

Aus dem Institut für Transfusionsmedizin und
Hämostaseologie – Universitätsblutbank –
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. V. Kretschmer
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg in
Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg
GmbH, Standort Marburg

*Untersuchungen zum Effekt von ASS – Einnahme
auf die in vitro Qualität von Thrombozyten bei
Thrombozytapherese und während der 5-Tages-
Lagerung von Thrombozytenkonzentraten*

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin

dem Fachbereich Humanmedizin der
Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Debora Drechsel (geb. Gritzka)
aus Halle/ Saale

Marburg 2006

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg
am: 12. Oktober 2006

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. Bernhard Maisch

Referent: PD Dr. Thomas Zeiler

Korreferent: PD Dr. Gabriele Jaques

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung	7
1.1	<i>Herstellung von Thrombozytenkonzentraten</i>	9
1.2	<i>Beeinflussung der Thrombozytenkonzentratqualität</i>	10
1.3	<i>Acetylsalicylsäure (ASS, Aspirin®)</i>	12
1.3.1	<i>Indikation</i>	12
1.3.2	<i>Wirkungsweise</i>	12
1.3.2.1	<i>Die Wirkung von ASS auf die Cyclooxygenase 1</i>	12
1.3.2.2	<i>Thromboxan</i>	13
1.4	<i>Fragestellung</i>	14
2	Material und Methoden	16
2.1	<i>Studiendesign</i>	16
2.2	<i>Spender</i>	16
2.3	<i>Herstellung der Thrombozytapheresekonzentrate</i>	17
2.3.1	<i>Zellseparation</i>	17
2.3.1.1	<i>COM TEC</i>	17
2.4	<i>Berechnung der Separationseffizienz</i>	20
2.5	<i>Probenentnahme</i>	20
2.5.1	<i>Proben von den Spendern</i>	20
2.5.2	<i>Proben aus den Thrombozytapheresekonzentraten</i>	20
2.6	<i>Methodenüberblick</i>	21
2.6.1	<i>Untersuchungen aus Spenderblut</i>	21
2.6.2	<i>Untersuchungen aus dem Thrombozytapheresekonzentrat</i>	22
2.6.3	<i>Herstellung von plättchenarmen Plasma (PAP) aus Thrombozytapheresekonzentrat</i>	22
2.7	<i>Zellzählung</i>	23
2.7.1	<i>Automatische Zellzählung</i>	23
2.7.2	<i>Material und Reagenzien</i>	23
2.7.3	<i>Mikroskopische Zellzählung</i>	23
2.7.3.1	<i>Mikroskopische Zellzählung Erythrozyten</i>	23
2.7.3.1.1	<i>Material und Geräte:</i>	23
2.7.3.1.2	<i>Durchführung</i>	23
2.7.3.2	<i>Mikroskopische Zellzählung Leukozyten</i>	24
2.7.3.2.1	<i>Material und Geräte:</i>	24

2.7.3.2.2	<i>Durchführung</i>	24
2.8	<i>Platelet Function Analyser</i>	25
2.8.1	<i>Funktionsweise</i>	25
2.8.2	<i>Reagenzien</i>	25
2.8.3	<i>Durchführung</i>	26
2.8.4	<i>Auswertung</i>	26
2.9	<i>Thrombozytenaggregation</i>	26
2.9.1	<i>Materialen und Geräte</i>	27
2.9.2	<i>Durchführung der Aggregation aus Blut</i>	27
2.9.2.1	<i>Herstellung von PRP/ PAP</i>	27
2.9.2.2	<i>Messen der Trübungsdifferenz</i>	28
2.9.3	<i>Durchführung der Aggregation aus Thrombozytapheresekonzentrat</i>	28
2.9.4	<i>Auswertung</i>	28
2.10	<i>Durchflusszytometrie</i>	29
2.10.1	<i>Aufbau und Funktionsweise</i>	29
2.10.1.1	<i>Datenverarbeitung</i>	30
2.10.1.2	<i>Gating</i>	30
2.10.1.3	<i>Voreinstellung am Gerät</i>	30
2.10.2	<i>Geräte, Antikörper und Chemikalien</i>	31
2.10.2.1	<i>Antikörper</i>	31
2.10.3	<i>Durchführung</i>	32
2.10.3.1	<i>Messung der Vollblutproben vom Spender</i>	32
2.10.3.2	<i>Messung der Proben aus den Thrombozytapheresekonzentraten</i> 33	
2.10.3.3	<i>Messung der Proben</i>	33
2.11	<i>Morphologie der Thrombozyten</i>	34
2.11.1	<i>Material</i>	34
2.11.2	<i>Durchführung</i>	34
2.11.3	<i>Auszählen und Auswertung</i>	35
2.12	<i>Stoffwechselfparameter</i>	35
2.12.1	<i>pH</i>	35
2.12.2	<i>pCo2</i>	36
2.12.3	<i>Laktat</i>	36
2.12.3.1	<i>Durchführung</i>	36

2.12.4	<i>Laktatdehydrogenase</i>	36
2.12.4.1	<i>Testprinzip</i>	37
2.12.4.2	<i>Durchführung</i>	37
2.13	<i>Swirling</i>	37
2.14	<i>Statistische Methoden</i>	38
3	<i>Ergebnisse</i>	39
3.1	<i>Kontrolle der ASS-Einnahme</i>	39
3.2	<i>Spenderblutbild und Separationsverlauf</i>	40
3.3	<i>Funktionelle Untersuchungen der Spenderblutproben vor und nach der Apherese</i>	41
3.3.1	<i>Thrombozytenaggregation</i>	41
3.3.2	<i>Durchflusszytometrie</i>	42
3.4	<i>Untersuchungen der Thrombozytapheresekonzentrate</i>	45
3.5	<i>Thrombozytenaggregation, Thrombozytenaktivierung und Stoffwechselfparameter im Thrombozytapheresekonzentrat</i>	46
3.5.1	<i>Stoffwechselfparameter und Thrombozytenmorphologie im Thrombozytapheresekonzentrat</i>	46
3.5.2	<i>Durchflusszytometrie</i>	47
3.5.3	<i>Thrombozytenaggregation</i>	49
4	<i>Diskussion</i>	51
4.1	<i>Auswirkungen der ASS-Einnahme auf die im Spenderblut zirkulierenden Thrombozyten</i>	53
4.2	<i>Effekt der Zellseparation auf die Thrombozytenfunktion und Auswirkungen von ASS auf Parameter der Zellseparation</i>	54
4.3	<i>Auswirkungen von ASS auf die Qualität der Thrombozyten im Thrombozytapheresekonzentrat im Verlauf der Lagerung</i>	56
4.3.1	<i>Ultrastrukturelle Veränderungen und Thrombozytenfunktion</i>	56
4.3.2	<i>Metabolismus</i>	58
4.4	<i>Schlussfolgerungen und kritische Beurteilung der Methodik</i>	59
5	<i>Zusammenfassung</i>	61
6	<i>Literaturverzeichnis</i>	63
7	<i>Abkürzungsverzeichnis</i>	73
8	<i>Abbildungsverzeichnis</i>	75
9	<i>Tabellenverzeichnis</i>	76

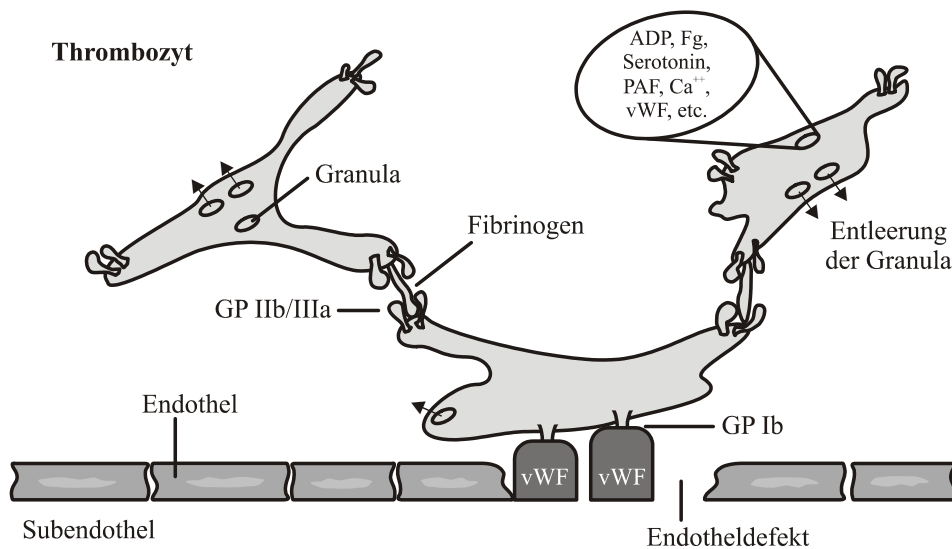
10	Anhang	80
10.1	Daten	80
10.1.1	Untersuchungen aus Spenderblut	80
10.1.2	Separationsparameter	84
10.1.3	Untersuchungen aus dem Thrombozytapheresekonzentrat	85
10.1.3.1	Herstellungstag (Tag 1)	85
10.1.3.2	3. Tag nach Herstellung (Tag 3)	88
10.1.3.3	5. Tag nach Herstellung (Tag 5)	91
10.2	Probandeninformation	95
10.3	Einwilligungserklärung	96
10.4	Danksagung	97
10.5	Akademische Lehrer	98
10.6	Ehrenwörtliche Erklärung	99

1 Einleitung

Unter der Vielzahl von Faktoren und physiologischen Prozessen, die den Stillstand einer Blutung herbeiführen nehmen die Thrombozyten eine zentrale Rolle ein. Ausgelöst durch die Verletzung eines Gefäßes oder Veränderungen am Gefäßendothel kommt es zur Adhäsion von Thrombozyten an subendotheliale Komponenten der Gefäßwand (insbesondere Kollagen). Der thrombozytäre Glykoproteinkomplex (GP) Ib-V-IX ist dabei der wichtigste Adhäsionsrezeptor für den von-Willebrand-Faktor, der eine molekulare Brücke zwischen den Gefäßkomponenten und dem GP Ib-V-IX bildet. Unmittelbar nach der Adhäsion folgt die Aktivierung der Thrombozyten. Initiiert durch enzymatische Hydrolyse von Membranphospholipiden kommt es zur Erhöhung der Kalziumionenkonzentration. Damit ist die Voraussetzung für die weitere Aktivierung der Thrombozyten geschaffen. Dieser Prozess besteht im Wesentlichen aus drei einander bedingenden und teilweise parallel ablaufenden Ereignissen: Sekretion, Formveränderung und Aggregation. Der erhöhte zytoplasmatische Spiegel von freiem Kalzium ermöglicht mittels Polymerisation von Aktin und Myosin die Formation eines kontraktiven Gels. Morphologisches Korrelat dieser Vorgänge ist der Formwandel „shape change“ der Thrombozyten unter Ausbildung von Pseudopodien. Diese Formveränderung bewirkt eine Zusammenlagerung von zentralen Zellorganellen und unterstützt die Ausbildung von Membrankontakten, so dass es zur Fusion der Speichergranula mit dem „open canalicular system“ (OCS) kommt und Inhaltsstoffe der Thrombozytenspeichergranula sezerniert werden können. Diese Inhaltsstoffe sind vasokonstriktische Faktoren (Serotonin, PDGF), aggregationsfördernde Faktoren (ADP, Fibrinogen, Thrombospondin), inflammatorische Proteine, Wachstumsfaktoren (PDGF, Transforming Growth Factor β (TGF β), Fibroblast Growth Factor (FGF)), Immunglobuline und adhäsive Proteine (Fibronektin, von Willebrandfaktor) (Klinger 1996; Eller 2000). Außerdem werden Komponenten des Gerinnungssystems sezerniert (Fibrinogen, Faktor V, VIII), sowie Thromboxan A₂ und Platelet Activating Factor (PAF). Das Verschmelzen der Granulamembranen mit dem OCS hat auch zur Folge, dass sich die Glykoproteinzusammensetzung der Thrombozytenmembran ändert und unter anderem das GP IIb/IIIa vermehrt exprimiert wird (Chernoff *et al.* 1992; Müller-Berghaus 1998). Bei aktivierten Thrombozyten kommt es zur intramolekularen Konformationsänderung des

GP1Ib/IIIa, so dass seine Bindungsstelle für die Adhäsivproteine Fibrinogen, das als Ligand die bedeutendste Rolle einnimmt, Fibronectin, Vitronectin und von Willebrandfaktor zugänglich wird (Sims *et al.* 1991). Die Bindung dieser Liganden an den 1Ib/IIIa Rezeptor ermöglicht die Interaktion zwischen Thrombozyten und eine Blutstillung durch die Bildung eines zunächst noch relativ instabilen Thrombozytenaggregates (Harbrecht 1998). Dieser bisher beschriebene Prozess wird als primäre Hämostase bezeichnet.

Abbildung 1-1: Schematisch dargestellte primäre Hämostase nach (Mutschler *et al.* 2001)



Legende: vWF = von-Willebrand-Faktor, Fg = Fibrinogen

Das zunächst entstandene Thrombozytenaggregat ist jedoch instabil und bedarf für eine dauerhafte Blutstillung einer Konsolidierung. Dieser Prozess wird als sekundäre Hämostase bezeichnet und gilt als die eigentliche Blutgerinnung (plasmatische Gerinnung). Er führt zur Ausbildung eines festen Fibrinnetzes, in das Erythrozyten und Thrombozyten eingebettet sind.

Nach Morawitz unterscheidet man drei Phasen der plasmatischen Gerinnung: Aktivierungsphase, Koagulationsphase und Retraktionsphase. Im Mittelpunkt der Aktivierungsphase steht die Aktivierung des Faktors X. Diese erfolgt durch ein kaskadenartig ablaufendes Gerinnungssystem, das aus didaktischen und historischen Gründen in das extrinsische und das intrinsische System unterteilt wird. Mit der Bildung des aktivierten Faktors X (Xa) münden beide Systeme in eine gemeinsame Endstrecke, die über die kalziumabhängige Aktivierung des Faktors X die Thrombinentstehung bewirkt. Thrombin kann dann Fibrinogen zu Fibrin spalten. Die Bildung und Polymerisierung dieser Fibrinmonomere wird als Koagulationsphase

bezeichnet. Induziert durch den Faktor XIII erfolgt dann die Quervernetzung und Stabilisierung des Fibringerinnsels. Dieses, nun unlösliche Fibrinpolymer stabilisiert den Thrombozytenthrombus und wird mittels GP IIb/IIIa und Fibronektin mit den Thrombozyten und dem umgebenden Gewebe verankert. Nach Bildung des fertigen Thrombus ziehen sich die Wundränder zusammen und pressen im Rahmen der Retraktionsphase Serum heraus.

Die Thrombozyten nehmen innerhalb der Hämostase eine zentrale Rolle ein, da sie nicht nur durch Adhäsion und Aggregation zum primären Wundverschluss führen, sondern auch die Reaktionsoberfläche für die plasmatischen Gerinnungsprozesse liefern. Die Aktivierung der ruhenden Thrombozyten resultiert in gravierenden Veränderungen wie Formenwandel, Sekretion prokoagulatorischer Substanzen und insbesondere der Bereitstellung der Reaktionsoberfläche für den Ablauf der plasmatischen Gerinnung. Negativ geladene Phospholipide der Thrombozytenmembran werden dabei im Rahmen der Aktivierung auf der Thrombozytenoberfläche exprimiert und sind Bestandteil sowohl des Faktor X aktivierenden (Tenase), als auch des Thrombin aktivierenden (Prothrombinase) Komplexes. Diese zentrale und aktive Rolle der Thrombozyten innerhalb der Hämostase wird vor allem bei Thrombozytenpenien oder Thrombozytopathien, die zu lebensbedrohlichen Blutungen führen können deutlich. Daher ist die Thrombozytentransfusion unverzichtbarer Therapiebestandteil bei vielen Erkrankungen, die mit Thrombozytopenien einhergehen. Dies gilt insbesondere für intensive zytostatische Behandlungen mit transientser Knochenmarksinsuffizienz (z.B. bei Stammzelltransplantation), bei DIC und bei Massivtransfusion (Machin *et al.* 1995; Kubanek 1999; Bundesärztekammer 2004).

1.1 Herstellung von Thrombozytenkonzentraten

Die Herstellung von Thrombozytenkonzentraten (TK) erfolgt entweder aus Vollblutspenden oder durch Thrombozytapherese. Bei der Gewinnung von TK aus Vollblutspenden werden jeweils 450 bzw. 500 ml Blut in 63 ml bzw. 70 ml CPD- oder CPDA-1-Stabilisatorlösung aufgenommen. Durch eine erste Zentrifugation wird dann das Vollblut in zelluläre Bestandteile und Plasma aufgetrennt. Das dabei entstehende Erythrozytenkonzentrat und das Plasma werden in Lagerungsbeutel übergeleitet und abgetrennt. Im Ursprungsbeutel verbleibt der so genannte Buffy Coat (ca. 80 ml). Dieser enthält fast alle Leukozyten und Thrombozyten des

Vollblutes, sowie Erythrozyten und Plasma. Durch erneute Zentrifugation dieses leukozyten- und thrombozytenhaltigen Buffy Coats wird nun das thrombozytenreiche Plasma (Thrombozytenkonzentrat) von den im Beutel verbleibenden Erythrozyten und Leukozyten abgetrennt. In der Regel werden die Thrombozyten aus 4 bis 6 blutgruppengleichen Einzelspenden zu einem Pool-TK zusammengeführt. Ein gepooltes TK enthält in der Regel 240 bis 360 x 10⁹ Thrombozyten, die in 200 bis 300 ml Plasma oder einer Plasmaersatzlösung suspendiert sind. Der Leukozytengehalt dieser Thrombozytenkonzentrate liegt unterhalb von 1 x 10⁶ pro TK.

Durch die Verwendung von speziellen Zellseparatoren können Thrombozytenkonzentrate mit mehr als 200 x 10⁹ Thrombozyten auch von einzelnen Blutspendern gewonnen werden. Bei dieser Technik wird das Blut des Spenders bereits bei der Spende aufgetrennt und das thrombozytenreiche Plasma in einem Beutel gesammelt. Alle nicht benötigten Bestandteile des Blutes werden dem Spender unverzüglich noch während der Apheresespende wieder retransfundiert. Mit diesem Verfahren können von einem einzelnen Spender größere Mengen an Thrombozyten gewonnen werden. Die Gewinnung dieser Thrombozytapheresekonzentrate erfolgt unter Verwendung des Stabilisators ACD. Die Thrombozytapheresekonzentrate von einem Einzelspender enthalten in der Regel 200 bis 400 x 10⁹ Thrombozyten in etwa 200 bis 300 ml Plasma. Auch diese Präparate enthalten weniger als 1 x 10⁶ Leukozyten (Müller-Eckhardt 1998).

1.2 Beeinflussung der Thrombozytenkonzentratqualität

Durch die Gewinnung und während der Lagerung von Thrombozytenkonzentraten werden die Thrombozyten physikalischen (z.B. Zentrifugationskräfte, Scherkräfte) und chemischen (z.B. Ansäuerung durch Citratbeimengung) Reizen ausgesetzt. Dadurch kann es zur Aktivierung von Thrombozyten sowie zu strukturellen und chemischen Veränderungen in den Thrombozyten kommen. Diese Aktivierung der Thrombozyten kann zu einer Abnahme der Thrombozytenfunktion und der in vivo Überlebensdauer nach Transfusion führen und damit den Transfusionserfolg schmälern (Schiffer *et al.* 1986; Fijnheer *et al.* 1990; Rinder *et al.* 1991). Die Betrachtung der Glykoproteinzusammensetzung der Thrombozytenmembran während der Herstellungs- und Lagerungszeit der Präparate sowie die Beobachtung der Ultrastruktur der Thrombozyten und der metabolischen Parameter im TK erklärt

diese, unter den Begriff „platelet storage lesion“ (Lagerungsschäden) zusammengefasst, Veränderungen im TK (Bode 1990; Chalandon *et al.* 1999). Der Lagerungsschaden im TK ist ein multifunktionaler Prozess. Er basiert auf Aktivierung, metabolischen Veränderungen und der physiologischen Seneszenz der Thrombozyten (Klinger 1996).

Als maßgebliche Voraussetzung für die gute Funktion der Thrombozyten im TK und auch damit nach der Transfusion wird deren Ausgangssituation und eine ungestörte Funktionsfähigkeit der Thrombozyten im Spenderblut angesehen (Jilma-Stohlawetz *et al.* 2001). Paglieroni *et al.* veröffentlichten jedoch im Jahr 2004, dass 38% der Vollblutspenden, aus einer Gruppe von freiwilligen, qualifizierten Vollblutspendern, abnorme Werte in Thrombozytenfunktionstests und/ oder einen veränderten Thrombozytenaktivationszustand aufweisen (Paglieroni *et al.* 2004). Die Liste der für diese Veränderungen in Frage kommenden Ursachen ist umfangreich. Flavinoide reiche Kost wie Rotwein, Grapefruitsaft, grüner Tee und einige Schokoladen- und Kakaosorten können die Thrombozytenfunktion vorübergehend behindern (Rein *et al.* 2000; Kang *et al.* 2001; Pearson *et al.* 2002). Dieser Zustand wird als Aspirin-like-Effekt bezeichnet. Fettreiche Kost, Rauchen oder die Sichelzellanämie hingegen setzen den Aktivierungszustand der Thrombozyten herauf (Nair *et al.* 2001; Hyson *et al.* 2002).

Eine besondere Rolle spielt in diesem Zusammenhang die Einnahme von Medikamenten, welche die Thrombozytenfunktion beeinflussen. Dies betrifft insbesondere die Einnahme von Aspirin[®] (ASS, Acetylsalicylsäure), welche von vielen Blutspendern im Rahmen der Spenderuntersuchung vor Spende nicht richtig angegeben wird (Paglieroni *et al.* 2004). Von Sharon *et al.* vorgelegte Daten beziffern bei zirka 6% der Blutspender eine vorausgegangene ASS-Einnahme im Sinne einer Schmerztablette, die trotz sorgfältiger Anamnese und Aufklärungsgespräch von den Spendern nicht angegeben wird (Sharon *et al.* 1980).

1.3 Acetylsalicylsäure (ASS, Aspirin[®])

1.3.1 Indikation

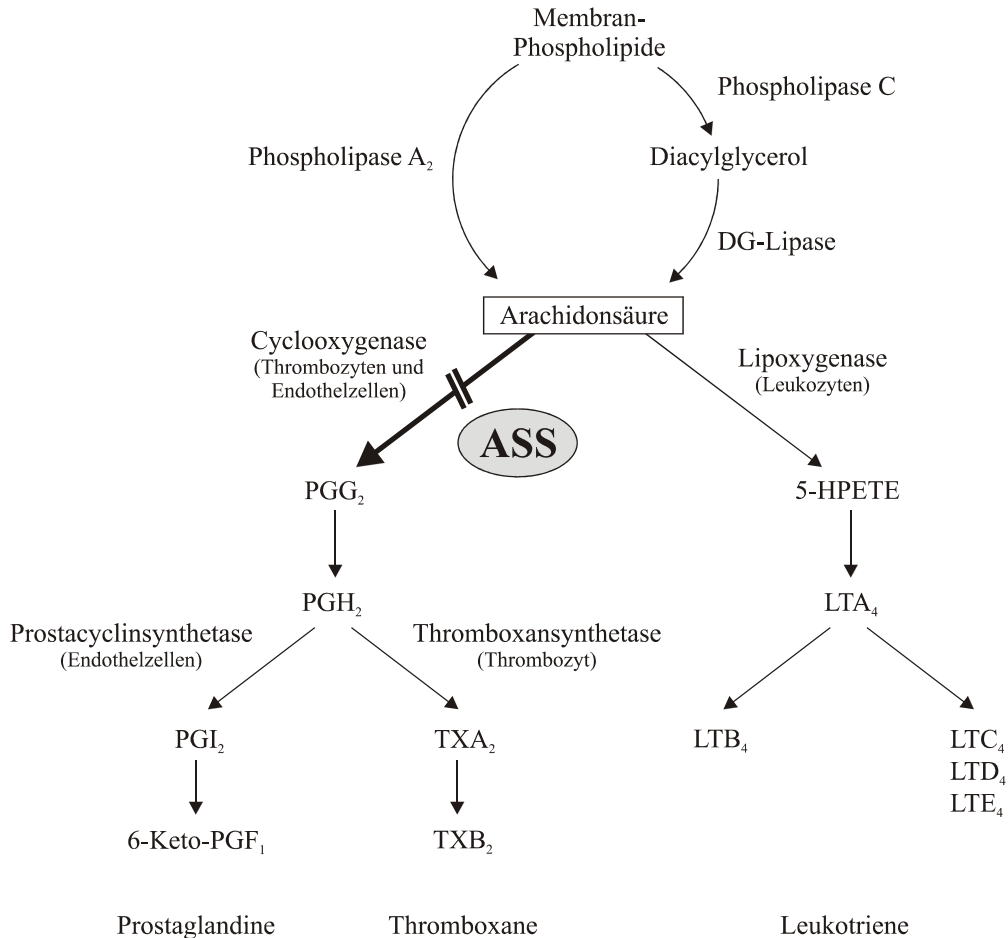
ASS ist das weltweit meist genutzte Schmerzmittel (Hein *et al.* 1998). Neben der analgetischen, antipyretischen und antiphlogistischen Wirkungen besitzt ASS auch thrombozytenaggregationshemmende Eigenschaften und wird deshalb auch als Thrombozytenaggregationshemmer eingesetzt. Gesicherte Indikationen zur Anwendung des Wirkstoffes als Thrombozytenaggregationshemmer sind z.B. instabile Angina pectoris, akuter Myokardinfarkt, PTCA, Stentimplantation, Sekundärprophylaxe der KHK, Sekundärprophylaxe und Rezidivprophylaxe einer zerebralen Ischämie (Karow *et al.* 2004).

1.3.2 Wirkungsweise

1.3.2.1 Die Wirkung von ASS auf die Cyclooxygenase 1

Die in Thrombozyten und in Endothelzellen enthaltene Cyclooxygenase 1 (COX 1) führt zur Entstehung von zyklischen Endoperoxiden, einer Vorstufe, aus der im Thrombozyten Thromboxane und in der Endothelzelle Prostaglandine entstehen. ASS greift in diesen Prozess ein, in dem es den Serinrest in der Position 530 der COX 1 alkyliert und damit die Synthese von Thromboxanen sowie Prostaglandinen inaktiviert. Im Gegensatz zur Endothelzelle besitzt der reife Thrombozyt jedoch keinen Zellkern, kann die einmal durch ASS inhibierte Cyclooxygenase nicht nachsynthetisieren und es unterbleibt die Thromboxansynthese über seine gesamte, verbleibende Lebensdauer (Harbrecht 1998; Mutschler *et al.* 2001).

