

Aus der Universitätsklinik für Anaesthesiologie und Intensivmedizin

Tübingen

Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. K. Unertl

Institut für klinische und experimentelle Transfusionsmedizin

Ärztlicher Direktor: Professor H. Northoff

Untersuchungen zur Anwendbarkeit der
Annexinbindung bei der Qualitätskontrolle von
Blutprodukten

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

der Medizinischen Fakultät der Eberhard Karls Universität

zu Tübingen

Vorgelegt von

Tobias Dominik Stöckle

aus Rottweil

-2006-

Dekan: Professor Dr. C. D. Claussen

1.Berichterstatter: Frau Professor Dr. Wernet

2.Berichterstatter: Professor Dr. M. Sessler

FÜR MEINE ELTERN ALBERT UND REGINA STÖCKLE

1.	EINLEITUNG	5
2.	MATERIAL UND METHODEN	10
2.1.	Herstellung von Blutprodukten.....	10
2.1.1.	Leukozytenarme Erythrozytenkonzentrate (LAE).....	10
2.1.2.	Thrombozytenpools	11
2.1.3.	Thrombozytenkonzentrate.....	12
2.2.	Verbrauchsmaterial und technische Geräte	12
2.2.1.	Antikörper und Antigene	13
2.2.2.	Chemikalien	14
2.2.3.	Labormaterial.....	14
2.2.4.	technische Geräte.....	14
2.3.	Laboruntersuchungen	15
2.3.1.	Wichtige Abkürzungen.....	15
2.3.2.	Thrombozytenpools/Thrombozytenkonzentrate	15
2.3.2.1.	Probenanzahl, Messtage.....	15
2.3.2.2.	CD62P	15
2.3.2.3.	pH Messung.....	16
2.3.2.4.	Aggregation	17
2.3.2.5.	Annexin V-PE.....	18
2.3.2.6.	Kontrollgruppe.....	19
2.3.3.	Erythrozytenkonzentrate.....	20
2.3.3.1.	Probenzahl, Messtage	20
2.3.3.2.	Freies Hämoglobin.....	20
2.3.3.3.	Freies Kalium.....	21
2.3.3.4.	Annexin V-PE.....	21
2.4.	Arbeitsweise der technischen Geräte	23
2.4.1.	Durchflusszytometer	23
3.	ERGEBNISSE.....	27
3.1.	Thrombozyten	27
3.1.1.	Thrombozytenpools	27
3.1.1.1.	CD62P und TRAP 6.....	29
3.1.1.2.	Aggregation	30
3.1.1.3.	Annexin V	31
3.1.1.4.	pH Wert.....	33
3.1.2.	Thrombozytenkonzentrate.....	34
3.1.2.1.	CD62P unstimuliert und stimuliert (TRAP 6).....	36
3.1.2.2.	Aggregation	37
3.1.2.3.	Annexin V	38
3.1.2.4.	pH Wert.....	40

3.1.3.	Thrombozytenpools ↔ Thrombozytenkonzentrate.....	41
3.1.3.1.	CD62P im Vergleich.....	41
3.1.3.2.	pH im Vergleich.....	42
3.1.3.3.	Aggregation im Vergleich.....	43
3.1.3.4.	Annexin V im Vergleich.....	44
3.2.	Erythrozyten.....	45
3.2.1.1.	Freies Kalium.....	47
3.2.1.2.	Freies Hämoglobin.....	48
3.2.1.3.	Annexin V.....	49
4.	DISKUSSION.....	51
4.1.	Thrombozyten.....	51
4.1.1.	Die Anwendbarkeit der Annexinbindung bei Thrombozyten.....	56
4.1.1.1.	Annexinbindung bei Thrombozyten allgemein.....	56
4.1.1.2.	Annexin V und CD62P.....	57
4.1.1.3.	Annexin V und Aggregation.....	58
4.1.1.4.	Annexin V und pH.....	59
4.1.1.5.	Qualitative Veränderungen durch Lagerung.....	59
4.1.1.6.	Qualitative Veränderungen durch Bestrahlung.....	60
4.2.	Erythrozyten.....	60
4.2.1.	Die Anwendbarkeit der Annexinbindung bei Erythrozyten.....	62
4.2.1.1.	Annexinbindung und Kalium.....	62
4.2.1.2.	Annexinbindung und freies Hämoglobin.....	63
4.2.1.3.	Annexinbindung.....	63
4.3.	Schlussfolgerung.....	65
5.	ZUSAMMENFASSUNG.....	66
6.	LITERATURVERZEICHNIS.....	68
7.	ANHANG.....	73
7.1.	Verzeichnis der Abkürzungen.....	73
7.2.	Verzeichnis der Tabellen.....	73
7.3.	Verzeichnis der Abbildungen.....	74

1. Einleitung

Die Geschichte der Blutspende reicht bis in das Jahr 1492 zurück. Damals wurde Papst Innozenz VIII. der ersten "Frischzellenkur" unterzogen. Er bekam das Blut von drei Knaben zu trinken. Zuerst starben die drei Kinder, dann der Papst. Ca. 500 Jahre später gelten in der Bundesrepublik Deutschland Blutprodukte als Arzneimittel im Sinne von § 2 (1) Arzneimittelgesetz i.V.mit § 2 Nr.3 Transfusionsgesetz und unterliegen den Vorschriften des Arzneimittelrechtes. (Bundesgesundheitsblatt 7/2000). Dabei sind sowohl für die Herstellung, die Lagerung und die Transfusion von Blutprodukten strenge Richtlinien zu beachten. Diese „sollen den Ärzten die notwendige Handlungsgrundlage geben und die erforderlichen Voraussetzungen beschreiben, um den Spender vor Schaden zu bewahren und um die Anwendung von Blutprodukten einschließlich Eigenblut für den Empfänger so gefahrlos und wirksam wie möglich zu gestalten.“ (Bundesgesundheitsblatt 7/2000).

Die Zahl der weltweit benötigten Blutspenden liegt bei rund 75 Millionen Blutspenden pro Jahr. Allein in Deutschland werden jährlich von den klinikintegrierten staatlich-kommunalen Blutspendediensten (StKB) bei über 500.000 Blutspendern ca. 1.400.000 Blutspenden entnommen, davon 950.000 Vollblutspenden, 300.000 Plasmaspenden (mittels maschineller Apherese) und 150.000 Thrombozytenspenden (mittels maschineller Apherese).

Daraus werden ca. 2.500.000 Blutkomponenten hergestellt und als 950.000 Erythrozytenkonzentrate, 345.000 Thrombozytenkonzentrate (aus Vollblut und aus maschineller Herstellung) sowie 150.000 Liter gefrorenes Frischplasma für die therapeutische Anwendung bei Patienten zur Verfügung gestellt. (Auszug aus der Stellungnahme des StKB zur öffentlichen Anhörung 20. Oktober 2004)

Je nach Art der Blutprodukte werden unterschiedliche Parameter herangezogen, um die Qualität zu überprüfen. Die für diese Dissertation verwendeten Blutkomponenten und die vorgeschriebenen Prüfparameter sind in den folgenden Tabellen dargestellt.

Blutkomponenten

Inhalt der Abbildungen 1-4 aus:

Richtlinien zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten Hämotherapie Bundesgesundheitsbl-Gesundheitsforsch-Gesundheitsschutz 2000 · 43:555–589

Tabelle 1 :

Qualitätskontrollen Leukozytendepletieretes Erythrozytenkonzentrat

Prüfparameter	Prüfkriterium	Zeitpunkt
Volumen	nach Festlegung, abhängig vom Entnahnevolumen	nach Herstellung
Hämatokrit	0,50 bis 0,75 l/l	nach Herstellung und am Ende der ermittelten Haltbarkeit
Gesamt-Hb	≥40 g/Einheit	nach Herstellung und am Ende der ermittelten Haltbarkeit
% Hämolyse	<0,8% der Erythrozytenmasse	am Ende der ermittelten Haltbarkeit
Visuelle Kontrolle	Beutel unversehrt, keine deutlich sichtbare Hämolyse	nach Herstellung und am Ende der ermittelten Haltbarkeit
Restleukozyten	<1 x 10 ⁶ /Einheit	nach Herstellung
Sterilität	steril	am Ende der ermittelten Haltbarkeit

Tabelle 2:

Qualitätskontrollen Leukozytendepletieretes Apherese -Thrombozytenkonzentrat

Prüfparameter	Prüfkriterium	Zeitpunkt
Volumen	> 200 ml	nach Herstellung
Thrombozytengehalt	> 200 x 10 ⁹ / Einheit	nach Herstellung
Thrombozyten/ml	Nach Festlegung, ermittelt abhängig von Lagerbedingungen	nach Herstellung
Restleukozyten	< 1 x 10 ⁹ / Einheit	nach Herstellung
Resterythrozyten	< 3 x 10 ⁹ / Einheit	nach Herstellung
pH-Wert	6,5 bis 7,4	am Ende der Haltbarkeit
Visuelle Kontrolle	Beutel unversehrt	am Ende der Haltbarkeit
Sterilität	steril	am Ende der Haltbarkeit

Tabelle 3:

Qualitätskontrollen Leukozytendepletieretes Pool-Thrombozytenkonzentrat

Prüfparameter	Prüfkriterium	Zeitpunkt
Volumen	> 40ml in Abhängigkeit von der Anzahl der gepoolten Einheiten	nach Herstellung
Thrombozytenzahl	> 60 x 10 ⁹ in Abhängigkeit von der Anzahl der gepoolten Einheiten	nach Herstellung
Restleukozyten	< 1 x 10 ⁶ in der gepoolten Einheit	nach Herstellung
Resterythrozyten	< 0,5 x 10 ⁹ in Abhängigkeit von der Anzahl der gepoolten Einheiten	nach Herstellung
pH-Wert	6,5 bis 7,4	am Ende der Haltbarkeit
Visuelle Kontrolle	Beutel unversehrt	am Ende der Haltbarkeit
Sterilität	steril	am Ende der Haltbarkeit

Regelmäßig werden in der Transfusionsmedizin Tübingen die oben genannten Parameter überprüft. Dabei beträgt die gesetzlich vorgeschriebene Häufigkeit der Qualitätskontrollen pro Monat 1% der hergestellten Einheiten, mindestens aber vier Einheiten; ausgenommen ist die Sterilitätstestung mit $0,4 \times \sqrt{n}$ (n =Zahl der hergestellten Einheiten pro Monat). Zusätzlich zu den genannten Parametern werden in Tübingen die Thrombozyten-Präparate noch mit zwei weiteren Methoden überprüft: Expression von CD62P auf der Thrombozyten-Oberfläche mit Hilfe eines markierten Antikörpers und die Aggregationsfähigkeit der Thrombozyten in den Präparaten mittels der durch Kollagen induzierten Aggregation. Diesen zwei Messmethoden liegt als Basis die Überlegung zugrunde, dass eine hohe Zahl aktivierter Thrombozyten oder eine verminderte Aggregationsfähigkeit im Präparat als negativ anzusehen ist und vermutlich mit einem schlechten Transfusionserfolg einhergeht.

CD62P (P-Selectin) dient der Adhäsion der Thrombozyten u.a. an Neutrophile. Dieser Rezeptor wird bei einer Aktivierung aus präformierten α -Granula auf die Thrombozytenoberfläche befördert und später proteolytisch abgespalten. Die Messung der mit dem Antikörper (Anti-CD62P-R-PE) angefärbten Zellen ermöglicht somit eine Aussage über die Rezeptordichte auf Thrombozyten und damit den Aktivierungszustand der Zellen.

Um die **Aggregationsfähigkeit** der Thrombozyten überprüfen zu können, wird in einer Küvette bei 37°C und definierter Geschwindigkeit plättchen-reiches Plasma (PRP) gerührt. Diese Küvette befindet sich zwischen einer Lichtquelle und einer Photozelle. Nach Zugabe einer bestimmten Menge Kollagen aggregieren die Plättchen und die Lichtdurchlässigkeit steigt dadurch an. Die Änderungen der Lichtdurchlässigkeit werden aufgezeichnet und mittels PC graphisch dargestellt.

In dieser Dissertation wird die Bindung von Annexin V an Phosphatidylserin als weiterer Marker für den Qualitätszustand der gelagerten Blutprodukte im Vergleich zu den anderen Qualitätsparametern untersucht. Die Verlagerung von Phosphatidylserin aus dem Zellinneren auf die Zelloberfläche ist Zeichen einer Aktivierung oder beginnenden Apoptose. Annexin V wiederum bindet sehr gut an Phosphatidylserin; deshalb kann mit markiertem Annexin V Phosphatidylserin auf der Zelloberfläche sichtbar gemacht werden, woraus sich ein Maß für den Alterungs- und Aktivierungszustand der Zelle ergibt.

Seit den 90er Jahren beschäftigt sich die Forschung mit Annexinen. 1991 überprüften THIAGARAJAN et al. (1991) die Funktion des Annexin V als Antikoagulant. Sie zeigten eine Bindung des Annexins an Phosphatidylserin. Phosphatidylserin auf der Oberfläche der Zellmembran dient als Vermittler der Gerinnungskaskade. Ein Jahr später gelang es MYRPHY CT. et al. (1992) als erstem, Annexin V in menschlichen Thrombozyten zu identifizieren. Es zeigte sich, dass Annexin V mit 0.02 bis 0.005% den größten Anteil der Annexinfamilie in menschlichen Thrombozyten bildet. Im Jahr 1993 zeigten FADOK VA et al. (1993), dass die Expression von Phosphatidylserin an der Zelloberfläche eine wichtige Rolle in der Beseitigung der apoptotischen Zellen durch die Makrophagen spielt. Im Ablauf der Apoptose wird Phosphatidylserin vom Zellinneren auf die Zelloberfläche transferiert, zu einem Zeitpunkt, bei dem die Apoptose bereits begonnen hat, aber die Zellmembran noch intakt ist. Gleichzeitig ist die Expression von Phosphatidylserin auf der Thrombozytenoberfläche ein Marker für die Aktivierung von Thrombozyten.

VAN HEERDE et al. (1995) diskutierten über die Darstellung von apoptotischen Zellen mittels Annexin V. Im selben Jahr verwendeten STRATTON et al. (1995) ⁹⁹Tc markiertes Annexin V, um akute links atriale Thromben zu detektieren. Die Anfärbarkeit der Thrombozyten und Erythrozyten mittels Annexin V-PE bietet also einen Weg, Schäden durch die Lagerungsdauer zu definieren, da mit zunehmender Lagerungsdauer zugrunde gehende Zellen Phosphatidylserin auf der Oberfläche exprimieren. Die Messung des gebundenen, markierten

Annexin V im Durchflusszytometer ermöglicht es, annexinpositive Zellen quantitativ zu erfassen, um somit eine möglicherweise bessere Aussage über den Qualitätszustand des Blutproduktes machen zu können.

Ein besonderer Aspekt in der Versorgung von Patienten eines Universitätsklinikums mit Blutprodukten ist die bei besonders gefährdeten Empfängern erforderliche Bestrahlung, um eine Graft-versus-Host-Reaktion zu vermeiden (siehe Tabelle 4). Für diese Empfänger müssen alle Blutkomponenten mit ionisierenden Strahlen (empfohlene Dosis: 30 Gy) behandelt werden (Bundesgesundheitsblatt 7/2000). Aus diesem Grund wurden die zu den Messungen herangezogenen Blutprodukte geteilt und je zur Hälfte bestrahlt.

Tabelle 4:

Indikationen für eine Bestrahlung von Blutprodukten

▪ Transfusion bei Stammzell/Knochenmarktransplantation
▪ Transfusion vor autologer Blutstammzellentnahme
▪ Transfusion bei schwerem Immundefektsyndrom
▪ Intrauterine Transfusion
▪ Austauschtransfusion
▪ Transfusion bei Hochdosis-Chemotherapie mit oder ohne Ganzkörperbestrahlung bei Leukämien, malignen Lymphomen und soliden Tumoren
▪ Transfusion bei M. Hodgkin
▪ Transfusion bei Frühgeborenen (weniger als 37 Schwangerschaftswochen)
▪ Transfusion bei Neugeborenen bei Verdacht auf Immundefizienz
▪ bei allen gerichteten Blutspenden von Blutsverwandten

Ziel dieser Dissertation ist es, den Einsatz von markiertem Annexin V in der Qualitätskontrolle von bestrahlten und unbestrahlten Blutprodukten zu überprüfen und mit bereits etablierten Methoden zu vergleichen.

2. Material und Methoden

2.1. Herstellung von Blutprodukten

2.1.1. Leukozytenarme Erythrozytenkonzentrate (LAE)

Bei der Blutspende wird das Vollblut in ein speziell für die sterile Trennung von Blutbestandteilen vorgesehene Beutelsystem geleitet. Dieses besteht aus drei Beuteln, wobei die Spende des Vollblutes zunächst in den mittleren Beutel erfolgt. (siehe Abbildung 1)

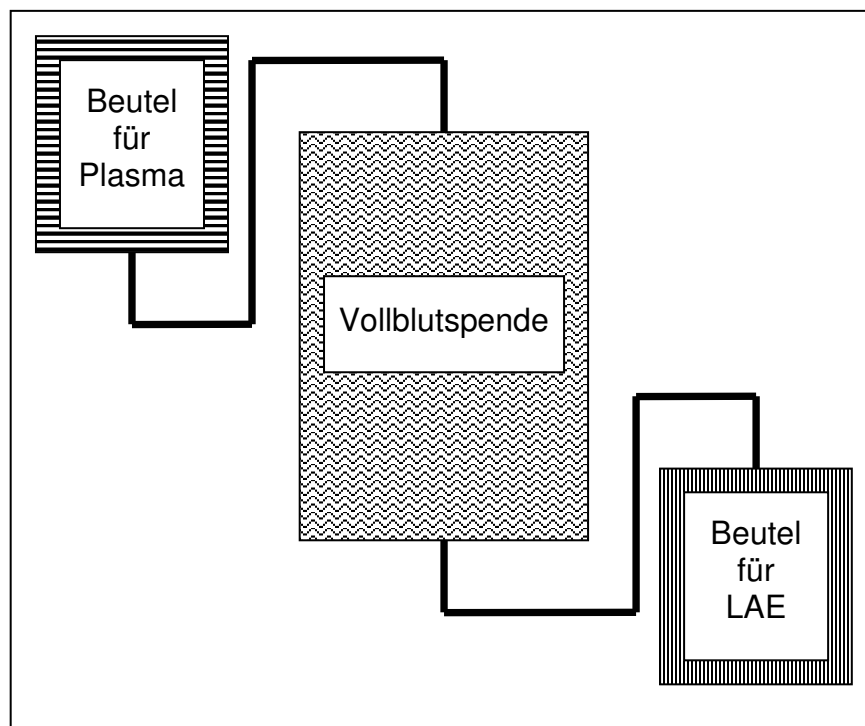


Abbildung 1: Prinzip der Auftrennung des Blutes

Nach abgeschlossener Spende wird die Blutkonserve bei 3500 U/min für 20 Minuten zentrifugiert. Durch diesen Vorgang trennt sich das Blut in dem mittleren Beutel in drei Schichten auf (siehe Abbildung 2).

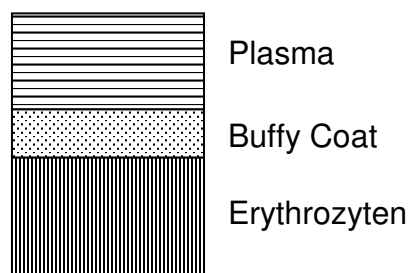


Abbildung 2: Vollblut nach der Zentrifugation

Im oberen Teil des Beutels befindet sich nun das Blutplasma, im mittleren Bereich der sogenannte Buffy Coat, bestehend aus Thrombozyten und Leukozyten, und im unteren Teil befinden sich die Erythrozyten. Mit Hilfe des Optipress II, einem automatischem Blutkomponenten-Extraktor (Abbildung 3) für die standardisierte Trennung von Vollblut in hochreine Einzelkomponenten, werden die drei Blutbestandteile nun steril voneinander getrennt. Dabei kontrollieren licht- und druckempfindliche Sensoren diesen Vorgang, bei dem durch kontrollierten Druck das Plasma vom Buffy Coat abgetrennt und in den oberen Beutel gelenkt wird. Nach demselben Prinzip werden die Erythrozyten in den unteren Beutel abgepresst. Am Ende der Komponententrennung werden die Beutel nun steril abgeschweißt und einzeln weiterverarbeitet.

Es gibt einen wichtigen Aspekt bei der Herstellung von Blutprodukten: Durch die Transfusion allogener, **nicht leukozytendepletierter** Blutkomponenten können unerwünschte Wirkungen beim Empfänger ausgelöst werden können. Hierbei spielt die febrile nicht-hämolytische Transfusionsreaktion, eine HLA-Alloimmunisierung, die Immunsuppression sowie die Übertragung von zellständigen Viren (KLEIN HG et al. 1998) eine wichtige Rolle. Deshalb wurde von der Aufsichtsbehörde (Paul-Ehrlich-Institut) entschieden, dass ab dem 01.01.2001 ausschließlich nur solche Produkte in Verkehr gebracht werden dürfen, die einen Restleukozytengehalt von $<1 \times 10^6$ pro Einheit (Blutkonserve) aufweisen (§28 Abs. 3 c des Arzneimittelgesetzes AMG). Deshalb folgt der oben genannten Herstellung eines Erythrozytenkonzentrats noch ein Schritt, in dem die Restleukozyten aus dem Erythrozytenkonzentrat herausgefiltert werden; gleichzeitig werden die Erythrozyten in einen Lagerbeutel verbracht, der eine Nährlösung enthält, die eine Lagerung bis zu 49 Tagen erlaubt.

2.1.2. Thrombozytenpools

Die Thrombozytenpools entstehen aus den Buffy Coats von vier Vollblutspenden. Dazu werden die vier Buffy Coats mit Hilfe von sterilem Zusammenschweißen der Beutel zusammen in einen Beutel verbracht. Dabei wird gleichzeitig eine Spül- und Nährlösung eingebracht. Durch die anschließende Zentri-

fugation erfolgt eine Trennung der restlichen Erythrozyten und Leukozyten, die die untere Schicht bilden, von den weniger dichten Thrombozyten, die im Überstand verbleiben. Um die in 2.1.1 angesprochenen Komplikationen bei nicht leukozytendepletierten Thrombozyten zu vermeiden, erfolgt nun die Filtration des thrombozytenreichen Präparates zur Abtrennung der Rest-Leukozyten. Die Lagerung der Thrombozyten erfolgt bei Raumtemperatur (22 °C) auf der Thrombozytenschaukel LPR 1 der Firma Melcoo Engineering.

2.1.3. Thrombozytenkonzentrate

Die Herstellung der Thrombozytenkonzentrate erfolgt durch Apherese mit integrierter Leukozytendepletion. Auch diesem Verfahren liegt die Zentrifugation zugrunde. Der Spender wird an einen extrakorporalen Kreislauf angeschlossen, bei dem noch während der Spende die Thrombozyten isoliert und die restlichen Bestandteile wieder dem Spender zurücktransfundiert werden. Im Gegensatz zu den Thrombozytenpools benötigen die maschinell hergestellten Apherese-TK keinen zusätzlichen Filtrationsschritt, da die geforderte Höchstzahl an Restleukozyten durch das Verfahren bereits unterschritten wird. Zum Einsatz kommen in Tübingen Zellseparatoren der Marken Baxter Amicus Crescendo (Abbildung Nr. 4), Cobe Spectra Gambro BCT und Trima accel Gambro.



