

Deutsches Kinderherzzentrum St. Augustin
Abteilung für Kinderherz- und Thoraxchirurgie
- **Direktor: Prof. Dr. B. Asfour**

**Untersuchung des Einflusses von Kunstherzen auf Thrombozyten
durch Bestimmung von Thrombozytenaktivität und Mikroaggregatbildung
mit Durchflußzytometrie nach Entwicklung eines Protokolls zur
Vollblutpräparation**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung des doctor medicinae
der Medizinischen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

Vorgelegt von
Sami Abdel-Karim
aus Dortmund
2011

Gedruckt mit Genehmigung
der Medizinischen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Wilhelm Schmitz

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Ch. Schmidt

2. Berichterstatter: Prof. Dr. B. Asfour

Tag der mündlichen Prüfung: 06.07.2011

Deutsches Kinderherzzentrum St. Augustin
Abteilung für Kinderherz- und Thoraxchirurgie
- Direktor: Prof. Dr. B. Asfour
Referent: Priv.-Doz. Dr. Ch. Schmidt
Koreferent: Prof. Dr. B. Asfour

Zusammenfassung

Untersuchung des Einflusses von Kunstherzen auf Thrombozyten
durch Bestimmung von Thrombozytenaktivität und Mikroaggregatbildung mit Durchflußzytometrie nach
Entwicklung eines Protokolls zur Vollblutpräparation

Abdel-Karim, Sami

Es ist bisher nicht ganz geklärt, wie die Hämostase auf künstliche Oberflächen reagiert. Da die Hämostase in der frühen postoperativen Phase nach Kunstherzimplantation die Prognose maßgeblich durch thrombembolische Komplikationen beeinflusst, werden mit dieser Studie (Institutional Review Board, Penn State College of Medicine, 17.12.2004, Protocol No. HY00-264EP), zur weiteren Klärung des Einflusses von künstlichen Oberflächen, Veränderungen der Hämostase während und nach einer Kunstherzimplantation (LVAD - TCI und Thoartec) untersucht.

Die postoperativen, thrombembolischen Komplikationen werden durch die primäre Hämostase verursacht. Die primäre Hämostase wird durch Thrombozyten gestellt. Die Untersuchungen der Thrombozyten sind mit Durchflußzytometrie durchgeführt worden. Im Vorfeld dieser Studie ist dafür ein Protokoll zur Vollblutpräparation entwickelt worden.

Der Einfluß der künstlichen Oberflächen wurde durch Bestimmung der Thrombozytenaktivität und Mikroaggregatbildung bestimmt. Die Expression von P-selectin ist als Aktivitätsmarker verwendet worden, die Bildung von Mikro-/Aggregaten ist durch die Kombination aus Thrombozytenidentifizierung (CD61) und Lichtreflex bzw. Vorwärtslichtzerstreuung (forward scatter) nachgewiesen worden. Diese Parameter sind in Kunstherzpatienten, Klappenersatzpatienten, Herzinsuffizienzpatienten (NYHA III-IV) und Freiwilligen untersucht worden.

Zusammenfassend kann aus dem geringen Patientenkollektiv, das der Studie zugrunde liegt, Folgendes festgehalten werden: Kunstherzen haben keinen signifikanten Einfluß auf den Aktivitätszustand von Thrombozyten und keinen signifikanten Einfluß auf die Bildung von Mikro-/Aggregaten im Vergleich mit Klappenersatzpatienten.

Als Zufallsbefund ist in der frühen postoperativen Phase (24h und 72h nach Operation) Hypersensitivität der Thrombozyten festgestellt worden. Dabei handelt es sich a.e. um eine Folge der Herz-Lungen-Maschine. Hypersensitiven Thrombozyten scheinen die Ursache für die bekannten postoperativen, thrombembolischen Komplikationen zu sein.

Tag der mündlichen Prüfung: 06.07.2011

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Ich gebe hiermit die Erklärung ab, dass ich die Dissertation mit dem Titel:

**Untersuchung des Einflusses von Kunstherzen auf Thrombozyten
durch Bestimmung von Thrombozytenaktivität und Mikroaggregatbildung
mit Durchflußzytometrie nach Entwicklung eines Protokolls zur
Vollblutpräparation**

in der Klinik:

Deutsches Kinderherzzentrum St. Augustin

unter Anleitung von:

Priv.-Doz. Dr. Ch. Schmidt

1. selbständig angefertigt habe,
2. nur unter Benutzung der im Literaturverzeichnis angegebenen Arbeit angefertigt und sonst kein anderes gedrucktes oder ungedrucktes Material verwendet,
3. keine unerlaubte fremde Hilfe in Anspruch genommen,
4. sie weder in der gegenwärtigen noch in einer anderen Fassung einer in- oder ausländischen Fakultät als Dissertation, Semesterarbeit, Prüfungsarbeit, oder zur Erlangung eines akademischen Grades, vorgelegt habe.

Ort, Datum

Unterschrift

Inhaltsverzeichnis

1 EINLEITUNG	1	
1.1	Kunstherzen	2
1.2	Herzinsuffizienz	5
1.2.1	Definition	5
1.2.2	Einteilungsformen	5
1.2.3	Stadieneinteilung	6
1.3	Kunstherzimplantation	6
1.3.1	Indikation	6
1.3.2	Kontraindikation	7
1.3.3	Operation	8
1.3.4	Komplikationen nach Implantation	8
1.4	Entwicklung der Fragestellung	8
1.5	Durchflußzytometrie	9
1.6	Hämostase	9
1.6.1	Primäre Hämostase	10
1.6.2	Primäre Hämostase auf Biomaterialien	13
1.7	BTG und PF4	14
1.8	Wer soll untersucht werden?	15
1.9	Fragestellung	15
2 METHODIK	16	
2.1	Durchflußzytometrie	16
2.2.	Antikörper	19
2.2.1	Thrombozytenidentifikationsmarker	19
2.2.2	Thrombozytenaktivitätsmarker	19
2.3	Antikörper gegen humane Thrombozyten	20
2.4	Antikörper gegen Kälberthrombozyten	20
2.4.1	Markierungsreaktionsschritte	21
2.4.1.1	Flurescein isothiocyanate - FITC	21
2.4.1.2	R phycoerythrin - PE	23
2.5	Kontrollantikörper	25
2.6	Protokollentwicklung	27
2.7.	Protokollkontrollphase	40
2.7.1	Positive Kontrolle	40
2.7.2	Negative Kontrolle	
	Kontrolle der Mikroaggreathbestimmung	54
2.8	Struktur der Studie	58
2.9	Nötige Änderungen des Protokolls im Verlauf	59
2.10	Ergebnis der Protokollentwicklung	61
2.11	Untersuchungsparameter	65
2.11.1	Wie beantworten die Parameter die Fragestellungen?	66
2.11.2	Andere Parameter	66
2.12	Statistik	67

3	ERGEBNISSE	68
3.1	Patientencharakteristika	68
3.1.1	Gesunde Freiwillige	68
3.1.2	Herzinsuffizienzpatienten	68
3.1.3	Klappenpatienten	69
3.1.4	Kunstherzpatienten	69
3.2	Ergebnisse	70
3.2.1	Gesunde Freiwillige – Gruppe I	70
3.2.2	Herzinsuffizienzpatienten – Gruppe II	71
3.2.3	Klappenpatienten – Gruppe III	72
3.2.4	Kunstherzpatienten – Gruppe IV	78
3.2.5	Andere Parameter	83
3.3	Explorative Analyse	83
3.3.1	Zeitraum bis 72h	83
3.3.1.1	Prozent aktivierte Thrombozyten (%+)	84
3.3.1.2	Prozent aktivierte Thrombozyten positive Kontrolle (%+pC)	84
3.3.1.3	Prozent Aggregate (% agg)	85
3.3.1.4	Prozent Aggregate positive Kontrolle (%agg pC)	85
3.3.2	Zeitraum nach 72h	86
3.3.2.1	Eine Woche nach OP	86
3.3.2.2	Zwei Wochen nach OP	88
3.3.2.3	Drei Wochen nach OP	89
3.3.2.4	30 Wochen Patient	90
4	DISKUSSION	92
4.1	Allgemeines	92
4.2	Diskussion der Ergebnisse	94
4.2.1	Diskussion der Wertverläufe	95
4.2.2	Diskussion der statistischen Auswertung	102
4.3	Ergebnis der Studie	107
4.3.1	Einfluß der Herz Lungen Maschine	109
4.3.2	Klinische Relevanz von hypersensitiven Thrombozyten	111
5	ZUSAMMFASSUNG	112
6	LITERTURVERZEICHNIS	113
7	ABKÜRZUNGEN	124
8	DANKSAGUNG	125
9	LEBENS LAUF	126
10	GENEHMIGUNG DER ETHIKKOMMISSION	129

1 EINLEITUNG

Herzerkrankungen gehören zu den häufigsten Erkrankungen in der Bevölkerung. In der Bundesrepublik Deutschland wird die Anzahl an chronisch Herzkranken auf zirka 800.000 geschätzt. In den letzten 20 Jahren hat sich die Anzahl der Menschen mit schweren chronischen Pumpstörungen vervierfacht. Dies liegt in erster Linie an den Auswirkungen von Bypass-Operationen, der heute besseren Behandlung von akuten Myokardinfarkten durch Lyse und an den perkutanen transluminalen Coronarangioplastien (PTCA) [108]. Am schwersten betroffen sind Patienten, deren Herzerkrankung sich bereits im Endstadium befindet (terminale Herzinsuffizienz), d.h. bei denen allein medikamentös eine adäquate Herzpumpleistung nicht mehr sichergestellt werden kann. Als Therapiemöglichkeit steht dann oft nur noch eine Herztransplantation zur Verfügung. Bis 1999 sind weltweit zirka 50.000 Herztransplantationen durchgeführt worden [108]. Bevor es zu einer Herztransplantation kommen kann, gilt es aber eine entscheidende Hürde zu nehmen - es muß ein passendes Spenderherz gefunden werden. Dies ist in den letzten Jahrzehnten immer problematischer geworden. 1998 zum Beispiel wurden 540 Herzen in Deutschland transplantiert, es wurden aber zirka zwei- bis dreimal so viele Spenderherzen benötigt. Diese Situation hat zu langen Patientenwartelisten geführt. Die Lage ist unbefriedigend, weil durch den ständigen Mangel an Spenderorganen ein großer Teil der Transplantationskandidaten in der Wartezeit auf ein Organ verstirbt. Schon vor Jahrzehnten wurde begonnen, nach Auswegen und Lösungen zu suchen. In dieser Situation ist die Idee entstanden, künstliche Herzen, d.h. mechanische Unterstützungspumpen zu entwickeln. Das Kunstherz unterstützt die zu schwache Pumpfunktion des kranken Patientenherzens bis ein geeignetes Spenderherz gefunden werden konnte oder bis sich sein eigenes Herz soweit erholt hat, daß es eine wieder ausreichende Pumpleistung alleine leisten kann. In allen deutschen Herzzentren werden heute Herzunterstützungspumpen verwendet. Erstmals gelang die Implantation eines Kunstherzens 1963 Liotta et al. [66], als Überbrückung bis zu einer Transplantation 1969 Cooley et al. [23]. Seitdem sind viele klinische Erfahrungen gesammelt worden. Diese hat die Überlebenschancen von Patienten mit Überbrückungs Herz und späterer Transplantation annähernd angeglichen an die Überlebenschancen von Patienten mit

sofortiger Transplantation [108]. Mittlerweile werden auch Kunstherzen entwickelt, die nicht nur als Übergangslösung dienen, sondern als Komplettersatz für eine Transplantation, d.h. als Dauerlösung eingesetzt werden können.

1.1 Kunstherzen

Unter einem Kunstherz bzw. Unterstützungssystem wird ein chirurgisch implantierbares, mechanisches Pumpsystem verstanden, das die Pumpfunktion des Herzens, die Funktion eines Ventrikels, unterstützen oder auch ersetzen kann. Nicht ersetzen kann es jedoch die endokrine Funktion des Herzens.

Damit ein Kunstherz die Funktion des natürlichen Herzens ersetzen kann, sind Antriebe vorhanden, die die Arbeit des Herzmuskels leisten. Diese mechanischen Antriebe brauchen eine Energieversorgung, die dem Stoffwechsel im Myokard gleichzusetzen ist. Steuer- und Regelungselektronik sind erforderlich zum Ersatz der nervalen Regelung der Herzfunktion. Hinzu kommen Anschlußelemente, um die künstlichen Blutpumpen mit dem Gefäßsystem des Patienten verbinden zu können. Sensoren zur Überwachung der Kunstherzfunktion und Sicherstellung einer ausreichenden Herzleistung für den Stoffwechselbedarf des Kunstherzempfängers sowie eine meist über Kabel von außen für den Betrieb notwendige externe Energieversorgung sind zusätzliche Komponenten eines Systems.

An diese Systeme werden sehr hohe medizinische und sicherheitstechnische Anforderungen gestellt. Als lebenserhaltende Implantate sind die Ansprüche an die Betriebszuverlässigkeit und die Dauerfestigkeit hoch. Heute werden mindestens fünf Jahre ununterbrochener Betrieb angestrebt. Die Systeme müssen eine hohe Bioverträglichkeit aufweisen, d.h. sie sollten blutschonend arbeiten und die Blutkontaktflächen sollten das Gerinnungssystem so wenig wie möglich beeinflussen. Die Materialien müssen nicht nur mechanisch extrem hoch belastbar, sondern auch chemisch und biologisch stabil sein. Des Weiteren müssen Kunstherzen für Patienten akzeptabel sein. D.h. störende Betriebsgeräusche und Vibrationen, die vom Patienten wahrgenommen werden könnten, sollten so gering wie möglich gehalten werden. Außerdem sollten die Mobilität und die allgemeine Lebensqualität des Kunstherzempfängers möglichst uneingeschränkt bleiben. Im Idealfall sollte die

Existenz des Kunstherzens, ähnlich wie bei einem Herzschrittmacher, vom Patienten praktisch vergessen werden können.

Die zur Zeit am meist verwendeten Systeme sind die sogenannten LVAD (left ventriculare assist device). Dabei handelt es sich um Systeme, die den linken Herzventrikel unterstützen. Ein klassischer LVAD setzt am linken Ventrikel an und saugt Blut aus der Kammer in die Pumpe. Das Kunstherz pumpt dann das Blut durch eine künstliche Gefäßverbindung über die Aorta wieder zurück in den großen Kreislauf. Versorgungskabel ziehen durch die Bauchdecke zu der Kontroll- und Versorgungseinheit des Unterstützungssystems. LVAD werden überwiegend in das obere Abdomen gepflanzt. Im Allgemeinen werden sie für Tage bis Monate eingesetzt.

Zur Zeit gibt es drei Systeme, die hauptsächlich implantiert werden. Zum einen gibt es das TCI, Heartmate Unterstützungssystem. Es ist ein pneumatisch betriebenes Herz, das in den linken, oberen Quadranten des Abdomens eingebracht wird. Ein Kabel und eine Druckluftleitung durchziehen die Bauchdecke nach außen. Thoratec, Thoratec Laboratorien Inc. ist das zweite System. Es ist ebenfalls ein pneumatisch angetriebenes System. Es wird auf die Bauchwand gepflanzt (parakorporal). Novacor, Novacor Baxter Laboratorien ist ein elektrisch betriebenes System. Es wird in den linken oberen Quadranten eingebracht und ebenfalls ziehen Versorgungsleitungen durch den linken unteren Quadranten der Bauchdecke. Die drei Systeme sind Langzeitunterstützungssysteme. Sie können gegebenenfalls auch kurzzeitig verwendet werden.

Wo liegen die Unterschiede der Systeme? Das TCI, Heartmate Unterstützungsherz enthält Bioklappen. Oberflächen, die mit Blut in Kontakt kommen, sind mit kleinen Titaniumperlen bestückt. Diese Oberflächenbeschaffenheit führt zur Ausbildung einer endothelialisierten Neointima aus Fibrin und eines kollagenartigen Gewebes, die zu einer besseren Bioverträglichkeit beitragen. Deswegen verursacht das TCI Kunstherz im Vergleich zu anderen Systemen weniger thrombembolische Komplikationen. Die Patienten müssen aber trotzdem täglich Acetylsalicylsäure oder Heparin einnehmen. Das Kunstherz kann nur an die Herzspitze bzw. den linken Ventrikel angeschlossen werden. Das Blut wird dann in die Aorta gepumpt. Das TCI System kann nicht an den Vorhof angebracht, noch als Rechtsherzunterstützung verwendet werden. Das Thoratec

Kunstherz arbeitet mit mechanischen Herzklappen. Die Blutkontaktflächen sind glatt (smooth surface) verarbeitet. Patienten, die dieses Herz implantiert bekommen, müssen Heparin oder Phenprocoumon einnehmen. Das System kann an das linke Atrium oder den linken Ventrikel operiert werden. Es pumpt das Blut ebenfalls in die Aorta. Das Thoratec-Kunstherz kann auch als Rechtsherzunterstützung eingesetzt werden. Das Novacor System arbeitet mit biologischen Klappen. Die Blutsackoberflächen sind ebenfalls glatt (smooth surface) verarbeitet. Das System arbeitet mit einer außergewöhnlichen Pumptechnik. Der Blutsack wird zwischen zwei Druckplatten blutleer gequetscht. Patienten mit diesem Kunstherz müssen dauerhaft antikoaguliert werden (Heparin, Phenprocoumon, Acetylsalicylsäure). Neben den beschriebenen, gibt es noch andere Systeme, die zum Einsatz kommen. Zum Beispiel das mit der US-Raumfahrtbehörde NASA zusammen entwickelte DeBakey-Linksherzunterstützungssystem. Es ist ein klappenloses, sehr leichtes und kleines System mit einer Axialpumpe. Es ist nur so groß wie eine Zigaretenschachtel und mit etwa 100 Gramm wiegt es nur rund ein Zehntel des Gewichts herkömmlicher Systeme. Die Axialpumpe erzeugt einen kontinuierlichen Blutfluß. Der Patient hat keinen meßbaren Puls mehr, und das System arbeitet aufgrund der Pumptechnik und nicht vorhandener mechanischer Klappen außergewöhnlich lautlos. Außerdem wird fieberhaft an neuen Systemen gearbeitet. Im Hershey Medical Center ist in der Abteilung für künstliche Organe das System Lionheart, Arrow International, entwickelt worden. Das Besondere und weltweit Einmalige an diesem System ist, daß es ohne jegliches Versorgungskabel nach außen auskommt. Das System ist voll implantierbar. Kontroll- und Steuereinheiten sind im Körper des Patienten. Die Energieversorgung und Steuermöglichkeiten werden über Induktionstechnik gewährleistet. Es ist eine Spule entwickelt worden, die auf den Rippen, aber unter die Haut des Patienten operiert wird und über die Energie übertragen, Kontrollbefehle übermittelt und Betriebsdaten erhalten werden können. Nach Implantation des Lionheart Systems hat der Patient keine erhöhte Infektionsgefahr aufgrund der den Körper von außen versorgende Kabel. Es ist aber sehr voluminös, so daß es weder für Kinder noch für schlanke Erwachsene in Frage kommt. Die Aufwendungen, um implantierbare, künstliche Herzen bzw. Herzunterstützungssysteme zu entwickeln, liegen bei weitem über allen Voraussagen,

die zu Beginn der Kunstherzforschung gemacht wurden. Zu Anfang ist von 10 bis 15 Jahren Entwicklungszeit ausgegangen worden. Bis heute sind zirka 40 Jahre vergangen und das Endziel, das auf Dauer implantierbare künstliche Herz, ist noch nicht absehbar.

1.2 Herzinsuffizienz

Kunstherzen kommen zum Einsatz bei Patienten, die an einer terminalen Herzinsuffizienz leiden (NYHA IV), andere therapeutische Möglichkeiten, wie zum Beispiel intraaortale Ballonpumpen (IABP) nicht erfolgversprechend oder kontraindiziert sind, und für die nicht rechtzeitig ein passendes Spenderherz gefunden werden kann.

1.2.1 Definition

Eine Herzinsuffizienz ist eine gestörte Herzfunktion, unter der das Herz eine den Stoffwechselbedürfnissen der Körpergewebe entsprechende Pumpfunktion nicht oder nur unter erhöhtem Füllungsdruck erbringen kann.

1.2.2 Einteilungsformen

Es gibt zwei klassische Insuffizienzformen: die akute und die chronische Form. Die akute Herzinsuffizienz entsteht am häufigsten nach einem Herzinfarkt (akute Linksherzinsuffizienz) oder nach akuter Lungenembolie (akute Rechtsherzinsuffizienz). Die chronische Form kann sehr unterschiedliche Ursachen haben. Allgemein steht meistens eine erhöhte Druckbelastung des Herzens im Mittelpunkt. Ursachen sind zum Beispiel arterielle Hypertonie, Klappenfehler.

Die Insuffizienz kann nur die linke oder nur die rechte Herzhälfte betreffen. Wenn beide Hälften betroffen sind, wird von einer Globalinsuffizienz gesprochen.

Die Herzinsuffizienz kann zu einem Rückwärts- oder Vorwärtsversagen führen. Beim Rückwärtsversagen (Backward-failure) ist die diastolische Füllung des Herzens beeinträchtigt, zum Beispiel durch eine Ventrikelwandversteifung. D.h. es ist dem Herzen nur noch unter erhöhtem Füllungsdruck in der Diastole möglich, ein normales Herzzeitvolumen zu pumpen. Ist es zum Vorwärtsversagen (Low-output-failure) gekommen, so ist der systolische Auswurf verringert und das Herz erbringt nicht mehr die für den Körper nötigen Blutmengen. Es gibt auch noch eine Insuffizienzform bei Hyperzirkulation (High-output-failure) bei Hyperthyreose oder Anämie.

1.2.3 Stadieneinteilung

Die Herzinsuffizienz wird nach den Richtlinien der New York Heart Association (NYHA) eingeteilt. Es werden vier Gruppen unterschieden:

- I keine Beschwerden unter normaler Belastung,
- II keine Beschwerden in Ruhe und bei leichter Belastung, aber bei normaler Belastung,
- III keine Beschwerden in Ruhe, aber bei leichter Belastung,
- IV Beschwerden in Ruhe, verstärkt bei leichter Belastung.

1.3 Kunstherzimplantation

1.3.1 Indikation

Liegt ein Linksherzversagen vor, so kann vor der Implantation eines Kunstherzens noch die Indikation für eine intraaortale Ballonpumpe (IABP) festgestellt werden. IABP werden eingesetzt bei kardialem Versagen nach Myokardinfarkt oder nach Herzoperation, allgemein bei schlechter Pumpfunktion. Klare Kontraindikationen sind aber eine Aortenklappeninsuffizienz, eine Aortendissektion oder ein thorakales Aneurysma. Ist medikamentös keine ausreichende Pumpfunktion des Herzens zu gewährleisten (NYHA IV, terminale Insuffizienz), eine IABP bei einem Linksherzversagen kontraindiziert oder liegt ein Rechtsherzversagen vor, wird die Indikation für ein Kunstherz geprüft. Eine Indikation ist unter anderem durch hämodynamische Grenzwerte festgelegt worden. Grenzwerte sind [108]:

- Herzindex $< 2,0 \text{ l/min/m}^2$,
- Arterieller Mitteldruck $< 60\text{-}70 \text{ mmHg}$,
- Pulmonaler Verschußdruck $> 20 \text{ mmHg}$,
- Urinausscheidung $< 20 \text{ ml/h}$.

Diese Grenzwerte sind aber nicht allein entscheidend. Ein weiterer wichtiger Entscheidungsparameter ist der Verwendungszweck der mit der Implantation verfolgt wird. Die Hauptfrage ist: Soll ein Kurzzeit- oder Langzeitunterstützungssystem implantiert werden?

Im Allgemeinen gibt es vier Verwendungszwecke [108]:

- Überbrückung bis zur Erholung des eigenen Herzens,
- Überbrückung bis zu einer Transplantation,
- Überbrückung bis zur Implantation eines Langzeitunterstützungssystems,
- Implantation eines Langzeitunterstützungssystems.

Das Grundleiden stellt ebenfalls ein Entscheidungsparameter dar. Bestimmte Krankheiten sind heute als Implantationsindikation allgemein akzeptiert [108]:

- dilatative Kardiomyopathie,
- ischämische Kardiomyopathie,
- nicht anders therapierbares Vitium,
- akuter Myokardinfarkt,
- akute Myokarditis,
- Postkardiotomieversagen,
- akutes Transplantatversagen.

Bevor es aber letztendlich zu einer Implantation eines Unterstützungssystems kommen kann, müssen ebenfalls die Kontraindikationen erörtert werden.

1.3.2 Kontraindikation

Leidet der Patient akut unter einer systemischen Infektion, kann es nicht zu einer Implantation eines Fremdkörpers kommen. Eine weitere Kontraindikation ist eine schwere Gerinnungsstörung. Gerinnungsstörungen machen einen chirurgischen Eingriff unmöglich. Wenn eine Vollantikoagulation nicht durchführbar ist, kann keine Implantation vorgenommen werden, weil diese für die Implantation eines Systems notwendig ist. Eine Kontraindikation kann sich aber auch aus der Gesamtsituation ergeben. Wenn bei einem Patienten zum Beispiel nichts gegen eine Implantation eines Kurzzeitüberbrückungssystems spricht, der Patient aber nicht für die spätere Transplantation zugelassen werden kann, macht die Implantation eines Kurzzeitüberbrückungsherzens keinen Sinn.

1.3.3 Operation

Die Operation implantierbarer Unterstützungsherzen erfolgt unter Verwendung der extrakorporalen Zirkulation (Herz-Lungen-Maschine) unter Vollantikoagulation mit Heparin am schlagenden Herzen.

1.3.4 Komplikationen nach Implantation

Blutungen sind eine häufige Komplikation besonders in den ersten Stunden nach einer Kunstherzimplantation [30, 36, 47, 61, 123]. Früh postoperative Blutungen rühren meist von der Vollheparinisierung und dem großen Wundgebiet her [108]. In ungünstigen Fällen können unbeherrschbare Blutungen auftreten.

Ein Kunstherzsystem ist ein großer Fremdkörper und begünstigt die Entstehung von akuten und chronischen Infektionen. Deshalb sind Infektionen häufige Komplikationen nach Implantation eines Unterstützungssystems [27, 30, 31, 40, 58, 91]. Jeder dritte Patient erleidet eine Besiedlung seines Systems. Im allgemeinen lassen sich diese aber mit Antibiotika beherrschen. Aber auch die Austrittsstelle der Kabel aus der Haut birgt ein hohes Risiko für Infektionen. Infektionen begünstigen die Pathogenese von Thrombembolien [22, 117].

Thrombembolien sind in der Regel einige Tage nach der Operation häufige und ernsthafte Komplikationen [36, 40, 41, 47, 61, 62, 65, 77, 91 u.a.]. Sie können im kranken Patientenherz und besonders im Unterstützungssystem entstehen. Klinisch erscheinen solche Komplikationen als zerebrale oder systemische Symptome. Am häufigsten sind zerebrale Symptome in Form von Hemiplegien. Systemische Embolien können in den Extremitäten, besonders in den Beinarterien zu Durchblutungsstörungen führen. Sehr häufig kommt es auch zu asymptomatischen Embolien der inneren Organe (Leber, Milz, Niere) [108].

1.4 Entwicklung der Fragestellung

Bis heute ist nicht ganz verstanden und geklärt, wie die Hämostase auf die Operation und den implantierten Fremdkörper reagiert. Da in den ersten Tagen und Wochen nach der Operation das Überleben der Patienten häufig von der Gerinnungslage und -reaktion abhängt, kommt der Hämostase eine besondere Bedeutung in der postoperativen Phase zu. Ein Problem der Unterstützungssysteme in Bezug auf die Hämostase ist die

künstliche Oberfläche, die das Kunstherz im Organismus darstellt und so Einfluß auf die Blutgerinnung nimmt [4, 10, 17, 26, 75, 76, 97 u.a.]. Da die Hämostase der limitierende Faktor in der frühen postoperativen Phase durch Blutungen und in der späteren postoperativen Phase durch Thrombembolien, ist, wurden mit dieser Studie Veränderungen von hämostatischen Parametern während und nach einer Kunstherzimplantation näher untersucht. Es wurden Thrombozyten näher untersucht, da sie 1. die primäre Hämostase darstellen und sie 2. maßgeblich verantwortlich für postoperative Blutungen und thrombembolische Komplikationen sind.

Den letzten Ausschlag für diese Studie gab eine unveröffentlichte Literaturstudie der Abteilung für künstliche Organe des Hershey Medical Centers [106]. Die Studie beschäftigt sich mit Veröffentlichungen im Bereich Hämostaseologie in Bezug auf Kunstherzen. Es wurde aufgezeigt, welche Teilbereiche der Hämostase bereits mit welchen Methoden untersucht worden waren [5, 7, 52, 110, u.a.]. Nach dieser Studie ist Durchflußzytometrie noch nicht verwendet worden, um Thrombozyten und deren Reaktion nach Kunstherzimplantation zu untersuchen.

1.5 Durchflußzytometrie

Durchflußzytometrie ist eine Methodik, die auf Lasertechnologie basiert. Sie bietet die Möglichkeit in einem vielfältigen Zellgemisch die Untersuchung nur auf eine bestimmte, gewünschte Zellart zu beschränken. D.h., es ist möglich Vollblutproben zu verwenden und die Untersuchung nur auf Thrombozyten zu konzentrieren. Separations- oder Waschungsschritte müssen nicht durchgeführt werden, um Thrombozyten aus dem Patientenblut zu isolieren. Die Thrombozyten werden bei dieser Untersuchungsmethode weniger beeinflusst und gleichzeitig macht es die Präparation einfacher. Die Durchflußzytometrie ist eine allgemein aber auch im Bereich von Untersuchungen an Thrombozyten sehr anerkannte Methodik [1, 34, 48, 56, 59, 79, 84, 85, u.a.].

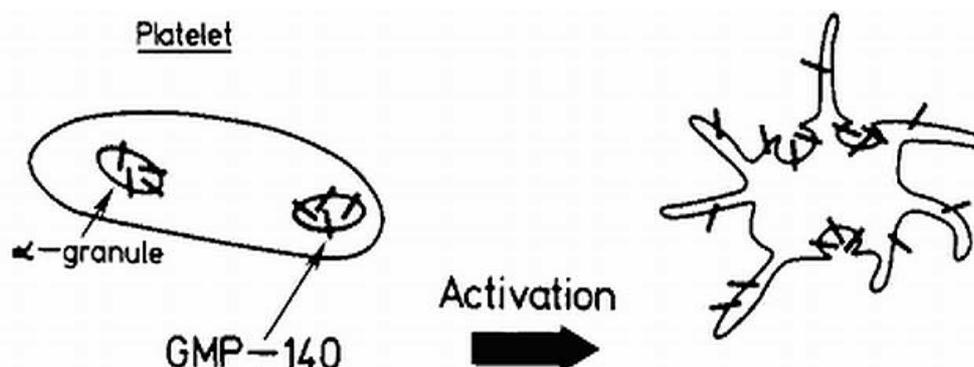
1.6 Hämostase

Die Blutgerinnung hat die Aufgabe, den Körper vor größeren Blutverlusten zu schützen. Sie ist ein komplexes Zusammenwirken von Endothel, Thrombozyten, Koagulationskaskade und fibrinolytischem System [21, 71, 74, 88, 90, 94, 114]. Eine zentrale Rolle in diesem Geschehen kommt den Thrombozyten zu.

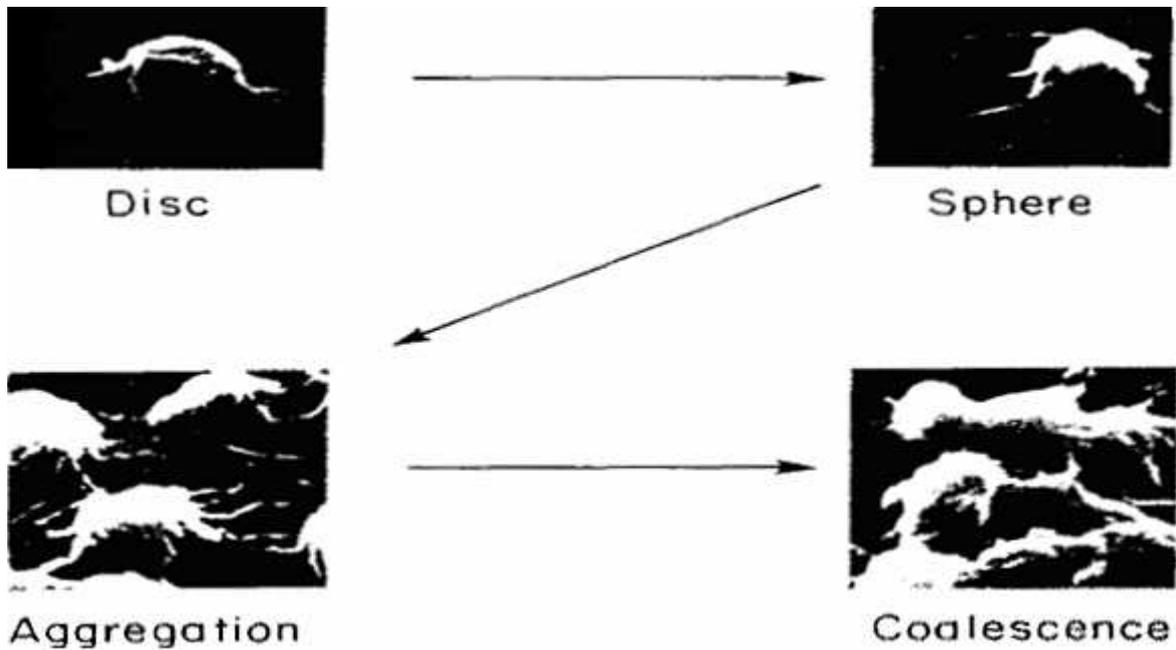
1.6.1 Primäre Hämostase

Die primäre Hämostase (Blutstillung) hat die Aufgabe, ein Wundgebiet zu verschließen, um damit einen größeren Blutverlust vorläufig zu stoppen. Außerdem aktiviert sie die nachfolgende Gerinnungskaskade (sekundäre Hämostase) und bildet so ein wichtiges Verbindungsglied zwischen primärer und sekundärer Hämostase. Thrombozyten stellen ebenfalls ein Verbindungsglied zum Immunsystem dar [22, 117]. Thrombozyten verbinden sich nach Aktivierung mit Leukozyten, besonders mit Monozyten und neutrophilen Granulozyten [18, 43, 53, 103, 105].

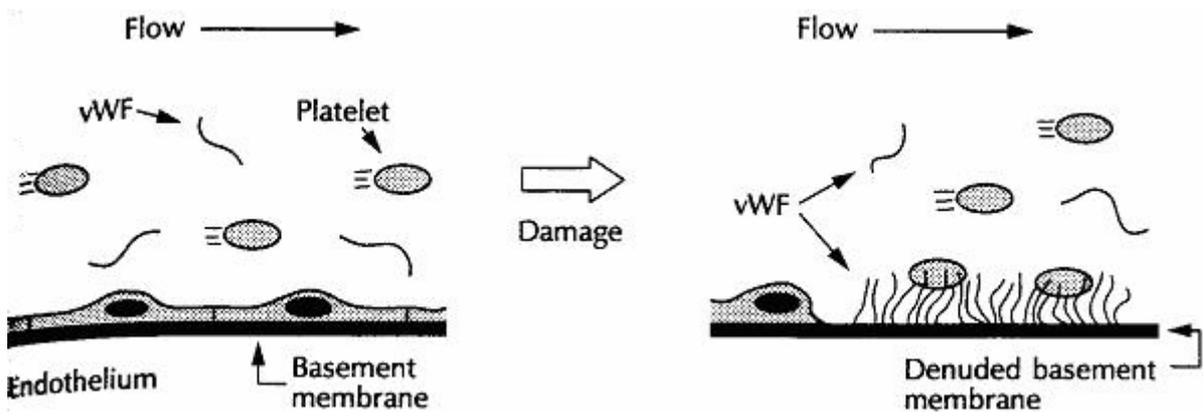
Die primäre Hämostase wird durch die kernlosen Thrombozyten (Blutplättchen) gestellt. Thrombozyten sind die kleinsten zellulären Elemente des Blutes. Sie sind kleine Bruchstücke der polyploiden Megakaryozyten, die sich im Knochenmark befinden. Ein gesunder Mensch hat zirka 200.000 Thrombozyten pro Mycroliter Blut. Thrombozyten sind unter Normbedingungen nicht aktiviert. In diesem Zustand aggregieren Thrombozyten nicht untereinander und haften auch nicht am Endothel, auch wenn sie mit diesem in Berührung kommen [26, 72, 73]. Kommt es aber zu einem Defekt am Gefäßsystem, traumatisch oder entzündlich bedingt, mit Freilegung der Basalmembran oder zu einem operativen Eingriff, werden Thrombozyten aktiviert. Aktivierte Thrombozyten adhärieren an die Basalmembran, setzen ihre Vesikelinhalte (dense, alpha) ins Blutplasma frei und formen Aggregate. Die Vesikelfreisetzung geht immer mit einer Zellverformung einher. Thrombozyten sind im unaktivierten Zustand Diskozyten und werden dann durch die Aktivierung zu Echinosphärozyten mit Pseudopodien.



