

Aus dem Institut für Hämostaseologie und Transfusionsmedizin
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Rüdiger E. Scharf

Thromboxan B₂, sCD40L und Thrombopoetin als Marker für die Qualität von Thrombozytenkonzentraten

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

vorgelegt von
Anja Bärthel
2010

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf
Dekan

Referent: PD. Dr. med. Dr. rer. nat. Günther Giers

Korreferentin: PD. Dr. med. Dr. med. dent. Rita Depprich

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Thrombozyten und Gerinnung	1
1.1.1 Die Anatomie und Physiologie von Thrombozyten	1
1.1.2 Die Blutgerinnung	2
1.2 Thrombozytenkonzentrate	6
1.2.1 Indikationen zur Thrombozytentransfusion	6
1.2.2 Herstellung, Lagerung und Qualitätskontrolle von Thrombozytenkonzentraten	7
1.3 ‚platelet storage lesion‘	11
1.3.1 Definition von ‚platelet storage lesion‘	11
1.3.2 Verfahren zur Charakterisierung von ‚platelet storage lesion‘ und Qualität von Thrombozytenkonzentraten	13
1.4 Biochemie und Physiologie von Thromboxan, Thrombopoetin und sCD40L	16
1.4.1 Thromboxan	16
1.4.2 Löslicher CD40-Ligand	18
1.4.3 Thrombopoetin	20
1.5 Zielsetzung	23
2 Material und Methoden	24
2.1 Spender und Proben	24
2.2 Probengewinnung und Versuchsansätze	24
2.2.1 Probengewinnung aus Vollblut und aus Apheresepräparaten	24
2.2.2 Aktivierung und Bildung eines Thrombus durch Zusatz von Calcium-Lösung	27
2.2.3 Inkubation mit Thrombopoetin	27
2.3 Quantifizierung von Thromboxan B ₂ , sCD40L und Thrombopoetin	28
2.3.1 Das Prinzip des Radio-Immunoassay (RIA)	28
2.3.2 Das Prinzip des Enzym-linked-Immunoassay (ELISA)	29
2.4 Datenverarbeitung und statistische Auswertung	32
2.4.1 Deskriptive Statistik	32
2.4.2 Statistische Testverfahren	32
3 Ergebnisse	34
3.1 Die Konzentration von sCD40L, Thromboxan B ₂ und Thrombopoetin im Thrombozytapheresepräparat während Herstellung und Lagerung	34
3.1.1 Die Anreicherung von sCD40L im Thrombozytapheresepräparat	34
3.1.2 Die Anreicherung von Thromboxan B ₂ im Thrombozytapheresepräparat	38
3.1.3 Die Elimination von Thrombopoetin aus dem Thrombozytapheresepräparat	42
3.2 Aktivierungs- und Inkubationsversuche	44
3.2.1 Die Freisetzung von sCD40L bei Plättchenaktivierung und Bildung eines Thrombus	44
3.2.2 Die Sekretion von Thromboxan bei Plättchenaktivierung und Bildung eines Thrombus	47
3.2.3 Die Aufnahme von Thrombopoetin im Übersättigungsbereich	50

4 Diskussion	53
4.1 Vergleich des Spenderkollektivs mit Daten aus der Literatur.....	53
4.2 Hintergründe und Ursachen der Konzentrationsänderung von sCD40L, Thromboxan B ₂ und Thrombopoetin im Thrombozytapheresepräparat während der Herstellung und Lagerung.....	54
4.3 Die Auswirkung von Herstellung und Lagerung auf die Funktionalität von Plättchen im Thrombozytapheresepräparat.....	57
4.4 Die Bedeutung der Veränderungen für die klinische Qualität von Thrombozytapheresepräparaten.....	62
4.5 Die Eignung der Methoden zur Qualitätskontrolle von Thrombozytenpräparaten	64
5 Zusammenfassung	65
6 Anhang	I

1 Einleitung

1.1 Thrombozyten und Gerinnung

1.1.1 Die Anatomie und Physiologie von Thrombozyten

Mit einem mittleren Durchmesser von etwa zwei Mikrometern sind die kernlosen Thrombozyten die kleinsten zellulären Elemente des Blutes. Sie entstehen im Knochenmark unter der Einwirkung des Wachstumsfaktors Thrombopoetin (s. 1.4.3) als Abschnürung von Megakaryozyten. Die Thrombozytenzahl im peripheren Blut beträgt 150.000 bis 450.000 pro Mikroliter. Nach sieben bis zehn Tagen mittlerer Verweildauer im Blutkreislauf setzen Apoptosemechanismen ein [37], und die Plättchen werden im retikuloendothelialen System von Leber und Milz abgebaut. Plättchen besitzen zwar keinen Zellkern, verfügen aber über mRNA aus ihrer Megakaryozyten-Vorläuferzelle und sind somit eingeschränkt in der Lage, Proteine zu synthetisieren [59, 105].

Die thrombozytäre Zellmembran weist eine Vielzahl von Glykoproteinen (GP) auf, die als Oberflächenrezeptoren der Adhäsion an Matrixsubstanzen, Bindung löslicher Agonisten, sowie der Aggregation dienen. Dazu gehören GPIb, das die Bindung an den Von-Willebrand-Faktor (VWF) vermittelt, und GPIIb/IIIa, das als Fibrinogenrezeptor für die Thrombozytenaggregation relevant ist.

Die Plättchen speichern Granula, deren Inhaltsstoffe sie bei ihrer Aktivierung sezernieren. Lysosomale Granula enthalten hydrolytische Enzyme. α -Granula speichern aktivierende und aggregationsfördernde Substanzen wie Adenosindiphosphat (ADP) und Fibrinogen, Gerinnungsfaktoren, proinflammatorische und zytokin-ähnliche Proteine wie β -Thromboglobulin und Wachstumsfaktoren, und adhäsive Proteine wie den VWF. In der Membran der α -Granula befinden sich Rezeptoren, die bei Aktivierung der Thrombozyten an der Zelloberfläche exprimiert werden, zum Beispiel das Adhäsionsmolekül P-Selektin (CD62P). Elektronendichte Granula beinhalten vasokonstriktorisch wirkendes Serotonin, ADP und Calcium in hoher Konzentration.

Thrombozyten besitzen ein oberflächengebundenes Membransystem aus verzweigten Kanälen, das beim Gestaltwandel der Zelle evaginiert wird. So entsteht bei der Plättchenaktivierung eine enorm vergrößerte Oberfläche für die Sekretion der Inhaltsstoffe von Speichergranula. Ein geschlossenes, tubuläres Membransystem dient als Speicher für Calcium-Ionen. [31, 32, 50]

1.1.2 Die Blutgerinnung

Unter der Vielzahl von Faktoren und physiologischen Prozessen, die zum Stillstand einer Blutung führen, nimmt die Aktivierung zirkulierender Thrombozyten eine zentrale Rolle ein. Thrombozyten bewirken durch Adhäsion und Aggregation rasch die primäre Abdichtung eines Gefäßwanddefekts. Sie tragen zur Aktivierung der plasmatischen Gerinnung bei und bilden die Reaktionsoberfläche für deren Ablauf.

Die primäre Hämostase

Nach einer Endothelverletzung binden Thrombozyten über Oberflächenrezeptoren an Substanzen der freigelegten subendothelialen Matrix wie Kollagen, Laminin und Fibronectin. Der Glykoprotein (GP) Ib-V-IX-Komplex ist der wichtigste Adhäsionsrezeptor für den an Kollagen immobilisierten Von-Willebrand-Faktor, der eine molekulare Brücke zwischen Gefäßwand und Plättchen bildet. Bei niedrigen Scherkräften erfolgt über GPIa/IIa auch eine direkte Bindung der Thrombozyten an freigelegtes Kollagen.

Die Adhäsion induziert die Quervernetzung der tyrosinkinase-gekoppelten Adhäsionsrezeptoren und löst so den Ablauf intrazellulärer Signalkaskaden aus. Auch die direkte Wirkung löslicher Agonisten wie ADP, Thrombin und Thromboxan A₂ über G-Protein-gekoppelte Oberflächenrezeptoren und die Einwirkung hoher Scherkräfte auf Thrombozyten induzieren diese aktivierenden Signalwege. Die Folge sind die Phosphorylierung zellulärer Proteine und ein Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration durch Freisetzung freier Calcium-Ionen aus dem tubulären Membransystem der Plättchen. Calcium fungiert als wichtiger ‚second Messenger‘ bei der Plättchenaktivierung.

Die Thrombozytenaktivierung führt zum Gestaltwandel und zur Freisetzung der Inhaltsstoffe von Speichergranula und ermöglicht die Zellaggregation über Fibrinogenbrücken. Die Aktivierung von Thrombozyten geht mit Veränderung des Zytoskeletts einher. Es kommt zum Formwandel mit Ausbreitung und Pseudopodienbildung. Teile des oberflächengebundenen Membransystems werden evaginiert. Dies führt zu einer Oberflächenvergrößerung und vermehrter Expression von Oberflächenrezeptoren. Bei der Sekretion von Speichergranula durch aktivierte Thrombozyten verschmilzt die Membran der Granula mit der Plasmamembran des Plättchens. Rezeptoren in der Membran der Granula werden so an die

Plättchenoberfläche transloziert und vermehrt exprimiert, darunter GPIIb/IIIa und CD62P.

Der erhöhte intrazelluläre Calciumspiegel stimuliert auch die Synthese von Thromboxan (s. 1.4.1). Einige der aktivierungsabhängig freigesetzten Substanzen verstärken durch Bindung an membranständige Rezeptoren die Zellaktivierung und aktivieren parakrin weitere Thrombozyten.

Die Plättchenaktivierung verursacht eine Konformationsänderung des GPIIb/IIIa Rezeptors, die ihn für lösliches Fibrinogen und andere Adhäsionsproteine sterisch zugänglich macht. Die Bindung dieser Liganden ermöglicht die noch reversible Plättchenaggregation über Fibrinogenbrücken und die Blutstillung durch Bildung eines zunächst noch instabilen Thrombozytenaggregats. [19, 36]

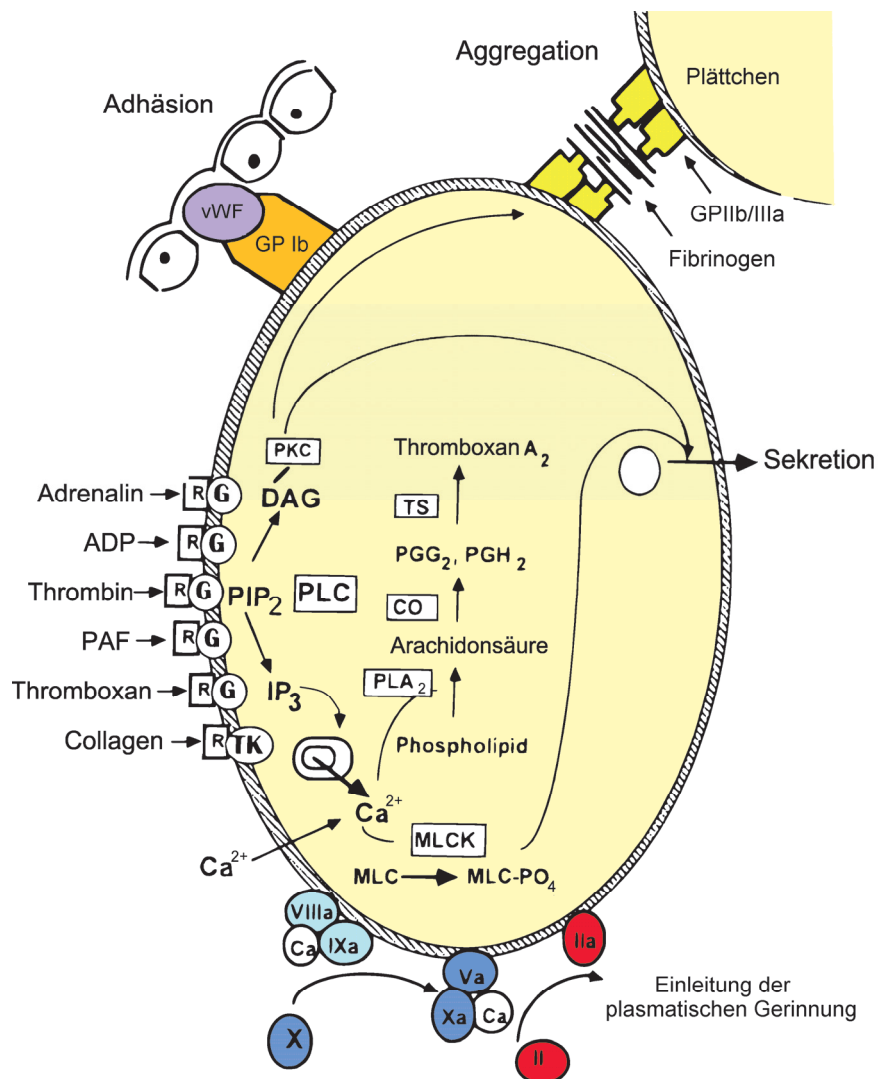


Abbildung 1: Thrombozytenadhäsion und -aggregation, verändert nach Colman et al. [19]

R: Rezeptor G: G-Protein TK: Tyrosinkinase
 PLC: Phospholipase C PKC: Proteinkinase C MLCK: Myosin-Leichtketten-Kinase
 PLA2: Phospholipase A2 CO: Zyklusoxigenase TS: Thromboxan-Synthetase

Durch enzymgetriebene Umverteilung in der Lipiddoppelschicht der Membran gelangen vermehrt anionische Phospholipide an die Oberfläche aktivierter Plättchen. Sie binden am Ort der Gefäßläsion calciumabhängig die Gerinnungsfaktoren II, VII, IX und X und bilden so die Reaktionsoberfläche für den Ablauf der plasmatischen Gerinnung.

Der in der primären Hämostase durch Zusammenlagerung von Thrombozyten entstandene Plättchenthrombus wäre bei nachlassender Vasokonstriktion instabil und wird durch den Ablauf der plasmatischen Gerinnung verfestigt. [19]

Die sekundäre Hämostase

Die plasmatische Gerinnung ist eine Kettenreaktion der sequentiellen Bildung aktiver Gerinnungsfaktoren aus inaktiven Proenzymen, die schließlich durch Polymerisierung löslichen Fibrinogens zur Bildung eines quervernetzten Fibringerinnsels führt. Sie wird klassisch in Aktivierungs-, Koagulations- und Retraktionsphase gegliedert [74].

Die Aktivierungsphase wird in das extrinsische und das intrinsische System unterteilt. Beide münden als gemeinsame Endstrecke in die Bildung des Prothrombinasekomplexes. Die Prothrombinase spaltet Prothrombin (Faktor II) zu Thrombin, das wiederum die Freisetzung von Fibrin aus Fibrinogen (Faktor I) vermittelt. Bei einer Gefäßverletzung gelangt Plasma in Kontakt mit freigelegten subendothelialen Zellen, die konstitutiv den ‚tissue-factor‘ (Faktor III) exprimieren. Faktor VII wird durch Bindung an den ‚tissue-factor‘ aktiviert. Der entstandene Komplex aus Faktor III und aktiviertem Faktor VII (Faktor VIIa), auch als extrinsische Tenase bezeichnet, aktiviert auf der Zelloberfläche die Gerinnungsfaktoren X und IX. Sogleich einsetzende Inhibitionsmechanismen führen dazu, dass nur wenig Faktor Xa entstehen kann. Auf der Oberfläche der ‚tissue-factor‘ tragenden Zelle wird so eine kleine Menge Thrombin gebildet. Die so entstandene Menge Thrombin vermag nicht genügend Fibrinogen zu Fibrin zu spalten, um ein stabiles Fibringerinnsel zu bilden, aktiviert aber Thrombozyten und amplifiziert durch Anstoß der intrinsischen Gerinnung auf der Oberfläche von Plättchen explosionsartig die Thrombinbildung. Das entstandene Thrombin setzt Faktor VIII, der im Plasma im Komplex mit VWF vorliegt, frei und aktiviert die Faktoren XI und V. Faktor XIa aktiviert dann Faktor IX. Der Komplex aus den Faktoren IXa und VIIIa bildet die intrinsische Tenase, die wiederum den Faktor X aktiviert. Der membran-assoziierte Prothrombinasekomplex aus Faktor Xa und Va generiert nun Mengen von Thrombin, die für die Gerinnung ausreichen.

Thrombin katalysiert in der Koagulationsphase die Spaltung von Fibrinogen zu Fibrinmonomeren, die anschließend durch nicht-kovalente Bindung polymerisieren. Es entsteht ein Fibrinnetz, das über GPIIb/IIIa mit den Thrombozyten verankert ist.

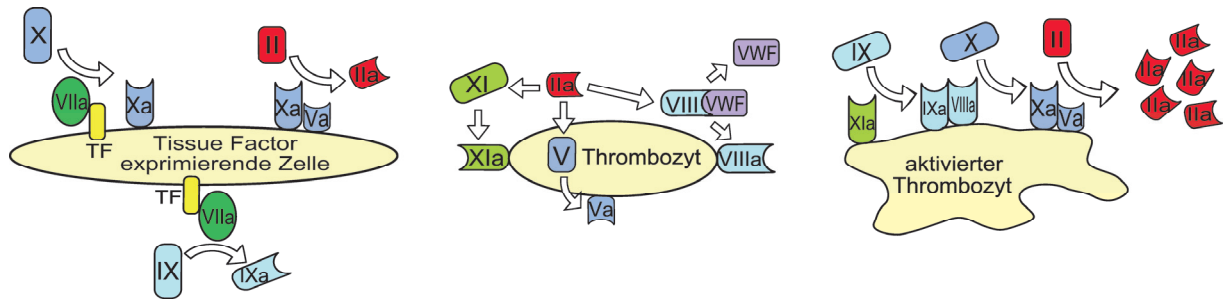


Abbildung 2: Die grundlegende Rolle von Thrombozyten bei der sekundären Hämostase nach Monroe et al. [73]. TF: 'tissue factor' (III), II: Thrombin

1. Die extrinsische Tenase aus VIIa und 'tissue-factor' aktiviert X und IX. Xa und Va bilden als Prothrombinase eine kleine Menge Thrombin (IIa) aus Prothrombin
2. Das entstandene Thrombin (IIa) amplifiziert die weitere Thrombinbildung, aktiviert Thrombozyten, setzt VIIIa frei und aktiviert XI und V.
3. XIa aktiviert IX. IXa bildet mit VIIa die intrinsische Tenase. Diese aktiviert X. Die Prothrombinase aus Xa und Va generiert Thrombinmengen, die für die Gerinnung ausreichen.

In der Retraktionsphase vermittelt Faktor VIIIa die kovalente Quervernetzung des Fibrinnetzes, das dann als unlösliches Polymer den Thrombus stabilisiert. Die GPIIb/IIIa-Fibrin-Komplexe sind mit dem kontraktilen Zytoskelett der Thrombozyten verbunden. Die Internalisierung der Fibrinfasern bewirkt eine Retraktion des Fibrinnetzes. [19, 31, 49, 73]

1.2 Thrombozytenkonzentrate

Die zentrale Rolle von Thrombozyten bei der Hämostase wird besonders bei Krankheiten, die mit einer erhöhten Blutungsneigung einhergehen und zu lebensbedrohlichen Blutungen führen können, deutlich.

Die Transfusion von Thrombozyten ist bei vielen Erkrankungen ein unverzichtbarer Therapiebestandteil. Der Bedarf an Thrombozytenkonzentraten wächst stetig, seit dem Jahre 2003 jährlich um ca 25.000 Einheiten. Im Jahr 2007 wurden in Deutschland 428.188 Thrombozytenkonzentrateneinheiten verbraucht. Bei mehr als der Hälfte davon handelte es sich um Thrombozytapheresepräparate. [40]

1.2.1 Indikationen zur Thrombozytentransfusion

Thrombozytenkonzentrate kommen zur Behandlung thrombozytopenischer Blutungen und zur Blutungsvorbeugung bei Thrombozytenbildungs-, -verteilungs- und -umsatzstörungen zum Einsatz.

Die meisten verordneten Thrombozytensubstitutionen dienen der Blutungsprophylaxe. Dabei ist die Indikation abhängig von der Thrombozytenzahl und -funktion, der Blutungssymptomatik, dem Blutungsrisiko (s. Tabelle 1) und der Grunderkrankung individuell zu stellen. Empfehlungen zum Einsatz von Thrombozytenkonzentraten basieren im Wesentlichen auf klinischer Erfahrung.

Tabelle 1: WHO Schweregradeinteilung der Blutung

Grad 1	kleinere Hämatome, Petechien, Zahnfleischbluten
Grad 2	kleinere Blutungen, die keine Transfusion von Erythrozytenkonzentraten erfordern
Grad 3	transfusionsbedürftige Blutung
Grad 4	organ- oder lebensbedrohliche Blutung

Die häufigste Indikation zur Plättchentransfusion ist die Thrombozytopenie bei primärer oder sekundärer Knochenmarksinsuffizienz, z.B. durch Knochenmarksdepression bei Leukämien, infolge aggressiver Zytostatikatherapie, oder nach Knochenmarkstransplantation. Starke Blutverluste oder Massivtransfusionen können eine Thrombozytensubstitution erfordern. Auch bei Thrombozytopathien kann der Thrombozytenersatz indiziert sein. Eine deutlich gesteigerte Blutungsneigung mit Gefahr einer Blutung ist bei hämostaseologisch stabilen Patienten ohne Risikofaktoren erst bei Thrombozytenzahlen unter 10.000 pro Mikroliter zu erwarten.

Bei einer Störung der plasmatischen Gerinnung, steilem Thrombozytenabfall oder Auftreten weiterer klinischer Zeichen wie Fieber und Infektion sollte bei Werten unter 20.000 pro Mikroliter eine prophylaktische Transfusion in Betracht gezogen werden. Eine schwere Blutung bei Thrombozytenzahlen unter 50.000 pro Mikroliter stellt eine zwingende Transfusionsindikation dar. Bei normaler Plättchenfunktion besteht bei einer Thrombozytenzahl über 50.000 pro Mikroliter kein erhöhtes Blutungsrisiko. Bei niedrigeren Werten sollten vor invasiven Eingriffen, abhängig von dem mit dem Eingriff einhergehenden Blutungsrisiko, eine Thrombozytentransfusion durchgeführt werden. Bei medikamenteninduzierten Immunthrombozytopenien und Autoimmunthrombozytopenien, sowie bei Sepsis und Verbrauchskoagulopathie ist eine Thrombozytensubstitution nur bei bedrohlichen Blutungen (WHO-Grad 4) angezeigt. Durch Transfusion einer therapeutischen Einheit wird, abhängig vom Blutvolumen, ein Anstieg der Thrombozytenzahl um ca. 30.000 Plättchen pro Mikroliter erreicht. [12, 61]

1.2.2 Herstellung, Lagerung und Qualitätskontrolle von Thrombozytenkonzentraten

Thrombozytenkonzentrate werden entweder aus Vollblutspenden oder durch maschinelle Thrombozytapherese hergestellt. In Deutschland werden mehr als die Hälfte der Konzentrate durch Apherese gewonnen [47].

Präparate aus Vollblutspenden entstehen aus Thrombozyten von vier bis sechs Einzelspenden der gleichen Blutgruppe. Sie werden entweder nach dem ‚PRP-Verfahren‘ aus plättchenreichem Plasma, oder aus dem ‚buffy-coat‘ hochtourig zentrifugierten Vollbluts, der 90 % der Thrombozyten enthält, gewonnen und zu einem Poolpräparat zusammengeführt. [22, 75]

Bei der Thrombozytapherese wird mithilfe eines Zellseparators eine Thrombozytenkonzentrateinheit mit mehr als 2×10^{11} Thrombozyten von einem einzigen Blutspender gewonnen. Dabei wird antikoaguliertes Vollblut des Spenders in einen extrakorporalen Kreislauf geleitet und durch Zentrifugation in seine einzelnen Bestandteile aufgetrennt. Das thrombozytenreiche Plasma wird gezielt entnommen, während alle anderen Blutbestandteile an den Spender retransfundiert werden. Zwei unterschiedliche Verfahren werden angewendet: das kontinuierliche Verfahren mit ständiger Entnahme und Retransfusion und das diskontinuierliche Verfahren, bei dem Zyklen der Entnahme- und Rückgabe von maximal 15 % des Blutvolumens des Spenders nacheinander ablaufen. [91]

Die Thrombozytapherese mit dem Haemonetics MCS+

In der Blutspendezentrale der Uniklinik Düsseldorf wird mit dem Haemonetics MCS+ (Mobile Collection System) eine diskontinuierliche Thrombozytapherese durchgeführt. Nach Punktion der Vena cubitalis wird dem Spender in mehreren Zyklen Vollblut entnommen und durch Zentrifugation in die einzelnen Bestandteile aufgetrennt. Die in Plasma resuspendierten Erythrozyten und Leukozyten werden dem Spender retransfundiert.



Abbildung 3: Haemonetics Mobile Collection System +

Um die Gerinnung des Blutes im extrakorporalen Kreislauf zu verhindern, wird dem entnommenen Vollblut unmittelbar hinter der Punktionsstelle das Antikoagulant ACD, eine Mischung aus Zitronensäure, Natriumcitrat und Dextrose, zugesetzt, das durch Komplexierung von Calcium-Ionen die Gerinnung verhindert. Die Separation des Vollbluts findet in der Lathamglocke (s. Abbildung 4) statt. Die Glocke rotiert mit einer Zentrifugationsgeschwindigkeit von 4800 Umdrehungen pro Minute. Antikoaguliertes Blut wird von oben über ein Rohr zum Glockenboden geleitet und fließt der Fliehkraft

folgend in die Separationskammer zwischen Glockenkern und Außenwand. Die Blutkomponenten ordnen sich entsprechend ihrer Dichte in vertikalen Schichten von außen nach innen an. Wenn die Glocke gefüllt ist, fließen aus den inneren Schichten plättchenarmes, gefolgt von plättchenreichem Plasma in die jeweiligen, getrennten Sammelbeutel ab. Ein am Dach der Glocke lokalisierter Optiksensord registriert den Übergang zwischen Plasma und Thrombozyten und steuert die Ventileinstellungen. Sobald der Sensor die Schicht aus Erythrozyten und Leukozyten erkennt, schließt das Spenderventil. Das zuvor gesammelte Plasma wird zurück in die rotierende Separationskammer geleitet und fließt durch die Zellschichten nach oben. Dabei zieht es weitere Thrombozyten mit sich, während Erythrozyten und Leukozyten zurückbleiben. Plasma und Thrombozyten werden in die entsprechenden Sammelbeutel geleitet. Diese Rezirkulation des Plasmas erhöht die Thrombozytenausbeute. Am Ende der Sammlung stoppt die Zentrifuge. Die Blutkomponenten in der Glocke mischen sich aufgrund der nachlassenden Zentrifugalkraft wieder miteinander und werden dem Spender gemeinsam mit Plasma aus dem Plasmabeutel retransfundiert. Die Dauer der Apherese und die Zahl der zur Gewinnung einer Thrombozyteneinheit benötigten Zyklen sind abhängig von Eigenschaften des Spenders, wie Thrombozytenzahl und Gewicht.

