

Dr. Marcel Grauer, Dr. Mario Majchrzak

Quantifizierung von ATP in Erythrozytenkonzentraten

ZUSAMMENFASSUNG Die Qualitätssicherung von Erythrozytenkonzentraten (EK) über ihre Haltbarkeit von bis zu 42 Tagen ist essenziell für die klinische Versorgung. Ein zentraler Funktionsparameter ist der intrazelluläre Adenosintriphosphat-(ATP)-Gehalt als Marker für metabolische Aktivität und strukturelle Integrität. Das Paul-Ehrlich-Institut (PEI) fordert ATP als verpflichtenden Vitalitätsparameter bei Zulassungsuntersuchungen. Der Wegfall des etablierten ATP-Hexokinase-Kits von DiaSys erfordert einen geeigneten Ersatz – besonders im Hinblick auf DEHP-freie Beutelsysteme. In Kooperation mit Promega wurde ein luminometrischer ATP-Assay erfolgreich implementiert. Dieser Artikel beleuchtet die regulatorischen Anforderungen, die klinische Relevanz und praktische Aspekte bei der Einführung des neuen Verfahrens zur ATP-Bestimmung.

SUMMARY The quality assurance of erythrocyte concentrates (EC) over their shelf life of up to 42 days is essential for clinical care. A key functional parameter is the intracellular adenosine triphosphate (ATP) content as a marker for metabolic activity and structural integrity. The Paul Ehrlich Institute (PEI) requires ATP as a mandatory vitality parameter in approval tests. The discontinuation of the established ATP hexokinase kit from Diasys requires a suitable replacement – especially with regard to DEHP-free bag systems. In cooperation with Promega, a luminometric ATP assay was successfully validated and implemented. This article highlights the regulatory requirements, clinical relevance, and practical aspects of introducing the new ATP determination method.

Hintergrund zur Umstellung auf DEHP-freie Systeme

Die EU-Verordnung (REACH) sieht vor, dass Medizinprodukte mit dem Weichmacher DEHP (Di(2-ethylhexyl)-phthalat) ab dem 30.06.2030 nicht mehr hergestellt oder in Verkehr gebracht werden dürfen¹. Dies betrifft insbesondere Blutbeutel- und Apheresesysteme, die bei der Herstellung und Lagerung von Blutkomponenten wie Erythrozytenkonzentraten (EK) oder Stammzellpräparaten verwendet werden.

Auswirkungen auf die Herstellung und Zulassung von EK

Die Umstellung auf DEHP-freie Systeme hat direkte Auswirkungen auf die Herstellungsprozesse und damit auch

auf die Zulassungsanforderungen für Erythrozytenkonzentrate (EK) als Arzneimittel:

- Validierungspflicht: Jede Änderung am verwendeten System (z. B. neuer Beuteltyp) erfordert eine Validierung durch die herstellende Einrichtung. Dies betrifft sowohl die Kompatibilität mit dem Herstellungsprozess als auch die Auswirkungen auf die Produktqualität.
- Zulassungsrelevanz: Da EK in Deutschland als Arzneimittel gelten, unterliegen sie der Zulassungspflicht durch das Paul-Ehrlich-Institut (PEI). Änderungen am Herstellungsprozess – wie der Wechsel auf DEHP-freie Systeme – machen Änderungsanzeigen oder Neuzulassungen erforderlich.

Für die antragstellenden Blutspendedienste oder herstellenden transfusionsmedizinischen Einrichtungen er-

Weichmacherwechsel bei	Benötigte Daten aus Validierung und/oder Qualitätskontrolle (QK)	Risikobewertung durch Antragsteller
Entnahme- und Prozessierungssets (Apheresesets, Vollblut-Entnahmesets) mit Änderung des Lagerbeutels, WM-Wechsel bei Babybeuteln	Komplette QK- und Haltbarkeitsdaten inkl. Funktionsdaten (mit ATP-, K+-, Hämolyserate) zusätzlich Sechs-Monats-Daten	erforderlich

Tabelle 1: Spezifische Anforderungen bei Erythrozytenkonzentraten (auch bestrahlt, kryokonserviert)

geben sich im Zuge des Wechsels des Weichmachers in Blutbeutelssystemen – wie auch bei der Herstellung von Erythrozytenkonzentraten – spezifische regulatorische und qualitätsbezogene Anforderungen, die im Rahmen der Zulassung und Validierung zwingend zu erfüllen sind und bedürfen einer zustimmungspflichtigen Änderungsanzeige (**Tabelle 1**)².

