

Aus dem Institut für Transplantationsdiagnostik und  
Zelltherapeutika (ITZ)  
Universitätsklinikum Düsseldorf  
Direktor: Dr. med. Johannes Fischer

Das mittlere Thrombozytenvolumen MPV als  
Qualitätskontrollparameter für Thrombozyten- und  
Stammzellaphereseverfahren

Dissertation

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

Anja Christina Bramhoff

2018

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

Gez:

Dekan: Prof. Dr. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Folker Wenzel

Zweitgutachter: Univ.-Prof. Dr. med. Rainer Haas

**Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:**

Anja Bramhoff, Günther Giers, Frithjof Blessing, and Folker Wenzel, „Using the mean platelet volume MPV for the quality assessment of apheresis procedures“, *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, vol. 3, no. 64, pp. 413–424, 2016.

## Zusammenfassung

Das Ziel der Arbeit ist es zu überprüfen, ob im Rahmen der Stammzell- bzw. Thrombozytenapherese, maschinell oder funktional bedingt, unterschiedlich große Thrombozyten apheriert werden und nicht, wie bisher angenommen, das ganze Volumenspektrum der Thrombozyten.

Um diese Frage zu beantworten, haben wir bei 29 Stammzellspendern und 10 Thrombozytenspendern die Thrombozytenzahl (PLT) und das mittlere Thrombozytenvolumen (MPV) im peripheren Blut der Spender vor der Apherese (vZS) und nach der Apherese (nZS) sowie im Spenderkonzentrat (Aph) bestimmt [1].

Unsere Arbeit konnte zeigen, dass bei den Stammzellspendern vermehrt großvolumige Thrombozyten apheriert wurden. Bei der Thrombozytenspende wurden hingegen primär kleinvolumige Thrombozyten separiert [1].

Sowohl bei der Stammzell- als auch bei der Thrombozytenapherese werden die zu separierenden Zellen der Buffy-Coat-Schicht entnommen. Bei der Thrombozytenspende werden die Thrombozyten vornehmlich aus den oberen Schichten separiert. Hier zeigt sich ein kleines mittleres Thrombozytenvolumen. Bei der Stammzellapherese werden die Zellen aus der unteren Buffy-Coat-Schicht apharesiert. Hier zeigt sich ein größeres mittleres Thrombozytenvolumen. Das mittlere Thrombozytenvolumen (MPV) im Apheresat spiegelt somit die Schicht wider, aus der die Zellen separiert wurden [1] [2] [3] [4].

Um den Einfluss der benutzten Gerinnungshemmer auf das gemessene Volumen der Thrombozyten zu untersuchen, erfolgte ferner eine Untersuchungsreihe mit fünf Probanden, bei denen jeweils EDTA, ACD-A (Citrat-Lösung) und Heparin als Gerinnungshemmer verwendet wurden. Hier konnte nachgewiesen werden, dass es im Citrat-Milieu (ACD-A) zu einer mittleren Abnahme der Thrombozytenvolumina um 15 % kam. Es ist daher anzunehmen, dass der Anteil der separierten großvolumigen Thrombozyten in Apheresaten, bei denen ein Citrat-Milieu herrscht, noch größer ist als zunächst gemessen [1].

Um messtechnische Ungenauigkeiten des Zellcounters, z. B. durch Zellüberlappungen, zu untersuchen, welche sich bei unterschiedlichen Zellkonzentrationen ergeben könnten, wurden bei den fünf Probanden desweiteren verschiedene Verdünnungsreihen erstellt und analysiert. Es stellte sich heraus, dass mit zunehmender Verdünnung das gemessene Thrombozytenvolumen leicht abnahm. Dies könnte ein Hinweis auf eine ungenaue Volumenmessung bei erhöhter Thrombozytenzahl aufgrund von Thrombozytenüberlagerungen sein [1].

Insbesondere bei der Thrombozytenspende existieren bisher als Qualitätskontrollparameter die Thrombozytenzahl im Apheresat, das Volumen des Thrombozytenkonzentrats, der Anteil an Restleukozyten und Restthrombozyten, der pH-Wert sowie die Sterilität und visuelle Kontrollen [5,1].

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass unsere Untersuchungsergebnisse einen wichtigen Beitrag dazu leisten, das mittlere Thrombozytenvolumen (MPV) als neuen Qualitätskontrollparameter für das Aphereseverfahren zu etablieren [1].

## Abstract

In this study we discuss whether during platelet apheresis or stem cell apheresis different kinds of platelets are collected and not as assumed so far the total spectrum of the platelets in the blood stream. The data of 29 stem cell donors and 10 platelet donors were analysed according to the platelet count, the mean platelet volume before and after apheresis as well as in the cell concentrate [1].

It was shown that the platelets in the cell concentrates differ from the platelets found in the peripheral blood. In platelet concentrates the thrombocytes were smaller than in the peripheral blood of the donors before or after apheresis. However stem cell concentrates contained platelets that were larger than the average platelet found in the peripheral blood of the donors before or after apheresis [1].

It seems that the thrombocyte apheresis procedure is more likely to separate platelets of a lower volume in contrast to that stem cell apheresis procedures collected platelets with a rather higher volume than the average platelet volume in the donor's blood stream. This could indicate that during platelet apheresis and stem cell apheresis, cells are collected from different layers inside the buffy coat.

During platelet apheresis contamination with for example leucocytes or monocytes, which could threaten the acceptors, health needs to be avoided so only the top layer of the buffy coat is separated. Here platelets with a lower volume are found. In contrast to that, in stem cell apheresis it is necessary to collect a great amount of stem cells from the peripheral blood stream of the donor as possible. So the cells are mainly collected from the lower layer of the buffy coat, where the most stem cells and also the platelets with a higher volume are found. The mean platelet volume of the platelets in the cell concentrate can be seen as an indicator of the buffy coat cell layer separated by the apheresis procedure [1] [6] [2] [3] [4].

To analyze the effect of the used of different anticoagulants we examined blood samples of five probands using the anticoagulants heparin, EDTA and Citrat. The analysis shows that in citrate the platelet volume is measured 15 % lower than in EDTA, which could indicate that our measurements of the platelet volume in the stem cell as well as in the platelet concentrates are measured to low [1].

During our study we analysed samples form peripheral blood stream as well as samples form platelet and stem cell concentrates. The samples varied a lot in cell concentration so we also investigated whether the platelet concentration has an impact on the measurement of the platelets volume. We analysed a dilution using blood samples of five probands as well as the same cell counter that has been used measuring the platelets during the apheresis process. The measurement of the platelet volume MPV in not physiological concentration as found in the cell concentrates however differs from the MPV value in the peripheral blood of the donors, which could be due to perhaps overlapping of platelets in high platelet concentration [1] [2] [3] [4].

In this study we could show that by measuring the mean platelet volume in the cell concentrate as well as the peripheral blood of the donor before and after apheresis there is a direct indication on which layer of the buffy coat the cells were collected from [1].

We also know that the layer collected has a great impact of the quality of the separated cell concentrate as well as the quality and efficiency of the apheresis procedure itself.

So after all measuring the MPV value during cell apheresis could be used to improve the apheresis procedures for both platelet and stem cell collection and to lower the risk and preserve the donor as well as the recipient from harmful reactions [1].

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	1
1.1 Hämatopoese .....	1
1.1.1 Pluripotente hämatopoetische Stammzellen .....	2
1.1.2 Erythrozyten .....	2
1.1.2 Leukozyten .....	3
1.1.3 Thrombozyten.....	5
1.2 Thrombozyten und Stammzellkonzentrate .....	7
1.2.1 Thrombozytengewinnung.....	8
1.2.2 Stammzellgewinnung .....	9
1.2.3 Buffy Coat .....	10
<b>2. Ziel der Arbeit</b> .....	12
<b>3. Methodik</b> .....	13
3.1 Thrombozytenspender .....	13
3.2 Stammzellspender.....	14
3.3 Probanden der Verdünnungsreihe .....	15
3.4 Verwendete Geräte .....	15
3.4.1 Multikomponentenapheresesystem MCS+ <sup>®</sup> Haemonetics.....	15
3.4.2 Hämapheresesystem Spectra Optia <sup>®</sup> .....	23
3.4.3 Zellcounter Sysmex XE-2100 <sup>®</sup> .....	29
3.4.3.1 RBC/PLT-Kanal .....	29
3.4.3.2 Hämoglobinkanal.....	31
3.4.3.3 Durchflusszytometrie.....	31
3.4.3.4 RET-Kanal.....	32
3.4.3.5 Bestimmung unreifer Thrombozyten.....	32
3.4 Statistische Auswertung .....	34
<b>4. Ergebnisse</b> .....	35
4.1 Thrombozytenspender .....	35
4.1.1 Veränderung der Thrombozytenzahl bei Thrombozytenspendern .....	35
4.1.2 Veränderung des mittleren Thrombozytenvolumens bei Thrombozytenspendern...	36
4.2 Allogene Stammzellspender .....	43

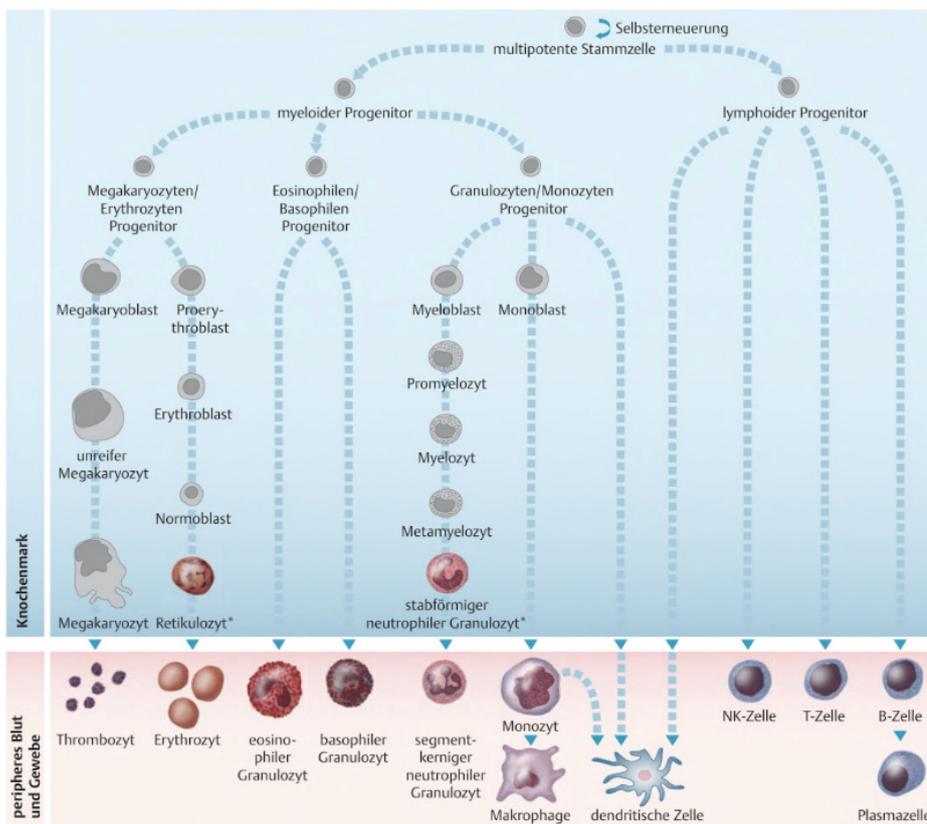
4.2.1	Veränderung der Thrombozytenzahl bei allogenen Stammzellspendern .....	43
4.2.2	Veränderung des mittleren Thrombozytenvolumens bei allogenen Stammzellspendern.....	44
4.3	Autologe Stammzellspender.....	50
4.3.1	Veränderung der Thrombozytenzahl bei autologen Stammzellspendern.....	50
4.3.2	Veränderung des mittleren Thrombozytenvolumens bei autologen Stammzellspendern.....	52
4.3.3	Veränderung der immature platelet fraction bei autologen Stammzellspendern .....	57
4.4	Vergleich zwischen Stammzellspendern und Thrombozytenspendern .....	59
4.5	Berechnung des theoretischen Thrombozytenvolumens .....	63
4.6	Verdünnungsreihen.....	64
4.6.1	Verdünnungsreihen mit Natriumchlorid.....	64
4.6.2	Verdünnungsreihen mit platelet poor plasma.....	66
4.6.3	Immature platelet fraction und Thrombozytenzahl .....	67
4.7	Milieueinflüsse auf das Thrombozytenvolumen (MPV) .....	68
<b>5.</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>71</b>
5.1	Einleitung.....	71
5.2	Thrombozytenzahl .....	71
5.3	Mittleres Thrombozytenvolumen (MPV).....	73
5.4	In vitro Verdünnungsreihen.....	79
5.5	Berechnung der Thrombozytenvolumina .....	81
5.6	Vergleich unterschiedlicher Antikoagulanzen .....	81
<b>6.</b>	<b>Schlussfolgerung</b> .....	<b>82</b>
<b>7.</b>	<b>Anhang</b> .....	<b>85</b>
7.2	Tabellenverzeichnis .....	88
7.3	Abkürzungsverzeichnis .....	89
7.4	Literaturverzeichnis .....	91

# 1. Einleitung

## 1.1 Hämatopoese

Die Hämatopoese erfolgt beim erwachsenen Menschen primär im Knochenmark. Während der Fetalzeit kommt es auch in Leber, Milz und Thymus zur Blutbildung. Alle Blutzellen stammen von hämatopoetischen Vorläuferzellen ab, deren Differenzierung von hämatopoetischen Wachstumsfaktoren gesteuert wird (Abb. 1).

Die Blutzellen müssen ständig erneuert werden, da sie nur eine begrenzte Lebensdauer besitzen [3] [7].



**Abbildung 1: Schematische Darstellung der Hämatopoese**, Copyright Georg Thieme Verlag KG, Verwendung mit freundlicher Genehmigung des Copyright Clearance Centers des Georg Thieme Verlags [7].

### **1.1.1 Pluripotente hämatopoetische Stammzellen**

Die hämatopoetischen Stammzellen befinden sich im Knochenmark, wo sie sich sowohl zu myeloischen als auch zu lymphatischen Stammzellen ausdifferenzieren können. Äußerlich ähneln sie den Lymphozyten und besitzen auch eine vergleichbare Dichte. Welche Zelllinie sie einschlagen, wird durch die Wachstumsfaktoren gesteuert. Die hämatopoetischen Stammzellen bilden das Oberflächenantigen CD34+ aus. Je mehr sich die Stammzellen ausdifferenzieren, desto geringer wird die Zahl der exprimierten CD34+ Oberflächenantigene. Im Knochenmark eines gesunden Menschen bilden etwa 2 bis 6 % der Zellen CD34+ aus, im peripheren Blut sind es nur 0,03 bis 0,15 % [8] [7].

Bei Patienten, die an Malignomen erkrankt sind, kann es im Rahmen der Chemotherapie zu einer Depression oder sogar zu einer Zerstörung des patienteneigenen Knochenmarks kommen. Die Blutbildung dieser Patienten kann durch eine Stammzelltransplantation wiederhergestellt werden. Erhält der Patient eigene Stammzellen, die ihm vor der Chemotherapie entnommen wurden, spricht man von einer autologen Transplantation. Der Patient kann allerdings auch allogene Stammzellen von einem HLA kompatiblen Spender erhalten. In der Regel erfolgt die Gewinnung der Stammzellen entweder direkt aus dem Knochenmark oder nach einer Stimulation mit G-CSF durch Apherese aus dem peripheren Blut des Spenders [5] [3] [6] [9].

### **1.1.2 Erythrozyten**

Die Erythrozyten sind mit ca. 96 % der zelluläre Hauptbestandteil des Blutes. Ihre durchschnittliche Lebenserwartung beträgt etwa 120 Tage, und sie besitzen von allen Blutzellen die höchste Dichte. Erythrozyten haben keinen Zellkern, sondern ein flexibles Zytoskelett aus Spektrin- und Ankyrinproteinen. Dies führt dazu, dass sie sich leicht verformen können, um beispielsweise das Kapillarnetz zu durchqueren. Gealterte Erythrozyten werden im retikuloendothelialen System, vorwiegend in der Milz, abgebaut und zum Teil der Erythropoese wieder zugeführt. Im Rahmen der Erythropoese werden täglich etwa 1 % der beim Erwachsenen vorhandenen 24 bis  $30 \times 10^{12}$  Erythrozyten ausgetauscht. Es müssen somit mehr als drei Millionen Erythrozyten pro Sekunde neu gebildet werden [6].

## **1.1.2 Leukozyten**

### **1.1.2.1 Granulozyten**

Die Granulozyten sind Teil der zellulären Immunabwehr und werden nach ihrer mikroskopischen Morphologie und dem Färbeverhalten folgendermaßen unterschieden: Die größte Gruppe bilden die neutrophilen Granulozyten. Sie werden in drei verschiedene Altersstufen aufgeteilt: in die jugendlichen (neutrophilen) Granulozyten 5 bis 10 %, die stabkernigen (neutrophilen) Granulozyten 0 bis 5 % und die segmentkernigen (neutrophilen) Granulozyten 50 bis 65 %. Die nächstgrößere Gruppe besteht aus den eosinophilen Granulozyten (2 bis 4 %). Nur 0 bis 3 % der Leukozyten bildet die letzte Gruppe der basophilen Granulozyten [10] [3].

### **Neutrophile Granulozyten**

Neutrophile Granulozyten sind 9 bis 12 µm groß und haben eine grobe Chromatinstruktur. Sie bilden mit 50 bis zu 70 % den Hauptbestandteil der Leukozyten. Ein erwachsener Mensch produziert mehr als  $10 \cdot 10^{10}$  neutrophile Granulozyten pro Tag. Ihr Hauptreservespeicher liegt im Knochenmark, wobei etwa 5 % der neutrophilen Granulozyten im peripheren Blut zirkulieren und zum Teil an den Blutgefäßwänden anhaften. Neutrophile Granulozyten sind für Phagozytose und für die Zerstörung mikrobieller Erreger verantwortlich [6].

Stabkernige neutrophile Granulozyten haben einen bandförmigen Zellkern und sind die direkte Vorstufe der segmentkernigen neutrophilen Granulozyten, deren Zellkern Einschnürungen aufweist. Das Zytoplasma der neutrophilen Granulozyten ist oxyphil, geht von fast farblos bis zartrosa/violett und enthält feine Granula, welche oft kaum sichtbar sind [3]. Das Zytoskelett aus Aktin und Myosin ermöglicht den neutrophilen Granulozyten, sich auf Oberflächen amöboid fortzubewegen [6]. Neutrophile Granulozyten können außerhalb des Knochenmarks etwa vier Tage überleben, bevor sie einen programmierten Zelltod sterben (Apoptose) [7].

## **Eosinophile Granulozyten**

Die eosinophilen Granulozyten besitzen größere und mit Eosin intensiv rot anfärbbare Granula. Darüber hinaus haben sie meist nur zwei Kernsegmenten. Sie sind ca. 12 bis 15 µm groß, somit etwas größer als die neutrophilen Granulozyten, denen sie sonst sehr ähneln. Eosinophile Granulozyten besitzen toxische Granula, deren Inhalt sie beim Vorhandensein von Fremdproteinen ausschütten. Physiologisch gesehen kommt es bei Allergien daher zu einer vermehrten Eosinophilie. Sie sind ferner zur Abwehr von Parasiten in der Lage. Eosinophile Granulozyten besitzen außerdem die Fähigkeit zur Phagozytose [6].

## **Basophile Granulozyten**

Die basophilen Granulozyten sind 8 bis 11 µm groß. Mit bis zu 3 % der Leukozyten im Blut sind die basophilen Granulozyten die kleinste Fraktion unter den Granulozyten. Da sie an ihrer Zelloberfläche Rezeptoren für spezifisches IgE besitzen, spielen sie eine Rolle bei der allergischen Sofort-Typ-Reaktion. Sie speichern Histamin, Heparin und das gefäßaktive Serotonin, welche bei Aktivierung freigesetzt werden [6] [3].

### **1.1.2.2 Lymphozyten**

Lymphozyten (20 bis 40 %) werden in drei Typen mit unterschiedlichen Funktionen unterteilt: in B-Lymphozyten (80 %), T-Lymphozyten (20 %), NK-Zellen (natürliche Killerzellen, < 1 %). Lymphozyten haben einen Durchmesser von etwa 8 bis 12 µm. Ihr Zellkern ist rund oder ovaloid mit scholliger Chromatinstruktur und ihr Zytoplasmasaum meist schmal und zartblau (basophil). Lymphozyten sind immunkompetente Zellen, welche durch Bereitstellung spezifischer Antikörper die neutrophilen Granulozyten und Monozyten in der Phagozytose unterstützen und bei der Abwehr von Infektionen und körperfremden Stoffen eine wichtige Rolle spielen [9,11,6].

Lymphozyten werden im Knochenmark, im Thymus, in der Milz und in den Lymphknoten „geprägt“. Sie erlernen, welche Zellstrukturen als fremd anzusehen sind. Somit gehören sie zur spezifischen Immunantwort. Durch Zellteilung der geprägten B-Lymphozyten entstehen Plasmazellen mit einer Lebensdauer von wenigen Wochen sowie Gedächtniszellen mit einer Lebensdauer von mehreren Jahren sogar bis zum Lebensende [3,10].

### **1.1.2.3 Monozyten**

Etwa 2 bis 10 % der Leukozytenpopulation bestehen aus Monozyten. Sie haben einen Durchmesser von 20 bis 40  $\mu\text{m}$ . Ihr Zytoplasma ist blaugrau und erscheint durch winzige Granulationen unruhig. Der Zellkern ist oftmals gelappt und zeigt eine feine Chromatinstruktur mit z. T. Vakuolen. Sie spielen eine wichtige Rolle als phagozytierende Abwehrzellen. Die Monozyten gehören zu den antigenpräsentierenden Zellen, können sich amöboid bewegen und besitzen inflammatorische Zytokine. Im Gewebe entwickeln sie sich nach immunologischer Stimulation zu Makrophagen [6].

Der wichtigste Speicherort der Monozyten ist die rote Milzpulpa, von der sie bei akuten Entzündungsprozessen in großer Zahl freigesetzt werden können [6].

### **1.1.3 Thrombozyten**

Thrombozyten sind diskoide 1,5 bis 3,5  $\mu\text{m}$  große und 0,3 bis 0,75  $\mu\text{m}$  dicke Blutbestandteile, die durch Abschnürung der Megakaryozyten im Knochenmark entstehen. Aus einem Megakaryozyten können auf diese Weise bis zu 8.000 Thrombozyten gebildet werden. Sie besitzen weder Zellkern noch DNA und sind somit nicht in der Lage, sich selbst zu replizieren oder Zellprodukte und Zellorganellen durch Transkription und Translation bestimmter genetischer Information nachzubilden. Eine Ausnahme stellt die aus den Megakaryozyten stammende mRNA dar, die es den Thrombozyten in begrenztem Maß ermöglicht, eigenständig Proteine neu zu synthetisieren. Neben Mitochondrien und dem rauen endoplasmatischen Retikulum besitzen Thrombozyten  $\alpha$ -Granula, elektronendichte Granula und Lysosome, die

wiederum essenzielle Faktoren und Enzyme beinhalten, die im Rahmen der primären Hämostase eine entscheidende Rolle spielen [10] [12].

Ihren Ursprung nehmen sie im Knochenmark, dort werden sie im Rahmen der Thrombozytopoese gebildet. Hier befinden sich die Mesenchymzellen, die als pluripotente Stammzellen noch in der Lage sind, sich in alle Blutzellen zu differenzieren [3,13].

Im Rahmen der Thrombozytopoese bilden die aus den Mesenchymzellen hervorgegangenen Hämozytoblasten spezifische Rezeptoren an ihrer Zelloberfläche aus, die das Hormon Thrombopoetin (TPO) binden. Thrombopoetin wird in der Leber, Niere und den Stromazellen des Knochenmarks gebildet. Der Hämozytoblast entwickelt sich durch Expression des Thrombopoetin-Rezeptors zum Megakaryoblast [12].

Thrombopoetin gehört zu den Zytokinen und ist ein glykosyliertes Protein. Seine N-terminale Domäne ähnelt in hohem Maße dem Erythropoetin. Die C-terminale Domäne trägt wesentlich zur Verlängerung der Halbwertszeit und zur Erhöhung der Bioverfügbarkeit bei. Thrombopoetin bindet über den c-Mpl-Rezeptor sowohl an Megakaryoblasten als auch an Thrombozyten. Sind weniger Thrombozyten im peripheren Blut vorhanden, kommt es demnach über einen erhöhten Spiegel von freiem ungebundenem Thrombopoetin zu einer vermehrten Bindung an Megakaryoblasten im Knochenmark, was wiederum zu einer gesteigerten Thrombozytopoese führt [14,15].

Nachdem Thrombopoetin an den c-Mpl-Rezeptoren der Megakaryoblasten gebunden hat, erfolgt eine Phosphorylierung der Tyrosinkinase Jak-2. Diese führt zu einer kaskadenartigen Phosphorylierung weiterer Substanzen, die weitere Signalwege innerhalb der Zelle in Gang setzen. Hierzu gehören STAT-Moleküle (Signal Transducer and Activator of Transcription), die MAP-Kinase ERK und Phosphoinositid-3-Kinase, die beispielsweise zur Expansion der Megakaryoblasten führen. Die Megakaryoblasten replizieren nun ihre DNA, ohne sich dabei zu teilen. Der Megakaryozyt entsteht [16] [13] [17] [6].

Der Megakaryozyt hat einen Durchmesser von 35 bis 160 µm, einen mehrfach gelappten Zellkern und viele Kopien seiner DNA. Bereits im Laufe seiner Entwicklung

beginnt der Megakaryozyt, Proplättchen abzuschnüren [6] [3]. Aus einem Megakaryozyten bilden sich auf diese Weise ca. 4 bis 8 Proplättchen, die sich wiederum in bis zu 1.000 Thrombozyten teilen. Man kann davon ausgehen, dass aus einer Mesenchymzelle auf diese Weise zwischen 4.000 und 8.000 Thrombozyten entstehen [9,18]. Täglich werden somit ca.  $35 \times 10^9$  Plättchen pro kg Körpergewicht gebildet. Das Blut eines Erwachsenen enthält etwa 170.000 bis 400.000 Blutplättchen pro  $\mu\text{l}$ . Die Lebensdauer der Thrombozyten beträgt in etwa 7 bis 10 Tage. Ihr Abbau erfolgt vorrangig in der Milz und Leber [18].

Die Hauptaufgabe der Thrombozyten ist die Blutstillung. Kommt es zur Schädigung eines Blutgefäßes, werden sie im Blutstrom nach außen gedrückt und binden an das freiliegende subendotheliale Kollagen. Der aus Megakaryozyten und Endothelzellen gebildete Von-Willebrand-Faktor bindet zusammen mit Laminin und Fibronectin am Glykoprotein Ib/IX auf den Thrombozyten, dadurch kommt es zur Aktivierung der Thrombozyten. Sie setzen die Inhaltsstoffe ihrer Granula frei, verändern ihre Form zu kugeligen Zellen mit kurzen Pseudopodien und langen Filopodien und bilden ein Thrombozytenaggregat, den weißen Thrombus [15] [6].

Um während einer akuten Blutung die benötigte Menge an Thrombozyten im peripheren Blut zu garantieren, verweilen nach dem Ausschwemmen aus dem Knochenmark ca. 30 % der Thrombozyten in der Milz. Dieser Vorgang wird als Milzpooling bezeichnet. Eine adäquate Anzahl von funktionsfähigen Thrombozyten ist somit essenziell für die primäre Hämostase, die wiederum ein wichtiger Bestandteil des stetigen Eigenreparaturmechanismus des Körpers ist [14] [19].

## **1.2 Thrombozyten und Stammzellkonzentrate**

Blutprodukte und die Substitution von Blutprodukten sind heutzutage ein wichtiger Bestandteil im klinischen Alltag. Die medizinische Übertragung von Blutprodukten wurde erstmalig in den 30er-Jahren beschrieben. Hierbei handelte es sich um eine Leukozytenpaste, die durch Zentrifugation von Vollblut gewonnen wurde [20,21,22]. Erst zu Beginn der 60er-Jahre konnte man mithilfe von Apheresesystemen bestimmte Blutzellen direkt aus dem Blutstrom entnehmen, ohne eine gesamte Vollblutspende zu benötigen [17].

### **1.2.1 Thrombozytengewinnung**

In der heutigen Zeit gibt es zwei Möglichkeiten zur Gewinnung von Thrombozytenkonzentraten. So werden sie sowohl durch die Zentrifugation von mehreren Vollblutspenden separiert und gesammelt als auch per Apherese nur einem einzelnen Spender entnommen. Erfolgt die Herstellung durch die Zentrifugation mehrerer Vollblutspenden, spricht man von einem gepoolten Thrombozytenkonzentrat. Hierzu werden in der Regel die Thrombozyten aus jeweils 4 à 500 ml Vollblutspende vermischt. Entscheidend ist, dass hierbei nach der Gewinnung der Thrombozyten möglichst alle Leukozyten oder Erythrozyten sowohl durch den Zentrifugationsvorgang an sich als auch durch nachgeschaltete Filter eliminiert werden, um mögliche unerwünschte Immunreaktionen bei der Transfusion zu vermeiden. Aus den restlichen Blutbestandteilen werden zumeist Erythrozytenkonzentrate hergestellt. Das abgepresste Plasma kann als gefrorenes Frischplasma oder auch FFP („fresh frozen plasma“) weiterverwendet werden [11,23].

Im Rahmen einer Thrombozytenapherese werden die Thrombozyten aus dem Blutstrom eines einzigen Spenders separiert. Dies kann sowohl kontinuierlich als auch diskontinuierlich erfolgen. Während einer kontinuierlichen Thrombozytenapherese wird dem Spender Vollblut entzogen und zeitgleich werden die nicht benötigten Blutbestandteile zurückgegeben. Bei der diskontinuierlichen Apherese wird zunächst eine gewisse Blutmenge in den extrakorporalen Kreislauf des Apheresesystems aufgenommen, dort zentrifugiert und die Thrombozyten werden separiert. Anschließend werden nicht benötigte Bestandteile zurückgegeben, bevor eine neue Menge Vollblut in die Aphereseinheit gezogen wird. Bei beiden Methoden ist zu beachten, dass sich nie mehr als 15 % des geschätzten Gesamtblutvolumens im extrakorporalen Kreislauf befinden sollte [23] [24,25].

Zum gegenwärtigen Stand der Wissenschaft kann nicht genau gesagt werden, ob die Thrombozytengewinnung aus Vollblutspenden via Zentrifugation oder die Thrombozytenapherese zu einem qualitativ hochwertigeren Ergebnis führt [24,26].

Das durchschnittliche Volumen eines Thrombozytenkonzentrats umfasst ca. 200 bis 300 ml. Damit die Thrombozytenkonzentrate den gewünschten Transfusionserfolg

gewährleisten können, darf eine Thrombozytenkonzentration von  $2 \times 10^{11}$  pro Einheit nicht unterschritten werden [27].

Bevor ein Thrombozytenkonzentrat jedoch als Arzneimittel freigegeben werden kann, durchläuft es ein durch das Paul-Ehrlicher-Institut festgelegtes Kontrollverfahren. Eines der wichtigsten Qualitätskontrollmechanismen ist neben der pH-Messung und der Sicherstellung der Sterilität vor allem die Messung der Thrombozyten- und Restleukozytenzahl. Die Restleukozytenzahl darf eine Konzentration von  $1 \times 10^6$  pro Konzentrat nicht überschreiten. Hergestellt und auf die gängigen Qualitätskontrollparameter überprüft, können die Thrombozytenkonzentrate bei einer durchschnittlichen Raumtemperatur von  $22\text{ °C}$  ca. 3 bis 5 Tage gelagert werden. Thrombozytenkonzentrate werden bei den verschiedensten Indikationen dem Patienten transfundiert. Zu den häufigsten Indikationen zur Thrombozytensubstitution gehören die Thrombozytopenie bei Verdünnungs- oder Verbrauchskoagulopathien sowie in der Hämatologie und Onkologie zur Behandlung der chemotherapieinduzierten Thrombozytopenie. Thrombozyten sollten AB0-kompatibel transfundiert werden, der Rhesusfaktor spielt hierbei eine untergeordnete Rolle, da Thrombozyten kein Rhesusantigen exprimieren [28] [29].

### **1.2.2 Stammzellgewinnung**

Blutstammzellen sind im menschlichen Körper zu 1 bis 2 % im Knochenmark sowie zu 0,1 bis 0,2 % im peripheren Blut zu finden. Da sie physiologisch nur zu einer verschwindend geringen Anzahl im Blutkreislauf vorkommen, war die periphere Stammzellapherese im Gegensatz zur Thrombozytenapherese lange Zeit nicht möglich. Die Gewinnung von Stammzellen erfolgte daher ursprünglich ausschließlich durch die Entnahme großer Mengen des roten Knochenmarks. Hierzu wird meist unter Narkose das Knochenmark im Beckenkamm punktiert. Über eine Kanüle können dann 1 bis 1,5 l Knochenmarkblut entnommen werden. Anschließend muss dieses speziell aufgereinigt werden, um die Stammzellen zu gewinnen [30] [31].

Die periphere Blutstammzellapherese mit ausreichender Zellseparation von hämatopoetischen pluripotenten Stammzellen wurde erst durch die Entwicklung von hämatopoetischen Wachstumsfaktoren (G-CSF) möglich. G-CSF stimuliert nicht nur

das Überleben und die Proliferation von Vorläuferzellen des hämatopoetischen Systems, sondern es führt außerdem dazu, dass sich die hämatopoetischen Stammzellen von ihrer gewohnten Umgebung, dem Knochenmark, lösen und in das periphere Blut abwandern. Hierdurch können die vornehmlich CD34+ hämatopoetischen Vorläuferzellen in ausreichender Anzahl (1 bis 2 %) für eine Transplantation aus dem peripheren Blut zu gewinnen [19] [32]. Vergleichbar mit der Gewinnung von Thrombozyten aus dem peripheren Blut geschieht dies ebenfalls mittels Apherese. Auf diese Weise werden dem Stammzellspender pro kg Körpergewicht ca.  $5 \times 10^6$  CD34+ Stammzellen entnommen [32] [33] [5] [6]. Um diese Menge an Stammzellen sammeln zu können, muss das geschätzte Gesamtblutvolumen des Spenders das Apheresesystem bis zu viermal durchlaufen [34].

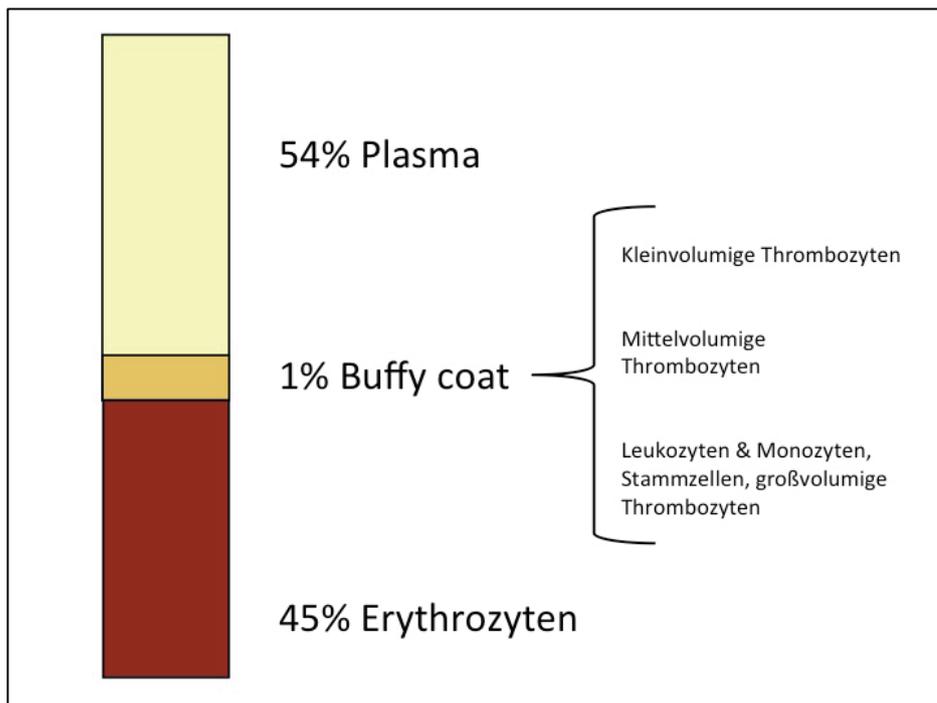
Stammzellkonzentrate können sowohl allogene als auch autologe gewonnen werden. Bei der autologen Stammzellspende werden einem Patienten, der beispielsweise aufgrund einer Hochdosis Chemotherapie eine Stammzellspende benötigt, zuvor eigene Stammzellen entnommen, die ihm zu einem späteren Zeitpunkt wieder zugeführt werden. Von einer allogenen Stammzellspende spricht man, wenn die Stammzellen von einem Fremd- oder Familienspender stammen. Entscheidend zur Vermeidung von sogenannten Graft-versus-Host-Reaktion (GvHR), einer Immunreaktion von im Stammzellkonzentrat vorhandenen immunkompetenten Leukozyten gegen Antigenstrukturen des Empfängergewebes, ist die Kompatibilität der HLA-Antigene zwischen Spender und Empfänger [35,19].