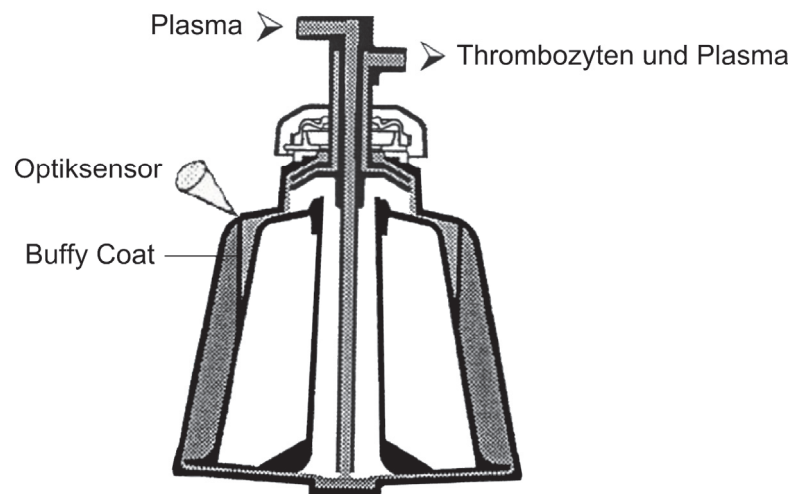


Abbildung 4: Latham Glocke während des Apheresevorgangs, Haemonetics Handbuch [33]
Die Blutkomponenten lagern sich in der rotierenden Glocke entsprechend ihrer Dichte an. Plättchenarmes und plättchenreiches Plasma verlassen nacheinander die Glocke und werden getrennt gesammelt. Das plättchenarme Plasma wird zurück zum Boden geleitet und reißt beim Rezirkulieren weitere Thrombozyten mit sich.

Die Fertigung der Thrombozytenpräparate bis zur Freigabe zur Transfusion

Nach der Zellseparation wird das Thrombozytenpräparat vom Entnahmesystem abgeschweift und ruht eine Stunde bei Raumtemperatur, um die Plättchenaktivierung zu mildern, und damit sich entstandene Plättchenaggregate lösen. Danach wird es über 30 Minuten im Thrombozytenlagerungsschrank unter Agitation bei 20°C gelagert. Anschließend wird der Thrombozytenlagerungsbeutel entlüftet. Zeitlich parallel wird Blut der Spender infektserologisch untersucht. Bei eindeutig negativen Ergebnissen wird das Präparat einige Stunden nach Beginn der Apherese zur Transfusion freigegeben. [33, 91]

Die Lagerung und Qualitätskontrolle von Thrombozytenkonzentraten

Nach ihrer Herstellung können Thrombozytenkonzentrate bei gleichförmiger Bewegung auf einem Flachbettagitator in ungeöffneten, sterilen, gasdurchlässigen Kunststoffbeuteln bei 20 bis 24°C bis zu fünf Tage lang zum Zweck der medizinischen Verwendung gelagert werden. In der Uniklinik Düsseldorf werden intern die meisten Präparate am ersten oder zweiten Tag der Lagerung transfundiert.

Jedes Thrombozytenkonzentrat muss während seiner Verarbeitung und vor der Verabreichung visuell auf die Unversehrtheit des Beutels, eventuelle Verklumpungen, Verfärbungen und das Swirling-Phänomen hin untersucht werden. [11]

Swirling bezeichnet die typische, durch Lichtbrechung bewegter, intakter Thrombozyten scheibenförmiger Morphologie entstehende Opaleszenz im Konzentrat. Beim Wandel zur kugelförmigen Gestalt verschwindet das Swirling [5]. Es ist ein einfaches und nicht-invasives, aber wenig sensitives Verfahren zum Nachweis von Schäden des Präparats. Verfärbungen weisen auf eine bakterielle Kontamination hin. Ein Prozent der hergestellten Thrombozytenkonzentrate muss monatlich auf die Qualitätskriterien der ‚Richtlinien zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten‘ der Bundesärztekammer hin geprüft werden [11]:

Tabelle 2: Qualitätskontrollen für leukozytendepletiertes Apherese-Thrombozytenkonzentrat, nach den ‚Richtlinien zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten‘ der Bundesärztekammer [11]

Prüfparameter	Prüfkriterium	Prüfzeitpunkt
Volumen	gemäß Zulassung	nach der Herstellung
Thrombozyten-	$> 2 \times 10^{11}$ /Einheit	nach der Herstellung und am Ende der Haltbarkeit
Resterythrozyten	$< 3 \times 10^9$ /Einheit	nach der Herstellung
Restleukozyten	$< 1 \times 10^6$ /Einheit	nach der Herstellung
pH-Wert bei 22°C	6,5–7,4	am Ende der Haltbarkeit
Sterilität	steril	am Ende der Haltbarkeit

1.3 ‚platelet storage lesion‘

1.3.1 Definition von ‚platelet storage lesion‘

Während der Herstellung und Lagerung von Thrombozytenkonzentraten treten morphologische Veränderungen und biochemische und funktionelle Einschränkungen der Plättchen auf. Auch die Lebensfähigkeit und Funktionalität der Thrombozyten nach der Transfusion im Empfängerorganismus nimmt im Laufe der Lagerung ab. Die multifaktoriell verursachten, von der Entnahme bis zur Transfusion an den Empfänger auftretenden, schadhafte Veränderungen der Plättchenstruktur und -funktion werden unter dem Begriff ‚platelet storage lesion‘ zusammengefasst. [42, 96, 97]

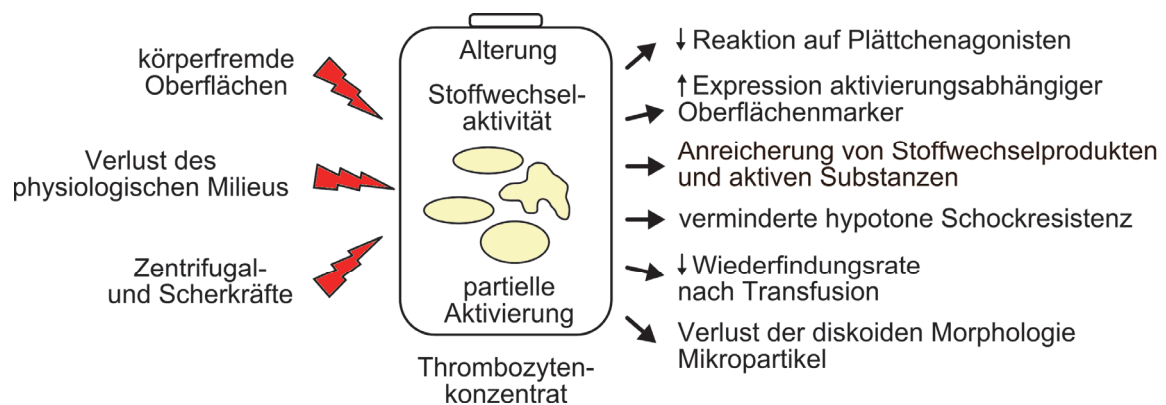


Abbildung 5: ‚platelet storage lesion‘: Einflüsse auf Thrombozyten während Apherese und Lagerung. Vorgänge im Präparat und messbare Veränderungen

Ursachen der Lagerungsschäden sind metabolische und aktivierungsbedingte Einflüsse auf die Thrombozyten und die Alterung der Plättchen [87]. Durch die Thrombozytapherese werden die Plättchen aus ihrer physiologischen Umgebung entnommen. Regulierende Einflüsse auf das Gerinnungssystem, wie beispielsweise die Wirkung des Endothels, entfallen. Während der Herstellung und Lagerung führen der Kontakt mit körperfremden Oberflächen, der dichte Zellkontakt und mechanische Einwirkungen wie Zentrifugal- und Scherkräfte und zu einer langsamen, partiellen Aktivierung der Plättchen. Ein zunehmender Anteil der Thrombozyten verliert die diskoidale Form. Im Laufe der Lagerung werden aktivierungsabhängige Oberflächenantigene wie CD62P und GPIIb/IIIa vermehrt exprimiert und es kommt zur Abspaltung von Mikrovesikeln. Mediatoren wie β -Thromboglobulin und Plättchenfaktor 4 reichern sich im Thrombozytenkonzentrat an. [52, 69, 96]

Thrombozyten sind bei 22°C stoffwechselaktiv. Durch die Anreicherung von Stoffwechselprodukten, wie CO₂ durch oxidativen Abbau und Laktat durch anaerobe Glykolyse, kann der pH-Wert im Präparat sinken. Fällt der pH-Wert unter 6,7, schwellen die Plättchen und verlieren ihre scheibchenförmige Gestalt. Bei einem pH-Wert unter 6,2 wird die Gestaltveränderung irreversibel, es kommt zu Agglutination und Lyse und die Thrombozyten verlieren ihre Funktionsfähigkeit [76]. Mit zunehmender Lagerungsdauer treten auch zunehmend apoptotische Veränderungen der Plättchen auf [65, 81].

Einige der im Rahmen der ‚platelet storage lesion‘ beobachteten schadhafte Veränderungen sind reversibel [89].

Als Lagerungsschaden im weiteren Sinne kann auch die Anreicherung von Zytokinen, Chemokinen und Wachstumsfaktoren im Präparat angesehen werden. Die Mediatoren können im Empfängerorganismus schadhafte Reaktionen auslösen. sCD40L (s. 1.4.2) in Plättchenkonzentraten gilt als eine Ursache von febrilen Transfusionsreaktionen und TRALI (Transfusion-related acute lung injury). [18]

Das Ausmaß der Entwicklung von Lagerungsschäden hängt auch von individuellen Voraussetzungen der Thrombozytenspende ab [30, 42].

1.3.2 Verfahren zur Charakterisierung von ‚platelet storage lesion‘ und Qualität von Thrombozytenkonzentraten

Die durch die Bundesärztekammer bei der stichprobenartigen Untersuchung von Thrombozytenkonzentraten vorgeschriebenen Prüfkriterien schließen Infektionen und Verunreinigungen der Präparate aus. Sie vermögen jedoch keine weitergehende Aussage über die Vitalität und In-vivo-Funktionalität der Plättchen zu treffen.

Die Suche nach adäquaten Verfahren zur Qualitätstestung ist Gegenstand aktueller Forschung und die Frage, welche In-vitro-Methode am besten geeignet ist, Aufschluss über die Qualität von Thrombozytenpräparaten zu geben, wird kontrovers diskutiert. Bislang existiert kein In-vitro-Test, der zuverlässig die Abschätzung der Qualität von Thrombozyten in vivo nach der Transfusion erlaubt und sich zudem für den routinemäßigen Einsatz zur Prüfung von Thrombozytenkonzentraten eignet.

Eine Vielzahl verschiedener biochemischer und funktioneller In-vitro-Untersuchungsmethoden wird zur Charakterisierung der ‚platelet storage lesion‘ herangezogen. Die verschiedenen in vitro untersuchten Eigenschaften und Funktionen der Thrombozyten stehen jedoch nur in einem indirekten Zusammenhang mit der hämostatischen Funktion und ihre Korrelation mit In-vivo-Verfahren ist gering.

Die begrenzte Vorhersagekraft der meisten In-vitro-Tests für den Transfusionserfolg und die Qualität der Plättchen in vivo hat ihre Ursache zum einen darin, dass viele der in vitro festgestellten Veränderungen nach Transfusion reversibel sind [13, 89]. Zum anderen sind die Eigenschaften der Plättchen in vivo nach Transfusion nicht nur von der Qualität des transfundierten Präparats, sondern auch vom Empfängerorganismus abhängig [43, 79, 87].

In-vivo-Tests werden bei der Zulassung neuer Verfahren oder Geräte eingesetzt. Sie sind aufwändig und invasiv und schließen sich daher für den Einsatz in der routinemäßigen Qualitätskontrolle aus.

In-vitro-Tests für die Qualität von Thrombozyten

Viele einzelne im Rahmen der ‚platelet storage lesion‘ auftretenden Veränderungen können in vitro erfasst werden und werden zur Bestimmung der Qualität von Plättchen herangezogen. In-vitro-Tests für die Plättchenqualität beurteilen Aspekte der Physiologie, Morphologie und Biochemie der Plättchen.

Sie umfassen die Auszählung von Plättchen veränderter Gestalt („morphology-score“), das Ausmaß des Formwandels als Reaktion auf Plättchenagonisten („shape change“), die hypotone Schockresistenz, das Swirling-Phänomen, die Bestimmung der Expression aktivierungsabhängiger Oberflächenmarker und die Messung metabolischer Indikatoren wie intrazellulärem ATP-Gehalt und pH-Wert und Konzentration von Sauerstoff, Kohlendioxid, Glucose und Laktat im Präparat [13, 42, 46].

Die Testung der hypotonen Schockresistenz beruht auf dem osmotischen Anschwellen von Blutplättchen nach Zugabe von reinem Wasser zu plättchenreichem Plasma. Thrombozyten, deren äußere Membran und Energiestoffwechsel intakt sind, sind in der Lage, das Wasser wieder abzugeben. Die Schwellung der Plättchen wird anhand veränderter Lichtbrechungseigenschaften photometrisch erfasst. [100]

Der „morphology-score“ ist ein subjektives und zeitaufwändiges Verfahren. Er wird durch mikroskopische Auszählung von Plättchen mit veränderter Form anhand eines Auswertungssystems ermittelt [62].

Ein Beispiel für die Untersuchung aktivierungsabhängiger Oberflächenmarker und der Sekretionsleistung der Plättchen ist die durchflusszytometrische Bestimmung der Expression von CD62P bei Stimulation mit Agonisten.

Die hier aufgeführten Untersuchungen metabolischer, morphologischer und funktioneller Parameter beschreiben allesamt eine Beeinträchtigung der Thrombozyten im Laufe der Lagerung.

In-vivo-Tests für die Qualität von Thrombozyten

Als In-vivo-Qualitätskriterien für Thrombozytenpräparate werden die Wiederfindungsrate nach Transfusion, die Überlebenszeit und die hämostatische Aktivität im Empfängerorganismus herangezogen.

Die Wiederfindungsrate transfundierter Plättchen hängt nicht nur von Einflüssen der Herstellung und Lagerung des Thrombozytenkonzentrats, sondern in bedeutendem Maße auch von spenderspezifischen Eigenschaften der Plättchen und Faktoren des Empfängerorganismus ab, die beide große interindividuelle Unterschiede aufweisen [4, 43, 87]. Die Wiederfindungsrate kann über den Anstieg der Plättchenzahl im Empfängerblut nach der Transfusion als „corrected count increment“ (CCI) oder durch Radiomarkierung der Plättchen mit anschließender Radioaktivitätsmessung erfasst werden [43]. Das CCI berechnet sich aus dem Anstieg der Plättchenzahl im

Empfängerblut, der Körperoberfläche des Empfängers und der Anzahl transfundierter Plättchen nach der folgenden Formel [42]:

$$CCI = \frac{\text{Anstieg der Thrombozytenzahl} \times \text{Körperoberfläche [m}^2] \times 10^{11}}{\text{Anzahl transfundierter Thrombozyten}}$$

Radiomarkierungsstudien erlauben eine Abschätzung der Wiederfindungsrate und der Überlebenszeit transfundierter Plättchen im Empfängerorganismus. Wie auch das CCI vermögen sie keine Aussage über die Funktion der Plättchen nach Transfusion zu treffen.

Verglichen mit der bei Transfusion frischer Plättchen erzielten Wiederfindungsrate zeigt sich bei Transfusion nach fünftägiger Lagerung sowohl bei Apherese- als auch bei Poolpräparaten eine Abnahme um 20-30 % [4, 42].

Bezüglich der Wiederfindungsrate bestehen große interindividuelle Unterschiede [30, 43]. Darin liegt ein Grund der schlechten Vorhersagekraft von In-vitro-Tests der Plättchenqualität für die Wiederfindungsrate in vivo.

1.4 Biochemie und Physiologie von Thromboxan, Thrombopoetin und sCD40L

1.4.1 Thromboxan

Thromboxan A_2 ist einer der stärksten Thrombozytenaktivatoren und potenziert als eigener Verstärker der Thrombozyten auto- und parakrin die Plättchenaktivierung. Das Eikosanoid wird aktivierungsabhängig über mehrere Schritte aus Arachidonsäure, die aus Membranphospholipiden freigesetzt wird, synthetisiert [27, 78].

Bei Stimulierung von Thrombozyten mit Kollagen oder Thrombin kommt es über zwei unterschiedliche Stoffwechselwege zur Freisetzung von ca. 20 % der gesamten in Membranphospholipiden der Zellmembran gebundenen Arachidonsäure. Der größte Teil der Arachidonsäure wird durch die Phospholipase A_2 hydrolytisch aus Phosphatidylcholin, Phosphatidylserin und Phosphatidylethanolamin freigesetzt. Außerdem spaltet die Phospholipase C Phosphatidylinositol zu IP_3 und Diazylglycerid. Die Diglyceridlipase setzt Diazylglycerid zu Arachidonsäure um (s. Abbildung 6).

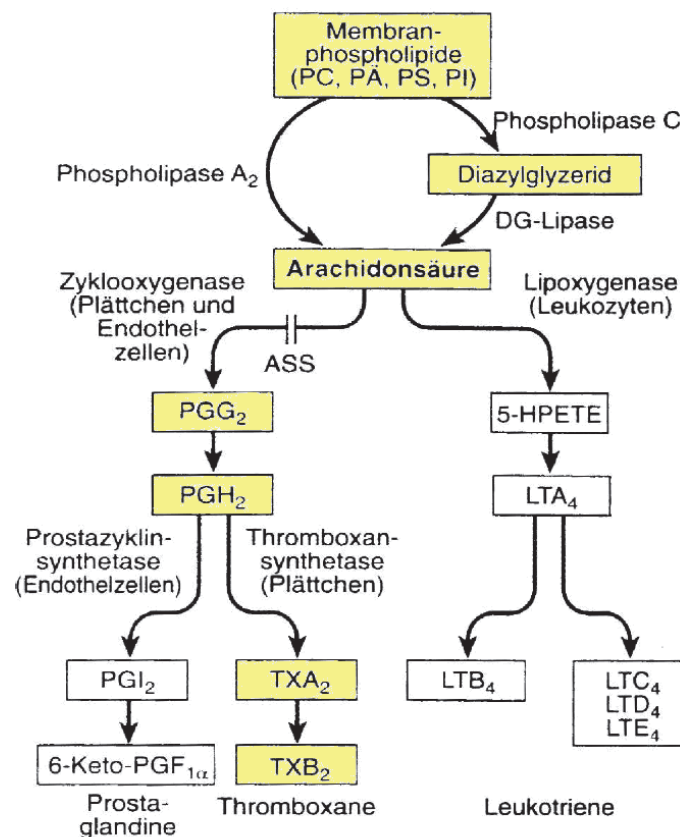


Abbildung 6: Der Arachidonsäurestoffwechsel, Scharf [92]

PC: Phosphatidylcholin

PÄ: Phosphatidyläthanolamin

PS: Phosphatidylserin

PI: Phosphatidylinositol

ASS: Acetylsalicylsäure

DG: Diazylglycerin

HPETE: Hydroperoxyeiketetraensäure

LT: Leukotrien

PG: Prostaglandin

TX: Thromboxan

Die Phospholipasen agieren calciumabhängig. In Thrombozyten und Endothelzellen wird Arachidonsäure durch die Zyklooxygenase zu den zyklischen Endoperoxiden Prostaglandin G_2 und H_2 umgesetzt. Die Zyklooxygenase kann durch Acetylsalicylsäure gehemmt werden [90]. Prostaglandin H_2 wird in Plättchen durch die Thromboxansynthase, die bei der Katalyse inaktiviert wird, zu Thromboxan A_2 umgewandelt [48]. In Endothelzellen entsteht aus Prostaglandin H_2 das antiaggregatorische Prostazyklin.

Eikosanoide werden nicht gespeichert. Als lipophile Substanzen diffundieren sie unmittelbar nach ihrer Synthese durch die Plasmamembran.

Thromboxan entfaltet seine Effekte über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren und weiter über Signalwege, wie den Anstieg des intrazellulären Calciums, Proteinphosphorylierung und Phosphoinositolhydrolyse. Es bewirkt die Aktivierung von Thrombozyten, die mit Gestaltwandel, Sekretion und Aggregation einhergeht.

Mit einer Halbwertszeit von nur 30 Sekunden hydrolysiert Thromboxan A_2 spontan zum inaktiven Thromboxan B_2 (TXB₂). [34, 98]

1.4.2 Löslicher CD40-Ligand

Der CD40-Ligand ist ein aus 261 Aminosäuren bestehendes, transmembranäres 33 kD Glykoprotein aus der Tumor-Nekrose-Faktor-Familie [94].

Der zugehörige CD40-Rezeptor wurde zuerst auf B-Lymphozyten beschrieben. Es folgte der Nachweis seines membrangebundenen Liganden CD40L auf aktivierten T-Lymphozyten. CD40 und CD40L werden von vielen verschiedenen Zelltypen exprimiert, darunter lymphatische Zellen, Endothelzellen, glatte Muskelzellen und Thrombozyten. Der Rezeptor und sein Ligand spielen eine zentrale Rolle bei der Vermittlung von Immun- und Entzündungsvorgängen. Die Ligandenbindung an den CD40-Rezeptor induziert wichtige immunologische Effekte wie die T-Zell-abhängige Aktivierung, Proliferation und Differenzierung von B-Zellen und den Immunglobulinklassenwechsel, die Reifung natürlicher Killerzellen und die Expression einer Fülle von für Immunreaktionen relevanten Zytokinen [93]. Über eine Integrin-Erkennungssequenz kann CD40L an den Fibrinogen-Rezeptor binden. Auf Thrombozyten exprimiertes CD40L wirkt thrombusstabilisierend [3].

Die lösliche Form sCD40L („soluble CD40-Ligand“) mit einer Masse von 15-18 kDa ist ein aktives Spaltprodukt des membrangebundenen Liganden. Einige chronisch entzündliche Erkrankungen, Autoimmunerkrankungen und Atherosklerose gehen mit einer erhöhten Konzentration von sCD40L im Serum einher. [21]

95 % des im Blut zirkulierenden löslichen CD40L stammen aus Thrombozyten [3]. Die Lokalisation im Plättchen ist vermutlich zytosolisch. Da CD40 wie CD62P bei der Plättchenaktivierung exprimiert wird, wurde zunächst angenommen, dass CD40L gemeinsam mit CD62P in α -Granula gespeichert wird [2]. Die Expression der beiden Marker wird über die gleichen intrazellulären Signale vermittelt, die Aktivierung der Phospholipase C und einen Anstieg des intrazellulären Calciums. Es zeigte sich aber, dass sich beide Substanzen in der Regulation ihrer Expression unterscheiden, da sie auf verschiedene Plättchenaktivatoren in unterschiedlichem Ausmaß reagierten, was an einer gemeinsamen Speicherung in α -Granula zweifeln ließ. Eine neuere Annahme, die sich auf immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchungen stützt, ist, dass sCD40L gelöst im Zytoplasma der Plättchen vorliegt. [41]

Bei der Plättchenaktivierung wird sCD40L an die Thrombozytenoberfläche transloziert. Der auf der Oberfläche exprimierte CD40-Ligand wird durch eine Metalloproteinase aus dem Blutplasma proteolytisch abgeschnitten und als sCD40L freigesetzt [85].

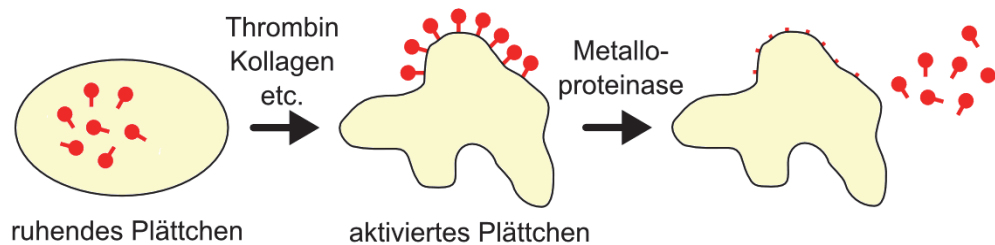


Abbildung 7: Die Expression und Abscherung von sCD40L nach Anand et al. [2].

CD40L liegt in unstimulierten Thrombozyten zunächst intrazellulär vor und wird bei Thrombozytenstimulierung durch ADP, Thrombin oder Kollagen an die Oberfläche transloziert. Der an der Oberfläche exprimierte Ligand wird als sCD40L losgelöst.

Sowohl die membrangebundene als auch die lösliche Form des CD40-Liganden sind biologisch aktiv [70]. sCD40L wird mit der Pathogenese von Transfusionszwischenfällen wie febrilen nicht-hämolytischen Transfusionsreaktionen, die mit Fieber, Schüttelfrost und Muskelrigidität einhergehen, und TRALI („transfusion related acute lung injury“) in Verbindung gebracht [6, 53, 73].

1.4.3 Thrombopoetin

Thrombopoetin (TPO) ist der wichtigste Wachstumsfaktor für die Proliferation und Ausreifung von Megakaryozyten und der Hauptregulator der Thrombozytopoese.

Der Begriff Thrombopoetin wurde schon 1958 für einen noch unbekannten Faktor, der bei Thrombozytopenie einen Anstieg der Plättchenzahl bewirkte, geprägt [56]. Erst der Entdeckung des für den Thrombopoetinrezeptor Mpl kodierenden Protoonkogens (Myeloproliferatives Leukämie-Virus-Onkogen, c-mpl) folgte 1994 die Charakterisierung und Isolation von TPO.