Das Paul-Ehrlich-Institut (PEI), als zuständige Bundesoberbehörde bewertet und überprüft die Qualität, Wirksamkeit und Unbedenklichkeit der Blutpräparate³. Im Rahmen von Zulassungsverfahren von Erythrozytenkonzentraten sind daher Daten zur Qualität und Haltbarkeit vorzulegen. Die umfassenden Stabilitätsdaten sind unter anderem erforderlich, die Vitalität der Erythrozyten über den gesamten vorgesehenen Lagerzeitraum zu belegen. Neben den Standard-Qualitätskontrollparametern bei EK sind ein zentraler Bestandteil dieser Haltbarkeitsstudien die Quantifizierung von Kalium und des intrazellulären Adenosintriphosphats (ATP)⁴. ATP ist ein essenzieller Marker, da es als Indikator für die metabolische Aktivität und Integrität der Zellmembran dient. Ein signifikanter Abfall des ATP-Gehalts während der Lagerung kann auf eine eingeschränkte Funktionalität der Erythrozyten hinweisen, was die Transfusionseffektivität beeinträchtigen könnte. Im Rahmen der Einreichung von Zulassungs- oder Änderungsanträgen sind ATP-Daten in standardisierten Tabellenformaten zu dokumentieren. Diese umfassen typischerweise Messzeitpunkte zu Beginn, in der Mitte und am Ende der Lagerzeit (z. B. Tag 1, 21, 35, 42). Zusätzlich sind die vollständige Methodenbeschreibung, Validierungsberichte sowie ggf. Vergleichsdaten mit der bisherigen Methode beizufügen.

ATP als Vitalitätsparameter – Klinische Relevanz

Adenosintriphosphat (ATP) ist für Erythrozyten von zentraler Bedeutung, da es als primäre Energiequelle nahezu alle energieabhängigen zellulären Prozesse ermöglicht.

Die Energiegewinnung in Erythrozyten erfolgt hauptsächlich über die anaerobe Glykolyse, in der Glukose bis Laktat abgebaut wird und insgesamt zwei Moleküle ATP pro Glukose-Einheit liefert. Über die Rolle als Energielieferant hinaus übernimmt ATP in Erythrozyten eine Vielzahl essenzieller Funktionen, die deren strukturelle Integrität und physiologische Leistungsfähigkeit maßgeblich beeinflussen. Diese Aspekte gewinnen insbesondere im transfusionsmedizinischen Kontext an Bedeutung, da der ATP-Gehalt zu einem wichtigen Qualitätsindikator für

Messzeitpunkt	Parameter	Einheit
Messung direkt nach der Herstellung	Leukozyten	/µl x 10 ⁶ /Einheit
	Thrombozyten	/µl x 10 ⁹ /Einheit
	Volumen	ml
	Hämatokrit	l/l
Messung direkt nach Herstellung und im Abstand von max. zehn Tagen bis zum Ende der Haltbarkeit	Gesamt Hb	g/l g/Einheit
	freies Hb	mg/ml g/Einheit
	Hämolyserate	%
	ATP	µmol/l µmol/gHb
	freies Kalium	mmol/l

Tabelle 2: Validierungsparameter zu Qualität und Haltbarkeit von Erythrozytenkonzentraten (für Zulassung, Änderung im Herstellungsverfahren)

Aspekt	ATP-Funktion	Klinische Relevanz (bei EK)
Zellfunktion & Homöostase	ATP ist essenziell für die Aufrechterhaltung des ionischen Gradienten (Na^+ , K^+ , sowie Mg^{2+} , Ca^{2+}), der Zellmorphologie und der Membranstabilität durch Bereitstellung metabolischer Energie für Ionenpumpen	Ein erhöhter ATP-Gehalt reduziert lagerungsinduzierte Zellschäden und minimiert das Risiko der Hämolyse
Membranintegrität	Unterstützt die strukturelle Integrität der Erythrozytenmembran und inhibiert die Bildung von Mikrovesikeln	Stabilität der Zellmembran begünstigt die posttransfusionelle Überlebensdauer und reduziert inflammatorische Reaktionen
Verformbarkeit & Mikrozirkulation	ATP ermöglicht die zytoskelettabhängige Deformierbarkeit, wodurch die Passage durch enge Kapillaren erleichtert wird	Optimierte Gewebeoxygenierung nach Transfusion durch erhöhte zirkulatorische Effektivität transfundierter Erythrozyten
Seneszenzprozesse	ATP trägt zur Vermeidung vorzeitiger eryptotischer Prozesse bei und verlängert die Lebensspanne zirkulierender Erythrozyten	Verlängerte Persistenz der transfundierten Erythrozyten im Empfängerkreislauf, was die Effektivität der Transfusion erhöht