Abbildung 1-2: Eingreifen von ASS in die Synthese von Thromboxanen und Prostaglandinen nach (Müller-Berghaus 1998)



Die Abbildung stellt schematisch die Bildung von Prostaglandinen, Thromboxanen und Leukotrienen aus ihren Vorstufen dar. Die Einnahme von ASS führt zu Hemmung der Cyclooxygenase, die in den kernlosen Thrombozyten nicht nachsynthetisiert werden kann. DG=Diacylglycerin; PGI₂=Prostacyclin; PGG₂=Hydroperoxyendoperoxid; PGH₂=Endoperoxid; TXA, TXB=Thromboxane; LTA₄=Epoxid; LTC₄, LTD₄, LTE₄=Cysteinyl-Leukotriene; LTB₄=cysteinylfreie Peptoleukotrien; HPETE=Hydroxy-Peroxy-Eicosatetransäuren

1.3.2.2 Thromboxan

Thromboxan gilt als einer der stärksten Thrombozytenagonisten. Die Entstehung von Thromboxan und dessen Bindung an seinen G-Protein-gekoppelten-Rezeptor bewirkt einen Anstieg des zytoplasmatischen Kalziums, Proteinphosphorylierung, Phosphoinositidhydrolyse, „Shape Change“, Sekretion und Aggregation der Thrombozyten. Das im Thrombozyten gebildete Thromboxan A₂ (TXA₂) vermag die Thrombozytenmembran zu passieren und andere Thrombozyten zu aktivieren (Harbrecht 1998). Schwächere Thrombozytenagonisten wie Epinephrin, ADP,

Kollagen und PFA aber auch potente Agonisten wie Thrombin aktivieren die Phospholipase A₂. Damit kann Arachidonsäure freigesetzt werden und die Synthese von Thromboxan fortgeführt werden (Rao *et al.* 1993). Dies verdeutlicht die zentrale Rolle die Thromboxan in der Funktion der Thrombozyten spielt.

Grundsätzlich können jedoch auch andere Thrombozytenagonisten, wie zum Beispiel Thrombin in entsprechend hoher Dosis eine Thrombozytenstimulierung und Aggregation bewirken (Muller *et al.* 1997). Epinephrin vermag gelagerte, durch Medikamente geschädigte Thrombozyten zu stimulieren, so dass diese ihre Reaktionsweise auf andere Agonisten wiedererlangen (Rao *et al.* 1985). ASS gilt als schwacher Antagonist am Thrombozyten. Klinisch verdeutlicht wird in einer Studie von Ardekian *et al.* die belegten, dass eine Niedrig-Dosis Therapie mit Aspirin vor einem oralchirurgischen Eingriff nicht abzusetzen ist, da die lokal wirkende Hämostase so suffizient arbeitet, dass sie die Blutung kontrolliert (Ardekian *et al.* 2000).

1.4 Fragestellung

Unter der Prämisse, dass Thrombozytenspender keine eingeschränkte Thrombozytenfunktion aufweisen sollen, werden Spender nach der Einnahme von Medikamenten befragt und von der Thrombozytenspende ausgeschlossen, wenn sie in den Tagen vor der Spende z.B. ASS eingenommen haben (Bundesärztekammer 2004). Trotz sorgfältiger Anamnese und Aufklärungsgespräch ist jedoch bei zirka 6% der Blutspender mit einer vorausgegangenen ASS-Einnahme (als Schmerzmittel) zu rechnen, ohne dass dies bei der Spenderbefragung berichtet wird (Sharon *et al.* 1980). Systematische Arbeiten, die untersuchen, ob es durch die ASS-Einnahme von Thrombozytenspendern zu einer relevanten Beeinträchtigung der klinischen Wirksamkeit der Thrombozytentransfusion kommt, gibt es bisher nicht.

Andererseits liegen Arbeiten aus der Aortokoronaren Venenbypass-Chirurgie vor, in denen partielle Inhibition der Thrombozytenfunktion mittels Ticlopidin Überleben und Funktion der Thrombozyten nach der Operation verbesserte und zu weniger postoperativen Blutungen und einem geringeren Bedarf an Blutprodukten führte (Hiramatsu *et al.* 1997; Bizzarri *et al.* 2001).

Es ist vorstellbar, dass die partielle Thrombozyteninaktivierung mit dem COX-Hemmer ASS auch bei der Herstellung und Lagerung von Thrombozytenkonzentraten zu solch einem positiven Effekt führt, wenn diese

während der Herstellung und Lagerung nicht so sensibel auf aktivierende Reize reagieren und damit Lagerungsschäden in geringerem Maße ausgebildet werden. Es stellt sich die Frage, ob die Einnahme von ASS zu einer Verringerung der Lagerungsschäden bei Thrombozyten führt und die Thrombozyten im Laufe der Lagerung nicht sogar eine besser konservierte Funktion aufweisen, oder ob sich die seit Jahrzehnten allgemein bestehende Meinung bewahrheitet, dass durch ASS geschädigte Thrombozyten auch in Thrombozytenkonzentraten so deutliche Funktionseinbußen aufweisen, dass der Ausschluss von Spendern nach ASS-Einnahme gerechtfertigt ist. In dem Bewusstsein, dass die Transfusion von intakten und interaktionsfähigen Thrombozytenkonzentraten in vielen Fällen ein notwendiger, lebensrettender Therapiebestandteil ist, stellt sich die wichtige Aufgabe eine Aussage über die Auswirkungen von ASS auf die Thrombozyten im Thrombozytenkonzentrat zu treffen, die die Herstellung sowie die 5-tägige Lagerungszeit umfasst. Mit der vorliegenden Arbeit soll untersucht werden ob die Einnahme von ASS in einer Dosierung wie sie üblicherweise in Schmerztabletten verwendet wird, zu einer messbaren Beeinträchtigung der Thrombozytenfunktion in Thrombozytenkonzentraten führt oder ob nicht sogar ein protektiver Effekt resultiert, welcher dazu beiträgt Lagerungsschäden im Thrombozytenkonzentrat vorzubeugen und/ oder diese zu verringern.

2 Material und Methoden

2.1 Studiendesign

Die Studie wurde von der Ethikkommission des Klinikums der Philipps-Universität beurteilt und positiv beschieden. Die Spender wurden vor Beginn der Studie ordnungsgemäß aufgeklärt und unterschrieben eine Einwilligungserklärung. In einem gepaarten Studienansatz wurden bei 10 gesunden, freiwilligen Blutspendern jeweils zwei Thrombozytapheresen durchgeführt. Die Durchführung der Apheresen fand unter fast identischen Separationsbedingungen (Uhrzeit, Maschine, Set, Separationsparameter) statt. Jeweils eine der beiden Apheresen erfolgte nachdem der Spender am Vorabend 500 mg ASS eingenommen hatte, die andere Apherese erfolgte ohne vorherige ASS-Einnahme. Die Reihenfolge dieser Spenden wurde von der Studienleitung nach dem Zufallsprinzip festgelegt. Der Untersuchende wusste nicht, ob der Spender zum jeweiligen Untersuchungszeitpunkt ASS eingenommen hatte oder nicht. Um eine Beeinträchtigung durch Medikamente oder vorausgegangene Blutspenden bzw. Thrombozytapheresen zu vermeiden durften die Spender in den der Spende vorausgegangenen 28 Tagen weder Medikamente eingenommen, noch Blut bzw. Thrombozyten gespendet haben. Der Mindestabstand zwischen den beiden Untersuchungsterminen betrug somit mindestens 28 Tage. Den Spendern wurden jeweils vor und nach der Thrombozytapherese Blutproben zur Untersuchung entnommen. Die Untersuchungen aus dem Thrombozytapheresekonzentraten erfolgten am Herstellungstag, sowie am dritten und fünften Lagerungstag.

2.2 Spender

Die Auswahl der Spender entsprach den in Deutschland gültigen Richtlinien für die Auswahl von Thrombozytenspendern (Bundesärztekammer 2004).

Die Geschlechts- und Altersverteilung der Spender ist in der Tabelle 2-1 aufgeführt.

Tabelle 2-1: Alter und Geschlechtsverteilung der Spender

Alter in Jahren	Min	Max	Median	Mittelwert
	25	48	39	36
Geschlechtsverteilung	Männlich		Weiblich	
	8		2	

2.3 Herstellung der Thrombozytapheresekonzentrate

2.3.1 Zellseparation

Die Gewinnung der Thrombozyten wurde mittels automatisierter Thrombozytapherese in einem geschlossenen System durchgeführt. Dabei wird dem Spender über Punktion einer Cubitalvene entnommenes Vollblut unmittelbar nach der Entnahmekanüle antikoaguliert, in einem geschlossenen Schlauchsystem zur Separationskammer geleitet und dort mittels Zentrifugation in die einzelnen Fraktionen aufgetrennt. Während der größte Teil der Thrombozyten mit ca. 300 ml Plasma in einem Beutel gesammelt wird, werden die übrigen zellulären und plasmatischen Blutbestandteile dem Spender unverzüglich über eine zweite Venenkanüle am kontralateralen Arm zurückgegeben (extrakorporale Zirkulation).

2.3.1.1 COM TEC

In dieser Arbeit erfolgten alle Thrombozytenapheresen mit dem Zellseparator COM TEC[®] der Firma Fresenius HemoCare unter Verwendung der Software PLT-5d und dem C5L-Aphereseset (Moog *et al.* 2003). Die Thrombozytapheresekonzentrate wurden in großvolumigen, aus einer gasdurchlässigen Spezialfolie bestehenden, Beuteln gelagert, die die Lagerungsfähigkeit des Thrombozytapheresekonzentrats über 5 Tage gewährleisten.

Zu Beginn des Verfahrens wurden Hämatokrit, Thrombozytenzahl im Spenderblut, Größe, Gewicht und Geschlecht des Spenders in die COM TEC[®]-Software eingegeben. Das Programm errechnet daraus die Separationsparameter (zu prozessierendes Vollblutvolumen, benötigte Separationszeit, Zellenfluss, benötigtes ACD-A Volumen).

Über eine bereits am Set vorkonnectierte, großlumige Punktionskanüle wird dem Spender aus einer Cubitalvene kontinuierlich Blut entnommen. Dieses Blut wird mit ACD-A antikoaguliert und durch ein Schlauchsystem, das zuvor mit isotoner

Kochsalzlösung und Antikoagulans gefüllt worden ist zur Separationskammer geleitet. Verschiedene Pumpen bewerkstelligen den Transport der verschiedenen Flüssigkeiten im Set.

Die einstufige starre Separationskammer C5 besteht aus Kunststoff und hat die Form einer progressiv ansteigenden Spirale. In der Separationskammer erfolgt die Auftrennung des antikoagulierten Spenderblutes in thrombozytenreiches Plasma, thrombozytenarmes Plasma und die restlichen zellulären Bestandteile durch Zentrifugation. Die Zentrifugenkammer verfügt über getrennte Abflusskanäle für die unterschiedlichen, die Kammer wieder verlassenden, aufgetrennten Blutkomponenten. Das thrombozytenreiche Plasma wird in einem Lagerungsbeutel gesammelt während die restlichen, nicht benötigten Blutbestandteile wieder zusammengeführt und dem Spender über eine Cubitalvene am kontralateralen Arm zurückgegeben werden.

Für die Herstellung qualitativ hochwertiger Produkte sind konstante Strömungsverhältnisse in der Separationskammer nötig. Diese Strömungsverhältnisse werden dadurch erreicht, dass eine zusätzliche Pumpe den Hämatokrit des in die Zentrifugenkammer gelangenden Bluts durch Plasmarezirkulation konstant bei 37 % hält.

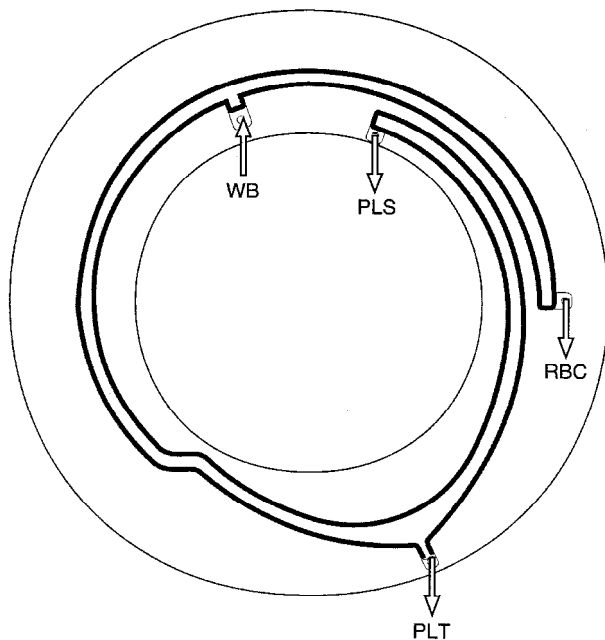
Die Steuerung der Pumpen und Ventile während der Zellseparation wird komplett automatisch durchgeführt. Eine Kamera detektiert bei jeder Umdrehung die Trenngrenze zwischen den lichtundurchlässigen zellulären Bestandteilen und dem lichtdurchlässigen Plasma in der Zentrifugenkammer. Abweichungen werden durch Veränderung der Plasmaflussrate kompensiert.

Nach einer kurzen Verweildauer in der Zentrifuge werden die Thrombozyten aus der Zentrifugenkammer in einen Lagerungsbeutel gepumpt und dort gesammelt. Das Verfahren wird beendet sobald der gewünschte Ertrag an Thrombozyten erreicht wurde. Die Dauer der Separation ist vom Thrombozytengehalt im Spenderblut abhängig (Moog, Zeiler, Heuft, Stephan, Fischer, Kretschmer, Rodel-Spieker, Strasser, Zingsem, 2003).

Tabelle 2-2: Parameter am Zellseparator

Basislösung	0,9% NaCl
Antikoagulans	ACD-A: Natriumcitrat 22,0 g/L Zitronensäure 7,3 g/L Glucose-Monohydrat 24,5 g/L Aqua ad iniectabilia ad 1000 ml
Zentrifugendrehzahl	2200U/min
Trenngrenzenposition	31

Abbildung 2-1: Schematisch dargestellte Separationskammer C5 nach Fresenius HemoCare 2001



Legende: PLS = thrombozytenarmes Plasma; RBC = Erythrozyten, WB = Vollblut; PLT = Thrombozyten (thrombozytenreiches Plasma)

Nach Beendigung der Zellseparation wurde das Thrombozytapheresekonzentrat vom Set entfernt und 30 min bei Raumtemperatur ruhen gelassen. Anschließend wurde es gewogen (Waage: Satorius[®]) und danach auf dem Flachbettagitator (Firma: Helmer) bei 30 horizontalen Schüttelbewegungen pro Minute bei Raumtemperatur gelagert.

2.4 Berechnung der Separationseffizienz

Die Berechnung der Separationseffizienz erfolgte nach der Formel:

$$\frac{\text{Gesamtthrombozytengehalt im Thrombozytapheresekonzentrat (x 10}^{11}\text{) x 100}}{(\text{Thrombozytenzahl im Spenderblut vor der Apherese (x 10}^{11}\text{/L) + Thrombozytenzahl im Spenderblut nach der Apherese (x 10}^{11}\text{ L) / 2 x prozessiertes Blutvolumen (ml)}}$$

2.5 Probenentnahme

2.5.1 Proben von den Spendern

Vor und nach der Zellseparation wurde den Spendern durch Punktion einer Cubitalvene Blut in jeweils eine 3,2 ml EDTA Monovette (Sarstedt[®]), eine 5 ml und eine 10 ml Citratmonovette (Sarstedt[®]) entnommen.

Das als Antikoagulans verwendete Citrat wurde im Verhältnis von 9 Teilen Blut und einem Teil Natriumcitrat (0,11 mol/L) gemischt, wie es für gerinnungsphysiologische Untersuchungen allgemein gebräuchlich ist (Dörer 2001).

2.5.2 Proben aus den Thrombozytapheresekonzentraten

Die Probenentnahme aus den Thrombozytapheresekonzentratbeuteln erfolgte über einen pyrogenfreien, sterilen Verbindungsdorn mit Injektionsanschluss (Firma Baxter). Dieser wurde vor und nach jeder Entnahme mit Kodan[®] Tinktur forte sorgfältig desinfiziert. Bei der Probenentnahme wurde darauf geachtet eine artifizielle Thrombozytenaktivierung durch hohe Strömungsgeschwindigkeit und Turbulenzen zu vermeiden.

Die Probenentnahmen am Herstellungstag, sowie am 3. und 5. Tag nach der Herstellung wurden immer zur gleichen Uhrzeit (13 Uhr) durchgeführt. Am Herstellungstag verblieb das Präparat nach der Herstellung zunächst 2 h auf dem Flachbettagitator. Während dieser Zeit konnten sich bei der Herstellung des Präparats entstandene Thrombozytenaggregate wieder lösen. Anschließend wurden die Proben entnommen.

Pro Untersuchungstag wurden jeweils 5 ml Thrombozytapheresekonzentrat in 2 Polystyrolröhrchen und 2 ml Thrombozytapheresekonzentrat einem PICO[™]

Probennehmer (Firma Radiometer Copenhagen; enthält 80 IU Lithium/ Natrium-Trocken-Heparin) entnommen.

Um artifizielle pH-Verschiebungen durch Gasaustausch zu vermeiden, wurden die Probenröhrchen nach dem Befüllen sofort verschlossen.

2.6 Methodenüberblick

2.6.1 Untersuchungen aus Spenderblut

Die folgenden Tabellen stellen alle Untersuchungen dar, die aus dem vor und nach der Zellseparation gewonnenem Spendervollblut erfolgten.

Tabelle 2-3: Untersuchungen aus Vollblut, dass vor der Zellseparation gewonnen wurde

Spender vor Separation	
Untersuchungsmaterial	Untersuchung
3,2 ml EDTA-Blut	Zählhämatologie am Sysmex
5 ml Citratblut	Durchflußzytometrie PFA 100 Messung
10 ml Citratblut	Thrombozytenaggregation

Tabelle 2-4: Untersuchungen aus Vollblut, dass nach der Zellseparation gewonnen wurde

Spender nach Separation	
Untersuchungsmaterial	Untersuchung
3,2 ml EDTA-Blut	Zählhämatologie am Sysmex
5 ml Citratblut	Durchflußzytometrie
10 ml Citratblut	Thrombozytenaggregation

Das nach den Untersuchungen in den Citratmonovetten verbleibende Blut wurde scharf abzentrifugiert (Zentrifuge: Heraus Instruments, 1984). Das nun gewonnene, sich im Überstand befindende plättchenarme Plasma (PAP) wurde vorsichtig abgehoben, in Eppendorfhütchen gefüllt und bei -70°C eingefroren.

2.6.2 Untersuchungen aus dem Thrombozytapheresekonzentrat

Die folgende Übersicht gibt einen Überblick über alle Untersuchungen, die in dieser Arbeit am Thrombozytapheresekonzentrat angewandt wurden.

Tabelle 2-5: Überblick über die am Thrombozytapheresekonzentrat durchgeführten Untersuchungen am Herstellungstag, sowie am 3. und 5. Tag nach Herstellung

Untersuchung	Herstellungstag	3. Tag nach Herstellung	5. Tag nach Herstellung
Gewichtsermittlung	✓		
Swirling	✓	✓	✓
Zellzählung	Thrombozyten	✓	✓
	Erythrozyten	✓	
	Leukozyten	✓	
Stoffwechselfparameter (LDH, Laktat, pH, pCO ₂ , Glukose)	✓	✓	✓
Aggregation	✓	✓	✓
Durchflußzytometrie	✓	✓	✓
Morphologie	✓	✓	✓

Legende: ✓= Untersuchung wurde durchgeführt

2.6.3 Herstellung von plättchenarmen Plasma (PAP) aus Thrombozytapheresekonzentrat

An jedem Untersuchungstag wurden zirka 8 ml des Thrombozytapheresekonzentrats 10 min bei 3000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert (Zentrifuge: Heraeus Instruments, 1984). Der Überstand (PAP) wurde abpipetiert und zur Einstellung der Plättchenanzahl in den Aggregationsmessungen verwendet. An jedem Untersuchungstag wurden außerdem 4 ml PAP bei -70°C eingefroren.

2.7 Zellzählung

2.7.1 Automatische Zellzählung

Die Bestimmung des Blutbildes der Spenderblutproben vor und nach der Zellseparation, sowie die Bestimmung der Thrombozytenzahl im Thrombozytapheresekonzentrat wurde mit dem automatisierten Zählgerät Sysmex K-1000 (TOA Medical Electronics Company, Kobe, Japan) durchgeführt.

2.7.2 Material und Reagenzien

Material : Sysmex K-1000

Reagenzien: Cellpack (Verdünnungsmittel)

Cellclean (Detergenz)

Lysemittel: Stromatolyser-3WP; Stromatolyser-C

Qualitätskontrolle: Sysmex Eightcheck-3WP

2.7.3 Mikroskopische Zellzählung

Die Leukozyten- und Erythrozytenzahlen in den Thrombozytapheresekonzentraten wurden jeweils am Herstellungstag mikroskopisch bestimmt.

2.7.3.1 Mikroskopische Zellzählung Erythrozyten

2.7.3.1.1 Material und Geräte:

Neubauer-Kammer

Mikroskop (Carl Zeiss, Jena) mit 10er Objektiv

HAYEM'sche Lösung (Merck, Artikel-Nummer: 1.09260)

Feuchte Kammer

Rollagitator

Eppendorfhütchen

2.7.3.1.2 Durchführung

Die zu messende Probe wird in einem Eppendorfhütchen 1:4 mit HAYEM'scher Lösung verdünnt. Nachdem die Suspension gut durchmischt worden ist, 10 min geruht hat und anschließend 15 min auf dem Rollagitator verbracht hat, wird die Neubauer-Kammer mit 2 mal 10 µl der Suspension beschickt.

Nach 10 min Sedimentationszeit erfolgt das Auszählen von 5 Gruppenquadranten unter dem Mikroskop mit dem 10er Objektiv.

Ist die Anzahl der gezählten Zellen kleiner 10 oder größer 30 wird eine weitere Kammer ausgezählt.

Zur Berechnung der Erythrozytenzahl (bei Auszählung von 5 Gruppenquadranten) gilt folgende Formel:

$$\text{Erythrozyten}/\mu\text{l Probe} = \text{gezählte Erythrozyten} \times 200$$

Die untere Nachweisgrenze für dieses Verfahren liegt bei 200 Erythrozyten/ μl .

2.7.3.2 Mikroskopische Zellzählung Leukozyten

2.7.3.2.1 Material und Geräte:

TÜRKSche Lösung (Merck, Artikel-Nummer: 1.09277.0500)

Mikroskop (Carl Zeiss, Jena) mit 20er Objektiv

Nageottekammer

Rollagitator

Feuchte Kammer

Eppendorfhüttchen

2.7.3.2.2 Durchführung

100 μl der Probe (siehe 2.5.2) werden zunächst in einem Eppendorf Hütchen 10 min auf dem Rollagitator gut durchmischt und dann mit 400 μl TÜRKScher Lösung aufgefüllt. Die verdünnte Probe wird nochmals gründlich auf dem Probenroller durchmischt. Anschließend wird die Nageottekammer beschickt. Zum Sedimentieren der Leukozyten wird die Nageottekammer für 10-30 min in die feuchte Kammer gelegt. Die Auszählung erfolgt unter dem Mikroskop mit dem 20er Objektiv. Unter Fokussierung des Zählnetzes werden die Leukozyten reihenweise ausgezählt. Sofern in maximal 40 Reihen weniger als 10 Leukozyten gezählt werden, wird ein komplettes zweites Zählnetz ausgezählt.

Zur Berechnung der Leukozytenanzahl gilt folgende Formel:

$$\text{Leukozytenzahl}/\mu\text{l Probe} = \frac{\text{gezählte Zellen} \times \text{Verdünnung}}{\text{Gemessenes Volumen}}$$

Ein Zählnetz, das entspricht 40 Reihen, misst einen Inhalt von 50 μl .

Die Nachweisgrenze dieser Methode liegt bei Auszählung von 2 Zählnetzen bei 0,05 Zellen pro μl der unverdünnten Probe.

2.8 Platelet Function Analyser

Die Überprüfung der ASS-Einnahme, bzw. der Ausschluss einer anderweitigen Thrombozytenfunktionsstörung erfolgte an einer Citratblutprobe mit dem PFA-100™ (Dade Behring). Dieses in vitro Analysensystem ist geeignet Thrombozytenfunktionsstörungen zu erkennen (Kretschmer *et al.* 1989; Kundu *et al.* 1995; Harrison *et al.* 2002). Zum Nachweis der durch ASS induzierten Thrombozytenfunktionsstörung wurden die mit Kollagen/ Epinephrin beschickten Messzellen eingesetzt (Marshall *et al.* 1997; Harrison *et al.* 1999). Marshall *et al.* (Marshall *et al.* 1997) beschrieben, unter Anwendung von Epinephrin als Agonisten, statistisch signifikante Verlängerungen der Verschlusszeit nach ASS-Einnahme bei gesunden Probanden.

Der PFA-100™ zeichnet sich neben einer hohen Sensitivität für Thrombozytenfunktionsstörungen auch durch eine hohe Spezifität für regelrechte Thrombozytenfunktionen aus (Mammen *et al.* 1998).

2.8.1 Funktionsweise

Das Gerät simuliert die Gerinnungsvorgänge an einer verletzten Kapillare. Dafür wird Citratblut aus einer Einmalmesszelle über eine Stahlkapillare bis zu einer perforierten, mit Kollagen beschichteten Membran angesaugt. Der Durchmesser der Appertur beträgt 147 µm. Die Membran ist mit einem Thrombozytenaggreganz benetzt. Dabei kann zwischen dem vom Hersteller angebotenen Epinephrin-Bitartrat (10 µg) und Adenosin Diphosphat (50 µg) gewählt werden.

Gemessen wird der initiale Blutfluss (d.h. Geschwindigkeit des Blutflusses zu Beginn der Messung), die Zeit bis zum Verschluss der Membranapperturporen durch den Thrombozytenpfropf (Verschlusszeit) und das Blutvolumen, das bis zu diesem Zeitpunkt die Kapillare durchflossen hat (Blutungsvolumen BV). Diese Parameter werden während der Messung in einem Diagramm des Blutflusses gegen die Zeit aufgetragen. Der integrierte Nadeldrucker gibt diese Daten, sowie die, über eine Tastatur eingegebene, Probenidentifikation aus.

2.8.2 Reagenzien

Dade® PFA Messzelle Kollagen/ Epinephrin

O-Ring Reinigungspad

Isopropanol

2.8.3 Durchführung

Vor Beginn der Messungen wurden die, bei 7°C gelagerte, Einmalmesszelle auf Raumtemperatur gebracht. Danach wird die Siegelfolie entfernt und die Messzelle wird in die Kassette an Position A gesteckt. Nach mehrmaligem, vorsichtigem Kippen der Citratmonovette werden 800 µl Vollblut blasenfrei in die Messzelle pipettiert.