### **1.2.3 Buffy Coat**

Sowohl bei der Stammzell- und Thrombozytenapherese als auch bei der Gewinnung von gepoolten Thrombozytenkonzentraten aus Vollblutspenden erfolgt die Separation der gewünschten Zellen aus dem sogenannten Buffy Coat. Zunächst wird das Blut zentrifugiert. Im Rahmen der Zentrifugation teilt sich das Blut entlang der spezifischen Dichte in seine Bestandteile auf [3] [31].

Die Erythrozyten bilden als Blutkörperchen mit der höchsten Dichte das Sediment. Das flüssige Blutplasma und die darin gelösten Blutbestandteile bilden die obere Schicht. Die Trennschicht zwischen dem Plasma und den Erythrozyten wird als Buffy Coat

bezeichnet. In dieser Schicht sammeln sich die Blutzellen an, die eine höhere Dichte als das flüssige Plasma, aber eine niedrigere Dichte als die Erythrozyten haben. Hierzu zählen beim gesunden Menschen die Leukozyten und Thrombozyten [11]. In Abbildung 2 ist eine schematische Darstellung einer zentrifugierten Blutprobe zu sehen.



**Abbildung 2: Buffy Coat schematisch dargestellt**

Der Buffy Coat macht ca. 1 % des Blutvolumens aus. Im Rahmen der Stammzellapherese werden die Stammzellen aus dem Knochenmark ins Blut ausgeschwemmt. Diese haben eine ähnliche Dichte wie die Leukozyten, sodass sie sich nach der Zentrifugation ebenfalls in dieser Zellschicht ansammeln. Auch innerhalb des Buffy Coats trennen sich die Thrombozyten, Leukozyten und Stammzellen nach ihrer jeweiligen Dichte auf [11,36].

Stammzellen, Leukozyten und Monozyten sowie großvolumige Thrombozyten lagern sich in den unteren Schichten des Buffy Coats ab. Kleine Thrombozyten mit einer niedrigeren Dichte sammeln sich im Buffy Coat weiter oben an. Je nachdem welche Zellart durch das Apheresesystem separiert werden soll, werden so auch unterschiedliche Schichten innerhalb des Buffy Coats anvisiert [11].

## **2. Ziel der Arbeit**

Ziel dieser Arbeit ist es zu überprüfen, ob das mittlere Thrombozytenvolumen (MPV) im Apheresat als neuer Qualitätsparameter für die Apherese verwendet werden kann. Im Detail wurde betrachtet, ob das durchschnittliche Thrombozytenvolumen des vom Apheresesystem hergestellten Zellkonzentrats in etwa der Volumenverteilung der Thrombozyten im peripheren Blut des Spenders entspricht oder ob hier separationstechnisch bedingt Abweichungen auftreten, die Aufschluss über die apheresierte Zellschicht innerhalb des Buffy Coats geben können.

Sollte es zu derartigen signifikanten und für das jeweilige Aphereseverfahren typischen Abweichungen des MPV-Werts kommen, könnte das mittlere Volumen der apheresierten Thrombozyten somit als Gütekriterium dienen, indem es die Schichteinstellung des Apheresesystems widerspiegelt und so eine präzise Analyse des Aphereseverfahrens ermöglicht.

Um die Auswirkung der während der Zellseparation verwendeten Gerinnungshemmer auf das Thrombozytenvolumen zu beurteilen, wurde ferner bei fünf Probanden das Zellvolumen unter Einfluss von Citrat (ACD-A), Heparin und EDTA bestimmt. Außerdem wurde bei diesen fünf Probanden überprüft, inwiefern sich messtechnisch ggf. notwendige Verdünnungen auf die Genauigkeit der Messinstrumente auswirken.

### 3. Methodik

#### 3.1 Thrombozytenspender

Im Rahmen der Datenerhebung wurden die Blutparameter von 10 Thrombozytenspendern erfasst, welche sich zwischen März und Dezember 2014 in der Blutspendezentrale des Universitätsklinikums Düsseldorf einer Thrombozytenspende unterzogen haben. Die Thrombozytenapherese erfolgt mit dem MCS<sup>+</sup><sup>®</sup> Apheresesystem der Firma Haemonetics.

Alle Spender wurden vor der Spende gemäß den „Richtlinien zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten“ auf ihre Spendertauglichkeit hin überprüft. Dies erfolgte anhand einer ärztlichen körperlichen Untersuchung, eines standardisierten Fragebogens sowie einer Blutuntersuchung [27]. Alle Spender wiesen vor der Thrombozytenapherese eine Thrombozytenkonzentration von über 150.000/ $\mu$ l auf. Des Weiteren wurden die Spender über die Durchführung der Spende und über die damit verbundenen Risiken aufgeklärt. Das Aphereseverfahren wurde so gewählt, dass nach der Apherese die Thrombozytenkonzentration der Spender nicht unter 100.000/ $\mu$ l lag. Tabelle 1 spiegelt die wichtigsten Parameter der Thrombozytenspender wider.

	weiblich	männlich	gesamt
<b>Anzahl</b>	n = 6	n = 4	n = 10
<b>Alter (Median)</b>	37,67 ( $\pm$ 6,04)	28,75 ( $\pm$ 1,88)	34,3 ( $\pm$ 3,15)
<b>Alter (Rang)</b>	26–40	24–33	24–46
<b>Mittlere Thrombozytenzahl vor Apherese</b>	296,33 ( $\pm$ 9,11)	284 ( $\pm$ 12,41)	291,4 ( $\pm$ 7,23)

**Tabelle 1: Allo gene Thrombozytenspender**, angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen [1].

### 3.2 Stammzellspender

Des Weiteren wurden die Blutparameter von 40 Stammzellspendern (10 autologe und 19 allogene Spender) untersucht, welche sich zwischen März und Dezember 2014 an der Universität Düsseldorf einer Stammzellspende im Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika unterzogen haben. Die Stammzellapherese wurde mit dem Apheresesystem Spectra Optia® der Firma Terumo BCT durchgeführt. Die Daten der autologen Stammzellspender sind in Tabelle 2 zusammengefasst, die der allogenen Stammzellspender in Tabelle 3.

	weiblich	männlich	gesamt
<b>Anzahl</b>	n = 3	n = 7	n = 10
<b>Alter (Median)</b>	44,33 (± 3,71)	31,43 (± 5,06)	35,30 (± 4,09)
<b>Alter (Rang)</b>	37–49	18–55	18–55
<b>Mittlere Thrombozytenzahl vor Apherese</b>	148,67 (± 56,45)	74,28 (± 9,86)	96,60 (± 19,67)

**Tabelle 2: Autologe Stammzellspender**, angegeben sind Mittelwerte und Standardfehler [1].

	weiblich	männlich	gesamt
<b>Anzahl</b>	n = 6	n = 13	n = 19
<b>Alter (Median)</b>	36 (± 5,51)	38,46 (± 3,32)	37,68 (± 2,78)
<b>Alter (Rang)</b>	22–48	19–54	19–54
<b>Mittlere Thrombozytenzahl vor Apherese</b>	170,16 (± 24,71)	197,15 (± 17,83)	190,10 (± 14,19)

**Tabelle 3: Allogene Stammzellspender**, angegeben sind Mittelwerte und Standardfehler [1].

Die Gesundheit und Spendertauglichkeit jedes Stammzell- und Thrombozytenspenders vor der jeweiligen Spende wurden gemäß den Empfehlungen der Bundesärztekammer mittels eines Fragebogens sowie eines persönlichen Aufklärungsgespräches und einer Untersuchung durch einen Facharzt der Klinik sichergestellt. Die Voruntersuchung durfte nicht länger als fünf Wochen vor der Spende liegen. Zur Mobilisation der Stammzellen aus dem Knochenmark ins periphere Blut erhielten die Stammzellspender an vier aufeinanderfolgenden Tagen sowie am fünften Tag kurz vor der

Stammzellapherese das G-CSF Präparat Lenograstim, Handelsname Granocyte34<sup>®</sup>, in einer Dosis von 10 µg/kg KG G-CSF subkutan injiziert [5].

### 3.3 Probanden der Verdünnungsreihe

Zur Bestimmung des Einflusses der jeweils verwendeten Gerinnungshemmer (ACD-A, Heparin und EDTA) und der Thrombozytenkonzentration auf das gemessene Thrombozytenvolumen wurde bei fünf Probanden jeweils eine Verdünnungsreihe mit den Verdünnungen 1:1, 1:2, 1:5 und 1:9 mit ACD-A und autologem Plasma angelegt. Zur besseren Übersicht sind die Daten der Probanden in Tabelle 4 zusammengefasst. Für die Blutentnahme kamen Monovetten der Firma Sarstedt zum Einsatz. Zur Gewinnung des autologen Plasmas verwendeten wir die Zentrifuge „Centrifuge 5810R“ der Firma Eppendorf.

	weiblich	männlich	gesamt
<b>Anzahl</b>	n = 1	n = 4	n = 5
<b>Alter (Median)</b>	24 (± 0)	21,75(± 0,75)	22,2 (± 0,82)
<b>Alter (Rang)</b>	24	20–23	20–24
<b>Hämoglobin in g/dl</b>	13,2 (± 0)	17,05 (± 0,29)	16,28 (± 0,80)
<b>Mittlere Thrombozytenzahl pro nl</b>	449 (± 0)	247,25 (± 22,66)	287,6 (± 44,01)
<b>MPV</b>	9,5 (± 0)	11,52 (± 0,26)	11,12 (± 0,45)

**Tabelle 4: Probanden der Verdünnungsreihe**, angegeben sind Mittelwerte und Standardfehler [1].

### 3.4 Verwendete Geräte

#### 3.4.1 Multikomponentenapheresesystem MCS+<sup>®</sup> Haemonetics

Das MCS+<sup>®</sup> ist ein Multikomponentenapheresesystem der Firma Haemonetics, das für die Sammlung von Thrombozyten, Plasma und Erythrozyten verwendet werden kann (siehe Abb. 3). Es handelt sich hierbei um eine diskontinuierliche Separation, bei der die Apherese in mehreren Zyklen erfolgt. Während jedes Zyklus wird dem Spender eine bestimmte Menge Blut entnommen und anschließend werden die nicht benötigten Blutbestandteile dem Spender zurückgegeben. Die Thrombozyten werden vom System separiert und in einem Sammelbeutel geleitet. Die Menge des entnommenen Blutes und

die Anzahl der Zyklen sind von den Blutparametern des Spenders abhängig und können individuell berechnet werden [2].

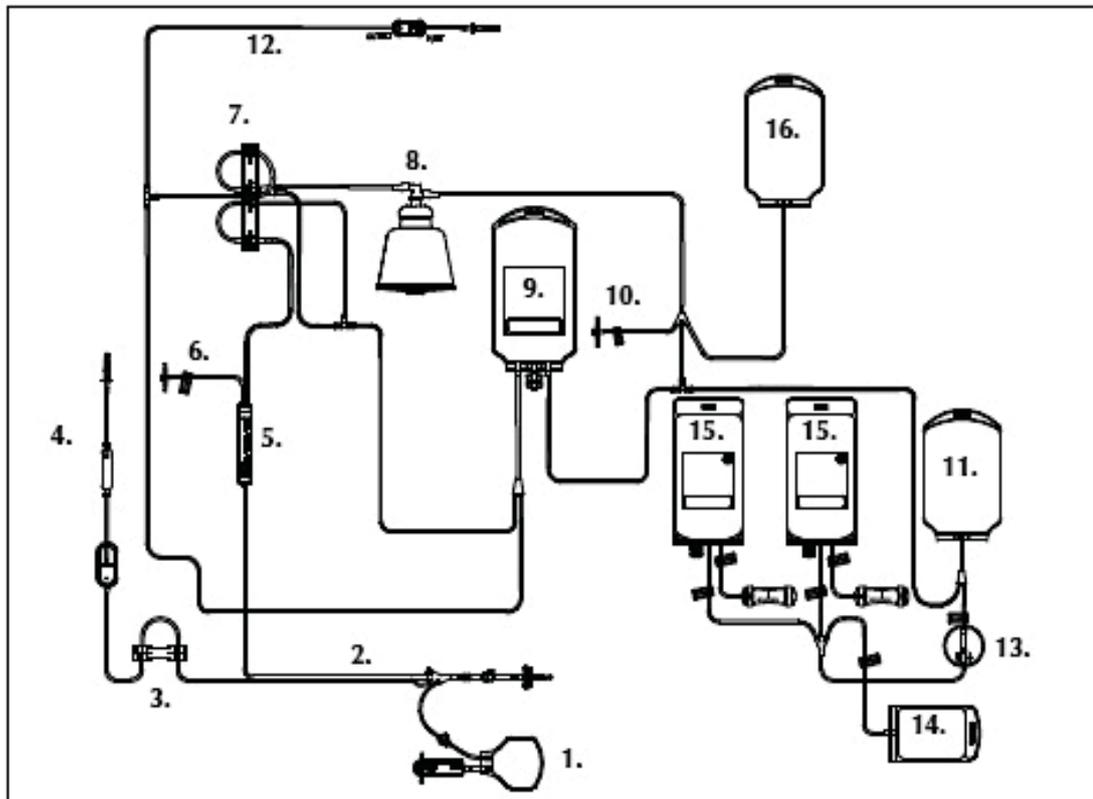


**Abbildung 3: MCS+® Haemonetics Apheresesystem**

Das MCS+® verwendet eine Ein-Nadel-Technik. Das Vollblut wird über dieselbe Kanüle entnommen, über welche die nicht benötigten Blutbestandteile dem Spender wieder zugeführt werden. Die Entnahmegeschwindigkeit wird über Sensoren an die Blutflusskapazität des Spenders angepasst. Während der gesamten Thrombozytenapherese trägt der Spender eine Tourniquet-Manschette am Oberarm oberhalb der Punktionsstelle. Diese bläst sich automatisch während der Entnahmephase auf, um einen guten Blutfluss zu gewährleisten. Während der Rückgabephase lässt der Druck der Manschette nach, damit das Blut zum Spender zurückfließen kann [2].

Zum Ausgleich des Blutverlustes wird über das MCS+® während der Spende physiologische Kochsalzlösung infundiert (siehe Abb. 4 Nr. 12). Zur Separation von Thrombozyten verwendet das MCS+® das „Universelle MCS+®

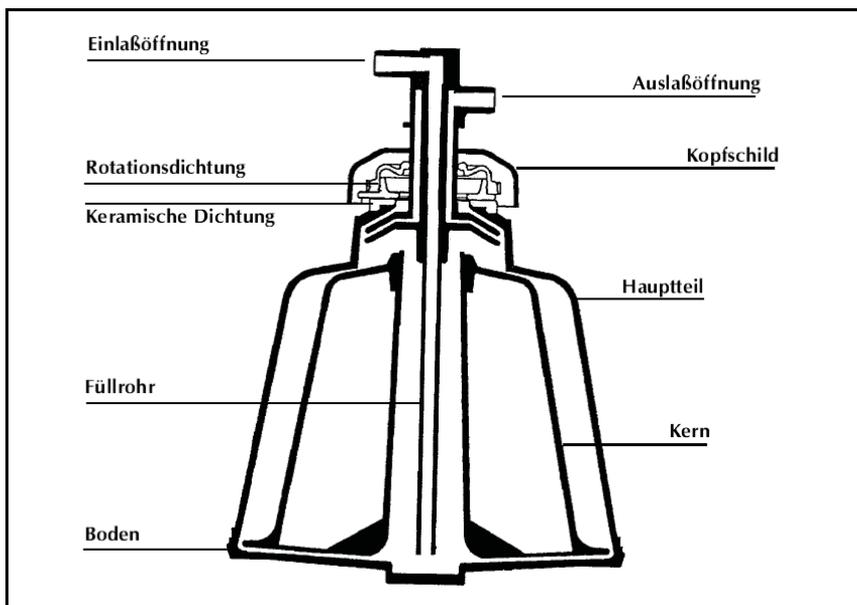
Thrombozytenprotokoll“ UPP. Abbildung 3 zeigt eine schematische Darstellung des UPP-Einmalsets LN 997CF-E, das bei der Thrombozytenapherese am Universitätsklinikum Düsseldorf eingesetzt wird. Es handelt sich um eine Einzelspenderthrombozytenapherese mit NaCl- oder Plasmakompensation [38].



**Abbildung 4: UPP-Einmalset LN 997CF-E**, 1. Spenderschlauchprobenbeutel, 2. Spender-/Nadelschlauch, 3. Einzelpumpenverteiler, 4. AC-Lösungsschlauch, 5. Blutfilterkammer, 6. Spenderdruckmonitor (DPM), 7. Doppelpumpenverteiler, 8. Latham-Glocke, 9. Plasmabeutel, 10. Systemdruckmonitor (SPM), 11. Thrombozytenreservoir, 12. NaCl-Schlauch, 13. Thrombozytenfilter, 14. Entlüftungsbeutel, 15. Thrombozytenlagerungsbeutel und Probenkolben, 16. Luftbeutel [39]. Images of the MCS® system and related disposables are used by permission of Haemonetics Corporation

Damit es im extrakorporalen Kreislauf nicht zu einer Gerinnung des entnommenen Blutes kommt, wird dem Blut ein Antikoagulans (siehe Abb. 4 Nr. 4) zugeführt. Das über die Kubitalvene entnommene Blut fließt über ein Einmalschlauchsystem in die Latham-Glocke, benannt nach dem Erfinder der ursprünglichen Zentrifugalverarbeitungskammer Allen Latham jr., dem Gründer von Haemonetics Corporation (siehe Abb. 4 Nr. 8). Diese Glocke ist das Kernstück des Apheresesystems [2].

In Abbildung 5 ist eine schematische Darstellung der Latham-Glocke zu sehen. Diese besteht aus zwei Abschnitten: einem festen Abschnitt mit Einlassöffnung, Füllrohr sowie einem Ausströmungsweg mit Auslassöffnung. Der zweite Abschnitt besteht aus der Zentrifugenglocke selbst und der Rotationsdichtung. Die Zentrifugenglocke hat ein Fassungsvermögen von ca. 125 ml und rotiert mit einer Geschwindigkeit von 4.800 Umdrehungen pro Minute um die eigene Achse [40].



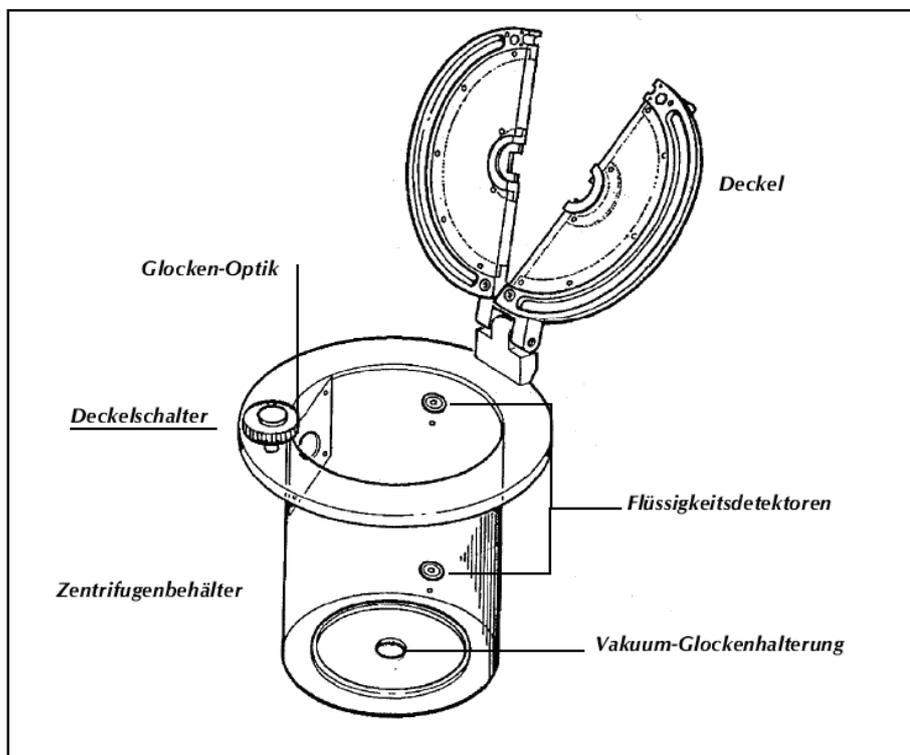
**Abbildung 5: Einwegblutverarbeitungsglocke von Latham** [38]. Images of the MCS® system and related disposables are used by permission of Haemonetics Corporation

In der Füllphase fließt das mit ACDA-Lösung im Schlauchsystem antikoagulierte Blut durch die Einlassöffnung in das Füllrohr und zum Grund der Glocke. Die sich in der Glocke befindende sterile Luft wird vom Blut in einen Sammelbeutel verdrängt (siehe Abb. 4 Nr. 16).

Sobald das Blut in die Glocke eintritt, beginnt die Zentrifugation. Durch die in der Glocke herrschenden Zentrifugalkräfte kommt es zur Separation der Blutbestandteile entsprechend ihrer Dichte. Bestandteile mit einer hohen Dichte, wie die Erythrozyten, sammeln sich in der äußersten Schicht an der Wand der Glocke. Darauf folgt der Buffy Coat. Die innen gelegene Schicht bildet das Plasma [40].

Ist die Glocke gefüllt, wird der Dichte nach zunächst das Plasma aus den innen gelegenen Schichten in die jeweiligen Beutel abgeleitet. Ist ein Großteil des Plasmas

abgesaugt, erreicht der Buffy Coat den Glockenoptiksensoren. Die Glockenoptik ist in den Zentrifugenbehälter eingelassen und detektiert die einzelnen Zellschichten und deren Position während der Zentrifugation (siehe Abb. 6). Dazu verwendet sie ein LED-Licht. Das LED-Licht trifft auf die verschiedenen Zellschichten in der Glocke und wird von ihnen an die Optik reflektiert. Anhand der unterschiedlichen Brechungsgrade des reflektierten LED-Lichts ist der Sensor der Glockenoptik in der Lage, die einzelnen Schichten (Luft, Übergang Luft/Plasma, Plasma, Buffy Coat) voneinander zu unterscheiden [38].

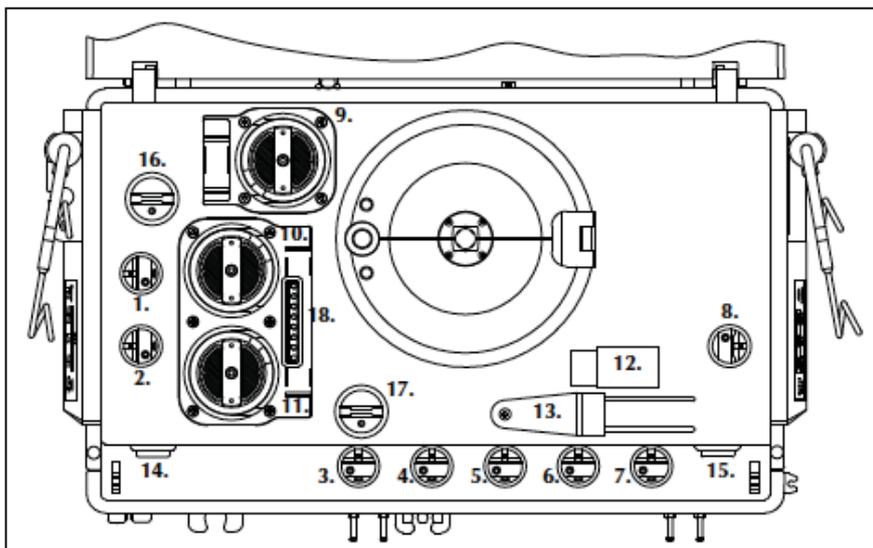


**Abbildung 6: Zentrifugenbehälter mit Glockenoptik [38].** Images of the MCS® system and related disposables are used by permission of Haemonetics Corporation

Erkennt die Glockenoptik den Buffy Coat, wird die Verweil- und Surge-Phase eingeleitet, in der die Thrombozyten aus der Buffy-Coat-Schicht ausgewaschen werden [2].

Mit dem Start der Verweilphase stoppt die Blutpumpe die Entnahme des Spenderbluts. Die Transverpumpe transportiert nun Plasma aus dem Plasmabeutel zurück in die Glocke, um das restliche Vollblut aus dem Glockenfüllrohr zu spülen. Dann beginnt die Surge-Phase [2].

In der Surge-Phase wird Plasma mit erhöhter Geschwindigkeit in die Glocke zurückgeleitet. Das Plasma fließt durch die Zellschichten nach oben. Dadurch wird die Dichtentrennung in den einzelnen Zellschichten erhöht. Das Plasma zieht die Thrombozyten, die eine geringere Dichte haben, nach oben mit sich, schwerere Zellen sammeln sich unten an. Dieses Verfahren verbessert die Separation der Zellschichten und trägt zu einer erhöhten Thrombozytenausbeute bei. Zusammen mit dem Plasma verlassen die Thrombozyten die Glocke über die Auslassöffnung in den Auslassschlauch [2].



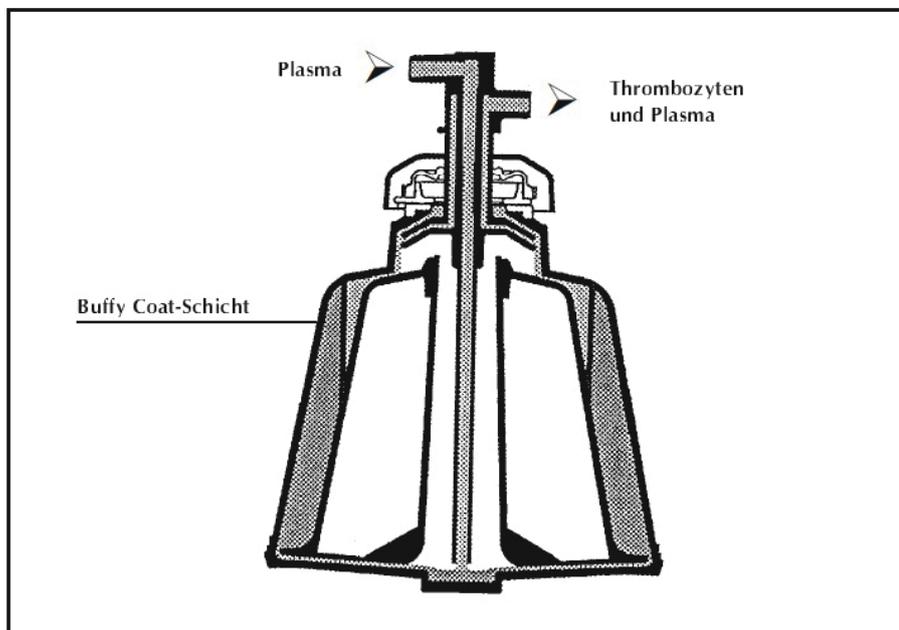
**Abbildung 7: MCS+® Ansicht von oben**, 9. AC-Pumpe, 10. Transferpumpe, 11. Blutpumpe, 12 optischer Line-Sensor, 13. Waage [39]. Images of the MCS® system and related disposables are used by permission of Haemonetics Corporation.

Der Auslassschlauch ist am Line-Sensor befestigt (siehe Abb. 7 Nr. 12). Dieser öffnet das Ventil zum Thrombozytenreservoir (siehe Abb. 4 Nr. 11), sobald er Thrombozyten im Auslassschlauch detektiert. Hierzu verwendet der Sensor Infrarotstrahlung [39].

Vor Beginn der Verweilphase, wenn die Glockenoptik den Plasma-Buffy-Coat-Übergang erkennt, meldet sie dies dem Line-Sensor, der dann eine Referenzmessung durchführt. Zu diesem Zeitpunkt befindet sich reines Plasma im Auslassschlauch. Der Line-Sensor sendet nun Infrarotstrahlung quer durch den Schlauch. Auf der anderen Seite detektiert er die ankommende Infrarotstrahlung und berechnet so, wieviel Prozent der Strahlung durch das Plasma absorbiert wurde. Mischen sich nun Thrombozyten ins

Plasma, steigt der Anteil an absorbiert Strahlung. Sobald mehr als 5 % der Gesamtstrahlung bedingt durch thrombozytenhaltiges Plasma absorbiert werden, öffnet der Line-Sensor das Ventil zum Thrombozytenreservoir [2] [38].

Die Thrombozyten werden nun in das Thrombozytenreservoir abgeleitet (siehe Abb. 8). Die angesammelten Thrombozyten werden als Thrombozyten-Peak bezeichnet. Bemerkt der Line-Sensor, dass die Thrombozytenkonzentration im Auslassschlauch abnimmt, beendet er die Surge-Phase. Die Rückgabephase wird dann eingeleitet [39].



**Abbildung 8: Latham-Glocke in der Entnahmephase/Surge-Phase** [38]. Images of the MCS® system and related disposables are used by permission of Haemonetics Corporation

Wenn die Latham-Glocke aufhört zu rotieren, vermischen sich die in der Glocke zurückgebliebenen Blutkomponenten wieder. Dieses Blut kann nun mit dem im Plasmabeutel befindlichen Plasma oder der physiologischen Kochsalzlösung dem Spender über dieselbe Kanüle reinfundiert werden. Nachdem am Ende eines solchen Apheresezyklus der restliche Glockeninhalte dem Spender zurückgeleitet wurde, werden die Glocke und der Blutfilter mit Restplasma aus dem Plasmabeutel durchspült. So kann gewährleistet werden, dass dem Spender möglichst viele nicht benötigte Blutkomponenten wieder zugeführt werden und der Blutfilter nicht verstopft. Um zu verhindern, dass sterile Luft aus dem Luftbeutel in das Schlauchsystem gerät und dem

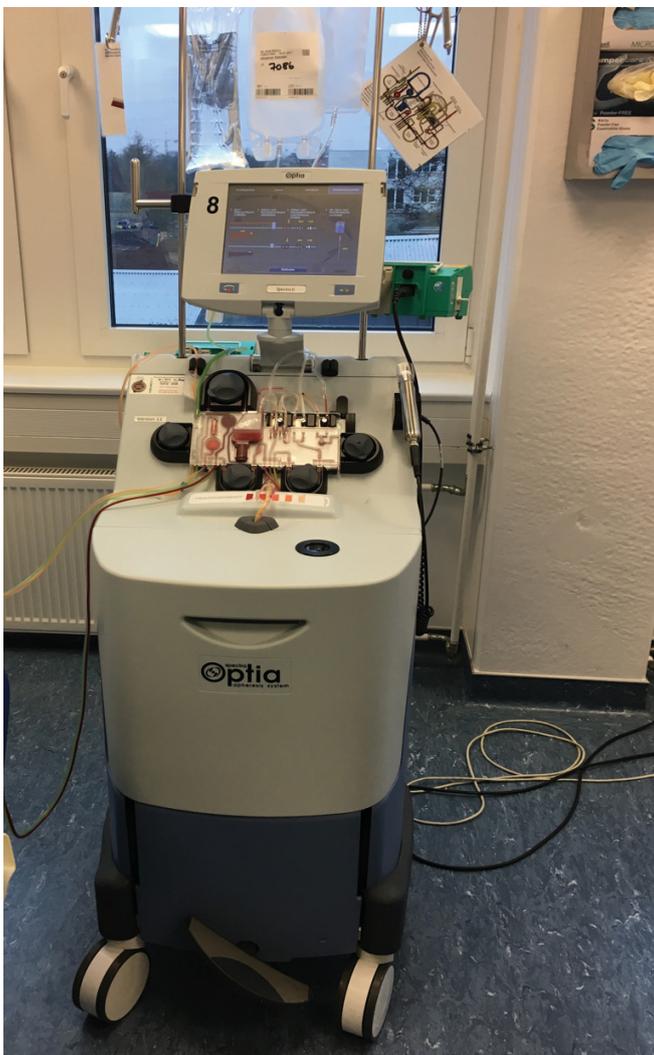
Spender infundiert wird, sind im System Detektoren installiert, die den Rückgabemodus unterbrechen, sobald sie Luft im Schlauchsystem bemerken [38].

Im letzten Zyklus werden die separierten Thrombozyten aus dem Thrombozytenreservoir durch den Thrombozytenfilter in den Thrombozytenlagerungsbeutel geleitet. Nachdem der Thrombozytenlagerungsbeutel durch die Waage des MCS+<sup>®</sup> verifiziert wurde, kann Thrombozytenadditivlösung dem Konzentrat zugeführt werden [40].

Mit dem MCS+<sup>®</sup> können auch konzentrierte Thrombozytenkonzentrate hergestellt werden. Hierzu muss vor der Spende die C-SDP-Protokolloption eingestellt werden. Ein besonderes Merkmal dieses Protokolls ist die Super-Surge-Entnahmephase, die im letzten Zyklus eines Thrombozytenaphereseprotokolls stattfindet. Im letzten Zyklus werden alle bisher gesammelten Thrombozyten in die Glocke zurückgegeben. Durch erneutes Zentrifugieren und Absaugen kann überschüssiges Plasma, das sich im Thrombozytenreservoir angesammelt hat, entfernt werden. Das gesamte Verfahren dauert pro Thrombozytenspende etwa 45 bis 60 Minuten [38].

### 3.4.2 Hämapheresesystem Spectra Optia®

Bei dem in der Universitätsklinik Düsseldorf verwendeten Stammzellapheresesystem handelt es sich um das Spectra Optia® der Firma Terumo BCT, Lakewood Colorado, USA. Das Apheresesystem Spectra Optia® orientiert sich am Vorgängermodell Cobe Spectra. Abbildung 9 zeigt eines der in der Universitätsklinik verwendeten Apheresesysteme.

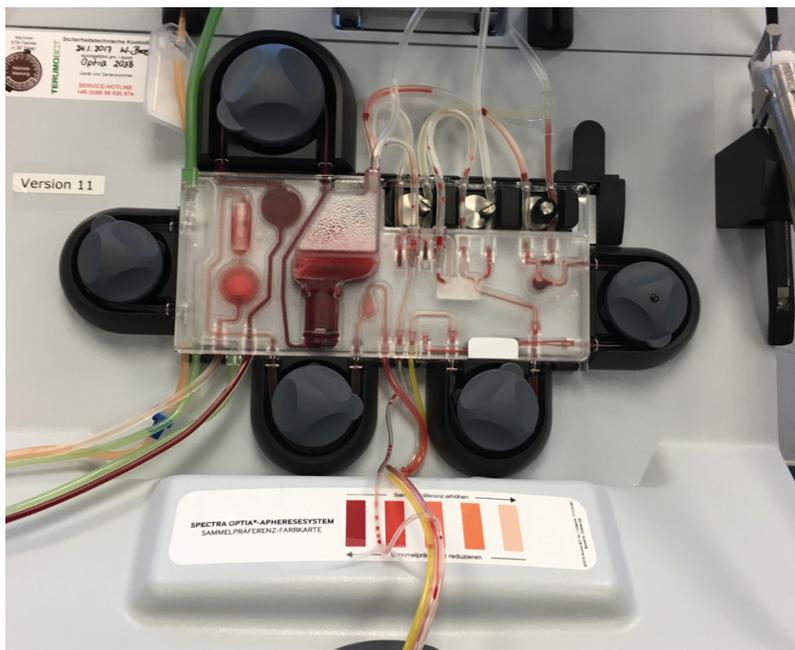


**Abbildung 9:** Apheresesystem Spectra Optia®

Das Apheresesystem ist ein Blutkomponentenseparator, der sowohl zur Zellsammlung als auch zur Zellverarbeitung verwendet werden kann. Neben der Stammzellapherese, die kontinuierlich (kMNZ) sowie diskontinuierlich (MNZ) durchgeführt werden kann, findet das Spectra Optia® unter anderem Anwendung im therapeutischen

Plasmaaustausch, im Erythrozytenaustausch sowie in der Depletion von Erythrozyten, Leukozyten oder Thrombozyten [4].