Tabelle 3: ATP-Gehalt in Erythrozyten, Funktion und klinische Relevanz

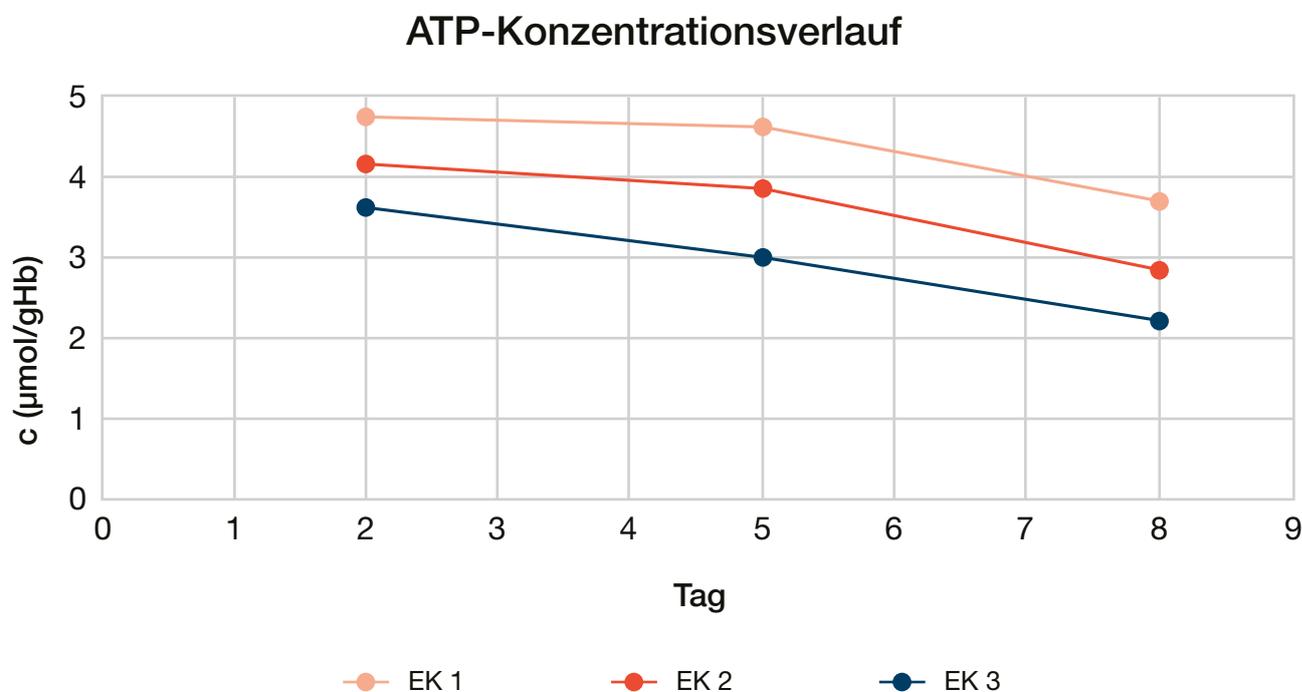


Abbildung 1: ATP-Konzentrationsverlauf von drei kryokonservierten Erythrozytenkonzentraten über einen Zeitraum von acht Tagen

