

Aus der Klinik für Anästhesiologie, Intensivmedizin und Schmerztherapie

Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. T. Volk

---

**Impedanzaggregometrische Analyse der Plättchenfunktion  
von Apherese-Thrombozytenkonzentraten  
in Abhängigkeit von der Lagerungsdauer**

*Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin*

*der Medizinischen Fakultät*

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

vorgelegt von: Janine Viola Bauer

geboren am: 10.10.1987 in Neustadt an der Weinstraße

Meiner Familie

gewidmet

## Inhaltsverzeichnis

<b>I</b>	<b>Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen .....</b>	<b>6</b>
<b>II</b>	<b>Verzeichnis der Abkürzungen .....</b>	<b>9</b>
<b>1.</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>12</b>
<b>2.</b>	<b>Summary .....</b>	<b>15</b>
<b>3.</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>18</b>
3.1	Anatomie, Biochemie und Physiologie der Thrombozyten .....	18
3.2	Die Rolle der Thrombozyten im Hämostasesystem .....	20
3.3	Thrombozytenfunktionsstörungen .....	23
3.3.1	Hereditäre Thrombozytopathien .....	24
3.3.2	Erworbene Thrombozytopathien.....	26
3.4	Methoden der Thrombozytenfunktionsdiagnostik .....	30
3.4.1	Standardmethoden .....	30
3.4.2	Point-of-Care-Methoden .....	32
3.5	Thrombozytenkonzentrate.....	38
3.5.1	Herstellung .....	39
3.5.2	Qualitätskontrollen.....	40
3.5.3	Indikationen.....	43
3.5.4	Plättchen-Lagerungsschaden .....	45
3.6	Zielsetzung.....	46
<b>4.</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>48</b>
4.1	Material .....	48
4.1.1	Verbrauchsmaterialien.....	48
4.1.1.1	Einmalartikel .....	48
4.1.1.2	Multiplate®-Agonisten.....	49
4.1.1.3	Composol® PS .....	49
4.1.2	Geräte .....	50
4.1.3	Thrombozytenkonzentrate .....	50
4.2	Methoden .....	51
4.2.1	Aufbau der Versuchsreihen .....	51
4.2.2	Bestimmung der Thrombozytenzahl .....	52
4.2.3	Abschnitt 1 – Etablierung einer Messmethodik .....	53
4.2.3.1	Einstellung der Zielzellkonzentration.....	53
4.2.3.2	Einstellung der Kalziumkonzentration .....	55

4.2.3.3	Messungen mit fester Zellzahl und fester Kalziumkonzentration .....	56
4.2.4	Abschnitt 2 – Messungen im zeitlichen Verlauf .....	56
4.2.4.1	Gewinnung steriler Proben .....	57
4.2.4.2	Impedanzaggregometrie .....	61
4.2.4.3	Blutgasanalysen .....	61
4.3	Software und Statistik.....	62
4.3.1	Computersoftware .....	62
4.3.2	Statistische Auswertung .....	62
4.3.3	Literaturrecherche .....	63
<b>5.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>64</b>
5.1	Zielkonzentration Thrombozyten .....	64
5.1.1	ASPItest .....	64
5.1.2	TRAPtest.....	65
5.2	Zielkonzentration Kalzium .....	65
5.2.1	ASPItest .....	66
5.2.2	TRAPtest.....	67
5.3	Abschnitt 1: 2-4 Tage alte Thrombozytenkonzentrate .....	68
5.4	Abschnitt 2: 5-12 Tage alte Thrombozytenkonzentrate .....	70
5.4.1	ASPItest .....	71
5.4.2	TRAPtest.....	72
5.4.3	Blutgasanalysen .....	73
5.4.3.1	Verlauf pH.....	73
5.4.3.2	Verlauf pO <sub>2</sub> .....	74
5.4.3.3	Verlauf pCO <sub>2</sub> .....	75
5.4.3.4	Verlauf Glukosekonzentration .....	76
5.4.4	Korrelationsanalysen .....	77
5.4.4.1	pO <sub>2</sub> vs. ASPItest .....	77
5.4.4.2	pO <sub>2</sub> vs. TRAPtest.....	78
5.4.4.3	pCO <sub>2</sub> vs. ASPItest.....	79
5.4.4.4	pCO <sub>2</sub> vs. TRAPtest .....	80
5.4.4.5	pH vs. ASPItest.....	81
5.4.4.6	pH vs. TRAPtest .....	82
5.4.4.7	Glukosekonzentration vs. ASPItest.....	83
5.4.4.8	Glukosekonzentration vs. TRAPtest.....	84
<b>6.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>85</b>

---

6.1	Abschnitt 1 – Etablierung einer Messmethodik .....	85
6.1.1	Zielkonzentration Thrombozyten.....	85
6.1.2	Verwendete Plättchenaktivatoren .....	86
6.1.3	Antikoagulation.....	88
6.1.4	Verdünnung mit Composol® PS.....	89
6.2	Abschnitt 2 – Messungen im zeitlichen Verlauf .....	91
6.2.1	Blutgasparameter und Plättchenstoffwechsel .....	91
6.2.2	Multiplate®-Ergebnisse und Korrelation mit Blutgasparametern .....	94
6.3	Schlussfolgerung.....	97
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>98</b>
<b>8.</b>	<b>Publikationen .....</b>	<b>112</b>
<b>9.</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>113</b>
<b>10.</b>	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>114</b>

# I Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

## Abbildungen

Abb. 1	Primäre Adhäsion von Thrombozyten an exponierten Strukturen der geschädigten Gefäßwand (modifiziert nach [121])
Abb. 2	Aggregatbildung zwischen adhärenenten und rekrutierten Thrombozyten und Stabilisierung durch Fibrin (modifiziert nach [121])
Abb. 3	Darstellung plättchenfunktionshemmender Substanzen und ihrer Angriffspunkte (modifiziert nach [109])
Abb. 4	Schematische Darstellung einer Messküvette (nach [146])
Abb. 5	Anlagerung aktivierter Thrombozyten an die Sensordrähte (nach [146])
Abb. 6	Aufbau der Versuchsreihen
Abb. 7	Schematische Darstellung eines Messwandlers, aus [132]
Abb. 8	Verdünnungsreihe Thrombozyten
Abb. 9	Übersicht über die Vergleichsgruppen in Abschnitt 1
Abb. 10	Schema der Messungen im zeitlichen Verlauf
Abb. 11	Darstellung der Ausgangssituation zur Gewinnung steriler Einzelproben
Abb. 12	Detailansicht der Ausgangssituation
Abb. 13	Resultat nach dem Welding-Prozess
Abb. 14	Thrombozytenkonzentrate und Transferbeutel nach dem Umfüllen der Probenvolumina
Abb. 15	Darstellung der AUC-Werte in Bezug auf drei unterschiedliche Thrombozytenkonzentrationen bei Verwendung des ASPItest
Abb. 16	Darstellung der AUC-Werte in Bezug auf drei unterschiedliche Thrombozytenkonzentrationen bei Verwendung des TRAPtest
Abb. 17	Darstellung der AUC-Werte nach Einstellung verschiedener Kalziumkonzentrationen im ASPItest
Abb. 18	Darstellung der AUC-Werte nach Einstellung verschiedener Kalziumkonzentrationen im TRAPtest
Abb. 19	Darstellung der AUC-Werte im ASPItest bezogen auf das Alter der getesteten Thrombozytenkonzentrate

---

Abb. 20	Darstellung der AUC-Werte im TRAPtest bezogen auf das Alter der getesteten Thrombozytenkonzentrate
Abb. 21	AUC-Werte im ASPItest bezogen auf das Alter der getesteten Thrombozytenkonzentrate
Abb. 22	AUC-Werte im TRAPtest bezogen auf das Alter der getesteten Thrombozytenkonzentrate
Abb. 23	Darstellung der pH-Werte der getesteten Thrombozytenkonzentrate bezogen auf den jeweiligen Analysetag
Abb. 24	Verlauf der $pO_2$ -Werte der getesteten Thrombozytenkonzentrate
Abb. 25	Verlauf der $pCO_2$ -Werte der getesteten Thrombozytenkonzentrate
Abb. 26	Veränderung der Glukosekonzentration der getesteten Thrombozytenkonzentrate im zeitlichen Verlauf
Abb. 27	Korrelation der AUC-Werte im ASPItest mit den $pO_2$ -Werten
Abb. 28	Korrelation der AUC-Werte im TRAPtest mit den $pO_2$ -Werten
Abb. 29	Korrelation der AUC-Werte im ASPItest mit den $pCO_2$ -Werten
Abb. 30	Korrelation der AUC-Werte im TRAPtest mit den $pCO_2$ -Werten
Abb. 31	Korrelation der AUC-Werte im TRAPtest mit den pH-Werten
Abb. 32	Korrelation der AUC-Werte im ASPItest mit den pH-Werten
Abb. 33	Korrelation der AUC-Werte im ASPItest mit der Glukosekonzentration
Abb. 34	Korrelation der AUC-Werte im TRAPtest mit der Glukosekonzentration

## Tabellen

Tab. 1	Übersicht über die Einteilung der Thrombozytopathien (modifiziert nach [108])
Tab. 2	Auflistung einiger Medikamente und Nahrungsmittel, die eine Plättchenfunktionsstörung induzieren können (modifiziert nach [110])
Tab. 3	Auflistung der kommerziell erhältlichen Multiplate <sup>®</sup> -Testreihen und Beschreibung der Aktivierungswege
Tab. 4	Merkmale der Qualitätskontrolle für leukozytendepletierte Apherese- und Pool-TK (modifiziert nach [15])
Tab. 5	Übersicht über die Risikofaktoren für das Auftreten von Blutungskomplikationen bei Thrombozytopenie (modifiziert nach [112])
Tab. 6	Verwendete Einmalartikel
Tab. 7	Zusammensetzung Composol <sup>®</sup> PS
Tab. 8	Verwendete Geräte
Tab. 9	Zusammensetzung Stabilisatorlösung TK
Tab. 10	Verdünnungsreihe Kalzium
Tab. 11	AUC-Werte im ASPItest für die angegebenen Kalziumkonzentrationen
Tab. 12	AUC-Werte im TRAPtest für die angegebenen Kalziumkonzentrationen
Tab. 13	AUC-Werte im ASPItest und TRAPtest für Thrombozytenkonzentrate im Alter von 2, 3 und 4 Tagen
Tab. 14	AUC-Werte der 5-12 Tage alten Thrombozytenkonzentrate für ASPI- und TRAPtest in Bezug auf die einzelnen Messtage
Tab. 15	Auflistung der fehlenden Messwerte für ASPItest und TRAPtest

## II Verzeichnis der Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ACE	Angiotensin converting enzyme
ADP	Adenosindiphosphat
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
AS	Average size
ASS	Acetylsalicylsäure
ATP	Adenosintriphosphat
AU	Aggregation Units
AUC	Area under the curve
BC	Buffy Coat
BSS	Bernard-Soulier-Syndrom
c	Konzentration
ca.	Circa
CaCl <sub>2</sub>	Kalziumchlorid
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
CCI	Corrected count increment
CD	Cluster of differentiation
CFT	Clot formation time
cGMP	Zyklisches Guanosinmonophosphat
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
COX	Cyclooxygenase
CT	Closure time/ Cotting time
DDAVP	Desmopressin
DGHO	Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und medizinische Onkologie
DGTI	Deutsche Gesellschaft für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie
dl	Deziliter
DNA	Deoxyribonukleinsäure
EGF	Epidermal growth factor
F	Faktor
FFP	Fresh frozen plasma
fl	Femtoliter
GP	Glykoprotein
GTH	Gesellschaft für Thrombose- und Hämostaseforschung

---

GvHD	Graft versus host disease
h	Stunde
HAES	Hydroxyethylstärke
HLA	Human leukocyte antigen
HUS	Hämolytisch-urämisches Syndrom
l	Liter
LMWH	Niedermolekulares Heparin
LTA	Lichttransmissionsaggregometrie
MACE	Major adverse cardiac events
MEA	Multiple electrode aggregometry
mg	Milligramm
min	Minute
µm	Mikrometer
mm	Millimeter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mmol	Millimol
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
n	Anzahl
NHFTR	Nicht-hämolytische febrile Transfusionsreaktion
NO	Stickstoffmonoxid
NSAR	Nichtsteroidale Antirheumatika
PAI	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor
PAS	Platelet additive solution
pCO <sub>2</sub>	Kohlendioxid-Partialdruck
PDGF	Platelet derived growth factor
PFA	Platelet function analyzer
pO <sub>2</sub>	Sauerstoffpartialdruck
POC	Point-of-Care
PPP	Plättchenarmes Plasma
PRP	Plättchenreiches Plasma
PTFE	Polytetrafluorethylen
ROTEM	Rotationsthrombelastometrie
SC	Surface coverage
SSRI	Selektive Serotonin Reuptake-Inhibitoren
Tab.	Tabelle
TCA	Trizyklische Antidepressiva
TEG	Thrombelastographie

---

TF	Tissue Factor
TFPI	Tissue-factor-pathway-inhibitor
TGF	Transforming growth factor
TK	Thrombozytenkonzentrat
t-PA	Tissue-Plasminogen-Aktivator
TRAP	Thrombin-Rezeptor aktivierendes Peptid
TSP-1	Thrombospondin 1
TTP	Thrombotisch-thrombozytopenische Purpura
TXA <sub>2</sub>	Thromboxan A <sub>2</sub>
UFH	Unfraktioniertes Heparin
V	Volumen
VEGF	Vascular endothelial growth factor
vs.	Versus
vWF	Von Willebrandt-Faktor
WHO	World Health Organization

## 1. Zusammenfassung

Thrombozytenkonzentrate werden zur Prophylaxe und Therapie klinisch relevanter Blutungen bei thrombozytopenischen Patienten eingesetzt. Weiterhin leisten sie einen wichtigen Beitrag zur Beherrschung „diffuser“ perioperativer Blutungen und zur Eindämmung postoperativer und traumatisch bedingter Entgleisungen der Blutgerinnung. Aufgrund der ständigen Weiterentwicklung und breiteren Anwendung von Chemotherapeutika sowie der daraus resultierenden Zunahme der Anzahl thrombozytopenischer Patienten ist der Bedarf an Thrombozytenkonzentraten weiterhin steigend. Im Jahr 2007 betrug die Gesamtzahl der in Deutschland hergestellten Thrombozytenkonzentrate ca. 5,5 Konzentrate pro 1000 Einwohner.

Die Lagerungszeit von Thrombozytenkonzentraten ist nach den aktuellen Richtlinien zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen der Bundesärztekammer auf maximal 4 Tage ab 24:00 Uhr des jeweiligen Entnahmetages beschränkt. Bezüglich der Qualitätskontrolle von Plättchenkonzentraten werden nach der Herstellung eine Überprüfung von Volumen, Restzellgehalt und Thrombozytenzahl gefordert. Am Haltbarkeitsende sind pH-Wert-Kontrollen sowie Sterilitätsprüfungen durchzuführen. Vor Transfusion der Konzentrate sollten eine visuelle Kontrolle und die Prüfung des Swirling-Phänomens erfolgen. Eine routinemäßige Funktionsprüfung der Thrombozyten ist jedoch aktuell noch nicht vorgesehen.

In Anbetracht der Vielzahl von Medikamenten, welche mit der Thrombozytenfunktion interferieren können, und der breiten klinischen Anwendung von Plättchenfunktionshemmern zur Prophylaxe und Therapie kardiovaskulärer Ereignisse, sind Störungen der Plättchenfunktion – gerade im prä-, peri- und postoperativen Setting – von großer Bedeutung in der Anästhesiologie und Intensivmedizin. Im Zuge dessen werden vermehrt patientennah und laborunabhängig durchführbare Methoden zur Thrombozytenfunktionsdiagnostik erforderlich. Moderne Point-of-Care Geräte erlauben eine schnelle und zuverlässige Analyse der Thrombozytenfunktion und werden daher im klinischen Alltag zunehmend eingesetzt. Die multiple Impedanzaggregometrie (Multiplate<sup>®</sup>) wurde für die zeitnahe Analyse von Vollblutproben entwickelt und erlaubt eine differenzierte Einschätzung der Thrombozytenfunktion sowie die Überwachung einer Therapie mit Plättchenfunktionshemmern.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, eine Methodik zur Evaluierung der

Aggregationsfähigkeit gelagerter Thrombozyten in Apherese-Konzentraten mittels Multiplate<sup>®</sup> zu entwickeln und die Veränderungen der Thrombozytenfunktion in Folge einer einwöchigen Lagerung zu charakterisieren. Weiterhin wurde die Korrelation zwischen den AUC-Werten im Multiplate<sup>®</sup> und den Ergebnissen der Blutgasanalysen überprüft.

Ein erster Versuchsabschnitt diente der Findung einer geeigneten Thrombozytenzahl und Kalziumkonzentration sowie der Evaluierung des Verdünnungsmediums Composol<sup>®</sup> PS und verschiedener kommerziell erhältlicher Plättchenagonisten. Nachfolgend wurden mithilfe der entwickelten Methodik 31 Thrombozytenkonzentrate im Alter von 2-4 Tagen analysiert. In einer zweiten Versuchsreihe wurden von 44 Konzentraten im Zuge einer einwöchigen Lagerung ab dem 5. Tag der Herstellung täglich impedanzaggregometrische Messungen und konventionelle Blutgasanalysen durchgeführt.

Im ersten Versuchsabschnitt ergaben sich im ASPI- und TRAPtest unter der Verwendung von Composol<sup>®</sup> PS stabile und reproduzierbare Messergebnisse für eine Thrombozytenkonzentration von 400000/ $\mu$ l und eine Kalziumkonzentration von 5 mmol/l. Die Analyse der AUC-Werte der 2-4 Tage alten Thrombozyten aus dem klinischen Umlauf ergab bei einer mittleren Aggregation von 67-77 U im ASPItest und 59-65 U im TRAPtest keine signifikanten Unterschiede bezogen auf das Alter der Konzentrate (Ausnahme TRAPtest Tag 4 versus Tag 3,  $p < 0,05$ ). Die 5-12 Tage alten Thrombozyten zeigten bis zum 10. Lagerungstag ebenfalls eine gute Stimulierbarkeit mit den Agonisten ASPI und TRAP sowie stabile AUC-Werte. Am 12. Analysetag waren die Multiplate<sup>®</sup>-Ergebnisse sowohl im ASPI- als auch im TRAPtest in Bezug auf alle vorherigen Tage signifikant schlechter (jeweils  $p < 0,05$ ). Weiterhin war eine stärkere Streuung der AUC-Werte zu verzeichnen. Die  $pO_2$ -Werte stiegen im Verlauf leicht an, während der  $pCO_2$  signifikant abfiel. Für den pH-Wert war am letzten Analysetag ein signifikanter Abfall zu verzeichnen, ein Minimum von 6,35 wurde aber im gesamten Lagerungszeitraum nicht unterschritten. Der  $pO_2$  zeigte keine Korrelation mit dem ASPItest ( $r = -0,098$ ;  $p > 0,05$ ) und eine sehr geringe negative Korrelation mit dem TRAPtest ( $r = -0,192$ ;  $p < 0,05$ ), die  $pCO_2$ -Werte sowie die Glukosekonzentration korrelierten mäßig mit den AUC-Werten in ASPI- und TRAPtest (je  $r = 0,416$  beziehungsweise  $0,399$ , sowie  $r = 0,398$  und  $0,405$ ;  $p < 0,05$ ), wohingegen pH-Werte und Multiplate<sup>®</sup>-Ergebnisse keinen linearen Zusammenhang aufwiesen.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass die multiple Impedanzaggregometrie (Multiplate<sup>®</sup>) zur Evaluierung der Veränderungen der Aktivierungs- und Aggregationsfähigkeit gelagerter Thrombozyten in Apherese-Konzentraten geeignet ist und dass sich unter Verwendung der beschriebenen Methodik stabile und reproduzierbare Messergebnisse erzielen lassen. Eine Ausweitung der Lagerungsdauer auf bis zu zehn Tage führte im Multiplate<sup>®</sup> zu keiner signifikanten Verschlechterung der Plättchenaggregation. In Bezug auf den Verlauf der erhobenen Blutgasparameter zeigten alle Thrombozytenkonzentrate bis zum letzten Lagerungstag akzeptable Werte, was auf eine ausreichende Sauerstoffversorgung und eine Aufrechterhaltung des oxidativen Metabolismus schließen lässt.

Inwiefern sich das Multiplate<sup>®</sup> für eine routinemäßige Funktionsanalyse im Rahmen der Qualitätskontrolle von Thrombozytenkonzentraten eignet, kann aufgrund der Studienergebnisse nicht abschließend beurteilt werden. Die klinische Relevanz sowie die Übertragung der vorliegenden in vitro Ergebnisse auf die in vivo Funktionalität der Thrombozyten sollten daher in weiteren Studien näher charakterisiert werden.

## 2. Summary

### **Impedance aggregometric analysis of platelet function of apheresis platelet concentrates as a function of storage time**

Platelet concentrates are widely used to prevent or treat clinically severe bleeding in thrombocytopenic patients. Furthermore they play an important role in the treatment of patients with bleeding problems related to surgery and trauma. As a result of ongoing research and wider implementation of the use of chemotherapeutic agents the number of thrombocytopenic patients will rise and so the demand for platelet transfusions as well. In Germany the total amount of produced platelet concentrates was about 5.5 related to 1000 inhabitants in the year 2007.

The storage time of platelet products is limited to 4 days according to the German guidelines for the harvesting of blood and blood components published by the "Bundesärztekammer". Quality controls of platelet concentrates include the examination of volume, residual cell count and platelet count. At the end of storage time pH-values and bacterial testing should be performed whereas visual controls and the examination of swirling should be done before transfusion. A routine analysis of the function of stored platelets before transfusion has not been implemented so far.

With regard to the variety of drugs that can affect platelet function and also due to the broad application of antiplatelet agents for the prevention and therapy of cardiovascular diseases, disorders of platelet function are of vital significance in modern anaesthesia and intensive care medicine. Therefore the implementation of bedside platelet function testing is of major importance.

The so called Point-of-Care devices allow patient-side and laboratory-independent determination of platelet function and are nowadays widely distributed in clinical routine. Multiple impedance aggregometry has been developed for the prompt determination of platelet function in whole blood assays and therefore provides precise information on platelet aggregation aspects as well as close monitoring of antiplatelet therapy.

The aim of the present study was the implementation of a method to examine platelet activation and aggregation in platelet concentrates and their developing changes during prolonged storage time. Furthermore we tried to determine a correlation between the results of multiple impedance aggregometry and blood gas analysis.

A first trial was performed to investigate the influence of platelet count and calcium concentration and to examine the suitability of the platelet additive solution Composol<sup>®</sup> PS in terms of sample dilution. Furthermore different commercially available platelet agonists were tested. The method was then used to determine platelet activation and aggregation of platelets at the age of 2 to 4 days in 31 platelet concentrates. In a second trial 44 samples of apheresis-concentrates underwent daily impedance aggregometric measurements and blood gas analysis during a prolonged storage time of one week.

We were able to show stable and reproducible results for a platelet count of 400000/ $\mu$ l and a calcium concentration of 5 mmol/l with regard to ASPI- and TRAPtest. Composol<sup>®</sup> PS proved to be a good solution for sample dilution without the need for plasma preparation. Platelets at the age of 2 to 4 days yielded stable aggregation results for ASPItest (on average 67-77 U) and TRAPtest (on average 59-65 U) whereas no significant difference could be found regarding platelet age (except TRAPtest day 4 versus day 3,  $p < 0.05$ ). Platelet concentrates at the age of 5 to 12 days also showed steady aggregation values and good response to platelet agonists ASPI and TRAP up to the age of 10 days but there was a significant decline on day 12 of storage time for both ASPI- and TRAPtest. Furthermore the AUC-values were considerably more distributed.  $pO_2$  increased slightly during storage time whereas carbon dioxide decreased steadily and significantly. pH-values showed a significant decline on day 12 but remained higher than 6.35 throughout storage time. Correlation was poor for  $pO_2$  and both ASPI- and TRAPtest ( $r = -0.098$ ;  $p > 0.05$  respectively  $r = -0.192$ ;  $p < 0.05$ ). A statistically significant correlation could be found regarding  $pCO_2$  and AUC-values for ASPI- and TRAPtest (each  $r = 0.416$  respectively 0.399) as well as glucose concentration and Multiplate<sup>®</sup>-results ( $r = 0.398$  respectively 0.405;  $p < 0.05$ ), whereas pH and aggregation values showed no correlation.

In sum, our data suggest that the Multiplate<sup>®</sup> device provides suitability for the evaluation of changes in both activation and aggregation of platelets stored in platelet concentrates for a prolonged time. With regard to the aforementioned method it is possible to obtain stable and reproducible measurement results. A prolonged storage time up to ten days seems not to be prejudicial regarding platelet aggregation in response to ASPI and TRAP. Blood gas parameters showed acceptable results

throughout the storage period suggesting sufficient oxygenation and maintenance of oxidative metabolism.

However, whether the Multiplate<sup>®</sup> is applicable for routine quality testing of platelet concentrates cannot be concluded from the aforementioned study results. Therefore the clinical relevance as well as the transmission of these in vitro findings on in vivo platelet function, recovery and viability remain to be investigated in further studies.

### 3. Einleitung

#### 3.1 Anatomie, Biochemie und Physiologie der Thrombozyten

**Anmerkung:** Im internationalen Sprachgebrauch wird für humane Thrombozyten der Ausdruck „Blutplättchen“ oder „Plättchen“ verwendet, während der Begriff „Thrombozyten“ sich auf die kernhaltigen Blutplättchen anderer Spezies bezieht. In dieser Arbeit werden die Ausdrücke „Thrombozyten“, „Plättchen“ und „Blutplättchen“ äquivalent gebraucht und beziehen sich jeweils auf die kernlose humane Form.

Donné, Zimmermann und Schultze beschrieben Mitte des 19. Jahrhunderts bei der Mikroskopie von Vollblut unabhängig voneinander die Existenz zellulärer Elemente, welche die Tendenz zeigten, sich zu Aggregaten zu formieren. Osler beschrieb 1873 die diskoide Form dieser Elemente, welche man bis dahin allerdings für Vorläufer von roten Blutkörperchen bzw. für Zellreste von Leukozyten hielt. Sieben Jahre später identifizierte Bizzozero die anatomische Struktur der Zellen und gab ihnen den Namen „Plättchen“ [133]. Die Entdeckung des Knochenmarks als Ursprung der Thrombozyten gelang im Jahre 1906 durch Wright [88].

Mit einer mittleren Größe von 2-5  $\mu\text{m}$  und einem Volumen von 6-10 fl [144] stellen Blutplättchen die kleinsten zellulären Elemente des Blutes dar. Sie entstehen im Knochenmark als Resultat der Proplättchen-Formation polyploider Megakaryozyten unter dem Einfluss des Wachstumsfaktors Thrombopoetin. Ein einzelner Megakaryozyt kann auf diese Weise Tausende von Thrombozyten produzieren [88]. Megakaryozyten wurden in geringem Ausmaß ebenfalls im peripheren Blut und in der Lunge identifiziert, allerdings ist nicht genau bekannt, inwiefern eine Thrombozytenfreisetzung in der Lunge zur Gesamtproduktion beiträgt [1, 64].

Obwohl Blutplättchen keinen Zellkern besitzen, beinhalten sie mRNA ihrer Mutterzelle und sind daher in gewissem Ausmaß zur Synthese von Proteinen wie GPIb, GPIIb-IIIa, Fibrinogen, Thrombospondin und Albumin fähig [59]. Der Gesamtgehalt an thrombozytärer RNA setzt sich zusammen aus messenger RNA (mRNA), mitochondrialer RNA (mtRNA) und ribosomaler RNA (rRNA) und ist ca. 100000-fach geringer als der RNA-Gehalt kernhaltiger Zellen [17].

Die Thrombozytenzahl im peripheren Blut gesunder Erwachsener beträgt ca. 150000-450000/ $\mu\text{l}$ . Nach einer mittleren Lebensspanne von etwa 8-10 Tagen [128] werden die Plättchen aufgrund von Alterungsprozessen und verschiedenen zell-

intrinsischen Mechanismen im retikuloendothelialen System von Leber und Milz sequestriert. Etwa zwei Drittel des menschlichen Thrombozytenpools zirkulieren im Blut, während ein Drittel reversibel in der Milz gespeichert wird und bei einem erhöhten Thrombozytenumsatz mobilisiert werden kann. Im Falle eines erhöhten Bedarfs ist im gesunden Organismus eine Steigerung der Thrombopoese bis zu einem Fünffachen der Normalproduktion möglich.

Die Membranoberfläche der Thrombozyten ist stark gefaltet und zeigt zahlreiche Einstülpungen, wodurch sich eine große reaktive Oberfläche ergibt, welche eine intensive Interaktion mit anderen Zellen ermöglicht. Membranglykoproteine wie GPIb $\alpha$ , GPVI und GPIIb-IIIa sind wichtige Oberflächenrezeptoren, welche der Bindung von regulativen Liganden dienen und so in die Abläufe von Adhäsion, Aktivierung und Aggregation eingebunden sind. Weiterhin enthalten Thrombozyten verschiedene Speichergranula, deren Inhalt im Zuge der Plättchenaktivierung sezerniert wird [53]. Die  $\alpha$ -Granula stellen die größten und zahlreichsten Granula dar. Sie beinhalten unter anderem adhäsive Glykoproteine (vWF, Fibronectin, Vitronectin, TSP-1 und Fibrinogen), verschiedene Gerinnungsfaktoren (Faktor V, VII, XI und XIII), Gerinnungsinhibitoren (PAI-1, TFPI, Protein C und S), Chemokine (Plättchenfaktor 4,  $\beta$ -Thromboglobulin) sowie Komplementfaktoren und Wachstumsfaktoren (TGF- $\beta$ , EGF, VEGF, PDGF). Elektronendichte Granula enthalten hauptsächlich ADP, ATP und proaggregatorische Substanzen wie Thromboxan A<sub>2</sub>, Serotonin, Histamin und Kalzium und spielen daher eine elementare Rolle als Verstärkermechanismen bei der Plättchenaktivierung. Die Lysosomen der Blutplättchen speichern Kollagenase, Elastase, Heparinase und Carboxypeptidasen. Ihre Hauptaufgabe besteht in der Degradation extrazellulärer Matrixproteine.

Die diskoide Struktur ruhender Thrombozyten wird durch das Zusammenspiel von Elementen des submembranösen Zytoskeletts (Spektrin, Aktinfilamente) und einem einzelnen Mikrotubulus aufrecht erhalten [77].

Das Aufgabenspektrum der Thrombozyten beschränkt sich nicht nur auf ihre essentielle Rolle im Hämostasesystem, sondern umfasst auch vielfältige Funktionen im Rahmen von Entzündungsprozessen, die Modulation der Immunabwehr sowie eine elementare Mitwirkung bei der Entwicklung von Arteriosklerose und thromboembolischen Komplikationen [52].

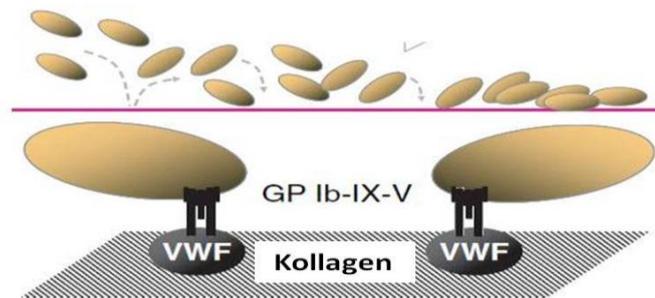
### 3.2 Die Rolle der Thrombozyten im Hämostasesystem

Als zentrale Strukturen des Hämostasesystems bilden die Blutplättchen die Reaktionsplattform für alle Schritte der Blutgerinnung. Durch ein komplexes Zusammenspiel von Thrombozytenadhäsion, -aktivierung und -aggregation entsteht unter dem Einfluss der plasmatischen Gerinnung ein stabiler Thrombus.

Aufgrund ihrer geringen Größe und Dichte werden die Blutplättchen durch den Blutfluss und die Axialmigration der Erythrozyten an die Gefäßwand gedrängt und treten so – bedingt durch den langsameren Blutfluss in der Peripherie – in engen Kontakt mit dem Endothel. Anämische Patienten zeigen eine deutliche Reduktion der Plättchen-Endothel-Interaktion, da in diesem Fall weniger Erythrozyten den zentralen Blutfluss okkupieren und auf diese Weise auch weniger Thrombozyten an der Gefäßwand entlang wandern.

Die strenge Unterteilung der Blutgerinnung in einen primären thrombozytären und einen sekundären plasmatischen Teil mit Auftrennung der plasmatischen Gerinnung in ein intrinsisches und ein extrinsisches System ist nicht mehr zeitgemäß, da mittlerweile bekannt ist, dass die Aktivierung der plasmatischen Gerinnungskaskade zeitgleich zur Thrombozytenadhäsion und -aktivierung initiiert wird und dass zwischen beiden Komponenten eine enge Verzahnung besteht. Viele Autoren favorisieren daher ein integratives, Zell-basiertes Modell der Blutgerinnung [44, 101]. Den initialen Trigger zur Aktivierung der Hämostase stellt eine Gefäßverletzung dar. Hierdurch werden thrombogene subendotheliale Strukturen (Kollagen, Thrombospondin-1, von Willebrand-Faktor) freigelegt, an welche zirkulierende Thrombozyten adhären (Adhäsionsphase, siehe Abbildung 1). Unter Blutflussbedingungen mit hohem Scherstress (arterielles System) wird der initiale Kontakt zwischen der Gefäßwand und den Thrombozyten über die Interaktion zwischen der A1-Domäne des immobilisierten von Willebrand-Faktors (vWF) und dem GPIIb $\alpha$  des GPIIb-V-IX-Komplexes vermittelt [62, 105, 106]. Der GPIIb-V-IX-Komplex ist mit der Plasmamembran der Blutplättchen verankert und wird durch wiederholten Kontakt und Quervernetzung mit dem multimeren vWF aktiviert, wodurch es zu einer festen Verankerung der Thrombozyten am Endothel kommt [51]. Diese Abbremsung der Plättchen erlaubt dem Kollagenrezeptor GPVI eine Kontaktaufnahme mit den freiliegenden Kollagenfibrillen des Endothels. Unter Bedingungen mit niedrigem Scherstress können die Thrombozyten via GPVI und Fc $\gamma$  auch direkt an freigelegtem

Kollagen adhären. Der initiale Kontakt der Plättchen mit dem Subendothel führt zu einer aktivierenden Konformationsänderung der Integrine  $\alpha_{IIb}\beta_3$  (GPIIb-IIIa) und  $\alpha_2\beta_1$  (GPIa-IIa), wodurch eine Bindung an Fibrinogen (via GPIIb-IIIa) und Kollagen (via GPIIb-IIIa und GPIa-IIa) und somit eine feste Adhäsion am Endothel ermöglicht wird [50].

