

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik III der
Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. W. Hiddemann

**Mikropartikel in Thrombozytenkonzentraten und
deren Veränderungen bei Lagerung sowie deren
Anstieg und Eliminationsverhalten nach Transfusion
in vivo**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Michael Iberer

aus Tegernsee

2013

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. E. Hiller

Mitberichterstatter:
Prof. Dr. med. R. Henschler
Prof. Dr. med. M. Spannagl

Betreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. A. Rank

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 28.02.2013

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Zielsetzung	7
3. Material und Methoden	9
3.1. Studiendesign	9
3.1.1. Patientenkollektiv	9
3.1.2. Kontroll-Gruppe	9
3.1.3. Herstellung der Thrombozytenkonzentrate	10
3.1.4. Probengewinnung	10
3.1.5. Laborwerte	11
3.1.6. Berechnung der Messwerte	11
3.1.7. Statistik	12
3.2. Durchflusszytometrie	12
3.2.1. Prinzip der Durchflusszytometrie	12
3.2.1.1. Messung der Lichtstreuung	13
3.2.1.2. Messung der Fluoreszenz	13
3.2.2. Antikörper zur Bestimmung von Mikropartikeln	14
3.2.2.1. Unspezifischer Antikörper Annexin V-FITC	14
3.2.2.2. Isotopen-Kontrolle mittels IgG1-PE	14
3.2.2.3. Antikörper gegen Integrin β3, CD 61-PE	14
3.2.2.4. Antikörper gegen E-Selectin, CD 62 E-PE	15
3.2.2.5. Antikörper gegen P-Selectin, CD 62 P-PE	15
3.2.2.6. Antikörper gegen LAMP 3, CD 63-PE	15
3.2.3. Mischungs- und Verdünnungsverhältnis der verwendeten Antikörper	16
3.2.4. Verdünnungs-, Stamm- und Puffer-Lösungen	16
3.2.4.1. Phosphat gepufferte Kochsalzlösung (PBS)	17
3.2.4.2. Calciumstammlösung	17
3.2.4.3. Citratstammlösung	17
3.2.4.4. Calciumpuffer	17
3.2.4.5. Citratpuffer	17
3.2.5. Probenansätze	18

3.2.6. Mikropartikel-Messung mittels Flow Cytometer	19
3.2.7. Geräte und Software	20
3.2.8. Verarbeitungszubehör	21
3.2.9. Chemikalien	21
4. Ergebnisse	22
4.1. Charakteristika der Studienteilnehmer	22
4.2. Beschreibung der Thrombozytenkonzentrate	23
4.3. Kontrollgruppe	24
4.4. Thrombozytenzahlen von Patienten, Kontrollgruppe und Konserven	24
4.5. Berechnung der Halbwertszeit der transfundierten Thrombozyten	25
4.6. Anreicherung von Mikropartikeln in Thrombozytenkonzentraten	26
4.6.1. Anreicherung der Gesamtzahl an Mikropartikeln	26
4.6.2. Anreicherung der CD 61 positiven Mikropartikeln	27
4.6.3. Anreicherung der CD 63 positiven Mikropartikeln	28
4.6.4. Anreicherung der CD 62-P positiven Mikropartikeln	29
4.6.5. Anreicherung der CD 62-E positiven Mikropartikeln	30
4.7. Veränderungen in Thrombozytenkonzentraten während der Dauer der Lagerung	31
4.7.1. Veränderung der Plättchenzahlen	31
4.7.2. Veränderung der Gesamtzahl an Mikropartikeln	32
4.7.3. Veränderung der CD 61 positiven Mikropartikeln	33
4.7.4. Veränderung der CD 63 positiven Mikropartikeln	34
4.7.5. Veränderung der CD 62-P positiven Mikropartikeln	35
4.7.6. Veränderung der CD 62-E positiven Mikropartikeln	36
4.8. Veränderungen der Thrombozytenzahl nach Transfusion in vivo	37
4.9. Veränderungen der Mikropartikelzahl nach Transfusion in vivo	38
4.9.1. Veränderung der Gesamtanzahl an Mikropartikeln	38
4.9.2. Veränderung der CD 61 positiven Mikropartikeln	39
4.9.3. Veränderung der CD 63 positiven Mikropartikeln	40
4.9.4. Veränderung der CD 62-P positiven Mikropartikeln	41
4.9.5. Veränderung der CD 62-E positiven Mikropartikeln	42
4.10. Berechnung der Halbwertszeit von Mikropartikeln nach Transfusion in vivo	43

5. Diskussion	44
5.1. Aufbau und Funktion von Thrombozyten	44
5.2. Herstellung von Thrombozytenkonzentraten	46
5.2.1. Herstellung aus Vollblutspenden	47
5.2.2. Herstellung mittels Apherese	47
5.2.2.1. Apherese mittels diskontinuierlichem Herstellungs-Prozess	48
5.2.2.2. Apherese mittels kontinuierlichem Herstellungs-Prozess	48
5.3. Veränderung der Thrombozytenzahl nach Transfusion	49
5.4. Mikropartikel in Thrombozytenkonzentraten	50
5.4.1. Gesamtzahl an Mikropartikeln	50
5.4.2. CD 61 positive Mikropartikel	51
5.4.3. CD 63 / CD 62-P positive Mikropartikel	52
5.4.4. CD 62-E positive Mikropartikel	53
5.5. Veränderung der Mikropartikelzahlen während fünftägiger Lagerung der Thrombozytenkonzentrate	55
5.5.1. Veränderungen der Gesamtzahl an Mikropartikeln	55
5.5.2. Veränderungen der CD 61 positiven Mikropartikel	55
5.5.3. Veränderungen der CD 63 / CD 62-P positiven Mikropartikel	56
5.5.4. Veränderungen der CD 62-E positiven Mikropartikel	56
5.6. Mikropartikel im Serum der Patienten vor Transfusion	57
5.7. Veränderung der Mikropartikelanzahl nach Transfusion in vivo	58
5.7.1. Veränderungen der Gesamtzahl an Mikropartikeln	58
5.7.2. Veränderungen der CD 61 positiven Mikropartikel	59
5.7.3. Veränderungen der CD 63 / CD 62-P positiven Mikropartikel	60
5.7.4. Veränderungen der CD 62-E positiven Mikropartikel	60
5.8. Elimination von Mikropartikeln	61
5.9. Ausblick	62
6. Zusammenfassung	63
7. Literaturverzeichnis	66
8. Danksagung	74
9. Lebenslauf	75

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Elektronenmikroskopisches Bild von ruhendem und aktiviertem Thrombozyten sowie freigesetztem Mikropartikel	2
Abb. 2:	Mikropartikel Entstehung und Funktion	4
Abb. 3:	Identifikation von Mikropartikel in der Durchflußzytometrie	20
Abb. 4:	Thrombozytenzahlen im Verlauf nach Transfusion	25
Abb. 5:	CD 61 positive Mikropartikel in Thrombozytenkonzentraten	27
Abb. 6:	CD 62-E positive Mikropartikel in Thrombozytenkonzentraten	30
Abb. 7:	Veränderung der Thrombozytenzahlen der Konzentrate im Laufe der Lagerung	31
Abb. 8:	Veränderung der Gesamtzahl an Mikropartikeln der TK im Laufe der Lagerung	32
Abb. 9:	Veränderung der CD 61 positiven Mikropartikel der TK im Laufe der Lagerung	33
Abb. 10:	Veränderung der CD 63 positiven Mikropartikel der Konzentrate im Laufe der Lagerung	34
Abb. 11:	Veränderung der CD 62-P positiven Mikropartikel der Konzentrate im Laufe der Lagerung	35
Abb. 12:	Veränderung der CD 62-E positiven Mikropartikel der Konzentrate im Laufe der Lagerung	36
Abb. 13:	Veränderung der CD 61 positiven Mikropartikel nach Transfusion	43
Abb. 14:	Elektronenmikroskopisches Bild von Erythrozyt, Thrombozyt und Leukozyt	44

Abkürzungsverzeichnis

ACDA	Acid-Citrat-Dextrose-Adenin-Lösung
ADP	Adenosin-5-diphosphat
Ak	Antikörper
Aqua dest	Destilliertes Wasser
AU	Arbitrary Unit (willkürliche Einheit)
BC	Buffy-Coat
BD	Becton Dickinson
Ca	Kalzium
CaCl ₂	Kalziumchlorid
ELAM	Endothelial-Leucocyte-Adhesion-Molecule
EMP	Endothelialer Mikropartikel
FACS	Fluorescence-Activated-Cell-Sorting (Durchflusszytometrieprinzip)
FITC	Fluoreszein-Isothiozyanat
Fl	Fluoreszenz
FSC	forward-scatter (Vorwärtsstreuung im Durchflußzytometer)
G	Giga
GvH	Graft-Versus-Host-Reaktion
Gy	Gray
HCl	Salzsäure
HLA	Human-Leucocyte-Antigen
HIT	Heparin-Induzierte-Thrombozytopenie
gp	Glykoprotein
IgG	Gammaglobulin
LAMP	Lysosomal-Membrane-Associated-Protein
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇	Tri-Natriumcitrat
Na ₂ HPO ₄	Di-Natrium-Hydrogenphosphat
NaOH	Natronlauge
nm	Nanometer

mmol	Millimol
MP	Mikropartikel
p	Signifikanzniveau
PBS	Phosphate-Buffered-Saline
PE	Phycoerythrin
pH	Potentia Hydrogenii
PMP	Thrombozytärer Mikropartikel
PRP	Plättchenreiches Plasma
r	Korrelationskoeffizient
R	Region
RPM	Umdrehungen pro Minute
σ	Standardabweichung
SSC	Side-scatter (Seitwärtsstreuung im Durchflußzytometer)
TK	Thrombozytenkonzentrat
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
μm	Mikrometer
μl	Mikroliter
V	Volumen

1. Einleitung

Seit vielen Jahren sind Transfusionen von Thrombozytenkonzentraten ein wichtiger Bestandteil der Therapie bei Patienten mit aplastischer Anämie, myelodysplastischen Syndromen, akuter Leukämie, chronischen Thrombozytopenien sowie bei Patienten nach Chemotherapie und nach autologer oder allogener Stammzelltransplantation [1].

Diese Therapie ist nicht nur kostenintensiv, sondern auch mit einer Reihe von Nebenwirkungen verbunden, wie febrile oder allergische Transfusionsreaktionen, die mögliche Übertragung von Infektionen, „transfusion-related acute lung injury“ oder eine Immunisierung des Empfängers [2]. Ein weiteres Problem stellt das erhöhte Risiko venöser und arterieller Thrombosen nach Transfusion von Thrombozytenkonzentraten dar [3].

Neben Thrombozyten enthalten Thrombozytenkonzentrate auch thrombozytäre Mikropartikel [4]. Mikropartikel wurden erstmalig von Wolf 1967 als „dust“ in menschlichem Plasma beschrieben. Dieser „Staub“ besteht aus Zellmembranfragmenten die eine Größe zwischen 0,1 und 1,0 µm im Durchmesser haben. Ein Zusammenhang zwischen Mikropartikeln und Blutgerinnung wurde vermutet [5]. Den Hauptanteil von Mikropartikeln im menschlichen Blut bilden thrombozytäre Mikropartikel [6]. Mikropartikel von anderen Zelltypen erscheinen in einem wesentlich geringeren Umfang und werden von Leukozyten, Erythrozyten und Endothelzellen abgeschnürt [7].

Abbildung 1 zeigt die im Jahr 2000 von Hughes et al. veröffentlichte elektronenmikroskopischen Aufnahmen von der Entstehung von Mikropartikeln aus aktivierten Thrombozyten. Hierfür wurden Thrombozyten mittels HIT-Serum aktiviert, was zu einer Veränderung der Form, dem Ausbilden von Pseudopodien und der Abschnürung von Mikropartikeln, mit Pfeilen markiert, aus dem distalen Ende der Pseudopodien führt.

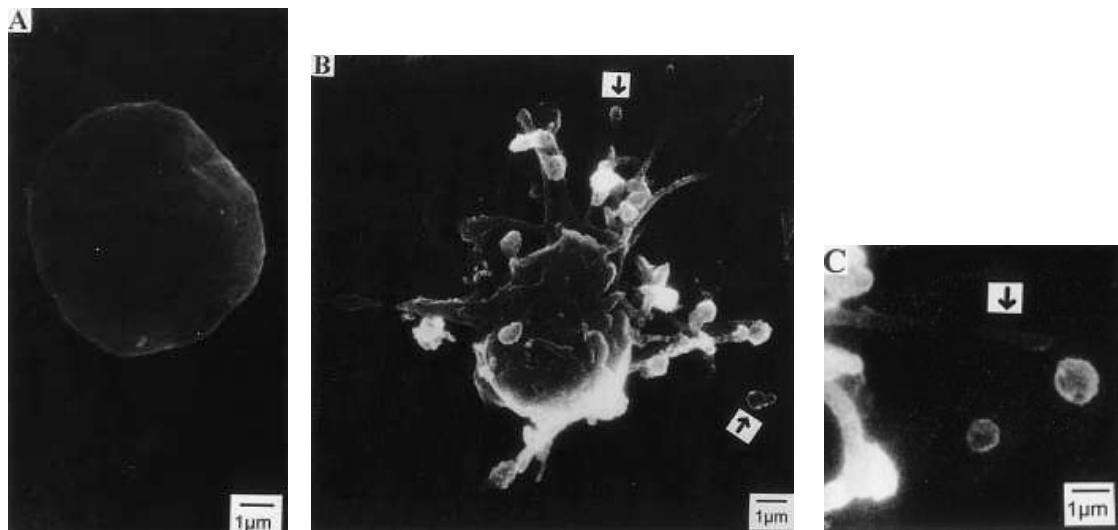


Abbildung 1: Elektronenmikroskopisches Bild von (A) ruhendem Thrombozyt, (B) aktiverter Thrombozyt mit Pseudopodien und beginnender Abschnürung von Mikropartikeln, (C) freigesetzter Mikropartikel am distalen Ende der Pseudopodien. [8]

Die Liste von Mikropartikeln anderer Zelltypen wird ständig erweitert und ist Gegenstand aktueller Forschungsprojekte, wahrscheinlich besitzen alle zellkernhaltigen Zellen die Fähigkeit, Mikropartikel bei Aktivierung oder Apoptose zu erzeugen [9].

Vieles spricht dafür, dass Mikropartikel eine zentrale Bedeutung der intrazellulären Kommunikation besitzen.

Es bestand lange die Annahme, dass 70-90 % aller im Plasma vorhandenen Mikropartikel von aktivierten Thrombozyten stammen. 2009 konnten Frauenhaft et.al. zeigen, dass Megakaryozyten ebenso CD 61-positive Mikropartikel bilden können.

Diese unterscheiden sich von den Mikropartikeln welche von aktivierten Thrombozyten stammen in der fehlenden Expression von P-Selectin und LAMP-1 Rezeptoren [10].

Diese Phosphatidylserin-positiven Partikel werden in der Zellkultur von Megakaryozyten des Menschen wie auch der Maus gebildet und stellen die größte Population der thrombozytären Mikropartikel im Plasma gesunder Menschen dar.

Wenngleich die Erkenntnis, dass thrombozytäre Mikropartikel vor allem von Megakaryozyten abstammen, weitere wissenschaftliche Absicherung erfordert, so konnte doch schon nachgewiesen werden, dass CD 61 positive/CD 62-P negative Mikropartikel

nach Bestrahlung des Knochenmarkes, dem Sitz der Megakaryozyten, weitestgehend verschwinden [11], CD 61 positive/CD 62-P positive Mikropartikel hingegen nach einer solchen Behandlung weiterhin in unveränderter Höhe im menschlichen Blut persistieren.

Es ist allgemein anerkannt, dass thrombozytäre Mikropartikel, wie alle anderen Mikropartikel auch, einen interzellularen Transfer von bioaktiven Molekülen, wie Lipiden oder Oberflächenrezeptoren und auch Enzymen ermöglichen und darüber hinaus in der Lage sind, die Funktion der Zielzelle zu beeinflussen [12-15].

Dieser rasch anwachsende Erkenntnisgewinn in Verbreitung und Funktion von Mikropartikeln begründet den großen wissenschaftlichen Drang, diese faszinierende Population des menschlichen Blutes weiter zu ergründen, da sich diesbezüglich mit jeder neuen Erkenntnis auch sofort neue faszinierende Fragestellungen ergeben.

Es sind bis heute zwei Wege der Entstehung von Mikropartikeln bekannt: Apoptose und Zell-Aktivierung [9, 16].

Als Auslöser für die Aktivierung können unterschiedlichste Ursachen ausgemacht werden: Thrombozyten beispielsweise werden durch Thrombin, ADP, Komplement Faktor C5b-9 oder einwirkende Scherkräfte aktiviert [12, 17-25].

Endothelzellen, Monozyten, Leberzellen und kleine Muskelzellen der Arterien werden durch bakterielle Lipopolysaccharide, Zytokine wie zum Beispiel TNF- α oder Interleukin 1, den Komplement Komplex C5b-9 oder Wasserstoffperoxid aktiviert [26-32].

Abbildung 2 beschreibt den Mechanismus der Mikropartikelfreisetzung. Hierbei ist der intrazelluläre Calciumspiegel der Zelle von großer Bedeutung. Innerhalb weniger Minuten nach dem Einwirken der aktivierenden Substanz kommt es zu einem Anstieg des zytosolischen Calciumspiegels, welcher Kinasen aktiviert, Phosphatasen hemmt und Calpain aktiviert. Dies führt dazu, dass sich Bestandteile des Zellmembranskelettes, wie Talin abbauen und es zum Verlust der Membranintegrität kommt. Erst hierdurch wird die Freisetzung von Mikropartikeln möglich [16, 21, 23-25, 29, 33-39].

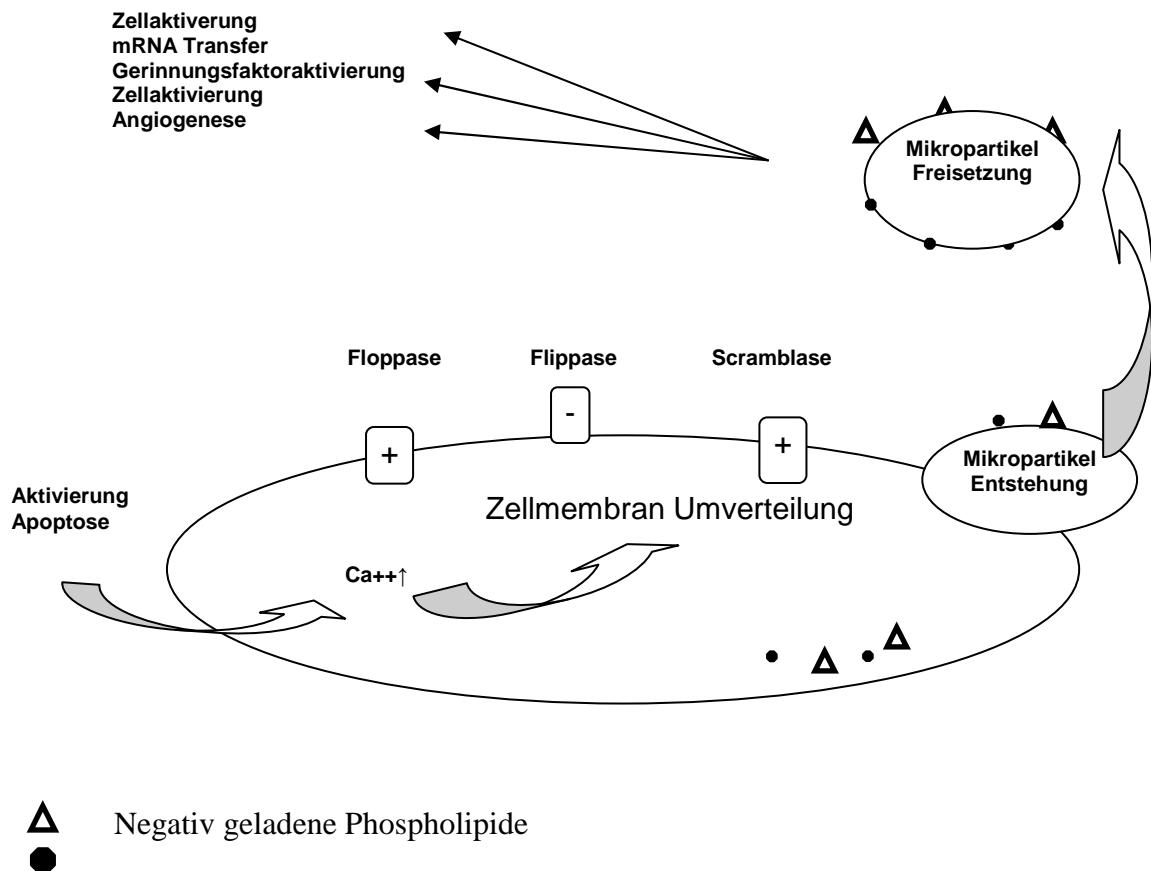


Abbildung 2: Mikropartikel-Entstehung und -Funktion

Negativ geladene Phospholipide werden im Laufe der Mikropartikel-Entstehung und -Freisetzung von intrazellulär an die Oberfläche transloziert und können somit zur Identifikation der Ursprungszellen benutzt werden.

Die dabei entstehenden Mikropartikel unterscheiden sich in Größe, Form, Phospholipid- und Protein-Zusammensetzung. Mikropartikel bestehen aus einer Phospholipid-Doppelschicht. Während bei ruhenden Zellen negativ geladene Phospholipide nur an der Innenseite der Zellmembran vorkommen, sind diese negativen Lipoproteine Bestandteile der Außenseite von Mikropartikeln. Hierbei sind unter anderem Phosphatidylserin und Phosphatidylethanolamin vorhanden.

Diese Tatsache erklärt den Effekt auf die Blutgerinnung von Mikropartikeln, da das negativ geladene Phosphatidylserin Gerinnungsfaktoren binden kann [18, 21, 40-42].

Thrombozytäre Mikropartikel können als solche über die Expression einer Reihe von Proteinen erkannt werden, wie zum Beispiel P-Selectin, Integrin $\beta 3$, Glykoprotein p 53 oder Granulophysin. Zudem ist hiermit die Unterscheidung möglich, ob es sich um ruhende oder aktivierte Thrombozyten handelt [18, 40, 43-46].

Mikropartikel anderer Gewebe zeigen entsprechende Oberflächenproteine, so dass eine Zuordnung zur Ursprungszelle möglich ist. So können beispielsweise E-Selectin und VE-Catherin zum Nachweis endothelialer Mikropartikel benutzt werden [47, 48]. Daneben präsentieren Endothel-Mikropartikel auch eine weitere Vielzahl von Proteinen, inklusive HLA-Antigenen auf ihrer Oberfläche [49].

Auch thrombozytäre Mikropartikel sind in der Lage Entzündungsreaktionen auszulösen. Dabei wird über Mikropartikel als Transporter Arachidonsäure an Endothelzellen gebracht. Dort folgt über eine erhöhte Expression von CD 54 eine verstärkte Adhäsion von Leukozyten, welche in das Endothel eindringen und dort eine Zytokin vermittelte Entzündung auslösen [50-52]. Erhöhte Mengen an Mikropartikeln wurden im Zusammenhang mit verschiedenen Erkrankungen des Menschen dokumentiert. Hierzu zählen sowohl Gefäßerkrankungen, als auch Diabetes, Traumata und verschiedene Arten von Malignomen [53-59].

