Aus dem Institut für Transfusionsmedizin
und Hämostaseologie
der Philipps-Universität Marburg und des
Universitätsklinikums Giessen und Marburg
Standort Marburg
Leiter: Univ.-Prof. Dr. med. V. Kretschmer

Durchflusszytometrische Untersuchung zur Frage der Absorbtion und Elution von HLA-Klasse I-Antigenen auf Thrombozyten während der Lagerung als gepoolte Thrombozytenkonzentrate

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin

dem Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Markus Heim
aus Mannheim

Marburg 2006

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg und des Universitätsklinikums Giessen und Marburg, Standort Marburg am 28.09.2006.
Gedruckt mit der Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. med. B. Maisch
Referent: PD Dr. med. T. Zeiler
Korreferent: Prof. Dr. J. Schneider

Inhaltsverzeichnis

A. Abbildungsverzeichnis 3

B. Tabellenverzeichnis 4

C. Abkürzungsverzeichnis 5

1. Einleitung 6

2. Material und Methoden 12

2.1 Auflistung verwendeter Geräte 12

2.1.1 Geräte 12

2.1.2 Pufferlösungen 12

2.1.3 Antikörper 12

2.1.4 Röhrchen und Spritzen 12

2.1.5 Pipetten 13

2.1.6 Software 13

2.1.7 Sonstiges 13

2.2 Herstellung und Lagerung von Thrombozytenkonzentraten aus Vollblut 13

2.2.1 Herstellung von Thrombozytenkonzentraten aus Vollblut 13

2.2.2 Lagerung und Überwachung der Intaktheit der TK 14

2.3 Technik der Probenentnahme 15

2.4 Verwendete Methoden 15

2.4.1 Zellzählung am Sysmex 15

2.4.2 Färbung 15

2.4.3 pH-Wert Bestimmung 16

2.4.4 Duchflusszytometrische Messung 16

2.4.5 Auswertung am Durchflusszytometer 18

2.5 Studiendesign 19

2.5.1 Vorversuch 19

2.5.2 Versuch 1 21

2.5.3 Versuch 2 23

2.6 Statistische Auswertung 27

3. Ergebnisse 29

3.1 Vorversuch 29

3.2 Versuch 1 31

3.3 Versuch 2 36

3.4 Positivkontrolle aus Versuch 1 und 2 42

4. Diskussion 44

4.1 Struktur und Funktion von Thrombozyten 44

4.2 Thrombozytäre Alloantigene 45

4.2.1 Lösliches HLA-Antigen im Plasma 46

4.2.2 Passive Adsorption von HLA-Klasse I-Antigen 48

4.2.3 Proteinbiosynthese durch Thrombozyten 49

4.3 Analyse und Diskussion der Methode und der Ergebnisse 50

5. Zusammenfassung 55

6. Literaturverzeichnis 58

7. Anhang 65

7.1 Ehrenwörtliche Erklärung 65

7.2 Danksagung 66

7.3 Lebenslauf 67

7.4 Verzeichnis der akademischen Lehrer 68

A. Abbildungsverzeichnis

2-1 : Beispielhafte Darstellung einer Messung der MFI des HLA-A2-Antikörpers bei 5000 detektierten Thrombozyten einer Negativkontrolle 19

2-2 : Studiendesign Versuch 1 23

2-3 : Studiendesign Versuch 2 25

2-4 : Auswerteplots aus Versuchsreihe 2 zur Veranschaulichung der Datenauswertung 27

3-1 : Kontrollgruppe: Bindung des Anti-HLA-A2-Antikörpers von „gewaschenen“ und „nicht gewaschenen Thrombozyten“ aufgetragen gegen die 5 Messzeitpunkte dargestellt als mittlere Fluoreszenzintensität 30

3-2 : Testgruppe: Bindung des Anti-HLA-A2-Antikörpers von „gewaschenen“ und „nicht gewaschenen Thrombozyten“ aufgetragen gegen die 5 Messzeitpunkte dargestellt als mittlere Fluoreszenzintensität 30

3-3 : Beispielhafte Ergebnisse eines Ansatzes aus Versuch 1 für Ia und IIIa zum Messzeitpunkt t0, t3 und t5 32

3-4 : Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) von Ia, IIa und IIIa aufgetragen gegen die 6 Messzeitpunkte (t0 – t5) 33

3-5 : Beispielhafte Ergebnisse eines Ansatzes aus Versuch 2 37

3-6 : Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der Bindung des Anti-HLA-A2-Antikörpers gemessen im Bereich Marker 1 für die Testansätze Ib, IIb und IIIb aufgetragen gegen die 6 Messzeitpunkte (t0 – t5) 40

3-7 : Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der IgG Isotypkontrollen von Ib, IIb und IIIb aufgetragen gegen die 6 Messzeitpunkte (t0 – t5) 41

3-8 : Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) des Anti-HLA-A2-Antikörpers der Positivkontrolle aus Versuch 1 und 2 (IVa und IVb) aufgetragen gegen die 6 Messzeitpunkte (t0 – t5) 43

3-9 : Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der IgG1 Markierung der Positivkontrolle (IVb) aufgetragen gegen die 6 Messzeitpunkte (t0 – t5) 43

4-1 : Struktur und Funktion von MHC Klasse I-Molekülen 46

B. Tabellenverzeichnis

2-1 : Settings FACSCalibur 18

3-1 : Ergebnisse Wilcoxon Vorzeichentest für Ia, IIa und IIIa. 31

3-2 : Bindung von Anti-HLA-A2-Antikörpern (dargestellt als MFI ± Standardabweichung) auf Thrombozyten über den Lagerungszeitraum (t0 – t5) 33

3-3 : Bindung von Anti-HLA-A2-Antikörpern (dargestellt als MFI ± Standardabweichung) über den Lagerungszeitraum (t0 – t5) 34

3-4 : Ergebnisse Wilcoxon Vorzeichentest an den 6 Messzeitpunkten (t0 - t5) 35

3-5 : Ergebnisse Wilcoxon Vorzeichentest für Ib, IIb, IIIb in Marker 1 36

3-6 : Ergebnisse Wilcoxon Vorzeichentest für die IgG Kontrollen von Ib, IIb, IIIb und IVb 38

3-7 : Bindung von Anti-HLA-A2-Antikörpern und IgG Isotypkontrollen über den Lagerungszeitraum (t0 – t5) (dargestellt als MFI ± Standardabweichung) 39

3-8 : Ergebnisse Wilcoxon Vorzeichentest an den 6 Messzeitpunkten (t0 - t6) 42

C. Abkürzungsverzeichnis

CILL	Critical immunogenic leukocyte load of blood products
EK	Erythrozytenkonzentrat
ELISA	Enzyme-linked immuno sorbent assay
FFP	Fresh frozen plasma
FITC	Fluoreszein
FSC	Forward Scatter (= VSL)
HPA	Plättchenspezifische Antigene
LCT	Lymphozytotoxischer Test
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PE	R-Phycoerythrin
Pool-TK	Gepooltes TK aus verschiedenen Vollblutspenden
RES	Retikuloendotheliales System
SSC	Side Scatter (= SSL)
SSL	Seitwärtsstreulicht
TK	Gepooltes Thrombozytenkonzentrat
TKZ	Thrombozytapheresekonzentrat vom Zellseparator
VSL	Vorwärtsstreulicht
ZFP	Zellfreies Plasma

1 Einleitung

In den beiden letzten Jahrzehnten ist der Bedarf an Thrombozytenkonzentraten in den medizinisch entwickelten Ländern stark angestiegen (Kroll H. *et al.* 2003). Allein in Deutschland wurden im Jahr 2002 191.458 Thrombozytapheresekonzentrate (TKZ) und 109.178 gepoolte Thrombozytenkonzentrate (Pool-TK) aus Vollblutspenden transfundiert (Bericht zur Meldung nach §21 Transfusionsgesetz 2003).

Thrombozytentransfusionen werden vor allem zur Vermeidung und/oder Therapie von Blutungen bei thrombozytopenischen Patienten eingesetzt. Dies betrifft im Bereich der Akuttherapie Thrombozytopenien nach starkem Blutverlust und Massivtransfusionen. Der größte Teil der Thrombozytentransfusionen findet jedoch bei Patienten statt, welche eine längerfristige Substitution von Thrombozyten benötigen. Vor allem hämatologische und onkologische Erkrankungen, respektive deren Therapie, führen zu primären und sekundären Knochenmarksinsuffizienzen, welche die Substitutionen mit Thrombozyten über einen längeren Zeitraum notwendig machen. Insbesondere bei Patienten mit akuten oder chronischen Leukämien, nach Radio-Chemotherapie und nach allogener oder autologer Stammzelltransplantation ist über mehrere Wochen oder Monate, beim myelodysplastischem Syndrom manchmal sogar über Jahre hinweg, die Substitution mit Thrombozyten erforderlich.

Das wiederholte Ausbleiben eines Therapieerfolges einer Thrombozytentransfusion, also ein nicht adäquater Anstieg der Thrombozytenzahlen beim Patienten trotz Übertragung einer ausreichenden Menge an Thrombozyten, der sog. Refraktärzustand, stellt dabei ein großes Problem dar. Thrombopenische Blutungen können für diese Patienten vital bedrohlich werden.

Die Gründe für das Ausbleiben des Transfusionserfolges werden in immunologische und nicht-immunologische unterteilt. Die nicht-immunologisch bedingten Ursachen sind v.a. Milzvergrößerungen, Verbrauchskoagulopathien, fieberhafte, septische Prozesse und Medikamenteneinnahme. So kann z.B. bei ausgeprägter Splenomegalie der Plättchenanstieg auf 20% reduziert sein (Slichter *et al.* 1990).

Immunologisch bedingte Ursachen sind vor allem das Vorliegen plättchenreaktiver Alloantikörper beim Patienten, welche sich gegen Antigene richten, die auf der Thrombozytenoberfläche exprimiert werden. Dies sind in erster Linie Antikörper gegen HLA-Klasse I-Antigene und in deutlich geringerem Ausmaß Antikörper gegen plättchenspezifische Antigene (HPA) sowie gegen die A- und B-Antigene des AB0 Systems (Kiefel V. *et al.* 2001; Heddle N.M. *et al.* 1995). Kontaminierende Leukozyten in Blutkomponenten konnten in verschiedenen Studien als Hauptursache für eine HLA-Immunisierung identifiziert werden (Brand A. *et al.* 2001; Heddle N.M. *et al.* 1995; Heddle N.M. *et al.* 1995; Novotny V.M. *et al.* 1995; TRAP study group 1997). Nach einer umfassenden Metaanalyse (Reesink H.W. *et al.* 1992) betrug die HLA-Immunisierungsrate bei insgesamt 1393 Patienten, die nicht-leukozytendepletierte zelluläre Blutkomponenten erhalten hatten, im Mittel 41%, während diese bei 663 Patienten, die mit leukozytendepletierten Präparaten transfundiert worden waren, nur bei 9% lag. Die größte prospektive und randomisierte Studie zu diesem Thema (TRAP study group 1997) umfasst 530 Patienten mit akuter myeloischer Leukämie, denen jeweils ungefilterte (TK, Kontrollgruppe), gefilterte (F-TK), mit UVB bestrahlte (UVB-TK) bzw. Thrombozytenkonzentrate als Apheresepräparat vom Zellseparator (A-TK) transfundiert wurden. Die Inzidenz des Auftretens lymphozytotoxischer Antikörper und die eines Refraktärzustandes waren in den 3 Behandlungsgruppen (F-TK, UVB-TK, A-TK) im Vergleich zur Kontrollgruppe (TK) signifikant geringer. Die Autoren schließen aus ihren Untersuchungen, dass Patienten, welche absehbar für längere Zeit Thombozytentransfusionen benötigen, mit leukozytendepletierten Blutkomponenten versorgt werden sollen um das Risiko einer Immunisierung gegen HLA-Antigene zu verringern.

In verschiedenen klinischen Studien konnte nachgewiesen werden, dass die Reduktion der Leukozytenzahlen in Blutprodukten unter 5×10^6 pro Einheit zu einer signifikanten Reduktion der primären HLA-Immunisierungsrate führt (Brand A. *et al* 1988; Saarinen U.M. *et al.* 1990; Fisher M. *et al.* 1985; Heddle N.M. *et al.* 1994). Aus diesem Grund wird dieser Grenzwert als „critical immunogenic leukocyte load of blood products (CILL)“ bezeichnet (Lane T.A. *et al.* 1992; Reesink H.W. *et al.* 1992). Allerdings kann dieser Grenzwert eine sekundäre Boosterung von, eventuell durch frühere Transfusionen oder Schwangerschaften bereits präformierten HLA-Antikörpern nicht vermeiden (Andreu G. *et al* 1994; Novotny *et al.* 1995). Daher wird der zulässige Schwellenwert

für kontaminierende Leukozyten in zellulären Blutkomponenten in manchen Ländern noch geringer (1 x 10^6) angesetzt (Transformation of labile blood products: deleukocytation, 1994).

Seit dem 1.10.2001 dürfen in Deutschland aufgrund gesetzlicher Bestimmungen ausschließlich solche Vollblute, Erythrozytenkonzentrate und Thrombozytenkonzentrate in Verkehr gebracht werden, deren Leukozytengehalt weniger als 1 x 10^6 pro Einheit (Blutkonserve) beträgt. Für Thrombozytenkonzentrate bezieht sich die Begrenzung der Leukozytenzahl auf die therapeutische Standarddosis entsprechend einem Thrombozytapheresekonzentrat oder einem gepoolten Thrombozytenkonzentrat aus 4 bis 6 Vollblutspenden. Die Leukozytenabreicherung ist vor der Lagerung der Vollblute, Erythrozytenkonzentrate und Thrombozytenkonzentrate mit einem geeigneten Verfahren durchzuführen (Bekanntmachung des Paul-Ehrlich-Instituts, 2000).

„Eine Reduzierung der HLA-Immunisierungsraten auf etwa 10-20% sollte die Einführung der generellen Leukozytendepletion in Deutschland mit sich bringen“, mutmaßte Kroll in Müller-Eckhardts Buch „Transfusionsmedizin“ (Kroll H. *et al* 2003). Nichts desto trotz stellt die Versorgung der Patienten, die aufgrund einer HLA-Immunisierung refraktär gegen Thrombozytentransfusionen geworden sind, auch weiterhin ein großes Problem dar. Diese Patienten müssen mit Thrombozyten von passenden, HLA-kompatiblen Blutspendern versorgt werden, um adäquate Anstiege der Thrombozytenzahlen nach Transfusion zu erreichen. Diese Thrombozytapheresekonzentrate werden durch ein automatisiertes Spendeverfahren unter Verwendung von Zellseparatoren von einzelnen, HLA typisierten Spendern hergestellt, und enthalten in der Regel zwischen 2 und 5 x 10^{11} Thrombozyten in etwa 300 ml Plasma (Kroll H. *et al* 2003). Die meisten Blutspendedienste verfügen zwar über Spenderkarteien mit HLA typisierten Spendern, aber dennoch können nicht in jedem Fall, bzw. rechtzeitig geeignete Thrombozytenkonzentrate zur Verfügung gestellt werden. Durch die Vielfalt des HLA-Systems ist es durchaus möglich, dass ein einzelner Blutspendedienst in seiner Kartei keinen passenden Spender führt, und sich somit u.U. bundesweit auf die Suche nach einem Spender machen muss.

Was also tun wenn kein passender Spender bzw. kein passendes HLA ausgewähltes Thrombozytenkonzentrat vom Zellseparator für den Patienten zur Verfügung steht? Im

klinischen Alltag muss man in dieser Situation gelegentlich auf randomisierte, nicht HLA ausgewählte Thrombozytenkonzentrate, gewonnen aus Vollblutspenden mehrerer verschiedener Einzelspender, zurückgreifen. Dies geschieht in der Vorstellung, dass unter den Thrombozyten von 4 - 6 verschiedenen Blutspendern mit hoher Wahrscheinlichkeit auch Thrombozyten vorhanden sind, gegen deren Oberflächenantigene der Empfänger noch nicht immunisiert ist.

Thrombozytenkonzentrate aus einzelnen Vollblutspenden enthalten > 6 x 10^{10} Thrombozyten. Zur Prophylaxe oder Therapie thrombozytopenischer Blutungen werden üblicherweise 4 - 6 dieser Einzelkonzentrate transfundiert. Werden diese Thrombozyten mittels eines Filters leukozytendepletiert, so kommt es im Rahmen der Abreicherung durch Filtration zu erheblichen Verlusten (bis 20 %) an Thrombozyten. Diese Thrombozyten verbleiben im Filter. Dabei ist allerdings ein Sättigungseffekt zu beobachten, weshalb es sinnvoll ist, mehrere Thrombozytenkonzentrate über denselben Leukozytenfilter zu filtrieren. Üblicherweise werden dafür 4 - 6 AB0 Blutgruppengleiche Thrombozytenkonzentrate aus Vollblutspenden in einen Transferbeutel zusammengeführt („gepoolt“) und anschließend über einen Leukozytenfilter in einen Lagerungsbeutel überführt.

Gepoolte Thrombozytenkonzentrate können alternativ auch durch das Poolen von 4 - 6 AB0-Blutgruppengleichen „Buffy-Coats“ mit anschließender Zentrifugation gewonnen werden.

Das Zusammenführen von Thrombozyten und Plasma verschiedener Spender und die anschließende Leukozytendepletion durch Filtration kann beim Poolen von einzelnen Thrombozytenkonzentraten aus Vollblut unmittelbar vor der Transfusion erfolgen, bei der Herstellung aus „Buffy-Coats“ erfolgt dies allein schon herstellungstechnisch bedingt, jedoch zu Beginn der Lagerungszeit. Die Lagerung bis zur Transfusion erfolgt unter ständiger Agitation und bei Temperaturen von 22°C ± 2°C über einen Zeitraum von maximal 5 Tagen (Eriksson L. *et al.* 1990; Eriksson L. *et al.* 1993). Die Thrombozytendosis eines gepoolten Thrombozytenkonzentrats beträgt > 2 x 10^{11} Thrombozyten (entsprechend einem Thrombozytapheresekonzentrat).

Nun gibt es jedoch aus verschiedenen Studien Hinweise darauf, dass Thrombozyten HLA-Antigene abgeben, bzw. diese aus dem Plasma aufnehmen. Eine Anlagerung lös-

licher bzw. gelöster HLA-Antigene aus dem Plasma während der Lagerung gepoolter Thrombozytenkonzentrate könnte zu HLA-Inkompatibilität vorher kompatibler Thrombozyten führen, und somit die Effizienz der Transfusion gepoolter Konzentrate bei alloimmunisierten Patienten reduzieren.

Die Existenz der löslichen HLA-Antigene wurde bereits 1970 durch van Rood beschrieben (van Rood J.J. *et al.* 1970) und ihre Quantifizierung mittels „enzyme-linked immunosorbant assay“ (ELISA) im Plasma gelang erstmals 1987 (Kao K.J. *et al.* 987). Letztendlich blieb jedoch bisher unklar, ob bzw. in welchem Umfang das HLA-Muster auf Thrombozyten das Ergebnis passiver Anlagerung löslicher HLA-Antigene aus dem Plasma, oder das Ergebnis der Proteinbiosynthese der Megakaryozyten bzw. Thrombozyten ist. Eine Frage die in der Literatur kontrovers diskutiert wird.

