

Aus dem Fachbereich Medizin  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
Frankfurt am Main

betreut an der  
Klinik für Anästhesiologie, Intensivmedizin und Schmerztherapie  
Direktor: Prof. Dr. Dr. Kai Zacharowski

**Charakterisierung des Einflusses der kontinuierlichen Agitation  
während der Lagerung leukozytendepletierter Pool-Thrombozyten-  
konzentrate auf die Thrombozytenfunktion - eine in vitro Studie**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin  
des Fachbereichs Medizin  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
Frankfurt am Main

vorgelegt von  
Sarah Kübel

aus Bayreuth

Frankfurt am Main, 2022

Dekan:	Prof. Dr. Stefan Zeuzem
Referentin:	PD Dr. Dania Fischer
Korreferent:	Prof. Dr. Erhard Seifried
Tag der mündlichen Prüfung:	27.09.2022

## Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis .....	- 7 -
1 Einleitung.....	- 10 -
1.1 Hämostase und Hämostasesystem .....	- 10 -
1.2 Thrombozyten und thrombozytäre Blutstillung.....	- 11 -
1.2.1 Thrombozyten und Thrombozytenmorphologie .....	- 11 -
1.2.2 Thrombozytäre Oberflächenrezeptoren .....	- 17 -
1.2.3 Der Ablauf der thrombozytären Blutgerinnung .....	- 19 -
1.3 Die plasmatische Blutstillung .....	- 23 -
1.4 Fibrinolyse .....	- 25 -
1.5 Regulationsmechanismen der Hämostase.....	- 25 -
1.6 Thrombozytenfunktionsdiagnostik .....	- 26 -
1.6.1 Blutungszeit .....	- 26 -
1.6.2 Lichttransmissionsaggregometrie (LTA) .....	- 27 -
1.6.3 Impedanzaggregometrie .....	- 27 -
1.7 Aufbau und Funktion der Mitochondrien .....	- 32 -
1.7.1 Aufbau und Organisation der Mitochondrien.....	- 33 -
1.7.2 Funktion der Mitochondrien .....	- 34 -
1.8 Analyse der mitochondrialen Funktion und Dysfunktion .....	- 37 -
1.8.1 Mitochondriale Dysfunktion.....	- 37 -
1.8.2 Analyse der mitochondrialen Funktion .....	- 38 -
1.9 Thrombozytenkonzentrate: Herstellung, Lagerung, Verwendung.....	- 44 -
1.9.1 Verwendung und Indikation.....	- 44 -
1.9.2 Herstellungsprozess .....	- 45 -
1.9.3 Lagerung und Haltbarkeit .....	- 47 -
1.10 Fragestellung und Zielsetzung .....	- 48 -

2	Material und Methoden.....	- 50 -
2.1	Verwendete Materialien .....	- 50 -
2.1.1	Thrombozytenkonzentrate und Herstellung .....	- 50 -
2.1.2	Transferbeutel .....	- 50 -
2.1.3	Puffer und Suspensionslösungen .....	- 51 -
2.1.4	Geräte, Labormaterialien und Reagenzien.....	- 52 -
2.2	Methoden .....	- 54 -
2.2.1	Generierung vergleichbarer TK-Gruppen.....	- 54 -
2.2.2	Beschreibung der Untersuchungsparameter und Messmethoden .....	- 55 -
2.2.3	Dokumentation und Zuordnung der TK zu den Probegruppen .....	- 55 -
2.2.4	Entnahme der Proben.....	- 56 -
2.2.5	Lagerungsmethoden.....	- 56 -
2.2.6	Organisation der Messabläufe und Messtage .....	- 58 -
2.2.7	Statistische Methoden.....	- 59 -
2.3	Durchgeführte Messungen.....	- 60 -
2.3.1	Messablauf am Multiplate® .....	- 60 -
2.3.2	Messablauf am Oxygraph-2k.....	- 62 -
2.4	Beschreibung der Ergebnisauswertung.....	- 64 -
2.4.1	Auswertung der Ergebnisse am Multiplate® .....	- 64 -
2.4.2	Auswertung der Ergebnisse am Oxygraph .....	- 65 -
3	Ergebnisse .....	- 66 -
3.1	Allgemeines Vorgehen .....	- 66 -
3.2	Versuchsreihe Multiplate® Analyzer.....	- 67 -
3.2.1	Kontinuierliche versus unterlassene Agitation (KG vs. TG-uA).....	- 67 -
3.2.2	Temporäre Kühlung (KG vs. TG-K).....	- 71 -
3.2.3	Versand mittels pneumatischer Rohrpostanlage (KG vs. TG-R).....	- 72 -

3.3	Versuchsreihe Oxygraph-2k.....	- 73 -
3.3.1	Mitochondriale Atmungsraten .....	- 74 -
3.3.2	Reservekapazität und Kopplungseffizienzen.....	- 79 -
3.4	Streubreiten der Einzelmessungen.....	- 85 -
4	Diskussion.....	- 86 -
4.1	Einsatz des Multiplate <sup>®</sup> Analyzers zur TK-Funktionstestung .....	- 87 -
4.2	ThZ-Aggregationsfunktion während TK-Transport und -Lagerung.....	- 89 -
4.2.1	Auswirkung des TK-Transports mittels Rohrpostsystemen .....	- 89 -
4.2.2	Auswirkung der temporären TK-Kühlung bei 4°C.....	- 90 -
4.2.3	Aggregationsfähigkeit im Verlauf der TK-Lagerung unter kontinuierlicher Agitation .....	- 93 -
4.2.4	Aggregationsfähigkeit im Verlauf der TK-Lagerung ohne Agitation .....	- 94 -
4.2.5	Einschränkungen der Multiplate <sup>®</sup> -Ergebnisinterpretation.....	- 97 -
4.3	Mitochondriale Respirationsraten während TK-Lagerung mit und ohne Agitation .....	- 99 -
4.3.1	Entwicklung der LEAK-Rate während der TK-Lagerung.....	- 101 -
4.3.2	Basal-/Maximalraten und Reservekapazitäten während TK-Lagerung.....	- 104 -
4.3.3	Kopplungseffizienz während der TK-Lagerung .....	- 107 -
4.4	Limitationen und Optimierungsansätze für Folgestudien.....	- 111 -
5	Zusammenfassung .....	- 115 -
6	Summary.....	- 117 -
7	Ergebnisanhang.....	- 119 -
7.1	Deskriptive und analytische Statistik – Multiplate <sup>®</sup> .....	- 119 -
7.2	Deskriptive und analytische Statistik – Oxygraph-2k .....	- 122 -
8	Literaturverzeichnis .....	- 129 -
	Lebenslauf .....	- 140 -
	Schriftliche Erklärung.....	- 141 -

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACD	Acid-Citrate-Dextrose, Stabilisatorlösung für Blutkonserven aus Citronensäure, Natriumcitrat und Glucose in Wasser
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
AU	Aggregation Units
AUC	area under the aggregation curve
B	Basalrate
B*	freie Basalrate
BC	Buffy Coat
bspw.	beispielsweise
CN <sup>-</sup>	Cyanid
CO	Kohlenmonoxid
COX	Cyclooxygenase
CPD	Citrate-Phosphate-Dextrose, Stabilisatorlösung mit zusätzlich Phosphat
DTS	dense tubular system, abgeschlossenes Membransystem
EK	Erythrozytenkonzentrat(e)
EM	Elektronenmikroskop
engl.	englisch
ETS	electron transport system, engl. für Atmungskette
EZM	extrazelluläre Matrix
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid, oxidierte Form (FADH <sub>2</sub> : reduzierte Form)
FCS	fetal calf serum (fetales Kälberserum; auch fetal bovine serum)
FCCP	Trifluorcarbonylcyanidphenylhydrazon
g	Erdbeschleunigung
GF	Gerinnungsfaktor(en)
GP	Glykoprotein
h	hours, Stunden
H <sup>+</sup>	Proton
H <sub>2</sub> O	Wasser
IMM	Innere Mitochondrienmembran
IMR	Intermembranraum

KCN	Kaliumcyanid
KE	Kopplungseffizienz
KG	Kontrollgruppe
L	LEAK-Rate
LTA	Lichttransmissionsaggregometrie
M	Maximalrate/ ETS-Rate
M*	freie Maximalrate/ freie ETS-Kapazität
min	Minuten (engl. minutes)
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamidadenindinukleotid, oxidierte Form,
NADH+H <sup>+</sup>	Nicotinamidadenindinukleotid, reduzierte Form
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NO	Stickstoffmonoxid
NSAR	nichtsteroidale Antirheumatika
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
OMM	outer mitochondrial membrane, äußere Mitochondrienmembran
OXPHOS	Oxidative Phosphorylierung
POC	Point-of-Care
POOL-TK	ein aus vier BC hergestelltes, „gepooltes“, TK
PRP	Platelet Rich Plasma, Plättchenreiches Plasma
PSL:	platelet storage lesions, thrombozytärer Lagerungsschäden
R	Residualrate/ KCN-Rate
RK	Reservekapazität
ROS	reactive oxygen species, reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
SCS	surface connected open canalicular system, oberflächenverbundenes Membransystem
SMC	submembranäres Zytoskelett
sog.	so genannt
Tab.	Tabelle
TF	Tissue Factor
TFG	Transfusionsgesetz
TFPI	Tissue Factor Pathway Inhibitor
TG	Testgruppe
TG-K	Testgruppe: TK nach Kühlung