Berkmans et al. [6] konnten 2001 zeigen, dass im Blut von gesunden Personen Mikropartikel verschiedener Gewebe in unterschiedlicher Anzahl vorkommen. Hierbei fanden sich thrombozytäre Mikropartikel in einer Anzahl von im Mittel $237 \times 10^6/l$, als auch Mikropartikel erythrozythären Ursprungs von im Mittel $28 \times 10^6/l$, sowie von Granulozyten im Mittel $46 \times 10^6/l$ und Mikropartikel von Endothelzellen von im Mittel $64 \times 10^6/l$.

Ebenso bekannt ist das Vorhandensein von Mikropartikeln in Thrombozytenkonzentraten. Diese können sowohl in mittels Apherese hergestellten Konzentraten nachgewiesen werden, als auch in gepoolten Konzentraten [1].

Dabei konnte ein Zusammenhang zwischen Art der Gewinnung und der Höhe der Mikropartikel-Anzahl wie auch ein Einfluss von Lagerungsbedingungen auf die Mikropartikel Entwicklung nachgewiesen werden [3, 60].

Die für die Gewinnung von Thrombozytenkonzentraten benötigten Spender sind gemäß den Richtlinien zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten (Hämatherapie) ausschließlich gesunde Erwachsene im Alter zwischen 18 und 68 Jahren [61].

Die in dieser Arbeit untersuchten Thrombozytenkonzentrate wurden alle durch das Verfahren der Apherese hergestellt. Hierbei werden Zellseparatoren für die Thrombozytenapherese verwendet. Es können dabei zwei Verfahren zum Einsatz kommen:

Ein kontinuierliches und ein diskontinuierliches. Beide Techniken basieren auf der Separation von Blutkomponenten nach Dichte und Größe. Der Spender ist dabei direkt mit der laufenden Zentrifuge verbunden, die mit mehr als 2000 U/min. arbeitet und so plättchenreiches Plasma herstellt [62]. Zellseparatoren mit diskontinuierlichem Wirkprinzip entnehmen und verarbeiten kleine Mengen Blut und retransfundieren die nicht benötigten zellulären Elemente, bevor eine neue Menge Blut entnommen und separiert wird. Kontinuierlich arbeitende Zellseparatoren extrahieren die zellulären Elemente aus dem ununterbrochen durchfließenden Blut [63]. Die nicht benötigten Zellkomponenten werden dabei bereits während der Extraktion fortlaufend an den Spender zurückgegeben. Thrombozytenkonzentrate, die in der automatischen Thrombozytapherese gewonnen werden, sind Einzelspender-Konzentrate.

Nach den "Richtlinien zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten (Hämotherapie)" muss das Thrombozytapheresekonzentrat wie auch das leukozytendepletierte Thrombozytapheresekonzentrat mehr als 2×10^{11} Thrombozyten pro Transfusionseinheit enthalten [61].

2. Zielsetzung

Die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit ist es, folgende fünf Fragen zu beantworten:

1. Wie hoch ist die Anzahl thrombozytärer Mikropartikel in Thrombozytenkonzentraten verglichen mit der Anzahl von Mikropartikeln in „Normalpersonen“, also potentiellen Spendern?

Da Mikropartikel unter anderem thrombogene Eigenschaften besitzen, erscheint eine Untersuchung von Mikropartikeln im Zusammenhang mit Transfusionen von Thrombozyten sinnvoll, um ein tieferes Verständnis über mögliche Folgen von Mikropartikel-Übertragung zu erlangen.

2. Lassen sich in Thrombozytenkonzentraten endotheliale Mikropartikel nachweisen?

Dies erscheint wahrscheinlich, da bei der Herstellung von Thrombozytenkonzentraten ein Anreicherungsverfahren zum Einsatz kommt, in dem mittels Zentrifugation plättchenreiches Plasma entsteht und dabei vermutlich auch im Blut befindliche endotheliale Mikropartikel angereichert werden.

Um eine HLA-Antigen Belastung für den Empfänger so niedrig wie möglich zu halten, werden verschiedenen Verfahren sowohl bei der Herstellung der Thrombozytenkonzentrate als auch bei deren Transfusion zum Einsatz gebracht.

Da endotheliale Mikropartikel HLA-Eigenschaften des Spenders tragen, würde eine erhöhte Anzahl endothelialer Mikropartikel in Thrombozytenkonzentraten möglicherweise eine transfusionsbedingte Immunisierung des Empfängers begünstigen.

Aus diesem Grunde wurde die Menge von endothelialen Mikropartikeln im Blut von Spendern und in mittels Apherese gewonnenen Thrombozytenkonzentraten untersucht.

3. Besteht ein Unterschied in der Anzahl von Mikropartikeln, thrombozytären und endothelialen Ursprungs bei unterschiedlich langer Lagerungszeit der Konzentrate vor Transfusion?

Eine Beantwortung dieser Frage erscheint von Interesse, da die transfundierten Thrombozytenkonzentrate eine unterschiedlich lange Lagerungsdauer hatten. Bisher wurde diese Frage noch nicht untersucht. Es wurde lediglich die Veränderung der Gesamtzahl von Mikropartikeln während eines Lagerungsvorgangs näher beleuchtet. Eine Spezifizierung von Mikropartikeln in gelagerten Thrombozytenkonzentraten wurde jedoch nicht durchgeführt.

4. Führen „mit-transfundierte“ Mikropartikel unmittelbar nach Transfusion eines Thrombozytenkonzentrates zu einer Erhöhung des Plasmaspiegels von Mikropartikeln im Patienten?
5. Kann für transfundierte Mikropartikel eine Halbwertszeit kalkuliert werden?

Auch diese Fragestellungen wurden bisher noch nie systematisch untersucht.

Zur Klärung dieser Frage wurde Patienten über einen definierten Zeitraum nach der Transfusion von Thrombozytenkonzentraten Blut entnommen und die Konzentration sowie die Art der Mikropartikel untersucht.

Beobachtet wurden Mikropartikel von ruhenden und aktivierten Thrombozyten sowie von Endothelzellen. Diese Werte wurden mit einem vor Transfusion bestimmten Ausgangswert der Patienten verglichen.

3. Material und Methoden

3.1. Studiendesign

3.1.1. Patientenkollektiv

Das Patientenkollektiv wurde von November 2006 bis Februar 2007 an der Medizinischen Klinik III des Klinikums Großhadern, der Ludwig Maximilians Universität München mit Schwerpunkt Hämatologie und Onkologie rekrutiert.

Untersucht wurde das Blut von Patienten mit folgenden Grundkrankheiten:

- akute lymphatische Leukämie
- akute myeloische Leukämie
- Osteomyelosklerose
- Multiples Myelom
- chronisch myeloische Leukämie
- schwere aplastische Anämie

Im Rahmen der Behandlung bekamen die Teilnehmer bei auftretender Thrombozytopenie (< 20 G/l) Thrombozytenkonzentrate. Die Schwelle zur Transfusionspflichtigkeit wurde mit 20 G/l festgelegt. Aufgrund der Grundkrankheit der Empfänger wurden alle Thrombozytenkonzentrate vor der Transfusion mit 30 Gy bestrahlt und über einen Leukozytenfilter transfundiert. Sämtliche Patienten waren negativ auf HIV, Hepatitis B und Hepatitis C getestet und hatten zum Zeitpunkt der Studie keine akute Infektion.

3.1.2. Kontroll-Gruppe

Eine Gruppe aus 36 freiwilligen Personen im Alter von 18 bis 70 Jahren, allesamt Nichtraucher, anamnestisch ohne thrombotischen Ereignisse und ohne Medikation diente als Kontrollgruppe. In Übereinstimmung mit den Regeln des Klinikums Großhadern wurden alle Teilnehmer der Studie umfassend aufgeklärt. Alle Spender willigten danach in die Untersuchung und Auswertung sowie die Veröffentlichung der Ergebnisse der Studie schriftlich ein. Ein positives Votum der Ethik-Kommission der LMU München wurde

eingeholt.

3.1.3. Herstellung der Thrombozytenkonzentrate

Alle Thrombozytenkonzentrate wurden aus dem peripheren Blut von einzelnen Spendern mittels eines Trima TM Accel (Software Version 5.1, CardianBCT, Lakewood, USA) hergestellt und bei 22 °C +/- 2 °C auf einer Durchmischungseinheit (Trima TM platelet set cat 80000; Martinsried, Deutschland) für eine mittlere Zeit von 4 (1-5) Tagen gelagert.

- 1 Tag: n=3
- 4 Tage: n=3
- 5 Tage: n=5

Die Plättchen-Anzahl pro Beutel lag bei 1163 (859-1374) G/l Thrombozyten. Die Menge pro Beutel entsprach einem Volumen von 246 (238-262) ml. Nach der Herstellung wurden die Plättchen in Spenderplasma, versetzt mit ACD-A, in einer Konzentration von 0,1ml/ml Lösung gelagert. Unmittelbar vor Transfusion wurden die Konzentrate mit 30 Gy bestrahlt.

3.1.4. Probengewinnung

Es wurden insgesamt vier Vollblutentnahmen pro Patient durchgeführt. Vor der Entnahme der Proben aus einem liegenden Hickman Katheter wurden 10 ml zentralvenöses Vollblut entnommen und verworfen. Die erste Entnahme fand vor Beginn der Thrombozyten-Transfusion statt, die zweite Abnahme erfolgte unmittelbar nach der Transfusion, nach einer Stunde folgte die dritte Entnahme und die vierte Blutprobe wurde nach drei Stunden genommen. Des Weiteren wurde eine Probe aus den Thrombozytenkonzentraten asserviert.

Die Blutentnahme der Kontroll-Gruppe wurde, um eine Aktivierung der Blutbestandteile zu vermeiden ohne Stauung der Vene durchgeführt. Die Entnahme der Proben erfolgte in Citratröhrchen der Fa Sarstedt S-Monovette Citrat 5ml. Nach der Blutabnahme wurden die Proben durch mehrmaliges vorsichtiges Schwenken vermischt. Die Proben wurden innerhalb von 15 Minuten nach Abnahme ins Labor gebracht und weiterverarbeitet.

Im Labor wurden die Citratröhrchen sofort für 20 Minuten bei 20°C mit 1550g in der Zentrifuge Mikro 22R der Firma Hettich, zentrifugiert.

Nach der Zentrifugation wurde der Überstand bis zu einem Abstand von einem Zentimeter über dem Sediment abpipettiert.

Das so gewonnene Serum wurde in einem Röhrchen (BD Falcon 15ml Polystyren Conical Tube) gesammelt und durch langsamen Schwenken vermischt.

Anschließend wurden jeweils 300 μ l Serum in Mikro Schraubröhren (1,5ml PP) der Firma Sarstedt abgefüllt.

Die Schraubröhren wurden zum Schockgefrieren für 20 Sekunden senkrecht in Flüssigstickstoff getaucht und anschließend für mindestens 15 Minuten im Stickstoffbad belassen, um die Proben zu stabilisieren.

Nach dem Schockgefrieren wurden die Proben bei -80 °C im Tiefkühlschrank bis zur Weiterverarbeitung gelagert.

3.1.5. Laborwerte

Für jeden Patienten wurden am Institut für Klinische Chemie am Klinikum Großhadern die Anzahl der Thrombozyten zu jedem Abnahmezeitpunkt bestimmt.

3.1.6. Berechnung der Messwerte

Die Anzahl der Mikropartikel pro μ l Plasma wurde über folgende Formel, entsprechend Beckermans RJ et al. 2001, errechnet:

$$\text{Mikropartikel / } \mu\text{l} = N \times (100 \mu\text{l} / 5 \mu\text{l}) \times (950 \mu\text{l} / V) \times (10^6 / 250 \mu\text{l})$$

N = Absolute Anzahl der Mikropartikel, welche über die FACS-Analyse bestimmt werden

V = tatsächlicher Einzug des Gerätes

100 μ l = Gesamtvolumen der aufbereiteten Mikropartikel

5 μ l = Menge der für die Messung verwendeten Mikropartikellösung

950 μ l = Gesamtvolumen der Probe vor der Messung

(Mikropartikellösung + Antikörper + Puffer)

250 μ l = ursprüngliches Volumen der Probe vor der Mikropartikelisolation

3.1.7. Statistik

Die Auswertung der Daten erfolgte unter Beratung des Instituts für medizinische Informationsverarbeitung, Biometrie und Epidemiologie der Ludwig-Maximilians-Universität München, Leitung Herr Prof. Dr. Mansmann, durch Frau Verena Hofmann und Herrn Dr. Alexander Crispin.

Die Datenerfassung erfolgte mit dem Programm Excel 97 SR-2 der Firma Microsoft auf einem Personal Computer. Für die Bearbeitung der Daten wurde das Programm SPSS™ (Version 17.0, SSPS Inc., Chicago, IL, USA) für Windows angewendet. Die Daten wurden deskriptiv mit Hilfe von Median, Mittelwert, Standardabweichung, Minimal- und Maximalwert dargestellt.

Unabhängige Variablen wurden mit Hilfe des Mann Whitney-U und des Fischers` Exakt Tests beurteilt, abhängige Parameter mit Hilfe des Wilcoxon-Vorzeichentests.

Signifikanz wurde für p Werte kleiner 0,05 angenommen.

3.2. Durchflußzytometrie

3.2.1. Prinzip der Durchflußzytometrie

Die Durchflusszytometrie ist eine Methode zur Analyse von Einzelzellen in Suspension. Sie basiert auf der Messung von Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften der Zellen. Anders als bei der Fluoreszenzmikroskopie kann mit einem Durchflusszytometer die simultane Messung der relativen Zellgröße, der Granularität und maximal drei verschiedener Fluoreszenzfarben vieler Einzelzellen in wenigen Sekunden getätigt werden.

Über einen angeschlossenen Computer werden die erhobenen Daten verarbeitet und gespeichert. Dafür werden die während der Messung auftretenden Lichtemissionen in numerische Signale umgesetzt.

Die Analyse der Zellen erfolgt in einem konstanten Flüssigkeitsstrom. Durch die umgebende Trägerflüssigkeit werden die Zellen beschleunigt, Zellaggregate aufgetrennt und die Zellen erreichen nacheinander den Analysepunkt. Dieser Vorgang wird hydrodynamische Fokussierung genannt.

Am Analysepunkt trifft der monochromatische Laserstrahl auf die durchströmende Zelle. Die entstehenden Streulicht- und Fluoreszenzsignale werden mit Hilfe von Spiegel- und Filtersystemen erfasst und können logarithmisch wie linear dargestellt werden.

3.2.1.1. Messung der Lichtstreuung

Die Lichtstreuung kommt durch die Wechselwirkung einer Zelle mit dem einfallenden Lichtstrahl zustande. Hierbei wird der größte Lichtanteil in Vorwärtsrichtung gestreut. Dieses Licht wird als Vorwärtsstreulicht (forward light scatter [FSC]) bezeichnet und ist ein Maß für die Zellgröße, d.h. kleine Zellen streuen weniger.

Das im rechten Winkel zum einfallenden Laserstrahl gestreute Licht ist abhängig von der intrazellulären Granularität und von Oberflächeneigenschaften der Zellen; es wird Seitwärtsstreulicht (side scatter [SSC]) genannt.

3.2.1.2. Messung der Fluoreszenz

In der analytischen Durchflußzytometrie werden luftgekühlte Argon-Ionenlaser verwendet, die Licht einer Wellenlänge von 488 nm generieren.

Aus diesem Grund werden in der Durchflußzytometrie vor allem Fluoreszenzfarbstoffe verwendet, die sich bei dieser Wellenlänge anregen lassen, jedoch verschiedene Emissionsmaxima besitzen.

Das von uns verwendete Durchflußzytometer FACScan der Firma Becton Dickinson ist in der Lage drei verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe auf drei verschiedenen Kanälen aufzuzeichnen, sofern diese sich in ihren emittierenden Wellenlängen unterscheiden.

Die Detektionswellenlänge von Kanal 1 liegt bei 530 nm, von Kanal 2 bei 585 nm und von Kanal 3 bei 650 nm.

An Fluoreszenzfarbstoffen verwendeten wir Fluoreszein-Isocyanat (FITC, mittlere Emissionswellenlänge = 525 nm) das wir auf Kanal 1 maßen, sowie Phycoerythrin (PE, mittlere Emissionswellenlänge = 575 nm), das wir auf Kanal 2 registrierten.

Durch das Koppeln der Fluoreszenzfarbstoffe an monoklonale Antikörper, die gegen spezielle Antigene auf den zu analysierenden Zellen gerichtet sind, erfolgt die Zellidentifikation.

3.2.2. Antikörper zur Bestimmung von Mikropartikeln

Mikropartikel exprimieren während ihrer Entstehung auf ihrer Oberfläche verschiedene Bestandteile der Ursprungszelle, hierzu gehören beispielsweise Phospholipide oder Proteine.

Diese, bei ruhenden Zellen nur intrazellulär vorkommenden Bestandteile, zum Beispiel Phosphatidylserin, Phosphatidylethanolamin, P-Selectin Integrin $\beta 3$, Glykoprotein p 53 oder Granulophysin, können hierzu mittels spezifischer Antikörper markiert und somit identifiziert werden.

3.2.2.1. Unspezifischer Farbstoff Annexin-V-FITC (IQP-120F)

Phosphatidylserin befindet sich normalerweise auf der Innenseite der Zellmembran einer ruhenden Zelle. Während der Entstehung von Mikropartikeln wird unter anderem Phosphatidylserin auf die Außenseite der Membran transloziert. Annexin-V bindet spezifisch an Phosphatidylserin. Durch Markierung von Zellen mit Annexin-V kann man somit Mikropartikel durchflusszytometrisch nachweisen [64].

Annexin-V wurde hierfür von IQ Products, Groningen, The Netherlands bezogen.

3.2.2.2. Isotypen-Kontrolle mittels IgG1-PE (A07795)

Um eine im Verlauf einer Analyse auftretende unspezifische Bindung eines spezifischen Antikörpers an Mikropartikeln zu erkennen, musste eine Isotypiekontrolle erfolgen. Hierzu wurde Isotyp-IgG1 Antikörper eingesetzt. Dieser wurde von der Firma IQ Products, Groningen, The Netherlands bezogen.

3.2.2.3. Antikörper gegen Integrin $\beta 3$, CD 61-PE (555754)

Integrin $\beta 3$ ist ein transmembranöses Glykoprotein, welches sich auf Zellen aus der Megakaryozyten-Linie befindet. Es findet sich ca. 80000 Mal auf der Oberfläche von Thrombozyten. Seine Funktion ist die Beteiligung an der Bindung von Fibrinogen an die Oberfläche des aktivierten Thrombozyten. PE gelabelte Antikörper gegen CD 61 können somit zum Nachweise von Mikropartikeln aus Thrombozyten verwendet werden [43].

Der CD 61-PE gelabelte Antikörper wurde von der Firma BD Biosciences, Heidelberg, Germany geliefert.

3.2.2.4. Antikörper gegen E-Selectin, CD 62 E-PE (551145)

Das Glykoprotein E-Selectin, auch endotheliale leukocyte adhesion molecule-1; ELAM, wird von aktivierten Endothelzellen gebildet. Es ist beteiligt an der Adhäsion von Leukozyten am Endothel und spielt somit bei der inflammatorischen Reaktion eine Rolle. Monoklonale Antikörper gegen E-Selectin können folglich zum Nachweis von endothelialen Mikropartikeln benutzt werden [47].

Der PE gelabelte CD 62E Antikörper wurde über die Firma BD Biosciences, Heidelberg, Germany bezogen.

3.2.2.5. Antikörper gegen P-Selectin, CD 62 P-PE (PN IM 1759)

P-Selectin ist mit 140 kDa das größte Protein der Selectin Gruppe. Weitere Bezeichnungen für P-Selectin sind CD 62-P, Granule Membrane Protein 140 (GMP-140), und Platelet Activation-Dependent Granule to External Membrane Protein (PADGEM). P-Selectin wird nach Stimulation in α-Granules von aktivierten Thrombozyten und Endothelzellen gebildet. Seine Funktion ist die Beteiligung an der Adhäsion von Leukozyten am Endothel. Antikörper gegen CD 62 P werden daher zum Nachweis aktiverter Thrombozyten benutzt [44].

Dieser Antikörper wurde von der Firma Immunotech, Marseille, France geliefert.

3.2.2.6. Antikörper gegen LAMP 3, CD 63-PE (PN IM 1914U)

CD 63 wurde als Thrombozyten aktivierendes Antigen identifiziert. Es entstammt der Gruppe der Tetraspanin Proteine. Es spielt eine Rolle bei der Adhäsion von Leukozyten, membranständiges Glykoprotein Granulophysin, auch lysosomal-membrane-associated glycoprotein 3, LAMP 3 sind Synonyme. Zum Nachweis von Mikropartikeln aktiverter Thrombozyten können somit monoklonale Antikörper gegen CD 63 verwendet werden [45].

Dieser Antikörper wurde über die Firma Immunotech, Marseille, France bezogen.

3.2.3. Mischungs- und Verdünnungsverhältnis der verwendeten Antikörper

Die fünf genannten Antikörper wurden im jeweiligen Mischungsverhältnis mit Calciumpuffer versehen und anschließend für 5 Minuten bei 13000 RPM 18°C Bremse 0 zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde jeweils die obere Hälfte der Antikörperlösung abgenommen und in Reagiergefäße (1,5ml PP) der Firma Sarstedt zur Weiterverarbeitung gegeben. Die untere Hälfte wurde verworfen. Die Annexin-V-FITC Lösung wurden ebenfalls im jeweiligen Mischungsverhältnis mit Calcium-Puffer versehen, aber nicht zentrifugiert.

Insgesamt wurden fünf verschiedenen Antikörpermischungen hergestellt.

- Annexin-V-FITC Leerprobe
- Annexin-V-FITC + IgG1-PE Isotypen-Kontrolle
- Annexin-V-FITC + CD 61-PE ruhende Thrombozyten
- Annexin-V-FITC + CD 63-PE aktivierte Thrombozyten
- Annexin-V-FITC + CD 62 P-PE aktivierte Thrombozyten
- Annexin-V-FITC + CD 62 E-PE aktivierte Endothelzellen

Die endgültigen Mischungsverhältnisse waren:

- Annexin-V-FITC 1:100
- CD 61-PE 1:100
- CD 63-PE 1:20
- CD 62P-PE 1:100
- CD 62E-PE 1:2

3.2.4. Verdünnungs-, Stamm- und Puffer-Lösungen

Zur Herstellung von Probenansätzen wurden verschiedene Pufferlösungen hergestellt.

Vor der Verwendung der Pufferlösungen wurden diese mit dem pH-Meter Inolab PH720 mit Temperaturfühler TFK 325 der Firma WTW (Weilheim, Deutschland) gemessen. Abweichungen vom physiologischen pH-Wert (7,36-7,43) wurden durch Zugabe von

einmolarer Salzsäure oder einmolarer Natronlauge ausgeglichen.

Nach der erfolgten pH Einstellung wurden die Pufferlösungen durch den Spritzenvorsatzfilter Minisart NML ($0,2\mu\text{m}$) sterilfiltriert.

3.2.4.1. Phosphat gepufferte Kochsalzlösung (PBS = Phosphate Buffered Saline)

Zur Herstellung des PBS-Puffers wurden 9g Natriumchlorid (NaCl) ($=154\text{mmol/l NaCl}$ 0,9%) und 0,25 g Di-Natrium-Hydrogenphosphat (Na_2HPO_4) ($=1,4\text{mmol/l Na}_2\text{HPO}_4$) in 1000ml Aqua dest aufgelöst. Dieser Puffer wurde bei Raumtemperatur gelagert und maximal zwei Wochen lang verwendet.