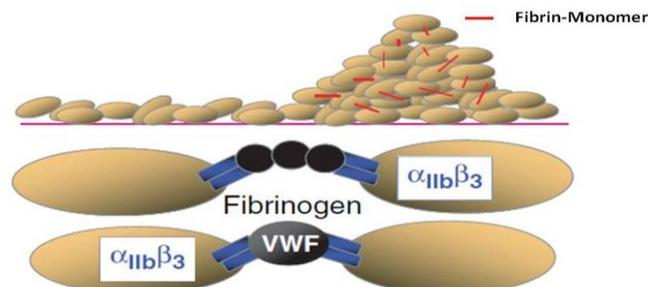


**Abb. 1**

Primäre Adhäsion von Thrombozyten an exponierten Strukturen der geschädigten Gefäßwand, modifiziert nach [121].

vWF: von Willebrand-Faktor, GP: Glykoprotein

Die Exozytose der Speichergranula führt in der Aktivierungsphase zu einer Freisetzung diverser prothrombotischer Thrombozytenagonisten wie beispielsweise Serotonin, Thromboxan  $A_2$  und ADP. Die meisten dieser Agonisten vermitteln ihre Signale durch komplexe, G-Protein-vermittelte Signaltransduktionsmechanismen und aktivieren und rekrutieren dadurch weitere Thrombozyten [86]. Den letzten Schritt der Thrombusformation bildet die Aggregationsphase (siehe Abbildung 2). Aktivierte Plättchen binden über den GPIIb-IIIa-Komplex lösliches Fibrinogen und Plasma-vWF aus dem Blut und vernetzen die Thrombozyten dadurch untereinander zu einem plättchenreichen Thrombus.



**Abb. 2**

Aggregatbildung zwischen adhärenenten und rekrutierten Thrombozyten und Stabilisierung durch Fibrin, modifiziert nach [121].

vWF: von Willebrand-Faktor

Im Zuge der Aktivierungsphase exprimieren Thrombozyten negativ geladene, prokoagulatorische Phospholipide auf ihrer Plasmamembran. Diese Lipide vermitteln die kalziumabhängige Bindung von plasmatischen Gerinnungsfaktoren auf der Thrombozytenmembran und fördern auf diese Weise die Konzentrierung der Faktoren am Ort der Gefäßverletzung. Durch die Endothelalteration kommt der normalerweise subendothelial lokalisierte Tissue Factor (TF) in Kontakt mit dem Faktor (F) VII, der bereits zu ca. 1% in der aktivierten Form als FVIIa im Blut zirkuliert [90]. Der FVIIa-TF-Komplex aktiviert nachfolgend den FX. Dieser bildet zusammen mit dem FVa den Prothrombinase-Komplex, welcher wiederum die Umwandlung von Prothrombin zu Thrombin fördert. Auf diese Weise wird auf der Oberfläche von Endothelzellen und weiteren TF-tragenden Zellen (Fibroblasten, Monozyten) bereits eine geringe Menge an Thrombin generiert. Diese Thrombinmengen sind allerdings nicht ausreichend für eine effiziente Thrombusstabilisierung [101]. Schwartz et al. berichteten 2006, dass Thrombozyten ebenfalls eine für den TF kodierende prä-mRNA besitzen, welche sie aktivierungsabhängig zur mRNA und zum fertigen TF prozessieren können [114].

Nachfolgend werden durch die bereits gebildeten geringen Thrombinmengen die Gerinnungsfaktoren V, VIII und XI sowie weitere Thrombozyten (über PAR-1 und PAR-4 [53]) aktiviert. Weiterhin kommt es durch den FVIIa-TF-Komplex sowie durch den thrombinaktivierten FXI zu einer Aktivierung von FIX zu FIXa. Dieser bildet mit dem bereits aktivierten FVIIIa den so genannten Tenase-Komplex, der wiederum die Generierung von FXa um mehrere Zehnerpotenzen beschleunigt und so die Bildung des Prothrombinase-Komplexes fördert. Die einzelnen Faktoren des Tenase- und Prothrombinase-Komplexes lagern sich auf der Membran aktivierter Thrombozyten an, wodurch es nachfolgend zu einer explosionsartigen Thrombin-Bildung, dem so genannten „Thrombinburst“, kommt. Dieser „Thrombinburst“ führt zur Bildung einer großen Menge an Fibrin. Unter der Einwirkung von FXIII werden die Fibrinmoleküle auf der Thrombozytenoberfläche quervernetzt und bilden so ein stabiles Netz.

### 3.3 Thrombozytenfunktionsstörungen

Bei der Betrachtung von Thrombozytenfunktionsstörungen kann man generell zwischen angeborenen und erworbenen Formen unterscheiden (siehe Tabelle 1). Hereditäre Thrombozytopathien sind im Gegensatz zu den weit verbreiteten erworbenen Plättchenfunktionsstörungen sehr selten. Der Ausdruck Thrombozytopathie im engeren Sinne bezeichnet Funktionsstörungen, welche mit einer herabgesetzten Thrombozytenfunktion einhergehen.

Klinisch äußern sich diese Störungen in Form von spontanen Blutungen (Petechien, Ekchymosen, Purpura), sowie in verstärkten und/oder verlängerten Blutungen ohne adäquates vorangegangenes Trauma. Diagnostisch wegweisend ist neben einer ausführlichen Familien- und Medikamentenanamnese und dem klinischen Befund die Verlängerung der Blutungszeit bei normaler Thrombozytenzahl. Aufgrund ihrer geringen Sensitivität und schlechten Reproduzierbarkeit wird die Bestimmung der in vivo-Blutungszeit in vielen Diagnostikalgorithmien allerdings nicht mehr empfohlen [70]. Einen Überblick über die Einteilung der Plättchenfunktionsstörungen gibt Tabelle 1.

**Tab. 1**

Übersicht über die Einteilung der Thrombozytopathien, modifiziert nach [108].

Hereditäre Thrombozytopathien	Erworbene Thrombozytopathien
Adhäsionsstörungen (Bernard-Soulier-Syndrom)	Medikamente (ASS, NSAR, Antidepressiva u.a.)
Aggregationsstörungen (Thrombasthenie Glanzmann)	Urämie bei chronischer Niereninsuffizienz
Plättchensekretionsstörungen (Storage-Pool-Erkrankungen)	Extrakorporale Zirkulation
Störungen der Signaltransduktion	Chronische Leberinsuffizienz
Störungen der prokoagulatorischen Aktivität (Scott-Syndrom)	Autoimmunerkrankungen mit antithrombozytären Antikörpern
Enzymdefekte und Rezeptordefekte	Hämatologische Erkrankungen

### 3.3.1 Hereditäre Thrombozytopathien

Bei den hereditären Störungen der Plättchenfunktion handelt es sich um eine heterogene Gruppe verschiedener Erkrankungen, welche abhängig von den zugrunde liegenden Pathomechanismen jeweils unterschiedliche Aspekte der Thrombozytenfunktion beeinträchtigen. Eine grobe Einteilung unterscheidet zwischen Adhäsions- und Aggregationsdefekten sowie Störungen der Sekretion der Plättchengranula. Zusätzlich existieren noch diverse Enzym- und Signaltransduktionsdefekte, welche im Rahmen dieser Arbeit nicht näher beleuchtet werden.

#### **Bernard-Soulier-Syndrom**

Die Beschreibung des Bernard-Soulier-Syndroms (BSS) erfolgte erstmals im Jahre 1948 durch die späteren Namensgeber Bernard und Soulier [69]. Es handelt sich hierbei um einen sehr seltenen, meist autosomal-rezessiv vererbten Defekt des Membrankomplexes GPIb-V-IX. Verschiedene Mutationen in den Genen für GPIb und GPIX [121] führen zu quantitativen oder qualitativen Störungen der assoziierten Glykoproteine. Die Plättchen sind dadurch nicht bzw. nur vermindert in der Lage, mit dem vWF in Wechselwirkung zu treten und so an den subendothelialen Strukturen geschädigter Gefäßwände zu adhären. Homozygote Patienten zeigen schon im Kindesalter Petechien, Purpura sowie diverse Schleimhautblutungen, wobei das Ausmaß der Blutungsneigung interindividuell starke Schwankungen zeigt [69]. Heterozygote Patienten sind meist asymptomatisch. Weiterhin besteht klinisch eine milde Thrombozytopenie. Im peripheren Blutausschlag imponieren die Blutplättchen vergrößert (Riesenplättchen). Therapeutisch werden bei massiven Blutungen Thrombozytentransfusionen eingesetzt, wobei die Indikation aufgrund der möglichen Sensibilisierung und Bildung von Isoantikörpern gegen die fehlenden Glykoproteine zurückhaltend zu stellen ist. Verschiedene Studien zeigten auch eine Wirksamkeit von DDAVP (Desmopressin) [20, 22] und rekombinantem FVII [26].

#### **Thrombasthenie Glanzmann**

Diese ebenfalls seltene, autosomal-rezessiv vererbte Plättchenfunktionsstörung beruht auf einer qualitativen oder quantitativen Störung des GPIIb-IIIa-Komplexes und wurde erstmalig 1918 durch den Schweizer Pädiater E. Glanzmann beschrieben [83]. Bisher sind über 100 Mutationen bekannt, welche die Expression und Funktion des GPIIb-IIIa-Komplexes beeinflussen und dadurch zu einer verminderten bzw. fehlenden Vernetzung aktivierter Thrombozyten führen. Die Anzahl und Morphologie

der Thrombozyten ist bei den meisten Patienten mit Thrombasthenie Glanzmann normal, in vitro Funktionstests ergeben hauptsächlich eine Aggregationsstörung. Die Quantifizierung des GPIIb-IIIa-Komplexes auf der Thrombozytenmembran erfolgt mittels Durchflusszytometrie. Entsprechend dem Ausmaß des Rezeptorbesatzes werden drei Gruppen unterschieden [121] (TypI: GPIIb-IIIa-Besatz < 5%; TypII: GPIIb-IIIa-Besatz 10-20%; TypIII: Varianten, Rezeptorbesatz > 50%). Die klinische Blutungsneigung variiert in Abhängigkeit vom jeweiligen Typ von petechialen Einblutungen und milden Schleimhautblutungen bis hin zu lebensbedrohlichen Blutungen. Das therapeutische Vorgehen entspricht im Wesentlichen der Therapie des BSS. Die einzige kurative Möglichkeit im Falle einer schweren klinischen Ausprägung bietet die allogene Knochenmarkstransplantation [7].

### **Plättchensekretionsstörungen (Storage-Pool-Diseases)**

Die Exozytose der Speichergranula im Zuge der Plättchenaktivierung führt nach Bindung der Plättchenagonisten an ihre spezifischen Rezeptoren über verschiedene Signaltransduktionsschritte zu einer Rekrutierung und Aktivierung weiterer Thrombozyten sowie zu einer Formänderung der Blutplättchen. Hereditäre Störungen der Plättchensekretion (Storage-Pool-Diseases, SPD) können entweder die  $\alpha$ - oder  $\delta$ -Granula oder beide zusammen betreffen.

Die sehr seltene Alpha-Storage-Pool-Erkrankung, auch Gray-Platelet-Syndrom genannt, resultiert aus einer Verminderung reifer  $\alpha$ -Granula und wurde erstmals 1971 beschrieben [121]. Der Defekt ist elektronenmikroskopisch nachweisbar, die betroffenen Blutplättchen erscheinen vergrößert, agranulär und grau. Die klinische Blutungsneigung ist interindividuell sehr heterogen, allerdings stellt die häufig auftretende Fibrosierung des Knochenmarks eine zusätzliche Komplikation dar [84]. Die therapeutischen Optionen beschränken sich aktuell auf die Gabe von Thrombozytenkonzentraten sowie den Einsatz von DDAVP [84].

Bei den Delta-Storage-Pool-Erkrankungen handelt es sich um eine genetisch heterogene Gruppe von Plättchenfunktionsstörungen, denen eine Reduktion der Anzahl oder des Inhaltes der dichten Granula gemeinsam ist. Defekte der dichten Granula können isoliert oder in Kombination mit genetischen Syndromen wie Hermansky-Pudlak-Syndrom und Chediak-Higashi-Syndrom auftreten. Allerdings wurde im Rahmen verschiedener hämato-onkologischer Erkrankungen auch über erworbene Formen der  $\delta$ -Storage-Pool-Disease berichtet [73]. Die momentan verfügbaren Therapieoptionen sind lediglich symptomatischer Natur und beinhalten

die Gabe AB0- und HLA-kompatibler Thrombozytenkonzentrate sowie die Applikation von Tranexamsäure und rekombinantem FVIIa.

### 3.3.2 Erworbene Thrombozytopathien

Erworbene Störungen der Plättchenfunktion sind im klinischen Alltag sehr häufig und resultieren aus einer Vielzahl medikamentöser und nicht-medikamentöser Ursachen (siehe Tabelle 1), deren Pathogenese zum Teil sehr komplex ist. Eine genaue Diagnosestellung wird vor allem durch die Koinzidenz mehrerer möglicher Auslöser erschwert. Zusammen mit den erworbenen Thrombozytopenien sind erworbene Störungen der Plättchenfunktion ursächlich für mehr als zwei Drittel aller hämorrhagischen Diathesen [78].

#### Medikamentös induzierte Plättchenfunktionsstörungen

Medikamente stellen die weitaus häufigste Ursache erworbener Thrombozytopathien dar. Im Falle der so genannten „Plättchenfunktionshemmer“ ist eine Hemmung der Thrombozytenfunktion die pharmakologische und klinische Intention, während es sich bei vielen anderen Medikamenten um unerwünschte und oftmals unerkannte Nebeneffekte handelt, welche in bestimmten klinischen Situationen Blutungen auslösen, fördern oder verschlimmern können. Einen Überblick über diese Medikamente und Nahrungsmittel gibt Tabelle 2.

**Tab. 2**

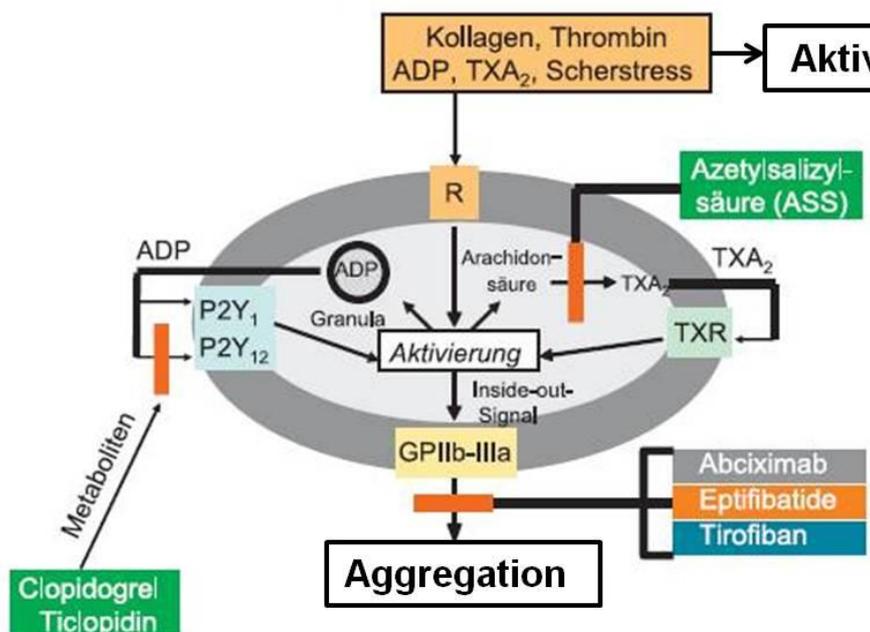
Auflistung einiger Medikamente und Nahrungsmittel, die eine Plättchenfunktionsstörung induzieren können, modifiziert nach [110].

<b>Wirkstoff</b>	<b>Zugrunde liegender oder vorgeschlagener Wirkmechanismus</b>
Acetylsalicylsäure	Irreversible Inhibition der COX-1
Andere NSAR (Indometacin, Diclofenac, Ibuprofen, Naproxen)	Reversible Inhibition der COX-1
Thienopyridine (Ticlopidin, Clopidogrel)	Irreversible Blockade des ADP-Rezeptors P2Y <sub>12</sub>
GPIIb-IIIa-Rezeptor-Antagonisten (Abciximab, Tirofiban, Eptifibatid)	Antagonismus am GPIIb-IIIa-Rezeptor
β-Lactam-Antibiotika (Penicilline, Cephalosporine)	Penicilline: Interaktion mit Plättchenrezeptoren und/oder vWF Cephalosporine: Interaktion mit Komponenten der Plättchenmembran
Nitrofurantoin	Inhibition der COX-1 (Tiermodell)

Miconazol	Inhibition der COX-1 (Tiermodell)
Aktivatoren der Adenylatzyklase (Prostanoide, Adenosin)	Erhöhung des intrathrombozytären cAMP-Spiegels
Heparine (UFH, LMWH)	Diverse
Phosphodiesterase-Inhibitoren (Dipyridamol, Theophyllin, Koffein)	Erhöhung des intrathrombozytären cAMP-Spiegels
Nitrate	Erhöhung von NO → Erhöhung des thrombozytären cAMP und cGMP
Kalzium-Antagonisten (Verapamil, Nifedipin, Diltiazem)	Hemmung der Plättchenantwort auf TXA <sub>2</sub> und Serotonin
Statine	Evtl. Veränderungen der Lipidzusammensetzung der thrombozytären Plasmamembran
Thrombolytika (Streptokinase, Urokinase, t-PA)	Multiple Mechanismen werden vorgeschlagen
Kolloidale Volumenersatzstoffe (Dextrane, HAES)	Interaktion mit Komponenten der Plasmamembran
Antihistaminika	Unklar
Trizyklische Antidepressiva	Unklar
SSRI	Multiple Mechanismen werden vorgeschlagen
Chemotherapeutika ( Cisplatin, Cyclophosphamid, Melphalan)	Verminderte Plättchensekretion
Alkohol	Unklar
Omega-3-Fettsäuren	Reduktion der Bildung von TXA <sub>2</sub>
Knoblauch, Zwiebelextrakte	Inhibition des Arachidonsäure-Metabolismus, Interaktion mit der Bindung von Fibrinogen

Obwohl die in Tabelle 2 aufgeführten Medikamente und Substanzen alle in gewisser Weise eine in vitro Verschlechterung der Plättchenfunktion induzieren, sind klinisch relevante Blutungen bisher nur im Zusammenhang mit „Plättchenfunktionshemmern“ im engeren Sinne sowie wenigen anderen Substanzen wie beispielsweise SSRIs beschrieben worden [40, 110]. Trotzdem sollte gerade bei älteren Patienten aufgrund der Vielzahl der eingenommenen Medikamente und Nahrungsergänzungsmittel und den sich daraus ergebenden Interaktionen eine mögliche iatrogene Erhöhung der Blutungsneigung bedacht werden.

Plättchenfunktionshemmende Substanzen wie Acetylsalicylsäure, ADP-Rezeptor-Antagonisten und GPIIb-IIIa-Rezeptor-Antagonisten werden in der Akuttherapie des akuten Koronarsyndroms, der Langzeittherapie koronarer, zerebraler und peripherer arterieller Durchblutungsstörungen sowie zur Verhütung von Thromboembolien nach Stentimplantation erfolgreich eingesetzt. Sie greifen an bestimmten Punkten der Plättchenaktivierung und -aggregation ein und hemmen so die Funktion der Thrombozyten im Rahmen der Atherogenese und Thrombusbildung (siehe Abb. 3).

**Abb. 3**

Darstellung plättchenfunktionshemmender Substanzen und ihrer Angriffspunkte, modifiziert nach [109].

Acetylsalicylsäure (ASS) hemmt über die irreversible Acetylierung eines Serinrests der Cyclooxygenase-1 (COX-1) die Bildung von Thromboxan A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>). ADP-Rezeptor-Antagonisten wie Clopidogrel und Ticlopidin blockieren nach Umwandlung zu aktiven Metaboliten irreversibel die Anlagerung von ADP an den P2Y<sub>12</sub>-Rezeptor. Auf diese Weise wird eine Plättchenaktivierung durch die Blockade aktiver Verstärkerschleifen verhindert. GPIIb-IIIa-Rezeptor-Antagonisten wie Abciximab, Tirofiban und Eptifibatid binden an das Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$ , blockieren den finalen Mechanismus der Plättchenaktivierung und verhindern so die Aggregation der Thrombozyten.

R: Rezeptor; TXR: Thromboxan-Rezeptor

### Plättchenfunktionsstörungen bei chronischer Niereninsuffizienz

Multifaktorielle Störungen der Thrombozytenfunktion stehen in engem kausalen Zusammenhang mit der bei urämischen Patienten häufig beobachteten Verlängerung der Blutungszeit, wohingegen Tests der plasmatischen Gerinnung wie aPTT und Prothrombinzeit nach Quick keine Auffälligkeiten zeigen. Blutungen treten bei circa einem Drittel der urämischen Patienten auf [10]. Die zugrunde liegenden Pathomechanismen sind bis heute nur unzureichend verstanden, diskutiert werden unter anderem Störungen der Freisetzung der Inhaltsstoffe der Plättchengranula, eine Verminderung des Gehalts an Serotonin und ADP in den Granula, eine Erhöhung von cAMP und NO sowie eine Dysfunktion des vWF [72]. Durch Hämodialyse sowie durch eine Erhöhung des Hämatokrits auf 30% mittels rekombinantem humanen Erythropoetin wird eine Verbesserung der hämostatischen Funktion beobachtet [10].

Die Applikation von Desmopressin [71] und konjugierten Östrogenen [68] führt zu einer deutlichen Verkürzung der Blutungszeit sowie zu einer Verbesserung der Hämostase bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz.

### **Plättchenfunktionsstörungen bei Leberzirrhose**

Die Blutungsneigung bei Patienten mit chronischen Lebererkrankungen ist komplexer Natur und beruht unter anderem auf einer Kombination von unterschiedlichen Störungen des Megakaryozyten-Plättchen-Systems, der plasmatischen Gerinnung sowie der Fibrinolyse [141]. Die bei zirrhotischen Patienten häufig nachweisbare Thrombozytopenie resultiert aus einem verstärkten linealen Pooling und einer Reduktion der Plättchenüberlebenszeit sowie aus Störungen der Thrombopoese und einem erhöhten Plättchenumsatz. Die Beeinträchtigung der Thrombozytenfunktion bei Patienten mit Leberzirrhose beruht auf einer Vielzahl unterschiedlicher Pathomechanismen. Diskutiert werden in diesem Rahmen unter anderem erworbene Storage-Pool-Defekte, komplexe Störungen in verschiedenen Mechanismen der Signaltransduktion sowie eine Verminderung der Anzahl der Plättchenrezeptoren [67]. Das Auftreten von Blutungen ist allerdings nicht hauptsächlich verursacht durch Störungen der Thrombozytenfunktion, sondern stellt primär eine Komplikation der portalen Hypertension dar [67], welche durch die begleitenden Hämostasestörungen zusätzlich kompliziert wird.

### **Plättchenfunktionsstörungen im Rahmen einer extrakorporalen Zirkulation**

Die Beeinträchtigung der Plättchenfunktion im Rahmen extrakorporaler Zirkulationsverfahren ist vielfältig und wird oftmals als einer der Hauptgründe für Blutungskomplikationen im Rahmen kardiochirurgischer Operationen angesehen [87]. Eine aufgrund der Hämodilution regelmäßig auftretende, meist jedoch nur transiente Thrombozytopenie scheint nicht primär ursächlich für diese Funktionsstörung zu sein. Frühere Studien legen nahe, dass der Kontakt der Plättchen mit Fremdoberflächen zu einer Plättchenaktivierung führt, messbar an einer verminderten in vitro Aggregation, einer verstärkten Plättchendegranulation sowie einem qualitativ und quantitativ veränderten Glykoproteinmuster auf der Thrombozytenmembran [97]. Ebenfalls als ursächlich für die Entwicklung klinisch relevanter Plättchenfunktionsstörungen im Rahmen extrakorporaler Zirkulationsverfahren werden die Einwirkungen von Heparin und Hypothermie angesehen [87]. Kestin et al. fanden allerdings bei der durchflusszytometrischen Analyse von

Thrombozyten kardiochirurgischer Patienten nach kardiopulmonalem Bypass weder eine Verschlechterung der *in vitro* Reaktivität noch eine Verminderung der GPIb-V-IX- und GPIIb-IIIa-Komplexe sowie nur eine geringe Anzahl degranulierter Plättchen [57]. Die detaillierten Auswirkungen einer extrakorporalen Zirkulation auf die Thrombozytenfunktion müssen daher in weiteren Studien evaluiert werden.

### 3.4 Methoden der Thrombozytenfunktionsdiagnostik

Plättchenfunktionstests wurden initial zur Erfassung angeborener und erworbener Thrombozytenfunktionsstörungen sowie zur Detektion einer Plättchenaktivierung entwickelt. Im Zuge der Weiterentwicklung pharmakologischer Angriffspunkte zur gezielten Hemmung der Plättchenaggregation bei Patienten mit kardiovaskulären Risikofaktoren bzw. nach kardiovaskulären Ereignissen werden Thrombozytenfunktionstests mittlerweile vermehrt im klinischen Alltag eingesetzt um eine Behandlung mit Thrombozytenfunktionshemmern zu überwachen und mögliche Nonresponder zu identifizieren [75].

Weiterhin hat die Thrombozytenfunktionsdiagnostik einen wichtigen Stellenwert in der prä-, peri- und postoperativen Betreuung blutungsgefährdeter Patienten sowie in der Erfassung möglicher Ursachen von hämorrhagischen Diathesen.

#### 3.4.1 Standardmethoden

##### **Messung der Blutungszeit**

Die Erfassung der Blutungszeit ist einer der ältesten Tests zur Charakterisierung der Thrombozytenfunktion. Es existieren drei unterschiedliche Verfahren, denen dasselbe Prinzip zugrunde liegt. Nach einer relativ oberflächlichen (Stich-) Inzision wird die Zeit bis zum Sistieren der Blutung gestoppt.

**Blutungszeit nach Duke:** Stichinzision in Fingerbeere oder Ohrläppchen (ca. 3 mm tief), Abtupfen des austretenden Blutes mit einem Filterpapier bis zum Sistieren der Blutung.

**Subaquale Blutungszeit nach Marx:** Stichinzision in die Fingerbeere und Eintauchen der Wunde in 37 °C warmes Wasser bis zum Stillstand der Blutung.

**Standardisierte Blutungszeit nach Ivy:** Aufpumpen einer Blutdruckmanschette am Oberarm auf einen Druck von 40 mmHg, Setzen eines Schnittes von definierter Länge und Tiefe mit einem automatischen Schneidegerät, Abtupfen des austretenden Blutes mit einem Filterpapier bis zum Sistieren der Blutung.

Die Vorteile der Methode liegen in der einfachen und schnellen Durchführbarkeit. Nachteilig sind die starke Untersucherabhängigkeit und die Beeinflussung durch Faktoren wie Hautdicke und -temperatur. Weiterhin variieren die Angaben zu den jeweiligen Referenzbereichen sehr stark, so dass die Bestimmung der in vivo Blutungszeit in den Diagnostikalgorithmien bei Verdacht auf eine Plättchenfunktionsstörung nicht mehr empfohlen wird [70, 103].

### **Induzierte Plättchenaggregation nach Born**

Das Verfahren der Lichttransmissionsaggregometrie (LTA) wurde erstmals 1962 von Born beschrieben [12] und gilt auch heute noch als „Goldstandard“ in der Thrombozytenfunktionsdiagnostik. Das Testprinzip beinhaltet die photometrische Erfassung der Veränderung der Lichttransmission in plättchenreichem Plasma (PRP) als Folge der Bildung von Plättchenaggregaten nach Zugabe verschiedener Agonisten wie ADP, Arachidonsäure, Kollagen, Ristocetin, TRAP und Thrombin [95]. Plättchenarmes Plasma (PPP) dient als Kontrolle (100%ige Lichtdurchlässigkeit). Die LTA wird eingesetzt zum Monitoring einer Therapie mit Plättchenfunktionshemmern (ASS, Thienopyridine, GPIIb-IIIa-Inhibitoren) und zur Erfassung angeborener Thrombozytopathien. Nachteile des Verfahrens sind die schlechte Reproduzierbarkeit durch die Notwendigkeit speziell geschulter Anwender, eine zeitintensive Probenpräparation, die Verwendung großer Probenvolumina und eine relativ lange Analysezeit. Aufgrund der Verwendung von plättchenreichem Plasma anstelle von Vollblut können die physiologischerweise im Rahmen der Plättchenaggregation auftretenden Interaktionen von Erythrozyten, Thrombozyten und Leukozyten nicht berücksichtigt werden. Weiterhin ist die Methode nicht für Thrombozytenkonzentrationen unter 100000/ $\mu$ l sowie für die Verwendung von lipämischem Plasma geeignet [93]. Aufgrund der Koexistenz unterschiedlicher Verfahren zur Herstellung von PRP und durch die Verwendung verschiedener Agonisten-Konzentrationen wird die Interpretation und Vergleichbarkeit von Studienergebnissen erschwert [70].

### **Durchflusszytometrie**

Die im Zuge einer Plättchenaktivierung vermehrt bzw. verändert exponierten Antigene auf der Plasmamembran von Thrombozyten können nach Induktion einer Immunfluoreszenz mittels Durchflusszytometrie analysiert werden [111]. Die Verwendung bestimmter fluoreszenzmarkierter monoklonaler Antikörper erlaubt einen gezielten Nachweis aktivierungsabhängiger Glykoproteine wie GPIIb-IIIa oder

CD62. Die Methode der Durchflusszytometrie gilt aktuell als Standardverfahren zur Erfassung der häufigsten hereditären Thrombozytopathien wie Bernard-Soulier-Syndrom, Thrombasthenie Glanzmann oder von Storage-Pool-Defekten [70]. Das Monitoring einer Therapie mit Plättchenfunktionshemmern ist ebenfalls möglich [13]. Der Vorteil des Verfahrens liegt in der Möglichkeit der Verwendung von Vollblut und somit in der Erhaltung eines physiologischen Testmilieus. Die für die Analysen benötigten Probenvolumina sind ebenfalls sehr gering. Mithilfe spezifischer monoklonaler Antikörper kann eine Vielzahl unterschiedlicher Antigene untersucht werden. Als Nachteile sind jedoch die Kostenintensität, der hohe Zeitaufwand sowie die Notwendigkeit speziell geschulten Personals zu nennen.

### **3.4.2 Point-of-Care-Methoden**

Point-of-Care (POC)-Verfahren erlauben eine patientennahe Evaluierung der Thrombozytenfunktion in antikoagulierten Vollblutansätzen. Im Gegensatz zu den herkömmlichen Labormethoden sind die Ergebnisse nicht von der Expertise des Anwenders abhängig und können meist ohne bzw. mit nur geringer Probenaufbereitung durchgeführt werden. Die Vorteile der POC-Methoden liegen in der Verwendung geringer Probenvolumina, der standardisierten und automatisierten Durchführbarkeit sowie in der schnellen Verfügbarkeit der Messparameter [70].

Die häufigsten POC-Geräte sollen nachfolgend näher erläutert werden.

#### **Platelet Function Analyzer 100 (PFA-100®)**

Der PFA-100® ist ein System zur Beurteilung der Thrombozytenadhäsion und -aggregation unter High-shear-Stress-Bedingungen [25]. Die ersten Beschreibungen von Kratzer und Born datieren aus dem Jahr 1985, die Einführung des Systems erfolgte 1995 [24]. Zitrat-antikoaguliertes Vollblut wird in eine Messzelle gefüllt und unter Vakuumbedingungen durch eine Kapillare in Richtung einer mit Kollagen sowie ADP oder Epinephrin beschichteten Nitrozellulosemembran gesaugt. In der Mitte dieser Membran befindet sich eine Öffnung mit einem Durchmesser von 150 µm. Die Thrombozyten adhärieren an der Kollagenmembran, aggregieren und verschließen dadurch die Öffnung, was zum Sistieren des Blutflusses führt. Die Zeit (in Sekunden) bis zum Verschluss der Membranöffnung durch den Thrombozytenpropf (Closure time, CT) wird registriert und dient als Maß für die Thrombozytenfunktion. Seit 2010 ist eine zusätzliche Messzelle zur Detektion von P2Y<sub>12</sub>-Antagonisten erhältlich. Der PFA-100® wird auch als „in vitro Blutungszeit“ bezeichnet, da er die in vivo Situation

einer Gefäßverletzung simuliert. Koscielny et al. zeigten 2007 an einer Studie mit 5649 Patienten, dass der PFA-100<sup>®</sup> in Kombination mit einer standardisierten Blutungsanamnese zur präoperativen Identifikation von Patienten mit klinisch relevanter Blutungsneigung geeignet ist [61]. Insgesamt belegen viele verschiedene Studien die Eignung des PFA-100<sup>®</sup> zur Detektion angeborener Thrombozytopathien, zum Monitoring einer Therapie mit Plättchenfunktionshemmern sowie zur Erkennung eines von Willebrand-Syndroms (abhängig vom jeweiligen Typ) [24, 70]. Als Nachteil des Systems ist die Beeinflussung durch Hämatokrit, vWF-Levels und Thrombozytenzahl zu werten.