TG-R	Testgruppe: TK nach Rohrpostversand
TG-uA	Testgruppe: unterlassene Agitation
ThZ	Thrombozyt(en)
TK	Thrombozytenkonzentrat(e)
TTK	Thrombozytenteilkonzentrat(e)
tPA	tissue Plasminogen Activator, Gewebsplasminogenaktivator
TxA <sub>2</sub>	Thromboxan A <sub>2</sub>
u.a.	unter anderem
v.a.	vor allem
vWF	Von-Willebrand-Faktor
z.B.	zum Beispiel
$\Delta p_{mt}$	mitochondriales Membranpotenzial
*	$p \leq 0,05$ (signifikant)
**	$p \leq 0,01$ (hoch signifikant)
***	$p \leq 0,00$ (höchst signifikant)

# 1 Einleitung

## 1.1 Hämostase und Hämostasesystem

Der Begriff „Hämostasesystem“ beschreibt alle Komponenten und Abläufe, die zur Blutstillung, der Hämostase, beitragen.<sup>1(p46)</sup> Unter Hämostase versteht man sowohl den raschen Verschluss der Verletzungsstelle als auch die Begrenzung der Blutgerinnung auf den Ort der Verletzung.<sup>1(p46)</sup> Das Hämostasesystem muss demnach zwei scheinbar gegensinnig verlaufende Reaktionen steuern. Zum einen muss es in der Lage sein, Gefäßläsionen umgehend zu verschließen, zum anderen müssen Blutgerinnsel auch schnell wieder lysiert werden können, um eine unkontrollierte Ausbreitung der Gerinnung zu unterbinden. Dies setzt ein fein abgestimmtes Gefüge voraus, welches durch verschiedene, ineinandergreifende und sich ergänzende Systeme bewerkstelligt wird.<sup>2(p187)</sup> Ähnlich wie andere Prozesse des menschlichen Körpers, z.B. das Immunsystem, besteht auch das Hämostasesystem aus zellulären und humoralen Bestandteilen, deren Interaktionen essenziell für einen reibungslosen Ablauf sind.<sup>1(p46),3(p8)</sup>

Zur besseren Verständlichkeit und Übersicht, wird das Hämostasesystem in den folgenden Abschnitten in vier Teilbereiche unterteilt, die nacheinander erläutert werden:

- Die zelluläre oder thrombozytäre Blutstillung
- Die humorale oder plasmatische Blutstillung
- Interaktionen und Regulationsmechanismen
- Fibrinolyse (Auflösung der Blutgerinnsel)

Es muss betont werden, dass diese Teilbereiche der Hämostase durch Wechselwirkungen miteinander verbunden sind, sich gegenseitig beeinflussen und simultan ablaufen.<sup>1(p46),3(p8)</sup>

Am Anfang der Hämostaseaktivierung steht die Läsion des Gefäßendothels, wodurch Proteine und Zellen der subendothelialen Matrix in Kontakt mit zirkulierenden, zellulären und humoralen Blutbestandteilen des Hämostasesystems kommen.<sup>1(p46),3(p8)</sup> Umgehend nach der Verletzung adhären die Blutplättchen, die Thrombozyten (ThZ), an der geschädigten Gefäßwand, werden aktiviert und aggregieren zu einem vorläufigen Thrombozytenklumpen. Diese thrombozytäre Blutstillung wird aufgrund des unmittelbaren Beginns häufig auch als „primäre Hämostase“ bezeichnet. Für die plasmatische Gerinnung wird auch der Begriff „sekundäre Hämostase“ genutzt.<sup>3(p8)</sup> Beide Begriffe werden in dieser Arbeit nicht verwendet, da sie fälschlicherweise den Eindruck einer

zeitlichen Abfolge vermitteln. Aktivierte ThZ schütten eine Vielzahl an Substanzen aus, die u.a. die Aktivierung und Aggregation weiterer ThZ potenzieren und eine Vasokonstriktion der Gefäßwand provozieren. Daraus resultiert eine Drosselung des lokalen Blutflusses, die, zusammen mit der Sezernierung humoraler Gerinnungsfaktoren (GF) aus den ThZ, die Brücke zur parallel begonnenen plasmatischen Gerinnung schlägt.<sup>2(p187)</sup> Diese läuft lokal konzentriert auf der Oberfläche aktivierter und aggregierter ThZ ab und führt zur Stabilisierung des initialen ThZ-Klumpens.<sup>2(p187),1(p55)</sup>

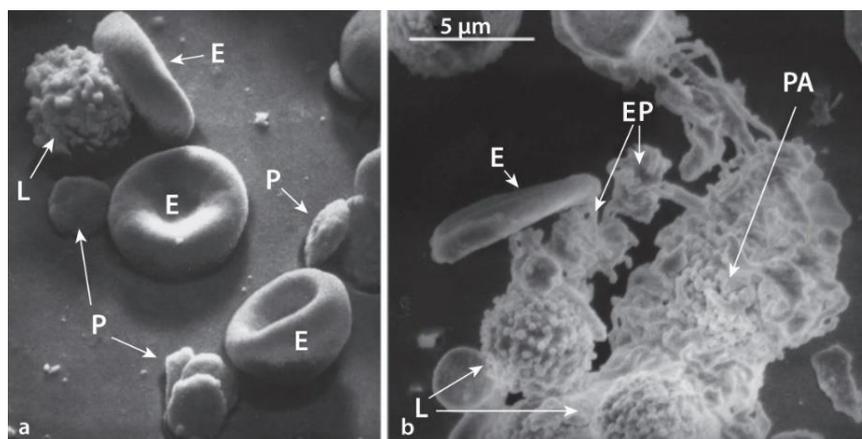
In den folgenden Abschnitten sollen die Abläufe und Regulationsmechanismen der genannten vier Teilbereiche der Hämostase nacheinander detailliert beschrieben werden. Diese getrennte Darstellung ist nur von didaktischem Interesse und darf keinesfalls als zeitliche Reihenfolge verstanden werden.

## 1.2 Thrombozyten und thrombozytäre Blutstillung

Im Folgenden wird zunächst auf den Aufbau der ThZ eingegangen.

### 1.2.1 Thrombozyten und Thrombozytenmorphologie

Die ThZ sind die kleinsten zellulären Bestandteile des Blutes. Es sind kernlose Blutzellen, die im Knochenmark aus den größten hämatopoetischen Zellen, den Megakaryozyten, entstehen. Zwischen 1.000-8.000 ThZ gehen aus einem Megakaryozyten hervor.<sup>3(p30)</sup> Die physiologische ThZ-Konzentration im menschlichen Blut liegt zwischen 150.000-400.000 ThZ/ $\mu$ l.<sup>4</sup> Etwa 15.000 ThZ/ $\mu$ l werden täglich produziert, deren durchschnittliche Überlebenszeit zwischen fünf bis elf Tagen liegt.<sup>1(p46),5</sup>



**Abbildung 1.1:** EM-Aufnahme von ThZ; **a:** ruhende, diskusförmige ThZ (P) neben Erythrozyten (E) und Leukozyten (L), **b:** Formation eines ThZ-Aggregats (PA) aus aktivierten ThZ (EP) nach ADP-Stimulation; nach<sup>3(p16)</sup>

Im unstimulierten Zustand liegen sie in Scheibenform vor und weisen eine Dicke von weniger als 1µm und einen Durchmesser von 2-3µm auf (vgl. Abb. 1.1, S. 11).<sup>3(p16),5</sup> Die Plättchenform ermöglicht optimale Bewegungen in unterschiedlichsten Strömungsverhältnissen. Die Aktivierung der ThZ führt innerhalb weniger Sekunden zu enormen morphologischen Veränderungen, die wichtige Voraussetzungen für die Abdichtung von Gefäßverletzungen sind. Sie gehen in eine Kugelform über und erweitern ihre Oberfläche durch Ausbildung zahlreicher Membranausstülpungen, sog. Pseudopodien.