3.2.4.2. Calciumstammlösung

Zur Herstellung der Calciumstammlösung ($=0,1\text{mol/l CaCl}_2$) wurden 1,47g Calciumchlorid (CaCl_2) in 100ml destilliertem Wasser (Aqua dest.) gelöst.

Bei Lagerbedingungen von $+2\text{ }^\circ\text{C}$ bis $+8\text{ }^\circ\text{C}$ kann diese maximal zwölf Monate gelagert und verwendet werden.

3.2.4.3. Citratstammlösung

Für die Citratstammlösung ($=124\text{mmol/l Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) wurden 3,2 Gramm Tri-Natriumcitrat ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) in 100ml Aqua dest. aufgelöst. Bei Lagerbedingungen von $+2\text{ }^\circ\text{C}$ bis $+8\text{ }^\circ\text{C}$ kann diese maximal zwei Monate gelagert und verwendet werden.

3.2.4.4. Calciumpuffer

Zur Herstellung des Calciumpuffers wurden 39 ml PBS und ein ml Calciumstammlösung vermischt.

3.2.4.5. Citratpuffer

Zur Herstellung des Citratpuffers werden 27 ml PBS und drei ml Citratstammlösung vermischt.

3.2.5. Probenansätze

Nach der Entnahme aus dem –80 °C Tiefkühlschrank wurden die Proben langsam über mindestens eine Stunde im Eisswasserbad aufgetaut.

Die jetzt flüssige Probe wurde durch vortexen (Vortex Genie 2TM der Firma Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz) homogen gemischt.

Nachdem 250 µl der Probe in eine Mikro Schraubröhre (1,5 ml PP) der Firma Sarstedt gefüllt und diese bei 17570 g, Bremse eins und 20°C für 30 Minuten in der Zentrifuge Mikro 22R, der Firma Hettich, zentrifugiert worden waren, erfolgte die Weiterverarbeitung.

Nach Entfernung von 225µl Überstand von der dem Pellet fernen Wandseite, wurde das verbliebene Mikropartikel Pellet mit 225µl Citratpuffer (3,2% Trip-Natrium-Citrat) resuspendiert und anschließend für 30 Minuten bei 17570 g, Bremse eins und 20°C erneut zentrifugiert. Der zentrifugierten Probe wurden wiederum 225µl entnommen und das Mikropartikel Pellet wurde mit 75µl Citratpuffer resuspendiert. So wurden 100µl Mikropartikellösung für die Mikropartikelmessung gewonnen.

Im Anschluss wurden sechs FACS-Röhrchen für die sechs verschiedenen Proben beschriftet. In ein Röhrchen wurde nun 35µl Citrat-Puffer gegeben, die Annexin-V- FITC Leerprobe. In die übrigen fünf Küvetten, wurden für die Antikörperproben jeweils 35µl Calcium-Puffer gefüllt. Zu den FACS-Röhrchen der Annexin-V-FITC-Leerprobe, der IgG-PE Probe, der CD 61-PE-Probe, der CD 62E-PE-Probe, der CD 63-PE-Probe und der CD 62P-PE-Probe wurden jeweils 5 µl gevortextes Annexin-V-FITC zugegeben.

Zu den Antikörper-FACS-Röhrchen wurden im nächsten Schritt jeweils 5µl des entsprechenden aufbereiteten Antikörpers zugefügt.

Im letzten Schritt wurde nun noch in jedes der fünf Probe-FACS-Röhrchen jeweils 5µl Mikropartikellösung zugegeben. Vor dem Pipetieren wurde die Mikropartikellösung ein bis drei Sekunden gevortext und dadurch gemischt. Die Proben wurden anschließend bei Raumtemperatur in Dunkelheit für fünfzehn Minuten inkubiert.

Nach der Inkubation wurde die Reaktion durch Zugabe von jeweils 900 µl Calcium-Puffer zu den Antikörper-Proben und jeweils 900 µl Citrat-Puffer zu der Annexin-V-Leerprobe gestoppt.

3.2.6. Mikropartikel Messung mit FACScan Flow Cytometer

Die so aufbereiteten Proben wurden mit dem FACScan Flow Cytometer, der Firma Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland) mit zugehöriger Cell Quest Software der Firma Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland) gemessen und ausgewertet.

Um die Detectionsleistung des Argonlasers zu verbessern, wurde dieser von einem Techniker der Firma Becton Dickinson neu justiert. Dies war notwendig, da die gemessenen Mikropartikel wesentlich kleiner sind, als die sonst in der Durchflußzytometrie zu messenden Zellen.

Vor der Messung wurden die Proben durch vortexen erneut gemischt. Alle Proben wurden für eine Minute mit einer Geschwindigkeit von 60 µl/min. eingesogen.

Zur Überprüfung des tatsächlich eingezogen Volumens wurde täglich eine Probe mit destilliertem Wasser für zehn Minuten gemessen. Aus dem Gewichtsunterschied vor und nach dem Einzug wurde die tatsächliche Geschwindigkeit, mit der das Gerät die Proben ansaugt ermittelt.

Dieser Wassereinzug, betrug im Durchschnitt 50-80 µl. Die so täglich ermittelten Geschwindigkeiten wurden in die Auswertung mit eingerechnet. Der Forward Scatter (FSC, Vorwärtsstreulicht) und der Side Scatter (SSC, Seitwärtsstreulicht) wurden nach logarithmischen Parametern eingestellt. Zur Bestimmung der unteren Nachweisgrenze wurden Negativkontrollen mit unspezifisch bindenden FITC- bzw. PE-gelabelten Antikörper verwendet. Als obere Nachweisgrenze wurde Vollblut gemessen. Hierbei wurde die Region unterhalb der Thrombozytengröße zur oberen Nachweisgrenze erklärt.

Die Mikropartikel wurden anhand ihrer Größe, zwischen 0,1 und 1,0 µm (FSC), ihrer Dichte (SSC) und ihrer Bindungsfähigkeit bezüglich Annexin-V detektiert.

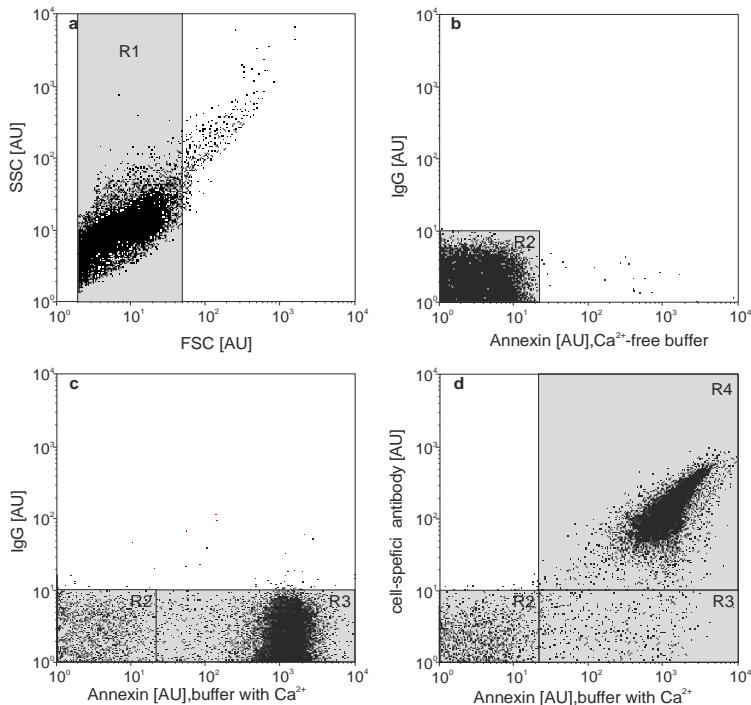


Abbildung 3: Identifikation von Mikropartikel in der Durchflußzytometrie

- (a) Mikropartikel wurden in vorangegangenen Messungen als Teilchen mit einer Größe zwischen 0,1 und 1,0 μm identifiziert (R 1)
- (b) Als Negativkontrolle wurde unspezifisches IgG und Annexin-V in Calcium freier Pufferlösung gemessen (R 2)
- (c) Mittels Zugabe von Calcium wurden Mikropartikel unspezifisch markiert. (R 3)
- (d) Mit Annexin-V und einem spezifischen Antikörper markierte Mikropartikel finden sich in (R 4)

3.2.7. Geräte und Software

- FACScan Flow Cytometer mit Cell Quest Software der Firma Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
- Zentrifuge Mikro 22R der Firma Hettich, Tutting, Deutschland
- Zentrifuge Hermle ZK380, Gosheim, Deutschland
- PH-Meter Inolab PH720 mit Temperaturfühler TFK 325 der Firma WTW, Weilheim, Deutschland
- Vortex Genie 2TM der Firma Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz

3.2.8. Verarbeitungszubehör

- Mikro Schraubröhre 1,5ml PP (RF 72.692.005), Firma Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
- Reagiergefäße 1,5ml PP (RF 72.690) Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
- BD Falcon 5ml Polystyren Round-Bottom-Tube, 12x27mm (RF 352052) Firma BD Biosciences, Bedford (USA)
- BD Falcon 15ml Polystyren Conical Tube 17x20mm der Firma BD Biosciences, Bedford, USA
- Pipettenspitzen epT.I.P.S. Standard in den Größen 0,5-20 μ l, 2-200 μ l und 200-1000 μ l der Firma Eppendorf AG aus Hamburg, Deutschland
- Costar Stripetten in den Größen 10ml und 5ml der Firma Corning, NY, USA
- Spritzenvorsatzfilter Minisart NML 0,2 μ m der Firma Vitaris AG, Baar, Schweiz
- 20ml Spritzen BD Discardit II der Firma Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
- EDTA-Röhrchen, S-Monovetten 2,3ml K3E (1,6 mg EDTA/ml Blut) der Firma Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
- Citrat-Röhrchen, S-Monovetten 5ml 9NC (Tri-Natriumcitrat-Lösung 0,106 mol/l; 0,50 ml Citrat-Lösung) der Firma Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

3.2.9. Chemikalien

- CaCl₂ (Calciumchlorid), Merck, Darmstadt, Deutschland
- Na₂HPO₄ (Dinatriumhydrogenphosphat), Merck, Darmstadt, Deutschland
- NaCl (Natriumchlorid), Merck, Darmstadt, Deutschland
- Na₃C₆H₅O₇ (Tri-Natriumcitrat), Merck, Darmstadt, Deutschland
- NaOH (Natronlauge) 1mol/l, Merck, Darmstadt, Deutschland
- HCl (Salzsäure) 1mol/l, Merck, Darmstadt, Deutschland

4. Ergebnisse

4.1. Charakteristika der Studienteilnehmer

Das für diese Arbeit rekrutierte Patientenkollektiv setzt sich aus elf Patienten zusammen, fünf weiblichen (\bar{x} 40,0 Jahre) und sechs männlichen (\bar{x} 49,7 Jahre), die von November 2006 bis zum Februar 2007 in der Medizinischen Klinik III des Klinikums Großhadern, der Ludwig Maximilians Universität München mit Schwerpunkt Hämatologie und Onkologie wegen eines im Rahmen einer hämatopoetischen Stammzelltransplantation auftretenden Zustandes der Aplasie behandelt wurden.

Sämtliche Patienten waren negativ getestet auf HIV, Hepatitis B und C und hatten zum Zeitpunkt der Studie keine akute Infektion. Einen genauen Überblick über Art der Erkrankung, Geschlecht und Alter der Patienten gibt Tabelle 1.

Alter [Jahre]	Geschlecht	Diagnose
18	weiblich	Schwere Aplastische Anämie
43	weiblich	Akute Lymphatische Leukämie
47	männlich	Akute Myeloische Leukämie
48	männlich	Osteomyelosklerose
48	weiblich	Chronische Myeloische Leukämie
35	männlich	Akute Myeloische Leukämie
37	weiblich	Akute Myeloische Leukämie
41	männlich	Akute Lymphatische Leukämie
54	weiblich	Multiples Myelom
59	männlich	Akute Myeloische Leukämie
68	männlich	Akute Myeloische Leukämie

Tabelle 1: Geschlecht, Erkrankung und Alter der Studienteilnehmer

4.2. Beschreibung der Thrombozytenkonzentrate

Im Rahmen der Behandlung bekamen die Teilnehmer wegen auftretender Thrombozytopenie Thrombozytenkonzentrate.

Die Schwelle zur Transfusionspflichtigkeit wurde mit 20 G/l festgelegt.

Aufgrund der Grundkrankheit der Empfänger wurden alle Thrombozytenkonzentrate vor der Transfusion mit 30 Gy bestrahlt und über einen Leukozytenfilter transfundiert.

Lagerzeit [Tage]	Spenderalter [Jahre]	Spender Geschlecht	Thrombozyten Konzentration in TK [G/l]	TK Volumen [ml]
5	25	weiblich	1213	239
5	33	weiblich	1374	262
5	51	weiblich	1260	246
5	26	männlich	1167	257
5	24	männlich	859	256
4	47	männlich	1163	249
4	35	weiblich	1128	257
4	42	weiblich	984	254
1	29	weiblich	1102	245
1	50	männlich	1218	238
1	29	weiblich	1185	253

Tabelle 2: Beschreibung der transfundierten Thrombozytenkonzentrate

(TK = Thrombozytenkonzentrat)

4.3. Kontrollgruppe

Eine Gruppe aus 36 freiwilligen Personen, allesamt Nichtraucher, anamnestisch keine thrombotischen Ereignisse, ohne regelmäßige Medikation, diente als Kontrollgruppe.

Das Alter und die Verteilung der Geschlechter unterschied sich nicht signifikant in den einzelnen Gruppen (Patienten, Thrombozyten-Spender und Kontrollgruppe).

4.4. Thrombozytenzahlen von Patienten, Kontrollgruppe und Konserven

Vor der Transfusion war die Thrombozyten-Anzahl der Patienten mit im Median 8 G/l (2 – 18) deutlich geringer als die der Kontroll-Gruppe. Die Kontrollpersonen hatten im Durchschnitt eine gemessene Thrombozytenzahl von 247 G/L (216 – 292).

Die Anzahl der Thrombozyten pro Konserven wurde im Mittel mit 1176 G/l (1072 – 1229) bestimmt.

Somit war die Anzahl der Thrombozyten in den Konzentraten im Mittel 4.8-mal höher als die der Kontroll-Gruppe.

4.5. Berechnung der Halbwertszeit der transfundierten Thrombozyten

Für den gemessenen Abfall der Thrombozytenzahlen nach Transfusion konnte eine Halbwertszeit-Berechnung durchgeführt werden. Hierbei konnte eine Halbwertszeit der transfundierten Plättchen von 24,0 Stunden nachgewiesen werden.

Die Berechnung der Halbwertszeit von transfundierten Thrombozyten gelang Herrn Dr. A. Crispin des Instituts für medizinische Informationsverarbeitung, Biometrie und Epidemiologie der Ludwig Maximilians Universität München mittels eines Random-Intercept-Modells. Hiermit konnte eine exponentielle Abnahme der Thrombozyten in vivo berechnet werden.

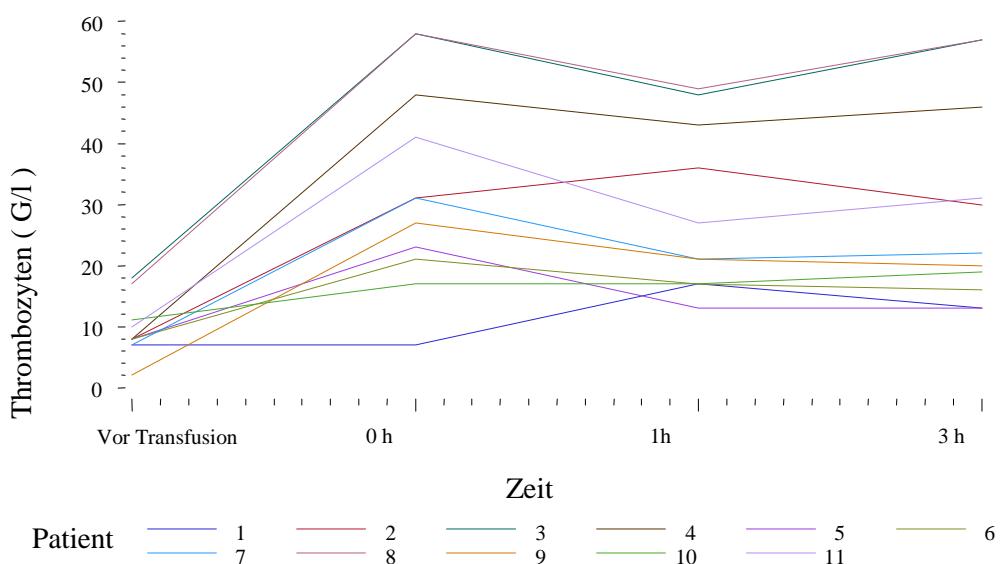


Abbildung 4: Thrombozytenzahlen im Zeitverlauf nach Transfusion

4.6. Anreicherung von Mikropartikeln in Thrombozytenkonzentraten

Thrombozytenkonzentrate enthalten erhöhte Mengen an Mikropartikeln.

Während der Herstellung der Thrombozytenkonzentrate findet eine Anreicherung des Konzentrates mit Mikropartikel statt.

4.6.1. Anreicherung der Gesamtzahl an Mikropartikeln

In Thrombozytenkonzentraten finden sich, verglichen mit dem Blut der Kontrollgruppe, erhöhte Mengen an Annexin-V-positiven Mikropartikeln.

Hierbei waren in Thrombozytenkonzentraten im Mittel $8751 \times 10^6/L$ (6563–14304) Annexin-V positive Mikropartikel messbar.

Im Blut der Kontrollgruppe waren hingegen nur $5121 \times 10^6/L$ (3231–7939) Annexin-V-positive Mikropartikel nachweisbar.

Die Menge an Annexin-V positiven Mikropartikeln ist in Thrombozytenkonzentraten um das 1,7 fache angereichert, gegenüber Personen der Kontrollgruppe.

Im Blut der Patientengruppe wurde vor Transfusion mit $691 \times 10^6/L$ (405–796) Annexin-V- positive Mikropartikel ein deutlich niedriger Wert bestimmt.

	<i>Thrombozytenkonzentrat</i>	<i>Patienten Gruppe</i>	<i>Kontroll Gruppe</i>
<i>n=</i>	10	11	36
<i>Annexin-V+MP</i>	8751	691	5121
<i>[x10⁶/L]</i>	(6563-14304)	(405-796)	(3231-7939)

Tabelle 4: Gesamtzahl an Mikropartikel in Thrombozytenkonzentrat, Patienten- und Kontrollgruppe

Anzahl im Median (Q1-Q3 (Interquartile range)).

4.6.2. Anreicherung der CD 61 positiven Mikropartikel

Die Anzahl an thrombozytären Mikropartikeln in Thrombozytenkonzentraten wurde mit im Median $8342 \times 10^6/\text{L}$ (5761–13531) CD 61 positiven Mikropartikeln bestimmt.

Im Blut der Kontrollgruppe lagen die bestimmten Werte mit $3593 \times 10^6/\text{L}$ (2174–6054) unter den Werten der Thrombozytenkonzentrate.

Thrombozytenkonzentrate enthalten somit eine 2,3-mal so hoch gemessene Menge an thrombozytären Mikropartikeln, welche CD 61 auf ihrer Oberfläche präsentieren, wie diese im Blut von Kontrollpersonen nachweisbar waren.

Im Blut der Patientengruppe lagen diese Mikropartikel vor Transfusion bei $490 \times 10^6/\text{L}$ (379–647).

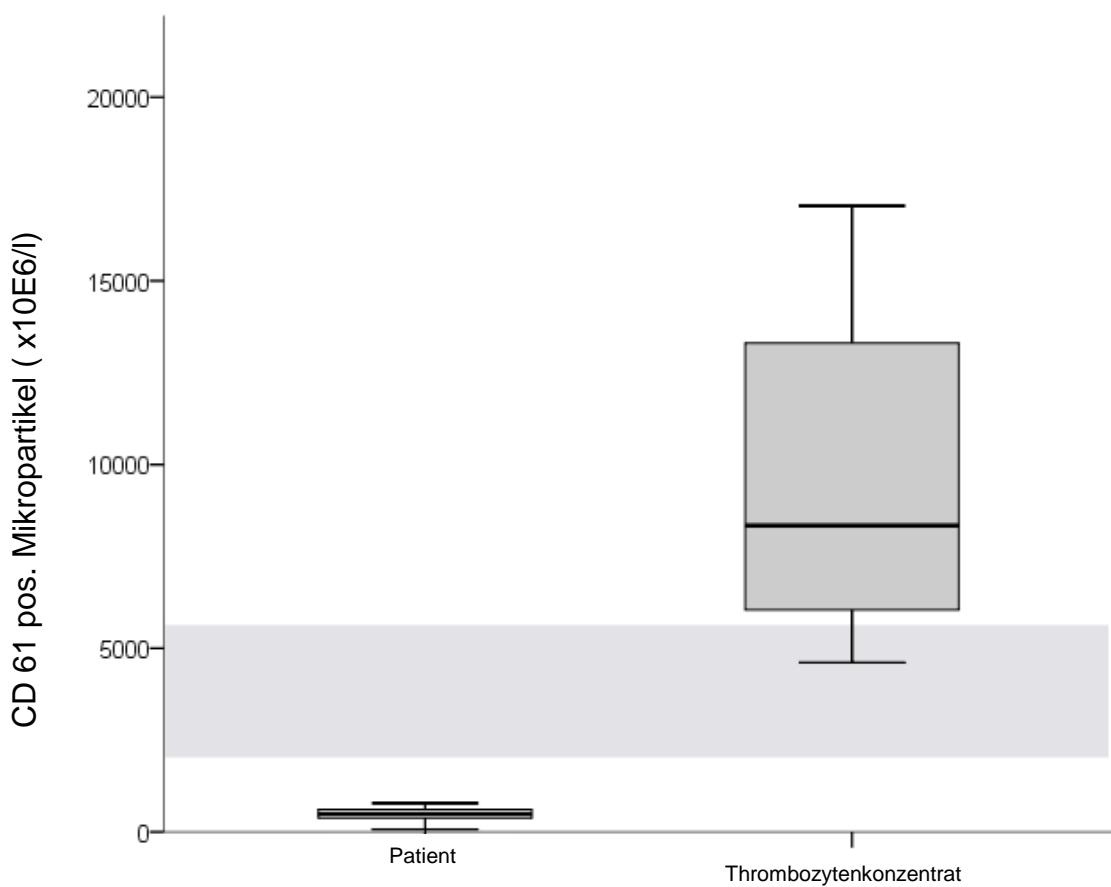


Abbildung 5: Die CD 61 positive Mikropartikelmenge in Thrombozytenkonzentraten ist erhöht (Baseline vor Transfusion)

Die graue Fläche repräsentiert den Interquartilsabstand der Kontrollgruppe

4.6.3. Anreicherung der CD 63 positive Mikropartikel

Thrombozytenkonzentrate enthalten eine erhöhte Menge an Mikropartikeln aktivierter Thrombozyten, welche wir im Mittel mit $258 \times 10^6/\text{L}$ (139–350) nachweisen konnten.

Verglichen hierzu waren diese im Blut der Kontrollgruppe mit im Schnitt $83 \times 10^6/\text{L}$ (44–178) deutlich niedriger nachweisbar.

Im Blut der Patientengruppe konnten vor Transfusion durchschnittlich $37 \times 10^6/\text{L}$ (13–51) CD-63-positive Mikropartikel gemessen werden.

Somit ergibt sich im Vergleich mit der Kontrollgruppe ein 3,1-mal so häufiges Erscheinen von Mikropartikeln in Thrombozytenkonzentraten, welche CD 63 exprimieren und ein 7,0-mal häufigeres Vorkommen von CD-63-positiven Mikropartikeln im Vergleich mit der Patientengruppe.