Thrombopoetin stimuliert nach Bindung an seinen Rezeptor synergistisch mit anderen Zytokinen die Proliferation von hämatopoetischen Stammzellen. Es regt die Proliferation und Reifung von Megakaryozyten an, bewirkt die Expression thrombozytenspezifischer Antigene und fördert die Abgabe von Thrombozyten in die Zirkulation. Darüber hinaus unterstützt TPO die Wirkung von Erythropoetin bei der Entwicklung von Erythrozytenvorläuferzellen. [53, 103]

Thrombopoetin ist ein Glykoprotein mit einer Masse von 60-70 kDa. Nach Abspaltung eines Signalpeptids besteht es aus 332 Aminosäuren. Der rezeptorbindende N-terminale Anteil zeigt eine Strukturähnlichkeit zu Erythropoetin. Der C-terminale Anteil besitzt viele glycosylierte Seitenketten und ist relevant für die Stabilität des Moleküls. [46, 90]

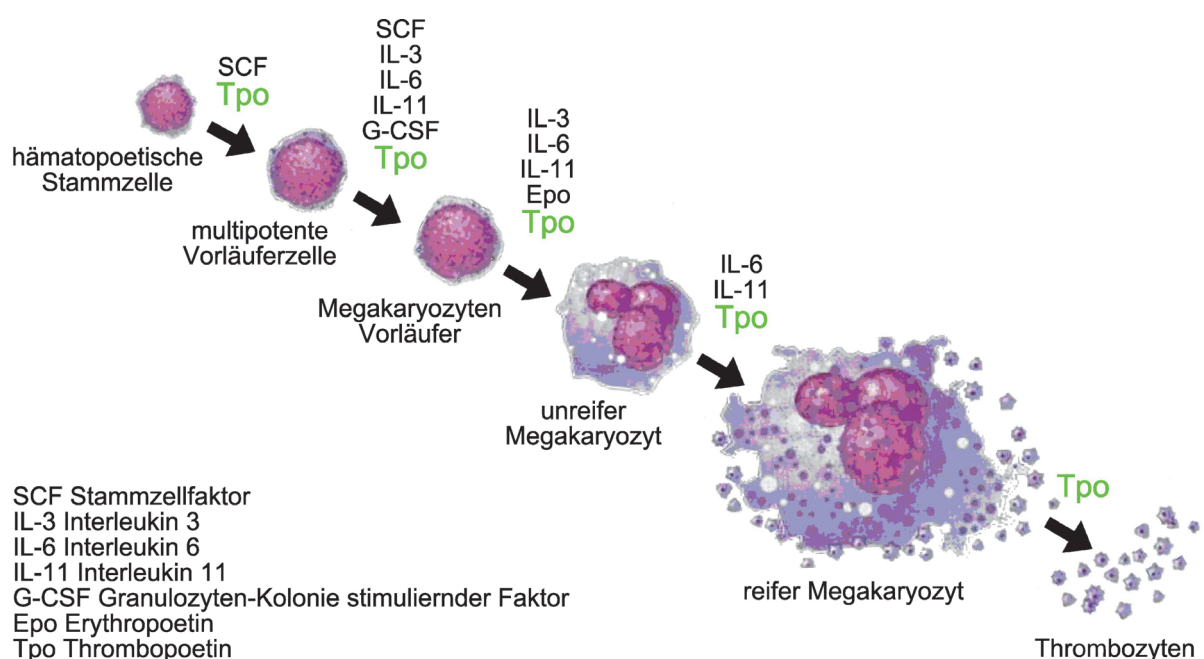


Abbildung 8: Der Einfluss von Thrombopoetin auf Megakaryozytopoese und Thrombozytopoese, verändert nach Kaushansky [53]

In unphysiologisch hohen Konzentrationen sensibilisiert Thrombopoetin Thrombozyten für aktivierende Einflüsse [1, 15].

Thrombopoetin wird hauptsächlich in Leberzellen gebildet. In geringerem Ausmaße wird es auch durch Nierentubuli-, Milz- und Knochenmarksstromazellen erzeugt. Hepatozyten und Nierenzellen produzieren Thrombopoetin weitgehend konstitutiv. Eine Ausnahme bildet die Aktivierung der hepatischen Thrombopoetinausschüttung durch den Entzündungsmediator Interleukin 6. Die Thrombopoetinproduktion im Knochenmark ist abhängig vom Thrombozytenbedarf. [54]

TPO entfaltet seine Wirkung über den Oberflächenrezeptor Mpl. Dieser hochaffine Zytokinrezeptor wird auf Thrombozyten und auf Megakaryozyten und ihren Vorläufern exprimiert. Die Zahl der Mpl-Rezeptoren eines Plättchen wird von durchschnittlich 30 ± 9 [10] bis 95 [26] angegeben. Beim Gesunden sind nur wenige Rezeptoren mit Thrombopoetin besetzt.

Der Thrombopoetin-Rezeptor ist an eine Januskinase gekoppelt. Die Ligandenbindung führt zur Rezeptordimerisierung und zur Phosphorylierung und damit Aktivierung der intrazellulären Kinase. Es folgt die Aktivierung weiterer Signalwege, die in Plättchen, Megakaryozyten und deren Vorläuferzellen unterschiedlich ablaufen [1]. Nach der Ligandenbindung wird der TPO-Rezeptor-Komplex internalisiert. Thrombopoetin wird aus der Zirkulation entfernt und abgebaut.

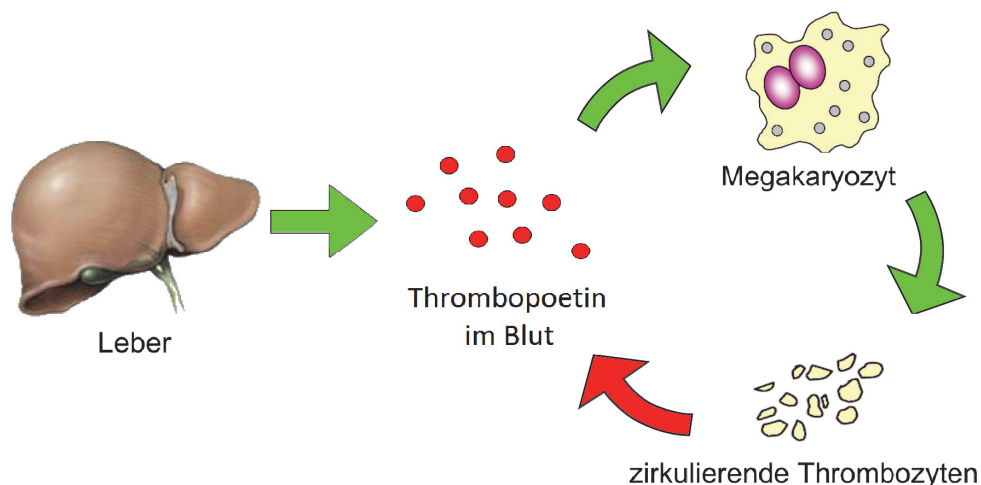


Abbildung 9: Der Regelkreis der Thrombozytopoese, nach Kaushansky [53]. Thrombopoetin wird konstitutiv in der Leber synthetisiert. Es stimuliert Zellen der Thrombozytopoese und wird durch Megakaryozyten und zirkulierende Thrombozyten eliminiert.

Die Internalisierung durch Thrombozyten und Zellen der Thrombozytopoese ist der einzige Weg, über den Thrombopoetin aus der Zirkulation entfernt wird. TPO ist im Blut mit einer Halbwertszeit von 18-24 Stunden stabil und wird weder durch andere Zellen, noch durch Plasmaproteasen abgebaut. Der Rezeptor wird nach seiner Internalisierung nicht wieder auf der Zelloberfläche exprimiert. [55, 63, 66]

Bei weitgehend konstanter Sekretion wird der Thrombopoetin-Spiegel im Blut durch die Zahl der zum TPO-Abbau fähigen Zellen bzw. ihrer bindungsfähigen Rezeptoren bestimmt. Zwischen Thrombozytenzahl und Thrombopoetinkonzentration im Blut besteht somit ein inverser Zusammenhang.

Beim gesunden Erwachsenen wurden mittlere Thrombopoetin-Plasmapiegel von 20 bis 240 pg/ml gemessen [28, 47]. Bei thrombozytopenen Zuständen wird durch die in geringerer Zahl vorliegenden Plättchen und Rezeptoren weniger TPO aus der Zirkulation entfernt. Der Thrombopoetinspiegel im Blut ist dadurch erhöht. Dies führt zu einer vermehrten Stimulation des Knochenmarks, das mit einer verstärkten Thrombozytopoese reagiert. Die vermehrt produzierten Plättchen internalisieren Thrombopoetin, der Thrombopoetin-Spiegel im Blut sinkt, und die Thrombopoeseaktivität des Knochenmarks nimmt konsekutiv ab. [54]

1.5 Zielsetzung

Nach den ‚Richtlinien zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten (Hämotherapie)‘ dürfen Thrombozytenkonzentrate nach ihrer Herstellung und Freigabe zur Transfusion bis zu fünf Tage lang gelagert und an Patienten transfundiert werden. Während der Herstellung und Lagerung treten Veränderungen und Beeinträchtigungen der Thrombozytenpräparate auf, die in ihrer Gesamtheit unter dem Begriff ‚platelet storage lesion‘ zusammengefasst werden.

In der Forschung und bei der Entwicklung neuer Verfahren zur Herstellung und Lagerung von Thrombozytenkonzentraten wird eine Reihe verschiedener biochemischer, morphologischer und funktioneller Tests zur Erfassung der Qualität von Thrombozytenkonzentraten eingesetzt. In der Routinetestung von Thrombozytenkonzentraten findet bisher kein funktioneller Test Anwendung.

In dieser Arbeit soll das Verhalten der Konzentrationen von sCD40L, Thromboxan B₂ und Thrombopoetin in Thrombozytapheresepräparaten im Laufe der Herstellung und Lagerung charakterisiert werden.

Die rein quantitative Messung der Substanzen wird durch funktionelle Tests mit den drei Substanzen ergänzt. Es wird untersucht, ob sich im Rahmen der Herstellung und Lagerung von Thrombozytapheresepräparaten Veränderungen in der exozytotisch-proteolytischen Freisetzung von sCD40L, der enzymatische Synthese und Sekretion von Thromboxan und der Aufnahme von Thrombopoetin manifestieren. Es soll herausgefunden werden, ob die drei getesteten Plättchenfunktionen im Laufe der Lagerung mit der ‚platelet storage lesion‘ vereinbare Einbußen aufweisen, und ob sich die Verfahren als neue Methoden zur Erfassung der Qualität von Thrombozytapheresepräparaten eignen.

2 Material und Methoden

2.1 Spender und Proben

Die Spender wurden zufällig aus dem Kollektiv der Thrombozytapheresespender der Blutspendezentrale der Universitätsklinik Düsseldorf ausgewählt. Alle waren gesunde Spender, die den Anforderungen der ‚Richtlinien zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten (Hämotherapie)‘ [11] entsprachen. Mindestens zehn Tage vor der Zellseparation sollten die Spender keine plättchenhemmenden Medikamente eingenommen haben. Die Spender wurden in einem Gespräch aufgeklärt und willigten in die Verwendung ihrer Proben ein.

2.2 Probengewinnung und Versuchsansätze

Vor der Spende wurde eine Probe aus Vollblut der Spender hergestellt. Weitere Proben wurden nach der Entlüftung des Thrombozyten-Lagerungsbeutels ungefähr 1,5 Stunden nach der Apherese, sowie nach Ablauf von 24, 72 und 120 Stunden Lagerungszeit aus dem Probenbeutel des Beutelsystems entnommen.

2.2.1 Probengewinnung aus Vollblut und aus Apheresepräparaten

Probengewinnung aus Vollblut

Unmittelbar vor der Thrombozytapheresespende wurde den Spendern Vollblut abgenommen. Nach Punktion der Vena cubitalis mit der am Einmalsystem vorkonnectierten Kanüle wurde Vollblut aus dem Spenderschlauchprobenbeutel (s. 3. in Abbildung 11) in Vacutainer-Citratröhrchen überführt. Das als Antikoagulanzen verwendete Citrat wurde dabei im Verhältnis von neun Teilen Blut zu einem Teil Natriumcitrat (0,11 mol/l) gemischt, wie es für gerinnungsphysiologische Untersuchungen gebräuchlich ist.

Die Proben wurden innerhalb von maximal zehn Minuten nach der Entnahme weiter verarbeitet. Durch zehnmütiges Zentrifugieren der Citratröhrchen bei 800 Umdrehungen (Zentrifuge: Hettich Rotixa/RP) wurde plättchenreiches Plasma (PRP) hergestellt. Zur Gewinnung von Plasma wurde das Vollblut über fünf Minuten bei 4000 Umdrehungen zentrifugiert.

Probengewinnung aus Apheresepräparaten

Die Thrombozytapherese wurde mit dem Haemonetics MCS+ Zellseparator (s. Abbildung 3) durchgeführt.

Beim Entlüften der Präparate ca. 1,5 Stunden nach der Apherese wurde ein Volumen von ungefähr fünf Millilitern in den Thrombozytenprodukt-Probenbeutel (s. Abbildung 11 und Abbildung 10) überführt. Der Probenbeutel wurde abgeschweißt und analog den Thrombozytenkonzentraten unter Agitation bei 22°C gelagert.



Abbildung 10: Thrombozytenprodukt-Probenbeutel

Beim Abschweißen des Probenbeutels vom Lagerungsbeutel wurde ein Stück des zuführenden Schlauches stehen gelassen.

Vor jeder Entnahme wurde das Präparat vorsichtig durchmischt. Zur Probenentnahme wurde der Schlauch mit einer sterilen Schere geöffnet und Thrombozytenkonzentrat bzw. Plasma daraus in ein Eppendorf-Röhrchen überführt. Bei der Probenentnahme aus dem Thrombozytenprodukt-Probenbeutel wurde darauf geachtet, eine artifizielle Thrombozytenaktivierung durch hohe Strömungsgeschwindigkeit und Turbulenzen möglichst zu vermeiden. Nach jeder Entnahme wurden die Probenbeutel wieder verschweißt.

Der Probenbeutel besteht wie der Lagerungsbeutel aus Polyolefin. Alle Probenbeutel zeigten zu jedem Zeitpunkt der Probenentnahme ein positives Swirling-Phänomen.

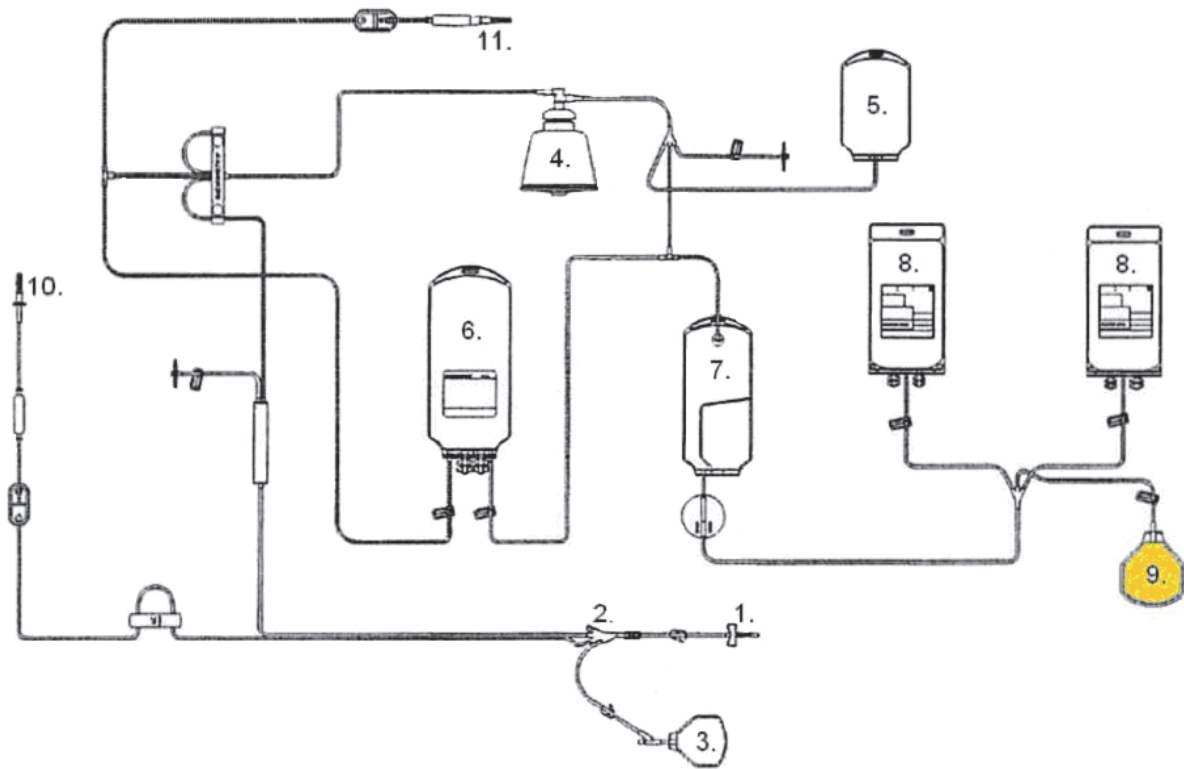


Abbildung 11: MCS+ Einmalset, Haemonetics Handbuch [33]

- | | |
|---|-------------------------------------|
| 1. Spendernadel | 7. Thrombozytenreservoirbeutel |
| 2. Nadelkonnektor und Injektionsanschluss | 8. Thrombozytenlagerungsbeutel |
| 3. Spenderschlauch-Probenbeutel | 9. Thrombozytenprodukt-Probenbeutel |
| 4. Lathamglocke | 10. Antikoagulan-Spike |
| 5. Luftauffangbeutel | 11. NaCl-Spike |
| 6. Plasmabeutel | |

Messung der Thrombozytenzahl und Verdünnung der Proben

Die Plättchenzahl jedes Thrombozytenpräparates wurde mit dem Zellzähler (Sysmex K-4500) bestimmt. Für die Aktivierungs- und Inkubationsversuche wurden die Proben aus dem Thrombozytenkonzentrat mit Plasma, das aus dem selben Präparat hergestellt wurde, auf die Plättchenkonzentration des vor Apherese aus Vollblut gewonnenen plättchenreichen Plasmas verdünnt. Diese Standardisierung gewährleistete ein gleiches Verhältnis von Thrombozyten zu zugesetztem Calcium bzw. Thrombopoetin und ermöglicht so einen Vergleich des Spenderbluts mit Proben aus den Thrombozytapheresepräparaten.

2.2.2 Aktivierung und Bildung eines Thrombus durch Zusatz von Calcium-Lösung

Um die Antikoagulation durch Citrat aufzuheben und den Ablauf der Gerinnung zu ermöglichen, wurde den Proben Calcium zugegeben.

900 μl Probenvolumen wurden in Eppendorf-Röhrchen mit 100 μl HEPES-NaOH-gepufferter 0,2 molarer Calciumchlorid-Lösung versetzt. Der Ansatz wurde geteilt. Eine Hälfte wurde als Referenz unverzüglich zentrifugiert und eingefroren. Die andere Hälfte wurde über drei Stunden im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Als Zeichen der abgelaufenen Gerinnung bildete sich ein makroskopisch sichtbarer Plättchenthrombus (s. Abbildung 12).

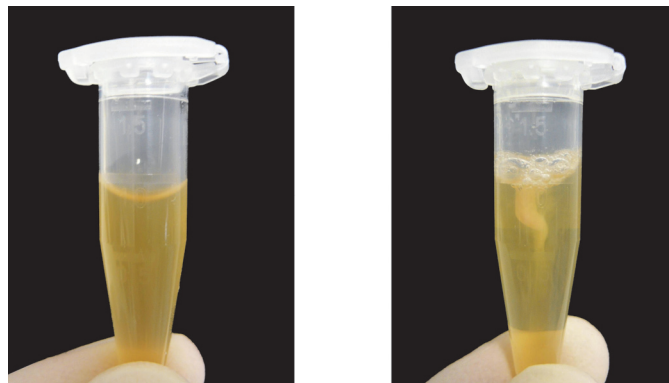


Abbildung 12: Nach Zugabe von Calcium-Lösung entstandener Plättchenthrombus. PRP im Eppendorf-Röhrchen vor (links) und nach (rechts) Inkubation mit Calciumchlorid-Lösung.

Die Proben wurden über fünf Minuten bei 4000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert und der Überstand anschließend in Eppendorf-Röhrchen pipettiert und bei -40°C tiefgefroren.

2.2.3 Inkubation mit Thrombopoetin

Die Proben wurden mit rekombinantem Thrombopoetin (Quantikine human TPO Immunoassay) auf eine Zielkonzentration von 600 pg/ μl aufgesättigt. Dies erfolgte durch Zusatz von 30 μl einer Lösung rekombinanten Thrombopoetins mit der Konzentration 20.000 pg/ μl zu 970 μl Probenvolumen in Eppendorf-Röhrchen. Die aufgesättigten Proben wurden geteilt. Die eine Hälfte wurde über fünf Stunden im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Die andere Hälfte diente als Referenz der Bestimmung der Ausgangskonzentration.

Alle Proben wurden über fünf Minuten bei 4000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert und schließlich der Überstand bei -40°C tiefgefroren.

2.3 Quantifizierung von Thromboxan B₂, sCD40L und Thrombopoetin

Zunächst wurden die Proben im Brutschrank bei 37°C über 30 Minuten aufgetaut und alle Reagenzien auf Raumtemperatur erwärmt.

2.3.1 Das Prinzip des Radio-Immunoassay (RIA)

Aufgrund der kurzen Halbwertszeit von Thromboxan A₂ wurde Thromboxan B₂, das stabile Produkt nichtenzymatischer Hydrolyse, gemessen. Die quantitative Bestimmung von Thromboxan B₂ wurde im Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie der Universität Düsseldorf mit einem Kohle-Einfachantikörper-Radioimmunoassay durchgeführt.

Das Prinzip der Messung basiert auf der Konkurrenz einer unbekannten Menge von Thromboxan B₂ in der Probe mit einer bekannten Menge von radioaktivem, mit Tritium markiertem Thromboxan B₂ ([³H] TXB₂) um die Bindung an einen spezifischen Antikörper.

Den Konzentrationsverhältnissen entsprechend stellt sich ein Dissoziationsgleichgewicht zwischen [³H] TXB₂ und aus der Probe stammendem Thromboxan B₂ ein. Nach 16 bis 20 Stunden Inkubationszeit wird freies Antigen durch Adsorption an Aktivkohle aus der Probe entfernt, während die Antigen-Antikörper-Komplexe im Überstand verbleiben.

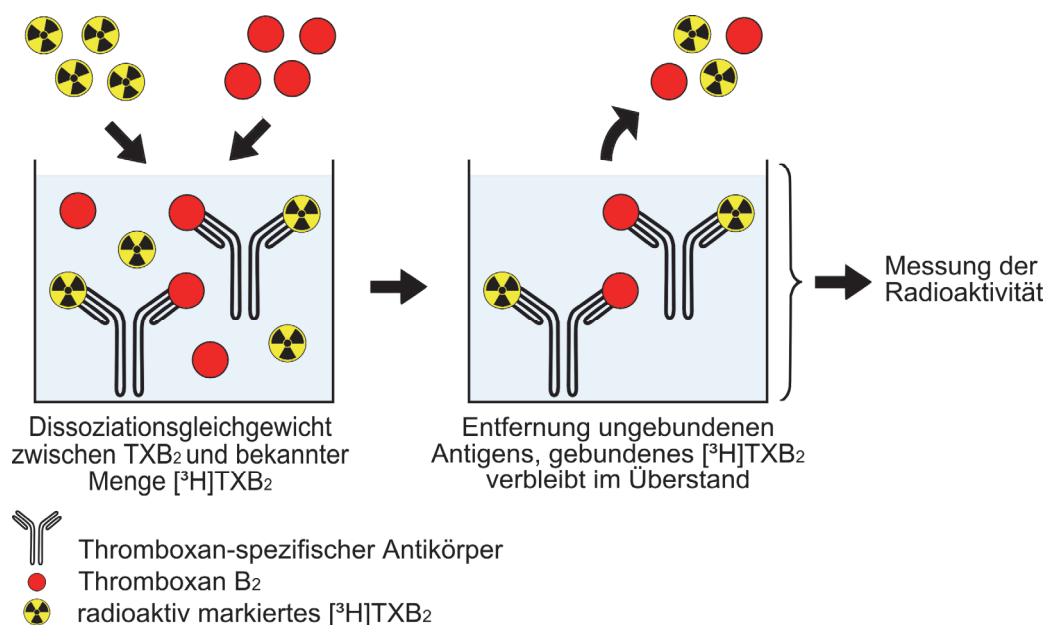


Abbildung 13: Das Prinzip des Radio-Immunoassay

Zur Messung der durch das antikörpergebundene [^3H] Thromboxan B₂ emittierten Radioaktivität wird der Überstand mit einer Szintillationslösung inkubiert und die Lichtimpulse im Szintillationszähler gezählt.

Aus der Zahl der Impulse wird anhand einer Eichkurve auf die Konzentration von Thromboxan B₂ in der untersuchten Probe geschlossen. Die Zahl der pro Minute erfassten Lichtimpulse ist dabei umgekehrt proportional zur Konzentration von Thromboxan B₂ in der Probe. Die Mess-Empfindlichkeitsgrenze lag bei 0,03 ng/ml.

2.3.2 Das Prinzip des Enzym-linked-Immunoassay (ELISA)

Die Konzentrationen von Thrombopoetin und sCD40L wurden mittels standardisierter Sandwich-ELISA-Testkits (Quantikine human TPO Immunoassay und Quantikine human soluble CD40 Ligand Immunoassay, R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA) bestimmt.

Das Verfahren basiert auf Antigen-Antikörper-Reaktionen. Die in der Probe enthaltene zu bestimmende Substanz bindet an einen auf der Polystyrol-Mikrotiterplatte fixierten substanzspezifischen, beim TPO-Assay monoklonalen, beim sCD40L-Assay polyklonalen, Antikörper. Nach Inkubation und Waschen der Platte wird ein zweiter, an das Enzym Meerrettich-Peroxidase gekoppelter, polyklonaler Antikörper dazu pipettiert, der sich den zuvor entstandenen Immunkomplexen anlagert.

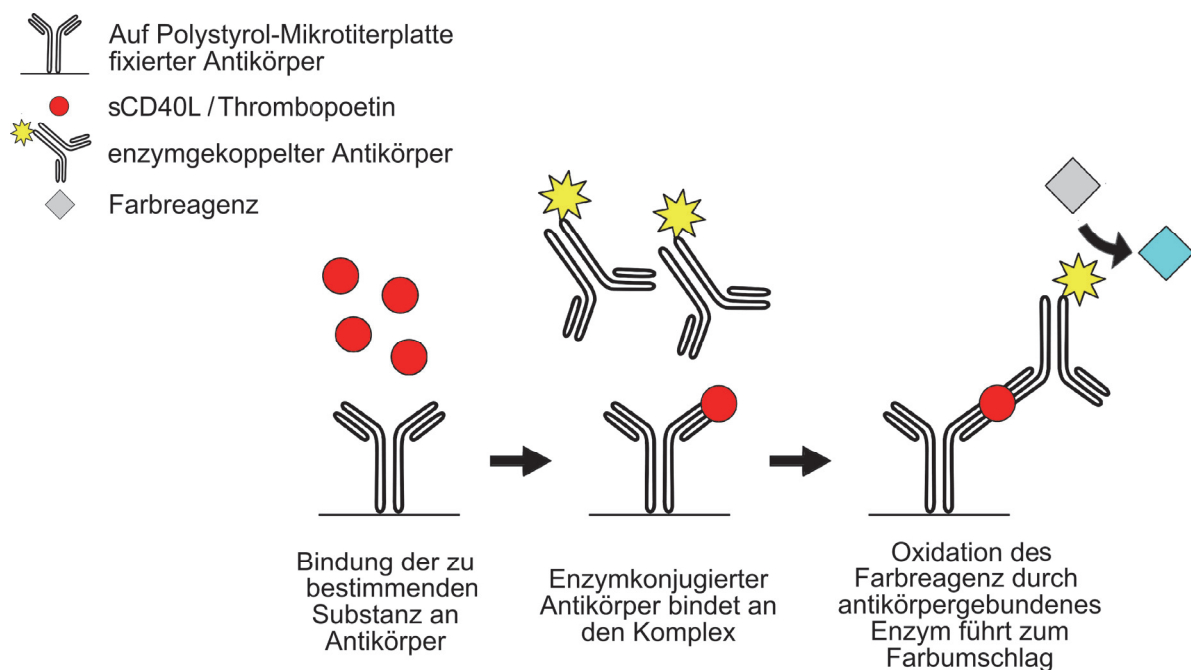


Abbildung 14: Das Prinzip des Enzym-Immuno-Assay (ELISA)

Durch erneutes Waschen nach Ablauf der Inkubationszeit werden ungebundene Antikörper entfernt. Die Substratlösung, angesetzt aus Wasserstoffperoxid und dem Farbreagenz Tetramethylbenzidin wird hinzugefügt. Die antikörperkonjugierte Meerrettich-Peroxidase oxidiert Tetramethylbenzidin zu einem blauen Farbkomplex. Die Zugabe von Schwefelsäure als Stoplösung nach 30-minütiger Inkubationszeit beendet den Ablauf der Reaktion und bewirkt einen Farbumschlag von blau nach gelb.