Der Thrombozytenaufbau kann in vier morphologische und gleichzeitig funktionell unterschiedliche Bereiche aufgeteilt werden.<sup>1(p30-31),6(p4)</sup>

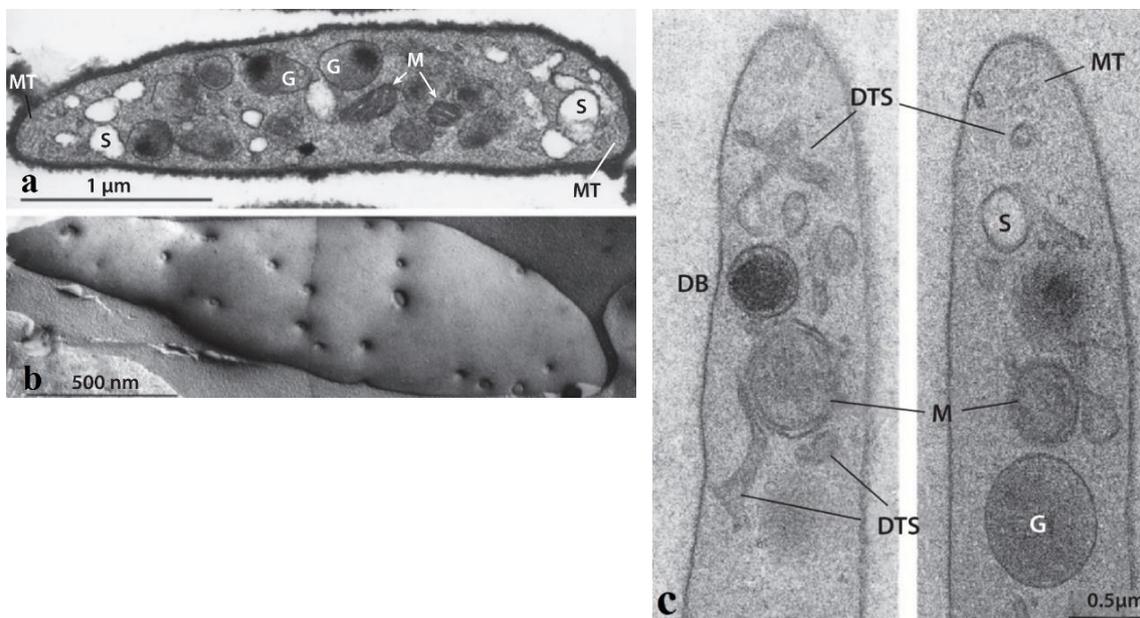
## **Die periphere Zone**

Die periphere Zone ist die äußere Begrenzung und gleichzeitig der Vermittler zwischen dem Zellinneren und seiner Umgebung. Die Zellmembran, eine typische nach innen negativ geladene Phospholipiddoppelschicht mit integrierten Membranproteinen, ist von einer Polysaccharidhülle, der Glykokalix, umgeben (vgl. Abb. 1.2, S. 13). Diese besteht aus den Zuckerketten der membranintegrierten, bzw. -assoziierten Glykolipiden, Glykoproteinen (GP) und Proteoglykanen. Die Vielfalt an Membranproteinen ist eine der besonderen Merkmale der ThZ und spielt eine zentrale Rolle in der Zellkommunikation, der Signalübermittlung ins Zellinnere und damit beim Ablauf der Hämostase.<sup>3(p18, p62)</sup> Die vielen unterschiedlichen Glykoproteine agieren als Oberflächenrezeptoren und interagieren mit löslichen oder gebundenen Liganden, mit Molekülen der extrazellulären Matrix (EZM) oder mit Rezeptoren anderer ThZ, Leukozyten und Endothelzellen.<sup>5</sup> Die Zusammensetzung der Zellmembran ist extrem dynamisch. Im Rahmen der ThZ-Aktivierung können sich die Membranlipide der Zellmembran innerhalb der Doppelschicht neu formieren und so z.B. die Exozytose von Botenstoffen erleichtern.<sup>3(p18)</sup> Negativ geladene Phospholipide werden an die Oberfläche der Zellmembran befördert. Die negative Oberflächenladung aktivierter ThZ spielt eine zentrale Rolle als Bindeglied zwischen thrombozytärer und plasmatischer Gerinnung.<sup>7</sup> Auch die Oberflächenrezeptoren sind in ihrer Anzahl und Zusammensetzung von der Aktivität der ThZ abhängig. Sie unterscheiden sich bezüglich Beschaffenheit, Aktivität und Funktion. Manche sind konstitutiv exprimiert und aktiv, andere müssen erst auf die ThZ-Oberfläche befördert und aktiviert werden. Ein Großteil der Rezeptoren befindet sich in Granula im Zellinneren oder ist entlang von Einstülpungen der Zellmembran verteilt.<sup>3(p62),5</sup> Manche

sind nur für einen speziellen Liganden bestimmt, andere gewähren die Interaktion mit mehreren Liganden.<sup>3(p18)</sup> Einige dienen der reinen ThZ-Aktivierung, andere auch der Adhäsion oder der festen Aggregation. Somit dient die periphere Zone v.a. der initialen Plättchenadhäsion und -aktivierung.<sup>1(p30)</sup> In Kapitel 1.2.2 (s. S. 17-19) werden die wichtigsten thrombozytären Oberflächenrezeptoren und deren Funktion erläutert.

## Das oberflächenverbundene Membransystem (SCS)

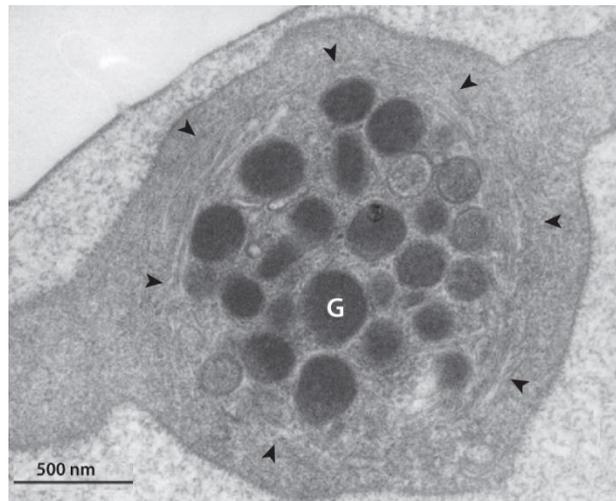
Im ruhenden ThZ findet sich ein weit ins Zellinnere hineinreichendes, verzweigtes Kanalsystem, welches durch Einstülpungen der Plasmamembran entsteht. Es steht mit der Plasmamembran und folglich dem Extrazellularraum in Verbindung, was durch Einmündungsstellen auf der ThZ-Oberfläche zu sehen ist.<sup>3(p25)</sup> Die gesamte Fläche des sog. „surface connected open canalicular system“ (SCS), zu Deutsch „oberflächenverbundenes Membransystem“, entspricht in etwa der Fläche der Zellmembran. Seine Membranorganisation entspricht ebenso dem Aufbau der Zellmembran.<sup>3(p25)</sup> So kann es in aktivierten ThZ als Membranreservoir dienen, an die Oberfläche befördert werden und zur Formänderung der ThZ beitragen. Auf gleiche Weise fungiert es als Rezeptorreservoir und Transportsystem für die Sekretion und Aufnahme von Partikeln.<sup>3(p25),5</sup>



**Abbildung 1.2:** EM-Aufnahme ruhender, diskusförmiger ThZ; **(a):** Spezialfixierung zur Darstellung der Glykokalix; **(b):** Darstellung der ThZ-Oberfläche mit Öffnungen des SCS; **(c):** Darstellung der Zellorganellen: MT (Mikrotubuli), DTS (dense tubular system), S (SCS), DB (dense bodies), M (Mitochondrien), G ( $\alpha$ -Granula); <sup>3(p17)</sup>

## Die strukturelle Zone

Unmittelbar unterhalb der Plasmamembran, mit den Membranproteinen der peripheren Zone verbunden, liegt die strukturelle Zone. Durch ein Zusammenspiel verschiedener struktureller Komponenten wird ein submembranäres Zytoskelett (SMC) gebildet. Dazu gehört ein randständig verlaufender, formgebender Mikrotubulus, ein kontraktiles Netzwerk aus Aktinfilamenten, welches das gesamte Zytoplasma durchspannt, und diverse Adapterproteine, die die kontraktile Komponente mit der Plasmamembran und deren Rezeptoren verbinden.<sup>3(p20)</sup>



**Abbildung 1.3:** EM-Aufnahme eines durch Kollagen aktivierten, sich in der Form verändernden ThZ: Abrundung, Pseudopodienbildung, Zentralisation der Organellen (G) durch Kontraktion des submembranären Zytoskeletts (Pfeilspitzen),<sup>3(p21)</sup>