	<i>Thrombozytenkonzentrat</i>	<i>Patientengruppe</i>	<i>Kontrollgruppe</i>
<i>n=</i>	10	11	36
CD63+MP	258	37	83
<i>[x10⁶/L]</i>	(139-350)	(13-51)	(44-178)

Tabelle 6: CD 63 positive Mikropartikel in Thrombozytenkonzentrat, Kontrollgruppe und Patientengruppe

Anzahl im Median (Q1-Q3 (Interquartile range)).

4.6.4. Anreicherung der CD 62-P positiven Mikropartikel

Mit im Schnitt $398 \times 10^6/\text{L}$ (263–830) enthalten Thrombozytenkonzentrate eine erhöhte Menge an Mikropartikeln, welche aktivierten Thrombozyten zuzuordnen sind.

Im Blut der Kontrollgruppe waren diese hingegen mit $46 \times 10^6/\text{L}$ (18–114) deutlich seltener nachweisbar.

Bei Patienten fanden sich $21 \times 10^6/\text{L}$ (5–46) CD 62-P positive Mikropartikel. Auch für CD 62-P-positive Mikropartikel, welche aus aktivierten Thrombozyten stammen, kann somit in Thrombozytenkonzentraten ein 8,6-mal häufigerer Nachweis als in der Kontrollgruppe erbracht werden.

	<i>Thrombozytenkonzentrat</i>	<i>Patientengruppe</i>	<i>Kontrollgruppe</i>
<i>n=</i>	10	11	36
<i>CD62P+MP</i>	398	21	46
<i>[x10⁶/L]</i>	(263-830)	(5-46)	(18-114)

Tabelle 6: CD 63 positive Mikropartikel in Thrombozytenkonzentrat, Patienten- und Kontrollgruppe

Anzahl im Median (Q1-Q3 (Interquartile range)).

4.6.5. Anreicherung der CD 62-E positiven Mikropartikel

Die Anzahl an endothelialen, CD 62-E positiven Mikropartikeln in Thrombozytenkonzentraten wurde mit im Median $840 \times 10^6/L$ (685–1384) Mikropartikeln bestimmt. Im Blut der Kontrollgruppe lagen die gemessenen Werte mit $323 \times 10^6/L$ (192–484) unter den Werten der Thrombozytenkonzentrate.

Mit $258 \times 10^6/L$ (202–426) gemessenen CD 62-E positiven Mikropartikeln war im Blut der Patientengruppe im Schnitt die geringste Menge an endothelialen Mikropartikeln im Vergleich zu gesunden Personen und Thrombozytenkonzentraten nachweisbar.

Thrombozytenkonzentrat enthalten somit 2,6-fach höhere gemessene Mengen an endothelialen Mikropartikeln, welche CD 62-E auf ihrer Oberfläche präsentieren können, als diese im Blut von Kontrollpersonen nachweisbar sind.

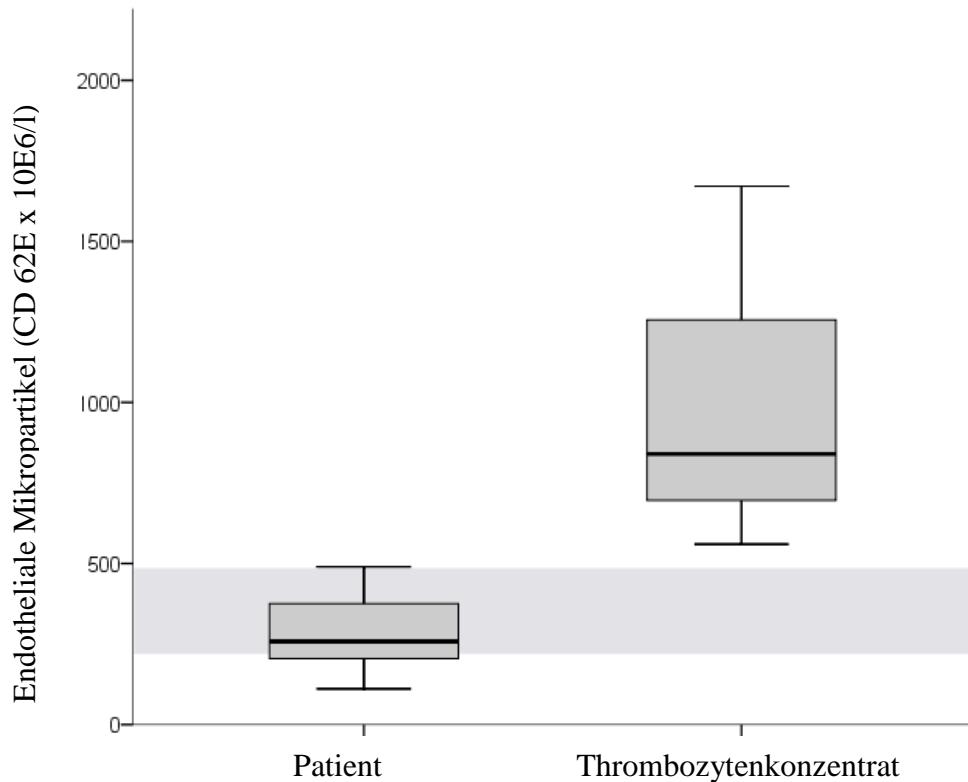


Abbildung 6: Erhöhte Menge an endothelialen Mikropartikel in Thrombozytenkonzentraten. (Baseline vor Transfusion)

Die graue Fläche repräsentiert den Interquartilsabstand der Kontrollgruppe

4.7. Veränderungen in Thrombozytenkonzentraten während der Lagerungsdauer

4.7.1. Veränderung der Plättchenzahlen

Die Anzahl der Thrombozyten in den gemessenen Thrombozytenkonzentraten lag erwartungsgemäß zu jedem Messzeitpunkt signifikant ($p<0,05$) über der Anzahl der Thrombozyten der Spender, 247 G/L (216–292). Thrombozytenkonzentrate, die einen, vier oder fünf Tage vor Transfusion gelagert wurden, zeigten vergleichbare Plättchenzahlen. Hierbei konnte nach einem Tag Lagerung ein Wert von im Mittel 1185 G/L (1102–1218) gemessen werden.

Dieser war nach vier Tagen Lagerung mit 1251 G/L (1128–1374) und nach fünf Tagen Lagerung mit 1167 G/L (921–1236) nahezu konstant.

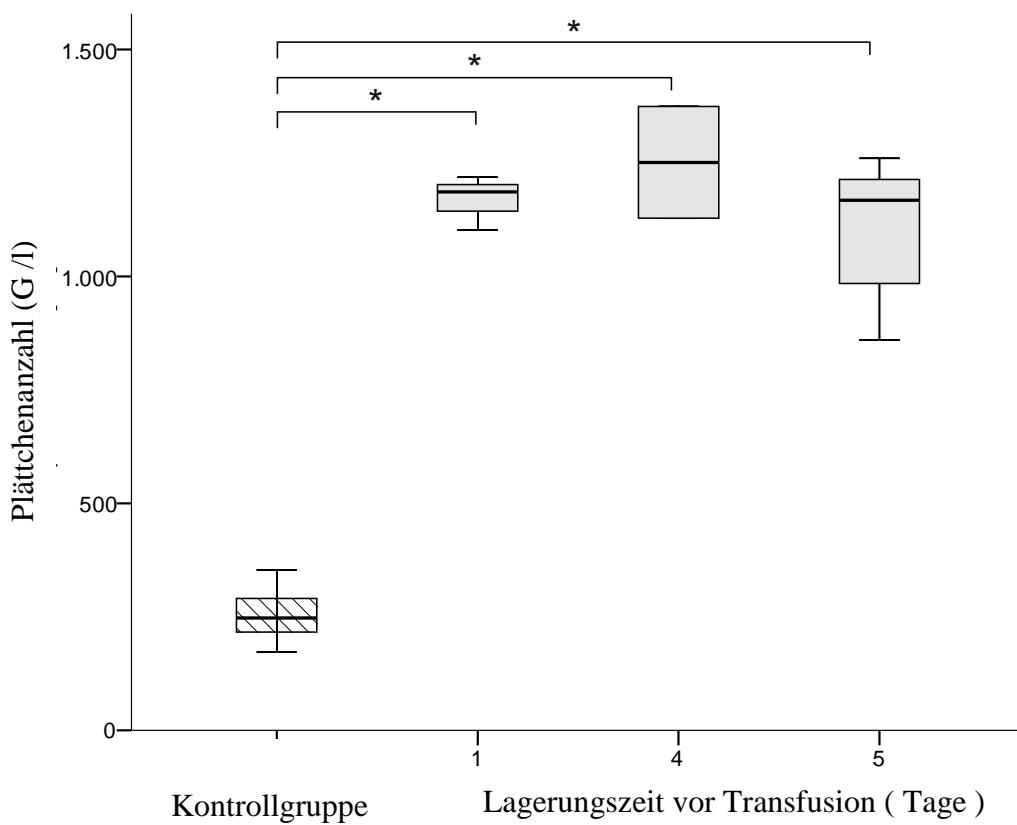


Abbildung 7: Veränderung der Thrombozytenzahlen der Konzentrate im Laufe der Lagerung.

Boxplots mit Medianwerten und Interquartilsabstand

*= $p<0.05$

4.7.2. Veränderung der Gesamtzahl an Mikropartikeln

Die gemessenen Thrombozytenkonzentrate enthalten eine höhere Menge an Annexin-V positiven Mikropartikeln als die Proben der Kontrollgruppe.

Die Gesamtzahl an Annexin-V positiven Mikropartikeln in den Thrombozytenkonzentraten zeigte keinen signifikanten Unterschied bei ein, vier oder fünftägiger Lagerung. Hierbei war nach einem Tag ein Wert von $10700 \times 10^6/\text{L}$ (5201–13950) zu messen. Nach vier Tagen konnte ein Wert von $10433 \times 10^6/\text{L}$ (6563–14304) nachgewiesen werden und nach fünf Tagen Lagerung waren $8717 \times 10^6/\text{L}$ (6208–18505) Annexin-V positive Mikropartikel nachweisbar.

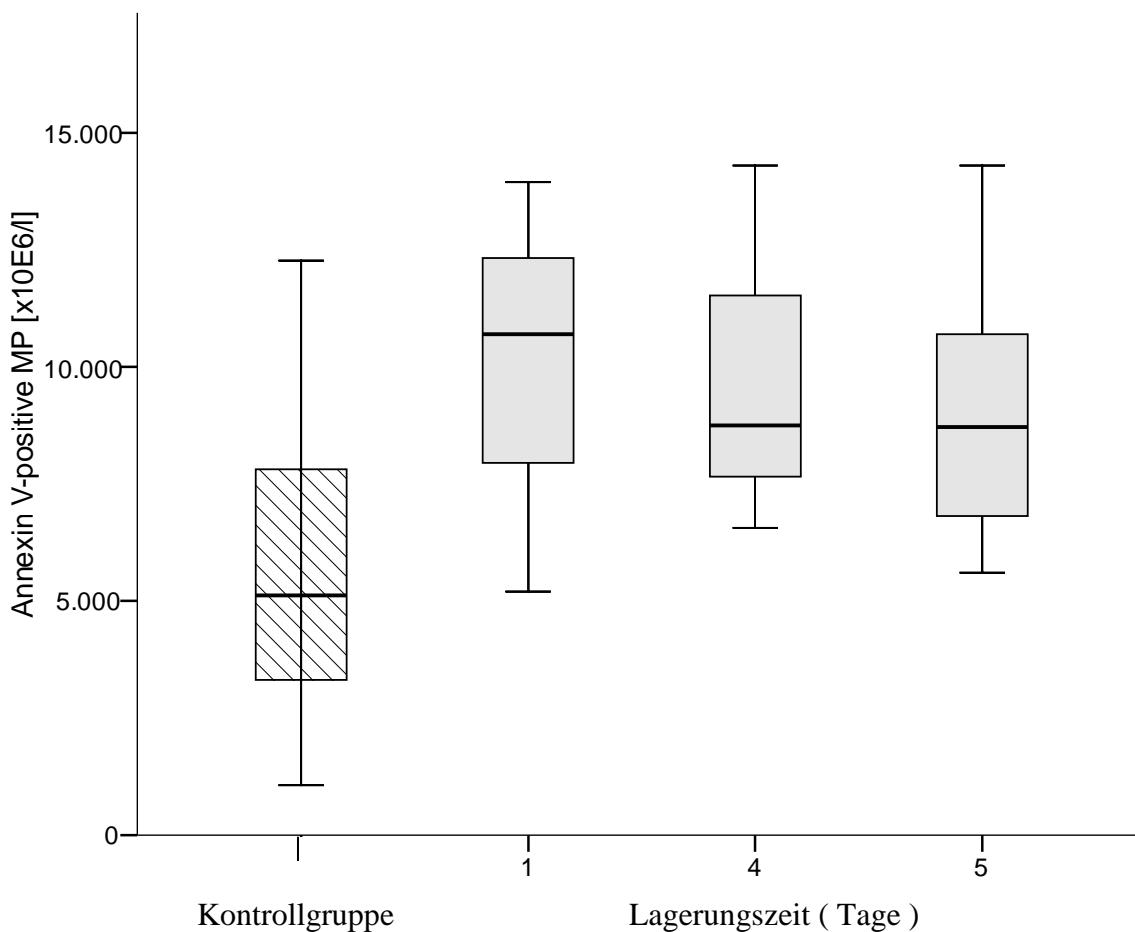


Abbildung 8: Veränderung der Annexin-V positiven Mikropartikel Anzahl im Laufe der Lagerung und Vergleich der Zahl der Mikropartikel bei Konzentraten und Kontrollpersonen

Boxplots mit Medianwerten und Interquartilsabstand

4.7.3. Veränderung der CD 61 positiven Mikropartikel

Thrombozytenkonzentrate enthalten eine, verglichen mit der Kontrollgruppe, erhöhte Menge an CD 61 positiven Mikropartikeln. Der Anteil CD 61 positiver Mikropartikel veränderte sich während der Lagerung nicht signifikant. Hierbei waren nach eintägiger Lagerung Werte von $10157 \times 10^6/\text{L}$ (4611–13076) nachweisbar. Bei viertägiger Lagerung konnten $8342 \times 10^6/\text{L}$ (5761–13531) Mikropartikel gemessen werden. Bei fünftägiger Lagerung konnten $8144 \times 10^6/\text{L}$ (5673–16793) CD 61 positive Mikropartikel gemessen werden.

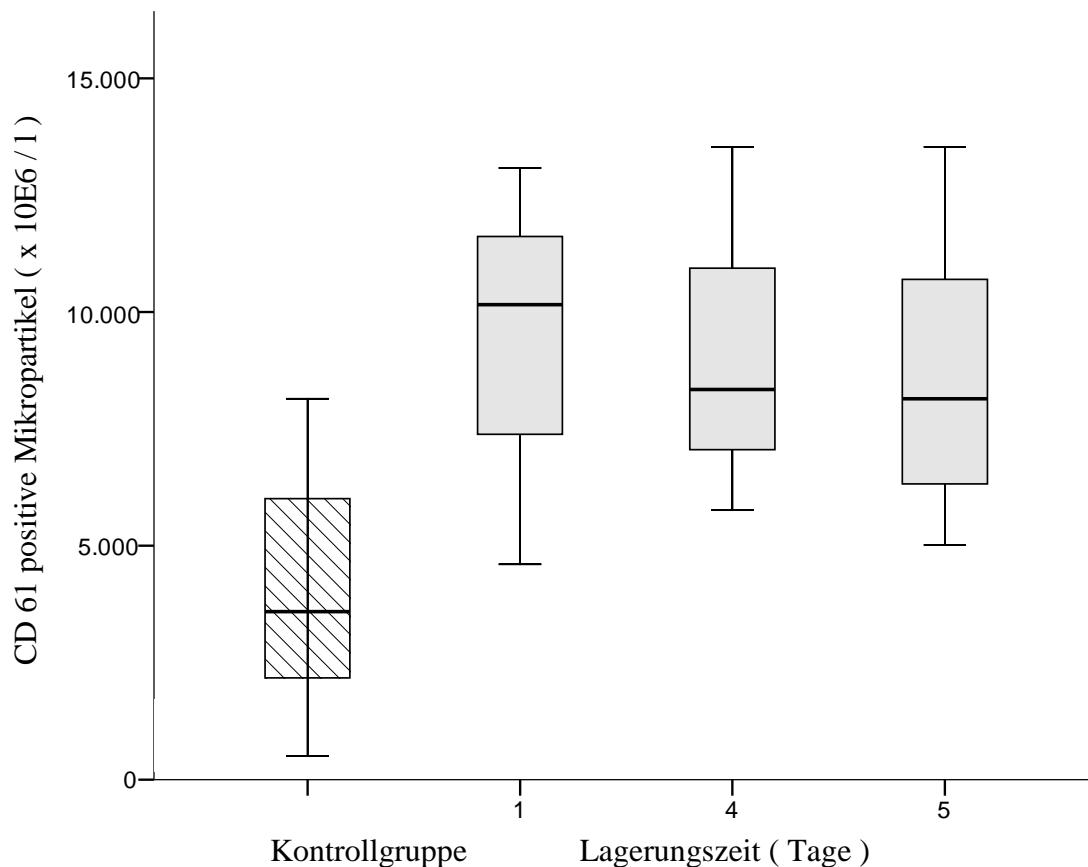


Abbildung 9: Veränderung der CD 61 positiven Mikropartikel-Anzahl im Laufe der Lagerung

Boxplots mit Medianwerten und Interquartilsabständen

4.7.4. Veränderung der CD 63 positiven Mikropartikel

Der Anteil CD 63 positiver Mikropartikel veränderte sich während der Lagerung signifikant. ($p<0,05$): Es konnte ein Anstieg der Mikropartikel-Anzahl bei fünftägiger Lagerung verglichen mit der Anzahl an CD 63 positiver Mikropartikeln der Spender und des Konzentrats nach eintägiger Lagerung gezeigt werden.

Hierbei waren bei eintägiger Lagerung Werte von $258 \times 10^6/L$ (53–337) nachweisbar. Nach viertägiger Lagerung konnten $258 \times 10^6/L$ (166–350) Mikropartikel gemessen werden, bei fünftägiger Lagerung $348 \times 10^6/L$ (137–1342) CD 63 positive Mikropartikel.

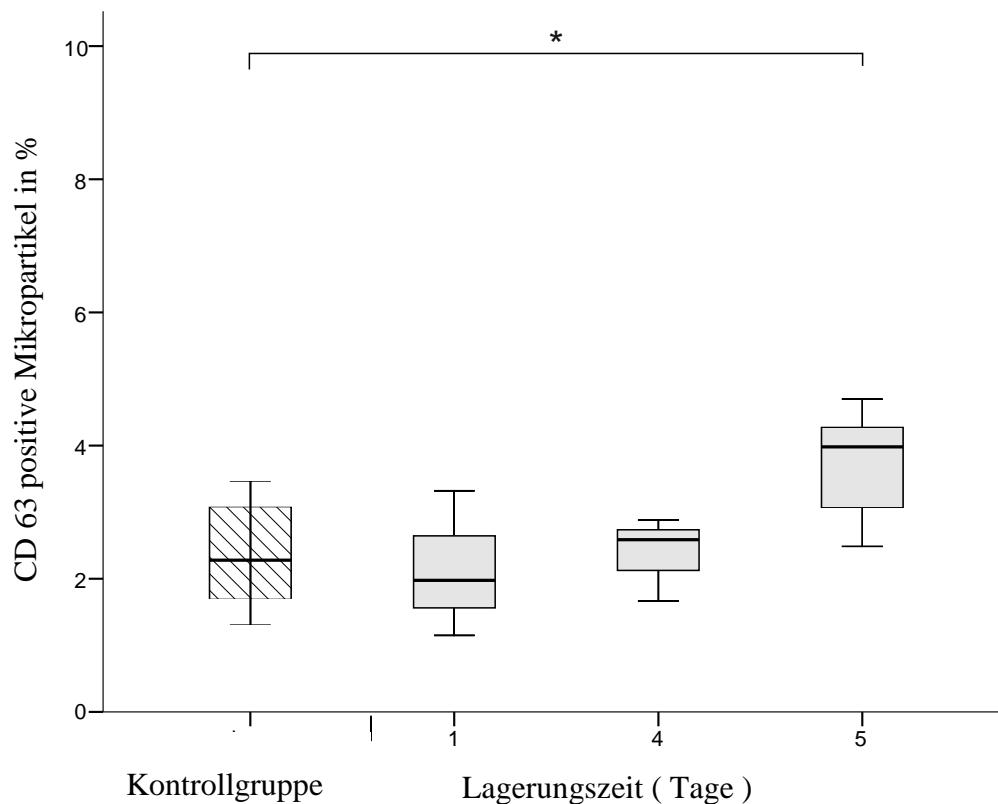


Abbildung 10: Veränderung der CD 63 positiven Mikropartikel Anzahl im Laufe der Lagerung

Boxplots mit Medianwerten und Interquartilsabständen

*= $p<0.05$

4.7.5. Veränderung der CD 62-P positiven Mikropartikel

Thrombozytenkonzentrate enthalten nach fünftägiger Lagerung signifikant erhöhte Anteile von CD 62 P-präsentierenden Mikropartikeln, also Mikropartikel, welche von aktivierten Thrombozyten stammen.

Hierbei wurde bei Thrombozytenkonzentraten, die einen Tag gelagert worden waren, ein Wert von $263 \times 10^6/\text{L}$ (49–344) gemessen.

Dieser Wert war bei vier Tage gelagerten Thrombozytenkonzentraten im Mittel um das 1,5-fache erhöht, nämlich auf im Mittel $398 \times 10^6/\text{L}$ (183–830) und stieg bei fünftägiger Lagerung auf einen Wert, im Vergleich zum Eintageswert von $578 \times 10^6/\text{L}$ (423–1254), was einer Zunahme um den Faktor 2,2 entspricht.