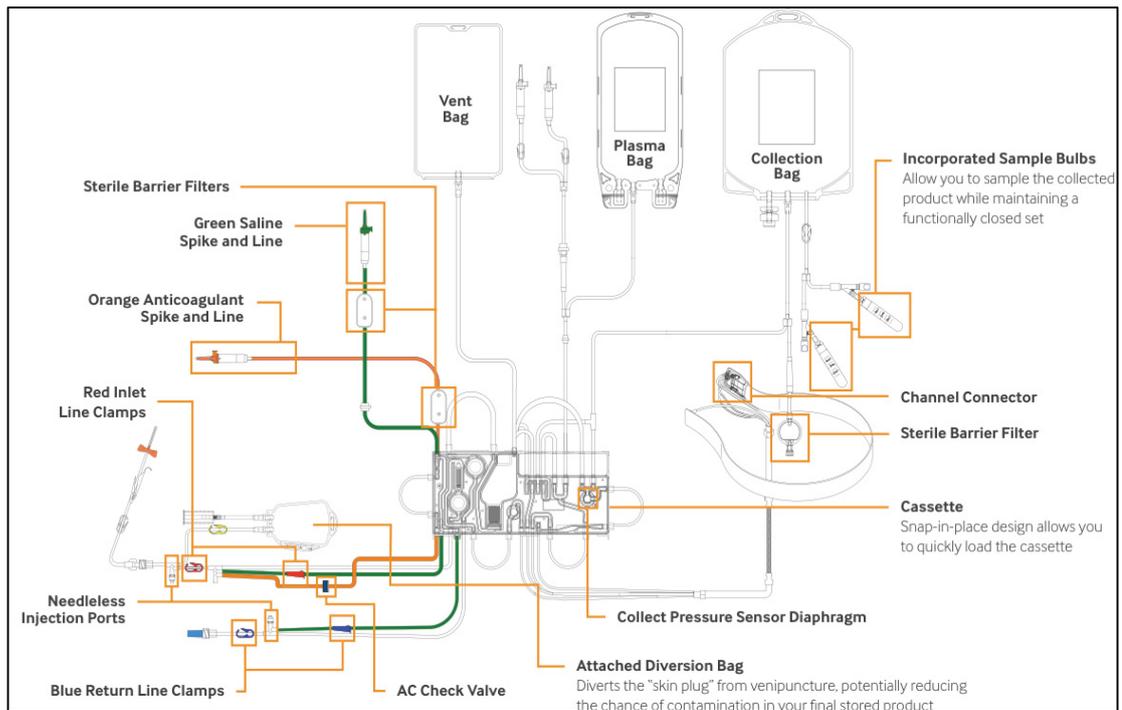
Zu dem System gehören neben dem Kernstück der Zentrifugenkammer mit Zentrifuge, Füllvorrichtung, Regulationskammer, Sammelkammer und dem ASM-System auch ein Monitor mit Touchscreen zur Überwachung und Regulation des Aphereseverfahrens sowie eine an der Front angebrachte Kassettenhalterung zur Befestigung des Einwegschlauchsystems mit multiplen Rollpumpen, Sensoren und Detektoren (siehe Abb. 10). Vor Gebrauch des Aphereseystems müssen einige Daten des Spenders sowie die Größe, das Gewicht und der Hämatokrit in das System eingegeben werden. Hieraus werden automatisch die notwendigen Plasmaflussraten und Pumpeinstellungen errechnet, um den Aphereseprozess individuell auf den Spender anzupassen [4] [41].



**Abbildung 10: Auswechselbares Einwegschlauchsystem**

Zur Apherese von peripheren Blutstammzellen (PBSZ) wird beim Spectra Optia® das kMNZ-Programm verwendet. Zu Beginn wird das Schlauchsystem über eine Kanüle an die Kubitalvene des Spenders angeschlossen. Das Schlauchsystem ist für den einmaligen Gebrauch gedacht, damit wird für eine sterile Herstellung des Blutzellkonzentrates gesorgt. Um Verstopfungen der Schlauchsysteme zu verhindern

und Gerinnsel zu vermeiden, wird das durchfließende Blut mit einer ACD-A-Lösung antikoaguliert. In Abbildung 11 ist eine schematische Darstellung des Schlauchsystems für die periphere Blutstammzellapherese mit dem kMNZ-Programm zu sehen [4].

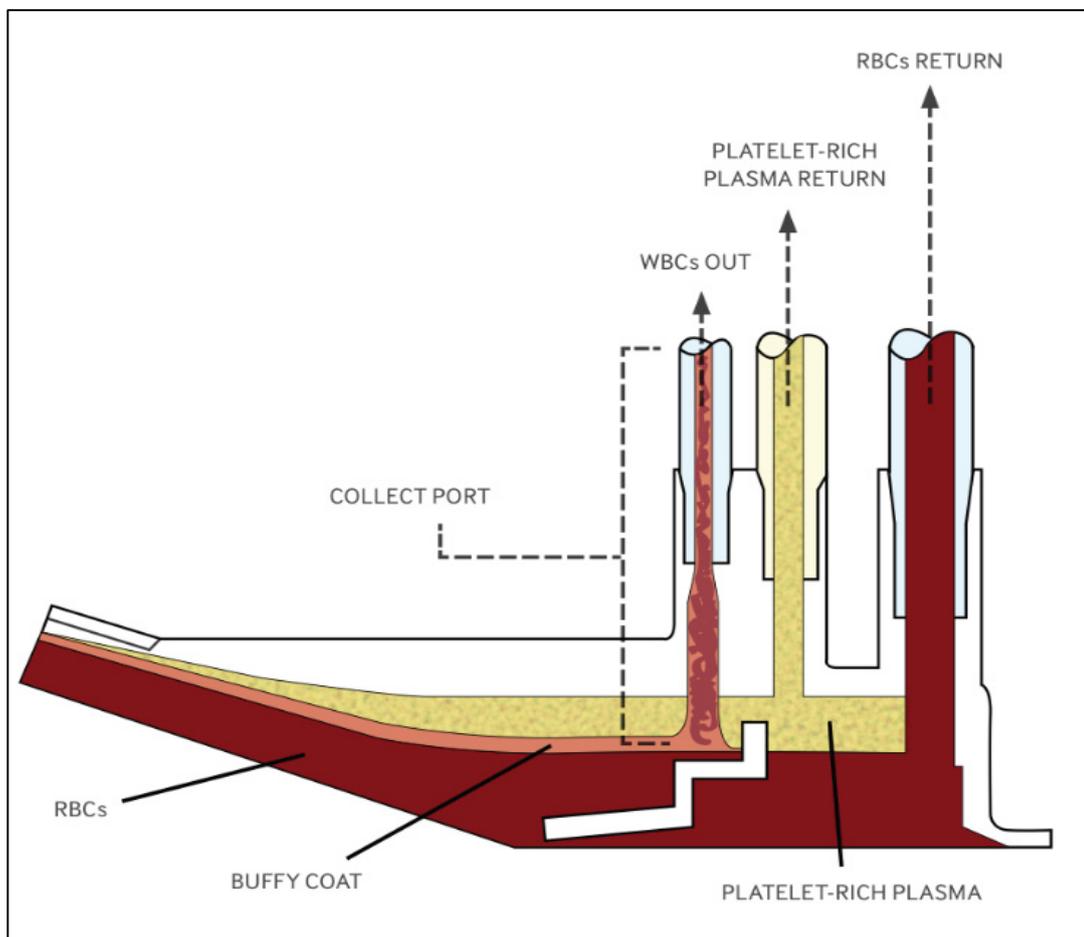


**Abbildung 11: Schematische Darstellung des Schlauchsystems beim kMNZ-Programm [41].** Copyright, Terumo BCT, Inc. 2017. Used with Permission.

Das Blut wird über das Schlauchsystem durch die Einlasspumpe in einen zweistufigen Kanal (dual stage channel) der Zentrifuge geleitet. An diesem Kanalsystem sind vier Schlauchsysteme angebracht, drei Auslassschläuche sowie ein Einlassschlauch, der das angesaugte Blut des Spenders in die Zentrifuge pumpt. Durch die drei Auslassventile können zum einen die zu sammelnden Stammzellen abgesaugt werden, zum anderen dienen sie zur Separation des Plasmas und der Erythrozyten. Die maximale Zentrifugiergeschwindigkeit beträgt 3.000 U/min mit einer maximalen Fliehkraft von 1.200 g [4]. Eine schematische Darstellung dieses Vorganges ist in Abbildung 12 zu sehen.

Im ovalen Kanalsystem wird das Blut der Dichte nach in seine einzelnen Bestandteile aufgetrennt. Die äußerste Schicht bilden die Erythrozyten, die innere Schicht das Plasma. Zwischen Erythrozyten und Plasma befindet sich die Schicht der Leukozyten,

in denen sich auch die Stammzellen ansammeln, im sogenannten Buffy Coat. Durch den Erythrozytenschlauch werden die Erythrozyten aus der äußeren Schicht abgesaugt. Der Plasmaschlauch saugt aus der inneren Schicht das Plasma ab. Dieses kann nun in einem Plasmabeutel gesammelt oder vermischt mit den Erythrozyten wieder an den Spender zurückgeleitet werden. Der dritte Auslassschlauch, der Sammelschlauch, dient zur Sammlung der Stammzellen an der Schnittstelle im Buffy Coat (siehe Abbildung 12) [4] [41].



**Abbildung 12: Schematische Darstellung der Regulationskammer** [41]. Copyright, Terumo BCT, Inc. 2017. Used with Permission

Die zellulären Bestandteile sammeln sich in der ersten Stufe des Kanals an. Das Sediment bilden die Erythrozyten. Der Erythrozytenschlauch saugt einen Teil der Erythrozyten ab und lagert diese im Reservoir. Über den Erythrozyten liegt die Schicht

der mononukleären Zellen sowie die der Stammzellen. Sie fließen mit dem Plasma über eine Barriere auf die zweite Stufe des Kanals. Das plättchenreiche Plasma kann hier über den Plasmaschlauch abgesaugt und in einem Plasmabeutel gesammelt oder mit den Erythrozyten vermischt dem Spender zurückgegeben werden. Große Thrombozyten mit einer höheren Dichte verbleiben auf der zweiten Stufe und vermischen sich im Buffy Coat mit der Schicht der mononukleären Zellen. Aus dieser Zellschicht werden nun die Stammzellen separiert und über den Sammelschlauch in den Sammelbeutel geleitet [42].

Am Sammelschlauch befindet sich das sogenannte „Automatische-Schnittstellen-Management-System“ (ASM). Es handelt sich hierbei um ein aus verschiedenen Bestandteilen zusammengesetztes optisches Erkennungssystem. Es erkennt die Schnittstelle innerhalb des Buffy Coats und sorgt für deren Einstellung in der Regulationskammer, indem es die Plasmapumpflussrate und Zentrifugiergeschwindigkeit des Systems erhöht oder erniedrigt. Das optische System des ASM-Systems ist in der Lage, Erythrozyten im Sammelschlauch zu detektieren. Übersteigt der Hämatokrit im Sammelschlauch einen bestimmten Wert, wird die Fluss- und Zentrifugationsrate derart angepasst, bis sich wieder weniger Erythrozyten im Sammelschlauch befinden. Das ASM-System kann sowohl im automatischen als auch im halb automatischen Modus betrieben werden. Im Automatikmodus steuert das ASM-System ohne weitere Angaben des Bedieners die Pumpflussrate und die Zentrifugendrehzahl, um die anfangs eingestellte Schnittstelle herzustellen und die Schnittstellenposition zu halten [41] [4].

Im halb automatischen Modus kann der Bediener Einfluss auf die Schnittstellenposition nehmen. Durch ein Sichtfenster in der Zentrifugenkammer kann der Bediener den Sammelschlauch kurz nach Verlassen der Regulationskammer beobachten. Der Sammelschlauch ist so zu jeder Zeit sichtbar und kann mit einer Farbskala, die am Gerät angebracht ist, verglichen werden. So ist es dem Bediener möglich, den aktuellen Hämatokrit im Sammelschlauch abzuschätzen und gegebenenfalls die Pumpflusseinstellungen anzupassen [4] [41].

Die Rotfärbung der Flüssigkeit im Sammelschlauch spiegelt hierbei die Menge an Erythrozyten und somit die eingestellte Sammelpräferenz wider, also die Schnittstelle

des Sammelschlauchs im Buffy Coat. Über Pfeiltasten auf dem Bildschirm kann die Sammelpräferenz verändert werden. Bei sehr hellem Schlauchinhalt kann durch Erniedrigen der Sammelpräferenz die Konzentration der Zellen im Sammelschlauch erhöht werden. Es erfolgt eine Apherese aus den tieferen Schichten des Buffy Coats. Somit werden mehr Stammzellen, allerdings auch mehr Erythrozyten separiert. Wird die Sammelpräferenz bei stark gerötetem Schlauchinhalt erhöht, wird die Anzahl an separierten Erythrozyten minimiert und aus den weiter oben gelegenen Schichten des Buffy Coats gesammelt. Als Standardeinstellung wird ein Hämatokrit im Sammelschlauch von ca. 3 bis 4 % toleriert [4,36].

Da es sich um einen kontinuierlichen Prozess handelt, wird der Spender über zwei Venenkanülen an das Apheresesystem angeschlossen. Über eine Kanüle fließt das Blut in das Apheresesystem, über die andere Kanüle werden nicht benötigte Blutbestandteile dem Spender wieder zugeführt. Das extrakorporale Volumen bei der kontinuierlichen Stammzellapherese beträgt ca. 253 ml. Während der Spende läuft das Blut des Spenders durchschnittlich viermal durch das Apheresesystem. Der gesamte Prozess dauert zwischen 3 und 4 Stunden [4] [41].

Das Volumen des Apheresats hängt dabei von der Konzentration der Stammzellen im Blut ab. Diese ist wiederum von der Mobilisation durch G-CSF sowie dem Geschlecht und Alter des Spenders abhängig. Können am ersten Spendetag nicht genug Stammzellen aus dem peripheren Blut separiert werden, kann der Apheresevorgang am Folgetag wiederholt werden [41] [4].

### 3.4.3 Zellcounter Sysmex XE-2100®

Für die Bestimmung der Laborparameter wurde der Sysmex Zellcounter XE-2100® verwendet. Dieser Zellcounter ist in Abbildung 13 dargestellt.



Abbildung 13: Sysmex XE-2100®

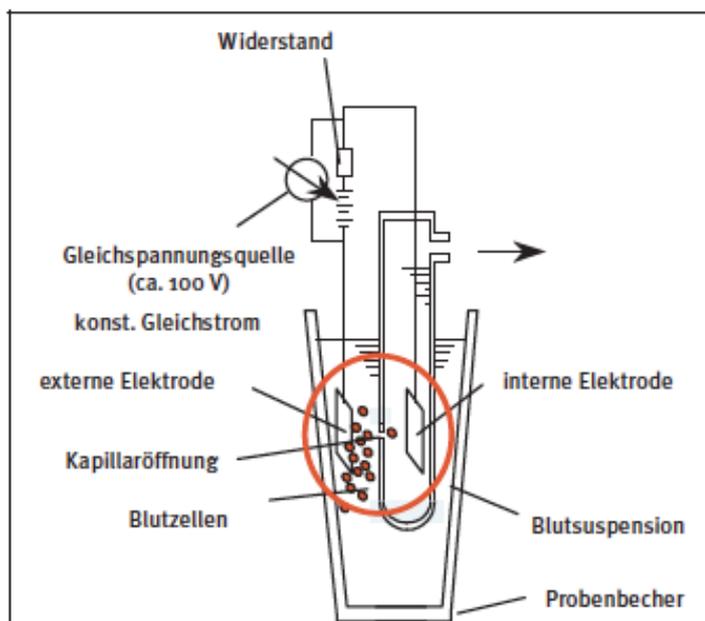
Das System der Firma Sysmex arbeitet mit einer Fluoreszenzdurchflusszytometrie in Kombination mit einer Mehrkanalmesstechnologie. Es enthält verschiedene Kanäle, die unterschiedliche Messprofile benutzen. Hierzu gehören der RBC/PLT-Kanal, Hämoglobinkanal, WBC/BASO-Kanal, DIFF-Kanal, IMI-Kanal, RET-Kanal und der NRBC-Kanal. Neben Zahlwerten werden vom Sysmex XE-2100® auch Histogramme und Scattergramme erstellt [43].

Zur Bestimmung der einzelnen Parameter wird eine Probenmenge von 500 µl pro Blutprobe über eine Düse aus einem Behältnis gesaugt. Nach jeder Probenentnahme folgt eine automatisierte Reinigung und Desinfizierung der Düse, um Verunreinigungen bei den folgenden Messungen anderer Proben zu verhindern [44].

#### 3.4.3.1 RBC/PLT-Kanal

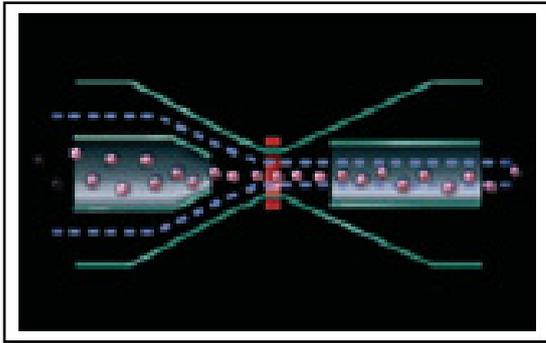
Rote Blutkörperchen und Plättchen werden mittels hydrodynamischer Fokussierung gemessen. Aufgrund der eindeutigen Größenunterschiede können beide Zellen in derselben Messkammer bestimmt werden. Von der Blutprobe werden 4 µl zur Messung

der Erythrozyten- und Thrombozytenkonzentration verwendet. Diese werden mit „Cellpack“, einem Verdünnungsreagenz, im Verhältnis 1:500 verdünnt. Von der Messkammer wird die Lösung durch eine Kapillaröffnung gesaugt. Beim Passieren der Öffnung verursachen die Zellen eine elektrische Widerstandsänderung, die als Impuls bestimmt werden kann. Der Impuls verhält sich proportional zur Größe der Zelle. So kann zwischen Thrombozyt und Erythrozyt unterschieden werden. Das Gerät misst die Anzahl und Größe der jeweiligen Impulse in einem definierten Zeitraum [43,45]. Dies ist in Abbildung 14 schematisch dargestellt.



**Abbildung 14:** Grafische Darstellung des RBC/PLT-Kanals [43]. Used with Permission

Durch das Reagenz „Cellshealth“ wird ein Mantelstrom erzeugt, der die einzelnen Zellen zylindrisch umhüllt. Diese Methode wird als hydrodynamische Fokussierung (HDF) bezeichnet (siehe Abb. 15). Sie garantiert, dass alle Zellen die Messöffnung einzeln und zentral passieren. So kann der Sysmex XE-2100<sup>®</sup> ein genaues Zählergebnis erzielen und Störsignale durch Koinzidenzen und Rezirkulation minimieren sowie das Verstopfen der Messöffnung durch andauernde Spülung verhindern. Die Ergebnisse werden in zwei Histogrammen grafisch dargestellt. Neben der Erythrozyten- und Thrombozytenzahl kann der Kanal zusätzlich den Hämatokrit und die Erythrozytenindizes berechnen [43,45].



**Abbildung 15: Grafische Darstellung der hydrodynamischen Fokussierung** [43]. Used with Permission

### 3.4.3.2 Hämoglobinkanal

Die Hämoglobinkonzentration wird mittels der Hämoglobin-SLS-Methode gemessen. Ein Teil des angesaugten Blutes wird hierbei mit einem Natrium-Lauryl-Sulfat(SLS)-haltigen Reagenz verdünnt. Das SLS löst die Zellmembran aller Zellen auf, und das Hämoglobin verlässt die Zellen. Die hydrophobe Gruppe des Natrium-Lauryl-Sulfates verbindet sich mit dem Globinanteil des Hämoglobins. Dies bewirkt eine Konformationsänderung des Hämoglobins, sodass es zu Methämoglobin oxidiert. Der hydrophile Anteil des SLS-Moleküls bindet nun das dreiwertige Eisen. Dadurch entsteht ein SLS-Hb-Komplex, der mittels Fotometrie mit einem Absorptionsmaximum von 555 nm gemessen werden kann. Störsignale durch Leukozyten oder Fette können aufgrund der Verdünnung mit SLS und der Messung in einem separaten Messkanal minimiert werden [43].

### 3.4.3.3 Durchflusszytometrie

Durch die Durchflusszytometrie können verschiedene Eigenschaften der einzelnen Blutzellen in den Messkanälen bestimmt werden. Das Blut wird mit einem Reagenz verdünnt und nach einer Inkubationszeit in der Durchflusszelle analysiert. Die Zellen werden dort mit monochromatischem Licht bestrahlt. Je nach Streuwinkel können bei Vorwärtstreuung die Zellgröße, bei Seitwärtstreuung interne Zellstrukturen und Komplexitäten und durch Seitwärtsfluoreszenzlicht der RNA/DNA-Gehalt der Zelle berechnet werden (siehe Abb. 16) [43].

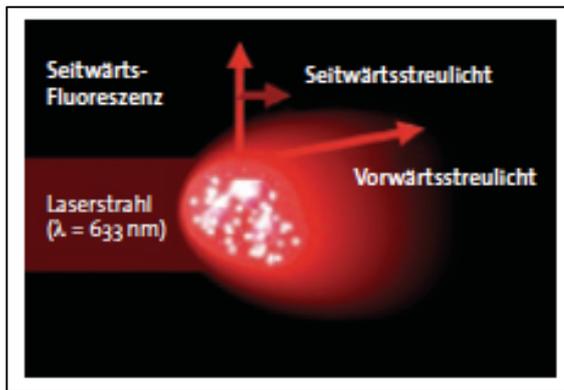


Abbildung 16: Grafische Darstellung der Lichtstreuung [43]. Used with Permission

### 3.4.3.4 RET-Kanal

Dieser Kanal wird zur Messung der Retikulozyten verwendet. Das Blut wird mit dem Reagenziensystem ret-search II inkubiert. Dies führt zu einer Perforation der Zellmembran. Ein Fluoreszenzfarbstoff dringt nun in die Zellen ein und färbt dort die Nucleinsäuren im Zellkern und im Zytoplasma. Mittels Streulicht und Fluoreszenzintensität kann so der Nucleinsäuregehalt der jeweiligen Zellen gemessen werden. Da Leukozyten und Erythroblasten einen deutlich höheren und Erythrozyten einen deutlich niedrigeren Nucleinsäuregehalt aufweisen, können diese klar von den Retikulozyten abgegrenzt werden. Des Weiteren nimmt der RNA-Gehalt (Nucleinsäure) der Retikulozyten im Laufe der Reifung kontinuierlich ab [44]. So können durch diese Messtechnik die verschiedenen Altersstufen der Retikulozyten bestimmt werden [43].

### 3.4.3.5 Bestimmung unreifer Thrombozyten

Mithilfe einer speziellen Software (IPF-Master) kann der Anteil unreifer, wenige Tage alter Thrombozyten mit dem RET-Kanal bestimmt werden. Sie enthalten mehr Ribonucleinsäure als die ausgereiften Blutplättchen. Da diese netzartig angeordnet sind, werden die Zellen auch als reticulated platelets bezeichnet. Der Anteil der unreifen Thrombozyten an der Gesamthrombozytenzahl wird als immature platelet fraction (IPF) in Prozent angegeben [46]. In Abbildung 17 ist ein IPF-Scattergramm dargestellt. Es zeigt die Verteilung der Blutzellen entsprechend der Vorwärtstreueung zu ihrer Fluoreszenz.

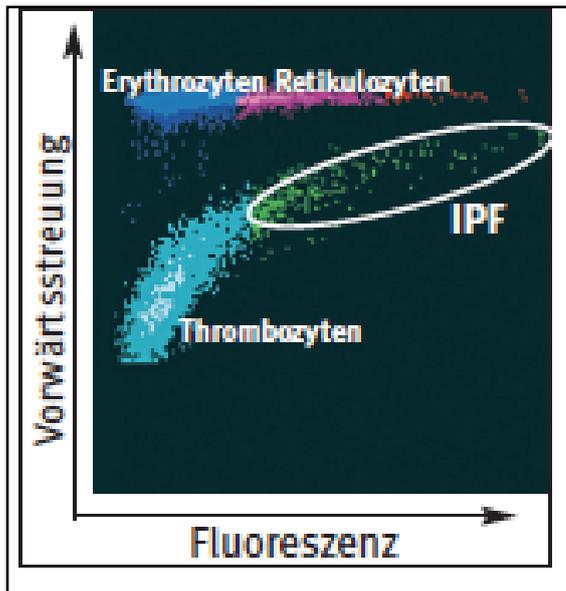


Abbildung 17: IPF-Scattergramm [46]. Used with Permission

Das Referenzintervall für die IPF des Sysmex XE-2100<sup>®</sup> beträgt 1,1 bis 6,1 % [47]. Dieses Intervall wurde im Rahmen amerikanischer und japanischer Studien bestätigt [48]. Für den so bestimmten IPF-Wert gibt es derzeit die verschiedensten Einsatzmöglichkeiten, insbesondere in der Differenzialdiagnose der Thrombozytopenie. Ist eine Thrombozytopenie durch eine Knochenmarkinsuffizienz, beispielsweise durch eine Chemotherapie, Nebenwirkungen von Medikamenten oder Strahlentherapie, bedingt, ist die IPF nicht erhöht [46].

Liegt eine Thrombozytopenie aufgrund eines erhöhten Thrombozytenverbrauchs vor, wie bei einer thrombotischen Mikroangiopathie oder autoimmunthrombozytopenischen Purpura, kommt es zu einer kompensatorischen Überaktivierung des Knochenmarks und somit zu einer vermehrten Bildung von unreifen Thrombozyten. Ein erhöhter IPF-Wert lässt sich hierbei ausmachen. Diese vermehrte Knochenmarkaktivität könnte sonst nur durch eine invasive Knochenmarkspunktion festgestellt werden. Auch bei einer disseminierten intravasalen Gerinnung wird eine erhöhter IPF gemessen. Des Weiteren kann die IPF auch als Verlaufparameter der oben genannten Pathologien verwendet werden [46] [49].

### **3.4 Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung wurde mit den Computerprogrammen GraphPad, Prism und Microsoft Excel vorgenommen. Sie erfolgte durch Berechnung der entsprechenden arithmetischen Mittelwerte, des Medians und der Standardabweichung/Standardfehler der einzelnen Werte. Zur Beurteilung der Unterschiede der einzelnen Gruppen hinsichtlich Signifikanzen und Mittelwertsunterschiede wurde der Wilcoxon-Mann-Whitney-Test angewendet. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$  wurde als statistisch signifikant festgelegt.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Thrombozytenspender

Bei den Thrombozytenspendern wurde das periphere Blut vor der Thrombozytenapherese (vZS) und nach der Thrombozytenapherese (nZS) untersucht sowie die Thrombozytenwerte im Thrombozytenkonzentrat (Aph) wurden bestimmt. Alle Spender vollendeten die Apherese problemlos. Die mittlere Apheresedauer betrug zwischen 45 und 60 Minuten.

#### 4.1.1 Veränderung der Thrombozytenzahl bei Thrombozytenspendern

In Tabelle 5 sind die Mittelwerte und Standardfehler der Thrombozytenzahlen (PLT) der Thrombozytenspender vor der Thrombozytenapherese (vZS), nach der Thrombozytenapherese (nZS) im peripheren Blut der Spender und im Apheresat in reellen Zahlen und in Prozent zusammengefasst.

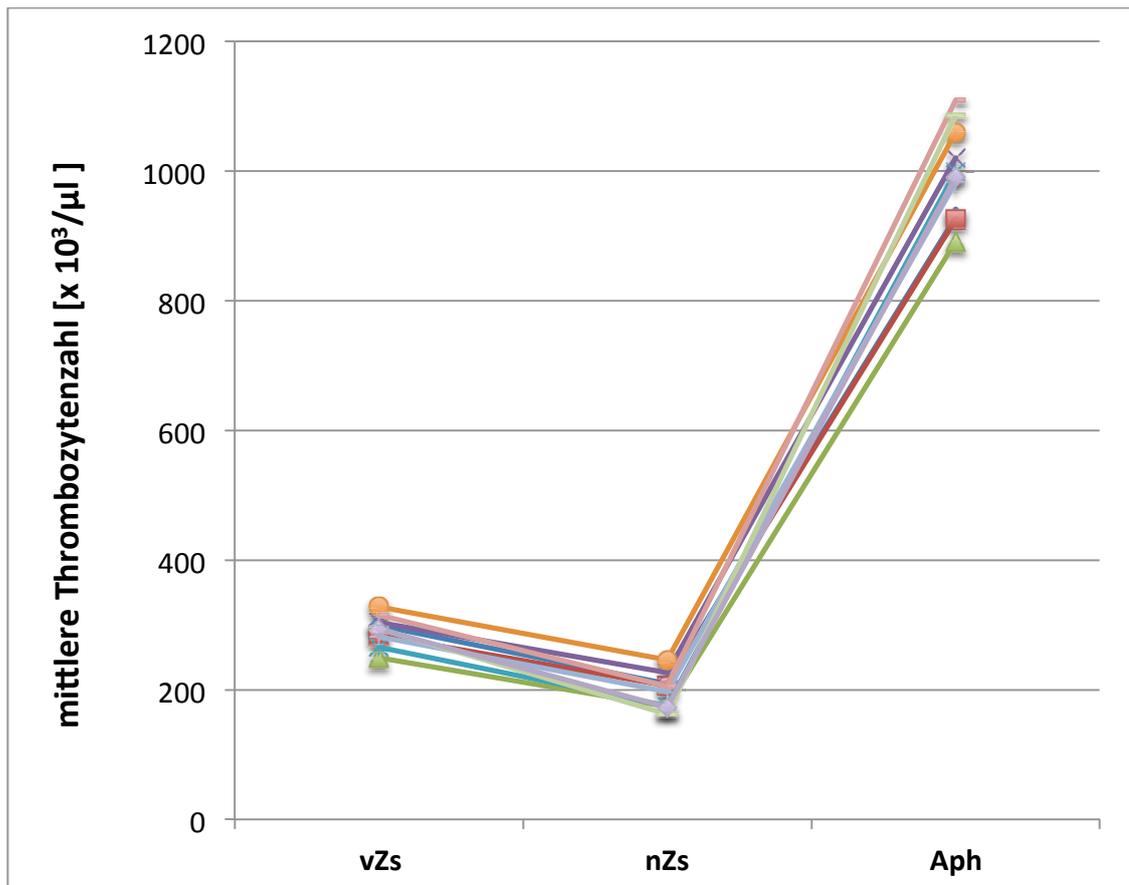
	vZS	nZS	Aph
PLT [ $10^3/\mu\text{l}$ ]	291,4 $\pm$ 7,23	197,3 $\pm$ 8,39	999,1 $\pm$ 22,63
PLT [%]	100	67,655 $\pm$ 2,05	343,611 $\pm$ 6,59

**Tabelle 5: Thrombozytenspender**, verwendet wurde das Apheresesystem MCS+® Haemonetics und der Zellcounter Sysmex XE-2100®, n = 10, angegeben sind die ermittelten Mittelwerte und Standardfehler im peripheren Blut und im Thrombozytenkonzentrat, PLT = Thrombozytenzahl, vZS = vor Zellseparation, nZS = nach Zellseparation, Aph = Thrombozytenkonzentrat, fl = Femtoliter

Die Thrombozytenseparation führte zu einer signifikanten Abnahme der Thrombozytenzahl im peripheren Blut von 291,4  $\cdot 10^3/\mu\text{l}$  auf 197,3  $\cdot 10^3/\mu\text{l}$ . Dies entspricht einer prozentualen Abnahme von 32,35 %. In den Thrombozytenkonzentraten konnte man eine mittlere Thrombozytenzahl von 999,1  $\cdot 10^3/\mu\text{l}$  messen.

Aufgrund möglicher interindividueller Unterschiede in den Thrombozytenzahlen der einzelnen Spender haben wir in Abbildung 18 die gemessenen Werte jedes einzelnen Spenders dargestellt. Aufgelistet sind die Thrombozytenzahlen aller Spender im

peripheren Blut sowohl vor (vZS) als auch nach der Thrombozytenspende (nZS) und im Thrombozytenkonzentrat (Aph). Jedem Spender wurde eine andere Farbe zugewiesen, um die individuelle Thrombozytenzahlveränderung zu illustrieren. Hier ist zu sehen, dass es bei jedem Thrombozytenspender zu einer Abnahme der mittleren Thrombozytenzahl im peripheren Blut gekommen ist.



**Abbildung 18: Mittlere Thrombozytenzahl bei allen Thrombozytenspendern**, apheresiert mit dem MCS+<sup>®</sup> Hämonetics Apheresesystem, gemessen mit Sysmex XE-2100<sup>®</sup>, n = 10, dargestellt sind die mittleren Thrombozytenzahlen aller 10 Thrombozytenspender, vZS = vor Thrombozytenapherese, nZS = nach Thrombozytenapherese, Aph = im Thrombozytenkonzentrat

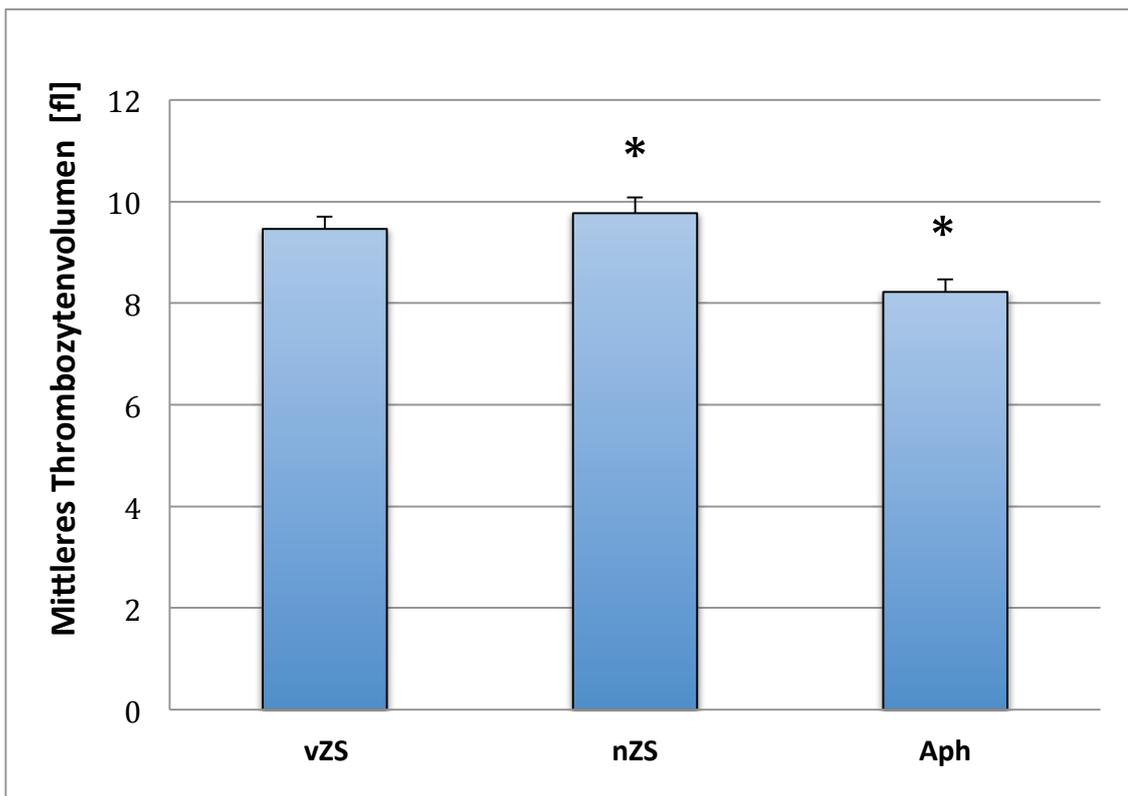
#### 4.1.2 Veränderung des mittleren Thrombozytenvolumens bei Thrombozytenspendern

Tabelle 6 fasst die Messergebnisse der mittleren Thrombozytenvolumina (MPV) der Thrombozytenspender vor der Thrombozytenapherese (vZS), nach der Thrombozytenapherese (nZS) im peripheren Blut der Spender und im Apheresat in reellen Zahlen und in Prozent zusammen.

	vZS	nZS	Aph
MPV [fl]	9,46 ± 0,80	9,71 ± 0,94	8,22 ± 0,79
MPV [%]	100	103,16 ± 0,88	86,80 ± 0,60

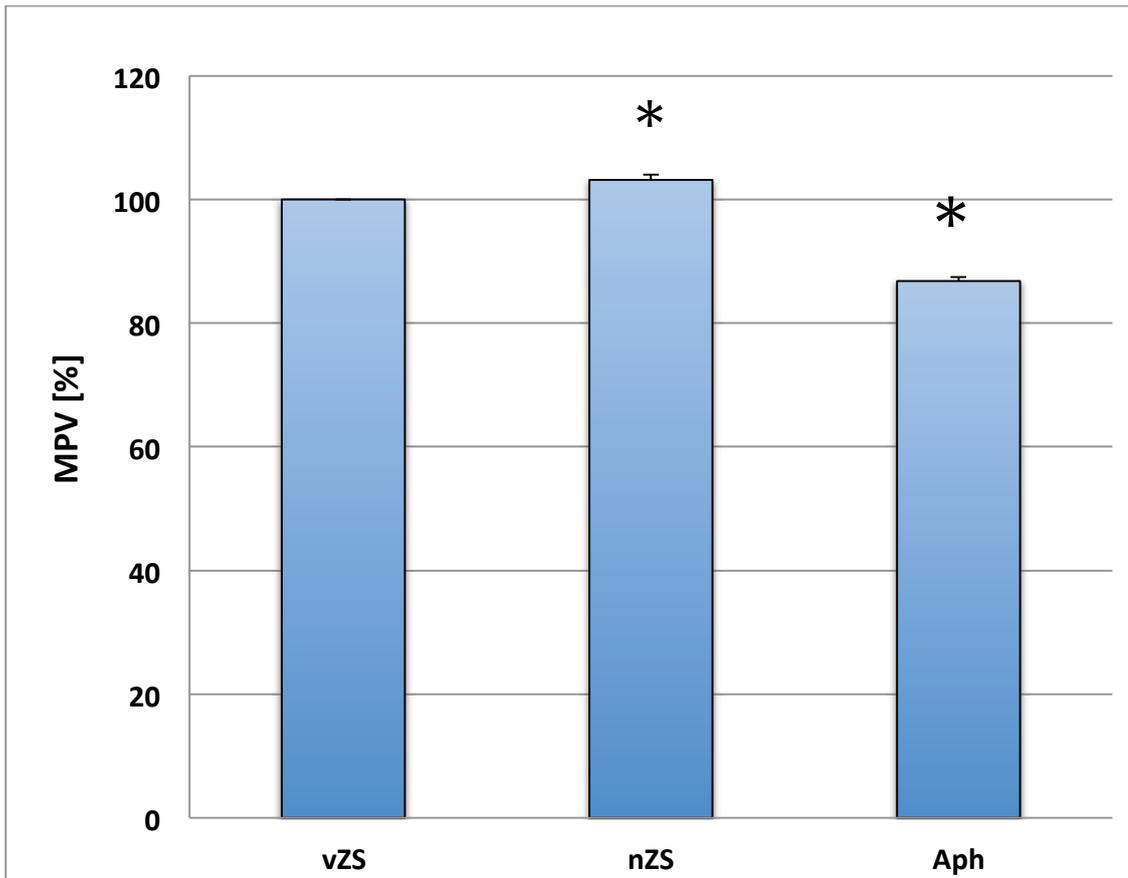
**Tabelle 6: Thrombozytenspender,** verwendet wurde das Apheresesystem MCS+® Haemonetics und der Zellcounter Sysmex XE-2100®, n = 10, angegeben sind die ermittelten Mittelwerte und Standardfehler im peripheren Blut und im Thrombozytenkonzentrat, MPV = mittleres Plättchenvolumen, vZS = vor Zellseparation, nZS = nach Zellseparation, Aph = Thrombozytenkonzentrat, fl = Femtoliter

In Abbildung 19 ist das mittlere Thrombozytenvolumen (MPV) grafisch dargestellt. Zunächst ist ein signifikanter Anstieg der MPV-Werte im peripheren Blut nach der Thrombozytenseparation (nZS) von 9,46 fl auf 9,77 fl zu erkennen. Im Thrombozytenapheresat (Aph) liegt das mittlere Thrombozytenvolumen mit 8,22 fl um 1,24 fl signifikant niedriger als im peripheren Blut des Spenders vor der Apherese (vZS).