All dies führt zur Bildung eines Thrombozytenpfropfens, der die Verletzungsstelle bzw. Operationswunde abdichtet.



Nachdem es zum Beispiel zu einer Gefäßverletzung gekommen ist, binden vor allem die Plasmaproteine von Willebrand Faktor (vWF) und Fibrinogen an freigelegtes, subendotheliales Kollagen (Typ IV) der Basalmembran. An subendotheliales Kollagen gebundener vWF ist eine wichtige Bindungsstelle für unaktivierte Thrombozyten.



Liegt zum Beispiel ein Mangel an vWF vor, so besteht die hämorrhagische Diathese von-Willebrand-Jürgens-Syndrom. Thrombozyten binden im unaktivierten Zustand mit dem Rezeptor GP Ib an den an subendotheliales Kollagen haftenden vWF. Hierbei handelt es sich um eine reversible Bindung. Die Bindung führt zur Aktivierung der Thrombozyten und des GP IIb/IIIa Komplexes.

Immobilisiertes Fibrinogen ist ebenfalls ein Adhäsionspunkt für unaktivierte Thrombozyten. Der unaktivierte Proteinkomplex GP IIb/IIIa bindet nur an immobilisierte Fibrinogen oder Fibrin und führt erstens zu einer irreversiblen Adhäsion und zweitens zur Aktivierung des Plättchens. Aktivierte Plättchen sind in der Lage Aggregate zu bilden. Im aktivierten Zustand, zum Beispiel durch vorherige Aktivierung des GP Ib Rezeptors, bindet der Komplex GP IIb/IIIa an eine Menge sowohl lösliche als auch bereits immobilisierte Adhäsionsproteine wie zum Beispiel vWF, Fibronectin, Vitronectin, Thrombospondin. Die Aktivierung des GP IIb/IIIa Komplexes ist unerlässlich für die Ausbildung von irreversiblen, soliden Bindungen, die dem Thrombus die nötige Stabilität verleihen, um die Verletzung zu verschließen. Die irreversible Bindung von GP IIb/IIIa ist um so wichtiger, da die Bindung des GP Ib Rezeptors an den vWF keine irreversible Bindung ist. Neben der Bindungsrate gibt es hier auch eine hohe Dissoziationsrate. Die Aktivierung des GP IIb/IIIa Komplexes ist auch von entscheidender Bedeutung, damit Thrombozytenaggregate entstehen können. Die Aggregation von Thrombozyten untereinander wird durch den Rezeptor GP IIb/IIIa hervorgerufen. Liegt zum Beispiel durch Mutation eine Verringerung der GP IIb/IIIa Komplexe vor oder fehlen sie sogar gänzlich, liegt die angeborene Thrombozytopathie Glanzmann-Naegeli-Syndrom vor. Damit Thrombozyten miteinander aggregieren können, bzw. damit eine Verbindung zwischen zwei GP IIb/IIIa Rezeptoren unterschiedlicher Thrombozyten zustande kommt, wird ausreichend Calcium und das lösliche Plasmaprotein Fibrinogen als Verbindungsglied benötigt. Die Bindung von löslichem Fibrinogen an funktionstüchtige GP IIb/IIIa Komplexe ist essentiell, damit Aggregate gebildet werden können. D.h., eine Aktivierung der Thrombozyten versetzt den GP IIb/IIIa Komplex erst in die Lage, lösliches Fibrinogen zu binden und so Thrombozytenaggregate zu bilden [12, 13, 67, 70, 71, 88, 94]. Durch die Adhäsion an Proteine werden Thrombozyten aktiviert und es kommt dadurch

zur Plättchenvesikelausschüttung. Durch die Exozytose geben die dichte Granula ADP, ATP, Ca u.a. die alpha Granula Fibrinogen, PF4, BTG u.a. ins Plasma ab. Gleichzeitig kommt es zu einer Erhöhung von unterschiedlichen Thrombozytenoberflächenproteinen wie zum Beispiel von GP 62p durch Verschmelzung der Vesikelmembran, auf der sich ebenfalls derartige Rezeptoren befinden mit der Thrombozytenzellmembran. Die ausgeschütteten Stoffe bewirken, daß im Blut zirkulierende, unaktivierte Thrombozyten im näheren Verletzungsgebiet ebenfalls aktiviert werden. Die neu aktivierten und mit mehr Oberflächenrezeptoren versehenen Thrombozyten adhären daraufhin an die bereits an das Wundgebiet gebundenen Thrombozyten. Außerdem formen nach der Vesikelfreisetzung im Plasma treibende aktivierte Thrombozyten untereinander Aggregate und adhären ebenfalls. Durch die Vesikelfreisetzung kommt es auch zu Vasokonstriktion im verletzten Bereich. Die im Blut aktivierten und dann neu adhärenen Thrombozyten tragen zur Klumpenbildung bei und die gleichzeitig ausgelöste Vasokonstriktion verkleinert das zu verschließende Verletzungsgebiet [21, 88, 90].

Plättchenadhäsion, Plättchenaktivierung, Vesikelausschüttung, Aggregatbildung und die Vasokonstriktion haben das gemeinsame Ziel, einen vorübergehenden Blutklumpen (weißer Abscheidungsthrombus) zu formen, damit es zum vorläufigen Blutungsstop kommt. Ein endgültiger, stabiler Thrombozytenpfropfen (roter Abscheidungsthrombus) bildet sich aus, nachdem die Blutgerinnungskaskade abgelaufen ist.

1.6.2 Primäre Hämostase auf Biomaterialien

Biomaterialien (künstliche Oberflächen) haben im Gegensatz zur natürlichen Oberfläche des Endothels Einfluß auf das Blut bzw. die Hämostase [2, 3, 17, 32, 35, 54, 120 u.a.]. Kommt Blut mit einer nicht körpereigenen Oberfläche in Kontakt, führt das immer zu Thrombozytenadhäsion, Aktivierung und Aggregation [4, 7, 75, 76, 97, 106 u.a.]. Körpereigene Oberflächen (Endothel) aktivieren Thrombozyten nicht. Endothel ist blutkompatibel [26, 72, 73, 121]. Intakte Endothelzellen bieten Schutz vor Adhäsionen von Thrombozyten. Der Schutz geht so weit, daß bereits gebildete Thromben abgestoßen werden, unter anderem weil das Endothel wie auch die Thrombozyten negativ geladen sind [72, 73, 121]. Nachdem Blut mit nicht körpereigenen Oberflächen in Kontakt gekommen ist, lagern sich Plasmaproteine auf der Oberfläche ab, die

Bindungsstellen für Thrombozyten sind [37]. Die Proteinzusammensetzung auf der künstlichen Oberfläche hat einen Einfluß auf die Adhäsion von Thrombozyten [10, 68]. Eine vermehrte Ablagerung von Fibrinogen oder Gamma-Globulinen unterstützt die Thrombozytenadhäsion, wohingegen die Adsorption von Albumin eher hemmend auf Thrombozytenadhäsion wirkt [2, 3, 50, 60, 69, 93, 107, 128, 130]. Die Adhäsionstendenz der unterschiedlichen Plasmaproteine ist materialabhängig.

Um Biomaterialien verträglicher einsetzen zu können, werden auf der einen Seite Anstrengungen unternommen, die Mechanismen der Hämostase besser zu verstehen, um so effektiver und genauer die Gerinnung bei Patienten mit Kunstherzen kontrollieren bzw. medikamentös steuern zu können, zum Beispiel durch Thrombozytenaggregationshemmer bzw. GP IIb/IIIa Antagonisten wie zum Beispiel Clopidogrel. Auf der anderen Seite wird nach Materialien geforscht, die das Gerinnungssystem weniger oder im Idealfall wie Endothel gar nicht aktivieren (blutkompatible Biomaterialien).

1.7 BTG und PF4

Neben Untersuchungen der Durchflußzytometrie stand außerdem noch die Bestimmung der Aktivitätsmarker β -Thromboglobulin (BTG) und Plättchenfaktor 4 (PF4) zur Diskussion. BTG und PF4 sind Proteine, die in den Alpha Granula gespeichert sind und nach der Aktivierung eines Plättchens durch die Vesikelfreisetzung ins Blutplasma ausgeschüttet werden. D.h., die Präsenz der Proteine im Blutplasma ist ein Marker für aktivierte Thrombozyten [7]. Es erschien hilfreich, neben der Durchflußzytometrieuntersuchung ebenfalls BTG und PF4 zu bestimmen. Sie sollten als Validierungsmöglichkeit bestimmt werden, um so später zusätzliche Ergebnisse neben den Durchflußzytometriedaten bei der Gesamtanalyse vorliegen zu haben. Nach Rücksprache mit dem Hämatologen Herr Dr. med. Al-Mondhiry des Hershey Medical Centers ist aber von der Bestimmung abgesehen worden. Die Durchflußzytometrie sei heute die Standardmethodik in diesem Bereich, die Bestimmung von BTG und PF4 sei Geld- und Zeitverschwendung. Außerdem gibt es Hinweise in der Literatur, daß die Marker unzuverlässig und auch widersprüchliche Ergebnisse erbracht haben [39, 86], obwohl sie früher gerne zur Aktivitätsbestimmung von Thrombozyten verwendet

wurden. Daraufhin sollten Thrombozyten während und nach Kunstherzimplantation nur mit Durchflußzytometrie untersucht werden.

1.8 Wer soll untersucht werden?

Untersucht werden sollten Patienten und Kälber. Die Systeme TCI und Thoratec sollten an Patienten untersucht werden. Ein in der tierexperimentellen Erprobungsphase befindliches total artificial heart (TAH) sollte an Kälbern untersucht werden.

1.9 Fragestellung

Wie bereits erwähnt, neigen Patienten nach Kunstherzimplantation oft erst zu Blutungen [30, 47, 61, 123 u.a.] und später zu thrombembolischen Komplikationen [6, 27, 28, 30, 36, 40, 41, u.a.]. Daß in den letzten Jahren mit der Einführung der Thrombozytenaggregationshemmer (Clopidogrel) deutliche Fortschritte bezüglich thrombembolischer Ereignisse in der postoperativen Phase erzielt werden konnten und dadurch eine Prognoseverbesserung erreicht wurde [108], macht nochmals deutlich, welche zentrale Rolle der primären Hämostase in der postoperativen Phase zukommt. In dieser Studie wurde mit Durchflußzytometrie der Einfluß von Kunstherzen auf Thrombozyten untersucht. Dafür galt es die folgenden zwei Fragen zu beantworten:

Werden Thrombozyten durch eine Kunstherzpräsenz aktiviert?

Kommt es daraufhin zu Mikro-/Aggregatbildung?

2 METHODIK

Die Untersuchung der Thrombozyten ist mit einem Durchflußzytometer durchgeführt worden.

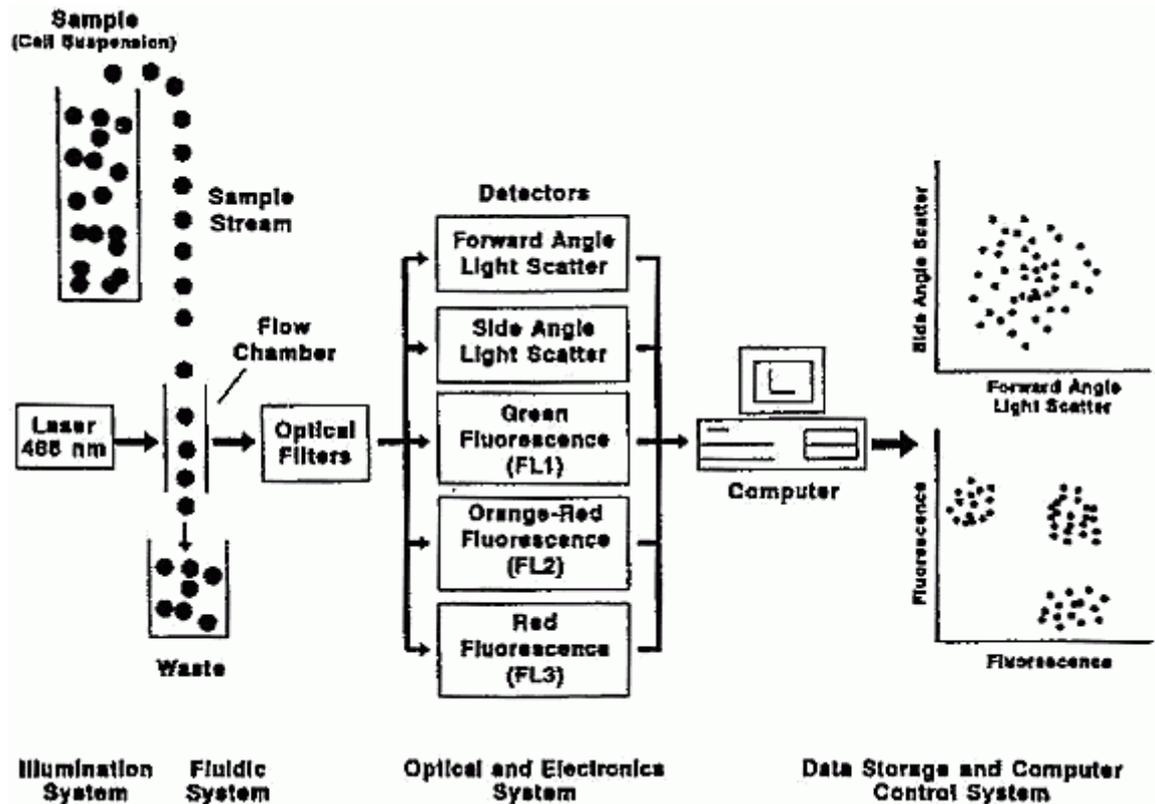
2.1 Durchflußzytometrie

Das Herz eines Durchflußzytometers ist ein Laser. Das grundlegende Prinzip der Untersuchungsmethodik besteht darin, daß ein zu untersuchendes Partikel in das Laserlicht gebracht wird und das Partikel eine Lichtantwort zurücksendet. Die Lichtantwort wird dann in verwertbare Informationen umgearbeitet. Durch das Laserlicht kann es zu zwei unterschiedlichen Lichtantworten kommen. Erstens wird das Partikel Licht reflektieren, d.h. je nachdem wie es geformt ist, wird es zu spezifischen Lichtreflexen kommen. Das Durchflußzytometer kann anhand des Lichtreflexes die Partikelmorphologie rechnerisch konstruieren. Zweitens können mit Hilfe von immunologischen Antikörpertechniken gleichzeitig sehr genaue zusätzliche Untersuchungen durchgeführt werden. D.h. vor der Untersuchung können Partikel bzw. bekannte Rezeptoren oder Strukturen mit ausgewählten Antikörpern markiert werden. Die Antikörper müssen vor der Verwendung mit fluoreszierenden Markern (z.B. FITC-Fluorescein isothiocyanate oder PE-phycoerythrin) konjugiert werden. Passieren diese fluoreszierenden Marker das Laserlicht, wird eine bestimmte, je nach Marker spezifische Lichtantwort hervorgerufen. Anhand der durch den Laser hervorgerufen spezifischen Lichtantwort der fluoreszierenden Marker kann das Durchflußzytometer die Antikörper erkennen und registrieren. Mit Hilfe der Antikörpermarkierungstechnik können Informationen zum Beispiel über den Zelltyp, -zustand, -bestandteile, u.a. gewonnen werden.

Der Lichtreflex und die Fluoreszenzantworten finden zur selben Zeit statt und die Maschine benötigt für die gesamte Untersuchung eines Partikels nur einen Bruchteil einer Sekunde. D.h. in kürzester Zeit kann eine riesige Menge an Partikeln einzeln untersucht, und gleichzeitig vielfältige Informationen von jedem gewonnen werden. Man kann das Durchflußzytometer auch als automatisiertes Fluoreszenz-Mikroskop bezeichnen [84, 100].

Ein Durchflußzytometer besteht aus vier Teilsystemen:

1. Fluß-System,
2. Laserlicht-System,
3. Optisch-Elektronisches-System,
4. Computer-Datenspeicherungs-System.



Das Fluß-System transportiert die Partikel der Probe durch die Maschine bzw. am Laser vorbei. Im Laserlicht-System kommt es zur Untersuchung der Partikel, indem das Partikel dem Laserstrahl ausgesetzt und die Licht und Fluoreszenzantwort hervorgerufen werden. Das Optisch-Elektronische-System nimmt die Licht- und Fluoreszenzantworten durch ein Spiegelsystem auf, Lichtdetektoren wandeln das aufgenommene Licht in elektrische Signale um und ein Analog-Digital-Wandler rechnet die elektrischen Signale in digitale Daten um. Im Computer-Datenspeicherungs-System werden die rohen, digitalen Daten gespeichert und auf Wunsch zu nützlichen Daten und Grafiken umgerechnet [84, 100]. Einige Durchflußzytometer haben noch ein zusätzliches Separations-System. D.h. mit Hilfe des Durchflußzytometers können dann nicht nur

unterschiedliche Zellen erkannt werden, sondern direkt im Anschluss auch separiert werden. Aus einem vielfältigen Zellgemisch können bestimmte, gewünschte Zellarten heraussortiert und gesammelt werden.

Diese Studie ist mit einem Becton Dickinson FACScan Durchflußzytometer durchgeführt und die gewonnenen Daten mit der Analysesoftware Cell Quest V 3.1 analysiert worden. Dieses Gerät besitzt kein Separations-System.

Zur Beantwortung der zwei Fragestellungen, werden Thrombozyten durch eine Kunstherzpräsenz aktiviert und kommt es daraufhin zu Mikroaggregatbildung mußten beide Wege der Informationsgewinnung, Lichtreflex und fluoreszierende Antikörper verwendet werden. Markierte Antikörper wurden benötigt, um Thrombozyten eindeutig in der Zellvielfalt des Vollblutes für das Durchflußzytometer erkennbar zu machen. D.h. es wurde ein Rezeptor gesucht, der ausschließlich auf Thrombozyten vorkommt und so eine eindeutige Identifizierung möglich machte. Ein weiterer Antikörper sollte klären, ob der Thrombozyt aktiviert war oder nicht. Es wurde ein Rezeptor benötigt, der nur auf aktivierten Thrombozyten vorhanden ist und so durch seine Präsenz den aktivierten Zustand eines Thrombozyten erkennbar macht. Zur Bestimmung der Mikroaggregate wurde die Kombination aus Thrombozytenidentifizierung und Lichtreflex bzw. Vorwärtslichtzerstreuung (forward scatter) ausgenutzt. Wenn Thrombozyten verklumpen, sind sie weiterhin positiv für den Thrombozytenidentifikationsmarker. Sie reflektieren aber aufgrund ihrer zusammen größeren Ausmaße mehr Licht in der Vorwärtslichtzerstreuung. D.h. aggregierte Thrombozyten bzw. Mikroaggregate sind solche Zellen, die positiv für den Thrombozytenidentifikationsantikörper sind und eine größere Vorwärtslichtzerstreuung als einzelne Thrombozyten besitzen [11, 16, 65, 79, 98].

2.2 Antikörper

2.2.1 Thrombozytenidentifikationsmarker

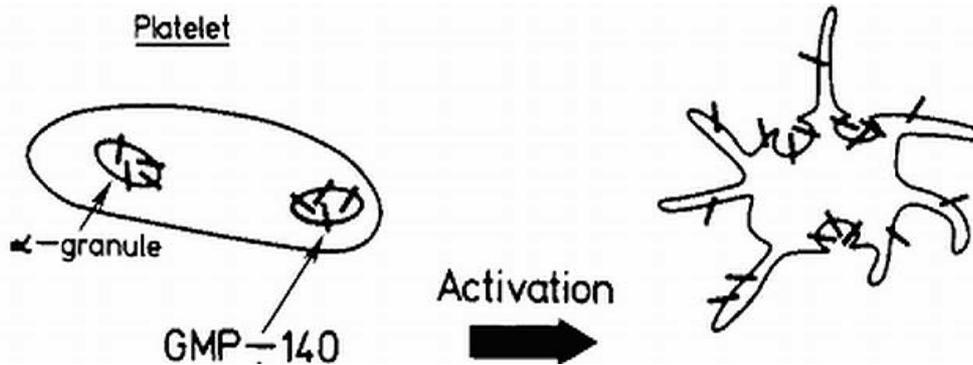
Bei der Frage der eindeutigen Thrombozytenidentifizierung wurde nach einem Antikörper gesucht, der an einen sehr häufig und ausschließlich auf Thrombozyten vorkommenden Rezeptor bindet. Je mehr Rezeptoren auf der Zelloberfläche vorhanden sind, desto mehr Antikörper binden pro Thrombozyt, d.h. desto heller die Lichtantwort bzw. deutlicher wird der Thrombozyt durch das Durchflußzytometer erkannt. GP IIb/IIIa kommt nur auf Thrombozyten vor und ist der häufigste Rezeptor auf der Oberfläche mit einer Häufigkeit von ca. 30. - 80.000 pro Thrombozyt. Er besteht aus zwei Untereinheiten GP IIb und IIIa und zusammen bilden sie den Rezeptor für Fibrinogen [25, 81, 94, u.a.]. Nach Aktivierung und ausreichend Kalzium ändert dieser seine Konformation. Erstmals wurde dieser Rezeptor 1979 von Marguerie et al. beschrieben [71].

Für Kälberthrombozyten gab es einen Antikörper für GP IIb/IIIa (CD41/61). Es mußte aber sichergestellt sein, daß der Antikörper immer, an aktivierte und unaktivierte Rezeptoren bindet, damit alle Thrombozyten immer eindeutig bestimmt werden konnten. Für das Menschenblut kamen als Rezeptoren letztendlich CD 41 (GPIIb) oder CD 61 (GPIIIa) in Frage, weil nur für Untereinheiten spezielle Antikörper erhältlich waren. D.h. die Antikörper banden unabhängig vom Konformationszustand des gesamten Rezeptors, weil die Antikörper rezeptoruntereinheitenspezifisch waren.

2.2.2 Thrombozytenaktivitätsmarker

Für die Aktivitätsbestimmung gab es mehrere Rezeptoren zur Auswahl (CD 62P = P-selectin = GMP-140 = PADGEM = LECAM-3; CD 63; CD 107 a / b = LAMP 1 / 2). Es wurde der Aktivitätsrezeptor P-selectin (CD62p) verwendet, weil dieser Rezeptor von unterschiedlichen Firmen (Beckman Coulter, Becton Dickinson, u.a.) empfohlen wurde und in anderen Studien bereits erfolgreich eingesetzt worden war [56, 63, 64, 77, 82, u.a.]. CD62p ist auf unaktivierten Thrombozyten kaum vorhanden (ca. 200 – 400 mal). Der Rezeptor befindet sich bei unaktivierten Thrombozyten hauptsächlich in Vesikeln, die sich im Zellplasma befinden. Wird der Thrombozyt aktiviert, so verbinden sich die Vesikel mit der Zelloberfläche (Exozytose).

Je mehr Vesikel mit der Zelloberfläche verbunden sind, desto mehr CD 62p Rezeptoren (= GMP-140) sind dann auf der Oberfläche vorhanden.



Auf stark aktivierten Thrombozyten befinden sich ca. 4000 - 8000 Rezeptoren [21, 88, 119]. Erstmals wurde CD62p 1984 von McEver et al. beschrieben [82]. Dieses Phänomen läßt sich für den Zweck der Aktivierungsbestimmung ausnutzen. Je stärker der Thrombozyt aktiviert ist, desto mehr Vesikel werden sich mit der Oberfläche verbinden, d.h. desto mehr Rezeptoren werden auf der Oberfläche vorhanden sein. Es werden mehr Antikörper an den Thrombozyten binden und desto heller wird die Lichtantwort im Durchflußzytometer.

2.3 Antikörper gegen humane Thrombozyten

Die Antikörper für humane Thrombozyten wurden nach Versuchen mit unterschiedlichen Antikörperklonen von unterschiedlichen Herstellern letztendlich von Becton Dickinson (www.bd.com) gekauft. Die Studie ist mit dem Anti-CD61-FITC (IgG, Cat. No. 348093) und Anti-CD62p-PE Antikörper (IgG, Cat.No.348107) durchgeführt worden.

2.4 Antikörper gegen Kälberthrombozyten

Der Anti-CD62p Antikörper für das Kälberblut wurde von Zymed (www.zymed.com) (IgG, Cat. No. 13-7500) und Anti-CD41/61 (IgG, Cat. No. CAPP2A) von VMRD (www.vmr.com) bestellt. Die Antikörper für Kälberblut waren aber nur unmarkiert erhältlich. D.h. die Antikörper mußten vor der Verwendung mit fluoreszierenden Markern konjugiert werden. Es wurden dann FITC (Fluorescein isothiocyanate) und PE (R phycoerythrin) Marker für die Konjugation separat bei Molecular Probes

(www.molecularprobes.com) gekauft (Cat. No. A-10235, Alexa Fluor® 488 Protein Labeling Kit und Cat. No. P-806, R-phycoerythrin).

2.4.1 Markierungsreaktionsschritte

Der Anti-CD41/61 Antikörper mußte mit FITC und der Anti-CD62p Antikörper mit PE konjugiert werden. Die Markierungsreaktionen waren notwendig, damit die Antikörper später bei der Untersuchung vom Durchflußzytometer identifiziert werden konnten. Ohne fluoreszierende Marker kommt es zu keiner Antikörperlichtantwort auf das ausgesendete Laserlicht.

2.4.1.1 Flurescein isothiocyanate - FITC

Der FITC-Farbstoff ist mit einem speziellen Kit zusammen geliefert worden, so daß alles nötige für die Reaktion vorhanden war. Der erste Schritt (4.1) bestand darin, eine 1 molare Natriumbicarbonatlösung herzustellen. Dafür mußten die vorhandenen 84 mg Pulver (Component B) in 1 ml deionisiertem Wasser aufgelöst werden. Da nur mit einer geringen Menge an Antikörpern gearbeitet wurde (0.1mg), konnte der nächsten Schritt (4.2) übersprungen werden, in dem die Antikörperkonzentration auf max. 2 mg/ml verringert werden sollte. Dann sollten 0,5 ml des Antikörpers mit 50 µl der 1 molaren Bicarbonatlösung gemischt werden. Da nur 0,1 ml vorhanden waren, ist nur mit 0,1 ml gearbeitet worden. Die Antikörper-Bikarbonatlösung ist dann in ein Gefäß transferiert worden, das den reaktiven FITC-Marker enthielt (4.4), nachdem das Gefäß mit dem Marker Raumtemperatur erreicht hatte. In der Lösung befand sich ein kleiner Magnetstab mit dem die Lösung dann für eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt wurde. Nach einer Stunde mußte die Reaktion mit 17 µl Hydroxylamin gestoppt werden. Dafür wurde das mitgelieferte Hydroxylaminpulver in 100 µl deionisiertem Wasser gelöst. Nach dem hinzugeben von 17 µl (4.5) mußte die Lösung weitere 30 Minuten gerührt werden. Mit dem nächsten Schritt wurde die Marker-Antikörper-Lösung durch ein Plastikröhrchen geleitet, das mit einem Filter bestückt war, um die erfolgreich markierten Antikörper von den nicht markierten Antikörpern zu trennen. Dafür wurde das mitgelieferte Material aufgebaut. Es bestand aus einer leeren Plastikröhre, auf die ein Trichter gesteckt und unter die Röhre ein kleiner Auffangplastikbehälter gestellt werden mußte (5.1). Als Nächstes mußte eine

Pufferlösung hergestellt werden. Dafür wurde der 10X Elution Puffer 10fach mit deionisiertem Wasser verdünnt (5.2). Der Puffer wurde für das spätere Trennungsverfahren benötigt. Um die markierten Antikörper von den nicht markierten zu trennen, mußte ein Filterbett in das Röhrchen eingebracht werden. Bevor die Purification resin (Component D), die die Filterfunktion übernahm, in das Röhrchen eingebracht werden konnte, mußte die Lösung sehr gut durchmischt werden. Nach dem Durchmischen wurde Material der Purification resin mit einer Pipette in die Plastikröhre eingebracht und das Bett bis zirka 2-3 cm unter den oberen Rand der Plastikröhre angefüllt. Das Bett mußte sich für zirka 30 Minuten setzen. In dieser Zeit lief Flüssigkeit aus dem Bett aus, die gesondert aufgefangen wurde. Nach 15 Minuten war das Filterbett etwas zusammengerutscht, so daß Material nachgegeben werden mußte. Nach zirka 20 Minuten war die benötigte Matrix zur Trennung ausgebildet. Nun konnte die Antikörper-Marker Lösung auf das Filterbett gegeben werden (5.4). Es war wichtig, erst die gesamte Lösung in das Bett einziehen zu lassen, um nicht den Antikörper mit dem Elutionspuffer zu verdünnen. Nachdem das geschehen war, wurden 100 µL des Elutionspuffers in das Antikörper-Marker Gefäß gegeben, um das Gefäß zu spülen und die restlichen Antikörper auch ins Filterbett einzubringen. Es wurde dann nochmals gewartet, bis die gesamten 100 µL in das Bett eingezogen waren. Danach wurden alle fünf bis zehn Minuten 100 µL des Puffers nachgegeben, damit die Antikörper durch das Filterbett getrieben wurden. Die Röhre durfte nicht stark erschüttert werden, um ein gleichmäßiges Durchziehen der Lösung zu gewährleisten. Nach kurzer Zeit bildeten sich zwei Banden aus. Die erste bestand aus den erfolgreich markierten Antikörpern, die später verwendet werden sollten.

Nachdem die erste Bande gewonnen werden konnte, mußte bestimmt werden, wie gut die Reaktion verlaufen war. Zur Bestimmung des Markierungsgrades wurde ein Photometer benutzt. 30 µL der gesammelten Antikörper-Lösung sind in 570 µL PBS (Phosphate Buffered Saline) verdünnt und wie in der Anleitung beschrieben bei 280 und 494 nm mit einem Photometer untersucht worden (6.1). Da der Antikörper in PBS verdünnt worden war, mußte reines PBS ebenfalls bei den Wellenlängen gemessen und die Werte dann von den Antikörper-PBS-Werten abgezogen werden. Die Ergebnisse wurden dann in die Formel 6.2 eingesetzt und damit die Proteinmenge errechnet

(0.0000224 M). Als Nächstes wurde das Maß der Markierung ermittelt (6.3), d.h. wieviel FITC-Moleküle im Schnitt pro Antikörper gebunden hatten. Bei sehr guten Markierungen konnten das fünf bis acht pro Antikörper sein. 0.89 mol FITC pro Mol Protein sind errechnet worden. 0.89 mol war sehr gering und damit schien die Reaktion nicht gut verlaufen zu sein. Der Kundenservice der Firma Molecular Probes riet dazu, die Antikörper wenigstens einmal zu testen. Unter günstigen Umständen, könnte diese auch nach einer nicht sehr erfolgreichen Markierung trotzdem verwendet werden. Es war auch möglich, daß die Trennung zwischen markierten und nicht markierten Antikörpern nicht so gut verlaufen war, was die Proteinkonzentration fälschlich erhöht und folglich den Grad der Markierung erniedrigt.

Die Empfehlung des Herstellers VMRD war, die Antikörperlösung bei einer Konzentration von 15 µl/ml zu verwenden. Es sollte dann mit 50 µl Antikörpern pro 1 Million Thrombozyten begonnen werden zu präparieren. Die photometrisch bestimmte Proteinmenge auf das vorhandene Volumen umgerechnet, ergab eine Konzentration von 3,25 mg/ml. D.h., um eine Konzentration von 15 µl/ml zu erhalten, mußte das Volumen 217-mal verdünnt werden. Es wurden 25 µl der Antikörperlösung mit 5,43 ml PBS verdünnt.

2.4.1.2 R phycoerythrin - PE

Für die Antikörpermarkierung mit PE wurde zusätzlich ein speziell für Reaktionen zwischen Antikörpern und Markern entwickelter Protein-Protein Crosslinking Kit benötigt. Dieser Crosslinking Kit wurde ebenfalls von Molecular Probes bestellt (Cat. No. P-6305, Protein-Protein Crosslinking Kit) und die Konjugation durchgeführt.

Der erste Schritt bestand darin, den Antikörper in ein kleines Plastikgefäß mit Rührmagneten zu transferieren. Es mußten dann 10 µl Natriumbicarbonat zum Antikörper im Plastikgefäß gegeben werden (2.1), um einen pH Wert zwischen 7,5 und 8,5 sicherzustellen. Ein pH Wert in diesem Bereich war Voraussetzung für die Reaktion. Danach wurde errechnet wie viel einer Dimethylsulfoxid (DMSO) – Succinimidyl-trans-4-(maleinidylmethyl)cyclohexane-1-carboxylat (SMCC) Lösung benötigt wurde (2.2). Da wiederum nur mit einer geringen Menge Antikörper gearbeitet wurde, wurden nur 0.92 µl der Lösung für die Reaktion benötigt. Weil 0.92 µl ein sehr kleines Volumen war, wurde beschlossen, die Lösung in Phosphate Buffered Saline (PBS) zu verdünnen

und dann mit einem größeren Volumen zu arbeiten. Um die DMSO - SMCC Lösung herzustellen, mußten die Gefäße erst auf Raumtemperatur gebracht werden. Das SMCC-Gefäß darf vor der Benutzung nicht geöffnet werden, weil das Pulver sofort Luftfeuchtigkeit aufnimmt und dann nach kurzer Zeit nicht mehr verwendbar ist. Es wurde dann 100 µl des DMSO in das SMCC Gefäß transferiert und die Substanzen gut vermischt, bis sich das SMCC Pulver komplett im DMSO gelöst hatte (2.3). Es wurden dann 10 µl der Lösung in 20 µl PBS verdünnt. Mit 2,76 µl der DMSO-SMCC-PBS Lösung wurde dann weitergearbeitet, anstatt mit den errechneten 0,92 µl. Die 2,76 µl DMSO-SMCC-PBS Lösung wurde zum gepufferten Antikörper (von 2.1) gegeben (2.4). Das Gemisch wurde für 1,5 Stunden bei Raumtemperatur gerührt (2.5). Ungefähr eine Stunde später wurde begonnen, den Marker Phycoerythrin (PE) für die Konjugation vorzubereiten. Da mit dem R-PE (P-806) gearbeitet wurde, mußten die Schritte 1.1-1.6 und 3.1-3.7 nicht durchgeführt werden. Es konnte direkt mit Schritt 4.1 begonnen werden. Als erstes mußte ausgerechnet werden wie viel Tris-(2-carboxyethyl)phosphinehydrochloride (TCEP) für die Reaktion benötigt wurde. Die Reaktion zwischen Antikörper und PE sollte im Mengenverhältnis 1:1 durchgeführt werden. Für dieses Reaktionsverhältnis wurden 1,98 µl einer 1 mg/ml TCEP Lösung zur Vorbereitung des PE benötigt (4.1). 1,7 mg TCEP sind in 1,7 ml PBS gelöst worden (4.2). Daraufhin wurden 1,98 µl der TCEP Lösung zu 83 µl des PE-Markers gegeben (4.3). 83 µl des PE-Markers entsprach der verwendeten Antikörpermenge (Mengenverhältnis 1:1). Das Gemisch ist für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert worden.