Abbildung: 3
automatischer Blutkomponenten-Extraktor
Opitpress II



Abbildung: 4
Baxter Amicus

Die folgende Kennzeichnung der Antikörper, Chemikalien und Geräte dient der Zuordnung zu den verschiedenen Versuchen.

Schlüssel zur Kennzeichnung der Tests:

- 1 Stimulation der Thrombozyten TRAP 6
- 2 Annexinbindung bei Thrombozyten
- 3 Ermittlung der Aggregation mit APACK 4
- 4 Positivkontrolle für Annexintest
- 5 Annexinbindung bei Erythrozyten

2.2.1. Antikörper und Antigene

- Monoklonal Antibody, Anti-CD62P, R-Phycoerythrin (R-PE) konjugiert Mouse IgG_{1κ}, Clone AK4 [1]
 - BD Biosciences, (10975 Torreyana Road), San Diego, USA
- Annexin V-PE konjugiert, 35-36 kDa Ca²⁺ abhängiges phospholipid-binding Protein [2] [4]
 - BD Biosciences, (10975 Torreyana Road), San Diego
- Kollagen-Reagens, 1ml Fläschchen (100µg/ml), Kat.Nr.: 5368 [3]
 - Rolf Greiner Biochemica, 65558 Flacht, Germany
- Thrombin Receptor Activator Protein 6 (TRAP 6), 5 mg, Kat.Nr.: H 8365
 - Bachem AG, (Hauptstrasse 144), CH-4416 Bubendorf, Swiss [1]
- Calciumionophore, A-23817, [4]
 - SIGMA, St. Louis, Missouri, USA

2.2.2. Chemikalien

- Annexin V Bindungspuffer, 50ml [2] [4]
 - BD Biosciences, (10975 Torreyana Road), San Diego, USA
- Waschlösung Thrombozyten [2] [5]:
 - 0,5% EDTA in isoton NaCl gelöst
- Ampuwa 100ml, Fresenius Kabi [1]
- PBS, Firma Life Technologies 70011036 [1]
- BSA, Firma Serva, 69115 Heidelberg, Germany

2.2.3. Labormaterial

- Frickenhausen Polysterol-Röhrchen, 14 ml [2] [5]
 - FA GREINER
- Save Lock Tubes, 2,5ml [2] [5]
 - FA Eppendorf
- FACS Röhrchen, 5 ml [2] [5]
 - FA Sarsted
- S-Monovette, 75 x 15,3 [2] [5]
- Beutelsysteme: Baxter Transfer Pack 150 ml [2] [5], Lagerungsbeutel

2.2.4. technische Geräte

- Zentrifuge: EBA 12 R , FA Hettich [2] [5]
- Waage: 1) Ottuss Analytical Standard [2] [5]
2) Sartorius excellence [2] [5]
- Celldyn: Abbott CellDyn 3500 [2] [5]
- Aggregometer: APACT 4 [2]
- pH-Meter: Radiometer Copenhagen 700 Series [2]
- Schweissgerät: 1) Terumo TSCD SC 201 –AH [2] [5]
2) Hamatron III, FA Baxter[2] [5]
- Thrombozytenschaukel: Modell: LPR 1 FA. Melcoo Engeniering [2]
- Bestrahlungsgerät: Bestrahlungsanlage Biobeam 8000 [2] [5]
- FACS Gerät: Coulter EPICS XL-MCL [2] [5]

2.3. Laboruntersuchungen

2.3.1. Wichtige Abkürzungen

TKZ	Thrombozytenkonzentrat
TP	Thrombozytenpool
TLB	Thrombozytenlagerbeutel
TBP	Thrombozytenprobe
SLT	Save Lock Tubes [2,5ml] der Firma Eppendorf
PSR	Polysterol-Röhrchen
HSR	Hypotone Schockreaktion
PAS	Platelet additive Solution
PBS	Phosphat buffered saline (0,1% BSA)
ABP	Annexin Bindungs Puffer
LAE	Leukozytenarmes Erythrozytenkonzentrat
BSA	Bovines Serum Albumine

2.3.2. Thrombozytenpools/Thrombozytenkonzentrate

2.3.2.1. Probenanzahl, Messtage

Probenanzahl: 3 Thrombozytenkonzentrate und drei Poolpräparate verteilt auf jeweils 2 Lagerbeutel

→ $6 \times 2 = 12$ Thrombozytenkonzentrate/Pools

→ Bestrahlung (30Gy) am 1. Messtag

Messtage: Am Tag der Herstellung (1), sowie am Tag 3 und Tag 7

2.3.2.2. CD62P

a) Prinzip

Thrombozyten verändern nach Aktivierung die Dichte diverser Oberflächenantigene, welche mittels der Durchflusszytometrie nachgewiesen werden können. CD62P dient der Adhäsion der Thrombozyten u.a. an Neutrophile. Dieser Rezeptor wird bei einer Aktivierung aus präformierten α -Granula auf die Thrombozytenoberfläche befördert und später proteolytisch abgespalten. Die Messung

durch den mit R-Phycoerythrin konjugierten Antikörper ANTI-CD62P ermöglicht eine Aussage über die Rezeptordichte auf Thrombozyten und den Aktivierungszustand der Zellen. Eine ebenfalls durchgeführte Stimulation mit TRAP6 als Kontrolle ermöglicht eine Aussage über die Aktivierbarkeit der Thrombozyten in der Präparation.

b) Herstellung der Thrombozytensuspension

- Abfüllen von 2 ml TKZ oder TP aus TLB in SLT (2,5ml)
- Ermitteln der Thrombozytenzahl mit Abott CellDyn
- Einstellen der Zellzahl auf 20.000/µl in PBS

c) Versuchsablauf 1 (Stimulation mit TRAP 6)

- 135 µl der verdünnten Thrombozyten werden in SLT gegeben
- Hinzufügen von 15 µl TRAP 6 und leichtes Schwenken
- Inkubation (10 min) bei Raumtemperatur und Dunkelheit
- 50µl der Suspension wird in neue SLT pipetiert
- Hinzugabe von 5µl ANTI-CD62P, Inkubation (5 min)
- Abstoppen der Reaktion mit 950 µl PBS
- Messung der Fluoreszenz mit Coulter EPICS XL-MCL

d) Versuchsablauf 2 (keine Stimulation)

- 50 µl der verdünnten Thrombozyten werden in SLT gegeben
- Hinzugabe von 5µl ANTI-CD62P, Inkubation (5 min)
- Abstoppen der Reaktion mit 950 µl PBS
- Messung der Fluoreszenz mit Coulter EPICS XL-MCL

2.3.2.3. pH Messung

a) Herstellung des Messmediums

- aus TLB werden 10 ml TKZ / TP in Spritzen aufgezogen

b) Versuchsablauf

- Messung des pH am Radiometer Kopenhagen

2.3.2.4. Aggregation

a) Prinzip

In einer Küvette wird bei 37°C und definierter Geschwindigkeit plättchenreiches Plasma (PRP) gerührt. Diese Küvette befindet sich zwischen einer Lichtquelle und einer Photozelle. Nach Zugabe einer bestimmten Menge Kollagen aggregieren die Plättchen und die Lichtdurchlässigkeit steigt an. Die Änderungen der Lichtdurchlässigkeit werden aufgezeichnet und mittels PC graphisch dargestellt. Die Qualitätskontrolle der Transfusionsmedizin Tübingen misst die Aggregation nach Zugabe von 30 µl Kollagen zu 170 µl PRP. Aus ungeklärten Gründen zeigt sich bei den Pools bei sofortiger Messung keine Aggregation. Deshalb wurden bei den Pools die Messungen erst nach 3 Stunden durchgeführt, weil früher nachgewiesen worden war, dass dann die Werte im Normbereich liegen.

b) Herstellung der Messmedien

- 1) PPP: platelet poor plasma
 - Abfüllen von 2,5 ml TBP in SLT, (bei TP 3h Lagerung in SLT bei RT)
 - Zentrifugation (830 g, 10 min bei 20°C)
 - Vorsichtiges Abpipetieren des Überstandes in ein neues SLT
- 2) PRP: platelet rich plasma
 - Abfüllen von 2,5 ml TBP in SLT und Messen der Zellzahl mittels CellDyn
 - Einstellen der Konzentration auf 250.000/ml in PPP

c) Versuchsablauf

- 170 µl PPP werden in Küvette pipetiert
- Einsetzen der Küvette in den AFACT 4
- Messung der Trübung von PPP, die PPP Küvette wird herausgenommen
- 170 µl PRP werden in zweite Küvette pipetiert
- Messung der Trübung von PRP
- Manuelles Starten des Messvorgangs
- Nach 10 sec werden 30 µl Kollagen dazugegeben
- Ablesen der Aggregation nach 520 sec

2.3.2.5. Annexin V-PE

a) Prinzip

Während der Frühphase der Apoptose der Erythrozyten findet eine Translokation von Phosphatidylserin von der Innenseite der Zellmembran an die Oberfläche der Zelle statt. In Anwesenheit von Calcium kann mittels Annexin V, ein 25-26 kDa großes Protein, das eine hohe Affinität für Phosphatidylserin aufweist, diese Expression an der äußeren Zellmembran apoptotischer Zellen nachgewiesen werden. Dabei wird Annexin V an den Fluoreszenzfarbstoff PE gekoppelt und nach Inkubation mit den Erythrozyten im Durchflusszytometer gemessen.

Bei den Thrombozyten kann die Translokation von Phosphatidylserin, die sowohl ein Maß für Aktivierung also auch beginnende Apoptose ist, durch die Anwesenheit der Agonisten Thrombin oder Kollagen herbeiführt werden (BEVERS et al. 1983) und damit sowohl eine Aussage über die während der Herstellung bereits aktivierten Thrombozyten als auch über die Aktivierbarkeit der Thrombozyten liefern. Da die Bindung des Annexins sehr Ca^{2+} abhängig ist, wird durch Zugabe einer standardisierten Menge Annexinbindungspuffer (enthält u.a. 25 mmol CaCl_2) die Möglichkeit der Bindung gewährleistet.

b) Herstellung der Messmedien

- 4 ml TBP werden aus den Baxter Transfer Packs in ein PSR (15ml) gegeben
- Zentrifugieren mit 1409 g, RT, 15 min
- Dekantieren
- Waschen (1x): Mischen mit 10 ml Thrombozyten-Waschlösung, anschließend Zentrifugieren mit 1409 g, RT, 15 min
- Dekantieren
- Waschen (2x): Zu dem Dekantat werden erneut 10 ml Waschlösung dazugegeben, Zentrifugieren mit 1409 g, RT, 15 min
- Dekantieren und Resuspendieren mit 4 ml ABP
- Messung der Zellzahl mittels CellDyn
- Einstellen der Thrombozytenkonzentration auf $2,0 \times 10^7/\text{ml}$ mit ABP

c) Versuchsablauf

- Vorbereitung: 100µl der verdünnten Thrombozyten werden in ein FACS Röhrchen pipetiert
- Anfärben der Thrombozyten: Inkubation mit 5µl PE markiertem Annexin V über 15 min bei Raumtemperatur in Dunkelheit
- Abstoppen der Reaktion mit 450 µl ABP
- Leichtes Aufschütteln der Lösung
- Messung am Durchflusszytometer

2.3.2.6. Kontrollgruppe**a) Prinzip**

Um sicherzustellen, dass die gelagerten Thrombozyten prinzipiell noch aktiviert werden können, wurde jeweils eine positive Kontrollgruppe mitgeführt, die durch Zusatz von Calcium Ionophore aktiviert wurde.

b) Herstellung der Messmedien

- 4 ml TBP werden aus den Baxter Transfer Packs in ein PSR (15ml) gegeben
- Zentrifugieren mit 1409 g, RT, 15 min
- Dekantieren
- Waschen (1x): Mischen mit 10 ml Thrombozyten-Waschlösung, anschließend zentrifugieren mit 1409 g, RT, 15 min
- Dekantieren
- Waschen (2x): Zu dem Dekantat werden erneut 10 ml Waschlösung dazugegeben, zentrifugieren mit 1409 g, RT, 15 min
- Dekantieren
- Resuspendieren mit 4 ml Annexin Bindungs- Puffer
- Messung der Zellzahl mittels CellDyn
- Einstellen der Thrombozytenkonzentration auf $2,0 \times 10^7$ /ml mit ABP

c) **Versuchsablauf**

- Vorbereitung: 100µl der verdünnten Thrombozyten werden in ein FACS Röhrchen pippetiert
- Anfärben der Thrombozyten: Inkubation mit 5µl Annexin V mit Zugabe von 1 µl Ca Ionophore über 15 min bei Raumtemperatur in Dunkelheit
- Abstoppen der Reaktion mit 450 µl ABP
- Leichtes Aufschütteln der Lösung
- Messung am Durchflusszytometer

2.3.3. **Erythrozytenkonzentrate**

2.3.3.1. Probenzahl, Messtage

Probenanzahl: 12 LAE unterschiedlichen Alters (s.u.),
verteilt auf jeweils 2 Lagerbeutel
→ $12 \times 2 = 24$ LAE

Bestrahlung: Bestrahlung von 12 LAE mit 30 Gy am 1. Messtag

Probenalter: Jeweils 4 Gruppen (à 3 LAE) im Alter von 14, 28, 35, 42 Tage

Messtage: Tag 1 am Tag der Bestrahlung, anschließend alle 7 Tage bis zum Tag 49 der Lagerung.

2.3.3.2. Freies Hämoglobin

a) **Prinzip**

- Durch Schäden an der Erythrozytenmembran tritt Hämoglobin aus dem Erythrozyten aus. Dieses kann photometrisch im Plasma bestimmt und zur Verlaufskontrolle der Erythrozytenqualität herangezogen werden.

b) **Herstellung der Messmedien**

- Aus den Lagerbeuteln (Lagerung unter standardisierten Bedingungen bei 4°C) werden unter sterilen Bedingungen 7 ml der jeweiligen LAE in die Transfer Packs mittels Schweissgerät Terumo TSCD SC 201–AH umgefüllt.
- Verteilen der Erythrozyten auf S-Monovette

c) Versuchsablauf

- Messung im Zentrallabor des Universitätsklinikums Tübingen

2.3.3.3. Freies Kalium

a) Prinzip

Durch Schäden an der Zellmembran tritt Kalium aus dem Erythrozyten aus. Der Kaliumspiegel wird ebenfalls als Qualitätsparameter herangezogen.

b) Herstellung der Messmedien

- Aus den Lagerbeuteln (Lagerung unter standardisierten Bedingungen bei 4°C) werden analog zu 2.3.3.2 unter sterilen Bedingungen 7 ml der jeweiligen LAE in die Transfer Packs überführt.
- Umfüllen der Erythrozyten auf S-Monovette

c) Versuchsablauf

- Messung im Zentrallabor des Universitätsklinikums Tübingen

2.3.3.4. Annexin V-PE

a) Prinzip

Während der Frühphase der Apoptose findet eine Translokation von Phosphatidylserin von der Innenseite der Zellmembran an die Oberfläche der Zelle statt. In Anwesenheit von Calcium kann mittels Annexin V-PE, ein 25-26 kDa großes Protein, das eine hohe Affinität für Phosphatidylserin aufweist, diese Expression an der äußeren Zellmembran apoptotischer Zellen nachgewiesen werden. Dabei ist Annexin V an den Fluoreszenzfarbstoff PE gekoppelt (Annexin V-PE) und wird nach Inkubation mit den Erythrozyten im Durchflusszytometer gemessen.

b) Herstellung der Messmedien

- Aus den Lagerbeuteln werden, analog zu 2.3.3.2, unter sterilen Bedingungen 5 ml der jeweiligen LAE in die Transfer Packs überführt.
- Umfüllen der Erythrozyten in ein Polysterol-Röhrchen
- Messung der Erythrozytenkonzentration am CellDyn
- Einstellen der Zellzahl auf $6 \times 10^6/\mu\text{l}$

Verdünnungsreihe:

- 10 μl Erythrozyten mit 990 μl ABP in FACS Röhrchen 1
- Leichtes Schwenken
- 50 μl aus dem Röhrchen 1 mit 450 μl ABP in FACS Röhrchen 2
- Leichtes Schwenken

c) Versuchsablauf

- Vorbereitung: 100 μl der verdünnten Erythrozyten werden in ein FACS Röhrchen pipetiert
- Markierung der Erythrozyten : Inkubation mit 5 μl Annexin V-PE über 15 min bei Raumtemperatur in Dunkelheit
- Leichtes Aufschütteln der Lösung
- Messung am Durchflusszytometer

2.4. Arbeitsweise der technischen Geräte

2.4.1. Durchflusszytometer

Allgemein:

Das Durchflusszytometer fungiert als optisches Meßsystem. In den 60er und 70er Jahren entwickelten mehrere Arbeitsgruppen unabhängig voneinander Geräte zur Messung von Tumorzellen, Lymphozyten und Bakterien mit Hilfe von Protein-, Nukleinsäurefarbstoffen und fluoreszenzmarkierten Antikörpern. Dabei bilden das Streulicht, die Fluoreszenz der einzelnen Zellen und das Definieren von Auswertefenstern = Gaten (deutsch: Schleusen) die Basis der Messung. Zur Untersuchung sind Zellen jeder Herkunft geeignet, sofern sie als Suspension von Einzelzellen vorliegen. Dazu ist es in manchen Fällen notwendig, Gewebsverbände mechanisch oder enzymatisch zu isolieren.



Abbildung 5: Foto Firma Beckman-Coulter

Streulicht:

Bei der Ermittlung des Streulichtes passiert eine Zelle zunächst im so genannten Durchflusszellenblock (Abbildung 6) einen Laserstrahl, der die Zelle von der Seite bestrahlt und je nach Eigenschaft der Zelle unterschiedlich gebrochen wird.

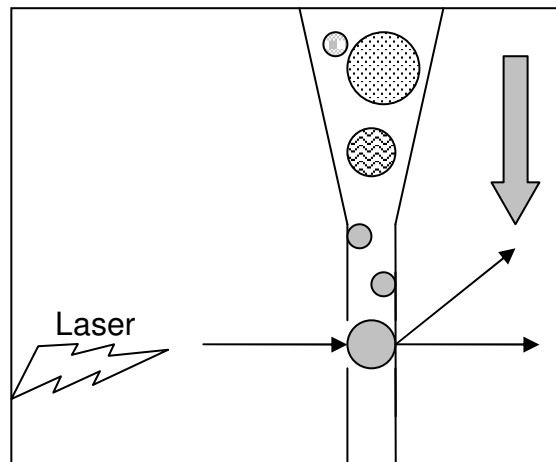


Abbildung 6: Prinzip des Durchflusszellenblocks

In der Durchflusszytometrie wird zwischen Vorwärtstreulicht und Seitwärtstreulicht unterschieden. Das Vorwärtstreulicht (Forward Side Scatter FSC, siehe Abbildung. 7) ist abhängig von der Größe der einzelnen Zelle und ist durch einen Winkel kleiner 10° charakterisiert. Das Seitwärtstreulicht (Side Scatter SSC, siehe Abbildung. 8) hingegen hängt sehr stark vom Inhalt der einzelnen Zelle ab. Je stärker die Membranfaltung und je mehr intrazelluläre Granula vorhanden sind, umso stärker bricht der Laserstrahl und umso größer das Seitwärtstreulicht. Dabei wird der Laserstrahl in einem Winkel von ca 90° gebrochen.

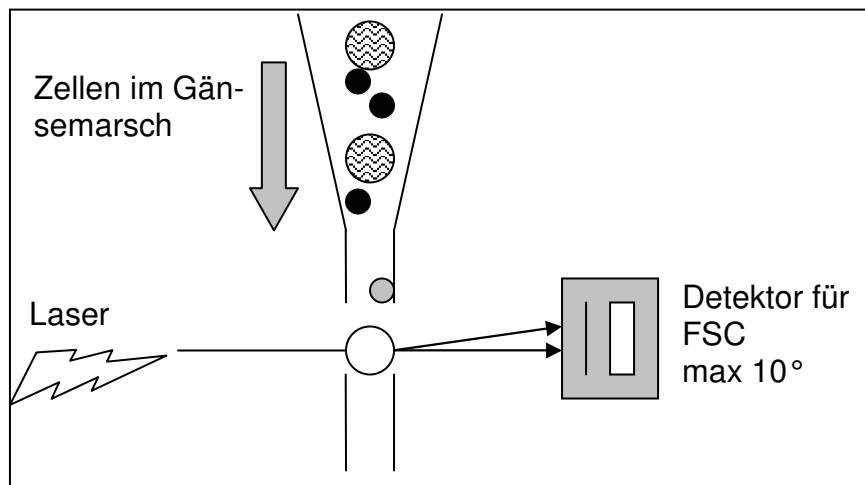


Abbildung 7: Prinzip des FSC

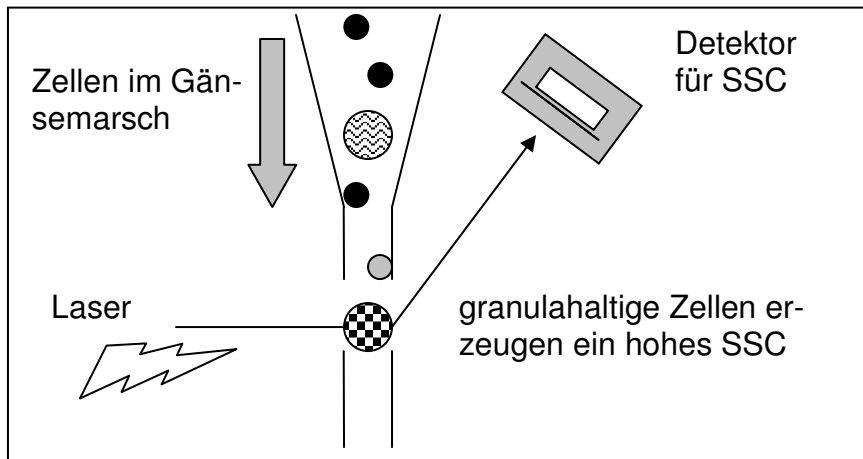


Abbildung 8: Prinzip des SSC

Die Darstellung der Ergebnisse erfolgt anschließend in einem so genannten Dot Plot (Abbildung 9). In der hier vorliegenden Dissertation wurden die Ergebnisse des SSC auf die X-Achse und die Ergebnisse des FSC auf die Y-Achse logarithmisch aufgetragen.

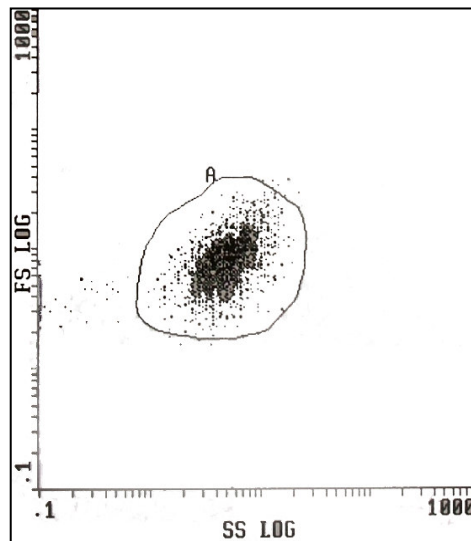


Abbildung 9: Dot-Plot Darstellung

Fluoreszenz:

Durch die Messung der Fluoreszenz können zusätzlich mit dem Durchflusszytometer die verschiedenen Zellen und deren unterschiedlichen Merkmale erfasst werden. Voraussetzung dafür ist das Markieren der zur untersuchenden Probe mit speziellen Antikörpern. Dabei werden die Zellsuspensionen mit den speziellen Antikörpern vermischt und bei Raumtemperatur und Dunkelheit 15

min gelagert. Das Prinzip der Inkubation mit den Antikörpern erklärt Abbildung 10. In dieser Arbeit werden als Antikörper ANTI-CD62P-PE und das Annexin V-PE eingesetzt. Nähere Informationen zu den Antikörpern siehe 2.2.1.