Mittels indirekter Hemmung des Lymphozytotoxischen Tests (LCT) fanden Lalezari et al. 1982 (Lalezari P. *et al.* 1982) sowie Santoso et al. 1986 (Santoso S. *et al.* 1986) Hinweise, die für die Anlagerung aus dem Plasma sprechen. Blumberg et al. (Blumberg N. *et al.* 1984) nutzten später das Antimalariamittel Chloroquin um das HLA-Antigen von der Oberfläche von Thrombozyten zu lösen, im Gegensatz zu Lymphozyten, die von dieser Behandlung unbeeindruckt blieben, gelang die Ablösung. Die Bindung von HLA-Antigen auf der Oberfläche von Thrombozyten musste sich von der auf Leukozyten unterscheiden, ein Ergebnis, was Ihrer Meinung nach, die Anlagerungstheorie stützte. Die Möglichkeit HLA-Antigene mittels Säure von der Oberfläche von Thrombozyten zu lösen nutzten 1996 Novotny und seine Kollegen (Novotny V.M. *et al.* 1996). Am Durchflusszytometer konnten sie mittels Fluoreszenzantikörpern die Fähigkeit der Thrombozyten zur (Wieder-) Anlagerung von HLA-Klasse I-Antigenen zeigen, eine Neusynthese der abgelösten Antigene konnte jedoch nicht nachgewiesen werden.

Kieffer et al. konnten dem entgegen durch Elektronenmikroskopie sowohl endoplasmatisches Retikulum als auch Ribosomen im Thrombozyten nachweisen (Kieffer N. *et al. 1987)*, somit war bewiesen, dass die Blutplättchen zumindest das Werkzeug zur Proteinbiosynthese besitzen. Durch die Möglichkeiten, die die Methode der Polymerase Kettenreaktion (PCR) bot, wiesen Santoso et al. mRNA in Thrombozyten nach. Außerdem konnten sie in der Gelelektrophorese Banden, die dem Molekulargewicht integraler Membranproteine von HLA-Antigen entsprachen, nachweisen (Santoso S. *et al.* 1993).

Sind die Thrombozyten nun in der Lage HLA-Antigen aus dem Plasma anzulagern? Können sie dadurch während der Lagerung in gepoolten Thrombozytenkonzentraten unter Routinebedingungen ihre Antigenität ändern? Werden vorher kompatible Thrombozyten durch eine mögliche Angleichung der HLA-Muster im gepoolten Präparat inkompatibel? Gibt es bei der Lagerung gepoolter Thrombozytenkonzentrate gar einen Shift von HLA-Antigenen, kommt es also zu einer Abschilferung und Übertragung von HLA-Antigenen zwischen Thrombozyten?

Diesen Fragen sollte diese Studie auf den Grund gehen.

2 Material und Methoden

2.1 Auflistung verwendeter Geräte und Materialien

2.1.1 Geräte

Automatischer Zellcounter:

-Sysmex K-1000 (TOA Medical Electronics, Kobe, Japan)

Zentrifugen:

-Varifuge K (Heräus-Christ GmbH, Osterode, Deutschland)

-Cryofuge 6000i (Heräus-Christ GmbH, Osterode, Deutschland)

Durchflusszytometer:

-FACSCalibur (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland)

pH-Meter:

-Digital-pH-METER, (Knick elektronische Messgeräte GmbH & Co KG, Berlin, Deutschland)

2.1.2 Pufferlösungen

Phosphatpufferkonzentrat (PBS, Behring Diagnostics, Deutschland)

Fetales Rinderserum (BSA, GipcoBRL, Karlsruhe, Deutschland)

PBS/BSA (99% PBS + 1% BSA)

Sörensen-Puffer (Lösung A: 11,839g Na_2HPO_4 * 2 H_2O / l H_2O; Lösung B: 9,074 g KH_2PO_4 / l H_2O. 196ml der Lösung B wird mit einem entsprechenden Volumen der Lösung A auf einen pH– Wert von 7,4 eingestellt, dann wird der Ansatz auf 1000ml mit H_2O aufgefüllt.)

2.1.3 Antikörper

CaliBRITE TM-Beads (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland)

Anti-CD41, PE konjugiert (clone P2, Coulter Immunotech, Marseille, Frankreich)

Anti-HLA-A2(28), FITC konjugiert (One Lambda, Canoga Parc, Kalifornien, USA)

Anti-IgG1 (mouse anti human), FITC konjugiert (Coulter Immunotech, Marseille, Frankreich)

2.1.4 Röhrchen und Spritzen

12 x 75mm Polystyrene Rundbodenröhrchen (BD Falcon™, Bedford, MA, USA)

50ml Röhrchen (BD Falcon™, Bedford, MA)

Sterile 2 ml Einmalspritzen (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland)

Sterile 20 ml Einmalspritzen (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland)

Sterile 1 mal Kanülen 19 G (Becton Dickinson, Drogheda, Ireland)

2.1.5 Pipetten

100µl Pipette (Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, Deutschland)

1000µl Pipette (Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, Deutschland)

2.1.6 Software

Excel (Excel XP, Microsoft, Redmond, CA, USA)

Word (Word XP, Microsoft, Redmond, CA, USA)

SPSS (SPSS 10.0, SPSS inc., Chicago, USA)

CELLQuest Standard Software (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland)

2.1.7 Sonstiges

Top and Bottom 5-fach Beutel-System (Compoflex, Fresenius HemoCare, Friedberg, Deutschland)

HLA-Mikrotitertestplatten (Biotest AG, Dreieich, Deutschland)

Sampling Site Coupler (Baxter, Deerfield, Illinois, USA)

0,22 µm Filter (Millipore corp., Bedford, MA, USA)

2.2 Herstellung und Lagerung von Thrombozytenkonzentraten aus Vollblut

Die für die Studie benötigten Thrombozytenkonzentrate wurden aus Vollblut hergestellt, gespendet von HLA typisierten Spendern aus der Kartei der Universitätsblutbank Marburg. Die Spender entsprachen den Regulationskriterien für Blutspender (Wissenschaftlicher Beirat der Bundesärztekammer, 2000). Ihr HLA-Muster war zuvor mittels Standard-Mikrolymphozytotoxititätstest (Terasaki P.I. *et al.* 1973) auf kommerziell erhältlichen vorbeimpften Mirkotitertestplatten bestimmt worden.

2.2.1 Herstellung von Thrombozytenkonzentraten aus Vollblut

Die Thrombozytenkonzentrate wurden mittels der Buffy-Coat-Methode (Kretschmer V. *et al.* 1990) aus Vollblutspenden hergestellt.

Die Vollblutspende erfolgte in ein 5-fach Beutel-System, bestehend aus einem Entnahmebeutel, einem Fresh-Frozen-Plasma (FFP) Lagerbeutel, einem TK Lagerbeutel, einem Transferbeutel für Erythrozytenkonzentrate (EK) und einem EK Lagerbeutel, sowie Punktionsnadel und Filter. Die Blutspende erfolgte direkt in den Entnahmebeutel. Unmittelbar nach der Spende wurde die Vollblutkonserve gewogen und das komplette Beutelsystem auf einer Kühlplatte bei 4°C für 60 – 120 min zwischengelagert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation des Beutelsystems für 15 min bei 4068 g, wobei es im Entnahmebeutel zur Auftrennung des Vollblutes in Plasma, Buffy-Coat und EK entsprechend der unterschiedlichen Dichte dieser Blutbestandteile kommt. Die Blutbestandteile wurden nun über einen Schlauchanschluss im oberen Beutelbereich (FFP) und im unteren Beutelbereich (EK) in die entsprechenden Lagerbeutel abgepresst. Das auf diese Weise entstehende EK sowie das FFP wurden zur weiteren Bearbeitung abgeschweißt. Am Entnahmebeutel verblieb der Thrombozytenlagerbeutel. Im Entnahmebeutel verblieben 80 – 120 ml Buffy-Coat, der fast alle Thrombozyten und Leukozyten der Vollblutspende enthielt. Dieses System ruhte dann für 2,5 – 4 Std. zur Desaggregation der Thrombozyten. Anschließend wurden die Beutel 30 min in einem Rotator durchmischt und dann erneut zentrifugiert. Bei diesem, mit niedriger G-Zahl durchgeführtem Zentrifugationsschritt (6 min 20 sec bei 462 g) entstand ein thrombozytenreiches Plasma, das dann in den Thrombozytenlagerungsbeutel abgepresst wurde. Das so entstandene TK wog ca. 50 g und enthielt zwischen 70 und 80% der Thrombozyten der jeweiligen Vollblutspende.

2.2.2 Lagerung und Überwachung der Intaktheit der Thrombozytenkonzentrate

Gelagert wurden die TK unter ständiger Agitation auf einer Thrombozyten-Schaukel bei 22°C ± 2°C über den Zeitraum von 5 Tagen. Dies entspricht der maximalen Lagerungszeit bis zu einer möglichen Transfusion unter Routinebedingungen (Eriksson L. *et al.* 1990; Eriksson L. *et al.* 1993). Vor jedem Messgang wurde die als „Swirling-Phänomen“ bezeichnete schimmernde Opaleszens des Konzentrats überprüft. Dies ist ein einfach durchzuführender visueller Test zur Überprüfung der Qualität von Thrombozyten in Thrombozytenkonzentraten. Zusätzlich wurde in der zweiten Versuchsreihe eine pH-Wert-Bestimmung am letzten Messtag durchgeführt um sicher zu stellen, dass sich die pH-Werte im vorgeschriebenen Toleranzbereich befanden (Wissenschaftlicher Beirat der Bundesärztekammer, 2000).

2.3 Technik der Probenentnahme

Um eine sterile Probenentnahme aus den TK zu gewährleisten wurden die TK mit einem Sampling Site Coupler versehen. Zu den jeweiligen Messzeitpunkten wurde, nach gründlichem Durchmischen des TK unter sterilen Bedingungen, mit einer 2 ml Einmalspritze und einer Einmalkanüle (19 G) zunächst das volle Volumen der Spritze vorsichtig aspiriert und dann, bis auf 0,1 – 0,2 ml, der Inhalt wieder in den TK Lagerungsbeutel abgegeben. So wurde sichergestellt, dass eine repräsentative Probe abgenommen wurde und möglichst viele Thrombozyten im Konzentrat verblieben. Die so gewonnenen Proben wurden in ein 12 x 75mm Polystyrene Rundbodenröhrchen überführt.

2.4 Verwendete Methoden

2.4.1 Zellzählung am Sysmex

Alle entnommenen Proben wurden vor der Markierung auf eine Thrombozytenkonzentration von ca. 20.000/µl verdünnt. Hierzu wurden die Proben (ca. 0,1 - 0,2 ml) zunächst mit 1 ml PBS/BSA verdünnt und anschließend die Thrombozytenkonzentration (/µl) mit dem automatischen Zellcounter Sysmex bestimmt. Anhand der ermittelten Thrombozytenkonzentration in der vorverdünnten Probe wurden die Proben dann mit PBS/BSA auf eine Thrombozytenkonzentration von ca. 20.000/µl eingestellt.

2.4.2 Färbung

2.4.2.1 Färbung mit Anti-HLA-A2

20 µl der verdünnten Thrombozytenprobe wurden mit 5 µl des FITC konjugierten Anti-HLA-A2 Antikörpers in einem Rundbodenröhrchen vorsichtig vermengt und dann in einer Styroporbox, unter Ausschluss von Licht, für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Während der Inkubationszeit wurden die Proben zweimal durch vorsichtiges Schütteln vermischt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Färbung durch die Zugabe von 500 µl kühlschrankkaltem PBS gestoppt.

2.4.2.2 Färbung mit Anti-IgG1 (Isotypkontrolle)

Die Färbung mit Anti-IgG1, die so genannte Isotypkontrolle, erfolgte exakt nach dem gleichen Schema. 20 µl der verdünnten Thrombozytenprobe wurden mit 5 µl des FITC

konjugierten Anti-IgG1-Antikörpers vermengt, 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und die Färbung wurde durch die Zugabe des kühlschrankkalten PBS gestoppt.

2.4.3 pH-Wert Bestimmung

Am letzten Messtag wurde der pH-Wert der Konzentrate bestimmt. Pro Untersuchung wurden jeweils 5 ml Thrombozytenkonzentrat in ein Polystyrolröhrchen abgenommen. Die Probenröhrchen wurden nach dem Befüllen sofort verschlossen um artifizielle pH-Verschiebungen durch Gasaustausch zu vermeiden. Die pH-Bestimmung erfolgte dann innerhalb von maximal 15 Minuten bei Raumtemperatur mit dem Digital-pH-METER.

2.4.4 Durchflusszytometrische Messung

2.4.4.1 Grundlegende Prinzipien der Durchflusszytometrie

Das Durchflusszytometer ist ein optoelektronisches Messgerät, das optische Signale unterschiedlicher Qualitäten (wie Streuung und Fluoreszenz) detektiert und quantifiziert. Mit Hilfe der Durchflusszytometrie kann innerhalb sehr kurzer Zeit eine Vielzahl von Zellen auf Einzelzellniveau bezüglich ihrer biochemischen und physikalischen Eigenschaften charakterisiert werden. Hierfür werden Einzelzellen (ggf. nach Färbung mit einem fluorochrom markierten Antikörper) in Suspension an einem Laserstrahl (fokussiertem monochromen Lichtstrahl) vorbeigeführt. Sowohl die Streuung und Brechung des Laserstrahles, als auch die Lichtemission durch die Fluorochrome nach Anregung durch das Laserlicht können gemessen und quantifiziert werden.

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

Als Lichtquelle diente dem in dieser Studie verwendeten FACSCalibur ein luftgekühlter Argon Laser, an dessen Licht die Thrombozyten perlschnurartig in einer Durchflusszelle vorbeigeführt wurden. Die einzelnen Zellen wurden in der Durchflusszelle von einem Hüllstrom aus Flüssigkeit umspült, der durch seine hohe Flussgeschwindigkeit dafür sorgte, dass sich die zu untersuchenden Zellen im Zentrum der Messzelle und somit im Fokus des Laserstrahls befanden („hydrodynamische Fokussierung“). Die Zellen pas-

sierten einzeln den Analysepunkt, an dem sie durch den einfallenden Laserstrahl (Wellenlänge 488 nm) erfasst wurden. Traf der Laserstrahl auf die Zelle, so wurde der größte Teils des Lichts in Richtung des einfallenden Strahls gebeugt. Das so entstandene Streulicht wird Forward Scatter (FSC) bzw. Vorwärtsstreulicht (VSL) genannt und gab Auskunft über die Zellgröße. Die innere Struktur der Zelle (Zellgranularität und Membranfaltung) brach und reflektierte das einfallende Licht des Lasers ebenfalls. Dieses, als Side Scatter (SSC) bzw. Seitwärtsstreulicht (SSL) bezeichnete Licht, wurde rechtwinklig zum einfallenden Laserstrahl gemessen.

Traf der Laserstrahl auf eine mit Fluorochrom markierter Zelle, so wurde das vom entsprechenden Fluoreszenzfarbstoff emittierte Fluoreszenzlicht gemessen und ließ damit Rückschlüsse auf die Stärke der Markierung zu. In dieser Arbeit wurde als Fluorochrom FITC (Emissionsmaximum 525 nm, Absorptionsmaximum 488 nm) zur Markierung verwendet.

Das optoelektronische Detektionssystem quantifizierte die Streulicht- bzw. Fluoreszenzwerte jeder einzelnen Zelle, indem Licht unterschiedlicher Wellenlänge durch optische Filter voneinander getrennt wurde und den Detektoren, sog. Lichtverstärkerröhren zugeleitet wurde.

Die Lichtverstärkerröhren wandelten Licht in elektrische Impulse um, wobei die Stärke des Lichtsignals mit der Höhe des Impulses korrelierte. Die elektrischen Impulse wurden verstärkt, und dann digitalisiert an den Rechner weitergegeben. Die an den Rechner übermittelten Impulse wurden, abhängig von ihrer Voltzahl, in Klassen eingeteilt. In jeder Klasse wurden Ereignisse identischer Größe addiert. Die Größe des Signalunterschieds zwischen zwei benachbarten Klassen hängt von der Wahl des Verstärkermodus – linear oder logarithmisch – ab.

2.4.4.2 Messung

Vor der eigentlichen Messung wurde an jedem Messtag die Geräteempfindlichkeit des FACS Calibur überprüft und sichergestellt. Hierzu wurde, wie vom Hersteller empfohlen, das Durchflusszytometer jeweils mit CaliBRITE TM-Beads kalibriert.

Für die Messungen wurde ein Messfenster zur Erfassung der Thrombozyten erstellt. Die Thrombozyten wurden hierzu durch ein für Thrombozytengröße und –granularität ent-

sprechendes VSL/SSL Fenster eingegrenzt. Die Position dieses Messfensters (gate) wurde zuvor anhand einer Färbung, mit einem für Thrombozyten spezifischen Antikörper (Anti-CD41), überprüft. Die Settings am Durchflusszytometer waren dabei wie aus der folgenden Tabelle ersichtlich eingestellt (s. Tab. 2-1).

Tab. 2-1: Settings FACSCalibur

Detectors/Amps:

Parameter	Detector	Voltage	AmpGain	Mode
P1	VSL	E01	2.00	Log
P2	SSL	392	1.00	Log
P3	FL1	886	1.00	Log
P4	FL2	674	1.00	Log

Threshold:
Primary Parameter: VSL
Value: 235
Compensation:
FL1 – 1.8% FL2
FL2 – 25.4% FL1

Die Messung am FACSCalibur schloss sich unmittelbar an das Stoppen der Färbung (s.2.4.2.1). Gemessen wurde mit der CELLQuest Standard Software. Da die zu erwartende minimale und maximale Signalintensität nicht nah beieinander lagen und kleine Zellen gemessen wurden, wählten wir eine logarithmische Verstärkung (s. „Mode“ in Tab. 2-1). Je 5 000 Ereignisse, also 5 000 Thrombozyten, wurden pro Probe detektiert, gemessen und gespeichert.

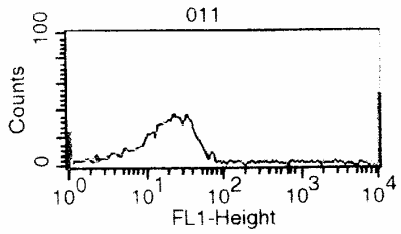
2.4.5 Auswertung am Durchflusszytometer

2.4.5.1 HLA-A2 Markierung

Gemessen wurde die Ausprägung von HLA-A2 auf der Oberfläche der Thrombozyten. Sie korreliert mit dem Maß der Antikörperbindung, die als Fluoreszenzintensität im Detektor Fluoreszenz 1 (FL1) vom Durchflusszytometer gemessen wurde. Gespeichert und zur Auswertung der statistischen Testung herangezogen wurde die mittlere Fluores-

zenzintensität, kurz MFI (s. Abb. 2.1). Zur Auswertung wurde die CELLQuest Standard Software verwendet.