**Abbildung 19: Mittleres Thrombozytenvolumen bei Thrombozytenspendern,** apheresiert mit dem MCS+® Haemonetics Apheresesystem, gemessen mit Sysmex XE-2100®, n = 10, dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler, \*signifikant für p < 0,05, vZS = vor der Stammzellapherese, nZS = nach der Stammzellapherese, Aph = im Stammzellapheresat, fl = Femtoliter

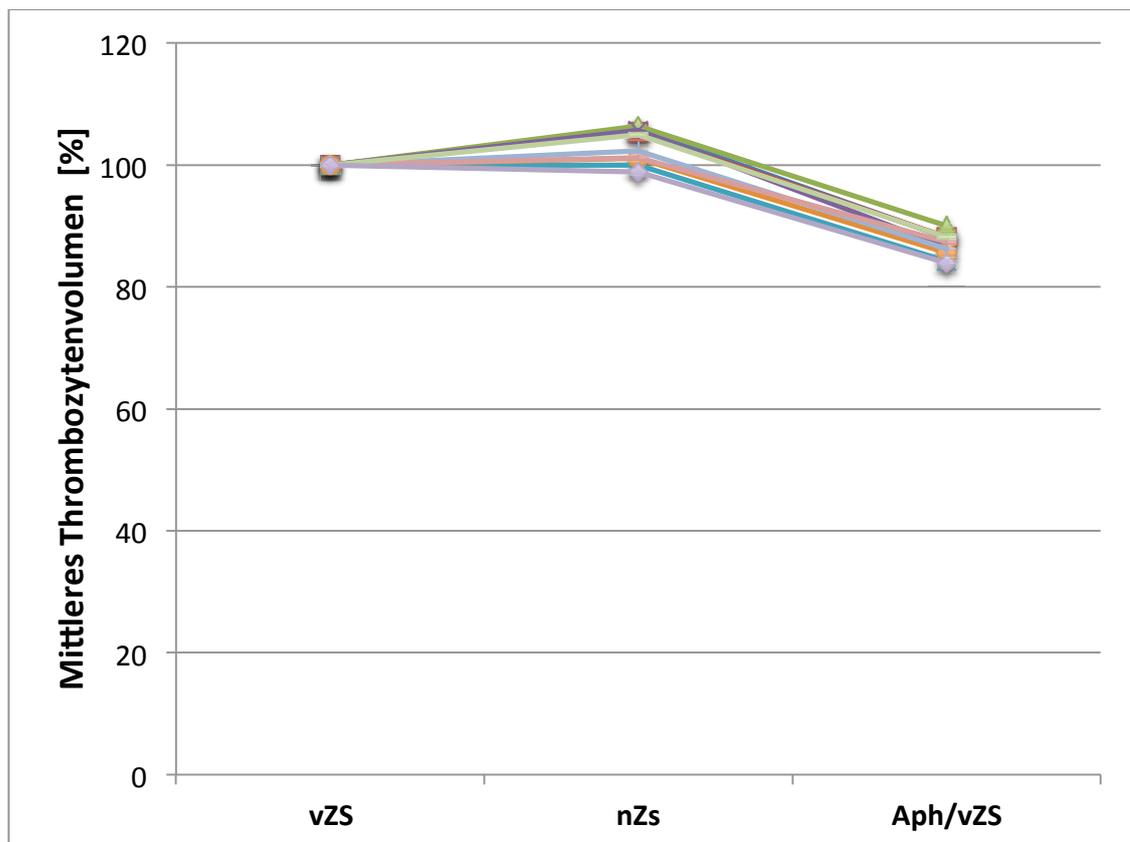
Abbildung 20 verdeutlicht die prozentuale Volumendifferenz der Thrombozyten. Als Referenzgruppe haben wir das Thrombozytenvolumen im peripheren Blut der Spender vor der Apherese mit 100 % gleichgesetzt. Zu sehen ist, dass die Thrombozyten im Apheresat durchschnittlich 13,2 % bzw. 16,3 % kleiner sind als die Thrombozyten im peripheren Blut der Spender vor bzw. nach der Apherese [1].



**Abbildung 20: Mittlere Thrombozytenvolumenveränderungen in Prozent bei Thrombozytenspendern**, apheresiert mit dem MCS+® Haemonetics Apheresesystem, gemessen mit Sysmex XE-2100®, n = 10, dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler, \*signifikant für  $p < 0,05$ , vZS = vor der Stammzellapherese, nZS = nach der Stammzellapherese, Aph = im Stammzellapheresat [1]

Da die einzelnen Spender untereinander große Volumendifferenzen ihrer Thrombozyten aufzeigten und auch die Abnahme des Thrombozytenvolumens nach der Apherese im peripheren Blut der Spender nicht bei allen Thrombozytenspendern gleich groß war, haben wir in Abbildung 21 die einzelnen MPV-Werte der Thrombozytenspender vor der Apherese (vZS), nach der Apherese (vZS) und im Thrombozytenkonzentrat (Aph) veranschaulicht.

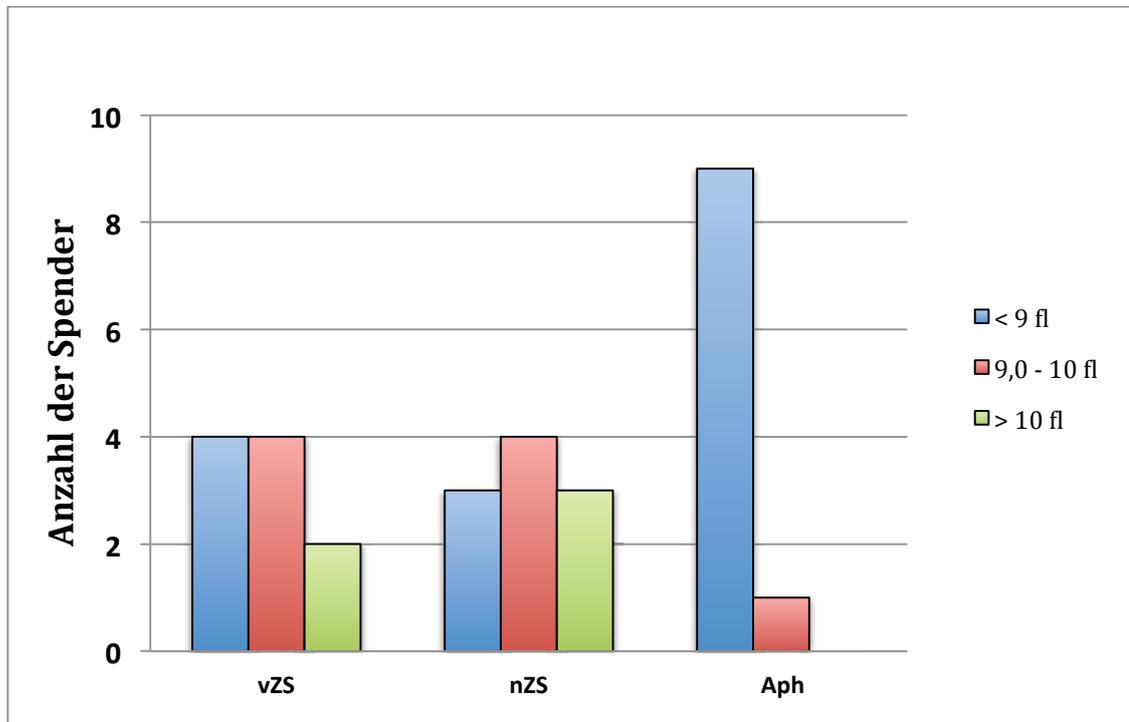
Zu erkennen ist, dass es trotz der interindividuellen Unterschiede bei allen 10 Spendern zu einer Abnahme der Thrombozytenvolumina nach der Thrombozytenspende gekommen ist und dass bei allen Spendern die Thrombozyten im Apheresat deutlich niedrigere MPV-Werte aufzeigen als die Thrombozyten im peripheren Blut des jeweiligen Spenders vor der Apherese. Ähnlich wie in Abbildung 18 wurde auch hier jedem Probanden eine Farbe zugewiesen, um sie unterscheiden zu können [1].



**Abbildung 21: Mittlere Thrombozytenzahl bei allen Thrombozytenspendern**, apheresiert mit dem MCS+® Haemonetics Apheresesystem, gemessen mit Sysmex XE-2100®, n = 10, dargestellt sind die mittleren Thrombozytenvolumina aller 10 Thrombozytenspender, vZS = vor Thrombozytenapherese, nZS = nach Thrombozytenapherese, Aph = im Thrombozytenkonzentrat [1]

Um die Volumenverteilung vor der Thrombozytenseparation (vZS), nach der Thrombozytenseparation (nZS) und im Apheresat (Aph) grafisch darzustellen, haben wir in Abbildung 22 die Thrombozytenvolumina in drei Gruppen aufgeteilt. Hier ist zu erkennen, dass vor der Zellseparation die meisten Spender kleine bis mittelgroße Thrombozyten im peripheren Blut mit einem MPV unter 10,0 fl aufzeigten. Im peripheren Blut nach der Apherese fanden wir bei den meisten Spendern durchschnittliche Thrombozytenvolumina von 9,0 fl bis 10,0 fl. In den Apheresaten lag

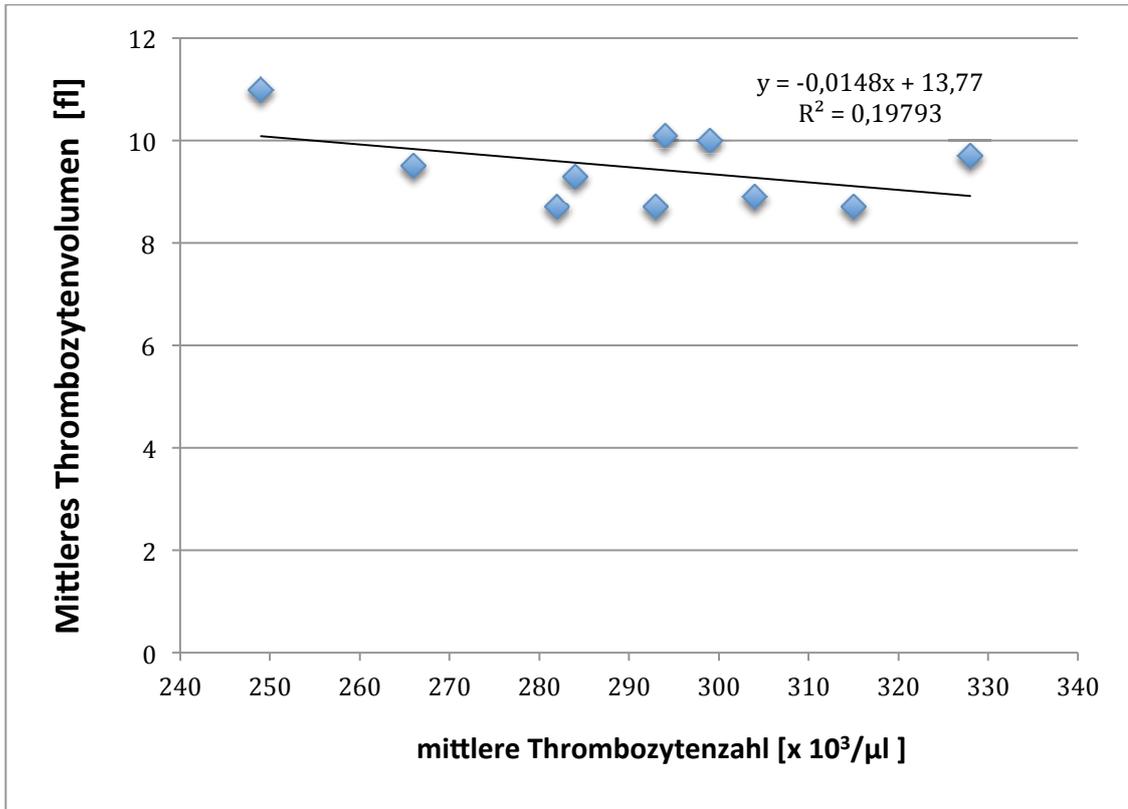
das MPV bei 90 % der Spender unter 9,0 fl [1].



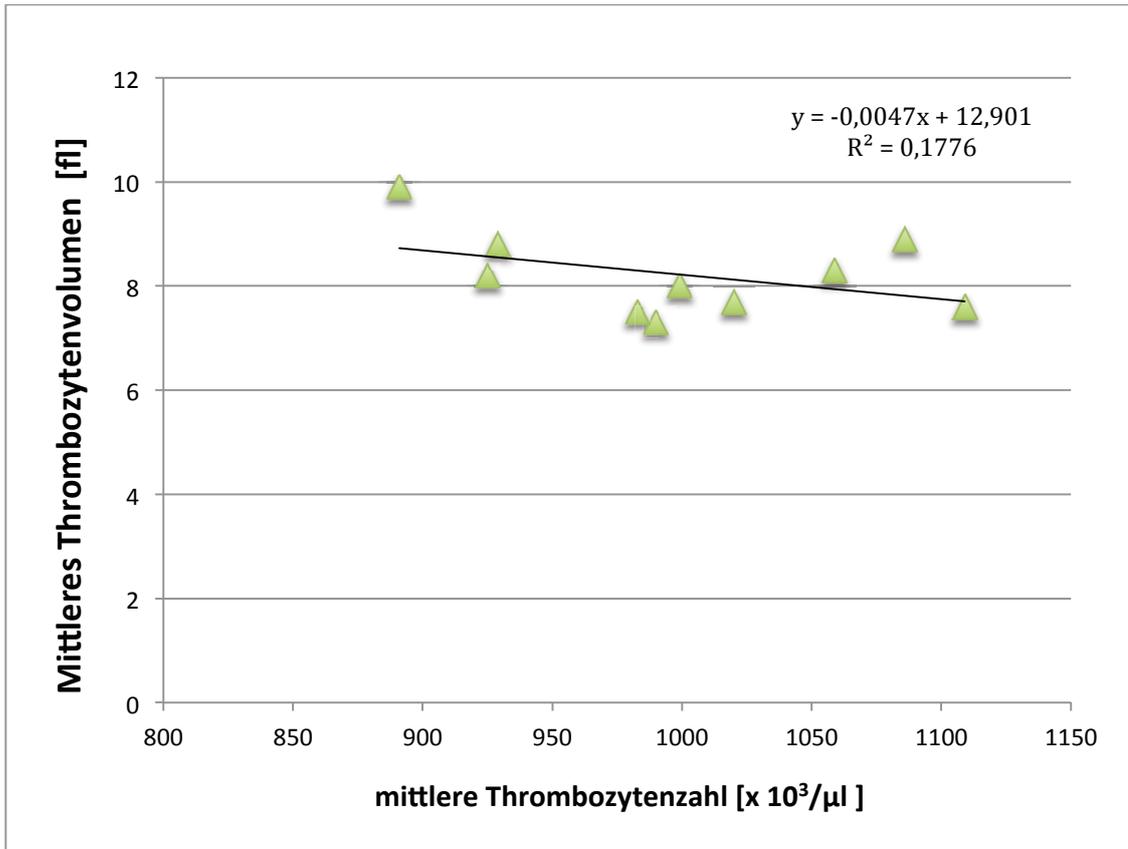
**Abbildung 22: Verteilung der Thrombozytenvolumina bei Thrombozytenspendern,** dargestellt sind die Mittelwerte, verwendet wurde das MCS+® Haemonetics und der Zellcounter XE-2100®, n = 10, fl = Femtoliter, blaue Säule = Anzahl der Proben mit MPV < 9 fl, rote Säule = Anzahl der Proben mit MPV 9,0 bis 10,0 fl, grüne Säule = Anzahl der Proben mit MPV > 10 fl, vZS = Verteilung des MPV im peripheren Blut vor der Zellseparation, nZS = Verteilung des MPV im peripheren Blut nach der Zellseparation, Aph = Verteilung des MPV im Thrombozytenkonzentrat [1]

Um auszuschließen, dass die gemessenen Thrombozytenvolumina von der Thrombozytenzahl abhängig sind, haben wir diese beiden Faktoren in den Abbildungen 23 und 24 einander gegenübergestellt. Abbildung 23 zeigt die Messwerte unter physiologischen Bedingungen im peripheren Blut der Thrombozytenspender vor der Apherese. Abbildung 24 veranschaulicht die Parameter bei stark erhöhten Thrombozytenzahlen im Thrombozytenkonzentrat.

Eine Korrelation zwischen Thrombozytenzahl (PLT) und Thrombozytenvolumen (MPV) konnte sowohl vor der Apherese als auch im Thrombozytenkonzentrat ausgeschlossen werden.



**Abbildung 23: Mittlere Thrombozytenzahlen bei unterschiedlichen Thrombozytenvolumina im Apheresat von Thrombozytenspendern, apheresiert mit dem MCS+® Haemonetics Apheresesystem, gemessen mit dem Zellcounter Sysmex XE-2100®, n = 10, fl = Femtoliter**



**Abbildung 24: Mittlere Thrombozytenzahlen bei unterschiedlichen Thrombozytenvolumina im Apheresat von Thrombozytenspendern**, apheresiert mit dem MCS+® Haemonetics Apheresesystem, gemessen mit dem Zellcounter Sysmex XE-2100®, n = 10, fl = Femtoliter

## 4.2 Allogene Stammzellspender

Bei den allogenen Stammzellspendern wurde die Apherese mit dem Apheresesystem Spectra Optia® durchgeführt. Die von uns erfolgten Messungen wurden nach der Mobilisation mit GCSF angefertigt.

### 4.2.1 Veränderung der Thrombozytenzahl bei allogenen Stammzellspendern

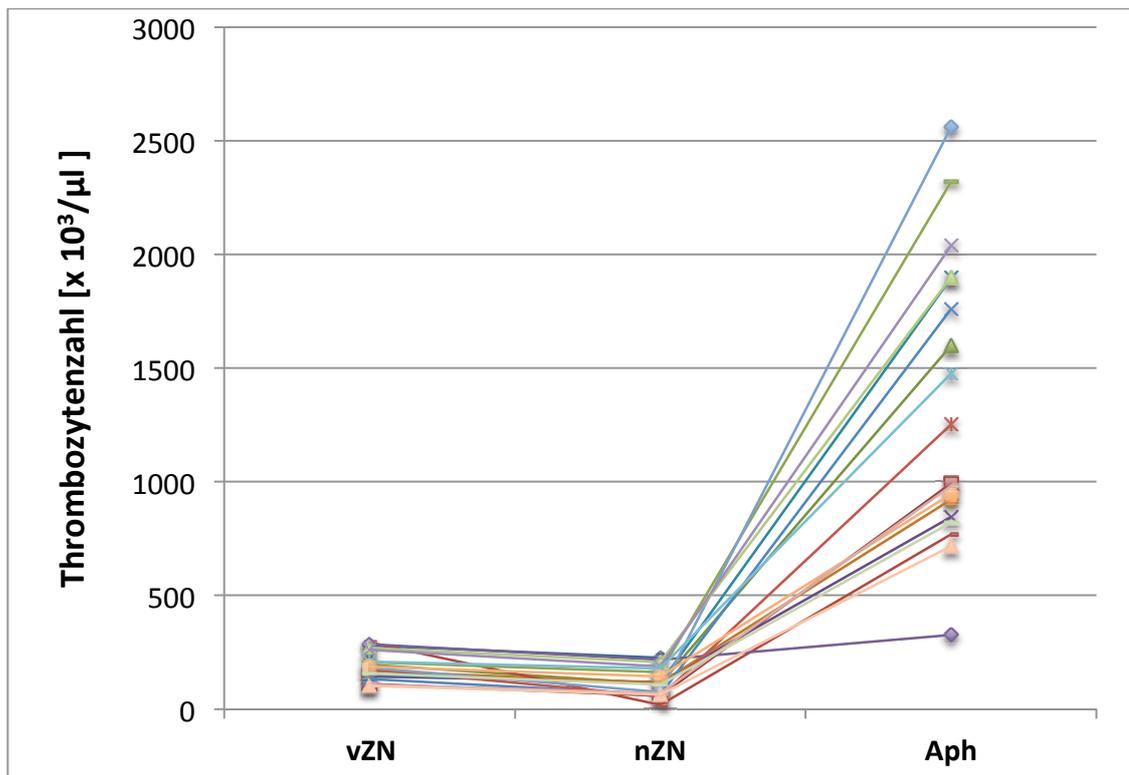
Tabelle 7 zeigt die mittleren Thrombozytenzahlen (PLT) im peripheren Blut der Spender vor der Stammzellapherese (vZS), nach der Stammzellapherese (nZS) und im Stammzellapheresat (Aph). Angegeben sind die ermittelten Mittelwerte und Standardfehler als reelle Zahlen und in Prozent.

Nach der Apherese sank die mittlere Thrombozytenzahl im peripheren Blut der Spender signifikant von  $190,10 \times 10^3/\mu\text{l}$  auf  $120,69 \times 10^3/\mu\text{l}$  ab. Die Plättchenzahl im Stammzellkonzentrat war mit  $1340,38 \times 10^3/\mu\text{l}$  ca. 7,6-mal so hoch wie im peripheren Blut der Spender vor der Apherese.

	vZS	nZS	Aph
PLT [ $10^3/\mu\text{l}$ ]	190,10 ± 14,19	120,69 ± 14,09	1340,38 ± 152,50
PLT [%]	100	63,54	772,72

**Tabelle 7: Allogene Stammzellspender**, dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler, apheresiert mit dem Apheresesystem Spectra optia®, gemessen mit dem Zellcounter Sysmex XE-2100®, n = 19, PLT = Thrombozytenzahl, MPV = mittleres Plättchenvolumen, vZS = vor Zellseparation, nZS = nach Zellseparation, Aph = Thrombozytenkonzentrat, fl = Femtoliter

In Abbildung 25 haben wir die Veränderungen der mittleren Thrombozytenzahl jedes einzelnen allogenen Stammzellspenders graphisch gezeigt. Hier ist eine Abnahme der Thrombozytenzahl bei allen Spendern nach der Apherese zu erkennen, welche zu einer stark erhöhten Thrombozytenzahl im Apheresat führt.



**Abbildung 25: Mittlere Thrombozytenzahl bei allen allogenen Stammzellspendern,** apheresiert mit dem MCS+® Haemonetics Apheresesystem, gemessen mit Sysmex XE-2100®, dargestellt sind die mittleren Thrombozytenzahlen aller 19 allogenen, n = 19, vZS = vor Thrombozytenapherese, nZS = nach Thrombozytenapherese, Aph = im Thrombozytenkonzentrat

#### 4.2.2 Veränderung des mittleren Thrombozytenvolumens bei allogenen Stammzellspendern

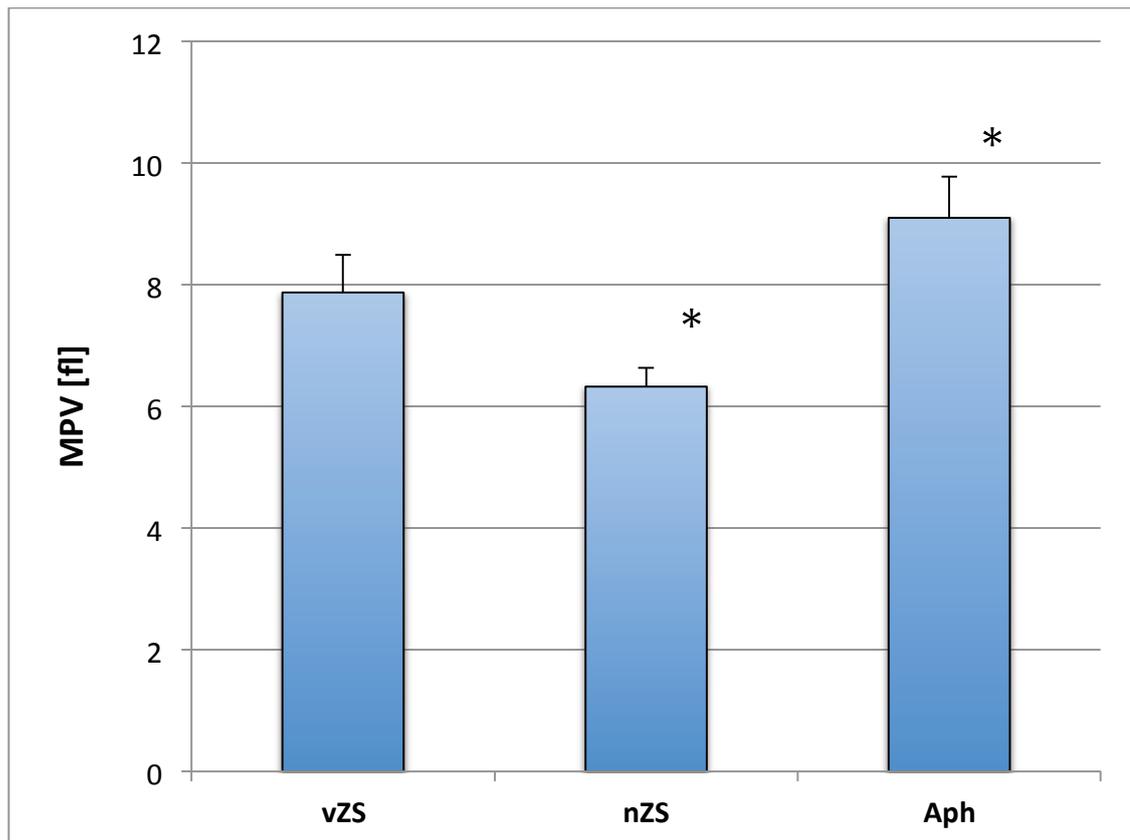
Tabelle 7 zeigt die Veränderungen des mittleren Thrombozytenvolumens bei den allogenen Stammzellspendern. Das MPV ist hier jeweils als reelle Zahl sowie als prozentuale Veränderung dargestellt. Angegeben sind die Mittelwerte der von uns untersuchten Spender.

	vZS	nZS	Aph
<b>MPV [fl]</b>	<b>7,87 ± 0,613</b>	<b>6,325 ± 0,312</b>	<b>9,1 ± 0,676</b>
<b>MPV [%]</b>	<b>100</b>	<b>84,24</b>	<b>117,45</b>

**Tabelle 8: Allogene Stammzellspender,** dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler, apheresiert mit dem Apheresesystem Spectra Optia®, gemessen mit dem Zellcounter Sysmex XE-2100®, n = 19, MPV = mittleres Plättchenvolumen, vZS = vor Zellseparation, nZS = nach Zellseparation, Aph = Thrombozytenkonzentrat, fl = Femtoliter

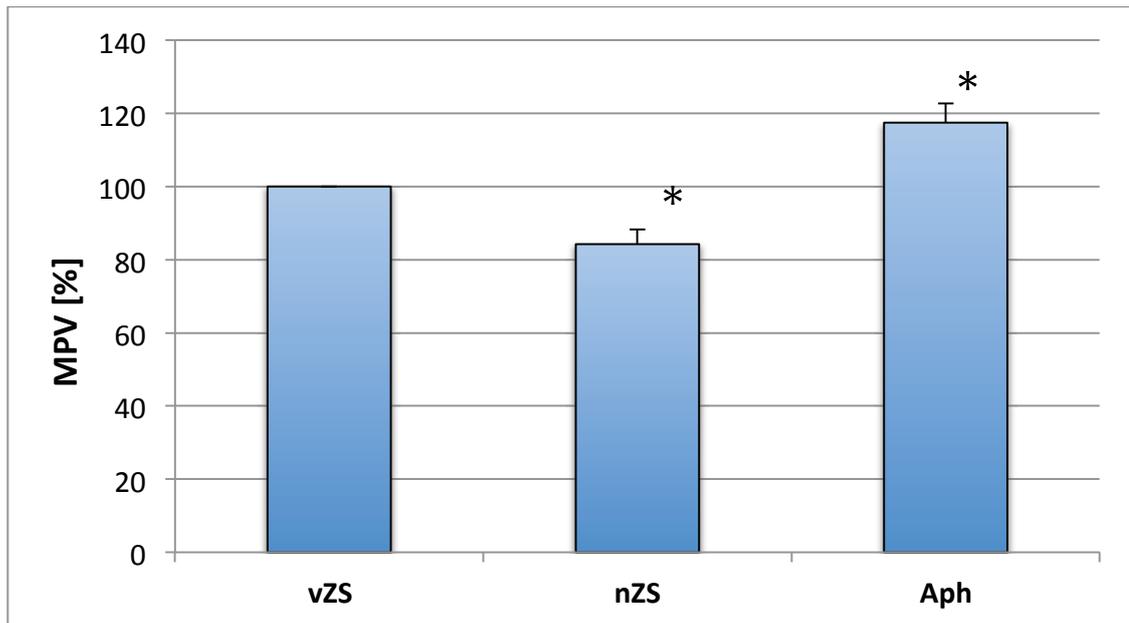
In Abbildung 26 ist das mittlere Thrombozytenvolumen (MPV) der allogenen Stammzellspender vor der Stammzellapherese (vZS), nach der Stammzellapherese

(nZS) und im Apheresat (Aph) aufgetragen. Im Stammzellapheresat ermittelten wir ein durchschnittliches MPV von 9,1 fl. Das MPV im Apheresat lag somit 1,23 fl über dem mittleren Thrombozytenvolumen im peripheren Blut der Spender vor der Stammzellapherese. Dies entspricht einer relativen Volumendifferenz von 17,45 %. Nach der Apherese war das mittlere Thrombozytenvolumen bei 6,32 fl.



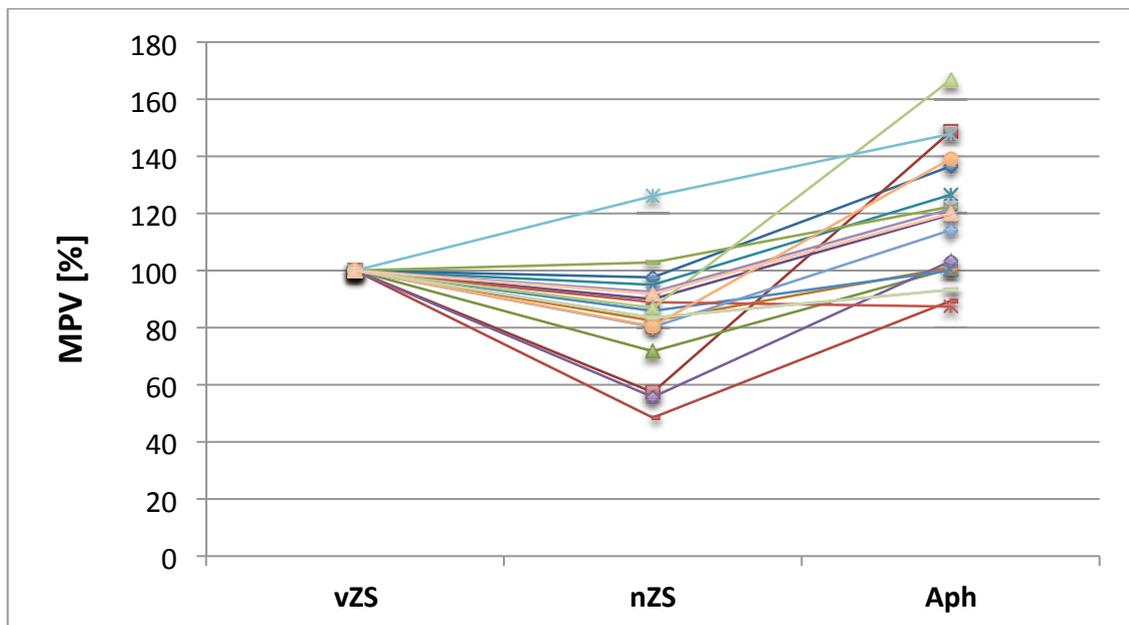
**Abbildung 26: Mittleres Thrombozytenvolumen bei allogenen Stammzellspendern,** angegeben sind die Mittelwerte, verwendet wurde das Apheresesystem Spectra Optia® und der Zellcounter Sysmex XE-2100®, n = 19, \*signifikant für p < 0,05, vZS = MPV im peripheren Blut vor der Zellseparation, nZS = MPV im peripheren Blut nach der Zellseparation, Aph = MPV im Stammzellapheresat, MPV = Mittleres Thrombozytenvolumen

In Abbildung 27 sind die prozentualen Volumenveränderungen der Thrombozyten vor und nach der Apherese und im Apheresat dargestellt. Hier wurde das Thrombozytenvolumen vor der Stammzellspende als Referenzgruppe betrachtet und mit 100 % gleichgesetzt. Nach der Apherese sank das mittlere Thrombozytenvolumen im peripheren Blut signifikant um durchschnittlich 15,76 %. Im Apheresat ist das mittlere Thrombozytenvolumen 17,45 % höher als im peripheren Blut der Spender vor der Apherese [1].



**Abbildung 27: Veränderung des mittleren Thrombozytenvolumens in Prozent**, angegeben sind die Mittelwerte, verwendet wurde das Apheresesystem Optia Spectra® und der Zellcounter Sysmex XE-2100®, n = 19, \*signifikant für  $p < 0,05$ , vZS = MPV im peripheren Blut vor der Zellseparation, nZS = MPV im peripheren Blut nach der Zellseparation, Aph = MPV im Stammzellapheresat, MPV = Mittleres Thrombozytenvolumen [1]

Um interindividuelle Unterschiede des mittleren Thrombozytenvolumens innerhalb der Stichprobe als Ursache für die signifikanten Volumenveränderungen ausschließen zu können, haben wir in Abbildung 28 die Volumenveränderung jedes einzelnen Spenders vor und nach der Apherese sowie im Apheresat dargestellt. Zu sehen ist, dass es bei 17 von 19 allogenen Stammzellspendern zu einer Abnahme des MPV im peripheren Blut nach der Spende gekommen ist und dass bei 18 allogenen Stammzellspendern das mittlere Thrombozytenvolumen im Stammzellapheresat deutlich höher war als im peripheren Blut vor der Spende [1].