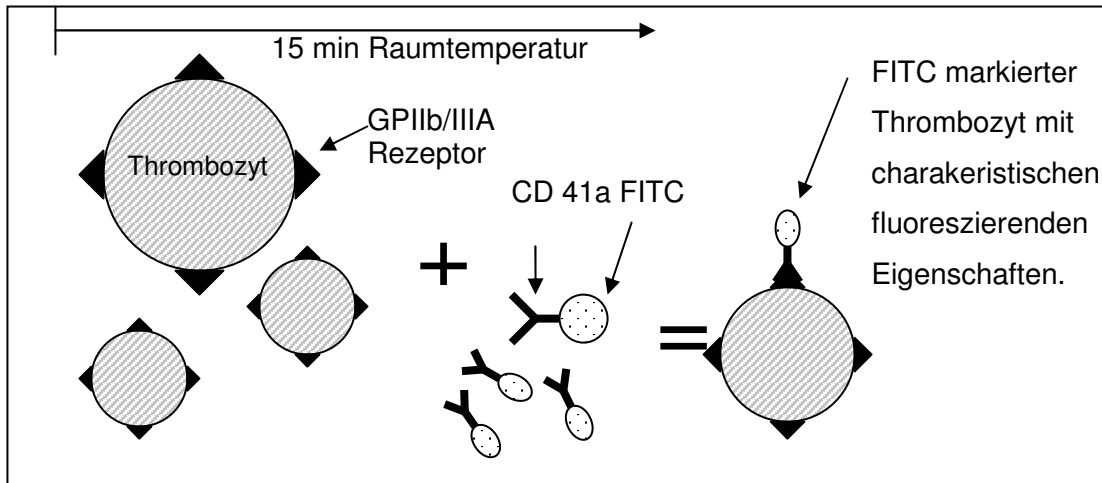


Abbildung 10: Inkubation von Thrombozyten mit Antikörpern

Gaten: (Englisch = schleusen)

An dem an das Durchflusszytometer angeschlossenen PC zeichnet man mit der Computer-Maus eine Region (siehe Pfeil in Abbildung 11) in das Streulichtdiagramm ein, die nur die für die Messungen relevanten Zellen enthält. Somit werden nur die für die Fragestellung wichtigen Zellen von der Software erfasst und für die Messungen herangezogen.

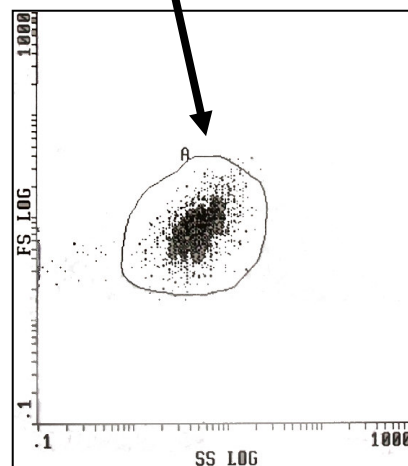


Abbildung 11: Dot-Plot Darstellung: Gaten

3. Ergebnisse

3.1. Thrombozyten

3.1.1. Thrombozytenpools

Es wurden drei Thrombozytenpools (z.B. 3406-10 = Nummer des Poolpräparates) geteilt und sowohl unbestrahlt als auch **bestrahlt (x)** überprüft. Untersucht wurden die Werte am Tag der Bestrahlung = Tag 1, Tag 3 und Tag 7.

Die Tabelle auf der kommenden Seite enthält die verschiedenen Messergebnisse der einzelnen Proben an den entsprechenden Prüftagen, sowie die Mittelwerte.

In den dann folgenden Abbildungen werden diese Daten graphisch dargestellt.

Tabelle 5: Ergebnisse Thrombozytenpools mit Durchschnittswerten der bestrahlten und unbestrahlten Proben

3.1.1	ANTI CD62P Unstimuliert %	ANTI CD62P T 6 Stimuliert %	Annexin V %	Annexin V und Iono- phore %	Aggregation %	pH
TAG 1						
3406-10	2,83	7,31	8,15	97,00	56,30	7,014
3406-10x	3,28	9,88	10,90	97,90	53,50	7,026
3407-10	3,26	9,71	8,04	97,20	58,00	6,968
3407-10x	3,51	9,63	8,24	96,90	56,60	6,977
3408-10	4,71	8,62	5,68	96,20	60,80	6,927
3408-10x	4,86	7,82	8,23	94,60	68,40	6,911
TAG 3						
3406-10	6,55	7,77	19,20	98,20	16,10	7,285
3406-10x	6,12	7,66	18,80		24,00	7,286
3407-10	4,95	8,46	16,60	98,10	17,90	7,206
3407-10x	6,01	8,28	19,70		19,40	7,201
3408-10	5,23	6,66	13,90	95,90	24,40	7,289
3408-10x	5,06	6,16	13,00		28,40	7,069
TAG 7						
3406-10	5,76	7,80	22,50	93,40	14,30	6,990
3406-10x	6,96	7,43	23,80	91,60	15,00	6,931
3407-10	4,91	5,44	24,30	95,90	24,60	6,973
3407-10x	4,62	5,64	24,20	97,10	21,20	6,942
3408-10	6,95	6,21	23,90	95,50	19,80	7,240
3408-10x	5,62	7,42	25,40	95,50	20,20	7,255
DURCHSCHNITT						
TAG 1						
unbestrahlt	3,60	8,55	7,29	96,80	62,38	6,970
bestrahlt	3,88	8,91	9,12	96,47	59,50	6,971
TAG 3						
unbestrahlt	5,58	7,63	16,57	97,40	23,04	7,260
bestrahlt	5,73	7,37	17,17		23,93	7,185
TAG 7						
unbestrahlt	5,87	6,48	23,57	94,93	19,82	7,068
bestrahlt	5,73	6,83	24,47	94,73	18,80	7,043

3.1.1.1. CD62P und TRAP 6

Bei allen drei Messgruppen lieferten die Ergebnisse am Tag eins die größte Aktivierbarkeit der Thrombozyten mittels TRAP 6. Bei den unstimuliert bestrahlten Thrombozyten lag die durchschnittliche Anfärbbbarkeit mit ANTI CD62P mit + 0,28 % leicht über der der unbestrahlten. Dies zeigte sich ebenfalls nach der Stimulation.

Am dritten Messtag war auf der einen Seite ein Anstieg der unstimuliert ANTI CD62P positiven Zellen zu verzeichnen (unbestrahlt 3,60% → 5,58%; bestrahlt 3,88% → 5,73%), auf der anderen Seite ein Rückgang der Aktivierbarkeit mittels TRAP 6 (unbestrahlt 8,55% → 7,63%; bestrahlt 8,91% → 7,37%). Im weiteren Verlauf der Lagerung kam es am siebten Messtag, bei gleicher Anzahl der unstimuliert ANTI CD62 P positiven Zellen, zu einem weiteren Rückgang der Aktivierbarkeit sowohl bei den bestrahlten als auch unbestrahlten Thrombozyten.

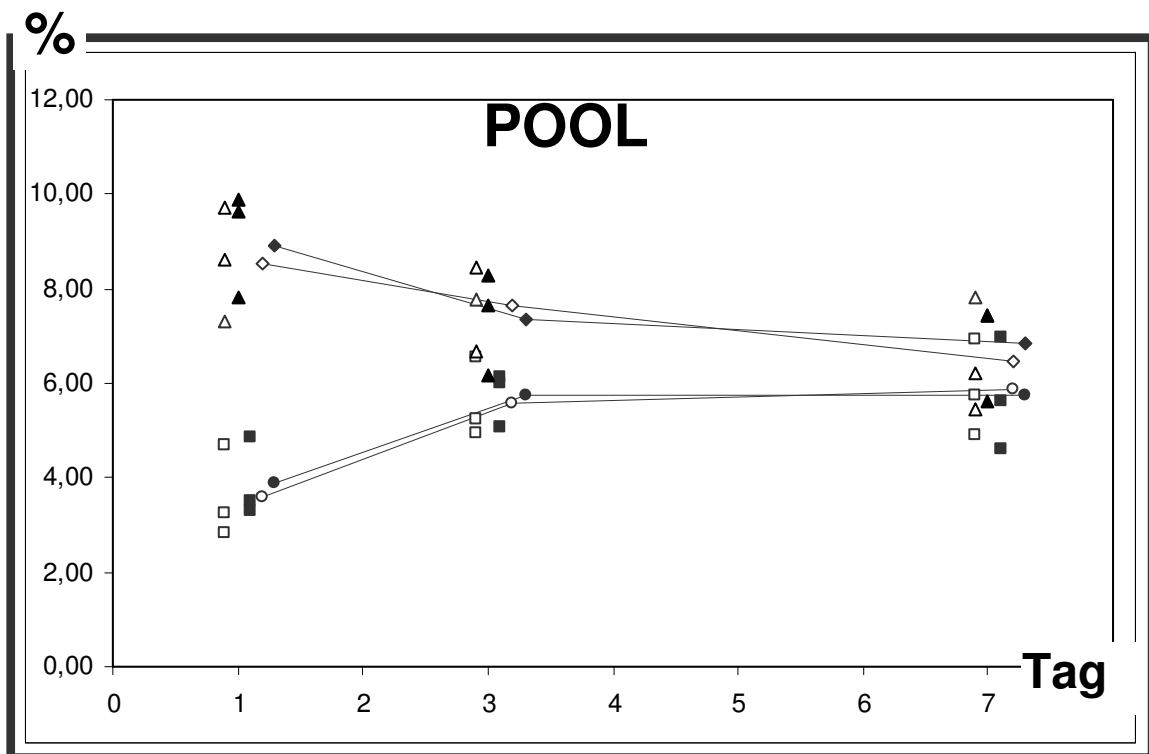


Abbildung 12: CD62P bestrahlt -■- / unbestrahlt -□- unstimuliert
 CD62P bestrahlt -▲- / unbestrahlt -△- stimuliert
 Durchschnitt: CD62P bestrahlt -●- / unbestrahlt -○- unstimuliert
 CD62P bestrahlt -◆- / unbestrahlt -◇- stimuliert

Es zeigt sich also mit zunehmender Lagerung eine Zunahme von CD62P, die einhergeht mit einer reduzierten Stimulierbarkeit.

3.1.1.2. Aggregation

Am ersten Messtag war die Fähigkeit zur Aggregation durch Kollagen bei den bestrahlten Thrombozyten (59,50%) leicht unter der der unbestrahlten (62,38%). Im weiteren Verlauf der Messung fielen die Werte stark ab und lagen somit am Tag drei der Messung bei beiden Gruppen zwischen 23 und 24%.

Dieser Abwärtstrend im Sinne eines Rückganges der Fähigkeit zur induzierten Aggregation war zwischen Tag drei und Tag sieben nur noch leicht erkennbar. Infolgedessen betrug am siebten Messtag die Fähigkeit zur Aggregation bei den bestrahlten Thrombozyten nur noch 18,80%, bei den unbestrahlten 19,82%.

Zusammenfassend beschreibt die Aggregation vor allem zwischen dem ersten und dritten Tag der Lagerung einen deutlichen Rückgang. Ein Unterschied zwischen den bestrahlten und unbestrahlten Thrombozyten ist nicht klar festzustellen.

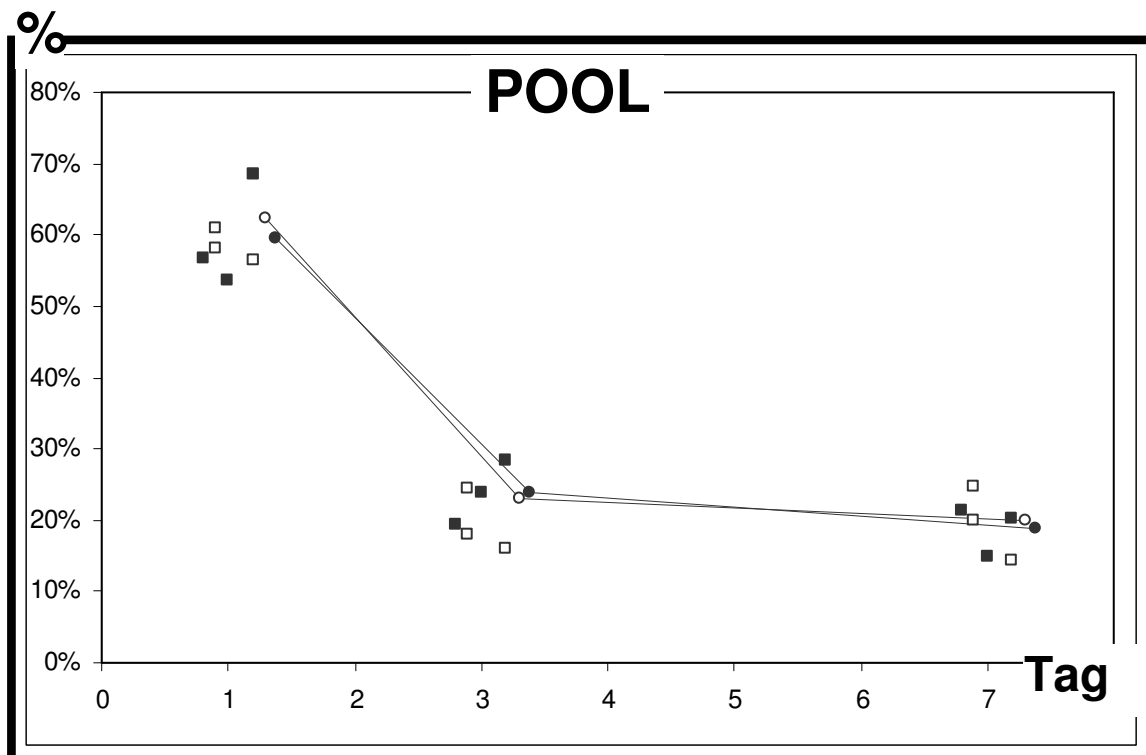


Abbildung 13: Aggregation bestrahlt - ■ -/ unbestrahlt -□-
 Durchschnitt bestrahlt - ● -/ unbestrahlt -○-

3.1.1.3. Annexin V

Am ersten Messtag waren bei den unbestrahlten Thrombozytenpools im Durchschnitt 7,29 % der Zellen annexinpositiv gefärbt, bei den bestrahlten 9,12%.

Im weiteren Verlauf der Messung ließ sich der deutlichste Anstieg der annexinpositiven Zellen zwischen dem ersten und dritten Tag vermerken. Folglich lagen bereits am dritten Messtag die durchschnittlichen Werte bei den bestrahlten Zellen bei 17,17 %, bei den unbestrahlten bei 16,57 %. Weniger steil im Anstieg verhielten sich die Werte zwischen Tag drei und Tag sieben. Jedoch lagen auch am siebten Messtag die bestrahlten Thrombozyten mit 24,47% leicht über denen der unbestrahlten mit 23,57%.

Die zeitgleich zu den Messungen durchgeführten Messungen mit Ca-Ionophore dienten der Sicherstellung der Annexinbindung an beschädigte Thrombozyten. Über den gesamten Messverlauf waren durchschnittlich über 94 % der Zellen nach der Inkubation mit Ionophore annexinpositiv (siehe Tabelle 5, diese Werte werden in Abbildung 14 nicht dargestellt).

Zusammenfassend zeigen die Messergebnisse mit Annexin V-PE während des gesamten Messzeitraumes einen kontinuierlichen Anstieg der annexinpositiven Zellen, der sich vor allem während der ersten drei Tage am eindeutigsten darstellt. Weiterhin lässt sich hier mit Annexin V-PE eine geringe Mehranfärbung der durch Bestrahlung beschädigten Thrombozyten im Gegensatz zu den unbestrahlten Thrombozyten erkennen.

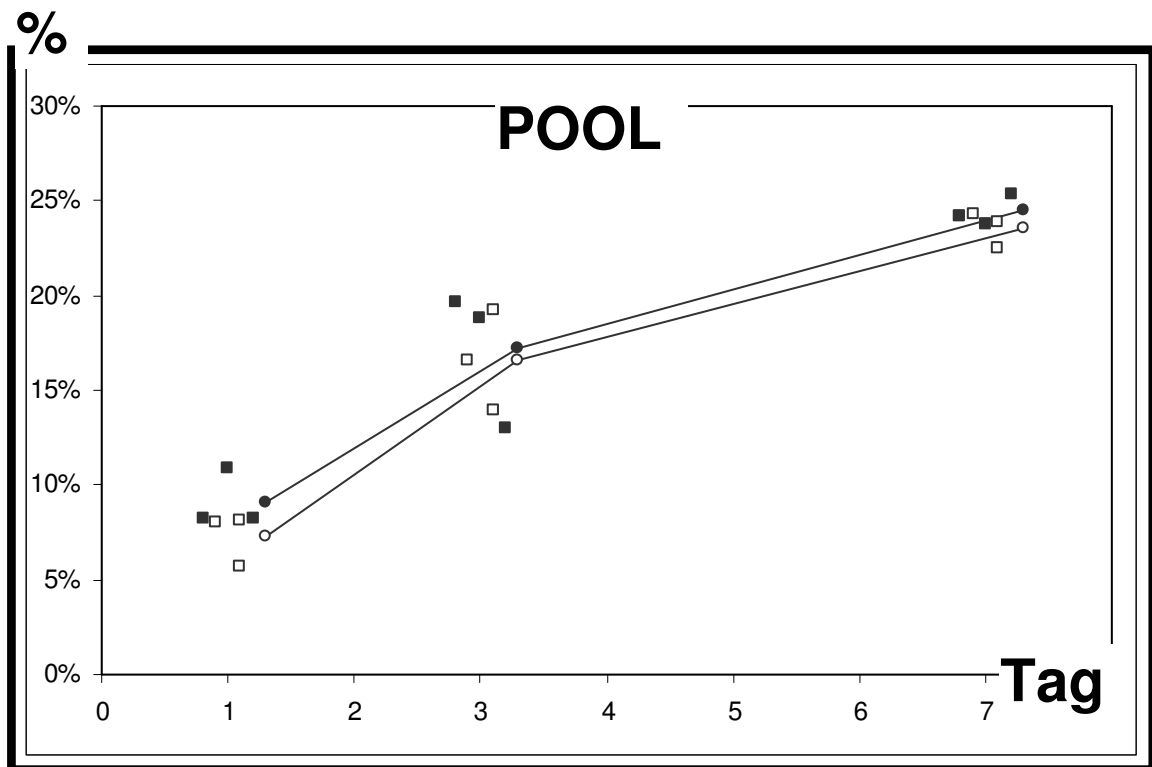


Abbildung 14: Annexin V
 bestrahlt - ■ - unbestrahlt - □ - (Einzelwerte)
 bestrahlt - ● - unbestrahlt - ○ - (Mittelwert)

3.1.1.4. pH Wert

Die Bestimmung der pH Werte ergab erneut einen Anstieg des pH Wertes insbesondere zwischen dem ersten und dritten Tag der Lagerung. Allerdings fielen die pH Werte im weiteren Verlauf der Messung und lagen am Tag 7 bei durchschnittlich 7,086 bei den unbestrahlten und bei 7,043 bei den bestrahlten Thrombozyten.

Bei Betrachtung der pH Werte der unbestrahlten und bestrahlten Thrombozyten ist im Vergleich zu den anderen Parametern eine vermehrte Streuung der Werte, vor allem am Tag drei und sieben der Messung, zu erkennen.

Zusammenfassend ist zwischen dem ersten und dritten Tag der Lagerung ein klarer Anstieg feststellbar, wohingegen kein eindeutiger Unterschied zwischen den bestrahlten und unbestrahlten Thrombozyten gezeigt werden konnte.

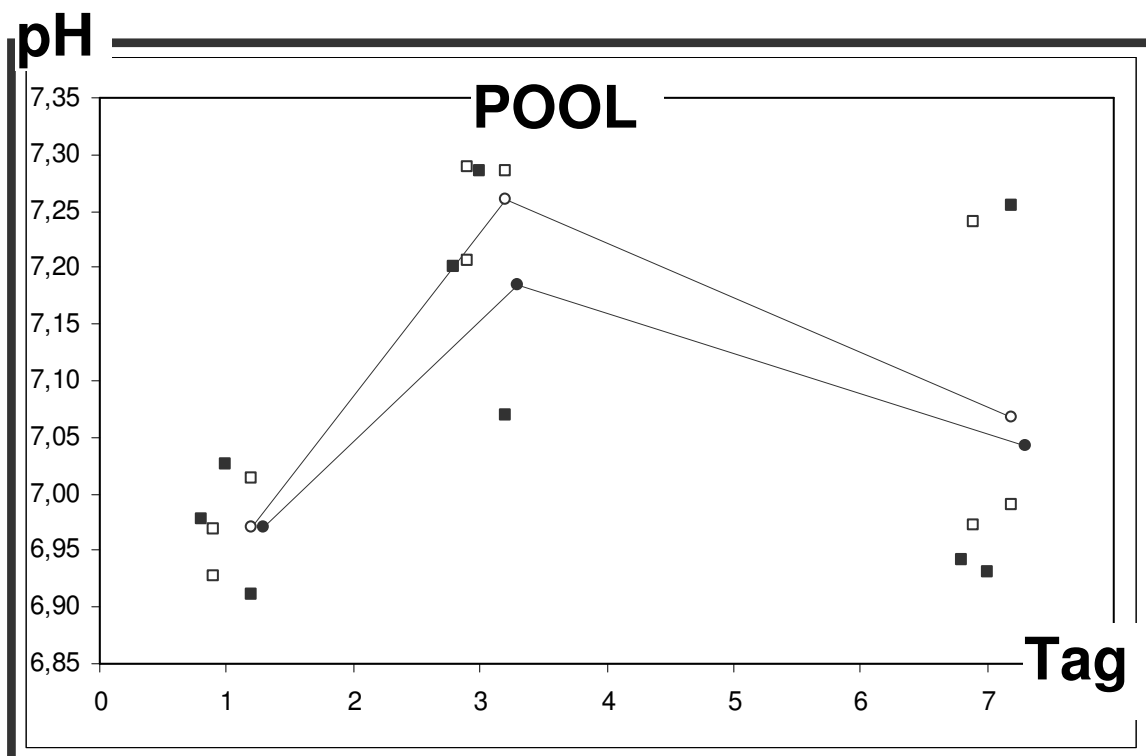


Abbildung 15: pH Wert bestrahlt - ■ -/ unbestrahlt - □ -
 Durchschnitt bestrahlt - ● -/ unbestrahlt - ○ -
 von allen 3 Thrombozytenpools

3.1.2. Thrombozytenkonzentrate

Es wurden drei Thrombozytenkonzentrate (z.B. 04600-154 = Nummer des Konzentrates) geteilt und sowohl unbestrahlt als auch **bestrahlt (x)** überprüft. Untersucht wurden die Werte am Tag der Bestrahlung = Tag 1, Tag 3 und Tag 7. Die nachfolgende Tabelle enthält die verschiedenen Messergebnisse der einzelnen Proben an den entsprechenden Prüftagen, sowie die Mittelwerte.