### **VerifyNow<sup>®</sup>**

Beim VerifyNow<sup>®</sup> oder Ultra Rapid Platelet Function-Analyzer handelt es sich um ein POC-Gerät zur Überwachung einer Medikation mit ASS, Thienopyridinen und GPIIb-IIIa-Antagonisten. Das Testprinzip leitet sich von der Born-Aggregometrie ab und basiert auf der Detektion einer prozentualen Zunahme der Lichtdurchlässigkeit als Folge einer Thrombozytenaggregation. Nach Zugabe verschiedener Agonisten werden die Thrombozyten in der Reaktionskammer aktiviert und binden über den aktivierten GPIIb-IIIa-Rezeptor an Fibrinogen-beschichtete Latexpartikel. Diese fallen durch die Agglutination aus und erhöhen das Ausmaß der photometrisch bestimmten Lichtdurchlässigkeit. Bei der Verwendung des GPIIb-IIIa-Assays zeigt sich eine direkte Relation zwischen dem Ausmaß der Rezeptorbesetzung durch die Antagonisten und dem Testergebnis im Assay [75]. Weiterhin zeigten Steinhubl et al. 2001 an einer Studie mit 500 Patienten, dass das Ausmaß der Rezeptorbesetzung durch die GPIIb-IIIa-Antagonisten die Häufigkeit des Auftretens kardiovaskulärer Ereignisse (major adverse cardiac events, MACE) prognostizieren kann [130]. Das System ist nicht geeignet zur Erkennung eines von Willebrand-Syndroms und ist Hämatokrit- und Thrombozytenzahl-abhängig.

### **Plateletworks<sup>®</sup>**

Dieses System ist in Europa nicht sehr weit verbreitet und basiert auf dem Prinzip der Thrombozytenaggregation und Thrombozytenzählung. In der nativen Blutprobe wird die Plättchenzahl gemessen, welche als Referenzwert dient. Nach Zugabe von Agonisten bilden sich Plättchenaggregate, die bei der anschließenden Thrombozytenzählung nicht mehr registriert werden. Die Differenz aus den Plättchenzahlen

der Ausgangsprobe und der Probe nach Aggregation gilt hierbei als Maß für die Thrombozytenfunktion.

### **Impact Cone and Plate(let) Analyzer®**

Zitratantikoaguliertes Vollblut wird auf eine mit Polystyrol beschichtete Platte aufgebracht und über einen rotierenden Stempel einer gleichförmig hohen Scherrate ausgesetzt. Die Thrombozytenadhäsion und -aggregation wird anhand des Ausmaßes der Plättchendeponierung auf der Platte analysiert. Ein Bildanalysator gibt den Prozentsatz der bedeckten Oberfläche (percent of surface coverage, SC) und die durchschnittliche Größe der Aggregate (average size, AS) an. In Bezug auf den Nutzen im klinischen Alltag und die Möglichkeit eines Therapiemonitorings von Plättchenhemmern existieren unterschiedliche Meinungen [118, 140].

### **Thrombelastographie (TEG®) und Rotationsthrombelastometrie (ROTEM®)**

Das erstmals 1948 von Hartert [42] beschriebene Prinzip der Thrombelastographie erlaubt die Analyse der viskoelastischen Eigenschaften von Vollblut während der Thrombusformation und -lyse. Hierbei ragt ein Stempel in eine in Längsrichtung oszillierende Messküvette, welche die Blutprobe enthält. Durch Aktivierung des Gerinnungsprozesses bilden sich Fibrinfäden zwischen der Messküvette und dem Stempel, wodurch die Änderungen der Viskoelastizität des Blutes auf den Stempel übertragen und graphisch als Kurve über die Zeit aufgezeichnet werden. Im Gegensatz zur klassischen Gerinnungsdiagnostik ermöglicht die Thrombelastographie somit auch eine Beschreibung der Parameter Gerinnselfestigkeit und -stabilität. Aufgrund der aufwändigen Handhabung und der starken Empfindlichkeit gegenüber Erschütterungen konnte sich das System gerade in Europa nur unzureichend im patientennahen Setting durchsetzen [63].

In den 90er Jahren entwickelte die Arbeitsgruppe um Calatzis das Prinzip der Thrombelastographie zur so genannten Rotationsthrombelastometrie weiter. Im Gegensatz zur klassischen Thrombelastographie rotiert hierbei nicht die Messküvette, sondern der Stempel, welcher zusätzlich durch ein Präzisionskugellager stabilisiert wird. Hierdurch reagiert das System weniger stark auf Erschütterungen und ist dadurch als POC-Gerät einsetzbar. Als Probenmaterial wird zitratantikoaguliertes Vollblut verwendet, die Messung wird durch die Zugabe von Kalzium und den jeweiligen Aktivatoren gestartet. Anhand der generierten Kurven können die Gerinnungszeit (clotting time, CT), die Dynamik der Thrombingenerierung

(clot formation time, CFT), sowie die mechanische Gerinnselstabilität und die Stabilität über die Zeit erfasst werden. Das ROTEM<sup>®</sup>-System erlaubt die Erfassung eines ausgeprägten Mangels an enzymatischen Gerinnungsfaktoren, einer Hyperfibrinolyse sowie eines Fibrinogen- und Thrombozytenmangels [32]. Aufgrund der starken Thrombingenerierung ist ein genaues Monitoring der Effekte von Plättchenfunktionshemmern nur eingeschränkt möglich.

### **Multiple Platelet Function Analyzer (Multiplate<sup>®</sup>)**

Das Grundprinzip der Impedanzaggregometrie wurde erstmals 1980 von Cardinal und Flower beschrieben [19]. Es basiert auf der Anlagerung und Aggregation aktivierter Blutplättchen an zwei silberbeschichteten Elektroden, woraus eine Erhöhung des elektrischen Widerstandes (so genannte „Impedanz“, da Verwendung von Wechselstrom) resultiert. Diese Impedanzänderung wird kontinuierlich registriert und ist proportional zur Menge der aggregierten Thrombozyten.

Riess et al. verglichen 1986 die Impedanzaggregometrie in Vollblut bzw. PRP mit der als Goldstandard geltenden induzierten Plättchenaggregometrie nach Born. Bei gesunden Probanden zeigten sich für beide Methoden vergleichbare Resultate bei der Verwendung der Thrombozytenagonisten ADP und Kollagen. Im Vergleich zur PRP-Impedanzaggregometrie zeigte die Vollblut-Impedanzaggregometrie eine höhere Empfindlichkeit gegenüber den aktivierenden Agonisten Thrombin, Ristocetin und Arachidonsäure sowie gegenüber den inhibierenden Effekten von Acetylsalicylsäure und Prostazyklin [96].

Das Multiplate<sup>®</sup>-Gerät („multiple platelet function analyzer“) arbeitet nach dem Prinzip der multiplen Impedanzaggregometrie (multiple electrode aggregometry, MEA) und stellt eine Weiterentwicklung der klassischen Impedanzaggregometrie nach Cardinal und Flower dar. Das Gerät stellt fünf Messkanäle für parallele Messungen bereit. Jede Einmalküvette beinhaltet zwei silberbeschichtete Drahtsensorpärchen (Länge je 3 mm, Durchmesser 0,3 mm), welche die resultierenden Impedanzänderungen unabhängig voneinander registrieren und somit als interne Qualitätskontrolle dienen (siehe auch Abbildungen 4 und 5). Weiterhin sorgt ein PTFE-beschichteter Magnetührer für eine ständige Durchmischung der Probe. Je 300 µl einer Heparin- oder Hirudin-antikoagulierten Vollblutprobe werden in einer automatisierten Pipettiersequenz 1:1 mit einer 0,9%igen, auf 37 °C vorgewärmten Kochsalzlösung verdünnt. Nach einer 3-minütigen Inkubationsphase bei 37 °C wird die Testreihe durch die Zugabe von 20 µl der jeweiligen Plättchenaktivatorlösung gestartet.

Eine Auflistung der kommerziell erhältlichen Thrombozytenagonisten zeigt Tabelle 3. Während der 6-minütigen Testlaufzeit registriert das Gerät die Anlagerung der Thrombozyten an die Sensoreinheiten der jeweiligen Drahtpärchen sowie die daraus resultierende Erhöhung des elektrischen Widerstandes. Diese Impedanzänderung wird kontinuierlich registriert und in frei wählbaren Aggregationseinheiten (Aggregation Units, AU) graphisch über die Zeit aufgezeichnet. Im Rahmen der Multiplate<sup>®</sup>-Analysen werden drei Parameter berechnet: die Aggregation (in AU), die Velocity (in AU/min) sowie das Integral unter der Aggregationskurve (Area under the Curve, AUC [U]). In dieser Arbeit wird durchgängig die AUC mit der Einheit Unit (U) verwendet.

Die automatische interne Qualitätskontrolle beinhaltet für jeden Messkanal die Berechnung des Pearson-Korrelationskoeffizienten sowie den Vergleich des Kurvenverlaufs der beiden Drahtsensorpärchen. Liegt der Korrelationskoeffizient unter 0,98 bzw. die Differenz der beiden Kurven über 20% wird die Messung als fehlerhaft gewertet und der Benutzer zur Wiederholung aufgefordert.

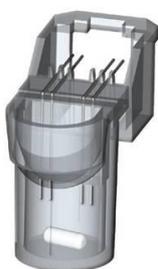
Aufgrund der Aufzeichnung elektrischer Signale können die Multiplate<sup>®</sup>-Analysen im Gegensatz zur Lichttransmissionsaggregometrie auch bei lipämischen Proben durchgeführt werden, welche mit den optischen Analysen der LTA interferieren würden. Weiterhin sind die Messergebnisse unabhängig von der Blutgruppe des jeweiligen Probanden und variieren im Tagesverlauf nicht signifikant [117]. Bezüglich des Einflusses der Thrombozytenzahl zeigten diverse Studien eine deutlich verringerte Aggregation bei Werten unter 100000/ $\mu$ l, so dass die Multiplate<sup>®</sup>-Ergebnisse thrombozytopenischer Patienten mit Vorsicht interpretiert werden müssen [41, 131]. In Abhängigkeit von den verwendeten Plättchenaktivatoren zeigt das Multiplate<sup>®</sup> eine hohe Sensitivität für die Effekte von ASS, Clopidogrel und GPIIb/IIIa-Antagonisten. Sibbing et al. konnten nachweisen, dass Patienten, welche im Rahmen einer Stentimplantation anhand ihrer Multiplate<sup>®</sup>-Ergebnisse als Clopidogrel-non-Responder klassifiziert wurden, ein signifikant höheres Risiko für eine Stentthrombose aufwiesen [120]. Die Arbeitsgruppe um Rahe-Meyer konnte nachweisen, dass die Ergebnisse der Multiplate<sup>®</sup>-Analysen einen prädiktiven Wert bezüglich des peri- und postoperativen Transfusionsbedarfs an Thrombozytenkonzentraten im Rahmen herzchirurgischer Eingriffe haben und dass der präoperative Einsatz der Impedanzaggregometrie geeignet ist um Patienten mit einem erhöhten Blutungsrisiko zu identifizieren [91, 92]. Weiterhin konnten Weber et al. die Eignung des Multiplate<sup>®</sup>

zum Monitoring der Effekte einer Therapie mit DDAVP bei kardiochirurgischen Patienten zeigen [143]. In Kombination mit der Rotationsthrombelastometrie scheint die multiple Impedanzaggregometrie die diagnostischen Lücken der konventionellen Gerinnungsdiagnostik zu schmälern. Sie wird daher insbesondere im peri- und post-operativen Setting zunehmend eingesetzt um die Gerinnungsfunktion detailliert zu analysieren und therapeutische Interventionen dementsprechend anzupassen [30].

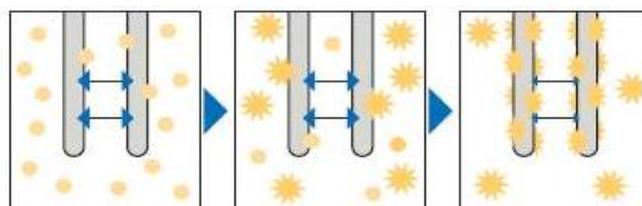
**Tab. 3**

Auflistung der kommerziell erhältlichen Multiplate<sup>®</sup>-Testreihen und Beschreibung der Aktivierungswege.

<b>ASPItest<sup>®</sup></b>	Arachidonsäure wird als Substrat der Cyclooxygenase (COX) im Thrombozyten zu TXA <sub>2</sub> umgewandelt.
<b>ADPtest<sup>®</sup></b>	ADP stimuliert Thrombozyten über die ADP-Rezeptoren P2Y <sub>1</sub> und P2Y <sub>12</sub> .
<b>ADPtest<sup>®</sup>HS</b>	Durch Zusatz des endogenen Thrombozytenaggregationshemmers Prostaglandin E <sub>1</sub> wird die Sensitivität bezüglich der Effekte von ADP-Antagonisten erhöht.
<b>TRAPtest<sup>®</sup></b>	TRAP-6 (SFLLRN) führt durch Stimulation der Thrombinrezeptoren PAR1 und PAR4 zu einer starken Thrombozytenaktivierung.
<b>COLtest<sup>®</sup></b>	Kollagen aktiviert den thrombozytären GPIIb/IIIa-Rezeptor, wodurch es zu einer endogenen Freisetzung von Arachidonsäure und konsekutiv zur Bildung von TXA <sub>2</sub> kommt.
<b>RISTOtest<sup>®</sup></b>	Ristocetin-induzierte Thrombozytenaggregation.



**Abb. 4**  
Schematische Darstellung einer Messküvette, nach [146].



**Abb. 5**  
Anlagerung aktivierter Thrombozyten an die Sensordrähte, nach [146].

### 3.5 Thrombozytenkonzentrate

Die ersten Übertragungen von Tierblut auf den Menschen erfolgten bereits 1667 durch Denis und Emmerez in Paris [5, 8]. Im Jahre 1825 gelang James Blundell im geburtshilflichen Kontext erstmals die Transfusion von menschlichem Blut. Die Entdeckung der vier Blutgruppen des AB0-Systems – vorherrschend durch den Wiener Pathologen Karl Landsteiner – im Jahre 1900 [5] sowie die Entwicklung von Zitratpuffern zur Antikoagulation von Vollblutkonserven führten im Verlauf des zwanzigsten Jahrhunderts zu einer zunehmenden Verwendung von Blutkonserven zur Therapie von Blutungen.

Während sich die Komponententherapie aufgrund der vorreitenden Arbeiten zur Plasmafraktionierung von E.J. Cohn [107] bereits während des zweiten Weltkriegs etablierte, rückte die Idee einer Transfusion von Thrombozyten im Zuge der Entwicklung verbesserter Zytostatika bei der Behandlung von Leukämiepatienten und der daraus resultierenden erhöhten Blutungsneigung vermehrt in den Fokus des Interesses. Im Jahre 1959 verglich die Arbeitsgruppe um E.J. Freireich in einer prospektiven randomisierten Studie an Leukämiepatienten erstmals die Effekte von Frischblut und gelagerten Blutbankkonserven auf das Sistieren von Blutungen. Die Studie zeigte, dass es bei der Verwendung von Frischblut deutlich häufiger zu einem Blutungsstillstand kam als bei der Gabe von herkömmlich gelagerten Blutkonserven [27]. Zwei Jahre später entwickelte Freireich gemeinsam mit seinem Kollegen A. Kliman ein System zur Gewinnung von plättchenreichem Plasma mittels Plasmaferese für die Therapie von akuten Blutungen bei pädiatrischen Leukämiepatienten [28]. In einer retrospektiven Arbeit zeigten Freireich und Gaydos einen direkten, kontinuierlichen Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der Thrombozytopenie und dem Auftreten von Blutungskomplikationen bei Patienten mit akuter Leukämie [29]. Der Bedarf an Thrombozytensubstitutionen ist heute vor allem durch die breite Anwendung der Hochdosischemotherapie bei malignen Erkrankungen und die daraus resultierende Zunahme thrombozytopenischer Patienten steigend.

Die zunehmende Vereinfachung der Herstellungsprozesse sowie die Verbesserung von Lagerung und Verträglichkeit von Thrombozytenkonzentraten führen bis heute zu einer steigenden Nutzung in der Prophylaxe und Therapie thrombozytopenisch und thrombozythopathisch bedingter Blutungen.

Im Jahr 2007 lag die Gesamtzahl der in Deutschland hergestellten Thrombozyten-

konzentrate (Apherese- und Pool-TK) bei 480 189 Konzentraten und somit bereits um 5,6 % höher als im Vorjahr. Extrapoliert auf die Gesamtbevölkerung in Deutschland entspricht dies einem Schnitt von 5,5 Thrombozytenkonzentraten auf 1000 Einwohner [43].

### 3.5.1 Herstellung

Zur Herstellung von Thrombozytenkonzentraten existieren prinzipiell zwei unterschiedliche Verfahren. Die Konzentrate können entweder durch Poolen mehrerer Einheiten aus Vollblutspenden (Buffy-Coat- bzw. PRP-Verfahren) oder mittels Apheresetechnik gewonnen werden.

Bei der Herstellung von Apheresekonzentraten wird dem Spender venöses Blut, meist über die Cubitalvene, entnommen und in einen Zellseparator gepumpt, welcher die Thrombozyten nach Zentrifugation vom restlichen Blutvolumen trennt. Die verbleibenden Blutbestandteile werden dem Spender nachfolgend über eine Vene des kontralateralen Armes zurücktransfundiert oder im Falle einer Multikomponentenspende für die jeweiligen Indikationen weiterverwendet. Die Leukozytendepletion erfolgt entweder mithilfe spezieller Leukozytendepletionsfilter im Anschluss an die Thrombozytenseparation oder durch ein Aphereseverfahren mit integrierter Leukozytendepletion. Während einer Apheresesitzung können – je nach Ausgangswert der Thrombozytenzahl des Spenders – bis zu 3 Thrombozytenkonzentrate von einem Spender gewonnen werden.

Der Anteil der Apheresekonzentrate an der Gesamtzahl der hergestellten Thrombozytenkonzentrate betrug in Deutschland im Jahr 2007 59,8%, wohingegen der Anteil in Gesamteuropa nur 35% ausmacht [43].

Für die Herstellung von Plättchenkonzentraten aus Vollblutspenden stehen zwei Verfahren zur Verfügung, die sich hauptsächlich in der Reihenfolge der Zentrifugationsschritte unterscheiden.

Bei der PRP (Platelet Rich Plasma)-Methode wird die Vollblutspende im ersten Schritt bei geringer Umdrehungszahl zentrifugiert, wodurch sich die Mehrzahl der Thrombozyten im Plasmaüberstand anreichert (plättchenreiches Plasma, PRP). Im zweiten Schritt wird der plättchenreiche Überstand mit hoher Geschwindigkeit zentrifugiert, so dass die Thrombozyten sedimentieren und ein plättchenarmer Überstand entsteht, welcher entfernt wird. Die abzentrifugierten Thrombozyten werden in Plasma oder Stabilisatorlösung resuspendiert und mit den Thrombozyten

aus weiteren Vollblutspenden zu einem Thrombozytenkonzentrat gepoolt. Die PRP-Methode wird vor allem in den USA zur TK-Herstellung genutzt, wobei mittlerweile auch dort zunehmend Apherese-Konzentrate verwendet werden [125].

Das Buffy-Coat-Verfahren (BC) stellt in Europa die führende Methode zur TK-Gewinnung aus Vollblutspenden dar. Hierbei laufen die Zentrifugationsschritte im Prinzip genau gegenteilig zur PRP-Methode ab. Bei einer ersten schnellen Zentrifugation der Vollblutprobe entsteht zwischen den abzentrifugierten Erythrozyten und dem Plasmaüberstand eine leukozyten- und plättchenreiche Schicht, der so genannte Buffy Coat (BC). Die Buffy Coats von 4-6 AB0-gleichen Vollblutspenden [15] werden anschließend gepoolt und bei niedriger Umdrehungszahl zentrifugiert, so dass die Leukozyten sedimentieren und die Thrombozyten im Überstand verbleiben. Der thrombozytenreiche Überstand wird mit Plasma oder Stabilisatorlösung zum TK suspendiert. Die noch verbliebenen Leukozyten werden mithilfe eines Leukozyten-depletionsfilters weitgehend entfernt.

Die Frage, welches der beiden Präparate (Apherese-TK versus Pool-TK) bevorzugt verwendet werden sollte, ist Gegenstand aktueller wissenschaftlicher Diskussion und Fragestellung vieler Studien. Schrezenmeier und Seifried bewerteten 2010 in einem Review die aktuelle Studienlage. Sie kamen zu dem Ergebnis, dass Apherese-TK und Pool-TK (BC- und PRP-Methode) in Bezug auf Qualität, Sicherheit, Wirksamkeit (gemessen am CCI) und Verträglichkeit bei nicht-immunisierten Empfängern als gleichwertig zu erachten sind [113].

### **3.5.2 Qualitätskontrollen**

Laut den Angaben der Querschnittsleitlinie zur Therapie mit Blutkomponenten und Plasmaderivaten der Bundesärztekammer enthalten Pool-TK ca.  $240$  bis  $360 \times 10^9$  Thrombozyten in  $200$  bis  $350$  ml Plasma oder Plasmaersatz-Lösung [14]. Apherese-TK sollen ca.  $200$  bis  $400 \times 10^9$  Thrombozyten in  $200$  bis  $300$  ml Plasma enthalten. Die Lagerung erfolgt unter ständiger Agitation bei  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  in speziellen Thrombozytenlagerungsschränken.

Diverse Studien konnten zeigen, dass Thrombozyten in Folge einer Lagerung bei Raumtemperatur ( $20$ - $24^\circ\text{C}$ ) im Vergleich zu kälteren Temperaturen eine längere in-vivo-Überlebenszeit und eine bessere hämostatische Aktivität aufweisen [46, 79]. In Bezug auf den geforderten Aspekt der kontinuierlichen Agitation führten Hunter et al. 2001 eine Studie an PRP-Pool-TK durch um den Einfluss einer Unterbrechung

der Agitation auf die Plättchenfunktion zu charakterisieren. Hier zeigte sich, dass eine Unterbrechung der kontinuierlichen Agitation für bis zu 24 Stunden zu keinem Plättchenschaden führt, gemessen am Ausmaß der Hypotonic Shock Response sowie dem Ausmaß der Veränderung der Plättchenform. Dies war jedoch nur dann der Fall, wenn der pH-Wert über 6,5 lag. Eine Unterbrechung der Agitation für 2 Tage oder mehr resultierte in Abhängigkeit von der Plättchenkonzentration in einer vermehrten Laktatproduktion, einem erhöhten Risiko für einen pH-Abfall unter 6,5 und einer daraus resultierenden Verschlechterung der Plättchenfunktion [48].

Van der Meer et al. zeigten, dass eine Unterbrechung der Agitation für bis zu 4 Tage (TK in PASIIM-Additivlösung) bzw. 16 Stunden (TK in Composol® PS-Additivlösung) keine nachteiligen Auswirkungen auf die gängigen in vitro Parameter hat [137, 138].

Die Lagerungszeit von Thrombozytenkonzentraten in sterilen, gasdurchlässigen Kunststoffbeuteln ist nach den aktuellen Richtlinien zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten der Bundesärztekammer auf maximal 4 Tage (4x24h) ab 24:00 Uhr des jeweiligen Entnahmetages beschränkt [15], ausgenommen pathogeninaktivierte Thrombozytenkonzentrate [16]. Rock et al. sowie Dumont und VandenBroeke zeigten 2003, dass eine Ausweitung der Lagerungsdauer auf bis zu 7 Tage keinen nachteiligen Effekt auf die Plättchenfunktion hat [23, 102], allerdings bleibt zu befürchten, dass eine Verlängerung der Lagerungszeit zu einer erhöhten Rate bakteriell kontaminierter Produkte führt.

In einer Spontanerfassung des Paul-Ehrlich-Institutes wurden im Zeitraum von 1997-2007 insgesamt 5 tödliche Ausgänge bakterieller Infektionen durch Thrombozytenkonzentrate gemeldet. 4 dieser 5 Fälle wurden durch Thrombozytenkonzentrate an Tag 5 der Lagerungsdauer verursacht [3]. Laut den Hämotherapie-Leitlinien der Bundesärztekammer von 2008 lässt sich bei 0,1-0,5% aller TK-Einheiten eine bakterielle Kontamination nachweisen [14], die Häufigkeit klinisch relevanter Reaktionen auf eine bakterielle Besiedelung liegt bei ca. 1:100000 TK. Mit der Zulassung eines Systems zur Pathogenreduktion von Thrombozytenkonzentraten (INTERCEPT, Cerus, USA) durch das Paul-Ehrlich-Institut im Jahr 2007 besteht mittlerweile die Möglichkeit, Viren, Bakterien, Pilze und Protozoen sowie verbliebene Leukozyten durch Induktion irreversibler DNA- und RNA-Schäden effektiv zu inaktivieren und dadurch die Lagerungsdauer der Konzentrate zu verlängern. Die Auswirkung der Pathogenreduktion auf die Funktionalität der Thrombozyten ist Gegenstand aktueller wissenschaftlicher Kontroverse. Ein aktuelles Cochrane-

Review kommt zu dem Ergebnis, dass pathogeninaktivierte TK und herkömmliche TK in Bezug auf die Gesamtmortalität, das Auftreten klinisch relevanter Blutungen und Transfusionsreaktionen sowie Nebenwirkungen nicht signifikant unterschiedlich sind. Allerdings benötigte die Patientengruppe, welche pathogeninaktivierte TK erhalten hatte, 7% mehr Transfusionen. Ebenso war das relative Risiko für Plättchenfunktionsstörungen 2,74-fach höher [18].

Qualitätskontrollen der in Umlauf gebrachten Thrombozytenkonzentrate müssen regelmäßig bei mindestens 1% der hergestellten Transfusionseinheiten durchgeführt werden (Minimum 4 Einheiten pro Monat). Einen Überblick über die von der Bundesärztekammer geforderten Qualitätsmerkmale gibt Tabelle 4.

**Tab. 4**

Merkmale der Qualitätskontrolle für leukozytendepletierte Apherese- und Pool-TK, modifiziert nach [15].

Prüfparameter	Prüfkriterium	Prüfzeitpunkt
Volumen	gemäß Deklaration	nach Herstellung
Thrombozytengehalt	$> 2 \times 10^{11}$ pro Einheit	nach Herstellung am Haltbarkeitsende
Restgehalt an Leukozyten	$< 1 \times 10^6$ pro Einheit	nach Herstellung
Restgehalt an Erythrozyten	$< 3 \times 10^9$ pro Einheit	nach Herstellung
pH-Wert bei $22 \pm 2$ °C	6,4 bis 7,8 *	am Haltbarkeitsende
Visueller Aspekt	Beutel unversehrt, keine Verfärbung Swirling	jeweils am Haltbarkeitsende, vor Abgabe und vor Transfusion
Sterilität	steril	am Haltbarkeitsende

\* 90% der Präparate müssen einen pH-Wert zwischen 6,5 und 7,6 aufweisen.

Die Prüfung des so genannten Swirling-Phänomens stellt eine einfache und zugleich zuverlässige Methode im Rahmen der Qualitätskontrolle von Plättchenkonzentraten dar. Der Ausdruck Swirling beschreibt den visuellen Effekt der Lichtbrechung und Wirbelbildung bei der manuellen Durchmischung eines Thrombozytenkonzentrates vor einer starken Lichtquelle. Diese Wirbelbildung kommt dadurch zustande, dass

qualitativ hochwertige, funktionstüchtige Thrombozyten eine diskoide Form aufweisen und sich dadurch im Lichtstrahl ausrichten können. Bei einem Verlust der diskoiden Form, z.B. durch metabolischen Stress oder Alterungsprozesse, ist das Swirling-Phänomen nicht mehr nachweisbar. Positives Swirling als ein Indikator der Membranintegrität von Thrombozyten [21] zeigt eine gute Korrelation mit in vitro Parametern und der in vivo Funktionalität von Thrombozyten [9, 74].

### 3.5.3 Indikationen

Thrombozytentransfusionen werden therapeutisch zur Behandlung aktiver thrombozytopenisch oder thrombozytopenisch bedingter Blutungen eingesetzt. Die prophylaktische Anwendung soll das Risiko des Auftretens bedrohlicher Blutungen reduzieren, wobei sich die Empfehlungen hierbei auf Daten aus kontrollierten klinischen Studien mit hämatologisch-onkologischen Patienten stützen. Für die übrigen Patientengruppen basieren die Empfehlungen hauptsächlich auf Fallbeobachtungen und Expertenempfehlungen.

Bei der Indikationsstellung sollten generell folgende Kriterien beachtet werden (modifiziert nach [112]):

- Grunderkrankung
- Aktuelle Thrombozytenzahl und -funktion
- Kinetik des Thrombozytenverlaufs
- Aktuelle Blutungssymptomatik (Einteilung in WHO-Grad 1-4)
- Zusätzliche Risikofaktoren für das Auftreten von Blutungen und Blutungskomplikationen (siehe Tabelle 5)
- Begleitende plasmatische Gerinnungsstörungen
- Begleitende oder vorbestehende Therapie mit Medikamenten, welche die Thrombozytenfunktion hemmen (z.B. Thrombozytenaggregationshemmer, Antibiotika, TCA, Neuroleptika, künstliche Kolloide)
- Invasivität des Eingriffes und daraus resultierendes Blutungsrisiko

Die aktuelle Querschnittsleitlinie zur Therapie mit Blutkomponenten und Plasma-derivaten der Bundesärztekammer gibt Empfehlungen zum klinischen Vorgehen bei hämatologisch-onkologischen Patienten sowie bei verschiedenen Prozeduren und Eingriffen [14].

Bei Patienten mit chronischer und therapierefraktärer Thrombozytopenie durch Thrombozytenbildungsstörungen wird eine prophylaktische Transfusion erst bei Thrombozytenzahlen unter 5000/ $\mu$ l empfohlen [33]. Patienten mit erhöhtem Thrombozytenumsatz infolge immunologisch oder nicht-immunologisch bedingter Umsatzsteigerung sollten nur im Fall von bedrohlichen Blutungen transfundiert werden, Patienten mit HUS, TTP oder medikamentös ausgelöster mikroangiopathischer Hämolyse nur nach Ausschöpfung aller anderen therapeutischen Optionen sowie bei klinisch bedrohlichen Blutungen (WHO-Grad 4) [33].

Patienten mit akuter krankheits- oder therapiebedingter Thrombozytenbildungsstörung sollten prophylaktisch erst bei einer Thrombozytenzahl von  $\leq$  10000/ $\mu$ l transfundiert werden, wenn keine weiteren Blutungsrisiken vorliegen. Bei Vorhandensein zusätzlicher Risikofaktoren (siehe Tabelle 5) erhöht sich der Schwellenwert auf Thrombozytenzahlen von  $\leq$  20000/ $\mu$ l [33].

**Tab. 5**

Übersicht über die Risikofaktoren für das Auftreten von Blutungskomplikationen bei Thrombozytopenie, modifiziert nach [112].

Risikofaktor
Fieber > 38 °C
Infektionen
Leukozytose
Prohämorrhagische Gerinnungsstörung
Klinische Blutungszeichen
Splenomegalie
Gleichzeitige Therapie mit Antikoagulantien
Steiler Thrombozytenabfall
GvHD

Bei Thrombozytenwerten von  $\geq$  50000/ $\mu$ l und normaler Thrombozytenfunktion ist bei den meisten invasiven diagnostischen Eingriffen und operativen Prozeduren nicht mit einer erhöhten Blutungsneigung zu rechnen, wobei der kritische Thrombozytenwert sehr stark vom individuellen Blutungsrisiko des Patienten und dem Ausmaß der Gewebetraumatisierung abhängig ist. Bei chirurgischen Eingriffen mit hohem Blutungsrisiko (Operationen am hinteren Augenabschnitt, neurochirurgische Eingriffe) wird die präoperative Anhebung der Thrombozytenzahl auf  $\geq$  70000-

100000/ $\mu$ l empfohlen [14]. Weitere Spezifikationen sowie die Empfehlungen für die einzelnen diagnostischen und operativen Eingriffe finden sich in den Empfehlungen zur Thrombozytentransfusion der Thrombozyten-Arbeitsgruppe der DGTI, GTH und DGHO [33].

#### **3.5.4 Plättchen-Lagerungsschaden (platelet storage lesion)**

Der Ausdruck „platelet storage lesion“ beschreibt die morphologischen, funktionellen und biochemischen Veränderungen, denen Plättchen im Verlauf von Herstellung, Transport, Lagerung und Transfusion unterliegen. Diese sind multifaktoriell begründet und unter anderem abhängig von der Art der TK-Herstellung und den Lagerungsbedingungen [115, 119]. Einige dieser Veränderungen scheinen nach Transfusion der Plättchenkonzentrate im menschlichen oder tierischen Organismus reversibel zu sein. Rinder et al. zeigten, dass ein vorübergehender, in vitro induzierter Plättchenschaden vollständig reversibel ist, sobald die Thrombozyten in einem geeigneten metabolischen Milieu resuspendiert sind oder transfundiert werden („metabolic rescue“) [99].

Als Reaktion auf diverse Stimuli, die Aktivierung durch den Kontakt mit Fremdoberflächen sowie durch eine mechanische Traumatisierung während des Herstellungsprozesses kommt es zu einer Änderung der Plättchenmorphologie (von diskoid zu sphärisch), zu einer Formierung von Mikroaggregaten [115] und zu einer Abspaltung von Mikrovesikeln.

Im Verlauf der Lagerung reichern sich Moleküle aus den  $\alpha$ - Granula wie  $\beta$ -Thromboglobulin und Plättchenfaktor 4 im Konzentrat an [21, 56]. Eine vermehrte Expression von P-Selektin (CD62P) und CD63 auf der Thrombozytenoberfläche gilt ebenfalls als Marker einer Plättchendegranulation. Weiterhin verlieren die Thrombozyten die Fähigkeit zur Aufrechterhaltung der Integrität ihrer Plasmamembran, sodass sie vermehrt anionische Phospholipide wie Phosphatidylserin an ihrer Membranoberfläche exponieren [119]. Die Präsentation von Phosphatidylserin auf der äußeren Schicht der Plasmamembran wirkt bei kernhaltigen Zellen an der Initiierung der Apoptose mit. Dies legt die Annahme dar, dass zwischen dem Plättchen-Lagerungsschaden und den Mechanismen der Apoptose gewisse Gemeinsamkeiten bestehen [116]. Perrota et al. und Li et al. zeigten, dass auch kernlose Zellen wie Thrombozyten zur Apoptose befähigt sind [89] und dass proapoptotische Signale mit zunehmender Lagerungsdauer vermehrt exprimiert werden [65].