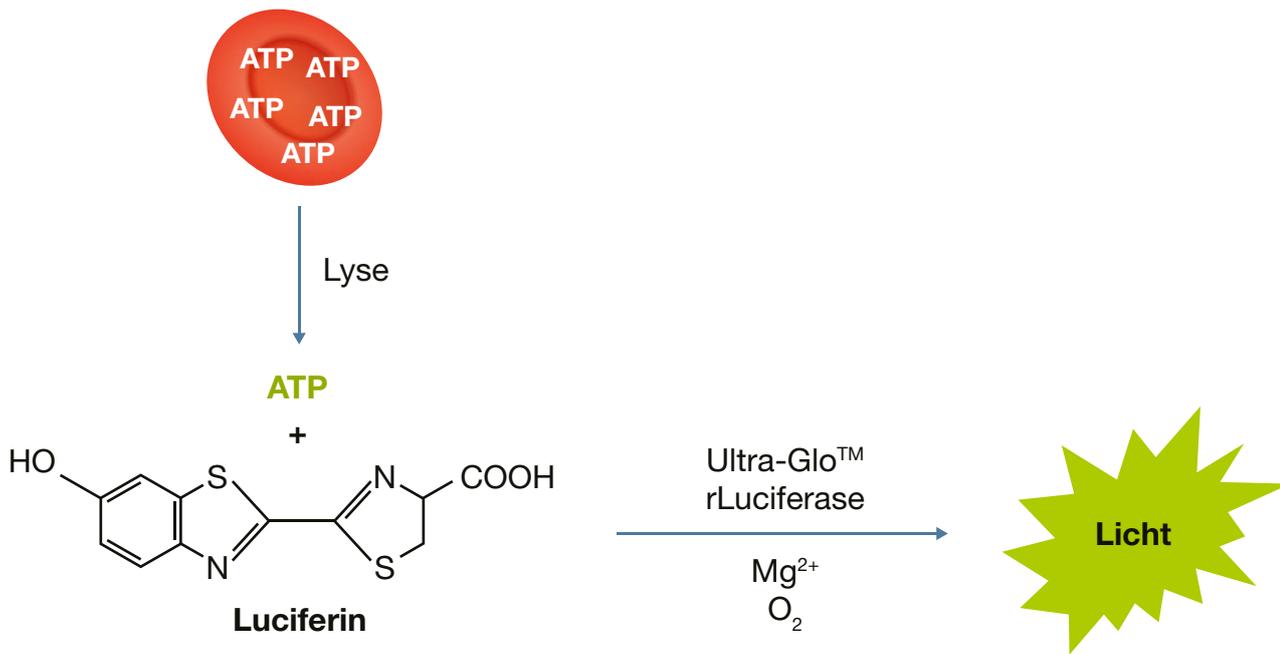


Abbildung 2: Schematische Darstellung der luciferasebasierten Biolumineszenzreaktion⁹

gelagerte Erythrozytenkonzentrate gilt. Es besteht eine deutliche Korrelation zwischen dem intrazellulären ATP-Gehalt und der posttransfusionellen Überlebensfähigkeit der Erythrozyten (**Tabelle 3**)⁵⁻⁷.

Insgesamt zeigt sich, dass ATP nicht nur als Energiespeicher, sondern auch als funktioneller Marker für die Qualität und Überlebensfähigkeit von Erythrozyten dient. Sein Erhalt ist eine entscheidende Voraussetzung für die Effektivität von Blutkonserven in der klinischen Anwendung. In Kombination mit anderen Parametern wie Hämolyse, 2,3-Bisphosphoglycerat (2,3-BPG) und extrazellulärem Kalium kann ATP helfen, die Lagerqualität von Erythrozytenkonzentraten umfassend zu beurteilen und gegebenenfalls Lagerzeiten anzupassen. Der ATP-Gehalt sinkt mit zunehmender Lagerungszeit, laut Literatur enthalten frische Zellen eine ATP-Konzentration von 3 bis 5 $\mu\text{mol ATP/gHb}$ ⁸. Konzentrationen unterhalb von 1,5 $\mu\text{mol/gHb}$ gelten als kritisch, da sie mit einer deutlich reduzierten Überlebensfähigkeit der Erythrozyten assoziiert sind. Diese Anfangswerte der ATP-Konzentration spiegeln sich auch in aktuellen Studien wider, wie am Beispiel von drei kryokonservierten Erythrozytenkonzentraten demonstriert wird (**Abbildung 1**). Die Daten wurden an drei Zeitpunkten (Tag 2, 5 und 8) nach dem Auftauen der EK erhoben. Die ATP-Konzentration wurde mit einem alternativen bioluminometrischen Assay ermittelt.

Anwendung eines bioluminometrischen Assays zur Bestimmung des ATP-Gehalts

Hintergrund

Die Einstellung der Produktion des bislang von vielen Blutspendediensten etablierten Hexokinase-basierten ATP-Testkits „ATP Hexokinase FS“ durch den Hersteller DiaSys stellt aktuell viele transfusionsmedizinische Einrichtungen vor die Herausforderung, eine gleichwertige und regulatorisch akzeptierte Alternative zu etablieren. Parallel werden unterschiedliche Konzepte der Blutspendedienste verfolgt. Der DRK-Blutspendedienst West hat den Fokus auf einen biolumineszenzbasierten Ansatz zur Quantifizierung von ATP in Erythrozytenkonzentraten gelegt. In Zusammenarbeit mit der Firma Promega wurde auf Basis des bestehenden CellTiter-Glo® 2.0 Cell Viability-Assays eine Methode zur Untersuchung von Erythrozytenkonzentraten etabliert. Seit der erfolgreichen Validierung findet die Methode Anwendung in der Qualitätskontrolle. Das Verfahren zur ATP-Quantifizierung sowie dessen praktische Umsetzung werden im Folgenden vorgestellt. Ergänzend werden Vergleichsdaten zum Hexokinase-ATP-Assay von DiaSys präsentiert, um das Potenzial der Methode als leistungsfähige und praxistaugliche Alternative für den Einsatz in weiteren Blutspendediensten aufzuzeigen.