Das Zytoskelett hat die Konsistenz eines viskoelastischen Gels und die Aufgabe, die native, diskusförmige ThZ-Form stabil gegen Scherkräfte zu halten sowie die durch ThZ-Aktivierung ausgelöste Formveränderung zu gewährleisten. Weiterhin beeinflusst das SMC die Zusammensetzung der Oberflächenrezeptoren und verhindert als Exozytosebarriere die unkontrollierte Freisetzung der Granula während Formveränderungen.<sup>3(p20)</sup> In aktivierten ThZ führt die Kontraktion des Zytoskeletts zur Zentralisation der Zellorganellen. Gleichzeitig breitet sich das Zytoplasma aus und die ThZ bilden Zellausläufer, Pseudopodien, welche die ThZ-Oberfläche vergrößern.<sup>1(p50)</sup> Die Kondensation der Zellorganellen im Zellzentrum ermöglicht Interaktionen zwischen den thrombozytären Granula und geht deren anschließender Exozytose voran (vgl. Abb. 1.3).<sup>3(p20),8</sup> Am Ende der Thrombusformation führt die Aktivierung des kontraktile Zytoskeletts aller beteiligten ThZ außerdem zur gesamten Kontraktion, Schrumpfung und

Festigung des Thrombus. Die entstandenen Rezeptor-Liganden-Komplexe werden in die ThZ hineingezogen, was zur Annäherung der ThZ und Festigung der Zellkontakte führt.<sup>3(p20)</sup>

## **Die Zone der Organellen**

Im Inneren der ThZ, liegt die Zone der Zellorganellen. Dort finden sich typische eukaryotische Organellen, wie Mitochondrien, Glykogenspeicher und verschiedenste Arten von Speichergranula (vgl. Abb. 1.2, S. 13).<sup>3(p21)</sup> Die thrombozytäre Energiebereitstellung kann sowohl durch anaerobe Glykolyse der zellulären Glykogenreserven als auch, bei ausreichendem Substrat- und O<sub>2</sub>-Angebot, durch oxidative Phosphorylierung (OXPHOS) in den Mitochondrien erfolgen.<sup>1(p31)3(p22)</sup> Der Aufbau der Mitochondrien und der Ablauf der OXPHOS wird in Kapitel 1.7 (s. S. 32-37) genauer besprochen.

Es werden drei thrombozytäre Granulaformen unterschieden:  $\alpha$ -Granula, elektronendichte Granula („dense bodies“) und Lysosomen.<sup>3(p68)</sup> Ihre gespeicherten Proteine sind unerlässlich für eine optimale ThZ-Funktion. Nach deren Freisetzung aus aktivierten ThZ verstärken sie bspw. die Aktivität der eigenen Zelle und rekrutieren und stimulieren zirkulierende ThZ. Die Tabelle 1.1 (s. S. 16) gibt einen Überblick über wichtige Inhaltsstoffe thrombozytärer Granula. In ruhenden ThZ werden die Granula von Zytoplasma umgeben und durch das SMC aus Aktinfilamenten voneinander getrennt. Dieser Schutz vor Fusion untereinander, mit der Plasmamembran oder dem SCS, geht in aktivierten ThZ verloren. Durch Kontraktion des Zytoskeletts nähern sich die Granula aneinander und an die Plasmamembran an, was deren Fusion und anschließende Exozytose ermöglicht.<sup>8</sup> Auch durch Fusion mit dem SCS können die Granula nach extrazellulär befördert werden.<sup>1(p30)</sup> Die aktivierungsabhängige Exozytose der Granula ist ein hochkomplexer, ATP-abhängiger Prozess.<sup>3(p71)</sup>

Mit einem Anteil von bis zu 15% am ThZ-Volumen, einer Größe zwischen 100-400 nm und einer Füllung mit über 280 verschiedenen Proteinen, stellen die  $\alpha$ -Granula den Hauptteil der Speichergranula dar. Sie enthalten viele adhäsive Glykoproteine, die die ThZ-Adhäsion und -Aggregation unterstützen, sowie pro- und antikoagulatorische Faktoren der plasmatischen Gerinnung.<sup>3(p68)</sup>

Die ca. 200 nm messenden „dense bodies“ beteiligen sich mit bis zu 1,2% am Zellvolumen. Namensgebend ist ihr elektronendichter Inhalt, v.a. Kalziumionen und anorganisches Phosphat, der sie im Elektronenmikroskop als dunkle Flecken darstellen lässt.<sup>3(p22)</sup> Weitere Inhaltsstoffe, wie ADP und Serotonin, führen zur Amplifikation der

ThZ-Aktivität. Die dritte Granulaform, die Lysosomen, beinhaltet eine Vielfalt an hydrolytischen Enzymen und dienen als Abbaustation überschüssiger Materialien und der Abtötung von Krankheitserregern.

In der Organellenzone findet sich weiterhin das sog. abgeschlossene Membransystem, das aufgrund seiner Erscheinung im Elektronenmikroskop auch als „dense tubular system“ (DTS) bezeichnet wird.<sup>3(p21)</sup> Es stellt ein zweites, stark verzweigtes, flächiges Hohlraumsystem mit ubiquitärer Verteilung dar. Als Abkömmling des endoplasmatischen Retikulums der Megakaryozyten stellt es ein wichtiges intrazelluläres Kalziumdepot dar und übernimmt deshalb eine wesentliche Rolle in der Steuerung der Plättchenaktivität.<sup>3(p21),5</sup>

Inhaltsstoffe der $\alpha$ -Granula	
Adhäsionsmoleküle	Fibrinogen, vWF, Thrombospondin-1, Fibronectin
Membranproteine	P-Selektin, , GPIIb/IIIa
Prokoagulatorische Faktoren	Faktor V/ VII/ XI/ XIII
Antikoagulatorische Faktoren	Plasminogen, Plasminogenaktivatorinhibitor, Tissue Factor pathway inhibitor, Protein C/S, $\alpha$ 2-Antiplasmin
Chemokine	Plättchenfaktor 4 (PF4), Plättchenaktivierender Faktor (PAF), $\beta$ -Thromboglobulin ( $\beta$ TG)
Wachstumsfaktoren	epidermal growth factor (EGF), vascular endothelial growth factor (VEGF), platelet-derived growth factor (PDGF)
Inhaltsstoffe der „dense bodies“	
Nukleotide	ADP, ATP, GDP und GTP (Guanosindj- bzw. -triphosphat)
Anionen, Kationen	Phosphat, $Ca^{2+}$ , $Mg^{2+}$
Transmitter	Serotonin, Histamin
Inhaltsstoffe der Lysosomen	
Proteasen	Elastase, Kollagenase, Heparinase
Saure Hydrolasen	Glycohydrolasen

**Tabelle 1.1:** Inhaltsstoffe thrombozytärer Granula, modifiziert nach<sup>9,3(p69)</sup>

## 1.2.2 Thrombozytäre Oberflächenrezeptoren

Im Folgenden werden die wichtigsten thrombozytären Oberflächenrezeptoren und deren Liganden beschrieben. Sie bilden die Grundlage zum Verständnis der hochkomplexen Reaktionen während der primären Hämostase.

### Von-Willebrand-Faktor (vWF) und VWF-Rezeptor (GPIb/IX/V)

Der vWF ist ein großes Glykoprotein, das von Megakaryozyten und Endothelzellen produziert wird. ThZ speichern vWF in ihren  $\alpha$ -Granula, während Endothelzellen ihn kontinuierlich ins Blutplasma sezernieren bzw. in sog. Weibel-Palade-Körperchen speichern können.<sup>10</sup> Als ein im Blut frei zirkulierendes Adhäsionsprotein bindet sich der vWF schnell und spezifisch an Kollagen der subendothelialen Matrix, welche bei Endotheldefekten dem Blut exponiert wird.<sup>7,10</sup> Weiterhin kann sich vWF auch zu hochmolekularen Multimeren zusammen lagern, die aufgrund ihrer Masse gerinnungsaktiver sind und mehrere vWF-Rezeptoren binden.<sup>7</sup> Nach Anlagerung an Kollagen, erfährt der vWF eine Aktivierung durch Konformationsänderung, die eine Bindung an den thrombozytären vWF-Rezeptor-Komplex, GPIb/IX/V, ermöglicht.<sup>3(p8)</sup> Der vWF-Rezeptor GPIb/IX/V ist ein Komplex aus mehreren Glykoproteinen und der einzige Rezeptor, der in inaktiven ThZ ausreichend hohe Affinität gegenüber aktiviertem vWF aufweist.<sup>10</sup> Er ist der zweithäufigste Rezeptor der ThZ-Oberfläche.<sup>3(p62)</sup>