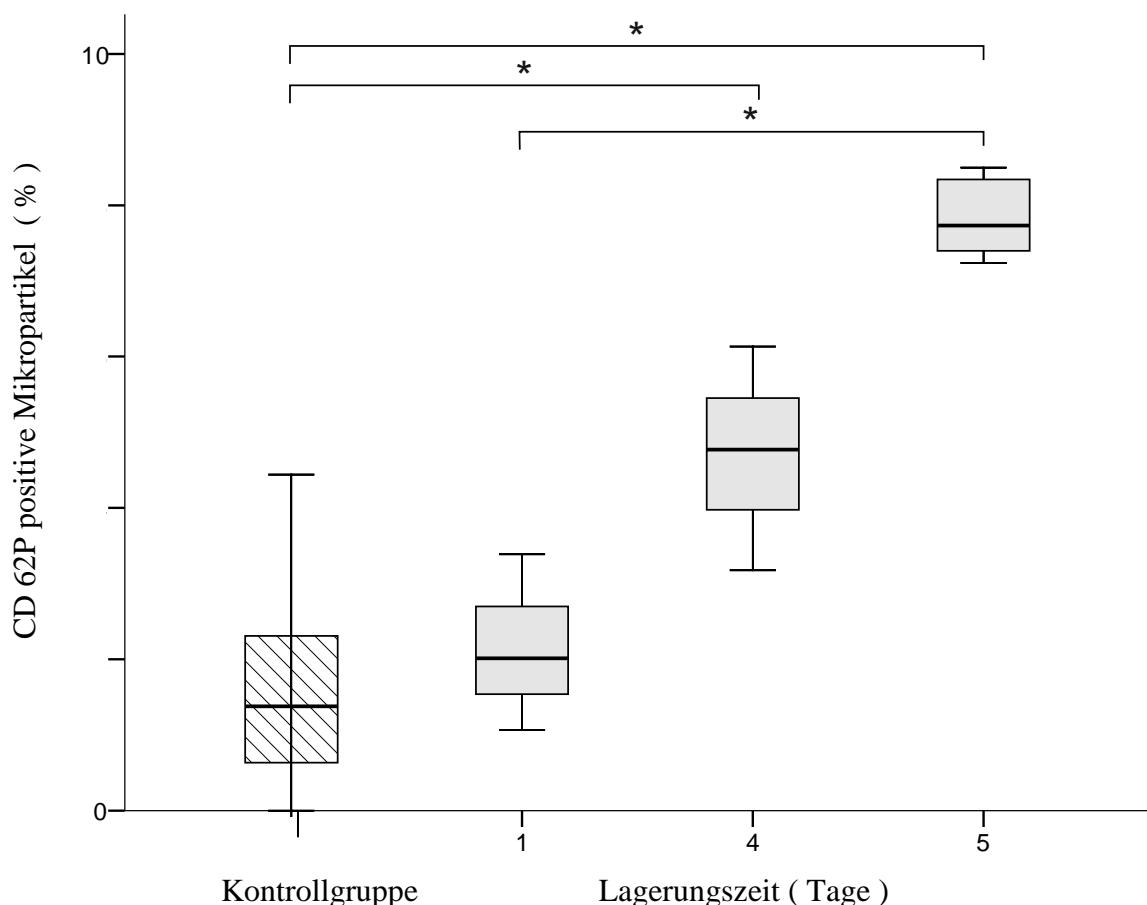


Abbildung 11: Anstieg der CD 62-P positiven Mikropartikel im Laufe der Lagerung in Prozent

Boxplots mit Medianwerten und Interquartilsspannen

*= $p<0.05$

4.7.6. Veränderung der CD 62-E positiven Mikropartikel

Der Anteil CD 62-E positiver, von Endothelzellen entstammender Mikropartikel veränderte sich während der Lagerung nicht signifikant.

Hierbei waren bei eintägiger Lagerung Werte von $775 \times 10^6/\text{L}$ (665–1129) nachweisbar. Nach viertägiger Lagerung konnten $1056 \times 10^6/\text{L}$ (707–1384) Mikropartikel gemessen werden, bei fünftägiger Lagerung $840 \times 10^6/\text{L}$ (622–2028) CD 62-E positive Mikropartikel.

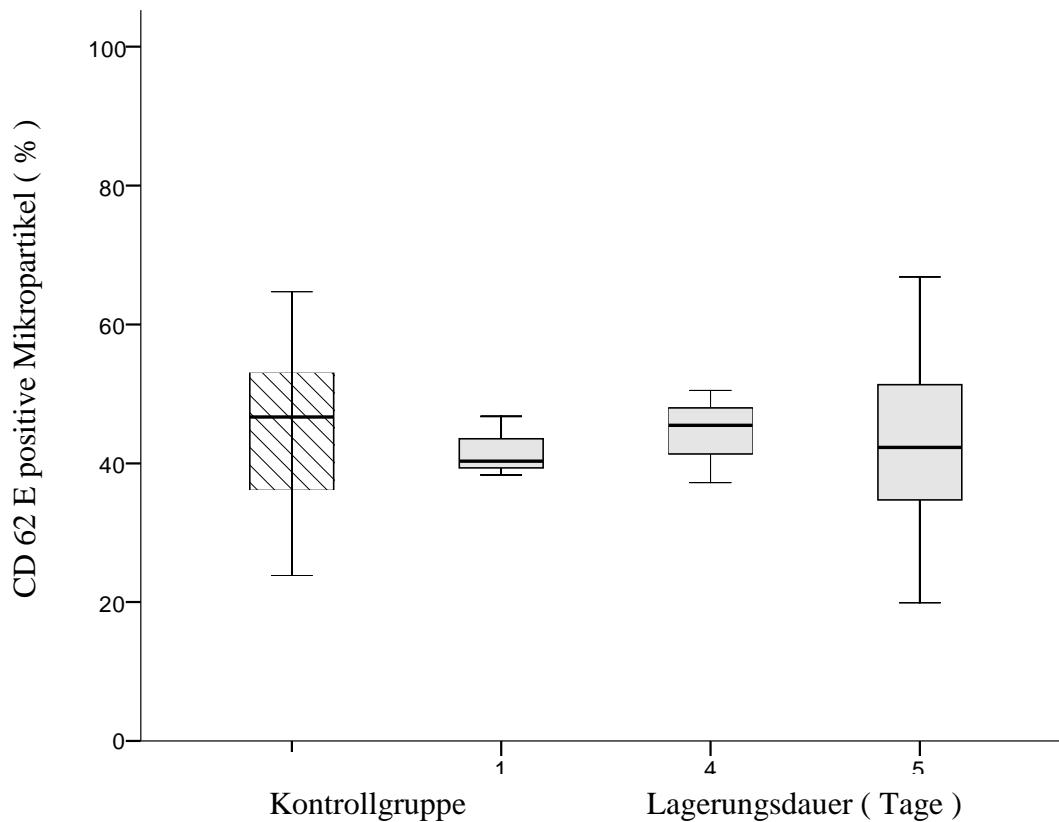


Abbildung 12: Veränderung der CD 62-E positiven Mikropartikel im Laufe der Lagerung in Prozent

Boxplots mit Medianwerten und Interquartilsspannen

4.8. Veränderungen der Thrombozytenzahl nach Transfusion *in vivo*

Nach der Thrombozyten-Transfusion konnte ein signifikanter Anstieg ($p < 0,05$) der Thrombozytenzahlen zu jedem gemessenen Zeitpunkt, unmittelbar nach Ende der Transfusion, nach einer Stunde und nach drei Stunden nachgewiesen werden. Von einem Ausgangswert, im Mittel 8 G/l (2–18), war unmittelbar nach Beendigung der Übertragung ein deutlicher Anstieg des Thrombozyten-Werts von im Mittel 31 G/l (7–58) messbar. Dieser Wert wurde nach einer Stunde, mit im Mittel 21 G/l (13–49) unterschritten und drei Stunden nach Beendigung der Transfusion mit 22 G/l (13–57) erneut bestimmt.

Die errechnete Halbwertszeit der transfundierten Thrombozyten lag bei 24 Stunden.

	<i>Patienten</i>			<i>TK</i>
	<i>vor Transfusion</i>	<i>0 h</i>	<i>1 h</i>	<i>3 h</i>
<i>n=</i>	11	11	11	11
<i>Thrombozyten</i>	8	31	21	22
<i>[x10⁹/l]</i>	(2-18)	(7-58) *	(13-49) *	(13-57) *
				(1072-1229)

Tabelle 3: Thrombozytenzahlen in Konzentrat und Patient sowie im Verlauf nach Transfusion (TK = Thrombozytenkonzentrat)

Anzahl der Thrombozyten im Median

(Q1-Q3 (Interquartile range)).

* $p < 0,05$ „vor Transfusion“

4.9. Veränderungen der Mikropartikelzahl in vivo nach Transfusion

4.9.1 Veränderung der Gesamtanzahl an Mikropartikeln

Ausgehend von einem Wert von $691 \times 10^6/\text{L}$ (405–796) Annexin-V positiven Mikropartikeln vor Beginn der Transfusion, kam es unmittelbar nach Beendigung der Transfusion zu einem signifikanten Anstieg der Gesamtzahl an Mikropartikeln.

Hierbei konnte im Mittel ein Wert von $1750 \times 10^6/\text{L}$ (1136–3793) gemessen werden.

Nach einer Wartezeit von einer Stunde wurde erneut die Gesamtmenge der vorhandenen Mikropartikeln bestimmt. Dabei konnten, mit im Durchschnitt $1463 \times 10^6/\text{L}$ (772–2519) geringere Werte als unmittelbar nach dem Ende der Transfusion bestimmt werden. Dieser lag jedoch noch signifikant über dem Ausgangswert.

Nach weiteren zwei Stunden Wartezeit, also drei Stunden post transfusionem wurde eine erneute Bestimmung der Gesamtzahl der Mikropartikel durchgeführt. Auch hier konnten noch erhöhte, wenngleich insgesamt abnehmende Werte, von $1415 \times 10^6/\text{L}$ (529–2433) für Annexin-V positive Mikropartikel bestimmt werden.

Zu jedem Messzeitpunkt konnten signifikant erhöhte Mengen an Mikropartikeln gemessen werden. Die gemessenen Höhen nahmen jedoch im Laufe der Messreihen ab.

<i>Zeit nach Transfusion</i>				
	<i>Vor Transfusion</i>	<i>0 h</i>	<i>1 h</i>	<i>3 h</i>
<i>n=</i>	11	11	11	11
<i>Annexin-V+MP</i>	691	1750	1463	1415
<i>[x10⁶/L]</i>	(405-796)	(1136-3793)*	(772-2519)*	(529-2433)*

Tabelle 7: Gesamtzahl an Mikropartikeln und Veränderung nach Transfusion

Anzahl im Median (Q1–Q3 (Interquartile range)).

* p<0.05 „vor Transfusion“

4.9.2 Veränderung der CD 61 positiven Mikropartikel

Auch für CD 61 positive Mikropartikel konnte ein signifikanter Anstieg der Mikropartikel-Anzahl nach Ende der Transfusion *in vivo* nachgewiesen werden.

Ausgehend von $490 \times 10^6/\text{L}$ (379–647) CD 61 positiven Mikropartikel konnten hierbei zum Zeitpunkt unmittelbar nach Ende der Transfusion mit im Mittel $1417 \times 10^6/\text{L}$ (626–3544) mehr CD 61 positive Mikropartikel belegt werden.

Eine Stunde nach Beendigung der Transfusion konnten mit $1260 \times 10^6/\text{L}$ (486–2269) noch signifikant erhöhte, wenngleich auch abnehmende Werte an CD 61 positiven Mikropartikel dokumentiert werden. Auch die Messung drei Stunden nach Beendigung der Transfusion erbrachte noch statistisch relevant erhöhte Werte für CD 61 positive Mikropartikel von $1106 \times 10^6/\text{L}$ (373–2143).

Zu jedem Messzeitpunkt konnten somit erhöhte Mengen an CD 61 positiven Mikropartikeln gemessen werden. Die gemessenen Höhen nahmen jedoch im Laufe der Messreihen ab.

	<i>Zeit nach Transfusion</i>			
	<i>vor Transfusion</i>	<i>0 h</i>	<i>1 h</i>	<i>3 h</i>
<i>n=</i>	11	11	11	11
CD61+MP	490	1417	1260	1106
<i>[x10⁶/L]</i>	(379-647)	(626-3544)*	(486-2269)*	(373-2143)*

Tabelle 8: Gesamtzahl an CD 61 positiven Mikropartikeln und Veränderung nach Transfusion

Anzahl im Median (Q1-Q3 (Interquartile range)).

* p<0.05 „vor Transfusion“

4.9.3. Veränderung der CD 63 positiven Mikropartikel

Unmittelbar nach Beendigung der Transfusion kam es zu einem Anstieg CD 63-positiver Mikropartikel, hierbei konnte im Mittel ein Wert von $70 \times 10^6/\text{L}$ (46–144) gemessen werden.

Nach einer Wartezeit von einer Stunde wurde erneut die Höhe CD 63-positiver Mikropartikel gemessen. Hierbei konnten mit im Durchschnitt $45 \times 10^6/\text{L}$ (30–92) geringere Werte als unmittelbar nach dem Ende der Transfusion bestimmt werden.

Nach weiteren zwei Stunden Wartezeit, also drei Stunden post transfusionem wurde eine erneute Bestimmung durchgeführt. Auch hier konnten noch erhöhte, wenngleich abnehmende Werte $56 \times 10^6/\text{L}$ (25–132) für CD 63 positive Mikropartikel bestimmt werden.

Sämtliche gemessene Werte waren gegenüber dem Ausgangswert von $37 \times 10^6/\text{L}$ (13–51) CD 63 positiven Mikropartikeln signifikant erhöht.

	<i>Zeit nach Transfusion</i>			
	<i>vor Transfusion</i>	<i>0 h</i>	<i>1 h</i>	<i>3 h</i>
<i>n=</i>	11	11	11	11
CD63+MP	37	70	45	56
<i>[x10⁶/L]</i>	(13-51)	(46-144)*	(30-92)*	(25-132)*

Tabelle 9: Gesamtzahl an CD 63 positiven Mikropartikeln und Veränderung nach Transfusion

Anzahl im Median (Q1-Q3 (Interquartile range)).

* p<0.05 „vor Transfusion“,

4.9.4. Veränderung der CD 62-P positiven Mikropartikel

Auch für CD 62-P positive Mikropartikel konnte ein Anstieg der Mikropartikel-Anzahl nach Ende der Transfusion *in vivo* nachgewiesen werden. Ausgehend von $21 \times 10^6/L$ (5–46) CD 62-P positiven Mikropartikel konnten hierbei zum Zeitpunkt unmittelbar nach Ende der Transfusion mit im Mittel $53 \times 10^6/L$ (14–142) signifikant mehr CD 62-P positive Mikropartikel belegt werden.

Zum Zeitpunkt der dritten Probeentnahme, eine Stunde nach Beendigung der Transfusion konnten mit $44 \times 10^6/L$ (24–96) noch signifikant erhöhte, wenngleich auch abnehmende Werte an CD 62P positiven Mikropartikel gemessen werden.

Auch die vierte Entnahme, drei Stunden nach Beendigung der Transfusion erbrachte noch statistisch relevant erhöhte Werte für CD 62P positive Mikropartikel $37 \times 10^6/L$ (20–106).

Es zeigte sich, nach einem Maximum nach Transfusion, eine stetige Abnahme der Mikropartikel-Anzahl im Laufe der Messzeitpunkte.

	<i>Zeit nach Transfusion</i>			
	<i>Vor Transfusion</i>	<i>0 h</i>	<i>1 h</i>	<i>3 h</i>
<i>n=</i>	11	11	11	11
<i>CD62P+MP</i>	21	53	44	37
<i>[x10⁶/L]</i>	(5–46)	(14–142)*	(24–96)*	(20–106)*

Tabelle 10: Gesamtzahl an CD 62-P positiven Mikropartikeln und Veränderung nach Transfusion

Anzahl im Median (Q1-Q3 (Interquartile range)).

* p<0.05 „vor Transfusion“,

4.9.5. Veränderung der CD 62-E positiven Mikropartikel

Wohl ein Trend, aber kein signifikanter Anstieg von endothelialen, CD 62-E positiven Mikropartikeln konnte nachgewiesen werden.

Hierbei waren die Mikropartikel-Zahlen zum Zeitpunkt vor der Transfusion mit $258 \times 10^6/L$ (202–436) nicht signifikant verändert zum Zeitpunkt nach Transfusion mit $315 \times 10^6/L$ (232–593), sowie zum Zeitpunkt eine Stunde nach Beendigung der Transfusion mit $330 \times 10^6/L$ (239–481).

Auch der letzte Messpunkt, drei Stunden nach Ende der Transfusion zeigte keine signifikante Veränderung für CD 62-E positive Mikropartikel.

	<i>Zeit nach Transfusion</i>			
	<i>Vor Transfusion</i>	<i>0 h</i>	<i>1 h</i>	<i>3 h</i>
<i>n=</i>	11	11	11	11
CD62E+MP	258	315	330	302
<i>[x10⁶/L]</i>	(202-426)	(232-593)	(239-481)	(224-482)

Tabelle 10: Gesamtzahl an CD 62-E positiven Mikropartikeln und Veränderung nach Transfusion

Anzahl im Median (Q1-Q3 (Interquartile range)).

4.10. Berechnung der Halbwertszeit von Mikropartikeln nach Transfusion in vivo

Sowohl die Gesamtzahl der gemessenen Mikropartikel, als auch die Anzahl thrombozytärer Mikropartikel waren unmittelbar nach Beendigung der Transfusion signifikant erhöht.

Es kam zu einer statistisch relevanten Abnahme der gemessenen Höhen zu jedem Messzeitpunkt.

Für Annexin-V positive Mikropartikel konnte eine Halbwertszeit von 5,8 Stunden (1,8–18,3 Stunden) berechnet werden.

Thrombozytäre, CD 61 positive Mikropartikel nahmen mit einer Halbwertszeit von 5,3 Stunden (2,0–14,2 Stunden) ab.

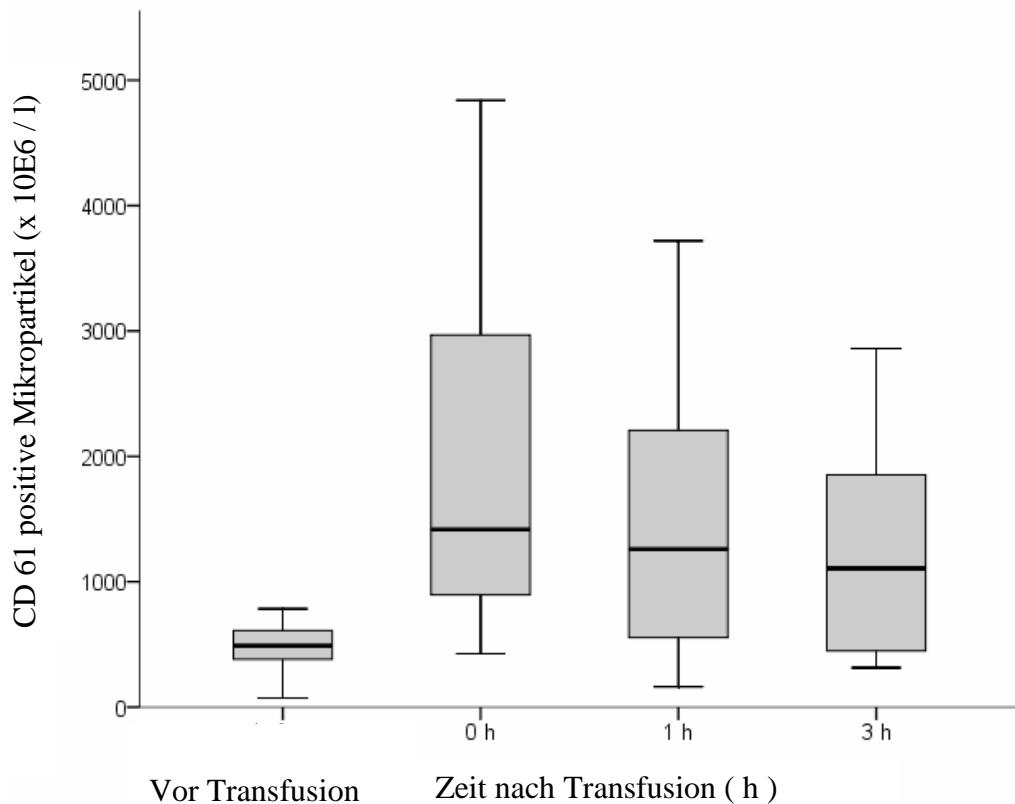


Abbildung 13: Anstieg und Abfall von CD 61 positiven Mikropartikeln nach Transfusion
Boxplots mit Medianwerten und Interquartilsspannen

5. Diskussion

5.1. Aufbau und Funktion von Thrombozyten

Thrombozyten wurden erstmals 1836 von Hermann Nasse als „seltsame kleine Kugelchen oder Körner, die sich zu unregelmäßigen Haufen verbinden und verbacken“ beschrieben [65]. 1860 beschrieben Gustav Zimmermann und 1865 Max Schultze Thrombozyten als dritte Gruppe der Blutkörperchen des menschlichen Blutes. Anfangs wurden Thrombozyten als Vorstufen der Erythroblasten angesehen und von Zimmermann als Hämoblasten bezeichnet. Es vergingen fast 20 Jahre, bis der Italiener Giulio Bizzozero erstmals die Aufgaben von Thrombozyten erforschte [66, 67]. Es gelang ihm, mittels eines Fadens, den er durch ein Mesenterialgefäß zog, die Aggregation von Thrombozyten experimentell zu beweisen. Als kleinste zelluläre Bestandteile des komplexen Systems der Blutgerinnung haben Thrombozyten lediglich einen Durchmesser von $2\text{-}5\mu\text{m}$ und eine Dicke von $0,3\text{-}0,5\mu\text{m}$ [67].

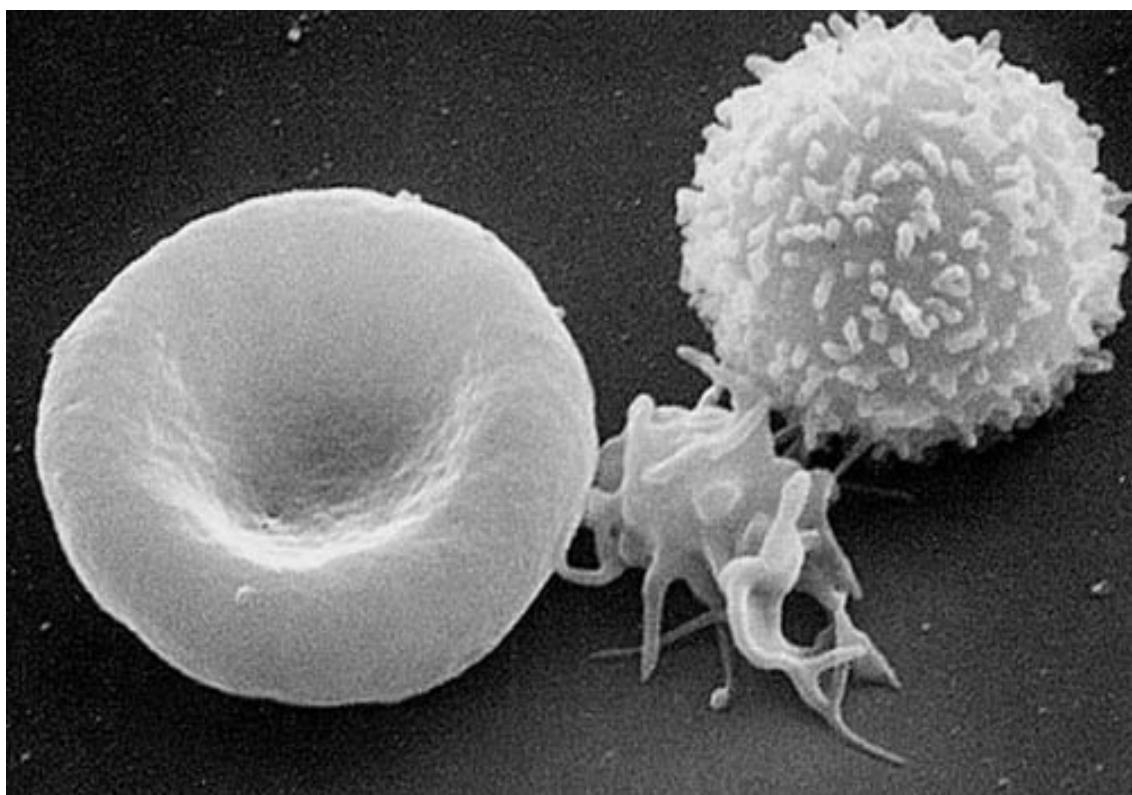


Abbildung 14: Von links nach rechts: Erythrozyt, aktiverter Thrombozyt mit Pseudopodien und Leukozyt

Elektronenmikroskopische Aufnahme von Blutzellen [68]

Thrombozyten entstehen durch Abschnürung aus Megakaryozyten, welche mit einer Größe von bis zu 0,1 mm zu den größten Zellen im menschlichen Körper gehören und hauptsächlich im roten, blutbildenden Knochenmark lokalisiert sind. Hier kommen sie mit einer Häufigkeit von circa sechs Millionen pro Kilogramm Körpergewicht vor. Dabei machen sie jedoch lediglich ca. 1% der im Knochenmark lokalisierten Zellen aus [69]. Täglich entstehen auf diese Weise etwa 35×10^9 Thrombozyten pro Kilogramm Körpergewicht [64]. Etwa ein Drittel der entstandenen Thrombozyten verbleiben in der Milz, um bei einer Verletzung sofort in hoher Zahl ins zirkulierende Blut abgegeben werden zu können. Hier können sie bis zu 36 Stunden verweilen [66].