Anschließend werden Messzelle und Kassette im Gerät platziert. Mit Betätigen der Funktionstaste „Test“ beginnt der Testlauf. Während der 3-minütigen Inkubationszeit erfolgte die Eingabe der Probenidentifikationsnummer in das Gerät. Zu Beginn jedes Arbeitstages wurde, als Teil der Routinequalitätskontrolle, der vom Hersteller vorgeschlagene „Selbsttest“ ausgeführt.

2.8.4 Auswertung

Zur Auswertung dieser Testergebnisse wurden die im Institut für Transfusionsmedizin und Hämostaseologie von Möller (Möller 2004) ermittelten Normalwerte zugrunde gelegt.

2.9 Thrombozytenaggregation

Zur Messung der Thrombozytenaggregation wurde die turbidimetrische Methode angewandt. Diese Methode misst die Lichttransmission eines waagrecht zur Flüssigkeit einfallenden Lichtstrahls (Mitchell *et al.* 1994). Dabei besitzt PAP die größte Durchlässigkeit für Licht (100 %) und plättchenreiches Plasma (PRP) die geringste Durchlässigkeit (0 %).

Nach Zugabe eines Aggreganz zur plättchenreichen Suspension lagern sich funktionsfähige Thrombozyten zusammen (aggregieren). In Abhängigkeit vom Ausprägungsgrad der Aggregatbildung klart die Zellsuspension auf und die Transmission nimmt zu (Born *et al.* 1963). Gemessen wird die, in Prozent angegebene, Transmissionsdifferenz vor und nach der Aggreganzzugabe.

Die Messung der Thrombozytenaggregation erfolgte aus den, vom Spender vor und nach der Thrombozytenapherese gewonnenen, Citrat-Blutproben, sowie aus den Thrombozytapheresekonzentratproben.

Das Aggregationsergebnis erteilt Auskunft über die Funktionstüchtigkeit der Thrombozyten, ist aber auch von methodischen Faktoren wie Temperatur, pH-Wert, Thrombozytenzahl und Geschwindigkeit des Rührvorganges abhängig (Patscheke *et*

al. 2000). Daher wurden die Untersuchungen unter Standardisierung der genannten Faktoren durchgeführt.

2.9.1 Materialien und Geräte

Platelet Aggregation Profiler, Modell PAP-3 (Bio Data Corporation/ Hatboro)

Paraflim (American National Can™)

Aggreganzien (s.u.)

0,1 M NaOH

0,1 M HCl

Silikonisierte Glasküvetten, 7,25 x 55 mm (Bio Data Corporation/ Hatboro)

Digital-pH-Meter (Knick, Hamburg)

Zentrifuge: Heraeus Instruments, 1984

Tabelle 2-6: Aggreganzien: Bezugsquelle und Endkonzentration

Aggreganz	Bezugsquelle	Endkonzentration
ADP 4	Sigma Diagnostics	10 µmol
ADP 2	Sigma Diagnostics	4 µmol
Kollagen	Sigma Diagnostics	4 µg/ml
Arachidonsäure	Mölab	500 µg/ml
Kollagen/ADP Mischaggreganz	Sigma Diagnostics	4 µg/ml/ 10 µmol

2.9.2 Durchführung der Aggregation aus Blut

2.9.2.1 Herstellung von PRP/ PAP

Nach der Blutentnahme ruhte das Citratblut zunächst für 30 min. Dann erfolgte eine erste, 15-minütige Zentrifugation (750 U/min ohne Bremse). Der Überstand (PRP) wurde vorsichtig abgehoben und in einem verschlossenen Polystyrolröhrchen aufbewahrt. Anschließend wurde die Citratmonovette ein zweites Mal zentrifugiert (10 min, 3000 U/min mit Bremse). Im Überstand befand sich nun PAP. Dieses wurde vorsichtig abgehoben und in ein weiteres Polystyrolröhrchen überführt. Die Thrombozytenzahl im PRP wurde mit dem Sysmex ermittelt und anschließend wurde, durch Mischen von PAP und PRP 2,5 ml einer Suspension mit einer Thrombozytenkonzentration von 250 000/µl hergestellt.

Anschließend ruhte die Thrombozytensuspension 30 min bei Raumtemperatur. Diese Zeit dient der Rückkehr aktivierter Thrombozyten in den Ruhezustand. Alle Proben

wurden vor der Messung mit 0,1 M NaCl oder 0,1 M HCl auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt.

2.9.2.2 Messen der Trübungsdifferenz

Zur Ermittlung der maximalen Transparenz (Standard = 100 %) im Zweikanal - Aggregometer dienten 250 µl PAP, in einem silikonisierten Glasröhrchen.

Anschließend wurde ein silikonisiertes Glasröhrchen mit 225 µl des eingestellten PRPs (und einem magnetischen Rührstäbchen) in den Strahlengang gebracht.

Die Induktion der Aggregation erfolgte durch Zugabe von 25 µl des frisch aufgetauten Aggreganz. Die Änderung der Transmission wurde über 7 min unter ständigem Rühren gemessen.

2.9.3 Durchführung der Aggregation aus Thrombozytapheresekonzentrat

Die Probe aus dem Thrombozytapheresekonzentrat wurde mit autologem PAP, dessen Herstellung der Vorgehensweise Punkt 2.6.3 entspricht, auf eine Konzentration von 250.000 Thrombozyten/µl eingestellt.

Die Suspension wurde verschlossen in einem Schnittger-Röhrchen aufbewahrt und mit 0,1 M NaCl oder 0,1 M HCl auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt.

Nach einer Ruhezeit von 30 min wurden 200 µl des PRP zur Messung in ein silikonisiertes Glasröhrchen gegeben.

Die weitere Verfahrensweise entspricht 2.9.2. Als Aggreganz wurde 50 µl eines frisch aufgetauten Mischaggreganzes verwendet. Dieses enthält im Ansatz 4 mmol/L ADP und 4 mg/ml Kollagen - im Verhältnis 1:1 gemischt.

2.9.4 Auswertung

Das Gerät stellt die Aggregation der Thrombozyten graphisch mittels einer Kurve dar. Die Berechnung der Aggregation erfolgt anhand der prozentualen Änderung der Transmission nach Zugabe des Aggreganz (Sigma Diagnostics 1994; Kolde 1995).

2.10 Durchflusszytometrie

Zur Bestimmung aktivierungsbedingter Veränderungen der Thrombozytenoberfläche wurden durchflusszytometrische Messungen durchgeführt. So konnten Änderungen der Glykoproteinzusammensetzung auf der Thrombozytenoberfläche, die durch die Zellseparation, während der Lagerung der Thrombozyten oder nach Zugabe von Stimulanzen auftraten, gemessen und quantifiziert werden.

2.10.1 Aufbau und Funktionsweise

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie kann innerhalb sehr kurzer Zeit eine Vielzahl von Zellen auf Einzelzellniveau bezüglich ihrer biochemischen und physikalischen Eigenschaften charakterisiert werden. Hierfür werden Einzelzellen (ggf. nach Färbung mit einem fluorochrom markierten Antikörper) in Suspension an einem Laser (fokussiertem monochromen Lichtstrahl) vorbeigeführt. Sowohl die Streuung und Brechung des Laserstrahles, als auch die Lichtemission durch die Fluorochrome nach Anregung durch das Laserlicht können gemessen und quantifiziert werden (Eckhardt 1991).

Das in dieser Arbeit verwendete System besteht aus einer Messeinheit (FACScan) und der Workstation, dem Computer (Apple Macintosh Power PC) mit entsprechender Software (CELLQuest; Becton Dickinson, Heidelberg) zur Speicherung und Auswertung der Messdaten.

Die zu analysierende Zellsuspension wird mittels Überdruck durch eine Stahlkapillare in die Messkammer transportiert, in der es zur Vereinzelung der Zellen des Probenstroms („hydrodynamische Fokussierung“) und einer Beschleunigung des Zellstroms kommt. Anschließend passieren die Zellen einzeln den Analysepunkt, an dem sie durch den einfallenden Laserstrahl (Wellenlänge 488 nm) erfasst werden (Longobardi-Givan 1992). Trifft der Laserstrahl auf die Zelle, so wird der größte Teil des Lichts in Richtung des einfallenden Strahls gebeugt. Das so entstehende Streulicht erhält die Bezeichnung Forward Scatter (FSC) und gibt Auskunft über die Zellgröße. Die innere Struktur der Zelle (Zellgranularität und Membranfaltung) bricht und reflektiert das einfallende Licht des Lasers ebenfalls (Schmitz 1994). Dieses, als Side Scatter (SSC) bezeichnete Licht, wird rechtwinklig zum einfallenden Laserstrahl gemessen.

Trifft der Laserstrahl auf eine mit Fluorochrom markierte Zelle, so wird das vom entsprechenden Fluoreszenzfarbstoff emittierte Fluoreszenzlicht gemessen und lässt damit Rückschlüsse auf die Stärke der Markierung zu. In dieser Arbeit wurden als Fluorochrome FITC (Emissionsmaximum 525 nm, Absorptionsmaximum 488 nm) und PE (Absorptionsmaximum 488 nm, Emissionsmaximum 575 nm) verwendet.

2.10.1.1 Datenverarbeitung

Mit Hilfe des Datenverarbeitungsprogramm CellQuest werden die Daten am Computer ausgewertet. Dabei bieten sich zwei Darstellungsformen an. Das Histogramm, bei dem die Zahl der Zellen (Ordinate) gegen die Lichtintensität der betreffenden Einzelzelle (Abszisse) aufgetragen wird und das Punktehistogramm (Dot Plot). Der Dot Plot bietet als Zweiparameterdarstellung die Möglichkeit zwei Zelleigenschaften miteinander zu korrelieren.

2.10.1.2 Gating

Bei der Messung werden alle, sich in der Probe befindenden, Zellen als Punkt im Dot Plot Diagramm dargestellt. Im Rahmen dieser Arbeit sollen nur Thrombozyten hinsichtlich bestimmter Eigenschaften untersucht werden. Darum wurde nach Identifikation der Thrombozytenpopulation ein Software-Fenster um die Zellwolke der Thrombozyten gelegt. Diese Vorauswahl bestimmter Zellpopulationen oder Eigenschaften wird als „Gating“ bezeichnet und bietet die Möglichkeit einzelne Zellpopulationen zu markieren und unabhängig von anderen Zellen und Partikeln zu zählen (Nebe 1996).

Die Eingrenzung der Thrombozytenpopulation erfolgte in dieser Arbeit anhand der Expression des Thrombozytenmarkers CD41 und des FSC im Dot Plot Diagramm (Shattil *et al.* 1985; Nebe 1996).

Je 5000 sich in diesem Fenster befindende Thrombozyten wurden gezählt und für die weitere Auswertung herangezogen.

2.10.1.3 Voreinstellung am Gerät

Vor jedem Messtag wurden die Fluoreszenzeinstellungen des Geräts, die Detektoren und Photomultiplier mit CaliBRITE™ Beads und dem Software Pogramm FACScmp überprüft. Außerdem wurde mit Hilfe dieser CaliBRITE™ Beads die Sensitivität der Instrumente überprüft und das Instrumentensetting eingestellt.

2.10.2 Geräte, Antikörper und Chemikalien

FACSCalibur mit Cell Quest Software (Becton Dickinson, Heidelberg)

Falcon® 5 ml Rundbodenröhrchen, Polystyrol

PBS Phosphate Buffer Concentrate (Dade Behring); pH: 7,4

Bestehend aus:

NaCl:	137 mM
KCl:	2,6 mM
Na ₂ HPO ₄ :	8,0 mM
KH ₂ PO ₄ :	1,4 mM

PBS +1 % Foetal Bovine Serum (FBS), (GibcoBRL, Karlsruhe)

PBS +1 % Paraformaldehyd (PFA)

TRAP-6 (Bachem, Heidelberg) bestehend aus 6 Aminosäuren: Serin-Phenylalanin-Leucin-Leucin-Aginin-ASN; 0,1 mmol/L

CaliBRITE™3 Beads (Becton Dickinson, Heidelberg)

FACSLyse™ (Becton Dickinson, Heidelberg)

FACSScan™ (Becton Dickinson, Heidelberg)

FACSflow™ (Becton Dickinson, Heidelberg)

2.10.2.1 Antikörper

Zur Charakterisierung bzw. Erkennung der Thrombozyten wurden PE-konjugierte Antikörper gegen die thrombozytären Glykoproteine IIb/IIIa (CD 41) verwendet. Als Aktivierungsmarker wurden FITC-konjugierte Antikörper gegen p-Selectin (CD 62p) und Fibrinogen eingesetzt. Zusätzlich wurde eine FITC-konjugierte Isotypkontrolle zur Abgrenzung unspezifischer Antikörperbindung eingesetzt.

Tabelle 2-7: Verwendete Antikörper

Antigen	Klon	Konjugation	Bezugsquelle
CD 41	P2	PE	Coulter Immunotech
CD 62P	CLB-Thromb/6	FITC	Coulter Immunotech
Isotypkontrolle	IgG1	FITC	Coulter Immunotech
Anti-Fibrinogen	Chicken WL – 51	FITC	WAK Chemie

2.10.3 Durchführung

Gemessen wurden nicht stimulierte, fixierte Proben (A) und stimulierte, nichtfixierte Proben (B).

2.10.3.1 Messung der Vollblutproben vom Spender

Da bereits 10 min nach der Blutentnahme eine vermehrte Aktivierung der Thrombozyten nachweisbar ist (Shattil *et al.* 1985), erfolgte die Fixierung bzw. die Stimulierung der Thrombozyten innerhalb 5 min nach der Blutentnahme.

A - fixierte Probe

Die Fixierung von Thrombozyten erfolgte durch Zugabe von 0,1 ml PBS/ PFA zu 0,1 ml Citratblut, welches sich in einem silikonisiertem Reagenzglas befand. Anschließend wurde die Probe vorsichtig durchmischt und nach 15 min Inkubationszeit bei Raumtemperatur mit PBS/ FBS auf eine Thrombozytenzahl von 20.000/ μ l eingestellt. Von dieser Probe wurden 30 μ l in ein FALCON-Teströhrchen gegeben, in das zuvor die Antikörper vorgelegt wurden.

Tabelle 2-8: Pipettierschema nicht stimulierte, fixierte Probe (A)

Röhrchen	Probe A	Antikörper
1	30 μ l	10 μ l anti-CD 41(PE); 10 μ l Isotypkontrolle (FITC)
2	30 μ l	10 μ l anti-CD 41(PE); 5 μ l anti-CD 62p (FITC)
3	30 μ l	10 μ l anti-CD 41(PE); 5 μ l anti-Fibrinogen (FITC)

B - stimulierte Probe

Zur Herstellung einer Probe mit stimulierten Thrombozyten wurden zunächst 0,1 ml Citratblut mit PBS/ FBS auf eine Thrombozytenzahl von 20.000/ μ l eingestellt. Aus diesem Gemisch wurden 200 μ l entnommen und mit 100 μ l TRAP-6 für 10 min inkubiert. Anschließend erfolgt die Zugabe dieser Probe in die FALCON-Teströhrchen, in die zuvor entsprechend dem Pipettierschema Antikörper vorgelegt wurden.

Tabelle 2-9: Pipettierschema stimulierte, nichtfixierte Probe (B)

Röhrchen	Probe B	Antikörper
5	30 µl	10 µl anti-CD 41(PE); 10 µl Isotypkontrolle (FITC)
6	30 µl	10 µl anti-CD 41(PE); 5 µl anti-CD 62p (FITC)
7	30 µl	10 µl anti-CD 41(PE); 5 µl anti-Fibrinogen (FITC)

Die Proben wurden durch leichtes Schwenken der Teströhrchen (1-7) durchmischt und bei Raumtemperatur 10-15 min im Dunklen inkubiert. Während der Inkubationszeit wurden die Proben zweimal durch leichtes Schwenken durchmischt. Die Inkubation wurde durch die Zugabe von 0,5 ml kühl-schrankkalter PBS abgestoppt.

2.10.3.2 Messung der Proben aus den Thrombozytapheresekonzentraten

Da die Thrombozytenkonzentration im Thrombozytapheresekonzentrat deutlich höher als im Vollblut ist (ca. 1 100 000 Thrombozyten/µl), wurden die Proben aus den Thrombozytapheresekonzentraten in einem ersten Schritt mit zuvor hergestellten (siehe 2.6.3) autologem PAP 1:5 verdünnt. Die weitere Verfahrensweise entsprach der der Vollblutproben.

2.10.3.3 Messung der Proben

Die Messung der Proben am Durchflußzytometer geschah innerhalb von 1,5 Stunden nach deren Fertigstellung. Alle Messungen erfolgten mit der geringsten Flussrate.

2.11 Morphologie der Thrombozyten

In Abhängigkeit von ihrem Aktivierungszustand verändern Thrombozyten ihre Form, so dass anhand der morphologischen Beschreibung der Thrombozyten Rückschlüsse auf deren Qualität gezogen werden kann. Frische, ruhende Thrombozyten nehmen eine diskoide Form ein. Mit zunehmender Aktivierung ändern sie ihre Form, bilden Dendriten und schwellen zuletzt an (Ballons) (Kunicki *et al.* 1975, Wagner *et al.* 2002).

2.11.1 Material

Glutarydialdehydgemisch bestehend aus: 1 ml Glutrydialdehyd (25%) +
4 ml Phosphatpuffer (0,1 M; pH 7,2)

Objektträger, 76 x 26 mm (Menzel Gläser)

Deckgläschen (Menzel Gläser)

Parafilm (American National Can™)

Silikonisierte Glasröhrchen, 8,75 x 50 mm (Bio Data Corporation)

Phasenkontrastmikroskop (Firma: Leitz, Wetzlar)

Okular 16-mal

Filter 3; Phaco 3; Scheibe 3, Grünfilter

Ölimersion, 100 fache Vergrößerung

2.11.2 Durchführung

Ein Milliliter einer Thrombozytapheresekonzentratprobe wird mit zuvor gewonnenem autologem PAP (siehe 2.6.3) 1:10 verdünnt. Anschließend werden 500 µl des Gemisches in ein silikonisiertes Röhrchen gegeben, mit Parafilm verschlossen und für 60 min bei 37°C inkubiert. Nach Beendigung der Inkubationszeit, welche die Rückbildung präparationsbedingter thrombozytärer Reizformen ermöglicht, werden 20 µl des zur Fixierung dienenden Glutarydialdehydgemisches hinzu gegeben und vorsichtig gemischt. Anschließend werden auf 2 Objektträgern je 20 µl des hergestellten Gemisches gegeben, mit einem Deckgläschen verschlossen und für eine Zeit von mindestens 20 min in die feuchte Kammer, zum Sedimentieren, gelegt.

Das so gelagerte Präparat ist bis zu 12 h haltbar (Kunicki *et al.* 1975).

2.11.3 Auszählen und Auswertung

Es werden 2 mal 100 Zellen ausgezählt. Dabei unterscheidet man zwischen Diskoiden, Sphärozyten, Dendriten und Ballons.

Zur Bestimmung des Morphologie Score wird jede Zelle der hundert gezählten Zellen mit dem für ihre Gruppe geltenden Faktor multipliziert. Die erhaltenen Werte werden addiert (Kunicki *et al.* 1975).

Tabelle 2-10: Einteilung der Thrombozyten und Multiplikationsfaktor

Zellart	Beschreibung	Faktor
Diskoide	scheibenförmig, scharf begrenzt, glatt, maximal eine leichte Ausbuchtung	4
Sphärozyt	1-2 lang gezogene Ausläufer	2
Dendrit	mehrere Ausläufer, ausgebreiteter Thrombozyt, unscharfe Begrenzung	1
Ballon	sehr große wolkige Zelle unscharfer Begrenzung, funktionsuntüchtig	0

Normalwert nach Kunicki (Kunicki *et al.* 1975) am Herstellungstag je nach Methode: 340-370.

2.12 Stoffwechselfparameter

Die Änderung der Stoffwechselfparameter (pH, LDH, Laktat, Glucose, pCO₂) im Thrombozytapheresekonzentrat während der 5-Tages-Lagerung sind Ausdruck der Thrombozytenstoffwechsellage im Präparat (Bock *et al.* 1993). Darum wurden die folgenden, veränderlichen Größen an jedem Untersuchungstag gemessen.

2.12.1 pH

Niedrige pH-Werte im Thrombozytapheresekonzentrat entstehen vor allem durch anaeroben Stoffwechsel im Konzentrat (Ogawa *et al.* 1988). Sinkt der pH auf einen Wert < 6,8 schwellen die Thrombozyten an und verlieren ihre diskoide Form. Dieser Vorgang ist bis zu einem pH-Wert von 6,1 reversibel. Sinkt der pH-Wert noch weiter, so ist die Thrombozytenschädigung irreversibel und es resultiert eine verminderte Überlebenszeit der Thrombozyten (Solberg *et al.* 1986).

2.12.2 pCO₂

Bei der Energiegewinnung der Thrombozyten entstehen saure Stoffwechselprodukte, deren Akkumulation der Kohlendioxid-Bikarbonatpuffer verhindert. Das dabei gebildete CO₂ kann die gaspermeablen Lagerungsbeutel passieren und entweichen. Hohe Kohlendioxidpartialdrücke im Thrombozytapheresekonzentrat sprechen für einen ungenügenden Gasaustausch, begründen niedrige pH-Werte und erteilen Auskunft über die Stoffwechsellage im Präparat (Bock *et al.* 1993; Mitchell *et al.* 1994).

2.12.3 Laktat

Laktat entsteht aus Pyruvat und ist ein Stoffwechselprodukt der anaeroben Glykolyse. Reguliert wird die Laktatbildung von der Pyruvatkonzentration, dem zellulärem Redoxstatus und der aktuellen Wasserstoffionenkonzentration. Das anfallende Laktat kann über den Cori-Zyklus sauerstoffabhängig oxidiert (Laktatdehydrogenase) und somit weiterverarbeitet werden (Koolmann *et al.* 1998). Eine Erhöhung der Laktatspiegels weist auf einen vermehrten Anfall oder eine verminderte (infolge von Sauerstoffmangel) Weiterverarbeitung hin. Während der Lagerung von Thrombozytapheresekonzentraten wird in der Regel ein Laktatanstieg von 2,5 mM pro Tag ermittelt (Bertolini *et al.* 1993). Fällt dieser Anstieg stärker aus, so ist das ein Hinweis auf eine schlechte Stoffwechsellage und eine schlechte Sauerstoffversorgung im Thrombozytapheresekonzentrat.

2.12.3.1 Durchführung

Die Bestimmung von pH, Laktat, pCO₂ erfolgte am Radiometer ABL 700. Hierzu wurden je 2 ml Thrombozytapheresekonzentrat in den PICOTM Aspirationsnehmer (Firma Radiometer Copenhagen) gefüllt. Um Wertverfälschungen (besonders pO₂ und pCO₂) zu vermeiden wurden in der Probe enthaltene Luftblasen vorsichtig entfernt. Die Messung der Parameter fand unmittelbar nach der Probenentnahme statt.

2.12.4 Laktatdehydrogenase

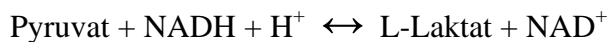
Die Laktatdehydrogenase (LDH) befindet sich als zytoplasmatisches Enzym in allen Körperzellen, in denen sie die reversible Oxidation von Milchsäure zu

Brenztraubensäure katalysiert. Bei Zelluntergängen und Zellschäden tritt das Enzym vermehrt ins Plasma über und Aktivitätssteigerungen sind messbar.

1993 zeigten Bock et al. einen deutlichen LDH-Anstieg im Verlauf der Lagerung von Thrombozytapheresekonzentraten (Bock *et al.* 1993). Der im Überstand gemessene LDH-Wert der Thrombozytapheresekonzentrate gilt als Marker für Thrombozytenschäden und -untergänge.

2.12.4.1 Testprinzip

Die Laktatdehydrogenase katalysiert die NADH₂- abhängige Reduktion von Pyruvat zu Laktat.



Gemessen wird (bei 37°C) die Geschwindigkeit der Abnahme von NADH₂, die sich proportional zur LDH-Aktivität verhält.

2.12.4.2 Durchführung

Der gewonnen Überstand wurde in eine 4,7 ml Li-Heparin-Gel Monovette (Firma Sarstedt) gefüllt.

Die Laktatdehydrogenasebestimmung erfolgte im Labor der Klinischen Medizin der Universitätsklinik Giessen und Marburg, Standort Marburg am automatischen Analyser Hitachi 917 der Firma Roche Diagnostik GmbH.

2.13 Swirling

Treffen Lichtstrahlen auf kolloidale Lösungen, so wird der Gang der Lichtstrahlen sichtbar. Dieses, nach dem englischen Physiker und Entdecker benannte, Tyndallphänomen ist auch bei Thrombozytapheresekonzentraten intakter Thrombozyten vorhanden. Verlieren die Thrombozyten ihre diskoidale Form, so lässt sich auch der Tyndalleffekt zunehmend weniger beobachten. Bertolini et al. beschrieben einen Zusammenhang zwischen pH-Wert und Swirling. Befand sich der pH zwischen 6,7 und 7,5 so fanden sie bei 94% aller Thrombozytenkonzentrate Swirling (Bertolini *et al.* 1996). Über- oder unterschritt der pH diese Werte, so konnte bei einem Großteil der Präparate kein Tyndalleffekt mehr nachgewiesen werden.

Da große multizentrische Untersuchungen der BEST working party dem Swirlingtest die Eignung zur Routinequalitätskontrolle bestätigt haben, wurde er auch in dieser Arbeit als einfacher, visueller Test an jedem Untersuchungstag durchgeführt

(Bertolini *et al.* 1994). Dabei wurde zwischen dem Vorhandensein des ausgeprägten Swirlingphänomens (2fach positiv), einer Zwischenstufe (positiv) und dem Fehlen des Swirlingphänomens (negativ) unterschieden.

2.14 Statistische Methoden

Insgesamt wurden bei 10 Spendern jeweils 2 Thrombozytapheresen durchgeführt. Eine Apherese erfolgte nach ASS-Einnahme am Abend vor der Spende (Gruppe A) und eine ohne vorherige ASS-Einnahme (Gruppe B). Zur Darstellung und Auswertung der Daten wurden die Programme Microsoft Office Standard Edition, Excel 2003 (Microsoft Corporation, Redmond, USA) und SPSS 11.5.1. für Windows (SPSS Inc. Chicago, USA) verwendet.

Zur Beschreibung der Daten wurden zunächst deskriptive Maßzahlen: Median, Minimum, Maximum, Mittelwert, Standardabweichung verwendet. Um signifikante Unterschiede zwischen den beiden untersuchten Gruppen (mit ASS/ ohne ASS) zu untersuchen wurde der Vorzeichenrangtest nach Wilcoxon für zwei abhängige Stichproben benutzt.

Bei Erreichen eines Signifikanzniveaus von $p \leq 0,05$ wurde das Ergebnis als signifikant bewertet. Eine Korrektur für die Durchführung multipler Tests wurde nicht durchgeführt.