In den dann kommenden Abbildungen werden diese Daten grafisch dargestellt.

Tabelle 6: Ergebnisse Thrombozytenkonzentrate mit Durchschnittswerten der bestrahlten und unbestrahlten Proben

3.1.2	ANTI CD62P Unstimuliert %	ANTI CD62P T 6 Stimuliert %	Annexin V %	Annexin V Ionophore %	Aggregation %	pH
TAG 1						
04600-154	2,88	16,30	24,50	96,00	72,10	7,014
04600-154x	2,77	17,90	24,80	96,30	80,60	6,978
04600-163	1,08	9,77	7,26	81,00	88,20	7,016
04600-163x	1,35	13,00	12,00	91,40	113,90	7,009
04600-164	1,26	6,69	15,00	91,80	83,50	7,058
04600-164x	1,25	6,22	14,70	92,20	99,10	7,040
TAG 3						
04600-154	4,66	18,90	25,70	97,20	94,80	7,466
04600-154x	4,56	19,50	25,60	97,50	94,10	7,480
04600-163	2,28	21,30	22,20	95,60	122,80	7,387
04600-163x	2,52	24,60	21,60	96,00	90,70	7,354
04600-164	1,73	10,50	17,80	95,30	62,60	7,468
04600-164x	1,68	10,00	17,40	94,70	75,40	7,460
TAG 7						
04600-154	2,85	14,30	30,10	95,70	67,00	7,414
04600-154x	2,91	17,30	29,90	93,50	78,10	7,435
04600-163	3,49	14,80	28,30	95,30	90,40	7,441
04600-163x	3,43	18,90	25,40	95,40	85,60	7,389
04600-164	1,94	9,61	24,30	90,80	37,80	7,422
04600-164x	1,94	8,22	24,60	92,40	43,20	7,427
3.1.2	ANTI CD62P Unstimuliert %	ANTI CD62P T 6 Stimuliert %	Annexin V %	Annexin V Ionophore %	Aggregation %	pH
DURCHSCHNITT von Proben 154,163,164 bestrahlt und unbestrahlt						
TAG 1						
unbestrahlt	1,74	10,92	15,59	89,60	81,27	7,029
bestrahlt	1,79	12,37	17,17	93,30	97,87	7,009
TAG 3						
unbestrahlt	2,89	16,90	21,90	96,03	93,40	7,440
bestrahlt	2,92	18,03	21,53	96,07	86,73	7,431
TAG 7						
unbestrahlt	2,76	12,90	27,57	93,93	65,07	7,426
bestrahlt	2,76	14,81	26,63	93,77	68,97	7,417

3.1.2.1. CD62P unstimuliert und stimuliert (TRAP 6)

Am ersten Messtag lagen die Durchschnittswerte der unstimuliert CD62P positiven Zellen sowohl bei den bestrahlten als auch bei den unbestrahlten Thrombozytenkonzentraten mit 1,7 % (unbestrahlt) und 1,79 % (bestrahlt) nahezu auf gleichem Niveau. Im weiteren Verlauf kam es am dritten Tag zu einem leichten Anstieg der Werte, welche bis zum siebten Tag, dem ansteigenden Trend entgegen, einen leichten Rückgang zeigten. Die Stimulation mit TRAP 6 führte, ähnlich der Tendenz der unstimulierten Messung, bei den bestrahlten und unbestrahlten Thrombozyten zu einem annähernd parallelen Verlauf der Aktivierbarkeit der Zellen. Allerdings war die Anzahl CD62P markierter Zellen bei den bestrahlten Thrombozyten über den gesamten Verlauf der Messung größer als die der unbestrahlten Zellen.

Zusammenfassend führte die Bestimmung der CD62P positiven Zellen zu keinem aussagekräftigen Unterschied zwischen den unstimulierten Proben. Am dritten Messtag lag die beste Aktivierbarkeit vor allem bei den bestrahlten Thrombozyten vor.

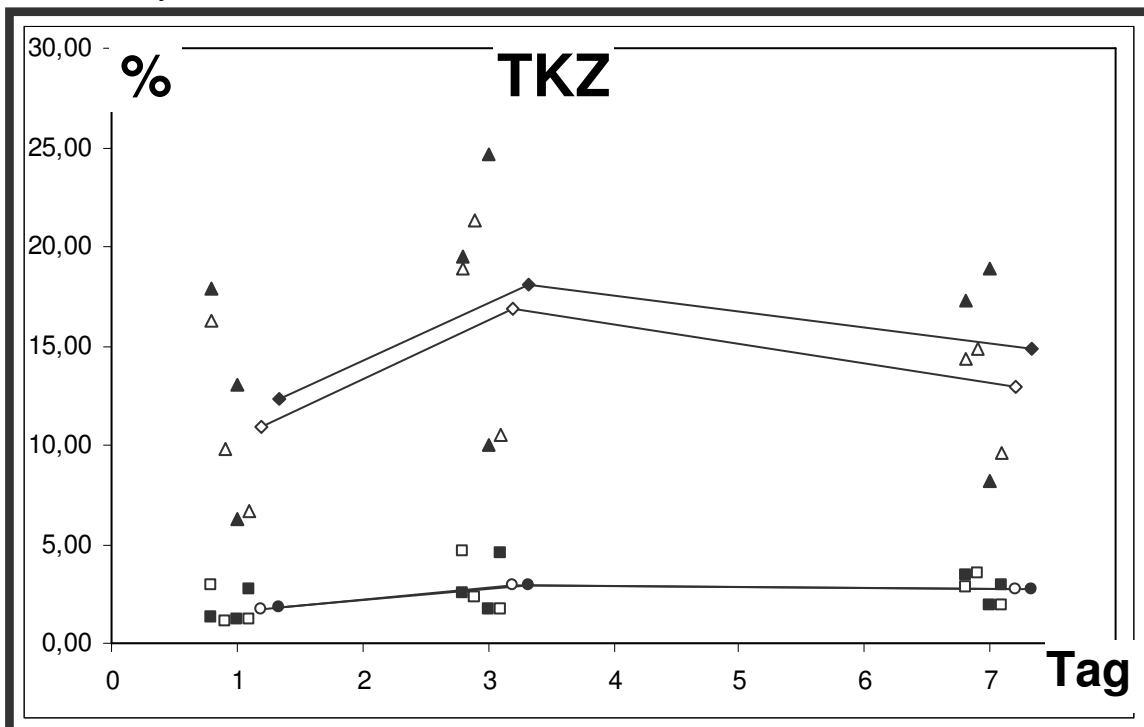


Abbildung 16: CD62P bestrahlt -■- / unbestrahlt -□- unstimuliert
 CD62P bestrahlt -▲- / unbestrahlt - △- stimuliert
 Durchschnitt: CD62P bestrahlt -●- / unbestrahlt -○- unstimuliert
 CD62P bestrahlt -◆- / unbestrahlt -◇- stimuliert

3.1.2.2. Aggregation

Die Ergebnisse der Aggregation zeigten am ersten Messtag den größten Unterschied zwischen den bestrahlten und unbestrahlten Zellen. Im weiteren Verlauf lagen jedoch die Durchschnittswerte enger beieinander und zeigten am siebten Messtag die niedrigsten Ergebnisse.

Zusammenfassend ist im Verlauf der sieben Messtage ein klarer Rückgang der Aggregation zu erkennen.

Ein klarer Unterschied zwischen den bestrahlten und unbestrahlten Zellen lässt sich aufgrund der Streuung der Einzelwerte nicht formulieren.

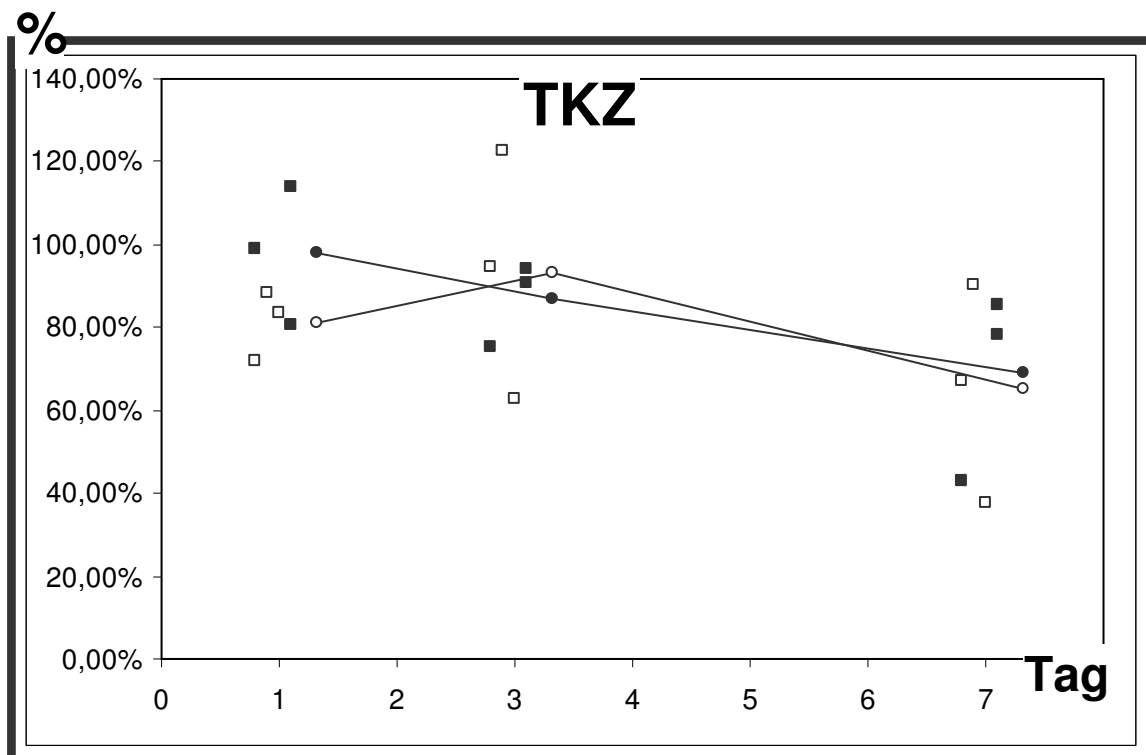


Abbildung 17: Aggregation bestrahlt - ■ -/ unbestrahlt - □-
 Durchschnitt bestrahlt - ● -/ unbestrahlt -○-

3.1.2.3. Annexin V

Bei Betrachtung der einzelnen Thrombozytenkonzentrate (siehe Tabelle 6) ließ sich ein klarer Unterschied zwischen Konzentrat 04600-154 und 04600-163 feststellen. Das Konzentrat 04600-163 zeigte mit 7,26% einen deutlich geringeren Anteil annexinpositiver Zellen im Vergleich zu Konzentrat 04600-154 mit 24,50 %. Dies ließ sich über den gesamten Verlauf von sieben Tagen beobachten. Im Durchschnitt waren am ersten Messtag bei den unbestrahlten Thrombozytenkonzentraten 15,59 % der Zellen annexinpositiv, bei den bestrahlten 17,17%. Dieser Unterschied von 1,58% verringerte sich im Laufe der ersten drei Tage auf 0,37%, wobei die unbestrahlten im Gegensatz zu Tag 1 leicht höhere Werte aufwiesen. An Tag sieben lagen die Durchschnittswerte erneut dicht beieinander, führten aber bei den unbestrahlten Thrombozyten zu einer gering höheren Anzahl an annexinpositiven Zellen von + 0,94%.

Bei den parallel zu den Messungen durchgeführten Untersuchungen mit Calionophore waren durchschnittlich 89,60 % und 94 % der Zellen nach der Inkubation mit Ionophore mit Annexin V angefärbt (siehe Tabelle 6; diese Werte werden in Abbildung 18 nicht dargestellt).

Zusammenfassend führte die zunehmende Lagerungsdauer zu einem kontinuierlichen Anstieg der annexinpositiven Zellen. Ein deutlicher Unterschied zwischen den bestrahlten und unbestrahlten Thrombozyten bestand während dem gesamten Messverlauf nicht, allerdings wiesen die Konzentrate untereinander vor allem am ersten Messtag deutliche Unterschiede auf.

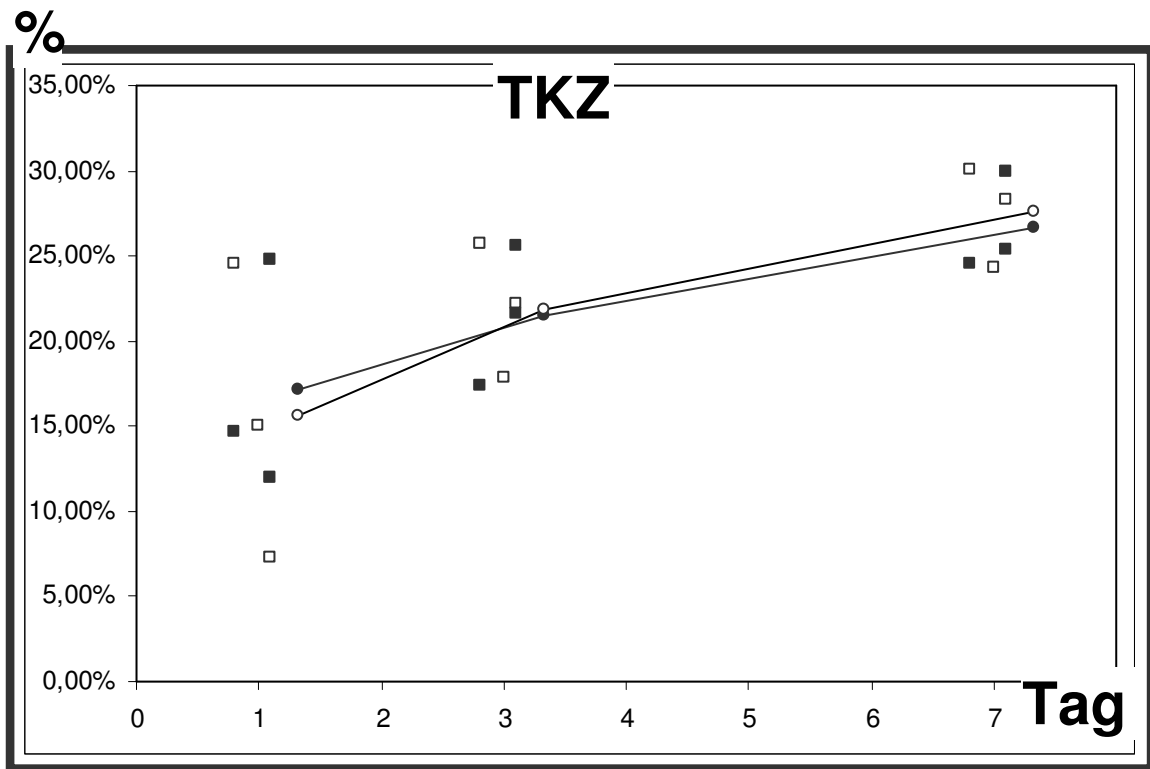


Abbildung 18: Annexin V bestrahlt - ■ - unbestrahlt - □ -
 Durchschnitt bestrahlt - ● - unbestrahlt - ○ -

3.1.2.4. pH Wert

Die Ergebnisse der pH Werte zeigten während der gesamten Lagerungsdauer einen parallelen Verlauf zwischen den bestrahlten und unbestrahlten Thrombozytenkonzentraten. Lagen die Ausgangswerte am ersten Messtag zwischen 7,009 bei den bestrahlten und 7,029 bei den unbestrahlten Zellen, so zeigte sich ein deutlicher Anstieg am dritten Tag der Lagerung auf 7,431 (bestrahlt) bzw. 7,440 (unbestrahlt). Zwischen dem dritten und siebten Messtag veränderte sich der pH nur gering (siehe Tabelle 6).

Zusammenfassend ist ebenfalls bei den Thrombozytenkonzentraten zwischen dem ersten und dritten Tag der Lagerung ein klarer Anstieg feststellbar. Ein Unterschied zwischen den bestrahlten und unbestrahlten Thrombozyten ist nicht klar zu erkennen.

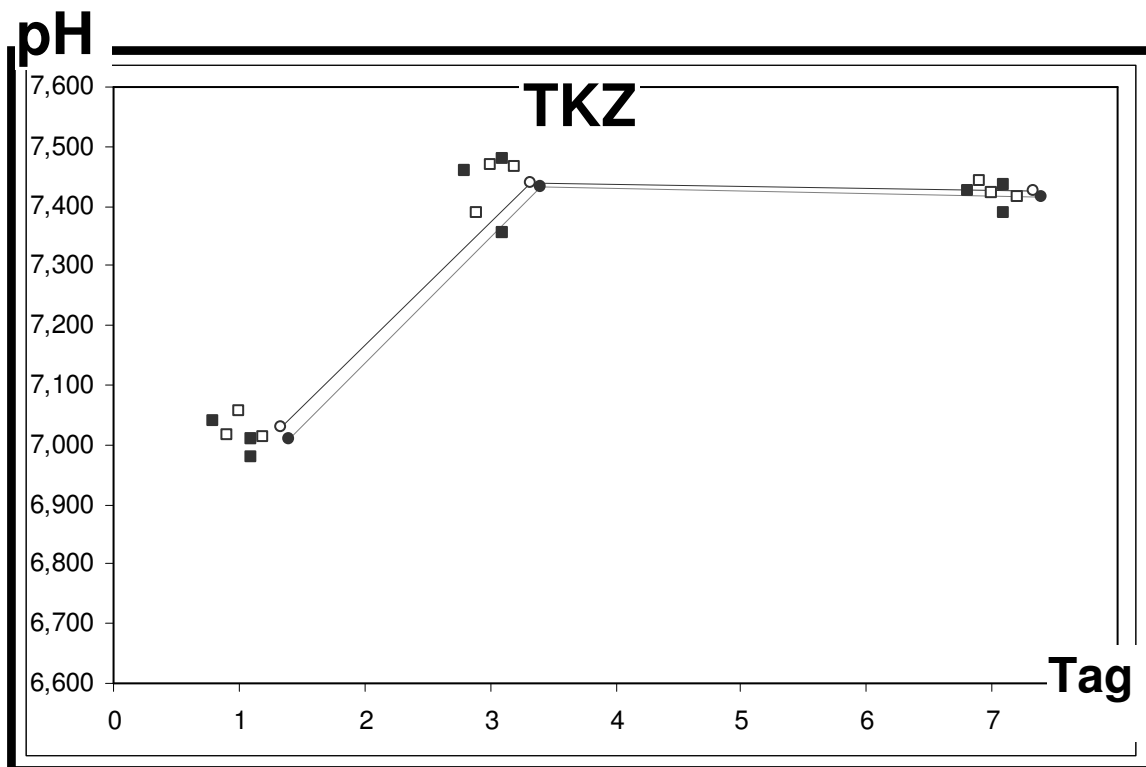


Abbildung 19: pH Wert bestrahlt - ■ -/ unbestrahlt -□-
 Durchschnitt bestrahlt - ● -/ unbestrahlt -○-

3.1.3. Thrombozytenpools ⇔ Thrombozytenkonzentrate

3.1.3.1. CD62P im Vergleich

Die Thrombozytenkonzentrate zeigten zum einen eine deutlich höhere Fähigkeit zur Stimulation mittels TRAP6, zum anderen lag ihr Anteil an unstimulierten CD62P positiven Zellen über den gesamten Verlauf der Messung unter denen der Thrombozytenpools. Bei beiden Thrombozytenpräparaten (TP und TKZ) beschrieben die unstimulierten Zellen einen ähnlichen Kurvenverlauf. Hingegen konnten TP weniger stimuliert werden und, entgegen dem Anstieg bei den TKZ an Tag 3, verzeichneten sie am dritten Messtag einen Rückgang der CD62P positiven Zellen.

Zusammenfassend zeigt sich bei den Thrombozytenkonzentraten sowohl ein geringerer Anteil an bereits aktivierten Zellen als auch eine bessere Stimulierbarkeit mittels TRAP 6. Die bestrahlten Thrombozytenkonzentrate zeigen die höchste Aktivierbarkeit.

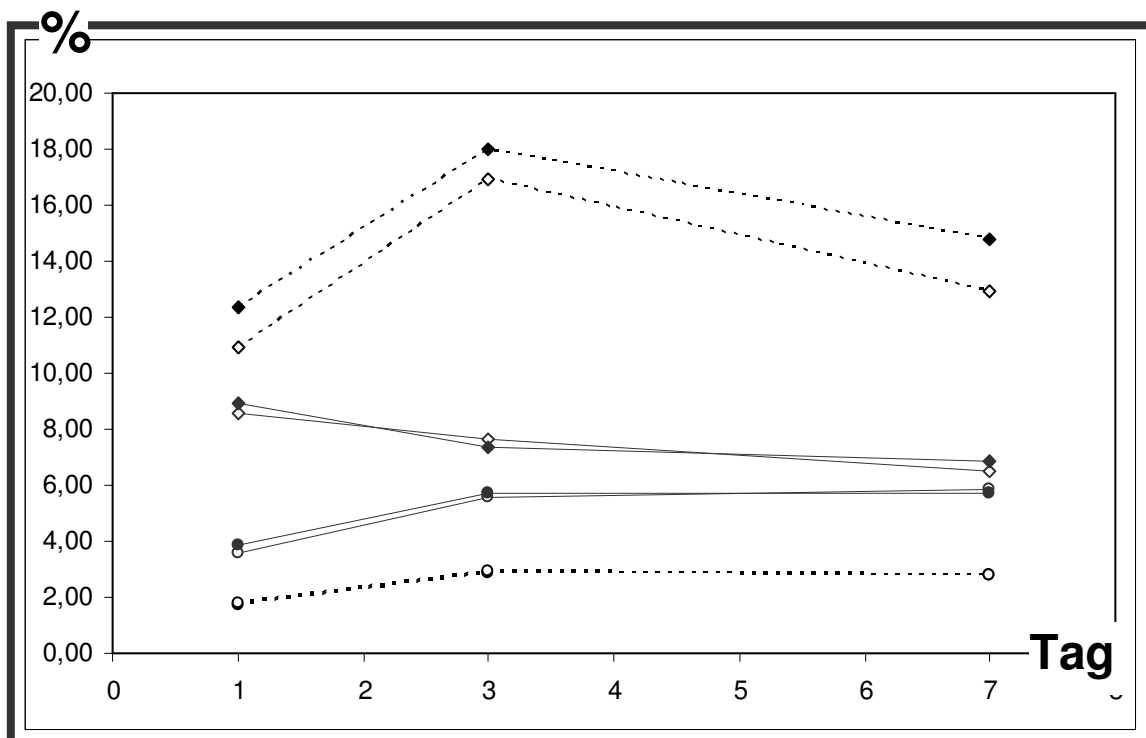


Abbildung 20:
POOL:

Linie durchgezogen

TKZ:

Linie punktiert

Mittelwerte im Vergleich

CD62P bestrahlt -●- / unbestrahlt -○- unstimuliert

CD62P bestrahlt -◆- / unbestrahlt -◇- stimuliert

CD62P bestrahlt -●- / unbestrahlt -○- unstimuliert

CD62P bestrahlt -◆- / unbestrahlt -◇- stimuliert

3.1.3.2. pH im Vergleich

Bei ähnlichen Ausgangswerten stieg bei den Thrombozytengruppen der pH Wert innerhalb der ersten drei Tage an. Ein Unterschied zeigte sich bei den Thrombozytenkonzentraten. Während dem gesamten Messverlauf lag deren pH Wert im Durchschnitt mit + 0,180 an Tag drei und + 0,358 am siebten Messtag deutlich über dem der gepoolten Thrombozyten.