### Kollagen und Kollagen-Rezeptoren (GPIa/IIa, GPVI)

Kollagen gilt als eines der potentesten Vermittler von ThZ-Adhäsion und -Aktivierung und ist das Hauptprotein der subendothelialen Matrix.<sup>10</sup> Zwei Kollagen-Rezeptoren stehen auf der ThZ-Oberfläche zur Verfügung: Glykoprotein VI (GPVI) und GPIa/IIa (Integrin  $\alpha 2\beta 1$ ).<sup>10</sup> GPVI weist nur geringe Affinität zu Kollagen auf, ist allerdings, ähnlich wie der GPIb/IX/V-Rezeptor-Komplex, bereits in inaktiven ThZ bindungsfähig. Er dient der initialen Abbremsung der ThZ aus der Blutbahn, Annäherung an die Gefäßwand und vorläufigen, schwachen ThZ-Adhäsion und Aktivierung.<sup>7,10</sup> Der zweite Kollagenrezeptor, GPIa/IIa, ist im Unterschied zu GPVI erst nach ThZ-Aktivierung bindungsfähig. Er sorgt für eine feste Adhäsion an die EZM, Formänderung und Degranulation der ThZ.<sup>10</sup> Beide Rezeptoren scheinen synergistisch zu wirken.<sup>10</sup>

## Fibrinogen und Fibrinogen-Rezeptor (GPIIb-IIIa)

Fibrinogen ist ein wichtiges Plasmaprotein, das sowohl für die thrombozytäre als auch die plasmatische Blutgerinnung essenziell ist. Es ist für die folgenden drei Funktionen verantwortlich: ThZ-Aggregation, Fibrin-Polymerisierung zu einem Gerinnsel nach dessen Umwandlung aus Fibrinogen und Aktivierung der Fibrinolyse.<sup>1(p57)</sup> Der Fibrinogen-Rezeptor, GPIIb/IIIa (Integrin  $\alpha 2\beta 3$ ), ist mit Abstand der häufigste thrombozytäre Rezeptor.<sup>10</sup> Er ist der entscheidende Rezeptor für die Thrombusformation, da er die Vernetzung der ThZ aneinander gewährleistet. Diese ThZ-Aggregation erfolgt über Fibrinogen, dem Hauptligand des Rezeptors, das als Bindeglied zwischen zwei GPIIb-IIIa-Rezeptoren fungiert. Auch diverse andere Proteine aus Plasma und aktivierten ThZ, wie z.B. vWF und Fibrin, können als Liganden fungieren.<sup>10</sup>

Rezeptor	Ligand	Funktion, Besonderheiten	Anzahl pro ThZ
GPIb/IX/V	vWF	aktiv in ruhenden ThZ, 1. Kontakt mit EZM, Abbremsen + instabile Adhäsion, zweithäufigster Rezeptor	~ 25.000 - 40.000
GPVI	Kollagen	aktiv in ruhenden ThZ, 1. Kontakt mit EZM, Abbremsen + instabile Adhäsion und initiale ThZ-Aktivierung	
GPIa/IIa ( $\alpha 2\beta 1$ )	Kollagen	Rezeptoraktivierung nach ThZ-Aktivierung, festere Adhäsion an subendotheliales Kollagen, Beteiligung an Formänderung	~ 2000 - 4000
GPIIb/IIIa ( $\alpha 2\beta 3$ )	Fibrinogen (vWF, Fibrin, Laminin)	Rezeptoraktivierung nach ThZ-Aktivierung, feste/irreversible Bindung an vWF/Fibrinogen, Verstärkung der ThZ-Aktivierung + Formänderung, wichtigster Rezeptor für ThZ-Aggregation über „Fibrinogen-Brücken“, häufigster Rezeptor,	~ 40.000 - 80.000
P2Y <sub>1</sub> / P2Y <sub>12</sub>	ADP	ADP-Bindung verstärkt ThZ-Aktivierung/-Adhäsion und -Aggregation	~ 150/500
TP	TxA <sub>2</sub>	Thromboxan A <sub>2</sub> Bindung verstärkt ThZ-Aktivierungsprozess	~ 1.000
PAR1/ PAR4	Thrombin	Thrombinbindung führt zur starken ThZ-Aktivierung. PAR1 ist sensitiver gegenüber Thrombin, als PAR4.	~ 1.8000

**Tabelle 1.2:** Übersicht über ThZ-Oberflächenrezeptoren, modifiziert nach <sup>1(p31),3(p62-64,84), 9-11</sup>

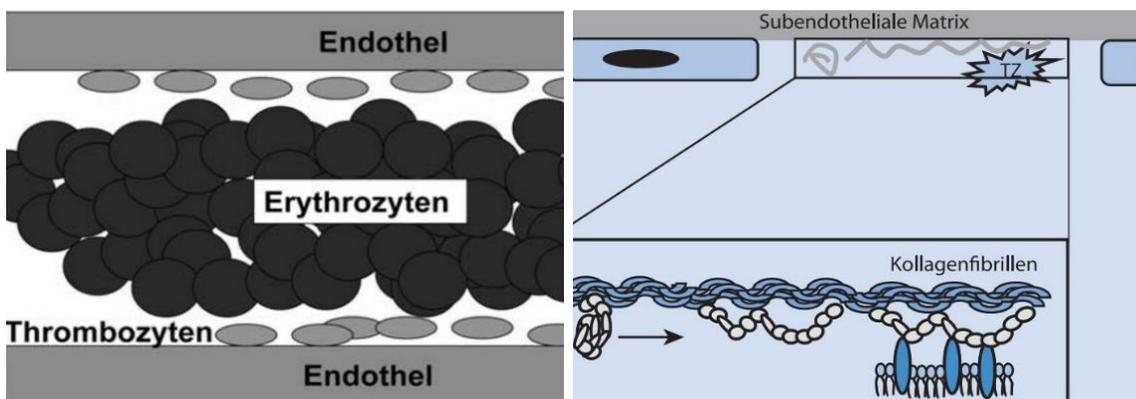
## ADP- /Thrombin- / Thromboxan A2- Rezeptoren

Neben Rezeptoren für ThZ-Adhäsion und -Aggregation besitzen ThZ weiterhin spezifische Rezeptoren für Aktivatorproteine.<sup>3(p62)</sup> Darunter zählen ADP, Thrombin und Thromboxan A2 (TxA<sub>2</sub>) (vgl. Tab. 1.2, S. 18). Diese Rezeptor-Ligand-Interaktion intensiviert die weitere Aktivierung bereits angelagerter ThZ und führt zur Rekrutierung und konsekutiver Aktivierung vorbeiströmender, inaktiver ThZ.<sup>9</sup>

### 1.2.3 Der Ablauf der thrombozytären Blutgerinnung

Die thrombozytäre Blutstillung beinhaltet folgende Prozesse: Adhäsion der ThZ am verletzten Gefäßendothel, initiale ThZ-Aktivierung und Formänderung, Freisetzung thrombozytärer Granula und Amplifikation der ThZ-Aktivierung, was letztendlich in der ThZ-Aggregation resultiert.<sup>1(p47), 7</sup>

Zelluläre und flüssige Bestandteile des Blutes fließen aufgrund hämodynamischer Effekte in getrennten Schichten. Durch hohe, gefäßwandnahe Scherkräfte, v.a. unter arteriellen Strömungsbedingungen, werden die großen Erythrozyten in die Gefäßmitte verdrängt. Dieses Phänomen wird als Axialmigration bezeichnet und hinterlässt einen dünnen, thrombozytenreichen Plasmasaum am Gefäßrand (vgl. Abb. 1.4).<sup>12</sup> Trotz des engen Kontaktes zur Gefäßwand adhären bei deren Unversehrtheit unter physiologischen Bedingungen keine ThZ. Einerseits liegen keine Bindungsstellen der subendothelialen Matrix frei, andererseits sezerniert intaktes Endothel stetig antikoagulatorische und vasodilatierende Faktoren wie Prostaglandine, Stickstoffmonoxid (NO) und ADPasen.<sup>1(p53)</sup>