Die restlichen zwei Drittel werden ins periphere Blut abgegeben. Unter physiologischen Bedingungen bleiben sie dort für sieben bis zehn Tage, um danach in Lunge und Milz abgebaut zu werden [67].

Ihre Hauptaufgabe liegt in der Adhäsion an verletzte Gefäßwände oder in der Aggregation mit anderen Thrombozyten zur Bildung des so genannten Thrombozytenpfropfes im Rahmen der physiologischen Blutstillung. Thrombozyten haben einen hierfür ausgerichteten spezifischen Aufbau. Sie bestehen aus drei verschiedenen Zonen:

Die periphere Zone besteht aus einer trilaminären Doppel lipidmembran, welche mittels verschiedenen Glykoproteinen für die Anheftung des Thrombozyten an die verletzte Gefäßwand zuständig ist.

Die intrazelluläre Sol-Gel-Zone enthält die Zellorganellen und erlaubt mittels eines kontraktilen Cytoskelettes eine Konformitätsänderung. Hierdurch wird die typische Veränderung der Form nach Aktivierung ermöglicht. Mittels exozytotischer Sekretion von Speichergranula können wichtige Voraussetzungen für die Blutgerinnung, wie die Vasokonstriktion, die Thrombozytenaggregation und die Akzeleration der Hämostase ermöglicht werden [64]. Die Oberfläche stellt zudem den Ort der Aktivierung der Gerinnungskaskade der plasmatischen Gerinnung dar.

Eine zusätzliche Funktion der Thrombozyten ist die Steuerung des Serotonin-Spiegels im Blut, da sie in ihren Delta-Granula Serotonin speichern können.

Die Wichtigkeit der Thrombozyten wird bei Patienten mit einem Mangel an funktionsfähigen Thrombozyten deutlich. Hierbei kommt es zu einem großen Blutungsrisiko, welches die Patienten im Alltag und in Notfallsituationen erheblich vital gefährdet.

W. Duke erkannte bereits 1910 den Zusammenhang zwischen einer verminderten Anzahl an Thrombozyten und dem Auftreten von lebensbedrohlichen Blutungen [68, 69].

Hierdurch erklärt sich die Notwendigkeit, Patienten mit einer Verminderung der Thrombozyten-Anzahl oder einer Störung der Thrombozytenfunktion in Abhängigkeit der klinischen Situation Thrombozyten zu transfundieren und somit eine funktionierende Blutgerinnung aufrecht zu erhalten [70].

5.2. Herstellung von Thrombozytenkonzentraten

Thrombozytenkonzentrate werden aus menschlichem Spenderblut als leukozytenarme Konzentrate hergestellt [71]. Ihre Haltbarkeit wird in der Querschnittsleitline 2009 der Bundesärztekammer zur Therapie mit Blutkomponenten und Plasmaderivaten noch mit fünf Tagen angegeben, diese wurde jedoch zwischenzeitlich aufgrund vermehrter bakterieller Kontaminationen im Laufe der Lagerung auf 4 Tage begrenzt [72, 73].

Sie werden in sterilen, gaspermeablen Kunststoffbeuteln abgefüllt und gelten als Arzneimittel, zugehörig der Stoffgruppe der zellulären Blutzubereitungen [73, 74].

Das Arzneimittel setzt sich aus menschlichen Blutplättchen in einer Konzentration von mehr als $2 \times 10^{11}/\text{ml}$ und sonstigen Bestandteilen wie humanem Plasma und einer ACDA-Lösung (Acid-Citrat-Dextrose-Adenin) zusammen. Eine geringe Restmenge von weißen Blutkörperchen ($< 1 \times 10^6/\text{ml}$) und roten Blutkörperchen ($< 3 \times 10^9/\text{ml}$) ist als Verunreinigung möglich [61].

Thrombozytenkonzentrate unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Herstellung, Anzahl an Plättchen, Volumens und dem Verunreinigungsgrad an weißen Blutkörperchen.

Zur Herstellung von zellulären Blutpräparaten wird Spenderblut mittels Zentrifugation in seine Bestandteile aufgetrennt. Hierbei wird das unterschiedliche Verhalten von verschiedenen schweren Zellen unter Rotation ausgenutzt. Jedes Teilchen bewegt sich dabei mit einer gewichtsspezifischen Geschwindigkeit vom Rotationszentrum weg und kann somit von den Restbestandteilen getrennt werden [61].

Zur Herstellung können entweder Vollblut-Spenden verwendet werden oder es kann das Prinzip der Apherese zum Einsatz kommen [71].

5.2.1. Herstellung aus Vollblutspenden

Vollblutspenden haben ein Volumen von 450–500 ml pro Spende. Dieses wird mit 63–70 ml einer Citrat-Phosphat-Dextrose-Stabilisatorlösung versetzt [73].

Grundsätzlich stehen hierbei zwei unterschiedliche Methoden zur Herstellung zur Verfügung:

Bei der PRP (Plättchenreiches Plasma)-Methode wird zunächst mittels Zentrifugation ein plättchenreiches Plasma erzeugt, welches anschließend weiterverarbeitet wird.

Als weitere Methode kann die so genannte Buffy-Coat-Methode zur Anwendung kommen. Dabei werden nach primärer Zentrifugation mit hoher Rotation ein Plättchen-Armes-Plasma, eine Schicht mit 60–90 % der Thrombozyten der Vollblutspende, der BC (Buffy-Coat) und eine Schichtung mit hauptsächlich Erythrozyten gewonnen [1]. Der Buffy-Coat hat hierbei ein Volumen von ca. 60 ml. Um hieraus ein Thrombozytenkonzentrat zu gewinnen, muss eine geeignete Menge aus vier bis sechs kompatiblen PRPs oder BCs zusammengeführt werden.

Das Endprodukt ist somit eine Einheit aus gepoolten Thrombozyten mit einer Konzentration von $240\text{--}360 \times 10^9$ Thrombozyten, welches in 200 ml Plasma gelagert wird [73, 75].

Nachteile von BC- oder PRP-Thrombozytenkonzentraten sind ein erhöhtes Infektionsrisiko sowie das Risiko von unerwünschten Nebenwirkungen durch das Vermischen von Alloantigenen der verschiedenen Spender [76].

5.2.2. Herstellung mittels Apherese

Eine etablierte Methode Blutprodukte herzustellen ist das Apherese-Verfahren [77].

Hierbei werden mittels speziellen Zellseparatoren auf vollautomatisiertem Standard Thrombozytenkonzentrate hergestellt. Diese Verfahren sind zeitsparend und effektiv, da das Spenderblut sofort weiterverarbeitet werden kann.

Abhängig von der Höhe der Thrombozyten-Anzahl des Spenders bietet dieses Verfahren zusätzlich die Option, eine doppelte Spendeeinheit aus einer Spende zu gewinnen, wobei jeweils eine vollwertige Konserve gewonnen werden kann [1].

Das von uns angewandte Sammelsystem, das TrimaTM- Apherese-System, arbeitet mit fünf Pumpen, die sich auf der Frontplatte befinden: Zufluss-, Antikoagulanz, Thrombozyten-,

Plasma- und Rückflusspumpe.

Hiermit werden aus Vollblut Thrombozyten, Plasma und Erythrozyten separiert, in Beuteln gesammelt oder die nicht benötigten Bestandteile direkt an den Spender zurückgeführt [71].

5.2.2.1. Apherese mittels diskontinuierlichem Herstellungsprozess

Wird ein diskontinuierliches Verfahren gewählt, so wird dem Spender Blut aus einer peripheren Vene in das System gesogen. Hier erfolgt eine Vermischung mit Antikoagulanz und anschließend eine Zentrifugation.

Während das Blut getrennt wird, werden die Plättchen und das Plasma abgepumpt.

Die roten Blutkörperchen werden dabei durch den Druck des Spenderblutes, welches in die Zentrifuge gedrückt wird, aus der Zentrifuge in einen Rücklaufbehälter gedrückt und nach Erreichen einer definierten Menge über die kanülierte Vene an den Spender zurückgepumpt [71]. Die Menge des dem Spender entnommenen Blutes darf dabei hierbei maximal fünfzehn Prozent des Gesamtvolumens des Spenders nicht überschreiten.

Der Vorteil des diskontinuierlichen Verfahrens ist, dass der Spender nur an einer Vene punktiert werden muss.

Als weitere Möglichkeit steht ein kontinuierliches Verfahren zur Verfügung.

5.2.2.2. Apherese mittels kontinuierlichem Herstellungsprozess

Wird das Verfahren der kontinuierlichen Apherese gewählt, müssen zwei periphere Venen punktiert werden.

Aus der ersten Vene wird das Spenderblut entnommen und zum Separator geführt. Auch hier erfolgt eine Vermischung mit Antikoagulanz und eine Zentrifugation wie oben beschrieben. Über die zweite Punktionsstelle kann die Rückführung der nicht benötigten Blutbestandteile kontinuierlich stattfinden.

Ein Vorteil des Apherese-Verfahrens ist, dass der Spender keiner Volumenbelastung ausgesetzt wird, da ihm nicht benötigte Blutbestandteile in gleicher Sitzung zurückgeführt werden können. Für den Empfänger bietet dieses Verfahren den Vorteil einer reduzierten Infektionsgefahr, sowie einer verminderten Alloantigenbelastung, da die Spende aus einem einzigen Spender hergestellt werden kann [1].

Aufgrund der Bauart der Apheresegeräte und der eingesetzten Filter können die vorgeschriebenen Grenzwerte für Leukozyten von maximal 1×10^6 Leukozyten pro Einheit eingehalten werden [78].

5.3. Veränderung der Thrombozytentanzahl nach Transfusion

Unmittelbar nach Beendigung der Transfusion kam es in unserem Patientenkollektiv zu einem Anstieg der Thrombozytentanzahl von im Schnitt 8000 G/l auf 31000 G/l. Dieser Wert sank dann im Laufe von drei Stunden auf Werte von im Mittel 22000 G/l ab.

Ermittelt man die Mengen an Thrombozyten welche in den Thrombozytenkonzentraten enthalten sind, so kann diese mit 1.176 G/l gemessen werden. Bei einem durchschnittlichen Volumen von 251ml pro Konserven bedeutet dies eine Gesamtzahl an transfundierten Thrombozyten von im Schnitt 294×10^6 Thrombozyten.

Wird nun ein durchschnittliches Verteilungsvolumen von fünf Liter im Empfänger angenommen, so würde dies einem Anstieg um 58.900 G/l im Patientenserum entsprechen. Tatsächlich konnte jedoch nur ein Anstieg auf Werte von im Mittel 31.000 G/l gemessen werden. Ursächlich für den rechnerisch inadäquaten Anstieg muss der Pool-Effekt der Milz angenommen werden, von wo aus es zu einer langsamen Abgabe in das Blut des Patienten kommt [79].

Transfundierte Thrombozyten haben im Vergleich zu nativen Thrombozyten eine verkürzte Lebenszeit. Hanson et. al. beschrieben eine Überlebenszeit eines Spender-Thrombozyten von im Schnitt 3,4 Tagen bei einer Thrombozyten Menge von < 50.000 G/l und zeigten, dass Thrombozytopenie per se die Lebensdauer eines Thrombozyten in vivo, post transfusionem verkürzt. Auch konnte eine große Varianz der Lebenszeit in Abhängigkeit von der Ausgangsmenge an Thrombozyten im Blut gezeigt werden [80].

In unseren Untersuchungen konnten wir eine durchschnittliche Halbwertszeit der transfundierten Thrombozyten von im Mittel 24 Stunden nach Transfusion berechnen, bei einer Thrombozytentanzahl von im Schnitt 8000 G/l vor Beginn der Transfusion.

Eine Halbwertszeitberechnung von transfundierten Thrombozyten ist bisher nicht beschrieben worden.

Vergleicht man die Zeiten von Hanson et. al. mit unseren Berechnungen, so zeigt sich in beiden Arbeiten eine doch erheblich zeitlich verkürzte Lebenszeit von transfundierten Thrombozyten bei thrombozytopenen Patienten.

Als Ursache hierfür können sowohl der vermehrte „Grundbedarf“ an Thrombozyten angenommen werden, um vorhandene Gefäßschäden zu verschließen, als auch ein vermehrter Abbau der bereits zum Zeitpunkt der Transfusion gealterten Thrombozyten.

5.4. Mikropartikel in Thrombozytenkonzentraten

Dass Thrombozytenkonzentrate Mikropartikel enthalten, ist eine durch mehrere Untersuchungen gut belegte Tatsache [3, 60, 81]. Über Art und Herkunft der Mikropartikel wurde bisher jedoch nur wenig publiziert.

5.4.1. Gesamtzahl an Mikropartikeln

Wie erwartet fanden wir in den gemessenen Thrombozytenkonzentraten eine nicht unerhebliche Menge an Mikropartikeln.

Die von uns gemessenen Mikropartikel entstammen mit höchster Wahrscheinlichkeit dem Blut der Spender und werden während des Apheresevorgangs im Konzentrat mitangereichert.

Bei diesem Verfahren werden das unterschiedliche Gewicht und damit das unterschiedliches Verhalten der einzelnen Blutbestandteile bei der Zentrifugation ausgenutzt, um diese in die einzelnen Fraktionen des Blutes aufzutrennen.

Indem Thrombozyten die leichteste Fraktion der korpuskulären Bestandteile des Blutes ausmachen, bewegen sich diese am wenigsten weit vom Rotationszentrum weg und können somit separiert werden. Da Mikropartikel ein noch geringeres Gewicht haben, werden diese somit am ehesten in der Fraktion der Thrombozyten mitangereichert. Dass sowohl thrombozytäre, als auch endotheliale Mikropartikel mit einer ähnlich hohen Anreicherung, im Konzentrat gefunden wurden, nämlich mit einer 2,3-fachen Anreicherung, stützt diese Überlegung zusätzlich.

Die Anreicherung von Thrombozyten im Konzentrat entspricht in etwa der doppelten Menge der von Mikropartikeln. Diese werden um den Faktor 4,8 fach so stark angereichert wie Mikropartikel. Die Tatsache, dass sich Mikropartikel nur halb so häufig in Konzentraten finden wie Thrombozyten, erklärt sich ebenfalls mit dem Gewichtsunterschied zwischen Mikropartikel und Thrombozyten und der damit unterschiedlichen Sedimentation während der Rotation, als auch aus der Tatsache, dass

unter Laborbedingungen für die Sedimentation von Mikropartikeln eine extrem hohe und lange andauernde Zentrifugation genutzt werden muss, um Mikropartikel anzureichern, wohingegen die Technik der Apherese mit einer wesentlich geringeren Umdrehungszahl und auch kürzeren Kontaktzeit arbeitet und somit die wesentlich leichteren Mikropartikel in nur geringerem Umfang in das Konzentrat gelangen als die schwereren Thrombozyten.

Ein weiterer Erklärungsversuch für die hohen Mikropartikel Anteile in Thrombozytenkonzentraten könnte sein, dass sich bereits vor der Apherese im Körper des Spenders gebildete Komplexe aus zum Teil aktivierten thrombozytären Mikropartikeln nach der Apherese im Konzentrat lösen und somit eine hohe Anzahl an Mikropartikeln freisetzen.

5.4.2. CD 61 positive Mikropartikel

CD 61 positive Mikropartikel stellen die größte Fraktion der Mikropartikel im Blut gesunder Menschen dar [11]. Dies bestätigte sich auch durch unsere Messungen im Blut der Kontrollgruppe. Da davon auszugehen ist, dass Mikropartikel während der Herstellung der Thrombozytenkonzentrate mitangereichert werden, erwarteten wir auch in den von uns gemessenen Konzentraten, dass die CD 61 positiven Mikropartikel am stärksten vertreten sind. Es bestand lange die Annahme, dass 70-90 % aller im Plasma vorhandenen Mikropartikel von aktivierten Thrombozyten stammen. 2009 konnten Flaumenhaft et al. zeigen, dass Megakaryozyten ebenso CD 61 positive Mikropartikel bilden können. Diese unterscheiden sich von den Mikropartikeln, welche von aktivierten Thrombozyten stammen, in der fehlenden Expression von P-Selectin und LAMP-1 Rezeptoren [10]. Diese Phosphatidylserin-positiven Partikel werden in der Zellkultur von Megakaryozyten des Menschen und auch der Maus gebildet und stellen die größte Population der thrombozytären Mikropartikel im menschlichen Plasma von gesunden Personen dar.

Wenngleich die Erkenntnis, dass thrombozytäre Mikropartikel vor allem von Megakaryozyten abstammen, weitere wissenschaftliche Absicherung erfordert, so konnte doch nachgewiesen werden, dass CD 61 positive Mikropartikel nach Bestrahlung des Knochenmarkes, dem Sitz der Megakaryozyten, weitestgehend verschwinden. Hingegen persistieren CD 62-P positive Mikropartikel nach solcher Prozedur [11]. Dies spricht für eine überwiegende Herkunft der CD 61 positiven Mikropartikel aus Megakaryozyten.

5.4.3. CD 63 / CD 62-P positive Mikropartikel

In den von uns gemessenen Thrombozytenkonzentraten konnten erhöhte Mengen an Mikropartikel aktiverter Thrombozyten gemessen werden.

Hierbei waren sowohl CD 63 positive Mikropartikel als auch CD 62-P positive Mikropartikel nachweisbar. Die in den Thrombozytenkonzentraten gemessenen Mikropartikelmengen waren gegenüber den in der Kontrollgruppe gemessenen Werten 3,1 bzw. 8,6-fach höher für CD 63 bzw. für CD 62-P. Bereits 1996 konnten Miyazaki et al. nachweisen, dass physikalischer Stress zur einer Aktivierung von Thrombozyten und damit zu Aggregation oder Mikropartikel Freisetzung führt [25]. Die Herstellung von Thrombozytenkonzentraten mittels Rotation beziehungsweise Zentrifugation kann als solcher Reiz angesehen werden, was dementsprechend zu einer vermehrten Freisetzung von Mikropartikel aktiverter Thrombozyten führt, die auf Ihrer Oberfläche CD 62 P bzw. CD 63 tragen [82, 83].

Die von uns gemessenen Anreicherungsfaktoren von 3,1 für CD 63-positive Mikropartikel und 8,6 für CD 62-P-positive Mikropartikel, lagen über den Werten für endotheliale Mikropartikel oder den Werten für ruhende Mikropartikel, welcher 2,6 beziehungsweise 2,3 betrug.

Beide Argumente, nämlich der erhöhte physikalische Stress und die stärkere Anreicherung der aktivierte Mikropartikel im Konzentrat, sprechen für die Entstehung dieser Mikropartikel von aktivierte Plättchen während des Anreicherungsvorgangs.

Wären die erhöhten Mengen an Mikropartikeln der Tatsache geschuldet, dass die Konzentrate per se mehr Thrombozyten enthalten und damit zwangsläufig mehr Mikropartikel, so hätten wir einen ähnlich hohen Anreicherungsfaktor für ruhende wie aktivierte Mikropartikel erwartet.

Die Tatsache, dass es sich dennoch insgesamt lediglich um eine moderate Erhöhung der aktivierte Thrombozyten-Mikropartikel handelt, mag der Tatsache geschuldet sein, dass die Anreicherung mittels moderner Zentrifugen, in unserem Fall der TrimaTM, erfolgt.

5.4.4. CD 62-E positive Mikropartikel

Wir konnten erstmalig einen nicht unerheblichen Anteil an endothelialen Mikropartikeln in Thrombozytenkonzentraten nachweisen.

Hierfür verwendeten wir einen Antikörper gegen ein spezifisches Protein, das ausschließlich von Endothelzellen exprimiert wird: E-Selectin, welches mittels Antikörper gegen CD 62-E spezifisch nachgewiesen werden kann.

Endothiale Mikropartikel können als biologische Marker angesehen werden, welche eine Störung der Endothelfunktion anzeigen, da sie direkt von gealterten oder aktivierte Endothelzellen entstammen. Die in den Konzentraten nachgewiesenen endothelialen Mikropartikel stammen mit höchster Wahrscheinlichkeit aus dem Blut der Spender und wurden während des Herstellungsprozesses der Konzentrate in diesem angereichert. Da Thrombozytenkonzentrate während des Herstellungsprozesses mit ca. 250 ml Plasma des Spenders versetzt werden, könnte auch diskutiert werden, ob somit ein Transfer der endothelialen Mikropartikel aus dem Spender in die Konserven stattfindet.

Dieser These widerspricht die Höhe der in den Thrombozytenkonzentraten gemessenen Menge an endothelialen Mikropartikeln, welche um den Faktor 2,6 fach höher ist, als die Menge der endothelialen Mikropartikeln im Serum der Kontrollgruppe, also der potentiellen Spender.

Wären die gemessenen endothelialen Mikropartikel mit den 250 ml Plasma des Spenders transferiert worden, so würde man die gleiche Menge an Mikropartikeln im Plasma der Spender, wie im Konzentrat erwarten können.

Somit erklärt sich die hohe Anzahl an endothelialen Mikropartikeln in den Konzentraten am ehesten über eine Anreicherung im Konzentrat während des Vorgangs der Apherese.

Zum gegenwärtigen Zeitpunkt steht bedauerlicherweise keine Methode zur Verfügung eine Unterscheidung von endothelialen Mikropartikeln bezüglich ihrer Herkunft vorzunehmen. Somit kann nicht sicher geklärt werden, ob die gemessenen endothelialen Mikropartikel von Endothelzellen des Spenders entstammen oder ob diese von frei im Blut zirkulierenden Endothelzellen abstammen, welche mit im Konzentrat angereichert werden. Für den letzteren wäre ein Anstieg der endothelialen Mikropartikel im Laufe der Lagerung zu erwarten, da die eventuell vorhandenen Endothelzellen im Laufe der Zeit weiterhin Mikropartikel generieren müssten. Einen solchen Anstieg konnten wir jedoch nicht nachweisen.

Neben E-Selectin präsentieren Endothel-Mikropartikel eine weitere Vielzahl von Proteinen, inklusive HLA-Antigenen auf ihrer Oberfläche [49]. Da es bei Transfusionen mit zu den erklärten Zielen gehört, eine größere Übertragung von HLA-Antigenen zu vermeiden, könnte der Entdeckung eines erheblichen Anteils an endothelialen Mikropartikeln in Thrombozytenkonzentraten eine besondere Bedeutung zukommen. Während HLA-präsentierende Endothelzellen im Thrombozytenkonzentrat durch entsprechende Filter vom Empfänger ferngehalten werden können, entgehen Mikropartikel aufgrund Ihrer geringen Größe einer Filtration.

Eine größere Übertragung von endothelialen Mikropartikeln während einer Transfusion konterkariert zusätzlich den Versuch, eine Reduktion von HLA-Antigenen des Spenders an den Empfänger mittels Leukozytenfilter zu erzielen, da endotheliale Mikropartikel eben diese HLA-Antigene in hoher Dichte enthalten, [49] und es somit trotz des Einsatzes eines Filtersystems es zu eben genau dieser Übertragung von HLA-Molekülen kommt.