Abb. 2.1: Beispielhafte Darstellung einer Messung der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) des HLA-A2 Antikörpers bei 5 000 detektierten Thrombozyten einer Negativkontrolle



Ordinate: Zahl der Ereignisse, also Anzahl der Thrombozyten

Abszisse: Fluoreszenz 1, also gemessene Fluoreszenzintensität der Zellen nach Markierung mit dem HLA-A2-Antikörper

2.4.5.2 Anti-IgG1 Markierung

Analog zur HLA-A2 Färbung der Thrombozyten erfolgt die Datenerfassung und Auswertung der Isotypkontrollen als MFI von 5 000 markierten Thrombozyten pro Probe.

2.5 Studiendesign

Die Studie bestand aus zwei Versuchsreihen und einem Vorversuch. Der Vorversuch diente dazu, die für das eigentliche Experiment benötigten Schritte zu überprüfen und abzustimmen.

2.5.1 Vorversuch

Grundsätzlich besteht bei der Messung der Antigenbeladung von Zellen in einer Suspension, welche die betreffenden Antigene auch in löslicher Form enthält, die Möglichkeit, dass die Antigene in löslicher Form die zum Nachweis eingesetzten Antikörper abbinden, und damit zu einem falsch negativen Messergebnis führen können. Dies wird bei immunhämatologischen Untersuchungen üblicherweise durch die Entfernung der löslichen Antigene aus der Aufschwemmlösung durch „Waschen“ erreicht. Dafür wird die Zellsuspension vor der Messung noch einmal zentrifugiert, der antigenhaltige Überstand dekantiert oder abgesaugt, und die Zellen werden für den nachfolgenden Versuchsansatz in einer antigenfreien Lösung resuspendiert. Zentrifugations- und Waschschritte bergen aber, insbesondere in der Thrombozytenserologie, ein erhebliches Risiko bezüglich der Verfälschung der Messergebnisse durch aktivierungsbedingte Modulation von Thrombozytenoberflächenrezeptoren sowie Thrombozytenaktivierung und –

Aggregation mit der Folge inkompletter Resuspension. Aus diesem Grund werden möglichst Versuchsansätze gewählt, welche ohne Waschschritte auskommen.

Auch in der vorliegenden Studie sollte artifizielle Thrombozytenaktivierung durch Zentrifugationsschritte möglichst vermieden werden. Um jedoch eine relevante Absättigung der zum Nachweis verwendeten Antikörper durch frei im Versuchsansatz vorliegende Antigene auszuschließen, wurden im Vorversuch eine „Wasch-Methode“ mit der später in den beiden Versuchsreihen verwendeten „Nicht-Wasch-Methode“ verglichen.

Im Vorversuch wurden beide Methoden bei 3 Ansätzen miteinander verglichen. Für einen Ansatz wurde je ein TK von einem HLA-A2 positiven Spender und ein TK von einem HLA-A2 negativen Spender benötigt. In 2 vorbereitete 50 ml Falcon Röhrchen wurde je ca. ein Drittel des HLA-A2 negativen Konzentrats über einen Sampling Site Coupler mit einer 20 ml Spritze überführt. In ein drittes Röhrchen ca. die Hälfte des HLA-A2 positiven Konzentrats. Das verbleibende Volumen in den beiden gespendeten Konzentraten wurde im Ansatz des Vorversuches nicht weiter benötigt und verworfen.

Die 3 Falcon Röhrchen wurden für 10 min bei Raumtemperatur in der Varifuge K. bei 2500 U/min (entspricht 1300 g) zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Plasmaüberstand in 3 weitere Falcon Röhrchen vorsichtig abgekippt, ohne dabei die entstandenen Thrombozytenpellets aufzuwirbeln. Das dekantierte Plasma wurde in einem weiteren Zentrifugationsschritt 10 min bei 3000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde dann über einen 0,22 µm Filter gepresst um noch verbleibende Thrombozyten zu entfernen (Zellfreies Plasma = ZFP). Ein Thrombozytenpellet des HLA-A2 negativen Konzentrats wurde nun mit einer 1000 µl Pipette vorsichtig mit dem ZFP des HLA-A2 positiven Spenders resuspendiert, das andere mit autologem, HLA-A2 negativem Plasma. Das Thrombozytenpellet des HLA-A2 positiven Konzentrats wurde verworfen.

Die 2 entstandenen Suspensionen (HLA-A2 negative Thrombozyten suspendiert in HLA-A2 positiven ZFP, in Folge III bzw. Testgruppe genannt, sowie HLA-A2 negative Thrombozyten suspendiert in autologem Plasma, in Folge II bzw. Kontrollgruppe genannt) wurden über einen Sampling Site Coupler in jeweils einen vorbereiteten TK Lagerungsbeutel überführt.

Da die derart hergestellten Proben ein geringeres Volumen hatten, als übliche Thrombozytenkonzentrate, wurden die TK Lagerungsbeutel mit einer Klemme versehen und

damit das Beutelvolumen künstlich reduziert. Damit wurde die für den Gasaustausch zur Verfügung stehende Beuteloberfläche dem geringeren Volumen der Proben angepasst und die Lagerungsbedingungen denen normaler Thrombozytenkonzentrate unter Routinebedingungen angeglichen.

Gemessen wurde im Vorversuch an 5 Messzeitpunkten; unmittelbar nach der Herstellung (Tag 1), sowie an den darauf folgenden 4 Tagen (Tag 2 – Tag 5).

Im Falle der „Nicht-Wasch-Methode“ wurde gemäß der unter Abschnitt 2.3 beschriebenen Technik die jeweilige Probe aus II und III entnommen und auf ca. 20.000/µl verdünnt (s. Abschnitt 2.4.1). Wie unter Abschnitt 2.4.2.1 bzw. Abschnitt 2.4.4.2 beschrieben, wurde gefärbt und gemessen. Ausgewertet wurde die MFI des HLA-A2-Antikörpers mit der CELLQuest Standard Software (s. 1.1.1.1).

Im Falle der „Wasch-Methode“ wurde die Thrombozyten - PBS/BSA Suspension im Rundbodenröhrchen, vor dem Färbe - und Messschritt, ein erneutes Mal bei 2000 U/min (entspricht 900 g) in der Varifuge für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und mit dem entsprechenden Volumen an Sörensen-Puffer überschichtet, ohne das Pellet bereits aufzuwirbeln. Nach einer Ruhezeit von 30 min wurde das Pellet dann vorsichtig mit einer 1000 µl Pipette in Sörensen-Puffer resuspendiert. Es folgen Färbung, Messung und Auswertung analog zur „Nicht-Wasch-Methode“.

2.5.2 Versuch 1

In Versuch 1 ging es darum, eine mögliche Anlagerung von HLA-A2-Antigen an HLA-A2 negative Thrombozyten während der routinemäßigen Lagerung nachzuweisen bzw. zu widerlegen. Dazu mussten Thrombozyten, die HLA-A2 negativ waren, in zellfreiem Plasma eines HLA-A2 positiven Spenders gelagert werden.

Es wurden 10 Ansätze hergestellt und gemessen, wobei, analog zum Vorversuch, pro Ansatz ein TK eines HLA-A2 negativen Spenders und ein TK eines HLA-A2 positiven Spenders benötigt wurde.

Zusätzlich wurde, im Gegensatz zum Vorversuch, das Restvolumen der Spenderkonzentrate im Falle der HLA-A2 negativen Spender als Negativkontrolle (Ia) und das Restvolumen der HLA-A2 positiven Spender als Positivkontrolle (IVa) mitgeführt und gemessen. Die Mixturen aus HLA-A2 negativen Thrombozyten resuspendiert in autolo-

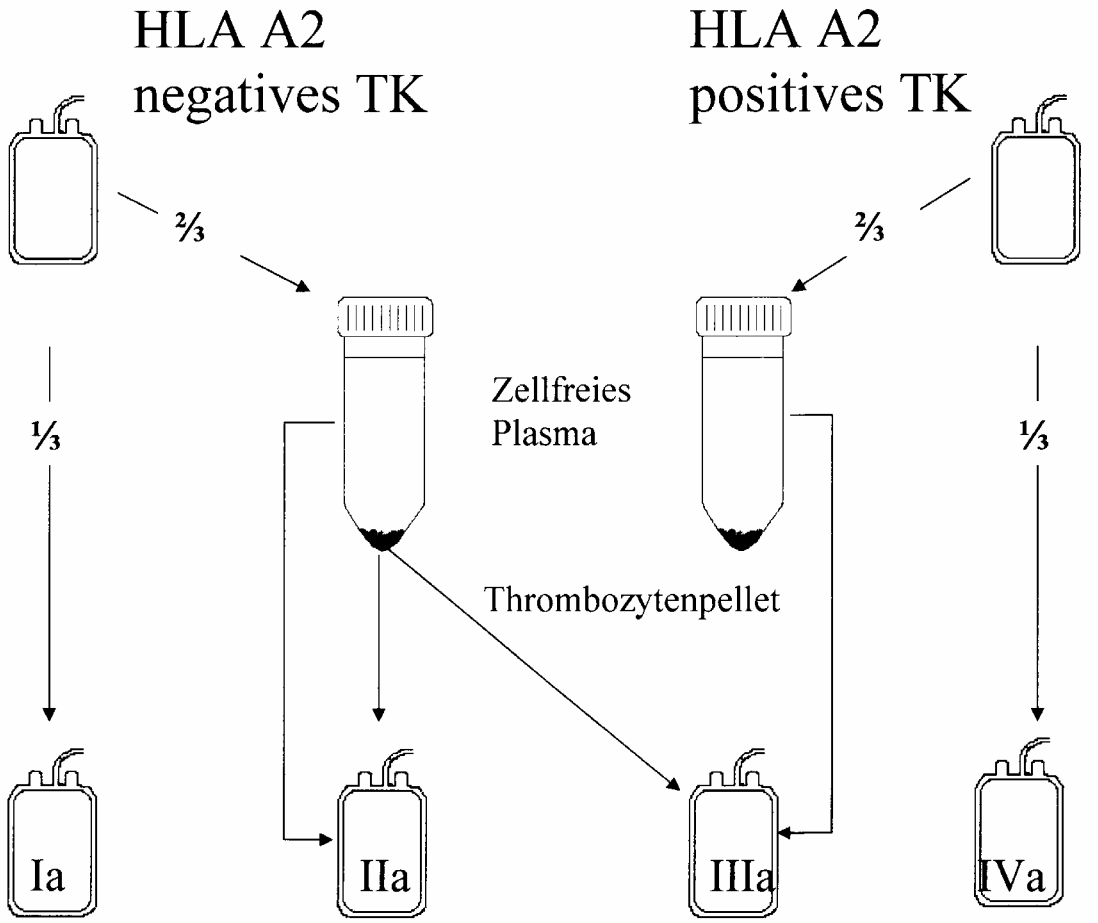
gem Plasma (IIa) bzw. aus HLA-A2 negativen Thrombozyten resuspendiert im ZFP des HLA-A2 positiven Spenders (IIIa) wurden analog zum Vorversuch hergestellt. Die Herstellung und Mitführung von IIa im Vergleich zur Negativkontrolle diente der Überprüfung, ob sich die Zentrifugation, die ja für die Herstellung der eigentlichen Testgruppe (IIIa) von Nöten war, auf die Antikörperbindung auswirkte. Wir hatten auf diese Weise sozusagen zwei Negativkontrollen, zum einen Ia, das Rest-TK des HLA-A2 negativen Spenders und zum anderen IIa, in dem die Thrombozyten dem selben Zentrifugations – und Resuspensionsstress unterzogen wurden wie die Thrombozyten der Testgruppe (IIIa).

Alle 4 Lagerungsbeutel eines Ansatzes (Ia, IIa, IIIa und IVa) wurden mit Klemmen zur Volumenreduzierung versehen. Die Herstellung der 4 Konzentrate ist in Abb. 2.2 schematisch dargestellt.

Es gab bei diesem Versuch 6 Messzeitpunkte. Unmittelbar nach der Herstellung (t0), 4 Stunden später (t1), sowie an den darauf folgenden 4 Tagen (t2 – t5).

Die Probengewinnung, Färbung, Messung und Auswertung an den 6 Messzeitpunkten erfolgte analog zur „Nicht-Wasch-Methode“ des Vorversuches.

Abb. 2.2: Studiendesign Versuch 1



Ia = Thrombozyten von HLA-A2 negativen Spendern (Negativkontrolle)

IIa = Thrombozyten von HLA-A2 negativen Spendern, abzentrifugiert und resuspendiert in autologem Plasma

IIIa = Thrombozyten von HLA-A2 negativen Spendern, abzentrifugiert und resuspendiert in zellfreiem Plasma (ZFP) von HLA-A2 positiven Spendern

IVa = Thrombozyten von HLA-A2 positiven Spendern (Positivkontrolle)

2.5.3 Versuch 2

In der zweiten Versuchsreihe ging es darum einen möglichen Shift, also die Abschilferung und Übertragung von HLA-Antigen zwischen Thrombozyten, nachzuweisen bzw. zu widerlegen.

Auch in der zweiten Versuchsreihe wurden 10 Ansätze hergestellt und gemessen. Wieder war für einen Ansatz jeweils ein HLA-A2 negatives TK sowie ein HLA-A2 positives TK erforderlich. Analog zu Versuch 1 wurden eine Negativkontrolle (hier Ib ge-

nannt) und eine Positivkontrolle (IVb) mitgeführt. Um einen möglichen Shift nachzuweisen, mussten HLA-A2 negative und HLA-A2 positive Thrombozyten in einem Lagerungsbeutel gemeinsam lagern. Es wurde ein „Pool-Präparat“ (hier IIb genannt) hergestellt. Dazu wurde in einen vorbereiteten und mit Sampling Site Coupler versehenen TK Lagerungsbeutel je ca. ein Drittel des Volumens aus dem Konzentrat des positiven Spenders sowie ein Drittel des Volumens aus dem Konzentrat des negativen Spenders gegeben.

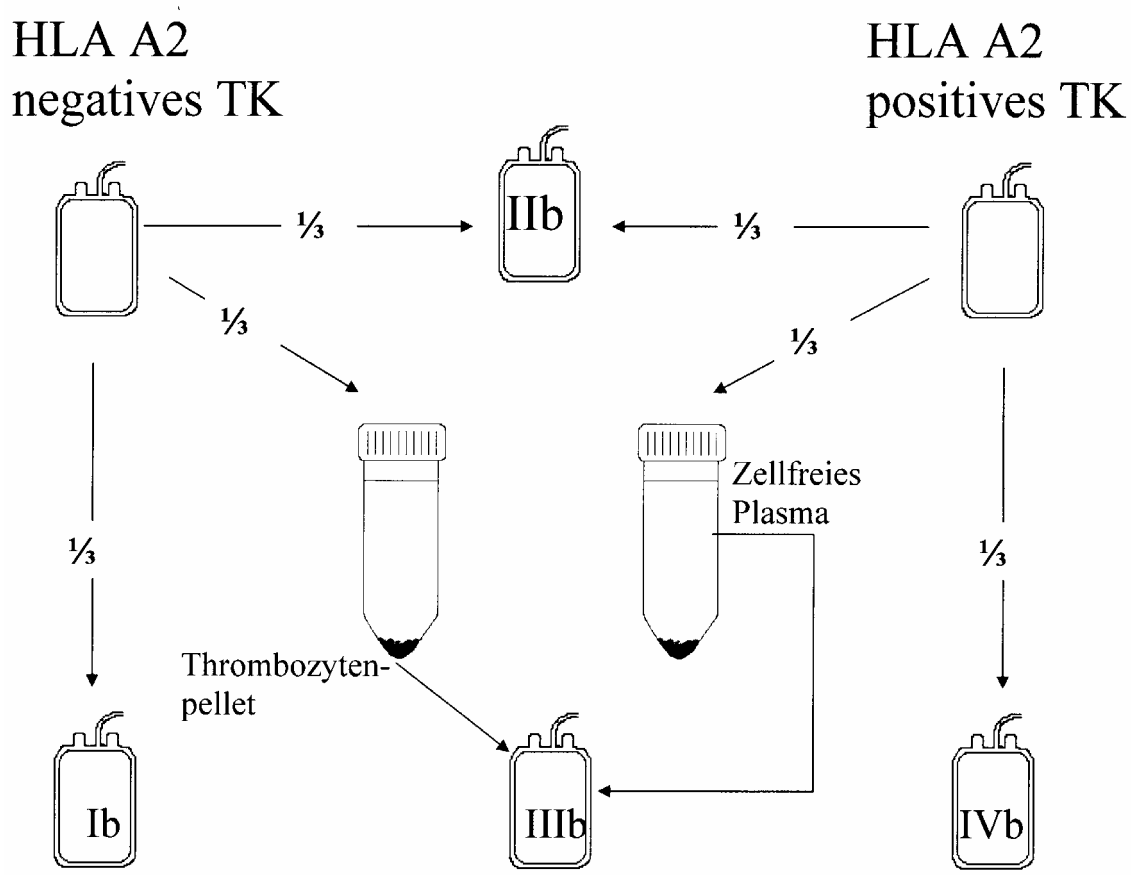
Um den Stichprobenumfang von Versuch 1 zu erhöhen, wurde, ab dem 3. Ansatz von Versuch 2, zusätzlich ein TK wie in Versuch 1, bestehend aus HLA-A2 negativen Thrombozyten resuspendiert in ZFP eines HLA-A2 positiven Spenders, hergestellt und mitgeführt (IIIb).

Die Herstellung der 3 (bzw. ab dem 3. Ansatz 4) Konzentrate ist in Abb. 2.3 schematisch dargestellt.

Bei Versuch 2 gab es 6 Messzeitpunkte. Wie in Versuch 1 unmittelbar nach der Herstellung (t0), 4 Stunden später (t1), sowie an den darauf folgenden 4 Tagen (t2 – t5). Die Probengewinnung, Färbung, Messung und Auswertung an den 6 Messzeitpunkten erfolgte analog zu Versuch 1.

Zusätzlich wurde in Versuch 2, wie unter Abschnitt 2.4.2.2 beschrieben, eine Isotypkontrolle mit einem Anti-IgG1 (mouse anti human) Antikörper mitgeführt und parallel zur Anti-HLA-A2 Markierung gefärbt, gemessen und ausgewertet.

Abb. 2.3: Studiendesign Versuch 2



Ib = Thrombozyten von HLA-A2 negativen Spendern (Negativkontrolle)

IIb = Poolpräparat, zu gleichen Teilen aus Thrombozyten von HLA-A2 negativen Spendern und HLA-A2 positiven Spendern

IIIb = Thrombozyten von HLA-A2 negativen Spendern, abzentrifugiert und resuspendiert in zellfreiem Plasma (ZFP) von HLA-A2 positiven Spendern

IVb = Thrombozyten von HLA-A2 positiven Spendern (Positivkontrolle)

Am letzten Messtag wurde, wie unter Abschnitt 2.4.3 beschrieben, der pH-Wert der Konzentrate bestimmt.