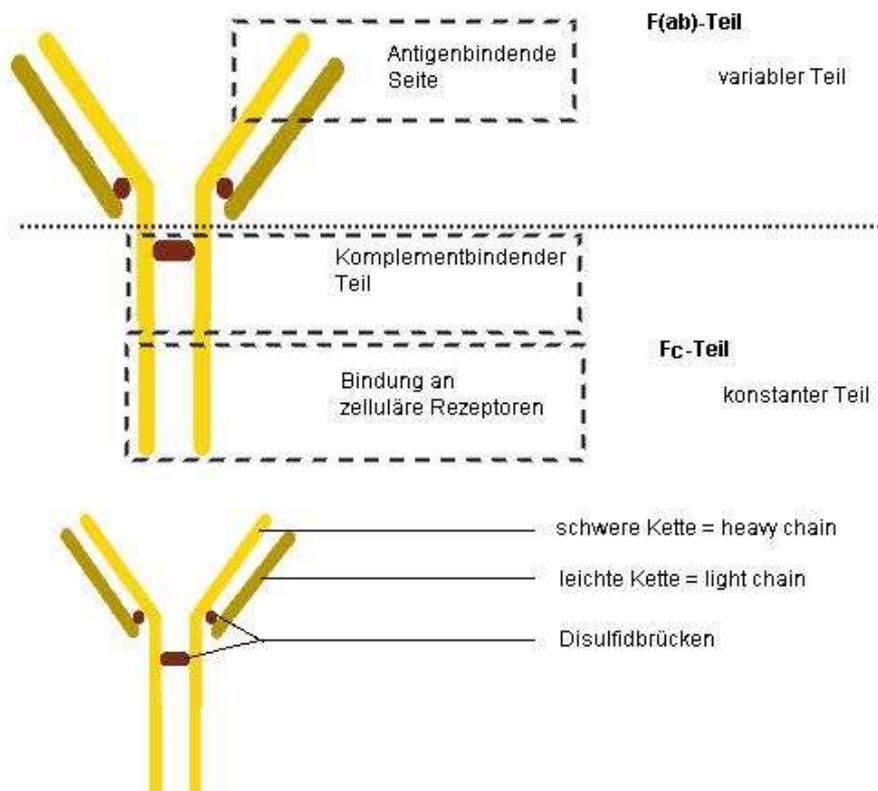
Nachdem der Antikörper mit der DMSO-SMCC-PBS Lösung für 1,5 Stunden und der PE-Marker mit der TCEP Lösung für 15 Minuten reagiert hatten, wurde die PE-TCEP Lösung zum Antikörper-Gemisch gegeben (5.1) und für eine Stunde bei Raumtemperatur und danach weiter über Nacht im Kühlschrank bei 4 °C inkubiert (5.2). Nach einer Reaktion mit dem Protein-Protein-Crosslinking Kit sollten 50-70% der Antikörper erfolgreich markiert sein. Es ist vom schlechtesten Ergebnis ausgegangen worden, so daß mit einer markierten Antikörperkonzentration von 0,5 mg/ml gerechnet wurde, weil die Ausgangsantikörperkonzentration 1 mg/ml betrug. Der Hersteller Zymed empfahl für Durchflußzytometrie Verwendung eine Antikörperkonzentration von 10 µg/ml. Da die 0,5 mg/ml in einem Volumen von 210 µl gelöst waren, mußte mit

einem Faktor von 10,5 verdünnt werden, um eine Konzentration von 10 µg/ml zu erhalten. Leider war keine Empfehlungsmenge zur Blutpräparation angegeben worden. Es ist mit dem selben Volumen (50 µl pro Blutprobe) zu Beginn präpariert worden, welches für den CD41/61 Antikörper empfohlen wurde.

2.5 Kontrollantikörper

Neben den Antikörpern CD61 bzw. CD41/61 und CD62p (=Anti-Antikörper) werden für eine Durchflußzytometeruntersuchung außerdem so genannte Kontrollantikörper benötigt (Isotype Kontrollen).

Ein Antikörper besteht aus zwei identisch leichten und zwei identisch schweren Ketten. Die vier Ketten sind symmetrisch in einer Y-Form angeordnet. Die N-terminalen variablen Arme der schweren und leichten Ketten bilden die antigenbindenden Fragmente oder auch fragment-antibody (Fab) mit Antigenbindungsstelle genannt. Diese sind mit dem C-terminalen konstanten sogenannten kristallisierbaren Fragment (fragment cristalline (Fc)) beweglich verbunden. Das Fc ist ein Teil der schweren Kette bzw. das andere Ende mit komplement- und zellbindender Funktion.



Durch diese zellbindende Funktion binden Antikörper nicht nur spezifisch über das antigenbindende Fragment (Fab). Sie können auch über das kristallisierbare Fragment, Fc-Fragment unspezifisch an Zellen binden und so die Untersuchungsergebnisse verfälschen. Um die Menge an unspezifischen Bindungen herauszufinden bzw. meßbar zu machen, müssen Isotype Kontrollen verwendet werden. Zur Bestimmung der unspezifischen Bindung muß immer ein zusätzliches Versuchsröhrchen pro Probe verwendet werden. Die in dem Kontrollröhrchen durch die Kontrollantikörper bestimmten unspezifischen Bindungen werden von dem Ergebnis der eigentlichen Probe subtrahiert, um dann die spezifischen Bindungen, d.h. die eigentlichen Werte zu erhalten. Isotype Kontrollen müssen dieselbe Klasse an Antikörpern wie die verwendeten Anti-Antikörper sein (in diesem Fall IgG1). Damit Kontrollantikörper nur unspezifisch binden können, bestehen sie entweder nur aus dem Fc-Teil, d.h. sie besitzen keine spezifische Bindungsstelle oder für den Fall das es sich um komplette Antikörper handelt, sind die Bindungsstellen nicht spezifisch, d.h. für nichts im Menschen bzw. Kalb spezifisch, so daß sie auch nur unspezifisch binden können.

Es wurde mit Isotypen Kontrollen einer Tochterfirma von Becton Dickinson, BD PharMingen (www.bdpharmingen.com) gearbeitet (PE markierte Maus IgG1, Isotype Kontrolle (Cat. No. 33815x), FITC markierte Maus IgG1, Isotype Kontrolle (Cat. No. 33814x)). Um auf die unspezifische Bindungsmenge in der eigentlichen Probe schließen zu können, mußte das Verhältnis Blut:Antikörper in beiden Röhrchen (Probe und Kontrolle) identisch sein. D.h. die Menge an Kontroll-Antikörpern in der Kontrolle mußte exakt gleich sein, wie die Menge an Anti-Antikörpern in der eigentlichen Probe und in der Probe mußte gleich viel Blut verwendet werden wie in der Kontrolle. Für den Fall, daß die Anti-Antikörperkonzentration und die Kontrollantikörperkonzentration nicht identisch sind, muß erst errechnet werden, wie viel Mycroliter Kontroll-Antikörper zur Präparation nötig sind, um die exakt gleiche Menge an Kontrollantikörpern in der Kontrollprobe zu verwenden, wie in der eigentlichen Probe an Anti-Antikörpern verwendet werden. In dieser Studie mußte auf den Konzentrationsunterschied geachtet werden.

2.6 Protokollentwicklung

Da am Hershey Medical Center zuvor noch keine derartige Untersuchung durchgeführt worden war, bestand zu Beginn die Aufgabe, eine Methodik zu recherchieren und zu entwickeln, mit der das Blut bearbeitet bzw. durchflußzytometriegerecht aufbereitet werden konnte. Es wurden folgende Ansprüche an das Protokoll gestellt:

- So wenig Präparationsschritte wie möglich.
- Die Proben sollten Vollblutproben sein, so daß keine Zellseparation oder ähnliches durchgeführt werden mußte.

Da Thrombozyten sehr reaktionsfähige Zellen sind, sollte sichergestellt werden, daß die Zellen während der gesamten Untersuchung so unbeeinflusst wie möglich blieben und nur wirklich notwendige Präparationsschritte durchgeführt wurden. Zu Beginn wurde allgemein nach Studien recherchiert, die die Methodik Durchflußzytometrie und Untersuchung von Thrombozyten etabliert haben [1, 24, 34, 63, 64, 85, 99, u.a.]. Auch einige Lehrbücher enthielten nützlich Informationen [8, 9, 42, 59, 84, 100, 109, 126]. Danach wurde allgemein nach Studien gesucht die mit Durchflußzytometrie durchgeführt worden waren und Thrombozyten untersuchten haben [29, 48, 49, 51, 55, 56, 57, 63, 78, 79, 125]. Shattil et al. haben 1987 zum ersten mal mit Vollblutproben gearbeitet und Thrombozytenaktivierungszustände mit Durchflußzytometrie gemessen (Detection of Activated Platelets in Whole Blood Using Activation-Dependent Monoclonal Antibodies and Flow Cytometry [112]). Die verwendete Methode diente uns als Ausgangspunkt für das Protokoll. Der Ansatz sah wie folgt aus:

Blood drawing:

Drawing with a 19 gauge butterfly into a tube containing citrate (0,5 of 3,8% sodium citrate) and take 4.5ml blood – discard 2 ml

Blood preparation:

- 1) Fixation - for 45 min in 1% paraformaldehyde

- 2) after fixation or 1 min after collection
 - a) take 5 µl aliquots
 - b) transfer into tube containing 50 µl of isotonic HEPES buffer
 - c) 5 µl of labeled PAC-1 or S12

- 3) Incubation at room temperature for 15 min. without stirring
- 4) 500 µl of isotonic buffer
- 5) Analyse by FC

Nach der Studienrecherche kristallisierte sich schnell heraus, daß Thrombozyten allgemein mit einem Puffer verdünnt, kleine Proben genommen, diese Proben mit Antikörper markiert und dann fixiert werden mit Paraformaldehyd oder Formaldehyd [29, 48, 49, 51, 56, 63, 78, 125, u.a.].

In verschiedenen Studien wurde mit unterschiedlichsten Puffern und Fixierung [1, 24, 34, 55, 57, 64, 79, 85, 99, u.a] gearbeitet. Es stellte sich die Frage, was die Unterschiede waren und wann welche benutzt werden sollten. Da der Thrombozytenaktivierungszustand in vivo bestimmt werden sollte, bestand ein großes Interesse an Fixierung, um so Zellreaktionen und Veränderungen nach der Blutabnahme unmöglich zu machen. Des Weiteren stellte sich die Frage, wie können Blutproben über längere Zeit gelagert werden. Das Durchflußzytometer stand nur in der Woche zwischen 10 und 17 Uhr zur Verfügung. Für Proben die außerhalb dieser Zeit oder am Wochenende gewonnen wurden, mußte ein Weg gefunden werden, diese zu lagern.

Als Fixation wurde letztendlich 1% Paraformaldehyd (PFA) ausgewählt. 1% Paraformaldehyd ist erstens allgemein die klassische Standardfixation und zweitens war es die Standardfixation in dem Durchflußzytometerlabor des Hershey Medical Centers. Bei der Frage des Puffers gab es etliche Wahlmöglichkeiten. Es schien, als würden die unterschiedlichen Puffer nicht wesentliche Vor- oder Nachteile aufweisen.

Es wurde dann mit PBS (Phosphate Buffered Saline) gearbeitet, weil dieser Puffer im Labor standardmäßig vorhanden war.

Was stand soweit fest?

- Anti-CD41 bzw. 41/61-FITC zur Thrombozytenidentifizierung,
- Anti-CD62p-PE zur Aktivitätsmessung,
- PE und FITC markierte Maus IgG1, Isotype Kontrollen,
- Protokoll nach Shattil,
- Fixation 1% PFA,
- PBS als Puffer.

Nachdem die Grundzüge für das Protokoll feststanden, wurde mit ersten Voruntersuchungen begonnen.

Was galt es unter anderem zu klären?

- Waren die Markierungsreaktionen der Kälberantikörper mit FITC/PE gut verlaufen?
- Bindet der Kälber-Anti-CD41/61-Antikörper unabhängig vom GP IIb/IIIa Rezeptorzustand?
- Sind die Antikörper und ihre Epitope fixationstauglich?
- Wie viel Mycroliter Antikörper mußten pro Test verwendet werden?

Als erstes wurde getestet, ob der Kälber-Anti-CD41/61-FITC Antikörper unabhängig vom Aktivierungszustand des GP IIb/IIIa Rezeptors bindet. Dies mußte sichergestellt sein.

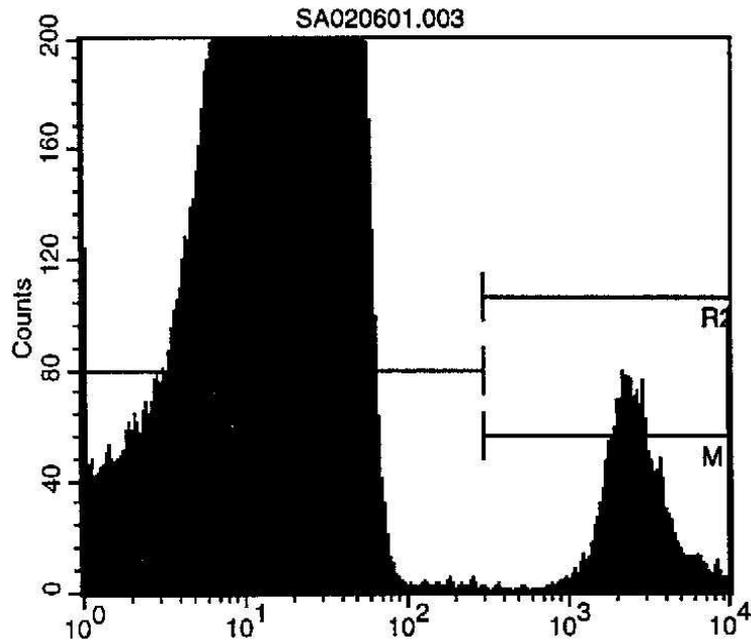
Der Antikörper hat unabhängig vom Aktivierungszustand des Rezeptors gebunden. Damit stand gleichzeitig fest, das die FITC-Markierungsreaktion erfolgreich verlaufen war, weil das Durchflußzytometer den Antikörper erkennen konnte. D.h. die Studie konnte mit dem Antikörper von VMRD (Cell Linie CAPP2A) durchgeführt werden.

Die Testung des Kälber-Anti-CD62p-Antikörpers wurde gleichzeitig mit einer weiteren Frage geklärt. Koktailing, das Verwenden von mehr als einem Antikörper in derselben Probe war nicht vom Hersteller empfohlen worden. Deshalb sollte getestet werden, ob die Verwendung beider Antikörper (CD41/61 und CD62p) gleichzeitig in derselben Probe einen Unterschied macht. Bei diesem Versuch konnte auch festgestellt werden, ob der zweite Antikörper CD62p ebenfalls erfolgreich markiert worden war. Dafür ist eine unaktivierte Probe mit beiden Antikörpern gleichzeitig und dieselbe Probe jeweils getrennt mit einem der Antikörper versehen worden. Der Versuch wurde mit den zugehörigen Kontrollproben durchgeführt.

Die Ergebnisse waren identisch. Der Durchflußzytometriespezialist versicherte außerdem nach dem Versuch, das Koktailing kein Problem sein sollte, auch wenn der Hersteller nicht dazu riet. Dies wäre die übliche Vorgehensweise. Letztendlich war nicht klar, ob der Anti-CD62p Antikörper wirklich einwandfrei funktionierte, weil in der Probe nicht mehr gemessen wurde, als in der zugehörigen Kontrolle. D.h. beim nächsten Mal mußte die Blutprobe vor der Markierung mit Antikörpern aktiviert werden, so daß ein klarer CD62p Peak gemessen werden würde.

Der Kälber Anti-CD41/61 Antikörper funktionierte soweit bei der empfohlenen Menge von 50 µl gut. Der beteiligte Durchflußzytometrieexperte riet aber trotzdem dazu, auf eine optimalere Antikörpermenge für das verwendete Blutvolumen zu testen. Er war der Meinung, daß die derzeitige Thrombozytenidentifizierung in der Vollblutprobe noch weiter verbessert werden könnte. Dafür wurde eine Titrationsreihe von 5 µl bis 105 µl Antikörper in 20 µl Schritten durchgeführt.

Bei 25 µl Anti-CD41/61 war die Thrombozytenidentifizierung am größten. 25 µl Anti-Antikörper entsprachen 7,5 µl Kontroll-Antikörpern.



Eine gute Identifizierung der Thrombozyten von den restlichen Zellen im Blut war wichtig, damit sich die Analyse der Probe nur auf die Thrombozyten beziehen konnte und nicht durch falsch positive Zellen ungenau würde.

Es schien bei den Untersuchungen, als ob die Gesamtereignisrate, d.h. wieviel Zellen insgesamt den Laser pro Sekunde passieren, einen großen Einfluß auf die gemessenen Mikroaggregate hätte. Je größer die Rate, desto mehr Aggregate wurden anscheinend angegeben. Um über den Ereignisraten-Aggregatmessungs-Zusammenhang Klarheit zu erhalten, wurde eine Titrationsreihe für die Ereignisrate pro Sekunde durchgeführt. Es wurde eine Probe mit 25 µl Anti-CD41/61 und die zugehörige Kontrollprobe hergestellt. Die selben Proben wurden bei 6400, 3800, 2200, 1300 und 600 Gesamtereignissen gemessen. Dabei bestätigte sich: desto niedriger die Rate war, um so weniger Aggregate wurden gemessen. Normalerweise ist das Durchflußzytometer bzw. das Flußsystem in der Lage, eine Probe so am Laser vorbeizuleiten, daß immer nur einzelne Zellen passieren. Der Durchflußzytometrieexperte war der Auffassung, daß das System bei sehr zellreichen Proben überfordert sein könnte und so dann mehrere Zellen gleichzeitig passieren. D.h. wenn aufgrund der Zelldichte im Vollblut gleichzeitig drei oder vier einzelne Thrombozyten den Laser passieren, erscheint das für die Maschine wie ein Thrombozytenklumpen, was es im Endeffekt nicht ist. D.h. es wird ein hoher Prozentsatz für Aggregate gemessen. Wird die Probe aber verdünnt und bei einer

geringeren Gesamtereignisrate untersucht, so ist es für die Maschine eher möglich, nur einzelne Zellen am Laser vorbeizuleiten, so daß die Ergebnisse für Aggregate niedriger ausfallen. Es wurde beschlossen, jede Probe mit einer Rate von 30 Thrombozyten pro Sekunde in Zukunft zu untersuchen. Diese Festlegung machte es möglich, bei der späteren Datenanalyse die Prozente an Aggregaten der unterschiedlichen Proben miteinander vergleichen zu können.

Als nächstes wurde ebenfalls eine Titrationsreihe für den Kälber Anti-CD62p Antikörper durchgeführt, um auch hier die Antikörpermenge herauszufinden, bei der der Peak am größten, deutlichsten ist.

Der Versuch verlief erfolglos. Obwohl die Proben mit Adenosindiphosphat (ADP) für fünf Minuten aktiviert worden waren, konnte in keiner der Proben Aktivierung gemessen werden. Als Erklärung kam in Frage: der Antikörper funktioniert nicht, die PE Markierung war nicht erfolgreich verlaufen oder die Aktivierung mit ADP hat nicht funktioniert.

Hilfreiche Unterstützung zur Protokollentwicklung wurde parallel von Beckman Coulter zur Verfügung gestellt. Beckman Coulter riet dazu, daß Vollblut sofort zu fixieren, dann auf zirka 20.000 Thrombozyten pro Mikroliter zu verdünnen und mit 40 µl Blutproben zu arbeiten. Sättigende Antikörperkonzentrationen sollten dann für menschliches Blut 10 µl für Anti-CD41 und 5 µl für Anti-CD62p sein. Beckman Coulter wies darauf hin, daß fixieren vor der Rezeptormarkierung mit Antikörpern negativen Einfluß auf die P-selectin-Rezeptoren haben könnte. Da aber ein Interesse an dem Thrombozytenaktivierungsstatus in vivo bestand, erschien die sofortige Fixierung nach der Blutabnahme sinnvoll. Außerdem ist die Beeinflussung der P-selectin-Rezeptoren in allen Proben gleich, so daß der negative Einfluß in allen Proben vorhanden ist und letztendlich wahrscheinlich kaum einen Einfluß haben würde. 40 µl ist ein angenehmer zu pipettierendes Volumen, das keinerlei Nachteile für die Fragestellung brachte. Nachdem für den Ansatz von Beckman Coulter Literaturnachweise vorlagen [55] wurde beschlossen, mit den Empfehlungen zu arbeiten. Um bei dieser Präparation nachher bei der Untersuchung auf eine Thrombozytenrate von zirka 30 pro Sekunde zu kommen,

mußten für Kälberblut 85 µl und für Menschenblut 230 µl der Proben vor der Untersuchung in 2 ml PBS Puffer verdünnt werden.

Das Protokoll sah zu diesem Zeitpunkt im Detail folgendermaßen aus:

1. add 1% paraformaldehyde to blood sample in 1:1 volume ratio, fix for 30 min
2. dilute with PBS buffer to get a concentration of about 20000 plat./microL
3. take 40 microL aliquots
4. add aliquots to
 - tube containing measured concentration of antibodies,
 - tube with matched isotype Controls
5. wait 10-15 minutes
6. dilute again 85b/230h blood in 2ml buffer to get a rate of 30 platelets per sec. (b = bovine, h = human)

Von nun an wurden alle Proben immer auf 20.000 Thrombozyten pro Mikroliter verdünnt, 40 µl Blut mit Antikörpern markiert und dann bei 30 Thrombozyten pro Sekunde untersucht.

Es wurde parallel zur Protokollentwicklung begonnen, die Lagerungsfähigkeit von Proben zu untersuchen. Dafür wurde eine Kälberblutprobe sofort nach Abnahme nur mit Anti-CD41/61 präpariert und untersucht. Zwei Tage später wurde eine neue Probe aus dem fixierten und in PBS auf 20.000 Thrombozyten pro Mikroliter verdünnten Blut entnommen, untersucht und die Ergebnisse verglichen.

Eine Lagerung von zwei Tagen, was zirka einem Wochenende entsprach, schien soweit mit dem Anti-CD41/61 durchführbar, ohne die Ergebnisse zu verfälschen.

Es wurde dann begonnen, die Antikörper für humane Thrombozyten zu testen. Zu Beginn ist mit dem Anti-CD41 Antikörper (Klon SZ22) der Firma Beckman Coulter

gearbeitet worden. Der Rezeptor GP IIb besteht aus zwei Ketten, α und β . Der Klon SZ22 bindet an die α Kette des CD41 Rezeptors (GPIIb). Der Klon wurde als erstes auf seine Fixationstauglichkeit getestet. Beckman Coulter konnte eine Fixationstauglichkeit nicht versichern. Da bereits feststand, mit fixierten Proben zu arbeiten, mußte der verwendete Klon fixationstauglich sein.

Es ergaben sich keine eindeutigen Ergebnisse, weil die Separation zwischen Thrombozyten und den restlichen Blutzellen nicht gut war. Da das Ergebnis nicht eindeutig war, mußte der Versuch nochmals wiederholt werden.

Der P-selectin (CD62p) Test der menschlichen Antikörper verlief ebenfalls nicht erfolgreich. Es stellte sich die Frage, ob unter Umständen das verwendete ADP nicht einwandfrei war. Das selbe ADP hatte schon die Kälberthrombozyten nicht aktiviert. ADP ist ein Thrombozytenaktivator, der als Routineaktivator allgemein benutzt wird. Es erschien eher unwahrscheinlich, daß das Problem bei dem CD62p Antikörper lag, weil die Antikörper für humane Thrombozyten bereits markiert gekauft worden waren.

Da sich die empfohlenen Antikörpermengen für menschliches Blut immer auf eine Million Thrombozyten bezogen, ist das Untersuchungsblutvolumen von 800.000 auf eine Million Thrombozyten angehoben worden. Damit weiterhin mit 20.000 Thrombozyten pro Mycroliter gearbeitet werden konnte, wurden jetzt 50 μ l Blutproben verwendet. Um einheitlich zu bleiben, wurde das Volumen ebenfalls für das Kälberblut auf 50 μ l angehoben und nochmals mit der ermittelten Antikörpermenge getestet. Das Ergebnis war unverändert zufriedenstellend.

Der Klon SZ22 Anti-CD41 für menschliches Blut wurde nochmals mit fixiertem Blut getestet.

Die Ergebnisse waren nicht überzeugend und nicht zufriedenstellend. Es mußte nach einem neuen Klon gesucht werden.

Da der Kälber Anti-CD62p Antikörper nach einigen Versuchen nicht funktionierte und es wahrscheinlich war, daß das Problem der Antikörper bzw. die Markierung war, wurde der menschliche CD62p Antikörper mit Kälberblut getestet. Die erhoffte Kreuzreaktion fand nicht statt.

Daraufhin wurden erneut Antikörper CD62p für Kälberblut bestellt, mit PE markiert und eine neue Versuchsreihe durchgeführt. Danach waren die Ergebnisse akzeptabel.

Als Nächstes wurde das Bindungsepitop auf Fixationsstabilität getestet. Der Antikörper CD62p für Kälberblut arbeitete auch nach Fixierung zufriedenstellend.

Als Letztes wurde dann eine Titrationreihe durchgeführt.

Bei 45 µl war der Peak des Antikörper CD62p für Kälberblut am größten. Das entsprach 9 µl Isotype Kontrollvolumen.

Weil der SZ22 Klon Anti-CD41 für humane Thrombozyten nicht fixationstauglich war, mußte nach einem neuen Klon gesucht werden. Beckman Coulter bietet noch weitere CD41 Klone an. Der P2-Klon war ebenfalls nicht nützlich, weil dieser nur an die aktivierte Form, nach Konformationsänderung des CD41 Rezeptors bindet. Der letzte Klon PLT-1 (Cat. No. PN 6602993) schien verwendbar. Es handelte sich dabei aber um einen IgM Klasse Antikörper. Der Durchflußzytometrieexperte war skeptisch, weil IgM Antikörper sehr viel mehr unspezifisch binden als IgG Antikörper und ein IgM und IgG Antikörpertyp zusammen verwendet würden. Da nicht komplett zu einem anderen Hersteller gewechselt werden sollte und bezüglich des CD41 Antikörpers keine andere Möglichkeit bestand, blieb keine andere Wahl. Da der PLT-1 Klon ein IgM Antikörper war, mußte auch ein neuer Kontrollantikörper erworben werden (IgM Kontrolle, Cat. No. PN 6602434). Anti-Antikörper und Kontrollantikörper müssen der selben Klasse angehören. Es wurde dann der neue Klon getestet. Der PLT-1 Klon funktionierte überraschend gut.

Nach einigen Fehlversuchen mit dem Anti-CD62p Antikörper für Menschenblut, ist es dann gelungen, eine aktivierte Probe zu erhalten und eine Titrationsreihe durchzuführen. 25 µl Anti-CD62p konnte als optimale Menge festgelegt werden. 3.1 µl war das entsprechende Kontrollantikörpervolumen.

Eine Titrationsreihe wurde ebenfalls für den neuen IgM Anti-CD41 Antikörper durchgeführt. 10 µl waren hier das optimale Volumen. Da der Kontrollantikörper gleich konzentriert war, mußten für die Kontrolle ebenfalls 10 µl verwendet werden.

Die Fixationstauglichkeit der Epitope der humanen Thrombozyten wurde mit 25 µl Anti-CD62p und 10 µl IgM Anti-CD41 getestet.

Die Ergebnisse waren nach Fixation unverändert, d.h. mit denen ohne Fixation identisch.

Als Letztes stellte sich die Frage, ob die Temperatur der Reagentien (PFA, PBS, ADP) einen Einfluß auf die Ergebnisse hatte. Dafür wurde eine Probe geteilt und zum einen mit 8 °C und zum anderen mit 37 °C warmen Reagentien präpariert und untersucht.

Die Ergebnisse waren identisch. D.h. die Reagentien mußten vor Verwendung nicht erst auf Körpertemperatur erwärmt werden.

Das Blut wurde bisher mit einer Spritze, in die vorher Zitrat aufgezogen worden war, abgenommen und danach mit PFA versehen. Um die Blutabnahme zu vereinfachen, sollte auf ein Adaptersystem (VACUTAINER) umgestiegen werden, das es möglich machte, direkt in mit Zitrat versetzten Vacuumgefäßen Blut abzunehmen und danach im selben Gefäß mit PFA zu mischen. Es bestand aber die Befürchtung, der in den Vacuumgefäßen herrschende Unterdruck könnte so groß sein, daß das Blut mit einer zu hohen Geschwindigkeit angesogen werden könnte. Eine hohe Blutgeschwindigkeit in der Nadel geht mit hohen Reibungskräften einher. Reibungskräfte aktivieren Thrombozyten. D.h. diese Möglichkeit der Abnahme könnte die Ergebnisse verfälschen. Es wurde dann auf beiden Wegen Proben gewonnen, präpariert und die Ergebnisse verglichen.

Es konnte in Zukunft mit dem Vacutaineradaptersystem gearbeitet werden, da die Ergebnisse in beiden Proben gleich waren.

Das Problem der Lagerung von Proben konnte durch eine Vereinbarung gelöst werden, so daß 24 Stunden, 7 Tage pro Woche das Durchflußzytometer benutzt werden konnte. Es mußten keine Proben mehr gelagert werden. Jede Probe sollte zirka eine Stunde nach Blutabnahme untersucht sein.

Was haben die Voruntersuchungen ergeben?

- Kälberantikörpermarkierungen waren nun erfolgreich,
- Der Anti-CD41/61 Antikörper bindet immer an GP IIb/IIIa,
- Die Antikörper und die Epitope waren fixationstauglich,
- Kälberantikörper:
Anti-CD41/61, von VMRD - cell line CAPP 2A, FITC markiert – 25 µl,
Anti-CD62p, von Zymed, PE markiert – 45 µl,
- Menschenantikörper:
Anti-CD41-FITC, Beckman Coulter Cat. No. PN 6602993 – 10 µl,
Anti-CD62p-PE, Beckman Coulter Cat. No. IM1759 – 25 µl,
- Kontrollantikörper:
PE markierte IgG1, Isotype Kontrolle, von BD PharMingen
Cat. No.33815x Kälberkontrolle 9 µl / Menschenkontrolle 3.1 µl,
FITC markierte IgG1, Isotype Kontrolle, von BD PharMingen
Cat. No.33814x Kälberkontrolle 7.5 µl,
FITC markierte IgM, Isotype Kontrolle, von Beckman Coulter
Cat. No. PN 6602434 Menschenkontrolle 10 µl,

- Es wird das Vacutaineradaptersystem mit Zitratgefäßen zur Blutabnahme verwendet,
- Blutabnahme mit 21 gauge Butterfly ohne Stauschlauch,
- Das Blut wird auf 20.000 Thrombozyten pro Mikroliter verdünnt,
- Sofortige Fixation des Blutes mit 1% PFA im Verhältnis 1:1 Blut:PFA für 30 min,
- PBS als Puffer,
- PFA , PBS müssen nicht auf Körpertemperatur erwärmt werden,
- Protokollansatz grundlegend Shattil mit Veränderungen nach Prof. Kokschi (Beckman Coulter),
- 50 µl Blutversuchsvolumen,
- Kocktailing war möglich,
- Proben bei einer Rate von 30 Thrombozyten / Sekunde untersuchen,
- keine Lagerung, alle Proben sollen 1 Stunde nach Abnahme untersucht sein.

Wie sahen die Ergebnisse der Voruntersuchungen in Protokollform aus:

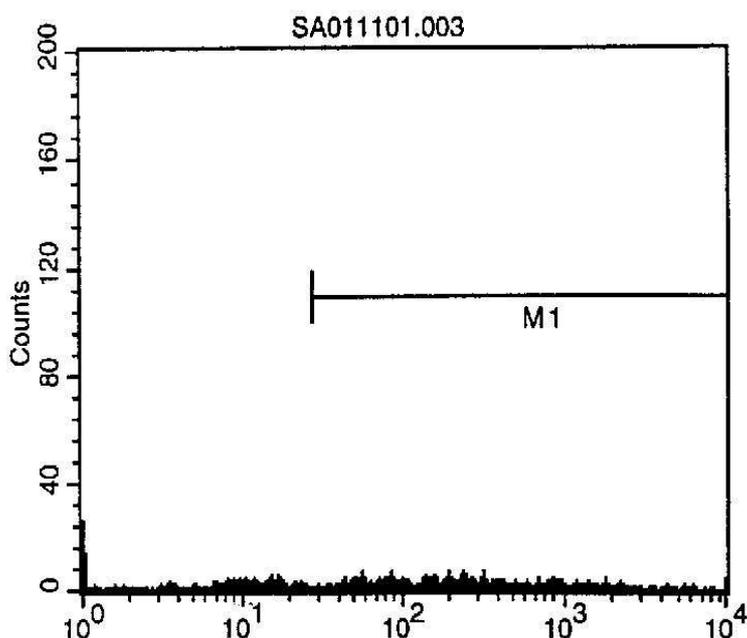
- Use 1% PF and PBS at room temperature
- draw blood with low or without tourniquet and discard the first 3cc blood
- draw blood into a 2,7 cc vacuum tube containing citrate
- open the tube add 2,7 cc 1% PF into the blood immediately and fix for 30 min
- shake the tube
- dilute with 22cc PBS to get a concentration of about 20000 plat. / micro L
- take 3 x 50 micro L aliquots into FC tubes
- add to the aliquot 45 / 25 µl of anti-P-selectin-PE and 7,5 / 10 µl of isotype control FITC directly into the blood - CONTROL I
- add to the aliquot of 25 / 10 µl anti-CD41-FITC and 9 / 3,1 µl of isotype control PE directly into the blood - CONTROL II
- add to the aliquot 45 / 25 µl of anti-P-selectin-PE and 25 / 10 µl of anti-CD41-FITC directly into the blood - SAMPLE
- wait 10-15 minutes for staining in the dark
- dilute again with 1ml PBS and shake the tube
- add again 1cc PBS
- take 85b / 230h microL of sample and dilute in a new FC tube containing 2cc PBS to get 30 plat. / sec
- ready for FC
- collect 10.000 platelets

2.7 Protokollkontrollphase

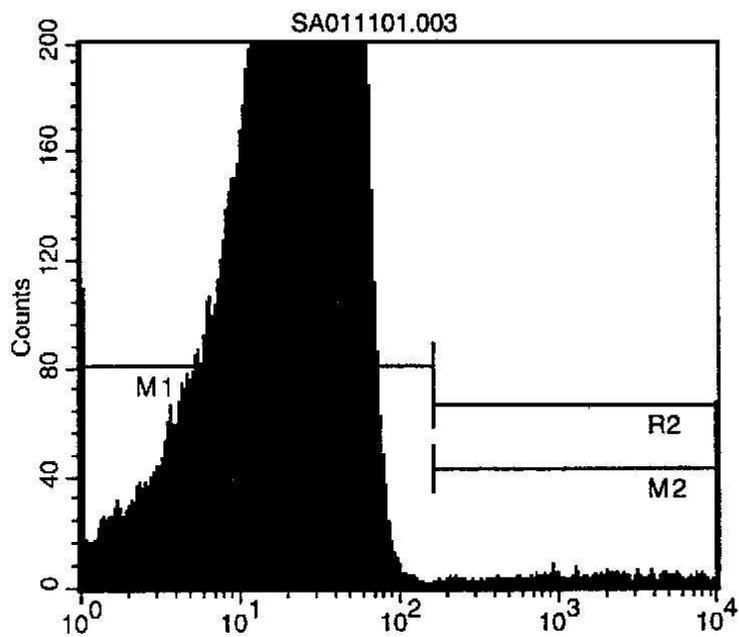
2.7.1 Positive Kontrolle

Nachdem die Protokollentwicklung abgeschlossen war, sollte jeweils eine klar positive Probe erbracht werden, d.h. eine Blutprobe sollte von einem Menschen und einem Kalb gewonnen und diese mit dem Aktivierungsagonisten ADP aktiviert werden. Ein hoher Prozentsatz an Thrombozyten sollte als aktiviert meßbar und einige klar als verklumpt zu bestimmen sein. Mit diesem Versuch sollte gezeigt und sichergestellt werden, daß die Protokollentwicklung wirklich abgeschlossen war und das gemessen werden konnte, woran Interesse bestand, die Bestimmung von aktivierten Thrombozyten und Mikroaggregaten.