Die Stoffwechselaktivität der Plättchen während der Lagerungszeit zeigt sich an einer Verringerung der Glukosekonzentration sowie an steigenden Laktat- und konsekutiv fallenden pH-Werten. Vor allem in Thrombozytenkonzentraten mit einer hohen Plättchenzahl kommt es im zeitlichen Verlauf zu einer Reduktion des oxidativen Stoffwechsels und daraus resultierend zu steigenden Laktat- und sinkenden pH-Werten [99]. Das Ausmaß des pH-Abfalls korreliert letztlich mit der Pufferkapazität der Thrombozyten und des Suspensionsmediums. Ein pH-Abfall auf ein Level von  $\leq 6,7$  führt zu einer Formänderung der Thrombozyten, durch den Verlust der osmotischen Stabilität kommt es zu einer Schwellung und Abrundung [47]. pH-Werte  $\leq 6,2$  stellen einen verlässlichen Indikator für eine schlechte in vivo Überlebenszeit nach der Transfusion dar [81, 99].

Weiterhin kommt es im zeitlichen Verlauf zu einer Akkumulation biologisch aktiver Substanzen [6]. Die Anhäufung von Zytokinen wird unter anderem für das Auftreten von nicht-hämolytischen febrilen Transfusionsreaktionen (NHFT) verantwortlich gemacht.

Zur Charakterisierung und Quantifizierung des Plättchen-Lagerungsschadens existieren verschiedene in vitro Tests, die allerdings aufgrund ihrer teilweise schwachen Korrelation mit in vivo Parametern (Plättchenerholung, -überlebenszeit und -funktionalität) bisher nur partiell Eingang in die routinemäßige Analyse von Plättchenkonzentraten gefunden haben [81] und mehrheitlich der Forschung vorbehalten sind. Eine akzeptable Korrelation mit dem in vivo Überleben zeigen Tests auf morphologischer Basis wie die Prüfung des Swirling-Phänomens [9, 47, 74] und die Messung des „extent of shape change“ sowie die „hypotonic shock response“ [21, 47]. Goodrich et al. fanden eine signifikante Korrelation zwischen dem pH-Wert und der thrombozytären Laktatproduktion und der Plättchenerholung sowie dem Überleben in vivo [31].

### **3.6 Zielsetzung**

Der Einsatz des Multiplate<sup>®</sup> gewinnt zunehmend an Bedeutung in der patienten-nahen, prä-, peri- und postoperativen Überwachung der Thrombozytenfunktion in Vollblutansätzen sowie zum Monitoring einer Therapie mit Plättchenfunktions-hemmern.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, inwiefern eine Analyse von

Apherese-Thrombozytenkonzentraten mittels multipler Impedanzaggregometrie unter Verwendung des Multiplate<sup>®</sup> möglich ist und ob sich diese Methode anwenden lässt, um mögliche Veränderungen der Aktivierungs- und Aggregationsfähigkeit gelagerter Thrombozyten im zeitlichen Verlauf zu erfassen.

Ziel des ersten Versuchsabschnitts war die Implementierung einer einfachen und reproduzierbaren Messmethodik ohne die Notwendigkeit einer zusätzlichen Verwendung von Plasmakomponenten. Im Rahmen von Verdünnungsreihen erfolgten zunächst die Erprobung des Verdünnungsmediums Composol<sup>®</sup> PS sowie die Einstellung einer geeigneten Thrombozyten- und Kalziumkonzentration. Weiterhin wurden verschiedene kommerziell erhältliche Plättchenaktivatoren auf ihre Eignung getestet. In einer weiteren Versuchsreihe erfolgte die impedanzaggregometrische Analyse von Thrombozytenkonzentraten im Alter von 2 bis 4 Tagen aus dem klinischen Umlauf.

In einem zweiten Versuchsabschnitt wurde untersucht, inwiefern eine einwöchige Lagerung bei  $22 \pm 2$  °C und ständiger Agitation die impedanzaggregometrischen Ergebnisse von Thrombozytenkonzentraten nach Ablauf des Haltbarkeitsdatums beeinflusst. Zusätzlich erfolgte eine Verlaufsbeobachtung konventioneller Blutgasparameter um eine mögliche Korrelation mit den Ergebnissen der Multiplate<sup>®</sup>-Analysen zu erfassen.

## 4. Material und Methoden

### 4.1 Material

#### 4.1.1 Verbrauchsmaterialien

##### 4.1.1.1 Einmalartikel

**Tab. 6**

Verwendete Einmalartikel

Eppendorf Pipetten (Eppendorf Reference)	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettenspitzen	SARSTEDT, Nürmbrecht
Reagiergefäße	SARSTEDT, Nürmbrecht
Spritzen B.Braun Inject <sup>®</sup>	B.Braun Melsungen AG, Melsungen
Kanülen BD Microlane <sup>™</sup>	Becton, Dickinson & Co. Ltd., Drogheda, Ireland
Combi-Stopper rot	B.Braun Melsungen AG, Melsungen
Probengefäße 25 ml yellow capped	SARSTEDT, Sarstedt Australia Pty, SA, Australia
Compoflex <sup>®</sup> 150 ml steril	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg
S-Monovette <sup>®</sup> 2,7 ml r-Hirudin	SARSTEDT, Nürmbrecht
Blutgas-Monovette 2 ml LH	SARSTEDT, Nürmbrecht
Multiplate <sup>®</sup> Vorwärmeröhrchen	Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim
Multiplate <sup>®</sup> Aliquotiergefäße	Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim
Multiplate <sup>®</sup> analysis Testreagenzien	Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim
NaCl 0.9% Braun Injektionslösung	B.Braun Melsungen AG, Melsungen
Composol <sup>®</sup> PS 300 ml Thrombozyten-Lagerlösung	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg
Kalziumchlorid 5,5%	Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim

#### 4.1.1.2 Multiplate®-Agonisten

Die Thrombozytenaktivierung erfolgte mit kommerziell erhältlichen Multiplate®-Agonisten in folgender Standardkonzentration:

<b>ASPItest</b>	(Endkonzentration: 0,5 mmol/l)
<b>ADPtest</b>	(Endkonzentration: 6,5 µmol/l)
<b>TRAPtest</b>	(Endkonzentration: 32 µmol/l)
<b>COLtest</b>	(Endkonzentration: 3,2 µg/ml)

Das Ansetzen der Reagenzien wurde mithilfe des in der Multiplate®-Software hinterlegten Programms „Liquidtrans“ durchgeführt.

Hierzu wurden je 1000 µl Aqua dest. zu den jeweiligen Trockenreagenzien pipettiert. Nach einer Ruhezeit von 10 min bei Raumtemperatur erfolgte das Umfüllen in die entsprechenden Aliquotiergefäße (1,5 ml Eppendorf-Gefäße).

Das Volumen von 1000 µl wurde hierfür entsprechend in 10 farblich markierte Aliquotiergefäße à 100 µl aufgeteilt (ebenfalls mithilfe von „Liquidtrans“).

#### 4.1.1.3 Composol® PS

Die erwünschte Plättchenkonzentration wurde durch Zugabe von Composol® PS der Firma Fresenius Kabi (Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg) erreicht. Hierbei handelt es sich um eine zitrathaltige Elektrolytlösung zur Herstellung und Lagerung von Thrombozytenkonzentraten mit folgender Zusammensetzung (siehe Tabelle 7):

**Tab. 7**  
Zusammensetzung Composol®PS

Natriumchlorid	5,257 g
Natriumglukonat	5,023 g
Natriumacetat-Trihydrat	3,675 g
Natriumzitat-Dihydrat	3,213 g
Kaliumchlorid	0,373 g
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	0,305 g
Hydrochloric Acid	q.s. ml
Aqua ad iniectionem	ad 1000 ml

### 4.1.2 Geräte

**Tab. 8**

Verwendete Geräte

Multiplate®	Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim
Stat Profile pHox Plus® Blutgasanalysator	Nova Biomedical, Waltham, MA, USA
ABL 800 Basic Blutgasanalysator	Radiometer GmbH, Willich
ABL 90 Flex Blutgasanalysator	Radiometer GmbH, Willich
Sysmex XE-5000 Thrombozytenzählung	Sysmex Deutschland GmbH, Norderstedt
Terumo TSCD-II Sterile Connecting Device	Terumo Deutschland GmbH, Eschborn
Multi Sealer MS 250 tube sealer	SARSTEDT, Nürmbrecht
PF 96h Horizon Series™ Platelet Agitator	Fenwal Europe sprl, Mont Saint Guibert, Belgien
PC 3200i i.Series™ Platelet Incubator	Fenwal Europe sprl, Mont Saint Guibert, Belgien

### 4.1.3 Thrombozytenkonzentrate

Die verwendeten Thrombozytenkonzentrate (Zulassungsnummer: PEI.H.03165.01.1) entstammten der Blutbank des Universitätsklinikums des Saarlandes.

Es handelt sich hierbei um Apheresekonzentrate mit einem durchschnittlichen Inhalt von 270 ml (210 bis 320 ml) und einer Thrombozytenzahl von  $2 \times 10^{11}$  bis  $4 \times 10^{11}$  Thrombozyten pro Standardpackung. Der Restzellgehalt pro Transfusionseinheit beträgt laut klinikinterner Fachinformation  $< 1 \times 10^6$  Leukozyten und  $< 3 \times 10^9$  Erythrozyten. Je 1 ml Thrombozytensuspension setzt sich zusammen aus 0,8 ml (0,76-0,83 ml) gerinnungsaktivem Humanplasma sowie 0,2 ml (0,17-0,24 ml) ACD-A Stabilisatorlösung. Bei dieser Stabilisatorlösung handelt es sich um eine Mischung

aus Natriumzitat, Zitronensäure-Monohydrat und Glukose-Monohydrat. Je 1000 ml ACD-A-Lösung enthalten (Tabelle 9):

**Tab. 9**

Zusammensetzung Stabilisatorlösung TK

Natriumzitat	22,0 g
Zitronensäure-Monohydrat	8,0 g
Glukose-Monohydrat	24,5 g
Aqua ad iniectam	ad 1000 ml

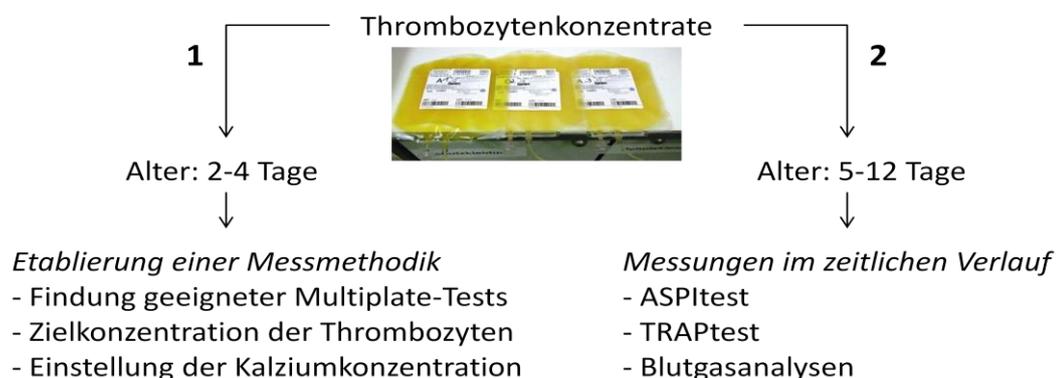
Der Tag der Herstellung der Plättchenkonzentrate wurde mit Tag 0 bezeichnet, das Verfallsdatum entsprechend mit Tag 4.

Die im ersten Abschnitt der Versuchsreihe verwendeten Proben wurden aus den nach der Transfusion der Thrombozytenkonzentrate noch im Infusionssystem verbleibenden Restvolumina gewonnen. Es handelte sich hierbei um Plättchenkonzentrate, welche nach klinischer und laborchemischer Indikation im herzchirurgischen OP transfundiert worden waren.

Die Proben für den zweiten Abschnitt (Thrombozytenkonzentrate nach Ablauf des Verfallsdatums) wurden uns freundlicherweise von der Blutbank des Universitätsklinikums des Saarlandes (Institut für Klinische Hämostaseologie und Transfusionsmedizin; Leitung: Univ.-Prof. Dr. med. Hermann Eichler) zur Verfügung gestellt.

## 4.2 Methoden

### 4.2.1 Aufbau der Versuchsreihen



**Abb. 6**

Aufbau der Versuchsreihen.

Abbildung 6 zeigt die Gliederung des praktischen Vorgehens in zwei Abschnitte. Der erste Versuchsabschnitt diente der Findung der Thrombozytenzahl und Kalziumkonzentration sowie der Auswahl geeigneter Multiplate<sup>®</sup>-Agonisten zur reproduzierbaren Durchführung der multiplen Impedanzaggregometrie.

Weiterhin wurden von 31 Thrombozytenkonzentraten im Alter von 2-4 Tagen impedanzaggregometrische Messungen mit festem Zielvolumen, fester Kalziumkonzentration und fester Zellzahl durchgeführt.

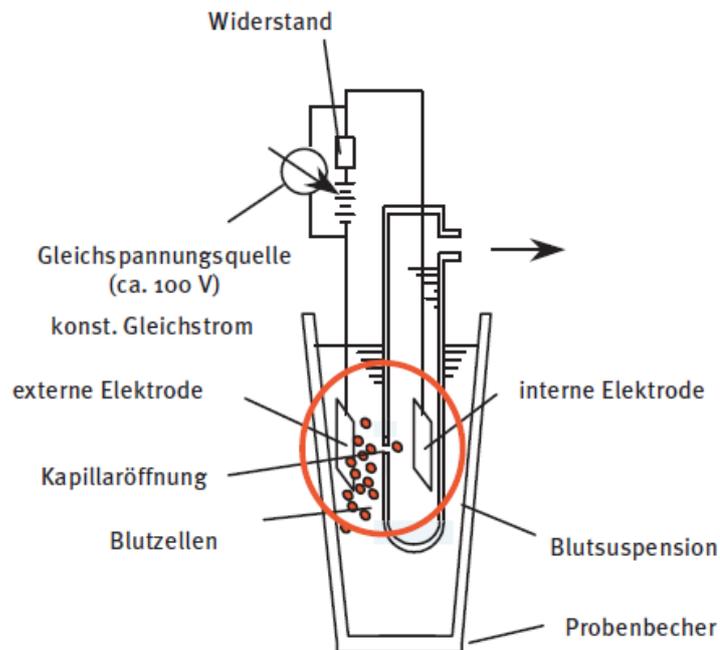
Im zweiten Abschnitt wurde die entwickelte Methodik verwendet, um Thrombozytenkonzentrate im Alter von 5 bis 12 Tagen mittels Multiplate<sup>®</sup> zu analysieren. Parallel zu den Multiplate<sup>®</sup>-Messungen erfolgten konventionelle Blutgasanalysen (pO<sub>2</sub>, pCO<sub>2</sub>, pH und Glukosekonzentration) der jeweiligen Proben.

#### **4.2.2 Bestimmung der Thrombozytenzahl**

Die Thrombozytenzahl der verwendeten Plättchenkonzentrate wurde mithilfe des Durchflusszytometers Sysmex XE-5000 (siehe Abbildung 7) im Zentrallabor des Universitätsklinikums bestimmt.

Als Probevolumen dienten ca. 0,5 ml des jeweiligen Thrombozytenkonzentrates. Dieses Volumen war zuvor aus dem zu messenden Thrombozytenkonzentrat entnommen und in ein Eppendorf-Gefäß überführt worden. Nach vorsichtiger Durchmischung der Probe erfolgte die automatische Bestimmung der Thrombozytenzahl und Angabe als Plättchenzahl/ $\mu$ l.

Für die automatisierte Bestimmung der Zellzahl werden die Zellen eines definierten Probevolumens (4  $\mu$ l, verdünnt in einem Verhältnis von 1:500) angesaugt und nacheinander durch eine Kapillaröffnung geleitet. Bei der Passage der Messöffnung erzeugen die Zellen eine Änderung des elektrischen Widerstands, welche als elektrischer Impuls aufgezeichnet wird. Die Entstehung von Störimpulsen wird durch die so genannte hydrodynamische Fokussierung verhindert. Hierfür werden die Thrombozyten beim Durchtritt durch die Kapillaröffnung von einem Mantelstrom umhüllt, sodass sie die Messöffnung nur einzeln und zentral passieren können. Der Sysmex XE-5000 arbeitet nach dem Prinzip der Absolutzählung (Auszählung eines genau definierten Volumens einer bestimmten Verdünnung) und erfasst Thrombozyten mit einer Größe zwischen 2 und 30 fl.

**Abb. 7**

Schematische Darstellung eines Messwandlers, aus [132].

#### 4.2.3 Abschnitt 1 – Etablierung einer Messmethodik

Alle Proben für den ersten Abschnitt stammten von Thrombozytenkonzentraten im Alter von zwei bis vier Tagen, die dem klinischen Bedarf zur Verfügung standen. Die für die nachfolgenden Multiplate<sup>®</sup>-Messungen verwendeten Konzentrate wurden nach klinischer und laborchemischer Indikation im herzchirurgischen OP transfundiert. Aus dem nach der Transfusion noch im Infusionssystem verbliebenen Restvolumen wurde mittels einer Spritze jeweils ein Volumen von 2,5 ml entnommen. Nach Protokollierung von Chargennummer, Herstellungs- und Verfallsdatum sowie Entnahmedatum und -uhrzeit erfolgte der Transport der Proben in das Forschungslabor der Klinik für Anästhesiologie, Intensivmedizin und Schmerztherapie. Die Bestimmung der Thrombozytenzahl der jeweiligen Konzentrate erfolgte wie unter 4.2.2 beschrieben im Zentrallabor. Währenddessen lagerten die übrigen Proben für die Multiplate<sup>®</sup>-Messungen unter kontinuierlicher Agitation und bei Raumtemperatur im Forschungslabor.

##### 4.2.3.1 Einstellung der Zielzellkonzentration

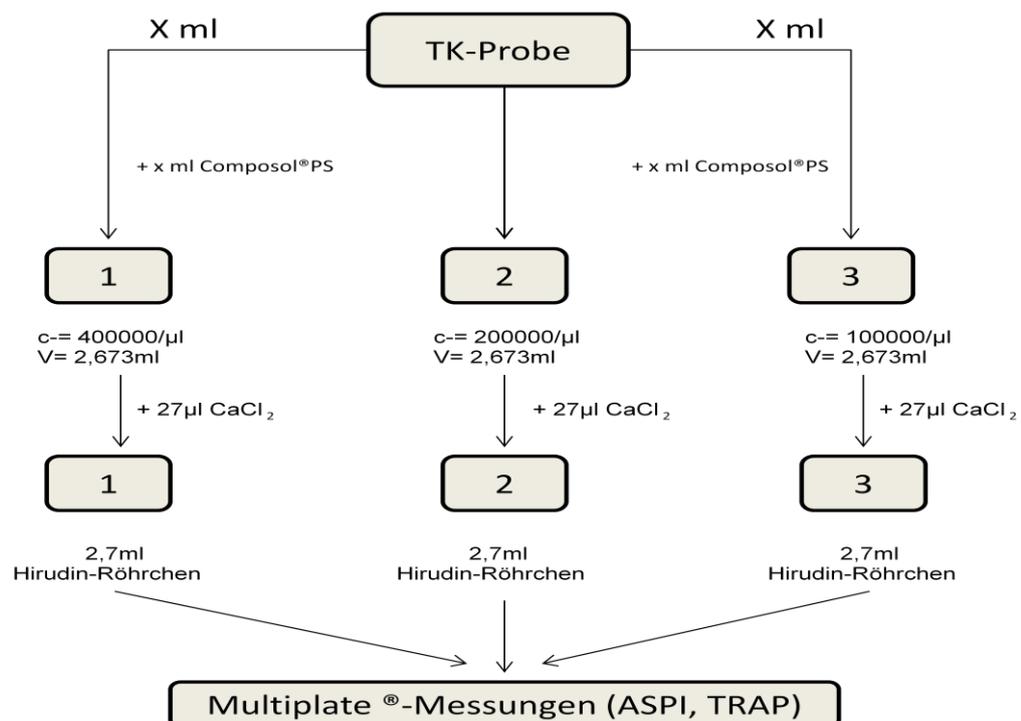
Zur Klärung der Frage, mit welcher Zellzahl die Multiplate<sup>®</sup>-Analysen in der vorliegenden Arbeit durchgeführt werden sollten, wurden für 7 Plättchenkonzentrate

Verdünnungsreihen mit drei unterschiedlichen Thrombozytenkonzentrationen erstellt. Für jedes Konzentrat erfolgten Multiplate<sup>®</sup>-Messungen mit folgender Plättchenkonzentration:

- c Thrombozyten [n/ $\mu$ l]:
1. 400000/ $\mu$ l
  2. 200000/ $\mu$ l
  3. 100000/ $\mu$ l

Die Gewinnung der Proben erfolgte analog dem unter 4.2.3 beschriebenen Vorgehen.

Nach Bestimmung der Thrombozytenkonzentration der jeweiligen Probe wurden mithilfe des Computerprogrammes Microsoft<sup>®</sup> Excel 2007 die notwendigen Volumina der Thrombozytenprobe und der Composol<sup>®</sup> PS-Verdünnungslösung berechnet. Das gewünschte Zielvolumen betrug 2,673 ml um nach Zugabe von 27  $\mu$ l Kalziumchlorid (dies entspricht einer Kalziumkonzentration von 5 mmol/l) ein Endvolumen von 2,7 ml zu erhalten. Dieses Zielvolumen entsprach dem Füllungsvolumen der Hirudin-Röhrchen, in welche die Proben unmittelbar vor Durchführung der Multiplate-Messungen überfüllt wurden (siehe Abbildung 8). Als Aktivatoren wurden die Agonisten ASPI und TRAP verwendet.



**Abb. 8**

Verdünnungsreihe Thrombozyten.

### 4.2.3.2 Einstellung der Kalziumkonzentration

Die Einstellung der Proben auf die gewünschte Thrombozytenzahl erfolgte mit der zittrathaltigen Plasmaersatzlösung Composol® PS der Firma Fresenius. Aufgrund der Überlegung, dass Zitrat die freien Kalziumionen in der TK-Probe komplexiert und diese dadurch nicht mehr für die Thrombozytenaktivierung und -aggregation zur Verfügung stehen, wurden Verdünnungsreihen mit fünf unterschiedlichen Kalziumkonzentrationen (0 mmol/l; 1,2 mmol/l; 2,5 mmol/l; 5 mmol/l und 10 mmol/l) durchgeführt um den Einfluss verschiedener Kalziumkonzentrationen auf die Aggregationsfähigkeit der Thrombozyten zu charakterisieren.

Bei einer Probenanzahl von 5 Plättchenkonzentraten wurden für jedes Konzentrat jeweils 5 Multiplate®-Messungen mit einer vorgegebenen Kalziumkonzentration durchgeführt. Die Thrombozytenkonzentration wurde für alle Messungen auf 400000 Plättchen/ $\mu$ l eingestellt. Durch Vorgabe eines festen Endvolumens von 2,7 ml ergaben sich unter Berücksichtigung des hinzuzufügenden Volumens an  $\text{CaCl}_2$  die in Tabelle 10 aufgeführten Zielvolumina (jeweils Summe aus Thrombozytenprobe und Verdünnungsmedium Composol®PS).

Die Aktivierung der Thrombozyten erfolgte analog zur unter 4.2.3.1 beschriebenen Thrombozytenverdünnungsreihe mit ASPItest und TRAPtest in Standardkonzentration.

**Tab. 10**

Verdünnungsreihe Kalzium.

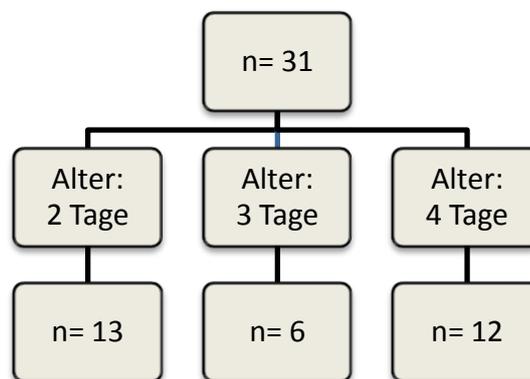
Messung	c $\text{Ca}^{2+}$ [mmol/l]	V $\text{CaCl}_2$ [ $\mu$ l]	$V_{\text{TK}} + V_{\text{Comp}}$ [ml]	Endvolumen [ml]
1	5	27	2,673	2,7
2	1,2	6,48	2,69352	2,7
3	10	54	2,646	2,7
4	2,5	13,5	2,6865	2,7
5	0	0	2,7	2,7

Die Tabelle zeigt die gewünschte Zielkonzentration (c) für  $\text{Ca}^{2+}$ , sowie die zugegebenen Volumina (V) an Kalziumchlorid ( $\text{CaCl}_2$ ), Thrombozytenkonzentrat (TK) und Composol®PS (Comp) um das angegebene Endvolumen zu erreichen.

#### 4.2.3.3 Messungen mit fester Zellzahl und fester Kalziumkonzentration

Nach Durchführung der entsprechenden Verdünnungsreihen zur Festlegung von Thrombozytenzahl und Kalziumkonzentration erfolgten Multiplate<sup>®</sup>-Analysen mit einer Zellzahl von 400000 Plättchen/ $\mu$ l sowie einer Kalziumkonzentration von 5 mmol/l (dies entspricht einem  $\text{CaCl}_2$ -Volumen von 27  $\mu$ l pro Messansatz).

Probatorische Multiplate<sup>®</sup>-Messungen zur Findung der geeigneten Thrombozytenaktivatoren hatten für ASPItest und TRAPtest reproduzierbare Resultate ergeben. Bei der Verwendung von ADPtest und COLtest ließen sich keine verwertbaren Ergebnisse erzielen, da entweder der Korrelationskoeffizient fehlerhaft war, oder die Differenz zwischen den beiden Referenzkurven einer Messung über 20 Prozent lag. Daher erfolgte die Durchführung der Multiplate<sup>®</sup>-Analysen mithilfe von ASPI- und TRAPtest in oben genannter Standardkonzentration des Herstellers. Insgesamt wurden 31 Thrombozytenkonzentrate im Alter zwischen 2 und 4 Tagen analysiert. Aufgrund der Altersverteilung der Plättchenkonzentrate ergaben sich folgende Vergleichsgruppen (siehe Abb. 9):



**Abb. 9**

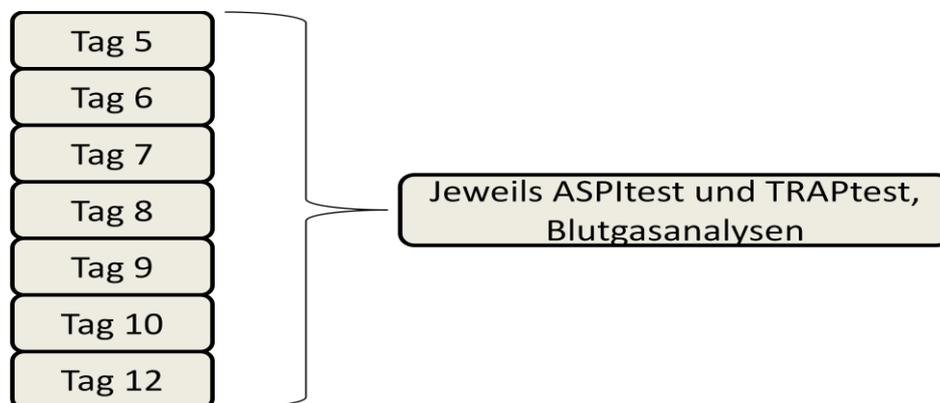
Übersicht über die Vergleichsgruppen in Abschnitt 1.

#### 4.2.4 Abschnitt 2 – Messungen im zeitlichen Verlauf

Dieser Versuchsabschnitt diente zur Klärung der Frage, wie sich eine Lagerung der Thrombozytenkonzentrate über das Verfallsdatum hinaus auf die Aggregationsfähigkeit der Plättchen auswirkt. Weiterhin wurden Blutgasanalysen der Konzentrate durchgeführt um die Veränderungen von  $\text{pO}_2$ ,  $\text{pCO}_2$ , pH-Wert und Glukosekonzentration im zeitlichen Verlauf zu bestimmen und diese Parameter anschließend mit den Ergebnissen der Impedanzaggregometrie zu korrelieren.

Nach den aktuellen Richtlinien der Bundesärztekammer und den klinikinternen Vorgaben des Instituts für Klinische Hämostaseologie und Transfusionsmedizin dürfen Thrombozytenkonzentrate, welche ein Alter von 4 Tagen (ab 24:00 Uhr des Entnahmetages) überschritten haben, nicht mehr transfundiert werden. Konzentrate, die bis zu diesem Zeitpunkt noch nicht transfundiert worden waren, wurden uns freundlicherweise von der klinikinternen Blutbank (Leiter: Univ.-Prof. Dr. med. Hermann Eichler) zur Verfügung gestellt.

Die zu analysierenden Plättchenkonzentrate wurden nach Ablauf des Verfallsdatums für weitere 7 Tage in der Blutbank gelagert und täglich (mit Ausnahme von Tag 11) – nach der Gewinnung steriler Proben – einer impedanzaggregometrischen Messung sowie einer Blutgasanalyse unterzogen (siehe Abbildung 10). Die jeweiligen Messungen wurden immer in der gleichen Tageshälfte und zu einer annähernd gleichen Uhrzeit durchgeführt. Die Durchführung der Multiplate<sup>®</sup>-Analysen erfolgte unter Berücksichtigung der Herstellerhinweise in einem Zeitraum von 2h nach der Probenentnahme, die Blutgasanalysen innerhalb 1h nach Probengewinnung. Die Durchführung der multiplen Impedanzaggregometrie wird unter 4.2.4.2 beschrieben.



**Abb. 10**

Schema der Messungen im zeitlichen Verlauf.

#### 4.2.4.1 Gewinnung steriler Proben

Die Thrombozytenkonzentrate lagerten nach Ablauf des Verfallsdatums bei einer konstanten Temperatur von  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  weiterhin unter ständiger Agitation im blutbankeigenen Plättchen-Inkubator der Firma Helmer (Plättchenagitator PF 96h Horizon Series<sup>TM</sup> mit Plättcheninkubator PC 3200i i.Series<sup>TM</sup>, beide Fenwal Europe sprl, Mont Saint Guibert, Belgien).

Eine Unterbrechung der kontinuierlichen Agitation erfolgte ausschließlich für die Probenentnahme. Zur Vermeidung einer bakteriellen Kontamination der Thrombozytenkonzentrate und zur Aufrechterhaltung der Dichtigkeit des TK-Beutels war eine sterile Gewinnung der Probevolumina für die täglichen Multiplate<sup>®</sup>-Messungen erforderlich. Mithilfe der Mitarbeiter der Blutbank wurde ein Verfahren entwickelt, welches durch die Verwendung eines funktionell geschlossenen Systems die Gewinnung steriler Einzelproben ermöglichte. Als Transportbehälter für die TK-Proben dienten Transferbeutel der Firma Fresenius Kabi (Compoflex<sup>®</sup> steril).

Zunächst wurde der Transferbeutel in einem so genannten Verschweißungs- oder Welding-Prozess über den zugehörigen Schlauch mit dem Verbindungsschlauch des Thrombozytenkonzentrates konnektiert. Dies geschah mithilfe des Schweißgerätes Terumo TSCD II. Zuerst wurde der Schlauch des TK-Beutels in der vorgesehenen Markierung platziert, danach wurde entgegengesetzt der Schlauch des Transferbeutels eingespannt (siehe Abbildungen 11 und 12). Nach dem Schließen der Abdeckungsklammern wurde der TSCD-Wafer (Metallplättchen) auf ca. 300 °C aufgeheizt und trennte so die beiden Schläuche durch Schmelzen an einer fixen Stelle. Die jeweiligen Schlauchenden wurden verworfen und die verbleibenden Zielenden der beiden Schläuche durch Verschiebung der Einspannungen in horizontaler Richtung so einander angenähert, dass sie sich genau gegenüber lagen. Nachfolgend wurde der Wafer entfernt und die beiden Schlauchenden miteinander verbunden. Die nun entstandene Verbindung zwischen TK-Beutel und Transferbeutel wurde durch Eröffnen der Versiegelung freigegeben und es wurde eine Menge von ca. 20 ml aus dem Thrombozytenkonzentrat in den Transferbeutel überführt. Danach wurde der Schlauch geklemmt (siehe Abbildung 13). Die nachfolgende Separation des Verbindungsschlauches sowie die Versiegelung der Schlauchenden erfolgten durch den Multi Sealer MS 250 der Firma Sarstedt. Hierbei handelt es sich um ein Schweißgerät zur Segmentierung von Blutbeutelschläuchen. Am Ende des Vorgangs erhielt man einen unversehrten TK-Beutel sowie eine steril abgefüllte Menge der TK-Probe im Transferbeutel (siehe Abb. 14). Die Transferbeutel wurden nachfolgend sofort ins Labor der Klinik für Anästhesiologie, Intensivmedizin und Schmerztherapie transportiert und dort in die entsprechenden Einzelproben für die Multiplate<sup>®</sup>-Messungen, die Blutgasanalysen und die Zellzahlbestimmung überführt. Hierfür wurde der Transferbeutel an der Konnektorstelle mit einer Kanüle angestochen und

die benötigten Volumina unter sterilen Kautelen in die entsprechenden Spritzen überführt.



**Abb. 11**

Darstellung der Ausgangssituation zur Gewinnung steriler Einzelproben: Platzieren von TK-Beutel (links) und Transferbeutel (rechts).



**Abb. 12**

Detailansicht der Ausgangssituation.

**Abb. 13**

Resultat nach dem Welding-Prozess: sterile Verbindung zwischen TK-Beutel und Transferbeutel und Überführen einer Probenmenge des TKs in den Transferbeutel.

**Abb. 14**

Thrombozytenkonzentrate und Transferbeutel nach dem Umfüllen der Proben volumina.