5.5. Veränderung der Mikropartikelzahlen während fünftägiger Lagerung der Thrombozytenkonzentrate

Über eine Veränderung der Mikropartikel-Anzahl und Zusammensetzung wurde bisher noch wenig publiziert. Aus diesem Grund untersuchten wir die Veränderungen sowohl der Gesamtanzahl an Mikropartikeln als auch die Anzahl und Veränderungen thrombozytärer Mikropartikel sowie die Veränderungen endothelialer Mikropartikel während fünftägiger Lagerung.

5.5.1. Veränderungen der Gesamtzahl an Mikropartikeln

Systematische Untersuchungen über eine Veränderung der Gesamtzahl von Mikropartikeln während der Lagerung von Thrombozytenkonzentraten gibt es bisher nicht. Es wurden lediglich die Veränderungen von Sub-Populationen, wie beispielsweise die der thrombozytären Mikropartikel oder CD 62-P positive Mikropartikeln, während einer Lagerung von Thrombozytenkonzentraten untersucht.

In unseren Messungen beobachteten wir erstmalig den Einfluss der Lagerung auf das Verhalten der Gesamtzahl an Mikropartikeln. Hierbei konnten wir während einer fünftägigen Lagerung keine signifikante Veränderung der Annexin-V positiven Mikropartikel, also der Gesamt-Mikropartikel-Anzahl, feststellen.

5.5.2. Veränderungen der CD 61 positiven Mikropartikel

In den von uns durchgeführten Messungen an unterschiedlich lange gelagerten Thrombozytenkonzentraten konnte keine signifikante Veränderung der thrombozytären Mikropartikel im Laufe der Lagerung festgestellt werden.

Hiermit stehen unsere Beobachtungen in Widerspruch zu zwei früheren Untersuchungen über Mikropartikel in Thrombozytenkonzentraten welche einerseits aus Vollblut hergestellt [81] und andererseits mittels Apherese produziert wurden [84]. In diesen Studien konnten ansteigende Gesamtmengen an thrombozytären Mikropartikeln während des Lagerungsvorgangs nachgewiesen werden.

Es sollte jedoch berücksichtigt werden, dass in diesen Studien Mikropartikel nur über die Größe der Teilchen definiert wurden, welches verglichen mit der wesentlich genaueren Fähigkeit, Licht zu brechen, zu einer unangemessenen Einstellung der Grenzwerte führt

und diese wiederum zu falsch hohen Ergebnissen führen kann. Da in beiden Studien keine Markierung der Mikropartikel mit CD 62P und CD 63 erfolgt ist, kann somit auch der Anteil an Mikropartikeln von ruhenden Thrombozyten nicht bestimmt werden.

Wir vermuten, dass die schonendere Herstellung der Thrombozytenkonzentrate durch die von unserem Labor verwendete TrimaTM eine Aktivierung von Thrombozyten reduziert und werten dies als Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse.

5.5.3. Veränderungen der CD 63 / CD 62-P positiven Mikropartikel

Für die Untergruppe der Mikropartikel von aktivierte Thrombozyten, CD 62-P und CD 63 positiv, konnten wir einen signifikanten Anstieg im Laufe der fünftägigen Lagerungszeit verzeichnen. Dieser Anstieg dürfte auf eine zunehmende Aktivierung von Thrombozyten im Laufe der Lagerung hinweisen. Eine direkte Messung der Thrombozytenaktivierung war dafür nicht notwendig, da die zur Messung verwendeten Antikörper, zum Beispiel P-Selectin spezifisch Plättchenaktivierung anzeigen. Dieser von uns gezeigte Anstieg von CD 62-P positiven Mikropartikeln während des Zeitraums der Lagerung wurde ebenso bereits in früheren Untersuchungen nachgewiesen [82, 83, 85].

5.5.4. Veränderungen der CD 62-E positiven Mikropartikel

Auch eine mögliche Zu- oder Abnahme von endothelialen Mikropartikeln in Thrombozytenkonzentraten wurde bisher noch nie untersucht.

Die Ergebnisse unserer Messungen erbrachten nicht nur den Nachweis von endothelialen Mikropartikeln in Thrombozytenkonzentraten, sondern auch den Beleg dass sich die Konzentration während fünftägiger Lagerung nicht verändert

Die konstante Menge an endothelialen Mikropartikeln spricht unseres Erachtens gegen eine fortwährende Entstehung von endothelialen Mikropartikel aus zirkulierenden Endothelzellen des Spenders.

5.6. Mikropartikel im Serum der Patienten vor Transfusion

In den letzten Jahren hat sich die Erkenntnis durchgesetzt, dass die Mehrzahl der Mikropartikel im menschlichen Plasma von Megakaryozyten abstammen [11]. Zuvor wurde die Ansicht vertreten, dass es sich bei den vorhandenen thrombozytären Mikropartikeln um ein Produkt thrombozytärer Aktivierung handele [86]. Wäre diese mittlerweile revidierte Ansicht zutreffend, so würde man bei unseren Patienten eine erhöhte Anzahl an thrombozytären Mikropartikeln erwarten können, da die von uns untersuchten Patienten auf Grund der hämatologischen Grunderkrankung an einem erhöhten Verbrauch und einer erhöhte Aktivierung von Thrombozyten leiden. Diese Vorstellung wurde unterstützt durch Beobachtungen bei Patienten mit soliden Tumorerkrankungen, da es bei solchen Patienten ebenfalls zu einer erhöhten Anzahl an Mikropartikeln im Serum kommen kann [58]. Hierbei spielen Mikropartikel offenbar bei Prozessen wie Tumorwachstum und Metastasierung, beziehungsweise Angiogenese eine bedeutende Rolle [59, 87, 88].

Eine vergleichbare Untersuchung bei Patienten mit hämatologischen Systemkrankheiten hat allerdings bisher noch nicht stattgefunden.

Tatsächlich konnten wir in unserer Patientengruppe jedoch erniedrigte Mikropartikel-Mengen, sowohl die Gesamtzahl aller Annexin-V positiven Mikropartikel, als auch die thrombozytären Mikropartikel aus ruhenden und aktivierten Thrombozyten betreffend, nachweisen. Dies entspricht der These, dass die Mehrzahl der thrombozytären Mikropartikel von Megakaryozyten entstammen welche im Rahmen der hämatologischen Grunderkrankung vermindert vorhanden sind, was sich als Thrombozytopenie äußert. Zusätzlich kann diese Überlegung durch Ergebnisse der Arbeitsgruppe um Rank A. und Delker R. belegt werden, die nachweisen konnten, dass es einen Zusammenhang zwischen der Anzahl der messbaren Thrombozyten im peripheren Blut und der Höhe der thrombozytären Mikropartikel im menschlichen Plasma gibt.

5.7. Veränderung der Mikropartikel-Anzahl nach Transfusion in vivo

Daten, in welchem Umfang sich die mittransfundierten Mikropartikel in Patienten verhalten, liegen bislang nicht vor.

Da durch die Transfusion von Thrombozyten eine hohe Anzahl an Mikropartikeln mitübertragen werden, könnte man auch einen Anstieg der Mikropartikel-Menge im Plasma des Patienten nach Transfusion erwarten. Ob, wie und in welcher Geschwindigkeit die übertragenen Mikropartikel wieder aus dem Blut der Patienten entfernt werden, erlangt angesichts einer erhöhten thrombogenen Potenz von Mikropartikel besondere Bedeutung. Eben diese erhöhte thrombogene Potenz von Mikropartikeln könnte eine Erklärung für die 2002 von Pihusch et al. beschriebene, paradoxerweise erhöhte Inzidenz von thrombembolischen Ereignissen bei thrombozytopenischen Patienten nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation sein [89].

5.7.1. Veränderungen der Gesamtzahl an Mikropartikeln nach Transfusion in vivo

Entsprechend unseren Erwartungen konnten wir unmittelbar nach Beendigung der Transfusion eine erhöhte Menge an Annexin-V positiven Mikropartikeln bestimmen. Die gemessenen Mengen waren zu jedem Messzeitpunkt signifikant höher als vor Beginn der Transfusion. Innerhalb des Beobachtungszeitraumes von drei Stunden wurden mehrere Blutentnahmen durchgeführt. Hierbei konnten, verglichen mit dem vorherigen Messwert jeweils signifikant reduzierte Mikropartikel Mengen, nachgewiesen werden, bei insgesamt deutlich erhöhten Mikropartikelmengen.

Der Nachweis erhöhter Mikropartikel Mengen nach Transfusion von Thrombozytenkonzentraten erhält besondere klinische Relevanz, da eine bei hämatologischen Erkrankungen häufig durchgeführte Therapie, die hämatopoetische Stammzelltransplantation ist. Als Nebenwirkung dieser Therapie kommt es zu einer langen aplastischen Phase, welches eine häufige Transfusion von Thrombozytenkonzentraten notwendig macht und es somit zu einer erhöhten Belastung der Patienten mit Mikropartikeln kommt [90].

Das Entstehen zahlreicher Komplikationen nach Transfusion von Thrombozytenkonzentraten, wie das sinusoidal obstruction syndrome, die microangiopathic hemolytic anemia, und die graft versus host disease scheinen die Konsequenz aus einem interessanten Zusammenspiel von Gerinnung, Thrombozyten und

dem Immunsystem zu sein [91, 92].

Letztendlich konnte die Genese dieser Erkrankungen noch nicht abschließend erklärt werden, jedoch muss eine Beteiligung von Mikropartikeln, welche mittels Transfusion übertragen werden, diskutiert werden.

Unsere Daten zeigen, dass eine Transfusion von Thrombozyten nicht nur eine Spende von Thrombozyten ist, sondern dass es somit auch zu einer erheblichen Übertragung von Mikropartikeln kommt.

Neben deren Fähigkeit den Gerinnungsprozess zu beeinflussen, sind Mikropartikel auch beteiligt am Transport und Transfer von bioaktiven Molekülen, dem Prozess der Zellaktivierung, an entzündlichen Vorgängen und an der Anpassung der körpereigenen Abwehr eben solcher Prozesse [12, 14, 50, 52, 93], was zu den gerade beschriebenen vermehrten Komplikationen führen kann.

5.7.2. Veränderungen der CD 61 positiven Mikropartikel nach Transfusion *in vivo*

Ebenso wie die Gesamtzahl der Mikropartikel, so war auch die Menge an thrombozytären CD-61 positiven Mikropartikeln nach Transfusion stark erhöht. Hierbei waren innerhalb des Beobachtungszeitraumes zu jedem Messzeitpunkt, verglichen mit der Ausgangsmenge, signifikant erhöhte Mikropartikelmengen nachweisbar.

Auch in dieser Mikropartikel Population kam es zu einem langsamen Rückgang der Mikropartikel Anzahl, nach einem Peak unmittelbar nach Beendigung der Transfusion.

Aufgrund der stark erhöhten Anzahl der CD 61-positiven Mikropartikel in den Konzentraten, kann diese Menge, trotz der circa 20-fachen Verdünnung der Konzentrate im Patienten nach Transfusion, für die Erhöhung der im Anschluss an die Übertragung der Thrombozytenkonzentrate gemessenen CD 61-positiven Mikropartikelmengen im Patientenblut verantwortlich gemacht werden.

Nieuwland et. al. beschrieben bereits 1997, dass thrombozytäre Mikropartikel eine hohe thrombogene Potenz besitzen und in der Lage sind, eine große Menge an gerinnungsfördernden Enzymen zu binden und zu aktivieren [94]. Neben der positiven Unterstützung der Hämostase im Sinne einer Blutungsprävention sind erhöhte Mengen an thrombozytären Mikropartikeln bei Patienten nach Transfusion von Thrombozyten mit dem Auftreten von Tiefen-Venen-Thrombosen assoziiert.

Dies wurde sowohl von Cook et al. 2005 für Patienten auf Intensivstationen beschrieben als auch von Khorana et al. 2008 für Patienten mit soliden Malignomen [3, 60].

5.7.3. Veränderungen der CD 63 / CD 62-P positiven Mikropartikel nach Transfusion in vivo

Ähnlich wie es sich mit der Gesamtzahl und der CD 61 positiven Mikropartikelmenge verhält, so werden auch CD 62-P und CD 63 positive Mikropartikel in erhöhtem Maß bei Transfusionen von Thrombozytenkonzentraten mitübertragen. Dies konnten wir im Plasma der Patienten nach Transfusion nachweisen.

Wie auch bei den zuvor beschriebenen Mikropartikel-Populationen kam es bei insgesamt erhöhten Mikropartikelmengen zu einem langsamen Rückgang der von aktivierten Thrombozyten stammenden Mikropartikeln.

Als eine weitere Erklärung für die hohen thrombozytären Mikropartikel-Werte nach Transfusion könnte ebenso eine durch die Transfusion von thrombozytären Mikropartikel verursachte Aktivierung von Thrombozyten im Patienten und nachfolgende Entstehung von Mikropartikeln diskutiert werden.

5.7.4. Veränderungen der CD 62-E positiven Mikropartikel nach Transfusion in vivo

Die ebenfalls in Thrombozytenkonzentraten enthaltenen endothelialen Mikropartikel stiegen zwar unmittelbar nach Beendigung der Transfusion an, jedoch war dieser Anstieg statistisch nicht signifikant. Dieser geringe Anstieg lässt sich jedoch ebenfalls aus den im Konzentrat vorhandenen deutlich geringeren endothelialen Mikropartikel Mengen erklären.

Die Präsentation von endothelialen Mikropartikel-Oberflächen, welche Zell-Adhäsionsmoleküle wie E-Selectin und ICAM-1 beinhalten, ist mit einer erhöhten Bindung und Aktivierung von Monozyten [95] und Leukozyten [96] verbunden, was die Mitwirkung von endothelialen Mikropartikeln am Transport und Transfer von bioaktiven Molekülen, der Zellaktivierung, dem Entzündungsprozess und der Ausbildung der erworbenen Immunität erklären kann [12, 14, 50, 52, 93].

Zusätzlich verringern endotheliale Mikropartikel die Freisetzung von endothelialen NO in vitro [97, 98] und führen zu einer Zunahme von Atherosklerose, Beeinflussen die Aktivierung und die Apoptose von Zellen [99] und könnten somit als Trigger von

immunogenen und pathogenen Prozessen verantwortlich sein.

Aus diesem Grund ist dieser, wenn auch nicht signifikante, Anstieg beunruhigend.

5.8. Elimination von Mikropartikeln in vivo

Die unmittelbar nach Transfusion erhöhten Mikropartikelspiegel sinken im Laufe der Zeit signifikant ab.

Unserer Arbeitsgruppe gelang es erstmalig, eine Halbwertszeit für die Elimination von Mikropartikeln in vivo zu berechnen. Hierbei konnte für thrombozytäre Mikropartikel eine Halbwertszeit von 5,3 Stunden und für Annexin-V positive Mikropartikel eine von 5,8 Stunden berechnet werden. Diese Halbwertszeiten sind wesentlich kürzer als die für transfundierte Thrombozyten.

Diese sanken nämlich mit einer Halbwertszeit von genau 24 Stunden, was auf einen unterschiedlichen Eliminations-Mechanismus schließen lässt.

Bis zum jetzigen Zeitpunkt ist nur relativ wenig über die Clearance von Mikropartikeln aus dem Blut bekannt. Eine weitgehend akzeptierte These geht von einer Phagozytose der zirkulierenden Mikropartikel durch Makrophagen aus. Diese Vorstellung wird durch die von

Marti-Lliteras et al. beschriebenen, ähnlichen Halbwertszeiten für die Elimination von Bakterien durch Makrophagen, die der Elimination von Mikropartikeln aus dem Blut der Patienten entspricht, gestützt [100].

Ein weiterer Mechanismus der Entfernung von Mikropartikeln aus dem Blut könnte die Bindung von Mikropartikeln an die Oberflächen von anderen Zellen sein. Dies wurde für Mikropartikel durch ihre Fähigkeit zelltypspezifische Bindungsproteine, Adhäsionsliganden oder Rezeptoren zu exprimieren belegt [12], ebenso wie ihre Fähigkeit, die Immunantwort zu verändern [101] und Tissue factor auf andere Zellen zu transferieren [102].

5.9. Ausblick

Die von uns durchgeführten Untersuchungen erbrachten viele bis dato unbekannte Erkenntnisse über Mikropartikel in Thrombozytenkonzentraten und deren Veränderungen in Art und Zusammensetzung während fünftägiger Lagerung.

Daneben konnten wir neue Einblicke über die Verteilung und den Abbau von Mikropartikeln nach Übertragung auf Patienten im Rahmen von Transfusionen gewinnen.

All diese Erkenntnisse werfen jedoch eine Vielzahl an neuen und interessanten Fragestellungen auf.

Da Mikropartikeln bei einer Vielzahl von pathologischen Vorgängen im menschlichen Körper beteiligt sind, sollte es das Ziel sein, die Übertragung von Mikropartikeln im Rahmen von Transfusionen so gering wie möglich zu halten.

Da die in den Konzentraten enthaltenen Mikropartikel mit größter Wahrscheinlichkeit aus den Spendern stammen und während des Herstellungsprozesses in die Konserven gelangen, sollte in Anbetracht der möglichen Konsequenzen einer vermehrten Mitübertragung von Mikropartikeln der Versuch unternommen werden, diesen Aspekt bei einer Weiterentwicklung der Apheresegeräte zu berücksichtigen und auf eine konsequente Reduktion der Mikropartikel Mengen größten Wert zu legen.

Dies gilt insbesondere bei den von uns untersuchten Patienten, da diese einen relativ hohen Bedarf an Transfusionen im Rahmen ihrer aplastischen Phase haben.

Ziel weiterer Studien sollte die Reproduzierbarkeit unserer Ergebnisse, als auch Studien mit größerem Patientenkollektiv sein, da die von uns untersuchte Gruppe mit elf Studienteilnehmern eine nur eingeschränkte statistische Aussagekraft besitzt.

Die nachgewiesenen endothelialen Mikropartikel, welche HLA-Eigenschaften des Spenders tragen, sollten hierbei im Vordergrund weiterer Untersuchungen stehen.

6. Zusammenfassung

Die von uns zu Beginn der Untersuchung gestellten Fragen können wir im Rahmen unserer Studienergebnisse wie folgt beantworten.

1. Thrombozytenkonzentrate enthalten eine erhöhte Menge an thrombozytären Mikropartikeln, hauptsächlich von ruhenden Thrombozyten beziehungsweise Megakaryozyten. Hiermit zeigen unsere Daten, dass eine Transfusion von Thrombozyten nicht nur eine Spende von Thrombozyten ist, sondern dass es auch zu einer relevanten Übertragung von Mikropartikeln kommt. Neben ihrer Fähigkeit, den Gerinnungsprozess zu beeinflussen, sind Mikropartikel auch beteiligt am Transport und Transfer von bioaktiven Molekülen, dem Prozess der Zellaktivierung, an entzündlichen Vorgängen und an der Anpassung der körpereigenen Abwehr eben solcher Prozesse. Dies lässt der Erkenntnis, dass Thrombozytenkonzentrate einen hohen Anteil an Mikropartikel beinhalten besondere Bedeutung zukommen.
2. Erstmalig konnten wir endotheliale Mikropartikel in Thrombozytenkonzentraten nachweisen. Wenngleich diese in geringerem Umfang als thrombozytäre Mikropartikel in den Konzentraten vorkommen, so betrug der Messwert das 2,6 fache des Plasmawertes gesunder Kontrollpersonen.

Bei der Transfusion eines Thrombozytenkonzentrates könnte es dabei zu einem relevanten HLA-Transfer vom Spender auf den Empfänger kommen, da endotheliale Mikropartikel HLA-Antigene in hoher Dichte auf ihrer Oberfläche präsentieren.

Möglicherweise sind HLA-tragende endotheliale Mikropartikel pathogenetisch für immunologische Reaktionen im Zusammenhang mit Transfusionen von Thrombozytenkonzentraten, trotz der Anwendung von Leukozytenfiltern mitverantwortlich.

Der darüber hinaus mögliche Effekt dieser mittransfundierten Teilchen auf den Empfänger muss ebenfalls beunruhigen, da endotheliale Mikropartikel Zell-Adhäsionsmoleküle wie E-Selectin und ICAM-1 beinhalten und mit einer erhöhten Bindung und Aktivierung von Monozyten und Leukozyten gerechnet werden muss. Zusätzlich verringern endotheliale Mikropartikel die Freisetzung von endothelialen

NO in vitro und führen damit zu einer Zunahme von Atherosklerose, beeinflussen die Aktivierung und die Apoptose von Zellen und könnten somit als Trigger von immunogenen und pathogenen Prozessen verantwortlich sein.

3. Über den beobachteten Zeitraum von fünf Tagen kam es zu keinem signifikanten Anstieg der Annexin-V positiven Mikropartikeln. Ebenso stabil zeigten sich die Mengen an thrombozytären Mikropartikeln, deren Gesamtzahl sich nicht wesentlich erhöhte. Die Anzahl an Mikropartikeln aktiverter Thrombozyten stieg hingegen signifikant an. Wenngleich diese Gruppe von Mikropartikel nur einen kleinen Anteil an der Gesamtmenge der thrombozytären Mikropartikel ausmacht, so geben diese Daten doch Hinweise auf eine zunehmende Aktivierung der gesammelten Thrombozyten mit fortschreitendem Alter der Konserven.
4. Unsere Ergebnisse bestätigen den Verdacht, dass es nach einer Transfusion von Thrombozyten, zu einem Anstieg der Plasmakonzentration von Mikropartikeln kommt. Die gemessenen Höhen erhäusern die Vermutung, dass diese Erhöhung durch die in den Thrombozytenkonzentraten enthaltenen Mikropartikel, also Mikropartikeln des Spenders, bedingt ist. Dies konnten wir sowohl für die Gesamtzahl, als auch für thrombozytäre Mikropartikel, welche den größten Anteil an den im Konzentrat vorhandenen Mikropartikeln ausmachen belegen. Endotheliale Mikropartikel wurden zwar ebenfalls mittransfundiert, deren Anstieg war jedoch nicht signifikant, was unseres Erachtens an der insgesamt geringen absoluten Menge an endothelialen Mikropartikeln lag. Da Mikropartikel neben vielen Effekten eine gewichtige Rolle an der Aktivierung der Blutgerinnung spielen, so könnte dies mit eine Erklärung für die vielfach beschriebene Entstehung von Thrombosen bei thrombozytopenen Patienten nach Transfusion von Thrombozyten sein.
5. Die nach Transfusion erhöhten Mikropartikelmengen nahmen im Laufe des Beobachtungszeitraumes stetig ab, waren jedoch auch nach den drei Stunden Beobachtung immer noch signifikant erhöht. Es gelang uns erstmalig, Halbwertszeiten für Elimination von Mikropartikeln im menschlichen Organismus zu berechnen. Diese wichen mit 5,3 Stunden für thrombozytäre Mikropartikel und 5,8 Stunden für die Gesamtzahl an Mikropartikel deutlich von der ebenfalls berechneten Halbwertszeit für Thrombozyten von 24 Stunden ab, was auf einen unterschiedlichen Eliminationsmechanismus hindeuten könnte. Die berechneten

Zeiten für Mikropartikel deckten sich mit denen, welche für die Elimination von Bakterien mittels Phagozytose durch Makrophagen bekannt sind. Diese Erkenntnis stützt die These, dass Mikropartikel mittels Phagozytose aus dem menschlichen Blut entfernt werden.