Zusammenfassend liegen bei den Thrombozytenkonzentraten während der gesamten Lagerung höhere pH Werte vor. Weiterhin zeigen sich bei den unbestrahlten Thrombozyten beider Gruppen leicht höhere pH Werte als im Vergleich zu den bestrahlten Zellen.

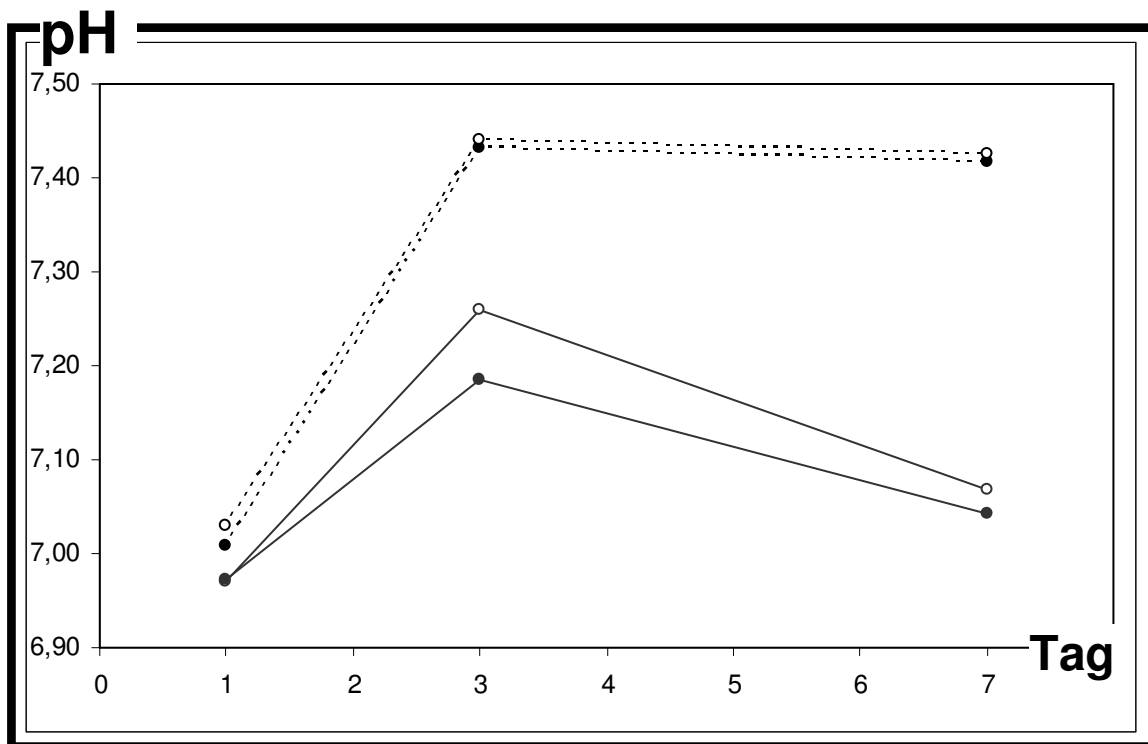


Abbildung 21:

POOL:

Linie durchgezogen

TKZ:

Linie punktiert

Mittelwerte im Vergleich

pH bestrahlt -●- / unbestrahlt -○-

pH bestrahlt -●- / unbestrahlt -○-

3.1.3.3. Aggregation im Vergleich

Die Dauer der Lagerung führte bei beiden Gruppen innerhalb der sieben Mess-tage zu einem Rückgang der Aggregationsfähigkeit, wobei dieser bei den Thrombozytenpools innerhalb der ersten drei Tage stärker ausfiel.

Ein deutlicher Unterschied lag zum einen in der Höhe der induzierbaren Aggregation von beispielsweise 97,87 % bei den bestrahlten TKZ (Tag1) und 59,50% bei den bestrahlten TP vor, zum anderen in der Tatsache, dass die TP direkt nach Entnahme aus dem Lagerbeutel kaum auf Kollagen reagierten und erst nach 3 Stunden Lagerung bei Raumtemperatur zur Messung herangezogen wurden.

Zusammenfassend zeigt sich bei den TKZ im Vergleich zu den TP sowohl eine deutlich höhere Fähigkeit zur Aggregation durch Kollagen als auch ein schnelleres Ansprechen auf Kollagen direkt nach Entnahme aus dem Lagerungsbeutel.

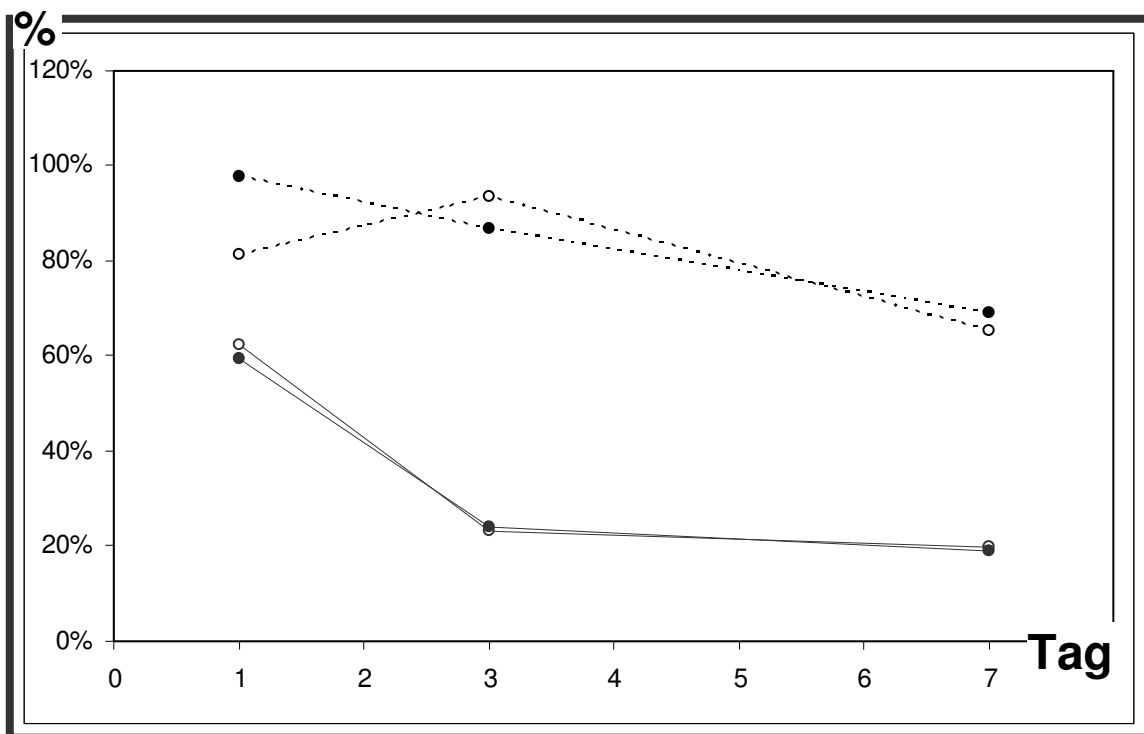


Abbildung 22:

POOL:
Linie durchgezogen

TKZ:
Linie punktiert

Mittelwerte im Vergleich

Aggregation bestrahlt -●- / unbestrahlt -○-

Aggregation bestrahlt -●- / unbestrahlt -○-

3.1.3.4. Annexin V im Vergleich

Im Vergleich zu den Thrombozytenpools lag bei den Thrombozytenkonzentrationen schon am ersten Messtag eine höhere Anzahl annexinpositiver Zellen vor. Die Mehranfärbung zog sich durch den gesamten Messverlauf, wobei dieser Unterschied am ersten Messtag am deutlichsten ausfiel. Im weiteren Verlauf näherten sich die Durchschnittswerte weiter an.

Bei Betrachtung der Thrombozytenpools zeigt sich vor allem zwischen dem ersten und dritten Messtag ein klarer Anstieg der annexinpositiven Zellen.

Zusammenfassend weisen die TKZ im Vergleich zu den TP sowohl eine deutlich höhere Anzahl annexinpositiver Zellen als auch höhere Endwerte am siebten Messtag auf.

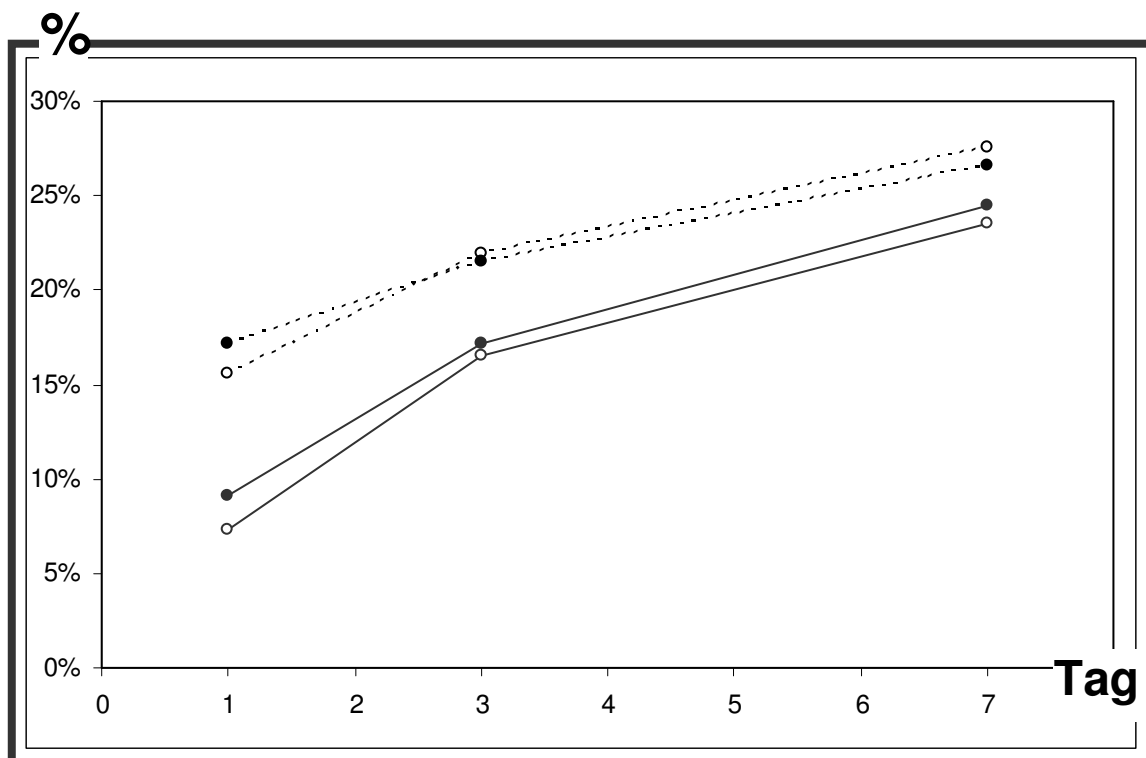


Abbildung 23:

POOL:
Linie durchgezogen
TKZ:
Linie punktiert

Mittelwerte im Vergleich

Annexin V bestrahlt -●- / unbestrahlt -○-
Annexin V bestrahlt -●- / unbestrahlt -○-

3.2. Erythrozyten

Es wurden 12 Erythrozytenkonzentrate (z.B.03628255-55 = Nummer des Präparates) geteilt und sowohl unbestrahlt als auch **bestrahlt** überprüft.

Dazu aus den Leitlinien zur „Therapie mit Blutkomponenten und Plasmaderivaten“ der Bundesärztekammer, Stand: 05.09.2002:

Die Bestrahlung der EK erfolgt bis zum 14. Tag nach der Herstellung. Die Lagerung bestrahlter EK soll entsprechend der ermittelten Haltbarkeit 28 Tage nach der Blutentnahme nicht überschreiten.

Um die Auswirkungen der Bestrahlung und Lagerungsdauer auf die Qualität der Erythrozyten erkennen zu können, wurden LAE unterschiedlichen Ausgangsalters (Tag 14, 21, 28, 35) zu den Messungen herangezogen.

Die Bestrahlung erfolgte am ersten Messtag, anschließend wurden die bestrahlten gemeinsam mit den unbestrahlten LAE überprüft.

Die Tabelle 7 auf der kommenden Seite enthält die verschiedenen Messergebnisse der einzelnen LAE an den entsprechenden Prüftagen sowie die Mittelwerte.

In den darauf folgenden Abbildungen werden diese Daten graphisch dargestellt.

Tabelle 7: Ergebnisse LAE bestrahlt / unbestrahlt

3.2	Kalium mmol/l						Freies Hämoglobin mmol/l						Annexin V %					
	TAG	14	21	28	35	42	49	14	21	28	35	42	49	14	21	28	35	42
8840	28,10	35,90	37,70	41,80	49,90	56,30	52,38	68,76	39,17	55,83	59,79	71,20	22,20	10,60	18,40	19,00	19,30	21,30
	42,80	80,40	85,80	88,90	105,90	95,30	88,84	368,00	186,71	242,85	364,90	525,79	20,10	9,08	9,66	16,40	19,00	20,20
8562	26,20	34,50	36,90	37,60	47,40	42,80	86,52	90,79	66,54	88,75	116,64	151,07	21,40	9,66	17,80	16,40	17,40	18,00
	37,40	78,60	82,60	88,80	110,00	92,60	112,79	436,99	153,77	291,60	500,00	626,98	14,60	7,68	9,23	14,50	16,00	17,30
8629	29,00	37,20	41,60	44,30	52,50	62,30	34,83	58,59	54,60	56,27	71,79	91,19	19,00	10,10	18,30	17,20	18,50	19,50
	41,00	81,20	83,90	100,70	106,30	111,60	114,52	198,53	95,91	210,29	319,51	374,92	16,70	8,22	8,69	15,60	18,00	18,60
7924		31,80	36,20	41,40	40,30	51,80		36,14	75,71	67,05	68,26	94,72		15,50	9,11	16,50	17,00	10,10
		30,20	56,30	61,90	67,70	77,60		58,97	155,36	142,40	178,79	244,82		16,10	7,85	8,57	15,10	15,50
8127		29,60	37,60	40,10	45,30	50,20		46,48	78,24	45,90	50,11	57,87		18,60	9,80	17,70	16,40	17,20
		34,10	61,90	69,60	73,00	79,50		44,08	92,76	89,57	131,35	176,16		17,00	8,49	10,00	16,20	17,40
8225		33,10	42,10	40,00	41,40	50,00		47,89	36,70	62,90	83,45	108,54		15,90	9,07	16,00	16,20	17,70
		47,70	88,60	87,40	91,60	108,20		162,54	514,50	338,59	551,15	806,19		15,40	8,06	9,73	15,60	16,10
7258			35,80	40,20	42,10	43,70			52,76	91,26	84,68	103,19			18,70	9,61	16,90	16,20
			43,70	78,80	78,30	82,80			150,85	353,07	410,97	634,11			17,00	9,12	9,20	17,00
7354			46,70	50,10	53,50	63,80			77,26	98,82	114,05	126,47			21,00	9,77	18,60	16,00
			48,00	71,20	75,70	86,30			91,75	194,00	221,89	299,79			18,10	9,17	9,08	17,70
7531			41,00	45,30	47,40	50,80			113,64	107,31	92,86	87,51			19,70	10,00	19,00	17,40
			47,40	76,20	78,70	88,60			87,10	214,08	283,96	317,39			17,90	8,18	9,47	15,90
6629				40,20	46,70	50,50				78,97	146,63	130,14				19,50	10,60	18,70
				41,10	64,90	70,10				189,64	363,25	408,94				16,70	7,69	9,24
6669				41,00	43,30	45,10				50,02	55,27	79,83				19,20	11,40	18,40
				44,50	72,40	71,30				102,63	218,80	383,45				17,10	8,95	9,44
6746				37,70	50,50	50,80				89,34	200,84	159,56				19,70	9,25	17,40
				48,50	70,10	70,00				106,75	239,41	329,76				12,00	8,30	10,10
MW	27,77	33,68	39,51	41,64	46,69	51,51	57,91	58,11	66,07	74,37	95,36	105,11	20,87	13,39	15,76	15,88	15,88	17,33
	40,40	58,70	66,47	71,47	82,88	86,16	105,38	211,52	169,86	206,29	315,33	427,36	17,13	12,25	11,66	12,26	12,72	15,37

3.2.1.1. Freies Kalium

Während des gesamten Lagerungszeitraumes stiegen bei allen unbestrahlten Produkten die Werte an freiem Kalium kontinuierlich an. Am Tag 14 der Lagerung betrug der durchschnittliche Wert an freiem Kalium 27,22 mmol/l und stieg bis auf 51,51 mmol/l am Tag 49 der Lagerung an. Bei Betrachtung der Mittelwerte der bestrahlten Produkte zeigte sich bei allen vier Messgruppen ein steiler Anstieg des freien Kaliums innerhalb einer Woche nach Bestrahlung. Dies war unabhängig vom Zeitpunkt der Bestrahlung zu sehen. Die Messgruppe 8480, 8562, 8629 wurde am Tag 14 der Lagerung bestrahlt und stieg mit dem freien Kalium innerhalb einer Woche von 40,40 mmol/l auf 80,07 mmol/l an. Demgemäß stieg auch das freie Kalium der Gruppe 7924, 8127, 8225, innerhalb einer Woche nach Bestrahlung an.

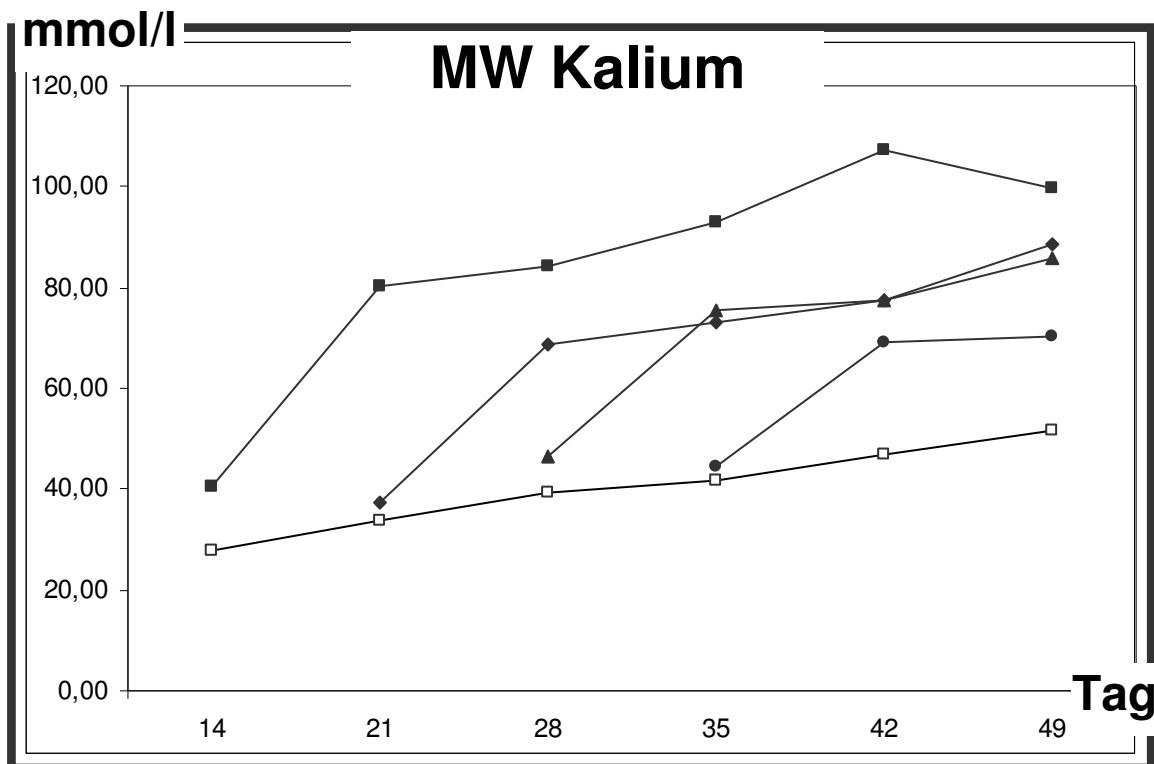


Abbildung 24: Mittelwert Kalium unbestrahlt -□- alle Proben
 bestrahlt an Tag 14 -■- / bestrahlt an Tag 21 -◆-
 bestrahlt an Tag 28 -▲- / bestrahlt an Tag 35 -●-

3.2.1.2. Freies Hämoglobin

Über den gesamten Verlauf der Messung hinweg stiegen bei allen unbestrahlten Proben die Werte an freiem Hämoglobin beständig an. Am Tag 14 lag der durchschnittliche Wert an freiem Hämoglobin bei 58,91 mmol/l und stieg bis auf 105,11 mmol/l am Tag 49 der Lagerung an.

Die Mittelwerte der bestrahlten Produkte zeigten bei allen vier Messgruppen einen klaren Anstieg des freien Hämoglobins innerhalb einer Woche nach Bestrahlung. Am deutlichsten war dies bei der Gruppe 8480, 8562, 8629 der Fall. Hier lag der Ausgangswert an freiem Hämoglobin am Tag 14 bei 105,38 mmol/l und verdreifachte sich innerhalb einer Woche auf 334,51 mmol/l.

Zusammenfassend zeigen die bestrahlten Proben bei allen Messgruppen höhere Werte an freiem Hämoglobin, die im Vergleich zu den unbestrahlten Proben zu deutlich höheren Endwerten am Tag 49 führen.