#### 4.2.4.2 Impedanzaggregometrie

Für die Durchführung der Multiplate<sup>®</sup>-Analysen wurden die jeweiligen Proben (Thrombozytenkonzentrat verdünnt mit Composol<sup>®</sup> PS) mit dem entsprechenden Volumen an CaCl<sub>2</sub> versehen und ein Probevolumen von 2,7 ml unmittelbar vor Beginn der Messungen mithilfe einer Eppendorf-Pipette in ein 2,7 ml r-Hirudin Röhrchen der Firma Sarstedt überführt. Anstelle der Verwendung der automatisierten Pipettiersequenz des Multiplate<sup>®</sup>-Systems erfolgten auch die nachfolgenden Pipettierschritte mit der Eppendorf-Pipette.

Gemäß der Herstellerhinweise wurden 300 µl einer auf 37 °C erwärmten physiologischen Kochsalzlösung (NaCl 0,9%) und 300 µl der Hirudin-Thrombozytenprobe in die Messzellen pipettiert. Während der 3-minütigen Inkubationsphase erfolgte das Aufwärmen der Multiplate<sup>®</sup>- Reagenzien. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die jeweiligen Testreihen durch Zugabe von 20 µl der Agonisten ASPI und TRAP zu den Messzellen gestartet. Während der 6-minütigen Messzeit registrierte das Gerät die Anlagerung der Thrombozyten an die Sensordrähte der Messzelle (je 2 Drahtpärchen pro Zelle) als Änderung des elektischen Widerstands (so genannte „Impedanz“, da Verwendung von Wechselstrom). Diese Impedanzänderung (ausgedrückt in frei wählbaren Aggregationseinheiten [AU]) wurde graphisch gegen die Zeit aufgezeichnet. Die Fläche unter der Kurve (area under the aggregation curve [AUC] mit der Einheit U) diente als Maß für die Thrombozytenaggregation und wurde für alle Proben protokolliert.

#### 4.2.4.3 Blutgasanalysen

Die aus dem Transferbeutel entnommenen Proben der jeweiligen Thrombozytenkonzentrate wurden innerhalb eines Zeitraumes von 1h nach Probenentnahme – parallel zu den impedanzaggregometrischen Messungen – der Analytik zugeführt. Die Bestimmung der Blutgaswerte (pO<sub>2</sub>, pCO<sub>2</sub>) sowie die Ermittlung von pH-Wert und Glukosekonzentration erfolgte mittels eines kombinierten automatischen Blutgasanalysators der Firma Nova Biomedical (Stat Profile pHox Plus<sup>®</sup>, Nova Biomedical, Waltham, MA, USA). Die Messungen erfolgten bei einer Gerätetemperatur von 37,0 °C. Aufgrund eines klinikinternen Gerätewechsels wurden ab dem 26.04.2012 die Blutgasanalysatoren der Firma Radiometer GmbH

(ABL 800 Basic, ABL 90 Flex) verwendet. Die Messtemperatur betrug hier ebenfalls 37,0° C.

### **4.3 Software und Statistik**

#### **4.3.1 Computersoftware**

Die schriftliche Abfassung dieser Dissertation wurde mit dem Programm Microsoft® Office Word 2007 (©2006 Microsoft® Corporation, Redmond, Washington, USA) erstellt. Die Berechnung der jeweiligen Volumina an Composol® PS zur Einstellung der gewünschten Thrombozytenzahl sowie der Kalziumzugabe erfolgte mithilfe des Programms Microsoft® Excel 2007 (©2006 Microsoft® Corporation, Redmond, Washington, USA). Für die Bildbearbeitung wurde das Tool Microsoft® Office Picture Manager (©2006 Microsoft® Corporation, Redmond, Washington, USA) verwendet.

#### **4.3.2 Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung der Messergebnisse sowie die Durchführung der Korrelationsanalysen erfolgte mit dem Statistikprogramm SigmaPlot® for Windows mit SigmaStat®-Integration (SigmaPlot® Version 9.01, Systat Software, Inc., Chicago, USA).

Thrombozytenkonzentrate, deren Messwerte nicht den geräteinternen Kontrollkriterien entsprachen (fehlerhafter Korrelationskoeffizient, zu große Differenz der Kontrollkurven), wurden nicht in die statistische Auswertung mit einbezogen.

Im Anschluss an den Nachweis einer Normalverteilung mittels Kolmogorov-Smirnov-Test erfolgte eine einfaktorielle Varianzanalyse (one-way ANOVA) zur Einschätzung der Gruppenunterschiede der jeweiligen Thrombozytenverdünnungsreihen und Kalziumkonzentrationen; p-Werte < 0,001 wurden hier als statistisch signifikant angesehen. Wurde bei der Varianzanalyse ein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt, erfolgte anschließend eine post-hoc-Analyse der Gruppenunterschiede mithilfe eines Mehrfachen-Vergleiche-Tests nach Holm-Sidak. Das Signifikanzniveau wurde auf  $p < 0,05$  festgelegt.

Zur statistischen Evaluation der 2-4 Tage alten Thrombozytenkonzentrate wurde ebenfalls eine einfaktorielle Varianzanalyse durchgeführt; p-Werte < 0,001 wurden als statistisch signifikant angesehen. Im Anschluss erfolgte auch hier ein Mehrfacher-Vergleiche-Test nach Holm-Sidak bzw. Student-Newman-Keuls zur weiteren Analyse

der Gruppenunterschiede; p-Werte  $< 0,05$  galten als statistisch signifikant. Die Auswertung der Daten der 5-12 Tage alten Thrombozytenkonzentrate und der Ergebnisse der Blutgasanalysen erfolgte ebenfalls mithilfe einer einfaktoriellen Varianzanalyse sowie unter Verwendung eines Mehrfachen-Vergleiche-Tests zur post-hoc-Analyse der Gruppenunterschiede.

Bei nicht normalverteilten Daten kamen die Kruskal-Wallis-Varianzanalyse an Rängen (ANOVA on Ranks) und nachfolgend die „All Pairwise Multiple Comparison“ Methode nach Dunn zur Anwendung. p-Werte  $< 0,001$  bzw.  $p < 0,05$  wurden als statistisch signifikant angesehen.

Zur Analyse der Verbindung zwischen den AUC-Werten in ASPI- und TRAPtest und den Ergebnissen der Blutgasanalysen wurden Korrelationsanalysen durchgeführt und jeweils der Pearson-Produkt-Moment-Korrelationskoeffizient für normal verteilte Daten und der Spearman-Rang-Korrelationskoeffizient für nicht normalverteilte Daten berechnet.

Die grafische Darstellung der Ergebnisse erfolgte als Boxplot sowie als Scatterplot und im Falle der Korrelationsanalysen als Dotplot.

### **4.3.3 Literaturrecherche**

Die Literaturrecherche im Internet erfolgte mithilfe der Meta-Datenbank PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>) sowie der Suchmaschine Google Scholar (<http://scholar.google.de>).

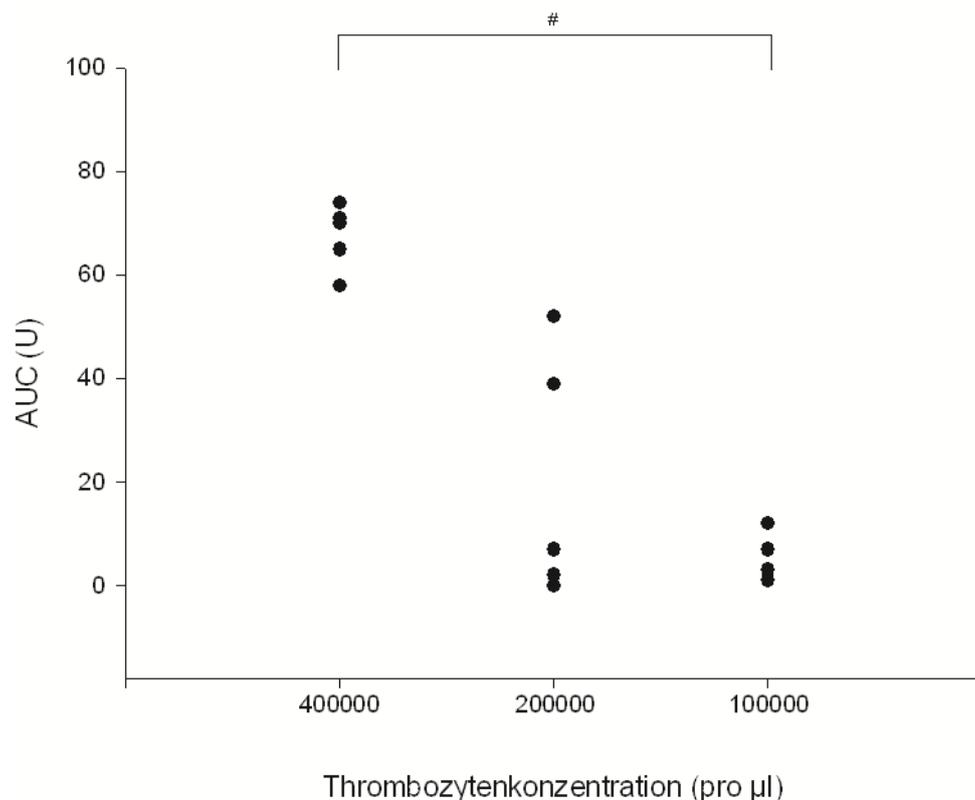
## 5. Ergebnisse

### 5.1 Zielkonzentration Thrombozyten

Um den Einfluss der Thrombozytenkonzentration auf die Ergebnisse der Impedanzaggregometrie zu untersuchen, führten wir für ASPItest und TRAPtest Multiplate<sup>®</sup>-Analysen mit drei unterschiedlichen Thrombozytenkonzentrationen durch. Für beide Tests ergaben sich bei einer Thrombozytenkonzentration von 400000/ $\mu$ l signifikant höhere AUC-Werte als bei einer Konzentration von 200000/ $\mu$ l bzw. 100000/ $\mu$ l (jeweils  $p < 0,05$  für 400000/ $\mu$ l vs. 200000/ $\mu$ l und 100000/ $\mu$ l).

Kein statistisch signifikanter Unterschied ergab sich bei Verwendung des ASPItest in Bezug auf den Vergleich der Konzentrationen 200000/ $\mu$ l versus 100000/ $\mu$ l. Hier zeigte sich allerdings eine statistische Signifikanz im TRAPtest ( $p < 0,05$  für 200000/ $\mu$ l vs. 100000/ $\mu$ l).

#### 5.1.1 ASPItest

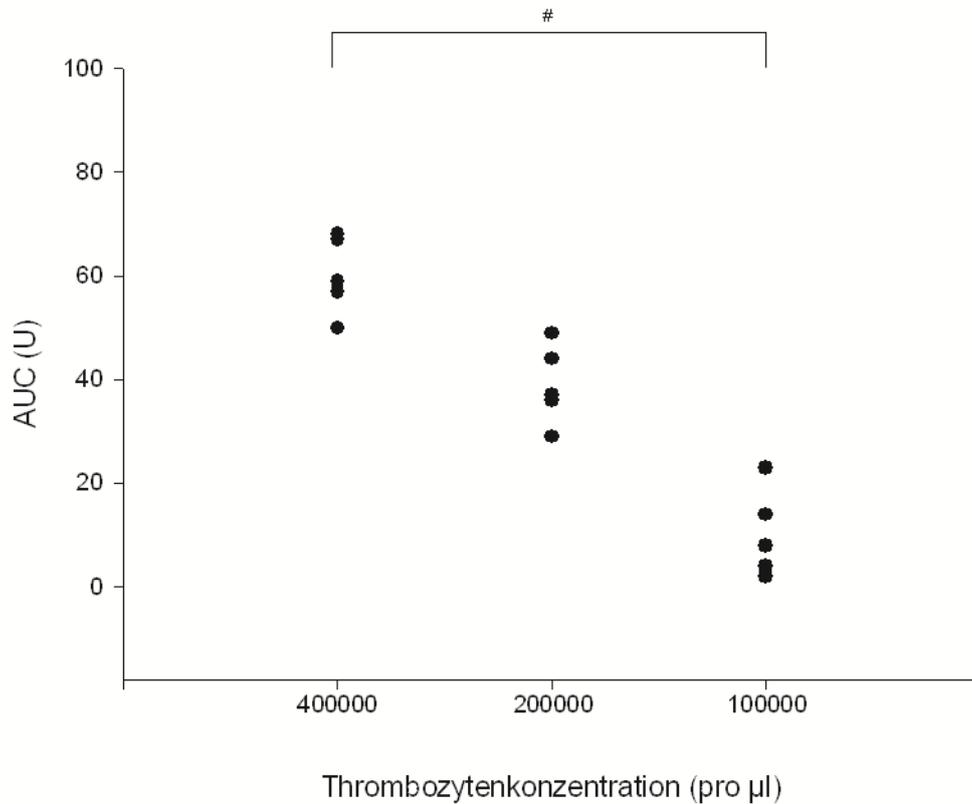


**Abb. 15**

Darstellung der AUC-Werte in Bezug auf drei unterschiedliche Thrombozytenkonzentrationen bei Verwendung des ASPItest.

(#)  $p < 0,05$  AUC-Werte für Thrombozytenkonzentration 400000/ $\mu$ l vs. 200000/ $\mu$ l und vs. 100000/ $\mu$ l

### 5.1.2 TRAPtest



**Abb. 16**

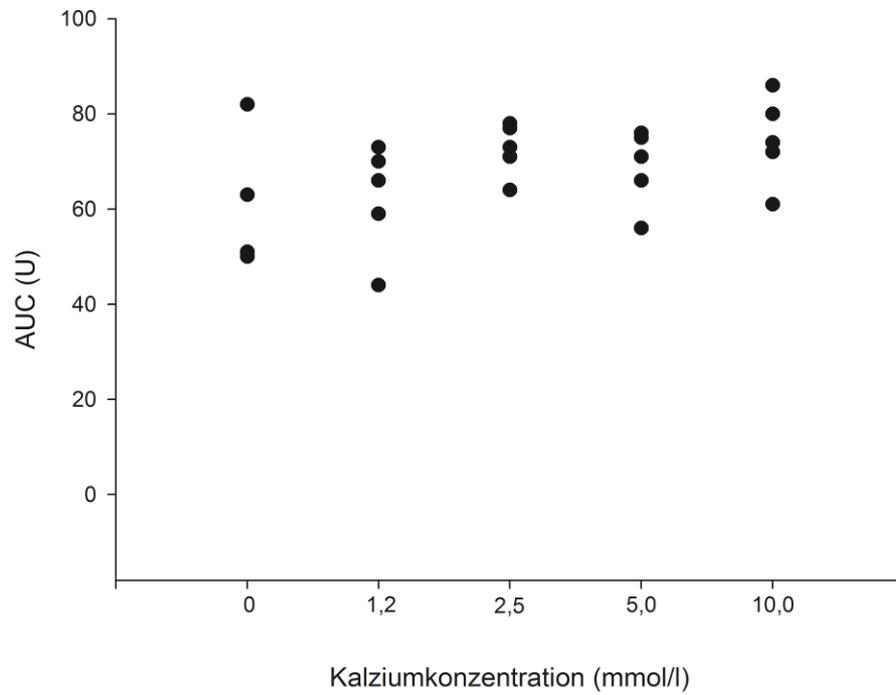
Darstellung der AUC-Werte in Bezug auf drei unterschiedliche Thrombozytenkonzentrationen bei Verwendung des TRAPtest.

(#)  $p < 0,05$  AUC-Werte für Thrombozytenkonzentration 400000/µl vs. 200000/µl und vs.100000/µl, sowie 200000/µl vs. 100000/µl

## 5.2 Zielkonzentration Kalzium

Zur Untersuchung des Einflusses der Kalziumkonzentration auf die Ergebnisse der Multiplate<sup>®</sup>-Analysen wurden Messungen mit fünf verschiedenen Kalziumkonzentrationen durchgeführt. Hier zeigte sich bei Betrachtung der AUC-Werte für die einzelnen Kalziumkonzentrationen weder im ASPI- noch im TRAPtest ein signifikanter Unterschied. Ein Vergleich der Gruppen untereinander wurde aufgrund der fehlenden statistischen Signifikanz der Vorteste nicht durchgeführt. Die jeweiligen Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung zeigen die Tabellen 11 und 12.

### 5.2.1 ASPItest



**Abb. 17**

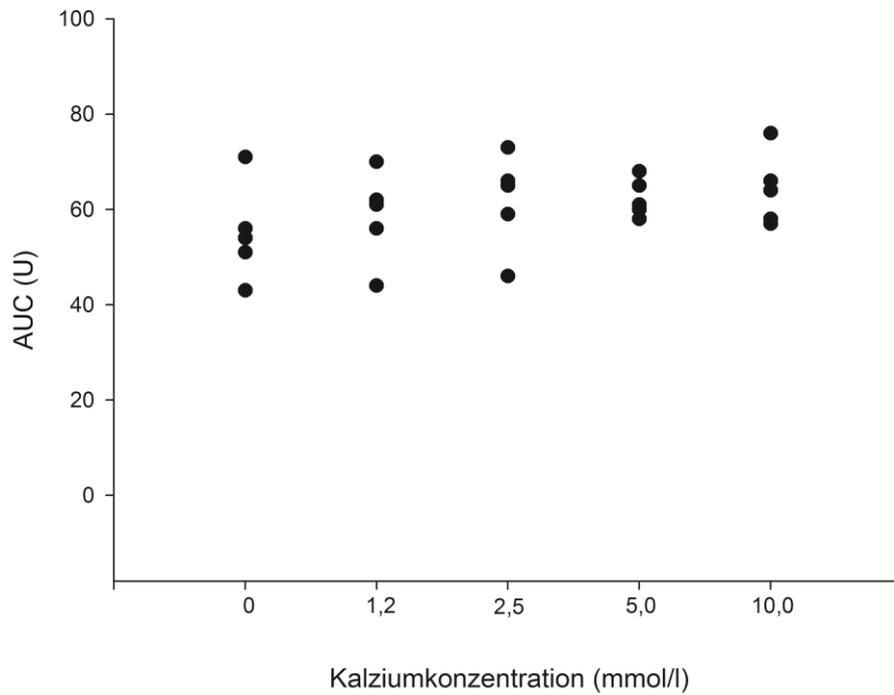
Darstellung der AUC-Werte nach Einstellung verschiedener Kalziumkonzentrationen im ASPItest.

**Tab. 11**

AUC-Werte im ASPItest für die angegebenen Kalziumkonzentrationen.  
Angabe der Werte als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung.

Kalziumkonzentration [mmol/l]	AUC [U]
0	59,4 $\pm$ 13,7
1,2	62,4 $\pm$ 11,5
2,5	72,6 $\pm$ 5,6
5	68,8 $\pm$ 8,2
10	74,6 $\pm$ 9,4

### 5.2.2 TRAPtest



**Abb. 18**

Darstellung der AUC-Werte nach Einstellung verschiedener Kalziumkonzentrationen im TRAPtest.

**Tab. 12**

AUC-Werte im TRAPtest für die angegebenen Kalziumkonzentrationen.  
Angabe der Werte als Mittelwert ± Standardabweichung.

Kalziumkonzentration [mmol/l]	AUC [U]
0	55,0 ± 10,2
1,2	58,6 ± 9,6
2,5	61,8 ± 10,1
5	62,4 ± 4,0
10	64,2 ± 7,6

### 5.3 Abschnitt 1: 2-4 Tage alte Thrombozytenkonzentrate

Bei einer mittleren Aggregation von 67 bis 77 U im ASPItest und 59 bis 65 U im TRAPtest ergab die statistische Auswertung der AUC-Werte der 2-4 Tage alten Thrombozytenkonzentrate für den ASPItest keinen signifikanten Unterschied in der Aggregationsfähigkeit, so dass hier kein post-hoc-Verfahren zur Analyse der Gruppenunterschiede in Bezug auf das Alter der Konzentrate erfolgte (siehe Tabelle 13 und Abbildung 19).

Bei Betrachtung der Ergebnisse für den TRAPtest zeigte sich ein signifikanter Abfall der AUC-Werte an Tag 4 versus Tag 3 ( $p = 0,035$ ). Kein signifikanter Unterschied ergab sich für den Vergleich der AUC-Werte an Tag 2 versus Tag 3 sowie Tag 2 versus Tag 4 (siehe Tabelle 13 und Abbildung 20).

Insgesamt wurden die AUC-Werte von 31 Thrombozytenkonzentraten in die Auswertung eingeschlossen. Die Altersverteilung stellte sich folgendermaßen dar:

- Alter 2 Tage:  $n = 13$
- Alter 3 Tage:  $n = 6$
- Alter 4 Tage:  $n = 12$

**Tab. 13**

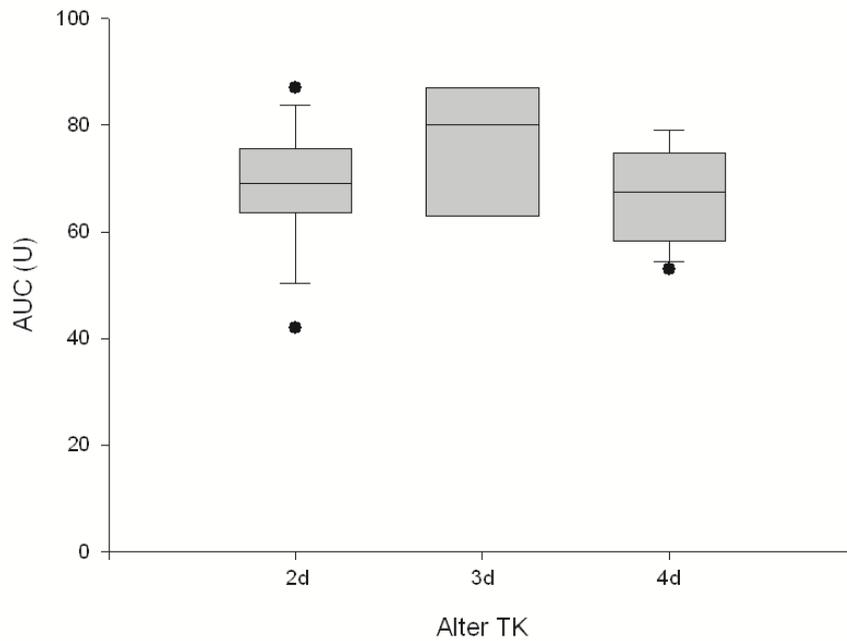
AUC-Werte im ASPItest und TRAPtest für Thrombozytenkonzentrate im Alter von 2, 3 und 4 Tagen.

Alter TK [d]	2	3	4
AUC ASPItest [U]	68,9 ± 10,7	76,7 ± 11,3	66,6 ± 9,2
AUC TRAPtest [U]	62,2 ± 4,7	65,3 ± 7,8	58,6 ± 3,8 *

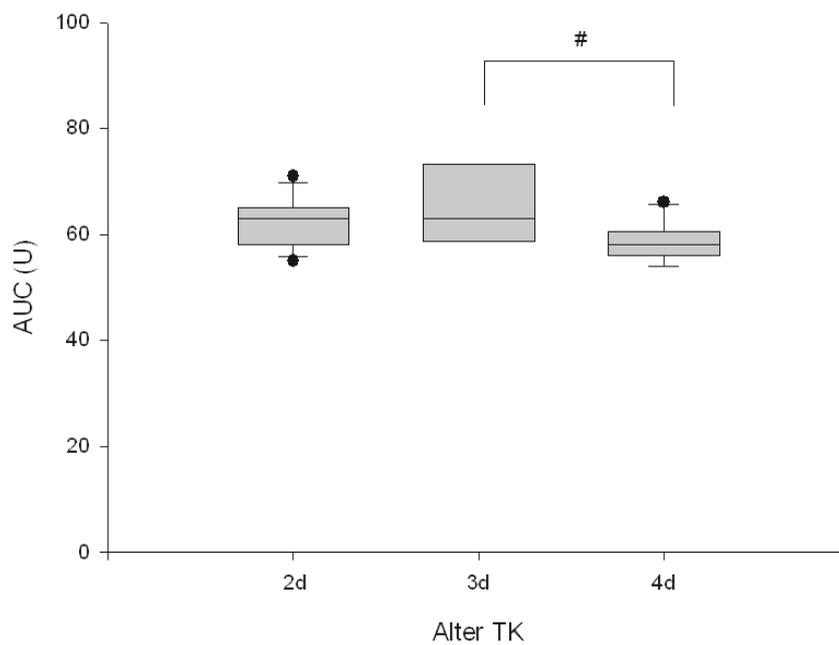
\*  $p = 0,035$  AUC TRAPtest d4 vs. d3

Angabe der Werte als Mittelwert ± Standardabweichung.

Für alle grafischen Darstellung im Box-Plot gilt: Die Begrenzungen der Box repräsentieren die 25. bzw. die 75. Perzentile, die mittlere Linie zeigt den Median. Die Whiskers begrenzen die 10. bzw. die 90. Perzentile, Ausreißer sind als Punkte dargestellt.

**Abb. 19**

Darstellung der AUC-Werte im ASPItest bezogen auf das Alter der getesteten Thrombozytenkonzentrate.

**Abb. 20**

Darstellung der AUC-Werte im TRAPtest bezogen auf das Alter der getesteten Thrombozytenkonzentrate.

(#)  $p < 0,05$  AUC-Werte d4 vs. AUC-Werte d3

## 5.4 Abschnitt 2: 5-12 Tage alte Thrombozytenkonzentrate

Um den Einfluss einer verlängerten Lagerung auf die Aggregationsfähigkeit der Thrombozyten zu analysieren, wurden an den Tagen 5, 6, 7, 8, 9, 10 und 12 impedanzaggregometrische Messungen mit dem Multiplate<sup>®</sup> durchgeführt und die entsprechenden AUC-Werte [U] protokolliert (siehe Tabelle 14). Insgesamt wurden 44 Thrombozytenkonzentrate in die Auswertung mit einbezogen. Proben, deren Messergebnisse nicht den geräteinternen Kontrollkriterien entsprachen, wurden aus der jeweiligen Tageswertung ausgeschlossen. Tabelle 15 gibt einen Überblick über die fehlenden Messwerte in Bezug auf die einzelnen Messtage für ASPItest und TRAPtest.

Die AUC-Werte der Analysetage 5 bis 10 lagen für den ASPItest im Mittel zwischen 58 und 66 U, für den TRAPtest bei 55 bis 60 U. Für beide Tests waren am 12. Lagerungstag ein signifikanter Abfall sowie eine vermehrte Streuung der Aggregationswerte zu verzeichnen.

**Tab. 14**

AUC-Werte der 5-12 Tage alten Thrombozytenkonzentrate für ASPI- und TRAPtest in Bezug auf die einzelnen Messtage.

Angabe der Werte als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung.

	d5	d6	d7	d8	d9	d10	d12
<b>ASPItest [U]</b>	61,4 $\pm$ 17,6	63,8 $\pm$ 10,0	64,2 $\pm$ 11,7	66,3 $\pm$ 13,1	62,8 $\pm$ 14,2	57,7 $\pm$ 16,4	25,5 $\pm$ 27,7
<b>TRAPtest [U]</b>	57,9 $\pm$ 13,0	58,7 $\pm$ 8,9	58,7 $\pm$ 9,6	60,1 $\pm$ 10,1	57,8 $\pm$ 10,4	54,6 $\pm$ 10,5	31,5 $\pm$ 21,6

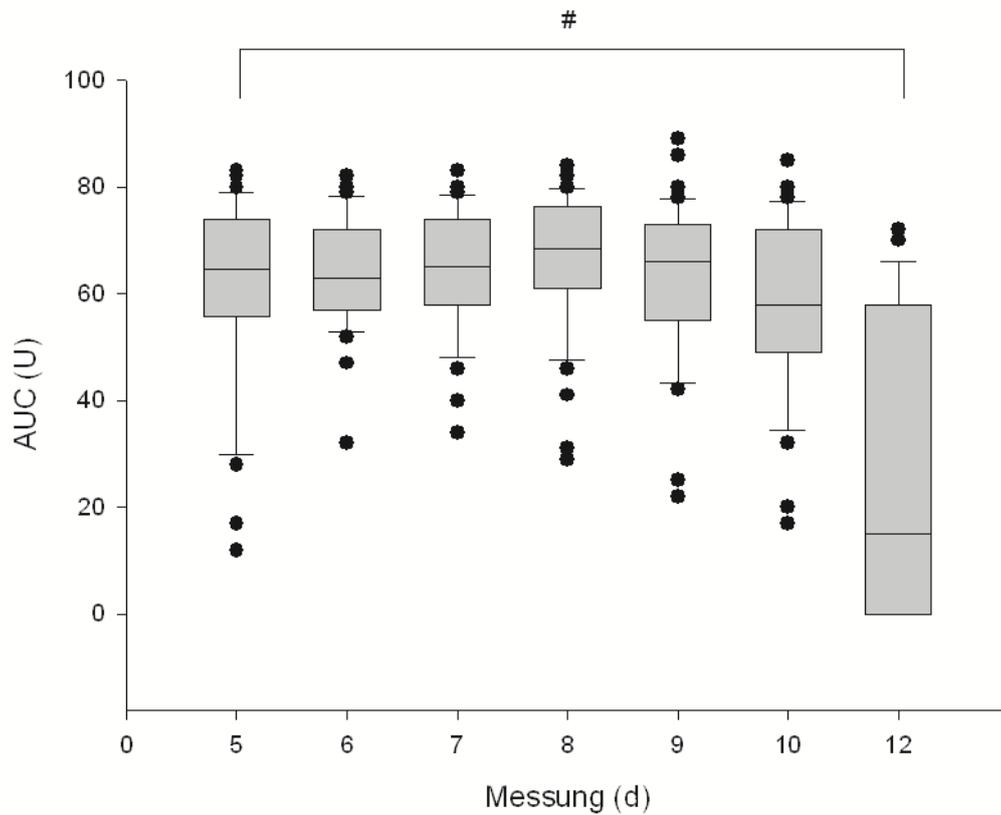
**Tab. 15**

Auflistung der fehlenden Messwerte für ASPItest und TRAPtest.

	d5	d6	d7	d8	d9	d10	d12
<b>ASPItest</b>	6	1	1	2	3	7	15
<b>TRAPtest</b>	6	0	1	0	2	5	15

### 5.4.1 ASPItest

Für den ASPItest zeigte sich im zeitlichen Verlauf ein signifikanter Abfall der AUC-Werte an Tag 12 in Bezug auf alle vorherigen Tage ( $p < 0,05$ ). Der Vergleich der restlichen Tage ergab keinen statistisch signifikanten Unterschied (siehe Abb. 21). Die AUC-Werte lagen von Tag 5 bis Tag 10 im Mittel zwischen 58 und 66 U, während am 12. Lagerungstag nur noch eine mittlere Aggregation von 26 U zu verzeichnen war.

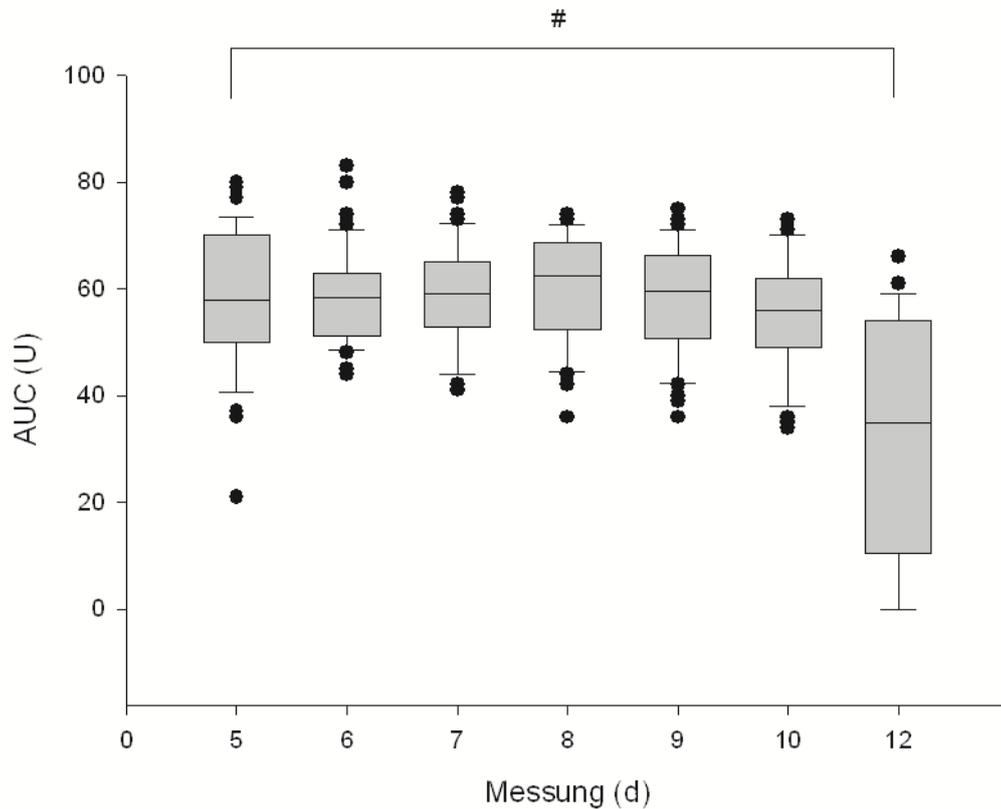


**Abb. 21**

AUC-Werte im ASPItest bezogen auf das Alter der getesteten Thrombozytenkonzentrate.  
(#)  $p < 0,05$  AUC-Werte d12 vs. AUC-Werte d5,6,7,8,9 und 10

### 5.4.2 TRAPtest

Für den TRAPtest ließen sich im Vergleich zu allen anderen Analysetagen am 12. Lagerungstag signifikant niedrigere AUC-Werte nachweisen ( $p < 0,05$ ) (siehe auch Abb. 22). Für die Analysetage 5 bis 10 betrug die Aggregationswerte im Mittel 55 bis 60 U. Wie auch im ASPItest waren am 12. Lagerungstag ein signifikanter AUC-Abfall ( $31,5 \text{ U} \pm 21,6 \text{ U}$ ) sowie eine breite Streuung der Werte zu verzeichnen.