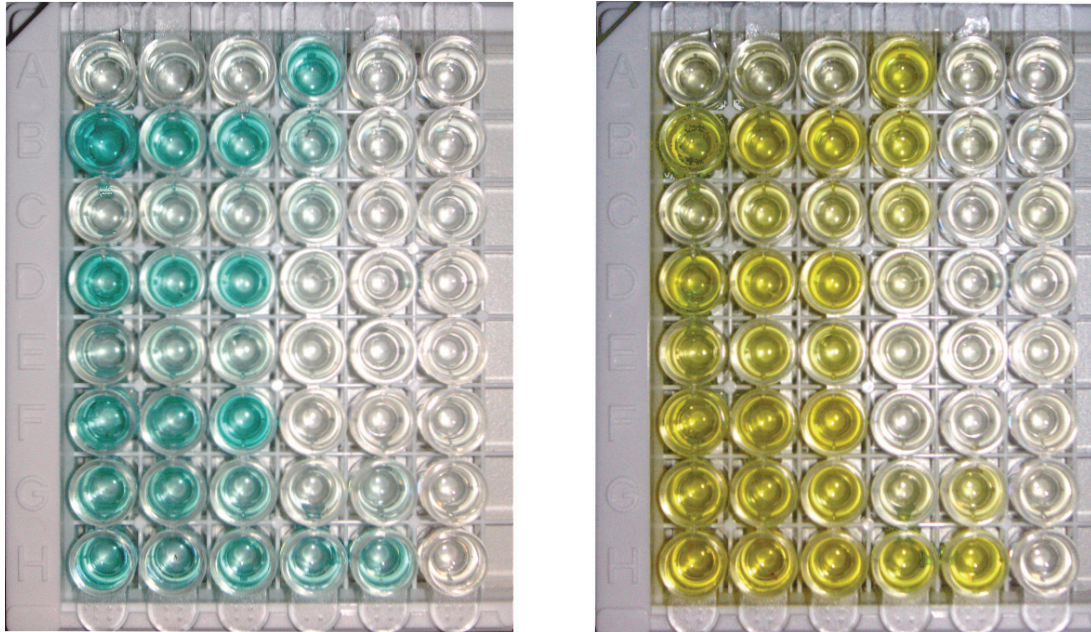


Abbildung 15: Farbumschlag nach Zugabe von Schwefelsäure auf ELISA Mikrotiterplatte
Am Ende der Durchführung des ELISA-Tests wird Schwefelsäure als Stop-Lösung für die Farbreaktion in die Wells pipettiert. Sofort ist ein Farbumschlag von blau nach gelb zu beobachten.

Bei einer Wellenlänge von 450 nm und einer Korrekturwellenlänge von 570 nm wird anschließend mit dem Mikroplattenleser (Dade Behring BEP III) photometrisch die Extinktion bestimmt und im Plattenreport dokumentiert. Die Extinktion der Lösung ist dem Lambert-Beer'schen Gesetz nach direkt proportional zu den enzymatisch umgesetzten Farbreagenzien und somit zur Thrombopoetin- bzw. sCD40L-Konzentration in der Probe.

Anhand einer aus rekombinantem Thrombopoetin bzw. sCD40L erstellten Standardkurve wird aus den Extinktionswerten die Konzentration in den Proben errechnet.

Plattenreport: Rohwerte

Platten-ID:	0023	Riegel:	1 - 6
BES Version:	V3.3	Validierung:	-
Analyzer:	161662	Einheit:	-
Testname:	Photometrieren	Valid.bereich	
Cut Off:	-		
Cut Off Formel:	-		
Wiederh.bereich:	-		
Blankkorrektur	-		
Niveau Korrektur	-		
Wellenlängen M/R:	450 nm / 570 nm		
Testkit Nr.:	-		
Platte definiert am:	14.11.2006 13:59 uhr		

!	Napfauffälligkeit	*	Ergebnis negativ
#	Keine Berechnung möglich		Ergebnis positiv
∞	Ergebnis zweifelhaft	?	Ergebnis in Wiederh.Ber.

Pos	ProbenID	Wert	Flag	Pos	ProbenID	Wert	Flag	Pos	ProbenID	Wert	Flag
A1	----	0.044		A2	----	0.097		A3	----	0.066	
B1	----	0.060		B2	----	0.051		B3	----	0.049	
C1	----	0.086		C2	----	0.046		C3	----	0.030	
D1	----	0.152		D2	----	0.046		D3	----	0.039	
E1	----	0.280		E2	----	0.046		E3	----	0.029	
F1	----	0.504		F2	----	0.041		F3	----	0.027	
G1	----	0.969		G2	----	0.043		G3	----	0.026	
H1	----	2.084		H2	----	0.041		H3	----	0.026	
A4	----	0.079		A5	----	0.072		A6	----	0.106	
B4	----	0.038		B5	----	0.049		B6	----	0.074	
C4	----	0.036		C5	----	0.049		C6	----	0.062	
D4	----	0.023		D5	----	0.052		D6	----	0.088	
E4	----	0.043		E5	----	0.060		E6	----	0.086	
F4	----	0.034		F5	----	0.127		F6	----	0.079	
G4	----	0.032		G5	----	0.083		G6	----	0.074	
H4	----	0.032		H5	----	0.089		H6	----	0.067	

Abbildung 16: Plattenreport eines Thrombopoetin-ELISA

2.4 Datenverarbeitung und statistische Auswertung

Die erhobenen Daten wurden mit Microsoft Office Excel 2003 (Microsoft Corporation, USA) erfasst. Auch die Durchführung statistischer Berechnungen und Tests und das Erstellen der Tabellen und Graphen erfolgte mit Microsoft Excel 2003.

2.4.1 Deskriptive Statistik

Zur Auswertung der deskriptiven Statistik wurden Mittelwert (arithmetisches Mittel), Standardabweichung, Standardfehler, Minimal- und Maximalwert, 25 %- und 75 %-Quantil und Median berechnet und angegeben. Zur Darstellung der Verteilungen dienen Box- and-Whisker-Plots.

2.4.2 Statistische Testverfahren

Die Werte in den jeweiligen Gruppen wurden als verbundene Stichproben miteinander verglichen. Da eine Normalverteilung der Daten aufgrund der Stichprobengröße nicht angenommen werden konnte, wurden nonparametrische Testverfahren angewendet.

Ein signifikanter Unterschied wurde für eine Irrtumswahrscheinlichkeit mit dem Signifikanzniveau $P \leq 0,05$ festgelegt. Aufgrund der geringen Fallzahlen lag das beste erreichbare Signifikanzniveau bei manchen der Messungen bei 0,0625.

Als Nullhypothese wurde formuliert, dass sich die Konzentrationen zu verschiedenen Zeitpunkten nicht unterscheiden. Die Alternativhypothese besagt, dass ein Unterschied zwischen den verschiedenen Messzeitpunkten besteht.

Der L-Test von Page

Der L-Test von Page ist der bekannteste Trendtest für Rangdaten bei verbundenen Stichproben. Er testet stets einseitig und stellt der Nullhypothese, die besagt, dass es keinen Unterschied zwischen den Gruppen gibt, die Trendalternativhypothese gegenüber, dass die Gruppen sich unterscheiden und unterschiedliche Behandlungen einen zunehmend größeren Einfluss auf die Variable haben.

Die Spalten, die den verschiedenen Zeitpunkten der Lagerung entsprechen, werden ansteigend in der erwarteten Reihenfolge durchnummeriert. Innerhalb jeder Zeile werden Ränge vergeben und die Rangsumme jeder Spalte gebildet. Die Rangsumme jeder Spalte wird mit der ihr zugeordneten Zahl der Nummerierung multipliziert. Die Summe der Produkte aller Spalten ergibt den Testwert L, mittels dessen anhand einer

Testtafel (s. Anhang Tafel I) die Testentscheidung getroffen wird. Der Trendtest von Page prüft selbst bei Erfüllung parametrischer Bedingungen meist schärfer als die parametrische Varianzanalyse [9, 80].

In diesem Falle besagt die Alternativhypothese, dass mit zunehmender Lagerungsdauer die Konzentration von sCD40L und Thromboxan im Präparat ansteigt, der Spiegel von TPO abfällt, und die Fähigkeit der Plättchen, sCD40L und Thromboxan freizusetzen bzw. Thrombopoetin aufzunehmen, abnimmt. Sie wird gegen die Nullhypothese getestet, dass kein Trend existiert.

Der Vorzeichen-Rangtest von Wilcoxon

Der Vorzeichen-Rangtest von Wilcoxon prüft, ob sich zwei verbundene Stichproben unterscheiden und verwertet dabei auch die Größe des Unterschieds. Die Nullhypothese geht davon aus, dass unter den verschiedenen Bedingungen kein Unterschied besteht. Die gerichtete Alternativhypothese besagt, dass der erste Messwert entweder größer oder kleiner als der zweite Messwert ist.

Für alle Messwertpaare wird die Differenz unter den beiden verschiedenen Bedingungen gebildet. Dann werden den Differenzen Rangwerte zugeordnet. Die Rangwerte werden nach dem Vorzeichen der zugehörigen Differenz in zwei Gruppen eingeteilt und aus jeder Gruppe wird die Rangsumme gebildet. Die kleinere der beiden Rangsummen ist die Prüfgröße T, die gleich oder kleiner als der kritische Wert auf der Testtafel (s. Anhang Tafel II) sein muss, um auf dem vorgegebenen Signifikanzniveau die Entscheidung für die Alternativhypothese zu treffen. Es kann einseitig oder zweiseitig getestet werden. [9, 106]

In dieser Arbeit wird die Alternativhypothese, dass sich die Konzentration zu zwei verschiedenen Zeitpunkten der Lagerung gerichtet unterscheidet, gegen die Nullhypothese, dass kein Unterschied besteht, getestet.

3 Ergebnisse

3.1 Die Konzentration von sCD40L, Thromboxan B₂ und Thrombopoetin im Thrombozytapheresepräparat während Herstellung und Lagerung

3.1.1 Die Anreicherung von sCD40L im Thrombozytapheresepräparat

Der mittlere sCD40L-Spiegel im Blut der Thrombozytapheresespender wurde bei 199 ± 60 pg/ml bestimmt. Im Blut der Plasmaspender lag die sCD40L-Konzentration durchschnittlich bei 139 ± 23 pg/ml.

Bereits nach der Herstellung liegt die Konzentration von sCD40L im Aphereseplättchenpräparat mit 340 ± 79 pg/ml höher als im Spenderblut. Im Laufe der fünftägigen Lagerung reichert sich sCD40L weiter im Thrombozytenkonzentrat an. Bis zum Ende der zum medizinischen Einsatz zulässigen Lagerungszeit steigt die Konzentration im Präparat im Mittel auf 2734 ± 243 pg/ml.

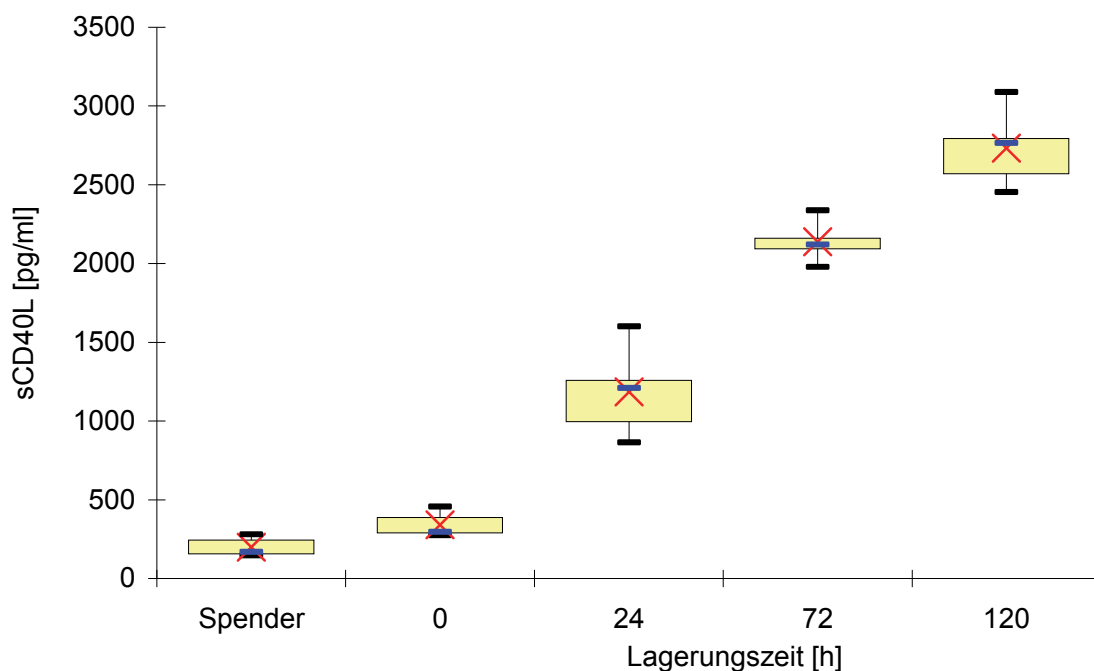


Abbildung 17: Box-Whisker-Plot: sCD40L-Anreicherung im Thrombozytenkonzentrat im Laufe der Lagerung. Die Box ist begrenzt durch die 25 %- und 75 %-Perzentile. Die Whisker stellen Minimal- und Maximalwert dar. Der blaue Strich steht für den Median, das rote Kreuz für den Mittelwert. Spender: Blutentnahme vor der Apherese.

Tabelle 3: Deskriptive Statistik: sCD40L im Thrombozytenkonzentrat im Laufe der Lagerung [pg/ml]. Spender: Blutentnahme vor der Apherese

	Lagerungszeit [h]				
	Spender	0	24	72	120
	147	288	1209	2092	2793
	281	388	995	2121	2453
	155	273	865	2161	2765
	168	456	1600	2337	2568
	242	296	1258	1978	3089
	Median	168	296	1209	2121
Mittelwert	199	340	1185	2138	2734
Standardabweichung	60	79	281	130	243
Standardfehler	27	35	126	58	109

Der Anstieg der mittleren Konzentration von sCD40L im Laufe der Lagerung wird durch den Page-Trendtest auf dem 1 %-Signifikanzniveau bestätigt:

Tabelle 4: Page-Test: sCD40L Anreicherung im Thrombozytenkonzentrat im Laufe der Lagerung.

	0	24	72	120
Rangsumme	5	10	15	20
Rang der Rangsumme	1	2	3	4
Rangsummen-Produkt	5	20	45	80
L-Wert	150			
P-Wert	0,01			

Um festzustellen, zwischen welchen Zeitpunkten der Lagerung signifikante Unterschiede der sCD40L-Konzentration im Präparat auftreten, wurden mit dem Wilcoxon-Vorzeichenrangtest Einzelvergleiche betrachtet (s. Tabelle 5).

Tabelle 5: Wilcoxon-Vorzeichenrangtest: sCD40L im Thrombozytenkonzentrat im Laufe der Lagerung

	Spender/0	0/24	0/72	0/120	24/72	72/120
Summe pos./neg. Ränge	0 / -15	0 / -15	0 / -15	0 / -15	0 / -15	0 / -15
T-Wert	0	0	0	0	0	0
P-Wert	0,031	0,031	0,031	0,031	0,031	0,031

Bereits während der Herstellung der Thrombozytapheresepräparate steigt die Konzentration von sCD40L im Vergleich zum Spiegel im Blut der Spender signifikant an. Im Laufe der anschließenden Lagerung sind über alle Zeitintervalle weitere signifikante Anstiege zu verzeichnen. So liegt die sCD40L-Konzentration im Präparat bereits am Ende des ersten Lagerungstages signifikant höher als zum Zeitpunkt der Freigabe des Präparats zur Transfusion. Auch zwischen 24 und 72 Stunden und zwischen 72 und 120 Stunden der Lagerung kommt es zu weiterer signifikanter Anreicherung von sCD40L im Präparat.

Prozentuale Darstellung der Anreicherung von sCD40L im Thrombozytenkonzentrat

Die Konzentration von sCD40L im frischen Präparat zum Zeitpunkt der Freigabe beträgt das 1,7-fache des Spenderblutspiegels.

Im Laufe des ersten Tages reichert sich sCD40L im Mittel auf das 3,5-fache des Wertes vom Lagerungsbeginn an. In den folgenden beiden Tagen steigt die Konzentration weiter und erreicht am Ende des dritten Lagerungstages das 6,5-fache des Ausgangswertes. Am Ende des fünften Tages, mit Ablauf der maximal zulässigen Lagerungszeit, hat sich sCD40L im Präparat auf mehr als das 8-fache des Wertes vom Lagerungsbeginn angereichert.

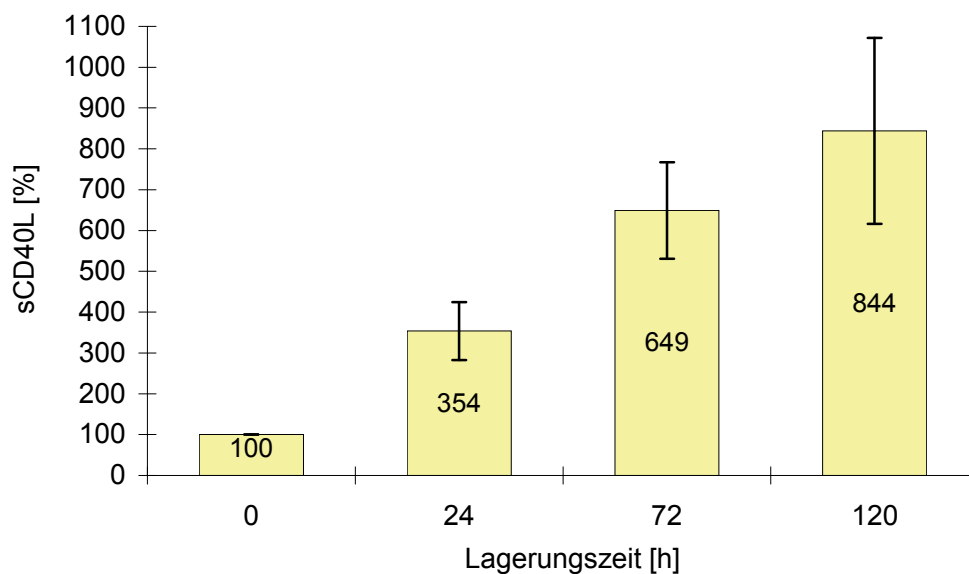


Abbildung 18: Mittlere sCD40L Anreicherung im Thrombozytenkonzentrat prozentual zum Lagerungsbeginn [%]. Die Prozentwerte wurden einzeln berechnet und dann gemittelt. Die Fehlerindikatoren entsprechen der Standardabweichung.

Tabelle 6: sCD40L im Thrombozytenkonzentrat im Laufe der Lagerung prozentual zum Lagerungsbeginn [%]. Die Prozentwerte wurden einzeln berechnet und dann gemittelt.

	Lagerungszeit [h]			
	0	24	72	120
Median	100	351	668	969
Mittelwert	100	354	649	844
Standardabweichung	0	71	118	228
Standardfehler	0	32	53	102

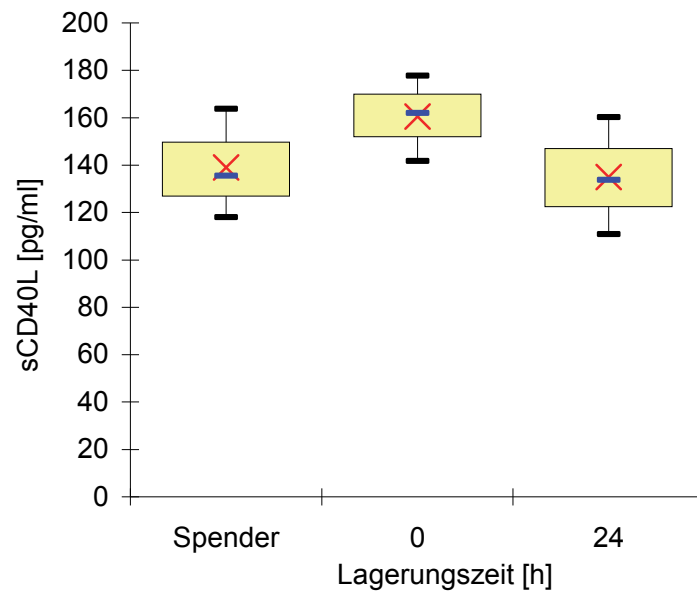
sCD40L im Plasmapheresepräparat

Abbildung 19: Box-Whisker-Plot: sCD40L im Spenderblut und im Plasmapheresepräparat. Die Box ist begrenzt durch die 25 %- und 75 %-Perzentile. Die Whisker stellen Minimal- und Maximalwert dar. Der blaue Strich steht für den Median, das rote Kreuz für den Mittelwert. Spender: Blutentnahme vor der Apherese.

Tabelle 7: Deskriptive Statistik: sCD40L im Plasmapheresepräparat [pg/ml]

	Lagerungszeit [h]		
	Spender	0	24
	164	178	160
	118	162	111
	136	142	134
Median	136	162	134
Mittelwert	139	160	135
Standardabweichung	23	18	25
Standardfehler	13	10	14

Im Plasmapräparat zeigt sich während der Herstellung durch Plasmapherese ein leichter Anstieg der Konzentration von sCD40L. In den ersten 24 Stunden der Lagerung nimmt die Konzentration von sCD40L im Plasmapräparat ab. Aufgrund des kleinen Stichprobenumfangs kann hier nur eine Tendenz aufgezeigt werden.

3.1.2 Die Anreicherung von Thromboxan B₂ im Thrombozytapheresepräparat

Thromboxan B₂ steigt im Laufe der Lagerung im Thrombozytenkonzentrat signifikant an. Der mittlere Spiegel von Thromboxan B₂ im Blut der Spender beträgt $0,24 \pm 0,15$ ng/ml. Am Ende der zum medizinischen Einsatz zulässigen Lagerungszeit beträgt die Konzentration von Thromboxan B₂ im Präparat $3,43 \pm 0,59$ ng/ml.

Im Präparat eines der Spender zeigte sich nur ein geringer Anstieg. Da Proben dieses Spenders auch im Aktivierungsversuch auf Calciumzugabe hin nur mit einem sehr schwachen Anstieg von Thromboxan B₂ reagierten, wurde dieses Thrombozytenkonzentrat in der Auswertung nicht berücksichtigt.

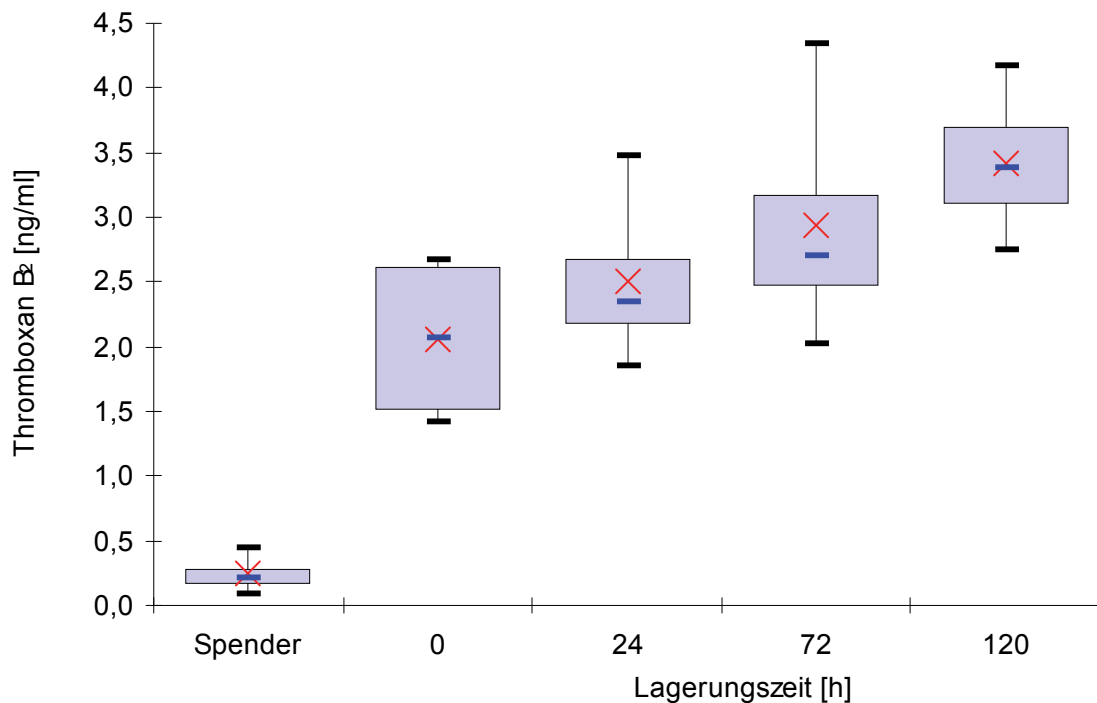


Abbildung 20: Box-Whisker-Plot: Thromboxan B₂-Anreicherung im Thrombozytenkonzentrat im Laufe der Lagerung. Die Box ist begrenzt durch die 25 %- und 75 %-Perzentile. Die Whisker stellen Minimal- und Maximalwert dar. Der blaue Strich steht für den Median, das rote Kreuz für den Mittelwert. Spender: Blutentnahme vor der Apherese.

Tabelle 8: Deskriptive Statistik: Thromboxan B₂-Anreicherung im Thrombozytenkonzentrat im Laufe der Lagerung [ng/ml]

	Lagerungszeit [h]				
	Spender	0	24	72	120
	0,09	1,54	2,30	2,79	3,53
	0,45	2,68	2,40	2,62	3,23
	0,22	2,59	3,48	4,34	4,18
	0,20	1,43	1,85	2,02	2,76
Median	0,21	2,07	2,35	2,71	3,38
Mittelwert	0,24	2,06	2,51	2,94	3,43
Standardabweichung	0,15	0,67	0,69	0,99	0,59
Standardfehler	0,08	0,33	0,35	0,49	0,30

Der Page-Trendtest bestätigt den Konzentrationsanstieg von Thromboxan B₂ im Thrombozytapheresekonzentrat auf dem 1 %-Niveau:

Tabelle 9: Page-Test: Thromboxan B₂-Anreicherung im Thrombozytenkonzentrat

	0	24	72	120
Rangsumme	6	7	12	15
Rang der Rangsumme	1	2	3	4
Rangsummen-Produkt	6	14	36	60
L-Wert	116			
P-Wert	0,01			

Unter der detaillierteren Fragestellung, nach welcher Lagerungszeit signifikante Konzentrationsunterschiede im Präparat auftreten, wurden mit dem Wilcoxon-Vorzeichenrangtest Einzelvergleiche der Thromboxankonzentrationen zu verschiedenen Zeitpunkten der Lagerung betrachtet. Das beste bei n = 4 erreichbare Signifikanzniveau beim Wilcoxon-Vorzeichenrangtest ist 0,062.