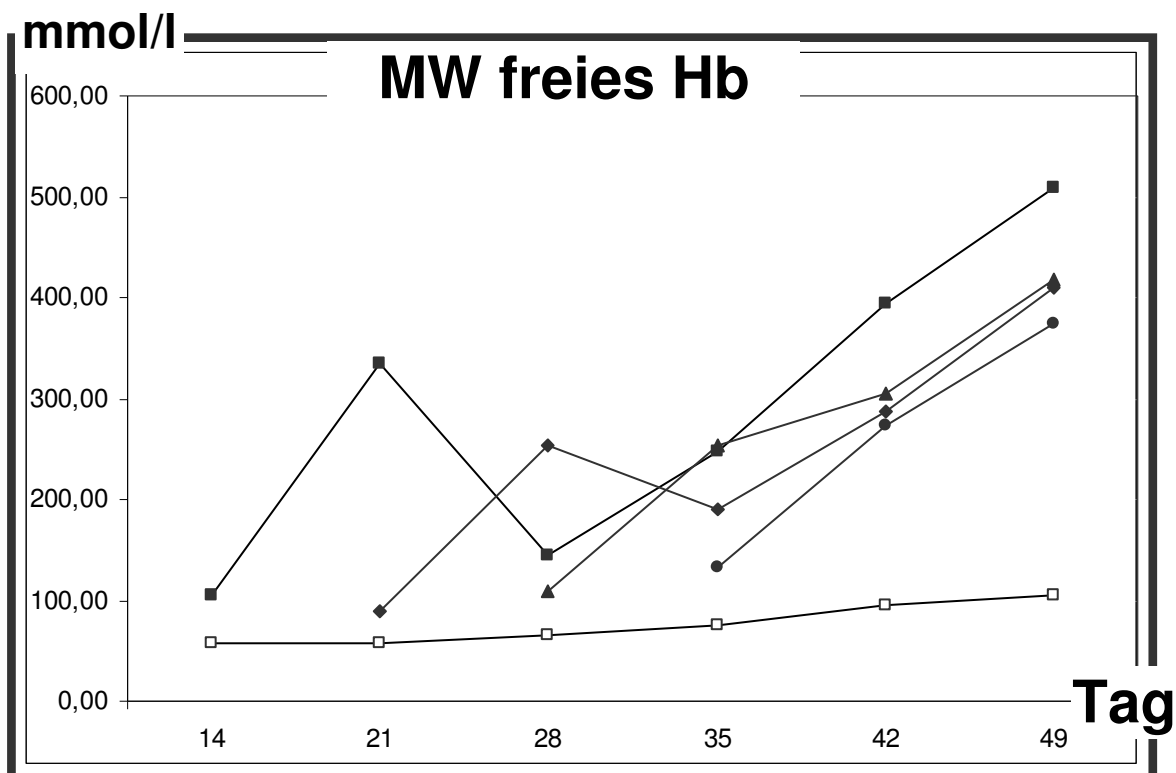


Abbildung 25: Mittelwert freies Hämoglobin unbestrahlt -□- alle Proben
 bestrahlt an Tag 14 -■- / bestrahlt an Tag 21 -◆-
 bestrahlt an Tag 28 -▲- / bestrahlt an Tag 35 -●-

3.2.1.3. Annexin V

Die Messung der Annexinbindung bei Erythrozyten zeigte bei den unbestrahlten Proben schon am Tag 14 der Lagerung hohe Werte von durchschnittlich 20,87% an. Im weiteren Verlauf kam es zu einem Rückgang der Annexinbindung am Tag 21 auf 13,39%. Eine Woche später stieg der Anteil an Annexin-positiven Zellen wieder auf 15,76 % an und betrug am letzten Tag der Messung 17,33%. Bei den bestrahlten Produkten zeigte sich bei allen vier Messgruppen ein Abfall der Annexinbindung innerhalb einer Woche nach Bestrahlung. Dies war unabhängig vom Zeitpunkt der Bestrahlung zu sehen. Anschließend kam es erst nach zwei Wochen zu einem Anstieg der Werte im Gegensatz zu dem Trend des freien Hämoglobins und Kaliums. Dies war bei allen vier Gruppen unabhängig voneinander zu sehen.

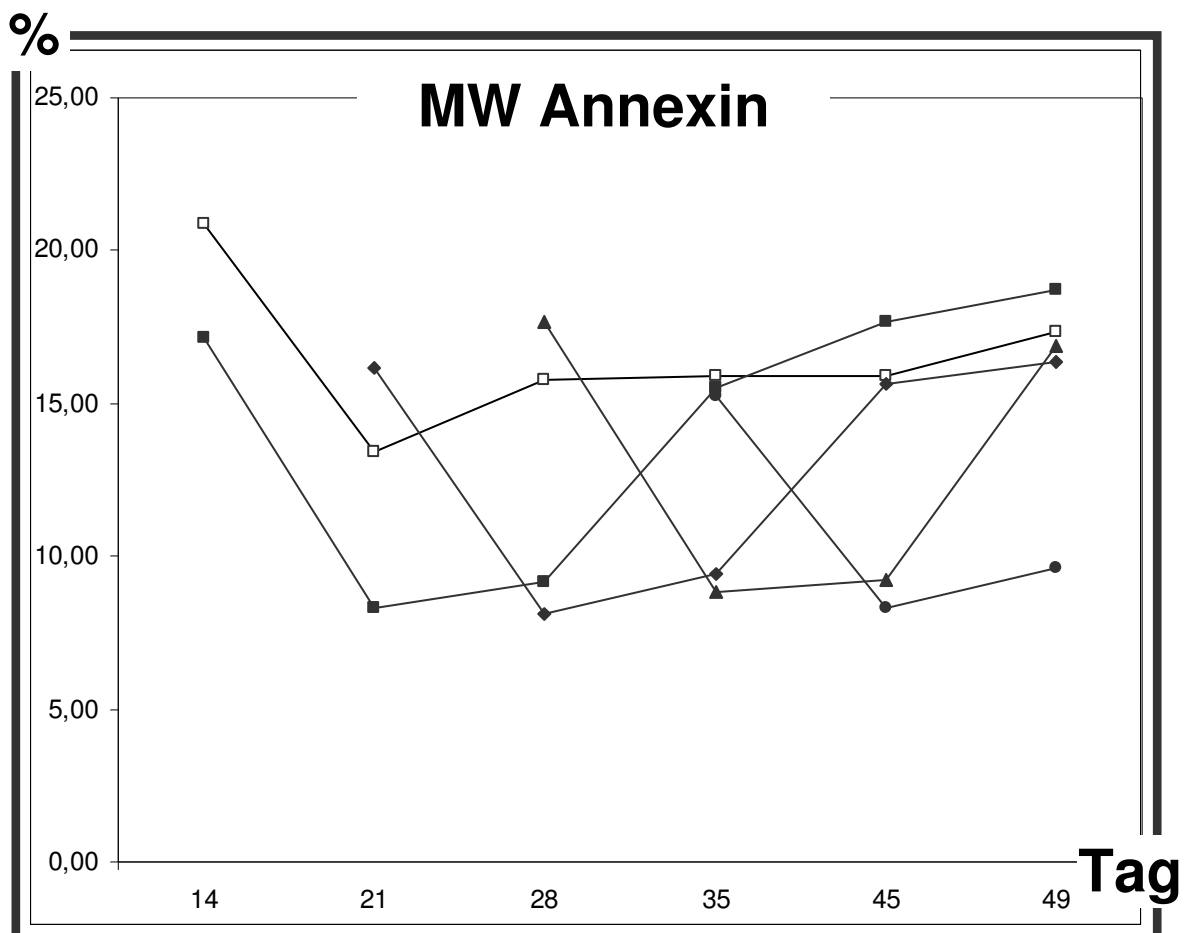


Abbildung 26: Mittelwert Annexin V unbestrahlt -□- alle Proben
 bestrahlt an Tag 14 -■- / bestrahlt an Tag 21 -◆-
 bestrahlt an Tag 28 -▲- / bestrahlt an Tag 35 -●-

Zusammenfassend zeigen die unbestrahlten Proben hohe Ausgangswerte an gebundenem Annexin V-PE. Hinzu kommt der Rückgang der Werte der unbestrahlten Proben am Tag 21 ohne eine Veränderung der Lagerbedingungen.

Die bestrahlten Proben zeigen ebenfalls hohe Ausgangswerte. Eine Woche nach Bestrahlung reduziert sich unerklärlicherweise bei allen Gruppen für die Dauer von zwei Wochen der Anteil an gebundenem Annexin V, um anschließend wieder annähernd auf den Ausgangswert anzusteigen.

Zusammenfassung Erythrozyten :

Im Verlauf der sechs Messtage lieferten die Parameter Kalium und freies Hämoglobin deutlich ansteigende Messwerte, wohingegen die Messwerte mittels Annexin V schon am ersten Tag auf Endniveau lagen. Das könnte darauf hindeuten, dass die Anzahl der Annexin-positiven Zellen und damit der Zustand der Erythrozytenmembranen im Verlauf der 6 wöchigen Messreihe keinen deutlichen Qualitätsverlust durchläuft.

Es bleibt also weiterhin zur Diskussion offen, warum die bestrahlten Erythrozyten durch alle Messgruppen hindurch niedrigere Werte zeigten, und inwiefern die ca. 20 %ige Bindung von Annexin V an die Erythrozyten mit einem Qualitätsverlust gleichzusetzen ist. Ebenso werfen diese Ergebnisse Fragen über den Anstieg der Konzentrationen an Kalium und Hämoglobin bei gleich bleibender Annexinbindung auf.

4. Diskussion

Mit der Entwicklung des Durchflusszytometers sowie der Anfärbung einzelner Zellen und deren gleichzeitigen Charakterisierung wurden neue Möglichkeiten im Bereich der Forschung und der Qualitätskontrolle von Blutprodukten geschaffen. Heute werden Durchflusszytometer in einer Vielzahl von Messungen eingesetzt, und ständig werden neue Antikörper zur Diagnostik und zur Charakterisierung von Zellen erforscht. Wie bereits in der Einleitung erwähnt, bildet das an ein Fluorochrom gebundene Annexin V die Grundlage vieler Studien. Im Verlauf dieser Dissertation wurden bei Thrombozytenpräparaten die Annexinbindung, die Expression von CD62P, die Aggregation und der pH Wert, bei den Erythrozytenpräparaten Annexinbindung und die Parameter Kalium und freies HB bestimmt. Im Folgenden soll die Anwendbarkeit der Annexinbindung in der Qualitätskontrolle im Vergleich zu den Routineparametern diskutiert werden.

4.1. Thrombozyten

Die Qualität der Thrombozytenpräparate wird von vielen Faktoren bestimmt. 1985 wurde veröffentlicht, dass die Überlebenszeit und die Aggregationsfähigkeit der Thrombozyten vor allem von der Lagerungstemperatur und dem pH Wert des Suspensionsmediums abhängig ist (MURPHY 1985).

Bei einer Lagertemperatur von 22 °C liegen die besten Bedingungen für Thrombozyten (MURPHY AND GARDNER, 1969) vor, da bei zu kalter Lagerungstemperatur Veränderungen in der Morphologie auftreten. Dabei erfolgt eine Umwandlung von der ursprünglichen Scheibenform in die Kugelform, welche mit minderer Funktionsfähigkeit vergesellschaftet ist. In einer Vielzahl von Studien wurde gezeigt, dass selbst bei 22 °C ein 20-45 %iger Anstieg in den morphologischen Veränderungen von Thrombozyten zwischen Tag 1 und 7 der Lagerung zu verzeichnen war, der mit einer Veränderung ihrer diskoiden Form einherging. (DUMONT et al. 2002). Des Weiteren beeinflussen auch die Stoffwechsellvorgänge innerhalb der Thrombozyten die Qualität des Produktes, vor allem die Veränderung der ATP Spiegel und der pH Werte. Annähernd 60 % von ADP

und ATP sind in den "dense bodies" innerhalb der Zelle gespeichert (CARDIGAN et al. 2003). Bei einem ATP Spiegel unter $4 \mu\text{l} / 10^{11}$ Thrombozyten korreliert dies mit einem Rückgang der Lebensfähigkeit der Thrombozyten (HOLME et al. 1998). KILKSON, et al. (1984) berichteten, dass die ultimative Lagerungsdauer eines Thrombozytenkonzentrates durch die kontinuierliche Laktatproduktion, die Pufferkapazität des Plasmas und die Glucosekonzentration des Konzentrates limitiert wird. Sie untersuchten die Laktatproduktion sowie die CO_2 Transportkapazität unterschiedlicher Beutel unter verschiedenen O_2 Bedingungen. Ein schneller pH-Abfall unter 7,0 zeigte sich bei einer Verringerung der Bikarbonatkonzentration unter 5 mEq/L bei gleichzeitigem deutlichem Laktatanstieg bis zu 25 mmol/L. In gut oxygeniertem Milieu war der Laktatanstieg im Vergleich zu dem O_2 -freien Beutel 5-8 fach geringer. Um die Bedingungen für die Thrombozyten zu optimieren, wurden in den 70er und den frühen 80er Jahren Sauerstoff durchlässige Thrombozytenbeutel entwickelt (MURPHY et al. 1982).

Auch heutzutage wird an der Verbesserung der Lagerbeutel ständig gearbeitet. Bei YUASA et al. (2004) waren bei Messungen an einem neu entwickelten Lagerbeutel, bestehend aus Polyolefin nach siebentägiger Lagerung bessere Milieueigenschaften vorhanden als in einem herkömmlichen Beutel. Dies zeigte sich bei hoch- und niederkonzentrierten Thrombozytenkonzentraten anhand höherer pH Werte und geringerer Laktatproduktion.

Ein Zusammenhang zwischen dem Lagerbeuteltyp und einer hypotonen Schockreaktion (HSR) nach siebentägiger Lagerung wurde von TAYLOR et al. (1983) beschrieben. Thrombozytenkonzentrate, die nach der Gambro Spectra/Trima Technologie gewonnen wurden, zeigten nach sieben Tagen in 51% eine hypotone Schockreaktion (DUMONT et al. 2002). Auch in Tübingen werden für die Herstellung der Thrombozytenkonzentrate Geräte derselben Technologie verwendet (Cobe Spectra Gambro BCT, Trima accel Gambro). Widersprüchlich dazu beschrieb GULLIKSSON et al. (2002) bei Anwendung der gleichen Technik eine HSR von nur 21 %, bei jedoch reduzierter Thrombozytenkonzentration.

Die Qualität der Thrombozyten hängt auch von der Kontamination mit Bakterien ab. Seit 1971 ist bekannt, dass sich Enterobacter-Bakterien während der sieben-tägigen Lagerung bei 22 °C vermehren können und gefährliche Folgen für die Patienten haben (BUCHHOLZ MD et al. 1971). Aus diesen Gründen wurde 1986 die Lagerungsdauer auf fünf Tage reduziert. KUEHNERT et al. (2001) beschrieben zwischen 1998 und 2000 34 Fälle von transfusionsinduzierter Bakteriämie und 9 Todesfälle. Wegen der Lagerung bei 22°C ist das bakterielle Infektionsrisiko bei Thrombozyten deutlich höher als bei Erythrozyten. Entsprechend der juristischen Vorgaben wird in Tübingen ein bestimmter Anteil der Blutprodukte im Rahmen der vorgeschriebenen Qualitätskontrolle auf Bakterien überprüft. Diese Form der Qualitätssicherung wurde in dieser Dissertation nicht als Vergleichsparameter herangezogen. Daher wird an dieser Stelle nicht näher darauf eingegangen.

Nicht nur der Lagerbeutel, sondern auch das Lagermedium wie Plasma und die Plasmazusatzlösungen, (engl. PAS) sind für die Qualität der gelagerten Thrombozyten essentiell. In Tübingen werden unterschiedliche Zusatzlösungen für die Thrombozyten verwendet.

1 ml Thrombozyten-Pool-Präparat enthält 0,07-0,10 ml CPD Stabilisator (Citrat, Na⁺-Citrat, Natriumdihydrogenphosphat und Dextrose), 0,29-0,40 ml Plasma und 0,64 – 0,50ml T-SOL (Na⁺Citrat, Na⁺Acetat, Na⁺Clorid).

Generell werden Plasmakonzentrationen von 30-45% benötigt, um die Thrombozytenfunktion zu gewährleisten. Dabei hängt der erforderliche Anteil von Plasma und PAS stark von der Zusammensetzung des PAS ab (CARDIGAN et al. 2003). In Europa sind momentan zwei PAS zugelassen (PASI und PASII), welche sich in ihrer Zusammensetzung unterscheiden. So beinhaltet PAS I Natriumchlorid (70 mmol L⁻¹), Natriumcitrat (30 mmol L⁻¹) Natriumphosphat (5 mmol L⁻¹), D-Mannitol (30 mmol L⁻¹) und Kaliumchlorid (10 mmol L⁻¹), PAS II Natriumchlorid (115,50 mmol L⁻¹), Natriumcitrat (10 mmol L⁻¹) und Natriumacetat (30 mmol L⁻¹). Die Messungen mit PAS II in unterschiedlichen Lagerbeuteln führten zu keiner konstanten Aufrechterhaltung des pH Spiegels nach fünf Tagen (VAN DER MEER et al. 2001). Dieselbe Forschergruppe wies auch auf Unterschiede bei pH Messungen an unterschiedlichen Geräten hin, die bei der Messung von

Thrombozytenkonzentraten mit PAS Zusatz eingesetzt wurden. Bei gepoolten Thrombozyten geht die Lagerung in PAS II im Vergleich zu Plasma mit einer höheren Expression von CD62P zwischen Tag 1 und 5 einher (DE WILDT-EGGEN et al. 1998). Dies ist auch deutlich bei den Ergebnissen in dieser Dissertation zu erkennen. Hier weisen die gepoolten Thrombozyten im Vergleich zu den Konzentraten eine auffallend höhere Expression von CD62P auf. Zwei Jahre zuvor war es KLINGER et al. (1996) bereits gelungen, die bessere Erhaltung der Plättchenstruktur bei gelagerten Thrombozyten mit Plasmazusatz im Vergleich zu PAS II nachzuweisen.

Dennoch wird PAS II heute in vielen Blutbanken eingesetzt. DUMONT et al. (2002) wiesen einerseits nach, dass gelagerte Thrombozyten, ungeachtet ausreichender Oxygenierung, stets Glukose in Laktat verstoffwechseln, andererseits, dass das im Plasma enthaltende Bicarbonat diesen Stoffwechselvorgang nur bis zu einem Plasmalaktatspiegel von 20 mM puffern kann. Wird jedoch Acetat, in Form von PASII, zu Plasma hinzugegeben, verändert sich diese Situation (MURPHY S. 1999), da es zu einer neuen Energiequelle für den oxidativen Stoffwechsel der Thrombozyten wird. Für diesen Vorgang muss aber Acetat zuvor in Acetoacetat umgewandelt werden, wofür H^+ benötigt wird.

Dies alles weist darauf hin, dass zahlreiche Faktoren in die Qualität der Thrombozytenpräparate eingreifen und dass deshalb die Qualitätskontrolle der Produkte von besonderer Bedeutung ist.

Ein wichtiger Punkt bei der Qualitätskontrolle ist der Aktivierungszustand der Thrombozyten, der während der Lagerungsdauer ansteigt (GEORGE et al. 1988) und damit auf einen möglichen Qualitätsverlust hinweist. Die Expression von CD62P auf der Thrombozytenoberfläche nimmt im Laufe der Lagerung zu (Prinzip siehe Kapitel 2.3.2.2). Dies wurde auch in einer anderen Studie beschrieben (METCALFE et al. 1997), die einen Anstieg der CD62P-positiven Thrombozyten von 20-30% an Tag 4/5 auf 30-50% an Tag 7/8 nachwies. Ebenso musste die Thrombinkonzentration von $0,11 \text{ U/ml}^{-1}$ an Tag 3 auf $0,56 \text{ U/ml}^{-1}$ an Tag 7 erhöht werden, um eine 50%ige Expression von CD62P positiven Thrombozyten zu erreichen.

Die Fähigkeit der Thrombozyten zur Aggregation in Antwort auf die physiologischen Stimuli wie ADP, Thrombin und Kollagen stellt ein weiteres wichtiges Qualitätsmerkmal dar. Auch eine verminderte Aggregationsfähigkeit weist auf einen Qualitätsverlust hin. So beschrieb LOZANO et al. (1997) einen 40 %igen Rückgang der maximalen Bindung von Fibrinogen an Thrombozyten in Reaktion auf Thrombin. Ebenso verringerte sich die Aggregationsfähigkeit auf Kollagen bei Thrombozyten nach sieben Tagen Lagerung. BOCK et al. (2002) beschrieben in diesem Zusammenhang eine Reduktion der Aggregation, auf niedrige Konzentration von Kollagen, zwischen dem vierten und siebten Tag der Lagerung von Thrombozyten. Wurde jedoch die Konzentration von Kollagen im selben Zeitraum erhöht, zeigte sich ein Rückgang der Aggregationsbereitschaft bei Konzentraten und bei Buffy Coats. Auch andere Studien beschrieben ebenso einen Rückgang der Reaktion der Thrombozyten auf Kollagen um 80-85% innerhalb einer Woche (BOOMGAARD et al. 1994).

Die Qualität der Blutprodukte hängt eng mit der Anzahl apoptotischer Zellen zusammen. In vivo dient die Apoptose dazu, ungewollte Zellen durch das Immunsystem zu entfernen (TZIMA et al. 2000). Dabei ist mit der Apoptose der Verlust der Asymmetrie der Phospholipidmembran verbunden (FADOK et al. 1992), welcher durch eine Translokation von Phosphatidylserin von der Zellinnenseite auf die Zelloberfläche zustande kommt. Diese Expression spielt eine wichtige Rolle für die Erkennung und Beseitigung von Zellen durch Macrophagen. (KOOPMANN G. et al. 1994). Obwohl weder Erythrozyten noch Thrombozyten einen Zellkern aufweisen, konnte für beide gezeigt werden, dass die entsprechenden Abläufe nachweisbar sind. Des Weiteren kann die Translokation bei Thrombozyten durch die Anwesenheit der Agonisten wie Thrombin oder Kollagen verursacht werden (BEVERS et al. 1983). Phosphatidylserin auf der Zelloberfläche spielt eine wichtige Rolle, um alte und apoptotische Zellen erkennen zu können. SCHROIT et al. (1985) schrieben diese Fähigkeit dem reticuloendothelialen System zu, welches mit Hilfe von Rezeptoren Phosphatidylserin-exprimierende Zellen, wie z.B alte Erythrozyten, erkennt und beseitigt. Befinden sich diese Phosphatidylserine auf der Zelloberfläche, können sie durch PE-

markiertes Annexin V sichtbar gemacht werden. Dies basiert auf der starken Bindung des Annexin V, speziell an anionische Phospholipide. Die ersten Beweise dafür, dass es mittels Annexin V möglich ist, intakte von apoptotischen Zellen zu unterscheiden, lieferten mehrere Forschergruppen (VERMES et al. 1995 und KOPPMAN et al. 1994). Innerhalb dieser Studien wurde auch beschrieben, dass während der Expression die apoptotischen Zellen ihre Plasmamembranintegrität aufrechterhalten.

4.1.1. Die Anwendbarkeit der Annexinbindung bei Thrombozyten

4.1.1.1. Annexinbindung bei Thrombozyten allgemein

Vergleicht man die Ergebnisse der Annexinbindung der unterschiedlichen Thrombozytenpools und Konzentrate miteinander, so ist zu erkennen, dass eine deutliche kontinuierliche Zunahme der annexinpositiven Zellen über den Zeitraum von sieben Tagen stattgefunden hat. Werden zusätzlich zu diesem Messwert die anderen Parameter herangezogen, so deutet dies auf eine mögliche Verschlechterung der Qualität hin. Ebenso sieht man deutlich bei den Pools eine Reduktion der Stimulierbarkeit der Thrombozyten mittels TRAP 6 innerhalb der ersten drei Tage. Dies stimmt mit den Aussagen von LOZANO et al. (1997) überein. Passend zu diesen Ergebnissen fällt auch bei den Pools die induzierte Aggregation mit Kollagen innerhalb dieser Zeitspanne am deutlichsten von 60% auf 20%, was bereits von BOCK et al. (2002) beschrieben wurde. Stellt man nun alle gemessenen Parameter der Annexinbindung gegenüber, so ist eine Aussage über den Qualitätsverlauf mit Hilfe von Annexin V möglich. Jedoch liefert die Messung mit Annexin V allein keine Aussage über die Art der Zellschädigung, da sowohl bei mechanisch geschädigten Thrombozyten als auch bei sich bereits in Apoptose befindenden Zellen die Phosphatidylserin-Annexinbindung möglich ist. LI et al. (2000) fanden einen deutlichen Anstieg der Phosphatidylserinexpression an Tag sieben. In dieser Dissertation waren jedoch bereits an Tag 1 ca. 8 % der Zellen Annexin V positiv bei den TP und ca 16% bei den TKZ. Es kann hier zum einen eine Aktivierung der Thrombozyten bei der Herstellung an-

genommen werden zum anderen eine bereits eingesezte Apoptose. Hier wäre die Frage zu klären, in wie weit während des Herstellungsverfahrens die Thrombozyten geschädigt wurden. Dabei ist sowohl an die Zentrifugation als auch an die Filterung der Thrombozyten zu denken. Die bei diesen Schritten auftretenden Scherkräfte können möglicherweise für die Schädigung verantwortlich sein. Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die Schäden bei der Herstellung bei den TKZ höher liegen als bei den Pools, möglicherweise weil bei den TKZ deutlich höhere Umdrehungszahlen eingesetzt werden. Ein deutlicher Qualitätsunterschied zwischen bestrahlten und unbestrahlten Thrombozyten konnte durch die Annexinbindung nicht ermittelt werden.