3 Ergebnisse

Insgesamt wurden bei 10 Spendern jeweils 2 Thrombozytapheresen durchgeführt. Eine Apherese erfolgte nach ASS-Einnahme am Vorabend der Spende (Gruppe A), die andere ohne vorherige ASS-Einnahme am Spendevorabend (Gruppe B). Die Kennzeichnung der beiden Gruppen A und B wird im Folgenden sowohl für die vergleichenden Untersuchungen der Spender, als auch der Thrombozytapheresekonzentrate verwendet.

3.1 Kontrolle der ASS-Einnahme

Die ASS-Einnahme wurde mittels der am PFA ermittelten Verschlusszeiten kontrolliert. Eine Verlängerung der Verschlusszeit galt als Ausdruck der durch ASS induzierten Thrombozytenfunktionsstörung („Aspirineffekt“) und diente als Indikator für eine stattgefundene ASS-Einnahme. Die ASS-Einnahme konnte in jedem Fall entsprechend der vorgesehenen Randomisierung der Spender bestätigt werden.

Tabelle 3-1: Auflistung der am PFA ermittelten Verschlusszeiten. Der obere Grenzwert für die Verschlusszeit lag bei 300 sek.

Spender	Verschlusszeit in Sekunden	
	Gruppe A	Gruppe B
1	164	105
2	155	83
3	192	159
4	>300	105
5	>300	95
6	>300	92
7	>300	149
8	135	99
9	149	92
10	>300	82

Tabelle 3-2: Mittelwerte der am PFA ermittelten Verschlusszeiten

	Gruppe	
	A	B
	Mittelwert \pm SD	Mittelwert \pm SD
Verschlusszeit (s)	229,5 \pm 75,65	106,1 \pm 26,51

3.2 Spenderblutbild und Separationsverlauf

In Bezug auf die, die Separation beeinflussenden Parameter Thrombozytenzahl, Hämoglobingehalt und Hämatokrit im Spenderblut gab es weder vor noch nach der Apherese statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen (Wilcoxon-Test).

Tabelle 3-3: Separationsbeeinflussende Blutparameter

	Gruppe	
	A	B
	Mittelwert \pm SD	Mittelwert \pm SD
Hb-vor (g/L)	146,50 \pm 14,39	146,80 \pm 10,89
Hb-nach (g/L)	140,20 \pm 15,94	142,50 \pm 12,80
PLT-vor (/nl)	256,70 \pm 61,60	251,00 \pm 68,12
PLT-nach (/nl)	194,30 \pm 57,45	189,00 \pm 68,02
Hämatokrit-vor (L/L)	0,42 \pm 0,04	0,42 \pm 0,03
Hämatokrit-nach (L/L)	0,41 \pm 0,05	0,41 \pm 0,04

Auch in Bezug auf Separationsdauer, Separationseffizienz und prozessiertem Blutvolumen ergaben sich im Wilcoxon-Test keine signifikanten Differenzen zwischen Gruppe A (ASS) und B.

Tabelle 3-4: Separationsparameter

	Gruppe	
	A	B
	Mittelwert \pm SD	Mittelwert \pm SD
Separationsdauer (min)	53,3 \pm 14,8	56,7 \pm 20,4
Separationseffizienz (%)	53,1 \pm 4	52,7 \pm 4
Proz. Blutvolumen (ml)	2845,5 \pm 586,5	3137,7 \pm 1033,7
ACD-Gehalt im TKZ (ml)	59,50 \pm 7,79	55,00 \pm 13,56

3.3 Funktionelle Untersuchungen der Spenderblutproben vor und nach der Apherese

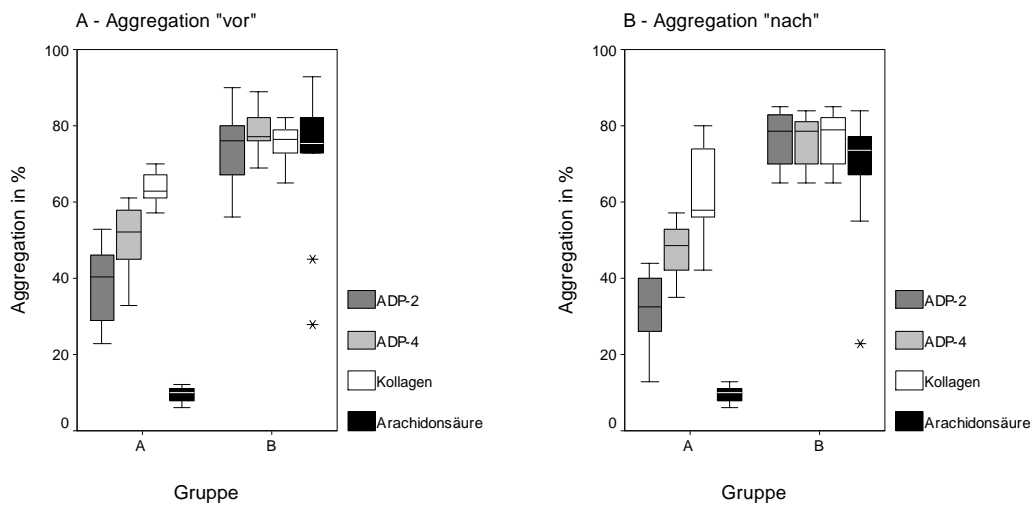
3.3.1 Thrombozytenaggregation

Hinsichtlich der Thrombozytenaggregation zeigte sich in allen Fällen eine signifikant verminderte Aggregation durch die ASS-Einnahme bei allen verwendeten Aggreganzien ($p < 0,005$). Die Apherese jedoch führte in keiner der Gruppen zu einer signifikanten Veränderung der Thrombozytenfunktion im Vergleich der „prä“ und „post“ Werte.

Tabelle 3-5: Aggregation aus Blut vor und nach der Thrombozytapherese

Aggreganz	Vor der Apherese Mittelwert (%) \pm SD		Nach der Apherese Mittelwert (%) \pm SD	
	Gruppe A	Gruppe B	Gruppe A	Gruppe B
ADP (4 μ mol)	39 \pm 10	73 \pm 10	34 \pm 14	77 \pm 8
ADP (10 μ mol)	50 \pm 9	77 \pm 7	48 \pm 13	76 \pm 6
Kollagen (4 μ g/ml)	63 \pm 6	76 \pm 5	62 \pm 12	77 \pm 7
Arachidonsäure (500 μ g/ml)	10 \pm 2	70 \pm 19	10 \pm 2	70 \pm 19

Abbildung 3-1: Aggregation vor (A) und nach (B) der Thrombozytapherese



Die waagerechte Linie in der Box gibt den Wert des Medians an. Das obere und das untere Quartil bilden die Begrenzung der Box, von denen ausgehend als Whisker-Enden, Maximum und Minimum dargestellt werden. Das Aggregationsvermögen der Thrombozyten der Gruppe A ist mit allen Aggreganzen gegenüber dem Aggregationsvermögen der Thrombozyten der Gruppe B statistisch signifikant eingeschränkt ($p < 0,005$). $n = 10$; * = Extremwert

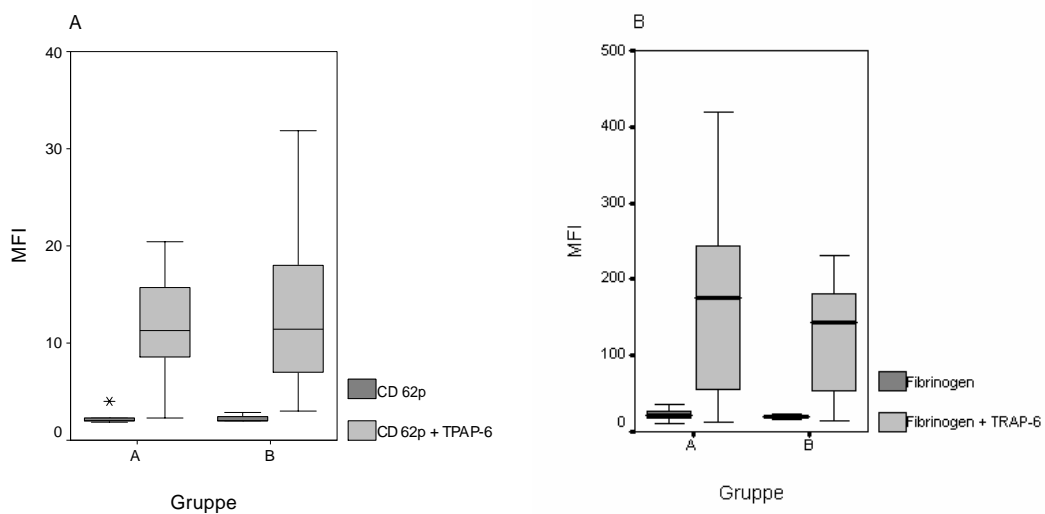
3.3.2 Durchflusszytometrie

Die durchflusszytometrisch ermittelte Expression der thrombozytären Oberflächenantigene CD 41, CD 62p und die Fibrinogenbindefähigkeit (d.h. die Aktivierung) des Glykoproteinrezeptors IIb/IIIa zeigte sich von der ASS-Einnahme unbeeinflusst. Weder in den vor der Thrombozytapherese abgenommenen Blutproben noch in den nach der Apherese gewonnenen Blutproben fanden sich zwischen Gruppe A (ASS) und Gruppe B signifikante Unterschiede in der Expression von CD 41 und CD 62p sowie der Fibrinogenbindung. Innerhalb der Gruppen bestand in Gruppe A ebenso wie in Gruppe B eine signifikante Erniedrigung der CD 41-Expression nach dem Aphereseverfahren (Gruppe A: $p = 0,009$; Gruppe B: $p = 0,005$). Die Apherese führte jedoch weder in Gruppe A noch in Gruppe B zu signifikanten Veränderungen in der Expression des Aktivierungsmarkers CD 62p und der Fibrinogenbindefähigkeit. Auch die Stimulierbarkeit der Thrombozyten mit TRAP-6 zeigte sich von der Apherese sowie von der ASS-Einnahme unbeeinflusst.

Tabelle 3-6: Expression von CD 41, CD 62 und Fibrinogenbindefähigkeit auf der Thrombozytenoberfläche vor und nach der Thrombozytapherese, nativ und nach Stimulation mit TRAP-6 (MFI = Mittlere Fluoreszenzintensität)

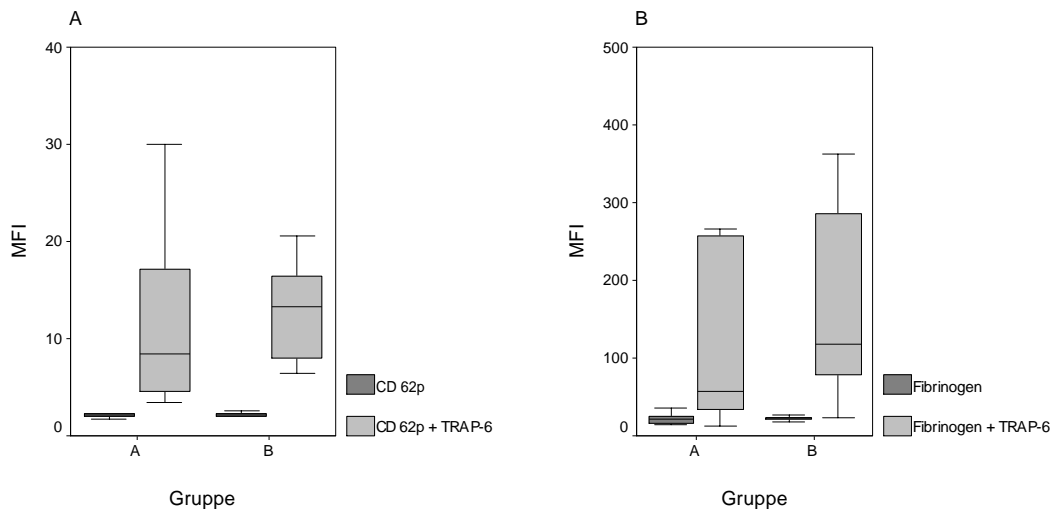
	Vor der Apherese MFI \pm SD		Nach der Apherese MFI \pm SD	
	Gruppe A	Gruppe B	Gruppe A	Gruppe B
CD 41	537 \pm 140	474 \pm 76	438 \pm 99	407 \pm 72
CD 62p	2,27 \pm 0,6	2,2 \pm 0,3	2,43 \pm 0,8	2,2 \pm 0,2
CD 62p + TRAP-6	16,3 \pm 17,2	13,6 \pm 8,9	14,7 \pm 15,0	14,3 \pm 6,8
Fibrinogen	23,7 \pm 5,7	20,0 \pm 2,7	21,9 \pm 6,4	22,7 \pm 3,3
Fibrinogen + TRAP-6	203 \pm 171	125 \pm 80	161 \pm 193	169 \pm 115

Abbildung 3-2: Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) des Aktivitätsmarkers CD 62p (A) und Fibrinogenbindefähigkeit des GPIIb/IIIa (B) vor der Thrombozytapherese



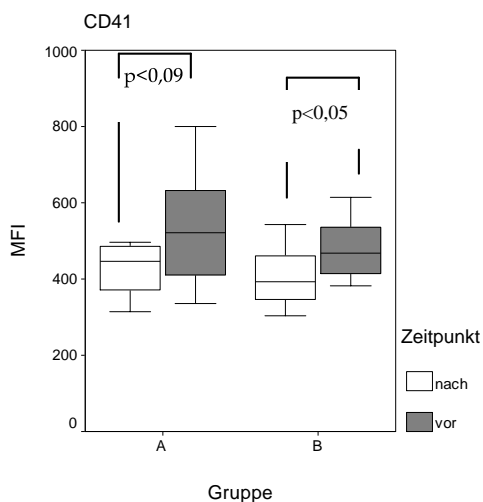
Die waagerechte Linie in der Box gibt den Wert des Medians an. Das obere und das untere Quartil bilden die Begrenzung der Box, von denen ausgehend als Whisker-Enden, Maximum und Minimum dargestellt werden. Zwischen Gruppe A (ASS) und Gruppe B gibt es keine signifikanten Unterschiede. $n = 10$; * = Extremwert

Abbildung 3-3: Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) des Aktivierungsmarkers CD 62p (A) und Fibrinogenbindefähigkeit des GPIIb/IIIa (B) nach der Thrombozytenapherese



Die waagerechte Linie in der Box gibt den Wert des Medians an. Das obere und das untere Quartil bilden die Begrenzung der Box, von denen ausgehend als Whisker-Enden, Maximum und Minimum dargestellt werden. Zwischen Gruppe A (ASS) und Gruppe B gibt es keine signifikanten Unterschiede. $n = 10$; * = Extremwert

Abbildung 3-4: Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der CD 41-Expression auf der Thrombozytenoberfläche vor und nach der Thrombozytenapherese



Die Abbildung 3-4 zeigt die Abnahme der CD 41 Expression auf der Thrombozytenoberfläche nach der Zellseparation, die unabhängig von der ASS-Einnahme in beiden Gruppen stattfand.

Die waagerechte Linie in der Box gibt den Wert des Medians an. Das obere und das untere Quartil bilden die Begrenzung der Box, von denen ausgehend als Whisker-Enden, Maximum und Minimum dargestellt werden. $n = 10$; * = Extremwert

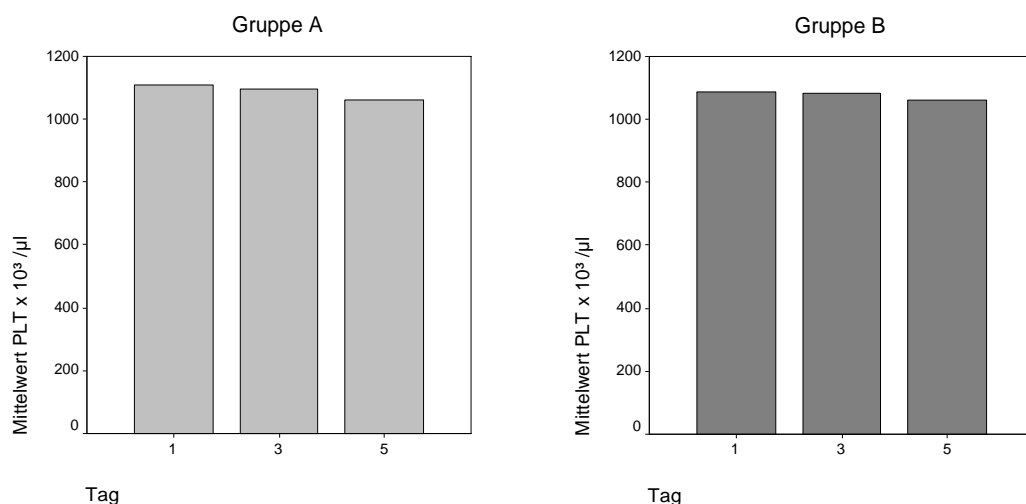
3.4 Untersuchungen der Thrombozytapheresekonzentrate

Die Thrombozytapheresekonzentrate unterschieden sich in Bezug auf Gewicht/Volumen, Thrombozytengehalt und Leukozytenkontamination nicht signifikant. Auch für den, während der gesamten Lagerungsdauer dokumentierten, Verlauf des Thrombozytengehalts ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

Tabelle 3-7: Mittelwerte der Anzahl und Konzentration der Thrombozyten, Leukozyten und Erythrozyten im Thrombozytapheresekonzentrat sowie Gewicht des Thrombozytapheresekonzentrats am Herstellungstag (Tag 1)

	Gruppe	
	A	B
	Mittelwert ± Standardabweichung	Mittelwert ± Standardabweichung
Thrombozytengehalt	$3,22 \times 10^{11} \pm 0,3 \times 10^{11}$	$3,20 \times 10^{11} \pm 0,3 \times 10^{11}$
Leukozytengehalt	$0,94 \times 10^5 \pm 1,64 \times 10^5$	$0,47 \times 10^5 \pm 1,00 \times 10^5$
PLT/ μl	$1100 \times 10^3 \pm 99 \times 10^3$	$1068 \times 10^3 \pm 105 \times 10^3$
Leukozyten/ μl	0,32± 0,56	0,16± 0,34
Erythrozyten/ μl	580,00 ± 1076,83	260,00 ± 267,50
Gewicht (g)	293,80 ± 7,76	294,40 ± 4,88

Abbildung 3-5: Verlauf der mittleren Thrombozytenkonzentration im Thrombozytapheresekonzentrat während der Lagerungsdauer



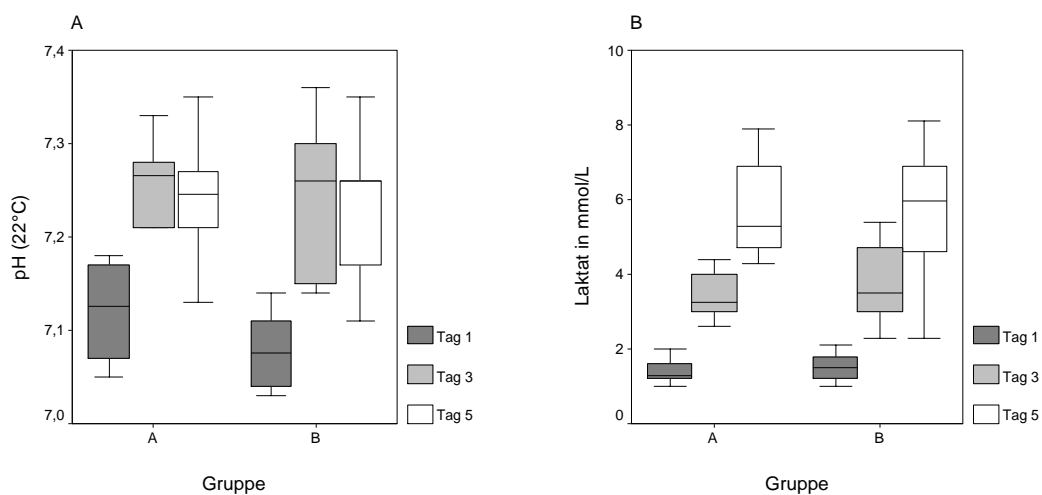
3.5 Thrombozytenaggregation, Thrombozytenaktivierung und Stoffwechselfparameter im Thrombozytapheresekonzentrat

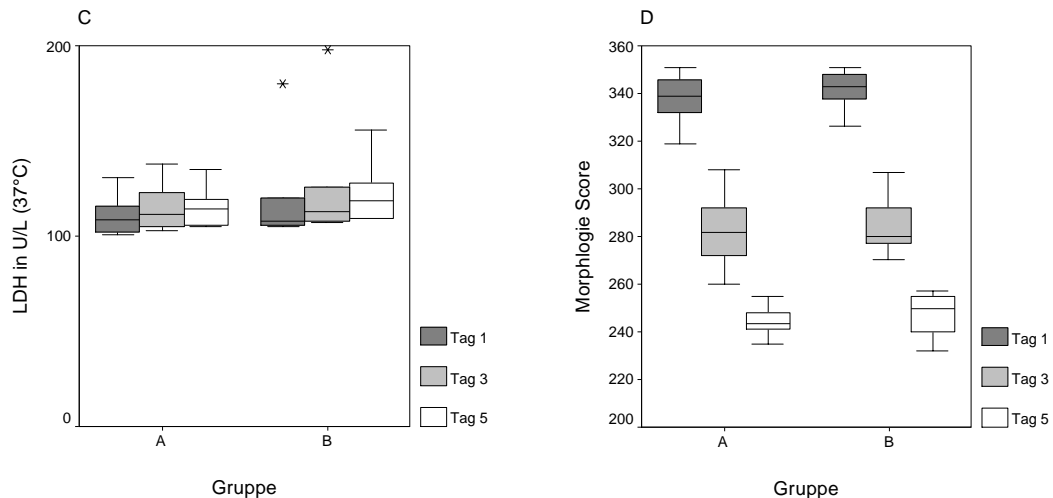
Es folgt die Darstellung der Ergebnisse der Untersuchungen zur Thrombozytenaggregation und Thrombozytenaktivierung sowie die ermittelten Stoffwechselfparameter im Thrombozytapheresekonzentrat am Herstellungstag (Tag 1) und während der Lagerungsdauer zu den Messpunkten am 3. und 5. Tag nach Präparatherstellung.

3.5.1 Stoffwechselfparameter und Thrombozytenmorphologie im Thrombozytapheresekonzentrat

Die Ergebnisse der Stoffwechselfparameter pH-Wert, LDH, Laktatkonzentration sowie Morphologie und Swirling lagen von Untersuchungsbeginn an in beiden Gruppen im selben Grundbereich und zeigten während der Lagerungsdauer eine nahezu identische Entwicklung. Diese umfasst eine deutliche Zunahme des Laktatspiegels, des mittleren Laktatdehydrogenasegehalts und des pH-Wertes, sowie eine Abnahme des Morphologie Scores. Das Swirling-Phänomen war während der gesamten Lagerungsdauer in allen Präparaten vorhanden. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen beiden Gruppen bestanden weder zu Beginn, noch im weiteren Verlauf der Lagerung.

Abbildung 3-6: Darstellung der Stoffwechselfparameter pH (A), Laktat (B), LDH (C) und Morphologie Score (D) am Herstellungstag (Tag 1), 3.Tag und 5.Tag nach Herstellung





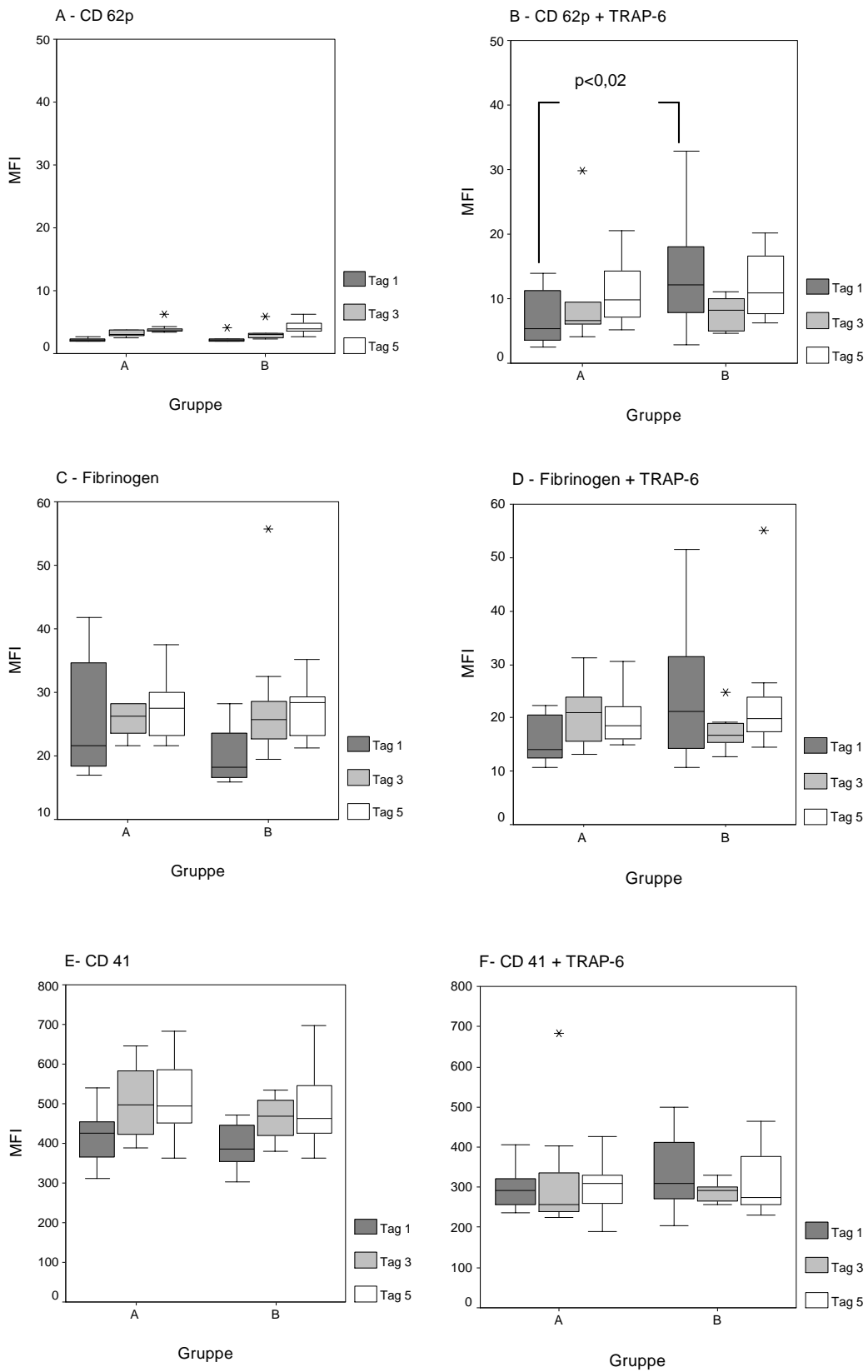
Die waagerechte Linie in der Box gibt den Wert des Medians an. Das obere und das untere Quartil bilden die Begrenzung der Box, von denen ausgehend als Whisker-Enden, Maximum und Minimum dargestellt werden. Für die einzelnen Parameter ergeben sich im Lagerungsverlauf keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

$n=10$; *=Extremwert

3.5.2 Durchflusszytometrie

Am Herstellungstag (Tag 1) wiesen die Aktivierungsmarker CD 62p und Fibrinogenbindung keine signifikanten Unterschiede zwischen den Thrombozytapheresekonzentraten beider Gruppen aus. Die Thrombozytapheresekonzentrate der Gruppe B vermögen jedoch nach Stimulation mit TRAP-6 CD 62p in einem signifikant größerem Maße zu exprimieren ($p < 0,02$). Im weiteren Verlauf der Lagerungsdauer waren dann jedoch weder im nativen noch in stimuliertem Zustand signifikante Differenzen bezüglich der Thrombozytenaktivierung zwischen der Gruppe A (ASS) und der Gruppe B nachzuweisen (siehe Abbildung 3-7). Innerhalb jeder der beiden Gruppen fand während der Lagerungsdauer eine signifikant verstärkte Expression des Aktivierungsmarkers CD 62p statt ($p = 0,005$), siehe Abbildung 3-8. Auf der Thrombozytenmembranoberfläche nahm die Anzahl der Glykoproteine IIb/IIIa (CD 41) während der Lagerungszeit in beiden Gruppen signifikant zu ($p < 0,01$). Die Fibrinogenbindefähigkeit der Thrombozyten nach Stimulation mit TRAP-6 verringerte sich in beiden Gruppen mit zunehmender Lagerungsdauer.