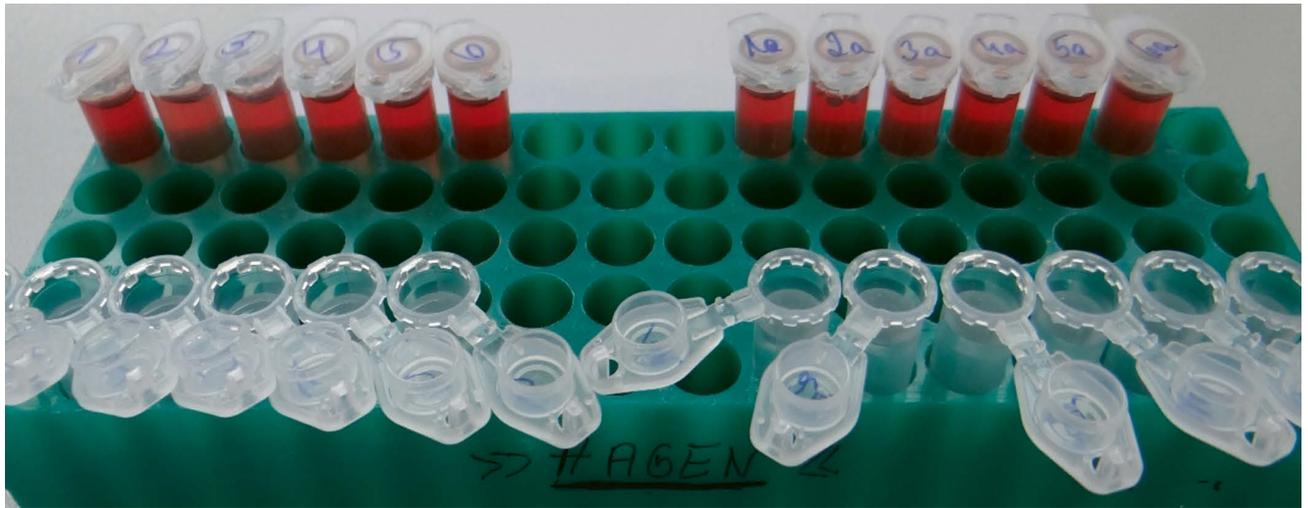


Abbildung 3: EK-Proben nach dem ersten Verdünnungsschritt 1:100 (oben) und nach dem zweiten Verdünnungsschritt 1:100 (unten)

Messprinzip

Der eingesetzte Assay basiert auf einer luciferasebasierten Biolumineszenzreaktion zur sensitiven und quantitativen Erfassung von intrazellulärem ATP. Die eigens von der Firma Promega thermostabile Ultra-Glo™-rLuciferase reagiert mit dem nach der Zellyse freigesetztem ATP (**Abbildung 2**)⁹. Die Monooxygenierung von Luciferin in Gegenwart von Mg²⁺, Sauerstoff und ATP resultiert in Emission von Licht in einer Wellenlänge im Bereich von 560–570 nm, dessen Intensität direkt proportional zur Menge an vorhandenem ATP ist.

Die vom Luminometer erfasste Lichtemission wird in relativen Lichteinheiten (RLU) gemessen. Durch die Auftra-

gung der RLU gegen bekannte ATP-Konzentrationen von Standards lässt sich der ATP-Gehalt in unbekanntem Proben zuverlässig quantifizieren.

Probenvorbereitung

Aufgrund der hohen Empfindlichkeit von Luminometern ist eine Verdünnung essenziell, um im linearen Bereich des Detektors aussagekräftige Ergebnisse zu erzielen. Optimale Resultate werden mit einem Verdünnungsfaktor von 10.000 erzielt (**Abbildung 3**). Dieser wird durch zwei aufeinanderfolgende 1:100-Verdünnungsschritte der zu analysierenden Erythrozytenkonzentrat-Proben mit destilliertem Wasser erreicht, wobei gleichzeitig eine vollständige Lyse der Erythrozyten erfolgt.

Durchführung der Messung und Auswertung

Für die Bestimmung des ATP-Gehalts der EK-Proben werden eigens verdünnte Standards und Kontrollen aus kommerziell erhältlichen ATP-Standards von Lonza und Merck verwendet. Insgesamt werden sechs Standards, zwei Kontrollen, die Anzahl der EK-Proben in Triplikaten und der Blank als Duplikat in die jeweiligen vorgesehenen Kavitäten einer weißen 96er Well-Mikrotiterplatte pipettiert. Pro Kavität werden 100 µl benötigt, im Anschluss erfolgt die Zugabe von jeweils 100 µl CellTiter-Glo® 2.0-Lösung (**Abbildung 4**).