Tabelle 10: Wilcoxon-Vorzeichenrangtest: Thromboxan B₂-Anreicherung im Thrombozytenkonzentrat

	Spender/0	0/24	0/72	0/120	24/72	72/120
Summe pos./neg. Ränge	0 / -10	1 / -9	1 / -9	0 / -10	0 / -10	1 / -9
T-Wert	0	1	1	0	0	1
P-Wert	0,062	0,125	0,125	0,062	0,062	0,125

Auf dem 0,062%-Niveau signifikante Unterschiede treten beim Vergleich des Thromboxan-Spiegels im Blut der Spender mit dem Präparat zu Lagerungsbeginn, sowie im Laufe der Lagerung zwischen der Konzentration vom Lagerungsbeginn und nach 120 Stunden auf. Die Konzentration von Thromboxan B₂ liegt im Thrombozytenkonzentrat zum Zeitpunkt der Freigabe 8,6-fach höher als im Blut der Spender.

Prozentuale Darstellung: Anreicherung von Thromboxan im Thrombozytenkonzentrat

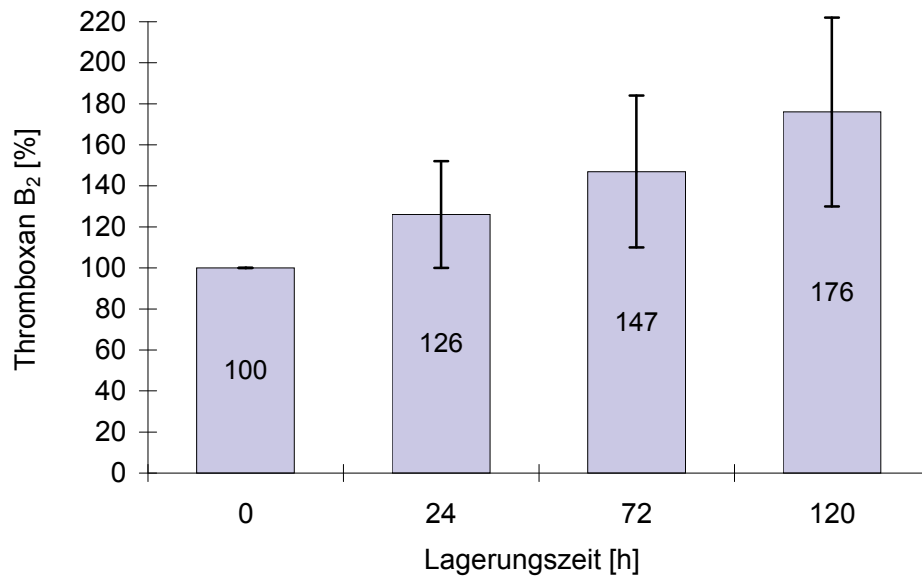


Abbildung 21: Mittlere Thromboxan B₂-Anreicherung im Thrombozytenkonzentrat im Laufe der Lagerung prozentual zum Lagerungsbeginn [%]. Die Prozentwerte wurden einzeln berechnet und dann gemittelt. Die Fehlerindikatoren geben die Standardabweichung an.

Tabelle 11: Deskriptive Statistik: Thromboxan B₂ im Thrombozytenkonzentrat im Laufe der Lagerung prozentual zum Lagerungsbeginn [%]. Die Prozentwerte wurden einzeln berechnet und dann gemittelt.

	Lagerungszeit [h]			
	0	24	72	120
Median	100	132	154	177
Mittelwert	100	126	147	176
Standardabweichung	0	26	37	46
Standardfehler	0	13	18	23

Thromboxan B₂ reichert sich im Thrombozytapheresepreparat bis zum Ende des fünften Tages mit Ablauf der maximal zulässigen Lagerungszeit auf das 1,76-fache des Ausgangswertes vom Beginn der Lagerung an.

Thromboxan B₂ im Plasmapheresepräparat

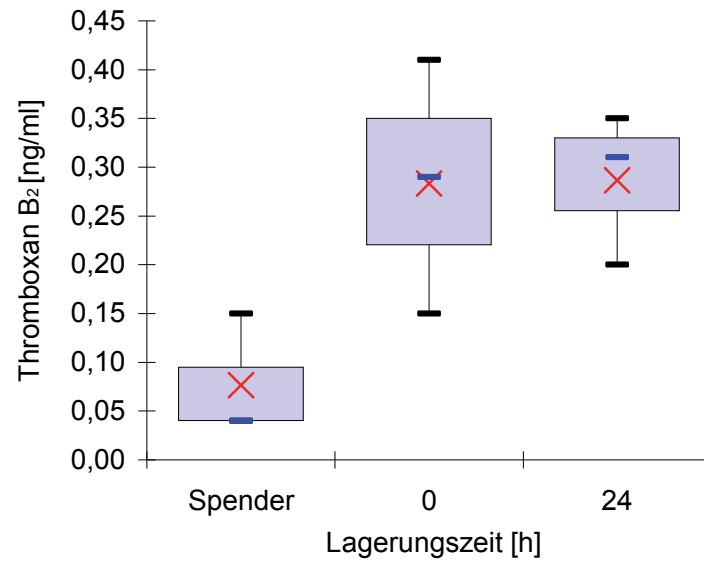


Abbildung 22: Box-Whisker-Plot: Thromboxan B₂ im Spenderblut und im Plasmapheresepräparat. Die Box ist begrenzt durch die 25 %- und 75 %-Perzentile. Die Whisker stellen Minimal- und Maximalwert dar. Der blaue Strich steht für den Median, das rote Kreuz für den Mittelwert. Spender: Blutentnahme vor der Apherese.

Tabelle 12: Deskriptive Statistik: Thromboxan B₂ im Plasmapheresepräparat [pg/ml]

	Lagerungszeit [h]		
	Spender	0	24
	0,15	0,29	0,31
	0,04	0,15	0,2
	0,04	0,41	0,35
Median	0,04	0,29	0,31
Mittelwert	0,08	0,28	0,29
Standardabweichung	0,06	0,13	0,08
Standardfehler	0,04	0,08	0,04

Auch im Plasmapräparat liegt nach der Herstellung mittels Plasmapherese der Thromboxan B₂-Spiegel höher als im Spenderblut.

3.1.3 Die Elimination von Thrombopoetin aus dem Thrombozytapheresekonzentrat

Der mittlere Thrombopoetinspiegel im Blut der untersuchten Thrombozytenspender lag bei 35,7 pg/ml. Eine zusätzlichen Messung unmittelbar nach der Apherese in aus dem Schlauchsystem gewonnenem Thrombozytenkonzentrat zeigte eine Abnahme der Konzentration auf 3,9 pg/ml. Bei Beginn der Lagerung war in zwei der Präparate die Konzentration von Thrombopoetin unter die mit 2,78 – 18,5 pg/ml angegebene Nachweisgrenze des Tests [84] gesunken. Nach 24 Stunden Lagerung war mit dem verwendeten ELISA in keinem der Thrombozytenkonzentrate Thrombopoetin nachweisbar.

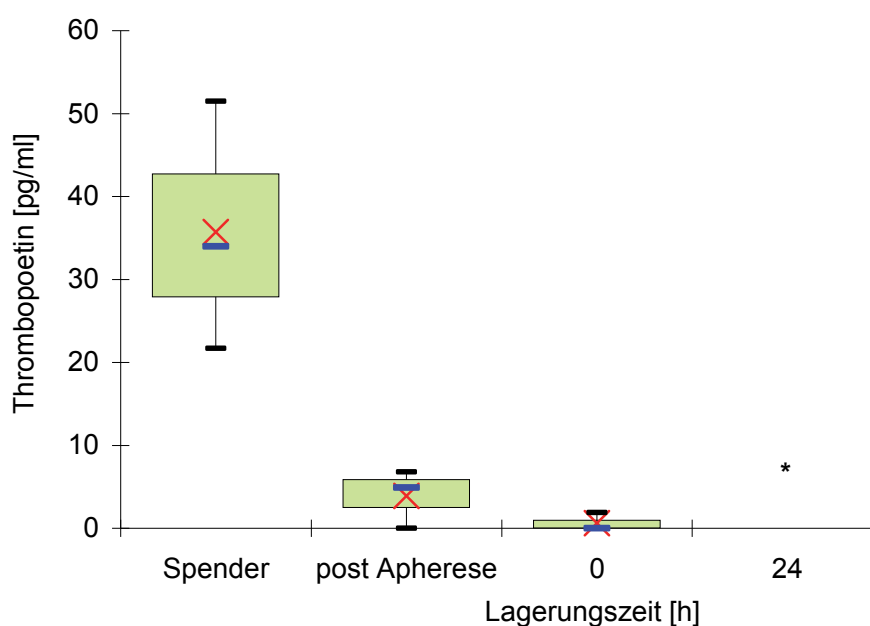


Abbildung 23: Box-Whisker-Plot: Elimination von Thrombopoetin aus dem Thrombozytenkonzentrat im Laufe der Lagerung. Die Box ist begrenzt durch die 25 %- und 75 %-Perzentile. Die Whisker stellen Minimal- und Maximalwert dar. Der blaue Strich steht für den Median, das rote Kreuz für den Mittelwert. Spender: Blutentnahme vor der Apherese. post Apherese: Probenentnahme aus dem Schlauchsystem unmittelbar nach der Apherese. *unter der Nachweisgrenze

Tabelle 13: Deskriptive Statistik: Thrombopoetin im Thrombozytenkonzentrat [pg/ml]. Spender: Blutentnahme vor der Apherese. post Apherese: Probenentnahme aus dem Schlauch des Systems unmittelbar nach Apherese. *unter der Nachweisgrenze

	Lagerungszeit [h]			
	Spender	post Apherese	0	24
	51,5	6,8	1,9	*
	21,7	4,9	*	*
	34,0	*	*	*
Median	34,0	4,9	*	*
Mittelwert	35,7	3,9	0,6	*
Standardabweichung	15,0	3,5	1,1	*
Standardfehler	8,7	2,0	0,6	*

Thrombopoetin im Plasmapheresepräparat

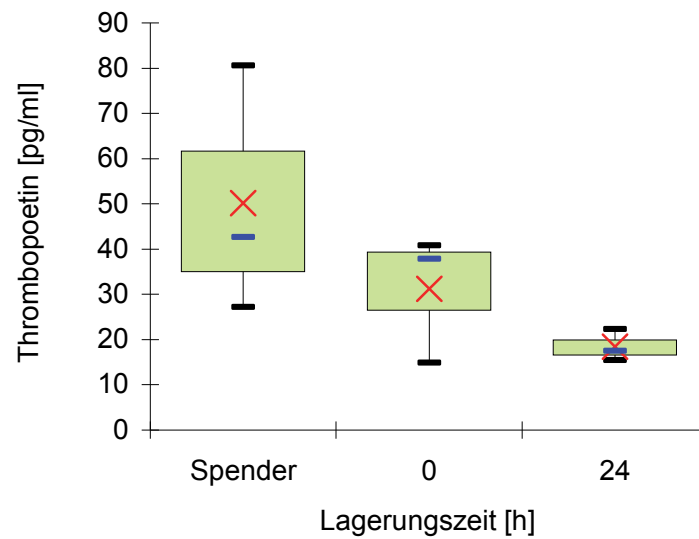


Abbildung 24: Box-Whisker-Plot: Thrombopoetin im Spenderblut und im Plasmapheresepräparat [pg/ml]. Die Box ist begrenzt durch die 25 %- und 75 %-Perzentile. Die Whisker stellen Minimal- und Maximalwert dar. Der blaue Strich steht für den Median, das rote Kreuz für den Mittelwert Spender: Blutentnahme vor der Apherese.

Tabelle 14: Deskriptive Statistik: Thrombopoetin im Plasmapheresepräparat [pg/ml]

	Lagerungszeit [h]		
	Spender	0	24
	27,2	14,9	15,5
	80,6	37,9	17,5
	42,7	40,8	22,3
Median	42,7	37,9	17,5
Mittelwert	50,2	31,2	18,4
Standardabweichung	27,5	14,2	3,5
Standardfehler	15,9	8,2	2,0

Die nach der Herstellung im Plasmapheresepräparat gemessene Konzentration von Thrombopoetin lag bei 60 % des Wertes im Spenderblut. Auf statistische Tests wird aufgrund der kleinen Stichprobe verzichtet.

3.2 Aktivierungs- und Inkubationsversuche

3.2.1 Die Freisetzung von sCD40L bei Plättchenaktivierung und Bildung eines Thrombus zu verschiedenen Zeitpunkten der Lagerung

Die Konzentration von sCD40L wurde in fünf Thrombozytenkonzentraten vor und nach dreistündiger Inkubation mit 0,2-molarer Calcium-Lösung bestimmt. Aus der Differenz der beiden Messwerte geteilt durch die Thrombozytenkonzentration im Präparat errechnet sich die bei Aktivierung und Bildung eines Thrombus pro Plättchen freigesetzte Menge sCD40L.

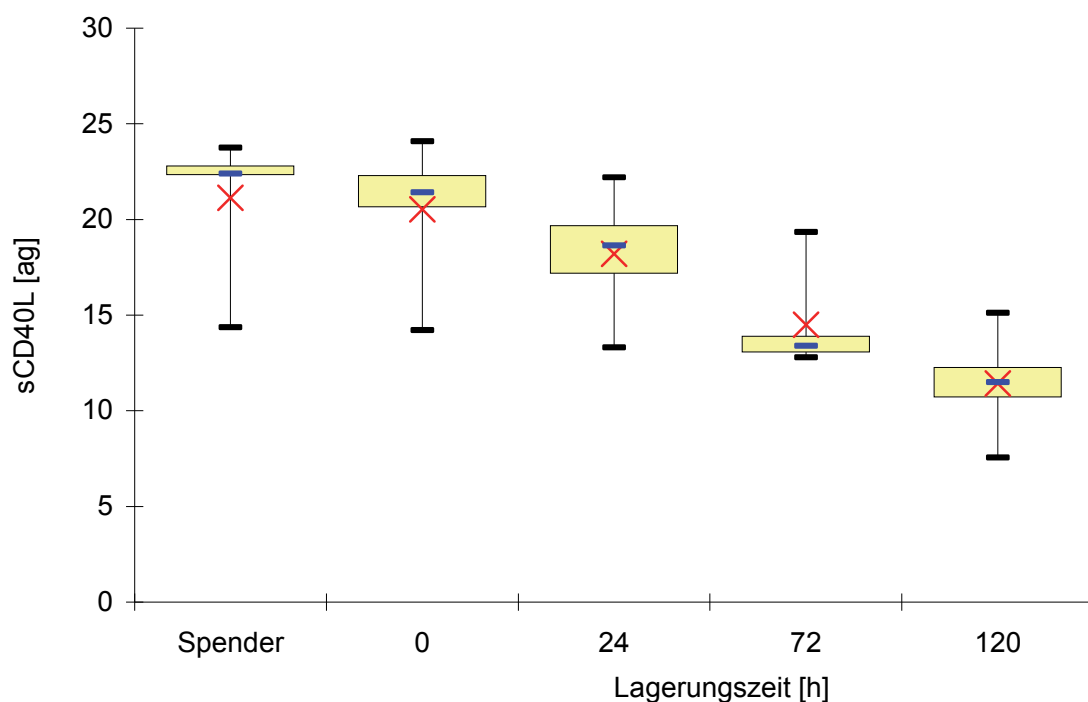


Abbildung 25: Box-Whisker-Plot: sCD40L-Freisetzung bei Aktivierung und Thrombusbildung pro Thrombozyt vor Apherese, zu Lagerungsbeginn und nach einem, drei und fünf Tagen Lagerung. Die Box ist begrenzt durch die 25 %- und 75 %-Perzentile. Die Whisker stellen Minimal- und Maximalwert dar. Der blaue Strich steht für den Median, das rote Kreuz für den Mittelwert. Spender: Blutentnahme vor der Apherese.

Die bei Plättchenaktivierung und Bildung eines Thrombus freigesetzte Menge sCD40L pro Plättchen nimmt im Laufe der Lagerungszeit ab (Tag 0: $20,5 \pm 3,8$ ag, Tag 1: $18,2 \pm 3,3$ ag, Tag 3: $14,3 \pm 2,8$ ag, Tag 5: $11,4 \pm 2,7$ ag).

Tabelle 15: Deskriptive Statistik: sCD40L-Freisetzung bei Aktivierung und Thrombusbildung pro Thrombozyt vor Apherese, zu Lagerungsbeginn und nach einem, drei und fünf Tagen Lagerung [ag]. Spender: Blutentnahme vor der Apherese.

	Lagerungszeit [h]				
	Spender	0	24	72	120
	14,4	14,2	13,3	12,8	7,6
	22,4	21,4	19,7	13,4	11,5
	22,3	20,6	18,6	13,9	12,3
	22,8	22,3	17,2	13,1	15,1
	23,7	24,1	22,2	19,3	10,7
	Median	22,4	21,4	18,6	13,1
Mittelwert	21,1	20,5	18,2	14,3	11,4
Standardabweichung	3,8	3,8	3,3	2,8	2,7
Standardfehler	1,7	1,7	1,5	1,3	1,2

Der Page-Trendtest bestätigt das Absinken der sCD40L-Freisetzung auf dem 1 %-Signifikanzniveau:

Tabelle 16: Page-Test: sCD40L-Freisetzung bei Aktivierung und Thrombusbildung pro Thrombozyt zu Lagerungsbeginn und nach einem, drei und fünf Tagen Lagerung.

	0	24	72	120
Rangsumme	20	15	9	6
Rang der Rangsumme	4	3	2	1
Rangsummen-Produkt	80	45	18	6
L-Wert	149			
P-Wert	0,01			

Unter der detaillierteren Fragestellung, zwischen welchen Lagerungszeiten die sCD40L-Freisetzung bei Plättchenaktivierung signifikant abnimmt, wurden mit dem Wilcoxon-Vorzeichenrangtest Einzelvergleiche betrachtet (s. Tabelle 17).

Tabelle 17: Wilcoxon-Vorzeichenrangtest: sCD40L-Freisetzung bei Aktivierung und Thrombusbildung

	Spender/0	0/24	0/72	0/120	24/72	72/120
Summe pos./neg. Ränge	13 / -2	15 / 0	15 / 0	15 / 0	15 / 0	12 / -3
T-Wert	2	0	0	0	0	3
P-Wert	0,094	0,031	0,031	0,031	0,031	0,156

Die Freisetzung von sCD40L bei Plättchenaktivierung ist bereits nach dem ersten Tag der Lagerung signifikant niedriger als beim Lagerungsbeginn ($P = 0,031$). Weiterhin war vom ersten auf den dritten Lagerungstag eine signifikante Abnahme der sCD40L-Freisetzung zu verzeichnen. Zwischen der sCD40L-Freisetzung nach 72 und 120 Stunden verändert sich der Spiegel von sCD40L nicht signifikant.

Zwischen Thrombozyten, die nicht den Apheresevorgang durchlaufen haben, und Plättchen im Thrombozytenpräparat zu Lagerungsbeginn besteht bezüglich der Freisetzung von sCD40L bei Aktivierung kein signifikanter Unterschied.

Prozentuale Darstellung: sCD40L-Freisetzung bei Aktivierung und Thrombusbildung

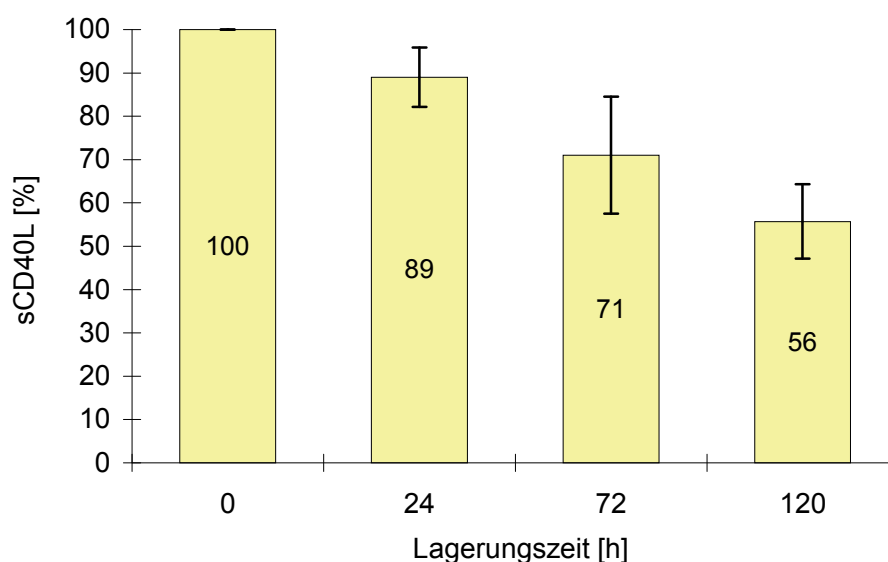


Abbildung 26: Mittlere sCD40L-Freisetzung bei Aktivierung und Thrombusbildung nach einem, drei und fünf Tagen Lagerung prozentual zum Lagerungsbeginn [%]. Die Prozentwerte wurden einzeln berechnet und dann gemittelt. Die Fehlerindikatoren geben die Standardabweichung an.

Tabelle 18: Deskriptive Statistik: sCD40L-Freisetzung bei Aktivierung und Thrombusbildung pro Thrombozyt prozentual zum Lagerungsbeginn [%]. Die Prozentwerte wurden einzeln berechnet und dann gemittelt.

	Lagerungszeit [h]			
	0	24	72	120
n	5	5	5	5
Median	100	92	64	54
Mittelwert	100	89	71	56
Standardabweichung	0	7	13	9
Standardfehler	0	3	6	4

Die durchschnittliche sCD40L-Freisetzung bei Aktivierung pro Plättchen sinkt nach dem ersten Lagerungstag auf 89 % des Wertes vom Lagerungsbeginn. Am Tag 3 setzen die Plättchen 71 % der zu Lagerungsbeginn abgegebenen Menge sCD40L frei. Nach dem fünften Lagerungstag ist die Abgabe von sCD40L bei Plättchenaktivierung und Bildung eines Thrombus im Mittel auf 56 % des Wertes vom Lagerungsbeginn abgesunken.

3.2.2 Die Sekretion von Thromboxan bei Plättchenaktivierung und Bildung eines Thrombus zu verschiedenen Zeitpunkten der Lagerung

Die Konzentration von Thromboxan B₂ wurde in fünf Thrombozytenkonzentraten vor und nach dreistündiger Inkubation mit 0,2-molarer Calcium-Lösung bestimmt. Aus der Konzentrationsdifferenz geteilt durch die Thrombozytenzahl im Präparat wurde die durchschnittlich pro Plättchen freigesetzte Menge Thromboxan errechnet. Ein Thrombozytapheresekonzentrat zeigte auf die Calciumzugabe hin nur einen schwachen Anstieg von Thromboxan B₂. Dieses Präparat wurde in der Auswertung nicht berücksichtigt.

Die bei Thrombozytenaktivierung und Bildung eines Thrombus pro Plättchen sezernierte Menge Thromboxan nimmt im Laufe der Lagerungszeit ab (Tag 0: 1184 ± 205 ag, Tag 1: 1095 ± 154 ag, Tag 3: 890 ± 155 ag, Tag 5: 687 ± 74 ag).

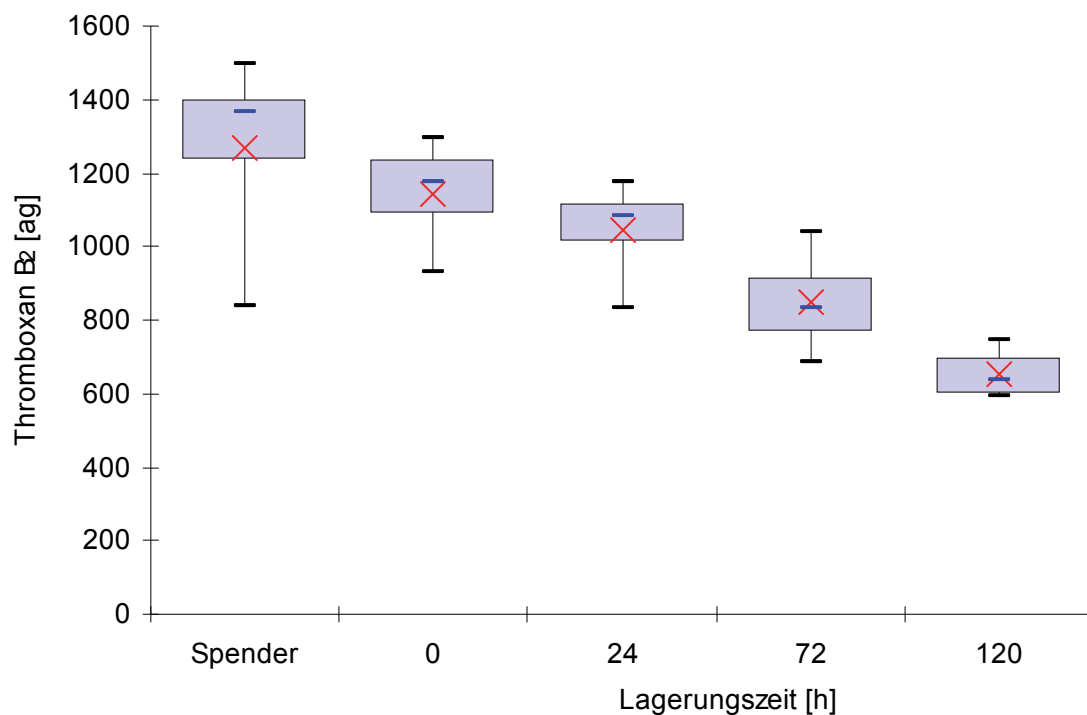


Abbildung 27: Box-Whisker-Plot: Thromboxan-Freisetzung bei Aktivierung und Thrombusbildung pro Thrombozyt vor Apherese, zu Lagerungsbeginn und nach einem, drei und fünf Tagen Lagerung. Die Box ist begrenzt durch die 25 %- und 75 %-Perzentile. Die Whisker stellen Minimal- und Maximalwert dar. Der blaue Strich steht für den Median, das rote Kreuz für den Mittelwert. Spender: Blutentnahme vor der Apherese.

Tabelle 19: Deskriptive Statistik: Thromboxan-Freisetzung bei Aktivierung und Thrombusbildung pro Thrombozyt vor Apherese, zu Lagerungsbeginn und nach einem, drei und fünf Tagen Lagerung [ag]. Spender: Blutentnahme vor der Apherese.