**Abbildung 28: Mittleres Thrombozytenvolumen bei allen allogenen Stammzellspendern,** apheresiert mit dem MCS+® Haemonetics Apheresesystem, gemessen mit Sysmex XE-2100®, n = 19, dargestellt sind die mittleren Thrombozytenvolumina aller Thrombozytenspender, vZS = vor Thrombozytenapherese, nZS = nach Thrombozytenapherese, Aph = im Thrombozytenkonzentrat [1]

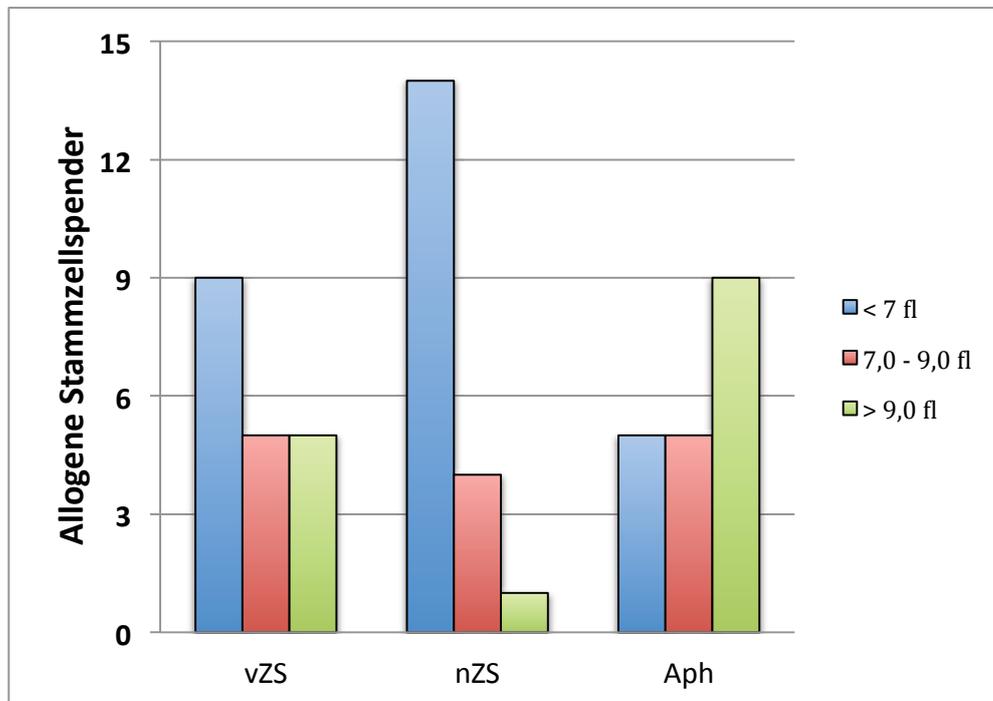
Zur besseren Veranschaulichung der Volumenverteilung der Thrombozyten haben wir die allogenen Stammzellspender und Stammzellkonzentrate nach ihrem mittleren Thrombozytenvolumen in drei Gruppen unterteilt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 29 zusammengefasst.

Wir konnten erkennen, dass vor der Zellseparation im peripheren Blut der Spender alle drei Volumengruppen etwa gleich stark vertreten waren. Vor der Zellseparation zeigte sich bei 5 Spendern ein MPV über 9,0 fl, bei 9 Spendern ein MPV unter 7,0 fl und bei 5 Spendern lag das MPV im peripheren Blut vor der Apherese zwischen 7,0 fl und 9,0 fl [1].

Nach der Apherese betrug lediglich bei einem Spender im peripheren Blut ein MPV über 9,0 fl. Bei 14 von 19 Spendern lag das mittlere Thrombozytenvolumen im peripheren Blut nach der Spende unter 7,0 fl und bei 4 Thrombozytenspendern zwischen 7,0 fl und 9,0 fl [1].

Betrachtet man das Stammzellapheresat, ist zu erkennen, dass bei den vielen Spendern

(9 von 19) ein MPV von über 9,0 fl gemessen wurde. In 5 Apheresaten lag das mittlere Thrombozytenvolumen zwischen 7,0 fl und 9,0 fl und nur bei 5 Stammzellapheresaten wurde ein MPV unter 7,0 fl gemessen [1].



**Abbildung 29: Verteilung der Thrombozytenvolumina bei allogenen Stammzellspendern,** verwendet wurde das Apheresesystem Spectra Optia® und der Zellcounter Sysmex XE-2100®, n = 19, blaue Säule = Anzahl der Proben mit MPV < 7 fl, rote Säule = Anzahl der Proben mit MPV 7,0 bis 9,0 fl, grüne Säule = Anzahl der Proben mit MPV > 9,0 fl, vZS = Verteilung des MPV im peripheren Blut vor der Zellseparation, nZS = Verteilung des MPV im peripheren Blut nach der Zellseparation, Aph = Verteilung des MPV im Stammzellkonzentrat, fl = Femtoliter, MPV = Mittleres Plättchenvolumen [1]

Um auszuschließen, dass die gemessenen Thrombozytenvolumina von der Thrombozytenzahl beeinflusst wurden, haben wir in den Abbildungen 30 und 31 das mittlere Thrombozytenvolumen der mittleren Thrombozytenzahl gegenübergestellt. Abbildung 30 bezieht sich auf die Messwerte im peripheren Blut der Spender vor der Apherese und Abbildung 31 auf die Messwerte im Stammzellkonzentrat. Hier ist ersichtlich, dass keine Korrelation zwischen den beiden Parametern besteht.

Messfehler, die auf unterschiedliche Thrombozytenkonzentrationen im peripheren Blut der Spender oder im Stammzellkonzentrat beruhen, scheinen daher kaum Einfluss auf die von uns ermittelten Thrombozytenvolumina zu nehmen.

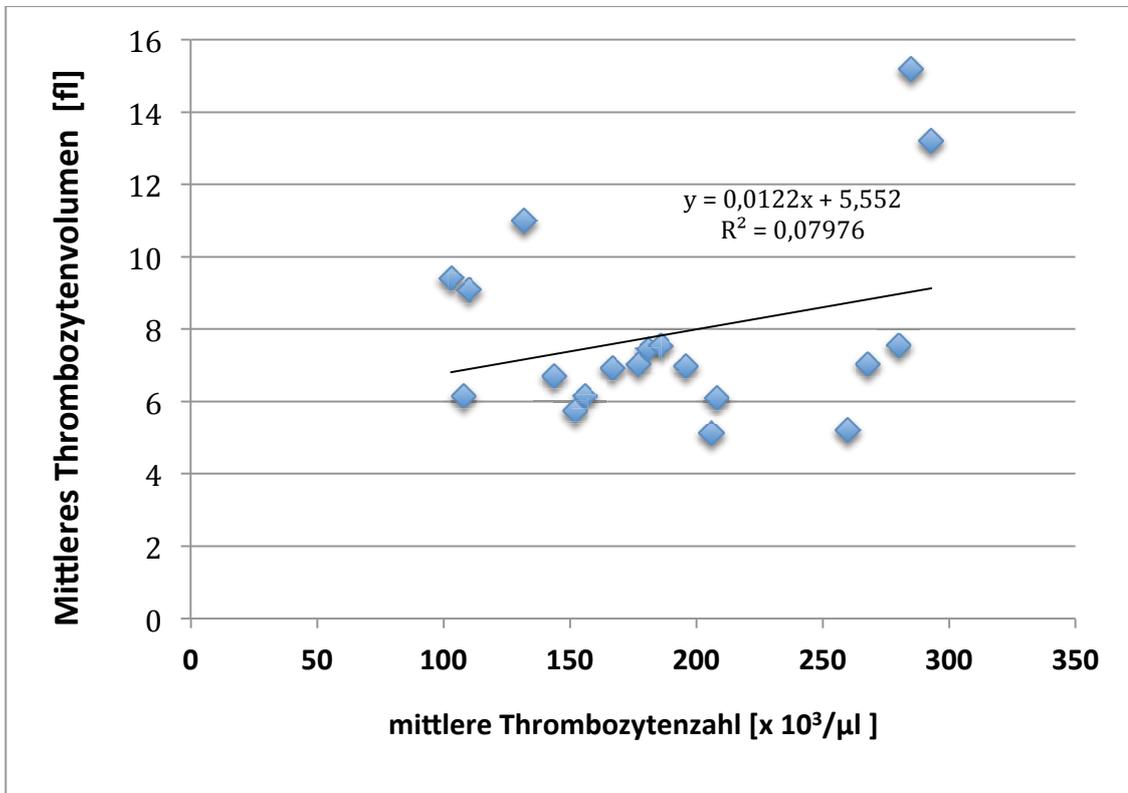


Abbildung 30: Mittlere Thrombozytenvolumina bei unterschiedlichen Thrombozytenzahlen vor der Apherese im peripheren Blut der allogenen Stammzellspender (vZS), apheresiert mit dem MCS+® Haemonetics Apheresesystem, gemessen mit dem Zellcounter Sysmex XE-2100®, n = 19

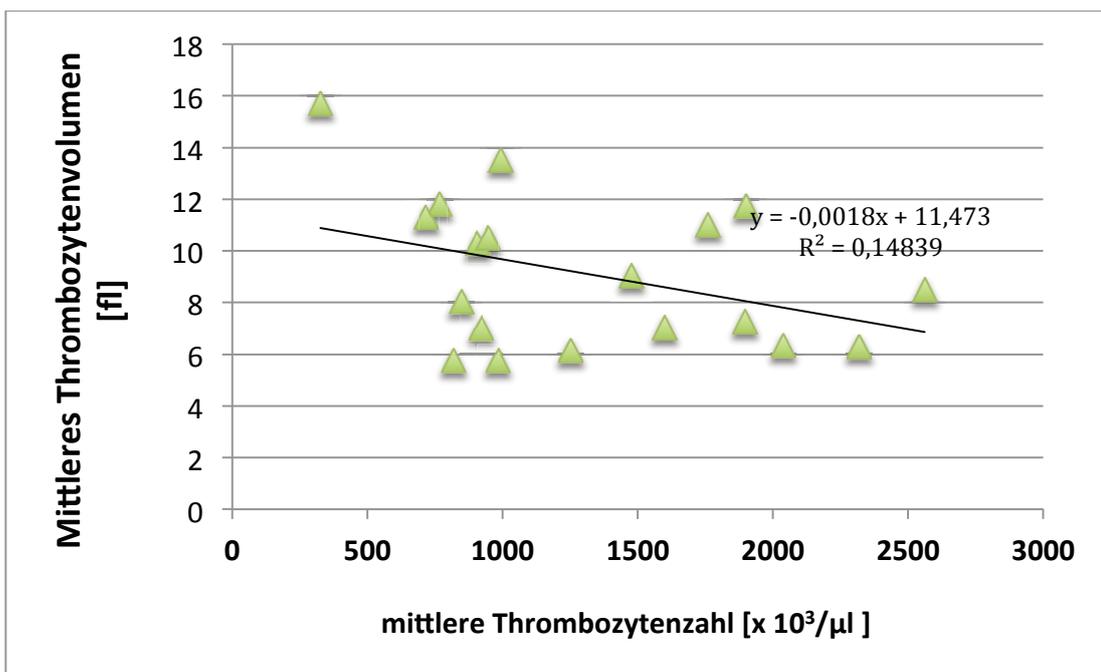


Abbildung 31: Mittlere Thrombozytenvolumina bei unterschiedlichen Thrombozytenzahlen im Stammzellapheresat (Aph) bei allogenen Stammzellspendern, apheresiert mit dem Spectra optia®, gemessen mit dem Zellcounter Sysmex XE-2100®, n = 19

## 4.3 Autologe Stammzellspender

Neben allogenen Stammzellspendern wurden auch die Thrombozytenwerte von autologen Stammzellspendern untersucht. Die Zellseparationen wurden ebenfalls mit dem Apheresesystem Spectra Optia<sup>®</sup> durchgeführt. Die von uns erhobenen Messungen erfolgten nach der Mobilisation mit GCSF.

In Tabelle 9 sind die Thrombozytenparameter der Messungen vor der Stammzellapherese (vZS), nach der Stammzellapherese (nZS) und im Stammzellapheresat (Aph) dargestellt. Angegeben sind die ermittelten Mittelwerte und Standardfehler als reelle Zahlen und in Prozent.

	vZS	nZS	Aph
PLT [ $10^3/\mu\text{l}$ ]	96,6 ± 19,67	60,3 ± 14,29	745,8 ± 134,18
PLT [%]	100	64,170 ± 5,40	969,32 ± 60,81

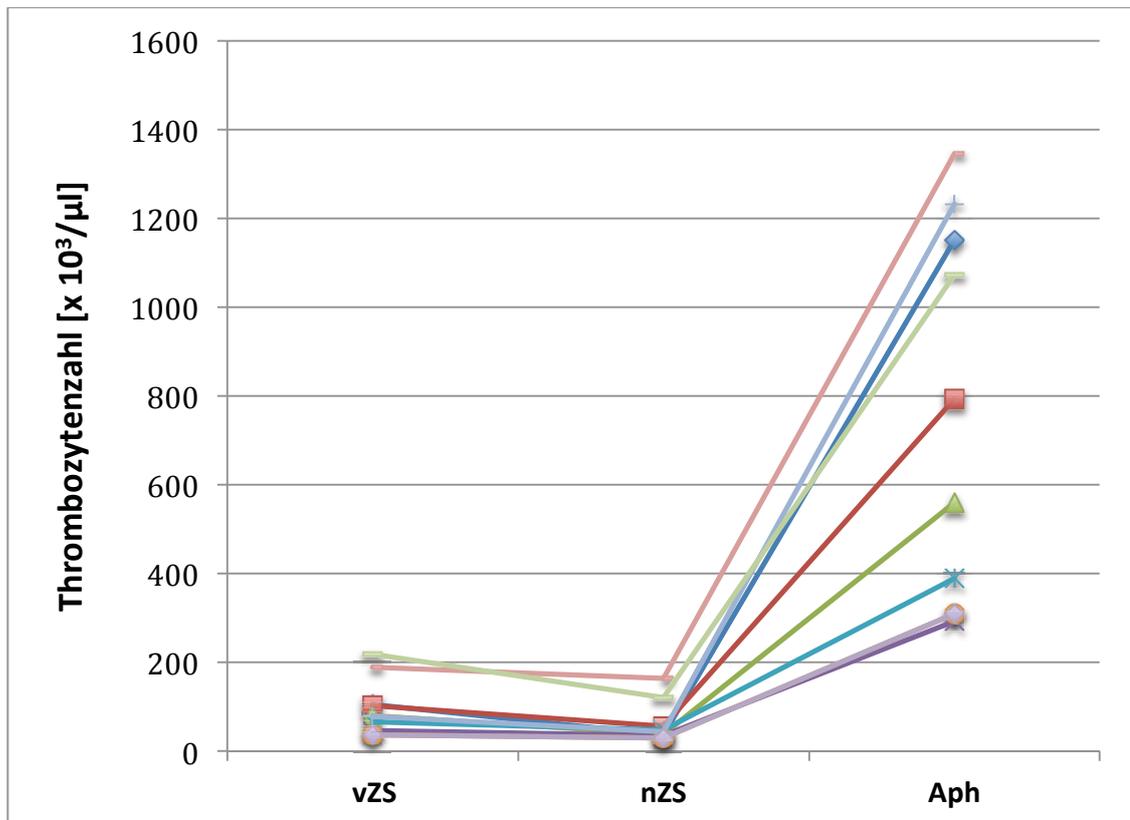
**Tabelle 9: Autologe Stammzellspender**, apheresiert mit dem Apheresesystem Spectra Optia<sup>®</sup>, gemessen mit dem Zellcounter Sysmex XE-2100<sup>®</sup>, n = 10, PLT = Thrombozytenzahl, MPV = mittleres Plättchenvolumen, IPF = Immature platelet fraction, vZS = vor Zellseparation, nZS = nach Zellseparation, Aph = Thrombozytenkonzentrat, fl = Femtoliter

### 4.3.1 Veränderung der Thrombozytenzahl bei autologen Stammzellspendern

Da es sich bei den autologen Stammzellspendern um hämatologische Patienten handelt, weisen die Spender keine physiologischen Thrombozytenkonzentrationen auf. Zu erkennen ist, dass die Thrombozytenzahlen im peripheren Blut der Spender nach der Zellseparation von  $96,6 \times 10^3/\mu\text{l}$  auf  $60,3 \times 10^3/\mu\text{l}$  signifikant abgesunken sind. Im Stammzellkonzentrat sehen wir mit  $745,8 \times 10^3/\mu\text{l}$  eine 9,69-fach höhere Thrombozytenkonzentration als im peripheren Blut der Spender vor der Apherese.

Bei den Thrombozytenzahlen der autologen Stammzellspender handelt es sich um pathologische Werte. Da diese vom individuellen Krankheitsverlauf der Spender abhängen, ist es auch hier wichtig, die Messwerte der einzelnen autologen Stammzellspender separat zu betrachten.

In Abbildung 32 sind die gemessenen Thrombozytenzahlen jedes Spenders zu sehen. Hier ist zu erkennen, dass es bei jedem einzelnen autologen Stammzellspender zunächst zu einer Abnahme der Thrombozytenzahlen im peripheren Blut gekommen ist. Zudem kann verzeichnet werden, dass bei jedem Spender im Apheresat deutlich höhere Thrombozytenzahlen gemessen wurden als im peripheren Blut des jeweiligen Spenders.



**Abbildung 32: Mittlere Thrombozytenzahl bei allen autologen Stammzellspendern, apheresiert mit dem MCS+® Haemonetics Apheresesystem, gemessen mit Sysmex XE-2100®, n = 10, dargestellt sind die mittleren Thrombozytenzahlen aller 10 autologen, vZS = vor Thrombozytenapherese, nZS = nach Thrombozytenapherese, Aph = im Thrombozytenkonzentrat**

### 4.3.2 Veränderung des mittleren Thrombozytenvolumens bei autologen Stammzellspendern

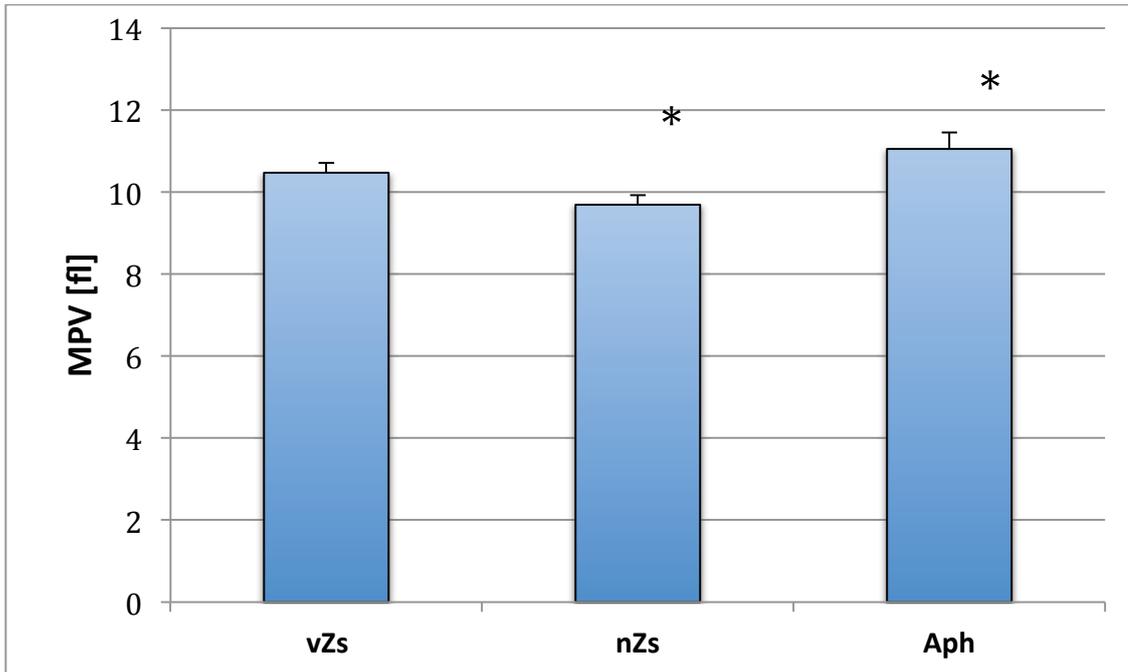
Tabelle 10 zeigt das MPV bei autologen Stammzellspendern. Diese sind sowohl in reellen Zahlen als auch als prozentuale Veränderung dargestellt. Alle Werte entsprechen den Mittelwerten der von uns untersuchten Spendergruppe.

	vZS	nZS	Aph
<b>MPV [fl]</b>	<b>10,47 ± 0,23</b>	<b>9,69 ± 0,27</b>	<b>11,05 ± 0,40</b>
<b>MPV[%]</b>	<b>100</b>	<b>92,57 ± 0,92</b>	<b>105,45 ± 2,58</b>

**Tabelle 10: Autologe Stammzellspender**, apheresiert mit dem Apheresesystem Spectra Optia®, gemessen mit dem Zellcounter Sysmex XE-2100, n = 10, PLT = Thrombozytenzahl, MPV = mittleres Plättchenvolumen, IPF = Immature platelet fraction, vZS = vor Zellseparation, nZS = nach Zellseparation, Aph = Thrombozytenkonzentrat, fl = Femtoliter

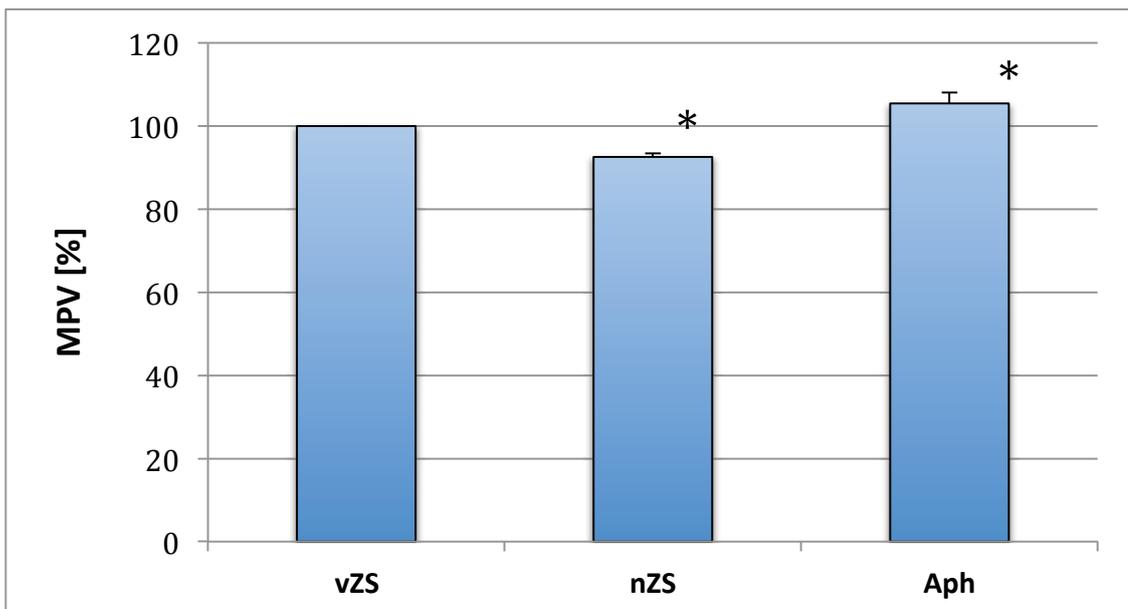
In Abbildung 33 ist das mittlere Thrombozytenvolumen (MPV) der autologen Thrombozytenspender aufgetragen. Wir stellten fest, dass das durchschnittliche Thrombozytenvolumen im Apheresat signifikant größer ist als das MPV im peripheren Blut der Spender vor der Zellseparation.

Zu sehen ist, dass das mittlere Thrombozytenvolumen im peripheren Blut der Spender nach der Stammzellapherese 0,78 fl kleiner ist als vor der Apherese. Vor der Apherese lag das mittlere MPV im peripheren Blut bei 10,47 fl und nach der Apherese bei 9,69 fl. Im Stammzellkonzentrat wurde ein mittleres Thrombozytenvolumen von 11,05 fl gemessen.



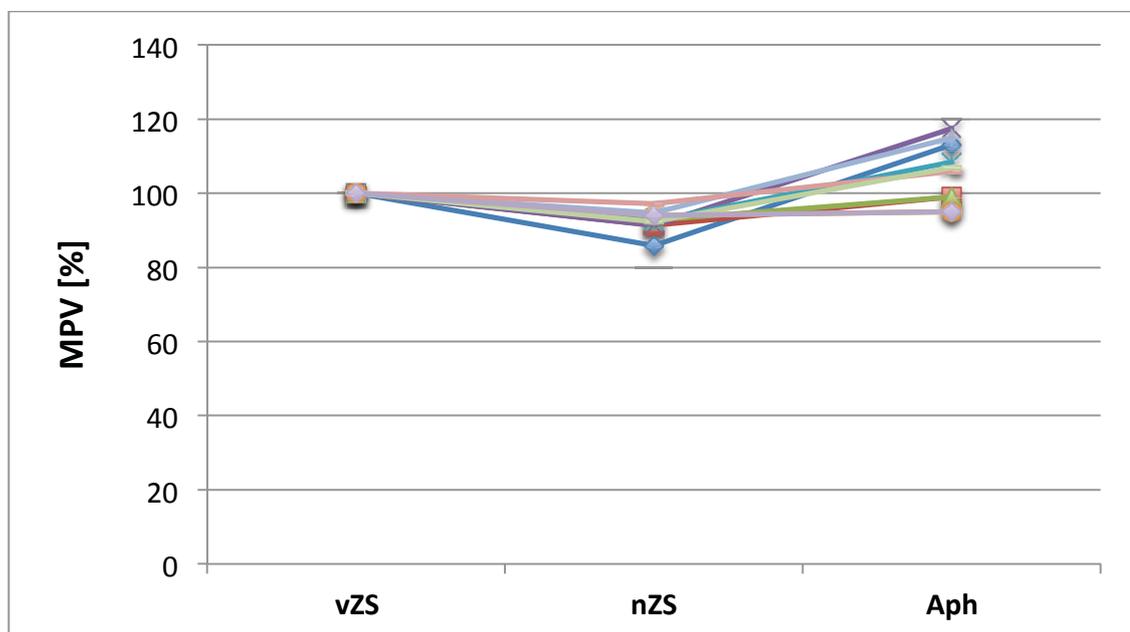
**Abbildung 33: Mittleres Thrombozytenvolumen bei autologen Stammzellspendern,** apheresiert mit dem Apheresesystem Spectra Optia®, gemessen mit dem Zellcounter Sysmex XE-2100®, n = 10, \*signifikant für  $p < 0,05$ , vZS = vor der Stammzellapherese, nZS = nach der Stammzellapherese, Aph = im Stammzellapheresat

Die relativen Volumendifferenzen im Vergleich zum Thrombozytenvolumen im peripheren Blut der autologen Stammzellspender vor der Apherese sind in Abbildung 34 dargestellt.



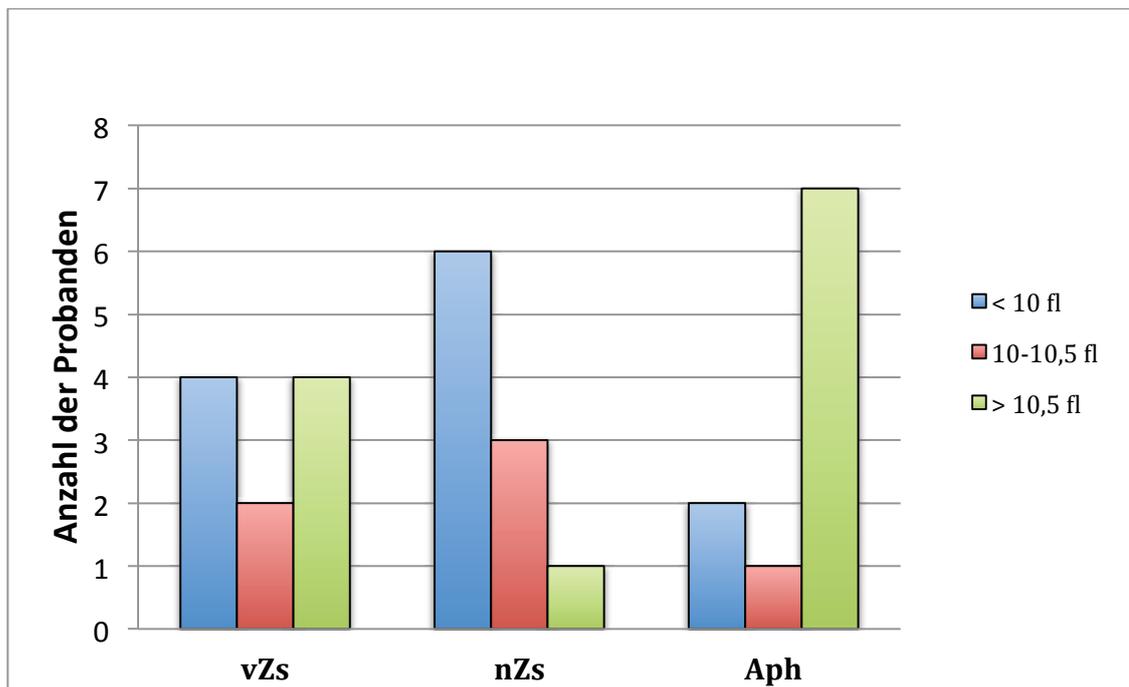
**Abbildung 34: Mittleres Thrombozytenvolumen bei autologen Stammzellspendern in Prozent,** apheresiert mit dem Apheresesystem Spectra Optia®, gemessen mit dem Zellcounter Sysmex XE-2100®, n = 10, \*signifikant für  $p < 0,05$ , vZS = vor der Stammzellapherese, nZS = nach der Stammzellapherese, Aph = im Stammzellapheresat [1]

In Abbildung 35 sind die prozentualen Veränderungen des MPV bei jedem einzelnen autologen Stammzellspender grafisch dargestellt. Als Referenzwert haben wir den MPV-Wert des jeweiligen Spenders im peripheren Blut vor der Apherese mit 100 % gleichgesetzt. Hier ist zu sehen, dass bei allen Spendern nach der Apherese ein niedrigerer MPV-Wert im peripheren Blut gemessen wurde als vor der Apherese. In den Apheresaten erkannten wir, dass bei über der Hälfte der Spender die Thrombozytenvolumina größer waren als vor der Apherese im peripheren Blut.



**Abbildung 35: Mittleres Thrombozytenvolumen bei allen autologen Stammzellspendern,** apheresiert mit dem MCS+® Haemonetics Apheresesystem, gemessen mit Sysmex XE-2100®, n = 10, dargestellt sind die mittleren Thrombozytenvolumina aller Stammzellspender, vZS = vor Thrombozytenapherese, nZS = nach Thrombozytenapherese, Aph = im Thrombozytenkonzentrat

Zur besseren Visualisierung der Thrombozytenvolumina haben wir in Abbildung 36 die Spender nach ihrem mittleren Thrombozytenvolumen (MPV) im peripheren Blut und im Apheresat in drei Gruppen unterteilt.



**Abbildung 36: Verteilung der Thrombozytenvolumina bei autologen Stammzellspendern,** apheresiert mit dem Apheresesystem Spectra Optia®, gemessen mit dem Zellcounter Sysmex XE-2100®, n = 10, blaue Säule = Anzahl der Proben mit MPV < 9 fl, rote Säule = Anzahl der Proben mit MPV 9,0 bis 10,0 fl, grüne Säule = Anzahl der Proben mit MPV > 10 fl, vZS = Verteilung des MPV im peripheren Blut vor der Zellseparation, nZS = Verteilung des MPV im peripheren Blut nach der Zellseparation, Aph = Verteilung des MPV im Stammzellkonzentrat, fl = Femtoliter, MPV = Mittleres Plättchenvolumen [1]

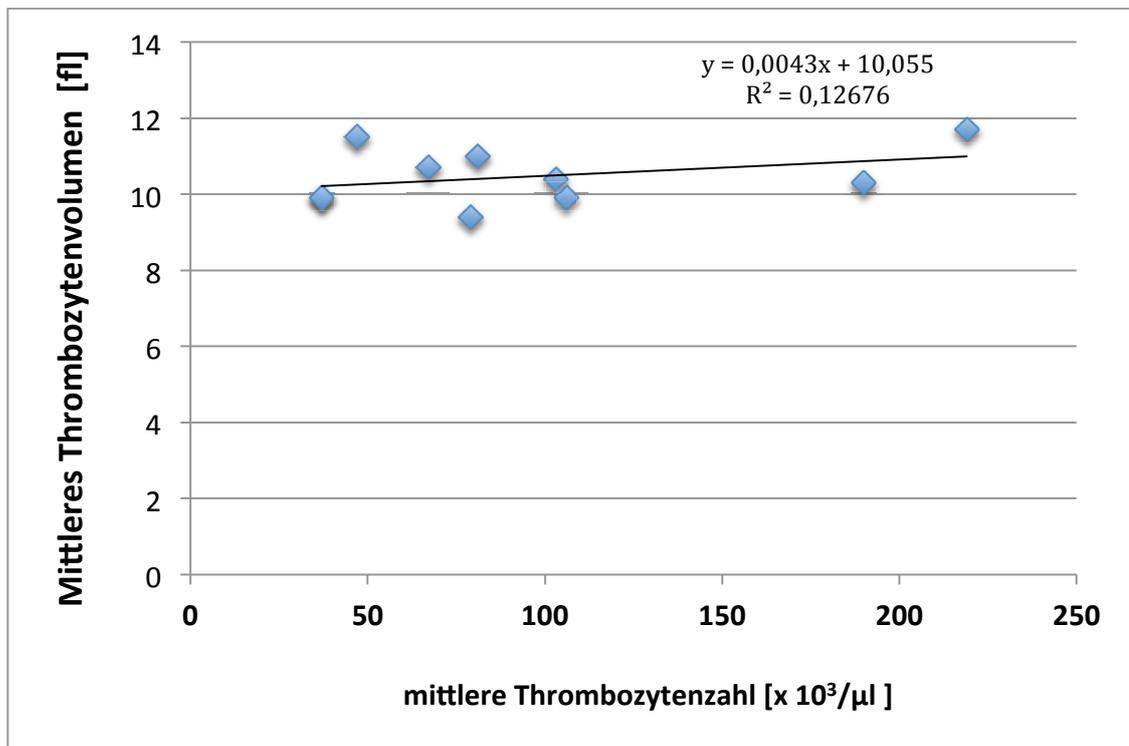
Hier ist zu erkennen, dass bei 7 von 10 Spendern im Apheresat das MPV über 10,5 fl gemessen wurde. In einem Apheresat wurde ein MPV zwischen 10,0 und 10,5 fl gemessen und in den Apheresaten von zwei Spendern lag das MPV unter 10,0 fl.

Vor der Separation war bei lediglich 4 Spendern das MPV im peripheren Blut größer als 10,5 fl. Bei weiteren 4 Spendern war das mittlere Thrombozytenvolumen unter 10,0 fl und bei den restlichen 2 Spendern zwischen 10,0 und 10,5 fl.

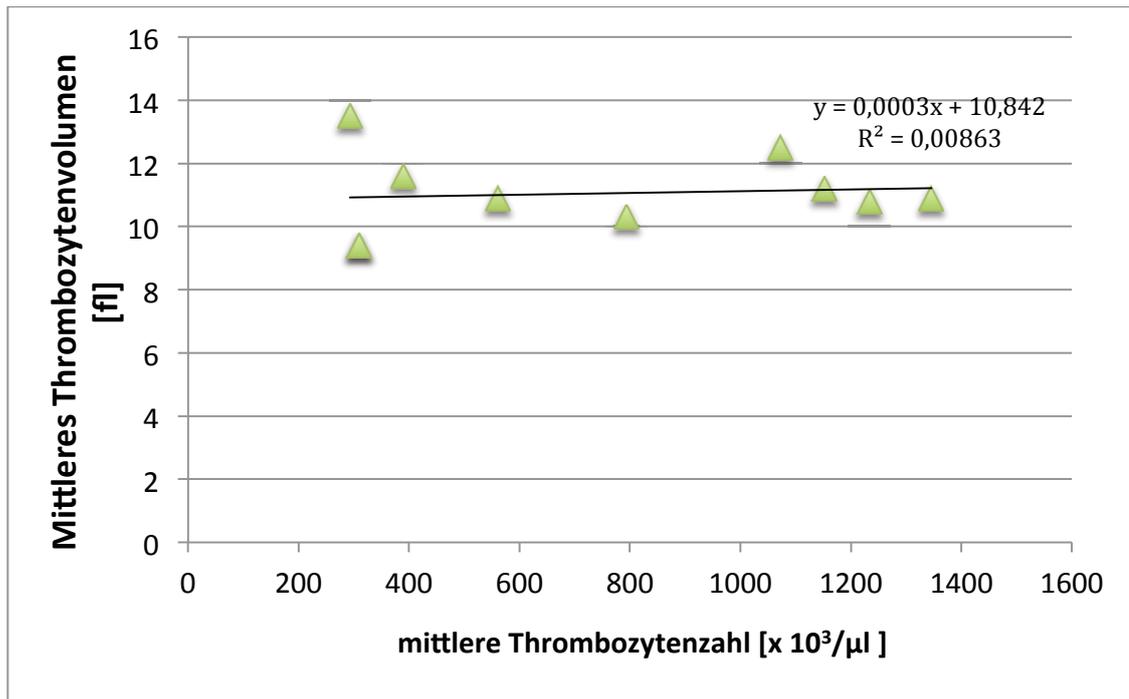
Nach der Apherese haben wir nur bei einem Spender ein mittleres Thrombozytenvolumen im peripheren Blut über 10,5 fl gemessen. Bei drei Spendern lag das MPV zwischen 10,0 und 10,5 fl und bei den restlichen 7 unter 10,0 fl.

Weiterhin ist zu erwähnen, dass bei keinem der Spender ein mittlere Thrombozytenvolumen unter 8,0 fl gemessen wurde.

Um auszuschließen, dass die von uns gemessenen Thrombozytenvolumina durch die unterschiedlichen Thrombozytenzahlen im peripheren Blut der Spender und im Stammzellkonzentrat beeinflusst wurden, haben wir in den Abbildungen 37 und 38 die beiden Thrombozytenparameter einander gegenübergestellt. Abbildung 37 zeigt die Werte im peripheren Blut der autologen Stammzellspender vor der Zellseparation (vZS) und Abbildung 38 die jeweiligen Messwerte im Stammzellapheresat. Ein Zusammenhang zwischen Thrombozytenzahl und gemessenem Thrombozytenvolumen ist weder bei geringen Thrombozytenzahlen im peripheren Blut noch bei sehr hohen Thrombozytenzahlen im Apheresat zu erkennen.