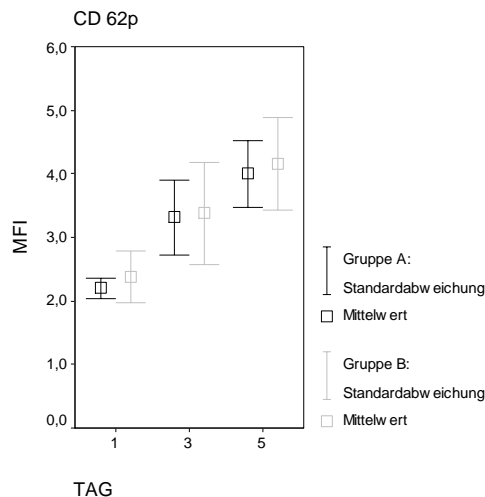
Abbildung 3-7: Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) von CD 62p, Fibrinogenbindefähigkeit und CD 41 am Herstellungstag und während der Lagerungsdauer im nativen Zustand (A, C, E) sowie nach Stimulation mit TRAP-6 (B, D, F)



Die waagerechte Linie in der Box gibt den Wert des Medians an. Das obere und das untere Quartil bilden die Begrenzung der Box, von denen ausgehend als Whisker-Enden, Maximum und Minimum dargestellt werden. Am Herstellungstag (Tag 1) zeigen die Präparate der Gruppe B nach Stimulation ein statistisch signifikant größeres Vermögen CD 62p zu exprimieren (B).

$n = 10$; * = Extremwert

Abbildung 3-8: Entwicklung des Aktivierungsmarkers CD 62p auf der Oberfläche der gelagerten, nicht mit TRAP -6 stimulierten Thrombozyten im Laufe der Lagerungsdauer.



Die Abbildung zeigt ein Fehlerbalkendiagramm. Dargestellt ist die MFI von CD 62p der Gruppe A und Gruppe B im Laufe der Lagerungszeit zu den Messpunkten Tag 1, 3 und 5. Das Quadrat markiert den Mittelwert, die t-förmig endenden Balken begrenzen die 2fache Standardabweichung (2 SD).

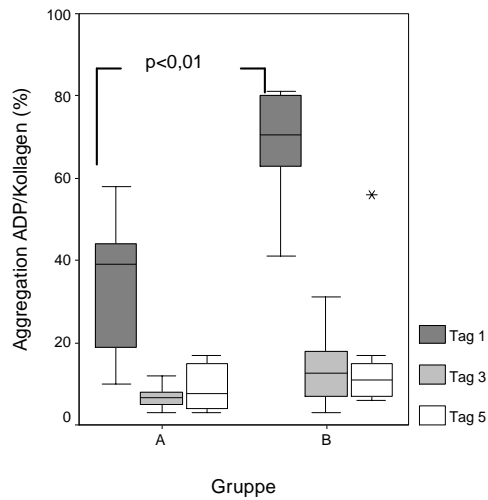
$n = 10$

3.5.3 Thrombozytenaggregation

Das Vermögen der Thrombozyten nach Zugabe des ADP/ Kollagen-Reagenz zu aggregieren sank in beiden Gruppen mit zunehmender Lagerungszeit signifikant. Für die Gruppe A (ASS) sowie für Gruppe B gilt die Differenz der Aggregationsfähigkeiten am Herstellungstag im Vergleich zum 5. Lagerungstag mit $p = 0,005$ als nicht zufällig.

Am Herstellungstag (Tag 1) waren die Thrombozytapheresekonzentrate der Gruppe B denen der Gruppe A hinsichtlich dieser funktionellen Leistung signifikant überlegen ($p = 0,01$). Am 3. und 5. Tag existiert jedoch kein statistisch signifikanter Unterschied mehr zwischen der Thrombozytenaggregation der Präparate der Gruppen A und B.

Abbildung 3-9: Thrombozytenaggregation aus den Thrombozytapheresekonzentraten der Gruppe A (ASS) und B am Herstellungstag (Tag 1) sowie am 3. Tag und 5. Tag der Lagerungsdauer



Die waagerechte Linie in der Box gibt den Wert des Medians an. Das obere und das untere Quartil bilden die Begrenzung der Box, von denen ausgehend als Whisker-Enden, Maximum und Minimum dargestellt werden. Am Herstellungstag (Tag1) sind die Präparate der Gruppe B den Präparaten der Gruppe A statistisch signifikant überlegen. Am 3. und 5. Tag nach Herstellung ist dieser Effekt nicht mehr nachweislich. $n = 10$; * =Extremwert

4 Diskussion

Die Herstellung und Lagerung von Thrombozytenkonzentraten führt zu morphologischen Veränderungen, funktionellen Einschränkungen und Vitalitätsverlusten der Thrombozyten des Thrombozytenkonzentrats gegenüber den im Blut zirkulierenden Thrombozyten des Spenders (Klinger 1996). Die Summe dieser Schäden wird unter dem Begriff „Platelet Storage Lesion“ (PSL) zusammengefasst.

Ein maßgeblicher Auslöser der PSL ist die Aktivierung der Thrombozyten während der Herstellung der Thrombozytapheresekonzentrate. Die Zellseparation kann dabei einen starken Aktivierungsreiz für die Thrombozyten darstellen. Zentrifugal- und Scherkräfte können zur Aktivierung der Thrombozyten führen. Anhand der Phosphorylierungsschemata zeigte Estebanell (Estebanell *et al.* 2000), dass die Zellseparation die Thrombozyten des Thrombozytenkonzentrats in einen Aktivierungszustand versetzt, der bis zu 24 Stunden anhält und die Thrombozyten daran hindert auf weitere Stimuli adäquat zu reagieren.

Die Aktivierung von Thrombozyten wirkt sich jedoch nicht nur negativ auf die Qualität der gesammelten Thrombozyten aus. Auch der Separationserfolg kann durch die Aktivierung von Thrombozyten geschmälert werden, wenn diese an den künstlichen Oberflächen der Separationskammer und im Schlauchsystem des Zellseparators adhären, im Zellseparator verkleben und damit nicht im Produkt zur Verfügung stehen (Holme *et al.* 1997; Gutensohn *et al.* 1997).

Auch Arbeiten aus der kardiovaskulären Chirurgie beschreiben die Aktivierung von Thrombozyten und ihre Neigung an den künstlichen Oberflächen der Schlauchsysteme der Herz-Lungen-Maschine zu adhären und zu aggregieren. Insbesondere unter zusätzlich verwendetem Heparin entsteht eine große Zahl verformter und zerstörter Thrombozyten, die für die Umsetzung einer suffizienten, postoperativen Hämostase nicht mehr zur Verfügung stehen (Ellison *et al.* 1978; Khuri *et al.* 1995).

Eine Möglichkeit, diesen Aktivierungsprozess zu verringern zeigten Hiramatsu *et al.* (Hiramatsu *et al.* 1997) in einem tierexperimentellen Ansatz. Sie verringerten während der ACVB-Operation an Pavianen unter Verwendung des reversiblen GP IIb/IIIa-Hemmers Tirofiban die Thrombozytenreagibilität für den Zeitraum der

Intervention. Der Erfolg dieser Methode, die sie „platelet anesthesia“ nannten, zeigte sich an der, zur Vergleichsgruppe signifikant beschleunigten, Wiederherstellung einer im Normbereich liegenden Blutungszeit nach der Operation. Weiterhin wiesen die Versuchstiere in der Interventionsgruppe postoperativ signifikant höhere Thrombozytenzahlen auf. Die Autoren interpretierten ihre Ergebnisse dahingehend, dass die Inhibition der Thrombozyten während der extrakorporalen Zirkulation sich positiv auf die postoperative Thrombozytenzahl und Thrombozytenfunktion auswirkt.

Unter der Vorstellung, dass der Lagerungsschaden, die „Platelet Storage Lesion“, von Thrombozytapheresekonzentraten ein Sprössling der Thrombozytenaktivierung ist, zu der es während der Herstellung und Lagerung von Thrombozytapheresekonzentraten kommt (Snyder 1992), stellte sich uns die Frage ob eine Steigerung der Separationseffizienz und der Qualität der gewonnenen Thrombozyten bei Thrombozytapheresekonzentraten durch eine pharmakologische Thrombozytenaggregationshemmung („platelet anesthesia“) während der Separation erreicht werden kann. Ein zu diesem Zweck geeigneter Thrombozytenfunktionshemmer könnte möglicherweise ASS sein. Über die Auswirkung einer ASS-Einnahme auf die Qualität von Thrombozyten in Thrombozytapheresekonzentraten liegen bisher keine Erfahrungswerte vor. ASS ist, wie bereits eingangs beschrieben, ein irreversibler Aggregationshemmer, der einige klassische Thrombozytenaktivierungswege blockiert. Aufgrund seiner analgetischen und antipyretischen Wirkung wird ASS von einer Vielzahl von Personen - und natürlich auch von Blutspendern - zur Selbstmedikation eingenommen. Dies wird insbesondere dadurch, dass es sich hierbei um ein frei zugängliches, nicht verschreibungspflichtiges Medikament handelt, gefördert. Da eine routinemäßige Testung der Thrombozytenfunktion von Blutspendern nicht durchgeführt wird, werden Blutspender, bei denen ein Anhalt für eine eingeschränkte Thrombozytenfunktion vorliegt üblicherweise von der Thrombozytenspende ausgeschlossen (Jilma-Stohlawetz *et al.* 2001). Hierfür werden die Spender nach der Einnahme von Medikamenten befragt. Die Angabe der Einnahme ASS-haltiger Medikamente in den Tagen vor einer geplanten Spende führt aufgrund der mutmaßlichen Thrombozytenfunktionshemmung meist zum Spenderausschluss (Bundesärztekammer 2004). Beachtenswert ist hierbei die oft unterschätzte Anzahl der Spender, die vor der Thrombozytenspende ASS als Schmerzmittel eingenommen

haben, dies jedoch bei der Spenderbefragung nicht angeben. Aufgrund vorliegender Studien (Sharon *et al.* 1980; Jilma-Stohlawetz *et al.* 2001) muss man davon ausgehen, dass eine nicht unbeträchtliche Zahl von Thrombozytenkonzentraten von Blutspendern stammt, die ASS eingenommen haben ohne dies zu berichten. Diese Tatsache steht in einem interessanten Widerspruch zum gänzlichen Fehlen von Studien oder anderen Berichten über negative Auswirkungen der ASS-Einnahme von Thrombozytenspendern auf die hämostyptische Wirkung der von ihnen gewonnenen Thrombozytenkonzentrate. Auch zeigten eigene Erfahrungen im Blutspendedienst in Einzelfällen einen adäquaten, hämostyptischen Effekt nach Transfusion von Thrombozytenkonzentraten, deren Spender ASS eingenommen hatten.

Somit stellte sich die Frage, ob die ASS-Einnahme womöglich tatsächlich keine derart große Beeinträchtigung der Thrombozytenfunktion im Thrombozytenkonzentrat darstellt, um den Ausschluss der betreffenden Spender zu rechtfertigen, oder aber sogar durch eine Verminderung der Plättchenaktivierung im Rahmen der Herstellung und Lagerung die Qualität der Thrombozyten positiv beeinflusst.

Zur Beantwortung dieser Fragen wurden in der vorliegenden Arbeit in einem gepaarten Versuchsansatz bei 10 gesunden Probanden jeweils 2 Thrombozytapheresen durchgeführt, wobei alle Bedingungen bis auf die Einnahme von 500 mg ASS am Vorabend von einem der beiden Spendetermine identisch waren. Untersucht wurden dann sowohl die Thrombozytenfunktion der Spender vor und nach Separation, als auch die gewonnenen Thrombozytapheresekonzentrate während der gesamten Lagerungszeit.

4.1 Auswirkungen der ASS-Einnahme auf die im Spenderblut zirkulierenden Thrombozyten

Die Kontrolle der ASS-Einnahme in der Interventionsgruppe mit Hilfe des Platelet Function Analysers (PFA) zeigte bei allen Probanden die durch ASS verursachten, typisch verlängerten in-vitro-Blutungszeiten. Wie zu erwarten führte die verminderte Thromboxansynthese der Thrombozyten in der ASS-Gruppe auch im Aggregationstest zu einer signifikanten Verminderung der Thrombozytenaggregation (Samra *et al.* 1991). Am stärksten ausgeprägt war die verminderte Aggregation erwartungsgemäß nach Zugabe des Aggreganz Arachidonsäure (Gruppe A: $9,60 \pm 1,96$ % versus Gruppe B: $70,80 \pm 19,42$ %), da ja hier spezifisch die Metabolisierung

des zugesetzten Aggreganz, der Arachidonsäure, blockiert war. Aber auch die Aggregation mit ADP (in beiden Konzentrationen) und Kollagen war bei den Blutproben, vor deren Abnahme die Spender ASS einnahmen gegenüber der Vergleichsgruppe zwar in geringerem Ausmaß, aber immerhin noch signifikant vermindert.

Morphologische und funktionelle Veränderungen der Thrombozyten spiegeln sich auch in der Glykoproteinzusammensetzung der Thrombozytenmembran wieder. In den durchflusszytometrischen Untersuchungen ergaben sich jedoch hinsichtlich der Expression von CD 41 und CD 62p bei unstimulierten Thrombozyten keine Unterschiede zwischen den im Blut zirkulierenden Thrombozyten der gesunden Spender mit und ohne ASS-Einnahme. Auch die durchflusszytometrisch bestimmte Reaktion (Expression von CD 62p und Fibrinogenbindung) auf Stimulation der Thrombozyten mit TRAP-6 wurde durch die ASS-Einnahme nicht beeinflusst. Trotz der, im Aggregationstest und im PFA nachgewiesenen, Funktionseinschränkung durch ASS konnte mit dem starken Agonisten TRAP-6 durchaus noch eine deutliche Stimulationsantwort erreicht werden. Diese Unabhängigkeit der α -Granulasekretion von einer Blockierung des Arachidonsäuremetabolismus steht im Einklang mit Untersuchungen von Rinder und Michelson (Rinder *et al.* 1993; Michelson *et al.* 1999). Wobei Rinder *et al.* diesen Effekt dahingehend deuteten, dass die Funktionsfähigkeit der Na^+/H^+ Transporter und damit der intrazelluläre pH-Wert grundlegende Voraussetzung für die α -Granulasekretion ist. Dies unterstreicht, dass ASS lediglich zu einer partiellen Thrombozytenfunktionsstörung führt und die Thrombozyten durchaus noch in der Lage sind, auf bestimmte Stimulationsreize zu reagieren.

Somit konnte die ASS-Einnahme bei allen Probanden der ASS-Gruppe verifiziert werden und verursachte die bekannten, partiellen Thrombozytenfunktionsstörungen (Samra *et al.* 1991; Marshall *et al.* 1997; Michelson *et al.* 1999).

4.2 Effekt der Zellseparation auf die Thrombozytenfunktion und Auswirkungen von ASS auf Parameter der Zellseparation

Anders als Gutensohn (Gutensohn *et al.* 1997, Gutensohn *et al.* 2000) und Wun (Wun *et al.* 1992), die in Arbeiten mit Zellseparatoren älterer Bauart eine mit der Separationsdauer zunehmende Ausschüttung der thrombozytären, intrazellulären α -Granula im Sinne einer Thrombozytenaktivierung der beim Spender zirkulierenden

Thrombozyten beschrieben, konnte in der vorliegenden Studie anhand des Aktivierungsmarkers CD 62p in keiner der beiden Gruppen eine Aktivierung der im Spenderblut zirkulierenden Thrombozyten zum Ende der Thrombozytapherese nachgewiesen werden. Auch die Reaktionsfähigkeit der Thrombozyten (CD 62p-Expression und Fibrinogenbindung) auf Stimulation mit TRAP-6 wurde durch die Apherese, unabhängig von der ASS-Einnahme, nicht beeinflusst. Analog dazu zeigte sich auch die Thrombozytenaggregation vom Separationsprozess unbeeinflusst. In beiden Gruppen konnte jedoch ein signifikantes Absinken der CD 41-Expression auf der Thrombozytenoberfläche des Spenders nach der Thrombozytapherese beobachtet werden. Dieses Phänomen ist sowohl für Thrombozytapheresen (Gutensohn *et al.* 1997) als auch für Hämoperfusion und ACVB-Operationen beschrieben worden (Musial *et al.* 1985; Rinder *et al.* 1991). CD 41 repräsentiert das calciumabhängige Glykoprotein IIb/IIIa. Die Ursachen der Verringerung der CD 41-Expression auf der Membranoberfläche im Verlauf der Thrombozytapherese sind vielfältig zu erklären. So spaltet beispielsweise das aktivierte Komplementsystem den Rezeptor. Außerdem erschwert die zunehmende Internalisation von CD 41 durch Aktivierung den monoklonalen Antikörpern den Zugang zu ihren Epitopen. Auch Thrombozyten-Biomaterial-Interaktionen und hämodynamische Scherkräfte während der Apherese, Thrombozytenaggregation und –Adhäsion und die Fragmentierung von Thrombozyten können den Verlust von CD 41 auf der Thrombozytenoberfläche erklären (Musial *et al.* 1985; Wenger *et al.* 1989). Außerdem gilt es auch zu bedenken, dass das während der Apherese zur Antikoagulation verwendete Citrat Calcium bindet. Dieses wird anschließend nicht substituiert und steht somit in geringer Konzentration zur Brückenbildung zwischen den beiden Untereinheiten des GPIIb/IIIa zur Verfügung (De Groot *et al.* 1998). Insofern stellt die Abnahme der CD 41-Expression womöglich einen empfindlicheren Marker für eine stattgehabte Thrombozytenaktivierung dar, als ein Anstieg der CD 62p-Expression. Aber auch bezüglich dieses möglicherweise empfindlichen Aktivierungsmarkers, der Verringerung der CD 41-Expression auf den Thrombozyten, zeigte sich kein protektiver Effekt der ASS-Einnahme in der Interventionsgruppe. Damit ist anhand der in dieser Studie erhobenen Daten nicht davon auszugehen, dass die Einnahme von ASS zu einer Verringerung der Thrombozytenaktivierung der im Spender verbleibenden Thrombozyten im Rahmen der Apherese führt.

Weiterhin sprechen die in dieser Arbeit erhobenen Daten auch gegen eine Beeinflussung der Separationseffizienz durch ASS. Weder die Effizienz der Separation, noch der Thrombozytengehalt oder die Zahl der im Präparat verbleibenden Leukozyten unterschied sich bei identischen Ausgangswerten der Spender zu beiden Spendeterminen zwischen den Gruppen signifikant. Auch die Separationsdaten wie Separationsdauer und prozessiertes Blutvolumen werden von der, der Zellseparation vorausgegangenen, ASS-Einnahme der Spender nicht beeinflusst.

4.3 Auswirkungen von ASS auf die Qualität der Thrombozyten im Thrombozytapheresekonzentrat im Verlauf der Lagerung

4.3.1 Ultrastrukturelle Veränderungen und Thrombozytenfunktion

Die Zunahme CD 62p positiver Thrombozyten im Thrombozytenkonzentrat mit zunehmender Lagerungsdauer ist eine Beobachtung, die in unterschiedlich starkem Ausmaß, von verschiedenen Autoren berichtet wurde (Rinder *et al.* 1991; Holme *et al.* 1997) und sich auch in den Untersuchungsergebnissen dieser Arbeit in beiden Gruppen zeigt.

Curvers (Curvers *et al.* 2004) fand, dass aktivierte, CD 62p positive Thrombozyten aus gelagerten Thrombozytapheresekonzentraten in geringerem Maße Fibrinogen binden als aktivierte, frische, aus Blut stammende Thrombozyten. Sie schlussfolgerte daraus, dass die Eigenschaften von Thrombozyten, die durch Lagerung oder Herstellung aktiviert wurden den Eigenschaften von Thrombozyten, die durch Agonisten aktiviert wurden ähnlich, aber nicht identisch seien und dass die während der Lagerungsdauer, ansteigende CD 62p-Expression auf einem anderen Mechanismus zu beruhen scheint, als die durch Agonisten induzierte CD 62p-Expression.

Nach Stimulation der Thrombozyten mit Thrombozytenagonisten bewerkstelligt die Tyrosinphosphorylierung von Molekülen die Signaltransduktion durch die Zellmembran. Verschiedene aktivierte Signalproteine haben dabei die Möglichkeit in das Zytoskelett eingebunden zu werden. Das submembranöse Zytoskelett kommuniziert mit den extrazellulären Rezeptoren und mit den intrazellulär gelegenen zytoplasmatischen Elementen (Fox *et al.* 1993; Morgenstern 1998 & 1978). Die Umbauten in der Zytoskelettstruktur, die auch die Polymerisation von kontraktilen Proteinen beinhaltet, spielen eine zentrale Rolle in der Plättchenfunktion

und bedingen die Thrombozytenaggregation (Lazarus *et al.* 2003). Herstellung und Lagerung der Thrombozytenkonzentrate führen zu Veränderungen in der Signalübermittlung (Tyrosinphosphorylierung) und zu einer Vielzahl von Umbauten im Zytoskelett (Estebanell *et al.* 2000). Mit zunehmendem Grad der zytoskelettalen Polymerisation verlieren die Thrombozyten die Fähigkeit weitere kontraktile Proteine, wie Aktin, in das Zytoskelett zu integrieren und verlieren so die Fähigkeit sich nach Zugabe von Thrombozytenagonisten zu verformen und zu aggregieren (Estebanell *et al.* 2000). Diese strukturellen Veränderungen gelagerter Thrombozyten erklären das Phänomen, dass obwohl die Anzahl der aggregationvermittelnden GPIIa/IIIb Rezeptoren (CD 41) auf der Thrombozytenoberfläche mit der Lagerungszeit signifikant ansteigt, gleichzeitig die Einschränkungen in der Aggregationsfähigkeit der Thrombozyten mit der Lagerungsdauer signifikant fortschreiten. Estebanell (Estebanell *et al.* 2000) zeigte, dass Thrombozyten, die drei Tage oder länger gelagert wurden, kaum noch aktivierungsfähig sind, da die Zugabe von Stimulanzien bei den gelagerten Thrombozyten nur noch in sehr geringen Maße zu Proteinphosphorylierung führte. Dieser Funktionsverlust, der auch durch Murphy (Murphy *et al.* 1994) beschrieben wurde, betraf in der vorliegenden Studie die durch ASS geschädigten Thrombozyten in gleichem Ausmaß wie die Kontrollgruppe. Unterschiede in der Thrombozytenfunktion zwischen den Thrombozytapheresekonzentraten der Gruppen A und B fanden sich nur am Herstellungstag (Tag 1). Im ruhenden Zustand zeigten die Präparate beider Gruppen ein fast identisches Aktivierungsniveau (CD 62p Gruppe A: $2,2 \pm 0,25$; Gruppe B: $2,38 \pm 0,63$). Nach Stimulation mit TRAP-6 reagierten jedoch die Thrombozyten der Gruppe B, gegenüber den durch ASS geschädigten Thrombozyten der Gruppe A, in einem signifikant ($p < 0,02$) größerem Umfang und exprimierten deutlich mehr CD 62p an der Oberfläche. Auch in der Aggregationsfähigkeit waren die Thrombozyten der Gruppe B denen der Gruppe A (ASS) lediglich am Herstellungstag deutlich überlegen. Ein Aggregationsdefizit der durch ASS geschädigten Thrombozyten war in ähnlichem Ausmaß auch schon bei den im Spenderblut zirkulierenden Thrombozyten nachweisbar. Hinsichtlich der CD 62p-Expression nach TRAP-6 Stimulation waren die im Blut zirkulierenden Thrombozyten der Gruppe A nach der Apherese denen der Gruppe B ebenbürtig. Im Thrombozytapheresekonzentrat besteht jedoch am Tag 1 nach TRAP-6 Stimulation eine deutliche Einschränkung der CD 62p-Expression in der Gruppe A.

Hier scheint also ein zusätzlicher Effekt vorzuliegen, der zusammen mit dem ASS-Effekt nun doch - zumindest am Herstellungstag - auch zu einer verminderten Stimulationsantwort auf TRAP-6 führt. Dies könnte auf den etwas geringeren pH in den frischen Thrombozytapheresekonzentraten, aber auch auf eine leichte Aktivierung durch die Zentrifugation zurückzuführen sein. Es ist vorstellbar, dass die Zellseparation bei durch ASS geschädigten Thrombozyten zu einem anderen Phosphorylierungsschema führt als bei nicht geschädigten Thrombozyten und somit die Reagibilität der Thrombozyten herabsetzt.