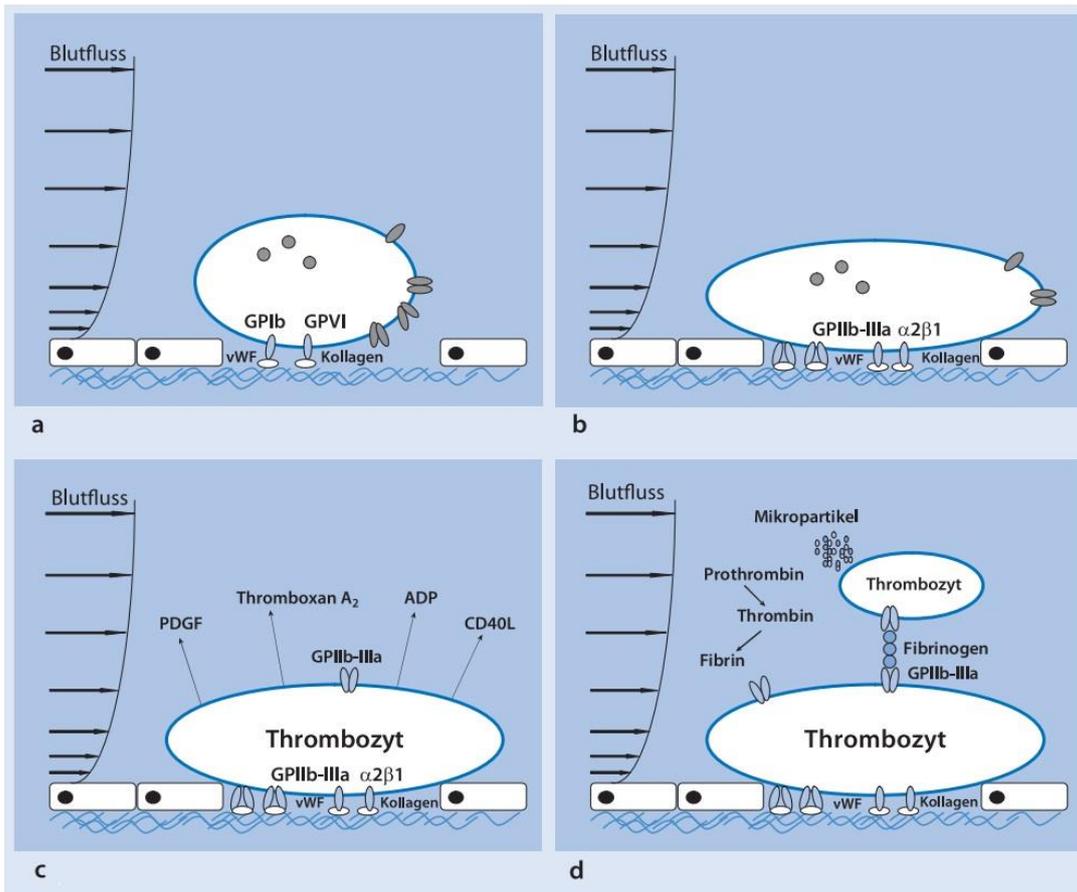
**Abbildung 1.4:** links: skizzierte Darstellung der erythrozytären Axialmigration mit thrombozytenreichem Plasmasaum, nach<sup>12</sup>; rechts: skizzierte Darstellung der globulären vWF-Multimere, deren Entfaltung durch Einwirkung von Scherstress (Pfeil), Adhäsion an Kollagen und Vermittlung der ThZ-Adhäsion, nach<sup>3(p8)</sup>

## **Endotheldefekt und Adhäsion**

Die Initiierung der Hämostase erfolgt über die Entstehung eines Endotheldefekts, den die vorbeiströmenden ThZ aufgrund ihrer unmittelbaren Nähe zur Gefäßwand direkt detektieren.<sup>3(p75)</sup> Der Kontakt mit dem Kollagen der subendothelialen Matrix wird durch ein Adapterprotein, dem vWF, vermittelt. Zu globulären Multimeren zusammengelagerter vWF wird durch den vorherrschenden Scherstress zwischen Gefäßwand und angrenzender Blutschicht entfaltet, wodurch deren Bindungsstellen für Kollagen und den thrombozytären GPIb/IX/V-Rezeptor freigelegt werden (vgl. Abb. 1.4, S. 19).<sup>3(p8,p75)</sup> Diese Rezeptor-Ligand-Interaktion ermöglicht zunächst ein Abbremsen der mit dem Blutstrom zirkulierenden ThZ. Sie nähern sich auf diese Weise dem Endotheldefekt an und werden entlang der Gefäßwand in Flussrichtung des Blutes gedehnt (vgl. Abb. 1.5 b, S. 21). Ihre Oberfläche wird dabei durch Einbau des SCS vergrößert.<sup>3(p76)</sup> Die Verankerung des GPIb/IX/V-Rezeptors mit dem Zytoskelett verleiht dem Rezeptor hohe Stabilität gegen die wirkenden Scherkräfte. Die hohe Dichte an GPIb/IX/V-Rezeptoren auf der Oberfläche ermöglicht die Ausbildung weiterer Kontakte während der ThZ-Streckung entlang der Gefäßläsion. Des Weiteren binden sich freie vWF-Moleküle an noch unbesetzte Rezeptoren der bereits anhaftenden ThZ. Vorbeiströmende ThZ können auf diese Weise in mehreren Schichten übereinander anhaften.<sup>1(p49-50)</sup> Für eine feste, irreversible Bindung an das Subendothel ist diese initiale Interaktion noch nicht ausreichend stark, erleichtert jedoch die Ausbildung weiterer Rezeptor-Ligand-Verbindungen.<sup>7,10</sup>

## **Aktivierung und Formveränderung der ThZ**

Der nächste entscheidende Schritt ist die Bindung an Kollagen über den GPVI-Rezeptor. Diese Rezeptor-Interaktion gibt den Startschuss für den initialen Aktivierungsprozess der ThZ. Aufgrund seiner relativ geringen Affinität zu Kollagen, spielt er selbst aber nur eine untergeordnete Rolle bei der ThZ-Adhäsion. Der GPVI-Kollagen-Interaktion folgt eine Konformationsänderung und Aktivierung des zweiten Kollagen-Rezeptors, GPIIb/IIIa, sowie des GPIIb/IIIa-Rezeptors.<sup>3(p63)</sup> Beide Rezeptoren zählen zu den sog. Integrin-Rezeptoren, die eine feste Adhäsion an extrazelluläres Kollagen bzw. vWF vermitteln (vgl. Abb. 1.5 b, S. 21). Diese feste Adhäsion führt zusammen mit der initialen Kollagen-Bindung zur ThZ-Aktivierung, die zur Formveränderung, Granulafreisetzung und letztlich zur Amplifikation der ThZ-Aktivierung und Rekrutierung führt (vgl. Abb. 1.5 c, S. 21).<sup>1(p50),3(p82),10</sup>



**Abbildung 1.5:** Veranschaulichung der initialen ThZ-Adhäsion an vWF und Kollagen der subendothelialen Matrix (a), feste Adhäsion über aktivierte GPIIb/IIIa- ( $\alpha_2\beta_1$ ) und GPIIb/IIIa-Rezeptoren (b), ThZ-Aktivierung, Granulasekretion (c) und ThZ-Aggregation über Fibrinogenbrücken mit parallel ablaufender plasmatischer Gerinnung (d); nach<sup>3(p64)</sup>

Aktivierte ThZ verändern ihre Form, indem sie durch Kontraktion des Zytoskeletts ihre Zellorganellen zentralisieren und gleichzeitig ihre Oberfläche durch Ausbildung von Pseudopodien vergrößern (vgl. Abb. 1.3, S. 14). Behilflich bei der Oberflächenvergrößerung ist der Einbau des im Zellinneren gelegenen SCS. Damit steigt die Anzahl der auf der Oberfläche exprimierten GPIIb/IIIa-Rezeptoren auf das Doppelte an.<sup>1(p50)</sup> Im Rahmen dieser Formänderung verschmelzen die ThZ-Granula mit der Plasmamembran, was zur Freisetzung deren Inhaltsstoffe führt. Weiterhin bilden aktivierte ThZ Thromboxan A<sub>2</sub> (TxA<sub>2</sub>) aus Arachidonsäure, welches über den thrombozytären Thromboxan-Rezeptor zur Verstärkung des Aktivierungsprozesses führt.<sup>9</sup> TxA<sub>2</sub> führt außerdem durch seinen vasokonstriktiven Effekt zur lokalen Drosselung des Blutflusses und erleichtert damit die Thrombusformation.<sup>9</sup> Außerdem spalten aggregierte ThZ prokoagulatorische Mikropartikel von der Oberfläche ihrer Zellmembran ab. Diese regen die Thrombinbildung an und fördern damit die plasmatische Blutgerinnung. Thrombin wiederum wirkt als starker

ThZ-Stimulator positiv verstärkend auf den Aktivierungsprozess. Zusätzlich katalysiert es die Umwandlung von Fibrinogen zu Fibrin in der Umgebung des ThZ-Aggregats, was letztendlich zur Thrombusfestigung beiträgt.<sup>9,3(p65)</sup>