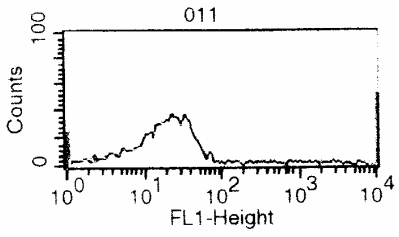
Die Auswertung des Pool-Präparates konnte nicht wie unter Abschnitt 1.1.1.1 beschrieben erfolgen, da das Durchflusszytometer sowohl HLA-A2 negative Thrombozyten also auch HLA-A2 positive Thrombozyten in der Pool-Probe detektiert. Um einen möglichen Shift zu erkennen, musste die Antikörpermarkierung von HLA-A2 positiven Thrombozyten bzw. HLA-A2 negativen Thrombozyten getrennt voneinander ausgewertet werden. Die CellQuest Standard Software bietet die Möglichkeit eines sog. „Over-

lays“ und die Möglichkeit, durch das Setzen von Markern, verschiedene Populationen einer Messung einzeln zu betrachten. Beides kam bei der Auswertung von Versuch 2 zum Einsatz.

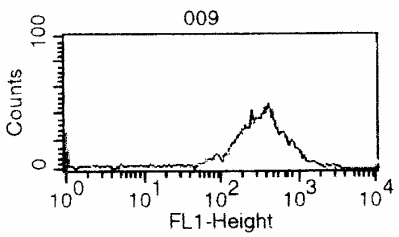
Positivkontrolle (IVb) und Negativkontrolle (Ib) wurden in einem Overlay gemeinsam dargestellt. Das Overlay wurde mit 2 Markern versehen, die sich an den Schnittpunkten beider Kurven trafen. Die so gesetzten Marker wurden nun in den Auswerteplot der Negativkontrolle sowie in den des Pool-Präparates kopiert. Marker 1 stellte dabei die Population der HLA-A2 negativen Thrombozyten dar, während Marker 2 die HLA-A2 positiven Thrombozyten in sich vereinte (s. Abb. 2.4).

Dementsprechend wurde die MFI in Marker 1 zur Auswertung und statistischen Testung herangezogen.

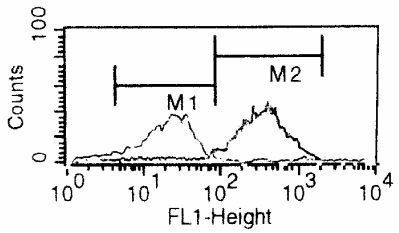
Abb. 2.4: Auswerteplots aus Versuchreihe 2 zur Veranschaulichung der Datenauswertung.



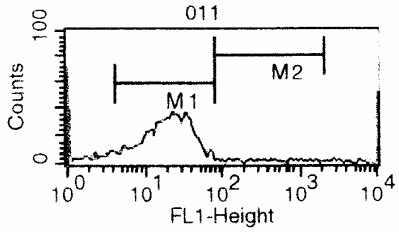
Negativkontrolle (Ib)



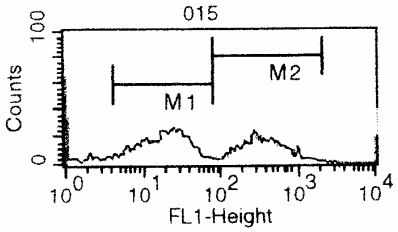
Positivkontrolle (IVb)



Ib und IVb als Overlay dargestellt und mit Markern versehen,
wobei Marker 1 die HLA-A2 negativen Thrombozyten abdeckt



Negativkontrolle (Ib)



Pool (IIb)

2.6 Statistische Auswertung

Die Kalkulationen wurden mit Hilfe von Excel und SPSS für Windows erstellt.

Veränderung der MFI, also der Antikörperbeladung und somit der HLA-Antigen Ausprägung auf Thrombozyten innerhalb einer Probe, z.B. der Negativkontrolle, über den Messzeitraum (t0 - t5), wurde mit dem Wilcoxon Vorzeichentest ausgewertet. Da 5 Tests pro Probe (jeweils t0 gegen t1 - t5) durchgeführt wurden, musste das Signifikanzniveau gemäß der Bonferoni-Korrektur auf 0,05/5 = 0,01 erniedrigt werden.

Veränderungen der MFI verschiedener Proben, also z.B. Marker 1 der Negativkontrolle gegen Marker 1 des Poolpräparates, wurden ebenfalls mit dem Wilcoxon Vorzeichentest ausgewertet. Da hier gemäß den 6 Messzeitpunkten jeweils 6 Tests pro Vergleich durchgeführt wurden, wurde das Signifikanzniveau auf 0,0083 erniedrigt (0,05/6).

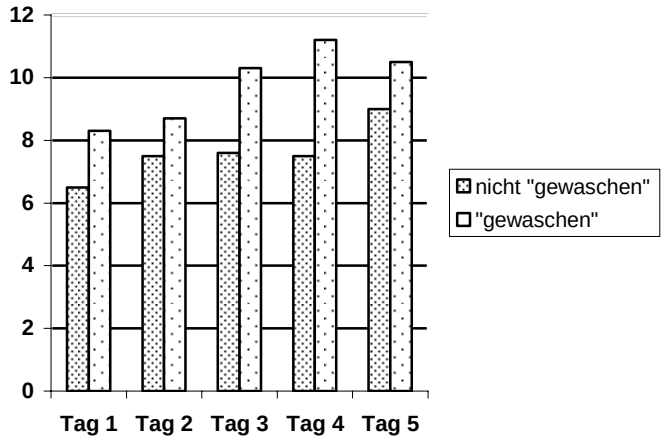
3 Ergebnisse

3.1 Vorversuch

Die Auswertung des Versuchs zeigte, dass es durch den Waschvorgang in allen Ansätzen zu einer verstärkten, jedoch unspezifischen Bindung des Anti-HLA-A2-Antikörpers kam. Zu jedem Messzeitpunkt war sowohl in der Gruppe II (= Kontrollgruppe; HLA-A2 negative Thrombozyten in autologem HLA-A2 negativem Plasma) als auch in Gruppe III (= Testgruppe; HLA-A2 negative Thrombozyten in Plasma von HLA-A2 positiven Spendern) die Bindung des Anti-HLA-A2-Antikörpers an gewaschene Thrombozyten höher als an ungewaschene Thrombozyten. Kontrollgruppe und Testgruppe unterschieden sich jedoch untereinander in Bezug auf die erhöhte Bindung des monoklonalen Antikörpers an gewaschene Thrombozyten statistisch nicht signifikant ($p = 0,36$). Die Zunahme der Antikörperbindung durch den Waschvorgang betrug in der Kontrollgruppe $26,6 \pm 12,9\%$ (median 26,9%) und $30,56 \pm 16,7\%$ (Median 28,2%) in der Testgruppe bei einem Stichprobenumfang von $n = 3$. Eine signifikant höhere spezifische Bindung des monoklonalen Anti-HLA-A2-Antikörpers in der Testgruppe durch einen Waschvorgang, beziehungsweise eine Blockierung der spezifischen Bindung des Antikörpers durch freie HLA-Antigene im Färbeansatz konnte somit ausgeschlossen werden. Folglich wurden die beiden Folgeansätze in einem Testansatz ohne Waschschritte durchgeführt. In beiden Gruppen kam es darüber hinaus im Verlauf der Lagerung zu einem Anstieg der Bindung des Anti-HLA-A2-Antikörpers in allen Ansätzen.

Dieses Ergebnis ist graphisch in Form von Säulendiagrammen in Abb. 2.1 für die Kontrollgruppe bzw. Abb. 2.2 für die Testgruppe dargestellt.

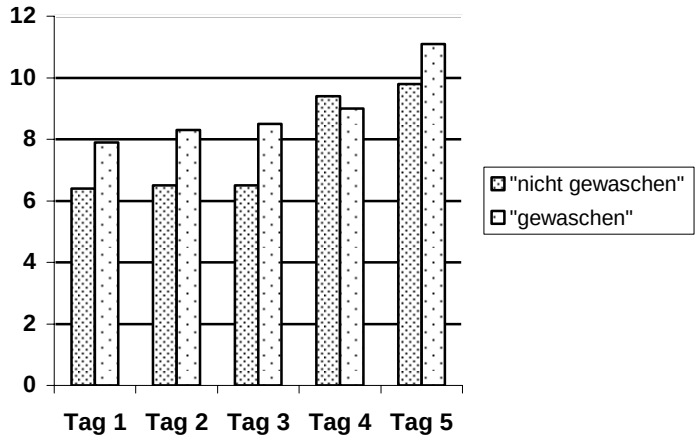
Abb. 3.1: Kontrollgruppe: Bindung des Anti-HLA-A2 Antikörpers von „gewaschenen“ und „nicht gewaschenen Thrombozyten“ aufgetragen gegen die 5 Messzeitpunkte (Tag 1 bis Tag 5), dargestellt als mittlere Fluoreszenzintensität (MFI)



„nicht gewaschen“ = nicht gewaschene Thrombozyten von HLA-A2 negativen Spendern, abzentrifugiert und resuspendiert in autologem Plasma

„gewaschen“ = gewaschene Thrombozyten von HLA-A2 negativen Spendern, abzentrifugiert und resuspendiert in autologem Plasma

Abb. 3.2: Testgruppe: Bindung des Anti-HLA-A2 Antikörpers an „gewaschenen“ und „nicht gewaschenen“ Thrombozyten aufgetragen gegen die 5 Messzeitpunkte (Tag 1 bis Tag 5), dargestellt als Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI)



„nicht gewaschen“ = nicht gewaschene Thrombozyten von HLA-A2 negativen Spendern, abzentrifugiert und resuspendiert in zellfreiem Plasma (ZFP) von HLA-A2 positiven Spendern

„gewaschen“ = gewaschene Thrombozyten von HLA-A2 negativen Spendern, abzentrifugiert und resuspendiert in zellfreiem Plasma (ZFP) von HLA-A2 positiven Spendern

3.2 Versuch 1

Es zeigte sich ein signifikanter Anstieg der MFI des Anti-HLA-A2-Antikörpers in allen TK die HLA-A2 negative Thrombozyten enthielten. Dies galt sowohl für die beiden Negativkontrollen, als auch für den eigentlichen Testansatz. Für die 3 Ansätze war ein statistisch gesicherter Anstieg der MFI ab t3 nachweisbar ($p< 0,01$). Die Ergebnisse der statistischen Testung sind in Tab. 2-1 zusammengefasst.

Tab. 3-1: Ergebnisse Wilcoxon Vorzeichentest für Ia, IIa und IIIa.

	t1 – t0	t2 – t0	t3 – t0	t4 – t0	t5 – t0
Signifikanz für Ia (2-seitig)	0,004	0,097	0,001 **(*)**	< 0,000 **(*)**	< 0,000 **(*)**
Signifikanz für IIa (2-seitig)	1,000	0,093	0,007 **(*)**	0,007 **(*)**	0,007 **(*)**
Signifikanz für IIIa (2-seitig)	0,122	0,002	<0,000 **(*)**	<0,000 **(*)**	<0,000 **(*)**

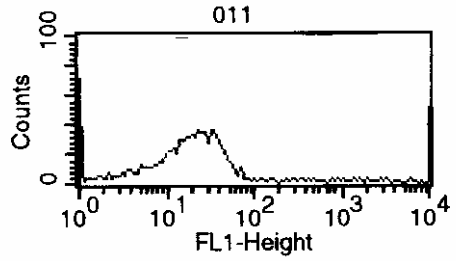
Dargestellt sind die Ergebnisse des Wilcoxon Vorzeichentests für Ia (Negativkontrolle, HLA-A2 negative Thrombozyten), IIa (HLA-A2 negative Thrombozyten abzentrifugiert und resuspendiert in autologem Plasma) und IIIa (Testgruppe, HLA-A2 negative Thrombozyten abzentrifugiert und resuspendiert in ZFP des HLA-A2 positiven Spenders). Signifikante Werte sind mit einem „**(*)**“ gekennzeichnet.

Die Darstellung der Ergebnisse im Histogramm ist beispielhaft für einen beliebigen Ansatz für Kontroll- und Testgruppe gegenüberstellend an den Zeitpunkten t0, t3 und t5 in Abb. 2.3 graphisch dargestellt.

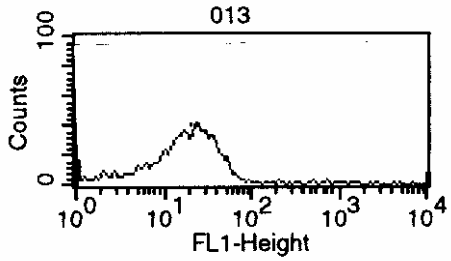
Die Auswertung der 10 Versuchsansätze zeigte, dass es zu einem Anstieg der Bindung des Anti-HLA-A2-Antikörpers an die HLA-A2 negativen Thrombozyten kam. Dies konnte jedoch sowohl für die Negativkontrollen (Ia und IIa), als auch für den Testansatz (IIIa) nachgewiesen werden. Dabei zeigte sich zu keinem Messzeitpunkt ein signifikanter Unterschied zwischen Negativkontrolle und Testansatz. Da es keinen Unterschied zwischen der Negativkontrolle (Ia), also den Thrombozyten ohne Manipulation, und der zweiten Negativkontrolle (IIa), also den Thrombozyten die dem gleichen Stress unterzogen wurden wie die der Testgruppe, gab, scheint es keine unspezifischen Bindungseffekte des Antikörpers durch die Zentrifugation und Resuspension gegeben zu haben.

Das Ergebnis der durchflusszytometrischen Messung von Versuch 1 ist in Tab. 2-2 zusammengefasst und als Säulendiagramm in Abb. 2.4 graphisch dargestellt.

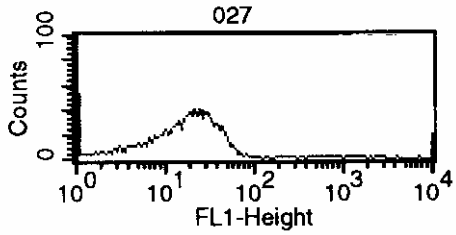
Abb. 3.3: Beispielhafte Ergebnisse eines Ansatzes aus Versuch 1 für Ia und IIIa zum Messzeitpunkt t0, t3 und t5



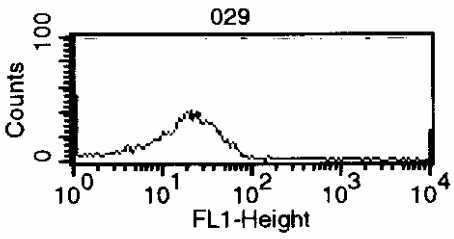
Negativkontrolle (Ia) zum Messzeitpunkt t0



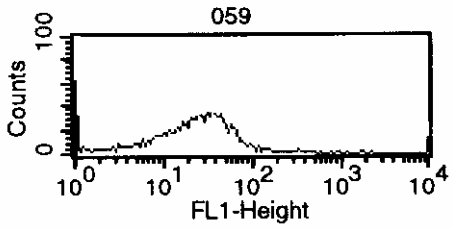
HLA-A2 negative Thrombozyten suspendiert in ZFP eines HLA-A2 positiven Spenders (IIIa) zum Messzeitpunkt t0



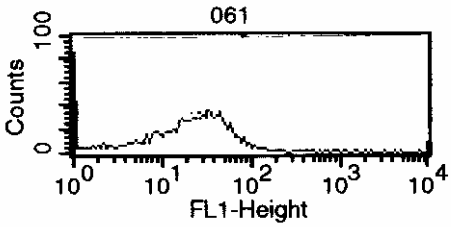
Ia zum Messzeitpunkt t3



IIIa zum Messzeitpunkt t3



Ia zum Messzeitpunkt t5



IIIa zum Messzeitpunkt t5

Dargestellt sind die Histogramme der Negativkontrolle (Ia, also HLA-A2 negative Thrombozyten) aus einem beliebigen Testansatz mit den Histogrammen des dazugehörigen Testansatzes (IIIa, also HLA-A2 negative Thrombozyten suspendiert in zellfreiem Plasma eines HLA-A2 positiven Spenders) beispielhaft an 3 Messzeitpunkten. t0 (direkt nach der Herstellung des Ansatzes), t3 (Tag 3) und t5 (Tag 5).

Tab. 3-2: Bindung von Anti-HLA-A2-Antikörpern (dargestellt als MFI ± Standardabweichung) auf Thrombozyten über den Lagerungszeitraum (t0 - t5)

	t0	t1	t2	t3	t4	t5
Ia (n=10)	27,0 ±16,6	24,8 ±16,0	29,3 ±14,4	32,5 ±13,6	37,4 ±17,1	38,1 ±16,6
IIa (n=10)	25,7 ±14,7	25,6 ±15,1	27,5 ±16,4	33,1 ±15,8	40,0 ±18,7	35,3 ±14,8
IIIa (n=10)	24,9 ±15,0	25,8 ±14,5	28,5 ±16,6	36,2 ±16,1	39,5 ±17,8	38,1 ±18,6
IVa (n=10)	363 ±182	291 ±160	352 ±177	349 ±159	355 ±161	348 ±166

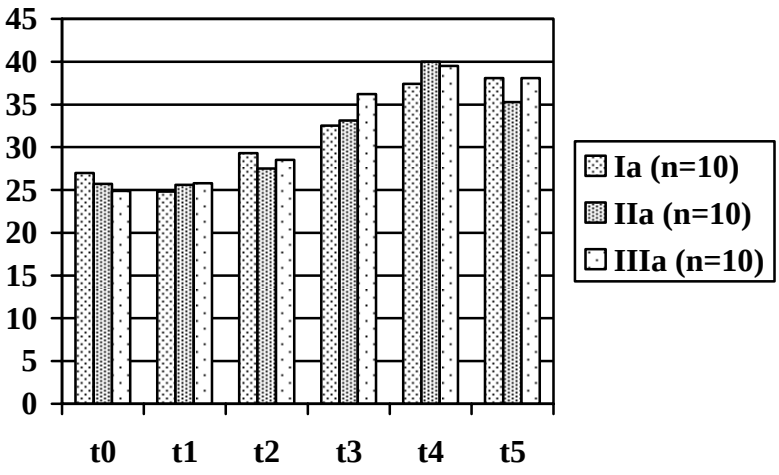
Ia = Thrombozyten von HLA-A2 negativen Spendern in autologem Plasma (Negativkontrolle ohne Manipulation der Thrombozyten durch Zentrifugation)

IIa = Thrombozyten von HLA-A2 negativen Spendern, abzentrifugiert und resuspendiert in autologem zellfreiem Plasma (Negativkontrolle zur Beurteilung der möglichen unspezifischen Effekte durch Zentrifugation und Resuspendierung der Thrombozyten im Testansatz)

IIIa = Thrombozyten von HLA-A2 negativen Spendern, abzentrifugiert und resuspendiert in zellfreiem Plasma (ZFP) von HLA-A2 positiven Spendern (eigentlicher Testansatz)

IVa = Thrombozyten von HLA-A2 positiven Spendern (Positivkontrolle)

Abb. 3.4: Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) von Ia, IIa und IIIa aufgetragen gegen die 6 Messzeitpunkte (t0 - t5)



Ia = Thrombozyten von HLA-A2 negativen Spendern (Negativkontrolle)

IIa = Thrombozyten von HLA-A2 negativen Spendern, abzentrifugiert und resuspendiert in autologem Plasma

IIIa = Thrombozyten von HLA-A2 negativen Spendern, abzentrifugiert und resuspendiert in zellfreiem Plasma (ZFP) von HLA-A2 positiven Spendern

Da in Versuch 2, ab Ansatz 3, ebenfalls ein TK aus HLA-A2 negativen Thrombozyten resuspendiert in ZFP eines HLA-A2 positiven Spenders mitgeführt wurde (wie in Abschnitt 1.2.3 beschrieben), ließen sich die Untersuchungen zusammenfassen, wodurch sich ein höherer Stichprobenumfang (n = 18) für Versuch 1 ergibt, der statistisch getestet wurde (s.Tab. 2-3).