Aufgrund des stabilen, „Glow-type“-Lumineszenzsignals können nach einer Wartezeit von zehn Minuten bis drei Stunden mit einem Mikroplatten-Luminometer die RLU der jeweiligen Kavitäten ermittelt und mithilfe eines Datenauswertungstools die ATP-Konzentrationen be-

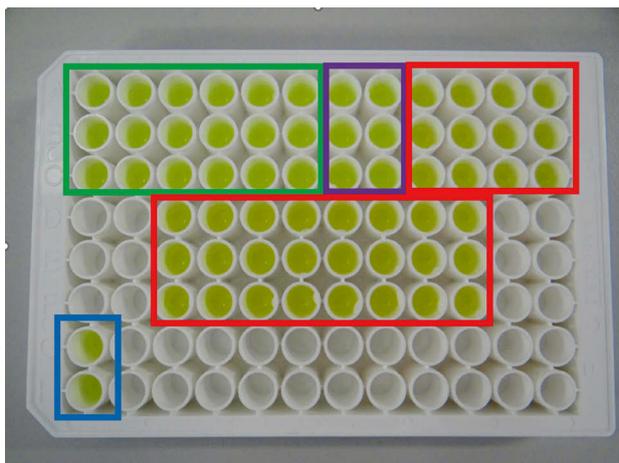


Abbildung 4: Darstellung des 96er Well-Mikroplattenlayouts für eine Messung von zwölf EK-Proben
(grün=Standards; lila=Kontrollen; rot=EK-Proben; blau=Blank)

ATP-Standardreihe

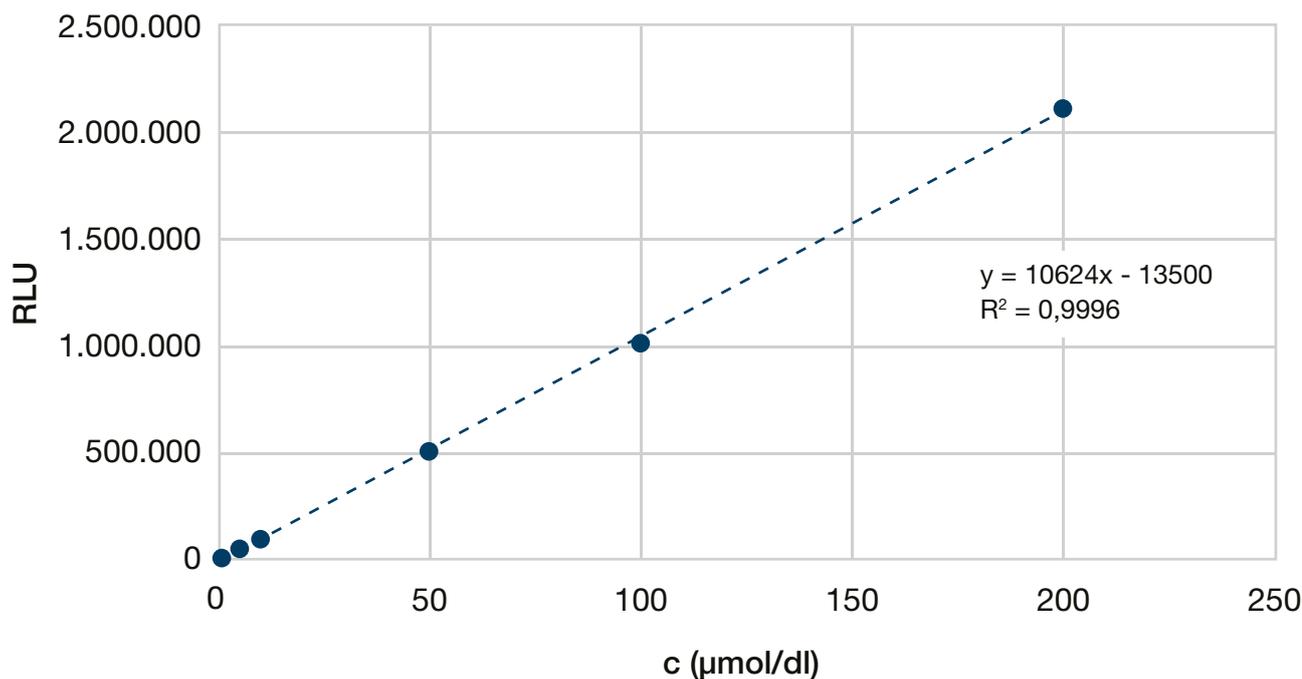


Abbildung 5: Standardkurve: Ermittelte RLU am Luminometer in Abhängigkeit von der ATP-Konzentration