4.3.2 Metabolismus

Im Metabolismus des Thrombozyts stellt die Verwertung von Glukose, unter Bildung von Laktat, die Hauptenergiequelle dar. Zur Charakterisierung der metabolischen Funktion der Thrombozyten eignet sich die Ermittlung von Laktatproduktion, Glucoseverbrauch und Sauerstoffverwertungs-kapazität der Thrombozyten. Unter optimaler Oxygenierung des Thrombozytenkonzentrats sollte die Anreicherung von Laktat im Präparat die Rate von 2,5 mM pro Tag nicht übersteigen (Murphy *et al.* 1982). In dieser Arbeit wurde diese Laktatproduktionsrate in keiner der beiden Gruppen überschritten. Die Vermeidung der Akkumulation von sauren Substanzen im Thrombozytenkonzentrat während der Lagerungszeit erfordert Pufferkapazitäten und einen suffizienten Gasaustausch. Die gute Gaspermeabilität der Lagerungsbeutel gewährt die Funktionstüchtigkeit des Kohlendioxid-Bikarbonat-Puffers, dem wichtigstem Puffersystems des Plasmas. Die Abgabe von CO₂ über den Lagerungsbeutel kompensiert die Bildung von sauren Stoffwechselprodukten und führt zu einem stabilen Zustand, der vom pH-Wert im Präparat angezeigt wird. Initial liegt der pH-Wert zwischen 7,0 und 7,3 und wird primär von der Blut-Antikoagulanzen-Ratio während der Apherese und dem Hämatokritwert des Spenders beeinflusst (Dumont *et al.* 2003). Während der gesamten Lagerungsdauer sollte der pH-Wert zwischen 6,8 und 7,4 liegen (Council of Europe 2004). Insbesondere bei einem starken Absinken des pH-Wertes als Ausdruck einer schlechten Stoffwechsellage muss mit schwerwiegenden, ultrastrukturellen Umbauten der Thrombozyten und einer verringerten posttransfusionellen Überlebenszeit der Thrombozyten gerechnet werden (Holme *et al.* 1978; Solberg, Holme and Little 1986). In der vorliegenden Studie verlief die Entwicklung der Laktat- und pH-Werte während der Lagerung in Gruppe A und Gruppe B fast identisch. Insbesondere die unteren Grenzwerte wurden in beiden Gruppen niemals

unterschieden. Auch bezüglich der weiteren gemessenen Marker der Thrombozytenqualität (LDH, Laktat, Swirling, Morphologie, Thrombozytenzahl) (Solberg *et al.* 1986; Holme *et al.* 1990; Bertolini and Murphy 1994; Bertolini and Murphy 1996) ergaben sich zwischen beiden Gruppen keine Unterschiede. Hier zeigte sich also kein Einfluss der ASS-Einnahme auf den Stoffwechsel der gelagerten Thrombozyten. Ein Vor- oder Nachteil der ASS-Einnahme konnte aus den Untersuchungen zum Metabolismus nicht abgeleitet werden.

4.4 Schlussfolgerungen und kritische Beurteilung der Methodik

Die Ergebnisse dieser Studie lassen nicht auf einen protektiven Effekt von ASS auf die funktionelle Qualität der Thrombozyten im Thrombozytapheresekonzentrat schließen. Auch auf das Herstellungsverfahren der Thrombozytapheresekonzentrate (insbesondere hinsichtlich Effizienz der Sammlung und Leukozytenkontamination) übte ASS keinen Einfluss aus. Die Ausbildung von Thrombozytenfunktionsdefiziten und Lagerungsschäden im Verlauf der Lagerung vom dritten bis zum fünften Lagerungstag betraf die Thrombozytapheresekonzentrate beider Untersuchungsgruppen in gleichem Umfang. Ein nachteiliger Effekt von ASS auf die Funktion der Thrombozyten war nur in wenigen Testsystemen und dann auch nur bei frisch hergestellten Thrombozytenkonzentraten am Herstellungstag nachweisbar. Bereits am dritten Lagerungstag erschien der ASS-Effekt als unerheblich und war weder in Funktion, Morphologie oder Metabolismus mit den angewandten Untersuchungsmethoden nachweisbar. Damit ergab sich, zumindest im Verlauf der Lagerung ab dem dritten Tag kein Anhalt für eine wesentliche funktionelle Beeinträchtigung der Thrombozyten durch die ASS-Einnahme des Spenders im Vergleich zu Thrombozyten, die ohne vorherige ASS-Einnahme gewonnen wurden. Grundsätzlich muss bei der Interpretation dieser Ergebnisse berücksichtigt werden, dass es sich um eine *in vitro* Untersuchungsreihe handelt. Letztendlich zählt für die Beurteilung der Qualität transfundierter Thrombozyten der Transfuserfolg beim Patienten, also die hämostyptische Wirkung und die Anzahl funktionstüchtiger und *in vivo* überlebensfähiger Thrombozyten. Die Beurteilung des *in vivo* Transfuserfolgs ist jedoch dadurch erschwert, dass insbesondere die posttransfusionelle Wiederfindungsrate und die Überlebensfähigkeit der transfundierten Thrombozyten in sehr großem Ausmaß von empfängerspezifischen Faktoren (z.B. Fieber, Sepsis, Splenomegalie, Blutung, Medikamente) abhängig ist

(Norol *et al.* 1998; Snyder *et al.* 2000, Rinder *et al.* 2003). Daher wird für die Beurteilung der Thrombozytenqualität meist auf *in vitro* Tests zurückgegriffen. Relativ gute Korrelationen mit der *in vitro* Überlebenszeit konnten für die Parameter pH, Morphologie und Swirling nachgewiesen werden (Owens *et al.* 1992). Bisher ist es allerdings noch nicht gelungen einen einzelnen *in vitro* Test zu entwickeln der den so genannten „Gold-Standard“ darstellt, also als Einzeltest zuverlässig die *in vivo* Funktion transfundierter Thrombozyten voraussagen könnte (Rinder 2003).

Üblicherweise wird daher auf eine Reihe verschiedener *in vitro* Testmethoden zurückgegriffen (Schmitz *et al.* 1998; Holme 1998). Aus der Summe der Untersuchungen, die die verschiedenen Aspekte der Thrombozytenfunktion erfassen lässt sich dann die zu erwartende Qualität der transfundierten Thrombozyten gut abschätzen. Dieses Verfahren wurde auch in der vorliegenden Untersuchung angewendet. Somit ist den Ergebnissen der Studie auch bei kritischer Beurteilung durchaus erhebliche Relevanz beizumessen.

Unter Berücksichtigung der allgemeinen und seit Jahrzehnten bestehenden Meinung, dass durch ASS geschädigte Thrombozyten von minderer Qualität seien, und dass der zu erwartende Nutzen beim Empfänger geringer sei als die Transfusionsrisiken und möglichen Transfusionskomplikationen, sind die Ergebnisse der Studie überraschend, denn in den vorliegenden Daten erscheint eine einmalige ASS-Einnahme der Spender am Spendevorabend, zumindest in gelagerten Thrombozytenkonzentraten, als nicht relevant. Lediglich bei frischen Thrombozytapheresekonzentraten zeigte sich eine Beeinträchtigung der Thrombozytenfunktion durch ASS, die jedoch offenbar so gering ist, dass sie im Verlauf der Lagerung von den auftretenden Lagerungsschäden überdeckt wird. Generell gilt jedoch, dass diese Annahmen auf *in vitro* Untersuchungen beruhen. Bewahrheitet werden können sie letztendlich nur durch eine *in vivo* Studie.

5 Zusammenfassung

Im Rahmen der Gewinnung und Lagerung von Thrombozyten für Transfusionszwecke kommt es zu einer Beeinträchtigung der Funktion der Thrombozyten im Konzentrat. Diese strukturellen und biochemischen Veränderungen werden unter dem Begriff „platelet storage lesion“ (PSL) zusammengefasst. Von entscheidender Bedeutung für die Entwicklung der PSL scheint die Thrombozytenaktivierung im Rahmen der Thrombozytapherese zu sein. Eine Prävention der Thrombozytenaktivierung während der Thrombozytapherese, beispielsweise durch den Thrombozytenfunktionshemmer ASS, könnte möglicherweise das Ausmaß der PSL verringern und den Transfusionserfolg vergrößern. Andererseits gilt die Einnahme des Cyclooxygenasehemmers ASS, da sie eine partielle Inhibierung der Thrombozytenfunktion bewirkt, allgemein als Spenderausschlusskriterium. Diese Einschätzung ist jedoch bisher nicht durch Literaturdaten belegt.

Ziel der vorliegenden Studie war daher zu untersuchen, ob durch ASS partiell-inhibierte Thrombozyten aufgrund ihrer eingeschränkten funktionellen Aktivität während der Thrombozytapherese und Lagerung eine geringere PSL und damit möglicherweise eine bessere Funktion nach Transfusion aufweisen oder ob tatsächlich die Einnahme von ASS die Thrombozytenfunktion im Konzentrat so stark beeinträchtigt, dass sie den Ausschluss von Spendern nach ASS-Einnahme rechtfertigt. Hierzu wurden in einer randomisierten crossover Studie bei 10 gesunden Spendern je 2 Thrombozytapheresen durchgeführt. Eine Apherese erfolgte jeweils 12 Stunden nach einer einmaligen Einnahme einer Dosis von 500 mg ASS (Gruppe A), die andere fand ohne vorausgegangene Medikamenteneinnahme statt (Gruppe B). In *in vitro* Untersuchungen wurden Separationsdaten und Thrombozytenfunktion im Spenderblut vor und nach der Apherese ermittelt. Im Thrombozytapheresekonzentrat wurden am Herstellungstag (Tag 1) und während der Lagerungsdauer (Tag 3 und 5) Thrombozytenfunktion, Morphologie und Stoffwechselfparameter bestimmt. Die Ergebnisse zeigten die zu erwartende signifikante Abnahme der Thrombozytenaggregationsfähigkeit der mit ASS partiell inhibierten Thrombozyten im Spenderblut ($p < 0,005$). Auch in den Thrombozytapheresekonzentraten der Gruppe A war am Tag 1 diese signifikante ASS induzierte Reduktion der

Thrombozytenaggregation belegbar ($p < 0,01$). Eine signifikante durch das Aphereseverfahren hervorgerufene, Aktivierung der Thrombozyten im Spenderblut oder in den Thrombozytapheresekonzentraten war jedoch nicht nachweisbar. Auch für die Separationseffizienz und Separationsdaten ergaben sich zwischen den Gruppen keine signifikanten Unterschiede. Im Verlauf der Lagerung nahm in den Thrombozytapheresekonzentraten beider Gruppen die Thrombozytenaktivierung in gleichem Ausmaß zu. Signifikante Unterschiede der in vitro Funktion fanden sich lediglich am ersten Lagerungstag. Zu diesem Zeitpunkt war das Vermögen der Thrombozyten der Gruppe A auf TRAP-6 Stimulierung mit CD 62p-Expression zu reagieren signifikant vermindert ($p < 0,02$). Im weiteren Verlauf der Thrombozytapheresekonzentratlagerungsdauer wiesen die untersuchten Parameter zur Beurteilung von Thrombozytenqualität (LDH, pH, Laktat, Morphologie) und in vitro Thrombozytenfunktion (CD 62p-Expression, Fibrinogenbindefähigkeit, Aggregationsfähigkeit) jedoch keine weiteren signifikanten Unterschiede zwischen Gruppe A und Gruppe B aus. Die am Herstellungstag noch nachweisbare Verminderung der Thrombozytenfunktion in der ASS-Gruppe trat im Verlauf der Lagerung hinter der in beiden Gruppen nachweisbaren, progredienten Verringerung der in vitro Funktion zurück.

Schlussfolgernd zeigen die vorliegenden Daten keinen nachweisbar vorteilhaften Effekt der ASS-Einnahme auf eine Verringerung der PSL. Diese kann also durch die ASS-Einnahme nicht vermieden oder verringert werden. Andererseits erscheint der negative Effekt einer ASS-Einnahme durch den Blutspender geringer als allgemein angenommen zu sein und ist in gelagerten Thrombozytenkonzentraten bereits am dritten Tag -zumindest in in vitro Untersuchungen- nicht mehr nachweisbar. Dies stellt Spenderauswahlverfahren, bei denen eine einmalige ASS-Einnahme innerhalb der letzten 7 Tage vor der Spende zum Spenderausschluß führt, zumindest in Frage.

6 Literaturverzeichnis

Ardekian,L., Gaspar,R., Peled,M., Brener,B. & Laufer,D. (2000) Does low-dose aspirin therapy complicate oral surgical procedures? *J.Am.Dent.Assoc.*, 131, 331-335.

Bertolini,F. & Murphy,S. (1994) A multicenter evaluation of reproducibility of swirling in platelet concentrates. Biomedical Excellence for Safer Transfusion (BEST) Working Party of the International Society of Blood Transfusion. *Transfusion*, 34, 796-801.

Bertolini,F. & Murphy,S. (1996) A multicenter inspection of the swirling phenomenon in platelet concentrates prepared in routine practice. Biomedical Excellence for Safer Transfusion (BEST) Working Party of the International Society of Blood Transfusion. *Transfusion*, 36, 128-132.

Bertolini,F., Porretti,L., Lauri,E., Rebulli,P. & Sirchia,G. (1993) Role of lactate in platelet storage lesion. *Vox Sang.*, 65, 194-198.

Bizzarri,F., Scolletta,S., Tucci,E., Lucidi,M., Davoli,G., Toscano,T., Neri,E., Muzzi,L. & Frati,G. (2001) Perioperative use of tirofiban hydrochloride (Aggrastat) does not increase surgical bleeding after emergency or urgent coronary artery bypass grafting. *J.Thorac.Cardiovasc.Surg.*, 122, 1181-1185.

Bock,M., Glaser,A., Pfosser,A., Schleuning,M., Heim,M.U. & Mempel,W. (1993) Storage of single-donor platelet concentrates: Metabolic and functional changes. *Transfusion*, 33, 311-315.

Bode,A.P. (1990) Platelet activation may explain the storage lesion in platelet concentrates. *Blood Cells*, 16, 109-125.

Born,G.V. & Cross,M.J. (1963) The Aggregation of Blood Platelets. *J.Physiol*, 168, 178-195.

Bundesärztekammer (2004) Richtlinien zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten (Hämotherapie). Deutscher Ärzteverlag; ISBN 3-7691 - 0422 – 6, *Deutscher Ärzteverlag*; Köln 2004.

Chalandon, Y., Mermillod, B., Beris, P., Doucet, A., Chapuis, B., Roux-Lombard, P. & Dayer, J.M. (1999) Benefit of prestorage leukocyte depletion of single-donor platelet concentrates. *Vox Sang*, 76, 27-37.

Chernoff, A. & Snyder, E.L. (1992) The cellular and molecular basis of the platelet storage lesion: A symposium summary. *Transfusion*, 32, 386-390.

Council of Europe (2004) Guide to the Preparation, Use and Quality Assurance of Blood Components. Recommendation No. R (95) 15, 10th edn. *Council of Europe Publishing*.

Curvers, J., van Pampus, E.C., Feijge, M.A., Rombout-Sestrienkova, E., Giesen, P.L. & Heemskerk, J.W. (2004) Decreased responsiveness and development of activation markers of PLTs stored in plasma. *Transfusion*, 44, 49-58.

De Groot, P.G., Sixma, J.J. (1998) Glykoproteinrezeptoren der Thrombozytenmembran: Biochemie, Molekularbiologie und Physiologie, In: Hämostaseologie, Molekulare und zelluläre Mechanismen, Pathophysiologie und Klinik (Hrsg.: Müller-Berghaus, G. & Pötsch, B.), *Springer-Verlag, Berlin* 15-25.

Dörer, K. (Hrsg.) (2001) Klinische Chemie und Hämatologie, 4. Auflage *Thieme Verlag*.

Dumont, L.J. & Vanden Broeke, T. (2003) Seven-day storage of apheresis platelets: Report of an in vitro study. *Transfusion*, 43, 143-150.

Eckhardt, R. (1991) Durchflußzytometrie, eine schnelle einfache Methode zur Analyse großer Zellzahlen. *Lab Med*, 15, 563-569.

Eller, T. (2000) Wächter der Gerinnung- Thrombozytenfunktion: Bedeutung in der primären Hämostase. *MTA Spektrum*, 09, 472-475.

Ellison, N., Edmunds, L.H. & Colman, R.W. (1978) Platelet aggregation following heparin and protamine administration. *Anesthesiology*, 48, 65-68.

Estebanell, E., Diaz-Ricart, M., Escolar, G., Lozano, M., Mazzara, R. & Ordinas, A. (2000) Alterations in cytoskeletal organization and tyrosine phosphorylation in platelet concentrates prepared by the buffy coat method. *Transfusion*, 40, 535-542.

Fijnheer,R., Modderman,P.W., Veldman,H., Ouwehand,W.H., Nieuwenhuis,H.K., Roos,D. & de Korte,D. (1990) Detection of platelet activation with monoclonal antibodies and flow cytometry. Changes during platelet storage. *Transfusion*, 30, 20-25.

Fox,J.E., Lipfert,L., Clark,E.A., Reynolds,C.C., Austin,C.D. & Brugge,J.S. (1993) On the role of the platelet membrane skeleton in mediating signal transduction. Association of GP IIb-IIIa, pp60c-src, pp62c-yes, and the p21ras GTPase-activating protein with the membrane skeleton. *J Biol.Chem.*, 268, 25973-25984.

Fresenius HemoCare (2001) COM.TEC Gebrauchsanweisung ab Software-Version 02.03.xx. 2001.

Gutensohn,K., Bartsch,N. & Kuehnl,P. (1997) Flow cytometric analysis of platelet membrane antigens during and after continuous-flow plateletpheresis. *Transfusion*, 37, 809-815.

Gutensohn,K., Alisch,A., Krueger,W., Kroeger, N. & Kuehnl,P. (2000) Extracorporeal Plateletpheresis induces the Interaction of Activated Platelets with White Blood Cells *Vox Sang.*, 78, 100-105.

Harbrecht,U. (1998) Die Thrombozytenaggregation: Physiologie und Biochemie. In: Hämostaseologie; Molekulare und zelluläre Mechanismen, Pathophysiologie und Klinik (Hrsg.: Müller-Berghaus,G. & Pötsch,B.), *Springer-Verlag, Berlin*, 27-35.

Harrison,P., Robinson,M., Liesner,R., Khair,K., Cohen,H., Mackie,I. & Machin,S. (2002) The PFA-100: A potential rapid screening tool for the assessment of platelet dysfunction. *Clin.Lab Haematol.*, 24, 225-232.

Harrison,P., Robinson,M.S., Mackie,I.J., Joseph,J., McDonald,S.J., Liesner,R., Savidge,G.F., Pasi,J. & Machin,S.J. (1999) Performance of the platelet function analyser PFA-100 in testing abnormalities of primary haemostasis. *Blood Coagul.Fibrinolysis*, 10, 25-31.

Hein,E. & Weckfort,R. (1998) Acetylsalicylsäure.
<http://www.hschockor.de/aspirin.htm>.

- Hiramatsu, Y.**, Gikakis, N., Anderson, H.L., Gorman, J.H., Marcinkiewicz, C., Gould, R.J., Niewiarowski, S. & Edmunds, L.H. (1997) Tirofiban provides "platelet anesthesia" during cardiopulmonary bypass in baboons. *J.Thorac.Cardiovasc.Surg.*, 113, 182-193.
- Holme, S.**, Heaton, W.A. & Whitley, P. (1990) Platelet storage lesions in second-generation containers: Correlation with in vivo behavior with storage up to 14 days. *Vox Sang.*, 59, 12-18.
- Holme, S.**, Sweeney, J.D., Sawyer, S. & Elfath, M.D. (1997) The expression of p-selectin during collection, processing, and storage of platelet concentrates: Relationship to loss of in vivo viability. *Transfusion*, 37, 12-17.
- Holme, S.**, Vaidja, K. & Murphy, S. (1978) Platelet storage at 22 degrees: Effect of type of agitation on morphology, viability, and function in vitro. *Blood*, 52, 425-435.
- Holme, S** (1998) Storage and quality assessment of platelets. *Vox Sang.* 74, 207-216.
- Hyson, D.A.**, Paglieroni, T.G., Wun, T. & Rutledge, J.C. (2002) Postprandial lipemia is associated with platelet and monocyte activation and increased monocyte cytokine expression in normolipemic men. *Clin.Appl.Thromb.Hemost.*, 8, 147-155.
- Jilma-Stohlawetz, P.**, Hergovich, N., Homoncik, M., Dzirlo, L., Horvath, M., Janisiw, M., Panzer, S. & Jilma, B. (2001) Impaired platelet function among platelet donors. *Thromb.Haemost.*, 86, 880-886.
- Kang, W.S.**, Chung, K.H., Chung, J.H., Lee, J.Y., Park, J.B., Zhang, Y.H., Yoo, H.S. & Yun, Y.P. (2001) Antiplatelet activity of green tea catechins is mediated by inhibition of cytoplasmic calcium increase. *J.Cardiovasc.Pharmacol.*, 38, 875-884.
- Karow, T.** & Lang-Roth, R. (2004) Periphere Analgetika. In: Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie. 13, 546-554.
- Khuri, S.F.**, Valeri, C.R., Loscalzo, J., Weinstein, M.J., Birjiniuk, V., Healey, N.A., MacGregor, H., Doursounian, M. & Zolkewitz, M.A. (1995) Heparin causes platelet dysfunction and induces fibrinolysis before cardiopulmonary bypass. *Ann.Thorac.Surg.*, 60, 1008-1014.

- Klinger, M.H.** (1996) The storage lesion of platelets: Ultrastructural and functional aspects. *Ann.Hematol.*, 73, 103-112.
- Lazarus, A.H.,** Song, S. & Crow, A.R. (2003) Understanding Platelet Function Through Signal Transduktion. *Transfusion Med. Reviews*, 17, 45-56.
- Kolde, H.-J.** (1995) Hämostaseologie: Messung der Thrombozytenfunktionen. *MTA-Journal*, 10., 1002-1008
- Koolmann, J.** & Röhm, K.-H. (Hrsg.) (1998) Taschenatlas der Biochemie, 2. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Kretschmer, V.,** Schikor, B., Sohngen, D. & Dietrich, G. (1989) In vitro bleeding test - A simple method for the detection of aspirin effects on platelet function. *Thromb.Res.*, 56, 593-602.
- Kubanek, B.** (1999) Substitutionstherapie mit Thrombozyten.
<http://www.uni-ulm.de/~wfliegel/ARZT/THR/thrtxt.htm>.
- Kundu, S.K.,** Heilmann, E.J., Sio, R., Garcia, C., Davidson, R.M. & Ostgaard, R.A. (1995) Description of an in vitro platelet function analyzer - PFA-100. *Semin.Thromb.Hemost.*, 21 Suppl 2, 106-112.
- Kunicki, T.J.,** Tuccelli, M., Becker, G.A., & Aster, R.H. (1975) A study of variables affecting the quality of platelets stored at "room temperature". *Transfusion*, 15, 414-421.
- Longobardi-Givan, A.** (1992). A. Flow Cytometry - First Principles *Wiley Liss*, New York.
- Machin, S.J.,** Kelsey, H., Seghatchian, M.J., Warwick, R. & Mackie, I.J. (1995) Platelet transfusion. *Thromb.Haemost.*, 74, 246-252.
- Mammen, E.F.,** Comp, P.C., Gosselin, R., Greenberg, C., Hoots, W.K., Kessler, C.M., Larkin, E.C., Liles, D. & Nugent, D.J. (1998) PFA-100 system: A new method for assessment of platelet dysfunction. *Semin.Thromb.Hemost.*, 24, 195-202.

- Marshall,P.W.**, Williams,A.J., Dixon,R.M., Growcott,J.W., Warburton,S., Armstrong,J. & Moores,J. (1997) A comparison of the effects of aspirin on bleeding time measured using the Simplate method and closure time measured using the PFA-100, in healthy volunteers. *Br J Clin Pharmacol*, 44, 151-155.
- Michelson,A.D.**, Barnard,M.R., Khuri,S.F., Rohrer,M.J., MacGregor,H. & Valeri,C.R. (1999) The effects of aspirin and hypothermia on platelet function in vivo. *Br.J Haematol.*, 104, 64-68.
- Mitchell,S.G.**, Hawker,R.J., Turner,V.S., Hesslewood,S.R. & Harding,L.K. (1994) Effect of agitation on the quality of platelet concentrates. *Vox Sang.*, 67, 160-165.
- Möller,A.** (2004) Normalwerte für die Parameter des PFA 100. Institut für Transfusionsmedizin und Hämostaseologie – Universitätsblutbank, Klinikum Gießen – Marburg, Standort Marburg.
- Moog,R.**, Zeiler,T., Heuft,H.G., Stephan,B., Fischer,E.G., Kretschmer,V., Rodel-Spieker,R., Strasser,E. & Zingsem,J. (2003) Collection of WBC-reduced single-donor PLT concentrates with a new blood cell separator: Results of a multicenter study. *Transfusion*, 43, 1107-1114.
- Morgenstern,E.** (1998) Morphologie der Thrombozyten. In: Hämatoseologie; Molekulare und zelluläre Mechanismen, Pathophysiologie und Klinik (Hrsg.: Müller-Berghaus,G. & Pötsch,B.) *Springer-Verlag, Berlin, 3-14*
- Morgenstern,E.** (1978) Ultrastrukturelle Aspekte des in vivo aktivierten Plättchens. In: Prostaglandine und Plättchenfunktion, Methoden zur Erfassung einer gesteigerten Plättchenaktivität. (Hrsg.: Breddin, H.K.) 192-196, *Schattauer Verlag, Stuttgart*.
- Muller,T.H.**, Schmidt,S., Schunter,F. & Reil,G.H. (1997) Platelet aggregation in response to collagen and thrombin reliably detects the ingestion of low-dose aspirin. *Beitr.Infusionsther.Transfusionsmed.*, 34, 105-109.
- Müller-Eckhardt,C.** (1998) Therapie mit Thrombozyten. In: Transfusionsmedizin; Grundlagen - Therapie - Methodik (Hrsg.: Müller-Eckhardt,C., Kiefel,V.), *Springer-Verlag, Berlin, 3, 393-408*.

- Müller-Berghaus,G.** (1998) Physiologie des Hämostasesystems. In: Hämostaseologie; Molekulare und zelluläre Mechanismen, Pathophysiologie und Klinik (Hrsg.: Müller-Berghaus,G. & Pötsch,B.) *Springer-Verlag, Berlin*, 47-53
- Murphy,S.**, Kahn,R.A., Holme,S., Phillips,G.L., Sherwood,W., Davison,W. & Buchholz,D.H. (1982) Improved storage of platelets for transfusion in a new container. *Blood*, 60, 194-200.
- Murphy,S.**, Rebulli,P., Bertolini,F., Holme,S., Moroff,G., Snyder,E. & Stromberg,R. (1994) In vitro assessment of the quality of stored platelet concentrates. The BEST (Biomedical Excellence for Safer Transfusion) Task Force of the International Society of Blood Transfusion. *Transfus.Med.Rev.*, 8, 29-36.
- Musial,J.**, Niewiarowski,S., Hershock,D., Morinelli,T.A., Colman,R.W. & Edmunds,L.H. (1985) Loss of fibrinogen receptors from the platelet surface during simulated extracorporeal circulation. *J Lab Clin.Med.*, 105, 514-522.
- Mutschler,E.**, Geisslinger,G., Kroemer,H.K. & Schäfer-Korting,M. (2001) Arzneimittelwirkungen - Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie. *Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbh Stuttgart*, 3.Auflage.
- Nair,S.**, Kulkarni,S., Camoens,H.M., Ghosh,K. & Mohanty,D. (2001) Changes in platelet glycoprotein receptors after smoking - A flow cytometric study. *Platelets.*, 12, 20-26.
- Nebe,C.T.** (1996) Durchflußzytometrische Meßtechnik und Datenauswertung *Infusionsther Transfusionsmed* 23, 111-113.
- Norol,F.**, Bierling,P., Roudot-Thoraval,F., Le Coeur,F.F., Rieux,C., Lavaux,A., Kuentz,M. & Duedari,N. (1998) Platelet transfusion: A dose-response study. *Blood*, 92, 1448-1453.
- Ogawa,A.**, Ishikawa,Y. & Sasakawa,S. (1988) Effects of changes in intracellular pH induced by platelet storage and treatment with monovalent cation ionophores on platelet functions. *Thromb.Res.*, 52, 369-379.