Tab. 3-3: Bindung von Anti-HLA-A2-Antikörpern (dargestellt als MFI ± Standardabweichung) über den Lagerungszeitraum (t0 - t5)

	t0	t1	t2	t3	t4	t5
Ia und b (n=18)	28,1 ±16,1	25,3 ±15,0	29,6 ±13,9	36,3 ±16,1	43,1 ±18,1	44,7 ±17,5
IIIa und b (n=18)	26,5 ±13,8	27,9 ±14,3	31,2 ±15,3	38,4 ±14,3	43,7 ±18,4	44,7 ±18,6

Ia und b = Thrombozyten von HLA-A2 negativen Spendern (Negativkontrolle) aus Versuch 1 und 2 (n = 18)

IIIa und b = Thrombozyten von HLA-A2 negativen Spendern, abzentrifugiert und resuspendiert in zellfreiem Plasma (ZFP) von HLA-A2 positiven Spendern aus Versuch 1 und 2 (n = 18)

Der Anstieg der MFI in der Negativkontrolle konnte nicht im Zusammenhang mit einer Anlagerung von HLA-A2 Antigen an die Thrombozyten stehen, da im Plasma kein entsprechendes Antigen in gelöster Form vorlag. Der Anstieg ist somit als nicht spezifische Bindung des Antikörpers an die alternden Thrombozyten zu werten.

Definiert man den mittleren Anstieg der MFI der Negativkontrolle zwischen t0 und t5 (= 16,4) als die Größe δa, so muss man von den Thrombozyten der eigentlichen Testgruppe, also den HLA-A2 negativen Thrombozyten resuspendiert und gelagert in ZFP des HLA-A2 positiven Spenders, einen Anstieg der MFI der größer ist als δa verlangen, um behaupten zu können, im Plasma lösliches HLA-Antigen lagere sich an HLA-A2 negative Thrombozyten an.

Es wurden folgende Hypothesen aufgestellt:

H0: $\mu III\ (a + b) \geq \mu I\ (a + b) + \delta a$

H1: $\mu III\ (a + b) < \mu I\ (a + b) + \delta a$

$\mu III(a + b)$ = MFI der Testgruppe aus Versuch 1 und 2

$\mu I(a + b)$ = MFI der Kontrollgruppe bzw. Negativkontrolle aus Versuch 1 und 2

δa = mittlerer Anstieg der MFI der Negativkontrolle bzw. Kontrollgruppe aus Versuch 1 und 2 zwischen t0 und t5

H0, die so genannte Nullhypothese, deckt hierbei ein mögliches „positives Ergebnis" ab, und wäre der Beweis für eine Anlagerung von löslichem HLA-A2-Antigen aus dem Plasma an HLA-A2 negative Thrombozyten. H1, die so genannte Gegenhypothese, deckt das mögliche „negative Ergebnis" ab, würde also eine Mehrbindung des Antikörpers im eigentlichen Testansatz (IIIa + b) gegenüber der Bindung des Antikörpers in der Negativkontrolle (Ia + b) widerlegen, und wäre somit der Beweis, dass es nicht zu einer Anlagerung kommt.

6 Tests wurden durchgeführt, also die Ergebnisse an jedem Messzeitpunkt (t0 – t5) gegeneinander getestet, mit einem Signifikanzniveau bei 0,0083.

Alle 6 p-Werte lagen unter 0,001. H0 wurde somit verworfen, H1 angenommen. Die Ergebnisse der statistischen Testung sind in Tab. 2-4 zusammengefasst.

Tab. 3-4: Ergebnisse Wilcoxon Vorzeichentest an den 6 Messzeitpunkten (t0 - t5)

	t0: μIII - μI+δa	t1: μIII - μI+δa	t2: μIII - μI+δa	t3: μIII - μI+δa	t4: μIII - μI+δa	t5: μIII - μI+δa
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	< 0,000 **(*)**	< 0,000 **(*)**	< 0,000 **(*)**	< 0,000 **(*)**	< 0,000 **(*)**	< 0,000 **(*)**

Dargestellt sind die Ergebnisse des Wilcoxon Vorzeichentests. Getestet wurde jeweils die MFI der Negativkontrolle (I, HLA-A2 negative Thrombozyten) + δa (mittlere Anstieg der MFI der Negativkontrolle zwischen t0 und t5) gegen die MFI der Testgruppe (III, HLA-A2 negativen Thrombozyten resuspendiert und gelagert in ZFP des HLA-A2 positiven Spenders) an den 6 Messzeitpunkten (t0 – t5). Signifikante Werte sind mit einem „**(*)**" gekennzeichnet.

Es wurde damit statistisch gesichert, dass es zu keiner Mehrbindung des Antikörpers im Vergleich zur Negativkontrolle kommt, und es somit zu keiner messbaren Anlagerung von HLA-Antigen aus dem Plasma eines HLA-A2 positiven Spenders an Thrombozyten eines HLA-A2 negativen Spenders kam.

3.3 Versuch 2

Versuch 2 sollte einen möglichen Shift, also die Abschilferung und Übertragung von HLA-Antigen zwischen Thrombozyten, nachweisen bzw. widerlegen. Dazu war es nötig, wie im Studiendesign bereits beschrieben, eine Mischpopulation HLA-A2 positiver und negativer Thrombozyten herzustellen, das Pool-Präparat (IIb). Wie unter Abschnitt 1.2.3 beschrieben und in Abb. 2.4 graphisch dargestellt war der Einsatz von Markern erforderlich um die Populationen getrennt von einander beurteilen zu können und einen möglichen Shift erkennen zu können.

Für die Test- und Kontrollgruppe (Ib und IIb) ließ sich ein signifikanter Anstieg der Antikörperbindung im Marker 1 ab t3 nachweisen. Für die HLA-A2 negativen Thrombozyten nach Abzentrifugation resuspendiert in autologem Plasma (IIIb) erreichte der Anstieg keine statistische Signifikanz, zu erklären durch den niedrigeren Stichprobenumfang (n = 8). Die Ergebnisse der statistischen Testung sind in Tab. 2-5 zusammengefasst.

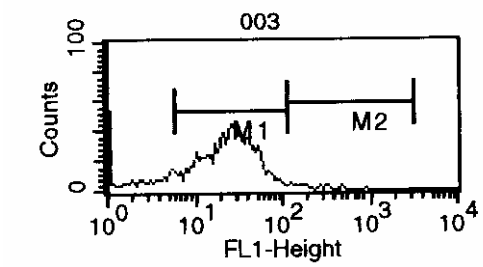
Tab. 3-5: Ergebnisse Wilcoxon Vorzeichentest für Ib, IIb, IIIb in Marker 1

	t1 – t0	t2 – t0	t3 – t0	t4 – t0	t5 – t0
Signifikanz für Ib (2-seitig)	0,074	0,202	0,005 **(*)**	0,005 **(*)**	0,005 **(*)**
Signifikanz für IIb (2-seitig)	0,953	0,007	0,005 **(*)**	0,005 **(*)**	0,005 **(*)**
Signifikanz für IIIb (2-seitig)	0,036	0,012	0,012	0,012	0,012

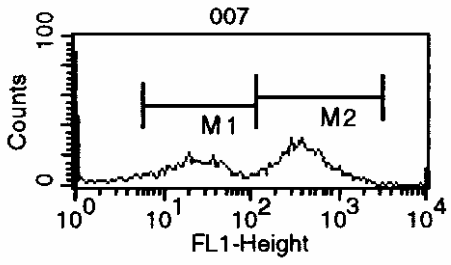
Dargestellt sind die Ergebnisse des Wilcoxon Vorzeichentests für Ib (Negativkontrolle, HLA-A2 negative Thrombozyten), IIb (Testgruppe, Mischpopulation aus HLA-A2 positiven und negativen Thrombozyten) und IIIb (HLA-A2 negative Thrombozyten abzentrifugiert und resuspendiert in ZFP des HLA-A2 positiven Spenders). Signifikante Werte sind mit „**(*)**“ gekennzeichent.

Das Ergebnis der HLA-A2 Markierung ist beispielhaft für einen beliebigen Ansatz für Kontroll- und Testgruppe an den Zeitpunkten t0, t3 und t5 in Abb. 2.5 graphisch dargestellt.

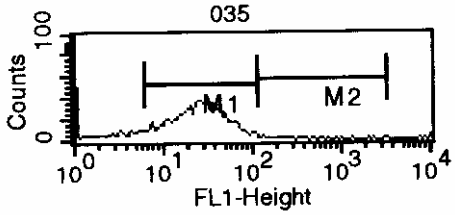
Abb. 3.5: Beispielhafte Ergebnisse eines Ansatzes aus Versuch 2



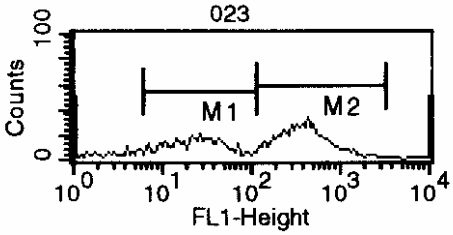
Negativkontrolle (Ib) zum Messzeitpunkt t0



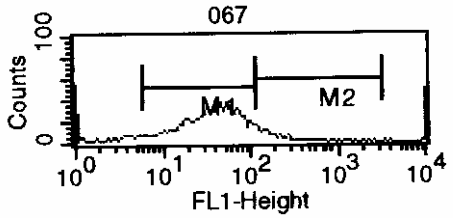
Poolpräparat (IIb) zum Messzeitpunkt t0



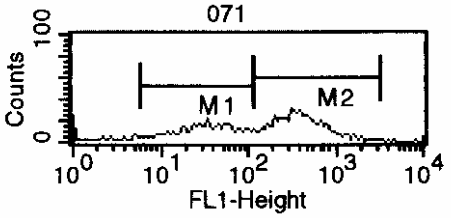
Ib zum Messzeitpunkt t3



IIb zum Messzeitpunkt t3



Ib zum Messzeitpunkt t5



IIb zum Messzeitpunkt t5

Dargestellt sind hier die Histogramme der Negativkontrolle (Ib, also HLA-A2 negative Thrombozyten) aus einem beliebigen Testansatz mit den Histogrammen des dazugehörigen Testansatzes, dem Pool-Präparat (IIb, also die Mischpopulation aus HLA-A2 positiven und negativen Thrombozyten) beispielhaft an 3 Messzeitpunkten. t0 (direkt nach der Herstellung des Ansatzes), t3 (Tag 3) und t5 (Tag 5).

Die in Versuch 2 mitgeführten IgG1-Kontrollen zeigten ebenfalls einen Anstieg der Bindung des Antikörpers. Für alle durchgeführten Testansätze war dieser Anstieg, also die Mehrbindung des Antikörpers, signifikant. Für die Negativkontrolle bestand Signifikanz ab Messzeitpunkt t4, für Positivkontrolle (IVb), Testansatz (IIb) und die in die Auswertung von Versuch 1 einfließenden Ansätze der HLA-A2 negativen Thrombozyten resuspendiert in autologem Plasma (IIIb) war der Anstieg bereits ab t3 signifikant ($p < 0,01$). Die Ergebnisse der statistischen Testung sind in Tab. 2-6 zusammengefasst.

Tab. 3-6: Ergebnisse Wilcoxon Vorzeichentest für die IgG Kontrollen von Ib, IIb, IIIb und IVb

	t1 – t0	t2 – t0	t3 – t0	t4 – t0	t5 – t0
Signifikanz für IgG ctl. Ib	0,001	0,695	0,019	0,002 **(*)**	0,001 **(*)**
Signifikanz für IgG ctl. IIb	0,008	0,114	0,007 **(*)**	0,005 **(*)**	0,005 **(*)**
Signifikanz für IgG ctl. IIIb	0,017	0,142	0,008 **(*)**	0,003 **(*)**	0,003 **(*)**
Signifikanz für IgG ctl. IVb	0,001	0,379	0,008 **(*)**	0,003 **(*)**	0,001 **(*)**

Dargestellt sind die Ergebnisse der statistischen Testung der IgG Kontrollen für Ib (Negativkontrolle, HLA-A2 negative Thrombozyten), IIb (Mischpopulation aus HLA-A2 positiven und negativen Thrombozyten), IIIb (HLA-A2 negative Thrombozyten abzentrifugiert und resuspendiert in ZFP des HLA-A2 positiven Spenders) und IVb (HLA-A2 positive Thrombozyten). Signifikante Werte sind mit einem „**(*)**“ gekennzeichnet.

Diese Ergebnisse stützten die Erkenntnisse aus Versuch 1. Wie in Versuch 1 konnte der Anstieg der MFI der Negativkontrolle nicht in Zusammenhang mit einer Anlagerung von löslichem HLA-Antigen aus dem Plasma stehen, da im Plasma kein entsprechendes Antigen in gelöster Form vorlag. Auch hier musste von einem nicht spezifischen Anstieg der Antikörper an die alternden Thrombozyten ausgegangen werden.

Dieses Ergebnis wurde durch die Resultate der in Versuch 2 mitgeführten IgG1-Kontrollen bestätigt.

Das Ergebnis der durchflusszytometrischen Messung aus Versuch 2 sowohl für die Anti-HLA-A2 Markierung als auch für die Anti-IgG1 Markierung sind in Tab. 2-7 zusammengefasst.

Die pH-Werte lagen zum Zeitpunkt t5 alle im Toleranzbereich (Wissenschaftlicher Beirat der Bundesärztekammer, 2000) und sind ebenfalls in Tab. 2-7 aufgeführt.

Das Ergebnis der Anti-HLA-A2 Markierung ist als Säulendiagramm in Abb. 2.6 dargestellt, das der Anti-IgG1 Markierung in Abb. 2.7.

Tab. 3-7: Bindung von Anti-HLA-A2 und IgG1-Isotypkontrollen auf Thrombozyten über den Lagerungszeitraum (t0 - t5) (dargestellt als MFI ± Standardabweichung) und pH-Wert der Testansätze am Ende der Lagerungszeit (dargestellt als Mittelwert ± Standardabweichung)

		t0	t1	t2	t3	t4	t5	pH
Ib (n=10)	HLA-A2	28,9 ±12,5	27,7 ±12,7	30,3 ±12,5	34,3 ±11,5	40,3 ±13,6	39,6 ±12,8	6,8 ±0,5
	IgG ctl.	9,2 ± 0,7	8,4 ± 0,4	9,2 ± 0,7	10,8 ±2,0	11,2 ±1,3	11,6 ±1,7	
IIb (n=10)	HLA-A2	28,3 ±12,2	28,3 ±12,4	30,6 ±12,7	35,1 ±13,7	38,2 ±13,8	40,1 ±13,9	7,3 ±0,2
	IgG ctl.	8,9 ± 0,6	8,5 ± 0,5	9,2 ± 0,7	9,8 ± 0,6	10,2 ±0,7	10,7 ±0,8	
IIIb (n=8)	HLA-A2	29,2 ±12,3	30,9 ±13,9	33,6 ±13,4	37,4 ±12,3	40,4 ±16,6	40,3 ±14,6	6,8 ±0,5
	IgG ctl.	9,3 ± 0,9	9,0 ± 0,7	9,7 ± 0,8	10,5 ±0,7	11,1 ±1,1	11,5 ±1,5	
IVb (n=10)	HLA-A2	278 ±45	250 ±45	279 ±46	280 ±35	271 ±56	263 ±55	7,0 ±0,4
	IgG ctl.	8,9 ± 0,6	8,3 ± 0,5	8,8 ± 0,4	9,5 ± 0,7	10,2 ±1,1	10,5 ±1,0	

Ib = Thrombozyten von HLA-A2 negativen Spendern (Negativkontrolle)

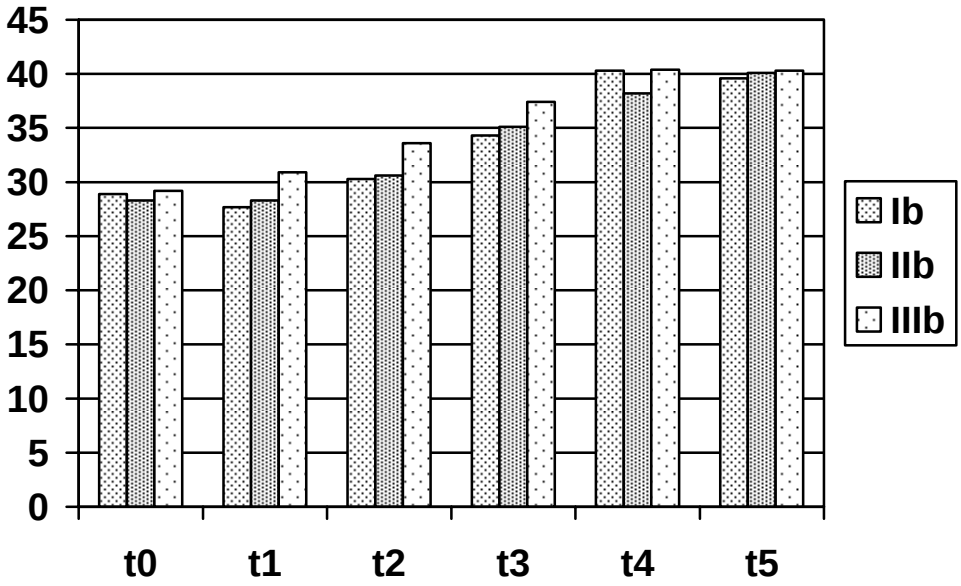
IIb = Poolpräparat, zu gleichen Teilen aus Thrombozyten von HLA-A2 negativen Spendern und HLA-A2 positiven Spendern

IIIb = Thrombozyten von HLA-A2 negativen Spendern, abzentrifugiert und resuspendiert in zellfreiem Plasma (ZFP) von HLA-A2 positiven Spendern

IVb = Thrombozyten von HLA-A2 positiven Spendern (Positivkontrolle)

IgG ctl. = IgG1-Isotypkontrolle

Abb. 3.6: Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der Bindung des Anti-HLA-A2-Antikörpers gemessen im Bereich des Marker I für die Testansätze Ib, IIb und IIIb aufgetragen gegen die 6 Messzeitpunkte (t0 - t5)

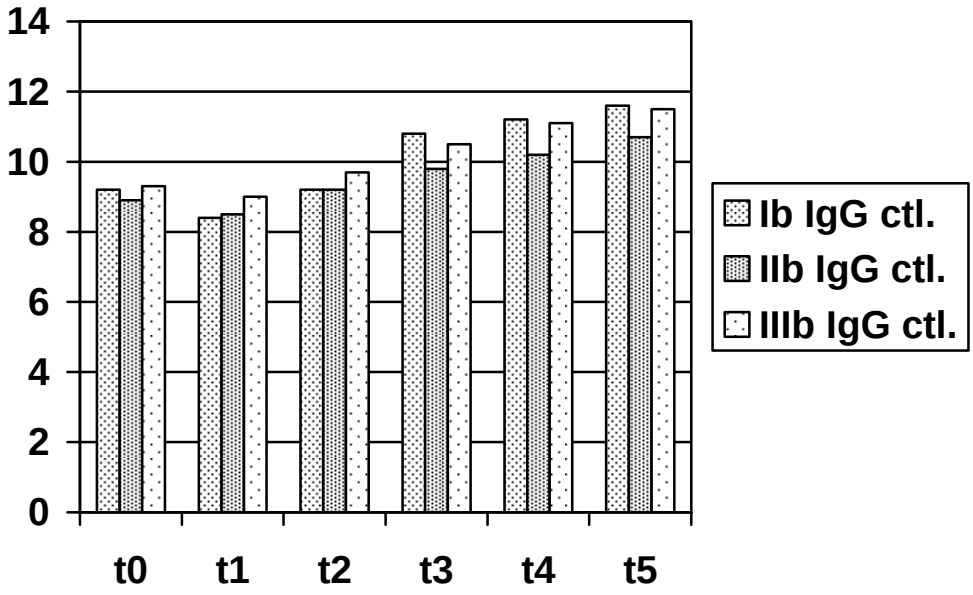


Ib = Thrombozyten von HLA-A2 negativen Spendern (Negativkontrolle)

IIb = Poolpräparat, zu gleichen Teilen aus Thrombozyten und Plasma von HLA-A2 negativen Spendern und HLA-A2 positiven Spendern

IIIb = Thrombozyten von HLA-A2 negativen Spendern, abzentrifugiert und resuspendiert in zellfreiem Plasma (ZFP) von HLA-A2 positiven Spendern

Abb. 3.7: Mittlere Fluoreszenzintensität der IgG1-Isotypkontrollen von Ib, IIb und IIIb aufgetragen gegen die 6 Messzeitpunkte (t0 - t5)



Ib = Thrombozyten von HLA-A2 negativen Spendern (Negativkontrolle)

IIb = Poolpräparat, zu gleichen Teilen aus Thrombozyten von HLA-A2 negativen Spendern und HLA-A2 positiven Spendern

IIIb = Thrombozyten von HLA-A2 negativen Spendern, abzentrifugiert und resuspendiert in zellfreiem Plasma (ZFP) von HLA-A2 positiven Spendern

Auch in Versuch 2 zeigte sich an keinem Messzeitpunkt ein signifikanter Unterschied zwischen Kontroll- und Testgruppe.