Der Nachweis von positiven Kontrollen gestaltete sich unerwartet schwierig. Die ersten Versuche mit ADP Aktivierung schlugen komplett fehl. Nicht nur das zu Beginn keine Aktivierung und Verklumpung meßbar waren, sogar die Identifikation der Thrombozyten in der Vollblutprobe war extrem beeinflußt und verändert.



Es zeigte sich kein Peak, d.h. es wurden keine aktivierten Thrombozyten gemessen.



Eine Separation zwischen Thrombozyten und den restlichen Blutzellen fand nicht statt, deutlich zu sehen am fehlenden Peak im Bereich M2

Die Ursache für die teilweise ausgebliebene Thrombozytenseparation war unklar. Es wurden weiter Versuche durchgeführt. Nach einiger Zeit stellte sich die Frage, ob das Blut nicht ausreichend mit ADP aktiviert werden könnte. Selbst die Verdoppelung und Verdreifachung der ADP Menge brachte keinen Erfolg. Es wurden dann auch andere Methoden zur Thrombozytenaktivierung getestet, wie 10 Minuten zentrifugieren oder hohe Reibungskräfte, aber nichts schien die Thrombozyten zu aktivieren. Es wurde unter anderem mit dem Gedanken gespielt, den Blutproben Kalzium kurz vor der Aktivierung zuzugeben. Das Blut wurde in Zitratröhrchen abgenommen. Zitrat bindet freies Kalzium. Es ist aber bekannt, daß Thrombozyten Kalzium benötigen, um vom nicht aktiven in den aktivierten Zustand übergehen zu können. Nach Rücksprache mit dem lokalen Hämatologielabor schien die Kalziumzugabe nicht das Problem zu sein, weil dort täglich Zitratblutproben mit ADP aktiviert und zum Beispiel mit dem Aggregometer erfolgreich untersucht werden konnten.

Es wurde nochmals in der Literatur diesbezüglich nachgelesen und ein wichtiger Punkt fiel auf. Das Blut wurde nach der Abnahme nicht auf Körpertemperatur gehalten. Es ist dann eine menschliche Blutprobe gewonnen worden, die nach der Blutgewinnung in einem 37 °C warmen Wasserbad aufbewahrt wurde. Auch während der

10 Minuten Aktivierung mit ADP wurde die Probe auf 37 °C gehalten. Diese Veränderung brachte den Durchbruch. Nachdem das Blut nun aktiviert werden konnte, fiel auf, daß es einen gewaltigen Unterschied machte, ob die Probe fixiert oder unfixiert war. Ziel der Versuche war es, festzustellen, ob die Protokollentwicklung wirklich abgeschlossen war. D.h. es mußte ebenfalls gezeigt werden, daß die Fixation des Blutes keine Veränderungen hervorrief. Deshalb wurden alle Blutproben geteilt. Die erste wurde nach der Aktivierung durch ADP sofort untersucht. Die zweite wurde erst fixiert und danach untersucht. Die Ergebnisse der beiden Versuche wurden dann verglichen.

unfixiert	66 %	aktiviert	63 % Aggregate
fixiert	47 %	aktiviert	3,3 % Aggregate

Die Ergebnisse waren erschreckend, weil die Antikörper und Epitope zuvor auf ihre Fixationstauglichkeit getestet worden waren.

Der gleiche Versuch, die Proben ebenfalls auf 37 °C gehalten, wurde mit Kälberblut durchgeführt. Leider ergab sich hierbei keine Aktivierung.

Da die Fixation erheblichen Einfluß auf die Ergebnisse hatte, wurden andere Fixationsmöglichkeiten getestet. Da Paraformaldehyd die Standardfixation ist, sollte diese vorerst nicht gewechselt werden. Es wurden unterschiedliche Prozentsätze getestet. Es wurde eine Probe viermal präpariert: 1. unfixiert, 2. 0.25% PFA, 3. 0.5% PFA und 4. 1% PFA. Die Ergebnisse der fixierten Proben waren alle unterschiedlich zur unfixierten.

Von nun an wurden pro Blutprobe immer vier Proben und eine Kontrolle präpariert, d.h. jeweils zwei unfixierte und fixierte Proben zuzüglich einer Kontrollprobe. Es sollte damit herausgefunden werden, ob die gleichen Proben (fixiert zu fixiert bzw. unfixiert zu unfixierte) überhaupt identisch waren.

Es wurde erneut ein Anlauf unternommen und sowohl Menschen als auch Kälberblut nochmals präpariert. Bei dieser Präparation wurden die Proben aber während der 30 Minuten Fixation auf Kühlschranktemperatur, d.h. zirka 7 °C gehalten. Es gab Hinweise in der Literatur, daß niedrige Temperaturen während der Fixation hilfreich sein könnten.

Das menschliche Blut konnte wieder aktiviert werden. Die Fixation hatte aber wiederum einen enormen Einfluß auf die Probe. Nicht nur das die Ergebnisse zwischen fixierten und unfixierten Proben unterschiedlich waren, auch die erste fixierte bzw. unfixierte Probe war unterschiedlich zur zweiten. Außerdem war die Separation zwischen Thrombozyten und den restlichen Blutzellen zum Teil wieder kaum vorhanden. Das Kälberblut ist wiederum nicht aktiviert worden und der Versuch damit fehlgeschlagen.

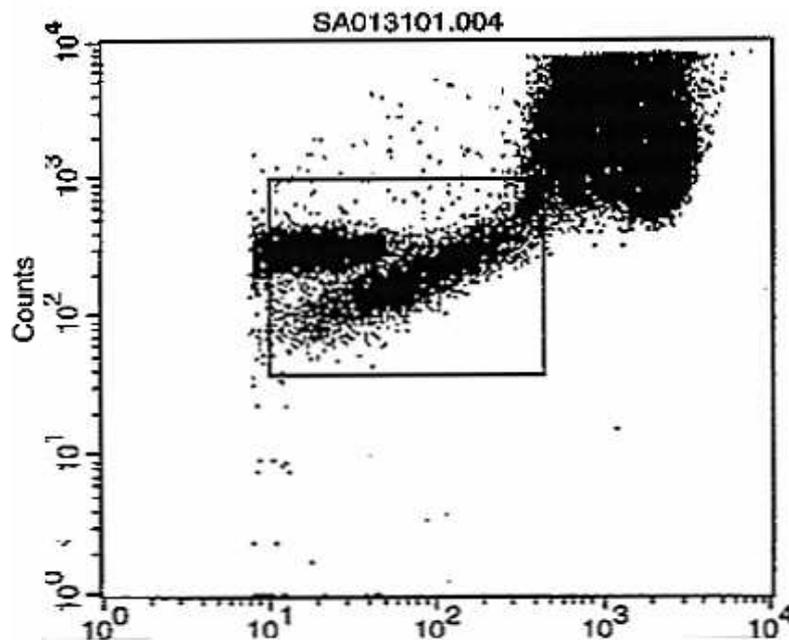
Es kam die Frage auf, ob Kälberthrombozyten anders als menschliche Thrombozyten funktionierten und unter Umständen nicht durch ADP aktiviert werden konnten. Nachdem Informationen eingeholt worden waren, sprach alles dafür, das auch Kälberthrombozyten durch ADP aktiviert werden sollten. Trotzdem wurde beschlossen, Kollagen anstatt ADP als zukünftigen Agonisten zu verwenden. Da das Kollagen der Firma Biodata aus Kälbern gewonnen wurde, war sicher, daß es die Kälberthrombozyten aktivieren wird. Das Kollagen konnte ebenfalls problemlos für Menschenblutaktivierung verwendet werden. Außerdem ist Kollagen ein stärkerer Aktivator als ADP was gut war, um deutlich positive Proben zu erhalten. Eine weitere Möglichkeit für die Probleme mit der Aktivierung von Kälberblut war eventuell, daß der Antikörper bzw. die Markierungsreaktion mit PE ein zweites mal nicht ausreichend erfolgreich verlaufen war. Die Antikörper binden an die Rezeptoren, diese konnten aber durch das Durchflußzytometer nicht immer erkannt werden, d.h. die Proben werden immer als nicht aktiviert bestimmt. Auf der anderen Seite erschien diese Möglichkeit eigentlich unwahrscheinlich, weil der markierte Antikörper bereits in den Voruntersuchungen funktioniert hatte.

Es stellte sich außerdem die Frage, ob das PFA nicht korrekt hergestellt wurde. Die Fixation schien nicht in Ordnung zu sein, da die Versuchsergebnisse so schlecht waren.

Nach erneuter Recherche fiel auf, daß nie auf den pH Wert der Lösung geachtet worden war. Der pH Wert der PFA Lösung wurde daraufhin bestimmt. Er war im Normalbereich.

Ein weiteres Problem, das immer wieder auftrat, war, die Bestimmung der aktivierten Thrombozyten. Die Ergebnisse (%+ = Prozent an aktivierten Thrombozyten) der fixierten und unfixierten Proben waren immer unterschiedlich. Der mögliche Grund für die unterschiedlichen Prozentsätze an aktivierten Thrombozyten war möglicherweise die Aktivierungszeit. Nach genauerer Überlegung fiel auf, daß die unfixierte Probe viel mehr Zeit hatte, durch Kollagen aktiviert zu werden als die fixierte. Die fixierte Probe hatte nur die reine Aktivierungszeit, um aktiviert zu werden, weil sie direkt danach fixiert wurde. Die unfixierte Probe hingegen hatte die gesamte Zeit bis zur eigentlichen Untersuchung, was im Schnitt zirka 45 Minuten waren, um aktiviert zu werden. D.h. am folgenden Tag wurde die Probe fixiert, wenn die unfixierte Probe mit dem Durchflußzytometer untersucht wurde, um so die Aktivierungszeit in beiden Proben gleich lang zu halten.

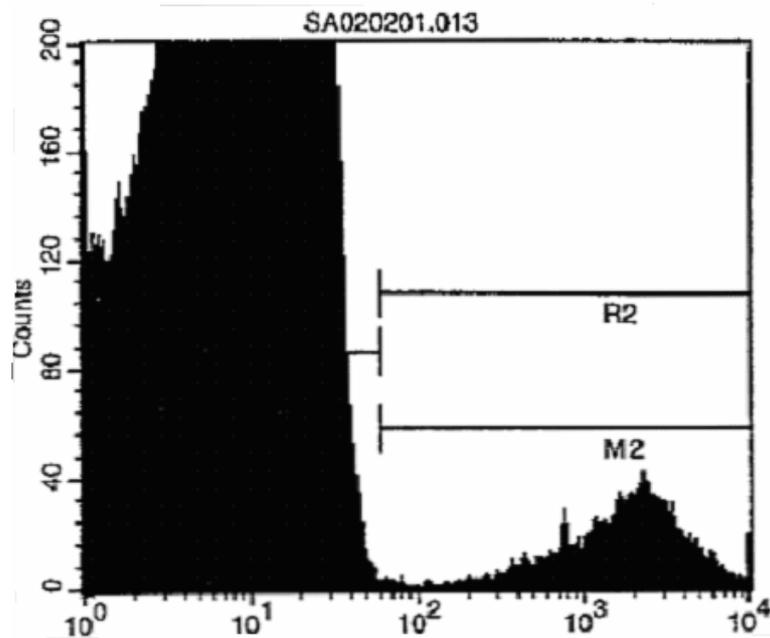
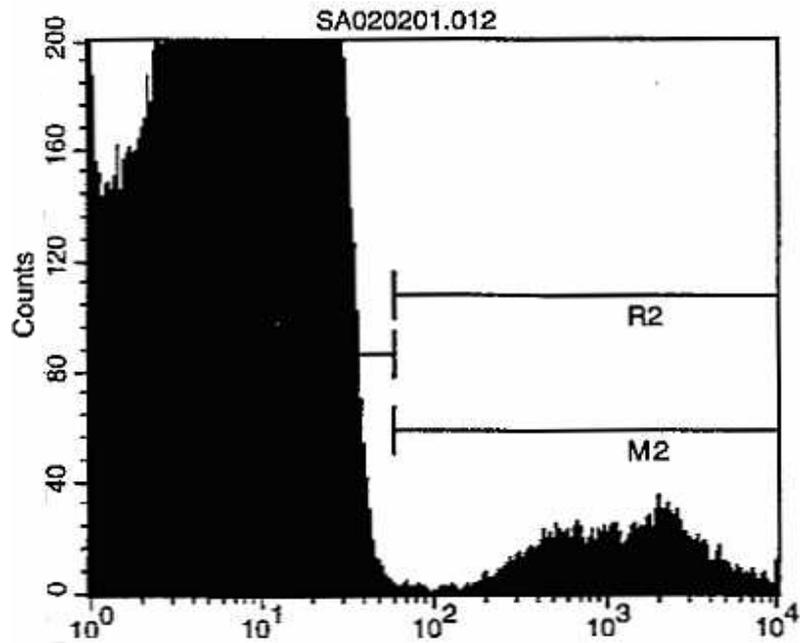
Die Ergebnisse waren nicht überzeugend. Außerdem hatte das PFA wieder großen Einfluß auf die Zellen. Diesmal sogar schon alleine deutlich zu sehen in der Abbildung, die auf Lichtzerstreuung beruhte.



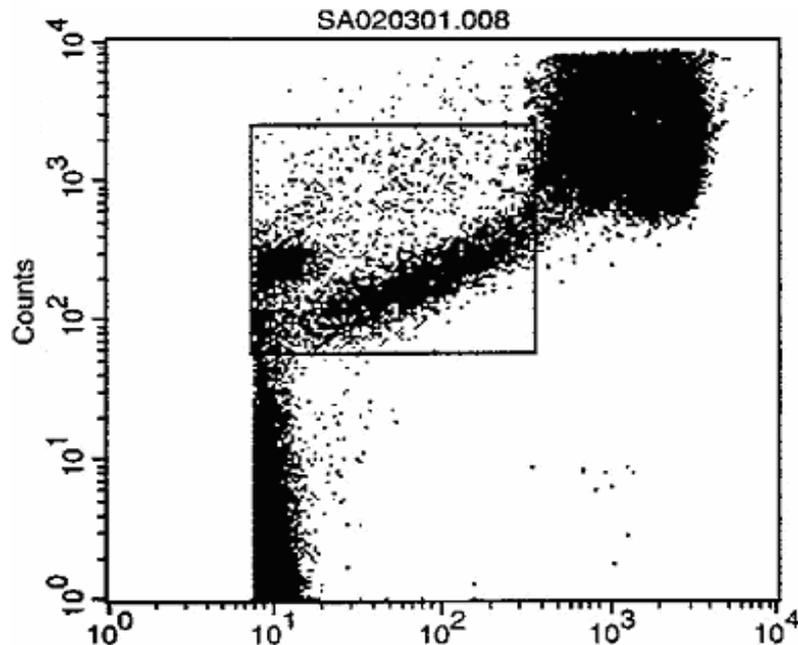
Wie deutlich zu erkennen ist, ist in dem markierten Teil das Feld segmentiert. Hier sollte ein homogener Bereich vorliegen, der die Thrombozyten darstellt.

Durch einen Zufall waren die gleichen Antikörper die für dieses Projekt verwendet wurden nochmals im Labor vorhanden. Diese waren von einer anderen Firma gekauft worden und fanden in einer anderen Studie Verwendung. Da die Projektsituation zu dem Zeitpunkt sehr aussichtslos war, wurden die Antikörper der anderen Firma, Becton Dickinson mit unseren Proben getestet. D.h. eine Probe wurde mit dem Anti-CD62p von Beckman Coulter und dem Anti-CD61 von Becton Dickinson versehen und umgekehrt. Die Ergebnisse waren erstaunlich gut, besonders der Anti-CD61 Antikörper der Firma Becton Dickinson arbeitete viel sauberer und klarer.

Nach diesen Ergebnissen wurden die Antikörper von Beckman Coulter zu Becton Dickinson umgestellt. Im Allgemeinen waren die Ergebnisse besser, besonders die Separation zwischen Thrombozyten und den restlichen Zellen war sehr klar. Es fiel aber immer ein Unterschied zwischen der ersten und zweiten fixierten bzw. unfixierten Probe auf. In der ersten Probe war der FITC-Peak eher flach und breit und in der zweiten spitz, schmal und die Separation war optimal, viel größer als in derselben ersten Probe. Es war aber immer noch klar und deutlich der negative Einfluß des PFA zu sehen.



Am folgenden Tag wurde der gleiche Versuch nochmals durchgeführt, um sicherzustellen, daß die guten Separationsergebnisse nicht nur ein Zufallsbefund waren. Die Ergebnisse waren diesbezüglich zufriedenstellend, aber der PFA Einfluß war enorm.



Das normal homogene, einheitliche Gebiet, das die Thrombozyten repräsentierte (R1) war in zwei geteilt. Die Ergebnisse für Prozent positive Thrombozyten und Aggregate waren im Vergleich fixierte zu unfixierte Probe besser, aber noch nicht zufriedenstellend.

Da von einer Blutprobe immer unterschiedliche Ergebnisse in unterschiedlichen Röhrcchen gemessen wurden, stellte sich die Frage, ob die Maschine überhaupt in der Lage war, von ein und demselben Röhrcchen mehrmals gleiche Ergebnisse zu liefern. Um dies herauszufinden, wurde ein und dasselbe Röhrcchen dreimal hintereinander untersucht und die Ergebnisse verglichen.

Das Problem lag nicht am Durchflußzytometer, die gemessenen Werte waren identisch. Es fiel aber wie immer der Einfluß des PFA auf.

Die letzten drei Untersuchungen sind dann noch mal aber zusammen ausgewertet worden. Es wurde festgestellt, daß immer konstante Unterschiede zwischen den fixierten und unfixierten Proben vorzufinden waren. Aber auch zwischen der ersten und zweiten Probe derselben Untersuchung konnten immer wieder gleiche Veränderungen festgestellt werden. Es ergab sich der Eindruck, daß die zweite Probe immer `gleich` anders war, als die erste. Dann fiel deutlich auf, daß die ersten Proben der fixierten mit

den ersten unfixierten Proben sehr identisch waren und die zweiten fixierten mit den zweiten unfixierten. Diese Veränderungen waren an allen drei Tagen immer konstant vorhanden. Da lag die Vermutung nah, das Problem in der Präparation der Proben zu suchen, weil es sich immer um unterschiedliche Blutproben handelte, die Präparationsschritte und Durchführung aber an allen Tagen dieselben.

Außerdem fielen noch die folgenden Veränderungen auf:

1. der Anti-CD61-FITC-Peak war in der ersten Probe immer sehr breit, in der zweiten aber immer schmal und spitz,
2. in der ersten Probe war meist mehr Aktivierung meßbar als in der zweiten,
3. die Gesamtereignisse von der ersten zur letzten Probe stiegen immer weiter an, um die selbe Anzahl (10.000) an Thrombozyten zu untersuchen,
4. bezüglich des PFA war auffällig, daß es in einigen Proben zu Veränderungen kam, d.h. die Population der Thrombozyten (R1) sah anders bzw. verändert aus und in einigen nicht, obwohl an allen drei Tagen mit dem selben PFA gearbeitet worden war.

Was wurde daraus geschlossen:

1. ein breiter Peak kann für zu wenig Antikörper sprechen. Wenn ausreichend Antikörper vorhanden sind, wird jeder Thrombozyt ungefähr gleich viele Antikörper binden, d.h. ungefähr gleich hell sein was einem schmalen, spitzen Peak entspricht. Sind hingegen zu wenig Antikörper vorhanden, so wird es nur wenige Thrombozyten geben, die ausreichend Antikörper binden, aber bei einer großen Anzahl von Thrombozyten bindet nicht an jeden CD61 Rezeptor ein Antikörper. In dieser Probe gibt es dann eine Streubreite im Extremfall von keinem Antikörper pro Thrombozyt bis zur vollen Sättigung, d.h. von nicht reflektierenden Thrombozyten bis sehr stark reflektierenden und alles dazwischen. Das ist nichts anderes als ein breiter und flacher Peak. Unlogisch war, daß in beiden Röhrchen gleich viel Antikörper verwendet wurden, in dem ersten schienen zu wenig und in dem zweiten ausreichend Antikörper vorhanden zu sein.
2. Für die unterschiedlichen Aktivierungszustände der Proben gab es keine Erklärung.
3. Die immer wieder von der ersten zur letzten Probe ansteigenden Gesamtereignisse, um dieselbe Anzahl an Thrombozyten (10.000) zu erhalten, sprachen für ein nicht ausreichendes Durchmischen der Proben. D.h. in den ersten Proben waren immer mehr Thrombozyten als in den letzten. Diese Schlußfolgerung machte Sinn in Verbindung mit den unterschiedlichen Anti-CD61-FITC Peaks. In der ersten Probe waren mehr Thrombozyten als in der zweiten. Deswegen wurde in den ersten Proben weniger Gesamtereignisse benötigt, aber die Antikörperkonzentration war nicht ausreichend zur Sättigung aller vorhandenen Thrombozyten. Im zweiten Röhrchen war es genau anders herum. Es waren weniger Thrombozyten vorhanden, so daß mehr

Gesamtereignisse benötigt wurden, um 10.000 Thrombozyten zu untersuchen, aber die Anti-CD61 Antikörperkonzentration war hier ausreichend, um alle Thrombozyten mit Antikörpern zu sättigen, weil insgesamt weniger Thrombozyten vorhanden waren.

4. Die unkontinuierlichen Veränderungen des PFA ließen auf ein PFA unabhängiges Problem schließen und hatte u.U. ebenfalls mit der Blutpräparation und der Durchmischung zu tun.

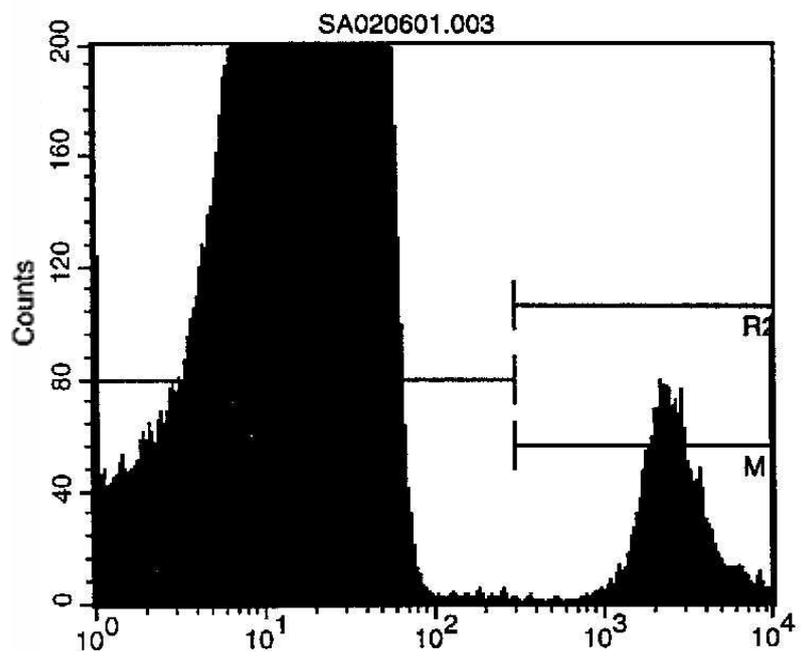
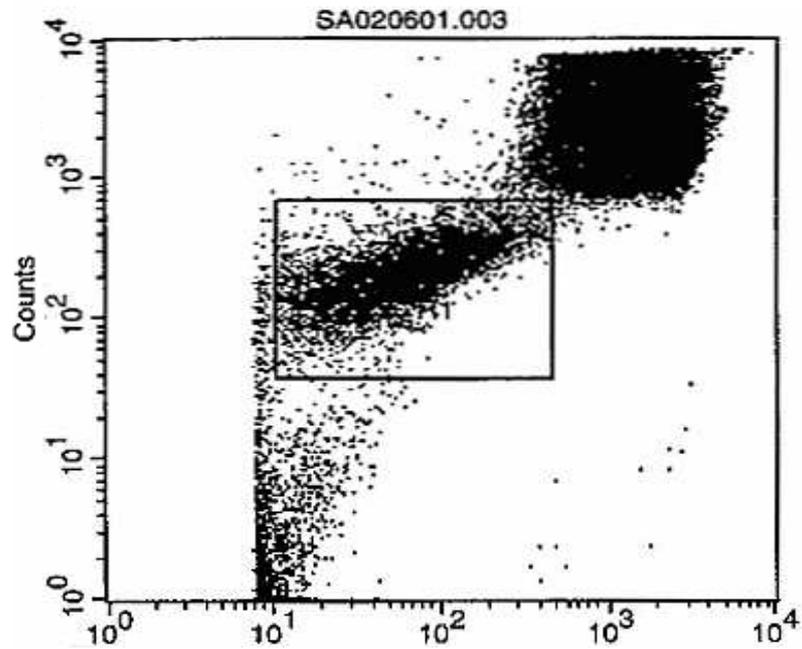
D.h. im Ganzen gesehen, ergeben sich zwei Schlußfolgerungen:

- Die Proben müssen zwischen jedem Schritt gut durchmischt werden.
- Es werden mehr Antikörper benutzt oder später vielleicht neue Titrationsreihen durchführt.

Es wurde eine Menschenblutprobe mit mehr Antikörpern versehen und zwischen jedem Arbeitsschritt gut gemischt.

Die Separation war optimal in allen Proben (fixierte und unfixierte) und die Peaks waren in allen Proben identisch. Die statistischen Werte für P-selectin (%+) waren ebenfalls identisch. In dem Plot der auf Reflexion beruhte, war die Region R1 bis auf die fixierte Kontrolle einwandfrei.

Am folgenden Tag wurde der Versuch wiederholt, um sicherzustellen, daß es sich dabei nicht um einen Zufallsbefund handelte. Die Ergebnisse am Folgetag waren ebenfalls zufriedenstellend. Zu einem späteren Zeitpunkt wurde nochmals eine Probe dieser Art durchgeführt, die ebenfalls sehr zufriedenstellend ausfiel.



Nachdem das Protokoll nun zufriedenstellend funktionierte und verwertbare Ergebnisse lieferte, wurde überlegt, ob und wie man das Protokoll aus finanzieller Sicht effektiver gestalten könnte. Weil Geld gespart werden sollte, wurde überlegt, die unter den

jetzigen Bedingungen gerade ausreichende Antikörpermenge zu bestimmen. Zusätzlich sollten auch die Volumina halbiert werden, so daß nicht mit 50 µl sondern nur noch 25 µl Blut pro Proben gearbeitet werden würde und so nochmals Antikörper gespart werden konnten.

Aus einer Probe wurden dann zwei Versuche gemacht. Zum einen wurde das Protokoll verwendet, das in den Tagen zuvor zufriedenstellend funktioniert hatte. Zum anderen wurde das veränderte Protokoll angewendet, d.h. das Bluttestvolumen auf 25µl halbiert und die Antikörper Menge auf das von der Firma empfohlene Maß zurückgebracht (von beiden Antikörpern wurden 10 µl benutzt).

Die Ergebnisse waren identisch und zufriedenstellend. Es wurde beschlossen von nun an mit dem neuen Protokoll weiter zu arbeiten. Für P-selectin sollte in Zukunft aber 15 µl pro Test verwendet werden, um auf der sicheren Seite zu sein und definitiv ausreichend Antikörper in der Probe zu haben.

Entscheidende Änderungen waren:

- regelmäßig gutes Durchmischen der Proben,
- das Probevolumen auf 25 µl reduzieren,
- Antikörper von Becton Dickinson,
- Anti CD61 10 µl und Anti CD62p 15 µl.

Das Protokoll wurde daraufhin geändert.

1. draw 3cc blood into syringe and discard
2. draw blood into a 2.7 cc vacuum tube preloaded with citrate without tourniquet (human blood has a concentration of 200.000 plat. / micro L)
3. open the tube add 2.7 cc 1% PF into the blood immediately and reseal it
4. gently shake the tube, making sure it mixes completely, fix for 30 min at room temperature – shake occasionally during fixing
5. transfer blood in 30 x 115 tube and dilute with 22cc PBS
(to get a concentration of about 20.000 plat. / micro L)
6. mix solution well gently by hand
7. remove out 3x 25 µl aliquots into each of 3 Flow Cytometry (FC) tubes
8. to the first aliquot add 15 µl of anti-P-selectin-PE
and 2.5 µl of control FITC - CONTROL
9. to the second aliquot add 10 µl of anti-CD61-FITC
and 1.8 µl of diluted control PE - CONTROL
10. to the third aliquot add 15 µl of anti-P-selectin-PE
and 10 µl of anti-CD61-FITC - SAMPLE
11. gently mix
12. wait 10 minutes for staining in darkness, mixing after 5min and at termination
13. dilute with 1ml PBS and gently mix tube
14. take 100 µl of sample and dilute in a new FC tube containing 2cc PBS
15. ready for Flow Cytometry
16. flick the tubes well before placing into Flow Cytometer

2.7.2 Negative Kontrolle – Kontrolle der Mikroaggregatbestimmung

Nachdem das Protokoll für Menschenblut gut funktionierte, stellten sich zwei neue Fragen:

- Wie sehen die Ergebnisse einer negativen Kontrolle aus, d.h. die Untersuchung des Blutes eines gesunden Freiwilligen?
- Können Mikroaggregate bestimmt werden?

Zu diesem Zweck ist Blut von einem gesunden Freiwilligen abgenommen worden und zum einen wie im Protokoll festgelegt, sofort fixiert worden und zum anderen nicht fixiert aber mit doppelt so viel Kollegen versehen worden als zuvor. Damit sollte ein hoher Prozentsatz an aktivierten Thrombozyten erhalten werden, damit die Wahrscheinlichkeit groß war, daß sich Mikroaggregate bilden.

Die negative Kontrolle fiel sehr gut aus, weniger als 1% der untersuchten Thrombozyten waren positiv bzw. aktiviert und es wurden 1,7% Aggregate gemessen.

In der extra stark aktivierten Probe waren 68% der Thrombozyten aktiviert. Es war aber erstaunlich, das in der extra stark aktivierten Probe die Verklumpung gering ausfiel mit 3,1%.

Negative Kontrolle

%+	< 1 %
% agg	1,7 %

Positive Kontrolle

%+	68 %
% agg	3,1 %

Da es in der extra stark aktivierten menschlichen Probe kaum zu Mikroaggregaten gekommen war, stellte sich die Frage, ob künstlich aktivierte Thrombozyten auf jeden Fall auch verklumpen. Es gab eine Studie [11], in der nach Aktivierung mit ADP

von 20% Aggregaten berichtet wurde. In einer anderen Studie [79] wurden die meisten Aggregate nach einer Minute gemessen. Dies wurde dann ausgetestet.

Es wurde Blut aktiviert und Proben nach 1, 2, 4 und 10 min gewonnen und fixiert. Leider waren die Ergebnisse anders als die in den Studien. Die Ergebnisse waren wie folgt:

1 min.	3 %,
2 min.	3 %,
4 min.	4 %,
10 min.	6 %.

Bezüglich der Thrombozytenaggregation sind Expertenmeinungen eingeholt worden. Zum einen machte es keinen Sinn, in nicht aktivierten Proben Thrombozytenaggregate zu messen und zum anderen schien es unverständlich, in stark aktivierten Proben kaum Aggregate bestimmen zu können. Der Thrombozytenexperte Prof. M. Kokschi von Beckman Coulter berichtete, er messe in nicht aktivierten Proben auch Aggregate. Dies bringe die Methode mit sich. Es würde in jeder Probe 1-3% Aggregate gemessen. Bezüglich der Aggregatbildung nach Agonistenaktivierung schrieb er, es könnten durchaus in künstlich aktivierten Proben mehr Mikroaggregate gemessen werden. Ein weiterer Experte, Herr Prof. W. Jeske von der Loyola University in Maywood, Illinois bestätigte ebenfalls, in nicht aktivierten Proben Aggregate gemessen zu haben. Zum Thema Aggregate in aktivierten Proben schrieb er, es sei wichtig unverdünntes Blut mit einem Agonisten zu aktivieren. Unverdünnte Blutproben waren aber bereits aktiviert worden.

Es wurde ein neuer Anlauf unternommen, Kälberblutproben zu untersuchen. Die in der Zwischenzeit vorgenommenen Änderungen am Protokoll wurden übernommen, d.h. Aktivierung mit Kollagen, gute regelmäßige Durchmischung während der Präparation und Reduzierung des Probenvolumens auf 25 µl. Die CD 62p Antikörpermenge ist erhöht worden von vorher 45 µl auf 67 µl. Bisher konnte keine Kälberblutprobe aktiviert werden. Mit der Antikörpermengenerhöhung sollte sichergestellt sein, daß ausreichend

Antikörper zur Verfügung standen. Leider verlief dieser Versuch ebenfalls negativ. Es wurde danach beschlossen, das Projekt vorerst nur auf Patienten zu beschränken. Es war nicht möglich, eine positive Probe für Kälberblut zu erhalten.

Alle Erkenntnisse bei Menschenblutproben halfen nicht beim Kälberblut. Nach der letzten Untersuchung war es sehr wahrscheinlich, daß scheinbar auch die zweite Markierungsreaktion mit PE nicht erfolgreich verlaufen war. Es wurde eine Liste für zukünftige Alternativmöglichkeiten zusammengestellt:

- die einfachste Lösung wäre, einen Hersteller ausfindig machen zu können, der bereits markierte Antikörper gegen Kälber CD62p produziert,
- nochmals Antikörper von Zymed bestellen und erneut mit dem Protein-Protein-Crosslinking Kit eine PE Markierung durchführen,
- da in der Beschreibung des Protein-Protein-Crosslinking Kit daraufhin gewiesen wurde, das freie Thiole auf den Antikörpern die Reaktion unmöglich machen, könnte vor einer erneuten PE Markierungsreaktion erst mit einem speziellen Kit getestet werden, ob sich auf den Antikörpern freie Thiole befinden,
- den Antikörper mit Biotin vormarkieren, was eine sehr gute und zuverlässige Reaktion ist und dann Biotin mit dem bereits PE markierten Streptavidin reagieren lassen (diese Reaktion verläuft von alleine),
- die letzte Möglichkeit bestand darin, einen Anti CD41/61 zu finden, der nicht von Mausezellen hergestellt worden ist, so daß mit einem bereits PE markierten Secondary Antikörper zum Anti-CD62p Antikörper gearbeitet werden konnte.

Bei dem Menschenblutprotokoll bestand immer noch das Problem, kaum Aggregate bestimmen zu können. Um die Wahrscheinlichkeit für Aggregate in einer Blutprobe zu erhöhen, ist dann eine Versuchsreihe mit doppelter Menge an Kollagen (200 µl) aktiviert und anstatt für 10 diesmal für 15 Minuten aktiviert worden. Auch das brachte nicht den erwünschten Erfolg, nur 3% Aggregate sind gemessen worden.

Um sicher zu stellen, daß die niedrigen Aggregatmessungen nicht doch etwas mit der Fixation zu tun hatten, ist nochmals eine Probe aktiviert und geteilt worden. Die eine Probe wurde fixiert, die andere nicht. Die Ergebnisse waren in beiden Proben, fixierte und unfixierte, identisch niedrig, d.h. die Fixation war nicht die Ursache für den niedrigen Prozentsatz an Aggregaten.

Da für die Entwicklung des Protokolls viel mehr Zeit benötigt worden war als erwartet, wurde begonnen, Patientenblut zu untersuchen. Es gab vom Protokoll und von der Methodik Durchflußzytometrie her nichts was bezüglich des Problems der niedrigen Aggregatmessung geändert werden konnte. Auch der beteiligte Durchflußzytometrieexperte teilte die Meinung, mit Patienten zu beginnen. Er war der Auffassung, es seien keine Aggregate im Blut vorhanden, der entwickelte Ansatz sei aber zweifelsohne fähig, Aggregate zu bestimmen. Unter Umständen konnte die Studie nur die erste Frage beantworten, ob Thrombozyten durch Kunstherzen aktiviert werden, aber nicht, ob Kunstherzen auch zur Mikroaggregatbildung beitragen. Bei allen Patienten sollten aber die Prozente für Mikroaggregate mit aufgenommen und zu einem späteren Zeitpunkt entschieden werden, ob es sinnvoll ist, die Werte mit in die Analyse einzubeziehen.