**Abbildung 37: Mittlere Thrombozytenvolumina bei unterschiedlichen Thrombozytenzahlen vor der Apherese im peripheren Blut der autologen Stammzellspender (vZS), apheresiert mit dem Spectra Optia® Apheresesystem, gemessen mit dem Zellcounter Sysmex XE-2100®**



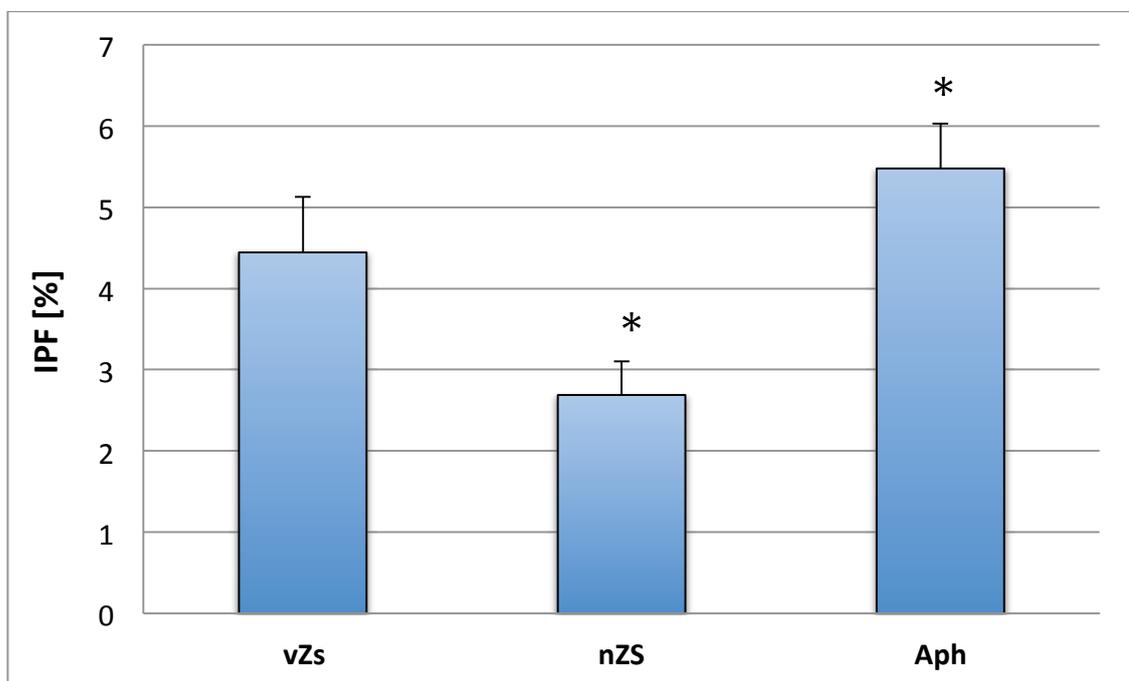
**Abbildung 38: Mittlere Thrombozytenvolumina bei unterschiedlichen Thrombozytenzahlen im Apheresat der autologen Stammzellspender (Aph), apheresiert mit dem Spectra Optia® Apheresesystem, gemessen mit dem Zellcounter Sysmex XE-2100®**

### 4.3.3 Veränderung der immature platelet fraction bei autologen Stammzellspendern

Als weiteren Parameter haben wir bei den autologen Stammzellspendern die immature platelet fraction (IPF) untersucht. Der prozentuale Anteil der unreifen Thrombozyten im peripheren Blut der Spender vor der Apherese betrug 4,44 %. Nach der Apherese sank der prozentuale Anteil auf 2,68 % ab. Im Apheresat erkennt man eine kummulative Ansammlung von unreifen großvolumigen Thrombozyten, hier wurde eine IPF von 5,47 % gemessen. Die Ergebnisse der IPF-Messung sind in Tabelle 11 und in Abbildung 39 dargestellt.

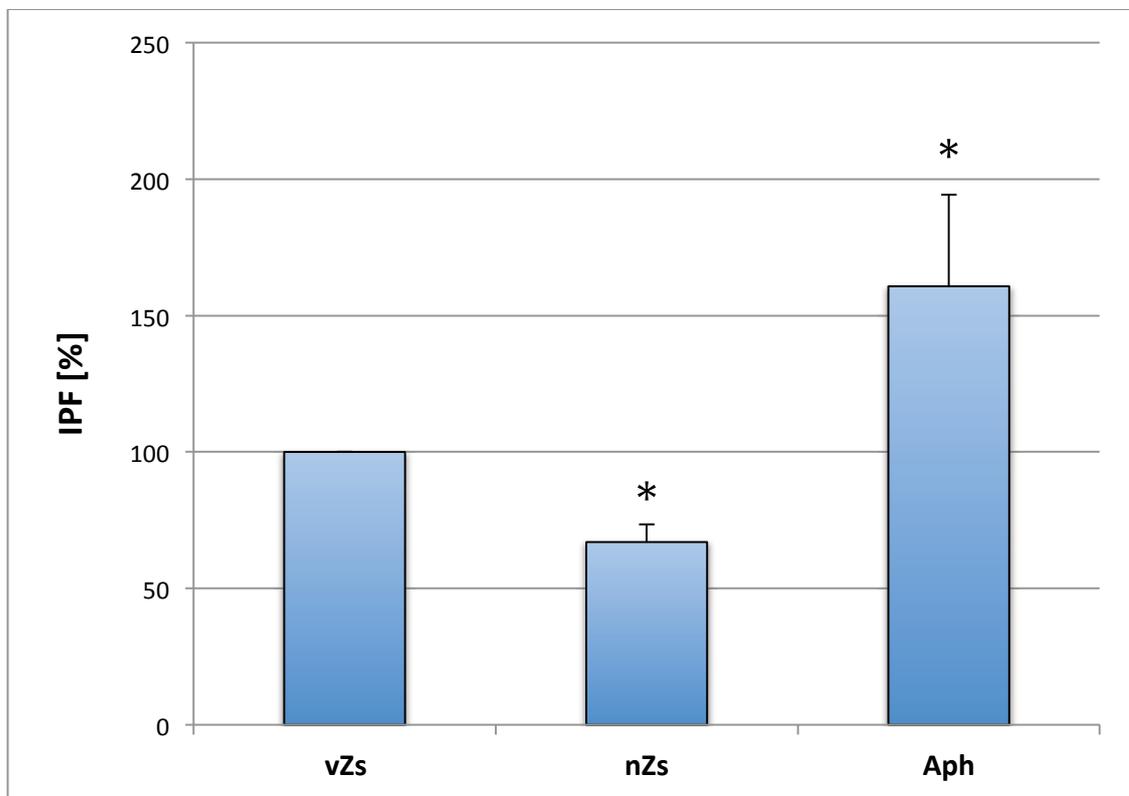
	vZS	nZS	Aph
IPF [%]	4,44 ± 0,68	2,68 ± 0,41	5,47 ± 0,54
IPF Veränderung [%]	100	66,14 ± 6,50	235,43 ± 28,45

**Tabelle 11: Autologe Stammzellspender**, apheresiert mit dem Apheresesystem Spectra Optia®, gemessen mit dem Zellcounter Sysmex XE-2100, n = 10, IPF = Immature platelet fraction, vZS = vor Zellseparation, nZS = nach Zellseparation, Aph = Thrombozytenkonzentrat, fl = Femtoliter



**Abbildung 39: Immatur platelet fraction der autologen Stammzellspende**, apheresiert mit dem Apheresesystem Spectra Optia®, gemessen mit dem Zellcounter Sysmex XE-2100®, n = 10, \*signifikant für p < 0,05, IPF = Immatur platelet fraction, vZS = vor der Stammzellapherese, nZS = nach der Stammzellapherese, Aph = im Stammzellapheresat

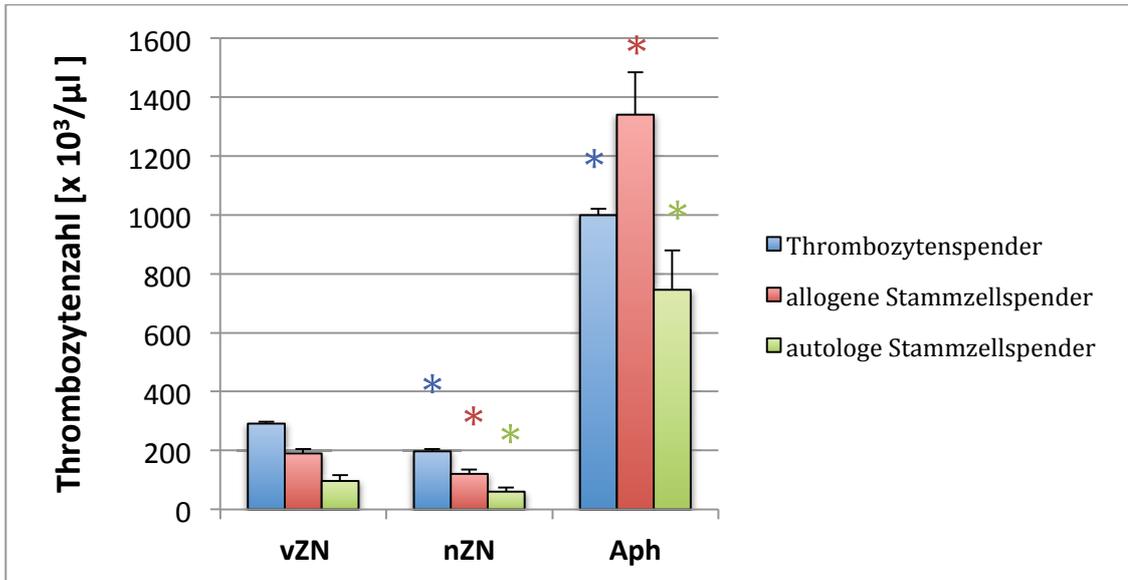
Um die Veränderung der immature platelet fraction (IPF) im peripheren Blut der Spender vor der Apherese (vZS), nach der Apherese (nZS) und im Zellkonzentrat (Aph) zu veranschaulichen, wurden die prozentualen Veränderungen in Abbildung 40 grafisch dargestellt. Dazu wurde die IPF im peripheren Blut der Spender vor der Stammzellapherese als Referenzgruppe mit 100 % gleichgesetzt. Hier ist zu sehen, dass nach der Apherese im Schnitt der Anteil der unreifen Thrombozyten um 33,05 % signifikant kleiner war als der IPF-Wert vor der Apherese. Weiterhin ist zu erkennen, dass die unreife Thrombozytenfraktion im Apheresat ca. 1,6-mal größer war als vor der Apherese im peripheren Blut [1].



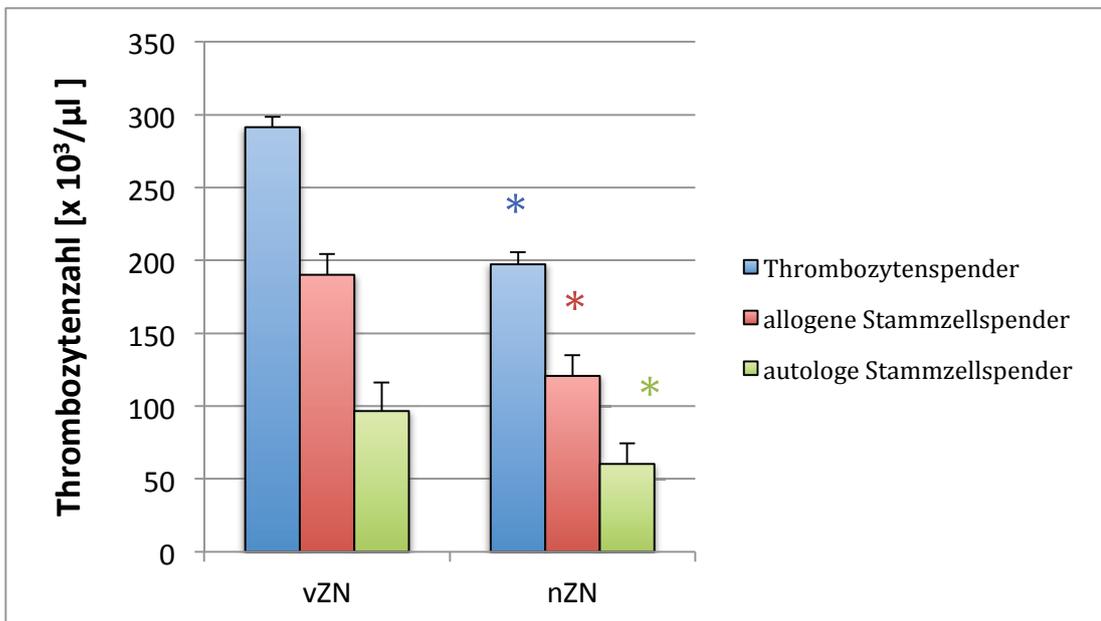
**Abbildung 40: Prozentuale Veränderung der IPF bei autologen Stammzellspendern, apheresiert mit dem Apheresesystem Spectra Optia®, gemessen mit dem Zellcounter Sysmex XE-2100®, IPF = Immatur platelet fraction, n = 10, \*signifikant für  $p < 0,05$ , vZS = vor der Stammzellapherese, nZS = nach der Stammzellapherese, Aph = im Stammzellapheresat [1]**

#### **4.4 Vergleich zwischen Stammzellspendern und Thrombozytenspendern**

Die Abbildungen 41 und 42 zeigen die Messergebnisse der drei Spendergruppen. Es sind jeweils die Veränderungen der Thrombozytenzahlen dargestellt. Zu sehen ist, dass es bei allen drei Spendergruppen zu einem signifikanten Abfall der Thrombozytenzahl im peripheren Blut nach der Apherese gekommen ist und die Thrombozytenzahlen in den Apheresaten signifikant höher waren als die Thrombozytenzahlen im peripheren Blut der Spender vor der Apherese.



**Abbildung 41: Mittlere Thrombozytenzahlen der Thrombozytenspender, der allogenen und autologen Stammzellspender**, apheresiert mit dem Apheresesystem Spectra Optia® und dem MCS+ Haemonetics, gemessen mit dem Zellcounter Sysmex XE-2100®, angegeben sind die Mittelwerte mit Standardfehlern, Thrombozytenspender n = 10, allogene Stammzellspender n = 10, autologe Stammzellspender n = 19, \*signifikant für p < 0,05, vZS = vor der Stammzellapherese, nZS = nach der Stammzellapherese, Aph = im Stammzellapheresat

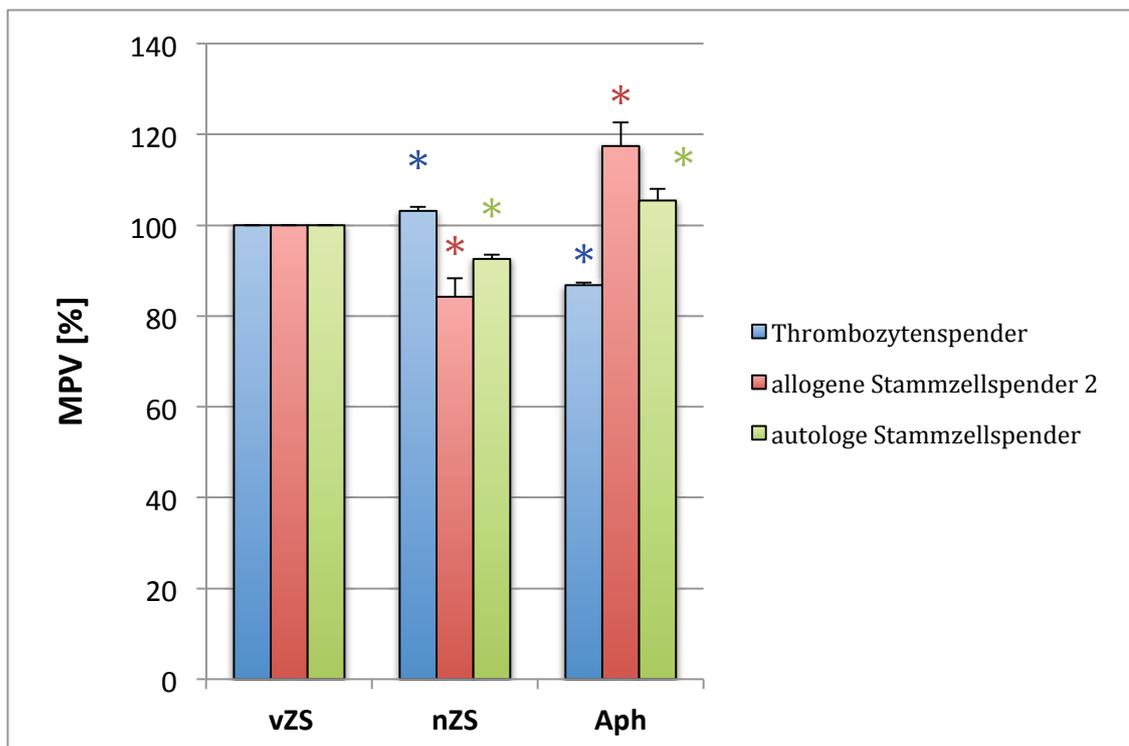


**Abbildung 42: Mittlere Thrombozytenzahlen der Thrombozytenspender, der allogenen und autologen Stammzellspender**, apheresiert mit dem Apheresesystem Spectra Optia® und dem MCS+ Haemonetics, gemessen mit dem Zellcounter Sysmex XE-2100®, angegeben sind die Mittelwerte mit Standardfehlern, Thrombozytenspender n = 10, allogene Stammzellspender n = 10, autologe Stammzellspender n = 19, \*signifikant für p < 0,05, vZS = vor der Stammzellapherese, nZS = nach der Stammzellapherese

Abbildung 43 gibt einen Überblick über die Thrombozytenvolumina (MPV) der jeweiligen Spender vor der Apherese (vZS), nach der Apherese (nZS) sowie in den Apheresaten (Aph) [1].

Bei den Thrombozytenspendern wurden im Vergleich zu den Stammzellspendern vornehmlich kleinvolumige Thrombozyten apheresiert.

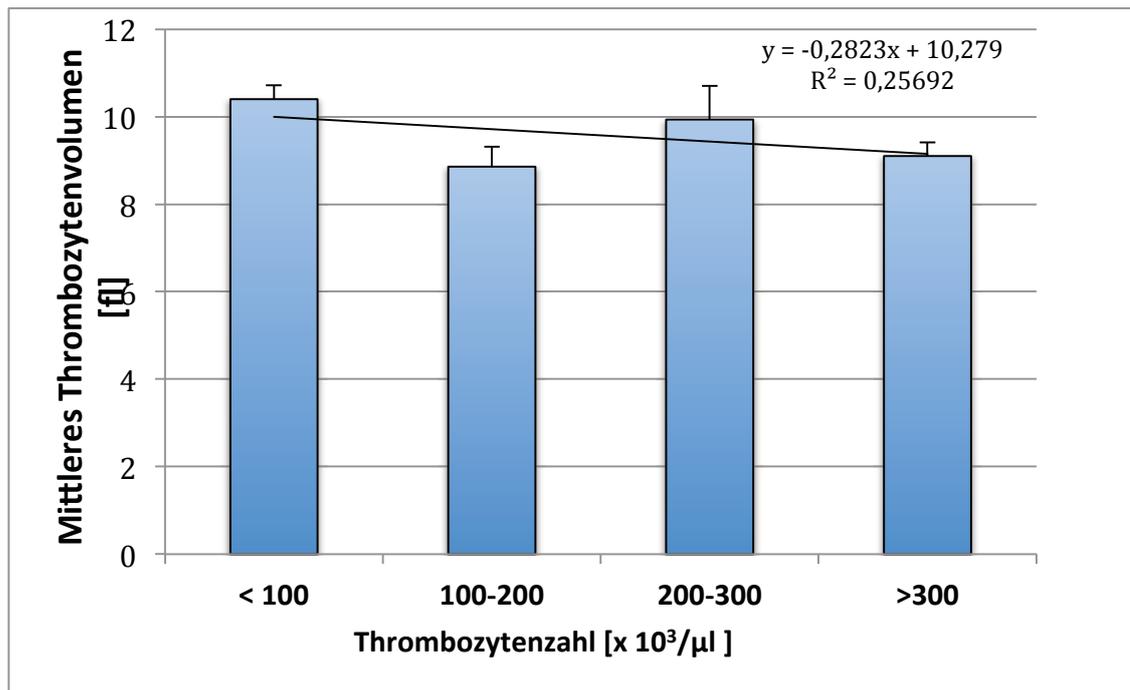
In den Apheresaten der Thrombozytenspender kam es zu einem signifikanten Abfall der mittleren Thrombozytenvolumina um 13,2 %. Bei den Stammzellspendern beobachteten wir hingegen eine signifikante Zunahme des mittleren Thrombozytenvolumens um 17,4 %.



**Abbildung 43: Mittlere Thrombozytenvolumina der Thrombozytenspender, der allogenen und autologen Stammzellspender**, apheresiert mit dem Apheresesystem Optia Spectra® und dem MCS+ Haemonetics, gemessen mit dem Zellcounter Sysmex XE-2100®, angegeben sind die Mittelwerte mit Standardfehlern, Thrombozytenspender n = 10, allogene Stammzellspender n = 10, autologe Stammzellspender n = 19, \*signifikant für p < 0,05, vZS = vor der Stammzellapherese, nZS = nach der Stammzellapherese, Aph = im Stammzellapheresat [1]

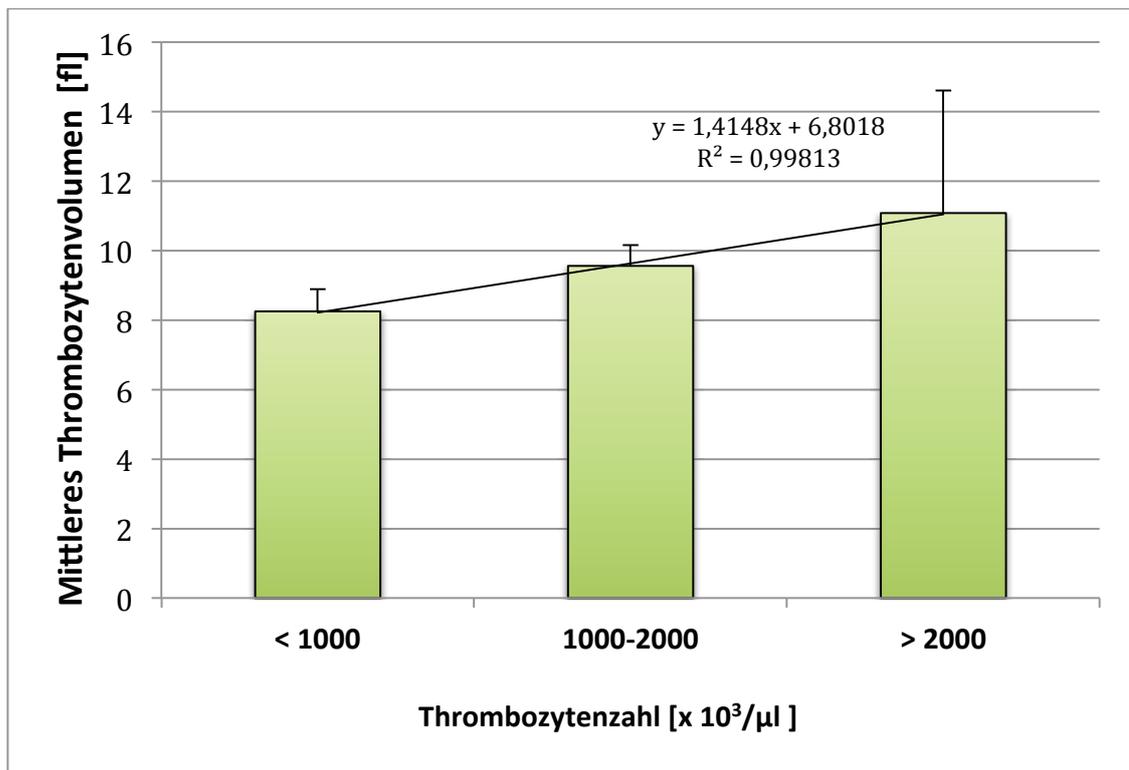
Die folgenden Abbildungen zeigen die unterschiedlichen Thrombozytenvolumina sowohl vor der Apherese (Abb. 44) als auch im Apheresat (Abb. 45). In Abbildung 44 bildeten wir je nach Höhe der Thrombozytenzahl vor der Apherese im peripheren Blut

der Spender vier Gruppen, in die wir die entsprechenden Spender einsortierten. In den einzelnen Gruppen berechneten wir das durchschnittliche Thrombozytenvolumen. Spender mit einer Thrombozytenzahl von unter  $100 \times 10^3/\mu\text{l}$  hatten durchschnittlich ein MPV von 10,4 fl. Demgegenüber zeigten Spender mit einer Thrombozytenzahl von mehr als  $300 \times 10^3/\mu\text{l}$  im Schnitt einen MPV-Wert von 9,1 fl.



**Abbildung 44: Mittleres Thrombozytenvolumen bei unterschiedlichen Thrombozytenzahlen im peripheren Blut der Stammzellspender (autolog und allogene) und der Thrombozytenspenders vor der Apherese, apheresiert mit dem Apheresesystem Spectra Optia® und dem MCS+ Haemonetics, gemessen mit dem Zellcounter Sysmex XE-2100®, angegeben sind die Mittelwerte mit Standardfehlern, Thrombozytenspenders n = 10, allogene Stammzellspender n = 10, autologe Stammzellspender n = 19**

In Abbildung 45 teilten wir ähnlich wie in Abbildung 44 die Thrombozytenapheresate je nach mittlerer Thrombozytenzahl in 3 Gruppen ein und bestimmten in den jeweiligen Gruppen das entsprechende durchschnittliche Thrombozytenvolumen. Apheresate mit einem durchschnittlichen Thrombozytengehalt von weniger als  $1000 \times 10^3/\mu\text{l}$  zeigten ein durchschnittliches MPV von 8,25 fl. Thrombozytenapheresate mit einer durchschnittlichen Thrombozytenzahl von mehr als  $2000 \times 10^3/\mu\text{l}$  hingegen zeigten ein durchschnittliches mittleres Thrombozytenvolumen von 11,08 fl.



**Abbildung 45: Mittleres Thrombozytenvolumen bei unterschiedlichen Thrombozytenzahlen im peripheren Blut der Stammzellspender (autolog und allogene) und der Thrombozytenspenders im Apheresat, apheresiert mit dem Apheresesystem Spectra Optia® und dem MCS+ Haemonetics, gemessen mit dem Zellcounter Sysmex XE-2100®, angegeben sind die Mittelwerte mit Standardfehlern, Thrombozytenspenders n = 10, allogene Stammzellspender n = 10, autologe Stammzellspender n = 19**

## 4.5 Berechnung des theoretischen Thrombozytenvolumens

Um die Genauigkeit unserer Messdaten zu überprüfen, haben wir mithilfe folgender Gleichung die theoretisch zu messenden mittleren Thrombozytenvolumina und Zellzahlen in den unterschiedlichen Apheresaten berechnet. Diese Gleichung bezieht sich exemplarisch auf die Thrombozytenzahlen und Thrombozytenvolumina in einem Liter Blut.

$$\frac{(PLT_{(vZS)} \times MPV_{(vZS)}) - (PLT_{(nZS)} \times MPV_{(nZS)})}{(PLT_{(vZS)} - PLT_{(nZS)})}$$

- PLT: mittlere Thrombozytenzahl [ $\times 10^3/\mu\text{l}$ ]  
 MPV: mittleres Thrombozytenvolumen [fl]  
 vZS: vor der Stammzellapherese im peripheren Blut der Spender  
 nZS: nach der Stammzellapherese im peripheren Blut der Spender  
 Aph: im Stammzellapheresat

Bei den Berechnungen der theoretischen mittleren Thrombozytenvolumina sahen wir durchschnittlich eine mittlere prozentuale Abweichung von weniger als 10 %.

Im Schnitt waren die gemessenen MPV-Werte der autologen Stammzellspender nur 8,2 % kleiner als die theoretisch errechneten Werte. Die gemessenen mittleren Thrombozytenvolumina der Thrombozytenspenders im Thrombozytenkonzentrat waren durchschnittlich 5,7 % kleiner als die errechneten Volumina. Bei den allogenen Stammzellspendern waren die gemessenen Thrombozytenvolumina im Stammzellkonzentrat 8,5 % kleiner als die theoretisch errechneten MPV-Werte.

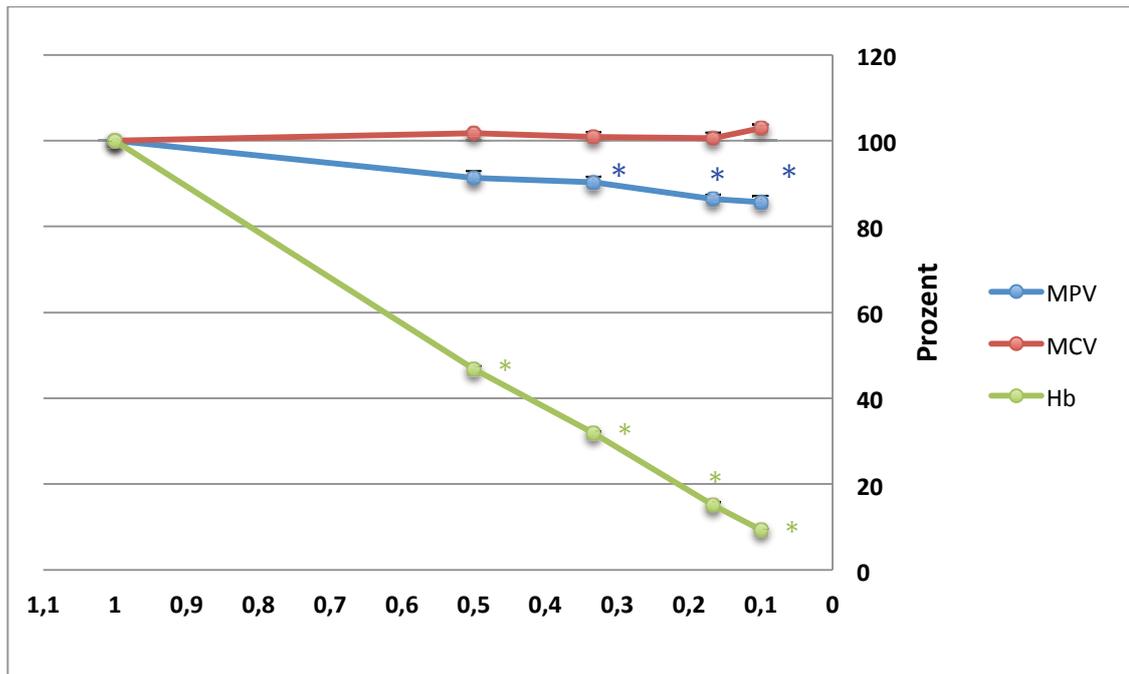
## **4.6 Verdünnungsreihen**

Um die Auswirkung von unterschiedlichen Zellkonzentrationen und Antikoagulantien auf die Messung des Thrombozytenvolumens mit dem Zellcounter Sysmex XE-2100<sup>®</sup> zu untersuchen, wurden mit den Blutproben von fünf Probanden mehrerer Verdünnungsreihen durchgeführt.

Zur Verdünnung wurde EDTA-Blut in verschiedenen Verhältnissen mit einer 0,9 % Natriumchloridlösung sowie durch Zentrifugation hergestelltem poor platelet plasma (PPP) verdünnt. Es wurden pro Proband und pro Verdünnungslösung vier Verdünnungen angefertigt. Die Verdünnungsverhältnisse betragen 1:1, 1:2, 1:5 und 1:9 [1].

### **4.6.1 Verdünnungsreihen mit Natriumchlorid**

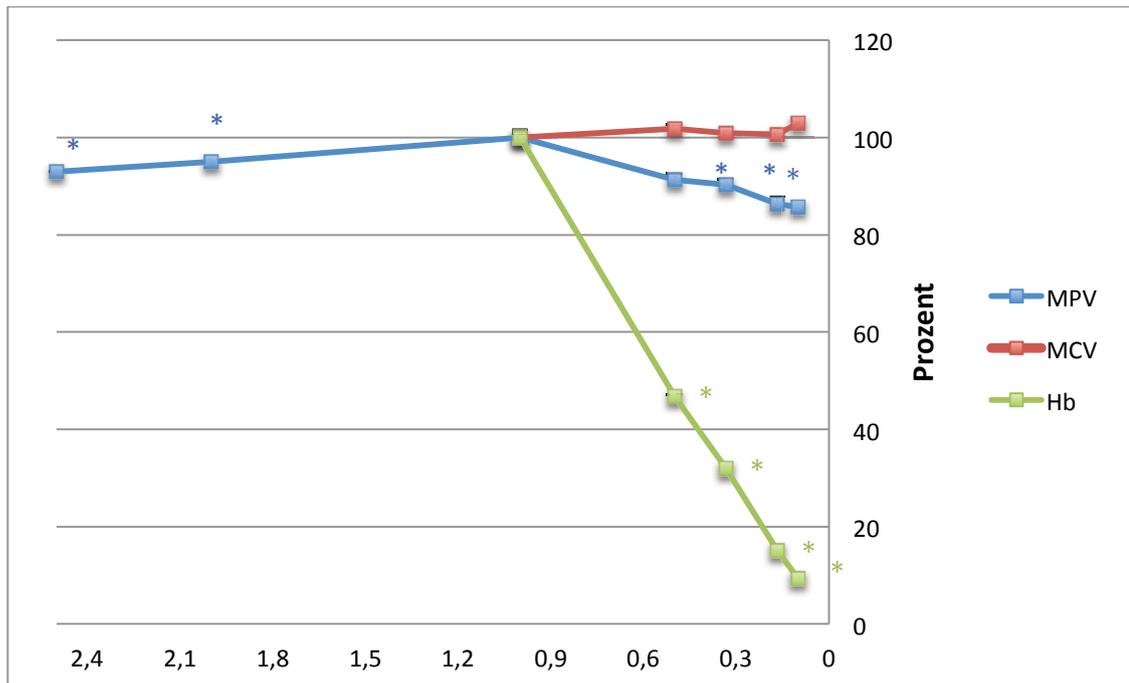
Die Ergebnisse der Verdünnungsreihen der Blutproben mit der Natriumchloridlösung (0,9 %) haben wir in Abbildung 46 grafisch dargestellt. Zu sehen ist die Veränderung des Hämoglobins (Hb), des mittleren Erythrozytenvolumens (MCV) und des mittleren Thrombozytenvolumens (MPV). Die jeweiligen Veränderungen sind in Prozent angegeben. Dazu wurden die Messwerte aus unverdünnten EDTA-Blutproben als Referenzgruppe mit 100 % gleichgesetzt.



**Abbildung 46: Verdünnungsreihe der EDTA-Blutproben mit Natriumchlorid**, gemessen wurde mit dem Zellcounter XE-2100®, \*signifikant für  $p < 0,05$ , NaCl = Natriumchlorid 0,9 %, MPV = mittleres Thrombozytenvolumen, MCV = mittleres Erythrozytenvolumen, Hb = Hämoglobin

Die grüne Kurve zeigt die prozentuale Abnahme des Hämoglobins. Diese Kurve dient als grafische Veranschaulichung der Verdünnung der Blutproben mit der Natriumchloridlösung. Die rote Kurve zeigt die Veränderung der Erythrozytenvolumina. Hier ist zu erkennen, dass das Volumen der roten Blutkörperchen durch die Verdünnung kaum beeinflusst wird und auf 100 % stagniert. Das mittlere Volumen der Thrombozyten (MPV) ist in der blauen Kurve dargestellt. Zu sehen ist, dass mit zunehmender Verdünnung das Volumen der Blutplättchen von 10,14 fl auf durchschnittlich 9,54 fl bei einem Verdünnungsverhältnis von 1:9 absinkt. Dies entspricht einer relativen Volumenabnahme von 14,3 %.

Neben der Verdünnung wurde durch Zentrifugation auch aufkonzentriertes Plasma (PRP) aus den Blutproben der fünf Spender hergestellt. Die im platelet rich plasma (PRP) gemessenen Thrombozytenvolumina wurden in Abbildung 47 in die grafische Darstellung miteinbezogen und lassen erkennen, dass nicht nur bei der Verdünnung, sondern auch bei der Aufkonzentrierung signifikant niedrigere Thrombozytenvolumina gemessen wurden als im Vollblut [1].