	Lagerungszeit [h]				
	Spender	0	24	72	120
	1367	1138	1068	1038	743
	1368	1294	1097	873	600
	1496	1213	1173	793	678
	839	932	834	688	595
Median	1367	1176	1083	833	639
Mittelwert	1268	1145	1043	848	654
Standardabweichung	292	155	146	148	70
Standardfehler	146	78	73	74	35

Der Page-Trendtest bestätigt die Abnahme der Thromboxan-Freisetzung im Laufe der Lagerung auf dem 5 %-Signifikanzniveau:

Tabelle 20: Page-Test: Thromboxan-Freisetzung bei Aktivierung und Thrombusbildung pro Thrombozyt

	0	24	72	120
Rangsumme	16	9	8	4
Rang der Rangsumme	4	3	2	1
Rangsummen-Produkt	64	27	16	4
L-Wert	111			
P-Wert	0,05			

Das für $n = 4$ maximal erreichbare Signifikanzniveau beim Wilcoxon-Vorzeichenrangtest ist 0,062. Im Einzelvergleich mittels Wilcoxon-Vorzeichenrangtest sind vom Lagerungsbeginn an zu allen Messzeitpunkten auf dem 6,2 %-Niveau signifikante Unterschiede zu verzeichnen.

Tabelle 21: Wilcoxon-Vorzeichenrangtest: Thromboxan-Freisetzung bei Aktivierung und Thrombusbildung pro Thrombozyt

	Spender/0	0/24	0/72	0/120	24/72	72/120
Summe pos./neg. Ränge	8 / -2	10 / 0	10 / 0	10 / 0	10 / 0	10 / 0
T-Wert	2	0	0	0	0	0
P-Wert	0,188	0,062	0,062	0,062	0,062	0,062

Zwischen Thrombozyten im plättchenreichen Plasma aus Spenderblut, die nicht die Apherese durchlaufen haben, und Plättchen im Thrombozytenpräparat zu Lagerungsbeginn besteht kein signifikanter Unterschied in der Thromboxan-Sekretion bei Aktivierung und Bildung eines Thrombus.

Prozentuale Darstellung der Thromboxan-Sekretion bei Aktivierung und Thrombusbildung

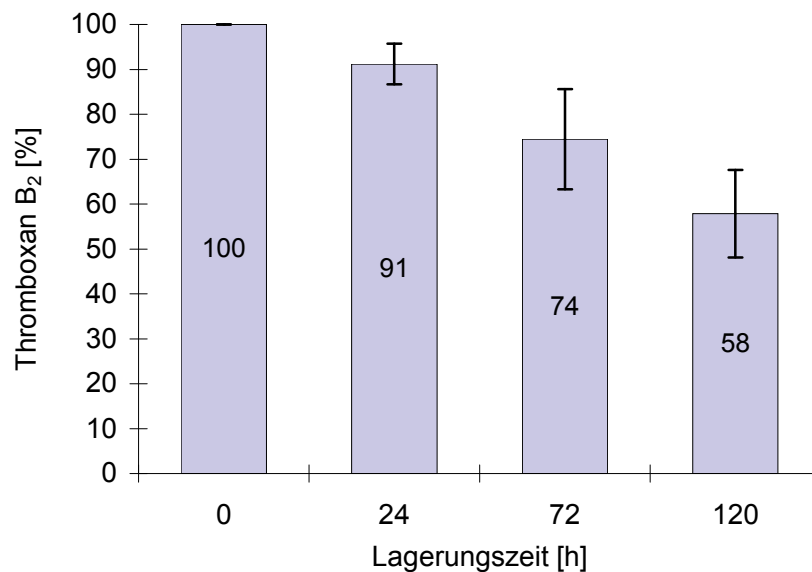


Abbildung 28: Mittlere Thromboxan-Freisetzung bei Aktivierung und Thrombusbildung nach einem, drei und fünf Tagen Lagerung prozentual zum Lagerungsbeginn [%]. Die Prozentwerte wurden einzeln berechnet und dann gemittelt. Die Fehlerindikatoren geben die Standardabweichung an.

Tabelle 22: Deskriptive Statistik: Thromboxan-Freisetzung bei Aktivierung und Thrombusbildung pro Thrombozyt prozentual zum Lagerungsbeginn [%]. Die Prozentwerte wurden einzeln berechnet und dann gemittelt.

	Lagerungszeit [h]			
	0	24	72	120
n	4	4	4	4
Median	100	92	71	60
Mittelwert	100	91	74	58
Standardabweichung	0	5	12	9
Standardfehler	0	3	6	4

Die durchschnittliche Thromboxan-Sekretion bei Aktivierung und Thrombusbildung pro Plättchen beträgt nach dem ersten Lagerungstag 91 % des Wertes vom Lagerungsbeginn. Dieser Unterschied ist mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 18,8 % nicht signifikant.

Bis zum Tag 3 der Lagerung sinkt die Thromboxan-Freisetzung auf 74 % der zu Lagerungsbeginn sezernierten Menge. Nach dem fünften Lagerungstag setzen die Plättchen nur noch 58 % der zu Lagerungsbeginn sezernierten Menge frei.

3.2.3 Die Aufnahme von Thrombopoetin im Übersättigungsbereich zu verschiedenen Zeitpunkten der Lagerung

Vier Thrombozytenkonzentrate wurden mit Thrombopoetin auf eine Zielkonzentration von 600 pg/ml aufgesättigt. Die Thrombopoetin-Konzentration wurde vor und nach fünfstündiger Inkubation bestimmt. Die Differenz der beiden Messwerte geteilt durch die Konzentration der Plättchen im Präparat ergibt die pro Thrombozyt abgebaute Menge Thrombopoetin.

Die im Übersättigungsbereich abgebaute Menge Thrombopoetin nimmt im Laufe der Lagerungszeit ab (Tag 0: $0,61 \pm 0,17$ ag, Tag 1: $0,55 \pm 0,11$ ag, Tag 3: $0,51 \pm 0,17$ ag, Tag 5: $0,48 \pm 0,12$ ag).

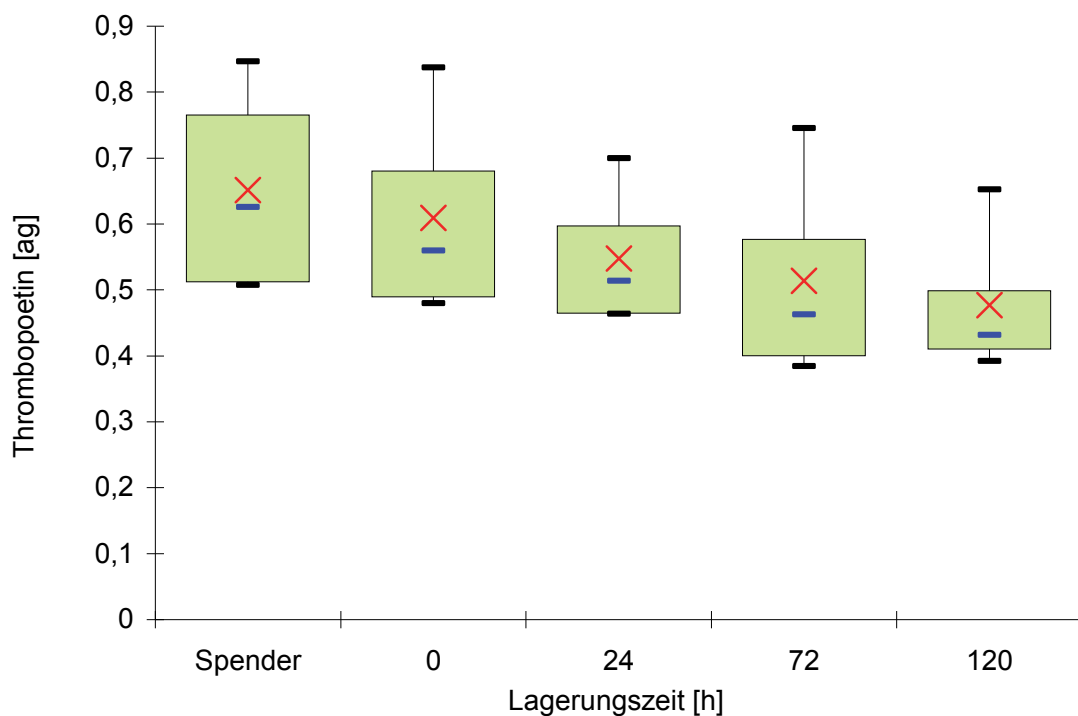


Abbildung 29: Box-Whisker-Plot: Thrombopoetin-Aufnahme im Übersättigungsbereich pro Thrombozyt vor Apherese, zu Lagerungsbeginn und nach einem, drei und fünf Tagen Lagerung. Die Box ist begrenzt durch die 25 %- und 75 %-Perzentile. Die Whisker stellen Minimal- und Maximalwert dar. Der blaue Strich steht für den Median, das rote Kreuz für den Mittelwert. Spender: Blutentnahme vor der Apherese.

Tabelle 23: Deskriptive Statistik: Thrombopoetinaufnahme im Übersättigungsbereich pro Thrombozyt vor Apherese, zu Lagerungsbeginn und nach einem, drei und fünf Tagen Lagerung [ag]. Spender: Blutentnahme vor der Apherese.

	Lagerungszeit [h]				
	Spender	0	24	72	120
	0,85	0,63	0,56	0,52	0,42
	0,51	0,49	0,46	0,38	0,45
	0,51	0,48	0,46	0,41	0,39
	0,74	0,84	0,70	0,75	0,65
Median	0,63	0,56	0,51	0,46	0,43
Mittelwert	0,65	0,61	0,55	0,51	0,48
Standardabweichung	0,17	0,17	0,11	0,17	0,12
Standardfehler	0,08	0,08	0,06	0,08	0,06

Der Page-Trendtest (s. Tabelle 24) bestätigt die Abnahme der Thrombopoetin-Aufnahme im Laufe der Lagerung auf dem 1 %-Signifikanzniveau.

Tabelle 24: Page-Test: Thrombopoetinaufnahme im Übersättigungsbereich pro Thrombozyt

	0	24	72	120
Rangsumme	16	11	8	5
Rang der Rangsumme	4	3	2	1
Rangsummen-Produkt	64	33	16	5
L-Wert	118			
P-Wert	0,01			

Zur Untersuchung, zwischen welchen Zeitpunkten der Lagerung die Internalisierung von Thrombopoetin bei Inkubation im Übersättigungsbereich signifikant abnimmt, wurden mit dem Wilcoxon-Vorzeichenrangtest Einzelvergleiche betrachtet (s. Tabelle 25). Bei einer Stichprobe von $n = 4$ ist das beste erreichbare Signifikanzniveau 0,062. Bereits nach dem ersten Tag der Lagerung war eine auf dem 6,2 %-Niveau signifikante Verringerung der TPO-Elimination auf 0,55 ag pro Plättchen zu verzeichnen.

Tabelle 25: Wilcoxon-Vorzeichenrangtest: Thrombopoetinaufnahme im Übersättigungsbereich

	Spender/0	0/24	0/72	0/120	24/72	72/120
Summe pos./neg. Ränge	7 / -3	10 / 0	10 / 0	10 / 0	8 / -2	8 / -2
T-Wert	3	0	0	0	2	2
P-Wert	0,312	0,062	0,062	0,062	0,188	0,188

Zwischen Thrombozyten im plättchenreichen Plasma aus Spenderblut, die nicht den Apheresevorgang durchlaufen haben, und Plättchen im Thrombozytenpräparat zu Lagerungsbeginn besteht bezüglich der Elimination von Thrombopoetin im Übersättigungsbereich kein signifikanter Unterschied.

Prozentuale Darstellung der Thrombopoetin-Aufnahme im Übersättigungsbereich

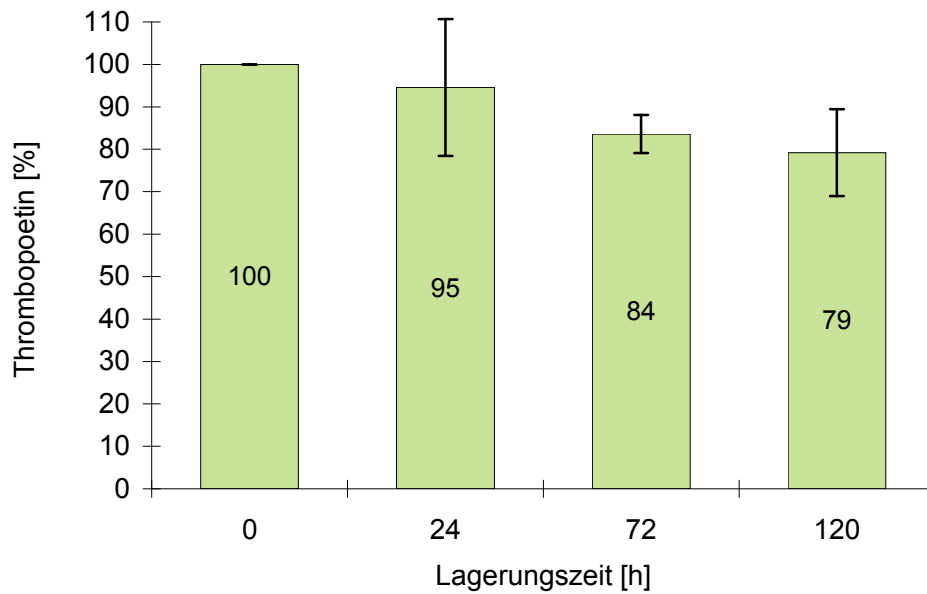


Abbildung 30: Mittlere Thrombopoetin-Aufnahme im Übersättigungsbereich nach einem, drei und fünf Tagen Lagerung prozentual zum Lagerungsbeginn [%]. Die Prozentwerte wurden einzeln berechnet und dann gemittelt. Die Fehlerindikatoren geben die Standardabweichung an.

Tabelle 26: Deskriptive Statistik: Thrombopoetinaufnahme im Übersättigungsbereich pro Thrombozyt prozentual zum Lagerungsbeginn [%]. Die Prozentwerte wurden einzeln berechnet und dann gemittelt.

	Lagerungszeit [h]			
	0	24	72	120
n	4	4	4	4
Median	100	95	84	80
Mittelwert	100	95	84	79
Standardabweichung	0	16	4	10
Standardfehler	0	8	2	5

Die mittlere Elimination von Thrombopoetin pro Plättchen im Übersättigungsbereich lag am Ende des fünften Lagerungstages bei 0,48 ag, bzw. 45 % des in der Lösung enthaltenen Thrombopoetins. Dies entspricht einer Abnahme der Thrombopoetin-Elimination auf 79 % der Aktivität zu Beginn der Lagerung.

4 Diskussion

Verschiedene biochemische und funktionelle In-vitro-Untersuchungsmethoden werden herangezogen, um Aspekte der ‚platelet storage lesion‘ zu erfassen. Die Suche nach adäquaten Verfahren ist Gegenstand aktueller Forschung und die Frage, welche Methoden geeignet sind, Aufschluss über die Qualität von Thrombozytenpräparaten zu geben, wird kontrovers diskutiert. Fast alle Verfahren dokumentieren über die Zeit der Lagerung Zeichen der Plättchenaktivierung und Einbußen der Funktionalität der Thrombozyten. [22, 52, 96, 97]

Die vorliegende Arbeit zeigt eine Anreicherung der aktivierungsabhängig freigesetzten Substanzen sCD40L und Thromboxan B₂ unter dem Einfluss der Herstellung und Lagerung von Thrombozytapheresepräparaten. Der Spiegel von Thrombopoetin hingegen sinkt.

In Aktivierungs- und Inkubationsversuchen zeigte sich im Laufe der Lagerung eine Beeinträchtigung der Plättchenfunktionalität in Einbußen in der exozytotisch-proteolytischen Freisetzung von sCD40L, der enzymatischen Synthese von Thromboxan und der Internalisierung von Thrombopoetin.

4.1 Vergleich des Spenderkollektivs mit Daten aus der Literatur

Die in der vorliegenden Arbeit gemessene mittlere Konzentration von sCD40L im Blut von Thrombozyten- und Plasmaspendern beträgt 176 ± 56 pg/ml. Literaturwerte für den sCD40L-Spiegel Gesunder liegen bei $60 \pm 8,5$ pg/ml [104] bis 180 ± 30 pg/ml [16].

Der mittlere Spiegel von Thromboxan B₂ im Plasma der hier untersuchten Spender wurde bei $0,16 \pm 0,14$ ng/ml bestimmt. Als Referenz werden Werte unter 1 ng/ml im Plasma Gesunder angegeben [102]. Häufiger als die Angabe des Plasmaspiegels findet sich in der Literatur die Nennung der Serumkonzentration von Thromboxan B₂ mit höheren Werten um $119,8 \pm 74,9$ ng/ml bis 327 ± 123 ng/ml [39, 102].

Der mittlere Thrombopoetin-Plasmaspiegel der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Thrombozyten- und Plasmaspender liegt bei 43 ± 21 pg/ml. Er liegt im Normbereich, der in der Literatur für Gesunde mit 20 bis 240 pg/ml angegeben wird [47]. Werte aus ELISA-Tests mit polyklonalen Antikörpern rangierten dabei meist im oberen Referenzbereich, Testkits mit monoklonalen Antikörpern, wie das in dieser Arbeit verwendete, ergaben niedrigere Werte [47].

4.2 Hintergründe und Ursachen der Konzentrationsänderung von sCD40L, Thromboxan B₂ und Thrombopoetin im Thrombozytapheresepräparat während der Herstellung und Lagerung

Die vorliegende Untersuchung weist Veränderungen der Konzentration von sCD40L, Thromboxan und Thrombopoetin bereits im frischen Präparat noch vor der Freigabe zur Transfusion nach. Zu Beginn der Lagerung liegen die Spiegel von Thromboxan B₂ und sCD40L im Präparat signifikant höher als zuvor im Blut der Spender. Die Konzentration von Thrombopoetin liegt nach der Herstellung im Präparat niedriger als zuvor im Blut der Spender.

Im Laufe der anschließenden Lagerung reichern sich sCD40L und Thromboxan B₂ weiter im Thrombozytapheresekonzentrat an. Thrombopoetin hingegen wird schnell aus dem Präparat eliminiert.

Mögliche Ursachen des Anstiegs von sCD40L und Thromboxan B₂

sCD40L und Thromboxan werden aktivierungsabhängig von Thrombozyten freigesetzt (s. 1.4.1 und 1.4.2). Der Anstieg von sCD40L und Thromboxan B₂ in Thrombozytapheresepräparaten kann als Zeichen einer partiellen Aktivierung der Plättchen verstanden werden. Die langsame, partielle Aktivierung von Thrombozyten im Laufe der Lagerung von Thrombozytenpräparaten gilt als ein Aspekt der ‚platelet storage lesion‘ [88]. Eine andere Annahme geht dahin, dass die im Laufe der Lagerung auftretenden Charakteristika der Plättchenaktivierung nicht durch Aktivierung, sondern durch eine langsame Schädigung und Alterung der Plättchen im Thrombozytenkonzentrat bedingt ist [20].

sCD40L ist ein empfindlicher Parameter, dessen Konzentrationsbestimmung im Plasma oder Serum ausgeprägten Schwankungen durch präanalytische Einflüsse unterliegt [104]. Es wird aktivierungsabhängig auf der Thrombozytenoberfläche exprimiert und enzymatisch mittels einer Metalloproteinase in seiner löslichen Form sCD40L freigesetzt [85]. 95 % des sCD40L im Blut stammen aus Thrombozyten [3]. Cognasse et al. [17] und Kaufman et al. [51] beschreiben im Laufe der Lagerung eine Anreicherung von sCD40L in Thrombozyten-Poolpräparaten und in Thrombozytenkonzentrat-Proben, die mittels der PRP-Methode aus Vollblut gewonnen wurden.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass auch im Apherese-Thrombozytenpräparat die Konzentration von sCD40L im Laufe der Lagerung ansteigt. Zudem wird belegt, dass

sich sCD40L bereits während der Herstellung des Thrombozytapheresepräparats, noch vor der Freigabe zur Transfusion, signifikant anreichert. Zum Zeitpunkt der Freigabe des Plättchenpräparats liegt die Konzentration von sCD40L im Mittel um 80 % höher als zuvor im Blut der Spender. Der Anstieg der sCD40L-Konzentration während der Herstellung kann einerseits während der Thrombozytapherese selbst, oder andererseits in der Zeitspanne zwischen der Apherese und der Freigabe stattfinden.

Bei der Untersuchung von Plasmapräparaten war während der Herstellung durch Plasmapherese ein leichter Anstieg der Konzentration von sCD40L zu verzeichnen (s. Abbildung 19). Die Plasmapherese, im Gegensatz zur Thrombozytapherese, führt zur Separation des Plasmas von allen zellulären Bestandteilen, einschließlich der Thrombozyten. Der erhöhte Spiegel von sCD40L im Plasmapräparat ist am ehesten durch die Freisetzung der Substanz durch aktivierte oder geschädigte Plättchen während der Apherese erklärbar, da danach Plasma und Thrombozyten voneinander getrennt sind. So lässt sich abschätzen, dass die Apheresetechnik zu einer geringfügigen Erhöhung des Spiegels von sCD40L führt. Bezogen auf die Apherese zur Thrombozytengewinnung bedeutet dies, dass die Apherese selbst einen vernachlässigbaren Anteil des sCD40L-Anstiegs im Thrombozytapheresekonzentrat vor der Freigabe ausmacht. Der größere Anteil des frühen Konzentrationsanstiegs von sCD40L liegt in Veränderungen im Präparat nach der Apherese.

Auch die Konzentration von Thromboxan B₂ steigt bereits während der Herstellung von Thrombozytapheresekonzentraten im Mittel auf das 8,6-fache des Blutspiegels der Spender. Im Plasmapheresepräparat liegt der Thromboxan B₂-Spiegel nach der Herstellung im Mittel 3,5-mal höher als im Spenderblut. Auch für Thromboxan gilt also, dass der größere Teil des im Rahmen der Herstellung beobachteten Konzentrationsanstiegs nach der Apherese im frischen Präparat stattfinden muss.

Im Laufe der anschließenden Lagerung reichern sich sCD40L und Thromboxan B₂ weiter im Thrombozytapheresepräparat an. Thromboxan ist einer der stärksten Thrombozytenaktivatoren. Freigesetztes Thromboxan bewirkt auto- und parakrin eine weitere Plättchenaktivierung. Prasad et al. zeigten, dass auch sCD40L als Plättchenagonist wirken und zur Aktivierung von Thrombozyten führen kann [83].

Diese Mechanismen können die Plättchenaktivierung und die weitere Anreicherung von sCD40L und Thromboxan B₂ im Laufe der Lagerung verstärken.

Die Anreicherung von sCD40L und Thromboxan B₂ im Präparat im Laufe der Lagerung, als Zeichen einer fortgesetzten partiellen Aktivierung oder einer Schädigung der Plättchen, steht in Übereinstimmung mit der ‚platelet storage lesion‘ [86]. Untersuchungen anderer Plättchenaktivierungsmarker, wie der Expression und Anreicherung von CD62P und der Expression und Konformationsänderung von GPIIb/IIIa, bestätigen, dass im Laufe der Lagerung eine partielle Aktivierung oder eine Schädigung der Plättchen auftritt [20, 60, 71, 88].

Hintergründe der Elimination von Thrombopoetin

Thrombopoetin wird nach seiner Bindung an den Mpl-Rezeptor auf der Oberfläche von Thrombozyten internalisiert und abgebaut (s. 1.4.3). Schon während der Apherese sinkt die Konzentration auf ein Zehntel des Spiegels im Spenderblut. Nach zwölfstündiger Lagerung war mittels des verwendeten ELISA in keinem der untersuchten Präparate Thrombopoetin nachweisbar (s. Abbildung 23). Die Ergebnisse der Inkubationsversuche zeigen, dass im frischen Präparat bei fünfstündiger Inkubation im Übersättigungsbereich bei 600 pg/ml pro Plättchen im Mittel 65 ag Thrombopoetin aufgenommen werden (s. 3.2.3). Bei einer angenommenen Thrombozytenzahl im Präparat von 1.000.000 pro Mikroliter beträgt die Internalisierungs-Kapazität der Plättchen ein Vielfaches des im Thrombozytenkonzentrat vorhandenen Thrombopoetins. Dies erklärt die schnelle Elimination von Thrombopoetin aus dem Thrombozytapheresepräparat.

4.3 Die Auswirkungen von Herstellung und Lagerung auf die Funktionalität von Plättchen im Thrombozytapheresepräparat

Die Auswirkungen der Herstellung

Zwischen mittels Zentrifugation aus Spenderblut gewonnen Plättchen und Plättchen im Präparat zum Zeitpunkt der Freigabe zeigt sich in der mittleren Freisetzung von sCD40L und Thromboxan bei Aktivierung und Bildung eines Thrombus kein signifikanter Unterschied. Auch die bei Inkubation im Übersättigungsbereich pro Plättchen abgebaute Menge Thrombopoetin unterscheidet sich zwischen Thrombozyten aus Spenderblut und aus dem Präparat zum Zeitpunkt der Freigabe nicht wesentlich.

Beim Vergleich von Spenderblut und Präparat ist zu berücksichtigen, dass auch Plättchen, die durch Zentrifugation aus Vollblut gewonnen werden, bei ihrer Separation aktivierenden oder anderweitigen schadhaften Einflüssen ausgesetzt sein können und möglicherweise nicht dem Zustand im Blut der Spender entsprechen.

Die Auswirkungen der Lagerung

Die Lagerung von Thrombozytapheresepräparaten geht mit Einbußen der Plättchenfunktionalität einher. Bereits nach den ersten 24 Stunden der Lagerung ist die Aktivität der Thrombozyten bezüglich der hier untersuchten Funktionen signifikant niedriger als zu Beginn der Lagerung. Am Ende der fünftägigen Lagerungszeit ist die Elimination von Thrombopoetin auf 79 % und die Freisetzung von sCD40L und Thromboxan auf unter 60 % des Wertes im frischen Präparat zum Zeitpunkt der Freigabe gesunken.

sCD40L wird aktivierungsabhängig an die Thrombozytenoberfläche transloziert und enzymatisch mittels einer Metalloproteinase in seiner löslichen Form sCD40L freigesetzt (s. 1.4.2). Die im Laufe der Lagerung beobachtete Abnahme der sCD40L-Freisetzung bei Aktivierung und Thrombusbildung kann demnach entweder in einer Abnahme der aktivierungsabhängiger Expression von CD40L auf der Oberfläche der Thrombozyten, oder in einer verminderten Aktivität der Metalloproteinase begründet sein. Geht man davon aus, dass in den kernlosen Plättchen keine Neusynthese von CD40L stattfindet, kann eine mögliche Abnahme der sCD40L-Expression nicht durch eine Beeinträchtigung der Proteinbiosynthese während der Lagerung verursacht sein. Allerdings ist bekannt,

dass Thrombozyten mittels mRNA aus Megakaryozyten in der Lage sind, Eiweiße wie Fibrinogen, Thrombospondin, Albumin, GPIIb/IIIa und kontraktile Proteine herzustellen [105]. Bei der Plättchenaktivierung ablaufende intrazelluläre Signalkaskaden vermitteln eine signalabhängige Translation. Einige Proteine, z.B. Interleukin-1 β werden so bei der Thrombozytenaktivierung vermehrt synthetisiert [67]. Darüber, ob auch sCD40L in Plättchen synthetisiert wird, ist in der Literatur keine Angabe zu finden.