### **Freisetzung von Granulainhalten, Amplifikation und Rekrutierung**

Aktiviert ThZ sezernieren reichlich ADP aus ihren Granula.<sup>9</sup> Über spezifische P2Y<sub>1</sub>- und P2Y<sub>12</sub>- Rezeptoren potenziert ADP die initiale ThZ-Aktivierung, rekrutiert und aktiviert vorbeiströmende, inaktive ThZ und unterstützt die Thrombin- und TxA<sub>2</sub>-vermittelte ThZ-Aktivierung.<sup>9,3(p84)</sup> Auch sezerniertes Serotonin fungiert als Verstärker der ThZ-Aggregation und wirkt ähnlich wie TxA<sub>2</sub> vasokonstriktiv.<sup>9</sup> In den  $\alpha$ -Granula befinden sich weiterhin vWF-Multimere, Fibrinogen sowie Faktor XIII. Auch sind weitere GPIIb/IIIa-Rezeptoren enthalten, die in die Plasmamembran eingebaut werden.<sup>13</sup> Gleichzeitig führt die Sekretion von pro- und antikoagulatorischen Faktoren, wie die Gerinnungsfaktoren V, VII, XI, XIII bzw. Plasminogen oder Protein C und S, zur unmittelbaren Verbindung von thrombozytärer und plasmatischer Gerinnung. Insgesamt führt die Degranulation der ThZ zur Ansammlung weiterer aktivierter ThZ an der Verletzungsstelle und zur Intensivierung der ThZ-Adhäsion und Aggregation. Die hohe Konzentration an Adhäsionsproteinen, Stimulanzen und plasmatischen GF potenziert auf diese Weise die Schritte der thrombozytären und plasmatischen Hämostase in direkter Umgebung zur Verletzungsstelle.<sup>3(p76)</sup>

### **Stabilisierung durch irreversible ThZ-Aggregation**

Entscheidend für die Ausbildung eines festen Thrombus ist die Aktivierung von GPIIb/IIIa. Er ist der häufigste Rezeptor der ThZ-Oberfläche und vermittelt die feste und irreversible Adhäsion an der Gefäßläsion und Aggregation der ThZ untereinander.<sup>3(p64)</sup> Im Rahmen der thrombozytären Aktivierung und Formveränderung steigt die Dichte an GPIIb/IIIa auf der ThZ-Oberfläche drastisch an. Als Bindeglied zwischen zwei benachbarten GPIIb/IIIa-Rezeptoren fungiert Fibrinogen, das in ruhenden ThZ nur geringe Affinität gegenüber GPIIb/IIIa aufweist. Die ThZ-Aktivierung führt zur Konformationsänderung des Rezeptors, die die Affinität drastisch erhöht und v.a. die Bindung von löslichem Fibrinogen ermöglicht.<sup>13</sup> Dieses lagert sich auf den zu Clustern formierten Rezeptoren aktivierter ThZ ab, woran sich wiederum frische, rekrutierte ThZ binden. Auf diese Weise wird die irreversible ThZ-Aggregation und die Formation eines weißen ThZ-Aggregats ermöglicht (vgl. Abb. 1.5 d, S. 21).<sup>3(p85)</sup>

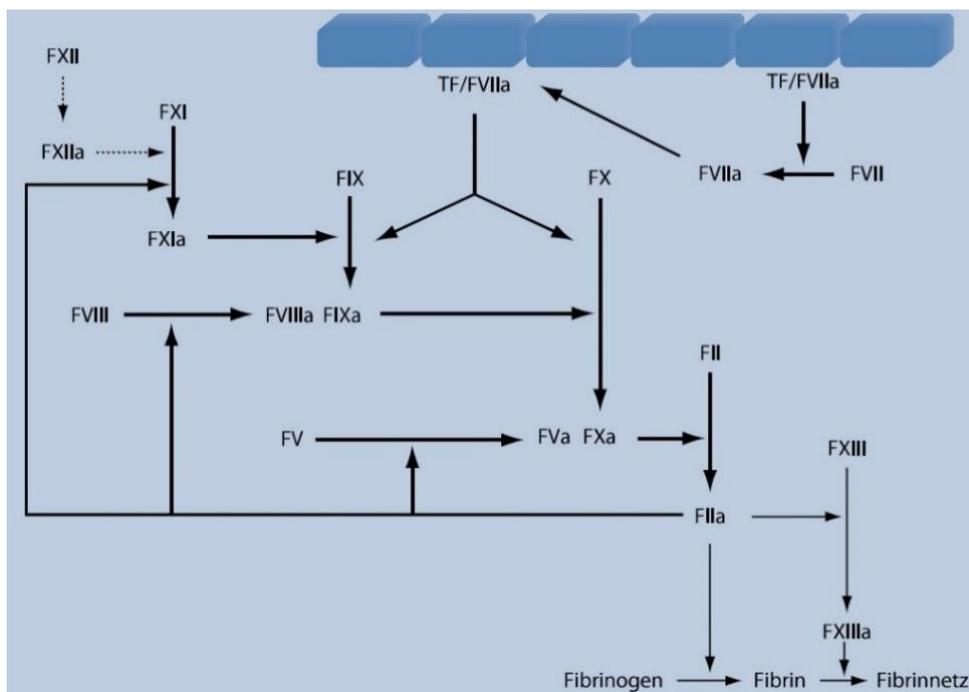
Auch in dieser Phase spielt die Formveränderung der ThZ eine wichtige Rolle. Durch Kontraktion des Zytoskeletts werden die an Fibrinogen gebundenen GPIIb/IIIa- Rezeptoren in Richtung des Zellzentrums gezogen, was die Kontakte zwischen den aggregierten ThZ verstärkt, das Thrombozytenaggregat schrumpfen lässt und dadurch stabilisiert.<sup>13</sup> Die Ausbildung eines stabilen Thrombus wird mit Hilfe der parallel ablaufenden plasmatischen Gerinnung vollendet. Die große Oberfläche der aggregierten ThZ fungiert als Plattform für die plasmatischen Gerinnungsfaktoren (GF), die sich dort anreichern. In aktivierten ThZ steigt der Gehalt an negativ geladenen Phospholipiden in der Plasmamembran.<sup>13</sup> Die plasmatischen GF können sich in Gegenwart von  $Ca^{2+}$  spezifisch an die nach extrazellulär gerichteten negativen Ladungen binden.<sup>2(p192)</sup> Weiterhin weisen die ThZ spezifische Rezeptoren für GF auf.<sup>13</sup> Durch Bindung an die ThZ werden sie zunächst vor ihren Inhibitoren geschützt und in räumliche Nähe zueinander gebracht. Nach ihrer Aktivierung im Rahmen der ThZ-Aggregation kann die plasmatische Gerinnung konzentriert, effektiv und lokal begrenzt auf der ThZ-Oberfläche ablaufen.<sup>13</sup> Letztendlich führt die plasmatische Gerinnung zum Einbau eines Fibrinnetzes in das Thrombozytenaggregat, was dem Thrombus seine finale Stabilität verleiht und Widerstandsfähigkeit gegen Abriss durch Scherkräfte gewährt.<sup>3(p79)</sup>

### **1.3 Die plasmatische Blutstillung**

Die plasmatische Blutgerinnung erfolgt zeitgleich mit der ThZ-Adhäsion am verletzten Gefäßendothel.<sup>3(p9)</sup> Sie wird durch die ausgeklügelte Interaktion von zwölf humoralen GF gewährleistet. Diese werden mit römischen Ziffern zw. I und XIII benannt. Die GF liegen zunächst als inaktive Vorstufen vor, um eine spontane Initiierung der Gerinnung zu vermeiden. Verschiedene Auslöser können ausgewählte GF aktivieren, die sich zu Enzymkomplexen zusammen lagern und andere GF aktivieren, welche wiederum weitere Enzymkomplexe bilden. Gebildete Komplexe können dabei stets eine Vielzahl an inaktiven GF aktivieren. Damit findet das Prinzip aus positiver Rückkopplung und Amplifikationsprozessen auch in der plasmatischen Blutstillung Anwendung.<sup>13</sup> Aktivierte Faktoren werden mit dem Suffix „a“ gekennzeichnet, z.B. FVII und FVIIa.<sup>3(p9)</sup>

Ein typischer Auslöser der plasmatischen Gerinnung ist die Interaktion von FVIIa mit Tissue Factor (TF). TF ist ein GF, der von Zellen der subendothelialen Matrix exprimiert wird. Nach einer Gefäßläsion kommt er in Kontakt mit im Blut zirkulierendem FVIIa, der zu einem geringen Anteil bereits aktiviert im Blut vorliegt (vgl. Abb. 1.6, S. 24). Der FVIIa-TF-Enzymkomplex ist zu Autoaktivierung befähigt. Er aktiviert rasch weiteren