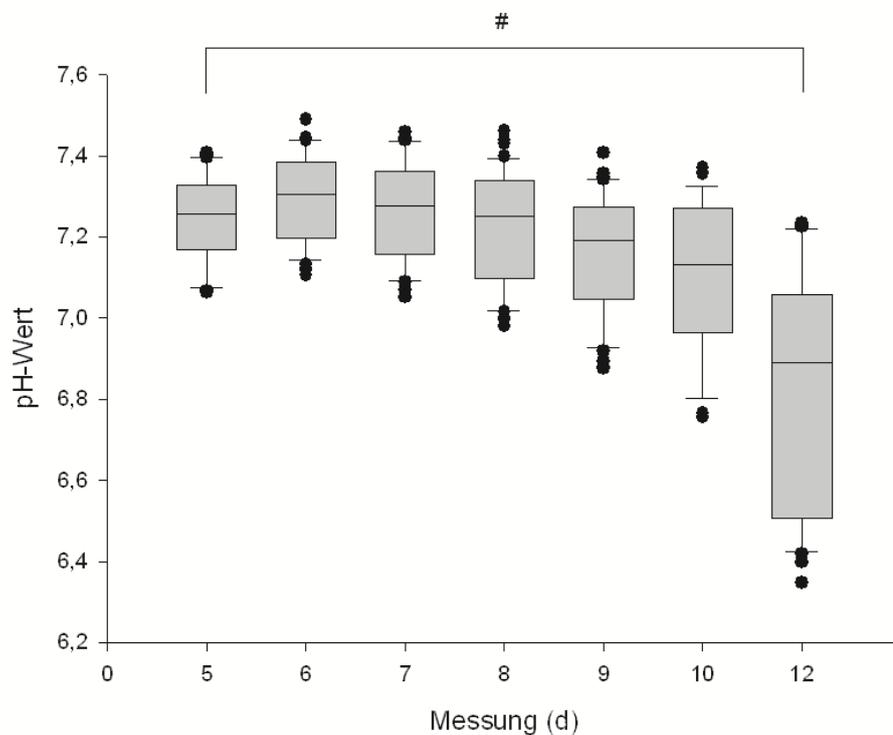
**Abb. 22**

AUC-Werte im TRAPtest bezogen auf das Alter der getesteten Thrombozytenkonzentrate.  
(#)  $p < 0,05$  AUC-Werte d12 vs. AUC-Werte d5,6,7,8,9 und 10

### 5.4.3 Blutgasanalysen

#### 5.4.3.1 Verlauf pH

In Bezug auf die unmittelbar während der jeweiligen Multiplate<sup>®</sup>-Analysen durchgeführten Blutgasanalysen zeigten sich für den pH-Wert zwischen dem 5. und dem 8. Tag relativ stabile Werte von im Mittel 7,243 bis 7,270. Verglichen mit den restlichen Tagen war am 12. Tag ein signifikanter pH-Abfall zu verzeichnen (siehe Abb. 23). Weiterhin waren die pH-Werte an den Tagen 5, 6, und 7 signifikant höher als am 10. Tag. Das pH-Maximum von 7,489 wurde am 6. Analysetag erreicht, der niedrigste gemessene Wert betrug 6,347 an Tag 12 der Lagerung.



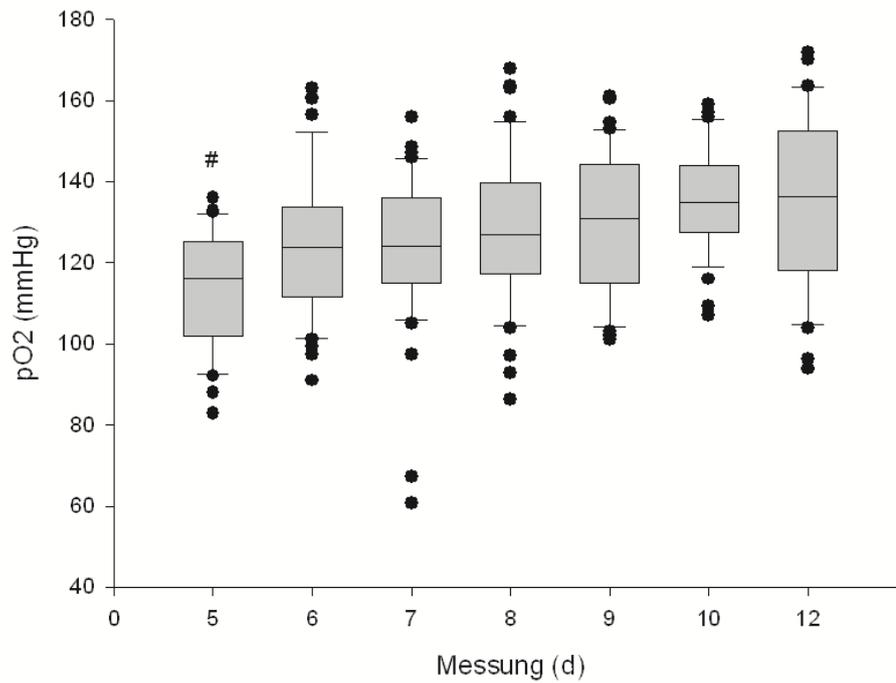
**Abb. 23**

Darstellung der pH-Werte der getesteten Thrombozytenkonzentrate bezogen auf den jeweiligen Analysetag.

(#)  $p < 0,05$  pH-Werte d12 vs. pH-Werte d5,6,7,8,9 und 10

### 5.4.3.2 Verlauf pO<sub>2</sub>

Bei Betrachtung der pO<sub>2</sub>-Werte zeigte sich im zeitlichen Verlauf insgesamt eine leicht steigende Tendenz von im Mittel 114 mmHg auf 136 mmHg, statistisch signifikant niedriger war der pO<sub>2</sub> an Tag 5 in Bezug auf die Tage 8, 9, 10 und 12 ( $p < 0,05$ ) (siehe Abb. 19).



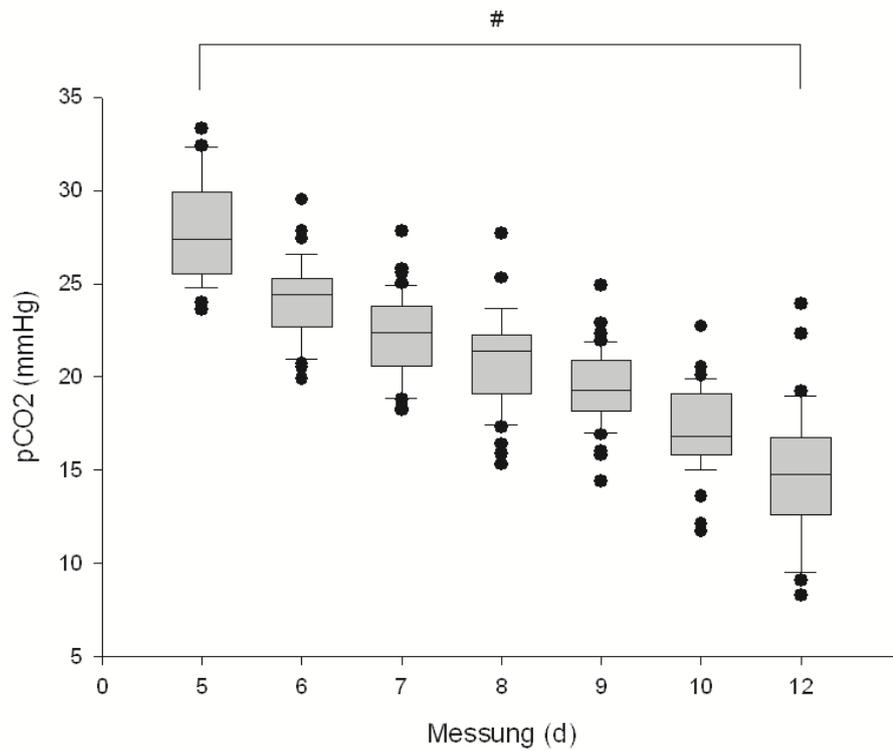
**Abb. 24**

Verlauf der pO<sub>2</sub>-Werte der getesteten Thrombozytenkonzentrate.

(#)  $p < 0,05$  pO<sub>2</sub>-Werte d5 vs. pO<sub>2</sub>-Werte d8, 9, 10 und 12

### 5.4.3.3 Verlauf pCO<sub>2</sub>

Die pCO<sub>2</sub>-Werte der Thrombozytenkonzentrate zeigten einen kontinuierlichen Abfall von 28 mmHg am 5. Lagerungstag auf 15 mmHg am 12.Tag. Hierbei waren auch die Vergleichsgruppen untereinander signifikant unterschiedlich ( $p < 0,05$ ) (siehe Abb. 25).



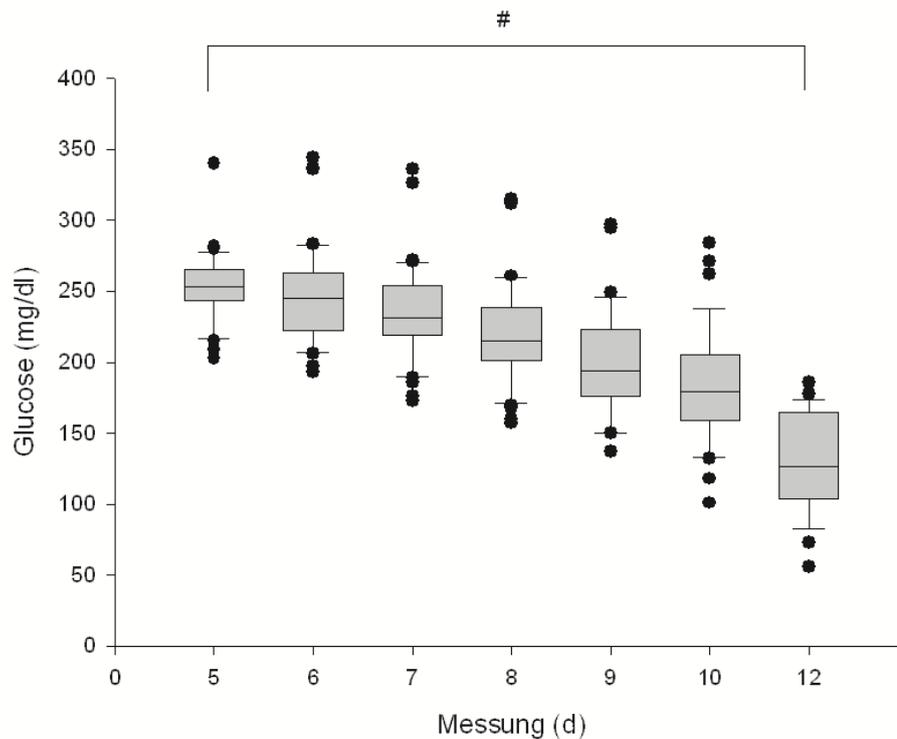
**Abb. 25**

Verlauf der pCO<sub>2</sub>-Werte der getesteten Thrombozytenkonzentrate.

(#)  $p < 0,05$  für pCO<sub>2</sub>-Werte an allen Messtagen

#### 5.4.3.4 Verlauf Glukosekonzentration

Die Glukosekonzentration zeigte insgesamt ebenfalls eine fallende Tendenz, der Mittelwert betrug 252 mg/dl am 5. Analysetag und 130 mg/dl am 12. Lagerungstag. Die Werte an Tag 12 waren – mit Ausnahme von Tag 10 – signifikant niedriger als an allen anderen Tagen ( $p < 0,05$ ) (siehe Abb. 26).



**Abb. 26**

Veränderung der Glukosekonzentration der getesteten Thrombozytenkonzentrate im zeitlichen Verlauf.

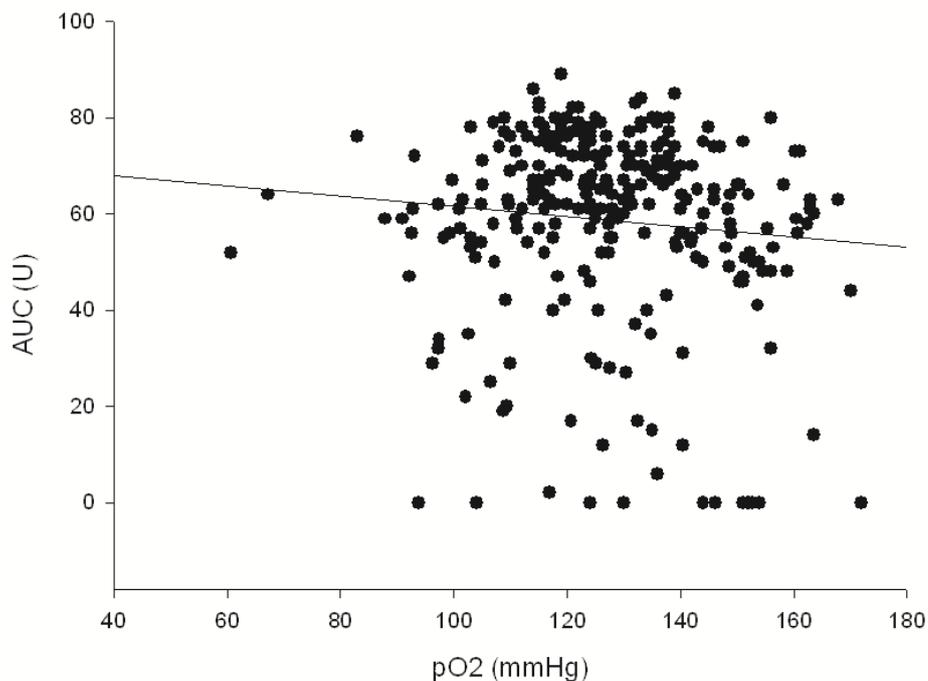
(#)  $p < 0,05$  für Glukosekonzentration d12 gegenüber allen anderen Tagen, ausgenommen d10

#### 5.4.4 Korrelationsanalysen

Zur Charakterisierung des Ausmaßes eines linearen Zusammenhangs zwischen den AUC-Werten der 5-12 Tage alten Thrombozytenkonzentrate und den Ergebnissen der Blutgasanalysen wurden jeweils für ASPI- und TRAPtest und die entsprechenden Blutgasparameter Korrelationsanalysen durchgeführt und die jeweiligen Korrelationskoeffizienten bestimmt. p-Werte kleiner 0,05 wurden als statistisch signifikant angesehen.

##### 5.4.4.1 pO<sub>2</sub> vs. ASPItest

Für die Korrelation zwischen pO<sub>2</sub> und den AUC-Werten im ASPItest ergab sich ein Korrelationskoeffizient von  $r = -0,098$  ( $p > 0,05$ ) und somit keine Korrelation.



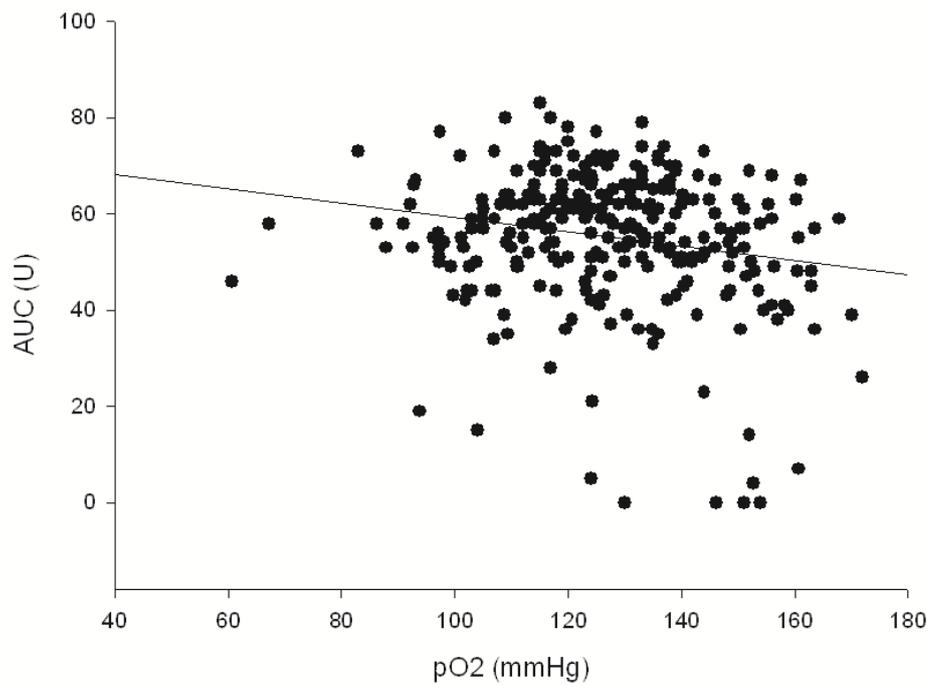
**Abb. 27**

Korrelation der AUC-Werte im ASPItest mit den pO<sub>2</sub>-Werten der jeweiligen Thrombozytenkonzentrate.

$r = -0,098$  ( $p > 0,05$ )

#### 5.4.4.2 pO<sub>2</sub> vs. TRAPtest

Für den Zusammenhang von pO<sub>2</sub> und AUC-Werten im TRAPtest ergab sich eine sehr geringe negative Korrelation ( $r = -0,192$ ,  $p < 0,05$ ).



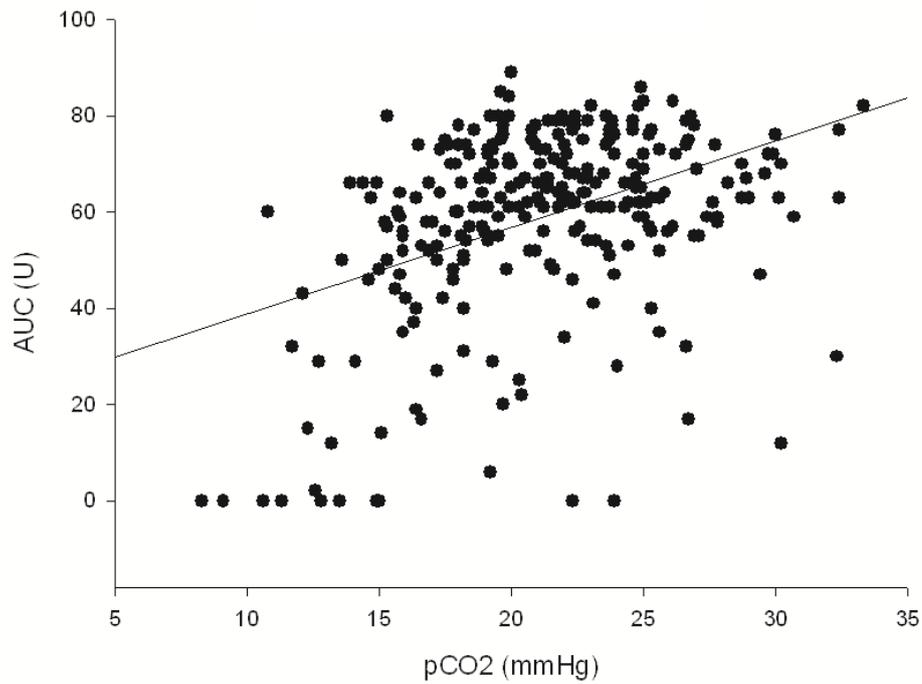
**Abb. 28**

Korrelation der AUC-Werte im TRAPtest mit den pO<sub>2</sub>-Werten der jeweiligen Thrombozytenkonzentrate.

$r = -0,192$  ( $p < 0,05$ )

#### 5.4.4.3 pCO<sub>2</sub> vs. ASPItest

Bezüglich der Verbindung zwischen pCO<sub>2</sub> und ASPItest ergab sich eine geringe, aber statistisch signifikante Korrelation mit  $r = 0,416$  ( $p < 0,05$ ).



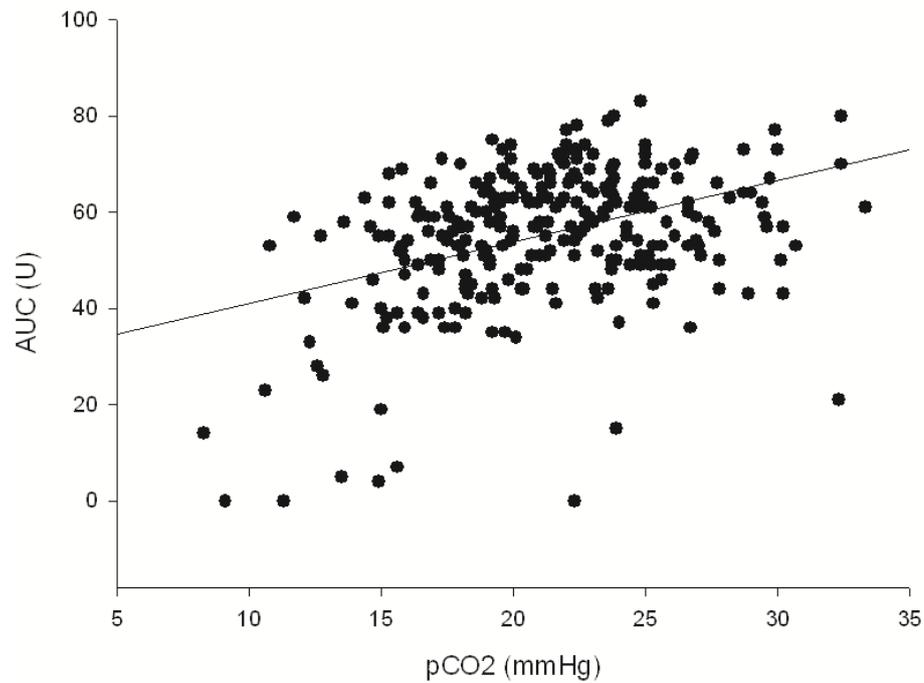
**Abb. 29**

Korrelation der AUC-Werte im ASPItest mit den pCO<sub>2</sub>-Werten der jeweiligen Thrombozytenkonzentrate.

$r = 0,416$  ( $p < 0,05$ )

#### 5.4.4.4 pCO<sub>2</sub> vs. TRAPtest

Die Korrelation zwischen pCO<sub>2</sub> und TRAPtest ergab ebenfalls eine geringe, aber statistisch signifikante Korrelation mit  $r = 0,399$  ( $p < 0,05$ ).



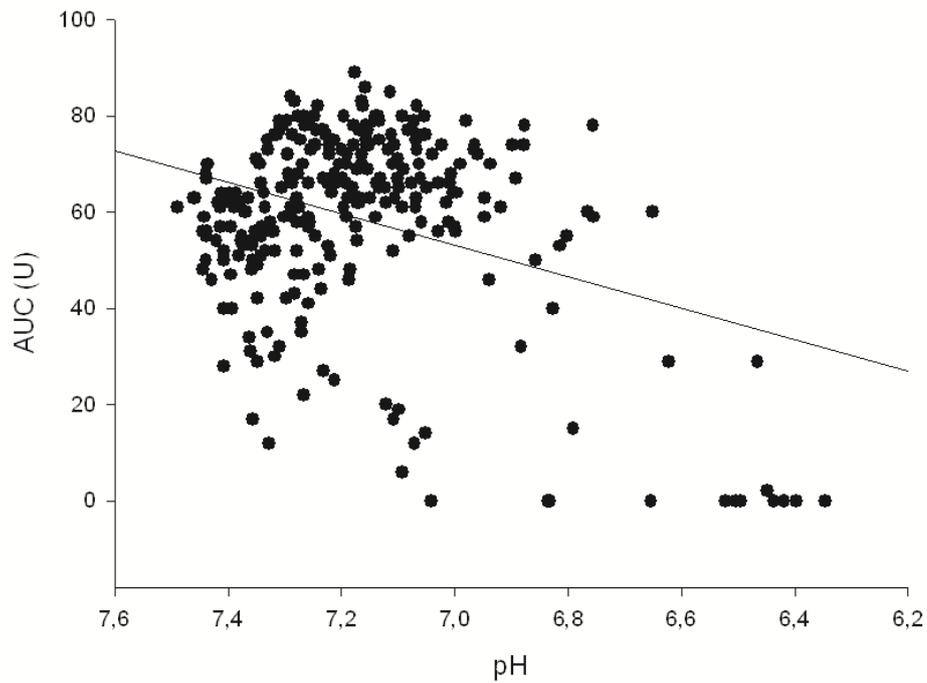
**Abb. 30**

Korrelation der AUC-Werte im TRAPtest mit den pCO<sub>2</sub>-Werten der jeweiligen Thrombozytenkonzentrate.

$r = 0,399$  ( $p < 0,05$ )

#### 5.4.4.5 pH vs. ASPItest

pH-Werte und AUC-Werte zeigten im ASPItest keine Korrelation ( $r = 0,083$ ;  $p > 0,05$ ).



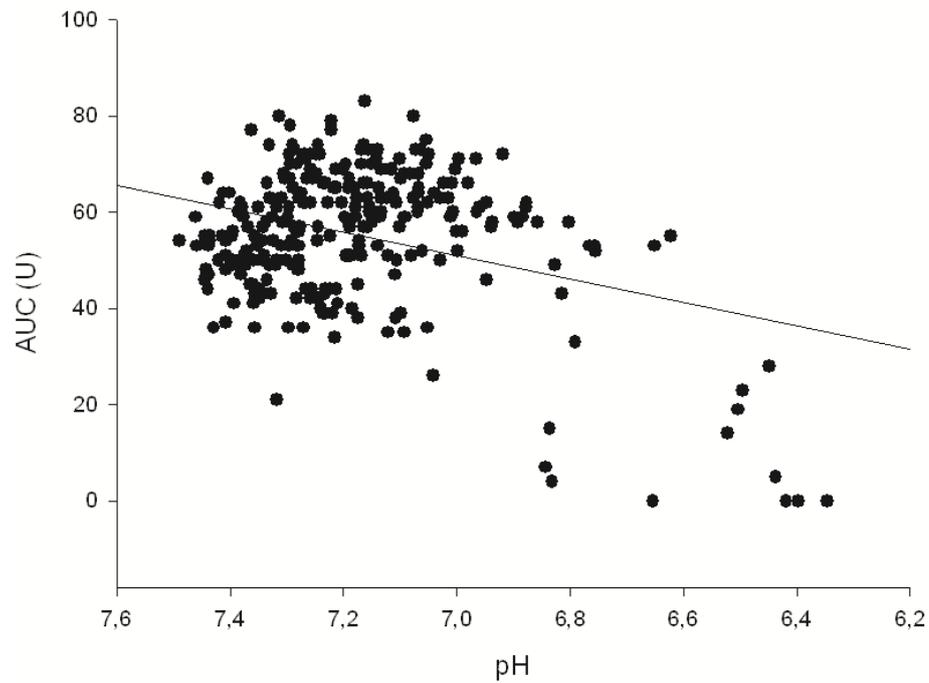
**Abb. 31**

Korrelation der AUC-Werte im ASPItest mit den pH-Werten der jeweiligen Thrombozytenkonzentrate.

$r = 0,083$  ( $p > 0,05$ )

#### 5.4.4.6 pH vs. TRAPtest

Im TRAPtest ergab sich ebenfalls keine Korrelation zwischen pH-Werten und AUC-Ergebnissen ( $r = 0,076$ ;  $p > 0,05$ ).



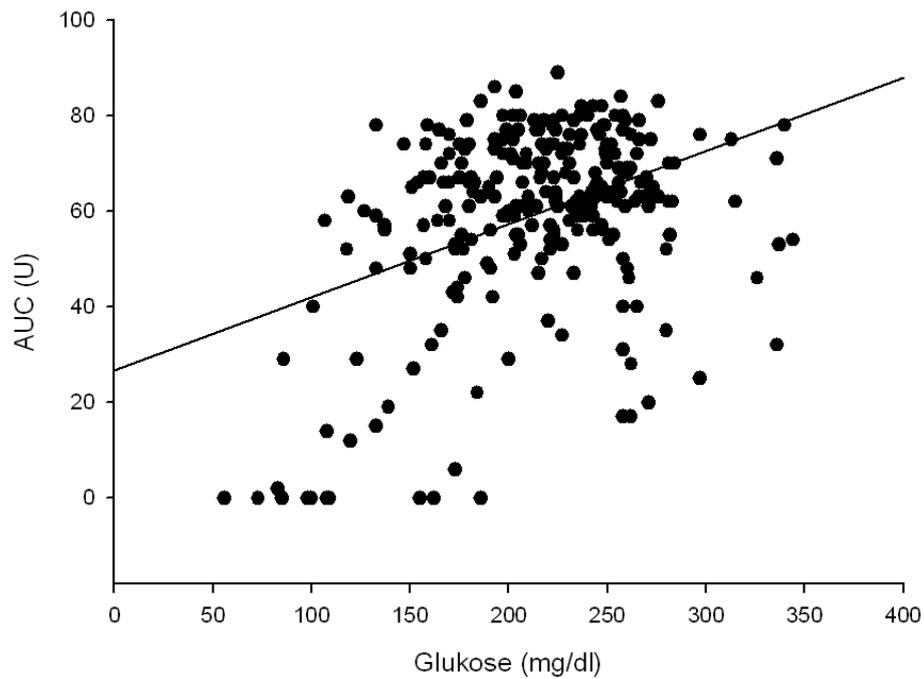
**Abb. 32**

Korrelation der AUC-Werte im TRAPtest mit den pH-Werten der jeweiligen Thrombozytenkonzentrate.

$r = 0,076$  ( $p > 0,05$ )

#### 5.4.4.7 Glukosekonzentration vs. ASPItest

Glukosekonzentration und AUC-Werte im ASPItest korrelierten schwach, aber statistisch signifikant mit  $r = 0,398$  ( $p < 0,05$ ).



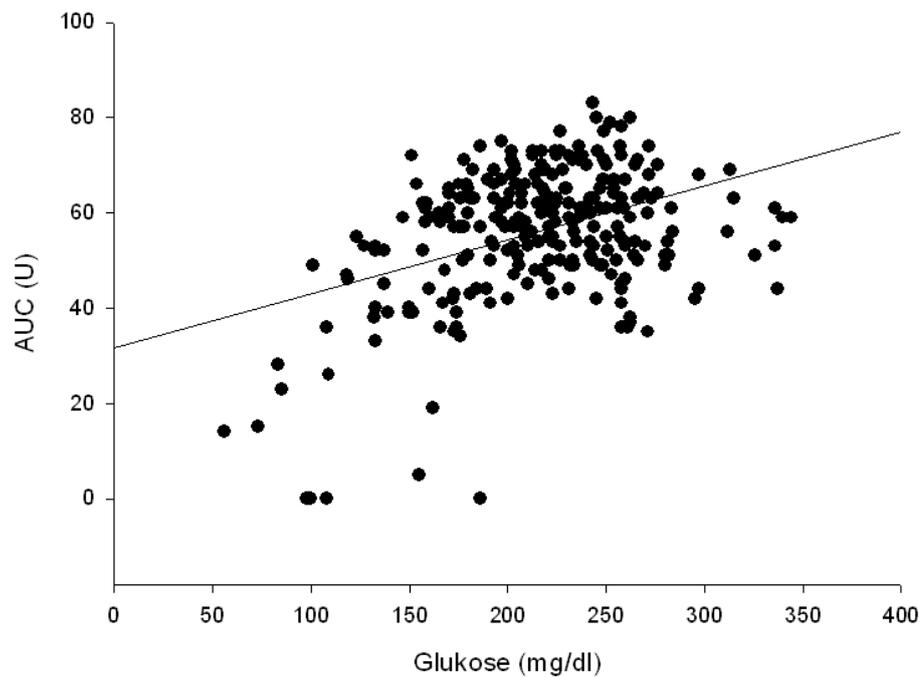
**Abb. 33**

Korrelation der AUC-Werte im ASPItest mit der Glukosekonzentration der jeweiligen Thrombozytenkonzentrate.

$r = 0,398$  ( $p < 0,05$ )

#### 5.4.4.8 Glukosekonzentration vs. TRAPtest

Auch im TRAPtest korrelierten Glukosekonzentration und AUC-Werte schwach, aber statistisch signifikant ( $r = 0,405$ ;  $p < 0,05$ ).



**Abb. 34**

Korrelation der AUC-Werte im TRAPtest mit der Glukosekonzentration der jeweiligen Thrombozytenkonzentrate.

$r = 0,405$  ( $p < 0,05$ )

## **6. Diskussion**

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, eine Methodik zur Evaluierung der Aktivierungs- und Aggregationsfähigkeit von gelagerten Apherese-Thrombozytenkonzentraten mittels Multiplate<sup>®</sup> zu entwickeln. Weiterhin wurde der Einfluss einer verlängerten Lagerungsdauer auf die Veränderung der AUC-Werte und den zeitlichen Verlauf konventioneller Blutgasparameter charakterisiert sowie die Korrelation beider Parameter überprüft.

### **6.1 Abschnitt 1 – Etablierung einer Messmethodik**

#### **6.1.1 Zielkonzentration Thrombozyten**

Um den Einfluss der Plättchenzahl auf die Aggregationsfähigkeit der Thrombozyten zu charakterisieren, führten wir Messungen mit drei unterschiedlichen Thrombozytenkonzentrationen durch. Sowohl im ASPI- als auch im TRAPtest ergaben sich für eine Thrombozytenkonzentration von 400000/ $\mu$ l im Vergleich zu einer Konzentration von 200000/ $\mu$ l bzw. 100000/ $\mu$ l signifikant höhere AUC-Werte. Hierbei zeigt sich eine Übereinstimmung mit den Ergebnissen diverser Studien, welche die Auswirkungen verschiedener Plättchenkonzentrationen auf die Multiplate<sup>®</sup>-Ergebnisse in Vollblutproben analysiert haben. Stissing et al. sowie Hanke et al. berichteten über eine Reduktion der Plättchenaggregation in antikoaguliertem Vollblut bei einer Plättchenzahl < 150000/ $\mu$ l [41, 131]. In Bezug auf Thrombozytenwerte im klinischen Referenzbereich (150000-400000/ $\mu$ l) fanden Tóth et al. bei der impedanzaggregometrischen Analyse von Zitrat- und Hirudin-antikoagulierten Vollblutproben keine Korrelation zwischen der Plättchenzahl und dem Ausmaß der Aggregationsfähigkeit [134]. Seyfert et al. zeigten im Gegensatz hierzu eine signifikante Korrelation im ADP- und COLtest [117].