- Owens,M.,** Holme,S., Heaton,A., Sawyer,S. & Cardinali,S. (1992) Post-transfusion recovery of function of 5-day stored platelet concentrates. *Br.J.Haematol.*, 80, 539-544.
- Paglieroni,T.G.,** Janatpour,K., Gosselin,R., Crocker,V., Dwyre,D.M., MacKenzie,M.R., Holland,P.V. & Larkin,E.C. (2004) Platelet function abnormalities in qualified whole-blood donors: Effects of medication and recent food intake. *Vox Sang.*, 86, 48-53.
- Patscheke,H.** & Ruf,A. (2000) Thrombozyten - Funktionstests. In: Labor und Diagnose (Hrsg.: Thomas,L.), *TH-Books GmbH* , 5, 610-612.
- Pearson,D.A.,** Paglieroni,T.G., Rein,D., Wun,T., Schramm,D.D., Wang,J.F., Holt,R.R., Gosselin,R., Schmitz,H.H. & Keen,C.L. (2002) The effects of flavanol-rich cocoa and aspirin on ex vivo platelet function. *Thromb.Res.*, 106, 191-197
- Rao,G.H.,** Escolar,G. & White,J.G. (1993) Biochemistry, physiology and function of platelets stored as concentrates. *Transfusion*, 33, 766-778.
- Rao,G.H.** & White,J.G. (1985) Disaggregation and reaggregation of 'irreversibly' aggregated platelets: A method for more complete evaluation of anti-platelet drugs. *Agents Actions*, 16, 425-434.
- Rein,D.,** Paglieroni,T.G., Wun,T., Pearson,D.A., Schmitz,H.H., Gosselin,R. & Keen,C.L. (2000) Cocoa inhibits platelet activation and function. *Am.J.Clin.Nutr.*, 72, 30-35.
- Rinder,C.S.,** Mathew,J.P., Rinder,H.M., Bonan,J., Ault,K.A. & Smith,B.R. (1991) Modulation of platelet surface adhesion receptors during cardiopulmonary bypass. *Anesthesiology*, 75, 563-570.
- Rinder,C.S.,** Student,L.A., Bonan,J.L., Rinder,H.M. & Smith,B.R. (1993) Aspirin does not inhibit adenosine diphosphate-induced platelet alpha-granule release. *Blood*, 82, 505-512.
- Rinder,H.M.,** Murphy,M., Mitchell,J.G., Stocks,J., Ault,K.A. & Hillman,R.S. (1991) Progressive platelet activation with storage: Evidence for shortened survival of activated platelets after transfusion. *Transfusion*, 31, 409-414.

- Rinder,H.M.**, Smith, B.R. (2003) In vitro Evaluation of stored platelets: Is there hope for predicting posttransfusion platelet survival and function, *Transfusion*, 43, 2-6.
- Rinder,H.M.**, Snyder,E.L., Tracey,J.B., Dincecco,D., Wang,C., Baril,L. Rinder,C.S. & Smith,B.R. (2003) Reversibility of severe metabolic stress in stored platelets after in vitro plasma rescues or in vivo transfusion: Resoration of secretory function and maintenance of platelet survival. *Transfusion*, 43, 1230-1237.
- Samra,S.K.**, Harrison,R.L., Bee,D.E. & Valero,V. (1991) A study of aspirin induced changes in bleeding time, platelet aggregation and Sonoclot coagulation analysis in humans. *Ann.Clin.Lab Sci.*, 21, 315-327.
- Schiffer,C.A.**, Lee,E.J., Ness,P.M. & Reilly,J. (1986) Clinical evaluation of platelet concentrates stored for one to five days. *Blood*, 67, 1591-1594.
- Schmitz,G.R.**, Rothe,G. (Hrsg.) (1994) Durchflußzytometrie in der klinischen Zelldiagnostik. *Schattauer-Verlag*, Stuttgart
- Schmitz, G.**, Rothe, G., Ruf, A., Barlage, St., Tschöpe, D., Clemetson, K.J., Goodall, A.H., Michelson, A.D., Nurden, A.T. & Shankey, T.V. for the European Working Group on Clinical Cell Analysis (1998) Consensus Protocol for the Flow Cytometric Charakterisation of Platelet Function, *Thromb. Haemost.*, 79, 885-896.
- Sharon,R.**, Kidroni,G. & Michel,J. (1980) Presence of aspirin in blood units. *Vox Sang.*, 38, 284-287.
- Shattil,S.J.**, Hoxie,J.A., Cunningham,M. & Brass,L.F. (1985) Changes in the platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa complex during platelet activation. *J.Biol.Chem.*, 260, 11107-11114.
- Sigma Diagnostics** (1994) Platelet Aggregation Reagents: Collagen, ADP, Epinephrin. St. Louis; USA, *Sigma Chemical Company*.
- Sims,P.J.**, Ginsberg,M.H., Plow,E.F. & Shattil,S.J. (1991) Effect of platelet activation on the conformation of the plasma membrane glycoprotein IIb-IIIa complex. *J.Biol.Chem.*, 266, 7345-7352.

Snyder,E., Rinder,H.M., Baril,L., Dincecco, D. & Smith,B.R. (2000) In vitro and radiolabeled in vivo evaluation of platelet storage lesion reversibility using a hypoxic platelet model. *Blood* 96 (Supp I), 658a.

Snyder,E.L. (1992) Activation during preparation and storage of platelet concentrates. *Transfusion*, 32, 500-502.

Solberg,C., Holme,S. & Little,C. (1986) Morphological changes associated with pH changes during storage of platelet concentrates in first-generation 3-day container. *Vox Sang.*, 50, 71-77.

Wenger,R.K., Lukasiewicz,H., Mikuta,B.S., Niewiarowski,S. & Edmunds,L.H. (1989) Loss of platelet fibrinogen receptors during clinical cardiopulmonary bypass. *J Thorac.Cardiovasc.Surg.*, 97, 235-239.

Wun,T., Paglieroni,T., Sazama,K. & Holland,P. (1992) Detection of plasmapheresis-induced platelet activation using monoclonal antibodies. *Transfusion*, 32, 534-540.

7 Abkürzungsverzeichnis

ACD	Acid Citrat Dextrose
ACVB	Aortokoronare Venenbypasschirurgie
ADP	Adenosindiphosphat
ASS	Acetylsalicylsäure
bzw	Beziehungsweise
CD	Cluster of Differentiation
CO ₂	Kohlendioxid
COX	Cyclooxygenase
CPD	Citrate Phosphate Dextrose
CPDA -1	Citrate Phosphate Dextrose Adenine
DIC	Disseminierte Intravasale Gerinnung
DG	Diacylglycerin
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Fg	Fibrinogen
GP	Glykoprotein
h	Stunden
HCl	Salzsäure
HPETE	Hydroxy-Peroxy-Eicosatetransäuren
KHK	Koronare Herzkrankheit
L	Liter
LDH	Laktatdehydrogenase
LTC ₄	Cysteinyl-Leukotrien C ₄
LTD ₄	Cysteinyl-Leukotrien D ₄
LTE ₄	Cysteinyl-Leukotrien E ₄
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimol
mm	Millimeter
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumlauge
nl	Nanoliter
nm	Nanometer

µl	Mikroliter
OCS	Open Canalicular System
PAP	Plättchen Armes Plasma
pCO ₂	Kohlendioxidpartialdruck
pO ₂	Sauerstoffpartialdruck
PDGF	Platelet Derived Growth Faktor
PGG ₂	Hydroxyendoperoxid
PGI	Prostacyclin
PLT	Thrombozyten
PRP	Plättchen Reiches Plasma
PTCA	Perkutane Transluminale Koronare Angioplastie
RBC	Erythrozyten
TXA ₂	Thromboxan A ₂
TXB ₂	Thromboxan B ₂
TK	Thrombozytenkonzentrat
s	Sekunden
WB	Vollblut

8 Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung 1-1:</i> Schematisch dargestellte primäre Hämostase nach (Mutschler et al. 2001)	8
<i>Abbildung 1-2:</i> Eingreifen von ASS in die Synthese von Thromboxanen und Prostaglandinen nach (Müller-Berghaus 1998)	13
<i>Abbildung 2-1:</i> Schematisch dargestellte Separationskammer C5 nach Fresenius HemoCare 2001	19
<i>Abbildung 3-1:</i> Aggregation vor (A) und nach (B) der Thrombozytapherese	42
<i>Abbildung 3-2:</i> Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) des Aktivitätsmarkers CD 62p (A) und Fibrinogenbindefähigkeit des GPIIb/IIIa (B) vor der Thrombozytenapherese	43
<i>Abbildung 3-3:</i> Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) des Aktivierungsmarkers CD 62p (A) und Fibrinogenbindefähigkeit des GPIIb/IIIa (B) nach der Thrombozytenapherese	44
<i>Abbildung 3-4:</i> Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der CD 41-Expression auf der Thrombozytenoberfläche vor und nach der Thrombozytenapherese.....	44
<i>Abbildung 3-5:</i> Verlauf der mittleren Thrombozytenkonzentration im Thrombozytapheresekonzentrat während der Lagerungsdauer	45
<i>Abbildung 3-6:</i> Darstellung der Stoffwechselfparameter pH (A), Laktat (B), LDH (C) und Morphologie Score (D) am Herstellungstag (Tag 1), 3.Tag und 5.Tag nach Herstellung	46
<i>Abbildung 3-7:</i> Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) von CD 62p, Fibrinogenbindefähigkeit und CD 41 am Herstellungstag und während der Lagerungsdauer im nativen Zustand (A, C, E) sowie nach Stimulation mit TRAP-6 (B, D, F)	48
<i>Abbildung 3-8:</i> Entwicklung des Aktivierungsmarkers CD 62p auf der Oberfläche der gelagerten, nicht mit TRAP -6 stimulierten Thrombozyten im Laufe der Lagerungsdauer.....	49
<i>Abbildung 3-9:</i> Thrombozytenaggregation aus den Thrombozytapheresekonzentraten der Gruppe A (ASS) und B am Herstellungstag (Tag 1) sowie am 3. Tag und 5. Tag der Lagerungsdauer	50

9 Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 2-1: Alter und Geschlechtsverteilung der Spender</i>	17
<i>Tabelle 2-2: Parameter am Zellseparator</i>	19
<i>Tabelle 2-3: Untersuchungen aus Vollblut, dass vor der Zellseparation gewonnen wurde.....</i>	21
<i>Tabelle 2-4: Untersuchungen aus Vollblut, dass nach der Zellseparation gewonnen wurde.....</i>	21
<i>Tabelle 2-5: Überblick über die am Thrombozytapheresekonzentrat durchgeführten Untersuchungen am Herstellungstag, sowie am 3. und 5. Tag nach Herstellung</i>	22
<i>Tabelle 2-6: Aggreganzen: Bezugsquelle und Endkonzentration.....</i>	27
<i>Tabelle 2-7: Verwendete Antikörper</i>	31
<i>Tabelle 2-8: Pipettierschema nicht stimulierte, fixierte Probe (A)</i>	32
<i>Tabelle 2-9: Pipettierschema stimulierte, nichtfixierte Probe (B)</i>	33
<i>Tabelle 2-10: Einteilung der Thrombozyten und Multiplikationsfaktor.....</i>	35
<i>Tabelle 3-1: Auflistung der am PFA ermittelten Verschlusszeiten. Der obere Grenzwert für die Verschlusszeit lag bei 300 sek.....</i>	39
<i>Tabelle 3-2: Mittelwerte der am PFA ermittelten Verschlusszeiten.....</i>	40
<i>Tabelle 3-3: Separationsbeeinflussende Blutparameter.....</i>	40
<i>Tabelle 3-4: Separationsparameter.....</i>	41
<i>Tabelle 3-6: Aggregation aus Blut vor und nach der Thrombozytapherese</i>	41
<i>Tabelle 3-7: Expression von CD 41, CD 62p und Fibrinogenbindefähigkeit auf der Thrombozytenoberfläche vor und nach der Thrombozytapherese, nativ und nach Stimulation mit TRAP-6 (MFI = Mittlere Fluoreszenzintensität)</i>	43
<i>Tabelle 3-8: Mittelwerte der Anzahl und Konzentration der Thrombozyten, Leukozyten und Erythrozyten im Thrombozytapheresekonzentrat sowie Gewicht des Thrombozytapheresekonzentrats am Herstellungstag (Tag 1).....</i>	45
<i>Tabelle 10-1: Überblick über Alter (in Jahren) und Geschlecht (M = Männlich, W= Weiblich) der Sender, sowie die vom Spenderblut am PFA ermittelten Verschlusszeiten in Sekunden (s) mit (Gruppe A) und ohne (Gruppe B) ASS-Einnahme.....</i>	80

<i>Tabelle 10-2:</i> Hämatologieparameter (Hämoglobingehalt (Hb in g/L), Hämatokrit (Hkt in L/L) und Thrombozytenzahl (PLT pro nl)) des Spenderbluts der Gruppen A (ASS) und B vor der Spende	81
<i>Tabelle 10-3:</i> Hämatologieparameter (Hämoglobingehalt (Hb in g/L), Hämatokrit (Hkt in L/L) und Thrombozytenzahl (PLT pro nl)) des Spenderbluts der Gruppen A (ASS) und B nach der Spende.....	81
<i>Tabelle 10-4:</i> Aggregation (in %) mit den Reagenzien ADP 2, ADP 4, Kollagen und Arachidonsäure aus Spenderblut der Gruppe A (ASS) vor und nach der Zellseparation.....	82
<i>Tabelle 10-5:</i> Aggregation (in %) mit den Reagenzien ADP 2, ADP 4, Kollagen und Arachidonsäure aus Spenderblut der Gruppe B vor und nach der Zellseparation	82
<i>Tabelle 10-6:</i> Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) für CD 41 an unstimulierten (nativ) und mit TRAP-6 stimulierten (TRAP-6) Thrombozyten des Spenderbluts der Gruppe A (ASS) und Gruppe B vor und nach der Zellseparation	83
<i>Tabelle 10-7:</i> Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) für CD 62p an unstimulierten (nativ) und mit TRAP-6 stimulierten (TRAP-6) Thrombozyten des Spenderbluts der Gruppe A (ASS) und Gruppe B vor und nach der Zellseparation	83
<i>Tabelle 10-8:</i> Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) für Fibrinogen an unstimulierten (nativ) und mit TRAP-6 stimulierten (TRAP-6) Thrombozyten des Spenderbluts der Gruppe A (ASS) und Gruppe B vor und nach der Zellseparation	84
<i>Tabelle 10-9:</i> Separationszeit (in min) und prozessiertes Blutvolumen (in ml) der Gruppe A (ASS) und Gruppe B	84
<i>Tabelle 10-10:</i> Volumen (Tk-Vol.), Gewicht (Tk-Gewicht) und ACD-Gehalt der Thrombozytapheresekonzentrate der Gruppe A (ASS) und Gruppe B.....	85
<i>Tabelle 10-11:</i> Im Thrombozytapheresekonzentrat enthaltene Thrombozytenzahl (PLT), Leukozytenzahl (Leuko) und Erythrozytenzahl (Ery) pro µl Thrombozytapheresekonzentrat der Gruppe A (ASS) und Gruppe B am Tag 1	85
<i>Tabelle 10-12:</i> Stoffwechselfparameter (pH-Wert, LDH (in U/L) und Laktat (in mmol/L)) in den Thrombozytapheresekonzentraten der Gruppe A (ASS) und Gruppe B am Tag 1	86
<i>Tabelle 10-13:</i> Thrombozytenfunktion (Swirling, Morphologiescore und Aggregation (in %)) in den Thrombozytapheresekonzentraten der Gruppe A (ASS) und Gruppe B am Tag 1	86

<i>Tabelle 10-14:</i> Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) für CD 41 an unstimulierten (nativ) und mit TRAP-6 stimulierten (TRAP-6) Thrombozyten des Thrombozytapheresekonzentrats der Gruppe A (ASS) und Gruppe B am Tag 1	87
<i>Tabelle 10-15:</i> Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) für CD62p an unstimulierten (nativ) und mit TRAP-6 stimulierten (TRAP-6) Thrombozyten des Thrombozytapheresekonzentrats der Gruppe A (ASS) und Gruppe B am Tag 1	87
<i>Tabelle 10-16:</i> Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) für Fibrinogen an unstimulierten (nativ) und mit TRAP-6 stimulierten (TRAP-6) Thrombozyten des Thrombozytenkonzentrats der Gruppe A (ASS) und Gruppe B am Tag 1	88
<i>Tabelle 10-17:</i> Im Thrombozytapheresekonzentrat enthaltene Thrombozytenzahl (PLT) pro μ l Thrombozytapheresekonzentrat der Gruppe A (ASS) und Gruppe B am Tag 3.....	88
<i>Tabelle 10-18:</i> Stoffwechselfparameter (pH-Wert, LDH (in U/L) und Laktat (in mmol/L)) in den Thrombozytapheresekonzentraten der Gruppe A (ASS) und Gruppe B am Tag 3	89
<i>Tabelle 10-19:</i> Thrombozytenfunktion (Swirling, Morphologiescore und Aggregation (in %)) in den Thrombozytapheresekonzentraten der Gruppe A (ASS) und Gruppe B am Tag 3	89
<i>Tabelle 10-20:</i> Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) für CD 41 an unstimulierten (nativ) und mit TRAP-6 stimulierten (TRAP-6) Thrombozyten des Thrombozytapheresekonzentrats der Gruppe A (ASS) und Gruppe B am Tag 3	90
<i>Tabelle 10-21:</i> Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) für CD 62p an unstimulierten (nativ) und mit TRAP-6 stimulierten (TRAP-6) Thrombozyten des Thrombozytapheresekonzentrats der Gruppe A (ASS) und Gruppe B am Tag 3.....	90
<i>Tabelle 10-22:</i> Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) für Fibrinogen an unstimulierten (nativ) und mit TRAP-6 stimulierten (TRAP-6) Thrombozyten des Thrombozytapheresekonzentrats der Gruppe A (ASS) und Gruppe B am Tag 3.....	91
<i>Tabelle 10-23:</i> Im Thrombozytapheresekonzentrat enthaltene Thrombozytenzahl (PLT) pro μ L Thrombozytapheresekonzentrat der Gruppe A (ASS) und Gruppe B am Tag 5.....	91
<i>Tabelle 10-24</i> Stoffwechselfparameter (pH-Wert, LDH (in U/L) und Laktat (in mmol/L)) in den Thrombozytapheresekonzentraten der Gruppe A (ASS) und Gruppe B am Tag 5	92

<i>Tabelle 10-25: Thrombozytenfunktion (Swirling, Morphologiescore und Aggregation (in %)) in den Thrombozytapheresekonzentraten der Gruppe A (ASS) und Gruppe B am Tag 5</i>	<i>92</i>
<i>Tabelle 10-26: Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) für CD 41 an unstimulierten (nativ) und mit TRAP-6 stimulierten (TRAP-6) Thrombozyten des Thrombozytapheresekonzentrats der Gruppe A (ASS) und Gruppe B am Tag 5</i>	<i>93</i>
<i>Tabelle 10-27: Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) für CD62p an unstimulierten (nativ) und mit TRAP-6 stimulierten (TRAP-6) Thrombozyten des Thrombozytapheresekonzentrats der Gruppe A (ASS) und Gruppe B am Tag 5</i>	<i>93</i>
<i>Tabelle 10-28: Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) für Fibrinogen an unstimulierten (nativ) und mit TRAP-6 stimulierten (TRAP-6) Thrombozyten des Thrombozytapheresekonzentrats der Gruppe A (ASS) und Gruppe B am Tag 5</i>	<i>94</i>

10 Anhang

10.1 Daten

10.1.1 Untersuchungen aus Spenderblut

Tabelle 10-1: Überblick über Alter (a in Jahren) und Geschlecht (M = Männlich, W= Weiblich) der Sender, sowie die vom Spenderblut am PFA ermittelten Verschlusszeiten in Sekunden (s) mit (Gruppe A) und ohne (Gruppe B) ASS-Einnahme

Spender	Alter (a)	Geschlecht	Verschlusszeit (s)	
			Gruppe A	Gruppe B
1	38	M	164	105
2	40	M	155	83
3	28	M	192	159
4	48	M	>300	105
5	42	W	>300	95
6	32	W	>300	92
7	39	M	>300	149
8	27	M	135	99
9	25	M	149	92
10	43	M	>300	82

Tabelle 10-2: Hämatologieparameter (Hämoglobingehalt (Hb in g/L), Hämatokrit (Hkt in L/L) und Thrombozytenzahl (PLT pro nl)) des Spenderbluts der Gruppen A (ASS) und B vor der Spende

Spender	Gruppe A			Gruppe B		
	Hb (g/L)	Hkt (L/L)	PLT (/nl)	Hb (g/L)	Hkt (L/L)	PLT (/nl)
1	148	40,6	210	145	39,1	201
2	155	46,2	340	157	46,1	346
3	136	39,9	347	138	40,1	357
4	147	42,8	219	145	41,9	210
5	138	39,9	314	139	40,1	292
6	114	34,3	189	13,2	38,6	175
7	148	41,6	213	137	39,1	203
8	164	46,2	238	162	45,8	217
9	157	45,1	300	13,6	46,5	311
10	158	45,2	200	150	43,7	198

Tabelle 10-3: Hämatologieparameter (Hämoglobingehalt (Hb in g/L), Hämatokrit (Hkt in L/L) und Thrombozytenzahl (PLT pro nl)) des Spenderbluts der Gruppen A (ASS) und B nach der Spende

Spender	Gruppe A			Gruppe B		
	Hb (g/L)	Hkt (L/L)	PLT (/nl)	Hb (g/L)	Hkt (L/L)	PLT (/nl)
1	136	38,1	163	140	37,7	153
2	150	45,0	273	154	45,6	279
3	133	38,9	280	135	39,7	308
4	139	40,4	152	141	40,1	144
5	128	37,4	237	132	38,4	215
6	109	32,4	129	123	36,0	109
7	135	38,8	154	134	28,1	142
8	165	47,3	176	166	46,8	162
9	154	45,3	241	155	44,3	244
10	143	44,0	138	145	41,8	134

Tabelle 10-4: Aggregation (in %) mit den Reagenzien ADP 2, ADP 4, Kollagen und Arachidonsäure aus Spenderblut der Gruppe A (ASS) vor und nach der Zellseparation

Spender	ADP 2 (%)		ADP 4 (%)		Kollagen (%)		Arachidonsäure (%)	
	Vor	Nach	Vor	Nach	Vor	Nach	Vor	Nach
1	43	40	33	52	62	56	10	8
2	38	31	50	45	62	79	12	12
3	53	34	54	42	65	64	11	11
4	40	37	59	57	70	58	11	13
5	48	44	61	53	61	58	11	9
6	27	64	55	75	70	80	7	10
7	29	25	38	35	57	58	10	6
8	46	26	47	52	67	74	8	10
9	41	28	58	44	51	52	10	10
10	23	13	45	36	64	42	6	6

Tabelle 10-5: Aggregation (in %) mit den Reagenzien ADP 2, ADP 4, Kollagen und Arachidonsäure aus Spenderblut der Gruppe B vor und nach der Zellseparation

Spender	ADP 2 (%)		ADP 4 (%)		Kollagen (%)		Arachidonsäure (%)	
	Vor	Nach	Vor	Nach	Vor	Nach	Vor	Nach
1	80	71	78	70	79	82	84	77
2	76	83	89	82	80	84	73	67
3	84	83	77	81	77	85	93	84
4	69	75	83	78	73	80	76	79
5	56	70	82	79	72	75	75	68
6	67	82	66	70	76	82	77	74
7	63	65	77	72	78	70	28	55
8	90	83	76	84	82	78	82	74
9	77	85	76	79	76	70	75	73
10	76	68	69	65	65	65	45	23

Tabelle 10-6: Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) für CD 41 an unstimulierten (nativ) und mit TRAP-6 stimulierten (TRAP-6) Thrombozyten des Spenderbluts der Gruppe A (ASS) und Gruppe B vor und nach der Zellseparation

	CD 41 (MFI)							
	Gruppe A				Gruppe B			
	Vor der Spende		Nach der Spende		Vor der Spende		Nach der Spende	
	Nativ	TRAP-6	Nativ	TRAP-6	Nativ	TRAP-6	Nativ	TRAP-6
1	632,00	442,63	316,00	455,95	546,00	339,00	469,76	595,22
2	398	504,69	383,2	429,52	382,68	393,28	346,35	379,17
3	549	631,62	498,6	493,26	389,62	104,45	341,35	462,28
4	596	607,00	442,42	430,98	450,01	582,15	385,28	526,71
5	335,27	265,45	371,37	336,06	512,4	553,55	462,59	486,92
6	801,02	1060,82	658,46	921,86	535,08	637,9	439,78	593,96
7	491,22	424,47	448,53	339,72	486,69	424,42	387,55	324,714
8	494,23	598,31	455,03	422,73	614,62	705,26	393,71	326,37
9	695,25	578,84	484,44	644,31	421,81	583,78	396,91	504,95
10	336,49	283,87	250,29	252,29	409,24	393,42	307,82	360,77

Tabelle 10-7: Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) für CD 62p an unstimulierten (nativ) und mit TRAP-6 stimulierten (TRAP-6) Thrombozyten des Spenderbluts der Gruppe A (ASS) und Gruppe B vor und nach der Zellseparation

	CD 62 (MFI)							
	Gruppe A				Gruppe B			
	Vor der Spende		Nach der Spende		Vor der Spende		Nach der Spende	
	Nativ	TRAP-6	Nativ	TRAP-6	Nativ	TRAP-6	Nativ	TRAP-6
1	7,64	15,89	3,21	8,91	4,56	4,6	3,16	21,34
2	14,26	26,78	1,95	16,67	1,94	10,06	3,1	11,97
3	2,82	13,29	3,87	17,87	2,88	14,9	3,62	18,76
4	2,05	10,1	2,31	9,15	3,94	17,97	2,88	17,59
5	3,36	5,60	3,50	3,85	2,03	7,07	3,94	8,51
6	2,21	65,79	6,29	56,76	6,65	33,48	2,49	29,42
7	3,83	13,31	22,01	9,37	9,22	14,76	2,29	10,3
8	4,53	9,06	2,68	4,69	3,54	9,94	2,23	14,56
9	5,15	16,27	2,66	25,25	2,35	23,69	2,13	8,93
10	2,33	7,00	5,21	7,97	2,78	7,23	1,95	6,18