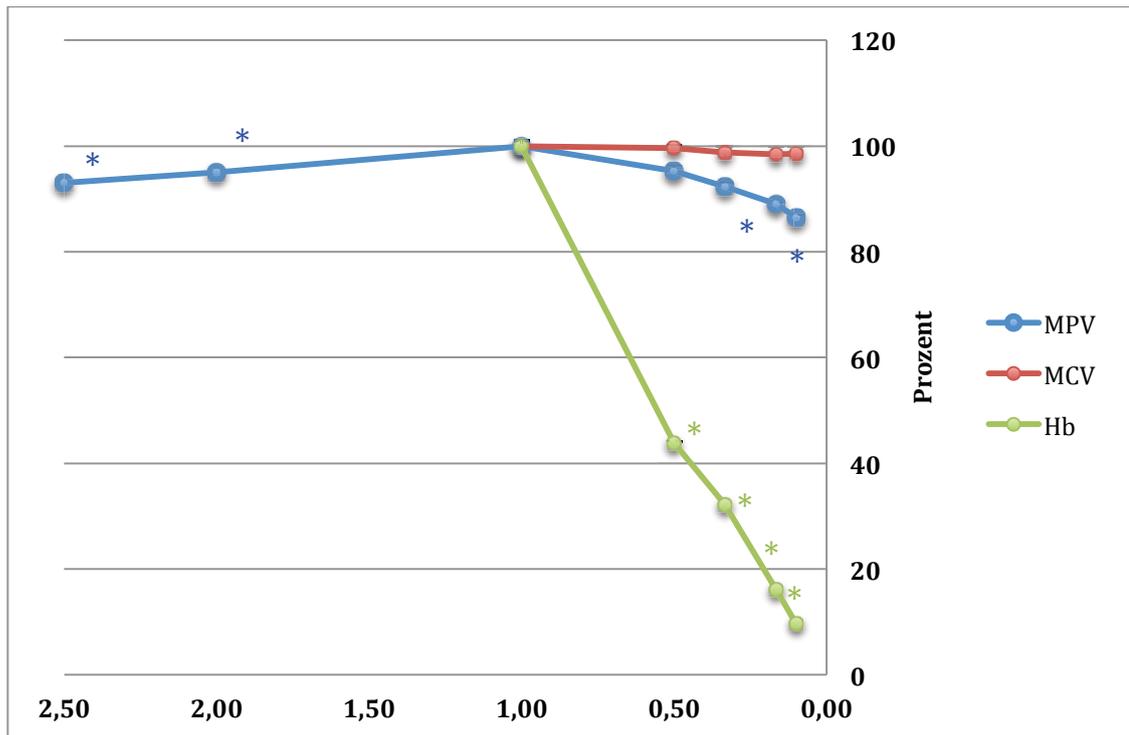


**Abbildung 47: Verdünnungsreihe der EDTA-Blutproben mit Natriumchlorid**, abgebildet sind die Mittelwerte der prozentualen Abweichung der folgenden Parameter vom Referenzwert aus der unverdünnten EDTA-Blutprobe der fünf Probanden, gemessen mit dem Zellcounter Sysmex XE-2100®, die Verdünnungsreihe wurde mit 0,9 % Natriumchloridlösung durchgeführt, \*signifikant für  $p < 0,05$ , MPV = mittleres Thrombozytenvolumen, MCV = mittleres Erythrozytenvolumen, Hb = Hämoglobin [1]

#### 4.6.2 Verdünnungsreihen mit platelet poor plasma

Die zweite Verdünnungsreihe wurde mit platelet poor plasma (PPP) durchgeführt. Die prozentualen Veränderungen sind in Abbildung 48 graphisch dargestellt. Auch hier wurden die Messwerte der einzelnen Parameter in unverdünntem EDTA-Blut als Referenzwerte mit 100 % gleichgesetzt.

Es zeigen sich ähnliche Messergebnisse, wie wir sie bei der Verdünnung mit der Natriumchloridlösung festgestellt haben. Zu verzeichnen was, dass mit zunehmender Verdünnung einen abnehmenden Hämoglobinwert (Hb), ein unverändertes Erythrozytenvolumen (MCV) und ein sowohl bei der Aufkonzentrierung im PRP als auch bei der Verdünnung mit PPP leicht abfallendes Thrombozytenvolumen (MPV).

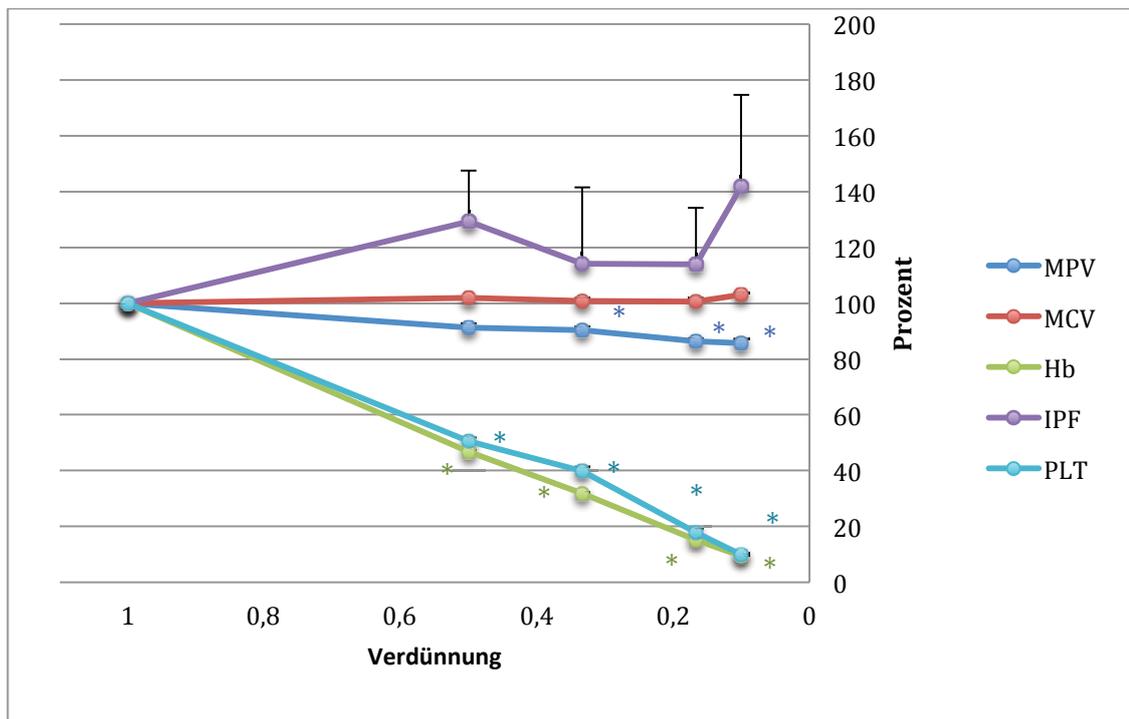


**Abbildung 48: Verdünnungsreihe der EDTA-Blutproben mit platelet poor plasma**, abgebildet sind die Mittelwerte der prozentualen Abweichung der folgenden Parameter vom Referenzwert aus der unverdünnten EDTA-Blutprobe der fünf Probanden, gemessen mit dem Zellcounter Sysmex XE-2100®, die Verdünnungsreihe wurde mit plättchenarmer Plasma (PPP) angefertigt, \*signifikant für  $p < 0,05$ , PPP = platelet poor plasma, MPV = mittleres Thrombozytenvolumen, MCV = mittleres Erythrozytenvolumen, Hb = Hämoglobin

#### 4.6.3 Immature platelet fraction und Thrombozytenzahl

Die Messung der IPF zeigte bei allen Proben physiologische Werte [47]. Es konnten folgende IPF-Werte gemessen werden: Proband 1: 2,3 %; Proband 2: 3,1 %; Proband 3: 1,2 %; Proband 4: 2,7 %; Proband 5: 2,5 %.

Betrachtet man den IPF-Wert in der Verdünnungsreihe, sieht man, dass die IPF mit zunehmender Verdünnung leicht ansteigt (siehe Abb. 49). Der Anstieg des IPF-Wertes erwies sich jedoch als nicht signifikant. Da die IPF den relativen Anteil der unreifen Thrombozyten an der gesamten Thrombozytenzahl widerspiegelt, haben wir zur Veranschaulichung in diesen Grafen die relative Veränderung der Thrombozytenzahl (PLT) hinzugefügt. Diese verhält sich ähnlich wie der Hämoglobinwert (Hb) und fällt mit zunehmender Verdünnung signifikant ab.



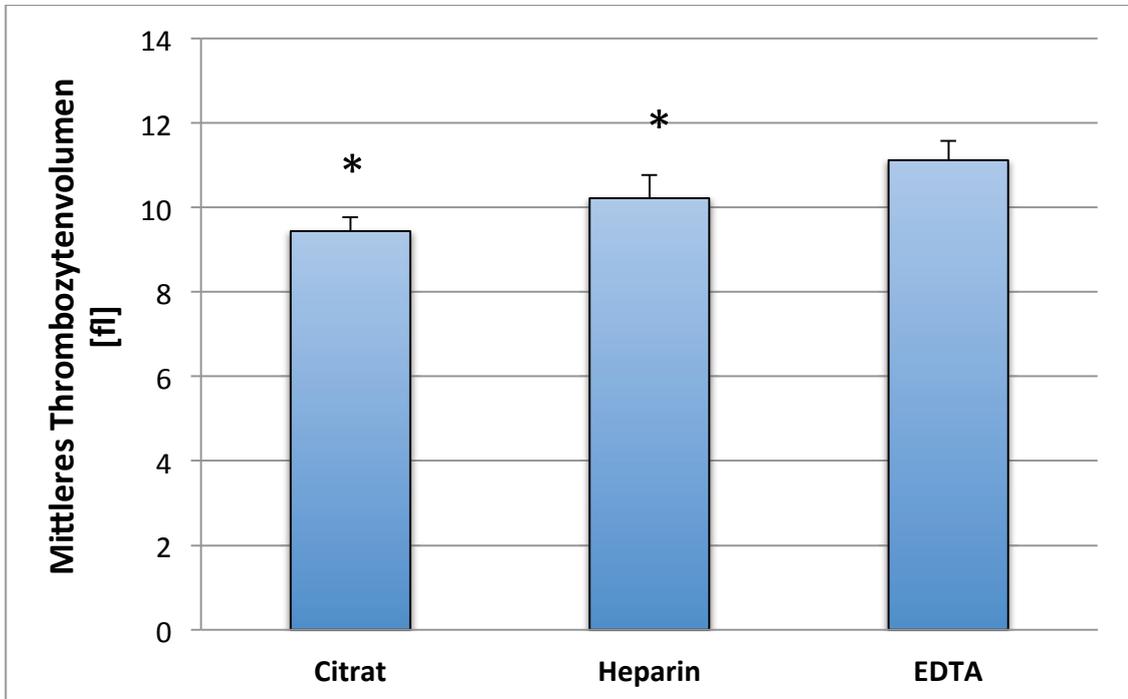
**Abbildung 49: Verdünnungsreihe der EDTA-Blutproben mit Natriumchlorid**, abgebildet sind die Mittelwerte der prozentualen Abweichung der folgenden Parameter vom Referenzwert aus der unverdünnten EDTA-Blutprobe der fünf Probanden, gemessen mit dem Zellcounter Sysmex XE-2100®, die Verdünnungsreihe wurde mit 0,9 % Natriumchloridlösung angefertigt, \*signifikant für  $p < 0,05$ , MPV = mittleres Thrombozytenvolumen, Hb = Hämoglobin, IPF = immatur platelet fraction, unreife Thrombozytenfraktion, **PLT = Thrombozytenzahl**

#### 4.7 Milieueinflüsse auf das Thrombozytenvolumen (MPV)

Zur Bestimmung wie auch zur Verwendung verschiedener Blutbestandteile werden diesen je nach Notwendigkeit unterschiedliche Antikoagulantien zugesetzt. Wir haben den Einfluss von Citrat (ACD-A), Heparin und EDTA auf das Thrombozyten- und Erythrozytenvolumen untersucht. Dazu verwendeten wir die Blutproben von fünf Probanden.

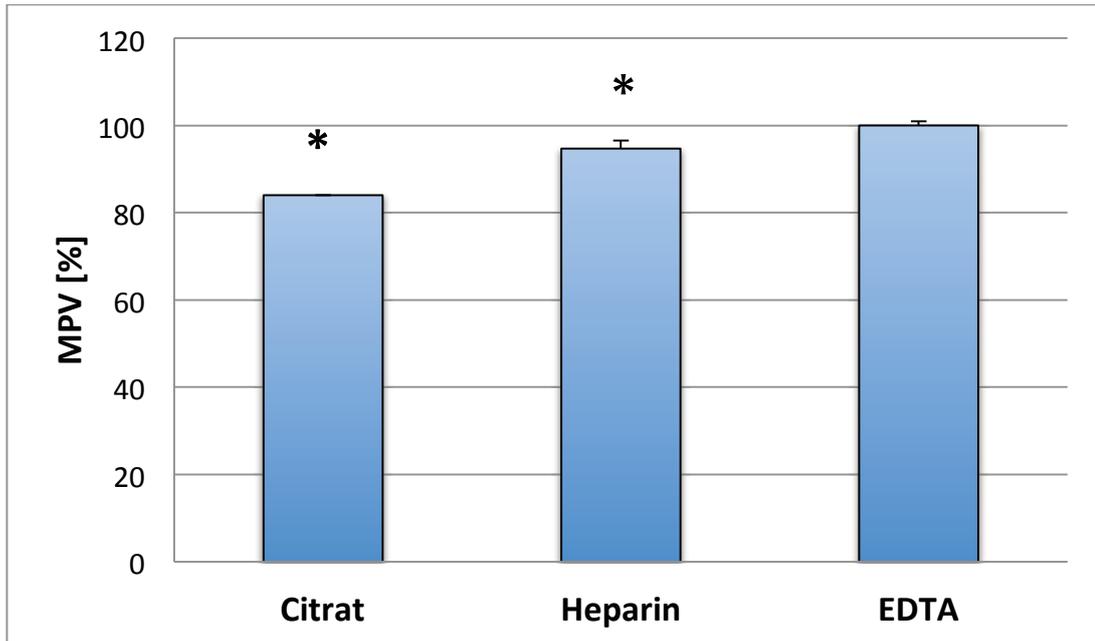
In Abbildung 50 ist das mittlere Thrombozytenvolumen (MPV) in den unterschiedlichen Milieus dargestellt. Das MPV im Citrat-Milieu (ACD-A) war mit einer Volumendifferenz von 16 % signifikant kleiner als im EDTA-Milieu. Das mittlere Thrombozytenvolumen betrug im EDTA-Milieu 11,2 fl, im Heparin-Milieu 10,22 fl und im Citrat-Milieu nur 9,64 fl.

Zwischen dem EDTA-Milieu und dem Heparin-Milieu wurde eine signifikante Volumendifferenz von 0,9 fl festgestellt. Dies entspricht einem relativen Volumenunterschied von 5,3 %.



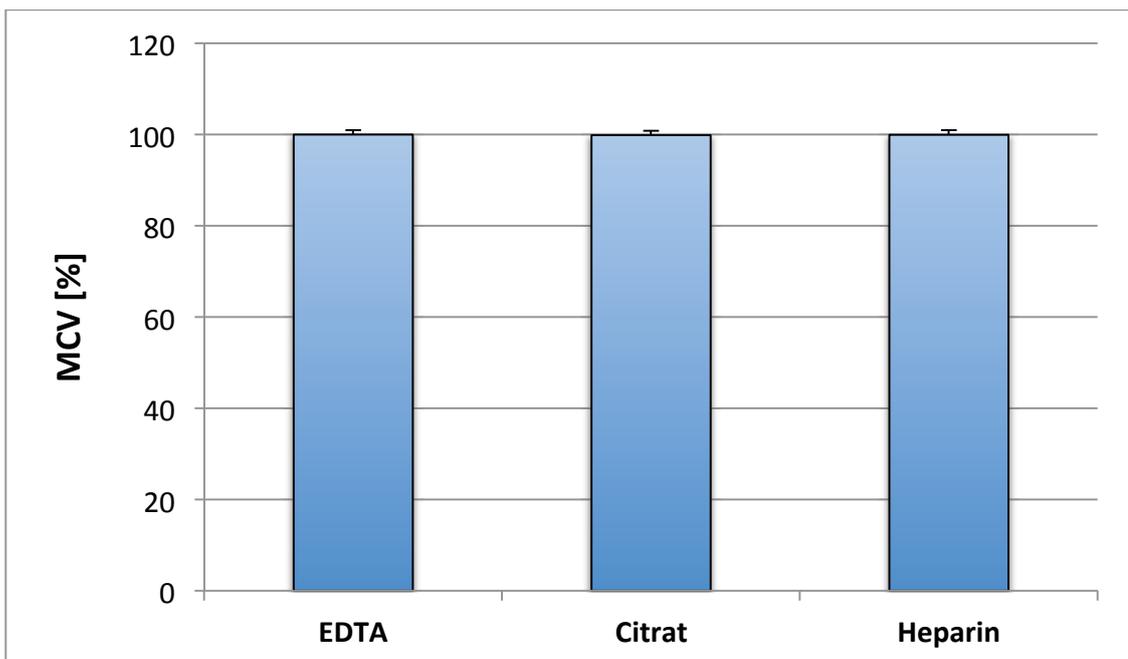
**Abbildung 50: Mittleres Thrombozytenvolumen in unterschiedlichen Milieus,** Citrat (ACD-A), Heparin, EDTA, dargestellt sind die errechneten MPV-Mittelwerte und Standardfehler aus den Blutproben der fünf Probanden, die Messung wurde mit dem Zellcounter Sysmex XE-2100® durchgeführt, \*signifikant für  $p < 0,05$

In Abbildung 51 sind die unterschiedlichen Volumenverhältnisse in Prozent angegeben. Als Referenzgruppe wurde das MPV im EDTA-Blut mit 100 % gleichgesetzt. Hier sehen wir eine signifikante MPV-Abnahme im Citrat und Heparin gegenüber den gemessenen Werten im EDTA-Blut [1].



**Abbildung 51: Prozentuale Veränderung des mittleren Thrombozytenvolumens in unterschiedlichen Milieus in Prozent, Citrat (ACD-A), Heparin, EDTA-Vollblut, die Messungen wurden mit dem Zellcounter Sysmex XE-2100® durchgeführt, MPV-Citrat: 86,9 %; MPV-Heparin: 94,7 %; MPV-EDTA: 100 %, \*signifikant für  $p < 0,05$  [1]**

Neben dem MPV untersuchten wir auch die Auswirkung der unterschiedlichen Milieus auf das mittlere Erythrozytenvolumen MCV. Hier konnten wir allerdings kaum Unterschiede zwischen den Antikoagulantien feststellen (siehe Abb. 52).



**Abbildung 52: Prozentuale Veränderung des mittleren Erythrozytenvolumens in unterschiedlichen Milieus in Prozent, Citrat (ACD-A), Heparin, EDTA-Vollblut, die Messungen wurden mit dem Zellcounter Sysmex XE-2100® durchgeführt, n = 5**

## **5. Diskussion**

### **5.1 Einleitung**

In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass die Art des Aphereseverfahrens die Größe der apheresierten Thrombozyten signifikant beeinflusst. Unsere Untersuchungen ergaben, dass bei der allogenen Thrombozytenspende vermehrt kleinvolumige Thrombozyten, bei der autologen und allogenen Stammzellspende hingegen eher großvolumige Thrombozyten apheresiert werden (siehe Abb. 43) [1].

Für die Herstellung von Thrombozytenkonzentraten werden von der Bundesärztekammer verschiedene Qualitätskontrollparameter berücksichtigt [5]. Diese Kontrollparameter beziehen sich bisher ausschließlich auf die Qualität des Thrombozytenkonzentrates und nicht auf die Qualität des Aphereseprozesses. Ein Qualitätsparameter für den Aphereseprozess wäre insofern interessant, als so auch eine Möglichkeit gegeben wäre, die Apheresegeräte untereinander zu vergleichen. In dieser Arbeit soll daher geprüft werden, ob das mittlere Thrombozytenvolumen (MPV) als möglicher Qualitätskontrollparameter für den Aphereseprozess Verwendung finden kann.

### **5.2 Thrombozytenzahl**

Im Allgemeinen konnten wir bei allen Aphereseverfahren eine Abnahme der Thrombozytenzahl im peripheren Blut erkennen.

#### **Thrombozytenspender**

Bei den Thrombozytenspendern sahen wir eine relative Abnahme der Thrombozytenkonzentration im peripheren Blut nach der Apherese von 291,4 auf  $197,3 \times 10^3/\mu\text{l}$ . Ähnliche Veränderungen in der Thrombozytenkonzentration im peripheren Blut von allogenen Thrombozytenspendern nach der Apherese konnten bereits von anderen Autoren nachgewiesen werden [50] [51]. In einer Studie von Das et al. kam es zu einem Abfall der mittleren Thrombozytenzahl von durchschnittlich 213,7 auf  $150,7 \times 10^3/\mu\text{l}$  [51].

Pathologische Thrombozytopenien nach der Apherese wurden bei keinem Spender

beobachtet. Alle Spender wiesen im peripheren Blut nach der Apherese eine Thrombozytenkonzentration von über  $150 \times 10^3$  Thrombozyten pro Mikroliter auf. Die hergestellten Thrombozytenkonzentrate enthielten allesamt ausreichende Thrombozyten für eine erfolgreiche Thrombozytentransfusion. Sie entsprachen den gängigen Richtlinien, die eine Thrombozytenkonzentration von durchschnittlich  $1000 \cdot 10^3$  Thrombozyten pro Mikroliter pro Thrombozytenkonzentrat vorschreiben [26,29].

### **Stammzellspender**

Im Rahmen der Stammzellapherese kam es sowohl bei autologen als auch bei allogenen Stammzellspendern zu einer signifikanten Abnahme der Thrombozytenzahl im peripheren Blut. Dies wurde bereits in anderen wissenschaftlichen Arbeiten beobachtet [52].

Ferner wird vermutet, dass bei den Stammzellspendern die Stimulation der hämatopoetischen Vorläuferzellen im Knochenmark mit G-CSF zu einer verminderten Bildung von Thrombozyten führt, weswegen die Thrombozytenzahl bei diesen Spendern durchschnittlich niedrigere Ausgangswerte im peripheren Blut aufzeigt als es bei den Thrombozytenspendern der Fall war [53].

Wir sahen bei den allogenen Stammzellspendern eine deutlich niedrigere Thrombozytenkonzentration vor der Apherese als bei den Thrombozytenspendern, die keine Stimulation erhalten hatten. Die Thrombozytenkonzentrate der allogenen Stammzellspender lagen durchschnittlich 90.000 bis 100.000 Plättchen pro Mikroliter unterhalb der mittleren Thrombozytenzahl der allogenen Thrombozytenspendern. Ähnliche Beobachtungen machten bereits andere Autoren, die den Unterschied in der Thrombozytenzahl unter anderem auf die Stimulation mit G-CSF zurückführten [54].

Des Weiteren gelten bei der Thrombozytenspende andere Auswahlkriterien als bei der Stammzellspende. So sollten Spender vor der Thrombozytenspende eine Thrombozytenkonzentration von mindestens 250.000 Thrombozyten pro Mikroliter aufweisen, um für die Spende zugelassen zu werden. Bei der Stammzellspende beziehen sich die Auswahlkriterien jedoch weniger auf die Thrombozytenzahl als auf eine ausreichende Mobilisation von Stammzellen.

Bei den autologen Stammzellspendern kommt erschwerend hinzu, dass der Krankheitsverlauf, der durch eine Knochenmarkinsuffizienz gekennzeichnet ist, zu einem noch deutlicheren Abfall der Thrombozytenausgangswerte führt [19] [55]. Die autologen Stammzellspender zeigten vor der Apherese eine durchschnittliche Thrombozytenzahl von ca.  $100 \cdot 10^3/\mu\text{l}$ .

### **Thrombozytenverlust während der Apherese**

Sowohl bei der Thrombozyten- als auch bei der Stammzellapherese ist ein geringgradiger Verlust von Thrombozyten während des Aphereseprozesses zu verzeichnen. Ein geringfügiger Teil der Thrombozyten agglutiniert im Schlauchsystem, wobei man nicht differenzieren kann, ob es sich dabei um eher groß- oder kleinvolumige Thrombozyten handelt. Man versucht, dies auf ein Minimum zu reduzieren, indem man Agglutinationshemmer verwendet [38].

Des Weiteren ist bekannt, dass es im Rahmen der Zellseparation zu einer Interaktion zwischen Thrombozyten und Monozyten kommen kann, die zur Bildung von Monozyten-Thrombozytenaggregaten führt. Diese können nur mithilfe aufwendiger Analysen von Monozyten- und Thrombozytenoberflächenantigenen nachgewiesen werden. Ein geringfügiger Verlust von Thrombozyten während der Aphereseprozesse scheint daher auch durch die Bildung von Monozyten-Thrombozytenaggregaten bedingt zu sein [56] [57] [58]. Eine maßgebliche Beeinflussung der Testergebnisse durch Thrombozytenverlust ist jedoch nicht anzunehmen.

Nähere Untersuchungen, die eine genaue Berechnung der gesamten Thrombozytenzahl im Konzentrat und im peripheren Blut der Spender vor und nach der Apherese ermöglichen, würden hier Aufschluss über den tatsächlichen Thrombozytenverlust durch mechanische Zerstörung oder Aggregatbildung der Thrombozyten geben.

## **5.3 Mittleres Thrombozytenvolumen (MPV)**

### **Thrombozytenspender**

Das mittlere Thrombozytenvolumen (MPV) war in allen Thrombozytenkonzentraten mit 8,22 fl signifikant kleiner als das mittlere Thrombozytenvolumen im peripheren Blut der Spender vor der Apherese (siehe Abb. 19). Nach der Apherese war das

gemessene MPV im peripheren Blut der Thrombozytenspender um durchschnittlich 3,2 % höher als vor der Apherese. Dies spricht dafür, dass das von uns verwendete Apheresesystem MCS+<sup>®</sup> bei der Thrombozytenspende selektiv kleinvolumige Thrombozyten apheresiert und die großvolumigen nach der Apherese zurück ins periphere Blut spült [1].

Die Auswirkung der selektierten Entnahme von kleinvolumigen Thrombozyten während des Aphereseprozesses auf den MPV-Wert im peripheren Blut ist gering, da nur ein kleiner Teil der Thrombozyten im peripheren Blut apheresiert wird (siehe Abb. 19 bis 22).

Da die Thrombozytenkonzentrate durchschnittlich kleinere Thrombozyten aufweisen als die im peripheren Blut vorhandenen Thrombozyten, stellt sich die Frage, ob kleinvolumige Thrombozyten gegenüber großvolumigen Thrombozyten Funktionseinschränkungen aufweisen. Dies konnte zum momentanen Standpunkt der Forschung noch nicht vollständig geklärt werden. Großvolumige Thrombozyten enthalten möglicherweise mehr Granula, kleinvolumige eine verhältnismäßige größere Oberfläche. Ob das mittlere Thrombozytenvolumen (MPV) etwas über die Qualität der Thrombozytenfunktion im peripheren Blut aussagt, ist noch unbekannt.

Ähnliche Studien, welche die Thrombozytenfunktion anhand des MPV beurteilen, beziehen sich meistens auf die Volumenveränderung der Thrombozyten während der Thrombozytenlagerung [59]. Singh et al. argumentieren, dass das Volumen von Thrombozyten, die im Zellkonzentrat in der Lage waren, den Milieuveränderungen durch Verformung standzuhalten, ein Indikator für eine gute Thrombozytenfunktion sei. Hier wurde die Veränderung der mittleren Thrombozytenvolumen als Qualitätskontrollparameter für die Thrombozytenkonzentratlagerung postuliert [60]. Inwiefern diese Überlegungen auch auf die MPV-Veränderungen im Rahmen des Aphereseverfahrens anwendbar sind, ist noch zu klären.

Bisher wurden Thrombozytenfunktionstests, wie die Hypotone-Schock-Reaktion (HSR) [61], die optische Aggregationsmessung LTA (light transmission aggregometry) nach Born [62] [63], die Impedanzaggregometrie mit dem Multiplate-System [64], die Durchflusszytometrie [65] sowie die Glukose- und Laktatmessung [66] [67] [68],

vorrangig dafür verwendet zu prüfen, wie sich die Lagerung und die Zugabe von verschiedenen Additivlösungen zu den Thrombozytenkonzentraten auf die Funktion auswirkt [69] [70] [71]. Hier wäre noch interessant zu messen, ob bereits nach der Thrombozytenspende Unterschiede in der Funktionalität der Thrombozyten bestehen. Falls dies der Fall ist, könnte untersucht werden, ob die Ergebnisse der Thrombozytenfunktionstests mit dem mittleren Volumen der Zellen korrelieren.

### **Stammzellspender**

Im Rahmen der Untersuchung der Stammzellspender konnten wir erkennen, dass vor allem großvolumige Thrombozyten apheresiert wurden. Das MPV im Stammzellkonzentrat der autologen Stammzellspender war im Mittel 5,45 % und das der allogenen Stammzellspender durchschnittlich 17,45 % höher als das mittlere Thrombozytenvolumen der Spender im peripheren Blut vor der Spende (siehe Abb. 27 und 33) [1].

Wir sahen ebenfalls einen signifikanten Abfall des Thrombozytenvolumens im peripheren Blut der Stammzellspender nach der Apherese. Auch hier ist zu beachten, dass nur ein kleiner Teil der Thrombozyten im peripheren Blut apheresiert wurde. Die Auswirkung der selektierten Entnahme von großvolumigen Thrombozyten während des Aphereseprozesses auf den MPV-Wert im peripheren Blut wäre ansonsten deutlich ausgeprägter [1].

Dies zeigt, dass das Spectra Optia<sup>®</sup> selektiv großvolumige Zellen apheresiert. Die kleinvolumigen Thrombozyten, die nicht im Stammzellkonzentrat aufgefangen werden, werden an den Spender zurückgegeben (siehe Abb. 29 und 36) [1].

### **Immature platelet fraction bei autologen Stammzellspendern**

Um zu zeigen, dass bei den autologen Stammzellspendern vornehmlich großvolumige Thrombozyten apheresiert werden, haben wir die immature platelet fraction (IPF), die den Anteil der unreifen retikulozytären Thrombozyten widerspiegelt, vor der Apherese und nach der Apherese im peripheren Blut sowie im Apheresat untersucht. Die IPF verdeutlicht die Aktivität des hämatopoetischen Knochenmarks und dient daher oft als Verlaufsparemeter bei der Therapie von Thrombozytopenien oder anderen

Erkrankungen, die mit einer Depression oder Insuffizienz des Knochenmarks einhergehen. Bei den von uns gemessenen Werten spiegelt die IPF somit die Aktivität des hämatopoetischen Knochenmarks wider. Wir konnten erkennen, dass autologe Stammzellspender mit niedrigen Thrombozytenzahlen im Schnitt höhere IPF-Werte hatten als die allogenen Stammzellspender mit höheren Thrombozytenzahlen.

Wie aus den Abbildungen 39 und 40 ersichtlich wird, sinkt der IPF-Wert im peripheren Blut der autologen Stammzellspender nach der Apherese von 4,4 % ( $\pm 2,29$ ) auf 2,68 % ( $\pm 1,30$ ) ab. Dies entspricht einem relativen Abfall auf 67 %. Das bedeutet, dass 33 % der unreifen Thrombozyten im Stammzellapheresat abgefangen wurden. Würde man davon ausgehen, dass das Apheresesystem Spectra Optia<sup>®</sup> die gesamte Bandbreite der Thrombozyten mit gleicher Affinität separiert, müsste der IPF-Wert vor und nach der Apherese identisch sein, da es sich bei der IPF lediglich um eine Untereinheit der Thrombozytenzahl handelt [1].

Da allerdings der Anteil unreifer Thrombozyten (IPF) im peripheren Blut nach der Apherese deutlich kleiner ist als vor der Apherese, ist dies ein Hinweis darauf, dass während der Apherese vermehrt großvolumige Thrombozyten apheresiert wurden, zu denen auch die unreifen Thrombozyten (IPF) zählen.

### **Vergleich der Apheresesysteme**

Die verwendeten Apheresesysteme Spectra Optia<sup>®</sup> und MCS+ Haemonetics<sup>®</sup> weisen unterschiedliche Affinitäten bezüglich der separierten Thrombozytenvolumina auf. Wir führten diese Beobachtung auf folgende Begebenheiten zurück.

### **Zentrifugation und Buffy Coat**

Im Rahmen der Thrombozyten- und Stammzellapherese wird durch Zentrifugation das Blut in seine einzelnen Bestandteile aufgetrennt. Die durch die Rotation entstehenden Fliehkräfte sorgen dafür, dass die einzelnen Bestandteile mit unterschiedlicher Sedimentationsgeschwindigkeit zum Boden des Behältnisses absinken. Die Sedimentationsgeschwindigkeit ist abhängig von der Dichte der Teilchen. Blutbestandteile mit einer hohen Dichte, zum Beispiel die Erythrozyten, sinken wesentlich schneller ab als Blutbestandteile mit niedrigerer Dichte. Das hat zur Folge, dass sich die Bestandteile des Blutes in unterschiedliche Schichten aufteilen [11,3].

Die unterste Schicht besteht aus den Erythrozyten. Sie haben eine Zelldichte von 1,1 g/ml. In der obersten Schicht sammelt sich das Plasma, also die flüssige Komponente des Blutes, die sich aus Wasser, Proteinen und Elektrolyten zusammensetzt, an. Das Plasma hat eine Zelldichte von 1,026 g/ml. Die Zwischenschicht bildet der sogenannte Buffy Coat. In dieser weißgelblichen Trennschicht befinden sich die zellulären Bestandteile des Blutes, die eine geringere Dichte haben als die Erythrozyten, also die Thrombozyten und Leukozyten (siehe Abb. 2) [1,2]. Bei der Thrombozyten- und Stammzellapherese geht es nun darum, die gewünschten Zellen aus dem Buffy Coat zu extrahieren [1].

### **Thrombozytenapherese**

Bei der Thrombozytenspende ist es das Ziel, ausschließlich Thrombozyten zu apheresieren, da Restleukozyten im Zellkonzentrat bei den Empfängern unerwünschte Nebenwirkungen, zum Beispiel Infektion mit zellständigen Viren wie dem CM-Virus, dem HI-Virus oder der varianten Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (vCJK), verursachen oder febrile nicht hämolytische Transfusionsreaktionen und andere allergische Reaktionen hervorrufen können [72,73,74,75]. In diesen Fällen kommt es zu einer Immunreaktion von Alloantikörpern gegen transfundierte Leukozyten und Thrombozyten [76,23]. Der Grenzwert von  $1 \times 10^6$  Restleukozyten pro Thrombozytenkonzentrat darf daher nicht überschritten werden [23,5,77].

Thrombozyten haben eine zelluläre Dichte von 1,058 g/ml [78]. Da Thrombozyten kleiner und leichter sind als Leukozyten, bilden diese den oberen Teil des Buffy Coats. Allerdings ist eine scharfe Unterteilung oft schwierig. Um diese Schwierigkeit zu überwinden, verwendet das Apheresesystem MCS+<sup>®</sup> die Glockenoptik und den Line-Sensor, mit denen es in der Lage ist, den Buffy Coat zu identifizieren und beim Absaugen die Thrombozyten zu detektieren. So wird gewährleistet, dass vor allem kleinvolumige Thrombozyten im Konzentrat enthalten sind, damit die Wahrscheinlichkeit, ungewollt Restleukozyten oder Resterythrozyten zu sammeln, reduziert wird [2].

Um zu verhindern, dass das Thrombozytenkonzentrat zu viele Restleukozyten oder Resterythrozyten enthält, stoppt das MCS+<sup>®</sup> automatisch den Separationszyklus, sobald

der Line-Sensor erkennt, dass sich im Auslassschlauch andere Zellen als die Thrombozyten befinden. Somit wird eine mögliche Verunreinigung des Konzentrats minimiert [38].

Die Glockenoptik und der Line-Sensor des MCS+<sup>®</sup> dienen also dazu, den Anteil an Restleukozyten auf ein Minimum zu reduzieren, indem vor allem kleinvolumige Thrombozyten selektiert werden. Leukozyten besitzen ein größeres Volumen. Es ist also zu erwarten, dass sich bei einem Thrombozytenkonzentrat mit vorrangig kleinvolumigen Thrombozyten weniger Leukozyten im Konzentrat befinden als bei einem Thrombozytenkonzentrat mit höheren Thrombozytenvolumina [1].

### **Stammzellapherese**

Im Gegensatz zur Thrombozytenspende werden bei der Stammzellapherese pluripotente Stammzellen aus dem peripheren Blut der Spender separiert. Diese haben eine höhere Dichte als Thrombozyten und sammeln sich daher im Buffy Coat in der unteren Schicht mit den mononukleären Zellen an [3]. Um möglichst viele Stammzellen apheresieren zu können, ist es bei der Stammzellapherese durchaus erwünscht, großvolumige Zellen zu sammeln. Das Apheresesystem Spectra Optia<sup>®</sup> nutzt das Automatische-Schnittstellen-Management-System<sup>™</sup> (ASM), um die gewünschte Zellschicht des Buffy Coats zu separieren. Es reguliert automatisch die Flussrate sowie die Geschwindigkeit der Zentrifuge, um möglichst viele Stammzellen aus dem Blut apherisieren, ohne zu viele Leukozyten und Thrombozyten im Konzentrat zu tolerieren. Des Weiteren ist es dem Bediener des Spectra Optia<sup>®</sup> im halbautomatischen Modus möglich, durch die direkte Kontrolle des Auslassschlauches und die Hämatokriteinschätzung anhand einer Farbskala den Aphereseerfolg zu beurteilen und die Sammelpräferenz gegebenenfalls anzupassen [4]. Die vermehrt großvolumigen Thrombozyten im Stammzellapheresat sprechen also dafür, dass das Spectra Optia<sup>®</sup> in der gewünschten Zelldichteschicht die Zellen apherisiert [1].