Analog zu Versuch 1, wurde die Größe δb (= 10,8) als mittlerer Anstieg der MFI im Marker 1 der Negativkontrolle definiert und folgende Hypothese aufgestellt:

H0: $\mu IIb \geq \mu Ib + \delta b$

H1: $\mu IIb < \mu Ib + \delta b$

μIIb = MFI in Marker 1 der Testgruppe aus Versuch 2

μIb = MFI in Marker 1 der Kontrollgruppe bzw. Negativkontrolle aus Versuch 2

δb = mittlerer Anstieg der MFI der Negativkontrolle bzw. Kontrollgruppe aus Versuch 2 zwischen t0 und t5

Die Nullhypothese (H0) deckt hier wieder ein mögliches „positives Ergebnis“ ab, also einen Shift von HLA-A2-Antigen zwischen den Thrombozyten, während die Gegenhypothese (H1) das „negatives Ergebnis“ abdeckt, und somit einen möglichen Shift widerlegen würde.

6 Tests wurden durchgeführt, also die Ergebnisse an jedem Messzeitpunkt (t0 – t5) gegeneinander getestet, mit einem Signifikanzniveau bei 0,0083 (wie in Versuch 1).

Alle 6 p-Werte lagen unter 0,0083, H0 wurde verworfen, H1 angenommen. Die Ergebnisse der statistischen Testung sind in Tab. 2-8 zusammengefasst.

Tab. 3-8: Ergebnisse Wilcoxon Vorzeichentest an den 6 Messzeitpunkten (t0 - t5)

	t0: μII - μI+δb	t1: μII - μI+δb	t2: μII - μI+δb	t3: μII - μI+δb	t4: μII - μI+δb	t5: μII - μI+δb
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	0,005 **(*)**	0,005 **(*)**	0,005 **(*)**	0,005 **(*)**	0,005 **(*)**	0,005 **(*)**

Dargestellt sind die Ergebnisse des Wilcoxon Vorzeichentests. Getestet wurde jeweils die MFI in Marker 1 der Negativkontrolle (I, HLA-A2 negative Thrombozyten) + δb (mittlere Anstieg der MFI der Negativkontrolle in Marker 1 zwischen t0 und t5) gegen die MFI in Marker 1 der Testgruppe (II, Mischpopulation aus HLA-A2 positiven und negativen Thrombozyten) an den 6 Messzeitpunkten (t0 – t5). Signifikante Werte sind mit einem „**(*)**“ gekennzeichnet.

Es wurde damit statistisch gesichert, dass es zu keiner Mehrbindung des Antikörpers in der Population der HLA-A2 negativen Thrombozyten des Pool-Präparates im Vergleich zur Negativkontrolle kam. Somit gab und gibt es keinen Anhalt für einen Antigen-Shift, also der Übertragung von HLA-A2-Antigen zwischen den Thrombozyten.

3.4 Positivkontrolle aus Versuch 1 und 2

Bei den Positivkontrollen ließ sich, im Gegensatz zu den Konzentraten die HLA-A2 negative Thrombozyten enthielten, keine Mehrbindung des Anti-HLA-A2-Antikörpers über die Lagerungszeit zeigen. Dagegen kam es aber (analog zu den IgG1 Markierungen der Negativkontrollen und den Testansätzen) bei der Isotypkontrolle der HLA-A2 positiven Thrombozyten zu einer Zunahme der MFI, und damit zu einer Mehrbindung des Antikörpers. Diese Zunahme war ab t3 statistisch signifikant (Tab. 2-6).

Die Ergebnisse der HLA-A2 Markierung sowie die der IgG1 Markierung sind in Abb. 2.8 bzw. in Abb. 2.9 als Säulendiagramme dargestellt.

Abb. 3.8: Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) des Anti-HLA-A2-Antikörpers der Positivkontrolle aus Versuch 1 und 2 (IVa und IVb) aufgetragen gegen die 6 Messzeitpunkte t0 - t5

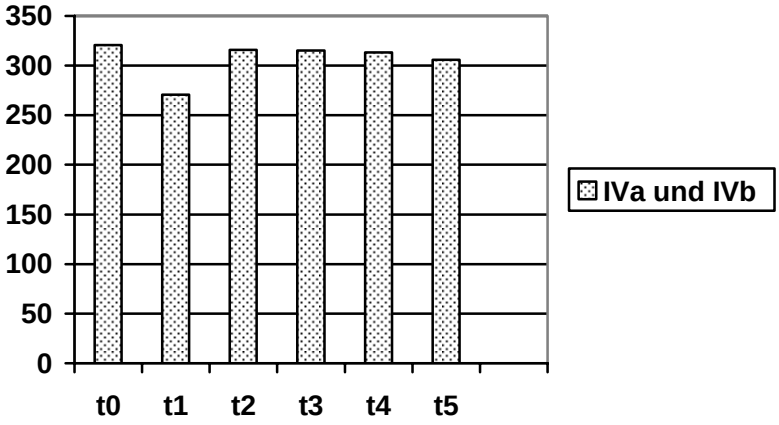
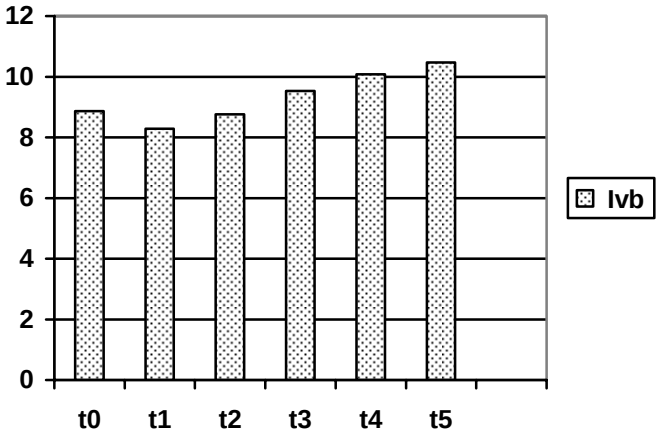


Abb. 3.9: Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der IgG1 Markierung der Positivkontrolle (IVb) aufgetragen gegen die 6 Messzeitpunkte (t0 - t5)



4 Diskussion

Die vorgelegte Studie ging der Frage nach, ob es während der Lagerung von Thrombozyten als gepoolte Thrombozytenkonzentrate von verschiedenen Spendern zu einer Abschilferung und Übertragung von HLA-Antigenen zwischen Thrombozyten oder zu einer Anlagerung von HLA-Antigen aus dem Plasma auf Thrombozyten kommt. Aufgeworfen wurde diese Frage einerseits durch den, herstellungstechnisch bedingten, zunehmenden Trend zum Zusammenführen (Poolen) von Thrombozyten und Plasma verschiedener Spender zu Beginn der Lagerungszeit und andererseits durch die widersprüchlichen Daten über die Herkunft der HLA-Antigene auf Thrombozyten. Eine Übertragung von HLA-Antigenen in einem gepoolten TK während der Lagerung könnte bei der Transfusion immunisierter Patienten vorher kompatible Thrombozyten inkompatibel machen. Das Ausbleiben eines Transfusionserfolges, also ein nicht adäquater Anstieg der Thrombozytenzahl trotz Übertragung einer ausreichenden Menge, wäre die Konsequenz.

4.1 Struktur und Funktion von Thrombozyten

Im Blut zirkulierende Thrombozyten sind kernlose Zytoplasmafragmente von Megakaryozyten. Sie sind von einer Lipiddoppelmembran umgeben, in die eine große Zahl von Proteinen integriert ist. Ca. 70% der Blutplättchen zirkulieren im Blut, ca. 30% werden als so genannter Milzpool in der Milz gespeichert (Aster R.H. *et al.* 1966). Die mittlere Überlebensrate der Blutplättchen beträgt 7 - 12 Tage, dann werden sie durch das Retikuloendotheliale System (RES) eliminiert.

Man kann die Thrombozyten als die zellulären Elemente des Hämostasesystems bezeichnen. Sie erfüllen eine Reihe wichtiger Funktionen, so tragen sie z.B. zur Aufrechterhaltung der Gefäßwandintegrität bei, sorgen nach Verletzungen für die Bildung eines hämostatisch wirksamen Blutpfropfes, fördern die lokale plasmatische Gerinnung durch Thrombinbildung auf ihrer Oberfläche und tragen zur Wundheilung bei.

4.2 Thrombozytäre Alloantigene

Die menschlichen Thrombozyten enthalten, ebenso wie alle anderen zellulären Blutelemente, genetisch determinierte Alloantigene, die unter anderem einen wichtiger Bestandteil des Immunsystems darstellen, da sie der Erkennung von „fremd“ und „selbst“ dienen.

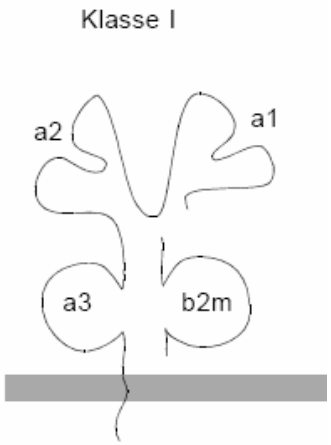
Thrombozytäre Alloantigene können anhand ihrer Gewebeverteilung klassifiziert werden. So genannte Typ I-Antigene, unter die ABH- und HLA-Klasse I-Antigene fallen, sind nicht nur auf Thrombozyten, sondern auch auf anderen Blutzellen und Gewebszellen nachweisbar. Typ II-Antigene, also immunogene genetische Varianten der Glycoproteinkomplexe (GP) IIb/IIIa, Ib/IX, Ia/IIa, IV und CD109 sind dagegen relativ spezifisch für Thrombozyten (Santoso S. *et al.* 2001).

Vor allem Antikörper gegen HLA-Klasse I-Antigene werden für das immunologisch bedingte Ausbleiben eines Transfusionserfolges verantwortlich gemacht. Pionierarbeit in der Erkenntnis dieser überragenden Bedeutung des HLA-Systems für die Alloimmunisierung von Patienten und dem daraus resultierenden Refraktärzustand leisteten Yankee et al. 1969 (Yankee R.A. *et al.* 1969). Man kann sagen, dass die Klasse I-Moleküle des HLA Komplexes das entscheidende Antigensystem darstellen, wenn es um das Überleben von transfundierten Thrombozyten bei alloimmunisierten Patienten geht (Mittal K.K. *et al.* 1976; Thomasulo P.A. *et al.* 1978).

Die meisten HLA-Klasse I-Antigene wurden auf der Thrombozytenmembran nachgewiesen, darunter vor allem HLA-A und –B-Antigene, während HLA-C-Antigene nur schwach exprimiert sind. Die Dichte der Antigene auf Thrombozyten weist dabei im Gegensatz zur Dichte auf Lymphozyten eine größere Variabilität auf (Liebert M. *et al.* 1977).

Die HLA-Klasse I-Antigene bestehen aus einer schweren Kette von 44kD, an die nicht kovalent gebundenes ß2-Mikroglobulin angelagert ist. Der extrazelluläre Anteil der alpha-Kette besteht aus drei Domänen, von denen die beiden äußersten durch die Aminosäuresequenz determinierte alloantigene Determinanten tragen. Sie bilden eine Rinne, in die Peptide passen, die von den MHC-Molekülen „präsentiert“ werden (s. Abb. 3.1).

Abb. 4.1: Struktur und Funktion von MHC Klasse I-Molekülen



a1, a2, a3 = die 3 Domänen der Alpha-Kette

b2m = nicht kovalent gebundenes ß2-Mikroglobulin

Die Herkunft der HLA-Klasse I-Antigene auf Thrombozyten wird kontrovers diskutiert. Unklar ist nach wie vor, ob die HLA Klasse I-Antigene auf Thrombozyten ausschließlich im Rahmen der Megakaryopoese bzw. Thrombopoese gebildet werden, oder ob auch reife Thrombozyten möglicherweise noch HLA-Antigene synthetisieren und exprimieren können und ob, und wenn ja, in welchem Ausmaß die auf Thrombozyten nachgewiesenen HLA-Antigene lediglich aus dem Plasma adsorbiert werden.

4.2.1 Lösliches HLA-Antigen im Plasma

Die Existenz löslichen HLA-Antigens im Plasma wurde erstmals 1970 beschrieben (van Rood J.J. *et al.* 1970; Charlton R.K. *et al.* 1970). Eine Zeit lang herrschte die Meinung, dass die Menge an gebundenem HLA auf der Oberfläche von Blutplättchen proportional zur Menge der im Plasma gelösten HLA-Antigene sei, wie es die Gruppe um Liebert am Beispiel HLA-B12 1977 postulierte (Liebert M. *et al.* 1977). Eine Quantifizierung sowohl des löslichen HLA-Antigens im Plasma, als auch des auf Thombozytenoberflächen gebundenen, gelang 1987 erstmals Kao et al. (Kao K.J. *et al.* 1987). Zuvor waren Konzentrationen nur semiquantitativ mittels Inhibition des Lymphozytotoxischen Tests (LCT) (Pellegrino M.A. *et al.* 1974) bzw. über die Neutralisation eines Thrombozytenzytotoxizitätstests (Aster R.H *et al.* 1973) bestimmt worden. Mit diesen Methoden war aber nur die Bestimmung eines bestimmten HLA-Antigen-Typs zu einer bestimmten Zeit möglich. Kao gelang nun die präzise Quantifizierung des gesamten gelösten und zellulär auf den Blutplättchen gebundenen HLA mittels ELISA. Seine Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass es keine Korrelation zwischen Plasmakonzentration löslicher HLA-

Antigene und Konzentration der an der Thrombozytenoberfläche gebundenen Antigene gibt. Sie widerlegten somit die bereits oben zitierte These von Liebert aus dem Jahre 1977. Eine wichtige Erkenntnis, auch für diese Studie, denn somit ist das Maß der an der Oberfläche gebunden Antigene nicht von der im Plasma gelösten Menge abhängig, man kann also auch kein Mindestmaß im Plasma definieren, welches die Spender in dieser Studie hätten mitbringen müssen, um den HLA-A2 negativen Thrombozyten genug „Material" für eine mögliche Anlagerung zu bieten. Auf eine HLA-Antigen-Plasmakonzentrationsbestimmung der Spender wurde deshalb verzichtet.

Ghio, der 1999 die Menge an löslichen HLA-Antigen in den verschieden Blutkomponenten untersuchte, kam zu dem Ergebnis, dass die Menge an löslichem HLA in nicht leukozytendepletierten Thrombozytenkonzentraten signifikant höher ist, als im Plasma bzw. in leukozytenarmen Präparaten (Ghio M. *et al.* 1999). Das Maß an gelösten Molekülen ist nach seinen Ergebnissen proportional zur Menge der im Präparat befindlichen Leukozyten und zur Lagerungszeit.

Da die für diese Studie herangezogenen Thrombozytenkonzentrate mittels der Buffy-Coat Methode aus Vollblutspenden ohne vorherige Leukozytenfiltration hergestellt wurden, ist von einer großen Menge gelösten HLA-Antigens für die Versuchsansätze auszugehen.

HLA-Klasse I-Antigene sind integrale Membranproteine, bestehend aus einer schweren Kette mit einem Molekulargewicht von 44 kD und einer leichten Kette (12 kD), dem nicht kovalent gebundenen ß2-Mikroglobulin (s. Abb. 3.1). Man nimmt an, dass das gelöste HLA im Plasma das Ergebnis einer Abschilferung von zirkulierenden Leukozyten darstellt (Allison J.P. *et al.* 1977). Später wurden auch HLA-Antigene mit einer schweren Kette niedereren Molekulargewichts, nämlich 39 kD beschrieben (Krangel M.S. *et al.* 1987). Dem Ursprung dieser HLA-Antigene gingen Haga et al. 1991 auf den Grund (Haga J.A. *et al.* 1991). Sie fanden heraus, dass es sich dabei wohl um von Leukozyten aktiv sezerniertes HLA-Antigen handelt, ohne die hydrophobe transmembrane Domäne der 44 kD schweren Ketten. Sie fanden noch weitere HLA-Antigene im Plasma, und zwar mit einem Molekulargewicht von 35 - 37 kD, die sie als Abbauprodukt der 39 kD Variante werteten, über deren Funktion aber Unklarheit herrscht. Es ist wohl zu erwarten, dass nur das 44 kD Molekül mit intakter bzw. vorhandener transmembra-

ner Domäne zur Anlagerung an z.B. Thrombozyten befähigt ist und somit, bei vorhandener HLA-Immunisierung, zum vorzeitigen Abbau der Thrombozyten durch das RES des Empfängers führen könnte. Denn die 39 kD Variante enthält weder ein hydrophobes transmembranes Segment noch irgendwelche Bindungslipide.