2.8 Struktur der Studie

Welche Patienten sollten untersucht und in die Studie aufgenommen werden?

Erstens sollten Patienten untersucht werden, die eine Linksherzunterstützungspumpe implantiert bekommen. Es bestand Interesse an Patienten mit TCI oder Thoratec System. Hierbei handelt es sich um zwei sehr häufig verwendete Systeme mit unterschiedlichen Oberflächenbeschaffenheiten. Das TCI ist ein System, das mit rauhen (textured surface) Blutkontaktflächen arbeitet, das Thoratec mit glatten (smooth surface). D.h. bei der Beantwortung der beiden Ausgangsfragestellungen sollte gleichzeitig untersucht werden, ob die Oberflächenbeschaffenheit des Systems einen Unterschied macht. Die zweite Gruppe sollten Patienten mit Herzklappenersatzoperation stellen. Bei den Überlegungen über die zu untersuchenden Patienten kam die Idee auf, daß bei Einbeziehung von Klappenpatienten in diese Studie gleichzeitig der Einfluß von Klappen auf Thrombozyten bestimmt werden konnte. Interessant erschien der mögliche Unterschied zwischen Patienten mit mechanischem und biologischem Klappenersatz. Der Einfluß von Klappen auf den Aktivitätszustand von Thrombozyten wurde als eher gering eingeschätzt, so daß diese Gruppe ebenfalls einen Eindruck über den Einfluß der Operation und des gesamten Prozedere auf die Thrombozyten geben sollte. Mit anderen Worten, die Differenz der Ergebnisse zwischen den beiden Gruppen sollte annähernd den Einfluß des LVAD auf Thrombozyten aufzeigen. Die dritte Gruppe stellten Patienten mit Herzinsuffizienz der NYHA Klasse III und IV. Mit dieser Gruppe sollte herausgefunden werden, welchen Einfluß der Krankheitszustand auf die Thrombozyten hat. NYHA Klasse III und IV Patienten sind Patienten, die kurz vor einer LVAD Implantation oder im glücklichen Fall vor einer Herztransplantation stehen. Als letzte Gruppe sollten gesunde Freiwillige aufgenommen werden. Zum einen konnte in dieser Gruppe erkannt werden, welchen Einfluß das Protokoll und die Präparationsschritte hatten zum anderen konnte mit dieser Gruppe ein Eindruck über die Verhältnisse in Gesunden gewonnen werden.

Wann sollte Blut von den Patienten abgenommen werden?

Es wurden vier Zeitpunkte festgelegt, an denen Blutproben von Patienten mit Kunstherz und Klappenersatz gewonnen werden sollten (vor der OP sowie 24h, 72h und 1 Woche nach der OP). Von Herzinsuffizienzpatienten und gesunden Freiwilligen sollte immer nur eine Probe abgenommen werden.

2.9 Nötige Änderungen des Protokolls im Verlauf

Nach Beginn der Studie fiel eine stärker als erwartet schwankende Thrombozytenkonzentration der Patienten auf. Mit 30 Thrombozyten pro Sekunde zu arbeiten, erschien nicht sinnvoll, weil dadurch mit teilweise sehr unterschiedlichen Gesamtereignisraten pro Sekunde gearbeitet werden mußte. Von den Gesamtereignissen sind die gemessenen Mikroaggregate aber abhängig. Je höher die Gesamtereignisse, desto höher die gemessenen Mikroaggregate. Daraufhin wurde beschlossen, immer mit 700 (+/-100) Gesamtereignissen weiter zu arbeiten, um so später bei der Auswertung die gemessenen Mikroaggregate vergleichen zu können. Da teilweise pro Probe mehr als 10 Minuten benötigt wurden, um bei 700 Gesamtereignissen pro Sekunde 10.000 Thrombozyten zu untersuchen, ist die Gesamtzahl der zu untersuchenden Thrombozyten auf 6000 pro Probe verringert worden. Der Durchflußzytometriexperte sah die Zuverlässigkeit der Ergebnisse durch diese Veränderung nicht in Gefahr.

Bei Betrachtung der ersten Ergebnisse konnte zwischen den Ergebnissen von Patienten und gesunden Freiwilligen kaum ein Unterschied erkannt werden. Da in allen Proben nur Normalwerte zu finden waren, wurde über neue Probeentnahmezeitpunkte nachgedacht. Wenn es zur Aktivierung von Thrombozyten kam, mußte dies während oder kurzzeitig nach der Operation geschehen, da nach 24h schon wieder Normalwerte gemessen wurden. Daraufhin wurden dann auch Proben während der Operation, kurzzeitig nach der Operation (bis max. 30 Minuten nach Beendigung) und 4h nach der Operation gewonnen. Nach zirka zwei Monaten wurde die kurzzeitig nach der Operation gewonnene Probe wieder abgesetzt. Die maximalen Werte ergaben sich meist während der Operation. 4h danach war ein Zeitpunkt, der interessant war, weil sich bei manchen Patienten die Werte bereits wieder normalisiert hatten, bei anderen aber nicht.

Eine Blutprobe dazwischen schien auf Dauer nicht nötig. D.h. die Studie wurde letztendlich mit folgenden Blutabnahmezeitpunkten durchgeführt:

für Gruppe III (Klappenp.), Gruppe IV (Kunstherzp.):

- vor OP,
- während OP,
- 4h nach OP,
- 24h nach OP,
- 72h nach OP,
- 1 Woche nach OP,
- dann einmal wöchentlich (falls noch im Krankenhaus);

für Gruppe I (Freiwillige), Gruppe II (NYHA III/IV)

- nur eine Probe.

Zirka 1,5 Monate nach Beginn der Studie wurde entschieden, bei jeder Blutuntersuchung immer auch eine positive Kontrolle der Blutprobe mit zu präparieren. D.h. einmal das Blut sofort nach der Abnahme mit PFA zu fixieren und zu untersuchen, gleichzeitig eine weitere Probe zu gewinnen, auf 37 °C zu halten und 10 Minuten mit Kollagen zu aktivieren und ebenfalls zu untersuchen. Dieser Zusatz schien sinnvoll, weil alle Ergebnisse bis zu dem Zeitpunkt widererwartend niedrig ausgefallen waren, auch an den nachträglich ergänzten Zeitpunkten.

Erstens wurde mit der positiven Kontrolle die Funktionstüchtigkeit der Methode bei jedem Versuch demonstriert, weil gleichzeitig neben den normalen Patientenproben und bis dahin immer sehr wenig aktivierten Proben eine klar positive, aktivierte Probe gemessen würde, d.h. das Protokoll als Ursache für die niedrigen Werte ausgeschlossen werden konnte.

Zweitens würde gezeigt, daß das Blut zur selben Zeit in einem höheren Aktivierungszustand sein könnte, als es in der eigentlichen Probe war, d.h. das Blut die Fähigkeit besitzt, aktivierter zu sein. Ferner werden mit der positiven Kontrollprobe die geringen Werte in der eigentlichen Probe bestätigt, weil das Blut bei entsprechenden Umständen in vivo mehr aktiviert worden wäre.

2.10 Ergebnis der Protokollentwicklung

- Anti-CD61-FITC zur Thrombozytenidentifizierung,
- Anti-CD62p-PE zur Aktivierungsmessung,
- Anti-Antikörper:
 - Anti-CD61-FITC, Becton Dickinson Cat.No.348093– 10 µl,
 - Anti-CD62p-PE, Becton Dickinson Cat.No.348107– 25 µl,
- Kontrollantikörper:
 - PE markierte IgG1, Isotype Kontrolle, von BD PharMingen
Cat. No.33815x 1.8 µl der 4x verdünnten Kontrolle,
 - FITC markierte IgG1, Isotype Kontrolle, von BD PharMingen
Cat. No.33814x 2.5 µl,
- Vacutaineradaptersystem mit zitratversetzten Vacuumgefäßen ,
- Blutabnahme mit 21 gauge Butterfly ohne Stauschlauch,
- Protokollansatz grundlegend nach Shattil mit Veränderungen nach Prof. Koksch,
- Sofortige Fixation des Blutes mit 1% PFA im Verhältnis 1:1 Blut:PFA für 30 min,
- PBS als Puffer,
- Blut auf 20.000 Thrombozyten pro Mikroliter verdünnen,
- PFA , PBS müssen nicht auf Körpertemperatur erwärmt werden,
- 25 µl Versuchsvolumen,
- gutes regelmäßiges Durchmischen der Proben während der Präparation,
- Proben mit 700 Gesamtereignissen pro Sekunde untersuchen,
- es werden 6000 Thrombozyten pro Probe untersucht,
- gleichzeitig wird immer eine positive Kontrolle durchgeführt,
- alle Proben sollen 1h nach Abnahme untersucht sein,
- Becton Dickinson FACScan mit Analysesoftware Cell Quest V 3.1,

Patientengruppen:

- | | |
|-------------------------------|---------------|
| 1. Freiwillige | (Gruppe I), |
| 2. NYHA III/IV | (Gruppe II), |
| 3. Herzklappenersatzpatienten | (Gruppe III), |
| 4. Kunstherzpatienten | (Gruppe IV); |

Blutabnahmen:

für Gruppe III und IV

- × vor und während OP,
- × 4h, 24h, 72h nach OP,
- × nach einer Woche und danach einmal wöchentlich;

für Gruppe I und II

- × nur eine Probe.

In Protokollform :

1. draw 3cc of blood for discard__
2. draw blood into both 2.7cc vacuum tubes preloaded with citrate without
tourniquet __ (human blood has a concentration of 200.000 plat. / micro L)
3. put the first tube into the water container until arriving in the lab__
4. open the second tube add 2.7 cc 1% PF into the blood immediately and
reseal it__
5. gently shake the second tube, making sure it mixes completely, fix for 30 min
at room temperature – shake occasionally during fixing__
6. 15 min after drawing start to prepare the positive Control
7. transfer 50 µl Collagen at 37 °C into a Flow Cytometry (FC) tube__
8. shake the first tube and transfer 50 µl blood to the Collagentube__
9. keep the tube for 10 min at 37 °C in the water bath__,
shake occasionally during that time__
10. take four new FC tubes and transfer 2cc PBS into each__
11. after 10 min take the Collagentube out of the water bath and add 200cc PBS__
(to get a concentration of about 20.000 plat. / micro L)
12. after 30 min fixation shake the tube,
transfer blood in 30 x 115 tube and dilute with 22cc PBS __
(to get a concentration of about 20.000 plat. / micro L)

13. mix both tubes well gently by hand__
14. remove out of the tube from step 11. two 25 μ l aliquots, transfer one in the Control FC tube and the other in the sample FC tube__ positive control sample
15. remove out of the tube from step 12. two 25 μ l aliquots, transfer one in the Control FC tube and the other in the sample FC tube__ real patient sample
16. to the first aliquots (control tubes) add 10 μ l of anti-CD61-FITC__
and 1.8 μ l of diluted control PE __ - CONTROL
17. to the second aliquots (sample tubes) add 15 μ l of anti-P-selectin-PE__
and 10 μ l of anti-CD61-FITC __ - SAMPLE
18. gently mix __
19. wait 10 minutes for staining in darkness, mixing after 5min__ and
at termination__
20. dilute each FC tube with 1ml PBS and gently mix tube __
21. ready to go down to the Flow Cytometer
22. run the sample at about 700 events/sec (+/- 150) and collect 6000 platelets
(area R1) for each sample
23. flick the tubes well before placing into Flow Cytometer

2.11 Untersuchungsparameter

Pro Patientenblutprobe sind jeweils vier unterschiedliche Parameter mit dem Durchflußzytometer untersucht worden. Die Ergebnisse basieren immer auf 6000 untersuchten Thrombozyten pro Probe.

Prozent positive, aktivierte Thrombozyten (%+)

Dieser Wert wurde direkt vom Durchflußzytometer angegeben. Er gab an wie viel Prozent der 6000 untersuchten Thrombozyten aktiviert waren.

Prozent positive, aktivierte Thrombozyten der positiven Kontrolle (%+ pC)

Dieser Wert ist vom Prinzip der selbe wie %+ . Der Unterschied besteht in der Probe, die untersucht wurde. Dieser Wert wurde in der positiven Kontrollprobe bestimmt. D.h. dieser Wert gibt wiederum an wie viel Prozent der 6000 untersuchten Thrombozyten aktiviert waren, nur das die Probe zuvor für 10 Minuten mit Kollagen aktiviert worden war.

Prozent aggregierte Thrombozyten (% agg)

Dieser Wert wurde nicht direkt vom Durchflußzytometer geliefert. Das Durchflußzytometer gab an, wie viel der 6000 untersuchten Thrombozyten einzelne Thrombozyten waren und bei wie vielen es sich um verklumpte handelte. Aus diesen beiden Werten wurde dann der Prozentsatz an verklumpten Thrombozyten errechnet.

Prozent aggregierte Thrombozyten der positiven Kontrolle (%agg pC)

Bei diesem Wert handelt es sich im Prinzip um den selben Wert wie % agg, nur das dieser wie schon bei %+ pC in der vor der Präparation mit Kollagen aktivierten Blutprobe gemessen wurde.

2.11.1 Wie beantworten die Parameter die Fragestellungen?

Die zu beantwortenden Fragen lauten:

1. Werden Thrombozyten durch eine Kunstherzpräsenz aktiviert?
2. Kommt es daraufhin zur Mikroaggregatbildung?

Frage eins wird durch den Parameter %+ beantwortet, die zweite Frage durch den Parameter % agg. %+ pC und %agg pC sind Parameter die zur Datenvalidierung aufgenommen wurden.

2.11.2 Andere Parameter

Neben den erklärten Durchflußzytometrie-Parametern wurden auch -andere Parameter erfaßt, die die Thrombozytenaktivität beeinflussen könnten. Die -anderen Parameter sollten ermöglichen, die Ursache für aktivierte Thrombozyten ausfindig zu machen, falls eine kunstherzunabhängige Ursache zugrunde liegen sollte. In wie weit diese Parameter später mit in die Analyse einbezogen würden, sollte nach Abschluß der Studie entschieden werden.

Für jeden Patienten wurde die Ausgangserkrankung festgehalten. Bei den Patienten der Gruppe IV ebenfalls die Zeit, die zwischen Implantationsbedarfsfeststellung und Unterstützungssystemimplantation vergangen war. Von allen Patienten bzw. Freiwilligen wurden die aktuelle Medikation mit Thrombozyteneinfluß wie Acetylsalicylsäure, Heparin, Phenprocoumon, etc. aufgenommen. Aktuelle und Vorerkrankungen wie zum Beispiel Diabetes mellitus, Nieren und Lebererkrankungen und hämatologische Erkrankungen wurden ebenfalls erfaßt.

Von der Operation wurden folgende Parameter mit aufgenommen. Die Operationsdauer, die Gesamtzeit, die der Patient an die Herz-Lungen-Maschine angeschlossen war und die Temperatur, auf die das Blut während dessen gekühlt wurde. Außerdem wurden verabreichte Medikamente und Blutprodukte wie platelet rich plasma, frish frozen plasma u.a. notiert.

Im postoperativen Zeitraum wurden die Nieren und Leberfunktion beobachtet und die verabreichten Arzneimittel notiert.

Über den gesamten Zeitraum bzw. für die Patienten der Gruppe I und II nur einmalig wurden alle Werte des Routinelabors aufgenommen.

Ein besonderes Interesse bestand an der Thrombozytenanzahl. Es ist bekannt, daß die Verwendung von Herz-Lungen-Maschinen zu einem Verlust von Thrombozyten und einer Verdünnung des Blutes führt. Niedrige Thrombozytenzahlen nach einer Operation können Ursache für Blutungsprobleme sein. Blutungen nach Herz-Lungen-Maschinen Operationen sind bekannt [14, 46, 124, 127, 129].

2.12 Statistik

Nach Rücksprache mit dem Institut für Medizinische Informatik und Biomathematik der Westfälischen Wilhelms-Universität wurden zur Beschreibung und Beurteilung der Daten folgende statistische Methoden angewendet:

Anzahl der Patienten, Minimal-, Maximal- und Mittelwert, Standardabweichung, Boxplot, KRUSKAL-WALLIS-Test und Excelgraphen.

Die Mittelwerte und Standardabweichungen sind mit Microsoft Excel 7.0 errechnet worden. Die Standardabweichung stellt den standard error of the mean (SEM) dar. Mit Hilfe von Boxplots wird die Verteilung der Werte im Gruppenvergleich visualisiert. Der KRUSKAL-WALLIS-Test zeigt statistisch signifikante Unterschiede zwischen den vier unterschiedlichen Untersuchungsgruppen auf. Ein Test ist signifikant, wenn der p -Wert < 0.05 ist. Die Erstellung der Boxplots und die Berechnungen des KRUSKAL-WALLIS-Test wurde mit dem Programm SPSS 10.0 für Windows durchgeführt. Mit Excelpunktliniendiagrammen wird der zeitliche Verlauf der Werte der operierten Patienten dargestellt.

Die Studie ist vor Beginn durch die lokale Ethikkommission (IRB) genehmigt worden.

3 ERGEBNISSE

3.1 Patientencharakteristika

Zur Auswertung liegen die Daten von 45 Patienten bzw. Freiwilligen vor. Alle Beteiligten waren nach den von der Ethikkommission genehmigten Kriterien ausgewählt worden und alle gaben vor Beginn ihr schriftliches Einverständnis zur Durchführung der Studie.

3.1.1 Gesunde Freiwillige

Von den 45 Patienten waren zwölf gesunde Freiwillige. Die Freiwilligen waren alle Mitarbeiter des Milton S. Hershey Medical Centers in Hershey, Pennsylvania, USA. Es sind von sechs Freiwilligen neben den %+ und % agg Werten auch positive Kontrollen, %+ pC und %agg pC gewonnen worden.

3.1.2 Herzinsuffizienzpatienten

13 Herzinsuffizienzpatienten sind in die Studie aufgenommen worden. Von zehn dieser Patienten konnten positive Kontrollen gewonnen werden. Bei zwei Patienten kam es zu Schwierigkeiten bei der Blutabnahme. Aufgrund des schlechten allgemeinen Venenzustands war es schwer, die Venen zu punktieren und Blut ohne Stauschlauch zu gewinnen. In einem Fall sind die Ergebnisse eindeutig negativ beeinflusst worden, so daß die Werte nicht mit in die Auswertung übernommen wurden. Die 13 Patienten sind ambulante Patienten in der Abteilung für Kardiologie des Milton S. Hershey Medical Centers gewesen.

3.1.3 Klappenpatienten

Von den 14 untersuchten Klappenpatienten konnten von sieben positive Kontrollen gewonnen werden. Auch in dieser Gruppe kam es bei einem Patienten zu Schwierigkeiten bei der Blutabnahme, so daß die Werte ebenfalls vor der Analyse entfernt worden sind.

3.1.4 Kunstherzpatienten

Insgesamt wurden sechs Kunstherzpatienten untersucht. In die Studie konnten nicht mehr Patienten aufgenommen werden, da in der Datenerhebungsphase nur wenig Patienten eine VAD Implantation benötigten. Fünf erhielten ein TCI Heartmate Kunstherz, einer ein Thoratec Kunstherz. Einer der TCI Patienten hatte vor der Operation bereits einen Abiomed™ VAD implantiert. Von diesem Patienten ist erstmalig 24h nach der Operation Blut abgenommen worden, um so den Einfluß des Abiomed™ VAD möglichst auszuschließen. Einer der fünf TCI Patienten hatte das Kunstherz bereits 30 Wochen implantiert. Von diesem Patienten konnten drei Proben gewonnen werden (30, 31 und 33 Woche nach Implantation). Vom ersten Kunstherzpatienten konnte erstmalig zum Zeitpunkt 72h eine positive Kontrollprobe gewonnen werden. Bei allen anderen konnten zu jedem Abnahmezeitpunkt positive Kontrollen gewonnen werden. Alle Patienten der Gruppe III und IV sind in der Abteilung für Herz-, Thoraxchirurgie des Milton S. Hershey Medical Centers operiert worden.

3.2 Ergebnisse

Das Durchflußzytometer gab die Ergebnisse mit zwei Dezimalen an. Diese Werte wurden in den Grafiken verwendet. Wie im Diskussionsteil noch erläutert wird, wurden die Werte später auf ganze Zahlen gerundet (siehe Wertetabellen).

3.2.1 Gesunde Freiwillige – Gruppe I

Die Ergebnisse für die Gruppe der Freiwilligen für den Wert Prozent aktivierte Thrombozyten (%+) sind sehr einheitlich, $1 \pm 0,62\%$. Bei den positiven Kontrollen (%+ pC) ist das anders. Die Werte sind in einem größeren Rahmen gestreut. Der Durchschnittswert liegt bei $56 \pm 21,36\%$. Der Prozentsatz an aggregierten Thrombozyten (%agg) ist wiederum sehr einheitlich. Der Mittelwert liegt bei $2 \pm 0,32\%$. Die positiven Kontrollen für Mikroaggregate (%agg pC) liegen im Schnitt bei $4 \pm 1,33\%$.

Wertetabelle der Freiwilligen in Gruppe I

Jede Zeile ist ein Patient

Gruppe I	%+	%+ pC	% agg	%agg pC
	0		2	
	1		2	
	0		1	
	0		1	
	1		2	
	1		2	
	0	39	2	4
	1	35	1	3
	1	52	1	3
	1	88	1	3
	2	46	2	4
	1	76	1	6
MAX	2	88	2	6
MIN	0	35	1	3
AVER	1	56	2	4
SEM	0,62	21,36	0,32	1,33

3.2.2 Herzinsuffizienzpatienten – Gruppe II

Für den Parameter %+ liegen der Mittelwert bei $1 \pm 1,05\%$. Bei einem Patienten kommt es zu einem deutlich überdurchschnittlichen Wert von 7% aktivierten Thrombozyten, weil sich Schwierigkeiten bei der Blutabnahme ergeben hatten, so daß es sich um den Datensatz handelt, der von der Analyse ausgenommen wurde. Die Werte für %+ pC sind breiter gestreut. Der Mittelwert liegt bei $73 \pm 11,87\%$. Für % agg liegt der Mittelwert bei $2 \pm 1,30\%$. Hier gibt es einen Patienten, bei dem 6% Mikroaggregate gemessen wurden. Die Blutabnahme war in diesem Fall einwandfrei verlaufen, so daß der Wert in die Bewertung mit einfloß. Der Mittelwert der positiven Kontrollen (%agg pC) liegt bei $3 \pm 1,94\%$. Hier kommt es zweimal zu überdurchschnittlich hohen Werten von 5% und einmalig von 8% Aggregaten bei standardmäßigen Blutabnahmen und Untersuchungen.

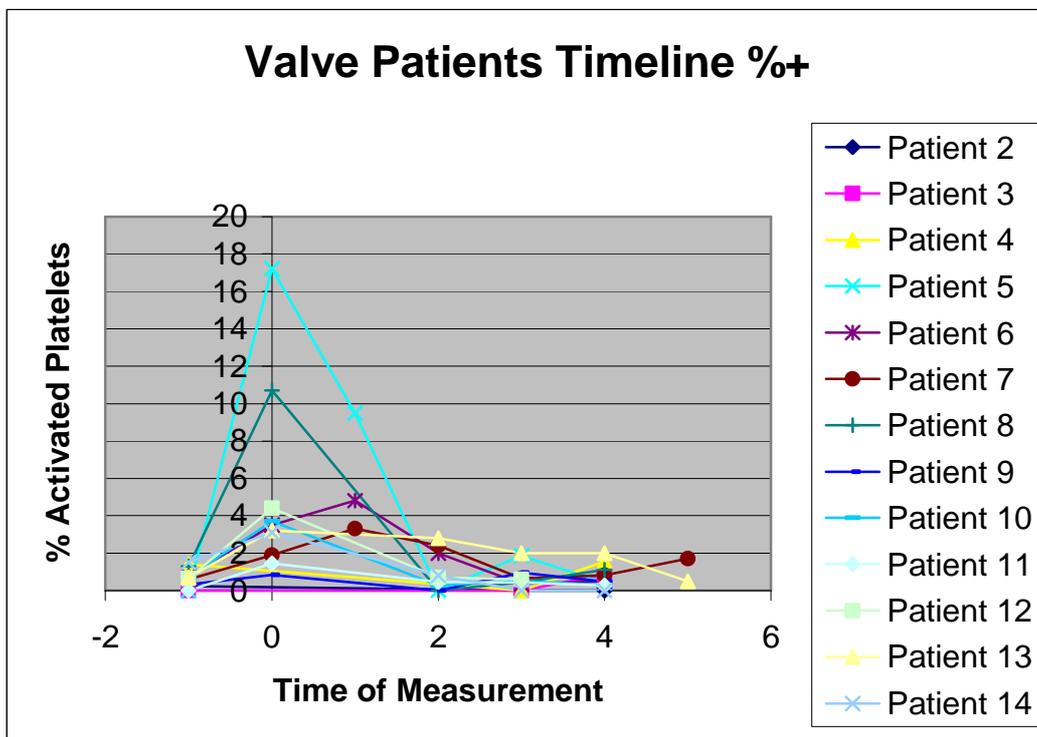
Wertetabelle der Patienten in Gruppe II

Jede Zeile ist ein Patient

Gruppe II	%+	%+ pC	% agg	%agg pC
	3		2	
	0		1	
	1		2	
	2	91	1	5
	1	83	2	4
	1	86	2	8
	0	71	1	5
	0	69	6	2
	0	59	1	3
	2	64	0	2
	7	86	1	1
	1	66	1	2
	0	59	1	2
MAX	7	91	6	8
MIN	0	59	0	1
AVER	1	73	2	3
SEM	1,05	11,87	1,30	1,94

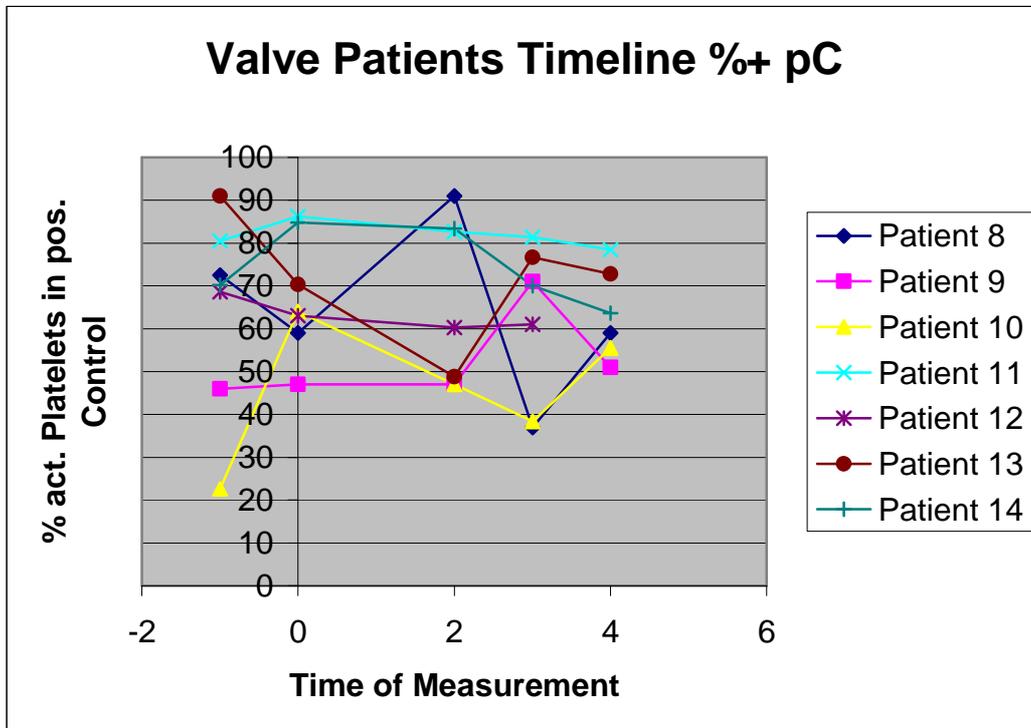
3.2.3 Klappenpatienten – Gruppe III

Die Werte für %+ sind sehr unterschiedlich. Es gibt fünf Patienten deren Thrombozyten durch die Operation kaum beeinflusst werden. Die Werte liegen zu allen Zeitpunkten bei maximal 2%. Bei sechs Patienten kommt es zu einem vorübergehenden Anstieg auf zirka 4% aktivierte Thrombozyten. Diese Werte werden während oder kurz nach der Operation erreicht. Sie normalisieren sich bis zur 24h Probe immer wieder. Bei zwei Patienten ist es -während der Operation- zu sehr hohen Werten gekommen. Patient sieben hatte 11% und Patient vier sogar 17% aktivierte Thrombozyten. Auch hier bestehen bereits 24h nach der Operation wieder Normalwerte. Der Patient eins dieser Gruppe ist später von der Analyse ausgeschlossen worden, weil die 24h Probe nicht gut untersucht werden konnte und die 72h Probe aufgrund von Blutabnahmeproblemen verfälscht wurde. Für den Parameter %+ liegt der Mittelwert über alle Meßzeitpunkte bei $2 \pm 3,79\%$.

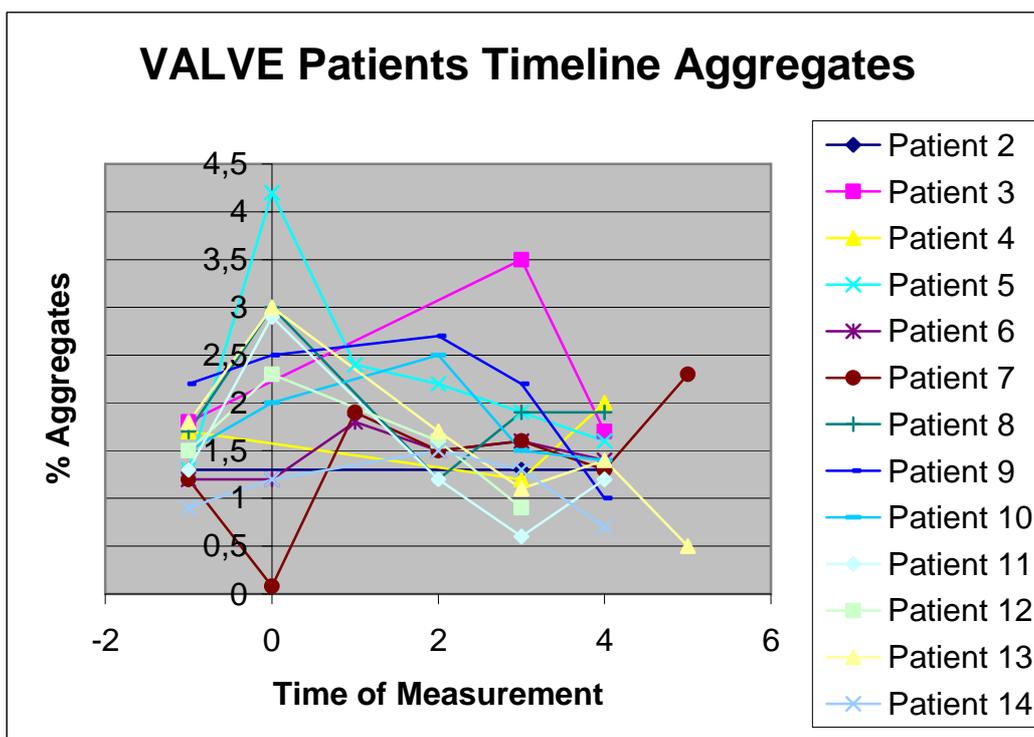


(Die X-Koordinaten in dieser und in allen folgenden Grafiken stehen für die folgenden Meßzeitpunkte -1=vor OP, 0=während der OP, 1=kurz nach OP, 2=4h, 3=24h, 4=72h, 5=1Woche, 6=2Wochen, 7=3Wochen, 8=4Wochen nach OP.)

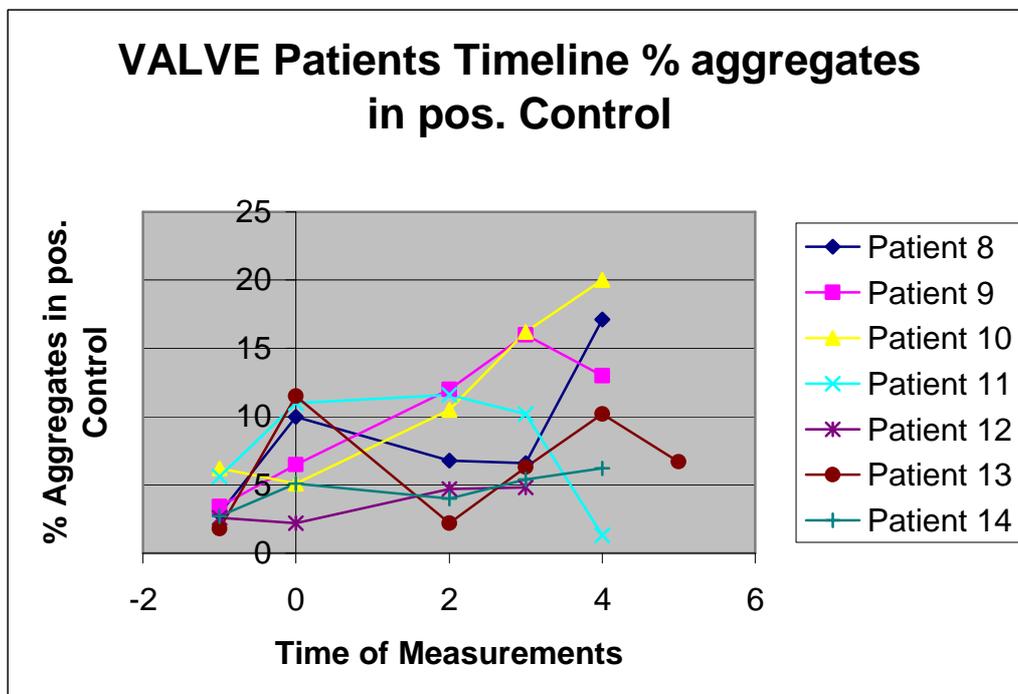
Die %+ pC Werte sind breit gestreut. Der Mittelwert liegt bei $66 \pm 16,72\%$. Die Graphik verdeutlicht, daß keine Regelmäßigkeit in den Daten erkennbar ist.



Die %agg Werte sind uneinheitlich über die Untersuchungszeit. Der Mittelwert liegt über alle Zeitpunkte bei $2 \pm 1,05\%$.



Der Verlauf der %agg pC ist auffällig. Besonders während und nach der Operation kommt es zu deutlichen Wertanstiegen. Der Maximalwert liegt bei 20% Aggregaten in der mit Kollagen aktivierten positiven Kontrolle. Patient sieben ist der erste Patient, bei dem ab dem Zeitpunkt eine Woche nach der Operation positive Kontrollen durchgeführt worden sind. Zu diesem Zeitpunkt sind 17% Aggregate gemessen worden. Bei Patient acht kommt es unter der Operation zu 10% Aggregaten. In der 4h und 24h Probe fallen die Werte auf 7% ab. Zur 72h Probe steigt der Wert wieder auf 17% an. Patient neun hat von der Operation an immer steigende Werte bis zur 24h Probe mit 16%. Bei der folgenden Probe (72h) fällt der Wert wieder leicht auf 13% ab.



Die %agg pC Werte des Patienten zehn steigen nach der Operation an. Der Maximalwert von 20% aggregierten Thrombozyten wird in der letzten Probe nach 72h gemessen. Bei Patient elf kommt es während der Operation zu 11% Aggregaten. Dieser Wert hält sich bis zur 24h Probe und fällt dann bis zur 72h Probe auf 1% ab. Vor der Operation sind bei Patient zwölf 3% und während der Operation 2% aggregierte Thrombozyten gemessen worden. Nach der Operation steigen die Werte dann

auf 5% an. Patient 13 erreicht während der Operation 12% Aggregate. Die Werte normalisieren sich zügig, steigen dann aber wieder stark zur 72h Probe auf 10% an. Der Verlauf des letzten Patienten ist eher unauffällig. Während der Operation sind 5% Aggregate gemessen worden. Dieser Wert wird über alle folgenden Meßzeitpunkte fast konstant gehalten. Der Mittelwert über alle Zeitpunkte hinweg liegt bei $8 \pm 4,99\%$.