Der Vergleich der oben angeführten Studienergebnisse mit unseren Resultaten wird insofern erschwert, als dass alle aufgeführten Studien die Aggregationsfähigkeit der Plättchen in Vollblut testen und dadurch die Interaktion der Thrombozyten mit anderen Zellen, vor allem Erythrozyten und Leukozyten, berücksichtigen. Daher reflektieren sie ein integratives Modell der Plättchenaggregation, was den natürlichen Vorgängen in vivo naturgemäß näher kommt. Aus diesem Grund darf spekuliert werden, dass die verminderte Aggregationsfähigkeit der Thrombozyten in den Vollblutansätzen letztlich unter anderem aus einem Verdünnungsprozess und einem

daraus resultierenden Abfall des Hämatokrits resultiert. Dieser Ansatz wird allerdings in der Studie von Hanke et al. widerlegt. Die Arbeitsgruppe konstruierte ein Modell, welches eine Einstellung der Plättchenzahl unter Erhaltung eines physiologischen Hämatokrits erlaubte. Auch hier zeigte sich bei Thrombozytenzahlen unter 150000/ $\mu$ l eine signifikante Abnahme der AUC-Werte im Multiplate<sup>®</sup>. Daraus lässt sich schließen, dass die Reduktion der Plättchenzahl mit der beobachteten Verminderung der Aggregationsfähigkeit in einem kausalen Zusammenhang steht. Die Tatsache, dass wir in unseren Versuchsansätzen wesentlich höhere Thrombozytenzahlen zur Erreichung angemessener AUC-Werte benötigten als in den oben aufgeführten Studien mit Verwendung von Vollblutproben, lässt sich durch den positiven Einfluss von Erythrozyten und Leukozyten auf die Plättchenaktivierung und -aggregation erklären. Die Interaktion von Thrombozyten und Erythrozyten fördert über eine vermehrte Expression von P-Selektin sowie durch die Aktivierung des  $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Integrins die Plättchenaggregation und -rekrutierung [135]. Allerdings zeigen in vitro Modelle zur Testung der Plättchenfunktion in Bezug auf eine Interaktion zwischen Thrombozyten und Erythrozyten widersprüchliche Ergebnisse. Bochsén et al. fanden im TRAP- und COLtest keine Unterschiede bezüglich der Multiplate<sup>®</sup>-Ergebnisse bei verschiedenen Hämatokrit-Werten (0; 0,15; 0,29); im ASPI- und ADPtest ließ sich hingegen mit einem Hämatokrit-Anstieg auch eine verbesserte Aggregation der Thrombozyten im Multiplate<sup>®</sup> nachweisen [11]. Die Autoren schlussfolgerten daher, dass Erythrozyten die resultierende Plättchenantwort auf schwache Agonisten wie ADP und Arachidonsäure verstärken. Im Gegensatz hierzu beschreiben Würtz et al. mit steigendem Hämatokrit beziehungsweise mit erhöhten Erythrozyten-Zahlen eine Verschlechterung der Aggregationsfähigkeit. Stafford et al. zeigten ebenfalls eine negative Korrelation [129, 145], während wiederum Rubak et al. überhaupt keine Assoziation feststellen konnten [104].

### **6.1.2 Verwendete Plättchenaktivatoren**

In Bezug auf die Auswahl der Plättchenaktivatoren erhielten wir reproduzierbare, stabile Messergebnisse bei der Verwendung von ASPI- und TRAPtest. Im ADP- und COLtest waren die Multiplate<sup>®</sup>-Messungen nicht zuverlässig durchführbar, da entweder der Korrelationskoeffizient fehlerhaft und/oder die Differenz der beiden Kontrollkurven zu groß war. Messungen, die den Testkriterien entsprachen, zeigten deutlich niedrigere AUC-Werte als bei der Verwendung von ASPI- oder TRAPtest.

Gerade in Bezug auf den COLtest verwundert dies, da es sich bei Kollagen um einen starken Plättchenaktivator handelt [11], welcher zudem den gleichen Signalweg wie der ASPItest – nämlich die endogene Freisetzung von Arachidonsäure und konsekutiv die Bildung von  $\text{TXA}_2$  – bewirkt. Jilma-Stohlawetz et al. publizierten 2009 erstmals Daten zum Einsatz des Multiplate<sup>®</sup> bei der Evaluation der in vitro Funktion von Plättchenkonzentraten [49]. In Anlehnung an die nur als Abstract veröffentlichten Daten von Wittman et al., welche die Agonisten TRAP-6 und COL als geeignete Plättchenaktivatoren zur Charakterisierung der Funktionalität von Thrombozytenkonzentraten vorschlugen, zeigte die Arbeitsgruppe um Jilma-Stohlawetz gute Ergebnisse für den Einsatz des starken Aktivators TRAP-6. Im Unterschied zu unserem Vorgehen erreichten die Autoren die Einstellung der Plättchenkonzentration auf Normwerte durch die Zugabe von FFP der Blutgruppe AB.

Bei ADP handelt es sich um einen schwächeren Thrombozytenagonisten. In Übereinstimmung mit der Studie von Seyfert et al. [117] erhielten Kaiser et al. bei der Verwendung des ADPtest wesentlich geringere Aggregationswerte als beim Einsatz des ASPItest. Weiterhin zeigte sich im ADPtest eine geringere Stabilität der Proben in Bezug auf die Lagerungszeit der Blutproben bis zur Analyse [54]. Bei der Übertragung dieser Erkenntnisse auf unsere Messansätze muss bedacht werden, dass es sich bei den analysierten Proben der aufgeführten Studien um Vollblutansätze handelt, wohingegen unsere Messungen mit verdünnten Apherese-Konzentraten durchgeführt wurden. In vivo tragen Erythrozyten durch die Freisetzung von ADP bzw. durch die Entfernung von Adenosin, einem Plättcheninhibitor, wesentlich zur Stimulation der Plättchenaggregation bei [131]. Dieser Effekt fehlt naturgemäß bei der Analyse von Thrombozytenkonzentraten und könnte daher eine Erklärung für die verminderten AUC-Werte im ADPtest darstellen. Keuren et al. untersuchten in einer Studie von 2006 die These, dass sich eine Plättchenstimulation mit ADP mit zunehmender Lagerungsdauer in synthetischen Thrombozytenlagerlösungen verschlechtert [58]. Während der Aufbewahrung von Thrombozyten kommt es zu einer vermehrten Freisetzung von ADP aus den dichten Granula, welche einerseits zu einer Aktivierung der Plättchen führt, die ADP-Rezeptoren andererseits aber auch refraktär für eine erneute Stimulation macht. Nach einer Lagerung von 4 Tagen in PAS-II bzw. Composol<sup>®</sup> PS zeigten die Plättchen im Vergleich zu einer Suspension in 100% Plasma eine deutlich verringerte Aggregation auf eine Stimulation mit ADP. Durch die Zugabe von Apyrase, einer ADPase, konnte die Ansprechbarkeit auf eine

Stimulation mit ADP erhalten werden. Diese Beobachtungen sind insofern von Bedeutung für unsere Messungen, als dass die Thrombozytenkonzentrate zwar nicht in Additivlösung gelagert wurden, die Einstellung der entsprechenden Thrombozytenzahl jedoch durch die Zugabe von Composol® PS erfolgte. Daher wurde der Plasmaanteil der Proben vor Durchführung der Multiplate®-Messungen deutlich reduziert. Da gerade die Antwort auf eine Stimulation mit Kollagen in hohem Maße vom verstärkenden Einfluss einer autokrinen ADP-Freisetzung abhängig ist, könnte dies eine mögliche Erklärung für die schlechteren Resultate im ADP- und COLtest darstellen. Weiterhin ist die Additivlösung Composol® PS magnesiumhaltig. Da Magnesium die ADP-induzierte Fibrinogenbindung und daher die Plättchenaggregation verschlechtert [34, 94], kann spekuliert werden, dass dieser Effekt möglicherweise ebenfalls einen negativen Einfluss auf die Plättchenantwort in Bezug auf eine Stimulation mit ADP und Kollagen hat.

### 6.1.3 Antikoagulation

Die Auswahl eines geeigneten Antikoagulans für die Anwendung der multiplen Impedanzaggregometrie in Vollblut ist Gegenstand intensiver Forschung. Wallén et al. schlugen schon 1997 die Verwendung von Hirudin bei der Durchführung von Plättchenfunktionstesten vor [142]. Solomon et al. evaluierten den Einsatz der MEA in der Herzchirurgie und favorisierten den Einsatz von Heparin im Vergleich zu Zitrat [127]. Die Arbeitsgruppe um Kalb empfiehlt sowohl die Verwendung von Heparin als auch von Hirudin, spricht sich aber entschieden gegen eine Antikoagulation mit Zitrat aus [55]. Dies ist in Einklang mit den Ergebnissen einer aktuellen Studie von 2012. Kaiser et al. untersuchten unter der oben genannten Fragestellung sechs verschiedene Antikoagulanzen und fanden für Natrium-Heparin sowie für Hirudin keine signifikant unterschiedlichen Resultate. Bei der Verwendung von Zitrat ergaben sich signifikant niedrigere AUC-Werte, was auch in einer vorherigen Studie von Tóth et al. der Fall war [134]. In unserer Klinik werden die Multiplate®-Messungen mit Hinblick auf die aktuellen Studienergebnisse mit Hirudin-antikoaguliertem Vollblut durchgeführt.

Der zusätzliche Einsatz eines Antikoagulans bei der Messung verdünnter Apherese-Konzentrate ist insofern zu kritisieren, als dass es durch die Verdünnung der Proben mit Composol® PS zu einer deutlichen Reduktion des Plasmaanteils kommt, wodurch plasmatische Gerinnungsfaktoren die Aggregation im Multiplate® nicht mehr

wesentlich beeinflussen. Weiterhin haben Jilma-Stohlawetz et al. bei der Analyse plasmaverdünnter Thrombozytenkonzentrate kein zusätzliches Antikoagulans verwendet [49]. Da der tatsächliche Plasmagehalt in unserer Studie jedoch nicht gemessen wurde, entschieden wir uns für eine Durchführung der Antikoagulation mit Hirudin um eine unabhängig von der Plättchenaktivierung stattfindende Thrombingenerierung zu verhindern. Rekombinantes Hirudin scheint vor allem deswegen geeignet, weil es nicht in den Kalziumhaushalt der Thrombozyten eingreift, nicht mit der Plättchenfunktion interferiert und keine direkten Effekte auf die Thrombozyten hat [45]. Dies kann auch insofern bestätigt werden, als dass sich unsere AUC-Werte – trotz der Verwendung von Hirudin – nicht wesentlich von den Werten in der Studie von Jilma-Stohlawetz et al. unterscheiden. Weiterhin beschrieben Tóth et al. für Hirudin-antikoagulierte Proben eine deutlich verringerte spontane Plättchenaggregation im Multiplate<sup>®</sup> im Vergleich zur Verwendung von Heparin [134].

#### **6.1.4 Verdünnung mit Compsol<sup>®</sup> PS**

Um die oben genannte Plättchenkonzentration von 400000/ $\mu$ l zu erreichen, wurden die TK-Proben entsprechend mit Compsol<sup>®</sup> PS verdünnt. Hierbei handelt es sich um eine Thrombozytenlagerlösung der neueren Generation mit einem pH von 7,0. Wir entschieden uns gegen den Einsatz von Plasma als Verdünnungsmedium, da wir in unserem Modell ein Point-of-Care-ähnliches Verfahren entwickeln wollten, welches die Charakterisierung der Aggregationsfähigkeit der Thrombozyten unabhängig von der Verfügbarkeit zusätzlicher Plasmakomponenten ermöglicht. Da Compsol<sup>®</sup> PS Natriumzitat enthält, ist zu vermuten, dass hierdurch die freien Kalziumionen in der TK-Probe komplexiert werden und die Plättchen in ihrer Adhäsions-, Aktivierungs- und Aggregationsfähigkeit eingeschränkt werden, wie es auch bei der Verwendung von Zitat zur Antikoagulation der Fall ist [85]. Diesen Effekt wollten wir durch die Zugabe von Kalziumchlorid verhindern. Die Durchführung einer Konzentrationsreihe mit verschiedenen Kalziumkonzentrationen (0mmol/l; 1,2mmol/l; 2,5mmol/l; 5mmol/l und 10mmol/l) zeigte in Bezug auf die erzielten AUC-Werte keine signifikanten Unterschiede, allerdings hatten sich in Vorversuchen stabile Resultate für eine Kalziumkonzentration von 5mmol/l ergeben. In der Studie von Jilma-Stohlawetz et al. wurden die TK-Proben mit FFP verdünnt, wodurch sich die Notwendigkeit einer Kalziumsubstitution nicht ergab [49]. Der Multiplate<sup>®</sup>-Hersteller empfiehlt für die Test-

durchführung mit Zitrat-antikoagulierten Vollblutproben eine partielle Rekalzifizierung mit Kalziumchlorid in einer Konzentration von 3 mmol/l [146].

Composol<sup>®</sup> PS wird normalerweise als Additivlösung bei der Lagerung von Thrombozytenkonzentraten verwendet [136]. Die Arbeitsgruppe um Gulliksson zeigte 2002, dass die Anwesenheit von Kalium und Magnesium in Lagerlösungen wie Composol<sup>®</sup> PS und PASIII-M zu einer Reduktion der glykolytischen Aktivität führt, woraus ein verringerter Glukoseverbrauch sowie eine erniedrigte Laktatproduktion resultieren. Dies bedingt eine geringere Plättchenaktivierung und konsekutiv eine bessere Stabilität während der Lagerungszeit [34]. Van der Meer et al. berichteten allerdings über eine verminderte Stabilität von in Composol<sup>®</sup>PS suspendierten Plättchenkonzentraten im Vergleich zu PASIII-M bezüglich einer Unterbrechung der kontinuierlichen Agitation [137]. Ringwald et al. zeigten eine höhere Rate an aktivierten Plättchen bei einer Lagerung in Composol<sup>®</sup>PS [100]. Da sowohl Composol<sup>®</sup> PS als auch PASIII-M Kalium und Magnesium sowie Acetat enthalten und sich lediglich im Vorhandensein von Phosphat (PASIII-M) bzw. Glukonat (Composol<sup>®</sup> PS) unterscheiden, ist die Ursache der oben genannten Resultate unklar und muss in weiteren Studien näher charakterisiert werden. Acetat stimuliert als mögliches Substrat der oxidativen Energiegewinnung den thrombozytären Sauerstoffverbrauch und supprimiert gleichzeitig über eine Hemmung der Phosphofruktokinase den Glukosemetabolismus, wodurch die Laktatproduktion verringert und der pH stabilisiert wird [82]. Weiterhin hat es einen zusätzlichen alkalisierenden Effekt, da bei der Umwandlung von Acetat zu Acetyl-Coenzym A, dem Substrat des Zitratzyklus, Wasserstoffionen verbraucht werden [100]. Inwiefern allerdings eine Verdünnung mit Composol<sup>®</sup> PS die Plättchenfunktion in unseren Proben zusätzlich zu den unter 6.1.2 aufgeführten Vermutungen affektiert, kann daher – vor allem in Hinblick auf die relativ kurze Verweildauer (max. 2h) der Proben in der Verdünnungslösung – nicht genau beantwortet werden. Festzuhalten bleibt allerdings, dass alle Messungen mit diesem Verdünnungsansatz zuverlässige und im zeitlichen Verlauf reproduzierbare Resultate im Multiplate<sup>®</sup> zeigten.

## 6.2 Abschnitt 2 – Messungen im zeitlichen Verlauf

### 6.2.1 Blutgasparameter und Plättchenstoffwechsel

In Bezug auf die Analyse der Blutgasparameter der 5-12 Tage alten Thrombozytenkonzentrate zeigte sich für den pH-Wert ein relativ stabiler Verlauf im Bereich von 7,2 von Tag 5 bis Tag 8. Ein signifikanter pH-Abfall war am 12. Tag festzustellen, das pH-Minimum lag bei 6,347 (Tag 12), das Maximum bei 7,489 (Tag 6). Als großer Kritikpunkt an unserer Vorgehensweise ist zu sehen, dass die pH-Messungen der jeweiligen Konzentrate nicht – wie im Rahmen anderer Studien und routinemäßiger Qualitätskontrollen vorgesehen – bei 22 °C, sondern mithilfe eines automatisierten Blutgasanalysators bei 37 °C erfolgten. Hierdurch sind eine Vergleichbarkeit mit den Ergebnissen anderer Studien sowie die Einordnung der Werte im Rahmen der Qualitätskontrolle nur unter Vorbehalt möglich. Allerdings kamen Kilkson et al. nach der Analyse einer größeren Serie von pH-Messungen an Thrombozytenkonzentraten zu dem Ergebnis, dass die pH-Werte bei 22 °C im Durchschnitt 0,18 Einheiten höher liegen als bei 37 °C [60]. Dies deckt sich mit den Ergebnissen von Slichter et al. [124]. Insofern entsprechen pH-Werte der Thrombozytenkonzentrate in unseren Versuchsreihen auch am letzten Lagerungstag noch den Qualitätsanforderungen der Bundesärztekammer [15]. In Anlehnung an die Beobachtungen von Kilkson et al. sowie Murphy et al. [60, 80], dass ein pH-Abfall unter 6,0 mit einer irreversiblen Formänderung, einem Verlust der Fähigkeit zur oxidativen Energiegewinnung sowie einer verringerten Plättchenüberlebenszeit in vivo einhergeht, scheinen die Thrombozyten in unseren Experimenten ein akzeptables metabolisches Milieu aufrecht erhalten zu haben.

Die Gas-Partialdrücke ( $pO_2$  und  $pCO_2$ ) in den Thrombozytenkonzentraten sind unter anderem abhängig vom Ausmaß der Äquilibration mit den atmosphärischen Partialdrücken, der Gaspermeabilität der TK-Container und dem Gasverbrauch der Thrombozyten beziehungsweise der aus den oxidativen Stoffwechselwegen resultierenden Gasproduktion [147]. Der  $pO_2$  unserer Messreihen zeigte insgesamt einen Anstieg von im Mittel 21 mmHg während der Lagerungsdauer von Tag 5 bis zu Tag 12, wohingegen der  $pCO_2$  im Verlauf kontinuierlich und statistisch signifikant fallend war. Ähnliche Resultate zeigten Gyongyossy-Issa et al., Zang et al., Slichter et al. und Skripchenko et al. [38, 122, 124, 147]. Im Gegensatz zu unseren

Ergebnissen, die sowohl für den pH als auch für den  $p\text{CO}_2$  einen abfallenden Verlauf zeigen, sehen Zang et al. eine negative Korrelation zwischen pH-Wert und  $p\text{CO}_2$ , welche sie darauf zurückführen, dass die große Anzahl von Wasserstoffionen bei niedrigen pH-Werten eine vermehrte  $\text{CO}_2$ -Produktion aus Carbonaten bedingt. Van der Meer und de Korte postulieren wiederum eine so hohe Gaspermeabilität neuerer TK-Container, dass ein verstärkter pH-Abfall letztlich nicht das Resultat einer erhöhten  $\text{CO}_2$ -Produktion darstellt [139]. Auf der anderen Seite gehen die Autoren aber von einem Zusammenhang zwischen einer Erhöhung des pH-Wertes und einer vermehrten  $\text{CO}_2$ -Diffusion aus, was sich wiederum mit den Überlegungen von Zang et al. deckt. Skripchenko et al. stellten fest, dass verlängerte Perioden erhöhter  $\text{CO}_2$ -Level in Kombination mit einer Reihe anderer Faktoren mit einer schlechteren pH-Kontrolle sowie mitochondrialer Dysfunktion assoziiert sind [123]. In Bezug auf unsere Messergebnisse ist davon auszugehen, dass die Gaspermeabilität der Container – vor allem auch unter Berücksichtigung der hohen  $p\text{O}_2$ -Werte in allen Proben – einen sehr guten Gasaustausch über die gesamte Lagerungsdauer erlaubte. Der beobachtete pH-Abfall könnte daher das Resultat einer Akkumulation von Laktat und einer konsekutiv verminderten Pufferkapazität durch den Verbrauch von Bikarbonat sein. Hier ist insofern Kritik an unserer Methodik zu üben, als dass weder die Laktatkonzentration, noch die Bikarbonatkonzentration bestimmt wurden und somit alle Überlegungen bezüglich des metabolischen Milieus rein spekulativ sind. Vor allem in Hinblick auf die starke Korrelation zwischen pH-Wert und Laktatproduktion [60] können durch die Bestimmung der Laktatkonzentration wesentlich differenziertere Einblicke in den Energiestoffwechsel gewonnen werden. Weiterhin stellt das Ausmaß der Laktatproduktion im Plättchenkonzentrat einen prädiktiven Wert für das in vivo Überleben der Thrombozyten dar [39].

Die Glukosekonzentration zeigte über die gesamte Lagerungsdauer einen kontinuierlichen, aber moderaten Abfall, die Vorräte waren auch am letzten Analysetag mit einer mittleren Konzentration von 130 mg/dl nicht aufgebraucht. Bezüglich des Energiemetabolismus von gelagerten Thrombozyten sowie der diesbezüglichen Rolle der Glukose existieren aktuell kontroverse Meinungen und Studienergebnisse [2, 4, 100]. Während Gulliksson davon ausgeht, dass das Vorhandensein von Glukose einen wichtigen Parameter zur Aufrechterhaltung des Thrombozytenstoffwechsels während der Lagerung darstellt und signifikant zur

Plättchenqualität beiträgt [35], hebt Gyongyossy-Issa die negativen Auswirkungen, nämlich eine erhöhte Glykolyserate mit konsekutiv steigender Laktatproduktion und nachfolgender Verschlechterung der Plättchenqualität, stärker hervor [39]. Die Autorin postuliert, dass nicht eine Förderung des thrombozytären Metabolismus, sondern eine drastische Reduktion der metabolischen Aktivität durch Suppression sowohl des aeroben als auch den anaeroben Stoffwechsels das Ziel während der Lagerung darstellen sollte. Andererseits existieren Hinweise, dass eine Hochregulierung der anaeroben Glykolyse im Zuge der Lagerung von Plättchenkonzentraten nicht den Grund, sondern einen Effekt darstellt, welcher zusammen mit einer Reihe anderer Mechanismen für die komplexe Pathologie des Plättchen-Lagerungsschadens verantwortlich ist [2, 66]. Li et al. konnten weiterhin zeigen, dass eine Suppression der Glykolyse keine Verbesserung der Qualität gelagerter Thrombozyten bewirkt [66].

Thrombozyten decken ihren Energiebedarf hauptsächlich (ca. 85%) durch die oxidative Verstoffwechslung verschiedener Substrate im Zitratzyklus [36, 82]. Während Glukose nicht das primäre Substrat für den oxidativen Energiestoffwechsel zu sein scheint [60], verwerten Blutplättchen unter normoxischen Bedingungen während einer Lagerung in Blutplasma hauptsächlich freie Fettsäuren [82]. Thrombozyten nutzen die anaerobe Glykolyse unter normalen Bedingungen zwar nur in geringerem Ausmaß zur Energiegewinnung, allerdings generieren sie auch in unstimuliertem, nicht hypoxischem Zustand ein Basislevel an Laktat, welches letztendlich für den pH-Abfall während der Lagerung verantwortlich ist. Im Zuge einer Aktivierung der Thrombozyten werden sowohl die anaerobe Glykolyse, als auch der oxidative Glukosemetabolismus hochreguliert [39], woraus einerseits eine vermehrte Laktat- und andererseits eine vermehrte  $\text{CO}_2$ -Produktion resultieren. Murphy et al. postulieren, dass hohe  $\text{pO}_2$ - und niedrige  $\text{pCO}_2$ -Werte ein Versagen des oxidativen Metabolismus reflektieren [81]. Aufgrund der weiter oben erläuterten Gaspermeabilität der Lagerungscontainer kann die Messung von  $\text{pO}_2$  und  $\text{pCO}_2$  allerdings nur partiell zur Evaluierung des Ausmaßes einer aeroben Glukoseverstoffwechslung herangezogen werden. Zwar gibt es einen direkten Zusammenhang zwischen dem Anteil der oxidativen Glukoseverwertung und dem thrombozytären Sauerstoffverbrauch, nach Kilkson et al. korreliert dieser Verbrauch aber nicht mit dem  $\text{pO}_2$  [60]. Dies liegt vor allem daran, dass eine Äquilibrierung des  $\text{pO}_2$ -Wertes mit dem atmosphärischen  $\text{pO}_2$  wesentlich rascher erfolgt als die

Verminderung des  $pO_2$  durch den Sauerstoffverbrauch der Thrombozyten, sodass die  $pO_2$ -Werte im Verlauf kontinuierlich ansteigen [147]. Ein erhöhter Sauerstoffpartialdruck im Konzentrat lässt daher nicht per se auf eine verminderte Sauerstoffutilisation und eine Reduktion des oxidativen Metabolismus schließen. Aufgrund der fehlenden Korrelation von  $pO_2$  und Sauerstoffverbrauch sind lokale hypoxische Zustände im Thrombozytenkonzentrat allerdings auch nicht sicher auszuschließen. Weiterhin ist bekannt, dass der Pasteur-Effekt, also eine Stimulation der anaeroben Glykolyse unter hypoxischen Bedingungen zwar auch für Thrombozyten nachgewiesen wurde [60], dieser aber erst bei Sauerstoffpartialdrücken unter 2 mmHg relevant zum Tragen kommt [37] und somit bei der Lagerung von Thrombozytenkonzentraten in neueren Containern keine Rolle spielt.

Zusammenfassend kann man sagen, dass der Verlauf der Blutgasparameter in unseren Versuchsreihen eine gewisse Übereinstimmung mit den Ergebnissen diverser anderer Studien zeigt, welche die metabolischen Veränderungen von Thrombozytenkonzentraten im zeitlichen Verlauf analysiert haben. Der pH-Wert der Thrombozytenkonzentrate unterschritt zu keinem Zeitpunkt eine kritische Grenze, was auf eine ausreichend hohe Pufferkapazität der Trägerlösung schließen lässt. Die Veränderungen der Glukosekonzentration lassen einen stetigen Glukoseverbrauch durch die Thrombozyten annehmen, wobei dieser allerdings eher moderat einzustufen ist, da die Glukose über den gesamten Lagerungszeitraum vorhanden war und keinen drastischen Konzentrationsabfall zeigte. Insofern erscheint eine erhöhte Glykolyserate, gemessen am Ausmaß der Glukoseverstoffwechslung, unwahrscheinlich. Eine genaue Quantifizierung der anaeroben Glykolyse kann aber letztendlich nur durch die Bestimmung der Laktatproduktion erfolgen. Bezüglich der erhobenen Partialdrücke von Sauerstoff und Kohlendioxid ist von einer sehr guten Gaspermeabilität der Lagerungscontainer auszugehen, was auf eine durchweg ausreichende Sauerstoffversorgung schließen lässt. Aufgrund der fehlenden Korrelation von Sauerstoffverbrauch und  $pO_2$  sind lokale hypoxische Zustände im Plättchenkonzentrat zwar nicht auszuschließen, scheinen aber in Zusammenschau aller erhobenen Parameter nicht von erheblichem Ausmaß gewesen zu sein.

### **6.2.2 Multiplate<sup>®</sup>-Ergebnisse und Korrelation mit Blutgasparametern**

Bei der Betrachtung der Multiplate<sup>®</sup>-Ergebnisse ergaben sich in Bezug auf die Thrombozytenkonzentrate im Alter von 2 bis 4 Tagen keine signifikanten

Unterschiede (Ausnahme TRAPtest d4 vs. d3), die AUC-Werte lagen im Mittel bei 67-77 U im ASPItest und bei 59-65 U im TRAPtest. Die 5-12 Tage alten Plättchenkonzentrate zeigten bis zum 10. Lagerungstag ebenfalls stabile Aggregationsergebnisse und eine gute Stimulierbarkeit mit den Aktivatoren ASPI und TRAP. Signifikant schlechter waren die AUC-Werte für beide Tests am 12. Analysetag, hier war zudem eine große Streuung der Multiplate<sup>®</sup>-Ergebnisse zu verzeichnen. In Zusammenschau aller AUC-Werte über die gesamte Lagerungsdauer lässt sich bis zum Tag 10 eine gute Aktivierungs- und Aggregationsfähigkeit der Thrombozyten nachweisen. Da jedoch keine Tests zur Detektion einer bakteriellen Besiedelung, sondern lediglich visuelle Kontrollen der Konzentrate durchgeführt wurden, kann letztlich nur postuliert werden, dass eine verlängerte Lagerung von bis zu zehn Tagen bei Raumtemperatur und kontinuierlicher Agitation keine nachteiligen Effekte bezüglich der Thrombozytenfunktion in vitro hat. Bei der Interpretation dieser Ergebnisse muss bedacht werden, dass die zugrunde liegende Methodik darauf abzielte, die Veränderungen der Aktivierungs- und Aggregationsfähigkeit gelagerter Thrombozyten nach einer Stimulation mit verschiedenen Agonisten im zeitlichen Verlauf zu charakterisieren. Insofern sind hier primär nicht die Absolutwerte, sondern die Streuung der AUC-Werte sowie die zeitliche Kinetik von Interesse. Zur Evaluierung einer Eignung des Multiplate<sup>®</sup> im Rahmen der Qualitätskontrolle von Thrombozytenkonzentraten wäre die Bildung eigener Referenzintervalle erforderlich, was im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht erfolgt war. Aufgrund der bereits beschriebenen Unterschiede bei der Verwendung von Vollblutproben bzw. Thrombozytenkonzentraten können die Referenzwerte für Vollblut lediglich als grobe Orientierung dienen. Die Multiplate<sup>®</sup>-Ergebnisse unserer Messungen liegen jedoch in der gleichen Größenordnung wie die Aggregationswerte der Plasma-verdünnten Apherese-Konzentrate in der Studie von Jilma-Stohlawetz et al [49].

Eine Übertragung unserer Ergebnisse auf die hämostatische in vivo Funktion der gelagerten Plättchen ist ohne die Durchführung klinischer Studien zur Evaluierung der posttransfusionellen Plättchenfunktion nur eingeschränkt möglich. In vitro Parameter erlauben keine genaue Vorhersage von in vivo Resultaten wie Plättchenerholung und -überleben [47, 98, 126]. Dies kann teilweise durch die Beobachtung erklärt werden, dass sich die meisten in vitro Parameter gelagerter Thrombozyten nach der Zugabe von frischem Plasma bzw. nach Transfusion

deutlich verbessern [76].

Eine Korrelation zwischen den AUC-Werten im Multiplate<sup>®</sup> und den Ergebnissen der Blutgasanalysen wird möglicherweise deshalb erschwert, weil die Thrombozyten für die Multiplate<sup>®</sup>-Analysen mit Composol<sup>®</sup> PS verdünnt und dadurch in Analogie zu den Beobachtungen von Rinder et al. [99] aus ihrem ursprünglichen Milieu herausgenommen wurden, woraus eventuell eine „metabolic rescue“ mit konsekutiv verbesserten Aggregationswerten resultierte. Die Blutgasparameter wurden hingegen an unverdünnten Proben bestimmt, welche die zum jeweiligen Zeitpunkt vorhandenen metabolischen Bedingungen reflektieren. Weiterhin muss auch eine mögliche Abhängigkeit der Stoffwechselfparameter von der Thrombozytenzahl im Konzentrat in Betracht gezogen werden [36], die aufgrund der Einstellung einer festen Plättchenkonzentration für die Ergebnisse der Multiplate<sup>®</sup>-Analysen nicht von entscheidender Bedeutung war.

### 6.3 Schlussfolgerung

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass die multiple Impedanzaggregometrie (Multiplate<sup>®</sup>) zur Evaluierung der Veränderungen der Aktivierungs- und Aggregationsfähigkeit gelagerter Thrombozyten in Apherese-Konzentraten geeignet ist. Unter der Verwendung von Composol<sup>®</sup> PS als Verdünnungsmedium sowie der Agonisten ASPI und TRAP-6 zur Plättchenaktivierung lassen sich für eine Thrombozytenkonzentration von 400000/ $\mu$ l stabile und im zeitlichen Verlauf reproduzierbare Messergebnisse erzielen. Eine Lagerung von bis zu 10 Tagen bei Raumtemperatur führte im Multiplate<sup>®</sup> zu keiner signifikanten Verschlechterung der Plättchenaggregation. In Bezug auf den Verlauf der erhobenen Blutgasparameter zeigten alle Thrombozytenkonzentrate bis zum letzten Lagerungstag akzeptable Werte, was auf eine ausreichende Sauerstoffversorgung und eine Aufrechterhaltung des oxidativen Metabolismus schließen lässt.

Aufgrund methodischer Einschränkungen und der geringen Korrelation von in vitro Methoden und klinischem Outcome kann anhand dieser Resultate kein sicherer Rückschluss auf andere in vitro Parameter und vor allem auf das in vivo Verhalten der Thrombozyten gezogen werden. Die Übertragung der vorliegenden in vitro Ergebnisse auf die in vivo Funktionalität der Thrombozyten sollte daher in weiteren Studien überprüft werden.