4.2.2 Passive Adsorption von HLA-Klasse I-Antigen

Lalezari et al. postulierten 1982, dass Thrombozyten HLA-Antigene aus dem Plasma anlagern können (Lalezari P. *et al.* 1982). Sie inkubierten HLA-A1 bzw. HLA-A2 negative Thrombozyten mit Plasma von Spendern, die bekannt positiv für diese Antigene waren, und konnten zeigen, dass die ursprünglich HLA-A1 bzw. HLA-A2 negativen Thrombozyten Lymphozytotoxizitätstiter von spezifischem HLA-Antiserum nach Adsorbtion vermindern konnten, vergleichbar mit den Thrombozyten aus der Kontrollgruppe, also solche von HLA-A1 bzw. HLA-A2 positiven Spendern. Dieses Ergebnis basierte auf der indirekten Hemmung des LCT. Die Arbeitsgruppe interpretierte dieses Ergebnis als Hinweis darauf, dass HLA-Antigen auf Blutplättchen das Ergebnis passiver Anlagerung aus dem Plasma ist.

Das Vorhandensein löslichen HLA-Antigens im Plasma, wie unter Abschnitt 3.2.1 beschrieben, ist unbestritten (Reisfeld R.A. *et al.* 1976; Aster R.H. *et al.* 1973; Kao K.J. *et al.* 1988). Auch Santoso et al. folgerten 1986 in Ihrer Veröffentlichung, dass Blutplättchen, zumindest zu einem geringen Teil, HLA-Antigen aus dem Plasma anlagern können (Santoso S. *et al.* 1986). Auch Sie konnten dieses Phänomen anhand indirekter Hemmung des LCT nachweisen. Ein direkter Nachweis des angelagerten Antigens, sozusagen in der Gegenprobe, mittels monoklonaler Antikörper im ELISA, gelang jedoch nicht. In einem in vivo Experiment wurden einer geringen Anzahl thrombozytopenischer Patienten, die bekannt HLA-A2 positiv waren, ein HLA-A2 negatives Thrombozytenkonzentrat vom Zellseparator verabreicht. Blutproben 2 und 18h nach Transfusion wurden entnommen und die Blutplättchen auf einen möglichen Anstieg an Antikörperbindung im ELISA hin untersucht. Eine ansteigende Bindung des HLA-Antikörpers, gewertet als Nachweis der Anlagerung von HLA an die Spenderthrombozyten, konnte jedoch nicht gezeigt werden.

Blumberg et al. nutzten 1984 das Antimalariamittel Chloroquin, von dem bekannt ist, dass es Antikörper von der Oberfläche von Erythrozyten entfernen kann, um HLA-

Antigen von der Oberfläche von Thrombozyten zu lösen (Blumberg N. *et al.* 1984). Sie konnten zeigen, dass nach der Behandlung von HLA-A2 positiven Thrombozyten mit Chloroquin, die Antikörperbindung der Blutplättchen auf dem Level von HLA-A2 negativen Thrombozyten war. Lymphozyten, die der gleichen Behandlung unterzogen wurden, zeigten diesen Effekt nicht. Es schien somit, dass die Bindung von HLA-Antigen an der Oberfläche der Blutplättchen unterschiedlich zu der Bindung derer an Lymphozyten ist. Die Autoren hielten es deshalb für wahrscheinlich, dass HLA-Antigen auf der Oberfläche von Thrombozyten wohl mehr das Ergebnis passiver Anlagerung löslichen Materials aus dem Plasma ist, denn das Ergebnis endogener Synthese während der Thrombozytogenese.

1996 lösten Novotny et al. (Novotny V.M. *et al.* 1996) die HLA-Klasse I-Antigene auf der Oberfläche von Thrombozyten durch Säure-Behandlung bei einem pH-Wert von 3, analog zu der Methode die Kurata bereits 1989 veröffentlicht hatte (Kurata Y. *et al.* 1989). Eine Wiederanlagerung, gemessen durch Fluoreszenzantikörpermarkierung am Durchflusszytometer, auf nahezu Ausgangsniveau, gelang bei der Inkubation der Blutplättchen in autologem Eluat, einen immer noch deutlichen Fluoreszenzanstieg zeigten die Thrombozyten inkubiert in allogenem Eluat, während bei den Thrombozyten, die in einem künstlichen, antigenfreien Nährmedium gelagert wurden, kein Anstieg zu detektieren war. Somit synthetisierten die Thrombozyten nach Ansicht der Autoren offensichtlich kein neues HLA-Antigen. Ob das gewählte Zeitintervall von 4 Stunden für die Inkubation nach der Säurebehandlung zu kurz gewählt wurde, um den im künstlichen Nährmedium lagernden Blutplättchen genug Zeit zu geben, eine messbare Zahl an Oberflächenantigen zu bilden, blieb jedoch offen.

4.2.3 Proteinbiosynthese durch Thrombozyten

Obwohl Thrombozyten keinen Zellkern besitzen, wurde Ihre Fähigkeit zur Proteinbiosynthese schon mehrfach beschrieben. Kieffer et al. wiesen elektronenmikroskopisch endoplasmatisches Retikulum sowie Ribosomen in Thrombozyten nach (Kieffer N. *et al.* 1987) und zeigten somit, dass den Thrombozyten zumindest die Mittel zur Proteinbiosynthese gegeben sind. Mit biochemischen und immunologischen Methoden konnten sie einige der synthetisierten Proteine charakterisieren, und somit die Fähigkeit des Thrombozyten zur Synthese von z.B. Membranglycoproteinen (GPIb, IIb und IIIa),

Fibrinogen, Albumin und von-Willebrand-Faktor nachweisen. Der von Newman et al. 1988 beschriebene Ansatz, große Mengen cDNA aus thrombozytenspezifischer mRNA mittels Polymerase Ketten Reaktion (PCR) herzustellen, ließ das genaue Studium der Variationen der verschiedenen Membranproteine der Thrombozyten auf molekularer Ebene zu (Newman P.J. *et al.* 1988).

Mittels der von Newman beschriebenen Methode wiesen Santoso et al. 1993 mRNA in Thrombozyten nach, die für HLA-Klasse I-Antigene codiert und konnten in der Gelelektrophorese 44 kD und 12 kD Banden darstellen, analog zum Molekulargewicht der schweren Kette von HLA-Klasse I-Antigen bzw. dem nicht kovalent gebundenen ß2-Mikroglobulin (Santoso S. *et al.* 1993). Somit gelang auf indirektem Wege der Nachweis, dass zirkulierende Thrombozyten zur HLA-Klasse I-Antigen Biosynthese befähigt sein müssten.

Zusammenfassend kann man jedoch sagen, dass alle bisher durchgeführten Versuche, Studien und Tests, wie z.B. die Hemmung des LCT oder der Nachweis von mRNA, nur indirekte Nachweise darstellen. Die Durchflusszytometrie dagegen könnte einen konkreten und direkten Nachweis erbringen, weshalb sie in dieser Studie zum Einsatz kam.

4.3 Analyse und Diskussion der Methode und der Ergebnisse

Die Determination von thrombozytenspezifischen Antigenen und HLA-Klasse I-Antigenen durch die Durchflusszytometrie wurde schon von mehreren Autoren als akkurate und schnelle Methode beschrieben und verwendet (Neumueller J. *et al.* 1995; Michelson A.D. *et al.* 1987; Marti G.E. *et al.* 1988). Dabei stellt die Durchflusszytometrie eine semiquantitative Methode dar, die, auf Einzelzellmessung beruhend, das Vorhandensein spezieller Antigene auf jeder einzelnen Zelle nachweisen kann. Keine andere Methode kann auf Einzelzellniveau das Vorhandensein, bzw. die Änderung der Menge, von bestimmten Antigenen an vielen tausend Zellen in so kurzer Zeit darstellen. Durch die Möglichkeit der Messung solch vieler Zellen ist eine differenzierte Aussage möglich, die auch statistisch gesichert werden kann. Andere Nachweismethoden wie z.B. ELISA, können zwar in der Summe sensitiver sein, lassen aber keine Beurteilung auf Einzelzellniveau zu. Auch die Empfindlichkeit der Durchflusszytometrie ist ausrei-

chend hoch. So können z.B. in Aktivierungsessays Subpopulationen in der Größe von 1% nachgewiesen werden (Kestin A.S. *et al.* 1993).

In dieser Studie wurden die Ergebnisse allerdings nicht als „% positiver Thrombozyten" angegeben, weil nicht zu erwarten war, dass es durch die Anlagerung zu distinkt trennbaren Populationen kommt, sondern dass sich die Expression der HLA-Antigene auf den Thrombozyten nur graduell ändern würde, was über die hier gewählte Darstellung als mediane Fluoreszenzintensität (MFI) besser zu beschreiben war.

Um die Entscheidung zwischen einer „Waschmethode" bzw. einer „Nicht-Waschmethode" zu treffen, wurde im Vorfeld dieser Studie der unter Abschnitt 1.2.1 beschriebene Vorversuch durchgeführt. Üblicherweise werden für die immunhämatologische Messung der Antigenbeladung von Zellen in einer Suspension, die die gesuchten Antigene auch in gelöster Form enthält, die Zellen vor der Messung „gewaschen". Hierfür werden die Zellen per Zentrifugation pelletiert, der antigenhaltige Überstand dekantiert bzw. abgesaugt, und danach die zu untersuchenden Zellen vor der Messung in antigenfreier Lösung resuspendiert. Grund dafür ist, dass das in der Suspension gelöste Antigen die zum Nachweis eingesetzten Antikörper abbinden könnte, und somit zu einem falsch negativen Messergebnis führen könnte. Da aber in der Thrombozytenserologie ein erhebliches Risiko bezüglich der Verfälschung der Messergebnisse durch aktivierungsbedingte Modulation von Oberflächenrezeptoren und Thrombozytenaktivierung besteht, ist es sinnvoll möglichst ohne Waschschritt auszukommen. Denn die Vermeidung von möglichen Aggregaten ist wichtig, da solche Aggregate vom Messgerät nicht als einzelne Zellen wahrgenommen werden können, und damit als einziges Ereignis eine höhere Antigendichte aufweisen. Das hätte in dieser Studie fälschlicherweise als Mehranlagerung, und somit als Beweis für die Anlagerung von Antigen gesehen werden können. Zwar würden größere Aggregate im VSL/SSL Bild erkannt werden, Doubletten oder Tripplets dagegen könnten sich durchaus im Streubereich der normalen Größenverteilung von Thrombozyten befinden und somit zu Fehlinterpretationen führen.

Das Ergebnis des Vorversuches war zwar nicht statistisch signifikant und konnte es aufgrund des geringen Stichprobenumfanges auch nicht sein, zeigte aber eine klare Tendenz und machte die Entscheidung für die „Nicht-Wasch-Methode" leicht, denn durch den Waschvorgang kam es in allen durchgeführten Ansätzen bei der „Wasch-Methode"

zu einer Mehrbindung des Antikörpers, sowohl in der Kontrollgruppe als auch in der Testgruppe, was einen unerwünschten Artefakt darstellte und die Messergebnisse dieser Studie verfälscht hätte.

Die in Folge diskutierten Ergebnisse bezüglich einer nicht spezifischen Mehrbindung des Antikörpers in den eigentlichen Versuchen, also Versuch 1 und 2, deuteten sich bereits im Vorversuch tendenziell an, auch wenn aufgrund des niedrigen Stichprobenumfangs (n = 3) hierfür keine statistische Signifikanz bestehen konnte.

Für eine passive Adsorption von HLA-Antigen aus dem Plasma konnte in dieser Studie kein Hinweis gefunden werden, vielmehr ließ sich die ja damit verbundene Mehranfärbung mit dem HLA-A2-Antikörper statistisch gesichert ausschließen. Der in allen Ansätzen gleichermaßen gefundene Anstieg der MFI konnte nicht das Ergebnis einer Anlagerung von HLA-A2 aus dem Plasma sein, da sich in den Negativkontrollen (Ia und IIa) kein entsprechendes HLA-Antigen befand. Um dennoch zu einer differenzierten Aussage zu gelangen, musste (in beiden Versuchen) die Größe δ definiert werden (s. Abschnitt 2.2 bzw. 2.3), als mittlerer Anstieg der Antikörperbindung der Negativkontrollen. Nur so ließ sich ein statistischer Test durchführen, denn die Gleichheit von Ergebnissen ist mathematisch ungleich schwieriger zu beweisen. So musste der gemessene Anstieg der MFI als nicht spezifische Mehrbindung des Antiköpers an alternde Thrombozyten gewertet werden. Für den Beweis einer Anlagerung von HLA-A2-Antigen an Thrombozyten, hätte die Testgruppe einen Mehranstieg als δ haben müssen. Dies war jedoch nicht der Fall.

Das Ergebnis der nicht spezifischen Mehrbindung des HLA-A2-Antikörpers im Verlauf der routinemäßigen Lagerung wurde zusätzlich durch das Ergebnis der IgG1-Antikörperfärbung gestützt. Die Isotypkontrolle zeigte in allen Ansätzen, in denen sie durchgeführt wurde, einen signifikanten Anstieg über den Messzeitraum und bestätigte somit die Interpretation der steigenden Antikörperbindung als nicht spezifische Anlagerung.

Einzig in der Positivkontrolle gab es eine Diskrepanz. Die über den Lagerungszeitraum offensichtlich stattfindende Mehrbindung des HLA-A2-Antikörpers ließ sich hier nicht reproduzieren. Und dies obwohl der statistisch signifikante Anstieg der Anti-IgG1 Färbung auch für die Positivkontrolle nachweisbar war. Vielleicht gab es bei den HLA-A2

positiven Thrombozyten eine geringe Abschilferung von HLA-A2-Antigen im Verlauf der Lagerung, der durch die zunehmende unspezifische Mehrbindung des HLA-A2-Antikörpers überdeckt wurde. Denn zu einer signifikanten Abschilferung scheint es ja nur bei unphysiologischen pH-Werten zu kommen (Novotny V.M. *et al.* 1996). Dieses Ergebnis ließ sich auch von uns in Untersuchungen im Vorfeld dieser Studie durch Säurebehandlung von Thrombozyten reproduzieren (die Ergebnisse dieser Testmessungen sind in dieser Arbeit nicht aufgeführt). Ein weiterer Punkt in diesem Zusammenhang ist, dass, bedingt durch die logarithmische Verstärkung, geringe Änderungen der HLA-A2 Bindung bei den positiven Thrombozyten deutlich weniger ins Gewicht gefallen wären, als dies bei den HLA-A2 negativen Thrombozyten der Fall war.

Für das Abschilfern von HLA-A2-Antigen gefolgt von einer Anlagerung an HLA-A2 negative Thrombozyten, einen so genannten Antigenshift, konnte in dieser Studie kein Hinweis gefunden werden, vielmehr ließ sich dieser Shift mit der hier verwendeten Messmethode statistisch gesichert ausschließen. Das Detektieren und Auswerten eines Shifts stellte sich aber deutlich schwieriger dar, als der mögliche Nachweis einer Anlagerung an zuvor negative Thrombozyten der Testgruppe aus Versuch 1. Die Auswertung der Messergebnisse des Durchflusszytometers erforderte hierfür die getrennte Betrachtung der HLA-A2 negativen und HLA-A2 positiven Thrombozyten, die sich in der Testgruppe, also dem Poolpräparat, ja als Mischpopulation in einer Probe befanden. Um dieses Problem zu lösen, wurden die unter Abschnitt 1.2.3 beschriebenen und in Abb. 2.4 graphisch dargestellten Marker gesetzt. Es wäre theoretisch denkbar, dass sich HLA-A2 negative Thrombozyten mit einer ausreichenden Menge an HLA-A2-Antigen ausgestattet haben, und sich somit der Messung in Marker 1 entziehen konnten. Dementsprechend hätten sich dann aber prozentual mehr Ereignisse, also HLA-A2 positive Thrombozyten, in Marker 2 befinden müssen, dies war nicht der Fall. Auch hätte diese Anlagerung sprunghaft sein müssen, um sich der Detektion des Durchflusszytometers am Übergang von Marker 1 zu Marker 2 zu entziehen. Die Veränderungen in Marker 1 des Poolpräparates, also der Testgruppe, entsprachen denen der Kontrollgruppe, bzw. eine Mehrbindung an Antikörper (als Nachweis eines Shifts) im Vergleich zur Kontrollgruppe konnte statistisch gesichert ausgeschlossen werden.

Somit bleibt als Fazit, dass es offensichtlich eine nicht spezifische Mehrbindung des HLA-A2-Antiköpers an die HLA-A2 negativen Thrombozyten im Verlauf der Lagerung

gab. Es kam aber nicht zu einer Anlagerung von HLA-A2 aus dem Plasma an die Thrombozyten. Ebenso wurde ein Antigenshift ausgeschlossen. Insbesondere, da die für diese Studie verwendeten TK nicht leukozytendepletiert waren, und somit den Thrombozyten ein Mehr an Antigen für eine mögliche Anlagerung zu Verfügung gestanden hätte, als dies heutzutage unter Routinebedingungen für Thrombozytenkonzentrate der Fall ist. Denn, wie bereits erwähnt, ist das Maß an gelösten Molekülen proportional zu der im Konzentrat befindlichen Anzahl an Leukozyten und zur Lagerungszeit (Ghio M. *et al.* 1999).

Das Zusammenführen von Thrombozyten verschiedener Spender in einem Pool Präparat führt offensichtlich nicht zur Veränderung der HLA-Muster der Thrombozyten der einzelnen Spender. Es kommt zu keiner Angleichung der HLA-Muster. Für die Sorge, vorher kompatible Thrombozyten würden durch die gemeinsame Lagerung in einem Pool-TK inkompatibel werden, konnte in dieser Studie kein Anhalt gefunden werden. Somit kann auch weiterhin, sofern kein TKZ eines ausgewählten Spenders vom Zellseperator für einen immunisierten Patienten zur Verfügung steht, ein Pool-TK transfundiert werden, in der Hoffnung es enthalte auch für Ihn kompatible Thrombozyten.

5 Zusammenfassung

Die Versorgung von HLA immunisierten Patienten mit geeigneten Thrombozyten stellt auch heute noch ein Problem in der Transfusionsmedizin dar. Zwar kann mittlerweile in den meisten Fällen durch die Bereitstellung passender Thrombozytapheresekonzentrate von HLA kompatiblen Einzelspendern ein adäquater Transfusionserfolg erreicht werden, nicht immer stehen jedoch geeignete HLA typisierte Spender kurzfristig zur Verfügung. In dieser Situation transfundierte man in der Vergangenheit Thrombozytenkonzentrate, die aus den Vollblutspenden verschiedener, nicht HLA typisierter, Blutspender gewonnen wurden. Begründet in der großen Vielfalt des HLA-Systems besteht dabei die Chance, dem Patienten auch solche Thrombozyten zur Verfügung zu stellen, gegen die er bisher noch keine HLA-Antikörper gebildet hat. Durch die Einführung neuer Herstellungstechniken werden diese Thrombozytenkonzentrate verschiedener Einzelspender mittlerweile jedoch zu Beginn der Lagerungszeit von maximal 5 Tagen zusammengeführt (gepoolt).