Bei Betrachtung der Thrombozytenanzahl ist ein typischer Verlauf für Herz-Lungen-Maschinen-Operationen (siehe folgende Tabelle Spalte plateletcount) zu sehen. Während und nach der Operation kommt es zu einem Abfall der Thrombozytenanzahl. Da die Patienten immer nur einige Tage nach der Operation im Krankenhaus blieben, konnte nicht beobachtet werden, wie lange es dauerte, bis wieder Normalwerte erreicht wurden.

Wertetabelle der Patienten in Gruppe III

Jeder Block entspricht einem Patienten

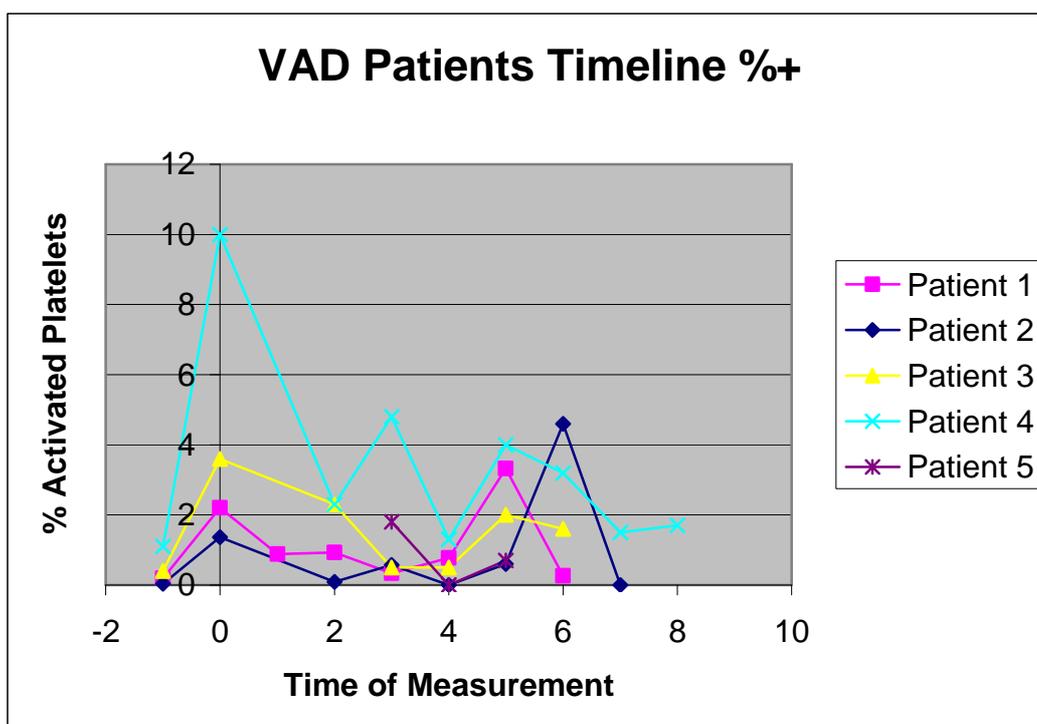
Klappentyp	Sample	plateletcount	%+	%+ pC	% agg	%agg pC
HandcockBiop.	preOP	197	2		2	
	24h		1		8	
	72h		23		4	
Tissue valve	preOP	268	0		1	
	24h		0		1	
	72h		0		1	
Carbomedicus	preOP		0		2	
	24h		0		4	
	72h		1		2	
Carpentier-Edwa.	preOP	186	1		2	
	24h		0		1	
	72h		2		2	
St. Jude	preOP	352	0		1	
	durOP		17		4	
	shafOP		10		2	
	4h		0		2	
	24h		2		2	
	72h		0		2	

Klappentyp	Sample	plateletcount	%+	%+ pC	% agg	%agg pC
Baxter Tissue	preOP	149	1		1	
	durOP		4		1	
	shafOP		5		2	
	7h		2		2	
	24h		0		2	
	72h	110	1		1	
Baxter Tissue	preOP	167	1		1	
	durOP		2		0	
	shafOP	102	3		2	
	5h		2		2	
	24h		1		2	
	72h	83	1		1	
	1w	80	2	73	2	17
SJM	preOP	279	1	73	2	3
	durOP		11	59	3	10
	4h		0	91	1	7
	24h		0	37	2	7
	72h		1	59	2	17
Baxter Tissue	preOP	188	0	46	2	3
	durOP		1	47	3	7
	4h		0	47	3	12
	24H	36	1	71	2	16
	72h	44	0	51	1	13
Carbomedicus	preOP	229	1	23	2	6
	durOP		4	64	2	5
	4h	127	0	47	3	11
	24h		1	38	2	16
	72h	104	0	56	1	20
EdwardsLifeTis.	preOP	170	0	81	1	6
	durOP		1	86	3	11
	4h	115	0	83	1	12
	24h		0	81	1	10
	72h	144	0	78	1	1
EdwardsLifeTis.	preOP	176	1	69	2	3
	durOP		4	63	2	2
	5h		1	60	2	5
	24h		1	61	1	5
SJM	preOP	150	1	91	2	2
	durOP		3	70	3	12
	4h	110	3	49	2	2
	24h		2	77	1	6
	72h	74	2	73	1	10
	1w	143	1	88	1	7

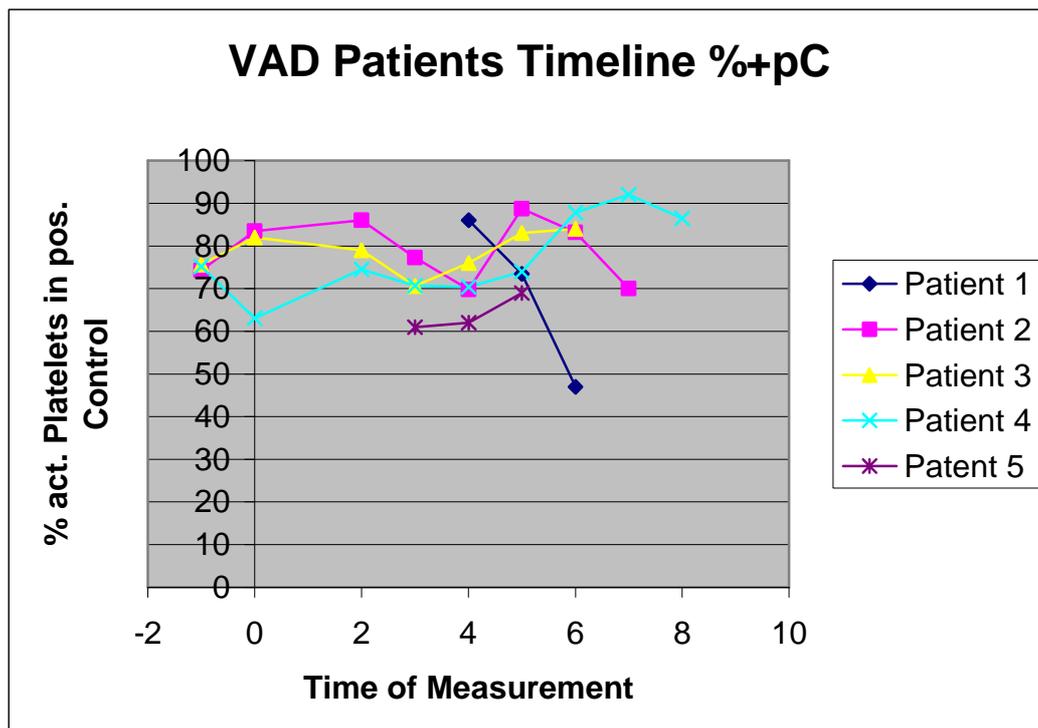
Klappentyp	Sample	plateletcount	%+	%+ pC	% agg	%agg pC
Tissue	preOP	122	2	70	1	3
	durOP		3	85	1	5
	4h	48	1	83	2	4
	24h		0	70	1	5
	72h	54	0	64	1	6
		MAX	23	91	8	20
		MIN	0	23	0	1
		AVER	2	66	2	8
		SEM	3,79	16,72	1,05	4,99

3.2.4 Kunstherzpatienten – Gruppe IV

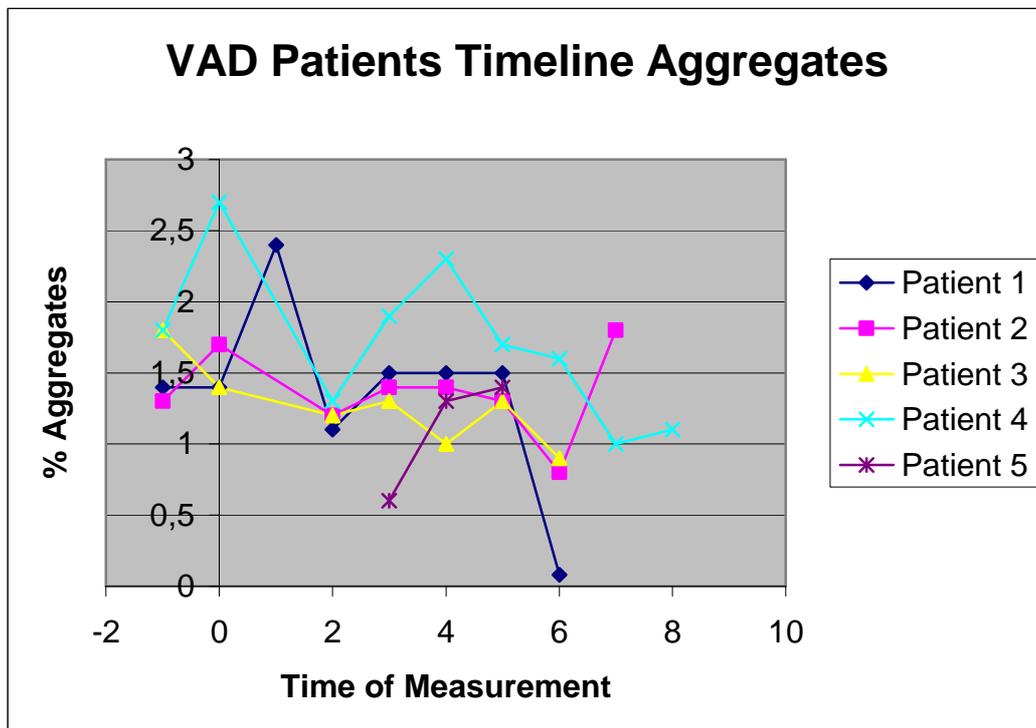
Bei den ersten beiden VAD Patienten ist es kaum zu meßbaren Einflüssen auf die Plättchenaktivität (%+) während der Operation gekommen. Der VAD Patient eins erreicht eine Woche nach der Operation den höchsten Wert für %+ von 3%. Zu allen Zeitpunkten vorher liegen die Werte niedriger. Der VAD Patient zwei erreicht den höchsten Wert über die gesamte Untersuchungszeit von 5% aktivierten Thrombozyten zwei Wochen nach der Operation. Bei Patient drei kommt es zu einem Anstieg auf 4% unter der Operation. Danach normalisiert sich der %+ Wert. Eine Woche nach der Operation kommt es bei Patient drei dann aber wieder zu einem geringen Anstieg auf 2%. Bei Patient vier sind während der Operation 10% der Thrombozyten aktiviert. Der Wert der 4h Probe ist fast wieder normal (2%), wo hingegen wieder 5% in der 24h Probe gemessen werden. Bis zur 72h Probe hat sich der %+ Wert wieder auf 1% normalisiert. Eine Woche nach der Operation kommt es erneut zu einem Anstieg auf 4%. Die %+ Werte für den Patienten sechs (30 Wochen nach Implantation; nicht in der Grafik enthalten) und den Patienten dem zuvor bereits ein Abiomed™ VAD (Patient 5) implantiert worden war, sind niedrig. Beide überschreiten 2% aktivierte Thrombozyten nicht. Der Mittelwert für %+ liegen über alle Zeitpunkte bei $2 \pm 1,90\%$.



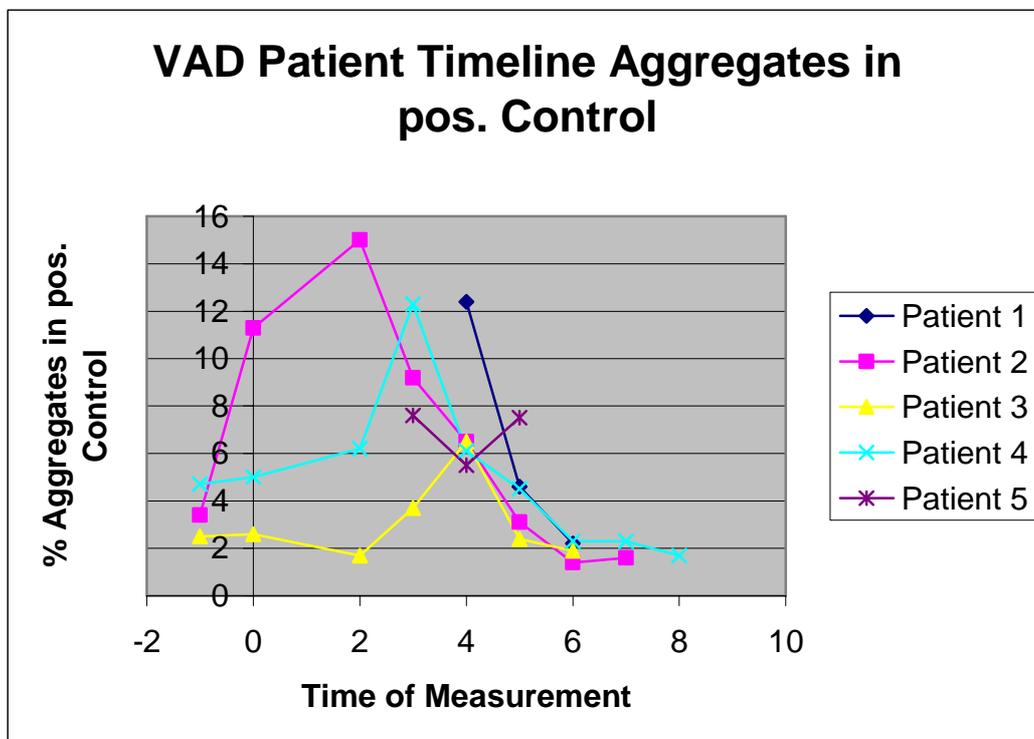
Die %+ pC Werte sind wie in allen anderen Gruppen ebenfalls sehr breit gestreut. Der Mittelwert liegt bei $76 \pm 9,48\%$. Bei dem VAD Patienten zwei fallen der Werte für %+ pC vom Zeitpunkt 4h stetig ab. Zum Zeitpunkt eine Woche steigt der Wert sprunghaft wieder von vorher 70% auf 89% an. Auch bei Patient drei kommt es zu einem erneuten Anstieg der %+ pC Werte ab Zeitpunkt 72h auf über 80%, obwohl die Werte zuvor nach der Operation stetig bis auf 71% gefallen sind. Patient vier erreicht seinen Spitzenwert für %+ pC nach drei Wochen. Nach der Operation fallen die Werte und ab Zeitpunkt eine Woche nach der Operation steigen sie wieder an. Sie steigen auf höhere Werte an als zum Zeitpunkt während der Operation (durOP 63%, 2w 88%, 3w 92%, 4w 87%). Bei Patient fünf (Abiomed™ VAD vor der TCI Implantation) und sechs (30 Wochen) kommt es über die Untersuchungszeit jeweils zu einem Anstieg der %+ pC Werte (Patient 5 von 61% auf 69%, Patient 6 von 68% auf 78%).



Die % agg Werte sind uneinheitlich über die gesamte Untersuchungszeit aber insgesamt im Normalbereich für diese Methode. Der Mittelwert % agg liegt bei $1 \pm 0,48\%$ für diese Gruppe.



In den %agg pC Werten wird bei drei Patienten ähnliches wie bei den Klappenpatienten gesehen. Es kommt während und nach der Operation zu erhöhten Werten über 10% Aggregaten. Patient drei und vier zeigen einen dazu ungewöhnlichen Verlauf. Während und nach der Operation ergeben sich ausschließlich Normalwerte. Bei der 72h Probe von Patient drei kommt es dann aber zu einem Anstieg auf 7% bzw. bei Patient vier zum Zeitpunkt 24h zu 12% Aggregate. Für Patient fünf (Abiomed™ VAD vor der TCI Implantation) kann der Verlauf nicht gut beurteilt werden, weil die erste Probe nach 24h gewonnen wurde. Es werden erhöhte Werte erreicht von jeweils 8% 24h und eine Woche nach Operation. Der Mittelwert liegt insgesamt bei $5 \pm 3,58\%$.



Der Thrombozytenzahlverlauf ist hier ebenfalls typisch für Herz-Lungen-Maschinen-Operationen. Ein drastischer Abfall nach der Operation ist klar zu sehen. Bei Patient eins kommt es zwei Wochen nach der Operation zu einem überhöhten Wert (Werte siehe Tabelle).

Wertetabelle der Patienten in Gruppe IV

Jeder Block entspricht einem Patienten

Kunstherz	Sample	plateletcount	%+	%+ pC	% agg	%agg pC
TCI	preOP	229	0		1	
	durOP		2		1	
	shafOP		1		2	
	4h	98	1		1	
	24h	101	0		2	
	72h	86	1	86	2	12
	1w	288	3	74	2	5
	2w	507	0	47	0	2
TCI	preOP	180	0	74	1	3
	durOP		1	84	2	11
	4h	95	0	86	1	15
	24h	112	1	77	1	9
	72h	124	0	70	1	7
	1w	260	1	89	1	3
	2w		5	83	1	1
	3w	227	0	70	2	2
TCI	preOP	275	0	76	2	3
	durOP		4	82	1	3
	4h	79	2	79	1	2
	24h	122	1	71	1	4
	72h	132	1	76	1	7
	1w	188	2	83	1	2
	2w	492	2	84	1	2
	Thoratec	preOP	113	1	75	2
durOP			10	63	3	5
4.5h		53	2	75	1	6
24h		97	5	71	2	12
72h		84	1	70	2	6
1w		74	4	74	2	5
2w		204	3	88	2	2
3w		230	2	92	1	2
TCI	24h	84	2	61	1	8
	nach	72h	158	0	62	1
Abiomed	1w	79	1	69	1	8
TCI	30w	162	2	68	1	2
	31w	139	1	71	1	4
	33w	135	1	78	1	2
		MAX	10	92	3	15
		MIN	0	47	0	1
		AVER	2	76	1	5
		SEM	1,90	9,48	0,48	3,58

3.2.5 Andere Parameter

Die -anderen Parameter- werden nicht einzeln aufgeführt. Sie können nur geringen Einfluß haben, weil die beschriebenen Ergebnisse für die vier Durchflußzytometrieparameter niedrig ausfallen. Das Institut für Medizinische Informatik und Biomathematik der Westfälischen Wilhelms Universität stellte fest, es sei statistisch nicht möglich so viele unterschiedliche und unabhängige Parameter zu analysieren. Die Analyse sollte auf die vier Hauptparameter konzentriert werden.

3.3 Explorative Analyse

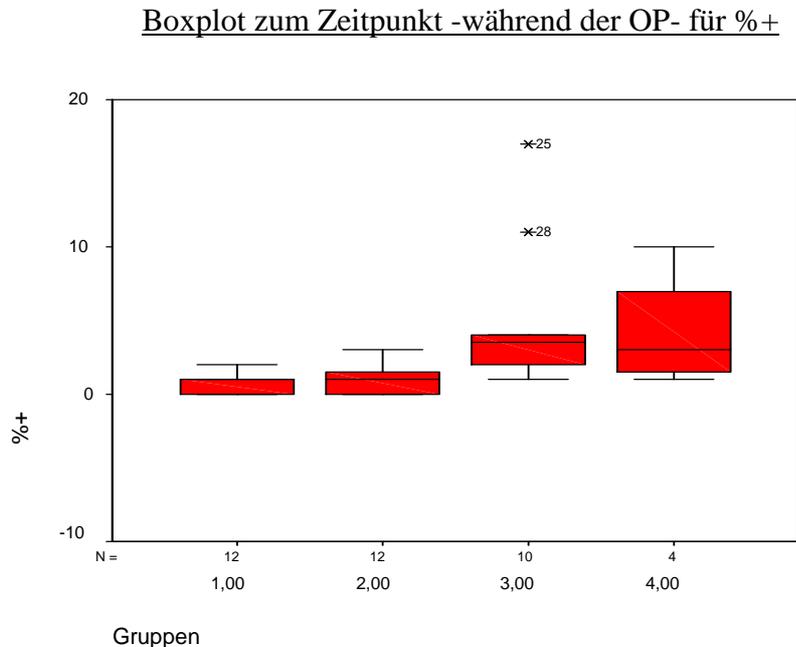
Die folgende explorative Analyse konzentriert sich ausschließlich auf die vier Durchflußzytometrieparameter. Damit mit den vorliegenden Daten Aussagen über den Einfluß von Kunstherzen auf Thrombozyten gemacht werden können, werden die Parameter der Gruppe III und IV parameter- und meßzeitpunktbezogen mit denen der Gruppe I und II verglichen. So kann der Einfluß der Kunstherzen, der Operation sowie der Klappen analysiert werden.

3.3.1 Zeitraum bis 72h

Bis zum Zeitpunkt 72h gibt es Daten in Gruppe III und IV. Für die Messungen nach dem Zeitpunkt 72h gibt es keine Daten von Gruppe III mehr, weil die Klappenpatienten in der Regel nach vier bis fünf Tagen das Krankenhaus verlassen haben. In Gruppe I und II gibt es pro Patient ohnehin nur eine Messung. D.h. die Daten des Meßzeitraums -vor Operation- bis 72h wurde mit dem KRUSKAL-WALLIS-Test und Boxplots meßzeitpunktspezifisch und parameterbezogen im Gruppenvergleich untersucht.

3.3.1.1 Prozent aktivierte Thrombozyten (%+)

Zum Zeitpunkt -während der OP- ist im Boxplot eine Signifikanz erkennbar. Auch der KRUSKAL-WALLIS-Test ist zu diesem Zeitpunkt positiv ($p = 0,001$).



Wie deutlich zu erkennen ist, gibt es einen signifikanten Unterschied zwischen den beiden nicht operierten Gruppen (I, II bzw. 1,00 und 2,00) und den operierten (III, IV bzw. 3,00 und 4,00) zum Zeitpunkt -während der Operation-. Gruppe III und IV bzw. I und II untereinander verglichen, weisen keinen Unterschied auf. Die Werte der Gruppe IV sind breiter gestreut. Alle Werte außer zwei Ausreißer der Gruppe III befinden sich in Streuungsrahmen der Gruppe IV.

Für den %+ Parameter kommt es zu keinem anderen Zeitpunkt zu statistisch signifikanten Unterschieden.

3.3.1.2 Prozent aktivierte Thrombozyten positive Kontrolle (%+ pC)

Für den %+ pC Parameter kann zu keinem Zeitpunkt ein statistisch, signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen ermittelt werden.

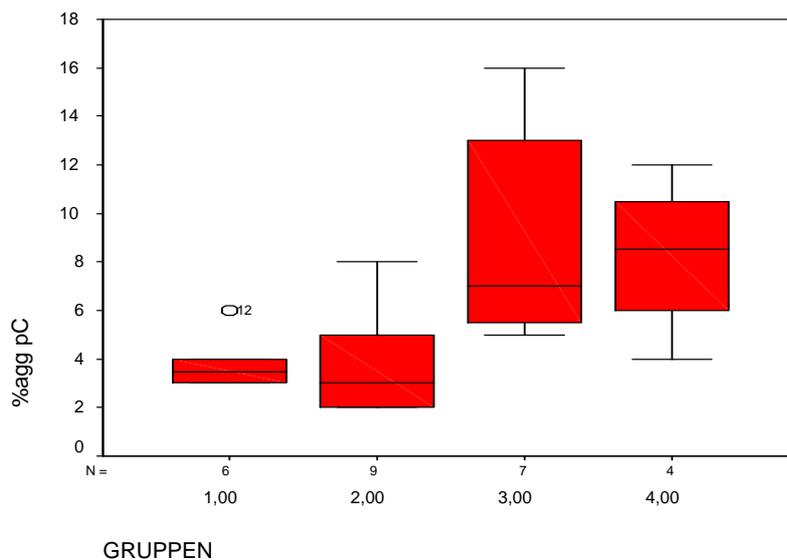
3.3.1.3 Prozent Aggregate (% agg)

Auch für den Parameter Prozent an aggregierten Thrombozyten (% agg) kann im Vergleich unter den vier Gruppen an allen gewählten Zeitpunkten keine statistische Signifikanz festgestellt werden.

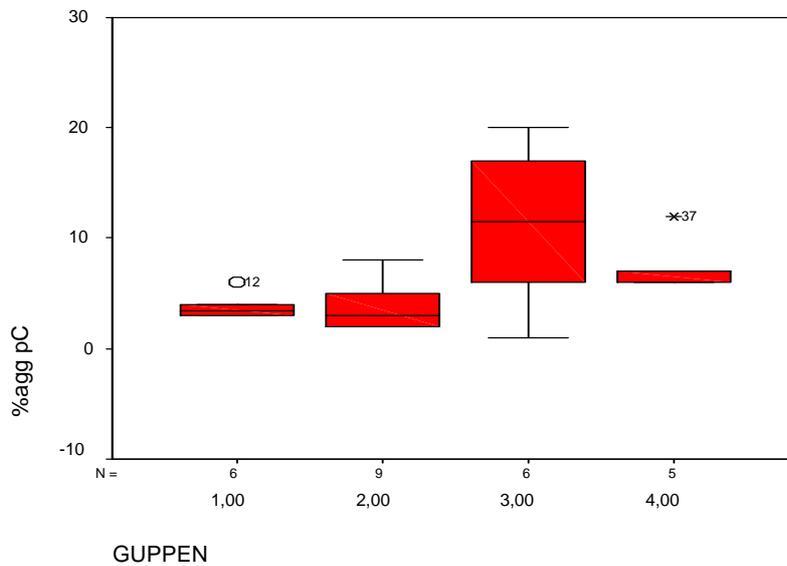
3.3.1.4 Prozent Aggregate positive Kontrolle (%agg pC)

Für den Zeitpunkt 24h und 72h nach Beendigung der Operation werden sowohl in den Boxplots als auch in den KRUSKAL-WALLIS-Tests signifikante Unterschiede festgestellt.

Boxplot zum Zeitpunkt 24h für %agg pC



Boxplot zum Zeitpunkt 72h für %agg pC



In beiden Grafiken kann deutlich ein Unterschied zwischen den nicht operierten Gruppen (I, II) und den operierten Gruppen (III, IV) gesehen werden. Der KRUSKAL-WALLIS-Test fällt in beiden Fällen positiv aus ($p = 0,005$ für 24h; $p = 0,017$ für 72h). Zwischen den Gruppen III und IV liegt kein signifikanter Unterschied vor. Zu beiden Zeitpunkten sind die Werte der Gruppe III weiter gestreut, aber alle Werte der Gruppe IV befinden sich ausschließlich in Streurahmen der Gruppe III.

3.3.2 Zeitraum nach 72h

Für die Zeitpunkte ab einer Woche nach der Operation konnten keine statistischen Untersuchungen durchgeführt werden, weil die Patientenzahl zu gering ist und damit die Untersuchungen ungenau würden. Für die ein bis drei Wochen Proben der Gruppe IV bleibt der Vergleich mit den Werten der Gruppe I und II. In diesem Zeitraum ist die Analyse durch den Vergleich von Mittel-, Minimal- und Maximalwerten zwischen Gruppe IV und I, II zustande gekommen.

3.3.2.1 Eine Woche nach OP

Der Durchschnittswert für %+ der Gruppe IV liegt mit 2% knapp über dem von Gruppe I und II mit 1%. Das Maximum liegt zwischen dem von Gruppe I und II. Das Minimum von 1% ist leicht höher als das von I und II mit 0%.

Der Mittelwert für %+ pC ist höher als der von Gruppe I und II mit 78% gegenüber 56% und 73%. Der Maximalwert liegt zwischen dem von Gruppe I und II. Das Minimum mit 69% deutlich höher als in Gruppe I und II (35%, 59%).

Der Mittelwert für % agg ist mit 1% niedriger als der von Gruppe I und II mit 2%. Der Maximalwert von Gruppe IV und I sind gleich bei 2% und deutlich unter dem von Gruppe II mit 6%. Der Minimalwert ist ebenfalls in Gruppe IV und I gleich bei 1%. Der Minimalwert der Gruppe II beträgt 0%.

Der %agg pC Durchschnittswert von Gruppe IV und I sind gleich bei 4% und der Wert der Gruppe II liegt bei 3%. Maximalwert von IV und II sind identisch mit 8%, der Maximalwert der Gruppe I liegt bei 6%. Das Minimum der Gruppe IV liegt mit 3% zwischen dem von I (3%) und II (1%).

Zum Zeitpunkt eine Woche ist der Aktivierungszustand der Thrombozyten gemessen an dem vier Parametern nicht erhöht im Vergleich mit Gruppe I und II. Folglich kommt es nicht zu Aggregatbildung. Lediglich der Durchschnittswert für %+ pC liegt deutlich höher als der von Gruppe I und auch gering höher als von Gruppe II.

Datenübersicht zum Zeitpunkt 1 Woche

Gruppe IV

	%+	%+ pC	% agg	%agg pC
1w	3	74	2	5
1w	1	89	1	3
1w	1	69	1	8
1w	4	74	2	5
1w	2	83	1	2
MAX	4	89	2	8
MIN	1	69	1	2
AVER	2	78	1	4

Gruppe I

MAX	2	88	2	6
MIN	0	35	1	3
AVER	1	56	2	4

Gruppe II

MAX	7	91	6	8
MIN	0	59	0	1
AVER	1	73	2	3

3.3.2.2 Zwei Wochen nach OP

Der Durchschnittswert für %+ der Gruppe IV liegt auch nach zwei Wochen mit 2% knapp über dem von Gruppe I und II mit wiederum 1%. Das Maximum liegt zwischen dem von I und II. Das Minimum ist in allen vier Gruppen bei 0%.

Der Mittelwert für %+ pC ist auch hier höher als der von Gruppe I und II mit 76% gegenüber 56% und 73%. Der Maximalwert von 88% ist mit dem der Gruppe I identisch und liegt unter den 91% von Gruppe II. Das Minimum mit 47% liegt zwischen dem von Gruppe I und II.

Der Mittelwert nach zwei Wochen für den % agg Wert ist mit 1% niedriger als der von Gruppe I und II mit 2%. Die Maximalwerte nach zwei Wochen sind identisch mit denen von Woche eins, Gruppe IV und I liegen gleich bei 2% aber deutlich unter dem von Gruppe II mit 6%. Der Minimalwert ist in Gruppe IV und II gleich bei 0%. Der der Gruppe I beträgt 1%.

Der %agg pC Durchschnittswert von Gruppe IV liegt zwischen dem von I und II (IV 2%, I 4% und II 3%). Der Maximalwert ist der geringste mit 2% gegenüber 6% und 8% von Gruppe I und II. Das Minimum der Gruppe IV liegt bei 1% wie das der Gruppe II. Das Minimum der Gruppe I beträgt 3%.

Zum Zeitpunkt zwei Wochen ist der Aktivierungszustand der Thrombozyten nicht erhöht sowie die Aggregatbildung nicht vermehrt im Vergleich mit Gruppe I und II. Der Durchschnittswert für %+ pC liegt wiederum deutlich höher als der von Gruppe I und auch gering höher als von Gruppe II. Es zeigt sich damit dasselbe Bild wie zum Zeitpunkt eine Woche.

Datenübersicht zum Zeitpunkt 2 Wochen

Gruppe IV

	%+	%+ pC	% agg	%agg pC
2w	0	47	0	2
2w	5	83	1	1
2w	2	84	1	2
2w	3	88	2	2
MAX	5	88	2	2
MIN	0	47	0	1
AVER	2	76	1	2

Gruppe I

MAX	2	88	2	6
MIN	0	35	1	3
AVER	1	56	2	4

Gruppe II

MAX	7	91	6	8
MIN	0	59	0	1
AVER	1	73	2	3

3.3.2.3 Drei Wochen nach OP

Der Durchschnittswert für %+ zum Zeitpunkt drei Wochen ist in allen drei Gruppen gleich bei 1%. Das Maximum von I und IV sind gleich mit 2%, Gruppe II liegt bei 7%. Das Minimum ist 0% in allen Gruppen.

Der Mittelwert der Gruppe IV für %+ pC ist höher als der von Gruppe I und II mit 81% gegenüber 56% und 73%. Der Maximalwert liegt mit 92% knapp über dem von Gruppe II mit 91% und über dem von Gruppe I mit 88%. Das Minimum liegt mit 70% deutlich höher als das der Gruppe I und II (35%, 59%).

Die Werte für % agg in der dritten Woche sind exakt gleich, wie die in der zweiten Woche. Der Mittelwert für % agg ist mit 1% niedriger als der von Gruppe I und II mit 2%. Die Maximalwerte von Gruppe IV und I sind gleich bei 2% und deutlich unter dem von Gruppe II mit 6%. Die Minimalwerte sind ebenfalls in Gruppe IV und I gleich bei 1%. Der der Gruppe II beträgt 0%.

Der %agg pC Durchschnittswert von Gruppe IV liegt unter dem von I und II (IV 2%, I 4% und II 3%). Der Maximalwert ist der geringste mit 2% gegenüber 6% und 8% von Gruppe I und II. Das Minimum der Gruppe IV liegt bei 2% und damit zwischen dem von I und II (3%, 1%).

Drei Wochen nach OP ist der Aktivierungszustand der Thrombozyten so wie eine Woche und zwei Wochen nach OP. Auch eine vermehrte Aggregatbildung ist nicht nachzuweisen. Für die Parameter %+, % agg, und %agg pC ist kein Unterscheid zu Gruppe I und II zu erkennen. Die Werte für %+ pC sind, wie bereits bekannt, erhöht.

Datenübersicht zum Zeitpunkt 3 Wochen

Gruppe IV

	%+	%+ pC	% agg	%agg pC
3w	0	70	2	2
3w	2	92	1	2
MAX	2	92	2	2
MIN	0	70	1	2
AVER	1	81	1	2

Gruppe I

MAX	2	88	2	6
MIN	0	35	1	3
AVER	1	56	2	4

Gruppe II

MAX	7	91	6	8
MIN	0	59	0	1
AVER	1	73	2	3

3.3.2.4 30 Wochen Patient

Auch für den 30 Wochen Patienten konnten keine Tests durchgeführt werden, weil nur drei Datensätze vorliegen, die für statistische Analysen zu wenig sind. Die Daten des Patienten 30 Wochen nach der TCI Implantation wurden ebenfalls mit denen der Gruppe I und II verglichen.

Beim Vergleich der Mittelwerte der vier Parameter des 30 Wochen Patienten mit den Mittelwerten der Gruppe I und II ist kaum ein Unterschied zu erkennen.

Der Mittelwert für den %+ Wert ist mit denen der Gruppe I und II identisch. Der Mittelwert für %+ pC liegt mit 72% deutlich über dem der Gruppe I mit 56% aber noch unter dem der Gruppe II mit 73%.

Für % agg liegt der Mittelwert von 1% unter dem von Gruppe I und II mit 2% . Der Mittelwert für %agg pC ist mit dem der Gruppe II identisch (3%) und der Wert der Gruppe I liegt höher bei 4%. Beim Vergleich der Maximalwerte fällt auf, daß die Werte aller vier Parameter des 30 Wochen Patienten nicht höher liegen als die Maximalwerte der Gruppe I und II. Bis auf das Minimum des %+ pC waren alle anderen unauffällig und nahezu identisch. Das Minimum von %+ pC ist wie in den anderen Fällen der Gruppe IV mit 68% höher als das von I und II mit 35% und 59%.