Vergleich ATP-Konzentration Hexokinase FS vs. CellTiter-Glo® 2.0

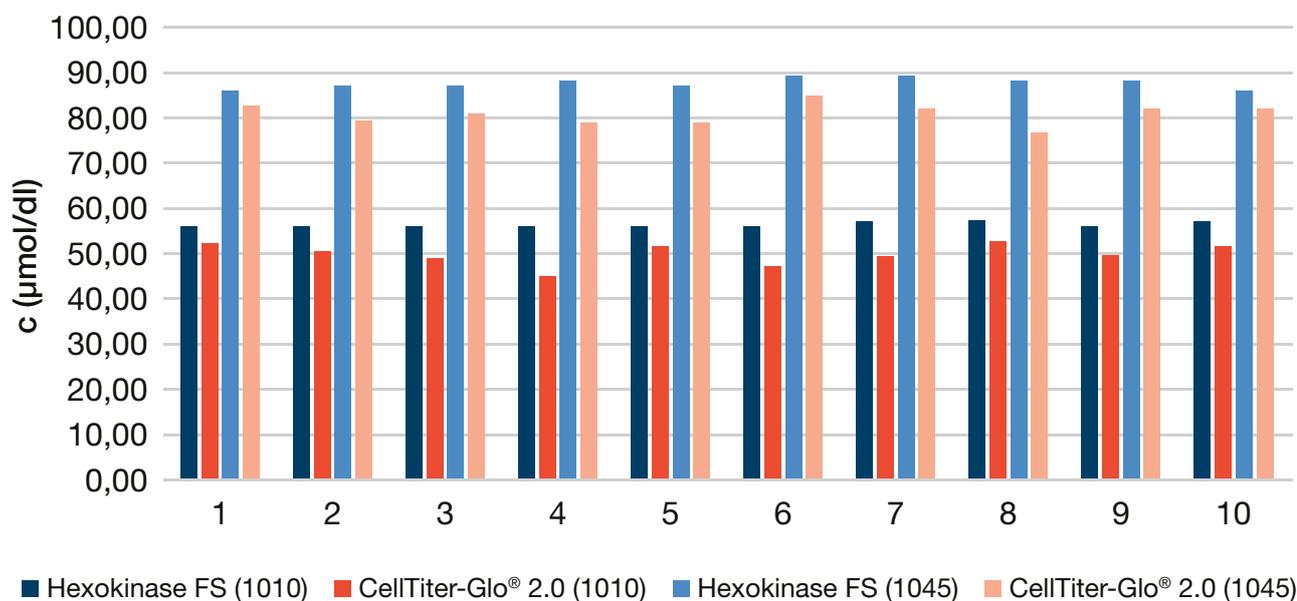


Abbildung 6: Gegenüberstellung der ermittelten ATP-Konzentrationen mit dem ATP Hexokinase FS-Assay (DiaSys) und CellTiter-Glo® 2.0 Cell Viability-Assay (Promega)

rechnet werden. Die bekannten ATP-Konzentrationen der ATP-Standards und die daraus resultierende lineare Regression (**Abbildung 5**) dienen als Grundlage für die Quantifizierung von ATP. In den bisherigen Untersuchungen wurden stets Korrelationskoeffizienten von >0.99 erzielt.

Vergleichsmessungen zum ATP Hexokinase FS-Assay von DiaSys

Im Zuge der Validierung wurden zur Überprüfung der Richtigkeit von einem leukozytendepletierten (1010) und einem zusätzlich bestrahltem EK (1045) jeweils von zehn Proben der ATP-Gehalt bestimmt. Die Messung mit dem Hexokinase FS vom Hersteller DiaSys erfolgte nach Fällung mit Trichloressigsäure photometrisch am Klinisch-chemischen Analyzer Indiko von Thermo Fisher Scientific. Nach Probenverdünnung und Herstellung der Standardreihe wurde der ATP-Gehalt nach Verwendung des CellTiter-Glo® 2.0 Cell Viability-Assays am Luminometer-Modus des GloMax Explorer von Promega bestimmt und die Daten verglichen (**Abbildung 6**).



Insgesamt bietet der CellTiter-Glo® 2.0-Assay eine leistungsstarke, zeiteffiziente und hochsensitive Methode zur ATP-Quantifizierung [...]

Die Ergebnisse zeigen, dass mit dem Hexokinase-Assay durchgängig geringfügig höhere ATP-Konzentrationen ermittelt wurden, die als Referenzwerte (100 %) herangezogen wurden. Der CellTiter-Glo® 2.0-Assay lieferte im Vergleich dazu leicht niedrigere, jedoch auch konsistente Werte. Die Wiederfindungsraten lagen bei 88,36 % für EK (1010) und 92,15 % für EK (1045), was auf eine gute Wiederfindung der Methode hinweist. Die zehnfachen Einzelmessungen pro Probe zeigten eine hohe Reproduzierbarkeit, was die Zuverlässigkeit beider Verfahren unterstreicht. Die Ergebnisse belegen, dass der CellTiter-Glo® 2.0-Assay trotz geringfügig niedrigerer Absolutwerte eine valide Alternative zur vormals etablierten Hexokinase-Methode darstellen kann – insbesondere im Hinblick auf Routineanwendungen oder methodische Umstellungen.