Die Ursache der Abnahme der aktivierungsabhängigen Expression von sCD40L kann auch in der Beeinträchtigung von Signalwegen, die die Plättchenaktivierung vermitteln, liegen. Dies liegt nahe, da die Sekretion des ebenfalls aktivierungsabhängig freigesetzten Thromboxans in einem ähnlichen Ausmaße wie die Freisetzung von sCD40L beeinträchtigt ist.

Böck et al. geben für die Thromboxanfreisetzung nach Stimulation von Apherese-Plättchen mit Kollagen für frische Präparate zu Lagerungsbeginn 1024 ± 48 ng/ml, entsprechend 706 ag pro Thrombozyt und am Ende der Lagerungszeit 792 ± 143 ng/ml, entsprechend 546 ag pro Thrombozyt an [7]. Die in dieser Arbeit beobachtete Thromboxanfreisetzung nach Calciumzusatz lag etwas höher (1145 ± 155 ag pro Thrombozyt zu Beginn gegenüber 654 ± 70 ag am Ende der Lagerung).

Thrombozyten haben einen aktiven und komplexen Fettstoffwechsel. Sie sind in der Lage, Lipide zu synthetisieren und zu metabolisieren. Thromboxan wird aktivierungsabhängig aus Arachidonsäure, die aus Membranphospholipiden freigesetzt wird, synthetisiert (s. 1.4.1). Hamid et al. zeigten, dass Thrombozyten während dreitägiger Lagerung ca 10% ihrer Membranphospholipide verlieren, sahen in dieser Veränderung der Membran aber nicht eine Ursache der Beeinträchtigung der Plättchenfunktionalität [35].

Cesar et al. belegten in Versuchen mit radioaktiv markierter Arachidonsäure, dass gelagerte Plättchen nach Stimulation mit Thrombin weniger Arachidonsäure aus Phospholipiden freisetzen als frische. Bei unveränderter Lipidzusammensetzung der Membran führten sie die Abnahme der Arachidonsäure-Freisetzung auf eine Beeinträchtigung der Signal- und Enzymkaskaden, die die Freisetzung und den weiteren

Stoffwechsel von Arachidonsäure regulieren, zurück. Sie stellten keine Einbußen durch die Herstellung von Thrombozytenpräparaten mittels der PRP-Methode fest [14].

Thrombozyten binden, internalisieren und zersetzen Thrombopoetin in vivo und in vitro. Transfundierte Thrombozyten senken den erhöhten Thrombopoetinspiegel im Blut thrombozytopenen Empfänger [72]. Dabei steigt der Thrombopoetiningehalt in den transfundierten Plättchen in den ersten zehn Minuten nach der Transfusion an und stabilisiert sich nach ein bis drei Stunden der Inkubation auf einem Plateau. Dies impliziert, dass sich ein Gleichgewicht zwischen der Aufnahme und dem Abbau von Thrombopoetin einstellt, der Vorgang der TPO-Elimination also sättigbar ist. [29]

Auch in vitro eliminieren Thrombozyten Thrombopoetin [10, 25, 26]. Li et al. zeigten, dass bei Inkubation von plättchenreichem Plasma mit hochkonzentriertem Thrombopoetin die größte Abnahme des TPO-Spiegels in den ersten drei Stunden der Inkubation stattfindet. Untersuchungen mit radioaktiv markiertem Thrombopoetin demonstrieren, dass nach 30-minütiger Inkubation mit Thrombopoetin im Übersättigungsbereich 70 - 80 % aller mit TPO besetzten Rezeptoren internalisiert sind, und dass die verbleibenden Rezeptoren auch nach längerer Inkubationszeit an der Plättchenoberfläche verweilen. Einmal internalisierte Rezeptoren werden nicht wieder an der Oberfläche exprimiert. [66]

Die Angabe der Zahl der Thrombopoetinrezeptoren pro Thrombozyt in der Literatur reicht von 30 ± 9 [10] bis 95 [26] Bindungsstellen. Li et al. geben eine Zahl von 56 Rezeptoren und eine totale Bindungskapazität für Thrombopoetin von 1,25 ag pro Plättchen an, ermittelt bei fünfstündiger Inkubation mit einer Lösung rekombinanten Thrombopoetins der Konzentration 1500 pg/ml. Dies entspricht der Elimination von 65 % des gelösten Thrombopoetins. [66]

Diese Daten sind vergleichbar mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit. Bei der Untersuchung von Plättchen aus Spenderblut, die durch zehnminütige sanfte Zentrifugation separiert worden waren, zeigte sich während fünfstündiger Inkubation mit einer 600 pg/ml konzentrierten Lösung rekombinanten Thrombopoetins eine Elimination von 60 % des TPO aus der Probe.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass die Freisetzung von sCD40L und die Sekretion von Thromboxan im Laufe der Lagerung prozentual in einem gleich großen Ausmaß beeinträchtigt werden. Das Ausmaß von Plättchenaktivierung und ‚platelet storage lesion‘ im Laufe der Herstellung und Lagerung wird von individuellen Voraussetzungen der Spender mitbestimmt [30, 42]. Die Thromboxan- und sCD40L-Freisetzung wurde in der vorliegenden Untersuchung in Proben derselben Spender bestimmt.

Möglicherweise beeinflussen sich Thromboxan- und sCD40L-Freisetzung bei der Plättchenaktivierung gegenseitig. Enomoto et al. beispielsweise zeigten, dass bei der Aktivierung von Thrombozyten über GPIIb/IX/V die Freisetzung von sCD40L durch Thromboxan induziert wird [23].

Untersuchungen der Plättchenfunktion mittels anderer aktivierungsabhängiger Parameter ergaben den Resultaten dieser Arbeit vergleichbare Ergebnisse. Curvers et al. zeigten, dass im Laufe der Lagerung von Thrombozytapheresepräparaten die Expression von CD62P bei Plättchenaktivierung durch Stimulation mit Thrombin abnimmt. Beim Vergleich von Plättchen aus Spenderblut mit Plättchen aus dem frischen Apheresepräparat fanden auch sie keine signifikante Abnahme der Thrombozytenaktivität [20].

Da sowohl sCD40L als auch Thromboxan aktivierungsabhängig freigesetzt werden, liegt der Schluss nahe, dass intrazelluläre Signalwege, die die Plättchenaktivierung vermitteln, während der Lagerung gestört werden. Bei der Freisetzung beider Substanzen spielen die Aktivität der Phospholipase C und der Anstieg des freien Calciums als ‚second messenger‘ eine Rolle. Schubert et al. beschrieben, dass Proteinkinasen, die durch Phosphorylierung von Proteinen in die Signaltransduktion eingreifen, bei der Entstehung von Lagerungsschäden mitwirken [95].

Calcium ist ein wichtiger ‚second messenger‘ bei der Plättchenaktivierung. Curvers et al. beurteilten die Signaltransduktion von Thrombozyten anhand ihrer Kapazität zur Mobilisation von Calcium aus intrazellulären Speichern bei Stimulation mit verschiedenen Agonisten, die an G-Protein-gekoppelte Rezeptoren oder Rezeptor-Tyrosinkinasen binden. Sie stellten zwischen frischen Plättchen aus Spenderblut und Plättchen aus Apheresepräparaten am ersten Lagerungstag eine leichte, statistisch nicht signifikante Abnahme der Calciumantwort fest. Nach viertägiger Lagerung war die intrazelluläre Calciumfreisetzung nach Agonistenstimulation signifikant erniedrigt.

Curvers et al. sehen eine der wichtigsten Auswirkungen der Lagerung in einer per se verringerten Aktivierbarkeit der Plättchen durch Alterung und Schädigung und nicht in einer aufgrund vorheriger partieller Aktivierung erniedrigten Ansprechbarkeit der Plättchen [20].

Die Beeinträchtigung aktivierender Signalwege kann aber nur einen Teil der beobachteten Aktivitätseinbußen erklären, denn auch bei der Internalisierung von Thrombopoetin, einem aktivierungsunabhängigen Prozess, treten im Laufe der Lagerung Einbußen auf.

Alle drei untersuchten Plättchenfunktionen sind energieabhängige Prozesse. Eine Beeinträchtigung des Energiestoffwechsels der Plättchen könnte die Funktionalitätsabnahme erklären. Diese Annahme wird durch Untersuchungen gestützt, die belegen, dass der ATP-Gehalt der Plättchen im Laufe der Lagerung auf ca 60 % des Wertes frischer Plättchen abnimmt [45, 68, 77].

Die in dieser Arbeit vorgenommene Untersuchung vermag nicht zu differenzieren, ob der beobachteten Reduktion der Plättchenaktivität im Thrombozytenkonzentrat eine Abnahme der Aktivität des einzelnen Plättchens, oder eine Verringerung der Gesamtzahl funktionsfähiger Thrombozyten zu Grunde liegt. Zirkulierende Plättchen haben eine Lebensdauer von 10 Tagen. Bei Lagerung in vitro bei 22°C ist die Alterung, verglichen mit physiologischen Bedingungen, etwa halbiert [44], dennoch ist ein signifikanter Teil der Plättchen im Präparat mit Ende der Lagerungszeit am Ende seiner Lebenszeit [20]. Wang et al. zeigten in durchflusszytometrischen Untersuchungen, dass im Laufe der Lagerung die Zahl von Thrombozyten, die nach Stimulation mit Thrombin CD62P auf ihrer Oberfläche exprimieren, abnimmt [101]. Es kann angenommen werden, dass sowohl die Reduktion der Aktivität des einzelnen Plättchens, als auch die Abnahme der Gesamtzahl funktionsfähiger Thrombozyten eine Rolle spielen.

4.4 Die Bedeutung der Veränderungen für die klinische Qualität von Thrombozytapheresepräparaten

Die Herstellung von Thrombozytapheresekonzentraten geht zwar, wie der Anstieg der aktivierungsabhängig freigesetzten Substanzen sCD40L und Thromboxan B₂ im Präparat zeigt (s. 4.2), mit einer partiellen Plättchenaktivierung einher, beeinträchtigt aber nicht die Funktionalität der Thrombozyten bezüglich der drei getesteten Substanzen.

Während der darauf folgenden Lagerung reichern sich beide Substanzen im Thrombozytapheresepräparat an. Der Anstieg von Thromboxan B₂ und sCD40L, der bei Induktion der Gerinnungs- und Plättchenaktivierung mit Bildung eines Thrombus erreicht wird, beträgt ein Vielfaches des ‚spontanen‘ Konzentrationsanstiegs im Präparat von Beginn bis Ende der Lagerung. Die ‚spontane‘ Plättchenaktivierung im Laufe der Lagerung ist also als relativ geringfügig zu bewerten.

Dennoch wirft die Beobachtung einer partiellen Aktivierung der Plättchen während der Herstellung und Lagerung von Thrombozytenkonzentraten die Frage auf, was diese Veränderung für den klinischen Einsatz und den Transfusionserfolg bedeuten. Die Expression von Phosphatidylserin und CD62P führt zu einer schnelleren Elimination der Plättchen aus der Zirkulation durch Makrophagen. Wenn aktivierte Plättchen schneller aus der Zirkulation entfernt werden, schränkt dies ihre Eignung für den prophylaktischen Einsatz ein. In einer akuten Blutungssituation hingegen könnte der aktivierte Zustand der Plättchen von Vorteil für die schnelle Sicherung der Blutgerinnung sein, wie es bei Patienten mit herzchirurgischen Eingriffen beschrieben ist [58].

Auch am Ende der zulässigen Lagerungszeit der Thrombozytenkonzentrate reagieren die Plättchen auf die Zugabe von Calcium mit der Bildung eines Thrombus und der Freisetzung von sCD40L und Thromboxan, aber die Messungen zeigten eine Abnahme der Aktivität der Freisetzungsprozesse im Laufe der Lagerungszeit. Die freigesetzte Menge der beiden Substanzen liegt am Ende der zulässigen Lagerungszeit bei knapp unter 60% des Wertes aus dem frischen Präparat.

Trotz der Schädigungen und funktionellen Einschränkungen der Thrombozyten, die sich im Laufe der Lagerung im Thrombozytapheresekonzentrat einstellen, zeigen Apherese-Plättchen in Radiomarkierungsstudien auch nach fünftägiger Lagerung eine akzeptable

Wiederfindungsrate. AuBuchon et al. beschreiben eine Wiederfindungsrate für Plättchen in frischen Apheresepräparaten von fast 75 %. Nach fünftägiger Lagerung liegt sie bei 58 % der transfundierten Thrombozyten [4]. Dies entspricht einer Abnahme um 22 % des mit frischen Präparaten erzielten Wertes. Die hohe Wiederfindungsrate frischer Aphereseplättchen spricht dafür, dass die in vitro festgestellten Veränderungen nicht mit einer gleichermaßen ausgeprägten Beeinträchtigung der Plättchen in vivo nach der Transfusion einhergehen.

Viele der in vitro im Rahmen der ‚platelet storage lesion‘ auftretenden Lagerungsschäden und Funktionalitätsseinbußen sind reversibel. Rinder et al. zeigten, dass sich eine Reihe von Plättcheneigenschaften und -funktionen, die bei der Lagerung hochkonzentrierter Thrombozytenkonzentrate beeinträchtigt werden, nach Zugabe autologen Plasmas erholen. Das gilt unter anderem für den ‚morphology score‘, die spontane GPIIb/IIIa-Expression und die Sekretionsreaktion von α -Granula bei Stimulation mit Plättchenagonisten, die sich in der Expression von CD62P zeigt. [89]

Die beobachtete Anreicherung von sCD40L ist für die Qualität der Präparate von Bedeutung, da eine hohe Konzentration von löslichem CD40-Liganden in Thrombozytenpräparaten mit der Pathogenese von Transfusionskomplikationen wie fieberhaften Transfusionsreaktionen und transfusions-assoziiertem akuten Lungenversagen (TRALI) in Verbindung gebracht wird [6, 17, 57, 82]. Febrile nicht-hämolytische Transfusionsreaktionen treten bei Thrombozytentransfusionen recht häufig auf und gehen mit Fieber, Schüttelfrost und Muskelrigidität einher [38].

Das von Thrombozyten freigesetzte sCD40L ist biologisch aktiv [64] und in der Lage, immunologische Wirkungen zu entfalten [57]. In der vorliegenden Arbeit wurde am Ende der Lagerungszeit in Thrombozytapheresepräparaten eine durchschnittliche Konzentration von sCD40L von knapp 3000 pg/ml nachgewiesen. Sie liegt damit in der gleichen Größenordnung wie die Konzentration im Plasma von Patienten mit einer chronischen Entzündung [21, 24]. Der Anreicherung von Zytokinen, die durch Leukozyten freigesetzt werden, wird durch standardmäßige Leukozyten-Depletion von Thrombozytenkonzentraten vorgebeugt [11]. Um die Belastung von Thrombozytapheresekonzentraten mit sCD40L möglichst gering zu halten, empfiehlt sich die Transfusion möglichst frischer Präparate.

4.5 Die Eignung der Methoden zur Qualitätskontrolle von Thrombozytenpräparaten

Aktuell werden zur routinemäßigen Qualitätskontrolle jedes Thrombozytenkonzentrats lediglich die Untersuchung der Thrombozytenzahl und der Test auf Swirling angewendet. Regelmäßig muss zudem ein Prozent der hergestellten Präparate auf pH-Wert, Resterythrozyten- und -leukozyten und Sterilität hin geprüft werden [11]. In der routinemäßigen Prüfung von Thrombozytenkonzentraten wird derzeit kein funktioneller Test eingesetzt.

In der Forschung und bei der Validierung neuer Verfahren der Herstellung oder Lagerung von Thrombozytenkonzentraten werden verschiedene biochemische und funktionelle Tests herangezogen (s. 1.3.2). Hier hat sich z.B. die Bestimmung der Expression von CD62P etabliert. Andere aufwändige Verfahren sind der ‚morphology score‘, dessen Ermittlung geschultes Personal erfordert und subjektiv ist, und die ‚hypotone Schock-Resistenz‘. Auch invasive In-vivo-Methoden, wie die Bestimmung der Wiederfindungsrate radioaktiv markierter Thrombozyten im Empfängerorganismus, finden hier Anwendung.

Die in der vorliegenden Arbeit vorgestellten Verfahren für die funktionelle Untersuchung von Thrombozyten zeigen eine Abnahme der Kapazität gelagerter Plättchen zur exozytotisch-proteolytischen Freisetzung von sCD40L, enzymatischen Synthese von Thromboxan und Aufnahme von Thrombopoetin.

Die Freisetzungskapazität für Signalstoffe und die Aktivität von Internalisierungsprozessen können als ein Maß für die Zellaktivität der Plättchen angesehen werden.

Die beschriebenen Methoden dokumentieren eine Beeinträchtigung der Plättchenfunktionalität, deren Ausmaß vergleichbar mit den Ergebnissen von anderen in der Literatur beschriebenen Untersuchungsverfahren ist.

Die drei in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Verfahren zur Testung der Plättchenfunktionalität erweisen sich als praktikabel für den Routineeinsatz, da sie objektiv sind, und durch den Einsatz eines automatisiert ablaufenden ELISA in der Praxis leicht durchführbar sind.

5 Zusammenfassung

Nach den ‚Richtlinien zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten (Hämotherapie)‘ dürfen Thrombozytenkonzentrate nach ihrer Herstellung vom Zeitpunkt der Freigabe zur Transfusion an bis zu fünf Tage lang gelagert und an Patienten transfundiert werden. Während der Herstellung und Lagerung treten Veränderungen und Beeinträchtigungen der Thrombozytenpräparate auf, die in ihrer Gesamtheit unter dem Begriff ‚platelet storage lesion‘ zusammengefasst werden. Verschiedene biochemische, morphologische und funktionelle Tests werden zur Erfassung der Qualität von Thrombozytenkonzentraten und zur Charakterisierung der Lagerungsschäden eingesetzt. In der Routinetestung findet bisher kein funktioneller Test Anwendung.

sCD40L ist das lösliche Spaltprodukt des CD40-Liganden. Es wird bei der Plättchenaktivierung exozytotisch-proteolytisch freigesetzt. Thromboxan wird, ebenfalls aktivierungsabhängig, aus Membranlipiden synthetisiert. Thrombopoetin, der wichtigste Wachstumsfaktor der Thrombopoese, wird durch Thrombozyten internalisiert.

In dieser Arbeit wird der Verlauf der Konzentrationen von sCD40L, Thromboxan B₂ und Thrombopoetin in Thrombozytapheresepräparaten während ihrer Herstellung und über die Zeit der Lagerung charakterisiert.

Als funktionelle Tests wurden die Kapazität der Plättchen, bei Aktivierung und Thrombusbildung Thromboxan und sCD40L freizusetzen, sowie im Übersättigungsbereich Thrombopoetin zu internalisieren, über die Lagerungszeit betrachtet. sCD40L und Thrombopoetin wurden mittels ELISA-Tests und der stabile Thromboxan-Metabolit, Thromboxan B₂ mit einem Radio-Immunoassay quantifiziert.

Die Spiegel der drei Substanzen im Blut der Thrombozytenspender lagen im in der Literatur angegebenen Normbereich. Die Konzentrationen von sCD40L und Thromboxan im Präparat waren bereits zum Zeitpunkt der Freigabe zur Transfusion signifikant höher als im Blut der Spender. Im Laufe der Lagerung reicherten sich beide Substanzen weiter im Thrombozytapheresepräparat an. Bis zum Ende der zur Transfusion zulässigen Lagerungszeit war Thromboxan bis auf das 1,7-fache und

sCD40L auf das 8,4 fache der jeweiligen Konzentration vom Lagerungsbeginn gestiegen. Thrombopoetin hingegen wurde schnell aus dem Präparat eliminiert und war nach 24-stündiger Lagerung mittels des verwendeten Tests in keinem Präparat mehr nachweisbar.

Die Plättchen zeigten zum Zeitpunkt der Freigabe im Vergleich zu Thrombozyten aus dem Blut der Spender keine signifikanten Einbußen der getesteten Funktionen. Im Laufe der weiteren Lagerung zeigten sich Beeinträchtigungen sowohl bei der Freisetzung von Thromboxan und sCD40L als auch beim Abbau von Thrombopoetin. Bis zum Ende der Lagerungszeit nahm die Freisetzung von sCD40L und Thromboxan bei Plättchenaktivierung und Thrombusbildung auf unter 60% der Werte vom Lagerungsbeginn ab. Die Abbau-Kapazität für Thrombopoetin sank bis zum Ende des fünften Lagerungstages auf 79% des Werts vom Lagerungsbeginn.

Der Anstieg von sCD40L und Thromboxan B₂ ist Zeichen einer partiellen Plättchenaktivierung, die einen bekannten Aspekt der ‚platelet storage lesion‘ darstellt. Insbesondere die Anreicherung von sCD40L im Präparat ist klinisch relevant, da sCD40L im Empfängerorgansimus immunologisch aktiv ist und mit Transfusionszwischenfällen assoziiert wird.

Die beobachteten Einbußen der Plättchenfunktionalität stehen im Einklang mit den Ergebnissen anderer Untersuchungsmethoden zur Erfassung von Lagerungsschäden und Thrombozytenqualität und bewegen sich in einer ähnlichen Größenordnung.

Die Methoden scheinen geeignet, Aufschluss über die Qualität der Plättchen zu geben. Sie sind, im Gegensatz zur bislang in der Routinetestung jedes Präparates eingesetzten Prüfung des Swirling, objektiv und, beispielsweise durch Einsatz automatisierter Verfahren, praktikabel für den Routineeinsatz.

6 Anhang

Abkürzungsverzeichnis

ACD	acid citrat dextrose
ADP	Adenosindiphosphat
CCI	corrected count increment
GP	Glykoprotein
MCS+	Mobile Collection System +
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
PRP	plättchenreiches Plasma
RIA	Radio-Immunoassay
sCD40L	soluble CD40-Ligand
TPO	Thrombopoetin
TRALI	Transfusion related lung Injury
TXB₂	Thromboxan B ₂
VWF	Von-Willebrand-Faktor
WHO	World Health Organisation

Literaturverzeichnis

- 1 Akkerman JW (2006). *Thrombopoietin and platelet function*. Semin Thromb Hemost 32(3): 295-304.
- 2 Anand SX, Viles-Gonzalez JF, Badimon JJ et al. (2003). *Membrane-associated CD40L and sCD40L in atherothrombotic disease*. Thromb Haemost 90(3): 377-384.
- 3 Andre P, Nannizzi-Alaimo L, Prasad SK et al. (2002). *Platelet-derived CD40L: the switch-hitting player of cardiovascular disease*. Circulation 106(8): 896-899.
- 4 AuBuchon JP, Herschel L, Roger J et al. (2004). *Preliminary validation of a new standard of efficacy for stored platelets*. Transfusion 44(1): 36-41.
- 5 Bertolini F and Murphy S (1996). *A multicenter inspection of the swirling phenomenon in platelet concentrates prepared in routine practice*. Biomedical Excellence for Safer Transfusion (BEST) Working Party of the International Society of Blood Transfusion. Transfusion 36(2): 128-132.
- 6 Blumberg N, Gettings KF, Turner C et al. (2006). *An association of soluble CD40 ligand (CD154) with adverse reactions to platelet transfusions*. Transfusion 46(10): 1813-1821.
- 7 Bock M, Glaser A, Pfosser A et al. (1993). *Storage of single-donor platelet concentrates: metabolic and functional changes*. Transfusion 33(4): 311-315.
- 8 Bortz J (1998). *Kurzgefaßte Statistik für die klinische Forschung ein praktischer Leitfaden für die Analyse kleiner Stichproben; mit 90 Tab.* Heidelberg Berlin [u.a.], Springer.
- 9 Bortz J, Lienert GA and Boehnke K (2008). *Verteilungsfreie Methoden in der Biostatistik : mit 247 Tabellen und 47 Tafeln.* Heidelberg, Springer-Medizin-Verl.
- 10 Broudy VC, Lin NL, Sabath DF et al. (1997). *Human platelets display high-affinity receptors for thrombopoietin*. Blood 89(6): 1896-1904.
- 11 Bundesärztekammer (2008). *Richtlinien zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten (Hämotherapie) aufgestellt gemäß Transfusionsgesetz von der Bundesärztekammer im Einvernehmen mit dem Paul-Ehrlich-Institut; Gesamtnovelle 2005; mit Änderungen und Ergänzungen 2007; 15 Tab.* Köln, Deutscher Ärzte-Verlag.
- 12 Bundesärztekammer (2009). *Querschnitts-Leitlinien zur Therapie mit Blutkomponenten und Plasmaderivaten mit 19 Tabellen herausgegeben von der Bundesärztekammer.* Köln, Deutscher Ärzte-Verlag.
- 13 Cardigan R, Turner C and Harrison P (2005). *Current methods of assessing platelet function: relevance to transfusion medicine*. Vox Sang 88(3): 153-163.
- 14 Cesar JM and Navarro JL (1990). *Arachidonic acid metabolism in platelets stored for 5 days*. Br J Haematol 74(3): 295-299.
- 15 Chen J, Herceg-Harjacek L, Groopman JE et al. (1995). *Regulation of platelet activation in vitro by the c-Mpl ligand, thrombopoietin*. Blood 86(11): 4054-4062.
- 16 Chew M, Rahman M, Ihrman L et al. *Soluble CD40L (CD154) is increased in patients with shock*. Inflamm Res.
- 17 Cognasse F, Boussoulade F, Chavarin P et al. (2006). *Release of potential immunomodulatory factors during platelet storage*. Transfusion 46(7): 1184-1189.
- 18 Cognasse F, Osselaer JC and Garraud O (2007). *Les cytokines des plaquettes et leurs effets lors des transfusions de concentrés de plaquettes*. Transfus Clin Biol 14(1): 69-78.