Zum Zeitpunkt 30 Wochen nach Implantation ist der Aktivierungszustand der Thrombozyten nicht erhöht im Vergleich mit Gruppe I und II. Auch wird keine vermehrte Aggregatbildung nachgewiesen.

Datenübersicht 30 Wochen nach Implantation

30 Wochen TCI Patient

	+%	+% pC	% agg	%agg pC
30w	2	68	1	2
31w	1	71	1	4
33w	1	78	1	2
MAX	2	78	1	4
MIN	1	68	1	2
AVER	1	72	1	3

Gruppe I

MAX	2	88	2	6
MIN	0	35	1	3
AVER	1	56	2	4

Gruppe II

MAX	7	91	6	8
MIN	0	59	0	1
AVER	1	73	2	3

4 DISKUSSION

Der Einfluß von Kunstherzen (LVAD: TCI und Thoartec) auf Thrombozyten ist mit Durchflußzytometrie untersucht worden. Ausgangsfragen waren: 1) Werden Thrombozyten durch eine Kunstherzpräsenz aktiviert und 2) kommt es daraufhin zur Mikro-/Aggregatbildung?

4.1 Allgemeines

Das im Vorfeld entwickelte Protokoll zur Präparation des Patientenblutes zur Untersuchung mit einem Durchflußzytometer hat sich als zuverlässig erwiesen, so daß die Studie problemlos verlief.

Während der Protokollentwicklungsphase konnten in Blutproben von Gesunden, in denen Thrombozyten mit Kollagen aktiviert worden waren, keine Aggregate gemessen werden. Der Grund dafür bleibt unklar. Kollagen ist in vitro sowie in vivo der klassische Aktivator. Die Methode Durchflußzytometrie hat im Verlauf der Studie im Blut, das durch das entwickelte Protokoll präpariert worden war, Aggregate bestimmt (siehe Gruppe III und IV).

Das Durchflußzytometer gibt als Ergebnisse Prozentsätze mit zwei Dezimalen an. Die von uns dokumentierten Ergebnisse wurden auf ganze Prozentsätze gerundet (siehe Ergebnistabellen). Zum einen waren zweistelligen Dezimalen für die Auswertung nicht entscheidend, denn ganze Prozentsätze waren für die vorliegenden Fragestellungen ausreichend. Zum anderen können mit dem P-selectin Rezeptor keine validen Dezimalbeträge bestimmt werden. Das liegt daran, daß der P-selectin Rezeptor kein on/off Rezeptor ist. Er ist kein on/off Rezeptor, weil auf unaktivierten Thrombozyten bereits in geringer Anzahl P-selectin Rezeptoren vorhanden sind. Zwischen unaktivierten (ca. 800 Rezeptoren auf der Membran) und aktivierten Thrombozyten (ca. 5000-8000 Rezeptoren) gibt es keine klare Grenze, sondern einen fließenden Übergang. Wann ein Thrombozyt vom Durchflußzytometer als aktiviert gewertet wird, wird im Falle des P-selectin Rezeptors durch die Kontrollprobe festgelegt und ist damit letztlich

eine willkürliche Festlegung. Die willkürliche Festlegung macht die Dezimalen ungenau.

Es waren positive Kontrollen als Validierungsparameter für den %+ und % agg Parameter in die Studie aufgenommen worden. Im Nachhinein stellt sich heraus, daß die beiden Parameter %+ pC und %agg pC neben der Wertvalidierung wertvolle, zusätzliche Informationen liefern. Mit Hilfe dieser Parameter kann festgestellt werden, daß Thrombozyten sensibler auf Aktivierungsreize reagieren.

Das Blut der positiven Kontrollen wurde immer mit der gleichen Menge Kollagen (100 µL) und immer für 10 Minuten aktiviert. Wenn in einer positiven Kontrollprobe deutlich mehr Thrombozyten aktiviert bzw. deutlich mehr Aggregate gebildet wurden als in Kontrollproben von Patienten der Gruppe I und II, sind die Thrombozyten sensibler (hypersensitiv) geworden. Die Thrombozyten waren ebenfalls hypersensitiv geworden, wenn sich in positiven Kontrollen eines Patienten vor der Operation deutlich geringere Werte für %+ pC und %agg pC ergaben als in positiven Kontrollen nach durchgeführter Operation. Die Thrombozyten waren auch in dem Fall sensibler (hypersensitiv) geworden, weil sie nach der Operation auf den selben Aktivierungsreiz (gleiche Kollagenmenge, selbe Aktivierungszeit) stärker reagierten.

Somit sind positive Kontrollen Validierungsfaktoren für die Werte des %+ und % agg Parameters und sie sind ein Marker für Hypersensitivität von Thrombozyten.

Ein Teilziel dieser Studie bestand darin, unterschiedliche Oberflächenbeschaffenheiten (TCI – rauhe Blutkontaktflächen (textured surface) und Thoratec System – glatte Blutkontaktflächen (smooth surface)) auf ihren plättchenaktivierenden Einfluß zu untersuchen. Die Studie umfaßt insgesamt nur sechs VAD Patienten, wovon einer der Patienten ein Thoratec System erhalten hat, alle anderen ein TCI. Da die Patientenzahl so niedrig ausgefallen ist, kann keine Aussage gemacht werden, ob Oberflächenbeschaffenheiten (rauh/glatt) einen unterschiedlichen Einfluß auf Thrombozyten haben.

Eine Analyse der Daten bezüglich der Frage des möglichen unterschiedlichen Einflusses von mechanischem und biologischem Klappenersatz auf Thrombozyten war ebenfalls

nicht möglich. In Gruppe III sind zwar mehr Patienten als in Gruppe IV untersucht worden, es mußten aber aufgrund der gegebenen Rahmenbedingungen Patienten mit unterschiedlichen Klappentypen in die Studie aufgenommen werden (siehe Ergebnistabelle Gruppe III). Dadurch fand jeder einzelne Klappentyp selten Verwendung. Mit nur vereinzelt Daten pro Klappentyp läßt sich ebenfalls keine gesicherte Aussage über den Einfluß auf Thrombozyten treffen.

4.2 Diskussion der Ergebnisse

Die folgende Diskussion konzentriert sich auf die Werte der vier Durchflußzytometrieparameter (%+, % agg, %+ pC, %agg pC) und die Ergebnisse der explorativen Analyse.

Nach Abschluß der Datenerfassung stellt sich die Frage, ob die gemessenen Daten valide sind. Damit diese Frage positiv beantwortet werden kann, müssen vier Punkte erfüllt sein:

In unaktivierten Proben von gesunden Probanden dürfen im Idealfall erstens keine aktivierten Thrombozyten, zweitens keine Mikro-/Aggregate zu messen sein. Drittens müssen in vivo vorliegende aktivierte Thrombozyten sowie viertens in vivo vorliegende Mikro-/Aggregate gemessen werden können.

Diese vier Voraussetzungen werden im Folgenden an den Werten der Gruppe I überprüft.

4.2.1 Diskussion der Wertverläufe

Gruppe I

In Gruppe I werden 0 bis $1 \pm 0,62\%$ für aktivierte Thrombozyten gemessen. Durch dieses niedrige Ergebnis ist sichergestellt, daß, wenn aktivierte Thrombozyten gemessen werden, dieser Aktivierungszustand wirklich in vivo besteht und nicht durch die Untersuchung fälschlich bestimmt wird. Damit ist die erste Voraussetzung erfüllt.

In unaktivierten Proben von gesunden Probanden werden 2% Mikro-/Aggregate gemessen. Damit ist die zweite Voraussetzung nicht erfüllt. Derartige Werte sind aber durchflußzytometriebedingt. Die gemessenen Aggregate in den Proben von Gesunden entstehen nicht durch einen Fehler im Protokoll. 2% Aggregate in nicht aktivierten Proben von gesunden Probanden sind Werte, die bei Untersuchungen mit Durchflußzytometrie gemessen werden.

Die Durchflußzytometrie-Thrombozytenexperten Herr Prof. M. Koksich von der Firma Beckman Coulter und Herr Prof. W. Jeske von der Loyola University in Maywood, Illinois/USA, hatten bereits während der Protokollentwicklungsphase bestätigt, daß durch die Methode bei jeder Untersuchung 2-4% Aggregate gemessen werden. Bei der Analyse wurden die erhöhten Werte berücksichtigt. Dadurch, daß die erhöhten Werte bei der Analyse berücksichtigt wurden, ist die zweite Voraussetzung erfüllt.

Als dritte Voraussetzung müssen aktivierte Thrombozyten bestimmt werden können. Die Bestimmung von aktivierten Thrombozyten ist möglich, da %+ pC Werte in Gruppe I von maximal 88% in anderen Gruppen sogar von maximal 92% dies bestätigen. Die Ergebnisse für den Parameter %+ pC in Gruppe I fallen im Vergleich zu den anderen Parametern inhomogen aus ($56 \pm 21,36\%$). D.h. die Thrombozyten von verschiedenen Patienten reagieren unterschiedlich empfindlich auf den Agonisten Kollagen. Eine Erklärung dafür ist primär nicht ersichtlich. Die starke Variation in der Antwort auf den Aktivitätsagonisten läßt sich möglicherweise mit der Physiologie erklären. Wird die Blutungszeit von Patienten gemessen, so gibt es ein physiologisches

Fenster von ein bis drei Minuten, bis das Blut geronnen ist. Folglich reagieren einige Patienten möglicherweise stärker und schneller auf Aktivierungsreize als andere.

Die %agg pC Werte liegen für die Gruppe I bei $4 \pm 1,33\%$. Werden die Ergebnisse mit denen von anderen Studien verglichen [11, 79], so fallen die gemessenen Werte sehr niedrig aus. Wie bereits erwähnt, bleibt es unklar, warum die Thrombozyten von Gesunden mit dem Agonisten Kollagen nicht stärker aggregieren.

Wie an den %agg pC Ergebnissen der Gruppe III und IV mit Spitzenwerten von bis zu 20% Aggregaten gesehen werden kann, sind Protokoll und Methode nicht die Ursachen für die bedenklich niedrigen Werte. Durch die hohen Werte in Gruppe III und IV ist sichergestellt, daß Aggregate bestimmt werden können, womit die vierte Voraussetzung erfüllt ist.

Zusammenfassend kann festgestellt werden: Die vorliegenden Daten sind valide, weil alle vier Punkte erfüllt werden. Damit können die beiden Fragestellungen dieser Studie mit den vorliegenden Daten beantwortet werden. Des Weiteren kann bei $1 \pm 0,62\%$ für %+ und $2 \pm 0,32\%$ für % agg die Präparation einen nur geringen Einfluß auf die Thrombozyten haben. Die gemessenen Daten der Gruppe I sind damit außerdem eine gute Grundlage für den Vergleich mit den Ergebnissen der anderen drei Gruppen.

Gruppe II

Der Mittelwert für den %+ Parameter der Gruppe II liegt um 1%, für % agg um 2%. Patienten im Stadium NYHA III-IV sind untersucht worden, um den Einfluß des Krankheitszustandes auf Thrombozyten zu bestimmen. So geringe Werte bedeuten, daß eine Herzerkrankung im Stadium NYHA III - IV keinen Einfluß bezüglich Aktivierung und Aggregatbildung der Thrombozyten hat.

Der %+ pC Mittelwert beträgt 73% mit, wie bereits in Gruppe I zu sehen ist, einer großen Schwankungsbreite ($\pm 11,87\%$). Der Mittelwert liegt im Vergleich zu Gruppe I aber deutlich höher (Gruppe I 56%).

3% als Mittelwert ergibt sich für den %agg pC Wert. Es bleibt auch hier unklar, warum die Thrombozyten mit dem Agonisten Kollagen nicht stärker aggregieren.

Thrombozyten von Patienten der Gruppe II reagieren stärker auf denselben Aktivierungsreiz als Thrombozyten von Patienten der Gruppe I. Dies ist am erhöhten Mittelwert für %+ pC der Gruppe II gegenüber Gruppe I zu erkennen. Sie bilden aber nicht mehr Aggregate. Wenn mehr Thrombozyten auf denselben Aktivierungsreiz (Standardbedingungen) aktiviert werden, müssen die Thrombozyten sensibler (hypersensitiv) geworden sein. Folglich versetzt eine Herzerkrankung im Stadium NYHA III – IV die Thrombozyten in einen hypersensitiven Zustand. Die statistische Auswertung hingegen zeigt diesbezüglich keine Signifikanz auf. Hinzuweisen gilt es aber auf das insgesamt geringe Patientenkollektiv, das der Schlußfolgerung zugrunde liegt.

Gruppe III

Die Ergebnisse für den %+ Parameter der Gruppe III geben Anlaß zur genaueren Betrachtung. Die Thrombozyten von fünf Patienten werden über die gesamte Zeit praktisch gar nicht beeinflusst, d.h. es werden 0-2% aktivierte Thrombozyten bestimmt. Bei sechs Patienten kommt es zu einem einmaligen Anstieg auf zirka 5% und während bzw. kurz nach der Operation kommt es bei zwei Patienten zu über 10% aktivierten Thrombozyten. Alle Patienten haben einen Klappenersatz erhalten und alle sind mit derselben Methode operiert worden. Der einzige Unterschied bestand in dem verwendeten Klappenersatz. Wie bereits erwähnt, sind in die untersuchten Patienten viele unterschiedliche Klappentypen operiert worden (siehe Ergebnistabelle für Gruppe III). Es handelt sich um acht unterschiedliche Klappentypen. Drei Typen sind nur einmalig verwendet worden. Vier Klappentypen zweimal und einer dreimal. Schon bei der Betrachtung der wenigen Ergebnisse der fünf Klappentypen, die zwei- bzw. dreimal Verwendung fanden, fällt auf, daß die Ergebnisse bei ein und demselben Klappentyp stark schwanken, so daß die unterschiedlichen Ergebnisse wahrscheinlich nicht klappentypabhängig sind. Wenn es sich um einen Einfluß der Klappen gehandelt hätte, so hätte sich dieser bei demselben Klappentypen annähernd wiederholen müssen. Hätte es sich aber um einen Einfluß der Operation gehandelt, dann wäre es bei allen Patienten zu einheitlichen Veränderungen gekommen. Beides ist nicht der Fall. Die gemessenen Veränderungen können demnach nur patientenabhängig sein.

In der Gruppe III sind die % agg Werte uneinheitlich. Wie in der Verlaufsgraphik des Parameters % agg für Gruppe III zu erkennen ist, kann keine patientenübergreifende Entwicklung erkannt werden. Alle gemessenen Werte liegen aber zwischen 0-4%. D.h. die Operation und die Herzklappen haben keinen Einfluß auf die Aggregatbildung.

Die %+ pC Werte weisen eine hohe Standardabweichung (SEM) auf. Im Werteverlauf kann keine Regelmäßigkeit erkannt werden. Auch zum Zeitpunkt –während der Operation- kommt es zu keiner übergreifenden Veränderung, teilweise steigt der Wert, zum Teil fällt er, einige Male ist er auch unverändert. Auch hier wird derselbe Werteverlauf wie schon in Gruppe I und II beobachtet. Einige Patienten reagieren stärker und schneller auf Aktivierungsreize als andere. Bei drei von 14 Patienten kommt es zu einem Anstieg des %+ pC Wertes in der frühen postoperativen Phase. Bei den drei Patienten scheinen die Thrombozyten zu den Zeitpunkten hypersensitiv. Im Vergleich der Mittelwerte liegt der Mittelwert der Gruppe III mit 66% leicht erhöht zu Gruppe I, mit 56% aber niedriger als der der Gruppe II mit 73%.

Sehr interessant ist auch der Verlauf der %agg pC Werte. Teilweise steigen die Werte unter der Operation an, fallen dann ab, teils bis auf Normalwerte, um später wieder anzusteigen. Zum Teil steigt der %agg pC Wert überhaupt erstmalig nach der Operation an. Bei einem Patienten kommt es nur zu ganz leicht erhöhten Werten. Der Anstieg des Wertes zum Zeitpunkt -während der Operation- ist nachvollziehbar. Für den vereinzelt Wiederanstieg bzw. den Erstanstieg nach der OP gibt es keinen erkennbaren Grund. Damit kommt es teilweise nach der Operation aus unbekanntem Grund zu einer höheren Sensibilisierung (Hypersensitivierung) der Thrombozyten. Es werden mehr Aggregate gebildet. Die Kollagenmenge und die Aktivierungszeit der positiven Kontrollen waren immer gleich. Zu diesen Zeitpunkten reagieren die Thrombozyten aber stärker. Das geht aber nicht mit einem generell erhöhten Aktivierungszustand einher. Die %+ Werte sind ausschließlich normal und auch die %+ pC Werte sind überwiegend unauffällig. Theoretisch würde zu diesem Zeitpunkt eine erhöhte Aktivität der Thrombozyten erwartet werden.

Um den Einfluß des OP-Procedere zu bestimmen, sind Patienten mit Klappenoperation untersucht worden. An den Hauptparametern %+ und % agg beurteilt, hat das Procedere kein Einfluß auf Thrombozyten. Die Veränderungen bei %+ scheinen patientenabhängig

zu sein, da sie nicht bei allen auftreten und alle % agg Werte im zu erwartenden Bereich liegen. Die Kontrollproben legen eine mögliche Hypersensitivität der Thrombozyten nach der Operation nahe.

Gruppe IV

Die %+ Daten der VAD Patienten sind denen der Gruppe III bis zum Zeitpunkt 72h sehr ähnlich. Es zeigt sich in beiden Gruppen eine uneinheitliche Entwicklung. Auch in Gruppe IV scheinen die Ergebnisse für den %+ Parameter in der intraoperativen und postoperativen Phase patientenabhängig und nicht operations- oder kunstherzabhängig zu sein.

Bei einem Patienten kommt es zu 10% aktivierten Thrombozyten, bei einem anderen Patient kommt es zu keiner Aktivierung (0 – 1%) und bei drei Patienten kommt es zu einem leichten Anstieg (bis zu 4%). Leider gibt es nur drei VAD Patienten, bei denen es möglich war, über alle Meßzeitpunkte Proben zu gewinnen.

Bei zwei von diesen Patienten kommt es zum Zeitpunkt eine Woche und bei einem anderen zum Zeitpunkt zwei Wochen nach der Operation zu leicht erhöhten %+ Werten. Der höchste Wert liegt bei 5%, was noch moderat ist, da bis zu 10% unter der Operation erreicht werden. Im Verlauf normalisieren sich die Werte aber wieder. Ein Grund für den späten Anstieg läßt sich nicht erkennen.

Über den gesamten Meßzeitraum betrachtet, kann es sich nicht um einen Einfluß durch das Kunstherz handeln. Erstens, weil die erhöhten Werte nicht bei allen Patienten auftreten. Zweitens, da die Werte erst verspätet, zweimal nach einer Woche und einmal nach zwei Wochen gemessen werden. Ein weiterer Grund, der einen Kunstherzeinfluß unwahrscheinlich macht, ist, der erhöhte Aktivierungszustand normalisiert sich unter Kunstherzpräsenz in allen Fällen wieder.

Die Werte für den % agg Parameter sind unauffällig. Es zeigt sich dasselbe Bild wie bereits in Gruppe III. Alle Werte liegen im Normbereich, in dem Bereich, der von der Methode immer gemessen wird. D.h. eine Kunstherzpräsenz hat keinen Einfluß auf Mikroaggregatbildung.

Die %+ pC Werte weisen, wie gewohnt, eine hohe Standardabweichung auf. In Gruppe IV kommt es, wie schon in den anderen Gruppen beschrieben, zu unterschiedlichen, inhomogenen Verläufen.

Verglichen mit den Mittelwerten könnten in Gruppe IV die Thrombozyten sensibler auf Kollagen geworden sein. Die Thrombozyten scheinen hypersensitiv zu sein, weil der Mittelwert mit 76% deutlich höher als der von Gruppe I ist und sogar noch etwas höher als von Gruppe II. Bei Patient eins kommt es zum Zeitpunkt 72h zu einem sehr hohen Wert von 12% Aggregaten (%agg pC). Weil es sich bei der 72h Probe um die erste positive Kontrolle für diesen Patienten handelt, ist unklar, ob es sich dabei um einen Wieder- oder Erstanstieg handelt. Wenn man einen Verlauf wie bei den anderen Patienten annimmt, so wäre der Wert bei diesem Patienten zum Zeitpunkt 72h erhöht. Bei dem Patienten zwei wird 4h nach der Operation der Spitzenwert von 15% erreicht, mit folgendem stetigem Abfall der Werte. 72h nach der Operation kommt es zum Spitzenwert von 7% Mikroaggregaten bei Patienten drei. Der Spitzenwert von Patient vier wird 24h nach der Operation mit 12% erreicht. Patient fünf gibt diesbezüglich keine Auskunft, weil die erste Probe nach 24h entnommen wurde. Zum Zeitpunkt 24h und eine Woche werden 8% Aggregate gemessen. Patient sechs befindet sich 30 Wochen nach der Operation. Hier liegen die Werte ausschließlich im Normalbereich.

Die Werte für den Parameter %agg pC der Gruppe IV zeigen einen ähnlicher Verlauf wie in Gruppe III. Nach der OP kommt es vereinzelt zu erhöhten Werten. Allerdings gibt es in Gruppe IV nur fünf untersuchte Patienten. An den Hauptparametern %+ und % agg der Gruppe IV beurteilt, hat eine LVAD Implantation keinen Einfluß auf Thrombozytenaktivität oder Aggregatbildung. Die Veränderungen des %+ Parameters scheinen patientenabhängig zu sein, da sie auch hier nicht bei allen auftreten und alle % agg Werte im zu erwartenden Bereich liegen.

Die Kontrollproben haben Hypersensitivität der Thrombozyten nach der OP aufgedeckt. Auch in Gruppe IV kommt es nach der Operation zu erhöhter Sensibilisierung der Thrombozyten. Aber auch hier gehen die erhöhten %agg pC Werte nicht zwingend mit erhöhten %+ bzw. %+ pC Werten einher.

Zusammenfassung der Diskussion der Werteverläufe

Nach Beurteilung der Werteverläufe scheint ein Kunstherz keinen Einfluß auf Thrombozyten zu haben. Der Vergleich der Werteverläufe zeigt keinen Unterschied zwischen Gruppen III und IV. Vereinzelt erhöhte Werte des %+ Parameters sind sowohl in Gruppe III als auch in IV patientenabhängig. Die % agg Werte liegen im Normbereich.

Die Ergebnisse der Kontrollproben lassen auf eine mögliche Hypersensitivität der Thrombozyten postoperativ schließen. Diese tritt aber erneut in Gruppe III und IV auf und ist damit kein Einfluß des Kunstherzens.

Um einen Kunstherzeinfluß handelt es sich möglicherweise bei erhöhten Werten für den Parameter %+ zweimal zum Meßzeitpunkt einer Woche und einmal zum Meßzeitpunkt zwei Wochen nach Implantation. Gegen die Hypothese eines Einflusses durch das Kunstherz sprechen aber drei Gründe: erstens, daß die Entwicklung nicht bei allen Patienten auftritt, zweitens, daß die erhöhten Werte zu unterschiedlichen Zeitpunkten gemessen werden und sich drittens die Werte dann unter Kunstherzpräsenz in allen Fällen wieder normalisieren.

Für den Zeitraum ab einer Woche nach Implantation gibt es keine Vergleichsdaten aus Gruppe III.

4.2.2 Diskussion der statistischen Auswertung

Bis 72h

Prozent aktivierte Thrombozyten (%+)

Es kommt in der statistischen Analyse im Zeitraum bis 72h zum Zeitpunkt -während der Operation- in den operierten Gruppen III und IV im Vergleich zu den nicht operierten Gruppen I und II zu einem statistisch signifikanten Anstieg der Thrombozytenaktivität (%+). Daß der signifikante Unterschied zwischen den operierten und nicht operierten Gruppen auftritt, mit anderen Worten auch in Gruppe III, zeigt, der plättchenaktivierende Einfluß kann nicht kunstherzspezifisch sein. Es ist von einem Einfluß durch die Operation auszugehen, weil die Einflüsse in Gruppen III und IV auftreten. Nahe liegend ist, daß es sich bei den gemessenen Veränderungen um Einflüsse der Herz-Lungen-Maschine handelt. Der Einfluß der Herz-Lungen-Maschine auf Thrombozyten ist bereits bekannt [4, 14, 15, 55, 83, 87, 101, 103, 104, 125, u.a.].

Prozent aktivierte Thrombozyten positive Kontrolle (%+ pC)

Prozent Aggregate (% agg)

Für die beiden Parameter %+ pC und % agg können zu keinem Meßzeitpunkt statistisch signifikante Werte bestimmt werden. Die Kunstherzpräsenz hat keinen Einfluß auf diese Parameter zu allen Zeitpunkten bis 72h.

Prozent Aggregate positive Kontrolle (%agg pC)

Zum Zeitpunkt 24h und 72h nach der Operation reagieren die Thrombozyten von Operierten statistisch signifikant stärker mit Aggregatbildung (%agg pC) auf den Aktivierungsagonisten Kollagen als die Thrombozyten von nicht Operierten. Die Thrombozyten der Patienten der Gruppe III und IV haben vor der Operation im Vergleich mit Gruppe I und II nicht signifikant stärker Aggregate gebildet. D.h. die Thrombozyten reagieren durch die Operation hypersensitiv. Weil die Hypersensitivität in Gruppen III und IV auftritt, handelt es sich wiederum um einen kunstherzunabhängigen Einfluß.

Die Hypersensitivität könnte ebenfalls eine Folge der Verwendung der Herz-Lungen-Maschine sein. Die statistische Auswertung kann keinen Kunstherzeinfluß nachweisen, da kein Unterschied zwischen Gruppe III und IV festzustellen ist. Die statistische Auswertung über den Wertverlauf bestätigt das bereits.

Die in dieser Studie verwendeten Kunstherzen haben an unseren Hauptparametern beurteilt keinen Einfluß auf die Thrombozyten im Vergleich mit Klappenpatienten bis zum Zeitpunkt 72h.

Durch den Kontrollparameter %agg pC ist allerdings Hypersensitivität der Thrombozyten festgestellt worden. Diese ist sowohl in Gruppe III als auch in Gruppe IV vermutlich durch die Herz-Lungen-Maschine hervorgerufen worden.

Nach 72h

1 bis 3 Wochen – im Vergleich mit Gruppe I und II

Für alle Meßzeitpunkte nach 72h konnten keine statistischen Auswertungen durchgeführt werden. Beim Vergleich der Werte der Gruppe IV mit denen der Gruppe I und II fällt auf, daß die %+ Mittelwerte fast gleich sind mit denen der Gruppe I und II zum Zeitpunkt eine und zwei Wochen nach der Operation (Gruppe IV jeweils 2%; Gruppe I und II 1%). In der dritten Woche sind die Mittelwerte der drei Gruppen gleich.

1 Woche nach Implantation

	+%	+% pC	% agg	%agg pC
MAX	4	89	2	8
MIN	1	69	1	2
AVER	2	78	1	4

2 Wochen nach Implantation

	+%	+% pC	% agg	%agg pC
MAX	5	88	2	2
MIN	0	47	0	1
AVER	2	76	1	2

3 Wochen nach Implantation

	+%	+% pC	% agg	%agg pC
MAX	2	92	2	2
MIN	0	70	1	2
AVER	1	81	1	2

Gruppe I

	+%	+% pC	% agg	%agg pC
MAX	2	88	2	6
MIN	0	35	1	3
AVER	1	56	2	4

GruppeII

	+%	+% pC	% agg	%agg pC
MAX	7	91	6	8
MIN	0	59	0	1
AVER	1	73	2	3

Der Mittelwert für den Parameter % agg der drei Gruppen ist nahezu identisch. Genau genommen ist der Mittelwert der Gruppe IV immer mit 1% etwas niedriger als der Mittelwert von Gruppe I und II mit jeweils 2%.

Der %+ pC Mittelwert ist der einzige Wert der immer leicht erhöht ist gegenüber Gruppe I und II.

Der letzte Parameter %agg pC ist eine Woche nach der Implantation identisch mit dem der Gruppe I (4%). In Woche zwei und drei ist der Wert (2%) sogar leicht niedriger als der Mittelwert von Gruppe I und II (Gruppe I 4%, Gruppe II 3%).

Die Vergleiche der Werte ein bis drei Wochen nach Implantation der Gruppe IV mit denen der Gruppe I und II weisen keine deutlichen Unterschiede auf. Es scheint, als hätten VADs in der späten postoperativen Phase kaum bis keinen Einfluß auf Thrombozyten. Die Ergebnisse für den Zeitraum nach 72h beruhen allerdings auf einem geringen Datenkollektiv.

30 Wochen Patient

Der 30 Wochen Patient gibt Aufschluß über Langzeiteffekte des Kunstherzens auf Thrombozyten. Der Vergleich der Werte des 30 Wochen Patienten mit den Werten der Gruppe I und II zeigt, daß keine höheren Werte vorliegen. Die Mittelwerte der vier Parameter liegen in keinem Fall über denen der Gruppe I oder II. Selbst die erreichten Maximalwerte liegen nie über denen von Gruppe I oder II.

Da die Mittelwerte aller vier Parameter des 30 Wochen Patienten mit denen der Gruppe I und II fast identisch sind und selbst die Maximalwerte aller vier Parameter nie über denen von Gesunden oder Herzinsuffizienzpatienten liegen, liegt kein meßbarer Einfluß auf die Thrombozyten vor.

Wichtig ist zu erwähnen, daß nach 30 Wochen keine Hyersensitivität mehr bestimmt werden kann. Das bestätigt die These der operationinduzierten Hypersensitivierung der Thrombozyten.

Zusammenfassung der Diskussion der statistischen Auswertung

Die statistische Auswertung mit Boxplot und KRUSKAL-WALLIS Test kann bis zum Zeitpunkt 72h keinen Kunstherzeinfluß nachweisen. Auch zu den späteren Meßzeitpunkten können keine signifikant erhöhten Werte im Vergleich mit Gruppe I und II nachgewiesen werden. Dies ist bereits vom Datenverlauf her festgestellt worden, da die Daten der Gruppe IV sich nicht wesentlich von denen der Gruppe III unterscheiden.

4.3 Ergebnis der Studie

Die in dieser Studie durch Durchflußzytometrie untersuchten Kunstherzen, Thoratec und TCI haben verglichen mit Klappenpatienten, Herzinsuffizienzpatienten und Gesunden keinen signifikanten Einfluß auf den Aktivitätszustand von Thrombozyten und auf Mikro-/Aggregatbildung.

Die beiden Ausgangsfragen der Studie 1) werden Thrombozyten durch eine Kunstherzpräsenz aktiviert und 2) kommt es daraufhin zu Mikroaggregatbildung, können beide mit nein beantwortet werden. Die Ergebnisse beruhen aber auf einem geringen Patientenkollektiv.

In der Literatur finden sich vier Studien, die vergleichbare Untersuchungen durchgeführt haben. Die Ergebnisse basieren in allen Fällen ebenfalls auf einem kleinen Patientenkollektiv. Die Ansätze und die Durchführungen der Studien sind unseren ähnlich.

Die Studie von Matsubayashi et al. [77] ist ein Bericht über zwei Patienten, die ein Novacor System erhalten haben. Es ist ein Anstieg der CD62p und CD 63 (= aktiviertes GP IIb/IIIa) bzw. des Thrombozytenaktivitätszustands gesehen worden. Es konnte eine Aktivierung der Thrombozyten während der gesamten LVAD Präsenz bestimmt werden. Nach Thrombinaktivierung kam es hingegen zu einer verminderten Expression von CD 62p und CD 63. In unseren Untersuchungen haben die Thrombozyten nach der Operation vermehrt hypersensitiv auf den Agonisten Kollegen reagiert und der 30 Wochen Patient hat gezeigt, daß sich der hypersensitive Thrombozytenaktivierungszustand mit der Zeit normalisierte, trotz LVAD Präsenz. Schon zum den Zeitpunkten eine, zwei und drei Wochen nach der Operation ist die Hypersensitivität nicht mehr nachweisbar.

In den folgenden Studien wurden andere Kunstherztypen untersucht. Die Studie von Baker et al. [11] untersuchte fünf Kühe mit implantierten nicht-pulsativen Kunstherzen. In allen Tieren ist ein Anstieg der Plättchenaktivität und ein Anstieg der Aggregatbildung festgestellt worden. Bei einigen verblieben die Werte auf erhöhtem

Niveau, bei anderen fielen die Werte wieder auf das Ausgangsniveau ab. D.h. die Ergebnisse der Studie widersprechen unseren Ergebnissen.

In der Studie von Snyder et al. [115] wurde eine axiale Pumpe untersucht. Auch hier wurde ein signifikanter Anstieg von aktivierten Thrombozyten für 17 Tage gesehen. Ein Anstieg von Mikroaggregaten fand sich aber generell nicht. Es fand sich aber ein temporärer Anstieg an Mikroaggregaten in der frühen postoperativen Phase. Ein Zusammenhang zwischen erhöhter Thrombozytenaktivität, Mikroaggregatbildung und Thrombembolien konnte später durch Autopsien gesichert, hergestellt werden. Auch diese Ergebnisse widersprechen unseren Befunden. In dieser Studie wird ausdrücklich auf die Fähigkeiten der Durchflußzytometrie zur Bestimmung von Thrombozytenaktivität und Mikroaggregaten hingewiesen.

In der Studie von Linneweber et al. [65] wurde eine in vitro Untersuchung einer centrifugal und roller pump durchgeführt. Auch hier wurde ein Anstieg der Mikroaggregate gesehen, mehr in der roller pump als in der centrifugal pump. Eine Untersuchung der Thrombozytenaktivität wurde nicht durchgeführt. Auch hier wiesen die Autoren auf die Überlegenheit der Durchflußzytometrie gegenüber dem Aggregometer zur Aggregatbestimmung hin.

Inwieweit diese Ergebnisse vergleichbar sind mit unseren bleibt fraglich, da es sich wie gesagt um andere Kunstherztypen, nicht-pulsative Systeme handelt.

Zusammenfassend zeigt sich, daß sich unsere Ergebnisse nicht mit denen aus anderen vergleichbaren Studien decken. Um endgültige Klarheit über den Einfluß von implantierten Kunstherzen auf Thrombozyten zu erhalten, besteht weiterer Forschungsbedarf, u.a. müßten Studien mit größeren Patientenkollektiven durchgeführt werden.

4.3.1 Einfluß der Herz-Lungen-Maschine

Obwohl die Kunstherzen in dieser Studie keinen meßbaren Einfluß auf die Thrombozytenaktivität und Aggregatbildung haben, ist es zu Veränderungen in Gruppe IV gekommen. Erstens zeigt sich eine signifikant erhöhte Thrombozytenaktivität zum Zeitpunkt -während der Operation- und zweitens zeigt sich Hypersensitivität der Thrombozyten zum Zeitpunkt 24h und 72h nach der Operation. Diese Veränderungen treten ebenso in Gruppe III auf. Es stellt sich die Frage, was die Ursache für die gemessene Veränderung ist. Am wahrscheinlichsten handelt es sich um Einflüsse der Herz-Lungen-Maschine auf Thrombozyten. Zum einen wird eine Herz-Lungen-Maschinenunterstützung sowohl für Klappen (Gruppe III) als auch für VAD Operationen (Gruppe IV) benötigt, was den Anstieg in beiden Gruppen erklärte. Zum anderen ist bereits in unterschiedlichen Studien gezeigt worden, daß es zu komplexen Veränderungen der Hämostase durch Herz-Lungen-Maschinen Operationen kommt [4, 14, 15, 44, 46, 83, 87, 103, 129, u.a.].