Tabelle 10-8: Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) für Fibrinogen an unstimulierten (nativ) und mit TRAP-6 stimulierten (TRAP-6) Thrombozyten des Spenderbluts der Gruppe A (ASS) und Gruppe B vor und nach der Zellseparation

	Fibrinogen (MFI)							
	Gruppe A				Gruppe B			
	Vor der Spende		Nach der Spende		Vor der Spende		Nach der Spende	
	Nativ	TRAP-6	Nativ	TRAP-6	Nativ	TRAP-6	Nativ	TRAP-6
1	135,37	419,68	140,7	196,21	271	209,1	129,12	487,36
2	98,97	225,18	61,95	227,6	107,72	164,82	160,76	127,18
3	52,94	224,9	150,32	250,76	183,36	179,64	126,72	362,86
4	67,11	570,17	182,78	201,11	83,34	326,97	186,36	694,36
5	118,11	165,21	216,15	161,21	79,08	375,86	112,37	180,87
6	153,52	550,79	386,85	620,66	90,4	254,23	139,3	401,95
7	234,16	309,69	238,76	132,72	297,38	317,75	170,46	626,22
8	626,95	456,16	338,44	654,45	164	520,59	175,33	74,44
9	382,73	472,14	286,7	354,22	85,33	325,2	348,71	542,7
10	144,32	153,54	141,51	271,18	92,4	245,17	205,4	181,56

10.1.2 Separationsparameter

Tabelle 10-9: Separationszeit (in min) und prozessiertes Blutvolumen (in ml) der Gruppe A (ASS) und Gruppe B

Spender	Gruppe A		Gruppe B	
	Separationszeit (min)	Prozessiertes Blutvolumen (ml)	Separationszeit (min)	Prozessiertes Blutvolumen (ml)
1	57,00	3144	56,00	3149
2	34,00	2069	33,00	1985
3	33,00	2018	31,00	1916
4	62,00	3240	67,00	3495
5	47,00	2311	49,00	2418
6	78,00	3580	95,00	3907
7	55,00	3375	57,00	3522
8	56,00	2974	67,00	3462
9	41,00	2403	36,00	2204
10	66,00	3341	69,00	3553

10.1.3 Untersuchungen aus dem Thrombozytapheresekonzentrat

10.1.3.1 Herstellungstag (Tag 1)

Tabelle 10-10: Volumen (Tk-Vol.), Gewicht (Tk-Gewicht) und ACD-Gehalt der Thrombozytapheresekonzentrate der Gruppe A (ASS) und Gruppe B

Spender	Gruppe A			Gruppe B		
	Tk-Vol. (ml)	Tk-Gewicht (g)	ACD-Gehalt (ml)	Tk-Vol. (ml)	Tk-Gewicht (g)	ACD-Gehalt (ml)
1	307,00	299,00	55,00	295,00	299,00	54,00
2	296,00	299,00	37,00	302,00	299,00	68,00
3	288,00	300,00	55,00	297,00	299,00	55,00
4	294,00	299,00	60,00	289,00	300,00	58,00
5	296,00	299,00	56,00	295,00	299,00	57,00
6	277,00	299,00	43,00	285,00	300,00	54,00
7	292,00	299,00	59,00	291,00	300,00	54,00
8	294,00	299,00	68,00	298,00	299,00	67,00
9	294,00	299,00	68,00	297,00	299,00	70,00
10	300,00	299,00	66,00	295,00	299,00	57,00

Tabelle 10-11: Im Thrombozytapheresekonzentrat enthaltene Thrombozytenzahl (PLT), Leukozytenzahl (Leuko) und Erythrozytenzahl (Ery) pro μl Thrombozytapheresekonzentrat der Gruppe A (ASS) und Gruppe B am Tag 1

	Gruppe A			Gruppe B		
	PLT $\times 10^3/\mu\text{l}$	Leuko/ μl	Ery/ μl	PLT $\times 10^3/\mu\text{l}$	Leuko/ μl	Ery/ μl
1	932	0	400	915	0	200
2	1251	0	0	1158	0,8	0
3	1078	0,8	600	1158	0	600
4	1233	0	200	1220	0	0
5	1154	0	200	1188	0	200
6	1028	1,6	3600	919	0	800
7	1032	0,8	200	1078	0,8	400
8	1134	0	0	1069	0	0
9	1175	0	400	1038	0	200
10	1084	0	200	1125	0	200

Tabelle 10-12: Stoffwechselfparameter (pH-Wert, LDH (in U/L) und Laktat (in mmol/L)) in den Thrombozytapheresekonzentraten der Gruppe A (ASS) und Gruppe B am Tag 1

Spender	Gruppe A			Gruppe B		
	pH	LDH (U/L)	Laktat (mmol/L)	pH	LDH (U/L)	Laktat (mmol/L)
1	7,18	117	1,0	7,14	152	1,0
2	7,05	103	1,3	7,07	105	1,1
3	7,17	113	1,4	7,12	106	1,2
4	7,17	63	1,6	7,04	74	2,1
5	7,1	101	1,0	7,11	109	1,4
6	7,07	131	2,0	7,07	180	2,0
7	7,06	106	1,2	7,08	118	1,5
8	7,08	116	1,6	7,03	120	1,7
9	7,15	102	1,2	7,11	106	1,5
10	7,15	111	1,3	7,04	107	1,8

Tabelle 10-13: Thrombozytenfunktion (Swirling, Morphologiescore und Aggregation (in %)) in den Thrombozytapheresekonzentraten der Gruppe A (ASS) und Gruppe B am Tag 1

Spender	Gruppe A			Gruppe B		
	Swirling	Morphologie	Aggregation (%)	Swirling	Morphologie	Aggregation (%)
1	++	335	37	++	338	80
2	++	341	44	++	340	78
3	++	332	58	++	346	81
4	++	319	14	++	348	81
5	++	346	41	++	326	63
6	+	306	57	++	322	32
7	++	338	28	++	347	71
8	++	351	19	++	351	68
9	++	332	41	++	340	70
10	++	349	10	++	351	41

Tabelle 10-14: Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) für CD 41 an unstimulierten (nativ) und mit TRAP-6 stimulierten (TRAP-6) Thrombozyten des Thrombozytapheresekonzentrats der Gruppe A (ASS) und Gruppe B am Tag 1

Spender	CD 41 (MFI)			
	Gruppe A		Gruppe B	
	Nativ	TRAP-6	Nativ	TRAP-6
1	395	325,38	446,04	411,9
2	394,53	277,98	332,67	280,68
3	463,73	322,39	371	272,97
4	453,42	303,09	440,2	295,03
5	333,69	236,37	339,49	251,92
6	539,26	407,49	671,5	485,93
7	415,45	257,81	393,55	293,56
8	365,15	243,33	393,71	326,37
9	442,65	320,25	451,98	498,19
10	271,39	212,88	377,36	326,83

Tabelle 10-15: Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) für CD62p an unstimulierten (nativ) und mit TRAP-6 stimulierten (TRAP-6) Thrombozyten des Thrombozytapheresekonzentrats der Gruppe A (ASS) und Gruppe B am Tag 1

Spender	CD 62p (MFI)			
	Gruppe A		Gruppe B	
	Nativ	TRAP-6	Nativ	TRAP-6
1	3,44	7,9	2,53	17,34
2	2,53	5,81	3,88	30,55
3	3,84	7,31	2,03	13,65
4	2,65	3,44	2,17	5,48
5	1,99	2,42	2,73	3,43
6	3,34	3,96	6,29	23,13
7	4,56	4,47	3,91	18,54
8	2,11	4,19	2,23	14,56
9	1,86	12,03	2,18	35,95
10	4,49	6,17	7,12	17,97

Tabelle 10-16: Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) für Fibrinogen an unstimulierten (nativ) und mit TRAP-6 stimulierten (TRAP-6) Thrombozyten des Thrombozytenkonzentrats der Gruppe A (ASS) und Gruppe B am Tag 1

Spender	Fibrinogen (MFI)			
	Gruppe A		Gruppe B	
	Nativ	TRAP-6	Nativ	TRAP-6
1	95,21	98,54	95,17	109,62
2	94,86	90,75	80,4	98,12
3	145,5	177,27	43,84	294,64
4	99,35	66,86	46,00	87,60
5	44,93	55,03	100,14	63,11
6	244,15	91,15	328,02	264,24
7	81,81	48,97	87,02	111,43
8	217,04	100,9	175,33	74,44
9	22,4	172,03	158,51	164,09
10	56,00	83,93	315,11	222,97

10.1.3.2 3. Tag nach Herstellung (Tag 3)

Tabelle 10-17: Im Thrombozytapheresekonzentrat enthaltene Thrombozytenzahl (PLT) pro µl Thrombozytapheresekonzentrat der Gruppe A (ASS) und Gruppe B am Tag 3

Spender	PLT x10 ³ /µl	
	Gruppe A	Gruppe B
1	911	931
2	1240	1168
3	1070	1162
4	1090	1286
5	1157	1138
6	1018	913
7	1028	1101
8	1231	1069
9	986	1165
10	1050	1082

Tabelle 10-18: Stoffwechselfparameter (pH-Wert, LDH (in U/L) und Laktat (in mmol/L)) in den Thrombozytapheresekonzentraten der Gruppe A (ASS) und Gruppe B am Tag 3

Spender	Gruppe A			Gruppe B		
	pH	LDH (U/L)	Laktat (mmol/L)	pH	LDH (U/L)	Laktat (mmol/L)
1	7,33	134	2,6	7,36	154	2,6
2	7,21	103	3,0	7,26	109	2,3
3	7,28	117	4,0	7,29	107	3,7
4	7,28	70	4,0	7,22	75	4,4
5	7,29	105	2,9	7,31	115	3,0
6	7,10	131	6,4	7,17	198	4,7
7	7,24	108	3,3	7,14	126	5,4
8	7,26	123	3,2	7,26	122	3,1
9	7,27	109	3,2	7,30	110	3,3
10	7,21	114	4,4	7,15	108	5,1

Tabelle 10-19: Thrombozytenfunktion (Swirling, Morphologiescore und Aggregation (in %)) in den Thrombozytapheresekonzentraten der Gruppe A (ASS) und Gruppe B am Tag 3

Spender	Gruppe A			Gruppe B		
	Swirling	Morphologie	Aggregation (%)	Swirling	Morphologie	Aggregation (%)
1	++	292	6	++	279	31
2	++	275	3	++	272	7
3	++	272	7	++	291	18
4	++	260	12	++	292	8
5	++	280	5	++	280	17
6	+	282	10	+	270	30
7	++	292	5	++	277	17
8	++	308	8	++	307	3
9	++	281	8	++	280	6
10	++	303	6	++	297	7

Tabelle 10-20: Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) für CD 41 an unstimulierten (nativ) und mit TRAP-6 stimulierten (TRAP-6) Thrombozyten des Thrombozytapheresekonzentrats der Gruppe A (ASS) und Gruppe B am Tag 3

Spender	CD 41 (MFI)			
	Gruppe A		Gruppe B	
	Nativ	TRAP-6	Nativ	TRAP-6
1	603,08	336,34	492,64	300,90
2	523,41	237,95	327,43	236,75
3	425,92	242,63	510,00	281,72
4	584,74	298,31	516,00	299,29
5	411,94	244,97	500,98	302,08
6	645,43	683,57	685,19	402,97
7	536,12	402,56	414,02	330,94
8	467,92	240,18	483,98	258,07
9	423,83	267,37	436,75	297,37
10	389,65	207,21	542,55	288,06

Tabelle 10-21: Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) für CD 62p an unstimulierten (nativ) und mit TRAP-6 stimulierten (TRAP-6) Thrombozyten des Thrombozytapheresekonzentrats der Gruppe A (ASS) und Gruppe B am Tag 3

Spender	CD 62p (MFI)			
	Gruppe A		Gruppe B	
	Nativ	TRAP-6	Nativ	TRAP-6
1	3,15	7,52	5,12	16,19
2	4,85	4,55	2,62	5,99
3	2,92	10,39	2,96	4,74
4	6,10	7,90	5,14	7,79
5	2,78	5,21	3,69	5,79
6	3,06	73,62	4,64	13,42
7	7,59	31,04	4,26	10,28
8	5,69	7,38	2,25	5,87
9	3,74	6,77	3,28	11,01
10	5,43	12,16	3,04	9,54

Tabelle 10-22: Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) für Fibrinogen an unstimulierten (nativ) und mit TRAP-6 stimulierten (TRAP-6) Thrombozyten des Thrombozytapheresekonzentrats der Gruppe A (ASS) und Gruppe B am Tag 3

Spender	Fibrinogen (MFI)			
	Gruppe A		Gruppe B	
	Nativ	TRAP-6	Nativ	TRAP-6
1	125,99	89,53	281,19	139,19
2	142,22	133,97	93,47	36,43
3	50,88	93,03	62,5	93,45
4	89,36	93,35	171,2	164,67
5	126,47	221,45	87,95	61,95
6	170,3	327,26	440,4	118,61
7	111,65	322,18	112,89	137,29
8	124,88	35,03	291,91	257,27
9	88,44	203,43	379,28	49,92
10	55,78	41,719	220,6	81,12

10.1.3.3 5. Tag nach Herstellung (Tag 5)

Tabelle 10-23: Im Thrombozytapheresekonzentrat enthaltene Thrombozytenzahl (PLT) pro μ l Thrombozytapheresekonzentrat der Gruppe A (ASS) und Gruppe B am Tag 5

Spender	PLT $\times 10^3/\mu$ l	
	Gruppe A	Gruppe B
1	859	900
2	1191	1158
3	1054	1140
4	1044	1185
5	1119	1129
6	1005	868
7	1038	1071
8	1080	1037
9	1009	1163
10	1060	1099

Tabelle 10-24 Stoffwechselfparameter (pH-Wert, LDH (in U/L) und Laktat (in mmol/L)) in den Thrombozytapheresekonzentraten der Gruppe A (ASS) und Gruppe B am Tag 5

Spender	Gruppe A			Gruppe B		
	pH	LDH (U/L)	Laktat (mmol/L)	pH	LDH (U/L)	Laktat (mmol/L)
1	7,35	118	4,3	7,35	160	4,6
2	7,21	105	4,7	7,26	113	2,3
3	7,25	119	6,9	7,26	109	6,6
4	7,25	70	5,9	7,18	79	6,5
5	7,29	106	4,8	7,3	124	4,6
6	7,13	135	7,9	7,16	212	7,3
7	7,24	110	5,1	7,17	128	6,9
8	7,26	128	4,7	7,28	124	4,6
9	7,23	111	5,5	7,26	109	5,4
10	7,17	119	7,8	7,11	110	8,1

Tabelle 10-25: : Thrombozytenfunktion (Swirling, Morphologiescore und Aggregation (in %)) in den Thrombozytapheresekonzentraten der Gruppe A (ASS) und Gruppe B am Tag 5

Spender	Gruppe A			Gruppe B		
	Swirling	Morphologie	Aggregation (%)	Swirling	Morphologie	Aggregation (%)
1	++	235	15	+	240	56
2	++	243	7	++	249	17
3	+	223	17	+	255	13
4	+	241	8	++	257	11
5	++	244	3	++	256	7
6	+	255	16	+	249	15
7	++	249	4	++	233	7
8	+	249	4	++	250	11
9	+	248	5	++	232	10
10	+	248	8	+	250	6

Tabelle 10-26: Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) für CD 41 an unstimulierten (nativ) und mit TRAP-6 stimulierten (TRAP-6) Thrombozyten des Thrombozytapheresekonzentrats der Gruppe A (ASS) und Gruppe B am Tag 5

Spender	CD 41 (MFI)			
	Gruppe A		Gruppe B	
	Nativ	TRAP-6	Nativ	TRAP-6
1	618,88	330,99	679,19	459,07
2	472,00	310,01	496,43	238,00
3	483,47	308,00	386,16	274,84
4	578,93	329,76	452,9	287,91
5	363,22	191,94	427,44	257,40
6	684,69	426,87	430,56	490,15
7	452,17	249,53	446,84	325,01
8	507,91	260,82	481,89	270,93
9	568,79	328,03	457,01	276,06
10	371,80	241,44	462,58	166,97

Tabelle 10-27: Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) für CD62p an unstimulierten (nativ) und mit TRAP-6 stimulierten (TRAP-6) Thrombozyten des Thrombozytapheresekonzentrats der Gruppe A (ASS) und Gruppe B am Tag 5

Spender	CD 62p (MFI)			
	Gruppe A		Gruppe B	
	Nativ	TRAP-6	Nativ	TRAP-6
1	3,33	6,42	6,90	9,13
2	8,41	25,94	5,06	14,41
3	4,38	8,83	10,50	13,28
4	5,66	13,56	6,45	7,10
5	4,47	5,65	3,88	6,62
6	6,99	16,99	22,14	37,48
7	3,37	8,22	8,13	20,85
8	5,56	7,04	4,77	11,76
9	4,46	17,23	9,34	17,61
10	6,80	19,52	5,22	11,47

Tabelle 10-28: Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) für Fibrinogen an unstimulierten (nativ) und mit TRAP-6 stimulierten (TRAP-6) Thrombozyten des Thrombozytapheresekonzentrats der Gruppe A (ASS) und Gruppe B am Tag 5

Spender	Fibrinogen (MFI)			
	Gruppe A		Gruppe B	
	Nativ	TRAP-6	Nativ	TRAP-6
1	110,28	155,06	110,65	206,86
2	97,53	148,94	165,95	244,05
3	113,70	56,85	74,49	54,37
4	113,92	111,11	205,58	70,02
5	69,10	71,59	77,79	69,79
6	103,35	150,51	197,70	295,93
7	170,14	91,56	96,83	62,01
8	219,66	181,27	92,72	175,43
9	64,95	132,11	235,85	120,59
10	2112,6	115,8	104,67	235,96

10.2 Probandeninformation

Institut für Transfusionsmedizin
und Hämostaseologie
Universitäts-Blutbank



Direktor: Univ.-Prof. Dr. Volker Kretschmer

Philipps-Universität Marburg
K L I N I K U M

Anstalt des öffentlichen Rechts, Sitz Marburg

Studienleiter: Prof. Dr. V. Kretschmer

Conradstraße, 35043 Marburg

Telefon: 06421-2864491/2864492

----- Probandeninformation -----

EINFLUSS DER EINNAHME VON AZETYLSALIZYLSÄURE (ASS, ASPIRIN®) AUF
DIE QUALITÄT VON THROMBOZYTENKONZENTRATEN

Sehr geehrte Frau, Sehr geehrter Herr,

wie sie wissen, ist Ihre Thrombozytenspende notwendig zur Behandlung von Patienten, die einen Mangel an eigenen Thrombozyten z.B. durch eine Chemotherapie haben, und dadurch gefährdet sind, gefährliche Blutungen zu erleiden. Wenn ein Thrombozytenspender ASS eingenommen hat, kann die Funktionsfähigkeit seiner Thrombozyten eingeschränkt sein. Wie ausgeprägt diese Beeinträchtigung ist, soll durch die oben genannte Studie untersucht werden.

Wir möchten Sie daher bitten, an dieser Studie teilzunehmen.

Was bedeutet die Teilnahme an der Studie für Sie und was müssen Sie beachten?

Bei Ihnen wird an zwei Terminen im Abstand von 4 Wochen eine Thrombozytenspende am Zellseparator durchgeführt. Am Vorabend einer dieser Spenden müssen Sie eine Tablette mit 500 mg ASS einnehmen. Vor welcher Spende Sie die Tablette einnehmen müssen, wird von uns festgelegt. Um Wechselwirkungen mit anderen Medikamenten dürfen sie bis eine Woche vor der ersten Spende keine Medikamente, gleich welcher Art, insbesondere keine fiebersenkenden Mittel oder Schmerzmittel genommen haben. Eine Einnahme von ASS-haltigen Mitteln sollte in den letzten vier Wochen vor der ersten Spende unterbleiben.

Die Einnahme von ASS kann zu Nebenwirkungen führen. Die wichtigsten sind: Eine erhöhte Blutungsbereitschaft, Förderung von asthmatischen Beschwerden, Schädigung der Schleimhaut von Magen und Darm bis zur Geschwürbildung. Daher dürfen Sie nicht an der Studie teilnehmen, wenn bei Ihnen eine erhöhte Blutungsneigung, eine Asthma-Erkrankung oder eine Neigung zu Magen-/Darmerkrankungen besteht oder in der Vergangenheit bestanden hat!

Im Unterschied zu normalen Thrombozytapheresen, bei denen Ihre Spende bei Patienten angewendet wird, werden die beiden hier gewonnenen Spenden vollständig für Untersuchungen zur Beantwortung von Fragestellungen dieser Studie verwendet. Es werden Ihnen außerdem pro Spende mehr Blutproben als üblich in einer zusätzlichen Menge von ca. 10 ml abgenommen.

Die von Ihnen gewonnenen Daten werden in einer EDV gespeichert, nachdem sie anonymisiert wurden (d.h. die Untersuchungsdaten sind nicht mehr mit Ihren persönlichen Daten verbunden). Die Teilnahme an der o.g. Studie ist freiwillig. Sie

können jederzeit ohne Angabe von Gründen Ihre Einwilligung widerrufen bzw. zurückziehen, ohne dass das Verhältnis zu den Sie betreuenden Ärzten und Mitarbeitern in irgendeiner Weise leidet oder dieses nachteilige Folgen für weitere Blutspenden hat.

10.3 Einwilligungserklärung

Institut für Transfusionsmedizin
und Hämostaseologie
Universitäts-Blutbank



Philipps-Universität Marburg
KLINIKUM

Anstalt des öffentlichen Rechts, Sitz Marburg

Direktor: Univ.-Prof. Dr. Volker Kretschmer

Studienleiter: Prof. Dr. V. Kretschmer
Conradistraße, 35043 Marburg
Telefon: 06421-2864491/2864492

----- *Einwilligungserklärung* -----

EINFLUSS DER EINNAHME VON AZETYLSALISYLSÄURE (ASS, ASPIRIN®) AUF
DIE QUALITÄT VON THROMBOZYTENKONZENTRATEN

Ich (Name des Probanden/ der Probandin) _____ bin über
Wesen, Bedeutung und Tragweite der o.g. Studie aufgeklärt worden und habe die
Probandeninformation gelesen und verstanden. Bei mir bestehen, soweit mit bekannt
ist, keine Blutungsneigung und keine Neigungen zu Magen-/ Darmgeschwüren oder
Asthma. Alle Fragen zu dieser vorgesehen Studie wurden von Herrn/ Frau Dr. med.
_____ zu meiner Zufriedenheit beantwortet.

Ich hatte genügend Zeit für meine Entscheidung und bin bereit, an der o.g. Studie
teilzunehmen. Ich bin mit der im Rahmen der Studie erfolgenden Aufzeichnung von
Spendedaten und ihrer Weitergabe entsprechend der Probandeninformation
einverstanden.

Ich weiß, dass ich jederzeit und ohne Angabe von Gründen mein Einwilligung zur
Teilnahme an dieser Studie widerrufen kann, ohne dass mir daraus Nachteile
erwachsen.

Eine Ausfertigung der Probandeninformation und Einwilligungserklärung habe ich
erhalten.

Marburg, den _____

Marburg, den _____

Unterschrift des Arztes

Unterschrift des Probanden/
der Probandin

10.4 Danksagung

Mein Dank gilt Herrn PD Dr. Th. Zeiler, von dem ich während der Laborzeit und bei der Erstellung der Dissertation sehr viel lernen und dessen Unterstützung ich mir stets gewiss sein durfte. Herzlichen Dank auch besonders für die weit reichende und geduldige Korrektur der Arbeit.

Besonders danken möchte ich Herrn Prof. Dr. V. Kretschmer für die Überlassung des Themas und die Ermöglichung der Durchführung der Studie.

Für die gute Zusammenarbeit möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Instituts für Transfusionsmedizin und Hämostaseologie – Universitätsblutbank – bedanken.

Insbesondere gilt mein Dank Herrn Dr. R. Karger, für die Unterstützung während der Durchführung und Auswertung Studie, Frau D. Lehmann und Frau R. Marschall, die mich so freundlich in ihrem Labor aufgenommen haben und mir stets mit Rat und Tat zur Seite standen und Herrn G. Friedrich für die Koordination und Durchführung der Zellseparationen.

Bei allen Thrombozytenspenderinnen und –spendern, ohne die die Durchführung der Untersuchungen nicht möglich gewesen wäre, möchte ich mich herzlich bedanken.

Samuel, danke für die bedingungslose Unterstützung in jeglicher Hinsicht!

Danke, meinen lieben Eltern, Dietmar und Dorothea, die mir das Studium und so vieles mehr ermöglicht haben. Danke, Familie!

10.5 Akademische Lehrer

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren die Damen und Herren:

Arnold, Aumüller, Barth, Basler, Baum, Behr, Bertalanffy, Bien, Daut,
Eilers, Fruhstorfer, Gemsa, Geus, Görg C., Görg K., Gotzen, Griss, Grzeschik,
Gudermann, Happle, Hasilik, Heeg, Höffken, Hofbauer, Hofmann, Jones,
Jungclas, Kern, Klenk, Klose, Koolman, Kretschmer, Krieg, Kroll, Lammel,
Lang, Lennartz, Leppek, Lill, Löffler M., Lorenz, Maisch, Moll, Moosdorf,
Müller, Mueller, Mutters, Neubauer, Oertel, Remschmidt, Renz, Röhm,
Rothmund, Schäfer, Schmidt, Schüffel, Schwarz, Seitz, Seyberth, Siegel,
Steiniger, Sturm, Sundermeyer, Vogelmeier, Vohland, Voigt, Walter, Weihe,
Werner, Westermann, Wulf

Meine akademischen Lehrer in Fulda waren die Damen und Herren:

Arps, Behr, Bohner, Bonzel, Czernik, Draf, Fassbinder, Feldmann, Greim, Hellinger,
Hertel, Höffkes, Hofman, Jaspersen, Kälble, Langohr, Manke, Radziwill, Repp,
Schneider, Spätling, Stegmann, Wächter, Walter, Wörsdörfer

10.6 Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel:

Untersuchungen zum Effekt von ASS– Einnahme auf die in vitro Qualität von Thrombozyten bei Thrombozytapherese und während der 5-Tages-Lagerung von Thrombozytenkonzentraten

im Institut für Transfusionsmedizin und Hämostaseologie – Universitätsblutbank – unter Leitung von: Prof. Dr. V. Kretschmer mit Unterstützung durch PD Dr. Th. Zeiler ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- und ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Marburg, den 22.06.2006