- 19 Colman RW, Clowes AW, George JN et al. (2006). *Overview of hemostasis*. Hemostasis and thrombosis. Basic principles and clinical practice. Colman RW. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins: XV, 1827 S.
- 20 Curvers J, van Pampus EC, Feijge MA et al. (2004). *Decreased responsiveness and development of activation markers of PLTs stored in plasma*. Transfusion 44(1): 49-58.
- 21 Danese S, Katz JA, Saibeni S et al. (2003). *Activated platelets are the source of elevated levels of soluble CD40 ligand in the circulation of inflammatory bowel disease patients*. Gut 52(10): 1435-1441.
- 22 Devine DV and Serrano K *The platelet storage lesion*. Clin Lab Med 30(2): 475-487.
- 23 Enomoto Y, Adachi S, Matsushima-Nishiwaki R et al. *Thromboxane A(2) promotes soluble CD40 ligand release from human platelets*. Atherosclerosis 209(2): 415-421.
- 24 Falco A, Romano M, Iapichino L et al. (2004). *Increased soluble CD40 ligand levels in cystic fibrosis*. J Thromb Haemost 2(4): 557-560.
- 25 Fielder PJ, Gurney AL, Stefanich E et al. (1996). *Regulation of thrombopoietin levels by c-mpl-mediated binding to platelets*. Blood 87(6): 2154-2161.
- 26 Fielder PJ, Hass P, Nagel M et al. (1997). *Human platelets as a model for the binding and degradation of thrombopoietin*. Blood 89(8): 2782-2788.
- 27 FitzGerald GA (1991). *Mechanisms of platelet activation: thromboxane A2 as an amplifying signal for other agonists*. Am J Cardiol 68(7): 11B-15B.
- 28 Fleschutz F (2008). *Dissertation. Bestimmung der Serumspiegel von Thrombopoietin und Erythropoietin bei Erst-, Vollblut und Thrombozytapheresespendern*. Institut für Hämostaseologie und Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Düsseldorf.
- 29 Folman CC, de Jong SM, de Haas M et al. (2001). *Analysis of the kinetics of TPO uptake during platelet transfusion*. Transfusion 41(4): 517-521.
- 30 Garner SF, Jones CI, Stephens J et al. (2008). *Apheresis donors and platelet function: inherent platelet responsiveness influences platelet quality*. Transfusion 48(4): 673-680.
- 31 Gawaz MP (1999). *Das Blutplättchen Physiologie, Pathophysiologie, Membranrezeptoren, antithrombozytäre Wirkstoffe und antithrombozytäre Therapie bei koronarer Herzerkrankung*. Stuttgart New York, Thieme.
- 32 George JN and Colman RW (2006). *Overview of platelet structure and function*. Hemostasis and thrombosis. Basic principles and clinical practice. Colman RW. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins: XV, 1827 S.
- 33 Haemonetics GmbH (2001). *Handbuch*.
- 34 Hamberg M, Svensson J and Samuelsson B (1975). *Thromboxanes: a new group of biologically active compounds derived from prostaglandin endoperoxides*. Proc Natl Acad Sci U S A 72(8): 2994-2998.
- 35 Hamid MA, Kunicki TJ and Aster RH (1980). *Lipid composition of freshly prepared and stored platelet concentrates*. Blood 55(1): 124-130.
- 36 Harbrecht U (1999). *Die Thrombozytenaggregation: Physiologie und Biochemie. Hämostaseologie. Molekulare und zelluläre Mechanismen, Pathophysiologie und Klinik*. Müller-Berghaus G PB. Berlin, Springer Verlag.
- 37 Hartley PS (2007). *Platelet senescence and death*. Clin Lab 53(3-4): 157-166.

- 38 Heddle NM, Klama LN, Griffith L et al. (1993). *A prospective study to identify the risk factors associated with acute reactions to platelet and red cell transfusions*. Transfusion 33(10): 794-797.
- 39 Hedegaard SS, Hvas AM, Grove EL et al. (2009). *Optical platelet aggregation versus thromboxane metabolites in healthy individuals and patients with stable coronary artery disease after low-dose aspirin administration*. Thromb Res 124(1): 96-100.
- 40 Henseler O, Heiden M, Haschberger B et al. (2009). *Bericht zur Meldung nach § 21 Transfusionsgesetz (TFG) für das Jahr 2007*. Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz 52(7): 715-731.
- 41 Hermann A, Rauch BH, Braun M et al. (2001). *Platelet CD40 ligand (CD40L)--subcellular localization, regulation of expression, and inhibition by clopidogrel*. Platelets 12(2): 74-82.
- 42 Holme S (1998). *Storage and quality assessment of platelets*. Vox Sang 74 Suppl 2: 207-216.
- 43 Holme S (2008). *In vitro assays used in the evaluation of the quality of stored platelets: correlation with in vivo assays*. Transfus Apher Sci 39(2): 161-165.
- 44 Holme S and Heaton A (1995). *In vitro platelet ageing at 22 degrees C is reduced compared to in vivo ageing at 37 degrees C*. Br J Haematol 91(1): 212-218.
- 45 Holme S, Heaton WA and Courtright M (1987). *Platelet storage lesion in second-generation containers: correlation with platelet ATP levels*. Vox Sang 53(4): 214-220.
- 46 Holme S, Moroff G and Murphy S (1998). *A multi-laboratory evaluation of in vitro platelet assays: the tests for extent of shape change and response to hypotonic shock*. Biomedical Excellence for Safer Transfusion Working Party of the International Society of Blood Transfusion. Transfusion 38(1): 31-40.
- 47 Jelkmann W (2001). *The role of the liver in the production of thrombopoietin compared with erythropoietin*. Eur J Gastroenterol Hepatol 13(7): 791-801.
- 48 Jones DA and Fitzpatrick FA (1990). *"Suicide" inactivation of thromboxane A2 synthase. Characteristics of mechanism-based inactivation with isolated enzyme and intact platelets*. J Biol Chem 265(33): 20166-20171.
- 49 Jurk K and Kehrel BE (2005). *[Platelets and the new comprehension of haemostasis]*. Hämostaseologie 25(1): 39-49.
- 50 Jurk K and Kehrel BE (2005). *Platelets: physiology and biochemistry*. Semin Thromb Hemost 31(4): 381-392.
- 51 Kaufman J, Spinelli SL, Schultz E et al. (2007). *Release of biologically active CD154 during collection and storage of platelet concentrates prepared for transfusion*. J Thromb Haemost 5(4): 788-796.
- 52 Kaufman RM (2006). *Platelets: testing, dosing and the storage lesion--recent advances*. Hematology Am Soc Hematol Educ Program: 492-496.
- 53 Kaushansky K (1998). *Thrombopoietin*. N Engl J Med 339(11): 746-754.
- 54 Kaushansky K (2003). *Thrombopoietin: a tool for understanding thrombopoiesis*. J Thromb Haemost 1(7): 1587-1592.
- 55 Kaushansky K (2006). *Thrombopoietin*. Hemostasis and thrombosis. Basic principles and clinical practice. Colman RW. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins: XV, 1827 S.
- 56 Kelemen E, Cserhati I and Tanos B (1958). *Demonstration and some properties of human thrombopoietin in thrombocythaemic sera*. Acta Haematol 20(6): 350-355.

- 57 Khan SY, Kelher MR, Heal JM et al. (2006). *Soluble CD40 ligand accumulates in stored blood components, primes neutrophils through CD40, and is a potential cofactor in the development of transfusion-related acute lung injury*. Blood 108(7): 2455-2462.
- 58 Khuri SF, Healey N, MacGregor H et al. (1999). *Comparison of the effects of transfusions of cryopreserved and liquid-preserved platelets on hemostasis and blood loss after cardiopulmonary bypass*. J Thorac Cardiovasc Surg 117(1): 172-183; discussion 183-174.
- 59 Kieffer N, Guichard J, Farcet JP et al. (1987). *Biosynthesis of major platelet proteins in human blood platelets*. Eur J Biochem 164(1): 189-195.
- 60 Kostelijk EH, Fijnheer R, Nieuwenhuis HK et al. (1996). *Soluble P-selectin as parameter for platelet activation during storage*. Thromb Haemost 76(6): 1086-1089.
- 61 Kroll H and Müller-Eckhardt C (2004). *Therapie mit Thrombozyten*. Transfusionsmedizin Grundlagen, Therapie, Methodik. Müller-Eckhardt C and Kiefel V. Berlin Heidelberg [u.a.], Springer: XIII, 704 S.
- 62 Kunicki TJ, Tuccelli M, Becker GA et al. (1975). *A study of variables affecting the quality of platelets stored at "room temperature"*. Transfusion 15(5): 414-421.
- 63 Kuter DJ, Beeler DL and Rosenberg RD (1994). *The purification of megapoietin: a physiological regulator of megakaryocyte growth and platelet production*. Proc Natl Acad Sci U S A 91(23): 11104-11108.
- 64 Langer F, Ingersoll SB, Amirkhosravi A et al. (2005). *The role of CD40 in CD40L- and antibody-mediated platelet activation*. Thromb Haemost 93(6): 1137-1146.
- 65 Li J, Xia Y, Bertino AM et al. (2000). *The mechanism of apoptosis in human platelets during storage*. Transfusion 40(11): 1320-1329.
- 66 Li J, Xia Y and Kuter DJ (1999). *Interaction of thrombopoietin with the platelet c-mpl receptor in plasma: binding, internalization, stability and pharmacokinetics*. Br J Haematol 106(2): 345-356.
- 67 Lindemann S, Tolley ND, Dixon DA et al. (2001). *Activated platelets mediate inflammatory signaling by regulated interleukin 1beta synthesis*. J Cell Biol 154(3): 485-490.
- 68 Lippa S, Mores N, Aureli V et al. (1987). *Biochemical and functional changes of platelet stored for transfusional use*. Folia Haematol Int Mag Klin Morphol Blutforsch 114(5): 680-685.
- 69 Maurer-Spurej E and Chipperfield K (2007). *Past and future approaches to assess the quality of platelets for transfusion*. Transfus Med Rev 21(4): 295-306.
- 70 Mazzei GJ, Edgerton MD, Losberger C et al. (1995). *Recombinant soluble trimeric CD40 ligand is biologically active*. J Biol Chem 270(13): 7025-7028.
- 71 Michelson AD and Furman MI (1999). *Laboratory markers of platelet activation and their clinical significance*. Curr Opin Hematol 6(5): 342-348.
- 72 Moller P, Andersson PO, Andersson AC et al. (2000). *Plasma thrombopoietin concentrations in response to platelet transfusion therapy*. Acta Haematol 102(3): 131-134.
- 73 Monroe DM, Hoffman M and Roberts HR (2002). *Platelets and thrombin generation*. Arterioscler Thromb Vasc Biol 22(9): 1381-1389.
- 74 Morawitz P (1905). *Die Chemie der Blutgerinnung*. Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology 4(1): 307-422.
- 75 Mueller-Eckhardt C and Kiefel V (2004). *Transfusionsmedizin: Grundlagen, Therapie, Methodik ; mit 121 Tabellen*. Berlin [u.a.], Springer.
- 76 Murphy S (1985). *Platelet storage for transfusion*. Semin Hematol 22(3): 165-177.

- 77 Murphy S, Rebulla P, Bertolini F et al. (1994). *In vitro* assessment of the quality of stored platelet concentrates. The BEST (Biomedical Excellence for Safer Transfusion) Task Force of the International Society of Blood Transfusion. *Transfus Med Rev* 8(1): 29-36.
- 78 Nakahata N (2008). *Thromboxane A2: physiology/pathophysiology, cellular signal transduction and pharmacology*. *Pharmacol Ther* 118(1): 18-35.
- 79 Norol F, Kuentz M, Cordonnier C et al. (1994). *Influence of clinical status on the efficiency of stored platelet transfusion*. *Br J Haematol* 86(1): 125-129.
- 80 Page EB (1963). *Ordered Hypotheses for Multiple Treatments: A Significance Test for Linear Ranks*. *Journal of the American Statistical Association* 58(301): 216-230.
- 81 Perrotta PL, Perrotta CL and Snyder EL (2003). *Apoptotic activity in stored human platelets*. *Transfusion* 43(4): 526-535.
- 82 Phipps RP, Kaufman J and Blumberg N (2001). *Platelet derived CD154 (CD40 ligand) and febrile responses to transfusion*. *Lancet* 357(9273): 2023-2024.
- 83 Prasad KS, Andre P, He M et al. (2003). *Soluble CD40 ligand induces beta3 integrin tyrosine phosphorylation and triggers platelet activation by outside-in signaling*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(21): 12367-12371.
- 84 R&D Systems. *Quantikine Human Tpo Immunoassay Handbuch*.
- 85 Reinboldt S, Wenzel F, Rauch BH et al. (2009). *Preliminary evidence for a matrix metalloproteinase-2 (MMP-2)-dependent shedding of soluble CD40 ligand (sCD40L) from activated platelets*. *Platelets* 20(6): 441-444.
- 86 Rinder HM and Ault KA (1998). *Platelet activation and its detection during the preparation of platelets for transfusion*. *Transfus Med Rev* 12(4): 271-287.
- 87 Rinder HM and Smith BR (2003). *In vitro* evaluation of stored platelets: is there hope for predicting posttransfusion platelet survival and function? *Transfusion* 43(1): 2-6.
- 88 Rinder HM and Snyder EL (1992). *Activation of platelet concentrate during preparation and storage*. *Blood Cells* 18(3): 445-456; discussion 457-460.
- 89 Rinder HM, Snyder EL, Tracey JB et al. (2003). *Reversibility of severe metabolic stress in stored platelets after in vitro plasma rescue or in vivo transfusion: restoration of secretory function and maintenance of platelet survival*. *Transfusion* 43(9): 1230-1237.
- 90 Roth GJ, Stanford N and Majerus PW (1975). *Acetylation of prostaglandin synthase by aspirin*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72(8): 3073-3076.
- 91 Sachs U and Bux J (2004). *Gewinnung, Herstellung und Lagerung von Blut und Blutkomponenten*. *Transfusionsmedizin. Grundlagen Therapie Methodik*. Müller-Eckhardt C and Kiefel V. Berlin, Springer-Verlag.
- 92 Scharf R (1997). *Der Arachidonsäurestoffwechsel*. Hämatologie, Onkologie. Seeber PCOuS. München [u.a.], Urban & Schwarzenberg: XII, 990 S.
- 93 Schonbeck U and Libby P (2001). *The CD40/CD154 receptor/ligand dyad*. *Cell Mol Life Sci* 58(1): 4-43.
- 94 Schonbeck U, Mach F and Libby P (2000). *CD154 (CD40 ligand)*. *Int J Biochem Cell Biol* 32(7): 687-693.
- 95 Schubert P and Devine DV *Towards targeting platelet storage lesion-related signaling pathways*. *Blood Transfus* 8 Suppl 3: s69-72.
- 96 Seghatchian J and Krailadsiri P (1997). *The platelet storage lesion*. *Transfus Med Rev* 11(2): 130-144.

- 97 Shrivastava M (2009). *The platelet storage lesion*. Transfus Apher Sci 41(2): 105-113.
- 98 Smyth EM and Funk CD (2006). *Platelet Eicosanoids*. Hemostasis and thrombosis. Basic principles and clinical practice. Colman RW. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins: XV, 1827 S.
- 99 Tsan MF (1984). *Kinetics and distribution of platelets in man*. Am J Hematol 17(1): 97-104.
- 100 Valeri CR, Feingold H and Marchionni LD (1974). *The relation between response to hypotonic stress and the 51Cr recovery in vivo of preserved platelets*. Transfusion 14(4): 331-337.
- 101 Wang C, Mody M, Herst R et al. (1999). *Flow cytometric analysis of platelet function in stored platelet concentrates*. Transfus Sci 20(2): 129-139.
- 102 Wang ZY, Shi JM, Han Y et al. (2001). *Comparative study of platelet activation markers in diabetes mellitus patients complicated by cerebrovascular disease*. Blood Coagul Fibrinolysis 12(7): 531-537.
- 103 Wendling F (1999). *Thrombopoietin: its role from early hematopoiesis to platelet production*. Haematologica 84(2): 158-166.
- 104 Wenzel F, Baertl A, Zimmermann N et al. (2008). *Different behaviour of soluble CD40L concentrations can be reflected by variations of preanalytical conditions*. Clin Hemorheol Microcirc 39(1-4): 417-422.
- 105 Weyrich AS, Schwertz H, Kraiss LW et al. (2009). *Protein synthesis by platelets: historical and new perspectives*. J Thromb Haemost 7(2): 241-246.
- 106 Wilcoxon F (1945). *Individual Comparisons by Ranking Methods*. Biometrics Bulletin 1(6): 80-83.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Thrombozytenadhäsion und -aggregation.....	3
Abbildung 2:	Die grundlegende Rolle von Thrombozyten bei der sekundären Hämostase...	5
Abbildung 3:	Haemonetics Mobile Collection System +	8
Abbildung 4:	Latham Glocke während des Apheresevorgangs.....	9
Abbildung 5:	„platelet storage lesion“: Einflüsse auf Thrombozyten während Apherese und Lagerung. Vorgänge im Präparat und messbare Veränderungen.....	11
Abbildung 6:	Der Arachidonsäurestoffwechsel.....	16
Abbildung 7:	Die Expression und Abscherung von sCD40L.....	19
Abbildung 8:	Der Einfluss von Thrombopoetin auf Megakaryozytopoese und Thrombozytopoese	20
Abbildung 9	Der Regelkreis der Thrombozytopoese	21
Abbildung 10:	MCS+ Einmalset.....	26
Abbildung 11:	Thrombozytenprodukt-Probenbeutel.....	25
Abbildung 12:	Nach Zugabe von Calcium-Lösung entstandener Plättchenthrombus	27
Abbildung 13:	Das Prinzip des Radio-Immunoassay (RIA)	28
Abbildung 14:	Das Prinzip des Enzym-Immuno-Assay (ELISA).....	29
Abbildung 15:	Farbumschlag auf ELISA-Mikrotiterplatte nach Zugabe von Schwefelsäure ..	30
Abbildung 16:	Plattenreport eines sCD40L-ELISA	31
Abbildung 17:	Box-Whisker-Plot: sCD40L-Anreicherung im Thrombozytenkonzentrat	34
Abbildung 18:	sCD40L Anreicherung im Thrombozytenkonzentrat prozentual zum Lagerungsbeginn.....	36
Abbildung 19:	Box-Whisker-Plot: sCD40L im Plasmapheresepräparat.....	37
Abbildung 20:	Box-Whisker-Plot: Thromboxan B ₂ -Anreicherung im Thrombozytenkonzentrat	38
Abbildung 21:	Thromboxan B ₂ -Anreicherung im Thrombozytenkonzentrat prozentual zum Lagerungsbeginn.....	40
Abbildung 22:	Box-Whisker-Plot: Thromboxan B ₂ im Plasmapheresepräparat	41
Abbildung 23:	Box-Whisker-Plot: Elimination von Thrombopoetin aus dem Thrombozytenkonzentrat	42
Abbildung 24:	Box-Whisker-Plot: Thrombopoetin im Plasmapheresepräparat	43
Abbildung 25:	Box-Whisker-Plot: sCD40L-Freisetzung bei Aktivierung und Thrombusbildung	44
Abbildung 26:	sCD40L-Freisetzung bei Aktivierung und Thrombusbildung prozentual zum Lagerungsbeginn.....	46
Abbildung 27:	Box-Whisker-Plot: Thromboxan-Freisetzung bei Aktivierung und Thrombusbildung	47
Abbildung 28:	Mittlere Thromboxan-Freisetzung bei Aktivierung und Thrombusbildung prozentual zum Lagerungsbeginn	49
Abbildung 29:	Box-Whisker-Plot: Thrombopoetin-Aufnahme im Übersättigungsbereich	50
Abbildung 30:	Thrombopoetin-Aufnahme im Übersättigungsbereich prozentual.....	52

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	WHO Schweregradeinteilung der Blutung.....	6
Tabelle 2:	Qualitätskontrollen für leukozytendepletiertes Apherese-Thrombozytenkonzentrat	10
Tabelle 3:	Deskriptive Statistik: sCD40L im Thrombozytenkonzentrat im Laufe der Lagerung	35
Tabelle 4:	Page-Test: sCD40L Anreicherung im Thrombozytenkonzentrat.....	35
Tabelle 5:	Wilcoxon-Vorzeichenrangtest: sCD40L im Thrombozytenkonzentrat	35
Tabelle 6:	sCD40L im Thrombozytenkonzentrat im Laufe der Lagerung prozentual zum Lagerungsbeginn	36
Tabelle 7:	Deskriptive Statistik: sCD40L im Plasmapheresepräparat	37
Tabelle 8:	Deskriptive Statistik: Thromboxan B ₂ -Anreicherung im Thrombozytenkonzentrat im Laufe der Lagerung.....	39
Tabelle 9:	Page-Test: Thromboxan B ₂ -Anreicherung im Thrombozytenkonzentrat.....	39
Tabelle 10:	Wilcoxon-Vorzeichenrangtest: Thromboxan B ₂ -Anreicherung im Thrombozytenkonzentrat	39
Tabelle 11:	Deskriptive Statistik: Thromboxan B ₂ im Thrombozytenkonzentrat im Laufe der Lagerung prozentual zum Lagerungsbeginn	40
Tabelle 12:	Deskriptive Statistik: Thromboxan B ₂ im Plasmapheresepräparat	41
Tabelle 13:	Deskriptive Statistik: Thrombopoetin im Thrombozytenkonzentrat.....	42
Tabelle 14:	Deskriptive Statistik: Thrombopoetin im Plasmapheresepräparat	43
Tabelle 15:	Deskriptive Statistik: sCD40L-Freisetzung bei Aktivierung und Thrombusbildung zu verschiedenen Lagerungszeiten	45
Tabelle 16:	Page-Test: sCD40L-Freisetzung bei Aktivierung und Thrombusbildung.....	45
Tabelle 17:	Wilcoxon-Vorzeichenrangtest: sCD40L-Freisetzung bei Aktivierung und Thrombusbildung zu verschiedenen Lagerungszeiten.....	45
Tabelle 18:	Deskriptive Statistik: sCD40L-Freisetzung bei Aktivierung und Thrombusbildung prozentual zum Lagerungsbeginn	46
Tabelle 19:	Deskriptive Statistik: Thromboxan-Freisetzung bei Aktivierung und Thrombusbildung zu verschiedenen Lagerungszeiten.....	48
Tabelle 20:	Page-Test: Thromboxan-Freisetzung bei Aktivierung und Thrombusbildung	48
Tabelle 21:	Wilcoxon-Vorzeichenrangtest: Thromboxan-Freisetzung bei Aktivierung und Thrombusbildung	48
Tabelle 22:	Deskriptive Statistik: Thromboxan-Freisetzung bei Aktivierung und Thrombusbildung prozentual zum Lagerungsbeginn	49
Tabelle 23:	Deskriptive Statistik: Thrombopoetinaufnahme im Übersättigungsbereich zu verschiedenen Lagerungszeiten.....	51
Tabelle 24:	Page-Test: Thrombopoetinaufnahme im Übersättigungsbereich	51
Tabelle 25:	Wilcoxon-Vorzeichenrangtest: Thrombopoetinaufnahme im Übersättigungsbereich	51
Tabelle 26:	Deskriptive Statistik: Thrombopoetinaufnahme im Übersättigungsbereich prozentual zum Lagerungsbeginn	52

Testtafeln

Tafel I: Trendtest von Page [80]

Die Tafel enthält die kritischen L-Werte für $\alpha = 0,001$ (oberer Wert), $\alpha = 0,01$ (mittlerer Wert) und $\alpha = 0,05$ (unterer Wert).

<i>m</i> Number of rankings or replications	<i>n</i> Number of treatments or objects ranked							
	3	4	5	6	7	8	9	10
2	—	—	109	178	269	388	544	726
	—	60	106	173	261	376	520	696
	28	58	103	166	252	362	500	670
3	—	89	160	260	394	567	790	1056
	42	87	155	252	382	549	761	1019
	41	84	150	244	370	532	736	987
4	56	117	210	341	516	743	1032	1382
	55	114	204	331	501	722	999	1339
	54	111	197	321	487	701	971	1301
5	70	145	259	420	637	917	1273	1704
	68	141	251	409	620	893	1236	1656
	66	137	244	397	603	869	1204	1614

Tafel II: Wilcoxon-Vorzeichenrangtest [8]

Die Tafel enthält die exakten Überschreitungswahrscheinlichkeiten P zu Wilcoxons Rangsumme T für den einseitigen Vorzeichenrangtest.

T	N								
	3	4	5	6	7	8	9	10	11
0	0,125	0,062	0,031	0,016	0,008	0,004	0,002 ⁻	0,001 ⁻	0,000
1	0,250	0,125	0,062	0,031	0,016	0,008	0,004 ⁻	0,002 ⁻	0,001 ⁻
2	0,375	0,188	0,094	0,047	0,023	0,012	0,006 ⁻	0,003 ⁻	0,001 ⁺
3	0,625	0,312	0,156	0,078	0,039	0,020	0,010 ⁻	0,005 ⁻	0,002 ⁺
4	0,750	0,438	0,219	0,109	0,055	0,027	0,014	0,007	0,003 ⁺
5	0,875	0,562	0,312	0,156	0,078	0,039	0,020	0,010 ⁻	0,005 ⁻

Datentabellen

sCD40L / Thromboxan

sCD40L-Konzentration nach Inkubation mit Calcium-Chlorid-Lösung [pg/ml]

	Lagerungszeit [h]				
	Spender	0	24	72	120
7201871	8178	8516	8799	8528	6675
7201872	9172	8912	8731	7251	6788
7201873	11815	10470	10335	8471	8415
7201874	10979	11408	10324	9104	9748
7201875	11713	12458	12628	11589	8381

Thromboxan B₂-Konzentration nach Inkubation mit Calcium-Chlorid-Lösung [ng/ml]

	Lagerungszeit [h]				
	Spender	0	24	72	120
7201871	764	661	611	525	385
7201873	715	642	560	422	280
7201874	709	598	599	415	326
7201875	406	472	429	344	297
7201872	27	21	17	12	10

Thrombozytenzahlen [$\times 10^6$ Thrombozyten/ml]

	Lagerungszeit [h]				
	Spender	0	24	72	120
7201871	559	579	570	503	514
7201873	397	398	393	383	377
7201874	522	494	508	480	461
7201875	474	491	508	518	475
7201872	483	505	512	497	494

Thrombopoetin

Ausgangswerte der Aufsättigung von Thrombozytenkonzentrat mit Thrombopoetin [pg/ml]

	Lagerungszeit [h]				
	Spender	0	24	72	120
7201287	547	465	444	427	411
7201288	421	420	424	374	409
7201872	327	361	324	336	319
7201873	586	656	594	630	594

Thrombopoetin Konzentration der aufgesättigten Proben nach Inkubation [pg/ml]

	Lagerungszeit [h]				
	Spender	0	24	72	120
7201287	199	198	217	238	243
7201288	225	217	244	229	238
7201872	123	170	141	180	171
7201873	201	243	238	272	293

Thrombozytenzahlen [$\times 10^6$ Thrombozyten/ml]

	Lagerungszeit [h]				
	0	3	24	72	120
7201287	410	425	403	363	404
7201288	387	412	389	376	382
7201872	397	398	393	383	377
7201873	522	494	508	480	461

Lebenslauf

Name	Anja Bärthel
Geburtsdatum	17.07.1984
Geburtsort	Mainz
07/1990 bis 06/1994	Suitbertus-Grundschule, Ratingen
08/1994 bis 06/2003	Carl-Friedrich von Weizsäcker-Gymnasium in Ratingen, Abitur
10/2003 bis 06/2010	Medizinstudium an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf Staatsexamen 06/2010
09/2007 bis 02/2008	Auslandssemester Université de Nantes, Frankreich
02/2009 bis 01/2010	Praktisches Jahr
3. Tertial	10/2009 bis 01/2010 Innere Medizin im Evangelischen Krankenhaus in Düsseldorf
2. Tertial	06/2009 bis 01/2010 Anästhesie im Evangelischen Krankenhaus in Düsseldorf
1. Tertial	04/2009 bis 06/2009 Chirurgie im Hôtel-Dieu in Paris, Frankreich 02/2009 bis 04/2009 Chirurgie im Royal North Shore Hospital, Sydney, Australien
seit 11/2010	Assistenzärztin in der Inneren Medizin im Evangelischen Krankenhaus in Mettmann