Unter diesen Studien gibt es etliche, die sich mit dem Einfluß der Herz Lungen Maschine speziell auf den Thrombozytenaktivitätszustand auseinandersetzen. Die Ergebnisse sind aber unterschiedlich und widersprüchlich. Eine Studie berichtet über keinen meßbaren Einfluß auf den Thrombozytenaktivitätszustand (P-selectin) nach Herz-Lungen-Maschinen Operation. Es konnte keine Änderung in der Aktivität durch P-selectin Messung festgestellt werden [38]. Thrombozytenaggregate wurden nicht untersucht. Zwei Studien berichten über einen Anstieg der Plättchenaktivität durch P-selectin bestimmt. Die Studien geben ebenfalls keine Auskunft über den Einfluß auf Aggregatbildung [24, 116]. In einer weiteren Studie wurde gezeigt, daß es zu einem Anstieg des Aktivitätszustandes unter der Operation kommt, daß es aber zu einer geringeren Aggregatbildung auf Agonsitenexposition kommt [33]. D.h. teilweise wird die These bestätigt, das die gemessenen Veränderungen Herz-Lungen-Maschinen induziert sind. Teilweise unterstützen sie die These auch nicht. Die in unserer Studie in Gruppe III und IV signifikant erhöhte Thrombozytenaktivitätszunahme zum Zeitpunkt -während der Operation- im Vergleich zu Gruppe I und II ist am ehesten durch die Herz-Lungen-Maschine verursacht worden, da sie erstens in beiden Gruppen auftritt und es zweitens keine andere plausible Erklärung für die Veränderung gibt.

Als Zufallsbefund ist zum Zeitpunkt 24h und 72h nach der Operation Hypersensitivität der Thrombozyten in der Gruppe III und IV durch die Parameter %+ pC und %agg pC im Vergleich mit Gruppe I und II bestimmt worden. Die Hypersensitivität scheint ebenfalls ein Einfluß der Herz-Lungen-Maschine zu sein. Dieses Phänomen konnte erstens erneut in beiden Gruppen, III und IV, bestimmt werden. Diese These wird zweitens unterstützt durch die Normalisierung des Aktivierungspotentials ab dem Zeitpunkt 1 Woche nach Operation und den Verhältnissen im 30 Wochen Patienten. Es wird keine Hyersensitivität nach 30 Wochen mehr bestimmt. Am ehesten scheint es sich um eine operationinduzierte Hypersensitivierung der Thrombozyten zu handeln, die sich über die Zeit zurückbildet, trotz des noch vorhandenen Kunstherzens. Erhöhte Reaktivität von Thrombozyten ist nach Verwendung der Herz-Lungen-Maschine bereits in der Studie von Ravn et al. [101] als auch von Kokschi [55] beschrieben worden. Hypersensitivität von Thrombozyten ist allgemein bereits bei vielen Erkrankungen beschrieben [19, 55, 56, 92, 101, 102, 118], u.a. wurde Hypersensitivität von Thrombozyten nach Myokardinfarkt, Apoplex, TIA und bei arterielem Hypertonus, pAVK, Diabetes mellitus, Hyperlipoproteinämie beschrieben.

4.3.2 Klinische Relevanz von hypersensitiven Thrombozyten

Es stellt sich die Frage, inwieweit hypersensitive Thrombozyten Einfluß auf die Klinik und die Prognose von VAD Patienten haben.

Nach VAD Implantation sind thrombembolische Komplikationen bekannt [6, 7, 27, 28, 30, 31, 40, 108, u.a.]. Diese äußern sich als Hemiplegien oder Embolien der Extremitäten. Häufig kommt es auch zu asymptomatischen Embolien von u.a. Leber, Milz oder Nieren.

Ein Grund für diese Komplikationen könnten hypersensitive Thrombozyten sein. Für diesen möglichen Zusammenhang sprechen drei Punkte:

Erstens sind Thrombozyten nach unseren Untersuchungen in der frühen postoperativen Phase hypersensitiv. Gerade in der frühen postoperativen Phase werden thrombembolische Komplikationen [6, 7, 27, 28, 30, 31, 40, 108, u.a.] beschrieben.

Zweitens vermindert die Anwendung von Thrombozytenaggregationshemmer (z.B. Clopidogrel) genau zu diesem Zeitpunkt deutlich die thrombembolischen Komplikationen, so daß es sogar zu einer Prognoseverbesserung kommt [108]. Die Thrombozytenaggregationshemmer vermindern das durch Hypersensitivität erhöhte Aktivierungspotential der Thrombozyten.

Drittens wurde in der späten postoperativen Phase bisher von keiner erhöhten thrombembolischen Komplikationsrate berichtet. Dies wird ebenfalls durch die Ergebnisse dieser Studie bestätigt. Ab dem Zeitpunkt 1 Woche bis zum Zeitpunkt 30 Wochen nach der Operation können keine hypersensitiven Thrombozyten mehr bestimmt werden. Da die Thrombozyten nicht mehr hypersensitiv sind, kommt es zu keiner Häufung von thrombembolischen Komplikationen in der späten postoperativen Phase.

Hypersensitive Thrombozyten scheinen verantwortlich zu sein für thrombembolische Komplikationen. Die Komplikationen äußern sich durch zerebrale oder systemische Beschwerden. Durch diese Beschwerden kommt es zur Prognoseverschlechterung.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Es ist bisher nicht ganz geklärt, wie die Hämostase auf künstliche Oberflächen reagiert. Da die Hämostase in der frühen postoperativen Phase nach Kunstherzimplantation die Prognose maßgeblich durch thrombembolische Komplikationen beeinflusst, werden mit dieser Studie (Institutional Review Board, Penn State College of Medicine, 17.12.2004, Protocol No. HY00-264EP), zur weiteren Klärung des Einflusses von künstliche Oberflächen, Veränderungen der Hämostase während und nach einer Kunstherzimplantation (LVAD - TCI und Thoartec) untersucht.

Die postoperativen, thrombembolischen Komplikationen werden durch die primäre Hämostase verursacht. Die primäre Hämostase wird durch Thrombozyten gestellt. Die Untersuchungen der Thrombozyten sind mit Durchflußzytometrie durchgeführt worden. Im Vorfeld dieser Studie ist dafür ein Protokoll zur Vollblutpräparation entwickelt worden.

Der Einfluß der künstlichen Oberflächen wurde durch Bestimmung der Thrombozytenaktivität und Mikroaggregatbildung bestimmt. Die Expression von P-selectin ist als Aktivitätsmarker verwendet worden, die Bildung von Mikro-/Aggregaten ist durch die Kombination aus Thrombozytenidentifizierung (CD61) und Lichtreflex bzw. Vorwärtslichtzerstreuung (forward scatter) nachgewiesen worden. Diese Parameter sind in Kunstherzpatienten, Klappenersatzpatienten, Herzinsuffizienzpatienten (NYHA III-IV) und Freiwilligen untersucht worden.

Zusammenfassend kann aus dem geringen Patientenkollektiv, das der Studie zugrunde liegt, Folgendes festgehalten werden: Kunstherzen haben keinen signifikanten Einfluß auf den Aktivitätszustand von Thrombozyten und keinen signifikanten Einfluß auf die Bildung von Mikro-/Aggregaten im Vergleich mit Klappenersatzpatienten.

Als Zufallsbefund ist in der frühen postoperativen Phase (24h und 72h nach Operation) Hypersensitivität der Thrombozyten festgestellt worden. Dabei handelt es sich a.e. um eine Folge der Herz-Lungen-Maschine. Hypersensitiven Thrombozyten scheinen die Ursache für die bekannten postoperativen, thrombembolischen Komplikationen zu sein.

6 LITERATURVERZEICHNIS

1. Abrams C., Ellison N., Budzynski A.Z., Shattil S.J. (1990) Direct Detection of Activated Platelets and Platelet-Derived Microparticles in Humans. *Blood* 75: 128-138
2. Absolom D.R., Zingg W., Policova Z., Neumann A.W. (1983) Determination of the surface tension of protein coated materials by means of the advancing solidification front technique. *Trans Am Soc Artif Intern Organs* 29: 146-151
3. Adams G.A., Feuerstein I.A. (1980) Visual fluorescent and radio-isotopic evaluation of platelet accumulation and embolization. *Trans Am Soc Artif Intern Organs* 26: 17-23
4. Addonizio V.P. (1990) Platelet function in cardiopulmonary bypass and artificial organs. *Hematol Oncol Clin North Am* 4: 145-155
5. Al-Mondhiry H, Walter E. Rae, et al. (1992) Platelet and Fibrinogen Survival in Calves Implanted with TAH and VAD - Correlation with Autopsy Findings. *F.K. Schattauer Verlagsgesellschaft mbH (Stuttgart)* 67 (4): 413-416
6. Al-Mondhiry H, Pae W., Rosenberg G., Pierce W. (1989) Hematologic abnormalities and thromboembolic complications in calves implanted with pneumatic artificial hearts. *Trans Am Soc Artif Organs* 35: 238-241
7. Al-Mondhiry H, Pierce WS (1989) Hemostatic Abnormalities in Two Patients Implanted with TAH. *Artificial Organs*, Raven Press, Ltd., New York 13 (5): 464-469
8. Ault K. A., Mitchell G., et al. (1992) Analysis of Platelets. *Flow cytometry in Hematology*: 153-163
9. Ault K. A. (1993) Flow Cytometric Analysis of Platelets. Chap. 23 of Bauer K. D., Duque R.E., et al. *Clinical Flow Cytometry – Principles and Applications*. ISBN 0-683-00480-8: 153-163
10. Baier R.E., Loeb G.I., Wallace G.T. (1971) Role of an artificial boundary in modifying blood proteins. *Fed Proc* 30: 1523-1538
11. Baker L. C., Davis W. C., Autieri J., Watach M. J., et al. (1998) Flow cytometric assays to detect platelet activation and aggregation in device-implanted calves. *J Biomed Mater Res* 41(2): 312-321
12. Bennett J.S., Vilaire G., Burch J.W. (1981) A role for prostaglandins and thromboxanes in the exposure of platelet fibrinogen receptors. *J Clin Invest* 68: 981-987

13. Bennett J.S., Vilaire G. (1979) Exposure of platelet fibrinogen receptors by ADP and epinephrine. *J Clin Invest* 64: 1393-1401
14. Beurling-Harbury C., Galvan C.A. (1978) Acquired decrease in platelet secretory ADP associated with increased postoperative bleeding in post-cardiopulmonary bypass patients and in patients with severe valvular heart disease. *Blood* 52: 13-23
15. Bick R.L. (1976) Alterations of hemostasis associated with cardiopulmonary bypass. *Semin Thromb Hemostas* 3: 59-82
16. Bokinsky G., Miller M., Adult K. (1995) Spontaneous platelet activation and aggregation during obstructiver sleep apnea and its response to therapie with nasal continuous positive airway pressure. A preliminary investigation. *Chest* 108(3): 625-630
17. Bruck S.D. (1980) Properties of biomaterials in the physiological environment. CRC Press, Boca Raton
18. Buttrum S., Hatton R., Nash G.B. (1993) Selectin-mediated rolling of neutrophils on immobilized Platelets. *Blood* 82 (Aug): 1165-1174
19. Carvalho A. C. A., Colman R. W. (1972) Platelet function in hyperlipoproteinemia. *N Eng J Med* Vol 290 (Feb.): 434-438
20. Coller B.S., Kutok J.L., Scudder L.E., et al. (1993) Studies of activated GP IIb/IIIa receptors on the luminal surface of adherent platelets. *J Clin Invest* 92: 2796-2806
21. Colman W. C., Hirsch J., et al. (1994) Hemostasis and Thrombosis 3rd Edition. J.B.Lippincott Company, ISBN 0-397-51059-4: Cha.19, 22, 23, 24, 59
22. Colucci M., Paramo J.A., Collen D. (1985) Generation in plasma of a fast acting inhibitor of plasminogen activator in response to endotoxin stimulation. *J Clin Invest* 75: 818-824
23. Cooley D.A., Liotta D., Hallman G.L., Bloodwell R.D., Leachman R.D., Milam J.D. (1969) Orthotopic cardiac prosthesis for two-staged cardiac replacement. *Am J Cardiol* 24: 723-730
24. Corash L. (1990) Measurement of platelet activation by fluorescence activated Flow Cytometry. *Blood Cells* 160: 97-108
25. Cruses J.M., Lewis R.E. (1995) Illustrated Dictionary of Immunology. CRC Press, INC; ISBN 0-8493-4557-X: 57-58

26. Danon D., Skutelsky E. (1976) Endothelial surface charge and its possible relationship to thrombogenesis. *Ann NY Acad Sci* 275: 47-63
27. DeVries W.C. (1988) The total artificial heart. *JAMA* 259: 849-859
28. DeVries W.C., Anderson J.L., Joyce L.D., et al. (1984) Clinical use of total artificial heart before transplantation. *N Eng J Med* 310: 273-278
29. Dickerhoff R., von Ruecker A. (1995) Enumeration of platelets by multiparameter flow cytometry using platelet specific antibodies and fluorescent reference particles. *Clin Lab Haematol* 17: 163-172
30. Didisheim P., Olsen D.B., Fara D.J., Portner P.M. (1987) Infection and thromboembolism with implantable cardiovascular devices. *ASAIO Transactions* 35(1): 54-58
31. Dobbins J.J., Johnson G.S., Kunin C.M., DeVries W.C. (1988) Post mortem microbiological findings in two artificial heart recipients. *JAMA* 259: 865-874
32. Feijen J. (1977) Thrombogenesis caused by blood-foreign surface interaction. *Artificial organs*, Macmillan, London: 235-240
33. Ferroni G., Ruvolo G., et al. (2000) Effects of normothermic versus hypothermic cardiopulmonary bypass on cytokine production and platelet function. *J Cardiovasc Surg* 41: 819-827
34. Fijnheer R., Modderman P.W., et al. (1990) Detection of platelet activation with monoclonal antibodies and flow cytometry. *Transfusion* 30: 20-25
35. Forbes C.D., Courtney J.M. (1981) Thrombosis and artificial surfaces. In: Bloom A.L., Thomas D.P. (eds) *Haemostasis and thrombosis*; Churchill Livingstone, Edinburgh: 902-910
36. Frazier O.H., Rose E.A., McCarthy P., et al. (1995) Improved mortality and rehabilitation of transplant candidates treated with a long-term implantable left ventricular assist system. *Ann Surg* 222: 327-338
37. Gendreau R.M., Winters S., Leininger R.I., Fink D., Hassler C.R. (1981) Fourier transform infrared spectroscopy of protein adsorption from whole blood: ex vivo dog studies. *Appl Spectrosc* 35: 353-359
38. George J. N., Pickett E. B. et al. (1986) Platelet surface glycoproteins. *J Clin Invest.* Vol 78 (Aug): 340-348
39. Gresele P., Catalano M., Giammarresi C. et al. (1997) Platelet activation markers in patients with peripheral arterial disease-A prospective comparison of different platelet function tests. *Thromb Haemost* 78: 1434-1437

40. Griffith B.P., Kormos R.L., Nastala C.J., Winowich S., Pristas J.M. (1996) Results of extended bridge to transplantation: window into the future of permanent ventricular assist devices. *Ann Thorac Surg* 61: 396-398
41. Griffith B.P., Hardesty R.L., Kormos R.L., et al. (1987) Temporary use of the Jarvik-7 total artificial heart before transplantation. *N Eng J Med* 316: 130-134
42. Gutensohn K., Sonneborn H.H., Schunter F. (1998) Flow Cytometry in transfusion medicine – Analysis of platelets. *Clinic Lab Publications*, Heidelberg, ISBN 3-9805785-2-6: 29-45
43. Hamburger S.A., Mc Ever R.P., (1990) GMP-140 mediates adhesion of stimulated platelets and neutrophils. *Blood* 75: 550-554
44. Harker L. A., Malpass T. W. (1980) Mechanism of abnormal bleeding in patients undergoing cardiopulmonary bypass: acquired transient platelet dysfunction associated with selective alpha granule release. *Blood* Vol 56, No 5 (Nov): 824-834
45. Hastings, Garth (1992) *Blood – Material Interactions in Cardiovascular BIOMATERIALS*. ISBN 3-540-19666-8, Springer Verlag: 39-55
46. Hennessy V.L. Jr, Hicks R.E., Niewiarowski S., Edmunds L.H Jr (1977) Function of human platelets during extracorporeal circulation. *Am J Physiol* 232: H622-628
47. Icenogle T.B., Smith R.G., Cleavinger M., Vasu M.A. Williams R.J. (1989) Thromboembolic complications of the Symbion AVAD system. *Artif Organs* 13: 532-538
48. Janes S.L., Wilson D.J., Chronos N. (1993) Evaluation of whole blood flow cytometric detection of platelet bound fibrinogen on normal subjects and patients with activated platelets. *Thromb Haemost* 70: 659-666
49. Janes S.L., Wilson D.J., Cox A.D., et al. (1994) ADP causes partial degranulation of platelets in the absence of aggregation. *Br J Haematol* 86: 568-573
50. Jenkins C.S.P., Packham M.A., Guccione M.A., Mustard J.F. (1973) Modification of platelets adherence to protein-coated surfaces. *J Lab Clin Med* 81: 280-288
51. Johnston G.I., Pickett E.B., McEver R.P., (1987) Heterogeneity of Platelet Secretion in Response to Thrombin demonstrated by Fluorescence Flow Cytometry. *Blood* Vol 69, No5 (May): 1401-1403

52. Kawahito K., Mohara J., et al. (1997) Platelet damage caused by the centrifugal pump: in vitro evaluation by measuring the release of alpha-granule packing proteins. *Artif Organs* (Oct.): 1105-1109
53. Kirchhofer D., Riederer M.A., Baumgartner H.R. (1997) Specific accumulation of circulating monocytes and polymorphonuclear leukocytes on platelets thrombi in a vascular injury model. *Blood* 89 (Feb.): 1270-1278
54. Klinkmann H. (1984) The role of biomaterials in the application of artificial organs. In: Paul J.P., Gaylor J.D.S., Courtney J.M. (eds) *Biomaterials in artificial organs*. Macmillan, London: 1-6
55. Kokschi. M. (1998) *Flow Cytometric Analysis of Platelet Hypo- and Hyperreagibility*. Clin. Lab. Publications, ISBN 3-9805785-2-6: 153-163
56. Kokschi. M., Zeiger F., et al. (2001) Coagulation, Fibrinolysis and Platelet P-selectin expression in peripheral vascular disease. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 21(2): 147-154
57. Kozek-Langenecker SA., Mohammad SF., Masaki T., et al. (2000) The effects of heparin, protamine, and heparinase 1 on platelets in vitro using whole blood flow cytometry. *Anesth Analg*. 90(4): 808-812
58. Kunin C.M., Dobbins J.J., Melo J.C. et al. (1988) Infectious complications in four long-term recipients of the Jarvik-7 total artificial heart. *JAMA* 259: 860-864
59. Laerum O.D., Bjerknes P. (1992) *Flow Cytometry in Hematology; Analysis of platelets*. US Edition, ISBN 0-12-432940-3: 153-162
60. Neumann A.W., Moscarello M.A., Zingg W., Hum O.S., Chang S.K. (1979) Platelet adhesion from human blood to bare and protein coated polymer surfaces. *J Pol Sci Pol Symp* 66: 391-398
61. Levinson M.M., Smith R.G., Cork R.C., Gallo J, Emery R.W. (1989) Thromboembolic complications of the Jarvik-7 total artificial heart : Case report. *Artif Organs*: 10236-10242
62. Levinson M.M., Smith R.G., Cork R.C., et al. (1986) Thrombotic complications of the Jarvik-7 total artificial heart: case report. *Artif Organs* 10: 236-244
63. Leytin V., Mody M., Semple JW., et al. (2000) Flow cytometric parameters for characterizing platelet activation by measuring P-selectin (CD62) expression: theoretical consideration and evaluation in thrombin-treated platelet populations. *Biochem Biophys Res Commun* 269(1): 85-90

64. Leytin V., Mody M., et al.(2000) Quantification of platelet activation status by analyzing P-selectin expression. *Biochem Biophys Res Commun* 273(2): 565-570
65. Linneweber J, Chow TW, Kawamura M, Moake JL, Nose Y. (2002) In vitro comparison of blood pump induced platelet microaggregates between a centrifugal and roller pump during cardiopulmonary bypass. *Int J Artif Organs* 25(6): 549-555
66. Liotta D., Hall C.W., Henly W.S., Beall A.C. Jr, Cooley D.A., Debakey M.E. (1963) Prolonged assisted circulation during and after cardiac or aortic surgery; prolonged partial left ventricular bypass by means of intracorporeal circulation. *Trans Am Artif Intern Organs* 9: 182-185
67. Lüscher E.F., Weber S. (1993) The formation of the hemostatic plug – a special case of platelet aggregation. *Thrombo and Haemost.* 70(2): 234-237
68. Lyman D.J., Metcalf L.C., Albo D. Jr., Richards K.F., Lamb J. (1974) The effect of chemical-structure and surface properties of synthetic polymers on the coagulation of blood. III In vivo adsorption of proteins on polymer surfaces. *Trans Am Soc Artif Intern Organs* 20: 474-478
69. Lyman D.J., Klein K.G., Brash J.L., Fritzing B.K. (1970) The interaction of platelets with polymer surfaces. *Thromb Diath Haemorrh* 23: 120-128
70. Marguerie G.A., Plow E.F. (1981) Interaction of fibrinogen with its platelet receptor: kinetics and effects of pH and temperature. *Biochemistry* 20: 1074-1080
71. Marguerie G.A., Plow E.F., Edgington T.S. (1979) Human Platelets possess an inducible and saturable Receptor specific for Fibrinogen. *J Biol Chem* 254: 5357-5363
72. Mason R.G., Mohammad S.F., Saba H.I., Chuang H.Y.K., (1979) Functions of endothelium. *Pathobiol Annu* 9: 1-48
73. Mason R.G., Sharp D.E., Chuang H.Y.K., Mohammad S.F. (1977) The endothelium: roles in thrombosis and hemostasis. *Arch Pathol Lab Med* 101: 61-64
74. Mason R.G., Mohammad S.F. (1976) The adhesion of platelets to subendothelium, collagen and artificial surface. *Semin Thromb Hemostas* 3: 98-116

75. Mason R. G., Mohammad SF, Hardison MD, Chuang HY, (1976) Adhesion of human blood platelets to glass polymer surfaces. II. Demonstration of the presence of a natural platelet adhesion inhibitor in plasma and serum. *Haemostasis* 5(2): 96-114
76. Mason R.G. (1972) The interaction of blood hemostatic elements with artificial elements. *Prog Hemost Thromb* 1: 141-164
77. Matsubayashi H., Fastenau DR., McIntyre JA., (2000) Changes in platelet activation associated with left ventricular assist system placement. *J Heart Lung Transplantat.* 19(5): 462-468
78. Matzdorff AC., Kuhnel G., Kemkes-Matthes B., et al. (2000) Effect of glycoprotein IIb/IIIa inhibitors on CD62p expression, platelet aggregates, and microparticles in vitro. *J Lab Clin Med.* 135(3): 247-255
79. Matzdorff A.C., Kuehnel G., et al. (1998) Quantitative assessment of platelets, platelet microparticles and platelet aggregates with Flow Cytometry. *J Lab Clin Med* 131(6): 507-517
80. McEver R.P. (1991) GMP-140: A receptor for neutrophils and monocytes on activated platelets and endothelium. *J Cell Biochem* 45: 156-161
81. McEver R.P., Bennett E.M., Martin M.N. (1983) Identification of two structurally and functionally distinct Sites on Human Platelet Membrane GP IIb-IIIa using Monoclonal Antibodies. *J Biol Chem* 258: 5269-5275
82. McEver R.P., Martin M.N. (1984) A Monoclonal Antibody to a Membrane Glycoprotein binds only to activated Platelets. *J Biol Chem* 259: 9799-9804
83. McKenna R., Bachmann F., Whittaker B. (1975) The hemostatic mechanism after open-heart surgery. II. Frequency of abnormal platelet functions during and after extra corporeal circulation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 70: 298-308
84. Michelson A.D. (1996) Flow Cytometry: A Clinical Test of Platelet Function. *Blood* 87(12): 4925-4936
85. Michelson A. D., Shattil S. J. (1996) The use of flow cytometry to study platelet activation. Chap. 6 of Watson S.P., Authi K.S. *Platelets – a practical Approach.* Oxford Uni Press, ISBN 0-19-963538-2: 111-129
86. Minar E., Ehringer H., Jung M., Koppensteiner R., Stümpflen A. (1988) Lack of influences of low-dose acetylsalicylic acid (100mg daily) on platelet survival time, β -thromboglobulin and PF4 in patients with peripheral arterial occlusive disease. *Thromb Res* 52: 219-226

87. Moriau M., Masure R., Hurlet A. (1977) Haemostasis disorders in open heart surgery with extracorporeal circulation. *Vox Sang* 32: 41-51
88. Müller-Berghaus, Gert (1999) *Hämostaseologie*. ISBN 3-540-60091-4, Springer Verlag
89. O'Connor CM., Gurbel PA., Serebruany VL. (1999) Usefulness of soluble and surface-bound P-selectin in detecting heightened platelet activity in patients with congestive heart failure. *Am J Cardiol.* 83(9): 1345-1349
90. Ogston D. (1983) *The physiology of hemostasis*. Croom Helm London
91. Oz M.C., Argenziano M., Catanese K.A., et al. (1997) Bridge experience with long-term implantable left ventricular assist devices. Are they an alternative to transplantation? *Circulation* 95: 1844-1852
92. Packham M. A. (1977) Methods for detection of hypersensitive platelets. *Thrombo Haemost.* 40(1): 175-195
93. Packham M.A., Evans G., Glynn M.F., Mustard J.F. (1969) The effect of plasma proteins on the interaction of platelets with glass surfaces. *J Lab Clin Med* 73: 686-697
94. Peerschke E.I., Zucker M.B., Grant R.A., et al. (1980) Correlation between Fibrinogen Binding to Human Platelets and Platelet Aggregability. *Blood* 55: 841-847
95. Piccione W. (1997) Mechanical circulatory assistance: changing indications and options. *J Heart Lung Transplant* 16: 25-28
96. Pierce W.S. (1986) The artificial heart: partial fulfillment of a promise. *Trans Am Soc Artif Intern Organs* 32: 5-10
97. Pierce W.S., Myers J.L., Donachy J.H., et al. (1982) Interaction of blood with artificial surfaces. *Thrombo Haemost.:* 944-953
98. Purvis N.B.Jr., Giorgio T.D. (1994) Cell size and surface area determined by Flow Cytometry. *Ann N Y Acad Sci* 714: 306-308
99. Purvis N.B.Jr., Giorgio T.D. (1994) Shear-induced platelet activation measured by flow cytometry. *Ann N Y Acad Sci* 714: 309-311
100. Radcliff G., Jaroszeski M. J. (1998) *Basics of Flow Cytometry*. Chap. 1 of Jaroszeski M. J., Heller R. *Flow Cytometry Protocols*. Humana Press Inc., ISBN 0-89603-538-7: 1-24

101. Ravn H. B., Hjortdal V. E., et al. (2001) Increased platelet reactivity and significant changes in coagulation markers after cavopulmonary connection. *Heart* 85: 61-65
102. Riddle J. M., Stein P. D., et al. (1983) Evaluation of platelet reactivity in patients with valvular heart disease. *J Am Coll Cardiol* 1(6): 1381-1384
103. Rinder C.S., Bonan J.L., Rinder H.M., et al. (1992) Cardiopulmonary bypass induces leukocyte-platelet adhesion. *Blood* 79: 1201-1205
104. Rinder C.S., Bohnert J., Rinder H.M. (1991) Platelet activation and aggregation during cardiopulmonary bypass. *Anesthesiology* 75: 388-393
105. Rinder H.M., Bonan J.L., Rinder C.S., et al. (1991) Activated and unactivated platelet adhesion to monocytes and neutrophils. *Blood* 78 (7): 1760-1769
106. Rosenberg G, Sun B, et al. (2000) Variation of specific Hematologic parameters during LVAD and TAH device Implantation. unveröffentlicht
107. Salzman E.W., Merrill E.W., Binder A., Wolf C.R.W., Ashford T.P., Austen W.J. (1996) Protein-platelet interaction on heparinized surfaces. *J Biomed Mater Res* 3: 69-81
108. Scheld H. H., et al. (2001) Kap. 4 Mechanische Ventrikelunterstützung in Leitfaden Herztransplantation, ISBN 3-7985-1224-8, Springer Verlag: 62-74
109. Schmitz G., Rothe G., Ruf A., et al. (1998) European Working Group on Clinical Cell Analysis: Consensus Protocol for the Flow Cytometric characterisation of platelet function. *Thromb Haemost* 79(5): 885-896
110. Serna L., King B., et al. (1998) Evidence for selective Degradation of Platelet GP IIb/IIIa Complex after prolonged in vitro ventricular assist. *J Investig Med* 46(6): 279-283
111. Shattil S.J., Brass L.F. (1986) Expression of fibrinogen receptors during activation and subsequent desensitization of human platelets by epinephrine. *Blood* 68(6): 1224-1231
112. Shattil S.J., Cunningham M., Hoxie J.A. (1987) Detection of Activated Platelets in Whole Blood Using Activation-Dependent Monoclonal Antibodies and Flow Cytometry. *Blood* 70: 307-315
113. Shattil S.J., Hoxie J.A., et al. (1985) Changes in the Platelet Membrane Glycoprotein IIb-IIIa Complex during Platelet Activation. *J Biol Chem* 260: 11107-11114

114. Sixma J.J. (1981) Role of blood vessels platelet and coagulation interactions in haemostasis. *Thrombo Haemost*: 253-260
115. Snyder TA, Watach MJ, Litwak KN, Wagner WR. (2002) Platelet activation, aggregation, and life span in calves implanted with axial flow ventricular assist devices. *Ann Thorac Surg* 73(6): 1933-1938
116. Solis R. T., Beall A. C. (1975) Platelet Aggregation: Effects of Cardiopulmonary Bypass. *CHEST* 67: 558-563
117. Spero J.A., Lewis J.H., Hasiba U. (1980) Disseminated intravascular coagulation findings in 346 patients. *Thrombo Haemost* 43: 28-33
118. Steinberg D., Carvalho A. C. (1975) Platelet hypersensitivity and intravascular coagulation in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Am J Med* Vol 59: 845-850
119. Stenberg P.E., McEver R.P., Shuman M.A., et al. (1985) A Platelet Alpha-Granule Membrane Protein (GMP-140) is expressed on the Plasma Membrane after Activation. *J Cell Biol* 101: 880-886
120. Szychner M. (1983) Thrombosis hemostasis, and thrombolysis at prosthetic interfaces. In Szycher M. (ed) *Biocompatible polymers, metals, and composites*. Technomic, Lancaster, Pennsylvania
121. Thorgeirsson G.,Robertson A.L. Jr. (1978) The vascular endothelium – pathobiologic significance. *Am J Pathol* 93: 803-848
122. Wagner W.R., Johnson P.C. (1994) Therapeutic techniques for reducing thrombosis after cardiovascular implants. *Problems in General Surgery*. J.B. Lippincott Company, Philadelphia 11(2): 241-246
123. Wagner W.R., Johnson P.C., Kormos R.L, Griffith P. (1993) Evaluation of bioprosthetic valve-associated thrombus in ventricular assist device patients. *Circulation* 88: I2023-2029
124. Wahba A., Black G., Koksich M. (1996) Cardiopulmonary bypass leads to a preferential loss of activated platelets. *Eur J Cardiothorac Surg* 10: 768-773
125. Wahba A., Rothe G., Lodes H., et al. (2000) Effects of extracorporeal circulation and heparin on the phenotype of platelet surface antigens following heart surgery. *Thrombosis Research* 97(6): 379-386
126. Watson S.P., Authi K.S. (1996) *Platelets – a practical Approach*. Oxford Uni Press, ISBN 0-19-963538-2: 111-129

127. Wenger R.K., Lukasiewicz H., Mikuta B.S. (1989) Loss of platelets fibrinogen receptors during clinical cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg* 97: 235-239
128. Whicher S.J., Brash J.L. (1978) Platelet-foreign surface interactions: release of granule constituents from adherent platelets. *J Biomed Mater Res* 12:181-201
129. Woodman R.C., Harker L.A. (1990) Bleeding complications associated with cardiopulmonary bypass. *Blood* 76: 1680-1697
130. Zucker M.B., Vroman L. (1969) Platelet adhesion by fibrinogen adsorbed onto glass. *Proc Soc Exp Biol Med* 131: 318-320

7 ABKÜRZUNGEN

ADP	Adenosindiphosphat
AVER	Average, Mittelwert
BTG	β -Thromboglobulin
DMSO	Dimethylsulfoxid
Fab	fragment-antibody, antigenbindendes Fragment
Fc	fragment cristalline, kristallisierbares Fragment
FITC	Flurescein isothiocyanate
HEPES	N-(2-hydroxyethyl)-piperazine-N'-2-ethanesulfonic acid
IABP	intraaortale Ballonpumpen
IRB	Institutional Review Board
LVAD	Left ventricular assist device, Linksherzunterstützungspumpe
MAX	maximal Wert
MIN	minimal Wert
NYHA	New York Heart Association
PBS	Phosphate Buffered Saline
PE	Phycoerythrin
PFA	1% Paraformaldehyd
PF4	Plättchenfaktor 4
SEM	standard error of the mean
SMCC	Succinimidyl-trans-4-(maleinidylmethyl)cyclohexane-1-carboxylat
TAH	Total artificial Heart
TCEP	Tris-(2-carboxyethyl)phosphine-hydrochloride
%+	Prozent positive, aktivierte Thrombozyten
%+ pC	Prozent positive, aktivierte Thrombozyten der positiven Kontrolle
% agg	Prozent aggregierte Thrombozyten
%agg pC	Prozent aggregierte Thrombozyten der positiven Kontrolle

8 DANKSAGUNG

Meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. med. Asfour, Leiter der Kinderherzchirurgie in St. Augustin, Herrn Dr. Rosenberg Leiter der Abteilung für Artificial Organs der Penn State University in Hershey sowie Herrn Siedlecki meinem Betreuer und Leiter des Labors gilt ganz besonderer Dank für die Betreuung meiner Doktorarbeit. Ebenfalls danke ich Herrn Sheaffer, Leiter des Durchflußzytometerlabors.

Herrn Dr. med. El-Banayosy vielen Dank für die Kontaktherstellung mit Herrn Dr. Rosenberg.

Der Firma Arrow International, für diese stellvertretend Herrn Goldschmidt danke ich für die finanzielle Unterstützung.

Ebenfalls danke ich meinen Eltern für die Unterstützung in vielfältiger Hinsicht.

Bedanken möchte ich mich auch bei allen Patienten, die sich bereit erklärt hatten, an dieser Studie teilzunehmen.

John Reibson und Sonja Harshman verdanke ich viele Einblicke in das Leben und die Kultur der Vereinigten Staaten von Amerika.

Abschließend zu erwähnen ist Tino Schulz der stets ein offenes Ohr für mich hatte in der Heimat sowie all diejenigen, die mich bei der Korrektur der Arbeit unterstützt haben.



Human Subjects Protection Office
Institutional Review Board
Penn State College of Medicine
Penn State Milton S. Hershey Medical Center
500 University Drive • Room C2706 • H112
Hershey, Pennsylvania 17033
Telephone: 531-5687 Fax: 531-3937

DATE: December 17, 2004

TO: Chris A. Siedlecki, Cardiothoracic Surgery (HMC)

FROM: Kevin Gleeson, M.D., Executive Chair
Institutional Review Board

COPY

RE: IRB Protocol No. HY00-264EP - Platelet Function in the Presence of a Ventricular Assist Device

The Human Subjects Protection Office (HSPO) received the progress report for the above titled investigation, with your request for Institutional Review Board (IRB) approval to continue this research. The progress report, protocol and supporting documentation were considered during the continuation review process. Expedited approval was granted to renew this investigation for a twelve-month period, from *January 1, 2005 through December 31, 2005*.

Please continue to forward all correspondence for the IRB directly to the Human Subjects Protection Office, with the IRB protocol number clearly noted. For research requiring written informed consent, the investigator should keep the original signed consent form, provide the subject with a photocopy, and for patients, include a copy in the medical record along with the research abstract.

Federal regulations require prompt reporting to the IRB of any proposed changes in a research activity and prior approval before changes are initiated, except where necessary to eliminate apparent immediate hazards to the subject. Federal regulations also require that serious, life-threatening or unexpected adverse events occurring in subjects participating in this project be reported immediately to the IRB. These events must be reported on the Adverse Event/Safety Report form. All other adverse events (such as mild or expected reactions) should be reported on the Progress Report for continuing review.

The Institutional Review Board appreciates your efforts to conduct research in compliance with the federal regulations that have been established to ensure the protection of human subjects.

KG\kl

Addendum: Please forward a memo to the HSPO indicating the location of your study records.