## 7. Literaturverzeichnis

- 1 Aliberti G, Proietta M, Pulignano I, Tritapepe L, Di Giovanni C, Schiappoli A, Vercillo G (2002) The lungs and platelet production. *Clinical & Laboratory Haematology* **24**: 161-164
- 2 Amorini AM, Tuttobene M, Tomasello FM, Biazzo F, Gullotta S, De Pinto V, Lazzarino G, Tavazzi B (2013) Glucose ameliorates the metabolic profile and mitochondrial function of platelet concentrates during storage in autologous plasma. *Blood Transfusion* **11**: 61-70
- 3 Arbeitskreis Blut (2008) Ergänzung zum Votum 38: Reduktion des Septikämierisikos bei der Anwendung von Thrombozytenkonzentraten
- 4 Badlou BA, Van Der Meer PF, Akkerman JWN, Smid WM, Pietersz RNI (2007) Metabolic energy reduction by glucose deprivation and low gas exchange preserves platelet function after 48 h storage at 4 °C. *Vox sanguinis* **92**: 311-318
- 5 Bauer A (2004) Von der Blutübertragung zur Hämotherapie –Das Jubiläum der DGTI in medizinhistorischer und bioethischer Perspektive. *Transfusion Medicine and Hemotherapy* **31**: 414-419
- 6 Bayraktaroglu Z, Yilmaz N, Cicek HK, Karafak A, Gul E (2007) Platelet storage time and cytokine (IL-2R, IL-8, TNF-alpha) levels. *Eastern Mediterranean Health Journal* **13**: 79-84
- 7 Bellucci S, Devergie A, Gluckman E, Tobelem G, Lethielleux P, Benbunan M, Schaison G, Boiron M (1985) Complete correction of Glanzmann's thrombasthenia by allogeneic bone-marrow transplantation. *British Journal of Haematology* **59**: 635-641
- 8 Benedum J (2004) Geschichte der Bluttransfusion. In: Mueller-Eckhardt C, Kiefel V (eds) *Transfusionsmedizin*. 3. Auflage (2004) Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, pp 4-16
- 9 Bertolini F, Murphy S, Biomedical Excellence for Safer Transfusion Working Party of the International Society of Blood T (1996) A multicenter inspection of the swirling phenomenon in platelet concentrates prepared in routine practice. *Transfusion* **36**: 128-132
- 10 Boccardo P, Remuzzi G, Galbusera M (2004) Platelet Dysfunction in Renal Failure. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* **30**: 579-589

- 11 Bochsén L, Johansson PI, Kristensen AT, Daugaard G, Ostrowski SR (2011) The influence of platelets, plasma and red blood cells on functional haemostatic assays. *Blood coagulation & fibrinolysis : An International Journal in Haemostasis and Thrombosis* **22**: 167-175
- 12 Born GVR (1962) Aggregation of Blood Platelets by Adenosine Diphosphate and its Reversal. *Nature* **194**: 927-929
- 13 Braunwald E, Angiolillo D, Bates E, Berger PB, Bhatt D, Cannon CP, Furman MI, Gurbel P, Michelson AD, Peterson E, Wiviott S (2008) Assessing the Current Role of Platelet Function Testing. *Clinical Cardiology* **31**: I10-I16
- 14 Bundesärztekammer (2008) Querschnitts-Leitlinien (BÄK) zur Therapie mit Blutkomponenten und Plasmaderivaten. 4. Auflage 2008
- 15 Bundesärztekammer (2010) Richtlinien zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten (Hämotherapie) gemäß §§ 12a u. 18 Transfusionsgesetz. Zweite Richtlinienanpassung 2010
- 16 Burger R, Offergeld R (2008) Festlegung der Haltbarkeitsfrist von Thrombozytenkonzentraten mit dem Ziel der Reduktion lebensbedrohlicher septischer Transfusionsreaktionen durch bakterielle Kontamination. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz* **51**: 1484-1484
- 17 Burgert P, Klüter H (2010) Das thrombozytäre Transkriptom. In: Pötzsch B, Madlener K (eds) *Hämostaseologie*. 2.Auflage (2010) Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, p 44
- 18 Butler C, Doree C, Estcourt LJ, Trivella M, Hopewell S, Brunskill SJ, Stanworth S, Murphy MF (2013) Pathogen-reduced platelets for the prevention of bleeding. *Cochrane Database of Systematic Reviews* **3**: DOI: 10.1002/14651858.CD009072.pub2
- 19 Cardinal DC, Flower RJ (1980) The electronic aggregometer: A novel device for assessing platelet behavior in blood. *Journal of Pharmacological Methods* **3**: 135-158
- 20 Coppola A, Di Minno G (2008) Desmopressin in inherited disorders of platelet function. *Haemophilia* **14**: 31-39
- 21 Devine DV, Serrano K (2010) The platelet storage lesion. *Clinics in Laboratory Medicine* **30**: 475-487

- 22 DiMichele DM, Hathaway WE (1990) Use of DDAVP in inherited and acquired platelet dysfunction. *American Journal of Hematology* **33**: 39-45
- 23 Dumont LJ, VandenBroeke T (2003) Seven-day storage of apheresis platelets: report of an in vitro study. *Transfusion* **43**: 143-150
- 24 Favaloro EJ (2008) Clinical Utility of the PFA-100. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* **34**: 709-733
- 25 Franchini M (2005) The platelet-function analyzer (PFA-100<sup>®</sup>) for evaluating primary hemostasis. *Hematology* **10**: 177-181
- 26 Franchini M, Lippi G, Guidi GC (2008) The use of recombinant activated factor VII in platelet-associated bleeding. *Hematology* **13**: 41-45
- 27 Freireich EJ, Schmidt PJ, Schneiderman MA, Frei E (1959) A Comparative Study of the Effect of Transfusion of Fresh and Preserved Whole Blood on Bleeding in Patients with Acute Leukemia. *New England Journal of Medicine* **260**: 6-11
- 28 Freireich EJ (2000) Supportive care for patients with blood disorders. *British Journal of Haematology* **111**: 68-77
- 29 Gaydos LA, Freireich EJ, Mantel N (1962) The Quantitative Relation between Platelet Count and Hemorrhage in Patients with Acute Leukemia. *New England Journal of Medicine* **266**: 905-909
- 30 Glas M, Mauer D, Brun K, Volk T, Kreuer S (2013) [Introduction into "Point-of-Care" testing: indications and limitations]. *Anästhesiologie Intensivmedizin Notfallmedizin Schmerztherapie* **48**: 324-334
- 31 Goodrich RP, Li J, Pieters H, Crookes R, Roodt J, Heyns AdP (2006) Correlation of in vitro platelet quality measurements with in vivo platelet viability in human subjects. *Vox sanguinis* **90**: 279-285
- 32 Görlinger K, Jambor C, Dirkmann D, Dusse F, Hanke A, Adamzik M, Hartmann M, Philipp S, Weber A-A, Rahe-Meyer N (2008) Messung der Thrombozytenfunktion mit Point-of-Care-Methoden. *Herz Kardiovaskuläre Erkrankungen* **33**: 297-305

- 33 Greinacher A, Kiefel V, Klüter H, Kroll H, Pötzsch B, Riess H (2006) Empfehlungen zur Thrombozytentransfusion der Thrombozyten-Arbeitsgruppe der DGTI, GTH und DGHO. *Transfusion Medicine and Hemotherapy* **33**: 528-543
- 34 Gulliksson H, AuBuchon JP, Vesterinen M, Sandgren P, Larsson S, Pickard CA, Herschel I, Roger J, Tracy JE, Langweiler M (2002) Storage of platelets in additive solutions: a pilot in vitro study of the effects of potassium and magnesium. *Vox sanguinis* **82**: 131-136
- 35 Gulliksson H (2003) Defining the optimal storage conditions for the long-term storage of platelets. *Transfusion Medicine Reviews* **17**: 209-215
- 36 Gulliksson H, Sandgren P, Sjodin A, Hultenby K (2012) Storage of platelets: effects associated with high platelet content in platelet storage containers. *Blood Transfusion* **10**: 205-212
- 37 Guppy M, Abas L, Arthur PG, Whisson ME (1995) The Pasteur effect in human platelets: implications for storage and metabolic control. *British Journal of Haematology* **91**: 752-757
- 38 Gyongyossy-Issa MIC, Zhang JG, Culibrk B, Hunter F, Levin E, Scammell K, Weiss S, Holmes DL, Holme S (2009) Novel system for storage of buffy-coat-derived platelet concentrates in a glucose-based platelet additive solution: parameters and metabolism during storage and comparison to plasma. *Vox sanguinis* **97**: 102-109
- 39 Gyongyossy-Issa MIC (2011) Glucose in platelet additive solutions: To add or not to add? *Transfusion and Apheresis Science* **44**: 283-295
- 40 Halperin D, Reber G (2007) Influence of antidepressants on hemostasis. *Dialogues in Clinical Neuroscience* **9**: 47-59
- 41 Hanke AA, Roberg K, Monaca E, Sellmann T, Weber CF, Rahe-Meyer N, Gorlinger K (2010) Impact of platelet count on results obtained from multiple electrode platelet aggregometry (Multiplate). *European Journal of Medical Research* **15**: 214-219
- 42 Hartert H (1948) Blutgerinnungsstudien mit der Thrombelastographie, einem neuen Untersuchungsverfahren. *Klinische Wochenschrift* **26**: 577-583
- 43 Henseler O, Heiden M, Haschberger B, Hesse J, Seitz R (2010) Report on Notifications Pursuant to §21 German Transfusion Act for 2007. *Transfusion Medicine and Hemotherapy* **37**: 29-47

- 44 Hoffman M, Monroe DM (2001) A Cell-based Model of Hemostasis. *Thrombosis and Haemostasis* **85**: 958-965
- 45 Hoffmann A, Markwardt F (1984) Inhibition of the thrombin-platelet reaction by hirudin. *Haemostasis* **14**: 164-169
- 46 Holme S, Sawyer S, Heaton A, Sweeney JD (1997) Studies on platelets exposed to or stored at temperatures below 20°C or above 24°C. *Transfusion* **37**: 5-11
- 47 Holme S (1998) Storage and Quality Assessment of Platelets. *Vox sanguinis* **74**: 207-216
- 48 Hunter S, Nixon J, Murphy S (2001) The effect of the interruption of agitation on platelet quality during storage for transfusion. *Transfusion* **41**: 809-814
- 49 Jilma-Stohlawetz P, Eichelberger B, Horvath M, Jilma B, Panzer S (2009) In vitro platelet function of platelet concentrates prepared using three different apheresis devices determined by impedance and optical aggregometry. *Transfusion* **49**: 1564-1568
- 50 Jurk K, Kehrel BE (2005) Platelets: physiology and biochemistry. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* **31**: 381-392
- 51 Jurk K, Kehrel BE (2005) Platelets and the new comprehension of haemostasis. *Hämostaseologie* **25**: 39-49
- 52 Jurk K, Kehrel BE (2008) Die Rolle von Thrombozyten bei Hämostase, Thrombose, Immunabwehr und Entzündung. *Deutsche Medizinische Wochenschrift* **133**: 1130-1135
- 53 Jurk K, Kehrel BE (2010) Pathophysiologie und Biochemie der Thrombozyten. *Der Internist* **51**: 1086-1094
- 54 Kaiser AF, Neubauer H, Franken CC, Kruger JC, Mugge A, Meves SH (2012) Which is the best anticoagulant for whole blood aggregometry platelet function testing? Comparison of six anticoagulants and diverse storage conditions. *Platelets* **23**: 359-367
- 55 Kalb ML, Potura L, Scharbert G, Kozek-Langenecker SA (2009) The effect of ex vivo anticoagulants on whole blood platelet aggregation. *Platelets* **20**: 7-11

- 56 Kaplan K, Owen J (1981) Plasma levels of beta-thromboglobulin and platelet factor 4 as indices of platelet activation in vivo. *Blood* **57**: 199-202
- 57 Kestin A, Valeri C, Khuri S, Loscalzo J, Ellis P, MacGregor H, Birjiniuk V, Ouimet H, Pasche B, Nelson M (1993) The platelet function defect of cardiopulmonary bypass. *Blood* **82**: 107-117
- 58 Keuren JFW, Cauwenberghs S, Heeremans J, De Kort W, Heemskerk JWM, Curvers J (2006) Platelet ADP response deteriorates in synthetic storage media. *Transfusion* **46**: 204-212
- 59 Kieffer N, Guichard J, Farcet J-P, Vainchenker W, Breton-Gorius J (1987) Biosynthesis of major platelet proteins in human blood platelets. *European Journal of Biochemistry* **164**: 189-195
- 60 Kilkson H, Holme S, Murphy S (1984) Platelet metabolism during storage of platelet concentrates at 22 degrees C. *Blood* **64**: 406-414
- 61 Koscielny J, Ziemer S, Radtke H, Schmutzler M, Kiesewetter H, Salama A, von Tempelhoff GF (2007) Präoperative Identifikation von Patienten mit (primären) Hämostasesstörungen - Ein praktisches Konzept. *Hämostaseologie* **27**: 177-184
- 62 Kulkarni S, Dopheide SM, Yap CL, Ravanat C, Freund M, Mangin P, Heel KA, Street A, Harper IS, Lanza F, Jackson SP (2000) A revised model of platelet aggregation. *The Journal of Clinical Investigation* **105**: 783-791
- 63 Lang T, von Depka M (2006) Diagnostische Möglichkeiten und Grenzen der Thrombelastometrie/-graphie. *Hämostaseologie* **26**: 20-29
- 64 Levine RF, Eldor A, Shoff PK, Kirwin S, Tenza D, Cramer EM (1993) Circulating megakaryocytes: delivery of large numbers of intact, mature megakaryocytes to the lungs. *European Journal of Haematology* **51**: 233-246
- 65 Li J, Xia Y, Bertino AM, Coburn JP, Kuter DJ (2000) The mechanism of apoptosis in human platelets during storage. *Transfusion* **40**: 1320-1329
- 66 Li J, Goodrich L, Hansen E, Edrich R, Gampp D, Goodrich RP (2005) Platelet glycolytic flux increases stimulated by ultraviolet-induced stress is not the direct cause of platelet morphology and activation changes: possible implications for the role of glucose in platelet storage. *Transfusion* **45**: 1750-1758

- 67 Lisman T, Leebeek FWG (2007) Hemostatic Alterations in Liver Disease: A Review on Pathophysiology, Clinical Consequences, and Treatment. *Digestive Surgery* **24**: 250-258
- 68 Livio M, Mannucci PM, Viganò G, Mingardi G, Lombardi R, Mecca G, Remuzzi G (1986) Conjugated Estrogens for the Management of Bleeding Associated with Renal Failure. *New England Journal of Medicine* **315**: 731-735
- 69 López JA, Andrews RK, Afshar-Kharghan V, Berndt MC (1998) Bernard-Soulier Syndrome. *Blood* **91**: 4397-4418
- 70 Mani H, Wolf Z, Lindhoff-Last E (2010) Fortschritte in der Thrombozytenfunktionsdiagnostik. *Hämostaseologie* **30**: 217-229
- 71 Mannucci PM, Remuzzi G, Pusineri F, Lombardi R, Valsecchi C, Mecca G, Zimmerman TS (1983) Deamino-8-D-Arginine Vasopressin Shortens the Bleeding Time in Uremia. *New England Journal of Medicine* **308**: 8-12
- 72 Mannucci PM, Tripodi A (2012) Hemostatic defects in liver and renal dysfunction. *American Society of Hematology Education Program Book* **2012**: 168-173
- 73 Masliah-Planchon J, Darnige L, Bellucci S (2013) Molecular determinants of platelet delta storage pool deficiencies: an update. *British Journal of Haematology* **160**: 5-11
- 74 Mathai J, Resmi KR, Sulochana PV, Sathyabhama S, Baby saritha G, Krishnan LK (2006) Suitability of measurement of swirling as a marker of platelet shape change in concentrates stored for transfusion. *Platelets* **17**: 393-396
- 75 Michelson AD, Frelinger Iii AL, Furman MI (2006) Current Options in Platelet Function Testing. *The American Journal of Cardiology* **98**: 4-10
- 76 Miyaji R, Sakai M, Urano H, Nakata K, Sakamoto H, Shirahata A (2004) Decreased platelet aggregation of platelet concentrate during storage recovers in the body after transfusion. *Transfusion* **44**: 891-899
- 77 Morgenstern E (2010) Thrombozytenmorphologie. In: Pötzsch B, Madlener K (eds): *Hämostaseologie*. 2.Auflage (2010) Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, p 20

- 78 Müller M, Kläffling C, Lindoff-Last E, Großmann R, Seifried E, Geisen C (2007) Hämorrhagische Diathesen - Eine Übersicht. *hämotherapie* **9**: 13-31
- 79 Murphy S, Gardner FH (1969) Platelet Preservation— Effect of Storage Temperature on Maintenance of Platelet Viability —Deleterious Effect of Refrigerated Storage. *New England Journal of Medicine* **280**: 1094-1098
- 80 Murphy S, Gardner F (1975) Platelet storage at 22 degrees C: role of gas transport across plastic containers in maintenance of viability. *Blood* **46**: 209-218
- 81 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. *Transfusion Medicine Reviews* **8**: 29-36
- 82 Murphy S (1995) The oxidation of exogenously added organic anions by platelets facilitates maintenance of pH during their storage for transfusion at 22 degrees C. *Blood* **85**: 1929-1935
- 83 Nair S, Ghosh K, Kulkarni B, Shetty S, Mohanty D (2002) Glanzmann's thrombasthenia: updated. *Platelets* **13**: 387-393
- 84 Nurden AT, Nurden P (2007) The gray platelet syndrome: Clinical spectrum of the disease. *Blood Reviews* **21**: 21-36
- 85 O'Brien JR, Shoobridge SM, Finch WJ (1969) Comparison of the effect of heparin and citrate on platelet aggregation. *Journal of Clinical Pathology* **22**: 28-31
- 86 Offermanns S (2006) Activation of Platelet Function Through G Protein-Coupled Receptors. *Circulation Research* **99**: 1293-1304
- 87 Paparella D, Brister SJ, Buchanan MR (2004) Coagulation disorders of cardiopulmonary bypass: a review. *Intensive Care Medicine* **30**: 1873-1881
- 88 Patel SR, Hartwig JH, Italiano JE, Jr. (2005) The biogenesis of platelets from megakaryocyte proplatelets. *The Journal of Clinical Investigation* **115**: 3348-3354
- 89 Perrotta PL, Perrotta CL, Snyder EL (2003) Apoptotic activity in stored human platelets. *Transfusion* **43**: 526-535

- 90 Pötzsch B, Madlener K, (eds) (2010) Hämostaseologie. 2.Auflage (2010) Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York
- 91 Rahe-Meyer N, Winterhalter M, Hartmann J, Pattison A, Hecker H, Calatzis A, Solomon C (2008) An evaluation of cyclooxygenase-1 inhibition before coronary artery surgery: aggregometry versus patient self-reporting. *Anesthesia and Analgesia* **107**: 1791-1797
- 92 Rahe-Meyer N, Winterhalter M, Boden A, Froemke C, Piepenbrock S, Calatzis A, Solomon C (2009) Platelet concentrates transfusion in cardiac surgery and platelet function assessment by multiple electrode aggregometry. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica* **53**: 168-175
- 93 Rand ML, Leung R, Packham MA (2003) Platelet function assays. *Transfusion and Apheresis Science* **28**: 307-317
- 94 Ravn HB, Kristensen SD, Vissinger H, Husted SE (1996) Magnesium inhibits human platelets. *Blood Coagulation & Fibrinolysis* **7**: 241-244
- 95 Rechner AR (2011) Platelet function testing in clinical diagnostics. *Hämostaseologie* **31**: 79-87
- 96 Riess H, Braun G, Brehm G, Hiller E (1986) Critical evaluation of platelet aggregation in whole human blood. *American Journal of Clinical Pathology* **85**: 50-56
- 97 Rinder CS, Bohnert J, Rinder HM, Mitchell J, Ault K, Hillman R (1991) Platelet activation and aggregation during cardiopulmonary bypass. *Anesthesiology* **75**: 388-393
- 98 Rinder HM, Smith BR (2003) In vitro evaluation of stored platelets: Is there hope for predicting posttransfusion platelet survival and function? *Transfusion* **43**: 2-6
- 99 Rinder HM, Snyder EL, Tracey JB, Dincecco D, Wang C, Baril L, Rinder CS, Smith BR (2003) Reversibility of severe metabolic stress in stored platelets after in vitro plasma rescue or in vivo transfusion: restoration of secretory function and maintenance of platelet survival. *Transfusion* **43**: 1230-1237
- 100 Ringwald J, Zimmermann R, Eckstein R (2006) The New Generation of Platelet Additive Solution for Storage at 22°C: Development and Current Experience. *Transfusion Medicine Reviews* **20**: 158-164

- 101 Roberts HR, Hoffman M, Monroe DM (2006) A Cell-Based Model of Thrombin Generation. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* **32**: 32-38
- 102 Rock G, Neurath D, Cober N, Freedman M, Leduc M, Nelson E, Lu M (2003) Seven-day storage of random donor PLT concentrates. *Transfusion* **43**: 1374-1377
- 103 Rodgers RPC, Levin J (1990) A Critical Reappraisal of the Bleeding Time. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* **16**: 1-20
- 104 Rubak P, Villadsen K, Hvas AM (2012) Reference intervals for platelet aggregation assessed by multiple electrode platelet aggregometry. *Thrombosis Research* **130**: 420-423
- 105 Ruggeri ZM (2004) Platelet and von Willebrand factor interactions at the vessel wall. *Hämostaseologie* **24**: 1-11
- 106 Ruggeri ZM, Mendolicchio GL (2007) Adhesion mechanisms in platelet function. *Circulation Research* **100**: 1673-1685
- 107 Rump G, Braun R, Jahn UR, Krakowitzky P, Sibrowski W, (eds) (2003) *Transfusionsmedizin compact*. 1. Auflage (2004) Georg Thieme Verlag Stuttgart, pp 2-5
- 108 Scharf R, Riess H, (eds) (2005) Angeborene und erworbene Thrombozytenfunktionsstörungen. In: Steinbeck G, Paumgartner G (eds): *Therapie innerer Krankheiten*. 11. Auflage (2005) Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, pp 1224-1234
- 109 Scharf RE (2008) Erworbene Plättchenfunktionsstörungen - Pathogenese, Klassifikation, Häufigkeit, Diagnostik und Behandlung. *Hämostaseologie* **28**: 299-311
- 110 Scharf RE (2012) Drugs that Affect Platelet Function. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* **38**: 865-883
- 111 Schmitz G, Rothe G, Ruf A, Barlage S, Tschöpe D, Clemetson KJ, Goodall AH, Michelson AD, Nurden AT, Vincent Shankey T, Cell ftEWGoC (1998) European Working Group on Clinical Cell Analysis: Consensus Protocol for the Flow Cytometric Characterisation of Platelet Function. *Thrombosis and Haemostasis* **79**: 885-896

- 112 Schrezenmeier H, Müller M, Seifried E (2010) Thrombozyten-Transfusionen: Aktuelle Aspekte und Kommentar zu Kapitel 2 „Thrombozytenkonzentrate“ der Querschnitts-Leitlinien zur Therapie mit Blutkomponenten und Plasmaderivaten der Bundesärztekammer 2008. *hämotherapie* **14**: 16-23
- 113 Schrezenmeier H, Seifried E (2010) Buffy-coat-derived pooled platelet concentrates and apheresis platelet concentrates: which product type should be preferred? *Vox sanguinis* **99**: 1-15
- 114 Schwertz H, Tolley ND, Foulks JM, Denis MM, Risenmay BW, Buerke M, Tilley RE, Rondina MT, Harris EM, Kraiss LW, Mackman N, Zimmerman GA, Weyrich AS (2006) Signal-dependent splicing of tissue factor pre-mRNA modulates the thrombogenicity of human platelets. *The Journal of Experimental Medicine* **203**: 2433-2440
- 115 Seghatchian J, Krailadsiri P (1997) The platelet storage lesion. *Transfusion Medicine Reviews* **11**: 130-144
- 116 Seghatchian J, Krailadsiri P (2001) Platelet storage lesion and apoptosis: are they related? *Transfusion and Apheresis Science* **24**: 103-105
- 117 Seyfert UT, Haubelt H, Vogt A, Hellstern P (2007) Variables influencing Multiplate™ whole blood impedance platelet aggregometry and turbidimetric platelet aggregation in healthy individuals. *Platelets* **18**: 199-206
- 118 Shenkman B, Einav Y, Salomon O, Varon D, Savion N (2008) Testing agonist-induced platelet aggregation by the Impact-R [Cone and plate(let) analyzer (CPA)]. *Platelets* **19**: 440-446
- 119 Shrivastava M (2009) The platelet storage lesion. *Transfusion and Apheresis Science* **41**: 105-113
- 120 Sibbing D, Braun S, Morath T, Mehilli J, Vogt W, Schömig A, Kastrati A, von Beckerath N (2009) Platelet Reactivity After Clopidogrel Treatment Assessed With Point-of-Care Analysis and Early Drug-Eluting Stent Thrombosis. *Journal of the American College of Cardiology* **53**: 849-856
- 121 Simon D, Kunicki T, Nugent D (2008) Platelet function defects. *Haemophilia* **14**: 1240-1249
- 122 Skripchenko A, Myrup A, Thompson-Montgomery D, Awatefe H, Moroff G, Wagner SJ (2010) Periods without agitation diminish platelet mitochondrial function during storage. *Transfusion* **50**: 390-399

- 123 Skripchenko A, Myrup A, Thompson-Montgomery D, Awatefe H, Wagner SJ (2011) Mitochondrial dysfunction of platelets stored in first- and second-generation containers is, in part, associated with elevated carbon dioxide levels. *Transfusion* **51**: 371-379
- 124 Slichter Sherrill J, Bolgiano D, Jones MK, Christoffel T, Corson J, Rose L, Foley J, Popovsky M, Baril Laurene L, Corda T, Dincecco Dorothy M, Snyder Edward L (2006) Viability and function of 8-day-stored apheresis platelets. *Transfusion* **46**: 1763-1769
- 125 Slichter SJ (2007) Platelet Transfusion Therapy. *Hematology/Oncology Clinics of North America* **21**: 697-729
- 126 Slichter SJ, Bolgiano D, Corson J, Jones MK, Christoffel T, Pellham E (2013) Extended storage of autologous apheresis platelets in plasma. *Vox sanguinis* **104**: 324-330
- 127 Solomon C, Winterhalter M, Gilde I, Hoy L, Calatzis A, Rahe-Meyer N (2008) Influence of the sample anticoagulant on the measurements of impedance aggregometry in cardiac surgery. *Medical Devices (Auckland)* **1**: 23-30
- 128 Spiess BD (2010) Platelet transfusions: the science behind safety, risks and appropriate applications. *Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology* **24**: 65-83
- 129 Stafford NP, Pink AE, White AE, Glenn JR, Heptinstall S (2003) Mechanisms Involved in Adenosine Triphosphate-Induced Platelet Aggregation in Whole Blood. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **23**: 1928-1933
- 130 Steinhubl SR, Talley JD, Braden GA, Tcheng JE, Casterella PJ, Moliterno DJ, Navetta FI, Berger PB, Popma JJ, Dangas G, Gallo R, Sane DC, Saucedo JF, Jia G, Lincoff AM, Theroux P, Holmes DR, Teirstein PS, Kereiakes DJ (2001) Point-of-Care Measured Platelet Inhibition Correlates With a Reduced Risk of an Adverse Cardiac Event After Percutaneous Coronary Intervention: Results of the GOLD (AU-Assessing Ultegra) Multicenter Study. *Circulation* **103**: 2572-2578
- 131 Stissing T, Dridi NP, Ostrowski SR, Bochsén L, Johansson PI (2011) The Influence of Low Platelet Count on Whole Blood Aggregometry Assessed by Multiplate. *Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis* **17**: E211-E217
- 132 Sysmex (01/2010) Thrombozytenverteilungskurven: Interpretationen, Möglichkeiten und Grenzen. Sysmex Xtra

- 133 Tocantins LM (1948) Historical notes on blood platelets. *Blood* **3**: 1073-1082
- 134 Toth O, Calatzis A, Penz S, Losonczy H, Siess W (2006) Multiple electrode aggregometry: a new device to measure platelet aggregation in whole blood. *Thrombosis and Haemostasis* **96**: 781-788
- 135 Vallés J, Santos MT, Aznar J, Martínez M, Moscardó A, Piñón M, Broekman MJ, Marcus AJ (2002) Platelet-erythrocyte interactions enhance  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  integrin receptor activation and P-selectin expression during platelet recruitment: down-regulation by aspirin ex vivo. *Blood* **99**: 3978-3984
- 136 Van Der Meer PF, Pietersz RNI, Reesink HW (2004) Storage of platelets in additive solution for up to 12 days with maintenance of good in-vitro quality. *Transfusion* **44**: 1204-1211
- 137 Van Der Meer PF, Gulliksson H, AuBuchon JP, Prowse C, Richter E, De Wildt-Eggen J, for the Biomedical Excellence for Safer Transfusion C (2005) Interruption of agitation of platelet concentrates: effects on in vitro parameters. *Vox sanguinis* **88**: 227-234
- 138 van der Meer PF, Liefiting LA, Pietersz RN (2007) The effect of interruption of agitation on in vitro measures of platelet concentrates in additive solution. *Transfusion* **47**: 955-959
- 139 van der Meer PF, de Korte D (2011) Platelet preservation: Agitation and containers. *Transfusion and Apheresis Science* **44**: 297-304
- 140 van Werkum JW, Bouman HJ, Breet NJ, ten Berg JM, Hackeng CM (2010) The Cone-and-Plate(let) analyzer is not suitable to monitor clopidogrel therapy: A comparison with the flowcytometric VASP assay and optical aggregometry. *Thrombosis Research* **126**: 44-49
- 141 Wada H, Usui M, Sakuragawa N (2008) Hemostatic abnormalities and liver diseases. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* **34**: 772-778
- 142 Wallén NH, Ladjevardi M, Albert J, Bröijersén A (1997) Influence of Different Anticoagulants on Platelet Aggregation in Whole Blood; A Comparison between Citrate, Low Molecular Mass Heparin and Hirudin. *Thrombosis Research* **87**: 151-157

- 
- 143 Weber CF, Dietrich W, Spannagl M, Hofstetter C, Jámbor C (2010) A Point-of-Care Assessment of the Effects of Desmopressin on Impaired Platelet Function Using Multiple Electrode Whole-Blood Aggregometry in Patients After Cardiac Surgery. *Anesthesia & Analgesia* **110**: 702-707
- 144 White JG (2007) Platelet structure. In: Michelson, AD (ed) *Platelets* (2nd edition). Academic Press, Burlington, pp 45-73
- 145 Würtz M, Hvas A-M, Kristensen SD, Grove EL (2012) Platelet aggregation is dependent on platelet count in patients with coronary artery disease. *Thrombosis Research* **129**: 56-61
- 146 [www.roche-multiplate.com](http://www.roche-multiplate.com)
- 147 Zhang JG, Carter CJ, Culibrk B, Devine DV, Levin E, Scammell K, Weiss S, Gyongyossy-Issa MIC (2008) Buffy-coat platelet variables and metabolism during storage in additive solutions or plasma. *Transfusion* **48**: 847-856

## **8. Publikationen**

Teile der vorliegenden Arbeit wurden veröffentlicht in:

Bauer J, Glas M, Kreuer S, Volk T (DIVI 2012) Abstract: A-479-0010-00165,  
Poster: P/05/08

Glas M, Bauer J, Schneider SO, Volk T, Kreuer S (ISTH 2013) Abstract: 1592,  
e-Poster: PO 315

## 9. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei all denjenigen bedanken, die mich während der gesamten Zeit meines Studiums auf unterschiedliche Weise unterstützt und gefördert haben und ohne deren Hilfe die Durchführung dieser Promotionsarbeit nicht möglich gewesen wäre.

Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Thomas Volk, dem Direktor der Klinik für Anästhesiologie, Intensivmedizin und Schmerztherapie am Universitätsklinikum des Saarlandes, danke ich für die Möglichkeit, die Promotion in seiner Klinik durchzuführen sowie für die stetige Diskussionsbereitschaft und Hilfestellung während allen Phasen dieser Arbeit.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Betreuer Herrn Dr. med. Michael Glas. Durch seine herausragende fachliche und menschliche Kompetenz gelang es ihm, mich auch in schwierigen Phasen immer wieder zu motivieren und meine Zweifel zu schmälern. Vielen Dank für die vielen Stunden der Diskussion, die zügige und sorgfältige Korrektur der Arbeit und das mir entgegen gebrachte Vertrauen und Verständnis.

Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Hermann Eichler, dem Leiter des Instituts für Klinische Hämostaseologie und Transfusionsmedizin am Universitätsklinikum des Saarlandes, danke ich für die Bereitstellung der Thrombozytenkonzentrate und die Möglichkeit zur Nutzung der Räumlichkeiten.

Vielen Dank auch an Frau Angelika Kojek für die kompetente Hilfestellung und die wohlwollende Unterstützung meiner Versuche.

Dem gesamten Team des Zentrallabors unter der Leitung von Prof. Dr. med. Jürgen Geisel danke ich für die Bereitstellung der Geräte und die angenehme Zusammenarbeit.

Ein großes Dankeschön gilt Frau Beate Wolf. Ihre verständnisvolle Art und ihre Unterstützung in allen Phasen dieser Arbeit waren mir eine große Hilfe.

Auf diesem Wege möchte ich mich ganz herzlich bei meinen lieben Eltern bedanken. Durch ihren uneingeschränkten Rückhalt und nicht zuletzt durch ihre finanzielle Unterstützung wurde mir die Durchführung meines Studiums und dieser Promotionsarbeit überhaupt erst ermöglicht.

## 10. Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name: Bauer  
Vorname: Janine Viola  
Anschrift: Storchenstraße 31, 66424 Homburg  
Geburtsdatum: 10.10.1987  
Geburtsort: Neustadt/Weinstraße  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Familie: Vater: Harald Bauer, Förderschulrektor  
Mutter: Renate Bauer, Oberstudienrätin  
Geschwister: Dr. med. Nicola Bauer, Assistenzärztin

### Schulischer Werdegang

1994 – 1998 Grundschule Dr. Albert-Finck-Schule in Neustadt-Hambach  
1998 – 2007 Kurfürst-Ruprecht-Gymnasium in Neustadt/Weinstraße  
03/2007 Erwerb der allgemeinen Hochschulreife am Kurfürst-Ruprecht-Gymnasium in Neustadt/Weinstraße (Gesamtnote 1,5)

### Studentische Laufbahn

10/2007 – 12/2013 Studium der Humanmedizin an der Universität des Saarlandes, medizinische Fakultät Homburg  
08/2009 Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung (Gesamtnote gut)  
08/2012 – 12/2012 Wahlfach Anästhesiologie, Intensivmedizin und Schmerztherapie am Universitätsklinikum des Saarlandes  
12/2012 – 04/2013 Tertian Chirurgie am Universitätsklinikum des Saarlandes  
04/2013 – 08/2013 Tertian Innere Medizin am Universitätsklinikum des Saarlandes  
11/2013 Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung (Gesamtnote sehr gut)  
12/2013 Approbation als Ärztin

### Berufliche Laufbahn

Seit 03/2014 Assistenzärztin in der Klinik für Anästhesiologie, Intensivmedizin und Schmerztherapie (Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. T. Volk)