Die Annexin-V-Bindung bietet die Möglichkeit, eine durch das Herstellungsverfahren eventuell früh stattgefundene Verschlechterung der Qualität darzustellen und die Qualität der Thrombozyten im Verlauf der Lagerung zu verfolgen.

4.1.1.2. Annexin V und CD62P

Bei den Thrombozytenpools gehen beide Messmethoden mit einem Anstieg während der Lagerung einher. Im Verhältnis zum Normwert zeigt sich ein leicht erhöhter Basiswert an Tag 1, der sich bei CD62P verdoppelt im Laufe der Lagerung, während sich der Wert der Annexinbindung verdreifacht. Die Expression beider Parameter an Tag 1 erlaubt möglicherweise eine Aussage über die stattgefundene Aktivierung durch die Spende oder die Präparation.

Unter der Annahme, dass alte Thrombozyten häufiger apoptotisch werden, kann eine Verbindung zu Annexin V angenommen werden. Dies wird dadurch verstärkt, dass sowohl Annexin V als auch CD62P erhöhte Ausgangswerte vorweisen und diese in gleichem Maße während der Lagerungsdauer ansteigen. Die Untersuchungen von METCALFE et al. (1997) zeigten ebenfalls einen Anstieg der CD62P positiven Thrombozyten während der Lagerung. Er vertritt die Ansicht, dass die Alterung der Thrombozyten mit der auftretenden Aktivierung zusammenhängen kann.

Bei den Thrombozytenkonzentraten ist sowohl bei der Annexinbindung als auch bei der Bestimmung von CD62P ein Anstieg der Werte während der Lagerung

zu erkennen. Im Vergleich zu den Thrombozytenpools findet man jedoch eine deutlich verringerte Zellaktivierung. Dies korreliert mit den Ergebnissen von Bock et al. (2002), die aufgrund niedriger Plasmakonzentrationen von PF4, Beta Thromboglobulin und P-selectin diese Hypothese sicherten. Zusätzlich wurde von dieser Forschergruppe die Ursache der Thrombozytenaktivierung in Bezug auf den Konzentrationsanstieg von C3a und dessen Abbauprodukt C3a-Desarginin während der Lagerung diskutiert. POLLEY & NACHMANN (1983) postulierten, dass diese Stoffe als starke Thrombozytenaktivatoren wirken.

4.1.1.3. Annexin V und Aggregation

Bei den Thrombozytenpools zeigten die durchgeführten Untersuchungen ebenfalls einen Zusammenhang beider Parameter. Es kam zu einem Rückgang der Aggregationsfähigkeit, vor allem innerhalb der ersten drei Tage. Die zeitgleiche Zunahme der Annexinbindung spricht für einen Zusammenhang beider Parameter bezüglich der Qualität der Thrombozyten. Eine Ursache für den Rückgang der Aggregationsfähigkeit wäre durch eine Zunahme der schon aggregierten Thrombozyten zu erklären. Die ständige Bewegung durch die Thrombozytenschaukel ist aber während der Lagerung gewährleistet. Untersuchungen von Bock et al. (2002) zeigten ebenfalls einen Rückgang der Aggregationsfähigkeit (siehe 4.1.1), vor allem bei gepoolten Thrombozyten im Vergleich zu apheretischen Konzentraten, und somit eine bessere hämostatische Kapazität der TKZ. Demzufolge hätte aber bei den TKZ die Annexinbindung geringer ausfallen müssen. Dies hat sich in dieser Arbeit jedoch nicht bestätigt; deshalb bleibt die Frage nach einem Zusammenhang ungeklärt.

Wie von Bock et al. (2002) bereits beschrieben, zeigte sich auch in dieser Arbeit ein deutlicher Aggregationsunterschied zwischen den TKZ und den gepoolten Thrombozyten. Bei den TP zeigte sich zudem ein weiterer Unterschied. Wurde die Aggregation sofort nach dem Waschen und der Einstellung der Konzentration der Thrombozyten im Aggregometer ermittelt, so wiesen die Ergebnisse eine sehr schlechte Aggregation auf. Wurden aber die Thrombozyten 3 Stunden offen in den Save Lock Tubes gelagert, lagen die Aggregationswerte

im Normbereich. Zurzeit gibt es keine Erklärung für diese Frage; das Problem sollte weiter verfolgt werden.

4.1.1.4. Annexin V und pH

Der kontinuierliche Anstieg der Annexin V positiven Zellen korreliert wenig mit dem pH Wert. Die Messungen des pH Wertes zeigten einen starken Anstieg innerhalb der ersten 3 Tage, dann einen Abfall und an Tag 7 Werte, die dem Ausgangs-pH von ca 7,0 entsprachen. Es gibt viele Untersuchungen über die optimalen Grenzen des pH Wertes. So beschrieben MURPHY UND GARDNER (1975) einen Rückgang der Thrombozytenausbeute in vivo bei pH Werten oberhalb von 7,2.

Ein Abfall der pH-Werte unter 6,0 ist ebenfalls mit einer schlechten Ausbeute in vivo vergesellschaftet (MURPHY et al. 1970). Im Gegensatz dazu beschrieben jedoch DUMONT et al. (2002) bei pH Werten von 7,6 weder einen Verlust der Lebensfähigkeit in vitro noch in vivo. Beim Betrachten der Messergebnisse der Thrombozyten stellt sich die Frage, warum ein deutlicher Anstieg des pH Wertes innerhalb der ersten drei Tage zu erkennen ist. Die ebenso zunehmende Annexinbindung innerhalb der ersten drei Tage lässt zunächst an eine Gemeinsamkeit im Sinne einer Verschlechterung der Qualität denken.

4.1.1.5. Qualitative Veränderungen durch Lagerung

Die Untersuchungen haben gezeigt, dass drei Testparameter (Aggregation, CD62P-Expression und Annexinbindung) eine zunehmende Verschlechterung mit zunehmender Lagerungsdauer aufweisen. Diese Befunde müssen in Korrelation gesetzt werden zu Bemühungen, die Lagerungsdauer von Thrombozytenpräparaten wieder zu verlängern, mit der Maßgabe, dass dabei eine mögliche bakterielle Kontamination ausgeschlossen wird. Hierbei ist geplant, Thrombozyten erst dann auszugeben, wenn bakterielle Untersuchungen nach 24 Stunden Bebrütung negativ ausfallen, was automatisch zur Folge hat, dass die Thrombozyten auf jeden Fall erst 24 Stunden nach der Herstellung ausgegeben werden könnten (SCHMIDT et al. 2005). Nach neueren Untersuchungen, die als einzig signifikante Korrelation zum Thrombozytenanstieg im Patienten die frische

des Präparates und die ABO-Kompatibilität definierten (SLICHTER et al. 2005), erscheint diese Bemühung, die Lagerungszeit zu verlängern, zumindest fragwürdig. Es ergibt sich die Frage, ob die längere Lagerungszeit nicht durch einen höheren Verbrauch ad absurdum geführt wird.

4.1.1.6. Qualitative Veränderungen durch Bestrahlung

Zahlreiche Studien beschäftigten sich mit der Auswirkung der Bestrahlung auf die Thrombozytenqualität. So fanden DUGUID et al. (1991) keine Auswirkungen bei einer Bestrahlung von 15 Gy auf die Thrombozyten. Ebenso scheiterten MOROFF et al. (1986) bei dem Versuch, durch die Bestrahlung von Thrombozyten mit 50 Gy einen Effekt auf die Funktion und die Oberfläche von Thrombozyten in vitro demonstrieren zu können. Die Messung mit Annexin V-PE ergab bei den unbestrahlten Thrombozyten nur geringe Unterschiede im Vergleich zu den bestrahlten Thrombozyten. Übereinstimmend dazu lagen bei zwei Thrombozytenpools die Ausgangswerte der unbestrahlten Thrombozyten unter denen der bestrahlten, so dass die Möglichkeit einer gering höheren Belastung oder Schädigung der Thrombozyten durch die Bestrahlung in Betracht gezogen werden kann.

In Übereinstimmung zu den obern genannten Studien zeigte die Bestimmung der Annexinbindung in dieser Arbeit, dass die Bestrahlung keine massiv verstärkte Apoptose in den Thrombozyten verursacht hatte. Anhand der anderen Parameter (CD62P, pH Wert, Aggregationsfähigkeit) bestätigt sich dies ebenfalls, da sich durch die Bestrahlung keine aussagekräftigen Qualitätsunterschiede ergeben. Dies wurde auch von SWEENEY et al. (1994) beschrieben. Seine gewonnenen Daten ergaben keine klinische Signifikanz bei gelagerten Thrombozyten nach Bestrahlung bezüglich der Thrombozytenqualität.

4.2. Erythrozyten

Die Qualität von Erythrozyten kann anhand verschiedener Parameter überprüft werden. Die visuelle Inspektion, Hämolyseparameter, die quantitative Bestimmung von 2,3 DPG und der ATP Spiegel (DE KORTE D. et al. 2004) sind nur einige Methoden, um die Qualität der Erythrozytenkonzentrate zu kontrollieren.

Da Erythrozyten weder Zellkern noch Mitochondrien besitzen, wurde ihre Fähigkeit zur Apoptose in Frage gestellt. Durch das Fehlen des Zellkerns und der Mitochondrien seien Erythrozyten nicht fähig, den klassischen Weg der Apoptose einzugehen (KS LANG et al. 2002).

Jedoch gelang es KS LANG et al. (2002), Vorgänge in Erythrozyten nachzuweisen, welche apoptoseähnlichen Charakter haben. Diese Forschungsergebnisse zeigten, dass durch osmotischen und oxidativen Stress Ca^{2+} Kanäle der Erythrozytenmembran geöffnet werden, welche wiederum einen Calciumeinstrom in die Zelle zur Folge haben. Dieser Anstieg des cytosolischen Calciums leitet die Apoptose der Zelle ein. Dieselbe Forschergruppe untersuchte dazu mehrere apoptoseinduzierende Faktoren. Somit ergab der induzierte Einstrom von Calcium durch eine Ionomycinbehandlung zwei apoptosetypische Effekte, zum einen, die Schrumpfung der Zellen, zum anderen den Anstieg der Expression von Phosphatidylserin auf der Oberfläche von Erythrozyten. Dieser Schrumpfung liegt ein Calcium-sensitiver Kaliumkanal der Zellmembran zugrunde, der zur Hyperpolarisation der Zelle und somit zu einem Verlust von KCl führt. (BRUGNARA et al. 1993) Bestätigend wurde dies auch von BRATOSIN et al. (2001) veröffentlicht. Hierbei zeigten alte Erythrozyten, durch einen Calciumeinstrom induziert, einen schnellen Selbstzerstörungsprozess, der Apoptosemerkmale wie Zellschrumpfung, Plasmamembran-Microvesikulation und die Expression von Phosphatidylserin auf der Oberfläche des Erythrozyten aufwies. Dabei ist die Expression von Phosphatidylserin eines der Signale, die es den Macrophagen ermöglichen, an alte Erythrozyten zu binden (BRATOSIN D et al. 1998). Durch die Durchflusszytometrie mit Hilfe von Annexin V nach Inkubation der Erythrozyten mit Ca-Ionophore und Ca^{2+} gelang es ebenfalls, die schnelle Phosphatidylserinexpression als Zeichen eines aktiven und regulierten Selbstzerstörungsprozesses zu beschreiben. Auch in der vorliegenden Dissertation ergab die Inkubation mit Ca-Ionophore durchgehend annexinpositive Erythrozyten. Anhand dieser Übereinstimmung soll nun in den folgenden Abschnitten die Annexinbindung mit anderen Qualitätsparametern wie freiem Hämoglobin und freiem Kalium diskutiert werden.

4.2.1. Die Anwendbarkeit der Annexinbindung bei Erythrozyten

4.2.1.1. Annexinbindung und Kalium

Als Folge der Lagerung von Erythrozytenkonzentraten kommt es zu zunehmender Rigidität der Erythrozyten, weiterhin zu komplexen funktionellen Veränderungen wie der Abnahme des ATP- und 2,3 DPG Gehalts sowie der Freisetzung von Inhaltsstoffen wie z.B Kalium, LDH und Hämoglobin. (Auszug aus der Gebrauchs- und Fachinformation des Zentrums für Klinische Transfusionsmedizin Tübingen). Da die extrazelluläre Kaliumbelastung ein signifikantes klinisches Problem bei bestimmten Patientengruppen darstellt, muss die zusätzliche Kaliumkonzentration im Plasma vor allem bei alternden, bestrahlten Blutprodukten bedacht werden (JETER EK et al. 1991).

Aus diesem Grund wird der Kaliumspiegel im Zuge der Qualitätssicherung in dieser Abteilung regelmäßig untersucht. Der Grenzwert bei den bestrahlten Erythrozyten liegt bei <150 mmol/l.

Unsere Untersuchungen bestätigten diesen von JETER veröffentlichten Anstieg an freiem Kalium während der Messung bis zum 49 Tag der Lagerung. (siehe Abbildung 24). Die Forschergruppe führte dies auf die Durchlässigkeit der Zellmembran und auf die Na^+K^+ Pumpe zurück, die auch schon von DEVENUTO et al. (1969) als Ursache für die Volumenänderung des Erythrozyten genannt wurde. Als Grundlage diente die Tatsache, dass sich durch die Kühlung auf 4 °C die Aktivität dieser Pumpe verringert. Unsere Ergebnisse zeigten einen deutlichen kontinuierlichen Anstieg des Kaliums bei sowohl bestrahlten als auch unbestrahlten Erythrozyten. Demgegenüber zeigte sich bei der Annexinbindung keine aussagekräftige Zunahme der Werte. Auffallend waren die Schwankungen der Messwerte an den zweiten und dritten Messtagen, auf deren Ursache im Kapitel 4.2.1.3 eingegangen wird.

Da die Ausgangswerte der Annexinbindung schon am ersten Messtag auf Endniveau bei ca 20% lagen, dem gegenüber Kalium jedoch kontinuierlich anstieg, ist ein direkter Zusammenhang mit dem Austritt von Kalium aus der Zelle und der der Annexinbindung zugrunde liegenden Phosphatidylserin-Expression eher

unwahrscheinlich. In unseren Messungen wurde allerdings erkennbar, dass bei noch normalen Kaliumspiegeln bereits mindesten 20% der Zellen Annexin V-positiv waren.

4.2.1.2. Annexinbindung und freies Hämoglobin

Durch die Schädigung der Zellmembran tritt Hämoglobin aus dem Erythrozyten in das Plasma über. In unseren Messungen zeigte sich ein deutlicher Unterschied zwischen den bestrahlten und unbestrahlten LAE. In Bezug auf die Lagerungsdauer war nur bei den bestrahlten Erythrozyten eine deutliche Konzentrationserhöhungen erkennbar. DAVEY et al. (1992) veröffentlichten signifikante Erhöhungen des freien Hämoglobins, vor allem bei mit 30 Gy bestrahlten Erythrozyten. In unserer Messreihe wurden die Blutprodukte ebenfalls mit 30 Gy bestrahlt. Dem gegenüber lag die Annexinbindung ab dem ersten Messtag gleich bleibend bei 20%. Somit zeigt auch in diesem Fall die Messung mit Annexin V-PE bereits am ersten Messtag eine Erhöhung der Phosphatidylserinexpression als Zeichen einer bereits eingeleiteten Apoptose. Es bleibt die Frage offen, warum die deutlich höhere Konzentration an freiem Hämoglobin bei den bestrahlten Produkten nicht mit einer ebenfalls ansteigenden Annexinbindung einhergeht. In diesem Punkt gelang es BRATOSIN et al. (2001) nachzuweisen, dass die Bindung von Annexin V selektiv nur an Phosphatidylserin stattfindet, welches auf der Oberfläche der Zelle exprimiert wurde, und die Bindung nicht auf die Schädigung der Zellmembran zurückzuführen ist. Warum jedoch die unbestrahlten Produkte höhere Annexinausgangswerte aufwiesen, bleibt ungeklärt.

4.2.1.3. Annexinbindung

Zunächst fällt auf, dass schon am ersten Messtag bei allen Messproben ca. 15 - 23% der Zellen annexinpositiv waren. Als Ursache kommt die Möglichkeit in Frage, dass während der Herstellung der LAE die Zellschrumpfung und Expression von Phosphatidylserin ausgelöst wurde, wobei bedacht werden muss, dass die erste Messung erst an Tag 14 nach der Spende durchgeführt wird. Auf der anderen Seite zeigt sich am ersten Messtag ein normaler Ausgangskalium-

spiegel. Auch hier zeigt sich ein Unterschied zwischen Annexinbindung und Membranschädigung im Sinne einer Durchlässigkeit der Zellmembran.

Bei genauerem Betrachten der Messergebnisse zeigte sich bei unbestrahlten Erythrozyten eine gering höhere Annexinbindung am ersten Tag der Messung. In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage nach der Auswirkung der Bestrahlung auf die Erythrozyten. Anhand der Zunahme der annexinpositiven Zellen besteht die Möglichkeit, dass durch den Vorgang der Bestrahlung die Expression von Phosphatidylserin auf der Oberfläche vermindert wurde. Da diese Expression den Makrophagen ermöglicht, an den Erythrozyten zu binden (BRATOSIN et al. 1998), müsste die Überlebensrate der Erythrozyten nach Transfusion bei den unbestrahlten Produkten geringer ausfallen. Jedoch zeigte MINTZ et al. (1993) mittels ^{51}Cr markierten Erythrozyten, dass es bei den bestrahlten Zellen zu keinem Unterschied in der 24 Stunden Überlebensrate nach Transfusion gekommen war. Ihre Ergebnisse zeigten weiterhin ein durchschnittliches Überleben von $>75\%$ sowohl bei bestrahlten als auch bei unbestrahlten Erythrozyten.

In diesem Zusammenhang muss nochmals auf die technische Durchführung der Messungen hingewiesen werden. Auffallend zeigte sich bei allen vier Messgruppen ein Rückgang der Annexinbindung am 2. Messtag. Durch die große Anzahl an Messproben, den standardisierten Messablauf und die Tatsache, dass ausschließlich die unbestrahlten Produkte einen Anstieg am 3. Messtag verzeichneten, ist ein konsequenter menschlicher als auch maschineller Fehler an diesen beiden Messtagen als Ursache weitgehend auszuschließen. Da auch die Herstellung und Zusammensetzung der Messmedien an jedem Messtag gleich war und die bestrahlten und unbestrahlten Proben jeweils paarweise durchgeführt wurden, verringert sich zusätzlich die Wahrscheinlichkeit eines Fehlers. Trotz ausführlicher Literaturrecherche konnten keine Daten gefunden werden, die eine Erklärung für eine kurzzeitige Reduktion der Phosphatidylserinexpression geben könnten.

Abschließend sollte noch auf folgenden Aspekt hingewiesen werden:

Die hier vorgestellten Daten zeigen, dass die Lagerung nach Bestrahlung mit zunehmender Dauer zu einem zunehmenden Austritt von Kalium und Hämoglobin führt. Das heißt, dass die derzeitige Praxis der Richtlinien, dass Erythrozytenkonzentrate nur bis Tag 14 nach der Spende bestrahlt werden dürfen, dann aber noch bis zum Ende der Laufzeit gelagert werden dürfen, schlechter ist als eine Regelung wäre, die eine Bestrahlung jederzeit erlaubte, aber dann keine Lagerung, sondern nur die sofortige Ausgabe an den Patienten. In der Vergangenheit war die letztere Version die Methode der Wahl, heute werden möglicherweise durch die juristischen Vorgaben schlechtere Produkte ausgegeben.

4.3. Schlussfolgerung

Die Ergebnisse der Annexinbindung der unterschiedlichen Thrombozytenpools und Konzentrate ergaben eine deutlich kontinuierliche Zunahme der annexinpositiven Zellen im Verlauf der Lagerung. Ebenso konnte gezeigt werden, dass durch die Bestrahlung kein verstärkter Zelluntergang bei den Thrombozyten verursacht worden war. Vergleicht man ferner Annexin V mit den Parametern CD62P und Aggregation, lässt sich eine gemeinsame Tendenz erkennen. Dies erlaubt die Aussage, dass mit der Annexinbindung eine verlässliche Qualitätskontrolle von Thrombozytenpräparaten möglich ist, die unter Umständen erlaubt, auf andere, technisch aufwändigere Methoden zu verzichten. Vor allem bei Einführung neuer Produktionsmethoden könnte sich die Annexinbindung als wertvoller Parameter erweisen, um ein Urteil über neue Produktionsmethoden im Vergleich zu alten abgeben zu können.

Dem gegenüber zeigt sich bei den Erythrozyten ein anderes Bild: die Höhe der Annexinbindung liegt schon zu Beginn der Messreihe auf Endniveau. Betrachtet man ferner die Absenkung an den zweiten und dritten Messtagen mit anderen Vergleichsparametern, z.B. freies K^+ oder freies Hb, spricht dies eher gegen eine Anwendung in der Qualitätskontrolle. Da aber ein Einfluss des Herstellungsprozesses und der Bestrahlung auf die Erythrozytenmembran anzunehmen ist, sollte die Annexinbindung unter diesem Aspekt überprüft und weiter validiert werden.

5. Zusammenfassung

Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit waren Untersuchungen zur Anwendbarkeit der Annexinbindung bei der Qualitätskontrolle von gelagerten Thrombozyten und Erythrozyten. Dabei wurden bei den Thrombozyten sowohl Pools als auch Thrombozytenkonzentrate von Einzelspendern in die Untersuchung mit eingeschlossen. Alle Blutprodukte wurden zusätzlich in zwei Gruppen aufgeteilt, wobei eine Gruppe mit 30 Gy bestrahlt wurde, um mittels Annexinbindung Aussagen über die Auswirkung der Bestrahlung auf die Zellen treffen zu können. Insgesamt wurden jeweils 12 bestrahlte und 12 unbestrahlte Erythrozytenkonzentrate und jeweils 3 Thrombozytenpools und 3 Thrombozytenkonzentrate untersucht.

Die Expression von Phosphatidylserin auf der Oberfläche von Zellen ist ein Hinweis auf beginnende Zellschädigung (Vorstufe der Apoptose bei Erythrozyten, Hinweis auf beginnende Apoptose und Aktivierung bei Thrombozyten).