## **5.4 In vitro Verdünnungsreihen**

Bei den gewonnenen Stammzell- und Thrombozytenkonzentraten bestehen hohe Zellkonzentrationen, die eventuell die Messgenauigkeit der Analysegeräte beeinflussen können. Um die Auswirkungen von unterschiedlichen Zellkonzentrationen auf die Messgenauigkeit der Analysegeräte genauer zu untersuchen, wurden verschiedene Verdünnungsreihen mit EDTA-Blut angefertigt.

Wie in den Abbildungen 46 bis 49 zu erkennen ist, scheint die Zellkonzentration Einfluss auf das gemessene Thrombozytenvolumen zu nehmen. Hier ist zu erkennen, dass mit Zunahme der Verdünnung mit NaCl-Lösung das mittlere Plättchenvolumen (MPV) bei einem Verdünnungsverhältnis von 1:9 um 14,32 % signifikant abnimmt. Da es keinen Anhaltspunkt dafür gibt, dass es sich hier um eine tatsächliche Volumenabnahme der Thrombozyten handelt, muss von einer leichten Messungenauigkeit bei hohen Zellkonzentrationen ausgegangen werden [1].

### **Aufkonzentration**

Unphysiologisch hohe Thrombozytenvolumina scheinen das Messverhalten des Sysmex XE-2100<sup>®</sup> zu beeinflussen. In Abbildung 47 wurden die MPV-Werte des aufkonzentrierten Plasmas in die Grafik einbezogen. Zu sehen ist, dass bei einer 2- bis 3-mal so hohen Zellkonzentration wie im peripheren Blut der Spender das Thrombozytenvolumen ebenfalls signifikant abnimmt – allerdings in geringeren Maßen als bei abnehmender Zellkonzentration.

### **Messprinzip**

Die Messung des mittleren Thrombozytenvolumens beim Zellcounter Sysmex XE-2100<sup>®</sup> erfolgt über die Bestimmung des Plättchenkrits PCT%, also dem prozentualen Anteil der Plättchen an allen zellulären Bestandteilen des Blutes sowie der Plättchenzahl. Der Plättchenkrit (PCT) wird mittels Widerstandsmessung mit hydrodynamischer Fokussierung bestimmt. Die Plättchenanzahl ermittelt der Sysmex XE-2100<sup>®</sup> mittels Impulshöhensummierung. Beide Größen kombiniert ergeben das mittlere Volumen eines einzelnen Thrombozyten (MPV) [45].

Während der Widerstandsmessung kann es bei erhöhten Zellkonzentrationen zu

Überlagerungen der einzelnen Thrombozyten kommen, sodass der Zellcounter anstatt zwei mittelgroße Thrombozyten einen großvolumigen Thrombozyten erkennt. Auch bei der Impulshöhensummierung können Überlagerungen dazu führen, dass bei hohen Zellkonzentrationen nicht alle Thrombozyten gezählt werden. So kann eine zu niedrig gemessene Zellkonzentration der Grund dafür sein, dass die Thrombozyten zu groß eingeschätzt werden und erst bei ausreichender Verdünnung das MPV bestimmt werden kann. Einige Studien konnten bereits zeigen, dass verschiedene Messverfahren zu unterschiedlichen Messergebnissen bei der Bestimmung der Thrombozytenzahl führten und somit Messungenauigkeiten nicht auszuschließen sind [79] [80].

### **Erythrozytenvolumen**

Erythrozyten zu identifizieren, ist für viele Zellcounter einfacher, als Thrombozyten zu erkennen. Die Erythrozyten haben ein deutlich größeres Volumen als die Thrombozyten, daher sind Überlagerungen im Messkanal unwahrscheinlicher als bei Thrombozyten. Des Weiteren wird versucht, Erythrozytenüberlagerungen durch die hydrodynamische Fokussierung zu verhindern [45]. Wie auf Abbildung 46 zu erkennen, ist kaum eine Volumenveränderung der Erythrozyten bei zunehmender Verdünnung eingetreten.

In Abbildung 23, 24, 29, 31, 37, 38, 44 und 45 untersuchten wir, ob ein Zusammenhang zwischen den gemessenen Thrombozytenvolumina und den gemessenen Thrombozytenzahlen bei unseren Spendern bestand. In keinem der Fälle konnten wir eine signifikante Tendenz erkennen. Daher gehen wir davon aus, dass bei den von uns durchgeführten Messungen der Thrombozytenvolumina sowohl im peripheren Blut der Spender als auch in den Apheresaten kaum mit Messfehlern aufgrund von Überlagerungen, Verstopfungen im Messkanal oder Ähnlichem gerechnet werden muss.

## **5.5 Berechnung der Thrombozytenvolumina**

Zur Überprüfung der Messdaten in den Apheresaten haben wir auch eine theoretische Berechnung der zu erwartenden Messwerte anhand der Blutparameter vor und nach der Apherese im peripheren Blut vorgenommen.

Es zeigte sich, dass bei allen Spendern größere Thrombozytenvolumina in den Apheresaten errechnet wurden. Wir führten dies auf Thrombozytenverluste im Sinne einer Aggregatbildung bei der Apherese zurück, wie bereits angeführt. Ferner scheint die Apherese von Thrombozyten im peripheren Blut zum Teil für eine Mobilisierung von weiteren Thrombozyten in das periphere Blut zu sorgen, zum Beispiel aus Reservoirs wie der Milz. Auch das Milieu, in dem die separierten Thrombozyten im Apheresat eingebettet sind, in diesem Fall das Citrat ACD-A, scheint für die Abweichung mitverantwortlich zu sein [81].

## **5.6 Vergleich unterschiedlicher Antikoagulanzen**

Die Analyse von Blutproben im Citrat-ACD-A-, Heparin- und EDTA-Milieu zeigte, dass das Citrat-ACD-A-Milieu zu einer Abnahme des gemessenen MPV führte. Im Citrat-Milieu war ein im Schnitt 15 % kleineres mittleres Thrombozytenvolumen nachweisbar als im EDTA-Milieu (siehe Abb. 50 und 51) [1].

Daher ist davon auszugehen, dass die Citrat-Lösung ACD-A, die bei der Aufbewahrung von Blutprodukten verwendet wird, zu einem Schrumpfen der Thrombozyten im Apheresat führt. Diese Erkenntnis impliziert, dass der Anteil der separierten großvolumigen Thrombozyten im Apheresat der Stammzellspender, bei Antikoagulation mit der Citrat-Lösung ACD-A, noch stärker ausgeprägt ist als gemessen und dieser durch den schrumpfenden Einfluss von Citrat auf das Zellvolumen unterschätzt wird. Ähnliche Veränderungen des mittleren Thrombozytenvolumens (MPV) bei Antikoagulation mit Citrat-Lösungen wurden bereits von anderen Autoren beobachtet. Hier wurde das MPV im Citrat-Milieu durchschnittlich 10 % niedriger gemessen als im EDTA-Milieu [81] [82].

## 6. Schlussfolgerung

Je nachdem welche Blutbestandteile gesammelt werden sollen, können unterschiedliche Schichten des Buffy Coats von dem Apheresesystem separiert werden.

In dieser Arbeit sollte überprüft werden, ob der MPV-Wert der apheresierten Thrombozyten mit der separierten Zellschicht des Buffy Coats korreliert und wir somit das mittlere Thrombozytenvolumen (MPV) als Qualitätskontrollparameter für Aphereseprozesse heranziehen können [1].

Die von uns untersuchten zwei Spendergruppen, Thrombozytenspender und Stammzellspender (autolog und allogene), unterscheiden sich hinsichtlich der zu separierenden Schichthöhe im Buffy Coat. Während bei den Thrombozytenspendern zur Verhinderung von Komplikationen die Separation von Leukozyten möglichst vermieden wird, indem man vornehmlich niedrigvolumige Thrombozyten separiert, werden bei den Stammzellspendern billigerweise zusätzlich großvolumige Thrombozyten bei der Separation von Stammzellen mitapheresiert, um möglichst viele Stammzellen zu sammeln, da die Thrombozyten bei dem Empfänger keine schwerwiegenden Komplikationen erwarten lassen [1].

In unserer Arbeit konnten wir nachweisen, dass sich bei den Thrombozytenspendern eher kleinvolumige Thrombozyten und bei den Stammzellspendern vornehmlich großvolumige Thrombozyten im Apheresat befinden.

Bei der Thrombozytenspende wird eine Minimierung der Verunreinigung durch andere Zellen, wie Leukozyten oder Erythrozyten, angestrebt, um Immunreaktionen zu verhindern. Daher ist es wünschenswert, die obersten Schichten des Buffy Coats zu apheresieren, damit die Leukozyten aus den unteren Schichten das Konzentrat nicht kontaminieren.

Bei der Stammzellapherese hingegen werden die hämatopoetischen Stammzellen apheresiert, die durch Mobilisierung mit G-CSF in das periphere Blut der Spender gespült wurden. Da die hämatopoetischen Vorläuferzellen eine ähnliche Dichte wie

Leukozyten aufweisen, sammeln sie sich in den unteren Schichten. Versucht das Apheresesystem die unteren Schichten des Buffy Coats zu separieren, werden vermehrt auch großvolumige Thrombozyten apheresiert.

Anhan der Thrombozytenvolumina im Apheresat sowie im peripheren Blut der Spender vor und nach der Apherese erhält man somit einen Hinweis auf die Buffy-Coat-Schicht, die vom Apheresesystem vorwiegend separiert wurde.

Die verschiedenen Apheresesysteme nutzen unterschiedliche Mechanismen, um die Schichteinstellung zu optimieren. Das MCS<sup>+</sup><sup>®</sup> der Firma Haemonetics verwendet zwei separate Sensoren, die mit unterschiedlichen Techniken an unterschiedlichen Stationen des Aphereseprozesses eingreifen, um zu garantieren, dass die Thrombozyten aus der obersten Buffy-Coat-Schicht abgesaugt werden und kaum andere Zellen in das Thrombozytenkonzentrat gelangen. Das Spectra Optia<sup>®</sup> der Firma Terumo BCT verwendet bei der Apherese von Stammzellen das ASM-System, das die zu sammelnden Zellen im Sammelschlauch erkennt und nur dann das Ventil zum Apheresebeutel öffnet, wenn sich die gewünschte Zellfraktion im Sammelschlauch befindet. Additiv werden Farbskalen eingesetzt, mit denen der Anwender manuell den Hämatokrit des Apheresats und damit die Schichttiefe im Buffy Coat abschätzen und gegebenenfalls ändern kann [1].

Bisherige Qualitätskontrollparameter nehmen vor allem Bezug auf die Qualität des Apheresats. Sie dienen dazu, beurteilen zu können, ob ein Konzentrat die nötigen Zellen enthält, um den gewünschten Therapieerfolg zu gewährleisten, und ob es während des Verfahrens oder der Lagerung zu Verunreinigungen des Konzentrats gekommen ist [5]. Allerdings geben sie wenig Auskunft darüber, wie effektiv das Apheresesystem arbeitet [29] [31].

Zwar wird bestimmt, wie viele Leukozyten nach der Apherese noch im Konzentrat zu finden sind, allerdings ist es nicht möglich zu beurteilen, ob das System nur wenig Leukozyten separiert hat oder ob die Leukozyten durch anschließende Leukozytenfilterung entfernt wurden. Weiterhin wird die Qualität der Thrombozyten in einigen Studien im Verlauf der Konzentratlagerung untersucht, um zu evaluieren, wie lange ein Konzentrat unter verschiedenen Lagerungsbedingungen für den Empfänger

geeignet ist. Sie nehmen bisher jedoch kaum Bezug darauf, ob es bereits qualitative Unterschiede zwischen den Thrombozytenkonzentraten bei verschiedenen Aphereseverfahren gibt.

Hier könnte das Thrombozytenvolumen als möglicher neuer Qualitätsparameter, wie in unserer Arbeit aufgezeigt, Verwendung finden.

Anhand des Thrombozytenvolumens erhält der Untersucher einen direkten Eindruck davon, aus welcher Schicht die Zellen apheresiert wurden, und kann so die Effizienz des von ihm verwendeten Apheresesystems besser einschätzen, kontrollieren und gegebenenfalls korrigieren [1].

Eine gute Schichteinstellung würde so nicht nur zur Verbesserung der Qualität des Konzentrats führen, sie würde auch für eine höhere Effizienz des Aphereseverfahrens sorgen, da sie zu einer höheren Ausbeute der erwünschten Zellart führt, aufwendige Reinigungsverfahren einspart und den Patienten schont.

## 7. Anhang

### 7.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Hämatopoese [5].	1
Abbildung 3: MCS+ <sup>®</sup> Haemonetics Apheresesystem	16
Abbildung 4: UPP-Einmalset LN 997CF-E, [38].	17
Abbildung 5: Einwegblutverarbeitungsglocke von Latham [37].	18
Abbildung 6: Zentrifugenbehälter mit Glockenoptik [37].	19
Abbildung 7: MCS+ <sup>®</sup> Ansicht von oben [38].	20
Abbildung 8: Latham-Glocke in der Entnahmephase/Surge-Phase [37].	21
Abbildung 9: Apheresesystem Spectra Optia <sup>®</sup>	23
Abbildung 10: Auswechselbares Einwegschlauchsystem	24
Abbildung 11: Schematische Darstellung des Schlauchsystems beim kMNZ-Programm [40].	25
Abbildung 12: Schematische Darstellung der Regulationskammer [40].	26
Abbildung 13: Sysmex XE-2100 <sup>®</sup>	29
Abbildung 18: Mittlere Thrombozytenzahl bei allen Thrombozytenspendern	36
Abbildung 19: Mittleres Thrombozytenvolumen bei Thrombozytenspendern	37
Abbildung 20: Mittlere Thrombozytenvolumenveränderungen in Prozent bei Thrombozytenspendern	38
Abbildung 21: Mittlere Thrombozytenzahl bei allen Thrombozytenspendern	39
Abbildung 22: Verteilung der Thrombozytenvolumina bei Thrombozytenspendern	40
Abbildung 23: Mittlere Thrombozytenzahlen bei unterschiedlichen Thrombozytenvolumina im Apheresat von Thrombozytenspendern	41
Abbildung 24: Mittlere Thrombozytenzahlen bei unterschiedlichen Thrombozytenvolumina im Apheresat von Thrombozytenspendern	42
Abbildung 25: Mittlere Thrombozytenzahl bei allen allogenen Stammzellspendern	44
Abbildung 26: Mittleres Thrombozytenvolumen bei allogenen Stammzellspendern	45
Abbildung 27: Veränderung des mittleren Thrombozytenvolumens in Prozent	46
Abbildung 28: Mittleres Thrombozytenvolumen bei allen allogenen Stammzellspendern	47

Abbildung 29: Verteilung der Thrombozytenvolumina bei allogenen Stammzellspendern.....	48
Abbildung 30: Mittlere Thrombozytenvolumina bei unterschiedlichen Thrombozytenzahlen vor der Apherese im peripheren Blut der allogenen.....	49
Abbildung 31: Mittlere Thrombozytenvolumina bei unterschiedlichen Thrombozytenzahlen im Stammzellapheresat (Aph) bei allogenen Stammzellspendern .....	49
Abbildung 32: Mittlere Thrombozytenzahl bei allen autologen Stammzellspendern ....	51
Abbildung 33: Mittleres Thrombozytenvolumen bei autologen Stammzellspendern ....	53
Abbildung 34: Mittleres Thrombozytenvolumen bei autologen Stammzellspendern in Prozent .....	53
Abbildung 35: Mittleres Thrombozytenvolumen bei allen autologen Stammzellspendern .....	54
Abbildung 36: Verteilung der Thrombozytenvolumina bei autologen Stammzellspendern.....	55
Abbildung 37: Mittlere Thrombozytenvolumina bei unterschiedlichen Thrombozytenzahlen vor der Apherese im peripheren Blut der autologen Stammzellspender (vZS).....	56
Abbildung 38: Mittlere Thrombozytenvolumina bei unterschiedlichen Thrombozytenzahlen im Apheresat der autologen Stammzellspender (Aph).....	57
Abbildung 39: Immatur platelet fraction der autologen Stammzellspende .....	58
Abbildung 40: Prozentuale Veränderung der IPF bei autologen Stammzellspendern ...	59
Abbildung 41: Mittlere Thrombozytenzahlen der Thrombozytenspende, der allogenen und autologen Stammzellspende .....	60
Abbildung 42: Mittlere Thrombozytenzahlen der Thrombozytenspende, der allogenen und autologen Stammzellspender .....	60
Abbildung 43: Mittlere Thrombozytenvolumina der Thrombozytenspende, der allogenen und autologen Stammzellspender.....	61
Abbildung 44: Mittleres Thrombozytenvolumen bei unterschiedlichen Thrombozytenzahlen im peripheren Blut der Stammzellspender (autolog und allogene) und der Thrombozytenspende vor der Apherese.....	62
Abbildung 45: Mittleres Thrombozytenvolumen bei unterschiedlichen Thrombozytenzahlen im peripheren Blut der Stammzellspender (autolog und allogene) und der Thrombozytenspende im Apheresat.....	63

Abbildung 46: Verdünnungsreihe der EDTA-Blutproben mit Natriumchlorid.....	65
Abbildung 47: Verdünnungsreihe der EDTA-Blutproben mit Natriumchlorid.....	66
Abbildung 48: Verdünnungsreihe der EDTA-Blutproben mit platelet poor plasma,.....	67
Abbildung 49: Verdünnungsreihe der EDTA-Blutproben mit Natriumchlorid.....	68
Abbildung 50: Mittleres Thrombozytenvolumen in unterschiedlichen Milieus, Citrat (ACD-A), Heparin, EDTA.....	69
Abbildung 51: Prozentuale Veränderung des mittleren Thrombozytenvolumens in unterschiedlichen Milieus in Prozent.....	70
Abbildung 52: Prozentuale Veränderung des mittleren Erythrozytenvolumens in unterschiedlichen Milieus in Prozent.....	70

## 7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Allogene Thrombozytenspender .....	13
Tabelle 2: Autologe Stammzellspender .....	14
Tabelle 3: Allogene Stammzellspender .....	14
Tabelle 4: Probanden der Verdünnungsreihe .....	15
Tabelle 5: Thrombozytenspender .....	35
Tabelle 6: Thrombozytenspender, .....	37
Tabelle 7: Allogene Stammzellspender, apheresiert mit dem Apheresesystem Spectra Optia® .....	43
Tabelle 8: Allogene Stammzellspender, apheresiert mit dem Apheresesystem Spectra Optia® .....	44
Tabelle 9: Autologe Stammzellspender, apheresiert mit dem Apheresesystem Spectra Optia® .....	50
Tabelle 10: Autologe Stammzellspender, apheresiert mit dem Apheresesystem Spectra Optia® .....	52
Tabelle 11: Autologe Stammzellspender, apheresiert mit dem Apheresesystem Spectra Optia® .....	58

## 7.3 Abkürzungsverzeichnis

<b>ACD-A</b>	Acid-Citrate-Dextrose-Formula A
<b>Aph</b>	im Apheresat
<b>C-Mpl</b>	cloned myeloproliferative leukemia protein, Thrombopoietin Rezeptor
<b>C-SDP</b>	concentrate single donor platelet
<b>CCM</b>	collect concentration Monitor
<b>CD</b>	Cluster of Differentiation
<b>CE</b>	Separationseffektivität (engl. Collection Efficiency)
<b>CM-Virus</b>	Cytomegalievirus
<b>CPD</b>	Lösung aus Citrat, Phosphat und Dextrose zur Konservierung von Frischblut
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraessigsäure
<b>ERK</b>	extracellular-signal regulated kinases
<b>G-CSF</b>	Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor
<b>G-CSF</b>	hämatopoetische Wachstumsfaktoren (engl. Granulocyte-Colony Stimulating
<b>GFP</b>	gefrorenes Frischplasma
<b>HGB</b>	Hämoglobin, gibt den Hämoglobingehalt je Volumeneinheit Blut an (Norm: Männer 13–18 g/dl, Frauen 11–16 g/dl)
<b>HVZ</b>	hämatopoetische Vorläuferzellen
<b>IPF</b>	immature platelet fraction
<b>JAK2</b>	Janus Kinase 2
<b>KM Tx</b>	Knochenmarktransplantation
<b>KOD</b>	kolloidosmotischer Druck
<b>LED</b>	light-emitting diode
<b>LTA</b>	light transmission aggregometry
<b>MAP</b>	mitogen-activated protein-kinase
<b>MCH</b>	mean corpuscular hemoglobin, gibt den Hämoglobingehalt eines einzelnen Erythrozyten an (Norm: 28 bis 33 pg)
<b>MCHC</b>	mean corpuscular hemoglobin concentration, gibt die Hämoglobinkonzentration im Erythrozyten an (Norm: 30 bis 36 g/dl)
<b>MCS<sup>®</sup>+</b>	multicomponent collection system der Firma Haemonetics

<b>MCV</b>	Mean Corpuscular Volume, gibt das Volumen eines einzelnen Erythrozyten an (Norm: 83 bis 97 fl)
<b>MPV</b>	mean platelet volume
<b>nZS</b>	nach der Zellseparation (Apherese)
<b>PBSC</b>	periphere Blutstammzellapherese
<b>PBSC</b>	periphere Blutstammzellen (engl. Peripheral Blood Stem Cell)
<b>PCT</b>	Plättchenkrit
<b>PLT</b>	Platelet count
<b>PPP</b>	platelet poor Plasma
<b>PRP</b>	platelet rich plasma
<b>µg /kg KG</b>	Mikrogramm pro Kilogramm Körpergewicht
<b>RBC</b>	red blood cell count
<b>RBC</b>	red blood cells, gibt die Erythrozytenanzahl an (Norm: Männer 4,8–5,9 Mio./µl, Frauen 4,3–5,2 Mio./µl).
<b>RET</b>	Retikulozyten
<b>SLS</b>	Sodium-Lauryl-Sulfat
<b>STAT</b>	Signal Transducers and Activators of Transcription
<b>SZK</b>	Stammzellkonzentrat
<b>TPO</b>	Thrombopoetin
<b>UPP</b>	universelles Thrombozytenprotokoll
<b>vCJK</b>	variante Creutzfeldt-Jakob-Krankheit
<b>VU</b>	Voruntersuchung (ca. 4–5 Wochen vor der Apherese)
<b>vZS</b>	vor der Zellseparation (Apherese), nach der Mobilisierung mit G-CSF

## 7.4 Literaturverzeichnis

- [1] Bramhoff A, Giers G, Blessing F, and Wenzel F, "Using the mean platelet volume MPV for the quality assessment of apheresis procedures," *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, vol. 64, no. 3, pp. 413-424, 2016.
- [2] Haemonetics Corporation, "Haemonetics MCS+ Das einzig wirkliche Multikomponentensystem," MCS+ - Broschüre, Deutschland, März 2008.
- [3] Jürgen Hallbach, *Klinische Chemie und Hämatologie*, 3rd ed.: Georg Thieme Verlag Stuttgart, 2011.
- [4] TerumoBCT, *Spectra Optia- Apheresesystem; Bedienungsanleitung*, Inc. TerumoBCT, Ed. Colorado, USA, 2015.
- [5] Bundesärztekammer, Leitlinien zur Therapie mit Blutkomponenten und Plasmaderivaten.
- [6] Hans-Christian Pape, Armin Kurtz, and Stefan Silbernagl, *Physiologie*, 7th ed. Deutschland: Georg Thieme Verlag Stuttgart, 2014.
- [7] Aumüller, Gerhard and Engele, Jürgen, *Duale Reihe Anatomie*, 3rd ed.: Thieme Verlag, 2014.
- [8] Wonder EW and Henon PR, "Peripheral blood stem cell autografts," 1993.
- [9] Hanns-Wolf Baenkler, Keikawus Arasteh, Christiane Bieber, Roland Brandt, and Tushar Chatterjee, *Duale Reihe Innere Medizin*.: Thieme, 2012.
- [10] Deetjen P., Speckmann E., and Hescheler J., *Physiologie*. München: Urban & Fischer Verlag, 2005.
- [11] Eckstein R, *Immunhämatologie und klinische Transfusionsmedizin*, 6th ed. München: Urban & Fischer Verlag, 2010.
- [12] JG Drachman, KM Millett, and K Kaushansky, "Thrombopoietin signal transduction requires functional JAK2, not TYK2.," *J Biol Chem*, no. 274(19), pp. 13480-13484, 1999.
- [13] Behrends J.C. et al., *Physiologie*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- [14] JK Akkerman, "Thrombopoetin and platelet function," *Seminars in thrombosis and hemostasis*, no. 32(3), 2006.
- [15] Michl M, *Hämatologie*, 2nd ed. München: Urban & Fischer.
- [16] Schulze H., Habilitationsschrift: Neue Erkenntnisse zur Zellbiologie der Thrombozytogenese und Pathophysiologie congenitaler Thrombozytopenien, Januar 2008.
- [17] SO Ciurea and R Hoffman, "Cytokines for the treatment of Thrombocytopenia," *Seminars in hematology*, no. 44(3), pp. 166-182, 2007.
- [18] Y. Chang, D. Bluteau, N. Debili, and W. Vainchenker, "From hematopoietic stem cell to platelets," *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, no. 5, pp. 318-327, 2007.

- [19] Possinger K and Regierer AC, *Facharztwissen Hämatologie Onkologie*, 3rd ed., Elsevier GmbH, Ed.: Urban & Fischer Verlag, 2015.
- [20] MM, "The effect of leukocytic cream injections in the treatment of the neutropenias," *Am J Med Sci*, no. 187, pp. 527-544.
- [21] Benedum J., "Geschichte der Transfusionsmedizin," in *Transfusionsmedizin*, 3rd ed. Berlin Heidelberg New York: Springer-Verlag, pp. 3-18.
- [22] Paul L. F. Giangrande, "The history of blood transfusion," *British journal of Haematologie*, no. 110 (4), pp. 758-767, 2000.
- [23] V. Kiefel and C. Mueller-Eckhardt, *Transfusionsmedizin und Immunhämatologie: Grundlagen, Therapie, Methoden*, 4th ed., V. Kiefe, Ed.: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2010.
- [24] U. Sachs and J. Bux, "Gewinnung, Herstellung und Lagerung von Blut und Blutkomponenten," in *Transfusionsmedizin*, Kiefel V (Hrsg.). Transfusionsmedizin In: Mueller-Eckhardt C, Ed. Berlin Heidelberg New York: Springer Verlag, 2003, pp. 247-272.
- [25] Love Em et al., "Serious Hazards of Transfusion," *Annual Report 1999-2000*, 2001.
- [26] Schrezenmeier H. and Seifried E., "Buffy-coat-derived pooled platelet concentrates and apheresis platelet concentrates: which product type should be preferred?," *Vox Sang*, no. 99, pp. 1-15, 2010.
- [27] Bundesärztekammer, Empfehlung ihres wissenschaftlichen Beirats, 2008.
- [28] Tullis JL, Surgernor DM, and Baudanza P, "Preserved platelets:their preparation, Storage and clinical use," *Blood*, vol. 14, pp. 456-475, 1959.
- [29] Bundesärztekammer, Leitlinien zur Therapie mit Blutkomponenten und Plasmaderivaten.
- [30] Peter Schramm, Periphere autologe Blutstammzelltransplantation nach Hochdosis-Chemotherapie am Klinikum Großhadern: Validierung der Transplantate und prädiktive Faktoren, 2009.
- [31] Bundesärztekammer, Paul-Ehrlich-Institut, "Richtlinien zur Transplantation peripherer Blutstammzellen," *Deutsches Ärzteblatt*, vol. 23, Juni 1997.
- [32] Reiffers J, Goldman JM, and Armitage JO, "Blood stem cell transplantation," *London : Martin Dunitz Ltd* , 1998.
- [33] Nash RA et al., "Haematopoietic stem cell transplantation," *Wintrobe's Clinical Haematology*, no. 10, 1991.
- [34] Passo-Coelho JL et al., "Predictive factors for peripheral-blood progenitor-cell collections using a single large-volume leukapheresis after cyclophosphamide and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor mobilization.," *J Clin Oncol.*, no. 13(3), pp. 705-714, 1995.
- [35] Kiefer V. Mueller-Eckhardt C, "Transfusionsmedizin," 2003.

- [36] Burk S.M., Optimierung des Buffy Coat Volumens bei Leukozytapheresen.
- [38] Haemonetics international, "Systembeschreibung," in *Haemonetics MCS+ LN 9000-220-E Bedienungsanleitung*, 1996.
- [39] Haemonetics corporation, "Haemonetics MCS+ Universelles Thrombozytenprotokoll," in *Bedienungshandbuch*, 2011.
- [40] Volker Kretschmer, Hans Gombotz, and Gerhard Rump, "Transfusionsmedizin- Klinische Hämotherapie: Kurzlehrbuch für Klinik und Praxis," pp. 140-145, 2008.
- [41] TerumoBCT, "Mononuclear cell collection.US; Advancing therapeutic apheresis and cell collections to the next level of patient care," 2012.
- [42] Terumo BCT, "Dual-Stage Platelet / AutoPBSC Channel," in *The COBE Spectra Apheresis System Operator's Manual*, 2005.
- [43] Sysmex Deutschland GmbH, "Fluoreszenz-Durchflusszytometrie in der Hämatologie XE 2100D," *Sysmex Xtra*, no. 2, 2008.
- [44] Sysmex Deutschland GmbH, *Muster-Standardarbeitsanweisung für den Sysmex Hämatologieanalysator XE-2100*, 2nd ed.
- [45] SYSMEX Deutschland GmbH, "Muster-Standardarbeitsanweisung SYSMEX Hämatologie System XE-2100," 2004.
- [46] Sysmex Deutschland GmbH, "Die klinische Bedeutung der Bestimmung unreifer Thrombozyten," *Sysmex Xtra*, no. 1, 2007.
- [47] C Briggs, S Kunka, D Hart, S Oguni, and S Machin, "Assessment of an immature platelet fraction ( IPF) in peripheral thrombocytopenia," *Brit J Hämatol*, vol. 126, pp. 93-99, 2004.
- [48] T Kickler, S Oguni , and M Borowitz, "A clinical evaluation of high fluorescent platelet fraction percentage in thrombocytopenia," *Am J Clin Patho*, vol. 125, no. 282, 2006.
- [49] C Briggs, D Hard , Kunka S, S Oguni, and S Machin, "Immature platelet fraction measurement: a future guide to platelet transfusion requirement after haematopoietic stem cell transplantation," *Transfusion Medicine*, vol. 16, p. 101, 2006.
- [50] Moog R, Heuft HG, and Zingsem J, "Donor safety and tolerance in triple platelet dose collections: results for 2169 aphereses of a hemapheresis multicenter trial," *J Clin Apheresis*, no. 23, pp. 11-12, 2008.
- [51] Das SS, Chaudhary R, Verma SK, Ojha S, and Khetan D, "Pre- and post-donation haematological values in healthy donors undergoing plateletpheresis with five different systems," *Blood Transfusion*, vol. 7, no. 3, pp. 188-92, Juli 2009.
- [52] Cherqaoui B et al., "Peripheral blood stem cell collection in low-weight children: retrospective comparison of two apheresis devices.," *Transfusion*, vol. 54, no. 5, pp. 1371-8, Mai 2014.

- [53] Anderlini P, Przepiorka D, Champlin R, and Körbling M, "Biologic and clinical effects of granulocyte colony-stimulating factor in normal individuals," *Blood*, no. 88, pp. 2819-2825, 1996.
- [54] Anderlini A et al., "Allogeneic Blood Stem Cell Transplantation: Considerations for Donors," *Blood*, vol. 3, no. 90, Mai 1997.
- [55] Link K et al., "Transplantation of hematopoietic stem cells. II: Indications for transplantation of hematopoietic stem cells after myeloablative therapy," *Klin Med (Munich)*, no. 92, pp. 534-45, 1997.
- [56] Barnard MR et al., "Effects of platelet binding on whole blood flow cytometry assays of monocyte and neutrophil procoagulant activity," *J Thromb Haemost*, no. 3, pp. 2563-2570, 2005.
- [57] Spangenberg P, "Adhesion of activated platelets to polymorphonuclear leukocytes," *Thromb Res* 74, pp. 35-44, 1994.
- [58] Bochar BA and Racy PB, "Platelets, leukocytes and coagulation," *Curr Opin Haematol*, no. 8, pp. 263-269, 2001.
- [59] Gulliksson H, "Defining the optimal storage conditions for long-term storage of platelets," *Transfus Med Rev*, 2003.
- [60] Singh H., Chaudhary R., and Ray V., "Evaluation of platelet storage lesions in platelet concentrates stored for seven days," *indian J Med Res*, no. 118, pp. 243-246, Dezember 2003.
- [61] Holme S and Murphy S, "Quantitative measurements of platelet shape by light transmission studies; application to storage of platelets for transfusion," *J Lab Clin Med*, no. 92, pp. 53-64, 1987.
- [62] Harrison P, "Measuring platelet fuction," *The hematology Journal*, no. 5, pp. 164-169, 2004.
- [63] Kratzer MA et. al., "Simulation of primary haemostasis in vitro," *Haemostasis*, no. 15(6), pp. 357-62, 1985.
- [64] Tóth O. et. al, "Multiple electrode aggregometry : A new device to measure platelet aggregation in whole blood," *Thromb Haemost*, no. 96, pp. 781-8, 2006.
- [65] Jaroszeski MJ et. al., "Fundamentals of flow cytometry ," *Mol Biotechnol*, no. 11(1), pp. 37-53, feb. 1999.
- [66] Ringwald J et al., "Impact of different hold time before addition of platelet additive solution on the in vitro quality of apheresis platelets," *Transfusion*, no. 46, pp. 942-948, 2006.
- [67] Holme S, "Storage and quality assessment of platelets," *Vox Sang*, pp. 207-216, 1998.
- [68] Kilkson H, Holme S, and Murphy S, "Platelet metabolism during storag of platelet concentrates at 22°C," *Blood*, no. 64, pp. 406-414, 1984.
- [69] Gulliksson H et al., "Storage of platelets in additive solutions: a pilot in vitro

- study of the effects of potassium and magnesium," *VOX Sang*, no. 82, pp. 131-136, 2002.
- [70] Diedrich B et al., "In vitro and in vivo effects of potassium and magnesium in storage up to 7 day of apheresis platelet concentrates in platelet additive solution," *Vox Sang*, no. 94, pp. 96-102, 2008.
- [71] Hornes VS et al., "Extended storage of platelets in SSP platelet additive solution," *Vox Sang*, no. 91, pp. 41-46, 2006.
- [72] M. Beekes and Robert Koch-Institut, "Die variante Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (VCJK)," *Bundesgesundheitsbl 2010*.
- [73] Holness I, Knippen MA, Simmons , and Lachenbruch PA, "Fatalities caused by TRALI," *Transfusion Medicine Reviews*, no. 18(3), pp. 184-8, 2004.
- [74] Karger R, Kretschmer V, and Wulf H., "Risiken der Transfusion vom Blutkomponenten: Aktuelle Anhaltzahlen für eine "quantitative" Risikoaufklärung," *Anästhesiologie & Intensivmedizin*, no. 45(7), pp. 430-434, 2004.
- [75] Centers for disease control, Possible transfusions-associated acquired immune deficiency syndrome ( AIDS), 1982.
- [76] M.B. Funk; S. Günay; A. Lohmann; O.Henseler; B. Keller-Stanislawski; "Bewertung der Maßnahmen zur Reduktion schwerwiegender Transfusionsreaktion ( Hämvigilanzdaten von 1997 bis 2008," *Bundesgesundheitsbl 20012*, no. 53, pp. 347-356, März 2010.
- [77] Bernek S and Biscopong J, "Risiken und Alternativen der Transfusion," *Anästhesiologie & Intensivmedizin*, no. 47(3), pp. 143-155, 2006.
- [78] Luttmann et al., "Zellseparation," *Der Experimentator:Immunologie*, pp. 52-70, 2014.
- [79] Hervig T et al., "The platelet count accuracy of platelet concentrates obtained by using automated analysis is influenced by instrument bias and activated platelet components," *Vox Sang*, no. 87, pp. 196-203, 2004.
- [80] Moroff G et al., "The influence of various hematology analyzers on component platelet counts," *Transfus Med Rev*, no. 19, pp. 155-166, 2005.
- [81] PM Bath, "The routine measurement of platelet size using sodium citrat alone as the anticoagulant," *Thromb Haemost*, vol. 4, no. 70, pp. 687 - 90, Oct. 1993.
- [82] Dastjerdi MS, Emami T, Najafian A, and Amini M, "Mean platelet volume measurement, EDTA or citrate?," *Hematology* , vol. 5, no. 11, pp. 317-9, OCT 2006.

## **Danksagung**

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Folker Wenzel für die freundliche Überlassung des Themas der Doktorarbeit, sowie für seine beispiellose Unterstützung und seine uneingeschränkte Mithilfe bei der Ausarbeitung der Disseration, sowie des von uns veröffentlichten Papers, diverser Kongressvorträge und Posterpräsentationen.

Ich danke meiner Familie und meinen Freunden für die liebevolle, ununterbrochene und vielseitige Unterstützung, ohne die diese Arbeit so nicht möglich gewesen wäre.