Fazit und Ausblick

Der CellTiter-Glo® 2.0-Assay überzeugte bisher durch eine Reihe praktischer Vorteile, die ihn besonders für den Einsatz in der Qualitätskontrolle attraktiv machen:

- Hohe Sensitivität, Messungen bis in den Nanomolarbereich möglich
- Einfaches Ein-Schritt-Protokoll ohne komplexe Reagenzienhandhabung
- „Add-Mix-Measure“: Simultane Zellyse und Signalentwicklung
- Messungen von bis zu 22 Proben (Triplikate) gleichzeitig möglich (96 Well-Mikrotiterplatte)
- Bis zu drei Stunden stabiles „Glow-type“-Lumineszenzsignal
- Verdünnte ATP-Standards sind eingefroren langzeitstabil (ca. fünf Monate)
- Keine Zellyse durch Proteinfällung mit TCA notwendig
- Kostengünstiges Reagenz mit einer Haltbarkeit von bis zu drei Jahren

Insgesamt bietet der CellTiter-Glo® 2.0-Assay eine leistungsstarke, zeiteffiziente und hochsensitive Methode zur ATP-Quantifizierung, die sich insbesondere für standardisierte Anwendungen in der Qualitätskontrolle hervorragend eignet.

Die Umstellung auf DEHP-freie Blutbeutelssysteme sowie der Wegfall des bislang eingesetzten Hexokinase-Tests – infolge der Produktionseinstellung durch den Hersteller – stellen Blutspendedienste vor neuen Herausforderungen. Der betreffende Funktionsparameter bleibt weiterhin verpflichtend im Rahmen der Zulassungsuntersuchungen, sodass valide Alternativen dringend erforderlich sind.

In diesem Zusammenhang hat sich der biolumineszenzmetrische ATP-Test von Promega aus Sicht des Blutspendedienstes West als praktikable und zuverlässige Methode erwiesen. Die vergleichbaren Ergebnisse zum bisherigen Verfahren, die einfache Handhabung und die gute Reproduzierbarkeit sprechen für seinen Einsatz im Rahmen von Validierungen und Routineuntersuchungen. Die Implementierung im Qualitätskontrolllabor ist mit überschaubarem Aufwand möglich.

Ein kooperativer Austausch zwischen den Blutspendediensten gewinnt angesichts dieser Entwicklungen zunehmend an Bedeutung. Sollte der ATP-Test oder eine alternative Methode bereits in anderen Einrichtungen Anwendung finden, wäre die Durchführung eines Ringversuchs zur Qualitätssicherung ein sinnvoller nächster Schritt. Ein solcher Vergleich könnte die Richtigkeit und Vergleichbarkeit der Messergebnisse absichern und zur Standardisierung der Methodik beitragen – ein wichtiger Aspekt für die zukünftige Anerkennung solcher Verfahren im Rahmen von Zulassungsuntersuchungen.

Zur weiteren Optimierung des ATP-Tests sind zusätzliche Untersuchungen geplant, insbesondere weitergehende Stabilitätsuntersuchungen zu den EK-Proben und den ATP-Standards. Diese Weiterentwicklungen sollen die Anwendungssicherheit weiter erhöhen, die Handhabung vereinfachen und die Grundlage für eine breitere Nutzung im transfusionsmedizinischen Umfeld schaffen. ■

Die Autoren



Dr. rer. nat. Marcel Grauer

Stellvertretender Abteilungsleiter der Qualitätskontrolle,
Zentrallabor Hagen, DRK-Blutspendedienst West
gemeinnützige GmbH
m.grauer@bsdwest.de



Dr. Mario Majchrzak

Stufenplanbeauftragter und Leiter der Qualitätskontrolle,
Zentrallabor Hagen, DRK-Blutspendedienst West
gemeinnützige GmbH
m.majchrzak@bsdwest.de



Hilfreiche Downloads und weitere Informationen zu diesem Beitrag finden Sie in der hämo-App, z. B.

-  Literaturhinweise
-  Weitere Beiträge zu diesem Thema
-  Weitere Infos zu den Autoren



Direkt zum Beitrag:

[www.drk-haemotherapie.de/
beitraege/45-atp](http://www.drk-haemotherapie.de/beitraege/45-atp)