Die Schädigung der Zellen mit Austritt von intrazellulären Bestandteilen und damit der Funktionsverlust der Zellen bilden den Hauptaspekt jeglicher Qualitätsuntersuchungen von zellulären Blutprodukten. Vor dem Hintergrund, dass nämlich durch Annexin V-PE die Möglichkeit besteht, am Durchflusszytometer die Phosphatidylserinexpression auf der Oberfläche der gelagerten Zellen quantitativ sichtbar zu machen, wurde dieser Parameter mit den herkömmlichen Standardparameter der Qualitätssicherung verglichen. Dazu zählten in dieser Dissertation bei den Thrombozyten der pH, die CD62P Expression, sowie Stimulation durch TRAP 6 und die induzierte Aggregation mittels Kollagen, bei den Erythrozyten das Kalium und das freie Hämoglobin.

Bei den Thrombozyten konnte durch Annexin gezeigt werden, dass die Bestrahlung keinen verstärkten Zelluntergang der Thrombozyten verursacht. Im Vergleich mit den Standardparametern zeigte die Annexinbindung einen parallelen Verlauf, nämlich eine zunehmende Verschlechterung mit zunehmender Lagerungsdauer. Infolgedessen ist die Annexinbindung als Qualitätskontrolle bei Thrombozytenpräparaten einsetzbar, vor allem, wenn sie aufwändigere Metho-

den ersetzen kann oder wenn sie beim Vergleich für neue Produktionsverfahren eingesetzt wird. Weiterhin konnte anhand unserer Ergebnisse deutlich gemacht werden, dass zwar die Thrombozytenkonzentrate von Einzelspendern bessere Eigenschaften in Stimulierbarkeit und Aggregation als die Thrombozytenpools vorwiesen, jedoch die Annexinbindung bei beiden gleich hohe Werte ergab. Dies zeigt, dass die Annexinbindung nicht die gleichen Membranveränderungen wie die anderen Parameter repräsentiert, also auch eine wesentliche Erweiterung des Methodenarsenals darstellen könnte. Durch diesen Marker besteht, im Gegensatz zu den anderen herkömmlichen Parametern, jederzeit die Möglichkeit, die sich in Apoptose befindenden Thrombozyten schnell quantitativ zu erfassen.

Bei den Erythrozyten zeigte sich ein auffällig hoher Ausgangswert bei der Annexinbindung, der im Vergleich zu den Standardparametern nicht verlässlich interpretiert werden konnte. Dabei ist allerdings zu bedenken, dass die Messungen erst ab Tag 14 durchgeführt wurden. Also spiegelt der Wert von ca. 20% den Status an Tag 14 wider; auffällig ist, dass dieser Wert dann aber stabil bleibt, im Gegensatz zu den anderen Prüfparametern, die eine weitere Verschlechterung mit zunehmender Lagerungsdauer aufweisen. Damit wird klar, dass die Annexinbindung, da sie nicht parallel zu den anderen Parametern verläuft, diese nicht ersetzen kann oder sollte; sie stellt aber möglicherweise einen wichtigen Parameter bei neuen Produktionsmethoden dar, da sie offensichtlich andere Membranveränderungen repräsentiert, als das freie Kalium und das freie Hämoglobin. Im Gegensatz zu den Thrombozyten weisen die Standardparameter eine deutliche Verschlechterung nach Bestrahlung und zunehmender Lagerungsdauer auf, was die derzeit herrschende Praxis, die es erlaubt, bestrahlte Produkte bis zu 14 Tage lang zu lagern, in Frage stellt. Auch hier gibt es keinen parallelen Verlauf bei der Annexinbindung.

Die Annexinbindung stellt also eine schnell durchführbare Methode dar, die bei der Qualitätsuntersuchung von Thrombozytenpräparaten andere Methoden ersetzen könnte, nicht aber bei den Erythrozytenpräparaten. Sie hat aber bei beiden Produktklassen einen Wert bei der Einführung neuer Produktionsmethoden, da sie andere Membranveränderungen abdeckt.

6. Literaturverzeichnis

BEVERS EM, COMFURIUS P, ZWAAL RF.

Changes in membrane phospholipid distribution during platelet activation. *Biochim Biophys Acta.* 1983 Dec 7;736(1):57-66.

BOOMGAARD MN, GOUWEROK CW, HOMBURG CH, DE GROOT G, IJSSELDIJK MJ, DE KORTE D The platelet adhesion capacity to subendothelial matrix and collagen in a flow model during storage of platelet concentrates for 7 days. *Thromb Haemost.* 1994 Oct;72(4):611-6.

BOCK M, RAHRIG S, KUNZ D, LUTZE G, HEIM MU.

Platelet concentrates derived from buffy coat and apheresis: biochemical and functional differences. *Transfus Med.* 2002 Oct;12(5):317-24.

BRATOSIN D, MAZURIER J, TISSIER JP, ESTAQUIER J, HUART JJ, AMEISEN JC, AMINOFF D, MONTREUIL J. Cellular and molecular mechanisms of senescent erythrocyte phagocytosis by macrophages. A review. *Biochimie.* 1998 Feb;80(2):173-95.

BRATOSIN D, ESTAQUIER J, PETIT F, ARNOULT D, QUATANNENS B, TISSIER JP, SLOMIANNY C, SARTIAUX C, ALONSO C, HUART JJ, MONTREUIL J, AMEISEN JC. Programmed cell death in mature erythrocytes: a model for investigating death effector pathways operating in the absence of mitochondria. *Cell Death Differ.* 2001 Dec;8(12):1143-56.

BRUGNARA C, DE FRANCESCHI L, ALPER SL. Inhibition of Ca(2+)-dependent K⁺ transport and cell dehydration in sickle erythrocytes by clotrimazole and other imidazole derivatives. *J Clin Invest.* 1993 Jul;92(1):520-6.

BUCHHOLZ DH, YOUNG VM, FRIEDMAN NR, REILLY JA, MARDINEY MR JR.

Bacterial proliferation in platelet products stored at room temperature. Transfusion-induced *Enterobacter* sepsis. *N Engl J Med.* 1971 Aug 19;285(8):429-33.

CARDIGAN R., L.M. WILLIAMSON. The quality of platelets after storage for 7 days, *Transfusion Medicine* 2003 Aug;13(4):173-87.

DAVEY RJ, NC MCCOY, M YU, JA SULLIVAN, DM SPIEGEL, SF LEITMAN. The effect of prestorage irradiation on posttransfusion red cell survival. *Transfusion* 1992 Jul-Aug;32(6):525-8.

DE WILDT-EGGEN J, SCHRIJVER JG, SMID WM, JOIE M, BOLLINNE V, BINS M. Platelets stored in a new-generation container differences between plasma and platelet additive solution II. *Vox Sang.* 1998;75(3):218-23.

DE KORTE D, VERHOEVEN AJ. Quality determinants of erythrocyte destined for transfusion. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 2004 Mar;50(2):187-95.

DEVENUTO F, LIGON DF, FRIEDRICHSEN DH, WILSON HL. Human erythrocyte membrane uptake of progesterone and chemical alterations. *Biochim Biophys Acta* 1969 Oct 14;193(1):36-47.

DUGUID JK, CARR R, JENKINS JA, HUTTON JL, LUCAS GF, DAVIES JM. Clinical evaluation of the effects of storage time and irradiation on transfused platelets. *Vox Sang*. 1991;60(3):151-4.

DUMONT LJ, AUBUCHON JP, WHITLEY P, HERSCHEL LH, JOHNSON A, MCNEIL D, SAWYER S, ROGER JC. Seven-day storage of single-donor platelets: recovery and survival in an autologous transfusion study. *Transfusion*. 2002 Jul;42(7):847-54.

FADOK VA, VOELKER DR, CAMPBELL PA, COHEN JJ, BRATTON DL, HENSON PM. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol*. 1992 Apr 1;148(7):2207-16.

FADOK VA, LASZLO DJ, NOBLE PW, WEINSTEIN L, RICHES DW, HENSON PM. Particle digestibility is required for induction of the phosphatidylserine recognition mechanism used by murine macrophages to phagocytose apoptotic cells. *J Immunol*. 1993 Oct 15;151(8):4274-85.

GEORGE JN, PICKETT EB, HEINZ R. Platelet membrane glycoprotein changes during the preparation and storage of platelet concentrates. *Transfusion*. 1988 Mar-Apr;28(2):123-6.

GULLIKSSON H, AUBUCHON JP, VESTERINEN M, SANDGREN P, LARSSON S, PICKARD CA, HERSCHEL I, ROGER J, TRACY JE, LANGWEILER M; BIOMEDICAL EXCELLENCE FOR SAFER TRANSFUSION WORKING PARTY OF THE INTERNATIONAL SOCIETY OF BLOOD TRANSFUSION. Storage of platelets in additive solutions: a pilot in vitro study of the effects of potassium and magnesium. *Vox Sang*. 2002 Apr;82(3):131-6.

HOLME S. Storage and quality assessment of platelets. *Vox Sanguinis* 1998;74 Suppl 2:207-16.

JETER EK, GADSDEN RH, CATE JC 4TH. Irradiation effect on aging red blood cells. *Ann Clin Lab Sci*. 1991 Nov-Dec;21(6):420-5.

KILKSON H, HOLME S, MURPHY S. Platelet metabolism during storage of platelet concentrates at 22 degrees C. *Blood*. 1984 Aug;64(2):406-14.

KLINGER MH, JOSCH M, KLUTER H. Platelets stored in a glucose-free additive solution or in autologous plasma--an ultrastructural and morphometric evaluation. *Vox Sang*. 1996;71(1):13-20.

KLEIN HG, Dzik S, Slichter SJ, et al. Leukocyte-reduced blood components: Current status. Washington, DC: American Society of Hematology, 1998:39-62.

KOOPMAN G, REUTELINGSPERGER CP, KUIJTEN GA, KEEHNEN RM, PALS ST, VAN OERS MH. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood*. 1994 Sep 1;84(5):1415-20.

KUEHNERT MJ, ROTH VR, HALEY NR, GREGORY KR, ELDER KV, SCHREIBER GB, ARDUINO MJ, HOLT SC, CARSON LA, BANERJEE SN, JARVIS WR. Transfusion-transmitted bacterial infection in the United States, 1998 through 2000. *Transfusion*. 2001 Dec;41(12):1493-9.

LANG KS, ROLL B, MYSSINA S, SCHITTENHELM M, SCHEEL-WALTER HG, KANZ L, FRITZ J, LANG F, HUBER SM, WIEDER T. Enhanced erythrocyte apoptosis in sickle cell anemia, thalassemia and glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Cell Physiol Biochem*. 2002;12(5-6):365-72.

LI J, XIA Y, BERTINO AM, COBURN JP, KUTER DJ. The mechanism of apoptosis in human platelets during storage. *Transfusion*. 2000 Nov;40(11):1320-9.

LOZANO ML, RIVERA J, GONZALEZ-CONEJERO R, MORALEDA JM, VICENTE V. Loss of high-affinity thrombin receptors during platelet concentrate storage impairs the reactivity of platelets to thrombin. *Transfusion*. 1997 Apr;37(4):368-75.

METCALFE P, WILLIAMSON LM, REUTELINGSPERGER CP, SWANN I, OUWEHAND WH, GOODALL AH. Activation during preparation of therapeutic platelets affects deterioration during storage: a comparative flow cytometric study of different production methods. *Br J Haematol*. 1997 Jul;98(1):86-95.

MINTZ PD, ANDERSON G. Effect of gamma irradiation on the in vivo recovery of stored red blood cells. *Ann Clin Lab Sci*. 1993 May-Jun;23(3):216-20.

MOROFF G, GEORGE VM, SIEGL AM, LUBAN NL. The influence of irradiation on stored platelets. *Transfusion*. 1986 Sep-Oct;26(5):453-6.

MURPHY CT, PEERS SH, FORDER RA, FLOWER RJ, CAREY F, WESTWICK J. Evidence for the presence and location of annexins in human platelets. *Biochem Biophys Res Commun.* 1992 Dec 30;189(3):1739-46.

MURPHY S, GARDNER FH. Effect of storage temperature on maintenance of platelet viability – deleterious effect of refrigerated storage. *N Engl J Med* 1969 May 15;280(20):1094-8.

MURPHY S, SAYAR SN, GARDNER FH. Storage of platelet concentrates at 22° C. *Blood* 1970;35:549-57.

MURPHY S, GARDNER FH. Platelet storage at 22 degrees C: Role of a gas transport across plastic containers in maintenance of viability. *Blood.* 1975;46(2): 209-218.

MURPHY S, KAHN RA, HOLME S, PHILLIPS GL, SHERWOOD W, DAVISSON W, BUCHHOLZ DH. Improved storage of platelets for transfusion in a new container. *Blood.* 1982 Jul;60(1):194-200.

MURPHY S. Platelet storage for transfusion *Semin Hematol.* 1985 Jul;22(3):165-77.

MURPHY S. The efficacy of synthetic media in the storage of human platelets for transfusion. *Transfus Med Rev.* 1999 Jul;13(3):153-63.

POLLEY, M. J., R. L. NACHMAN. 1983. Human platelet activation by C3a and C3a des-arg. *J Exp Med.* 1983 Aug 1;158(2):603-15.

SCHROIT AJ, MADSEN JW, TANAKA Y. In vivo recognition and clearance of red blood cells containing phosphatidylserine in their plasma membranes. *J Biol Chem.* 1985 Apr 25;260(8):5131-8.

SLICHTER S.J, DAVIS KA, ENRIGHT HE, BRAIN HA, GERNESHEIMER TE, KAO KU, KICKLER TH, LEE ED, MCFARLAND JA, MCCULLOUGH JE, RODES GL, SCHIFFER CH, WOODSON RO. Factors affecting posttransfusion platelet increments, platelet refractoriness, and platelet transfusion intervals in thrombocytopenic patients *Blood* 2005 May 15; 105(10): 4106-14.

SCHMIDT MI, WEIS CR, HECK JU, MONTAG TH, NICOL SV, HOURFAR MI, SCHAEFER VO, SIREIS WA, ROTH W, SEIFRIED ER. Optimized Scansystem™ platelet kit for bacterial detection with enhanced sensitivity: detection within 24 h after spiking. *Vox Sanguinis* 2005 Oct;89(3):135-9.

STRATTON JR, DEWHURST TA, KASINA S, RENO JM, CERQUEIRA MD, BASKIN DG, TAIT JF. Selective uptake of radiolabeled annexin V on acute porcine left atrial thrombi. *Circulation* 1995 Nov 15;92(10):3113-21.

Sweeney JD, Holme S, Moroff G. Storage of apheresis platelets after gamma radiation. *Transfusion*. 1994 Sep;34(9):779-83.

TAYLOR MA, TANDY NP, FRASER ID. Effect of new plastics and leucocyte contamination on in vitro storage of platelet concentrates. *Clin Pathol*. 1983 Dec;36(12):1382-6.

THIAGARAJAN P, TAIT JF. Collagen induced exposure of anionic phospholipid in platelet and platelet derived microparticles *J Biol Chem* 1991, 266(36): 24302-7.

TZIMA E, WALKER JH. Platelet annexin V: the ins and outs. *Platelets*. 2000 Aug;11(5):245-51.

YUASA T, OHTO H, YASUNAGA R, KAI T, SHIRAHAMA N, OGATA T. Improved extension of platelet storage in a polyolefin container with higher oxygen permeability. *Br J Haematol*. 2004 Jul;126(1):153-9.

VAN DER MEER, P.F., PIETERSZ, R. & REESINK, H. Leucoreduced platelet concentrates in additive solution: an evaluation of filters and storage containers. *Vox Sang*. 2001;81(2):102-7.

VAN HEERDE WL, DE GROOT PG, REUTLINGSPERGER CP. The complexity of the phospholipid binding protein Annexin V. *Thromb-Haemost* 1995 Feb;73(2):172-9.

VERMES I, HAANEN C, STEFFENS-NAKKEN H, REUTELINGSPERGER C. A NOVEL ASSAY FOR APOPTOSIS. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods*. 1995 Jul 17;184(1):39-51.

7. Anhang

7.1. Verzeichnis der Abkürzungen

TKZ	Thrombozytenkonzentrat
TP	Thrombozytenpool
TLB	Thrombozytenlagerbeutel
TBP	Thrombozytenprobe
SLT	Save Lock Tubes [2,5ml] der Firma Eppendorf
PSR	Polysterol-Röhrchen
HSR	Hypotone Schockreaktion
PAS	Platelet additive Solution
PBS	Phosphat buffered saline (0,1% BSA)
BSA	Bovines Serum Albumine
ABP	Annexin Bindungs Puffer
LAE	Leukozytenarmes Erythrozytenkonzentrat
FSC	Forward Side Scatter
SSC	Side Scatter

7.2. Verzeichnis der Tabellen

Tabelle 1:	Qualitätskontrollen Leukozytendepletiertes Erythrozytenkonzentrat.....	Seite 6
Tabelle 2:	Qualitätskontrollen Leukozytendepletiertes Apherese -Thrombozytenkonzentrat	Seite 6
Tabelle 3:	Qualitätskontrollen Leukozytendepletiertes Pool –Thrombozytenkonzentrat.....	Seite 6
Tabelle 4:	Indikationen für eine Bestrahlung von Blutprodukten.....	Seite 9
Tabelle 5:	Ergebnisse Thrombozytenpools mit Durchschnittswerten der bestrahlten und unbestrahlten Proben.....	Seite 28
Tabelle 6:	Ergebnisse Thrombozytenkonzentrate mit Durchschnittswerten der bestrahlten und unbestrahlten Proben.....	Seite 34

Tabelle 7:	Ergebnisse LAE bestrahlt / unbestrahlt.....	Seite 46
------------	---	----------

7.3. Verzeichnis der Abbildungen

Abbildung 1:	Prinzip der Auftrennung des Blutes.....	Seite 10
Abbildung 2:	Vollblut nach der Zentrifugation.....	Seite 10
Abbildung 3:	Foto automatischer Blutkomponenten-Extraktor Baxter Amicus	Seite 12
Abbildung 4:	Foto automatischer Blutkomponenten-Extraktor Opitpress II.....	Seite 12
Abbildung 5:	Foto Firma Beckman-Coulter.....	Seite 23
Abbildung 6:	Prinzip des Durchflusszellenblocks.....	Seite 24
Abbildung 7:	Prinzip des FSC.....	Seite 24
Abbildung 8:	Prinzip des SSC.....	Seite 25
Abbildung 9:	Dot Plot Darstellung.....	Seite 25
Abbildung 10:	Inkubation von Thrombozyten mit spez. Anti- körpern.....	Seite 26
Abbildung 11:	Dot-Plot Darstellung: Gaten.....	Seite 26
Abbildung 12:	CD62P bei Thrombozytenpools.....	Seite 29
Abbildung 13:	Aggregation bei Thrombozytenpools.....	Seite 30
Abbildung 14:	AnnexinV- PE bei Thrombozytenpools.....	Seite 32
Abbildung 15:	pH bei Thrombozytenpools.....	Seite 33
Abbildung 16:	CD62P bei Thrombozytenkonzentraten.....	Seite 36
Abbildung 17:	Aggregation bei Thrombozytenkonzentraten....	Seite 37
Abbildung 18:	Annexin V-PE bei Thrombozytenkonzentraten..	Seite 39
Abbildung 19:	pH bei bei Thrombozytenkonzentraten	Seite 40
Abbildung 20:	Mittelwert CD62P im Vergleich	Seite 41
Abbildung 21:	Mittelwert pH im Vergleich.....	Seite 42
Abbildung 22:	Aggregation im Vergleich.....	Seite 43
Abbildung 23:	Mittelwert Annexin V-PE im Vergleich.....	Seite 44
Abbildung 24:	Mittelwert Freies Kalium bei Erythrozyten	Seite 47
Abbildung 25:	Mittelwert Freies Hämoglobin bei Erythrozyten..	Seite 48
Abbildung 26:	Mittelwert Annexin V-PE bei Erythrozyten.....	Seite 49

Danksagung:

Für den erfolgreichen Abschluss der vorliegenden Arbeit möchte ich mich aus ganzem Herzen bei Frau Prof. Wernet für die Überlassung des Themas und die optimale Betreuung bedanken. Ohne ihren Anregungen und Ideen wäre diese Arbeit nicht in dieser Form entstanden. Auch Ihre menschliche und freundliche Art haben mir während der Fertigstellung der Doktorarbeit immer viel Kraft gegeben.

Ganz herzlich möchte ich mich auch bei meinen Betreuern, Frau Dr. Schnaidt und Herrn Dr. Weinstock bedanken. Herr Weinstock hat mir in der Anfangsphase der Doktorarbeit treu mit seinen fachkundigen Ratschlägen zur Seite gestanden. Bei ihm möchte ich mich für die Einarbeitung in dieses Thema sehr bedanken. Ich wünsche ihm und seiner Familie in Bad Kreuznach alles Gute und werde ihn immer als sehr fachkundigen und freundlichen Betreuer in Erinnerung behalten.

Großer Dank geht speziell auch an Frau Dr. Schnaidt, die nach dem Umzug von Herrn Weinstock die Betreuung übernahm. Sie hat mich während der gesamten weiteren Zeit intensiv unterstützt und durch ihre konstruktiven und kompetenten Anregungen und ihre menschliche Art sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Vielen Dank!

Auch bei allen Mitarbeitern im Labor der Transfusionsmedizin, in der Blutspende und im Zentrallabor möchte ich an dieser Stelle ganz herzlich DANKE sagen. Ich wurde sehr herzlich aufgenommen und meine alltäglichen technischen Probleme und Fragen bestanden, dank der guten Zusammenarbeit, nur kurze Zeit.

An dieser Stelle sei auch nochmals meinen Eltern gedankt. Sie haben mir dieses Studium ermöglicht, mich durch Höhen und Tiefen begleitet und mich durch ihre Gedanken und Gebete gestärkt.

Meiner Frau Miriam, die ich vor acht Wochen geheiratet habe, gehört dieser letzte Dank. Sie hat mich seit dem 2. Semester durch alle großen und kleinen Prüfungen des Studiums und des Lebens begleitet und mir durch ihre wunderbare Art unheimlich viel Kraft und Durchhaltevermögen gegeben. Ich danke ihr von ganzem Herzen dafür!

Lebenslauf Tobias Dominik Stöckle

22. Mai 1976 geboren in Rottweil a.N.
- 1982- 1986 Grundschule Kressbronn
- 1986 -1989 Montfort Gymnasium Tettnang
- 1989 -1993 Realschule Kressbronn
- 1993 -1996 Ernährungswissenschaftliches Gymnasium Friedrichshafen
Leistungskurse Chemie und Biologie
- Juni 1996 Abitur
- Nov. 1996 dreizehn Monate Zivildienst beim DRK Friedrichshafen als
Rettungssanitäter
- Dez. 1997 sieben Monate Zeitvertrag als Rissprüfer bei ZF Friedrichshafen
- Sep. 1998 einjähriger Besuch des theologischen Vorseminars
„Ambrosianum“ in Ehingen/Donau
Abschluss: Großes Latinum
- Okt. 1999 Beginn des Medizinstudiums an der Universität Heidelberg
- Aug. 2001 Ärztliche Vorprüfung
- Sep. 2002 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
- Okt. 2002 Weiterführung des Medizinstudiums an der Universität Tübingen
- 2001- 2003 Famulaturen in Chirurgie, Anästhesie, Gastroenterologie,
Kardiologie, Transfusionsmedizin
- Sep. 2004 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
- 2004-2005 Praktisches Jahr an der Universitätsklinik Tübingen
Chirurgie (Allgemeinchirurgie, Kinderchirurgie)
Innere Medizin (Hämato-Onkologie, Infektiologie)
Pädiatrie (Hämato-Onkologie, Neonatologie)
- 24.Nov. 2005 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung.