

Aus der Abteilung für Transfusionsmedizin und Transplantationsimmunologie  
der Chirurgischen Klinik und Poliklinik des  
Universitäts-Krankenhauses Eppendorf Hamburg  
Direktor: Prof. Dr. med. P. Kühnl

**Durchflußzytometrische Untersuchung der  
Veränderung thrombozytärer und leukozytärer Antigene  
im Verlauf der Thrombozytapherese**

D i s s e r t a t i o n  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

dem Fachbereich Medizin  
der Universität Hamburg vorgelegt von

**MANUELA MÄRZ**

aus  
Hamburg

Hamburg  
2000

Angenommen von dem Fachbereich der Medizin  
der Universität Hamburg am : 24. Oktober 2000

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin  
der Universität Hamburg

Sprecher: Prof. Dr. H.-P Leichtweiß

Referent: Prof. Dr. P. Kühnl

Korreferenten: -----

## Für meine Eltern

Wenn du willst, daß Menschen ein Schiff bauen,  
gib ihnen nicht einen Plan oder Hammer und Nägel,  
sondern entzünde in ihnen die Sehnsucht nach dem  
weiten offenen Meer.

Antoine de Saint-Exupéry

## Inhaltsverzeichnis

	<u>Abkürzungsverzeichnis</u> .....	6
1.	<u>Einleitung</u> .....	8
1.1	Einfluß der Thrombozytapherese auf die Biokompatibilität.....	8
1.2	Ziele der Studie.....	9
1.3.	Struktur und Funktion von Thrombozyten.....	9
1.4	Struktur und Funktion von neutrophilen Granulozyten und Monozyten .....	12
1.5	Indikation für die Transfusion von Thrombozytenkonzentraten .....	16
1.6	Herstellung von Thrombozytenkonzentraten .....	17
1.7	Thrombozytapherese.....	18
1.8	Einfluß extrakorporaler Kreisläufe auf zelluläre und nicht- zelluläre Blutkomponenten.....	19
1.9	Durchflußzytometrie.....	21
1.9.1	Methodische Grundlagen.....	21
1.9.2	Monoklonale Antikörper .....	24
1.9.3	Thrombozytenuntersuchung .....	26
1.9.4	Leukozytenuntersuchung.....	27
2.	<u>Material und Methoden</u> .....	28
2.1	Auswahl der Spender .....	28
2.2	Thrombozytapherese.....	28
2.3	Durchflußzytometer.....	29
2.4	Probenentnahme .....	29
2.5	Aufbereitung des Untersuchungsmaterials und durchflußzytometrische Messung der Thrombozyten .....	30
2.5.1	Fixierung und Stabilisierung.....	30
2.5.2	Markierung mit monoklonalen Antikörpern .....	31
2.5.3	Messung am Durchflußzytometer .....	31
2.5.4	Durchflußzytometrische Auswertung .....	32
2.6	Aufbereitung des Untersuchungsmaterials und durchflußzytometrische Messung der Leukozyten.....	33
2.6.1	Fixierung und Stabilisierung.....	33
2.6.2	Markierung mit monoklonalen Antikörpern .....	33
2.6.3	Messung am Durchflußzytometer .....	34
2.6.4	Durchflußzytometrische Auswertung .....	34

---

2.7	Statistik .....	34
3.	<u>Ergebnisse</u> .....	36
3.1	Spenderkollektiv .....	36
3.2	Thrombozytapherese .....	36
3.3	Laboranalytische Untersuchungen .....	36
3.4	Durchflußzytometrische Untersuchungen .....	37
3.4.1	Thrombozytenergebnisse .....	37
3.4.2	Leukozytenergebnisse .....	40
4.	<u>Diskussion</u> .....	49
5.	<u>Zusammenfassung</u> .....	60
6.	<u>Literaturverzeichnis</u> .....	61
7.	<u>Anhang</u> .....	72
7.1	Verzeichnis der Abbildungen .....	72
7.2	Verzeichnis der Tabellen .....	73
7.3	Verzeichnis der Originaldaten .....	73
8.	<u>Danksagung</u> .....	79
9.	<u>Lebenslauf</u> .....	80
10.	<u>Erklärung</u> .....	81

## Abkürzungsverzeichnis

ACD	<i>acid-citrate-dextrose</i>
ADC	Analog-Digital-Wandler
AK	Antikoagulanz
BTD	Bluttransfusionsdienst
C5a	Komplementfaktor 5a
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CHO	<i>carbohydrate</i>
CPB	<i>cardiopulmonary bypass</i>
DNA	<i>desoxy-ribonucleic acid</i>
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
FACS	<i>fluorescence activated cell sorter</i>
FITC	Fluoreszein-Isothiocyanat
FSC	<i>forward side scatter</i> (Vorwärtsstreulicht)
gl	<i>glycolipid</i>
GM-CSF	<i>granulocyte-macrophage colony stimulating factor</i>
GMP-140	<i>granule membrane protein 140 kDa</i>
GP	Glykoprotein
HAT	Hypoxanthin, Aminopterin, Thymidin
HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase
ICAM	<i>intercellular leukocyte adhesion molecule</i>
IgG	Immunglobulin G
ITP	idiopathisch thrombozytopenische Purpura
LAD	<i>leukocyte adhesion deficiency</i>
LCA	<i>leukocyte common antigen</i>
LBP	<i>lipopolysaccharide-binding protein</i>
LFA	<i>lymphocyte function-associated antigen</i>
MAK	Monoklonaler Antikörper
MCFI	<i>mean channel fluorescence intensity</i>
PADGEM	<i>platelet activation dependent granule-external membrane protein</i>
PE	Phycoerythrin
PECAM	<i>platelet endothelial cell adhesion molecule</i>
PEG	Polyethylenglycol
PI	Propidiumjodid
PSGL-1	<i>P-selectin-glycoprotein ligand-1</i>

SSC	<i>side scatter</i> (Seitwärtsstreulicht)
TNF	Tumornekrosefaktor
UKE	Universitäts-Krankenhaus Eppendorf
VCAM	<i>vascular cell adhesion molecule</i>
VLA	<i>very late activation antigen</i>
vWF	von-Willebrand-Faktor

---

# 1. Einleitung

## 1.1 Einfluß der Thrombozytapherese auf die Biokompatibilität

Die Thrombozytentransfusion gehört heute zu den klinischen Therapiemaßnahmen bei der Behandlung und Prophylaxe von hämorrhagischen Diathesen und ist ein Teil der selektiven Transfusion von Blutkomponenten (Kretschmer, Borberg et al. 1987; Kretschmer 1996). Die Indikation findet sich primär bei der supportiven Behandlung thrombozytopenischer Zustände. Neben der Gewinnung mittels der buffy-coat-, bzw. der plättchenreichen Plasma (PRP)-Technik ist die Gewinnung von Thrombozytenkonzentraten durch maschinelle Apheresen an Zellseparatoren von Einzelspendern in den letzten Jahren immer weiter in den Vordergrund getreten (Mueller-Eckhardt 1993; Morgan 1996).

Bei der Thrombozytapherese handelt es sich in der Regel um einen extrakorporalen Kreislauf, wie man ihn auch in ähnlicher Form bei kardiopulmonalen Operationen und bei der Hämodialyse findet. Aufgrund vielfältiger Interaktionen zwischen Biomaterialien sowie zellulären und nicht-zellulären Blutbestandteilen unter dem Einfluß eines extrakorporalen Kreislaufs, wurde die Untersuchung der Biokompatibilität zum Forschungsgegenstand mehrerer Arbeitsgruppen (Gawaz, Mujais et al. 1994; Högman 1996; Muehrcke, McCarthy et al. 1996; Bonomini, Stuard et al. 1997; Gutensohn, März et al. 1997). Dort beobachtete Veränderungen beruhen auf vielfältigen Interaktionen, resultierend durch den Kontakt zwischen Spenderblut und Fremdmaterialien, sowie Einflüssen von Scherkräften (Nose, Yamaji et al. 1997). Unter den zellulären Komponenten zeigen insbesondere die Thrombozyten Veränderungen des Glykoproteinmusters, wie z.B. ein Zunahme des aktivierungsabhängigen Markers CD62p auf der Plättchenoberfläche (Purvis, Giorgio et al. 1994), sowie eine Bildung thrombozytärer Mikropartikel im Blut (Goodman, Cooper et al. 1993). Ferner kommt es zu Veränderungen von Leukozyten und deren Subpopulationen, wie z.B. einer Expressionszunahme von CD11b und CD11c auf Monozyten und neutrophilen Granulozyten (Tielemans, Delville et al. 1993). Eine signifikante Beteiligung von Lymphozyten an diesen Prozessen konnten bisher nicht bestätigt werden (Rinder, Bonan et al. 1991; Bau, Gutensohn et al. 1997; Kirchhofer, Riederer et al. 1997). Diese und weitere Antigenalterationen bilden letztendlich die Voraussetzungen für heterotype Interaktionen zwischen Leukozyten und Thrombozyten (Lawrence und



Springer 1991; Lorant, Patel et al. 1991; Ruf und Patscheke 1995; Bonomini, Stuard et al. 1997).

Für die Analyse der Glykoproteinalteration auf Zelloberflächen, als wichtigen Parameter zur Untersuchung der Biokompatibilität, eignet sich die Durchflußzytometrie. Diese Methodik erlaubt in Verbindung mit monoklonalen Antikörpern eine simultane Analyse mehrerer physikalischer und immunologischer Parameter jeweils einer einzelnen Zelle. Aufgrund der hohen Zählrate und der großen Sensitivität, wie Spezifität eignet sich die Durchflußzytometrie für die Verarbeitung von Vollblutproben und ermöglicht gegenüber klassischen Verfahren eine direkte Untersuchung der Zellaktivierung von Leukozyten und Thrombozyten (Ormerod 1990; Longobardi Givan 1992; Michelson 1996; Thylen, Fernvik et al. 1996).

## 1.2 Ziele der Studie

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluß eines extrakorporalen Systems im Rahmen der Thrombozytenapherese auf leukozytäre und thrombozytäre Antigene untersucht. Dabei wurde unter Zuhilfenahme monoklonaler Antikörper die Methode der Durchflußzytometrie angewandt.

Neben der Fragestellung, ob es zu einer Veränderung der Antigenmuster auf der Oberfläche von Leukozyten und Thrombozyten kommt, sollten aus den Ergebnissen weiterhin Rückschlüsse auf eine mögliche Beeinflussung, bzw. Interaktion zwischen Leukozyten und Thrombozyten gezogen werden.

## 1.3. Struktur und Funktion von Thrombozyten

Das hämostatische System, bestehend aus der plasmatischen Komponente, den Gerinnungsfaktoren und aus der zellulären Komponente, den Thrombozyten, schützt den Organismus, indem es bei Verletzungen zu einer effektiven Blutstillung beiträgt. Für diese Funktion ist sowohl eine quantitative Balance der Komponenten als auch die qualitative Funktionsfähigkeit der Bestandteile erforderlich, wobei den Thrombozyten eine besondere Bedeutung zukommt (Mueller-Eckhardt, Scharf et al. 1993).

---

Thrombozyten sind kernlose Zytoplasmafragmente der Megakaryozyten und somit per Definition keine Zellen. Trotz dieser Tatsache wird in der deutschsprachigen Literatur vorwiegend der Ausdruck "Thrombozyt" vor dem Synonym "Blutplättchen" verwendet. Die physiologische Thrombozytenzahl liegt im peripheren Blut zwischen 150.000 bis 400.000/ $\mu\text{l}$  und das durchschnittliche Volumen beläuft sich zwischen 5 und 10 fl pro Thrombozyt. Ungefähr 65 bis 90% der zirkulierenden Thrombozyten liegen scheibenförmig vor, mit einem Durchmesser von 1,5 bis 3,5  $\mu\text{m}$  und einer Dicke von 0,8 bis 1,2  $\mu\text{m}$ . Die Plasmamembran mit ihren assoziierten Strukturen ist Träger wichtiger Rezeptoren für die Thrombozytenadhäsion und -aggregation. Weiterhin enthält sie die für die Thrombozytenfunktion benötigten Enzyme, wie z.B. ATPasen. Unter der Zellmembran liegt der Bereich, der die Signalübertragung zwischen Rezeptor und Zellinnerem vermittelt. Über die Invagination der Plasmamembran in das offene kanalikuläre System besteht die Möglichkeit des Metabolitentransportes zwischen der Oberfläche und dem Thrombozyteninneren (Mueller-Eckhardt 1993).

Die Hypothese, daß Thrombozyten durch unverletztes Endothel nicht aktiviert werden, ist auf die besonderen Eigenschaften der Glykokalix der Endothelzellmembran zurückzuführen, für die Thrombozyten keinen Rezeptor besitzen. Hinzu kommt, daß Endothelzellen Faktoren in das Gefäßlumen abgeben, die einer Plättchenaktivierung entgegenwirken (Bauer 1994) . Bei einer Gefäßverletzung werden jedoch subendotheliale Strukturen, v.a. Kollagenfasern freigelegt, an denen sich die Thrombozyten über den nun freiliegenden von-Willebrand-Faktor (vWF) anlagern können (Clemetson 1995).

Die Adhäsion erfolgt u.a. mit Hilfe eines von Endothelzellen und Thrombozyten gebildeten Proteins, dem von-Willebrand-Faktor. Dieser Ligand interagiert mit seinem Hauptrezeptor, dem GPIb-V-IX (CD42), der sich aus drei Untereinheiten zusammensetzt. Dem Komplex wird in der ersten Phase der Blutgerinnung eine große Bedeutung beigemessen, indem er sich an den von-Willebrand-Faktor anlagert (Clemetson und Clemetson 1995). Fehlt GPIb, so ist die normale Adhäsion der Thrombozyten nicht mehr möglich und die Thrombozytenmembran zeigt Veränderungen auf, wie es bei dem Bernard-Soulier-Syndrom der Fall ist (Clemetson und Clemetson 1995). Diese und andere Interaktionen sind bei der Induktion weiterer Signaltransduktionen innerhalb der Thrombozyten von essentieller Bedeutung; als Beispiel sei hier die thrombinabhängige Aktivierung genannt. Ermöglicht wird sie über Aktin-Bindungsproteine, die den GPIb-Komplex

---

mit dem Thrombozytenskelett verbinden (Lefkovits, Plow et al. 1995). Die folgende Aktivierung der Thrombozyten wird unterstützt durch verschiedene Agonisten, wie z.B. ADP, Thrombin und Adrenalin (Clemetson und Clemetson 1995).

Auf den aktivierten Thrombozyten kommt es zu einer Konformationsänderung, bzw. Aktivierung des GPIIb-IIIa-Komplexes, der zur Familie der Adhäsionsrezeptoren, den sogenannten Integrinen zählt. GPIIb (CD41) besteht aus einer großen  $\alpha$ -Untereinheit und einer kleineren  $\beta$ -Untereinheit. GPIIIa (CD61) ist eine einkettige Untereinheit, die in einem stöchiometrischen Verhältnis von 1:1 nichtkovalente, kalziumabhängige Komplexe bildet (Lefkovits, Plow et al. 1995). Der CD61-Rezeptor wird in den elektronendichten-Granula und  $\alpha$ -Granula, wie auch auf der Oberfläche, aller ruhenden und aktivierten Thrombozyten nachgewiesen (Youssefian, Masse et al. 1997). Auf aktivierten Thrombozyten hat der Komplex die Möglichkeit, eine Bindung zwischen verschiedenen "Adhäsionsproteinen" einzugehen. Die Bindung an Fibronektin und vWF bewirkt die Thrombozytenadhäsion. Die Expression von Fibrinogenrezeptoren und die entsprechende Bindung von Fibrinogen, erlaubt primär die Aggregation. Außerdem besteht eine Interaktionsmöglichkeit zu weiteren Adhäsionsrezeptoren, wie Fibronektin-Rezeptoren, *very late activation antigens* (VLA) und verschiedenen Leukozytenrezeptoren (Mac-1, LFA-1) (Spangenberg, Redlich et al. 1993; Lefkovits, Plow et al. 1995).

Ein Thrombozyt trägt im Vergleich zu seinen anderen Oberflächenantigenen die relativ hohe Anzahl von ca. 50.000 - 80.000 GPIIb-IIIa-Komplexen auf seiner Oberfläche (70% aller Rezeptorstrukturen), das entspricht ungefähr 1-2% seiner Gesamtproteine. Weitere 30% liegen als "verborgene" GPIIb-IIIa-Komplexe zwischen der Membran des oberflächlichen kanalikulären Systems und in den  $\alpha$ -Granula des Zytoplasmas (Phillips, Charo et al. 1988). Fehlt der GPIIb-IIIa-Komplex, so kommt es zur Manifestation der Glanzmann-Thrombasthenie, einer hämorrhagischen Diathese, die bei normaler Thrombozytenkonzentration mit einer verlängerten Blutungszeit aufgrund einer fehlenden Thrombozytenaggregation einhergeht (Shattil, Hoxie et al. 1985; Phillips, Charo et al. 1988).

Als weitere Reaktion der Thrombozyten auf Kontakt mit einem Agonisten kommt es zu einer Exozytose. Hierbei degranulieren zunächst die  $\alpha$ - und  $\delta$ -Granula, nach einer Latenzzeit auch die lysosomalen Granula. Die Sekretion der Granula-Inhaltsstoffe ist an die Verfügbarkeit freier Calciumionen gebunden und stellt einen energieabhängigen Prozeß dar, der das Ergebnis eines kombinierten Vorganges

aus Kontraktion und Fusion der Granula ist. Die freigesetzten Substanzen, wie z.B. ADP nehmen bei der Sekretion lokal zu, was wiederum zu einer Aktivierung weiterer Thrombozyten führt. Während dieser Vorgänge werden aktivierungsabhängige Rezeptoren exprimiert, wie z.B. GP53 (CD63) und das P-Selektin (GMP140, CD62p). Der Nachweis beider Glykoproteine auf der Thrombozytenoberfläche mit Hilfe spezifischer monoklonaler Antikörper dient als Kriterium dafür, daß diese Zellen eine Sekretion, bzw. Aktivierung durchlaufen haben (Gutensohn, Sutteck et al. 1996; Gutensohn, März et al. 1997). GP53 fusioniert bei Stimulation mit der Membran der lysosomalen Granula. Über die Funktion ist neben Assoziationen mit VLA-3 und VLA-6 wenig bekannt (Nieuwenhuis, van Oosterhout et al. 1987). Das P-Selektin ist in den  $\alpha$ -Granula ruhender Thrombozyten gespeichert. Weiterhin findet sich GMP140 in Megakaryozyten und Endothelzellen (Johnston, Kurosky et al. 1989). Die Funktion von CD62p ist weitgehend unbekannt, doch weiß man, daß es als ein Adhäsionsrezeptor die Interaktion zwischen aktivierten Thrombozyten, neutrophilen Granulozyten und Monozyten vermitteln kann (Larsen, Celi et al. 1989; Lawrence und Springer 1991).

#### 1.4 Struktur und Funktion von neutrophilen Granulozyten und Monozyten

Sowohl Granulozyten als auch Monozyten stammen von pluripotenten Stammzellen ab und bilden u.a. mit den B- und T-Lymphozyten der lymphatischen Reihe die zelluläre und humorale Abwehr des Menschen. Diesen Zellen gemeinsam ist eine Beteiligung an der spezifischen oder unspezifischen Immunabwehr des Organismus.

Der reife Granulozyt hat einen Durchmesser von 10 bis 15  $\mu\text{m}$ . Sein Zellkern ist gelappt und chromatinreich. Mehrere Einschnürungen gliedern den Kern in einzelne Segmente, welche charakteristisch für den reifen Granulozyten sind. Das Zytoplasma ist schwach azidophil und weist unterschiedliche Granula auf (Lydyard und Grossi 1995). Grundsätzlich dienen die Enzyme der primären (azurophilen) Granula vornehmlich intrazellulären Abbauvorgängen, während der Inhalt der sekundären (spezifischen) Granula mehr bei extrazellulären Vorgängen eingesetzt wird. Aufgrund dieser morphologischen als auch funktionellen Unterschiede werden

---

die Granulozyten in neutrophile, eosinophile und basophile Granulozyten unterteilt (Nerl 1993).

Der Durchmesser des Monozyten beträgt 15 - 20 µm. Sein Zytoplasma ist schwach basophil und enthält feinste, rosettenförmig angeordnete Granula. Der Zellkern ist gegenüber den anderen Leukozytensubpopulationen relativ groß. Nierenförmig und manchmal gelappt liegt er oft etwas exzentrisch im Zytoplasma. Da Monozyten amöboid beweglich sind und Phagozytose-Eigenschaften besitzen, beträgt ihre Verweildauer im Blut nur 16 - 23 Stunden, anschließend werden sie in andere Zellen des mononukleären Phagozytensystems transformiert und verlassen die Blutbahn. Die Hauptfunktionen dieser mononukleären Phagozyten ist es zum einen durch Phagozytose körperfremde Antigene zu beseitigen und zum anderen diese phagozytierten Antigene den spezifischen Lymphozyten zu präsentieren.

Die verschiedenen Funktionen der Granulozyten und Monozyten sind durch mehrere aufeinanderfolgende Schritte charakterisiert, die mit den Begriffen Chemotaxis, Lokomotion, Phagozytose und Degranulation beschrieben werden können. Bestimmte Reize lösen bei den reifen neutrophilen Granulozyten und Monozyten eine gerichtete Bewegung aus. Voraussetzung für diese Aktivierungsvorgänge sind u.a. Rezeptoren, die auf der Oberfläche von Granulozyten und Monozyten exprimiert werden und die verschiedene chemotaktisch wirksame Substanzen binden können. Hierzu zählen neben Prostaglandinen, Leukotrienen, etc. eine Reihe von Faktoren, die von Thrombozyten bzw. Leukozyten selbst sezerniert werden können (Nerl 1993).

Eines der am häufigsten vertretenen Glykoproteine auf der Oberfläche von Leukozyten ist das *leukocyte common antigen* (LCA) CD45. Die Isoformen dieses transmembranen Moleküls finden sich insbesondere in unterschiedlichen Mustern auf den einzelnen Lymphozytensubpopulationen, auf denen es zum Teil 10% der Gesamtberfläche einnimmt. Über die Regulation und Funktion von CD45 ist wenig bekannt, doch gibt es Hinweise, daß CD45 an der antigenstimulierten Proliferation von T-Lymphozyten beteiligt ist (Sato, Furukawa et al. 1993; Trowbridge und Thomas 1994). Weiterhin dient das Glykoprotein CD45 vor allem im Rahmen seiner Funktion als LCA. Aufgrund der Tatsache, daß neutrophile Granulozyten die größte Subpopulation unter der Gesamtpopulation der Leukozyten bildet, werden CD45-Antikörper häufig zur Untersuchung neutrophiler Granulozyten eingesetzt.

---

Zur näheren Untersuchung von Monozyten eignet sich die Antigenstruktur CD14, welche hauptsächlich auf Monozyten und Makrophagen, sowie schwach auf neutrophilen Granulozyten exprimiert wird. Die leucinreiche Antigenstruktur CD14 kooperiert mit LPS (*lipopolysaccharide-binding protein*)-Komplexen, woraufhin eine Aktivierung und Freisetzung von Zytokinen wie z.B. Tumornekrosefaktor erfolgt, so daß CD14 eine Beteiligung an der akuten Entzündungsreaktion und dem Endotoxinschock zugesprochen wird; im Rahmen dieser Vorgänge wird ebenso eine Zunahme von Oberflächenproteinen, einschließlich Zelladhäsionsstrukturen beobachtet (Haziot, Tsuberi et al. 1993).

Die für die Leukozytenadhäsion verantwortlichen Glykoproteinmoleküle, die ebenso an der Leukozyten-Thrombozyten-Interaktion beteiligt sind gehören den Immunglobulinen der "Supergene", der Integrin- oder der Selektinfamilie, an. Die Selektinfamilie umfasst drei Proteine, die die Präfixe E (*endothelial*), P (*platelet*) und L (*leukocyte*) erhalten. Sowohl E- als auch P-Selektine findet man auf Endothelzellen. L-Selektine wurden ursprünglich auf menschlichen murinen Lymphknoten identifiziert (Bevilacqua und Nelson 1993; Carlos und Harlan 1994). Allen Rezeptoren gemeinsam ist eine endständige NH<sub>2</sub>-Struktur am Lektinmolekül, gefolgt von einer Struktur, die dem epidermalen Wachstumsfaktor gleicht, mehreren Aminosäuren (komplementregulierend), einer transmembranen und einer zytoplasmatischen Sequenz (Bevilacqua und Nelson 1993; Mayadas, Johnson et al. 1993).

Ein wichtiger Ligand des P-Selektins ist das PSGL-1 (*P-selectin-glycoprotein ligand-1*). Dieser Ligand findet sich auf Knochenmarkzellen, neutrophilen Granulozyten und Monozyten, sowie auf einer Subpopulation von T-Lymphozyten. PSGL-1 ist ein integrales Membranprotein mit einer sich 14-fach wiederholenden threoninreichen extrazellulären Komponente, sowie einer transmembranen und cytoplasmatischen Komponente. Damit PSGL-1 mit dem P-Selektin interagieren kann, ist die Zwischenschaltung oligosaccharidhaltiger Liganden erforderlich (Furie und Furie 1995).

An den selektinvermittelten, heterotypen Interaktionen sind oligosaccharidhaltige Liganden beteiligt. Die zwei Isomere der Kohlenhydrat-Liganden Lewis x und Lewis a setzen sich aus einer Neuraminsäure, einer Galaktose, einer Fucose und einem N-Acetylglucosamin zusammen. Die beiden Isomere unterscheiden sich nur hinsichtlich ihrer isomerischen Bindung zwischen dem N-Acetylglucosamin und der Galaktose bzw. Fruktose (Bevilacqua und Nelson 1993). Die sialysierte Form von

Lewis x (SLe<sup>x</sup>, CD15s) findet sich insbesondere auf neutrophilen Granulozyten und Monozyten. Periphere T- und B- Lymphozyten zeigen nur im Rahmen einer ex vivo-Aktivierung eine SLe<sup>x</sup>-Expression. Eine SLe<sup>a</sup>-Expression wurde bisher nur auf einigen Tumorzellen beobachtet aber nicht auf Leukozyten. Aufgrund dieser Tatsache ist die Untersuchung der SLe<sup>a</sup>-Expression eher bezüglich Metastasenabsiedlung relevant und nicht im Rahmen leukozytärer Interaktionen (Carlos und Harlan 1994). Die Aufgabe dieser Bindungsmoleküle besteht in der Kooperation zwischen den unterschiedlichen Selektinen auf der einen Zelle und den Adhäsionsstrukturen einer weiteren, heterotypen Zelle. So erfolgt der Kontakt zwischen E-Selektin und verschiedenen Leukozytenantigenstrukturen wie z.B. CD66, CD62L, CD11/CD18 oder zwischen dem P-Selektin und dem PSGL-1 (*P-selectin-glycoprotein ligand-1*) über SLe<sup>x</sup> (Bevilacqua und Nelson 1993; Carlos und Harlan 1994).

Die physiologische Bedeutung von SLe<sup>x</sup> für den Menschen zeigt sich bei einem Mangel dieses Liganden. Die betroffenen Patienten leiden unter rezidivierenden Infektionen, wie man sie vom klassischen LAD-Syndrom Typ I (*leukocyte adhesion deficiency syndrome*) kennt, zeigen aber keinen Mangel von  $\beta_2$ -Integrinen, die für diese Erkrankung charakteristisch wäre, sondern ein SLe<sup>x</sup>-Mangel, weswegen man in diesem Fall von einem LAD-Typ II spricht (Carlos und Harlan 1994).

Integrine sind transmembrane Zelloberflächenproteine, die sich an das Zytoskelett binden und vorwiegend für die extrazelluläre Signalübertragung verantwortlich sind. Jeder Integrin-Rezeptor setzt sich aus einer nicht kovalentgebundenen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette zusammen, die untereinander kombiniert bisher 21 unterschiedliche Rezeptor-Subtypen bilden (Arnaout 1990). Den  $\beta_2$ -Integrinen ist eine  $\beta$ -Kette (CD18) gemeinsam, die mit drei unterschiedlichen  $\alpha$ -Ketten verbunden sein kann: CD11a (*lymphocyte function associated-1* oder LFA-1), CD11b (Mac-1, Mo-1) und CD11c (p150,95) (Stöckl, Majdic et al. 1995). Die Expression von  $\beta_2$ -Integrinen ist ausschließlich auf Leukozyten beschränkt, wobei die Verteilung der CD11/18-Komplexe auf den einzelnen Leukozytensubklassen differiert. Lymphozyten im peripheren Blut exprimieren hauptsächlich CD11a/CD18, während neutrophile Granulozyten und Monozyten alle drei  $\beta_2$ -Integrine exprimieren (Darcissac, Bahr et al. 1996). Signifikante intrazelluläre Speicher für CD11b/CD18 und CD11c/CD18 finden sich in zirkulierenden Granulozyten und Monozyten. Ein Speicher von CD11a/CD18 ist nicht bekannt (Arnaout 1990).

Eine Expressionszunahme der  $\beta$ 2-Integrine kann, ähnlich wie bei den Thrombozyten durch verschiedene Agonisten induziert werden, wie z.B. GM-CSF, C5a und TNF- $\alpha$ , die auf CD11b/CD18 und CD11c/CD18 Einfluß nehmen. Eine CD11b/CD18-Expression ist nach Adhäsion von neutrophilen Granulozyten an E-Selektin beobachtet worden. Fehlen, bzw. liegt ein Mangel an  $\beta$ 2-Leukozytenintegrinen vor, so kommt es zum Bild des LAD Typ I-Syndroms. Bei dieser autosomal-rezessiven Erkrankung ist es neutrophilen Leukozyten nicht möglich, in entzündetes Gewebe einzuwandern (Mayadas, Johnson et al. 1993; Stöckl, Majdic et al. 1995). In der zweiten Unterfamilie der Integrine ( $\beta$ 1-Integrine) sind verschiedene Polypeptide mit der  $\beta$ 1-Kette (CD29) verknüpft. Hierzu gehören die "sehr späten" Aktivierungsmarker (VLA = *very late activation*) (Carlos und Harlan 1994).

In die Immunglobulinfamilie der "Supergene" gehören fünf Gruppen, die alle in die Leukozytenadhäsion involviert sind: interzelluläre Adhäsionsmoleküle (ICAM-1, CD54, ICAM-2, ICAM-3), vaskuläre Zelladhäsionsmoleküle (VCAM-1, CD106), Plättchen-Endothelzell-Adhäsionsmoleküle (PECAM-1, CD31) und die mukosalen Adressine (Carlos und Harlan 1994; Holness, Bates et al. 1994). Anzumerken ist, daß neben den hier dargestellten Rezeptoren eine ganze Reihe weiterer, mehr oder weniger zell- bzw. funktionsspezifischer Rezeptoren existieren.

## 1.5 Indikation für die Transfusion von Thrombozytenkonzentraten

Schon 1910 demonstrierte Duke die Rolle der Thrombozyten bei der Hämostase und die Möglichkeit der Transfusion von Blutplättchen. Weitere Versuche der Thrombozytentransfusion gelangen 1952 durch die Übertragung plättchenreicher Bluttransfusionen, die aus dem Blut von Patienten mit Polycythämia vera hergestellt wurden (Hirsch und Gardner 1952). Im Laufe der Jahre gewann der Einsatz von Thrombozytenkonzentraten zunehmend an Bedeutung und ist heute ein fester Bestandteil in der Prophylaxe und Therapie von hämorrhagischen Diathesen (Kretschmer 1996).

Abhängig von der Ätiologie und den klinischen Symptomen kommen unterschiedliche Transfusionsstrategien zum Einsatz. Eine absolute Indikation zur Thrombozytentransfusion sind thrombozytäre Bildungsstörungen mit lebensbedrohlichen Blutungen. Die Ursachen können auf einer Thrombozytopenie (z.B. bei Hämoblastosen, Knochenmarkkarzinosen, aplastischen Anämien, iatrogen



nach Bestrahlung etc.) basieren (Höcker 1996; Kretschmer 1996). Die Transfusion bei thrombozytären Umsatzstörungen wie z.B. der idiopathisch thrombozytopenischen Purpura (ITP) oder Verbrauchskoagulopathien kommt in der Regel nur in der Notfallmedizin (Operation, intrazerebrale Blutung) zum Einsatz. Die Ursache liegt in der möglichen Bildung thrombozytenspezifischer Antikörper gegen Antigene der übertragenen Thrombozyten. So gilt der Grundsatz: so wenig wie möglich, so gezielt wie möglich, und so kompatibel wie möglich zu transfundieren. Das heißt, daß mittels serologischer Voruntersuchungen eine weitgehende Übereinstimmung des Gewebemusters zwischen dem Spender und Empfänger gesichert wird (Kretschmer, Borberg et al. 1987).

Bei Knochenmarkshypoplasie oder -aplasien wird, soweit nicht weitere Komplikationen vorliegen, derzeit empfohlen, bei Werten zwischen 10.000 und 20.000 Plättchen/ $\mu$ l eine Thrombozytentransfusion durchzuführen (Kretschmer 1996). Im Unterschied dazu wird beim perioperativen Einsatz versucht, Thrombozytenwerte von 50.000 bis 100.000/ $\mu$ l zu erreichen und diese postoperativ mindestens eine Woche zwischen 30.000 und 50.000/ $\mu$ l zu halten (Höcker 1996). Aus den angegebenen Beispielen wird ersichtlich, daß sich der Zeitpunkt der Thrombozytentransfusion sowohl an der Ätiologie, als auch an der absoluten Thrombozytenzahl orientiert. So zeigen Patienten mit Leukämie oft schon Blutungen bei einem Wert von 20.000 Thrombozyten/ $\mu$ l, während bei Immunthrombozytopenien selbst bei viel tieferen Werten keine nennenswerten hämorrhagischen Diathesen beobachtet werden (Kretschmer 1996).

## 1.6 Herstellung von Thrombozytenkonzentraten

Es existieren verschiedene Techniken zur Gewinnung von Thrombozytenkonzentraten. Die Mehrzahl der europäischen Zentren verwendet Plättchenkonzentrate von Einzelspendern für akut thrombozytopenische Patienten (Kretschmer 1996). Da hier davon ausgegangen werden kann, daß es sich im Gegensatz von Patienten mit angeborener oder erworbener Thrombozytopenie um eine kurzzeitige Therapie handelt, werden trotz der geringeren Kompatibilität diese Präparate angewendet. Hierbei wird aus Vollblut durch eine erste langsame Zentrifugation bei Raumtemperatur zunächst plättchenreiches Plasma (PRP) und aus diesem durch eine zweite schnellere Zentrifugation das Thrombozytenkonzentrat gewonnen.

Eine zweite Methode, die sich in den letzten Jahren zunehmend durchsetzte, ist die Gewinnung von Thrombozytenkonzentraten aus gepoolten "buffy coats". Nach einer scharfen, ersten Zentrifugation wird zunächst plättchenarmes Frischplasma gewonnen. Der thrombozytenreiche "buffy coat" wird in einen zweiten Beutel überführt und in ca. 50 ml plättchenarmen Plasma resuspendiert, bevor durch eine zweite langsame Zentrifugation die kontaminierenden Erythrozyten und Leukozyten abgetrennt werden. Unter diesen beiden Methoden schneidet die "buffy coat"-Gewinnung hinsichtlich der Ausbeute, Leukozytenkontamination und der in vitro-Funktion der Thrombozyten besser ab (Andreu 1996; Murphy, Heaton et al. 1996).

Als weitere Möglichkeit zur Gewinnung von Thrombozytenkonzentraten bietet sich die Zellapherese an, auf die im folgenden Kapitel näher eingegangen wird. In Studien, die die in vitro-Funktion von Apherese- und "buffy coat"-Präparaten untersucht haben, zeigen die Apherese-Präparate zum Teil bessere Ergebnisse, die Unterschiede sind jedoch gering (Andreu 1996). Da allerdings pro Thrombozytenkonzentrat die Fremdartigenexposition für den Empfänger reduziert, und somit die Gefahr der Alloimmunisierung gesenkt wird, kommen Aphereseprodukte hauptsächlich bei chronisch-thrombozytopenischen Patienten zum Einsatz (Andreu 1996).

## 1.7 Thrombozytapherese

Das geschlossene Thrombozytapheresesystem wurde erstmals im Jahre 1968 von Tullis beschrieben, konnte sich aber trotz der guten Thrombozytenausbeute und der relativ geringen Leukozytenkontamination erst im Laufe der Jahre im klinischen Alltag etablieren (Tullis, Eberle et al. 1968; Morgan 1996). Aufgrund fortwährender Optimierung in der Gewinnung von Thrombozytenkonzentraten wurde es möglich, die Qualität der Produkte kontinuierlich zu verbessern (Mueller-Eckhardt 1993).

Die Thrombozytapherese erfolgt an automatisierten Zellseparatoren. Hierbei kommen zwei unterschiedliche Verfahren zur Anwendung, das kontinuierliche und das diskontinuierliche. Gemeinsam ist den beiden Techniken, daß sie die Zentrifugalmethode anwenden, um das Vollblut in seine Hauptbestandteile, das Plasma und die zellulären Komponenten aufzutrennen. Um eine Gerinnung des Blutes im extrakorporalen Kreislauf zu verhindern, wird es mit einem Antikoagulant (AK), z. B. ACD (*acid citrate dextrose*) versetzt.

Bei der diskontinuierlichen Methode ist ein venöser, *single needle*-Zugang erforderlich, über den dem Spender mehrmals ca. 300 ml Vollblut entnommen wird. Es wird mit Antikoagulanzen versetzt, in eine Zentrifuge überführt und in die gewünschten Blutbestandteile aufgetrennt. Plasma sowie Erythrozyten und Leukozyten werden dem Spender reinfundiert, während die gewonnene Thrombozytenfraktion in einen Sammelbeutel geleitet wird. Dieser Vorgang wird mehrfach wiederholt, um die gewünschte Menge an Thrombozyten zu erhalten (Tullis, Eberle et al. 1968; Tullis, Tinch et al. 1971).

Das kontinuierliche Verfahren erfordert zwei venöse Zugänge (*double needle*), den Zulauf und den Rücklauf. Das antikoagulierte Vollblut des Spenders läuft kontinuierlich über den Zulauf in eine Zentrifuge. Wie beim diskontinuierlichen Verfahren entscheidet primär das Verhältnis zwischen Zentrifugengeschwindigkeit und spezifischen Gewicht der einzelnen Blutkomponenten welche Zellpopulation sich an den Schnittstellen der Zentrifugenkammer bilden. Blutbestandteile mit der höchsten Dichte, wie Erythrozyten werden an der äußeren Zentrifugenwand angereichert, während sich Komponenten mit geringeren Dichten, wie Plasma und Thrombozyten, an der inneren Wand befinden. An der Zentrifugenwand sind mehrere Auslaßschläuche angebracht, die je nach angewandten Verfahren die einzelnen Blutkomponenten sammeln, bzw. über den Rücklauf dem Spender zurückführen. Die individuell einzustellenden Parameter wie AK-Infusionsrate, Blutflußrate etc. werden aus den eingegebenen Daten wie z.B. Geschlecht, Größe, Gewicht, Hämatokrit und Thrombozytenzahl automatisch berechnet.

## 1.8 Einfluß extrakorporaler Kreisläufe auf zelluläre und nicht-zelluläre Blutkomponenten

Extrakorporale Systeme, zu denen auch das Verfahren der Thrombozytapherese zählt, induzieren zahlreiche Veränderungen im Hämostasesystem und an den zellulären Komponenten des Blutes. Da sich die Einflüsse der einzelnen Faktoren wie Fremdmaterial, Antikoagulantien oder Scherkräfte, bedingt durch Pumpen und Zentrifugen schwer voneinander trennen lassen, ist es kaum möglich, den Einfluß jedes einzelnen Faktors auf die zellulären und nicht zellulären Blutbestandteile genau zu bestimmen.

Wenn Blut mit Fremdmaterialien in Kontakt kommt, so folgen eine Reihe von Veränderungen, des Gerinnungssystems, des fibrinolytischen-, des Kinin- und des Komplementsystems (Nose, Yamaji et al. 1997). Haeffner-Cavaillon untersuchte an einem extrakorporalen System die Freisetzung verschiedener Zytokine, einschließlich IL-1, IL-6, IL-8 und Tumornekrosefaktor- $\alpha$ , aus aktivierten Monozyten und ist der Ansicht, daß insbesondere das IL-1 und der Tumornekrosefaktor- $\alpha$  von großer Bedeutung bezüglich der Biokompatibilität sind (Haeffner-Cavaillon und Kazatchkine 1994). Weiterhin wurden zahlreiche Untersuchungen über die Aktivierung von Komplementfaktoren, insbesondere C3a und C5a durchgeführt (Chenoweth 1986; Kazatchkine und Carreno 1988; Goodman, Cooper et al. 1993; Nose, Yamaji et al. 1997). Im Bereich der Hämodialyse konnte gezeigt werden, daß insbesondere die Dialyse-Membranen zu einer Zunahme von C3a und C5a beitragen, während bei den CPB-Operationen der Oxygenator als hauptverantwortlich einzustufen ist (Chenoweth 1986). Hsu konnte neben diesen Faktoren auch eine Korrelation zwischen dem Grad der Komplementaktivierung und dem Vorliegen heparinbeschichteter Oberflächen an Hämodialysatoren aufzeigen (Hsu 1996).

Die zellulären Komponenten eignen sich ebenso für die Beurteilung der Biokompatibilität extrakorporaler Systeme. Insbesondere die Thrombozyten zeigen Veränderungen des Glykoproteinmusters, wie z.B. eine Zunahme des aktivierungsabhängigen Markers CD62p auf der Plättchenoberfläche, sowie eine Zunahme thrombozytärer Mikropartikel im Blut, die wahrscheinlich von dem mechanischen Streß herrühren, dem die Thrombozyten während der extrakorporalen Zirkulation unterworfen sind. Es existieren unterschiedlich ausgerichtete Untersuchungen über den Einfluß von Hämodialysatoren (Gutensohn, Sputtek et al. 1996; Bonomini, Stuard et al. 1997), kardiopulmonalen Bypass-Operationen (CPB-Operationen) (Muehrcke, McCarthy et al. 1996) und Zellseparatoren (Gutensohn, März et al. 1997; Bartsch 1998). Neben einer Korrelation zwischen mechanischen Scherkräften und der Zunahme der Thrombozytenaggregation postulieren Goodman et al. ein Dreistufenmodell für die Entstehung von Thromben, Emboli und Mikroaggregaten bzw. Zell-Interaktionen in extrakorporalen Kreisläufen (Purvis, Giorgio et al. 1994). Nach einer initialen Adhäsion der Thrombozyten an die synthetische Oberflächenstruktur wird eine weitere Aktivierung der Plättchen induziert, die schließlich zur Aggregation von Thrombozyten und anderen korpuskulären Blutbestandteilen führt (Goodman, Cooper et al. 1993). Eine klinische Manifestation zeigt sich z.B. bei Patienten, die sich einer CPB-Operation unterzogen haben. Untersuchungen beschreiben

Störungen der Thrombozytenfunktion, die aufgrund der extrakorporalen Zirkulation ausgelöst werden. Diese Veränderungen führen zum Teil soweit, daß bei 10% aller Patienten, die einer Bypass-Operation unterzogen wurden, aufgrund der Thrombozytopenie und -schädigung ausgedehnte postoperative Blutungen auftreten (Woodman und Harker 1990). Der Schweregrad der Thrombozytenschädigung scheint mit der Dauer der extrakorporalen Zirkulation zu korrelieren, und manifestiert sich in einer Verlängerung der Blutungszeit (Scharf 1986).

## 1.9 Durchflußzytometrie

### 1.9.1 Methodische Grundlagen

Zur Untersuchung der zum Teil oben genannten Antigenalteration an Thrombozyten und Leukozyten bietet sich die immunologische Untersuchung an einem Durchflußzytometer an. Die Durchflußzytometrie war bis vor wenigen Jahren ausschließlich in der Grundlagenforschung vertreten. Die Optimierung auf dem Gebiet der Herstellung monoklonaler Antikörper, die Entdeckung geeigneter Fluoreszenzfarbstoffe, sowie die Verbesserung der Zytometer, verbunden mit einer einfacheren Gerätebedienung ermöglichten es der Durchflußzytometrie, zu einer weiten Verbreitung in der klinischen Routine zu kommen (Eckhardt 1994; Schmidt 1994).

Voraussetzung für diese multiparametrische Analyse, die sich grundsätzlich an allen biologischen Zellen durchführen läßt, ist das Vorliegen einer Zellsuspension von 0,5 bis 20 Mio. Zellen pro Milliliter. Diese muß den Analysepunkt, den Ort, an dem der Laser und der Flüssigkeitsstrahl senkrecht aufeinander treffen, passieren. Nur Zellen, die diesen Punkt passieren, können korrekt erfaßt, analysiert und klassifiziert werden (Raffael 1987). Um dieses zu erreichen bedient man sich der hydrodynamischen Fokussierung, die sich aus zwei Flüssigkeitszugängen zusammensetzt. Über einen Zugang wird mittels einer Pumpe kontinuierlich Trägerflüssigkeit in die aus Quarzglas bestehende Meßküvette gepumpt. Die Zellsuspension wird über einen zweiten Zugang, entweder über ein Ansaugsystem oder mittels Überdruck in die Meßkammer überführt. Das Ende der zweiten Kapillare ist auf das Zentrum der Meßküvette gerichtet. Unmittelbar nachdem die Zellsuspension die Kapillare verläßt, wird sie von der Trägerflüssigkeit erfaßt. Beim

Zustrom auf die Meßküvette erfährt der Probenstrom so eine Beschleunigung von wenigen Zentimetern pro Sekunde auf etwa sieben Meter pro Sekunde, so daß die Einzelzellen hintereinander aufgereiht den Analysepunkt passieren und detektiert werden (Ormerod 1990; Longobardi Givan 1992).

Die Lichtquellen, die in der Durchflußzytometrie eingesetzt werden, müssen verschiedene Anforderungen erfüllen. Die häufigste Anwendung finden Laser, wie z.B. der Argon-Ionenlaser. Charakteristisch für diese Lichtquelle ist die Monochromasie, so daß das Emissionsspektrum im Absorptionsbereich der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe liegt. Eine hohe Energiedichte und konstante Strahlenleistung ist erforderlich, um ausreichende Fluoreszenz- und Streulichtsignale zu induzieren. Ein Strom von ca. 0,5 W wird benötigt, um das Argongas zu ionisieren. Reflektionsspiegel an beiden Enden der Röhre verstärken die Stimulation und durch Einstellung des Prismas am hinteren Ende der Röhre läßt sich eine bestimmte Wellenlänge (z.B. 488 nm beim Argonlaser) herausfiltern. Ein an der Vorderseite der Röhre befindlicher Spiegel läßt einen Teil des Lichtes passieren. Dieser Teil des Laserstrahls wird durch eine optische Einrichtung fokussiert und auf die Meßküvette mit der Zellsuspension ausgerichtet (Ormerod 1990). Wird eine Zelle im Analysepunkt von dem Laser getroffen, so werden charakteristische Lichtstreuungs- und Fluoreszenzeffekte ausgelöst. Üblicherweise wird die Lichtstreuung im Vorwärtsstreulicht  $0 - 10^\circ$  (*forward side scatter* = FSC) und im Seitwärtsstreulicht von  $90^\circ$  (*side scatter* = SSC) detektiert. Das Vorwärtsstreulicht gibt Zellgrößenrelationen wieder, Seitwärtslichtstreuung beruht auf unterschiedlichen Eigenschaften der Zelle und liefert Informationen über Zellmembran, Zellkern und intrazelluläre granuläre Bestandteile (Granularität).

Abgestimmt auf den verwendeten Laser, müssen die für die spezifische Markierung der Zellen geeigneten Fluorochrome ausgewählt werden. Das heißt, bei einem Argon-Laser mit einer Emissionslinie von 488 nm kommen nur Fluorochrome mit einem Exzitationsbereich um 488 nm in Betracht. Um eine exakte Trennung der Signale zu gewährleisten, muß ein Unterschied in der Absorptions- und Emissionswellenlänge (*stokes shift*) bei der Mehrfarbenfluoreszenzanalyse vorhanden sein. Darüber hinausgehende Untersuchungen, die aufgrund des Aufwandes nur zum Teil in der Routine zum Einsatz kommen, werden z.B. durch den Einsatz von Tandem-Farbstoffen oder mehrere Laser verschiedener Wellenlänge möglich. Zur Färbung werden zum einen Fluoreszenzfarbstoffe benutzt, die selbst eine spezifische Affinität zu bestimmten Zellstrukturen haben, wie z.B. Propidiumjodid (PI) mit roter Fluoreszenz für DNA-Messungen. Zum

anderen können die Fluoreszenzfarbstoffe, wie z.B. Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) und Phycoerythrin (PE) an monoklonale Antikörper gebunden werden, die spezifisch für die zu untersuchenden Strukturen sind (Ormerod 1990; Raffael, Nebe et al. 1994).

Nach jeder Interaktion einer Zelle mit dem Laserstrahl werden FSC, SSC und die Fluoreszenz(en) gemessen. Beim Durchflußzytometer finden sich zwei Arten von Detektoren: erstens die Photodiode, die ein Detektor mit einer geringen Lichtempfindlichkeit ist und Verwendung bei der Messung relativ intensiver Lichtsignale wie dem Vorwärtsstreulicht findet. Zweitens der *photomultiplier* (Photoröhre), der in der Lage ist, ein sehr schwaches Lichtsignal um mehrere Größenordnungen zu verstärken. Zur Verstärkung der schwächeren Fluoreszenz- und Seitwärtsstreulichtsignale werden daher Photomultiplier eingesetzt (Raffael 1987).

Ein Analog-Digital-Wandler (ADC) konvertiert das analoge in ein digitales Signal um. Die gemessenen Signale werden dabei je nach der Auflösung des ADC in 256, bzw. 1024 Kanäle getrennt. Zusätzlich besteht die Möglichkeit, einen elektronischen Schwellenwert (*threshold*), der sich auf einen bestimmten Auslöseparameter bezieht (z.B. Vorwärtsstreulicht), miteinzubeziehen. Diese Einstellung wird häufig genutzt, um Rausch- und Störsignale zu reduzieren (Longobardi Givan 1992; Eckhardt 1994).

Die Wahl der Signalverstärkung hängt von der untersuchten Zellpopulation und -eigenschaft ab. So stehen zwei Arten der Signalverstärkung, eine lineare und eine logarithmische, zur Verfügung. Bei Parametern, die einen großen Bereich von Kanälen benötigen, kommt die logarithmische Verstärkung in einem Bereich von 4 Dekaden (1 bis 10.000 logarithmischen Skalenkanälen) zum Einsatz. Für die meisten Anwendungen werden Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht jedoch linear und die Fluoreszenz logarithmisch verstärkt (Raffael, Nebe et al. 1994).

Während der Messung besteht weiterhin die Möglichkeit, durch Vorgabe von Begrenzungen (*gate*) nur solche Zellen zuzulassen, die aufgrund ihrer Parameter einer bestimmten Zellpopulation zugeordnet werden können (Eckhardt 1994). Für die Analyse dieser Daten werden leistungsfähige Computerprogramme benötigt, welche die Möglichkeit bieten, die Einzelparameter in beliebigen Kombinationen darzustellen. Die einfachste Art der Meßdatendarstellung ist die Histogramm- oder Häufigkeitsverteilung (Einparameterdarstellung) in linearer oder logarithmischer

---

Auflösung. Korrelierte Zweiparameterdarstellungen zeigen die Relation zweier verschiedener Eigenschaften einer Zelle. Hierfür bieten sich die Darstellung im Punkthistogramm (*dot plot*) sowie Konturlinien- und 3-dimensionale Darstellungen an (Ormerod 1990; Raffael, Nebe et al. 1994).

## 1.9.2 Monoklonale Antikörper

1984 erhielten Köhler und Milstein den Nobelpreis für Medizin für die Entwicklung der monoklonalen Antikörper (Köhler und Milstein 1975). Das von ihnen entwickelte Verfahren ermöglicht es, gegen nahezu jedes Antigen monoklonale Antikörper zu produzieren, wodurch der Medizin und anderen Bereichen neue Möglichkeiten der Diagnostik, aber auch der Therapie eröffnet wurden, die bis dahin konventionellen Nachweismethoden verschlossen blieben (Ernst 1987).

Die Herstellung monoklonaler Antikörper erfolgt mittels der Hybridomtechnik. Hierzu werden Lymphozyten aus der Milz einer immunisierten Maus isoliert und mit Myelomzellen fusioniert. Durch Zusatz von Polyethylenglycol (PEG) wird die Zahl der Fusionen erhöht. Die entstehenden Hybridome sind im Gegensatz zu den Lymphozyten potentiell unsterblich. Um nur die Hybridome zu gewinnen, wird für längere Zeit in einer Primärkultur mit HAT-Medium (Hypoxanthin, Aminopterin, Thymidin) inkubiert. Aminopterin blockiert die endogene Purinbiosynthese. Die Myelomzellen, denen im Gegensatz zu den Milzzellen das Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase-Enzym fehlt, können kein exogenes Hypoxanthin zur Purinsynthese verwenden und sterben ab. Die Milzzellen unterliegen nach 1 - 2 Wochen dem natürlichen Zelltod. So verbleiben in der Kultur nur die Hybridome, weil sie über die autonome Zellproliferation der Myelomzellen und dem HPRT-Enzym (Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase) der Milzzellen verfügen (Petrides 1990). Da von den Hybridomen nur einige wenige auch Antikörper bilden, müssen diese durch Verdünnung vereinzelt und anschließend durch Klonierung vermehrt werden. Unter diesen kann ein Klon, der Antikörper mit möglichst hoher Spezifität gegen das gesuchte Antigen produziert, ausgewählt werden (Steward und Male 1995).

Nach der Etablierung dieses Verfahrens entstanden viele nebeneinander existierende Nomenklaturen von Antikörpern, hervorgerufen aus der Entwicklung verschiedener Labore und kommerzieller Hersteller. Um eine Systematik in die



---

Vielfalt der Reagenzien zu bekommen, werden seit 1980 regelmäßig internationale Workshops eingerichtet. Monoklonale Antikörper, die das gleiche Zelloberflächenantigen erkennen, wurden zu sogenannten *Cluster of differentiation* (CD) zusammengefaßt (Bernard, Boumsell et al. 1984). Nach der CD-Klassifizierung folgen die typischen Zellpopulation und das Molekulargewicht des spezifischen Antigens in Kilodalton. Die voranstehenden Buchstaben p (*protein*), gp (*glycoprotein*), gl (*glycolipid*), CHO (*carbohydrate*) oder u (*unknown*) beschreiben das Antigen. Vorläufige Cluster-Definitionen werden als "CDw" gekennzeichnet.

Das Hauptanwendungsgebiet monoklonaler Antikörper findet sich in der Immunfluoreszenztechnik, wo sie u.a. zur Markierung von Zelloberflächen-Strukturen eingesetzt werden. Hier werden sie entweder direkt oder indirekt an einen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt. Bei der indirekten Markierung wird ein zweiter monoklonaler Antikörper, der gegen den ersten Antikörper gerichtet ist, zur Immunfluoreszenzmarkierung benötigt. Als weitere indirekte Markierung existiert die Biotin-Avidin-Methode. An den primären Antikörper wird ein Biotin-Molekül gekoppelt, das spezifisch Avidin bindet, welches wiederum den Farbstoff trägt (Tschöpe 1991). Vorteil der direkten Färbung ist eine schnelle und einfache Durchführung im Gegensatz zu den indirekten Färbemethoden. Ein Nachteil besteht allerdings in der unter Umständen nicht ausreichenden Fluorochromkonjugation für den Nachweis schwach exprimierter Antigenstrukturen. Im Routinelabor häufig verwendete Farbstoffe sind Phycoerythrin (PE) mit einer Fluoreszenz im roten Bereich (578 nm) des sichtbaren Lichtes sowie Fluorescein-Isocyanat (FITC) mit einer Fluoreszenz im grünen Bereich (525 nm), die beide mit dem Argonlaser angeregt werden können. Weiterhin ist bei der Wahl der Farbstoffkombinationen auf die relative Sensitivität der Fluorochrome zu achten. Da PE eine 10fach höhere Empfindlichkeit als z.B. FITC aufweist, empfiehlt es sich für schwach exprimierte Antigenstrukturen PE-konjugierte Antikörper einzusetzen (Raffael, Nebe et al. 1994).

### 1.9.3 Thrombozytenuntersuchung

Die Durchflußzytometrie ist eine geeignete Methode zur Untersuchung von Thrombozyten-Formveränderungen sowie der Expression von struktur- und aktivierungsabhängigen Antigenen. Wie bereits erwähnt, weisen Thrombozyten gegenüber anderen Blutzellen mehrere Besonderheiten auf. So reagieren sie empfindlich hinsichtlich einer Aktivierung, wie sie z.B. während der Blutentnahme oder Probenverarbeitung entstehen kann. Aus diesem Grund empfiehlt sich nach der Probenentnahme eine sofortige Fixierung und Stabilisierung der Thrombozyten. Weiterhin kann durch die Aufarbeitung von Vollblutproben auf Zentrifugationsschritte, wie sie für die Verarbeitung z.B. von plättchenreichem Plasma (PRP) notwendig wären, verzichtet werden. Thrombozyten sind sehr klein und ihre Streulichteigenschaften sind schwer exakt von Rauschsignalen oder Debris zu trennen, was eine Doppelmarkierung sinnvoll erscheinen läßt. Hierbei wird neben dem eigentlich interessierenden Antikörper mit einem zweiten spezifischen thrombozytären Antikörper (z.B. CD 42b) markiert. Mit Hilfe einer elektronischen Eingrenzung (*gate*), das die Fluoreszenz von CD42b erfaßt, wird somit eine immunologische Abgrenzung der Thrombozyten ermöglicht (Ruf und Patscheke 1996).

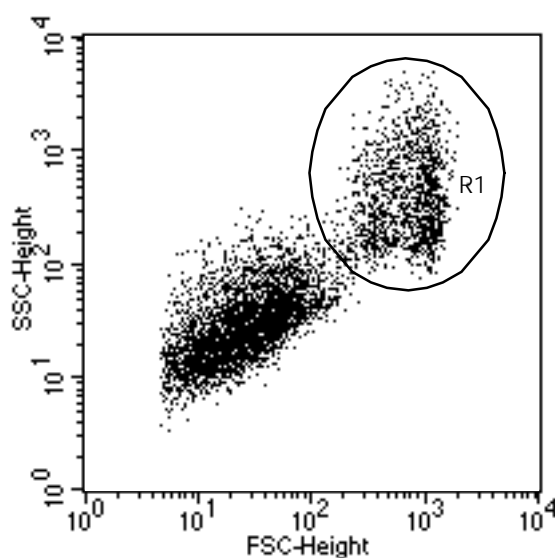


Abb. 1 Darstellung einer durchflußzytometrischen Vollblutanalyse im FSC/SSC. Die Thrombozyten befinden sich vorwiegend in den ersten beiden Dekaden, während die Leukozyten und Erythrozyten vor allem in der dritten und vierten Dekade zu finden sind (gate R1).

### 1.9.4 Leukozytenuntersuchung

Die Leukozyten- und speziell Lymphozytenanalyse war eines der ersten Einsatzgebiete der Durchflußzytometrie und ist inzwischen weit entwickelt (Wright, Lazarus et al. 1995). Leukozyten lassen sich aufgrund ihrer Lichtbrechungseigenschaften durchflußzytometrisch orientierend in Monozyten, Granulozyten und Lymphozyten differenzieren. Hierzu müssen jedoch andere Zellen, z.B. Erythrozyten, zuvor über einen Lyseschritt aus dem Vollblut entfernt werden. Um auf eine Dichtegradientenzentrifugation zu verzichten und somit einen unbeabsichtigten Ausschluß einzelner Leukozytensubpopulationen vermeiden zu können, bietet sich die Immunfluoreszenzmarkierung an. Durch die Anwendung von bis zu drei verschiedenen monoklonalen Antikörpern mit unterschiedlicher Farbmarkierung und durch Setzen von Meßfenstern über mehrere Parameter im "mehrdimensionalen Raum" läßt sich die Abgrenzung der Lymphozyten von Monozyten und Granulozyten in der Vollblutprobe wesentlich verbessern (Wright, Lazarus et al. 1995).

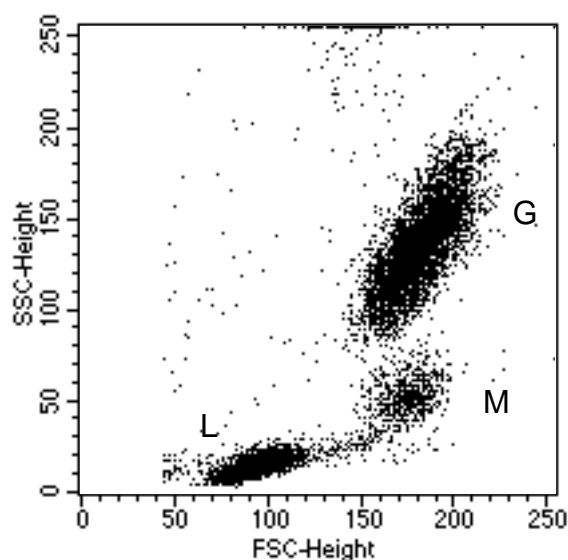


Abb. 2 Durchflußzytometrische Darstellung einer lysierten Vollblutprobe im FSC/SSC. Die Punktwolken repräsentieren die einzelnen Leukozytensubpopulationen. G = Granulozyten, M = Monozyten, L = Lymphozyten.

---

## 2. Material und Methode

### 2.1 Auswahl der Spender

In die Studie wurden 10 Blutspender eingeschlossen, die zum Spenderkollektiv des Bluttransfusionsdienstes (BTD) im Universitäts-Krankenhaus Eppendorf in Hamburg gehörten. Sie erfüllten die Anforderungen der Deutschen Gesellschaft für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie bezüglich der Thrombozytapherese (Kretschmer, Borberg et al. 1987). Diese fordert eine Thrombozytenzahl zwischen 120.000 - 500.000 Zellen/ $\mu$ l Blut. Die Leukozytenzahl sollte nicht unter 4.000 Zellen/ $\mu$ l und nicht über 10.000 Zellen/ $\mu$ l liegen (Kretschmer, Borberg et al. 1987).

Neben den bereits erwähnten Empfehlungen wurden für die Studie weitere Ein- und Ausschlusskriterien aufgestellt, von denen bekannt ist, daß sie einen relevanten Einfluß auf die durchflußzytometrische Untersuchung von Thrombozyten und Leukozyten nehmen (Zatta und Prosdocimi 1990; Gabriel 1994).

Mindestens 10 Tage vor der Zellseparation nahmen die Probanden keine plättchenaggregationshemmenden Medikamente wie z. B. Acetylsalicylsäure ein. Weiterhin sollte drei Tage vor der Spende schwere körperliche Aktivität (z.B. Sport) vermieden werden, da neben einer Thrombozytenaktivierung ebenso die Leukozytensubpopulationen in ihrer Absolutzahl als auch in ihrer relativen Verteilung beeinflusst werden (Gabriel 1994). Ein Nikotinkonsum mußte in den letzten drei Tagen vor der Spende vermieden werden (Zatta und Prosdocimi 1990). Als weitere Ausschlusskriterien galten chronische Erkrankungen wie z.B. Hypertonus, Diabetes mellitus und Hypercholesterinämie.

Es wurden die Thrombozytenzahl, das mittlere Thrombozytenvolumen, Hämatokrit, Hämoglobin sowie die Leukozyten und Erythrozytenzahl bestimmt.

### 2.2 Thrombozytapherese

Die Thrombozytapherese wurde an der COBE Spectra™ (COBE Laboratories, Lakewood, USA) mit kontinuierlichem Blutfluß durchgeführt. Es wurde ein "Zweinadel-Langzeit-Thrombozyten-Set" verwendet (COBE). Die Gesamtdauer der

Apherese wurde jeweils auf 60 Minuten angesetzt. Als Antikoagulanzen wurde ACD-Lösung (*acid-citrate-dextrose*) eingesetzt (Baxter, Deutschland). Durch Eingabe von Geschlecht, Körpergewicht und Thrombozytenzahl des Probanden wurden alle weiteren Aphereseparameter wie z.B. AK-Infusionsrate, Blutflußrate von der Software des Zellseparators berechnet.

### 2.3 Durchflußzytometer

Gemessen wurde am FACScan<sup>®</sup> (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland) mit der Software CELLQuest<sup>™</sup> (Becton Dickinson). Das Gerät ist mit einem luftgekühlten Argon-Ionen-Laser (15mW, 488nm) ausgestattet. Aufgrund täglicher Schwankungen der Laserleistung wurden jeweils vor Meßbeginn das Durchflußzytometer mit fluoreszierenden Kunststoffbeads (Calibrite<sup>®</sup>, Becton Dickinson) eingestellt.

Die durchflußzytometrische Untersuchung der Thrombozyten und Leukozyten erfolgte mit Ausnahme der Lichtstreuung in einer logarithmischen Verstärkung der Fluoreszenzen. Im Rahmen der Thrombozyten- und neutrophilen Granulozyten-Untersuchungen wurden 5.000 Ereignisse, im Rahmen der Monozyten-Untersuchung 2.500 Ereignisse pro Probe akquiriert.

### 2.4 Probenentnahme

Generell führt jede Blutentnahmetechnik zu einer Gefäßverletzung und damit zu einer Aktivierung der Hämostase, die insbesondere die Thrombozyten miteinschließt. Ziel ist es, den "in-vivo"-Zustand der Thrombozyten möglichst zu bewahren, um eine Voraussetzung für die optimale Interpretation der Meßwerte zu schaffen. Daher steht bei der Thrombozytenuntersuchung eine standardisierte Materialvorbereitung und Probenentnahme im Vordergrund, d.h. die Blutentnahmetechnik muß schonend vorgenommen werden und das gewonnene Untersuchungsmaterial sofort mit den, für die einzelnen Untersuchungen verschiedenen Fixantien und Stabilisatoren versetzt werden (Tschöpe 1994).

Die erste Blutentnahme erfolgte zwischen 7.15 Uhr und 7.30 Uhr am sitzenden Spender. Unmittelbar vor Beginn der Zellseparation wurde eine Probe entnommen, um einen Ausgangswert zu erhalten. Die venöse Stauung belief sich, zu Beginn wie

auch während der Apherese, maximal auf 40 mmHg. Verwendet wurde die am Einmalsystem befindliche Hämodialyse-Dauerkanüle 16G (Baxter, Dialyse-Technik GmbH, Ettlingen, Deutschland). Zur Probenentnahme wurde ein 3-Wege-Hahn (pvb medizintechnik GmbH, Kirchseeon, Deutschland) zwischen der Hämodialyse-Dauernadel und dem zum Zellseparator zuführenden Schlauchsystem (Zulauf) geschlossen. Am verbleibenden Zugang des 3-Wege-Hahns befand sich ein 10 cm langes, offenes Schlauchstück (Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland), worüber die Probenentnahme erfolgte. Um den Einfluß von Scherkräften möglichst gering zu halten, ließ man das Blut direkt in die vorbereiteten Probenentnahmeröhrchen tropfen.

Für jede weitere Probenentnahme wurde ein neues Schlauchstück verwendet und die ersten 2 ml des neu gewonnenen Blutes verworfen, um eine Verfälschung mit "aktivierten" Thrombozyten und Leukozyten, die sich in der Entnahmeverrichtung abgeschieden hatten, zu vermeiden. Die weiteren Probenentnahmen erfolgten zu den Zeitpunkten 15, 30 und 60 Minuten.

Entsprechend den einzelnen Untersuchungen wurden unterschiedliche Probenentnahmeröhrchen eingesetzt, für die Untersuchung der Blutgerinnungsparameter Citrat-Monovetten (Sarstedt, Nuembrecht, Deutschland), für die Blutbildbestimmung EDTA-Monovetten (Sarstedt) und für die durchflußzytometrischen Untersuchungen Polypropylen-Reagenzröhrchen (Sarstedt) bzw. EDTA -Monovetten (Sarstedt).

## 2.5      Aufbereitung des Untersuchungsmaterials und durchflußzytometrische Messung der Thrombozyten

### 2.5.1    Fixierung und Stabilisierung

Die Vollblutprobe wurde direkt in ein Polypropylen-Reagenzröhrchen übergeführt und sofort fixiert. Die Fixierungslösung setzte sich zusammen aus Glyoxal (Merck, Darmstadt, Deutschland) 40%ig in Aqua dest. gelöst, Paraformaldehyd (Merck) 10%ig in Aqua dest. gelöst und Phosphatpuffer (Merck)  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$  und  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ , beide 0,15 M gelöst in Aqua dest. Der Ansatz wurde vorsichtig durchmischt und anschließend 10 Minuten bei Raumtemperatur ( $20 \pm 2^\circ\text{C}$ ) inkubiert. Ein Aliquot der fixierten Probe wurde entnommen und mit Glycin (Serva

---

Feinbiochemica, Heidelberg, Deutschland), 0,2%ig in Aqua dest. gelöst, versetzt. Die so stabilisierte Probe konnte bis zur Markierung mit den monoklonalen Antikörpern bei einer Temperatur von 4°C gelagert werden.

### 2.5.2 Markierung mit monoklonalen Antikörpern

Es wurde eine Färbung mit direkt FITC-, bzw. PE- konjugierten, monoklonalen Antikörpern (Becton Dickinson) durchgeführt. Zur Untersuchung der Thrombozyten wurden als Marker für Strukturproteine CD41a und CD42b ausgewählt. Um die aktivierungsabhängigen Glykoproteine zu markieren, wurde CD62p verwendet. Die zuvor austitrierte Antikörperlösung wurde in ein Polystyrene-Meßröhrchen (12x75 mm Falcon-Röhrchen, Becton-Dickinson) vorgelegt. Auf jeden Antikörperansatz wurde ein Aliquot des fixierten und stabilisierten Vollblutansatzes pipettiert. Anschließend wurde "gevortext" und für 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nach der Inkubation wurde der Ansatz mit phosphat-gepufferter physiologischer Kochsalzlösung (Life Technologies GmbH, Eggenstein, Deutschland) versetzt. Eine unspezifische Maus-IgG-Isotyp-Kontrolle wurde zum Zweck der Negativkontrolle analog angesetzt.

### 2.5.3 Messung am Durchflußzytometer

Die Analyse der Ansätze erfolgte innerhalb von sechs Stunden am Durchflußzytometer. Zunächst wurde über eine FSC-/SSC-Darstellung eine grobe Abgrenzung der einzelnen Blutzellen über deren Streulichteigenschaften durchgeführt. Durch Setzen entsprechender Begrenzungen (*gate*) in der oben genannten Darstellung war es möglich, nur die Ereignisse zu berücksichtigen, die innerhalb dieses eingegrenzten Bereiches lagen. Aufgrund der Verwendung von Vollblutproben mußten die Thrombozyten mittels Doppelmarkierung über ein thrombozytenspezifisches Antigen identifiziert werden. Zur exakteren Abgrenzung der Thrombozyten, z.B. gegenüber Erythrozyten, erfolgte eine zweite Eingrenzung mittels dem stark exprimierten Antigen CD42b. Das Setzen der Meßbereiche erfolgte in der am Histogramm dargestellten Fluoreszenz in logarithmischer Skalierung. Um Zelldebris und Rauschsignale auszuschließen, wurde ein Schwellenwert (*threshold*) eingestellt.

## 2.5.4 Durchflußzytometrische Auswertung

Zur Auswertung der durchflußzytometrischen Messungen wurde die Software CELLQuest™ (Becton Dickinson) verwendet. Da sowohl Thrombozyten als auch monoklonale Antikörper eine unspezifische Eigenfluoreszenz besitzen, ist es bei den Untersuchungen erforderlich, die unspezifische Fluoreszenz (Negativkontrolle) in die Auswertung mit einzubeziehen. Als ein "positives" Ereignis galt jedes Fluoreszenzsignal, das höher als die Fluoreszenz der Isotyp-Kontrolle lag. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des "overlay-mode", d.h. die für die Antigenstruktur spezifische Fluoreszenz wurde mit der Fluoreszenz der Negativkontrolle in einem Histogramm überlagert und subtrahiert. Für die Darstellung der Ergebnisse diente die *mean channel fluorescence intensity* (MCFI).

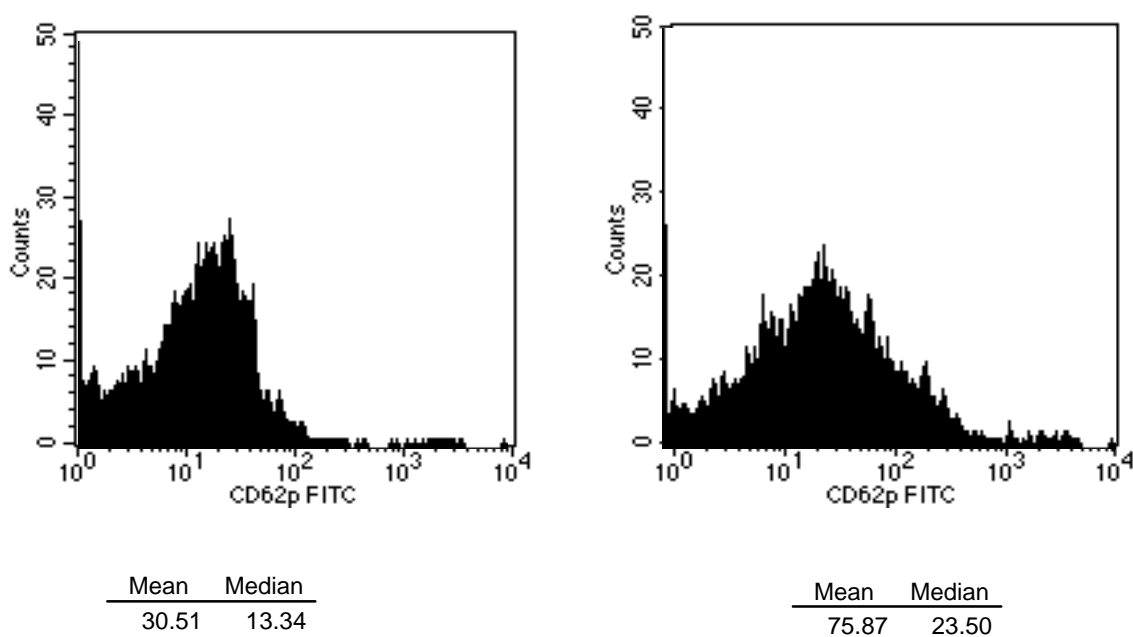


Abb. 3 Expression der spezifischen Fluoreszenz von CD62p auf der Oberfläche von Thrombozyten. Links die Fluoreszenz von ruhenden Thrombozyten, rechts dagegen die von aktivierten Thrombozyten, erkennbar am nach links verschobenen *mean* auf der x-Achse.



## 2.6 Aufbereitung des Untersuchungsmaterials und durchflußzytometrische Messung der Leukozyten

### 2.6.1 Fixierung und Stabilisierung

Die Vollblutprobe wurde direkt in eine EDTA-Monovette überführt und vorsichtig geschwenkt. Anschließend erfolgte die Fixierung mit 5%igen Phosphatpuffer (Merck)  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$  und  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ , jeweils 0,15 M gelöst in Aqua dest. Die so vorbereitete Probe konnte bis zur Markierung mit den monoklonalen Antikörpern bei einer Temperatur von 4°C gelagert werden.

### 2.6.2 Markierung mit monoklonalen Antikörpern

Es wurde eine Färbung mit direkt FITC-, PE-, bzw. PE-Cy5- konjugierten Antikörpern durchgeführt. Um die Auftrennung der Leukozytenpopulationen in neutrophile Granulozyten und Monozyten zu ermöglichen wurde eine Dreifachmarkierung durchgeführt unter Kombinationen der Antikörper CD3, CD14, CD19 und CD45 (Becton Dickinson). Zur Untersuchung aktivierungsabhängiger Epitope wurden die Antikörper CD11a, CD11c und CD18 der Firma Coulter-Immunotech (Hamburg, Deutschland) sowie CD11b und CD62L (Becton Dickinson) eingesetzt. Die zuvor austitrierte Antikörperlösung wurde in ein gekennzeichnetes Polysterene-Röhrchen (12x75 mm Falcon-Röhrchen, Becton-Dickinson) vorgelegt. Auf jeden Antikörperansatz wurde ein Aliquot des fixierten Vollblutansatzes pipettiert. Anschließend wurde "gevortext" und für 20 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert.

Zur Lysierung der Erythrozyten wurde 10 Minuten mit Lyse-Lösung (FACS<sup>®</sup> Brand Lysing Solution, Becton Dickinson) lysiert. Es folgte eine Zentrifugation von 5 Minuten bei 3,2xg. Der Überstand wurde dekantiert und der Bodensatz mit phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (PBS; siehe Kapitel 2.5.1) gewaschen. Nach dem Waschvorgang wurde der Ansatz mit PBS auf die gewünschte Zählrate eingestellt.

### 2.6.3 Messung am Durchflußzytometer

Die Analyse am Durchflußzytometer erfolgte direkt im Anschluß. Zur Messung der Leukozytensubpopulationen wurde eine *gate*-Kombination aus mehreren Darstellungsdiagrammen konzipiert. Zunächst erfolgte über eine FSC-/SSC-Darstellung eine erste Eingrenzung der Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten. Jeder einzelnen Subpopulation konnte in der FSC-/SSC-Darstellung ein charakteristisches Muster und spezielle Lokalisation zugeordnet werden. Hierbei konnte jedoch nicht ausgeschlossen werden, daß einzelne Zellen einer Subpopulationen in eine andere hineinstreuen und somit nicht erfaßt wurden. Um einen selektiven Zellverlust bzw. -zunahme zu verhindern, wurden zusätzliche Parameter in die Messung einbezogen. Durch gezielte Kombination der Fluoreszenzfarbstoffe und Darstellung, der für die Subpopulation typischen Rezeptoren, wurden weitere *dot-plot*-Diagramme erstellt. Aus der *gate*-Kombination der einzelnen Diagramme erhielt man schließlich eine Schnittmenge, d.h. nur die Signale, die in allen Parametern wie FSC, SSC, Fluoreszenz etc. der jeweiligen Subpopulation entsprachen, wurden als positives Ergebnis gewertet.

### 2.6.4 Durchflußzytometrische Auswertung

Die Auswertung erfolgte analog der durchflußzytometrischen Auswertung der Thrombozyten (siehe Kapitel 2.5.4).

## 2.7 Statistik

Aus den erhaltenen Meßwerten der durchflußzytometrischen Untersuchung wurde, aufgrund natürlicher großer interindividueller Schwankungen, eine Mittelwertnormierung der *mean channel fluorescence intensity* (MCFI) durchgeführt (die Originalwerte sind im Anhang aufgeführt). Das heißt, daß zunächst aus den vier Einzelwerten (0, 15, 30 und 60 min) jedes Spenders und Markers der Mittelwert gebildet wurde. Anschließend wurde jeder Einzelwert durch den Mittelwert dividiert. Die hieraus normierten Werte wurden zur deskriptiv-statistischen Darstellung verwendet. Ein Nachteil dieses Verfahrens besteht darin, daß die Absolutwerte nicht erkennbar sind. Der Vorteil beruht jedoch darauf, daß die Werte untereinander leichter erfaßbar und besser vergleichbar sind.

Zur Untersuchung des Ausmaßes der Antigenalteration an Thrombozyten und Leukozyten wurde der Friedman-Test angewandt. Dieser ist ein nichtparametrischer Test, der außer rangskalierten Daten keine Voraussetzungen benötigt. Für die vorliegende Untersuchung wurden jedoch folgende Bedingungen zugrunde gelegt:

- Probandenspezifische Unterschiede in der Aktivierung der Strukturantigene waren in der Untersuchung nicht von Interesse.
- Eine zeitlich konstante Zunahme der Antigene wurde nicht vorausgesetzt.
- Gearbeitet wurde mit der *mean channel fluorescence intensity* (MCFI) des entsprechenden Antigens, deren Werte entsprechend aufsteigende Ränge zugeteilt wurden.

Die Daten wurden auf einem Signifikanzniveau von  $\alpha = 0,01$  untersucht. War der berechnete Wert gleich oder größer als der kritische Tabellenwert (Sachs 1984), so war die Nullhypothese abzulehnen und somit ein signifikanter Einfluß auf die jeweils untersuchten Antigene während der Thrombozytapherese bewiesen.

Die statistischen Auswertungen erfolgten mit der Statview<sup>®</sup> Software (Abacus Concepts Inc., Berkeley, USA).

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Spenderkollektiv

Das Spenderkollektiv teilte sich auf in 5 weibliche Spender mit einem Alter zwischen 25 - 50 Jahren (Durchschnittsalter 39,8 Jahre) und 5 männlichen Spendern mit einem Alter zwischen 28 - 37 Jahren (Durchschnittsalter 32,8 Jahre).

#### 3.2 Thrombozytapherese

Die durchschnittliche Flußrate betrug 49,8 ml (min. 44,3 ml; max. 60,0 ml), das durchschnittlich prozessierte Gesamtvolumen 3205 ml (min. 2700 ml; max. 4080 ml) und das mittlere Produktvolumen belief sich auf 255,3 ml (min. 190,0 ml; max. 300,0 ml).

#### 3.3 Laboranalytische Untersuchungen

Während der Thrombozytapherese kam es im Blut der Spender zu einer Reduzierung der Thrombozytenzahl (Abb. 4) von  $264.000/\mu\text{l} \pm 82.000/\mu\text{l}$  auf  $184.000/\mu\text{l} \pm 81.000/\mu\text{l}$  (mittlerer Thrombozytenabfall 30,9 %).

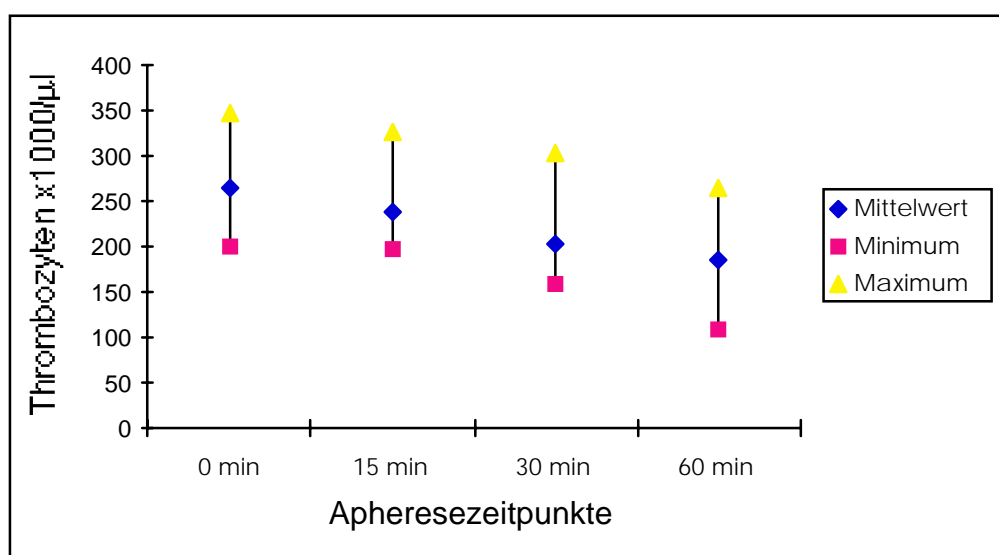


Abb. 4 Das Diagramm zeigt die Abnahme der Thrombozytenzahl ( $\times 10^3$  pro  $\mu\text{l}$ ) im Blut der Spender ( $n=10$ ), im Verlauf der Apherese.

Eine Abnahme der Gesamt-Leukozytenzahl konnte bei 9/10 Spendern beobachtet werden von  $7,1 \times 10^3/\mu\text{l} \pm 3,7 \times 10^3/\mu\text{l}$  auf  $6,2 \times 10^3/\mu\text{l} \pm 2,6 \times 10^3/\mu\text{l}$ . Der mittlere Abfall betrug 14,9 %, bei einer maximalen Leukozytenreduktion von 21,4 % und einer minimalen Reduktion von 6,2 %.

Im Rahmen der Thrombozytapherese kam es innerhalb der ersten 15 Minuten zu einem Abfall der Erythrozytenzahl von durchschnittlich  $4,3 \text{ Mio}/\mu\text{l} \pm 0,9 \text{ Mio}/\mu\text{l}$  auf  $4,1 \text{ Mio}/\mu\text{l} \pm 0,9 \text{ Mio}/\mu\text{l}$  Erythrozyten (mittlerer Erythrozytenabfall 5,5%), der sich primär in den ersten 15 Minuten der Apherese manifestierte. Einen analogen Verlauf zeigten die Hämatokrit- und Hämoglobinwerte. Der Hämatokritwert fiel bei einem durchschnittlichen Ausgangswert von  $38 \% \pm 5 \%$  auf  $36 \% \pm 3 \%$  nach 15 Minuten und blieb bis zum Ende der Apherese konstant ( $36 \% \pm 4 \%$ ). Ein Abfall des Hämoglobinwertes von durchschnittlich  $13 \text{ g/dl} \pm 3 \text{ g/dl}$  auf  $12 \text{ g/dl} \pm 2 \text{ g/dl}$  erfolgte bis zur 15. Minute und blieb bis zum Ende der Apherese konstant ( $12 \text{ g/dl} \pm 2 \text{ g/dl}$ ).

### 3.4 Durchflußzytometrische Untersuchungen

#### 3.4.1 Thrombozytenergebnisse

In Abbildung 5 und 6 sind die normierten Mittelwerte der MCFI von CD41a und CD62p im Verlauf der Apherese dargestellt. Sowohl am aktivierungsabhängigen Marker CD62p, wie auch am strukturabhängigen Glykoprotein CD41a ist in der graphischen Darstellung eine Zunahme der MCFI nach 30 Minuten zu erkennen. Eine objektive Bewertung wird mit Hilfe der Statistik möglich.

Der CD41a-Marker wurde auf einem Niveau von  $\alpha = 0,01$  untersucht. Bei der durchflußzytometrischen Auswertung zeigt sich bei allen 10 Spendern nach 60 Minuten ein signifikanter Anstieg der MCFI des strukturabhängigen Antigens CD41a ( $p < 0,01$ ) gegenüber dem Ausgangswert. Eine maximale Zunahme der MCFI erreichen 10/10 Spender im Zeitraum zwischen 30 bis 60 Minuten, 3/10 bereits nach einem Verlauf von 30 Minuten.

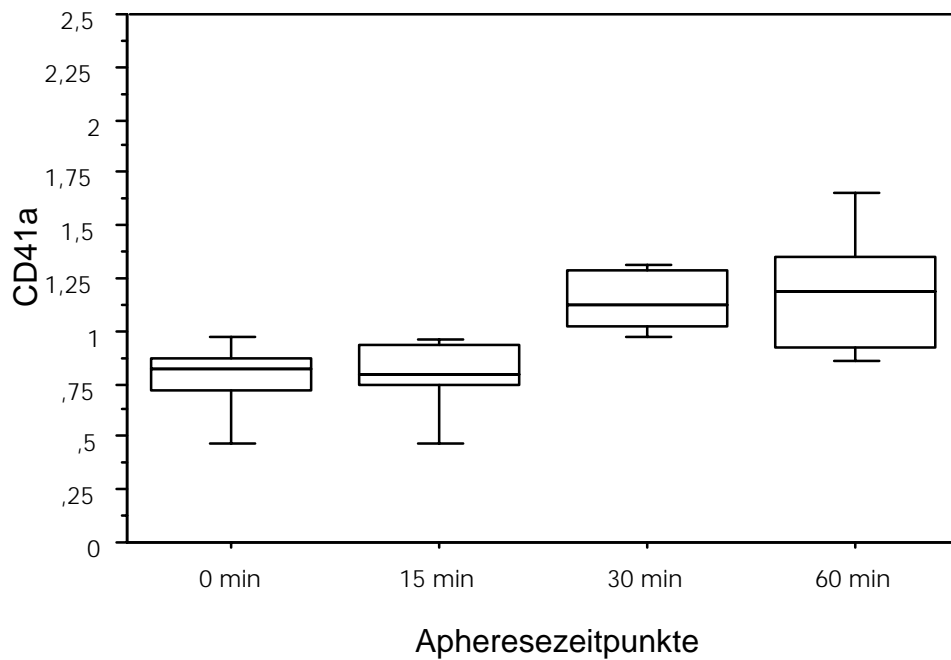


Abb. 5 Antigenalteration von CD41a (normierte Mittelwerte der MCFI) im Verlauf der Apherese. Dargestellt in einem Box-plot-Diagramm. In die Box fallen 50% der Meßwerte, der Balken innerhalb der Box entspricht dem Median. Die Vertikalen sind bis zu den Extremwerten ausgezogen.

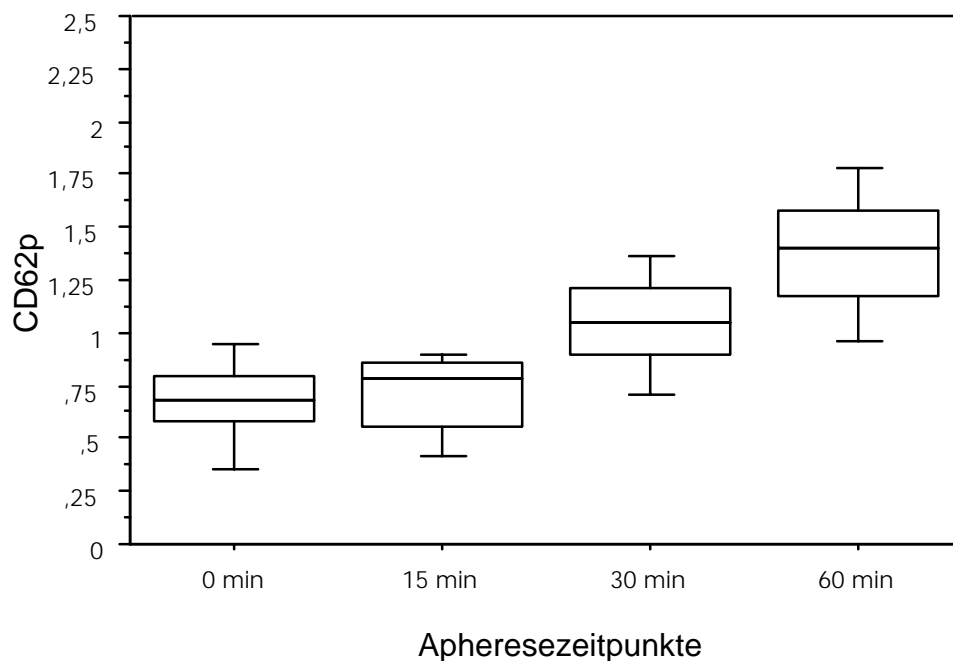


Abb. 6 Verlauf der Antigenexpression von CD 62p (normierte Mittelwerte der MCFI) während der Apherese.

Neben dem strukturabhängigen Glykoprotein CD41a wurde der aktivierungsabhängige Marker CD62p im Verlauf der Apherese untersucht. Hier zeigt sich ebenso wie bei CD41a nach 60 Minuten bei 10/10 Spendern auf dem Niveau  $\alpha = 0,01$  eine signifikante Zunahme ( $p < 0,01$ ) der MCFI. Die maximale MCFI erreichen 8/10 Spender nach 60 Minuten, 2/10 Spendern bereits nach 30 Minuten, wobei sich ebenso wie bei CD41a auf einem Niveau von  $\alpha = 0,01$  signifikante Unterschiede aufzeigen lassen ( $p < 0,01$  für CD41a und CD62p) (Tab. 1).

Tab. 1 Veränderung der normierten Mittelwerte der (MCFI) des strukturabhängigen Markers CD41a und des aktivierungsabhängigen Markers CD62p über den Zeitraum der Thrombozytapherese.

Monoklonaler Antikörper	0 min	15 min	30 min	60 min
CD 41a	0,77	0,78	1,21	1,24
Variationsbreite	0,54	0,51	1,35	1,03
CD 62 p	0,67	0,71	1,24	1,37
Variationsbreite	0,69	0,58	1,71	1,18

### 3.4.2 Leukozytenergebnisse

Für die Untersuchung der leukozytären Antigene wurden die Marker CD11a, CD11b, CD11c, CD18 und CD62L auf neutrophilen Granulozyten und Monozyten betrachtet und der Verlauf der MCFI während der Thrombozytapherese bestimmt (Tab. 2 und 3).

Tab. 2 Veränderung der normierten Mittelwerte der MCFI auf neutrophilen Granulozyten über den Zeitraum der Thrombozytapherese.

Monoklonaler Antikörper	0 min	15 min	30 min	60 min
CD 11a	1,07	1,05	0,98	0,90
Variationsbreite	0,16	0,31	0,20	0,22
CD 11b	0,64	0,68	1,20	1,48
Variationsbreite	0,74	0,68	0,94	1,35
CD 11c	0,82	0,79	1,13	1,26
Variationsbreite	0,54	0,48	0,49	0,84
CD 18	1,01	0,95	1,03	1,02
Variationsbreite	0,36	0,23	0,47	0,28
CD 62L	0,78	1,08	1,02	1,12
Variationsbreite	0,37	0,57	0,57	0,47



Tab. 3 Veränderung der normierten Mittelwerte der MCFI auf Monozyten im Verlauf der Thrombozytapherese.

Monoklonaler Antikörper	0 min	15 min	30 min	60 min
CD 11a	1,11	1,03	1,01	1,00
Variationsbreite	0,45	0,59	0,46	0,50
CD 11b	0,77	0,86	1,16	1,31
Variationsbreite	0,50	0,34	0,38	0,58
CD 11c	0,89	0,87	1,09	1,15
Variationsbreite	0,46	0,39	0,31	0,55
CD 18	1,11	0,98	0,96	0,95
Variationsbreite	0,21	0,24	0,26	0,25
CD 62L	0,81	1,12	1,00	1,07
Variationsbreite	0,34	0,73	0,67	0,57

Die graphische Darstellung des Glykoproteins CD11a auf neutrophilen Granulozyten (Abb. 7) zeigt eine kontinuierliche Abnahme der MCFI im Verlauf der Zytapherese. Auf einem Niveau von  $\alpha = 0,01$  kann ein signifikanter Verlauf dargestellt werden ( $p < 0,01$ ). Bei 9/10 Spendern kommt es innerhalb der ersten 30 Minuten zu einem Abfall der MCFI gegenüber dem Ausgangswert.

Die statistische Untersuchung der CD11a-Expression auf Monozyten zeigt einen analogen Verlauf zur CD11a-Alteration auf neutrophilen Granulozyten. Bei 9/10 Spendern kommt es nach 60 Minuten zu einer Abnahme der CD11a-Expression ( $p = 0,06$ ).

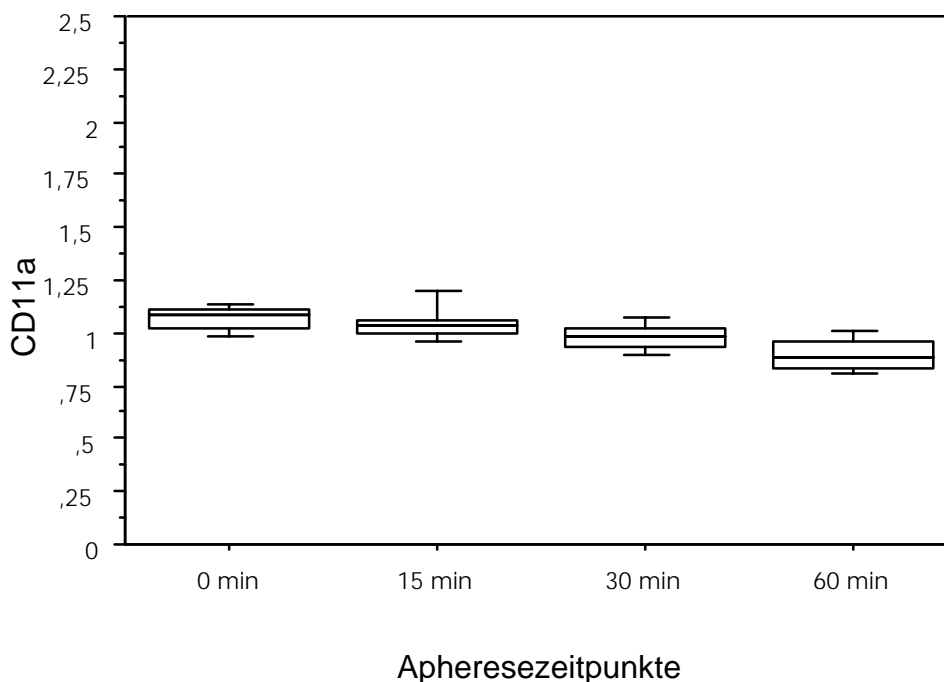


Abb. 7 Box Plot-Diagramm der normierten Mittelwerte der MCFI von CD11a auf neutrophilen Granulozyten im Verlauf der Apherese.

Wie bei den thrombozytären Markern CD41a und CD62p zeichnet sich auch bei den leukozytären Markern CD11b (Abb. 8 und 9) und CD11c (Abb. 11 und 12) auf neutrophilen Granulozyten und Monozyten im Verlauf der Zytapherese eine starke Zunahme der MCFI ab. Beide Marker zeigen gegenüber ihren Ausgangswerten bis zur 60. Aphereseminute einen signifikanten Anstieg. Betrachtet man die Rangverteilung der MCFI-Werte, so lassen sich bei den neutrophilen Granulozyten zwischen den Zeiträumen 0. bis 15. Aphereseminute und 30. bis 60. Aphereseminute eine geringgradige Zunahme feststellen, die statistisch betrachtet nicht signifikant ist ( $p = 1,0$ ).

Im Gegensatz zu der sprunghaften CD11b-MCFI-Zunahme bei den neutrophilen Granulozyten zeigen die Monozyten über den gesamten Verlauf der Apherese eine kontinuierliche Zunahme der CD 11b-Expression ( $p < 0,01$ ).

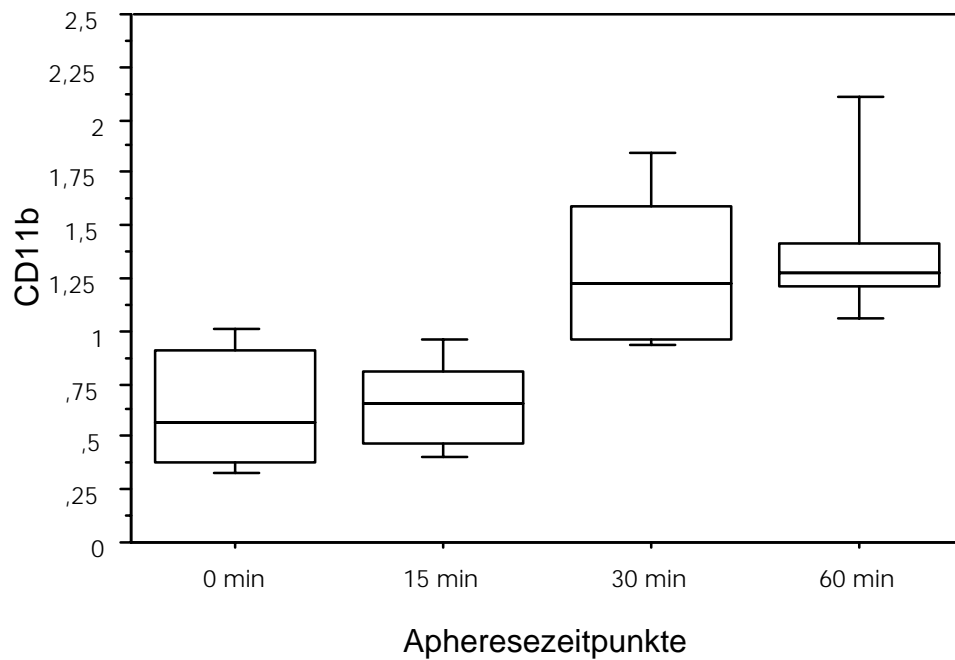


Abb. 8 Das Box Plot-Diagramm zeigt die normierten Mittelwerte der CD11b-MCFI auf neutrophilen Granulozyten im Verlauf der Apherese.

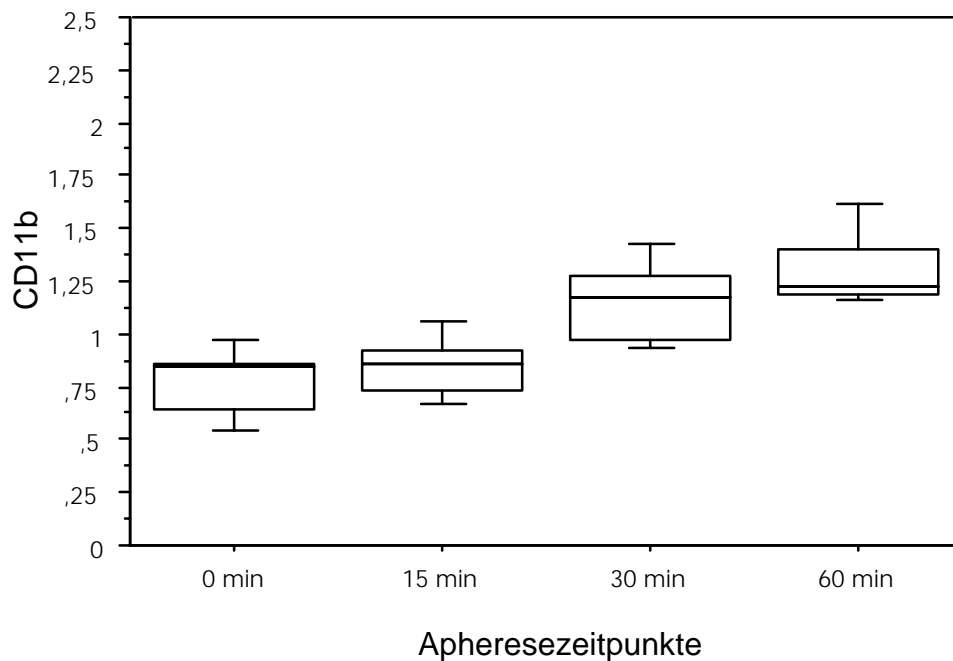


Abb. 9 Das Box Plot-Diagramm zeigt die normierten Mittelwerte der CD11b-MCFI auf Monozyten im Verlauf der Apherese.

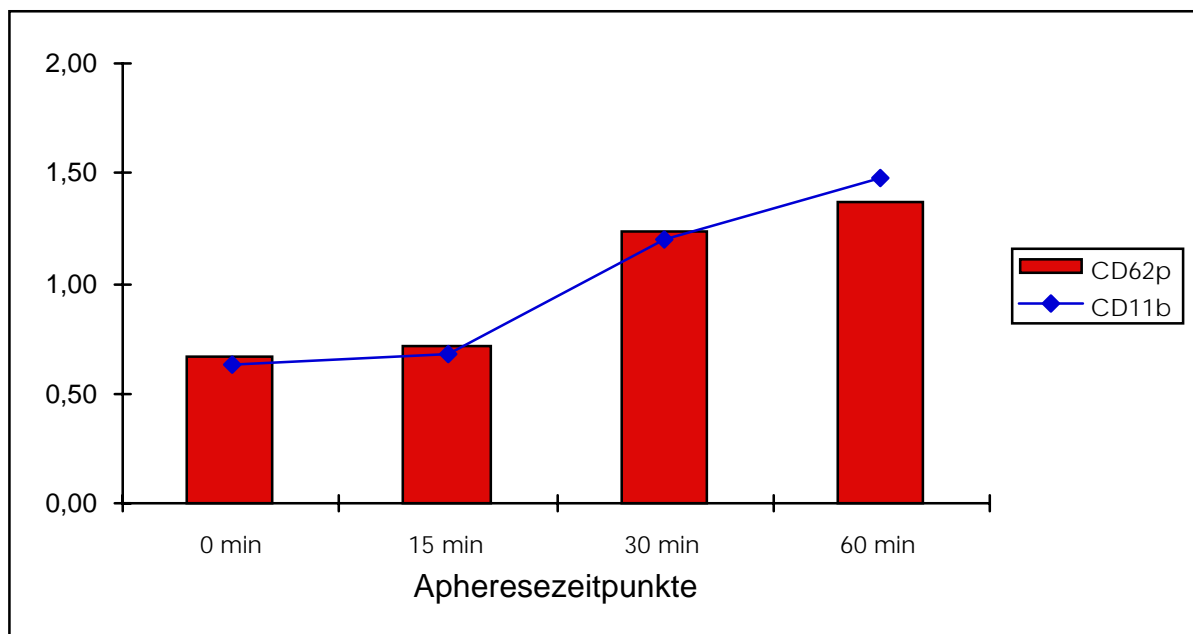


Abb. 10 Das Diagramm zeigt eine Gegenüberstellung der MCFI (normierte Mittelwerte) von CD62p (Thrombozytenantigen) und CD11b (Antigen auf neutrophilen Granulozyten).

Verschiedene Studien, die Interaktionsprozesse zwischen Leukozyten und Thrombozyten untersucht haben, postulieren gegenseitige Wechselbeziehungen (Lawrence und Springer 1991; Lorant, Patel et al. 1991). Vergleicht man die beiden Expressionsmuster von CD62p und CD11b, so zeigt sich ein nahezu paralleler Verlauf dieser beiden Marker (Abb. 10).

Bei näherer Betrachtung der Ergebnisse für den Marker CD11c auf neutrophilen Granulozyten (Abb. 11) erreichen 8/10 Spendern die höchste MCFI nach 60 Minuten, bei 9/10 Spendern bereits nach der 30. Minute ( $p < 0,05$ ).

Für die leukozytäre Subpopulation der Monozyten (Abb. 12) zeigt sich ein nahezu konformer Verlauf. Nach 30 Minuten werden maximale CD11c-Expressionen von 5/10 Spendern erreicht, zwischen der 30. und 60. Minuten erreichen alle Spender eine maximale CD11c-Expression ( $p < 0,01$ ).

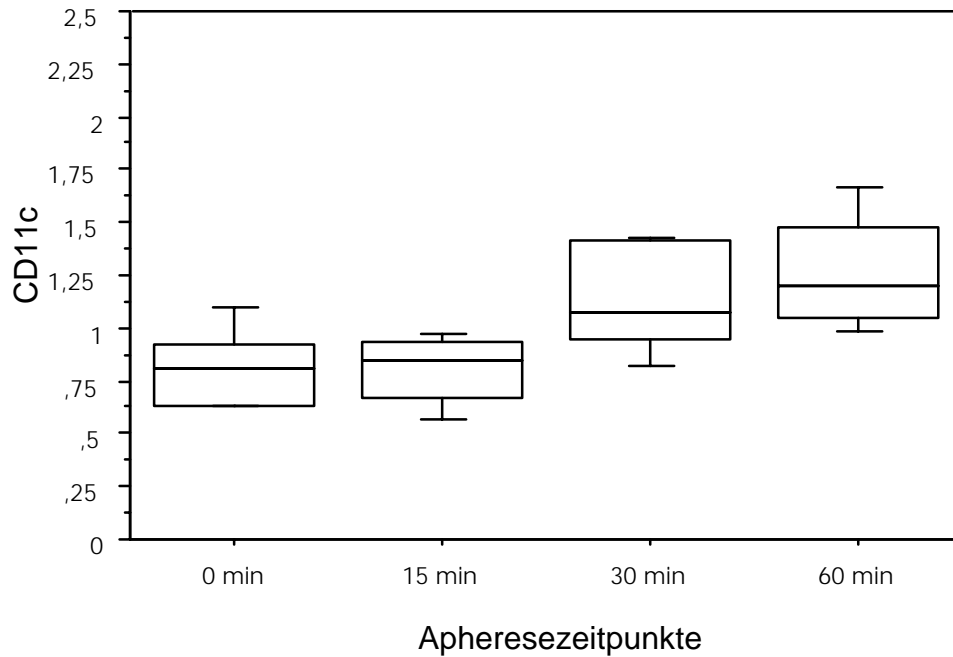


Abb. 11 Dargestellt ist die MCFI (normierte Mittelwerte) von CD11c auf neutrophilen Granulozyten im Verlauf der Apherese.

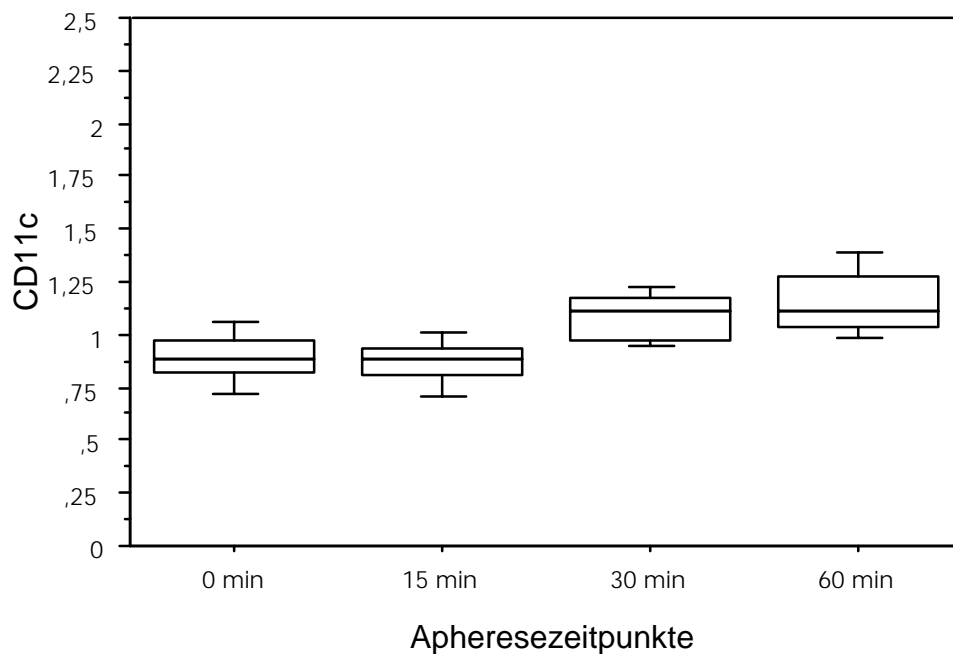


Abb. 12 Dargestellt ist die MCFI (normierte Mittelwerte) von CD11c auf Monozyten im Verlauf der Apherese.

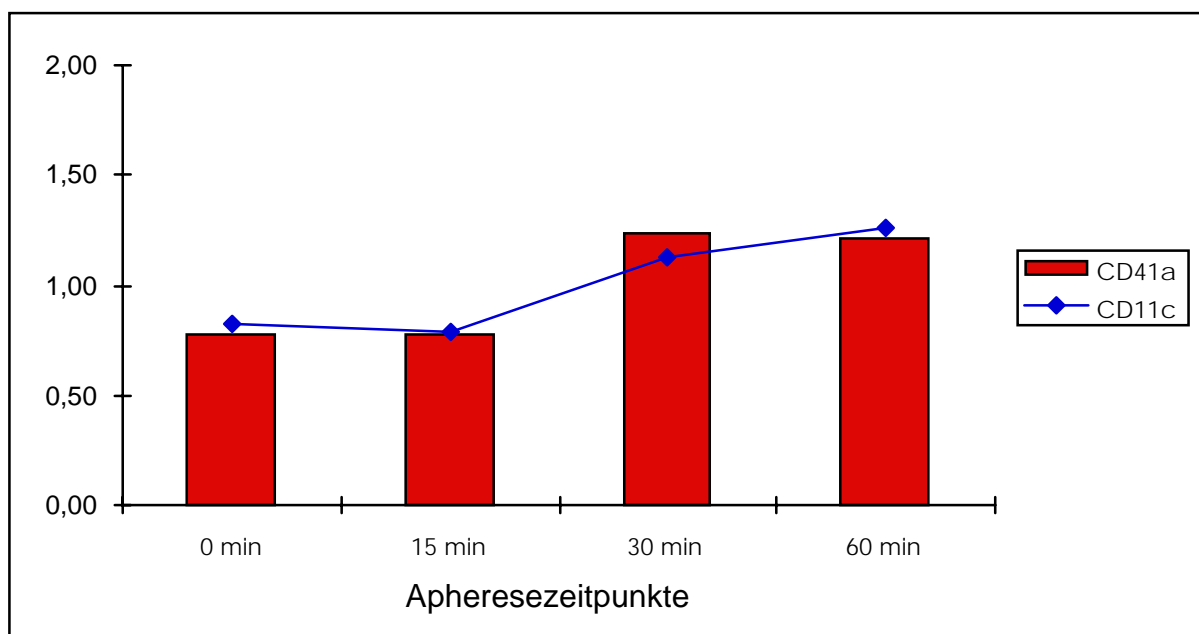


Abb. 13 Das Diagramm zeigt eine Gegenüberstellung der MCFI (normierte Mittelwerte) von CD41a (Thrombozytenantigen) und CD11c (Antigen auf neutrophilen Granulozyten).

Eine Beteiligung des thrombozytären Glykoproteins CD41a an Interaktionsprozessen zwischen Leukozyten und Thrombozyten wird aufgrund der Ergebnisse verschiedener Studien postuliert (Spangenberg, Redlich et al. 1993; Yeo, Sheppard et al. 1994). In der Gegenüberstellung von CD41a und CD11c zeigt sich im kinetischen Verlauf eine parallele Expressionszunahme (Abb.13).

Die graphische Darstellung von CD18 auf neutrophilen Granulozyten (Abb. 14) zeigt keine wesentlichen Veränderungen in der MCFI. Es trat keine signifikante Rangplatzverteilung in den Gruppen (0, 15, 30 und 60 Minuten) auf woraus im Friedman-Test keine signifikanten Veränderungen gegenüber den Ausgangswerten im Verlauf der Thrombozytapherese ( $p = 0,8$ ) resultieren.

Auf den Monozyten (Abb. 15) läßt sich gegenüber den neutrophilen Granulozyten eine signifikante Abnahme der MCFI im Verlauf der Apherese ermitteln ( $p < 0,01$ ). Bereits nach 15 Minuten kommt es zu einer signifikanten Abnahme der MCFI auf den Monozyten ( $p < 0,05$ ); zwischen der 15. und 60 Apherese minute erfolgen keine weiteren signifikanten MCFI-Veränderungen ( $p = 0,9$ ).

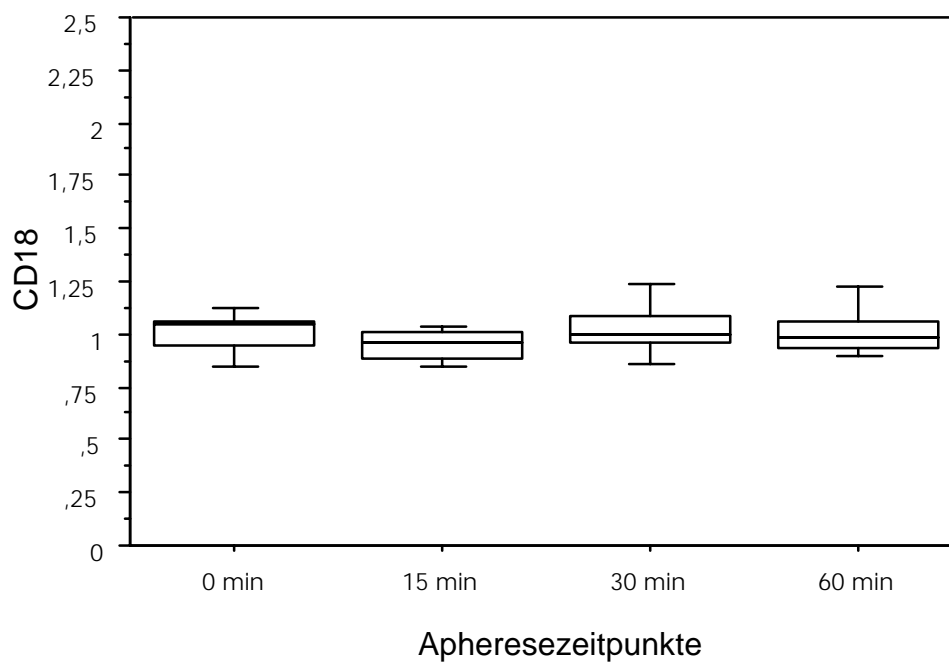


Abb. 14 Antigenalteration von CD18 auf neutrophilen Granulozyten (normierte Mittelwerte der MCFI).

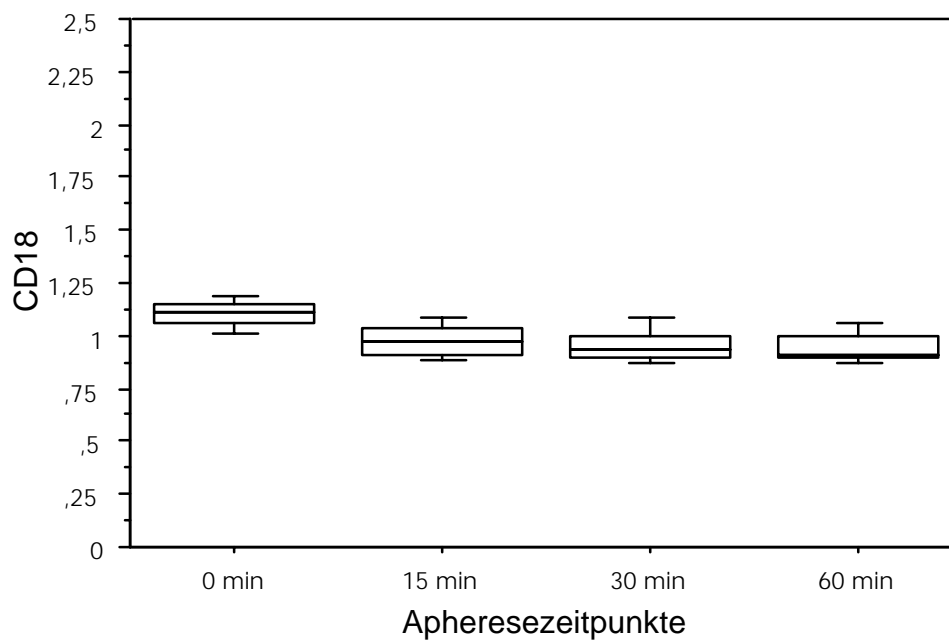


Abb. 15 Antigenalteration von CD18 auf Monozyten (normierte Mittelwerte der MCFI).

Aus der Gruppe der Selektine wurde der Marker CD62L untersucht. Bereits nach der 15. Apherese minute zeigte die leukozytäre Subpopulation der neutrophilen Granulozyten (Abb. 16) bei 10/10 Spendern einen Anstieg der MCFI, die sich statistisch belegen lässt ( $p < 0,05$ ). Im Gesamtverlauf, also vom Beginn der Apherese (0. Minute) bis zum Ende (60. Minute), bestätigt sich auf dem Niveau  $\alpha = 0,01$  eine Signifikanz ( $p < 0,05$ ) bei 10/10 Spendern. Betrachtet man die Rangverteilung zwischen der 15. und 60. Apherese minute, zeigen sich graphisch keine signifikanten Veränderungen, welches die statistische Auswertung bestätigt ( $p = 0,5$ ).

Eine analoger Verlauf der MCFI stellt sich bei den Monozyten dar. Über den gesamten Aphereseverlauf bestätigt sich nur auf dem Niveau  $\alpha = 0,05$  eine Signifikanz ( $p < 0,05$ ). Ebenso wie bei den neutrophilen Granulozyten zeigen sich ausschließlich zwischen der 0. und 15. Minute Apherese minute statistisch signifikante Veränderungen der MCFI ( $p = 0,08$ ), zwischen der 15. und 60. Apherese minute ergeben sich dagegen keine signifikanten Veränderungen ( $p = 0,74$ ).

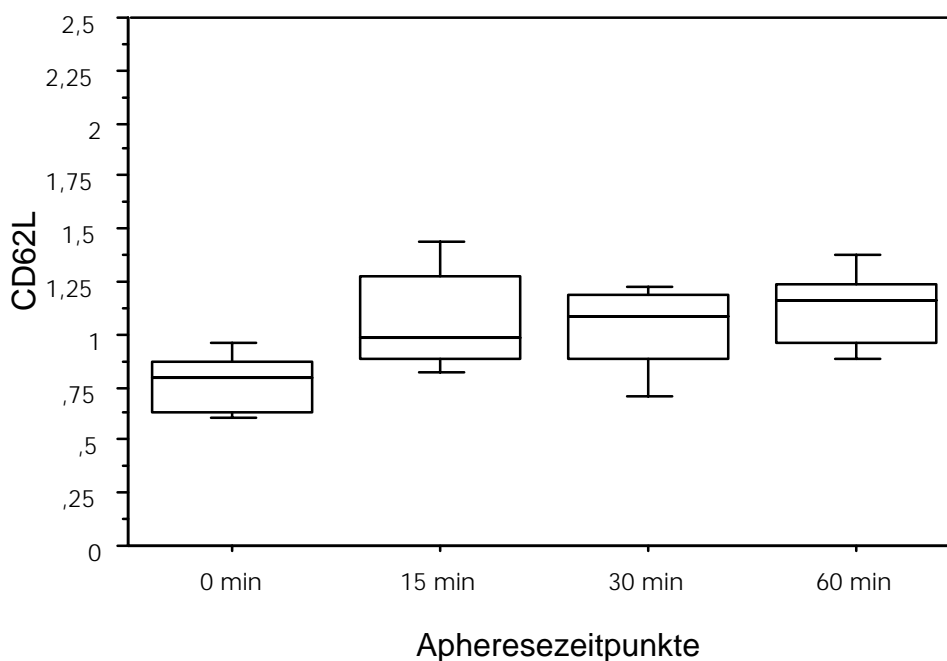


Abb. 16 Verlauf der Fluoreszenzexpression von CD62L auf neutrophilen Granulozyten (normierte Mittelwerte der MCFI).



## 4. Diskussion

Die Entwicklung und Anwendung extrakorporaler Kreisläufe, wie sie in der Hämodialyse, bei kardiopulmonalen Bypass-Operationen (CPB) oder bei Apheresesystemen in der Transfusionsmedizin zum Einsatz kommen, haben zu einem großen Interesse bezüglich der durch sie induzierten Effekte an Blutbestandteilen geführt (Ratner 1993). Aus früheren Untersuchungen geht hervor, daß eine Thrombozyten- sowie Leukozytenaktivierung, wie sie z.B. durch Antikoagulantien (Rinder, Bonan et al. 1991), Oberflächenmaterialien (Fukutomi, Kobayashi et al. 1996; Bonomini, Stuard et al. 1997) oder Scherkräfte (Brown, Leverett et al. 1975; Jen und McIntire 1984; Moake, Chintagumpala et al. 1994) entstehen kann, zu vermeiden ist, da aktivierte Thrombozyten und Leukozyten homo- und heterotype Interaktionen eingehen. In der vorliegenden Studie wurde der Einfluß der Thrombozytapherese auf thrombozytäre und leukozytäre Antigene untersucht.

Zur Untersuchung der Glykoproteinrezeptorstrukturen auf Thrombozyten und Leukozyten bietet sich die immunologische Untersuchung an einem Durchflußzytometer an (Ault und Mitchell 1994; Kleine, Hackler et al. 1994). Aufgrund der Methodik erlaubt die Durchflußzytometrie die Analyse hoher Zellzahlen, wodurch die Gefahr einer Fehlinterpretation natürlich bedingter Streuungen sinkt. Durch die Verarbeitung von Vollblutproben kann ein physiologisches Milieu zum Teil beibehalten werden und die Problematik einer Zellirritation im Rahmen der Probenaufbereitung minimiert werden (Michelson 1996).

Untersuchung der Spezifität und Sensitivität am Durchflußzytometer sind aufgrund fehlender Vergleichsmöglichkeiten bei Thrombozyten bisher nur teilweise untersucht (Michelson 1996). Weiterhin muß bei der Methode bedacht werden, daß sie nur zirkulierende Thrombozyten und Leukozyten erfaßt. Kommt es zu einer Aktivierung, mit resultierender Adhärenz der unterschiedlichen Blutbestandteile, z.B. an die unphysiologischen Oberflächenstrukturen des extrakorporalen Kreislaufsystems, muß u.U. mit einer unvollständigen Erfassung der aktivierten Zellen gerechnet werden (Michelson 1996). Fehlerhafte Meßergebnisse müssen ebenso in der Markierung mit monoklonalen Antikörpern gesucht werden. Die ausführliche Diskussion der einzelnen Probenaufbereitungsschritte wie

Stabilisierungen, Fixierungen, Markierung mit monoklonalen Antikörpern etc. würde den Rahmen der Möglichkeiten bei weitem überschreiten und wurde zum Teil in den entsprechenden Kapiteln kurz angesprochen. Die Vielfältigkeit der hier angewendeten Verfahrensschritte hat ihre Berechtigung in den zum Teil empirisch ermittelten Auswirkungen, die jeder Probenaufbereitungsschritt auf die Thrombozyten und Leukozyten hat.

Thrombozyten sind kernlose Blutzellen, die eine entscheidende Rolle in der Blutkoagulation und Hämostase erfüllen. Die zirkulierenden Thrombozyten verbleiben so lange in einem Ruhezustand, bis es aufgrund äußerer Einflüsse zu einer Aktivierung kommt. Diese führt zu morphologischen, biochemischen und funktionellen Veränderungen (Mueller-Eckhardt 1993). Während des Aktivierungsprozesses kommt es zu Veränderungen der Antigene, u.a. zu Konformationsänderung membranassoziierter Antigene wie beim GPIIb-IIIa-Komplex und zur Bildung von Neoepitopen im Rahmen von Degranulations- und Sekretionsvorgängen.

Ein solches Antigen ist das P-Selektin (CD62p). Dieses aktivierungsabhängige Glykoprotein ist in den  $\alpha$ -Granula ruhender Thrombozyten lokalisiert. Kommt es zu einer Aktivierung, so fusionieren die  $\alpha$ -Granula mit der Zytoplasmamembran der Plättchen und exprimieren CD62p an ihrer Oberfläche. Aufgrund dieser Tatsache dient das Vorliegen, bzw. die Zunahme von CD62p als ein Indikator für eine Plättchenaktivierung. Weitere Untersuchungen haben ergeben, daß diese Antigenstruktur an Interaktionsprozessen zwischen Thrombozyten und Leukozyten beteiligt ist (Holme, Sweeney et al. 1997).

In der vorliegenden Studie wird eine signifikante Expressionszunahme der *mean channel fluorescence intensity* (MCFI) von CD62p nach ca. 30 Minuten darstellbar, die bis zum Ende der Apherese weiterhin zunimmt. Diese Expressionsveränderung des aktivierungsabhängigen Epitops CD62p deutet auf eine hohe Beeinflussung der Plättchen durch den extrakorporalen Kreislauf hin. Eine bereits nach 5 Minuten deutliche Zunahme der CD62p-Expression zeigte die Arbeit von Bartsch, die aufgrund eines nahezu identischen Versuchsaufbaus, bezüglich Zellseparator, Probenaufbereitung und durchflußzytometrischer Meßtechnik eine gute Vergleichsmöglichkeit bietet (Bartsch 1998). Diese zeitlichen Unterschiede bezüglich der CD62p-Expression ergeben sich wahrscheinlich aufgrund verschiedener Probenentnahmestellen. In der Studie von Bartsch wurde die

Probenentnahme am Rücklaufsystem des extrakorporalen Kreislaufs durchgeführt und somit der unmittelbare Effekt des Zellseparators auf eine Plättchenaktivierung untersucht. In der vorliegenden Studie erfolgte dieses am Zulaufsystem und ermöglichte somit die Untersuchung der aktivierten Thrombozyten des Probanden vor erneuten Kontakt mit dem Apheresesystem. Aufgrund eines Verdünnungseffektes der aktivierten Plättchen im Körper des Spenders ist anzunehmen, daß sich eine deutliche CD62p-Expression erst zu einem späteren Zeitpunkt manifestieren kann. Ähnliche Beobachtungen der CD62p-Expression während der Hämodialyse und des kardiopulmonalen Bypass-Operationen wurden von weiteren Gruppen berichtet (Gutensohn, Sputtek et al. 1996; Muehrcke, McCarthy et al. 1996; Holme, Sweeney et al. 1997 ).

Untersuchungen von Gawaz et al. an Patienten, die eine Hämodialysetherapie erhielten, konnten zwar eine Plättchen-Leukozyten-Interaktion belegen, jedoch keine signifikanten Veränderungen in der CD62p-Expression nachweisen (Gawaz, Mujais et al. 1994). Gawaz et al. Erklärung für die zu erwartende und doch nicht beobachtete CD62p-Expressionszunahme ist die Möglichkeit, daß sich die aktivierten, CD62p-positiven Thrombozyten an der Endotheloberfläche, bzw. im System des extrakorporalen Kreislaufs anheften und somit mittels der Durchflußzytometrie nicht mehr erfaßbar sind. Vorausgehende Studien (Mueller-Eckhardt 1993; Scharf et al. 1986) und die Beobachtung von Gawaz et al. lassen den Schluß zu, daß der Nachweis von CD62p an der Thrombozytenzytoplasmamembran einen Indikator für eine Thrombozytenaktivierung darstellt, ein Fehlen jedoch eine Thrombozytenaktivierung nicht ausschließt.

Hier muß, wie auch auf die folgenden Antigenstrukturen zutreffend, auf die Problematik des Resultatvergleichs hingewiesen werden. Neben der Tatsache, daß die vorliegende Studie signifikante Aussagen über Tendenzen, bzw. Verlaufsänderungen bezüglich der Expression der einzelnen Antigenepitope zuläßt, dürfen die zum Teil beträchtlichen interindividuellen Unterschiede in den Ausgangs- und Verlaufsmessungen nicht übergangen werden. Eine Erklärung kann eine interindividuelle Ausgangsstimulation, bzw. Prädisposition bezüglich der Thrombozytenreaktion auf exogene und endogene Einflüsse sein. Weiterhin muß darauf hingewiesen werden, daß die erwähnten Studien zum Teil sehr unterschiedlich aufgebaut sind und somit verschiedene Untersuchungen zum Einfluß von Biomaterialien, Scherkräften, Antikoagulantien etc. und ihren Auswirkungen auf Thrombozyten vorliegen (Rinder, Bonan et al. 1991; Moake, Chintagumpala et al. 1994; Fukutomi, Kobayashi et al. 1996; Bonomini, Stuard et

al. 1997). Trotz dieser möglichen Variablen unterschiedlicher Einflüsse, resultiert im Verlauf der Thrombozytapherese eine Zunahme der CD62p-Expression, die als eine Voraussetzung für eine Interaktion zwischen Leukozyten und Thrombozyten gilt (Hamburger und McEver 1990; Furie und Furie 1995).

Die Beobachtungen von Spangenberg et al. und Yeo et al. postulieren, daß neben dem aktivierungsabhängigen Marker CD62p ebenso das strukturabhängige Glykoprotein GPIIb-IIIa in einer Thrombozyten-Leukozyten-Interaktion involviert ist (Spangenberg, Redlich et al. 1993; Yeo, Sheppard et al. 1994). Der GPIIb-IIIa-Komplex, der bereits auf ruhenden Thrombozyten vorzufinden ist, ist der am häufigsten vorkommende Rezeptor auf der Zytoplasmamembran von Blutplättchen. Mediatoren wie z.B. Kathepsin G (aus azurophilen Granula aktivierter Granulozyten) und Thrombin bewirken neben einer Zunahme des IIb-IIIa-Komplexes auf der Thrombozytenoberfläche ebenso eine Konformationsänderung dieser Glykoproteinstrukturen (Molino, Di Lallo et al. 1993). Dem aktivierten IIb-IIIa-Komplex ist es möglich in Anwesenheit von  $Ca^{2+}$ -Ionen an eines von vier verschiedenen Adhäsionsproteinen (Fibrinogen, Fibronectin, von Willebrand-Faktor und Vitronectin) zu binden (Phillips, Charo et al. 1988). CD41a bindet spezifisch an die Integrin  $\alpha$ -IIb-Kette des GPIIb-IIIa-Komplexes, die u.a. für die nichtkovalente Bindungen zwischen der Plättchenoberfläche und Zell-Interaktionen verantwortlich ist .

Ein Anstieg der MCFI von CD41a resultierte analog der CD62p-Expression nach 30 Minuten und nahm bis zum Ende der Apherese (60. Minute) weiterhin zu. Dieser Expressionsverlauf ist eine von vielen Voraussetzungen für heterotype Interaktionen und kann als ein erster Hinweis dafür gelten. Ähnliche Beobachtungen einer frühen Veränderung der Thrombozytenantigenexpression während der Hämodialyse und der CPB-Operationen wurden von anderen Gruppen berichtet (Rinder, Mathew et al. 1991; Kondo 1993). Auf die Untersuchungen von Gutensohn et al. und Bartsch werde ich aufgrund ihrer Vergleichbarkeit im Studiendesign näher eingehen (Gutensohn, März et al. 1997; Bartsch 1998). Beide Studien zeigen im Verlauf der Apherese eine Abnahme der CD41a MCFI, die sich in der vorliegenden Studie nicht bestätigen läßt. In den genannten Untersuchungen konnte es zu einer Fragmentierung der Glykoproteinkomplexe gekommen sein, bzw. zu einer Adhäsion stark CD41a exprimierender Thrombozyten am Biomaterial des Zellseparators (Haycox und Ratner 1993; Cenni, Arciola et al. 1995; Michelson 1996), woraus eine scheinbare Abnahme der CD41a-Expression, der mit dem Durchflußzytometer erfaßten Thrombozyten resultiert. In der vorliegenden Studie

könnten diese möglichen Effekte, die zu einer scheinbaren Abnahme der CD41a-Expression führen unterschiedlich stark ausgeprägt sein, bzw. fehlen. Ursache kann wieder die abweichende Lokalisation der Probenentnahmen sein. Wie bereits erwähnt fand die Probenentnahme der vorliegenden Studie am Zulaufsystem des Zellseparators statt und zeigte somit die aktivierten Thrombozyten des Spenders in vivo und nicht die unmittelbaren Auswirkungen des extrakorporalen Kreislaufs. Weitere Parameter, die im Vergleich der beiden Studien z.T. identisch waren, aber ebenso die Antigenexpression beeinflussen können, sind z.B. besondere Auswahlkriterien des Spenderkollektivs, unterschiedliche Zellseparatoren und Software, Einsatz von Leukozytenreduktionsfiltern (LRS®) etc.

Die Gesamtpopulation der Leukozyten wird mit unterschiedlich hohen Anteilen aus Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten gebildet. Je nach Subpopulation fallen auf die einzelnen Zelltypen Aufgaben und Funktionen der humoralen und zellvermittelten Immunantwort (Lydyard und Grossi 1995). In der vorliegenden Studie wurden zur Untersuchung der neutrophilen Granulozyten und Monozyten die beiden Antikörper gegen die Epitope CD45 und CD14 eingesetzt. Das Glykoprotein CD45 wird auch als *leukocyte common antigen* (LCA) bezeichnet und wird aufgrund der Tatsache, daß neutrophile Granulozyten die größte Subpopulation unter den Leukozyten bildet, häufig für deren Untersuchung eingesetzt (Sato, Furukawa et al. 1993). Für die Untersuchung an Monozyten eignet sich die Antigenstruktur CD14, die primär auf Monozyten exprimiert wird (Haziot, Tsuberi et al. 1993). Auf die Untersuchung von Lymphozyten im Rahmen von heterotypen Zellinteraktionen mit Thrombozyten wurde in dieser Studie verzichtet, da unterschiedliche Arbeitsgruppen, die sich mit Leukozyten-Thrombozyten-Interaktionen beschäftigten keine signifikante Beteiligung von Lymphozyten an diesen Prozessen erkennen konnten (Rinder, Bonan et al. 1991; Bau, Gutensohn et al. 1997; Kirchhofer, Riederer et al. 1997). Die an der Zell-Interaktionen beteiligten Glykoproteinmoleküle gehören den Immunglobulinen der "Supergene", der Integrin- (CD11, CD18) oder Selektinfamilie (CD62p, CD62L) an (Bevilacqua und Nelson 1993; Carlos und Harlan 1994). Gegenstand der vorliegenden Untersuchung waren die Antigenstrukturen CD11a, CD11b, CD11c, CD18 und CD62L auf neutrophilen Granulozyten und Monozyten.

Jeder Integrin-Rezeptor setzt sich aus einer  $\alpha$ -Kette (CD11) und einer  $\beta$ -Kette (CD18) zusammen. Diese CD11/CD18-Komplexe setzen sich wiederum aus drei unterschiedlichen Oberflächenglykoproteinen (CD11a, CD11b, CD11c) zusammen

und kommen ausschließlich auf Leukozyten vor. CD11a/CD18 wird auf allen Leukozyten exprimiert, während CD11b/CD18 und CD11c/CD18 auf Monozyten, Granulozyten und natürlichen Killerzellen exprimiert werden (Darcissac, Bahr et al. 1996). Im Rahmen der Veränderungen dieser Adhäsionsrezeptoren zeigen diese eine wesentliche Beteiligung an der Adhäsion an Endothelzellen oder Fremdoberflächen (Ruf und Patscheke 1995; Darcissac, Bahr et al. 1996; Gopalan, Smith et al. 1997). So sind die Integrin-Rezeptoren auf zirkulierenden Leukozyten normalerweise in inaktivem oder zumindest niedrig-aktivem Zustand, indem es zu keiner bzw. nur minimaler physiologischer Anheftung an Endothelzellen kommt. Mit zunehmender Aktivierung der Leukozyten, z.B. durch exogene Faktoren wie sie in einem extrakorporalen Kreislauf vorliegen, transformieren die Integrinrezeptoren in einen Zustand, indem sie in der Lage sind an verschiedene Oberflächenstrukturen zu binden. Diese Affinitätszunahme kann durch zwei unterschiedliche Mechanismen erfolgen. Zum einen in der Zunahme der Rezeptorexpression, zum anderen in der "inside-out" Signalübertragung, d.h. an Konformationsänderungen an den Post-Rezeptorstrukturen (z.B. Verbindungen zum Zytoskelett) (Carlos und Harlan 1994). Die relative Verteilung der CD11/CD18-Komplexe variiert zudem abhängig vom Reifegrad, dem Zelltyp und dem vorliegenden Aktivierungszustand. So weisen Granulozyten im aktivierten Zustand weit mehr CD11b/CD18-Komplexe als CD11a/CD18- bzw. CD11c/CD18-Komplexe auf. Auf Monozyten im ruhenden Zustand zeigt sich folgende relative Verteilung: CD11a/CD18 > CD11b/CD18 > CD11c/CD18 (Arnaout 1990).

Die Ergebnisse der durchflußzytometrischen Untersuchung des Markers CD11a zeigten über den gesamten Verlauf der Apherese eine kontinuierliche Abnahme auf der Oberfläche von neutrophilen Granulozyten wie auch Monozyten. Arbeiten verschiedener Autoren (Tielemans, Delville et al. 1993; Diacovo, Roth et al. 1996) zeigten im Gegensatz dazu eine geringe Zunahme, bzw. keine Veränderungen der CD11a-Expression. Ein intrazellulärer Pool für den CD11a/CD18-Komplex liegt nicht oder nur in sehr geringen Umfang vor (Arnaout 1990), wodurch sich ein konstanter Verlauf der CD11a-Expression erklären ließe. Andererseits können aufgrund hämodynamischer Scherkräfte, wie sie in einem extrakorporalen Kreislauf entstehen, Glykoproteinkomplexe fragmentiert werden und somit, wie in der vorliegenden Studie, die Abnahme von CD11a auf der Zelloberfläche erklären.

Die Glykoproteine CD11b und CD11c zeigten gegenüber dem Ausgangswert auf neutrophilen Granulozyten wie Monozyten eine Expressionszunahme zum Ende der Apherese nach 60 Minuten. Unterschiede stellten sich jeweils im zeitlichen

Verlauf der Expression dar. Auf den neutrophilen Granulozyten zeigten die Marker CD11b und CD11c in der vorliegenden Studie bis zur 30. Minute eine deutliche Expressionszunahme, die anschließend bis zum Ende der Apherese nur noch geringfügig weiter stieg. Die Expression des Glykoproteins CD11b auf Monozyten nahm hingegen im Verlauf der gesamten Apherese kontinuierlich zu. Der Marker CD11c auf den Monozyten zeigte gegenüber den neutrophilen Granulozyten nach 30 Minuten eine geringere, aber dennoch signifikante Zunahme der Expression.

Exogene Einflüsse, wie sie in einem extrakorporalen Kreislauf anzutreffen sind, können zu einer Expressionszunahme der Glykoproteine CD11b und CD11c auf Granulozyten und Monozyten *in vitro* wie *in vivo* führen. Hierbei fusionieren intrazelluläre Speicher mit der Zelloberfläche (Arnaout 1990). Insbesondere die unterschiedliche Expressionskinetik von CD11b auf Monozyten und neutrophilen Granulozyten in dieser Studie wird von vergleichbaren Untersuchungen an einem extrakorporalen Kreislauf im Rahmen kardiopulmonaler Operationen zum Teil bestätigt (Rinder, Bonan et al. 1992). Untersuchungen von Rinder et al. zeigten, daß wie auch in der vorliegenden Arbeit, eine kontinuierliche CD11b-Expressionszunahme auf Monozyten, sowie eine unmittelbare Zunahme der CD11b-Expression auf neutrophilen Granulozyten erfolgte (Rinder, Bonan et al. 1992). Der erst nach 30 Minuten signifikante Anstieg der CD11b-Expression auf neutrophilen Granulozyten in der vorliegenden Arbeit könnte sich, wie bereits erwähnt, durch eine unterschiedliche Probenentnahme erklären. In der vorliegenden Studie erfolgte diese an der Vena cubitalis (Zulaufsystem) und nicht wie bei Rinder et al. an der Arteria radialis. Aufgrund von Verdünnungseffekten der aktivierten Leukozyten im Körper des Spenders während der Thrombozytapherese und möglicherweise geringerer Auswirkungen auf die zellulären Blutbestandteile bei kardiopulmonalen Operationen ist anzunehmen, daß sich eine deutliche CD11b-Expression auf neutrophilen Granulozyten aus diesem Grund erst zu einem späteren Zeitpunkt manifestiert. Untersuchungen von Diacovo et al. und Rinder et al. postulieren, daß diese beiden Strukturen primär in einer Leukozyten-Thrombozyten-Interaktion involviert sind (Rinder, Bonan et al. 1992; Diacovo, Roth et al. 1996). Der genaue Mechanismus, der Zellinteraktion und die Beteiligung des CD11/CD18-Komplexes ist noch nicht vollständig geklärt. Neben quantitativen Veränderungen, gehen ebenso qualitative Veränderungen dieser Rezeptorstrukturen mit einer Zellaktivierung einher.

Verschiedene Arbeitsgruppen, die Interaktionsprozesse zwischen Leukozyten und Thrombozyten untersucht haben, postulieren gegenseitige Wechselbeziehungen.

So verfügt das von aktivierten Thrombozyten freigesetzte CD62p (P-Selektin) über eine Schlüsselrolle in der Thrombozyten-Leukozyten-Interaktion, indem es an transzellulären Signalübertragungen beteiligt ist und z.B. eine Freisetzung von Superoxid-Anionen in Leukozyten bewirkt (Del Maschio, Dejana et al. 1993; Nagata, Tsuji et al. 1993; Furie und Furie 1995). Nagata et al. postulieren, daß die Zunahme der Superoxid-Anionen-Konzentration wiederum eine P-Selektin-Expression an Endothelzellen induziert, die für eine Anheftung von Monozyten und neutrophilen Granulozyten verantwortlich ist (Nagata, Tsuji et al. 1993). Mehrere Studien stellen die Hypothese auf, daß ein Stadium durchlaufen wird in dem P-Selektin (CD62p) und CD11/CD18-Komplexe interagieren (Lawrence und Springer 1991; Lorant, Patel et al. 1991). Vergleicht man die beiden Expressionsmuster von CD62p und CD11b, so zeigt sich ein nahezu paralleler Verlauf dieser beiden Marker, der diese Hypothese der heterotypen Interaktionen unterstützt.

Weiterhin konnten Furie und Furie eine P-Selektin-abhängige Gewebefaktor-Expression auf Monozyten beobachten, welche als Mediator für Adhäsionsprozesse zwischen Thrombozyten und Monozyten, wie neutrophilen Granulozyten beteiligt ist (Celi, Pellegrini et al. 1994; Furie und Furie 1995). Aber auch von Leukozyten können Mediatoren freigesetzt werden, aus denen eine Plättchenaktivierung resultiert. Die Leukozytenproteinase Kathepsin G, die in den azurophilen Granula neutrophiler Granulozyten gespeichert ist, wird im Rahmen einer leukozytären Zellstimulation sezerniert und triggert den Thrombozytenmetabolismus im Rahmen eines Calcium-Ionen-Anstiegs, welcher wiederum eine Voraussetzung für die Expression des Aktivitätsmarkers CD62p ist (Del Maschio, Dejana et al. 1993; Pidard, Renesto et al. 1994; Cerletti, Evangelista et al. 1995). Leukozytenelastase, ebenso eine Proteinase der Leukozyten, ist zwar nicht in den Thrombozytenmetabolismus involviert, aber dafür in der Lage eine Untereinheit des GPIIb-IIIa-Rezeptors abzuspalten, was zu einer Aktivitätszunahme dieses Rezeptors führt (Pidard, Renesto et al. 1994).

Die Beteiligung des thrombozytären Glykoproteins CD41a an Interaktionsprozessen zwischen Leukozyten und Thrombozyten wird aufgrund der Ergebnisse verschiedenen Studien postuliert (Spangenberg, Redlich et al. 1993; Yeo, Sheppard et al. 1994; Bonomini, Stuard et al. 1997). Ruf et al. vermuten einen Zwei-Stufen-Prozeß, während der Interaktion zwischen Thrombozyten und Leukozyten. Die Adhäsion scheint primär über CD62p vermittelt zu werden, während die Aktivierung von neutrophilen Granulozyten eine Bindung von Fibrinogen zwischen dem thrombozytären GPIIb-IIIa-Komplex (CD41a) und dem



leukozytären CD11c/CD18-Komplex erfordert (Ruf und Patscheke 1995). Der konforme Expressionsverlauf von CD41a und CD11c, sowie CD62p und CD11b unterstützt die Vermutung eines Zwei-Stufen-Prozesses zur Ausbildung von heterotypen Interaktionen wie von Ruf et al. beschrieben.

CD18 ist die  $\beta$ -Kette der  $\beta$ 2-Integrine und bildet gemeinsam mit den drei unterschiedlichen  $\alpha$ -Ketten CD11a, CD11b und CD11c Komplexe, deren relative Verteilung wie bereits oben beschrieben vom Zelltyp, dessen Reifegrad und Aktivierungszustand abhängt (Arnaout 1990).

Die MCFI des Markers CD18 blieb im Verlauf der Apherese bei den neutrophilen Granulozyten konstant. Bei den Monozyten erfolgte jedoch nach den ersten 15 Apherese Minuten eine signifikante Abnahme der CD18-Expression, die danach bis zum Ende der Apherese nahezu konstant blieb. Eine Erklärung für die Tatsache der konstanten CD18-Expression auf neutrophilen Granulozyten könnte sein, daß CD18 als Komplex zusammen mit CD11a, CD11b und CD11c auftritt (Arnaout 1990). Durch die unterschiedliche Expressionszunahme, bzw. -abnahme der einzelnen Komplexe könnte hieraus ein sich gegenseitig aufhebender Prozeß resultieren, der im Endeffekt zu einer Konstanz der Expression von CD18 führt. Die Abnahme der CD18-Expression auf den Monozyten könnte mit der Hypothese von Scannell et al. erklärt werden. Diese Arbeitsgruppe untersuchte die interzellulären Adhäsionsmoleküle CD11b und CD18 von polytraumatisierten Patienten (Scannell, Waxman et al. 1995). Entgegen allen Erwartungen zeigten die untersuchten Marker eine signifikante Abnahme der Expression. Eine Erklärung könnte sein, daß tatsächlich eine Expressionszunahme von CD18 erfolgt, es aber aufgrund der Aktivierung eine Adhäsion und Aggregation insbesondere der Monozyten in der Mikrozirkulation erfolgt und diese im Rahmen der Durchflußzytometrischen Untersuchung nicht erfaßt wurden (Scannell, Waxman et al. 1995).

Das L-Selektin CD62L findet sich ausschließlich auf Leukozyten und scheint primär in der Adhäsion von neutrophilen Granulozyten und Monozyten an Endothelzellen involviert zu sein (Carlos und Harlan 1994). Gegenüber dem P- und E-Selektin ist das L-Selektin stets auf der Leukozytenoberfläche nachweisbar. Neben einer Konformationsänderung, die für die Regulation der Selektinfunktion verantwortlich ist, erfolgt nach einer vorübergehenden Zunahme des L-Selektins auf der aktivierten Granulozytenoberfläche, schließlich eine Freisetzung dieses Rezeptor in das Plasma (Bevilacqua und Nelson 1993). Zwar liegen Studien mit einer direkten Beteiligung des L-Selektins an einer Leukozyten-Thrombozyten-Interaktion zur Zeit

noch nicht vor, doch konnten Untersuchungen von Gopalan et al. die Hypothese unterstützen, daß L-Selektine auf neutrophilen Granulozyten einen Einfluß auf die Aktivierung von CD11a und CD11b nehmen. Aus diesem Grund findet sich eine nähere Betrachtung von CD62L in dieser Studie (Gopalan, Smith et al. 1997).

Die vorliegenden Untersuchungen zeigten bei den neutrophilen Granulozyten, wie bei den Monozyten bereits nach 15 Minuten einen signifikanten Anstieg der CD62L-Expression, der im Aphereseverlauf keine weitere signifikante Veränderungen aufweist. Ein paralleler Verlauf zu CD11a und CD11b ist nicht zu erkennen, vielmehr zeigen sich zum Teil entgegengesetzte Verläufe. Steigt die Expression von CD62L in den ersten 15 Minuten und bleibt bis zum Ende der Apherese konstant, so nimmt die CD11a-Expression kontinuierlich bis zum Ende der Apherese ab. Die CD11b-Expression nimmt erst zwischen der 15. und 30. Minute deutlich zu, um dann auf konstantem Niveau zu bleiben. Ein verzögerter Einfluß von CD62L auf CD11b kann daher nicht vollkommen ausgeschlossen werden. Betrachtet man weitere Studien, so zeigen sich gegensätzliche Aussagen zum Expressionsverhalten von CD62L, in Abhängigkeit von der untersuchten Leukozytensubpopulation. Gegenstand der Untersuchung von Thylen et al. ist die Beobachtung der CD62L- und CD11b/CD18-Expression während der Hämodialyse. Hier zeigen sich abhängig von der Leukozytensubpopulation unterschiedliche Veränderungen. Während der Hämodialyse zeigen Monozyten innerhalb der ersten 15 Minuten eine Expressionszunahme, die im Verlauf bis unter den Ausgangswert abfällt. Die Granulozyten zeigen hingegen nach einem anfänglichen Abfall eine kontinuierliche Zunahme der Expression (Thylen, Fernvik et al. 1996). Diese beiden gegensätzlichen Verlaufsbeobachtungen innerhalb der Leukozytenpopulationen zeigen, wie schwierig eine Interpretation des CD62L-Selektins ist. Um exaktere Aussagen zu ermöglichen, sollte neben der CD62L-Expression ebenso das Serum auf lösliches CD62L untersucht werden, um ggf. eine Expressionsabnahme von einer -zunahme mit einhergehender Freisetzung von CD62L in das Plasma zu unterscheiden und so eine eventuelle Triggerfunktion von CD62L besser beurteilen zu können (Stohlawetz 1998).

Aufgrund der hier dargestellten Einflüsse extrakorporaler Systeme auf die Antigenalteration von Thrombozyten und Leukozyten ergeben sich zum Teil gegensätzliche Anforderungen an die Thrombozytapherese. Zum einen, eine schonende Zellseparation, um den physiologischen Zustand der Thrombozyten möglichst zu erhalten und eine optimale in vivo-Funktion beim Empfänger zu

gewähren, gleichzeitig aber auch eine exakte und somit nicht unbedingt schonende Trennung der Thrombozyten von den übrigen Blutkomponenten, um eine Leukozytenkontamination zu minimieren. Die vorliegende Studie gibt durch die gezielte Auswahl und Untersuchung der Antigenalteration auf Thrombozyten, sowie auf neutrophilen Granulozyten und Monozyten Informationen über den Einfluß der Thrombozytapherese auf diese Zellen. Da die Untersuchung der Blutkompatibilität keine einseitige Fragestellung ist, kann daher nicht allein vom Expressionsgrad der durchflußzytometrisch analysierten Epitope auf die Biokompatibilität geschlossen werden (Ratner 1993). Trotz allem sind durchflußzytometrische Studien von thrombozytären und leukozytären Antigenen sehr sinnvoll. Sie können durch sensitive und äußerst spezifische, multiparametrische Aussagen auf Einzelzellebene dazu beitragen, die Biokompatibilität von Zellseparatoren zu kontrollieren und zu verbessern.

## 5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Studie wurde durchflußzytometrisch der Einfluß der Thrombozytapherese auf thrombozytäre und leukozytäre Antigene untersucht.

Es wurden 10 Probanden im Verlauf der Zellseparation mit kontinuierlichem Blutfluß untersucht. Vollblutproben wurden zu Beginn und während des Verlaufs der Apherese entnommen. In der durchflußzytometrischen Untersuchung wurden die thrombozytären Marker CD41a und CD62p, sowie die leukozytären Marker CD11a, CD11b, CD11c, CD18 und CD62L auf neutropilen Granulozyten und Monozyten untersucht.

Die Analysen ergaben eine Expressionszunahme der thrombozytären Marker CD41a und CD62p, die eine Thrombozytenaktivierung im Verlauf der Apherese zeigen. Konsequenzen dieser Aktivierung können eine reduzierte in vivo-Effizienz der Thrombozyten sein, die z.B. mit einem verminderten Adhäsions- und Aggregationsvermögen der Thrombozyten einhergeht oder einer vermehrten Sequestration aktivierter Thrombozyten nach einer Transfusion. Dies kann durch die erhöhte Oberflächenexpression von CD62p und eine damit assoziierte Interaktion zwischen Thrombozyten und Leukozyten potentiert werden.

Die leukozytären Marker CD11b, CD11c und CD62L zeigten ebenfalls eine Zunahme. Der Verlauf von CD18 blieb nahezu unverändert, die CD11a-Expression nahm im Verlauf der Apherese kontinuierlich ab. Aufgrund der vorliegenden Antigenalterationen kann von einer Leukozytenaktivierung ausgegangen werden. Die Expressionszunahmen von CD11b und CD11c, die primär an heterotypen Interaktionen beteiligt sind, unterstützen diese Hypothese.

Extrakorporale Systeme üben durch unphysiologische Strömungsverhältnisse und Druckschwankungen, z.B. beim Übergang vom Gefäßsystem in den extrakorporalen Keislauf, Scherkräfte auf Thrombozyten und Leukozyten aus. Diese physikalischen Einflüsse, wie auch Interaktionen mit Biomaterialien, können eine Thrombozyten- und Leukozytenaktivierung induzieren, die mit einer Alteration antigener Strukturen einhergehen.

Die hier durchgeführten Untersuchungen können daher für die Beurteilung der Biokompatibilität extrakorporaler Systeme hinzugezogen werden und als Ausgangswert für weitere Untersuchungen dienen.

## 6. Literaturverzeichnis

Andreu G (1996). Why choose apheresis platelet concentrates. *Infusionsther Transfusionsmed* 23: 24 - 34.

Arnaout M (1990). Structure and function of the leukocyte adhesion molecules CD11/CD18. *Blood* 75: 1037 - 1050.

Ault K, Mitchell J (1994). Analysis of platelets by flow cytometry. *Methods Cell Biol* 42: 275 - 294.

Bartsch N (1998). Durchflußzytometrische Untersuchungen thrombozytärer Glykoproteine unter dem Einfluß der Thrombozytapherese. *Med. Inaugural-Dissertation. Universität Hamburg.*

Bau J, Gutensohn K, Keck A, Rauhoeft C, Stein J, Kuehnl P, Kuck H (1997). Platelet-leukocyte interaction during PTCA (percutaneous transluminal coronary angioplasty). 28. Hämophilie-Symposium Hamburg 1997. Hrsg.: Scharrer I, Schramm W. Springer, Heidelberg.

Bauer C (1994). *Blut. Lehrbuch der Physiologie.* Hrsg.: Klinke R, Silbernagl S. Thieme, Stuttgart: 183 - 211.

Bernard A, Boumsell L, Hill C (1984). Joint report of the first international workshop on human leucocyte differentiation antigens by the investigators of the participating laboratories. *Leucocyte Typing.* Bernard A, Boumsell L, Dausset J, Milstein C. Springer, Berlin: 621 - 630.

Bevilacqua M, Nelson R (1993). Selectins. *J Clin Invest* 91: 379 - 387.

Bonomini M, Stuard S, Carreno M-P, Settefrati N, Santarelli P, Haeffner-Cavaillon N, Albertazzi A (1997). Neutrophil reactive oxygen species production during hemodialysis: Role of activated platelet adhesion to neutrophils through P-selectin. *Nephron* 75: 402 - 411.

Brown C, Leverett L, Lewis C, Alfrey C, Hellums J (1975). Morphological, biochemical, and functional changes in human platelets subjected to shear stress. *J Lab Clin Med* 86: 462 - 471.

Carlos T, Harlan J (1994). Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood* 84: 2068 - 2101.

Celi A, Pellegrini G, Lorenzet R, de Blasi A, Ready N, Furie B, Furie B (1994). P-selectin induces the expression of tissue factor on monocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 8767 - 8771.

Cenni E, Arciola C, Ciapetti G, Granchi D, Savarino L, Stea S, Cavedagna D, Curti T, Falsone G, Pizzoferrato A (1995). Platelet and coagulation factor variations induced in vitro by polyethylene terephthalate (Dacron®) coated with pyrolytic carbon. *Biomaterials* 16: 973 - 976.

Cerletti C, Evangelista V, Molino M, de Gaetano G (1995). Platelet activation by polymorphonuclear leukocytes: Role of cathepsin G and P-selectin. *Thromb Haemost* 74: 218 - 223.

Chenoweth D (1986). Complement activation produced by biomaterials. *Trans Am Soc Artif Intern Organs* 32: 226 - 232.

Clemetson K, Clemetson J (1995). Platelet GPIb-V-IX complex: structure, function, physiology, and pathology. *Semin Thromb Hemost* 21: 130 - 156.

Clemetson KJ (1995). Platelet Activation: Signal transduction via membrane receptors. *Thromb Haemost* 74: 111 - 116.

Darcissac E, Bahr G, Parant M, Chedid L, Riveau G (1996). Selective induction of CD11a,b,c/CD18 and CD54 expression at the cell surface of human leukocytes by muramyl peptides. *Cell Immunol* 169: 294 - 301.

Del Maschio A, Dejana E, Bazzoni G (1993). Bidirectional modulation of platelet and polymorphonuclear leukocyte activities. *Ann Hematol* 67: 23 - 31.

---

Diacovo T, Roth S, Buccola J, Bainton D, Springer T (1996). Neutrophil rolling, arrest, and transmigration across activated, surface-adherent platelets via sequential action of P-selectins and the beta2-integrin CD11b/CD18. *Blood* 88: 146 - 157.

Duke W (1910). Relation of blood platelets to hemorrhagic disease. Description of a method for determining bleeding time and coagulation time and report of three cases of hemorrhagic disease relieved by transfusion. *J Am Med Assoc* 55: 1185.

Eckhardt R (1994). Grundlagen der Durchflußzytometrie: Problemerkennung und -bewältigung (Teil1). *mta* 9: 992 - 994.

Ernst M (1987). Monoklonale Antikörper: Theoretische Grundlagen und Produktion (Teil 1). *mta* 11: 4-6.

Fukutomi M, Kobayashi S, Niwaya K, Hamada Y, Kitamura S (1996). Changes in platelet, granulocyte, and complement activation during cardiopulmonary bypass using heparin-coated equipment. *J Artif Organs* 20: 767 - 776.

Furie B, Furie B (1995). The molecular basis of platelet and endothelial cell interaction with neutrophils and monocytes: Role of P-selectins and the P-selectin ligand, PSGL-1. *Thromb Haemost* 74: 224 - 227.

Gabriel H (1994). Standardisierung der Blutentnahmebedingungen bei der Leukozytenphänotypisierung unter besonderer Berücksichtigung akuter körperlicher Arbeit. *Durchflußzytometrie in der klinischen Diagnostik*. Schmitz G , Rothe G. Schattauer, Stuttgart: 178 - 183.

Gawaz M, Mujais S, Schmidt B, Gurland H (1994). Platelet-leukocyte aggregation during hemodialysis. *Kidney Int* 46: 489-95.

Goodman S, Cooper S, Albrecht R (1993). Integrin receptors and platelet adhesion to synthetic surfaces. *J Biomed Mater Res* 27: 683 - 695.

Gopalan P, Smith C, Lu H, Berg E, McIntire L, Simon S (1997). Neutrophil CD18-dependent arrest on intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) in shear flow can be activated through L-Selectin. *J Immunol* 158: 367 - 375.

---

Gutensohn K, März M, Kühnl P (1997). Alteration of platelet-associated membrane glycoproteins during extracorporeal apheresis of peripheral blood progenitor cells. *J Hematother* 6: 315 - 321.

Gutensohn K, Sputtek A, Voss A, Stahl R, Kühnl P (1996). Modification of activation-dependent platelet antigens CD62p and CD63 during haemodialysis. *Transfus Sci* 17: 489 - 491.

Haeffner-Cavaillon N, Kazatchkine M (1994). Methods for assessing monocytic cytokine production as an index of biocompatibility. *Nephrol Dial Transplant* 2: 112 - 115.

Hamburger S, McEver R (1990). GMP-140 mediates adhesion of stimulated platelets to neutrophils. *Blood* 75: 550 - 554.

Haycox C, Ratner B (1993). In vitro platelet interactions in whole blood exposed to biomaterial surfaces: insights in blood compatibility. *J Biomed Mater Res* 27: 1181 - 1193.

Haziot A, Tsuberi B, Goyert S (1993). Neutrophil CD14: Biochemical properties and role in the secretion of tumor necrosis factor alpha in response to lipopolysaccharide. *J Immunol* 12: 5556 - 65.

Hirsch E, Gardner F (1952). The transfusion of human blood platelets. *J Lab Clin Med* 39: 556.

Höcker P (1996). Platelet transfusion practice. *Infusionsther Transfusionsmed* 23: 12 - 18.

Högman C (1996). How can we improve platelet preparation and storage? *Transfus Sci* 17: 545 - 551.

Holme S, Sweeney J, Sawyer S, Elfath M (1997). The expression of P-selectin during collection, processing, and storage of platelet concentrates: Relationship to loss of in vivo viability. *Transfusion* 37: 12 - 17.



---

Holness C, Bates P, Littler A, Buckley C, McDowall A, Bossy D, Hogg N, Simmons D (1994). Analysis of the binding on intercellular adhesion molecule 3 for the leukocyte integrin lymphocyte function-associated antigen 1. *J Biol Chem* 270: 877 - 884.

Hsu L (1996). Biocompatibility. *Perfusion* 11: 256 - 263.

Jen C, McIntire L (1984). Characteristics of shear-induced aggregation in whole blood. *J Lab Clin Med* 103: 115 - 124.

Johnston G, Kurosky A, McEvert R (1989). Structural and biosynthetic studies of the granule membrane protein, GMP-140, from human platelets and endothelial cells. *J Biol Chem* 264: 1816-1823.

Kazatchkine M, Carreno M (1988). Activation of the complement system at the interface between blood and artificial surfaces. *Biomaterials* 9: 30 - 35.

Kirchhofer D, Riederer M, Baumgartner H (1997). Specific accumulation of circulating monocytes and polymorphonuclear leukocytes on platelet thrombi in a vascular injury model. *Blood* 89: 1270 - 78.

Kleine T, Hackler R, Raffael A (1994). Differenzierung von Leukozytenuntergruppen mittels der Zweifarbenfluoreszenz im lysierten Vollblut. *Durchflußzytometrie in der klinischen Zelldiagnostik*. Schmitz G, Rothe G. Schattauer, Stuttgart: 217 - 228.

Köhler G, Milstein C (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256: 495 - 497.

Kondo C (1993). Platelet dysfunction during cardiopulmonary bypass. *ASAIO* 39: 550.

Kretschmer V (1996). Current trends in platelet transfusion - transfusion practices in Europe. *Infusionsther Transfusionsmed* 23: 5 - 11.

Kretschmer V, Borberg H, Giannitsis D, Kamanabroo D, Mempel W, Müller N, Neumeyer H (1987). Durchführung apparativer Hämapharesen zur Gewinnung von Blutbestandteilkonserven. *Infusionstherapie* 14: 57 - 64.

---

Larsen E, Celi A, Gilbert G, Furie B, Erban J, Bonfanti R, Wagner D, Furie B (1989). PADGEM Protein: A receptor that mediates the interaction of activated platelets with neutrophils and monocytes. *Cell* 59: 305 - 312.

Lawrence M, Springer T (1991). Leukocytes roll on a selectin at physiologic flow rates: Distinction from prerequisite for adhesion through integrins. *Cell* 65: 859 - 873.

Lefkovits J, Plow E, Topol E (1995). Platelet glycoprotein IIb-IIIa receptors in cardiovascular medicine. *N Engl J Med* 332: 1553 - 1559.

Longobardi Givan A (1992). The Past as Prologue. In: *Flow Cytometry First Principles*. Hrsg.: Longobardi Givan A. Wiley-Liss, New York: 1-9.

Longobardi Givan A (1992). Seeing the light: Lasers, fluorochromes, and filters. In: *Flow Cytometry First Principles*. Hrsg.: Longobardi Givan A. Wiley-Liss, New York: 55-73.

Lorant D, Patel K, McIntyre T, McEver R, Prescott S, Zimmermann G (1991). Coexpression of GMP-140 and PAF by endothelium stimulated by histamine or thrombin: a juxtacrine system for adhesion and activation of neutrophils. *J Cell Biol* 115: 223 - 234.

Lydyard P, Grossi C (1995). *Zellen der Immunantwort. Kurzes Lehrbuch der Immunologie*. Roitt I, Brostoff J, Male D. Thieme, Stuttgart.

Mayadas T, Johnson R, Rayburn H, Hynes R, Wagner D (1993). Leukocyte rolling and extravasation are severely compromised in P selectin-deficient mice. *Cell* 74: 541 - 554.

Michelson A (1996). Flow Cytometry: A clinical test of platelet function. *Blood* 87: 4925 - 4933.

Moake J, Chintagumpala M, Turner N, McPherson P, Nolasco L, Steuber C, Santiago-Borrero P, Horowitz M, Pehta J (1994). Solvent/detergent-treated plasma suppresses shear-induced platelet aggregation and prevents episodes of thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood* 84: 490 - 497.

---

Molino M, Di Lallo M, Martelli N, Gaetano de G, Cerletti C (1993). Effects of leukocyte-derived cathepsin G on platelet membrane glycoprotein Ib-IX and IIb-IIIa-complexes: A comparison with thrombin. *Blood* 82: 2442 - 2451.

Morgan S (1996). Economic impact of using single-donor platelets. *Infusionsther Transfusionsmed* 23: 30 - 34.

Muehrcke D, McCarthy P, Kottke-Marchant K, Harasaki H, Pierre-Yared J, Ogella D, Cosgrove D (1996). Biocompatibility of heparin-coated extracorporeal bypass circuits: A randomized, masked clinical trial. *J Thorac Cardiovasc Surg* 112: 472 - 483.

Mueller-Eckhardt C (1993). In: *Klinische Hämatologie*. Hrsg.: Begemann H, Rastetter J. Thieme, Stuttgart: 873

Mueller-Eckhardt C (1993). Therapie mit Blut und Blutbestandteilen. In: *Klinische Hämatologie*. Hrsg.: Begemann H, Rastetter J. Thieme, Stuttgart: 202 - 220.

Mueller-Eckhardt C, Scharf R, Greinacher A (1993). Thrombozytäre hämorrhagische Diathesen. In: *Klinische Hämatologie*. Hrsg.: Begemann H, Rastetter J. Thieme, Stuttgart: 938 - 943.

Murphy S, Heaton W, Rebullia P (1996). Platelet production in the old world-and the new. *Transfusion* 36: 751 - 754.

Nagata K, Tsuji T, Todoroki N, Katagiri Y, Tanoue K, Yamazaki H, Hanai N, Irimura T (1993). Activated platelets induce superoxide anion release by monocytes and neutrophils through P-selectin (CD62). *J Immunol* 151: 3267 - 3273.

Nerl C (1993). Zellen der Granulozytopoese. In: *Klinische Hämatologie*. Hrsg.: Begemann H, Rastetter J. Thieme, Stuttgart: 66 - 71.

Nieuwenhuis H, van Oosterhout J, Rozemuller E, van Iwaarden F, Sixma J (1987). Studies with a monoclonal antibody against activated platelets: Evidence that a secreted 53,000-molecular weight lysosome-like granule protein is exposed on the surface of activated platelets in the circulation. *Blood* 70: 838 - 845.

---

Nose Y, Yamaji K, Sueoka A, Yamane S (1997). Membrane apheresis technology: Historical perspective and new trends toward bioincompatible systems. *Therapeutic Apheresis* 1: 5 - 12.

Ormerod M (1990). *Flow cytometry: A Practical Approach*. Oxford University Press, New York. An introduction to fluorescence technology: 29-44.

Petrides P (1990). *Immunsystem. Physiologische Chemie*. Löffler G , Petrides P. Springer, Heidelberg: 927 - 950.

Phillips D, Charo I, Parise L, Fitzgerald L (1988). The platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa complex. *Blood* 71: 831-843.

Pidard D, Renesto P, Rabhi S, Chignard M (1994). Regulation of the structure and activity of platelet adhesion receptors by leukocyte proteinases. *Nouv Rev Fr Hematol* 1: 99 - 101.

Purvis N, Giorgio T, Stelzer G, Shults K (1994). Shear-induced platelet activation measured by flow cytometry. *Ann NY Acad Sci* 18: 309 - 311.

Raffael A (1987). *Einführung in die analytische Durchflußzytometrie*. Heidelberg, Becton Dickinson GmbH.

Raffael A, Nebe T, Valet G (1994). *Grundlagen der Durchflußzytometrie*. In: *Durchflußzytometrie in der klinischen Zelldiagnostik*. Hrsg.: Schmitz G, Rothe G. Schattauer, Stuttgart.

Ratner B (1993). The blood compatibility catastrophe. *J Biomed Mater Res* 27: 283 - 287.

Rinder C, Bonan J, Rinder H, Mathew J, Hines R, Smith B (1992). Cardiopulmonary bypass induces leukocyte-platelet adhesion. *Blood* 79: 1201 - 1205.

Rinder C, Mathew J, Rinder H, Bonan J, Ault K, Smith B (1991). Modulation of platelet surface adhesion receptors during cardiopulmonary bypass. *Anesthesiology* 75: 563 - 570.

---

Rinder H, Bonan J, Rinder C, Ault K, Smith B (1991). Dynamics of leukocyte-platelet adhesion in whole blood. *Blood* 78: 1730 - 1737.

Ruf A, Patscheke H (1995). Platelet-induced neutrophil activation: platelet-expressed fibrinogen induces the oxidative burst in neutrophils by an interaction with CD11c/CD18. *Br J Haematol* 90: 791 - 796.

Ruf A, Patscheke H (1996). Flußzytometrische Bestimmung aktivierter Plättchen. Begleitskriptum zum Workshop Durchflußzytometrie im Rahmen der 39. Jahrestagung der Ärzte Staatlicher und Kommunalen Blutspendedienste e.V., Göttingen.

Sachs L (1984). *Angewandte Statistik*. Springer, Berlin.

Sato T, Furukawa K, Autero M, Gahmberg C, Kobata A (1993). Structural study of the sugar chains of human leukocyte common antigen CD45. *Biochemistry* 47: 12694 - 704.

Scannell G, Waxman K, Vaziri N, Zhang J, Kaupke C, Jalali M, Hect C (1995). Effects of trauma on leukocyte intercellular adhesion molecule-1, CD11b and CD18 expressions. *J Trauma* 39: 641 - 644.

Scharf (1986). Acquired platelet storage pool deficiency: Clinical and experimental considerations. Rational diagnosis and treatment of haemorrhagic diathesis and thrombembolic disorders. Wenzel E, Hellstern P, Morgenstern M, Köhler G, Blohm V. Schattauer, Stuttgart.

Schmidt R (1994). Monoklonale Antikörper in der Diagnostik von Zelloberflächenantigenen. *Durchflußzytometrie in der klinischen Zelldiagnostik*. Schmitz G, Rothe G. Schattauer, Stuttgart: 63 - 75.

Shattil S, Hoxie J, Cunningham M, Brass L (1985). Changes in the platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa complex during platelet activation. *J Biol Chem* 260: 11107-11114.

Spangenberg P, Redlich H, Bergmann I, Lösche W, Göttrath M, Kehrel B (1993). The platelet glycoprotein II-IIIa-complex is involved in the adhesion of activated platelets to leukocytes. *Thromb Haemost* 70: 514 - 521.

---

Steward M, Male D (1995). Immunologische Testmethoden. Kurzes Lehrbuch der Immunologie. Roitt I, Brostoff J, Male D. Thieme, Stuttgart: 352 - 354.

Stöckl J, Majdic O, Pickl W, Rosenkranz A, Prager E, Gschwantler E, Knapp W (1995). Granulocyte activation via a binding site near the C-terminal region of complement receptor type 3 alpha chain (CD11b) potentially involved in intramembrane complex formation with glycosylphosphatidylinositol-anchored Fc gamma RIIIB (CD16) molecules. *J Immunol* 154: 5452 - 5463.

Stohlawetz P (1998). Flow cytometric evaluation of P-selectin expression on platelets and P-selectin plasma concentrations during plateletpheresis. *Flow cytometry in transfusion medicine*. Gutensohn K, Sonnenborn H, Schunter F, Kühnl P. Clin Lab Publications, Heidelberg.

Thylen P, Fernvik E, Lundahl J, Lins L-E, Jacobson S (1996). Monocyte and granulocyte CD11b/CD18, CD62l expression and sICAM-1 concentration in the interdialytic period. *Nephron* 74: 275 - 282.

Tielemans C, Delville J-P, Husson C, Madhoun P, Lambrechts A, Goldman M, Vanherweghem J-L (1993). Adhesion molecules and leukocyte common antigen on monocytes and granulocytes during hemodialysis. *Clin Nephrol* 39: 158 - 165.

Trowbridge I, Thomas M (1994). CD45: an emerging role as a protein tyrosine phosphatase required for lymphocyte activation and development. *Annu Rev Immunol* 12: 85 - 116.

Tschöpe D (1991). Thrombozytendiagnostik mit durchflußzytometrischen Verfahren. *mta* 6: 477 - 483.

Tschöpe D (1994). Markeranalyse und Funktionstest an Thrombozyten. In: *Durchflußzytometrie in der klinischen Zelldiagnostik*. Hrsg.: Schmitz G, Rothe G. Schattauer, Stuttgart: 430-431.

Tullis J, Eberle W, Baudanza P, Tinch R (1968). Platelet-pheresis description of a new technic. *Transfusion* 8: 154 - 164.

Tullis J, Tinch R, Baudanza P, Gibson J, DiForte S, Conneely G, Murthy K (1971). Plateletpheresis in a disposable system. *Transfusion* 11: 368 - 377.

Woodman R, Harker L (1990). Bleeding complications associated with cardiopulmonary bypass. *Blood* 76: 1680 - 1697.

Wright J, Lazarus A, Freedmann J (1995). Applications of flow cytometry in the analysis of blood leukocytes. *Transfus Sci* 16: 333 - 341.

Yeo E, Sheppard JA, Feuerstein I (1994). Role of P-selectin and leukocyte activation in polymorphnuclear cell adhesion to surface adherent activated platelets under physiologic shear conditions (an injury vessel wall model). *Blood* 83: 2498 - 2507.

Youssefian T, Masse J, Rendu F, Guichard J, Cramer E (1997). Platelet and megakaryocyte dense granules contain glycoproteins Ib and IIb-IIIa. *Blood* 89: 4047 - 57.

Zatta A, Prosdocimi M (1990). Platelet aggregation in male and female smokers. *Thromb Haemost* 63: 140.

## 7. Anhang

### 7.1 Verzeichnis der Abbildungen

Abb. 1	Darstellung der durchflußzytometrischen Vollblutanalyse im FSC/SSC-Diagramm	27
Abb. 2	Durchflußzytometrische Darstellung einer lysierten Vollblutprobe im FSC/SSC-Diagramm	28
Abb. 3	Expression der spezifischen Fluoreszenz von CD62p auf der Oberfläche von Thrombozyten	33
Abb. 4	Abnahme der Thrombozytenzahl im Blut der Probanden, im Verlauf der Apherese	37
Abb. 5	Verlauf der Fluoreszenzexpression von CD41a	39
Abb. 6	Verlauf der Fluoreszenzexpression von CD62p	39
Abb. 7	Verlauf der Fluoreszenzexpression von CD11a auf neutrophilen Granulozyten	43
Abb. 8	Verlauf der Fluoreszenzexpression von CD11b auf neutrophilen Granulozyten	44
Abb. 9	Verlauf der Fluoreszenzexpression CD11b auf Monozyten	44
Abb. 10	Gegenüberstellung der MCFI von CD62p und CD11b	45
Abb. 11	Verlauf der Fluoreszenzexpression von CD11c auf neutrophilen Granulozyten	46
Abb. 12	Verlauf der Fluoreszenzexpression von CD11c auf Monozyten	46
Abb. 13	Gegenüberstellung der MCFI von CD41a und CD11c	47
Abb. 14	Verlauf der Fluoreszenzexpression von CD18 auf neutrophilen Granulozyten	48
Abb. 15	Verlauf der Fluoreszenzexpression von CD18 auf Monozyten	48
Abb. 16	Verlauf der Fluoreszenzexpression von CD62P auf neutrophilen Granulozyten	49



## 7.2 Verzeichnis der Tabellen

Tab. 1	Thrombozyten-Antigenexpression im Verlauf der Apherese	40
Tab. 2	Antigenexpression auf neutrophilen Granulozyten im Verlauf der Apherese	41
Tab. 3	Antigenexpression auf Monozyten im Verlauf der Apherese	42

## 7.3 Verzeichnis der Originaldaten

### 7.3.1 Veränderung der Thrombozytenzahl beim Spender $\times 10^3$ / $\mu\text{l}$ Blut im Verlauf der Thrombozytapherese.

Spender	Zeitpunkt 0 min	Zeitpunkt 15 min	Zeitpunkt 30 min	Zeitpunkt 60 min
1	200	183	160	109
2	250	202	178	155
3	304	241	171	211
4	223	197	177	154
5	346	325	197	229
6	211	195	173	148
7	292	274	258	227
8	340	324	304	265
9	224	216	193	162
10	254	230	205	182

### 7.3.2 Veränderung der Leukozytenzahl beim Spender $\times 10^3$ / $\mu\text{l}$ im Verlauf der Thrombozytapherese.

Spender	Zeitpunkt 0 min	Zeitpunkt 15 min	Zeitpunkt 30 min	Zeitpunkt 60 min
1	4,8	4,4	4,2	4,5
2	9,0	7,2	7,1	7,6
3	5,6	4,3	5,5	4,4
4	10,9	9,0	9,0	8,9
5	8,5	8,1	8,5	7,4
6	5,1	4,4	4,3	4,5
7	6,8	6,9	6,3	5,8
8	9,0	8,5	7,8	7,2
9	7,3	7,3	7,8	7,9
10	4,5	3,8	3,6	3,9

7.3.3 Veränderung der Erythrozytenzahl beim Spender in Mio/ $\mu$ l Blut im Verlauf der Thrombozytapherese.

Spender	Zeitpunkt 0 min	Zeitpunkt 15 min	Zeitpunkt 30 min	Zeitpunkt 60 min
1	3,75	3,66	3,58	3,71
2	4,61	4,17	4,28	4,29
3	4,57	4,20	4,24	4,20
4	4,32	3,93	4,06	4,06
5	3,93	3,84	3,90	3,93
6	4,12	3,88	3,84	3,81
7	4,59	4,50	4,35	4,33
8	4,72	4,53	4,46	4,45
9	4,22	4,09	4,02	4,03
10	4,47	4,11	4,25	4,22

7.3.4 Veränderung des Hämatokrits in % beim Spender im Verlauf der Zytapherese.

Spender	Zeitpunkt 0 min	Zeitpunkt 15 min	Zeitpunkt 30 min	Zeitpunkt 60 min
1	33,6	32,9	31,9	33,4
2	42,0	37,7	38,6	38,9
3	35,9	33,1	33,4	33,3
4	39,1	35,6	36,9	36,7
5	40,1	39,1	39,8	40,0
6	37,2	34,9	34,6	34,4
7	39,9	39,2	37,9	38,1
8	41,4	39,5	39,1	38,8
9	37,9	36,9	36,2	36,1
10	40,5	36,9	38,1	38,3

### 7.3.5 Veränderung des Hämoglobinwertes in g/dl beim Spender im Verlauf der Thrombozytapherese.

Spender	Zeitpunkt 0 min	Zeitpunkt 15 min	Zeitpunkt 30 min	Zeitpunkt 60 min
1	11,4	10,9	10,8	10,9
2	14,5	13,1	13,2	13,4
3	12,2	11,1	11,3	11,2
4	13,6	12,6	12,8	12,8
5	14,4	14,1	14,2	14,2
6	12,9	12,1	12,0	11,9
7	13,7	13,5	13,0	13,1
8	14,5	13,9	13,8	13,7
9	13,4	12,8	12,7	12,7
10	14,0	12,9	13,2	13,1

### 7.3.6 Veränderung der MCFI der struktur- und aktivierungsabhängigen Thrombozytenmarker im Verlauf der Thrombozytapherese. Gemessen wurden 5000 CD41a-positive Ereignisse.

Spender	Zeitpunkt 0 min	Zeitpunkt 15 min	Zeitpunkt 30 min	Zeitpunkt 60 min	Monoklonaler Antikörper
1	157,67	168,74	180,59	219,21	CD 41a
2	179,70	174,35	223,58	294,02	
3	225,61	224,44	555,87	850,52	
4	426,90	383,95	402,61	499,48	
5	576,43	568,50	2893,97	1007,12	
6	248,32	286,95	395,32	279,96	
7	273,34	293,11	442,19	511,22	
8	210,70	211,19	298,24	420,74	
9	225,69	252,57	284,15	287,22	
10	300,71	250,00	418,50	292,40	
1	11,09	9,62	10,41	13,01	CD 62p
2	8,88	9,98	11,15	19,58	
3	9,41	13,11	25,90	46,27	
4	17,90	19,70	22,92	31,18	
5	30,51	34,06	249,07	75,87	
6	13,70	16,41	31,49	24,26	
7	16,04	18,92	34,49	40,25	
8	7,45	4,55	10,59	15,00	
9	9,83	14,82	19,26	19,69	
10	13,21	12,29	12,75	21,87	

7.3.7 Veränderung der MCFI der neutrophilen Granulozyten-Antigene während der Thrombozytapherese. Gemessen wurden 5000 CD45-positive Ereignisse.

Spender	Zeitpunkt 0 min	Zeitpunkt 15 min	Zeitpunkt 30 min	Zeitpunkt 60 min	Monoklonaler Antikörper
1	165,10	162,23	164,34	165,86	CD 11a
2	28,88	26,23	24,49	22,36	
3	37,47	35,18	33,17	27,01	
4	25,69	21,72	25,03	20,18	
5	29,64	30,77	32,48	28,61	
6	26,24	27,39	21,68	20,00	
7	30,13	36,59	27,50	23,28	
8	33,82	30,75	31,34	27,04	
9	23,98	24,62	22,20	22,20	
10	29,03	28,41	24,08	27,29	
1	51,15	55,99	146,04	375,91	CD 11b
2	93,72	79,31	278,06	246,29	
3	151,90	129,69	246,27	449,36	
4	93,71	69,68	82,25	107,41	
5	171,06	225,27	442	312,52	
6	35,22	50,31	198,82	142,08	
7	40,55	53,66	51,97	152,53	
8	46,78	103,18	144,37	103,63	
9	53,15	51,43	56,43	73,50	
10	57,53	48,37	60,24	72,25	
1	39,64	33,22	64,81	113,07	CD 11c
2	43,83	35,47	84,66	74,90	
3	50,72	40,80	60,51	94,08	
4	45,50	33,09	37,12	41,23	
5	60,20	65,54	97,90	84,19	
6	23,50	25,80	54,36	47,02	
7	26,29	28,27	21,91	44,68	
8	26,61	39,62	58,88	42,11	
9	26,92	29,26	26,69	33,49	
10	32,78	27,81	34,87	30,26	
1	39,64	37,36	46,19	58,13	CD 18
2	39,20	32,50	39,84	37,24	
3	46,36	39,71	38,13	51,19	
4	35,37	28,36	29,67	27,22	
5	38,32	42,02	63,73	45,56	
6	27,34	28,11	31,27	28,46	
7	31,12	31,61	25,81	31,88	
8	29,83	31,03	34,58	27,02	
9	25,33	23,61	22,70	23,43	
10	29,62	27,58	26,92	25,71	

Spender	Zeitpunkt 0 min	Zeitpunkt 15 min	Zeitpunkt 30 min	Zeitpunkt 60 min	Monoklonaler Antikörper
1	16,81	27,94	34,47	34,04	CD 62L
2	30,74	46,66	36,52	37,07	
3	40,31	54,14	32,34	42,30	
4	22,00	33,94	42,96	40,73	
5	24,99	39,05	17,09	22,95	
6	37,73	47,65	70,87	83,46	
7	42,69	67,36	43,46	43,25	
8	42,19	50,37	59,59	62,27	
9	46,44	56,09	72,38	88,58	
10	45,18	46,97	57,25	62,76	

### 7.3.8 Veränderung der MCFI der Monozyten-Antigene während der Thrombozytapherese.

Gemessen wurden 5000 Ereignisse, die CD14-positiv waren.

Spender	Zeitpunkt 0 min	Zeitpunkt 15 min	Zeitpunkt 30 min	Zeitpunkt 60 min	Monoklonaler Antikörper
1	69,08	67,01	78,62	87,14	CD 11a
2	71,97	53,94	63,03	56,99	
3	103,06	89,32	93,70	83,00	
4	69,46	54,35	57,37	49,77	
5	63,32	65,66	61,82	60,67	
6	54,46	54,32	51,776	45,08	
7	64,74	67,62	55,04	47,66	
8	66,31	58,74	58,36	53,79	
9	54,09	53,00	46,19	50,16	
10	53,46	51,27	45,81	43,54	
1	66,73	74,14	117,38	198,08	CD 11b
2	93,35	74,00	139,25	130,23	
3	144,75	125,42	218,77	199,05	
4	74,32	71,72	77,22	92,47	
5	00,89	100,51	142,03	131,45	
6	63,66	78,83	132,64	119,95	
7	51,97	72,02	71,69	116,70	
8	46,91	99,01	113,45	114,61	
9	64,23	69,94	73,41	98,47	
10	62,16	59,58	82,09	87,73	

Spender	Zeitpunkt 0 min	Zeitpunkt 15 min	Zeitpunkt 30 min	Zeitpunkt 60 min	Monoklonaler Antikörper
1	115,21	89,85	143,48	211,96	CD 11c
2	124,79	98,42	139,28	127,14	
3	130,83	114,72	159,78	189,66	
4	107,96	91,85	92,35	101,76	
5	118,37	120,13	150,91	131,87	
6	79,19	83,75	119,90	111,90	
7	63,40	62,81	68,82	91,32	
8	59,98	96,71	116,58	101,41	
9	79,14	87,46	87,51	103,76	
10	70,16	64,23	84,89	69,79	
1		72,27	85,24	95,43	CD 18
2	63,20	52,99	62,49	53,38	
3	89,51	77,55	74,64	80,69	
4	66,92	56,84	54,87	52,06	
5	67,90	57,79	70,44	58,56	
6	58,87	51,57	41,01	42,10	
7	54,37	53,35	43,84	43,51	
8	50,70	50,67	50,47	49,80	
9	51,80	44,10	40,53	45,66	
10	51,43	45,97	41,35	39,39	
1	13,94	21,13	28,10	19,55	CD 62L
2	29,64	45,99	31,21	34,65	
3	39,15	54,84	32,82	45,85	
4	25,92	45,61	56,65	51,55	
5	24,60	41,65	17,65	17,86	
6	28,65	41,61	49,91	62,60	
7	51,90	77,07	52,00	49,56	
8	38,22	40,66	45,88	50,16	
9	57,31	59,82	65,83	84,69	
10	43,38	46,32	50,54	64,18	

## 8. Danksagung

Bei Herrn Professor Dr. P. Kühnl möchte ich mich für die Überlassung des Themas sowie für die motivierende Unterstützung und Übernahme des Referates herzlich bedanken.

Mein Dank gilt Herrn Dr. K. Gutensohn, durch dessen kontinuierliche und verlässliche Betreuung diese Arbeit entstehen konnte.

Weiterhin möchte ich Frau Dipl.-Chem. Ganschow und Frau J. Preuß meinen Dank aussprechen, die mich geduldig und gewissenhaft am Durchflußzytometer einarbeiteten und mir wertvolle Erfahrungen vermittelten.

Den Mitarbeitern des Arbeitsbereichs Zellseparation danke ich für die konstruktive Zusammenarbeit.

Besonders bedanke ich mich bei meinen Freunden, die mich jeder auf ihre persönliche Art und Weise unterstützt haben.

## 9. Lebenslauf

### Persönliche Daten:

Name, Vorname	März, Manuela
Geburtsdatum	15.01.1968
Geburtsort	Hamburg
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch

### Schulbildung:

1974 - 1978	Grundschule, Hamburg
1978 - 1980	Gymnasium, Hamburg
1980 - 1984	Realschule, Hamburg Abschluß: Mittlere Reife
1990 - 1993	Abendgymnasium St. Georg, Hamburg Abschluß: Allgemeine Hochschulreife

### Berufsausbildung:

08/84 - 07/86	Ausbildung zur staatlich geprüften chem.-techn. Assistentin an der Berufsfachschule Hamburg
seit 10/93	Studium der Humanmedizin, Universität Hamburg
08/95	Ärztliche Vorprüfung
03/97	1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
03/99	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
06/00	3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

### Berufstätigkeit:

09/86 - 06/90	Entwicklungsassistentin in den Philips Röhren- und Halbleiterwerken, Hamburg
---------------	--



## 10. Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, daß ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfaßt, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe, und daß ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.