7. Literaturverzeichnis

1. Schrezenmeier, H. and E. Seifried, Buffy-coat-derived pooled platelet concentrates and apheresis platelet concentrates: which product type should be preferred? *Vox Sang*, 2010. 99(1): p. 1-15.
2. Wandt, H., K. Schaefer-Eckart, M. Frank, et al., A therapeutic platelet transfusion strategy is safe and feasible in patients after autologous peripheral blood stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*, 2006. 37(4): p. 387-92.
3. Khorana, A.A., C.W. Francis, N. Blumberg, et al., Blood transfusions, thrombosis, and mortality in hospitalized patients with cancer. *Arch Intern Med*, 2008. 168(21): p. 2377-81.
4. Apelseth, T.O., O. Bruserud, T. Wentzel-Larsen, et al., In vitro evaluation of metabolic changes and residual platelet responsiveness in photochemical treated and gamma-irradiated single-donor platelet concentrates during long-term storage. *Transfusion*, 2007. 47(4): p. 653-65.
5. Wolf, P., The nature and significance of platelet products in human plasma. *Br J Haematol*, 1967. 13(3): p. 269-88.
6. Berckmans, R.J., R. Neijland, A.N. Boing, et al., Cell-derived microparticles circulate in healthy humans and support low grade thrombin generation. *Thromb Haemost*, 2001. 85(4): p. 639-46.
7. Weerheim, A.M., A.M. Kolb, A. Sturk, et al., Phospholipid composition of cell-derived microparticles determined by one-dimensional high-performance thin-layer chromatography. *Anal Biochem*, 2002. 302(2): p. 191-8.
8. Hughes, M., C.P. Hayward, T.E. Warkentin, et al., Morphological analysis of microparticle generation in heparin-induced thrombocytopenia. *Blood*, 2000. 96(1): p. 188-94.
9. Freyssinet, J.M. and F. Toti, Formation of procoagulant microparticles and properties. *Thromb Res*, 2010. 125 Suppl 1: p. S46-8.
10. Flaumenhaft, R., J.R. Dilks, J. Richardson, et al., Megakaryocyte-derived microparticles: direct visualization and distinction from platelet-derived microparticles. *Blood*, 2009. 113(5): p. 1112-21.
11. Rank, A., R. Nieuwland, R. Delker, et al., Cellular origin of platelet-derived microparticles in vivo. *Thromb Res*, 2010. 126(4): p. e255-9.
12. Barry, O.P., D. Pratico, J.A. Lawson, et al., Transcellular activation of platelets and endothelial cells by bioactive lipids in platelet microparticles. *J Clin Invest*, 1997. 99(9): p. 2118-27.

13. Baj-Krzywczeka, M., M. Majka, D. Pratico, et al., Platelet-derived microparticles stimulate proliferation, survival, adhesion, and chemotaxis of hematopoietic cells. *Exp Hematol*, 2002. 30(5): p. 450-9.
14. Sprague, D.L., B.D. Elzey, S.A. Crist, et al., Platelet-mediated modulation of adaptive immunity: unique delivery of CD154 signal by platelet-derived membrane vesicles. *Blood*, 2008. 111(10): p. 5028-36.
15. Tang, K., J. Liu, Z. Yang, et al., Microparticles mediate enzyme transfer from platelets to mast cells: a new pathway for lipoxin A4 biosynthesis. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010. 400(3): p. 432-6.
16. Morel, O., F. Toti, L. Jesel, et al., Mechanisms of microparticle generation: on the trail of the mitochondrion! *Semin Thromb Hemost*, 2010. 36(8): p. 833-44.
17. Forlow, S.B., R.P. McEver and M.U. Nollert, Leukocyte-leukocyte interactions mediated by platelet microparticles under flow. *Blood*, 2000. 95(4): p. 1317-23.
18. Sims, P.J., T. Wiedmer, C.T. Esmon, et al., Assembly of the platelet prothrombinase complex is linked to vesiculation of the platelet plasma membrane. Studies in Scott syndrome: an isolated defect in platelet procoagulant activity. *J Biol Chem*, 1989. 264(29): p. 17049-57.
19. Tans, G., J. Rosing, M.C. Thomassen, et al., Comparison of anticoagulant and procoagulant activities of stimulated platelets and platelet-derived microparticles. *Blood*, 1991. 77(12): p. 2641-8.
20. Taube, J., N. McWilliam, R. Luddington, et al., Activated protein C resistance: effect of platelet activation, platelet-derived microparticles, and atherogenic lipoproteins. *Blood*, 1999. 93(11): p. 3792-7.
21. Gilbert, G.E., P.J. Sims, T. Wiedmer, et al., Platelet-derived microparticles express high affinity receptors for factor VIII. *J Biol Chem*, 1991. 266(26): p. 17261-8.
22. Siljander, P., O. Carpen and R. Lassila, Platelet-derived microparticles associate with fibrin during thrombosis. *Blood*, 1996. 87(11): p. 4651-63.
23. Gemmell, C.H., M.V. Sefton and E.L. Yeo, Platelet-derived microparticle formation involves glycoprotein IIb-IIIa. Inhibition by RGDS and a Glanzmann's thrombasthenia defect. *J Biol Chem*, 1993. 268(20): p. 14586-9.
24. Wiedmer, T. and P.J. Sims, Participation of protein kinases in complement C5b-9-induced shedding of platelet plasma membrane vesicles. *Blood*, 1991. 78(11): p. 2880-6.
25. Miyazaki, Y., S. Nomura, T. Miyake, et al., High shear stress can initiate both platelet aggregation and shedding of procoagulant containing microparticles. *Blood*, 1996. 88(9): p. 3456-64.

26. Satta, N., F. Toti, O. Feugeas, et al., Monocyte vesiculation is a possible mechanism for dissemination of membrane-associated procoagulant activities and adhesion molecules after stimulation by lipopolysaccharide. *J Immunol*, 1994. 153(7): p. 3245-55.
27. Combes, V., A.C. Simon, G.E. Grau, et al., In vitro generation of endothelial microparticles and possible prothrombotic activity in patients with lupus anticoagulant. *J Clin Invest*, 1999. 104(1): p. 93-102.
28. Patel, K.D., G.A. Zimmerman, S.M. Prescott, et al., Novel leukocyte agonists are released by endothelial cells exposed to peroxide. *J Biol Chem*, 1992. 267(21): p. 15168-75.
29. Miyoshi, H., K. Umehita, M. Sakon, et al., Calpain activation in plasma membrane bleb formation during tert-butyl hydroperoxide-induced rat hepatocyte injury. *Gastroenterology*, 1996. 110(6): p. 1897-904.
30. Leeuwenberg, J.F., E.F. Smeets, J.J. Neefjes, et al., E-selectin and intercellular adhesion molecule-1 are released by activated human endothelial cells in vitro. *Immunology*, 1992. 77(4): p. 543-9.
31. Schechter, A.D., B. Spirn, M. Rossikhina, et al., Release of active tissue factor by human arterial smooth muscle cells. *Circ Res*, 2000. 87(2): p. 126-32.
32. Taraboletti, G., S. D'Ascenzo, P. Borsotti, et al., Shedding of the matrix metalloproteinases MMP-2, MMP-9, and MT1-MMP as membrane vesicle-associated components by endothelial cells. *Am J Pathol*, 2002. 160(2): p. 673-80.
33. Huber, J., A. Vales, G. Mitulovic, et al., Oxidized membrane vesicles and blebs from apoptotic cells contain biologically active oxidized phospholipids that induce monocyte-endothelial interactions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2002. 22(1): p. 101-7.
34. Ariyoshi, H. and E.W. Salzman, Association of localized Ca²⁺ gradients with redistribution of glycoprotein IIb-IIIa and F-actin in activated human blood platelets. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1996. 16(2): p. 230-5.
35. Coleman, M.L., E.A. Sahai, M. Yeo, et al., Membrane blebbing during apoptosis results from caspase-mediated activation of ROCK I. *Nat Cell Biol*, 2001. 3(4): p. 339-45.
36. Yano, Y., J. Kambayashi, E. Shiba, et al., The role of protein phosphorylation and cytoskeletal reorganization in microparticle formation from the platelet plasma membrane. *Biochem J*, 1994. 299 (Pt 1): p. 303-8.
37. Fox, J.E., C.D. Austin, J.K. Boyles, et al., Role of the membrane skeleton in preventing the shedding of procoagulant-rich microvesicles from the platelet plasma membrane. *J Cell Biol*, 1990. 111(2): p. 483-93.

38. Basse, F., P. Gaffet and A. Bienvenue, Correlation between inhibition of cytoskeleton proteolysis and anti-vesiculation effect of calpeptin during A23187-induced activation of human platelets: are vesicles shed by filopod fragmentation? *Biochim Biophys Acta*, 1994. 1190(2): p. 217-24.
39. Fox, J.E., The platelet cytoskeleton. *Thromb Haemost*, 1993. 70(6): p. 884-93.
40. Sims, P.J., E.M. Faioni, T. Wiedmer, et al., Complement proteins C5b-9 cause release of membrane vesicles from the platelet surface that are enriched in the membrane receptor for coagulation factor Va and express prothrombinase activity. *J Biol Chem*, 1988. 263(34): p. 18205-12.
41. Pitney, W.R. and J.V. Dacie, A simple method of studying the generation of thrombin in recalcified plasma; application in the investigation of haemophilia. *J Clin Pathol*, 1953. 6(1): p. 9-14.
42. Hamilton, K.K., R. Hattori, C.T. Esmon, et al., Complement proteins C5b-9 induce vesiculation of the endothelial plasma membrane and expose catalytic surface for assembly of the prothrombinase enzyme complex. *J Biol Chem*, 1990. 265(7): p. 3809-14.
43. Bennett, J.S., Structure and function of the platelet integrin alphaIIbbeta3. *J Clin Invest*, 2005. 115(12): p. 3363-9.
44. Singbartl, K., S.B. Forlow and K. Ley, Platelet, but not endothelial, P-selectin is critical for neutrophil-mediated acute postischemic renal failure. *FASEB J*, 2001. 15(13): p. 2337-44.
45. Maecker, H.T., S.C. Todd and S. Levy, The tetraspanin superfamily: molecular facilitators. *FASEB J*, 1997. 11(6): p. 428-42.
46. Toth, B., [Microparticles and female issues]. *Hamostaseologie*, 2009. 29(1): p. 46-50.
47. Nelson, R.M., S. Dolich, A. Aruffo, et al., Higher-affinity oligosaccharide ligands for E-selectin. *J Clin Invest*, 1993. 91(3): p. 1157-66.
48. Gotsch, U., E. Borges, R. Bosse, et al., VE-cadherin antibody accelerates neutrophil recruitment in vivo. *J Cell Sci*, 1997. 110 (Pt 5): p. 583-8.
49. Sander, T.L., J.S. Ou, J.C. Densmore, et al., Protein composition of plasminogen activator inhibitor type 1-derived endothelial microparticles. *Shock*, 2008. 29(4): p. 504-11.
50. Barry, O.P., D. Pratico, R.C. Savani, et al., Modulation of monocyte-endothelial cell interactions by platelet microparticles. *J Clin Invest*, 1998. 102(1): p. 136-44.
51. Mesri, M. and D.C. Altieri, Endothelial cell activation by leukocyte microparticles. *J Immunol*, 1998. 161(8): p. 4382-7.

52. Nomura, S., N.N. Tandon, T. Nakamura, et al., High-shear-stress-induced activation of platelets and microparticles enhances expression of cell adhesion molecules in THP-1 and endothelial cells. *Atherosclerosis*, 2001. 158(2): p. 277-87.
53. Martinez, M.C., A. Tesse, F. Zobairi, et al., Shed membrane microparticles from circulating and vascular cells in regulating vascular function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2005. 288(3): p. H1004-9.
54. Hron, G., M. Kollars, H. Weber, et al., Tissue factor-positive microparticles: cellular origin and association with coagulation activation in patients with colorectal cancer. *Thromb Haemost*, 2007. 97(1): p. 119-23.
55. Kanazawa, S., S. Nomura, M. Kuwana, et al., Monocyte-derived microparticles may be a sign of vascular complication in patients with lung cancer. *Lung Cancer*, 2003. 39(2): p. 145-9.
56. Kim, H.K., K.S. Song, Y.S. Park, et al., Elevated levels of circulating platelet microparticles, VEGF, IL-6 and RANTES in patients with gastric cancer: possible role of a metastasis predictor. *Eur J Cancer*, 2003. 39(2): p. 184-91.
57. Tesselaar, M.E., F.P. Romijn, I.K. Van Der Linden, et al., Microparticle-associated tissue factor activity: a link between cancer and thrombosis? *J Thromb Haemost*, 2007. 5(3): p. 520-7.
58. Toth, B., S. Liebhardt, K. Steinig, et al., Platelet-derived microparticles and coagulation activation in breast cancer patients. *Thromb Haemost*, 2008. 100(4): p. 663-9.
59. van Doormaal, F.F., A. Kleinjan, M. Di Nisio, et al., Cell-derived microvesicles and cancer. *Neth J Med*, 2009. 67(7): p. 266-73.
60. Cook, D., M. Crowther, M. Meade, et al., Deep venous thrombosis in medical-surgical critically ill patients: prevalence, incidence, and risk factors. *Crit Care Med*, 2005. 33(7): p. 1565-71.
61. Bundesministerium der Justiz, Bekanntmachung der Richtlinien zur Herstellung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten (Hämotherapie) gemäß §§ 12 und 18 des Transfusionsgesetzes (TFG) (Änderungen und Ergänzungen 2010), B. Paul Ehrlich Institut, Editor. 2010: Bundesanzeiger, Langen.
62. Loos, J.A.; Van Aken, W.G.: Herstellung von Blutkomponenten . In: Mueller-Eckhardt, C. (Hrsg): Transfusionsmedizin , 1. Auflage , Springer , Berlin , 232-244 (1988)
63. Neppert, J.: Therapeutische Plasmapherese und Zytapherese . In: Mueller-Eckhardt, C. (Hrsg): Transfusionsmedizin , 1. Auflage , Springer , Berlin , 533-551 (1988)
64. VanWijk, M.J., E. VanBavel, A. Sturk, et al., Microparticles in cardiovascular diseases. *Cardiovasc Res*, 2003. 59(2): p. 277-87.

65. Nasse, H., Das Blut in mehrfacher Beziehung physiologisch und pathologisch untersucht. 1836: Habicht.
66. Brewer, D.B., Max Schultze (1865), G. Bizzozero (1882) and the discovery of the platelet. Br J Haematol, 2006. 133(3): p. 251-8.
67. Neumann, H., Das Gerinnungssystem: Physiologie und Pathophysiologie. Eine Einführung. 2008, Berlin: ABW Wissenschaftsverlag, Berlin.
68. Tuchin, V., Advanced Optical Flow Cytometry. Methods and Disease Diagnoses. 2011: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. p 19-24.
69. Patel, S.R., J.H. Hartwig and J.E. Italiano, Jr., The biogenesis of platelets from megakaryocyte proplatelets. J Clin Invest, 2005. 115(12): p. 3348-54.
70. Thon, J.N. and J.E. Italiano, Platelet formation. Semin Hematol, 2010. 47(3): p. 220-6.
71. Wittenberg-Rump, G., Transfusionsmedizin compact. Thieme Verlag, Stuttgart, 2003: p. 82ff.
72. Burger, R., Festlegung der Haltbarkeitsfrist von Thrombozytenkonzentraten mit dem Ziel der Reduktion lebensbedrohlicher septischer Transfusionsreaktionen durch bakterielle Kontamination. Bundesgesundheitsblatt, 2008. Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz. 2008;1884-1884.
73. Bundesärztekammer, Querschnitts-Leitlinien (BÄK) zur Therapie mit Blutkomponenten und Plasmaderivaten – 4. Auflage. 2009: Deutscher Ärzteverlag, Köln.
74. Mutschler, E., G. G. K. H. et al., Mutschler Arzneimittelwirkungen, Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie. Vol. 8. Auflage. 2001, Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH. 1-10, 491 - 494, 678 - 681.
75. Hogman, C.F., L. Eriksson and J. Kristensen, Leukocyte-depleted platelets prepared from pooled buffy coat post-transfusion increment and "in vitro bleeding time" using the Thrombostat 4000/2. Transfus Sci, 1993. 14(1): p. 35-9.
76. Hellstern, P. and W. Hitzler (2007) Thrombozytenkonzentrate aus Vollblutspenden – time to say goodbye, Transfus Med Hemother, 2007, 34, p 208-210.
77. Biscoping, J., [Therapy with blood components and plasma derivatives: the current cross-sectional guidelines]. Anaesthesist, 2009. 58(11): p. 1083-4.
78. Ringwald, J., T. Duerler, O. Frankow, et al., Collection of hyperconcentrated platelets with Trima Accel. Vox Sang, 2006. 90(2): p. 92-6.
79. Kutti, J., A. Weinfeld and J. Westin, The relationship between splenic platelet pool and spleen size. Scand J Haematol, 1972. 9(4): p. 351-4.

80. Hanson, S.R. and S.J. Slichter, Platelet kinetics in patients with bone marrow hypoplasia: evidence for a fixed platelet requirement. *Blood*, 1985. 66(5): p. 1105-9.
81. Bode, A.P., S.M. Orton, M.J. Frye, et al., Vesiculation of platelets during in vitro aging. *Blood*, 1991. 77(4): p. 887-95.
82. Hagberg, I.A., C.A. Akkok, T. Lyberg, et al., Apheresis-induced platelet activation:comparison of three types of cell separators. *Transfusion*, 2000. 40(2): p. 182-92.
83. Perseghin, P., L. Mascaretti, T. Speranza, et al., Platelet activation during plasma-reduced multicomponent PLT collection: a comparison between COBE Trima and Spectra LRS turbo cell separators. *Transfusion*, 2004. 44(1): p. 125-30.
84. Kraladsiri, P. and J. Seghatchian, Are all leucodepleted platelet concentrates equivalent? Comparison of Cobe LRS Turbo, Haemonetics MCS+ LD, and filtered pooled buffy-coat-derived platelets. *Vox Sang*, 2000. 78(3): p. 171-5.
85. Biro, E., J.W. Akkerman, F.J. Hoek, et al., The phospholipid composition and cholesterol content of platelet-derived microparticles: a comparison with platelet membrane fractions. *J Thromb Haemost*, 2005. 3(12): p. 2754-63.
86. Siljander, P.R., Platelet-derived microparticles - an updated perspective. *Thromb Res*, 2011. 127 Suppl 2: p. S30-3.
87. Morel, O., N. Morel, B. Hugel, et al., [The significance of circulating microparticles in physiology, inflammatory and thrombotic diseases]. *Rev Med Interne*, 2005. 26(10): p. 791-801.
88. Benameur, T., S. Tual-Chalot, R. Andriantsitohaina, et al., PPARalpha is essential for microparticle-induced differentiation of mouse bone marrow-derived endothelial progenitor cells and angiogenesis. *PLoS ONE*, 2010. 5(8): p. e12392.
89. Pihusch, R., C. Salat, E. Schmidt, et al., Hemostatic complications in bone marrow transplantation: a retrospective analysis of 447 patients. *Transplantation*, 2002. 74(9): p. 1303-9.
90. Rank, A., R. Nieuwland, R. Delker, et al., Surveillance of megakaryocytic function by measurement of CD61-exposing microparticles in allogeneic hematopoietic stem cell recipients. *Clin Transplant*, 2011. 25(3): p. E233-42.
91. Holler, E., H.J. Kolb, E. Hiller, et al., Microangiopathy in patients on cyclosporine prophylaxis who developed acute graft-versus-host disease after HLA-identical bone marrow transplantation. *Blood*, 1989. 73(7): p. 2018-24.
92. Rio, B., G. Andreu, A. Nicod, et al., Thrombocytopenia in venocclusive disease after bone marrow transplantation or chemotherapy. *Blood*, 1986. 67(6): p. 1773-6.

93. Barry, O.P., M.G. Kazanietz, D. Pratico, et al., Arachidonic acid in platelet microparticles up-regulates cyclooxygenase-2-dependent prostaglandin formation via a protein kinase C/mitogen-activated protein kinase-dependent pathway. *J Biol Chem*, 1999. 274(11): p. 7545-56.
94. Nieuwland, R., R.J. Berckmans, R.C. Rotteveel-Eijkman, et al., Cell-derived microparticles generated in patients during cardiopulmonary bypass are highly procoagulant. *Circulation*, 1997. 96(10): p. 3534-41.
95. Jy, W., A. Minagar, J.J. Jimenez, et al., Endothelial microparticles (EMP) bind and activate monocytes: elevated EMP-monocyte conjugates in multiple sclerosis. *Front Biosci*, 2004. 9: p. 3137-44.
96. Arteaga, R.B., J.A. Chirinos, A.O. Soriano, et al., Endothelial microparticles and platelet and leukocyte activation in patients with the metabolic syndrome. *Am J Cardiol*, 2006. 98(1): p. 70-4.
97. Mezentsev, A., R.M. Merks, E. O'Riordan, et al., Endothelial microparticles affect angiogenesis in vitro: role of oxidative stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2005. 289(3): p. H1106-14.
98. Amabile, N., A.P. Guerin, A. Leroyer, et al., Circulating endothelial microparticles are associated with vascular dysfunction in patients with end-stage renal failure. *J Am Soc Nephrol*, 2005. 16(11): p. 3381-8.
99. Albanese, J., S. Meterissian, M. Kontogianne, et al., Biologically active Fas antigen and its cognate ligand are expressed on plasma membrane-derived extracellular vesicles. *Blood*, 1998. 91(10): p. 3862-74.
100. Marti-Lliteras, P., V. Regueiro, P. Morey, et al., Nontypeable *Haemophilus influenzae* clearance by alveolar macrophages is impaired by exposure to cigarette smoke. *Infect Immun*, 2009. 77(10): p. 4232-42.
101. Thery, C., L. Duban, E. Segura, et al., Indirect activation of naive CD4+ T cells by dendritic cell-derived exosomes. *Nat Immunol*, 2002. 3(12): p. 1156-62.
102. Del Conde, I., C.N. Shrimpton, P. Thiagarajan, et al., Tissue-factor-bearing microvesicles arise from lipid rafts and fuse with activated platelets to initiate coagulation. *Blood*, 2005. 106(5): p. 1604-11.

8. Danksagung

Bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Erhard Hiller für die freundliche und geduldige Betreuung sowie seine konstruktiv kritischen Kommentare, die sehr zum Gelingen der vorliegenden Arbeit beigetragen haben.

Mein spezieller Dank gebührt meinem Betreuer, Herrn Dr. med. Andreas Rank, für die Einführung in die wissenschaftliche Arbeit, seine Hilfe bei der Akquirierung von Studienteilnehmern, der Anleitungen bei der Arbeit im Labor, dass er mir immer mit Rat und Tat zur Seite gestanden ist und eine stetige Quelle an Inspiration war.

Ohne seine geduldige Unterstützung wäre diese Arbeit nie zu einem glücklichen Ende gekommen.

Er war mir der beste Betreuer den ein Student sich nur wünschen kann.

Dem Team des Forschungslabors am Klinikum Großhadern danke ich für die Unterstützung und Hilfen beim Verarbeiten und Messen der Proben.

Vielen Dank auch an Herrn Dr. med. Alexander Crispin und Frau Verena Hoffmann vom Institut für medizinische Informationsverarbeitung, Biometrie und Epidemiologie der Ludwig-Maximilians-Universität München für die Unterstützung und Beratung bei der Auswertung der Daten.

Meiner lieben Freundin, Frau Carolin Kleiber ein herzliches Dankeschön für die schnelle Korrekturlesung.

Vor allem aber möchte ich meiner Frau für Ihre Liebe und Geduld danken und dafür, dass sie mir stetig den Rücken frei hält und keine Mühen scheut mich bei meiner Arbeit zu unterstützen.