Da aufgrund der derzeitigen Studienlage nicht zweifelsfrei zu klären ist, ob (bzw. in welchem Umfang) Thrombozyten HLA-Antigene aus dem Plasma passiv adsorbieren, stellte sich die Frage, ob es im Verlauf der routinemäßigen Lagerung dieser Pool-TK zu einer Adsorption von HLA-Antigenen aus dem Plasma und somit zu einer Angleichung der HLA-Antigene auf den gemeinsam gelagerten Thrombozyten kommt. Eine Inkompatibilität vorher kompatibler Thrombozyten, und damit verbunden, ein geringerer Anstieg der Thrombozytenzahl beim Empfänger des Konzentrats wären die Folge.

In der vorliegenden Studie wurde mittels durchflusszytometrischer Bestimmung von HLA-A2-Antigenen auf Thrombozyten eine mögliche Übertragung von HLA-Antigenen während der Lagerung von gepoolten Thrombozytenkonzentraten untersucht.

In einem ersten Versuch sollte eine mögliche Anlagerung von HLA-Antigen aus dem Plasma nachgewiesen bzw. widerlegt werden. Dazu wurden in je 10 Ansätzen Thrombozyten von HLA-A2 negativen Spendern durch Zentrifugation pelletiert und nach Entfernung des autologen Plasmas in thrombozytenfreiem Plasma von HLA-A2 positiven Spendern resuspendiert. Diese Aufschwemmungen wurden 5 Tage unter Routinebedin-

gungen für Thrombozytenkonzentrate gelagert. Die Expression von HLA-A2- Antigenen auf den Thrombozyten wurde im Verlauf der Lagerung durchflusszytometrisch anhand eines FITC konjugierten Anti-HLA-A2-Antikörpers bestimmt. Verglichen wurde die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der Anti-HLA-A2 Markierung der Thrombozyten, wobei pro Messgang und Probe die MFI von jeweils 5 000 Ereignissen bestimmt wurde. Als Negativkontrollen dienten das unbehandelte Präparat des HLA-A2 negativen Spenders sowie pelletierte Thrombozyten des HLA-A2 negativen Spenders, die in autologem Plasma resuspendiert wurden. Als Positivkontrolle diente das unbehandelte Präparat des HLA-A2 positiven Spenders. Sowohl im Versuchsansatz, als auch in den Kontrollen war im Verlauf der Lagerung ein Anstieg der Bindung des Anti-HLA-A2-Antikörpers zu verzeichnen. Dieser Anstieg unterschied sich jedoch nicht zwischen Versuchsansatz und Negativkontrollen und ist somit als unspezifisch zu werten.. Eine spezifische Mehranlagerung des Antikörpers als Nachweis einer HLA-Anlagerung aus dem Plasma in den Testansätzen konnte statistisch gesichert ausgeschlossen werden.

In einer zweiten Versuchsreihe sollte ein möglicher „Shift“, also die Abschilferung und Übertragung von HLA-Antigen zwischen Thrombozyten im Poolkonzentrat, nachgewiesen bzw. widerlegt werden. Auch hier wurden je 10 Versuchsansätze durchgeführt. Um einen möglichen Shift nachzuweisen, wurden die HLA-A2 negativen Thrombozyten in einer Mischpopulation mit HLA-A2 positiven Thrombozyten gelagert und Veränderungen der MFI der HLA-A2 negativen Thrombozyten im Vergleich zu einer Negativkontrolle (siehe oben) am Durchflusszytometer gemessen. Zusätzlich wurden Isotypkontrollen (Anti-IgG1) zu jedem Messzeitpunkt mitgeführt. Auch eine pH-Wert Bestimmung der Konzentrate am Ende der Lagerungszeit, also nach 5 Tagen, wurde durchgeführt. Die signifikante, aber nicht spezifische Zunahme der Antikörperbindung des HLA-A2-Antikörpers bei allen Konzentraten die HLA-A2 negative Thrombozyten enthielten, zeigte sich auch in Versuch 2. Analog zeigte sich jedoch auch eine parallele, signifikante Mehrbindung des Antikörpers der Isotypkontrolle in allen Ansätzen. Eine spezifische Mehranlagerung bzw. Mehrbindung des HLA-A2-Antikörpers im Testansatz, dem Pool-Präparat, im Vergleich zur Negativkontrolle, gewertet als Shift, konnte statistisch gesichert ausgeschlossen werden.

Es darf daraus geschlossen werden, dass das Poolen von TK verschiedener Spender nicht zu einer Veränderung bzw. einer Angleichung der HLA-Antigene auf der Oberflä-

che der Thrombozyten während der routinemäßigen Lagerungszeit und unter Routine-Lagerungsbedingungen führt. Somit darf auch in Zukunft davon ausgegangen werden, dass, sofern kein passender HLA typisierter Spender für einen immunisierten Patienten zur Verfügung steht, auf ein Poolpräparat verschiedener Vollblutspender zurückgegriffen werden kann, in der Hoffnung, es enthalte auch Thrombozyten, gegen die der Patient noch nicht immunisiert ist.

6 Literaturverzeichnis

1. Allison J.P., Pellegrino M.A., Ferrone S., Callahan G.N., Reisfeld R.A. (1977) "Biologic and chemical characterization of HLA antigens in human serum." J.Immunol. 118.3, 1004-09.

2. Andreu G., Dewailly J. (1994) "Prevention of HLA alloimmunization by using leukocyte-depleted components." Curr.Stud.Hematol.Blood Transfus.60, 29-40.

3. Aster, R. H. (1966) "Pooling of platelets in the spleen: role in the pathogenesis of "hypersplenic" thrombocytopenia." J.Clin.Invest 45.5, 645-57.

4. Aster R.H., Miskovich B.H., Rodey G.E. (1973) "Histocompatibility antigens of human plasma. Localization to the HLD-3 lipoprotein fraction." Transplantation 16.3, 205-10.

5. Bericht zur Meldung nach §21 Transfusionsgesetz (2003) für die Jahre 2001 und 2002.

6. Blumberg N., Masel D., Meyer T., Horan P., Heal J. (1984) "Removal of HLA-A,B antigens from platelets." Blood 63.2, 448-50.

7. Brand, A., Claas F.H., Voogt P.J., Wasser M.N., Eernisse J.G. (1988) "Alloimmunization after leukocyte-depleted multiple random donor platelet transfusions." Vox Sang. 54.3, 160-66.

8. Brand A., Claas F.H., Voogt P.J., Wasser M.N., Eernisse J.G. (2001) "Alloimmune platelet refractoriness: incidence declines, unsolved problems persist." Transfusion 41.6, 724-26.

9. Charlton R.K., Zmijewski C.M. (1970) "Soluble HL-A7 antigen: localization in the beta-lipoprotein fraction of human serum." Science 170.958, 636-37.

10. Eriksson L., Hogman C.F. (1990) "Platelet concentrates in an additive solution prepared from pooled buffy coats. 1. In vitro studies." Vox Sang. 59.3, 140-45.

11. Eriksson L., Shanwell A., Gulliksson A., Hogman C.F., Svensson L.A. (1993) "Platelet concentrates in an additive solution prepared from pooled buffy coats. In vivo studies." Vox Sang. 64.3, 133-38.

12. Fisher, M., Chapman J.R., Ting A., Morris P.J. (1985) "Alloimmunisation to HLA antigens following transfusion with leucocyte-poor and purified platelet suspensions." Vox Sang. 49.5, 331-35.

13. Ghio M., Contini P., Mazzei C., Brenci S., Puppo F. (1999) "Soluble HLA class I, HLA class II, and Fas ligand in blood components: a possible key to explain the immunomodulatory effects of allogenic blood transfusions." Blood 93.5, 1770-77.

14. Haga J.A., She J.X., Kao K.J. (1991) "Biochemical characterization of 39-kDa class I histocompatibility antigen in plasma. A secretable membrane protein derived from transmembrane domain deletion." J.Biol.Chem. 266.6, 3695-701.

15. Heddle, N. M. (1994) "The efficacy of leukodepletion to improve platelet transfusion response: a critical appraisal of clinical studies." Transfus.Med.Rev. 8.1, 15-28.

16. Heddle N. M., Blajchman M.A. (1995) "The leukodepletion of cellular blood products in the prevention of HLA-alloimmunization and refractoriness to allogeneic platelet transfusions." Blood 85.3, 603-06.

17. Heddle N.M., Soutar R.L., O'Hoski P.L., Singer J., McBride J.A., Ali M.A., Kelton J.G. (1995) "A prospective study to determine the frequency and clinical significance of alloimmunization post-transfusion." Br.J.Haematol. 91.4,1000-05.

18. Kao, K. J. (1987) "Plasma and platelet HLA in normal individuals: quantitation by competitive enzyme-linked immunoassay." Blood 70.1, 282-86.

19. Kao K.J., Scornic J.C., Riley W.J., McQueen C.F. (1988) "Association between HLA phenotype and HLA concentration in plasma or platelets." Hum.Immunol. 21.2, 115-24.

20. Kestin A.S., Ellis P.A., Barnard M.R., Errichetti A., Rosner B.A., Michelson A.D. (1993) "Effect of strenuous exercise on platelet activation state and reactivity." Circulation 88.4 Pt 1, 1502-11.

21. Kiefel V. Konig H., Kroll H., Santoso S. (2001) "Platelet alloantibodies in transfused patients." Transfusion 41.6, 766-70.

22. Kieffer N., Guichard J., Farcet J.P., Vainchenker A.E., Breton-Gorius J. (1987) "Biosynthesis of major platelet proteins in human blood platelets." Eur.J.Biochem. 164.1, 189-95.

23. Krangel, M. S. (1987) "Two forms of HLA class I molecules in human plasma." Hum.Immunol. 20.2, 155-65.

24. Kretschmer V., Biermann E., Loh H. (1990) "Separation of platelet concentrates (PC) from buffy coat (BC) using the bottom and top drainage (BAT) system." Beitr.Infusionsther. 26, 65-70.

25. Kroll H., Mueller-Eckhardt C. and Kiefel V. (2003) "Therapie mit Thrombozyten" aus Müller-Eckhard C (ed) : Tranfusionsmedizin; p394-406.

26. Kurata Y., Oshida M., Take H., Nakao H., Yonezawa T. (1989) "New approach to eliminate HLA class I antigens from platelet surface without cell damage: acid treatment at pH 3.0." Vox Sang. 57.3, 199-204.

27. Lalezari P., Driscoll A.M. (1982) "Ability of thrombocytes to acquire HLA specificity from plasma." Blood 59.1, 167-70.

28. Lane, T. A., Anderson K.C., Goodnough K.T., Kurtz S., Moroff, G. (1992) "Leukocyte reduction in blood component therapy." Ann.Intern.Med. 117.2, 151-62.

29. Liebert M., Aster R.H. (1977) "Expression of HLA-B12 on platelets, on lymphocytes and in serum: a quantitative study." Tissue Antigens 9.4, 199-208.

30. Marti G.E., Magruder L., Schuette W.E., Gralnick H.R. (1988) "Flow cytometric analysis of platelet surface antigens." Cytometry 9.5, 448-55.

31. Michelson, A. D. (1987) "Flow cytometric analysis of platelet surface glycoproteins: phenotypically distinct subpopulations of platelets in children with chronic myeloid leukemia." J.Lab Clin.Med. 110.3, 346-54.

32. Mittal K.K., Ruder E.A., Green D. (1976) "Matching of histocompatibility (HL-A) antigens for platelet transfusion." Blood 47.1, 31-41.

33. Neumueller J., Tohidast-Akrad M., Jilch R., Schwartz D.W., Mayr W.R. (1995) "Standardization of the flow cytometric determination of HLA class I antigens, 'platelet-specific' glycoproteins and activation markers." Vox Sang. 68.2, 109-20.

34. Newman P.J., Gorski J., White G.C., Gidwitz S., Cretney C.J., Aster R.H. (1988) "Enzymatic amplification of platelet-specific messenger RNA using the polymerase chain reaction." J.Clin.Invest 82.2, 739-43.

35. Novotny V. M., van Dorn R., Witvliet M.D., Claas F.H., Brand A. (1995) "Occurrence of allogeneic HLA and non-HLA antibodies after transfusion of prestorage filtered platelets and red blood cells: a prospective study." Blood 85.7, 1736-41.

36. Novotny V. M., Doxiadis A.N., van Doorn R, Brand A. (1996) "The kinetics of HLA class I elution and the relevance for the use of HLA-eluted platelet transfusions." Br.J.Haematol. 95.2, 416-22.

37. Novotny V. M., Huizinga D.W., van Doorn R., Briet E., Brand A. (1996) "HLA class I-eluted platelets as an alternative to HLA-matched platelets." Transfusion 36.5, 438-44.

38. Paul-Ehrlich-Institut. "Bekanntmachung des Paul-Ehrlich-Instituts vom 18.08.2000 (2000) über die Ergebnisse des Stufenplanverfahrens zur Einführung der Leukozytendepletion von zellulären Blutprodukten."

39. Pellegrino M. A., Ferrone S., Pellegrino A.G., Oh S.K., REisfeld R.A. (1974) "Evaluation of two sources of soluble HL-A antigens: platelets and serum." Eur.J.Immunol. 4.4, 250-55.

40. Reesink H. W., Nydegger U.E., Brand A., Pietersz R.N., Andreu G. (1992) "Should all platelet concentrates issued be leukocyte-poor?" Vox Sang. 62.1, 57-64.

41. Reisfeld R.A., Allison J.P., Ferrone S., Pellegrino M.A., Poulik M.D. (1976) "HLA-antigens in serum and urine: isolation, characterization, and immunogenic properties." Transplant.Proc. 8.2, 173-78.

42. van Rood J.J., van Leeuwen A., van Santen M.C. (1970) "Anti HL-A2 inhibitor in normal human serum." Nature 226.5243, 366-67.

43. Saarinen U. M., Kekomaki R., Siimes M.A., Myllyla G. (1990) "Effective prophylaxis against platelet refractoriness in multitransfused patients by use of leukocyte-free blood components." Blood 75.2, 512-17.

44. Santoso S., Müller-Eckhardt G., Kiefel V., Müller-Eckhardt C. (1986) "HLA antigens on platelet membranes. In vitro and in vivo studies." Vox Sang. 51.4, 327-33.

45. Santoso, S., Kalb R., Kiefel V., Müller-Eckhardt. (1993) "The presence of messenger RNA for HLA class I in human platelets and its capability for protein biosynthesis." Br.J.Haematol. 84.3, 451-56.

46. Santoso S., Kiefel V. (2001) "Human platelet alloantigens". Wien Klin Wochenschr. 113, 806-13.

47. Slichter SJ., Nance SJ. (1990) Mechanism and Management of Platelet Refractoriness. Nance SJ (ed) Transfusion Medicine in the 1990's. American Association of Blood Banks, Arlington; p95-179.

48. Terasaki P. I., McCurdy B., McClelland J. (1973) "Microdroplet lymphocyte cytotoxicity test." Nippon Rinsho 31.11, 3314-20.

49. Thomasulo PA. (1978) "Management of histocompatibility antigens for platelet transfusion" in Schiffer J (ed): Platelet Physiology and Transfusion. Arlington, VA, American Assosiation of Blood Banks. p69.

50. "Transformation of labile blood products: deleukocytation." (1994) Journal Officiel de la Republique Francaise 8, 6738.

51. TRAP study group (1997) "Leukocyte reduction and ultraviolet B irradiation of platelets to prevent alloimmunization and refractoriness to platelet transfusions. The Trial to Reduce Alloimmunization to Platelets Study Group." N.Engl.J.Med. 337.26, 1861-69.

52. Wissenschaftlicher Beirat der Bundesaerztekammer. (2000) Richtlinien zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten (Hämotherapie).

53. Yankee R. A., Grumet F.C., Rogentine G.N. (1969) "Platelet transfusion the selection of compatible platelet donors for refractory patients by lymphocyte HLA typing." N.Engl.J.Med. 281.22, 1208-12.

7 Anhang

7.1 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Humanmedizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Thema: „Durchflusszytometrische Untersuchung zur Frage der Absorption und Elution von HLA-Klasse I-Antigenen auf Thrombozyten während der Lagerung als gepoolte Thrombozytenkonzentrate“ im Institut für Transfusionsmedizin und Hämostaseologie unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med. Volker Kretschmer ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keinem in- und ausländischen medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

_____

Markus Heim

7.2 Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Volker Kretschmer für die Überlassung des Themas.

Besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. med. Thomas Zeiler für die Idee zu dieser Arbeit, die vielen konstruktiven Anregungen, die engagierten und schnellen Korrekturvorschläge und die außerordentlich gute Betreuung.

Frau Lehmann danke ich für die praktischen Hilfestellungen bei der Herstellung der Pufferlösungen, für die Tipps im Umgang mit dem FACSCalibur und für die freundliche Hilfe beim Reinigen des Durchflusszytometers.

Dem ganzen Team der Blutspende sei ebenfalls gedankt, im Besonderen Frau Erika Gutjahr, die mir jederzeit Ihre Hilfe beim Einbestellen der Spender anbot.

Danke dem Team der Fraktionierer der Blutbank für die Herstellung der für die Studie benötigten Thrombozytenkonzentrate.

Dank gilt auch Frau Dr. Cornelia Dempfle, vom Institut für Biometrie der Philipps-Universität Marburg, für die statistische Beratung.

Ebenfalls gilt mein Dank dem MTA-Team des Instituts für Transfusionsmedizin und Hämostaseologie der Philipps-Universität Marburg für die Unterstützung dieser Arbeit.

Schließlich gilt mein besonderer Dank noch meinen Eltern, ohne deren Unterstützung mein Studium und diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

7.3 Lebenslauf

Name:	Markus Heim	
Geburtsdatum:	12. Mai 1976	
Geburtsort:	Mannheim	
Staatsangehörigkeit:	deutsch	
Familienstand:	ledig	
Schulausbildung:	1982 – 1986	Grundschule, Wachenheim
	1986 – 1995	Werner-Heisenberg-Gymnasium, Bad Dürkheim
Zivildienst:	1995 – 1996	Rettungssanitäter, Lehrrettungswache des DRK Kreisverbandes Bad Dürkheim
Studium:	1997 – 2002	Humanmedizin an der Philipps-Universität, Marburg
	2002 – 2003	Praktisches Jahr an der LMU, München
AktuelleTätigkeit:	seit 2004	AIP bzw. Assistenzarzt am Institut für Anästhesiologie und Intensivmedizin der Technischen Universität, München

7.4 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren:

Austermann, Basler, Behr, Bertalanffy, Bien, Engenhard-Cabillic, Feuser, Fuchs, Gotzen, Gress, Grzeschik, Gudermann, Hasilik, Hermann-Lingen, Hertl, Hofmann, Hoyer, Kill, Klenk, Klose, Koolmann, Kretschmer, Krieg, Kroll, Lenz, Lill, Löffler, Maier, Maisch, Moll, Moosdorf, Mueller, Neubauer, Oertel, Reichard, Remschmidt, Renz, Röhm, Rothmund, Schäfer, Sundermayer, Vogelmeier, Wagner, Weihe, Werner, Wulf

Meine akademischen Lehrer in der Schweiz (Wolhusen, Universität Bern) waren:

Spirig

Meine akademischen Lehrer in München waren:

Mudra, Peter