FVII wodurch sich vermehrt FVIIa-TF-Komplexe bilden.<sup>1(p55)</sup> Diese aktivieren daraufhin die GF IX und X. Ein Teil dieser Faktoren bleibt an der Stelle der Gefäßläsion und sorgt dort für den Ablauf der Gerinnungskaskade. Ein anderer Teil diffundiert zu den negativ geladenen Phospholipiden der Plasmamembran bereits anhaftender ThZ.<sup>2(p189)</sup> Aufgabe des FIXa ist der Zusammenschluss mit noch inaktivem FVIII zum FIXa-VIII-Komplex, der die Aktivierung von FX zu FXa unterstützt. Diese Enzymaktivität ist zunächst noch sehr langsam, wird aber im Verlauf durch rückkoppelnde Aktivierung von FVIIIa um ein Vielfaches beschleunigt. Die geringen Mengen an FXa verbinden sich mit FV, aktivieren diesen und produzieren als FXa-FVa-Komplex aus Prothrombin den zentralen Verstärker der plasmatischen Gerinnung, das Thrombin (F IIa). Die vorerst geringen Mengen an Thrombin sind bereits ausreichend für eine initiale ThZ-Aktivierung. Weiterhin sorgt Thrombin nun für die Steigerung seiner eigenen Produktion, indem es die Faktoren V, VIII und XI verstärkt aktiviert. Die erhöhte lokale Konzentration der aktivierten GF führt zu einer explosionsartigen Verstärkung der Thrombingenerierung. Die massiv gesteigerte Thrombinkonzentration macht eine rasante Umwandlung von Fibrinogen zu Fibrin möglich, welches sich rasch zu einem Netzwerk polymerisiert. Dieses Fibrinnetzwerk spannt sich zwischen die zeitgleich aggregierenden ThZ und ermöglicht dessen Stabilisierung. Die anfänglich noch instabilen Fibrin-Quervernetzungen werden dann durch FXIIIa stabilisiert. Dieser wird sowohl von Thrombin aktiviert, als auch von den ThZ selbst ausgeschüttet.<sup>2(p189-191)</sup>



**Abbildung 1.6:** Ablauf der Gerinnungskaskade und Amplifikation durch Thrombin (FII/ FIIa); nach<sup>1(p56)</sup>

## 1.4 Fibrinolyse

Die Fibrinolyse beschränkt das Thrombuswachstum auf das Verletzungsareal und verhindert einen vollständigen Gefäßverschluss. Weiterhin ist sie eine wichtige Komponente der Wundheilung.<sup>1(p60)</sup> Der Abbau des gebildeten Thrombus wird durch die proteolytische Aktivität des plasmatischen Enzyms Plasmin gewährleistet. Analog zu den Rückkopplungsmechanismen, die zur Thrombusbildung führen, wird auch die Auflösung des Thrombus durch negative und positive Steuerungsvorgänge beeinflusst.<sup>1(p60)</sup> Zunächst muss Plasmin aus seiner inaktiven Vorstufe, Plasminogen, durch Gewebsplasminogenaktivator (tissue (t)-PA) gebildet werden. Hierbei dient das prokoagulatorische Fibrin als Kofaktor für t-PA und katalysiert dessen Aktivierung. Dadurch wird die Fibrinolyse v.a. in Bereichen starker Gerinnungsaktivität mit hoher Fibrinkonzentration gefördert. Plasmin spaltet anschließend sowohl lösliches als auch zu Netzwerken formiertes Fibrin. Hemmende Wirkung auf die Fibrinolyse vermittelt  $\alpha$ 2-Antiplasmin. Es gilt als wichtigster Inhibitor der Fibrinolyse durch irreversible Hemmung der Enzymaktivität von Plasmin.<sup>3(p12)</sup>

## 1.5 Regulationsmechanismen der Hämostase

Um eine unkontrollierte Thrombusbildung oder Fibrinolyse zu verhindern, wird die thrombozytäre und plasmatische Gerinnung durch verschiedene Mechanismen reguliert.<sup>3(p10)</sup> Dabei laufen prokoagulatorische und antikoagulatorische Mechanismen stets zeitgleich ab. Folgende vier Mechanismen zählen zu den wichtigsten Regulationssystemen: der Tissue Factor Pathway Inhibitor (TFPI), das Antithrombin-Heparin-System, das Thrombomodulin-Protein-C-System und das Prostazyklin-Thromboxan-System. Bei allen vier spielen die Endothelzellen eine zentrale Rolle.<sup>1(p58)</sup>

Der von Endothelzellen und aktivierten ThZ sezernierte TFPI bindet den FVIIa-TF-Komplex und FXa gleichzeitig, was zu deren unmittelbarer Inaktivierung führt. Die Gerinnungskaskade wird damit direkt von Beginn an unterbunden.<sup>1(p60)</sup> Gebildetes Thrombin leitet gleichzeitig einen antikoagulatorischen Rückkopplungsmechanismus ein. Es bindet an Thrombomodulin, einen Rezeptor der Endothelzellen, wodurch es seine prokoagulatorische Fähigkeit verliert und antikoagulatorische Eigenschaften entwickelt. Das veränderte Thrombin aktiviert antikoagulatorisches Protein C, welches im Komplex mit Protein S die prokoagulatorischen GF Va und VIIIa abbaut.<sup>3(p126)</sup> Thrombin wird zusätzlich

von im Plasma zirkulierenden Enzymen in seiner prokoagulatorischen Wirkung eingeschränkt. Dazu zählt Antithrombin, ein wichtiger Inhibitor von FIXa, FXa und Thrombin. Mit der Membranoberfläche von Endothelzellen verbundenes Heparansulfat sowie endogene Heparine beschleunigen den Inaktivierungsprozess von Antithrombin.<sup>1(p58)</sup> Endothelzellen sezernieren weiterhin Prostazyklin (PGI<sub>2</sub>), welches die ThZ-Aggregation hemmt, zur Gefäßdilatation führt und damit einen direkten Gegenspieler des thrombozytär produzierten TxA<sub>2</sub> darstellt.<sup>3(p11)</sup>

## **1.6 Thrombozytenfunktionsdiagnostik**

Im Laufe der vergangenen 100 Jahre wurde eine Vielzahl an Methoden zur Evaluation der ThZ-Funktion entwickelt. Sie basieren auf unterschiedlichen Funktionsprinzipien, die verschiedene Seiten der ThZ-Funktion beleuchten. Keines der diagnostischen Verfahren ist geeignet, um den kompletten Umfang der existierenden ThZ-Funktionsstörungen zu identifizieren.<sup>3(p846)</sup> Die ersten Schritte der ThZ-Funktionstestung prägte William Duke 1910 mit der Bestimmung der Blutungszeit in vivo.<sup>14</sup> Einen weiteren Meilenstein in der Geschichte der ThZ-Funktionstestung setzte Born 1962 durch die Entwicklung der Lichttransmissionsaggregometrie (LTA) für plättchenreiches Plasma (PRP). Sie ist seither die am weitesten verbreitete in-vitro Labormethode und gilt als Goldstandard der ThZ-Aggregationsmessung.<sup>14</sup> Mit der Entdeckung der Impedanzaggregometrie stellten Cardinal und Flower 1980 die Weichen für ein schnelleres, einfacheres und standardisierbares Messverfahren, welches sowohl mit PRP als auch mit antikoaguliertem Vollblut unter physiologischeren Bedingungen durchgeführt werden kann.<sup>15</sup>

Im Folgenden wird ein kurzer Überblick über die Bestimmung der Blutungszeit sowie die grundlegende Funktionsweise der LTA gegeben. Anschließend wird die Methode der Impedanzaggregometrie detailliert erläutert.

### **1.6.1 Blutungszeit**

Die Blutungszeit ist festgelegt als die benötigte Zeit vom Setzen einer definierten Hautverletzung bis zum Sistieren der Blutung. Sie ist schnell und einfach durchzuführen und erfasst v.a. die Funktion der thrombozytären Hämostase, da der rasche initiale Wundverschluss von der Geschwindigkeit der Plättchenaggregation geprägt ist.<sup>14</sup> Die standardmäßige Bestimmung der Blutungszeit ist mittlerweile obsolet, da sie durch diverse Parameter wie Hauttemperatur- und -dicke sowie der Hautdurchblutung beeinflusst wird und stark untersucherabhängig ist.<sup>3(p846)</sup>

## **1.6.2 Lichttransmissionsaggregometrie (LTA)**

Die LTA, auch photo-optische Aggregationsmessung nach Born genannt, basiert auf der photometrischen Ermittlung der Lichtdurchlässigkeit von PRP in einer Messküvette bei 37°C.<sup>14</sup> Die Zugabe eines ThZ-Agonisten löst eine ThZ-Aggregation aus, die zur Abnahme der Trübung des PRP führt und die Lichtdurchlässigkeit der Probe erhöht. Die Entwicklung der Lichtdurchlässigkeit während der Aggregation, von 0% in plättchenreichem bis 100% in plättchenarmem Plasma, wird als Kurve über die Zeit dargestellt.<sup>14</sup> Die Geschwindigkeit der Aggregatbildung und der prozentuale Anstieg der Lichtdurchlässigkeit lassen Rückschlüsse auf die Stimulations- und Aggregationsfähigkeit der ThZ schließen.<sup>16</sup> Eine große Auswahl an ThZ-Agonisten ermöglicht die Beurteilung verschiedenster Aktivierungswege. Damit analysiert die LTA ein breites Spektrum an thrombozytären Funktionsmechanismen.<sup>14</sup>

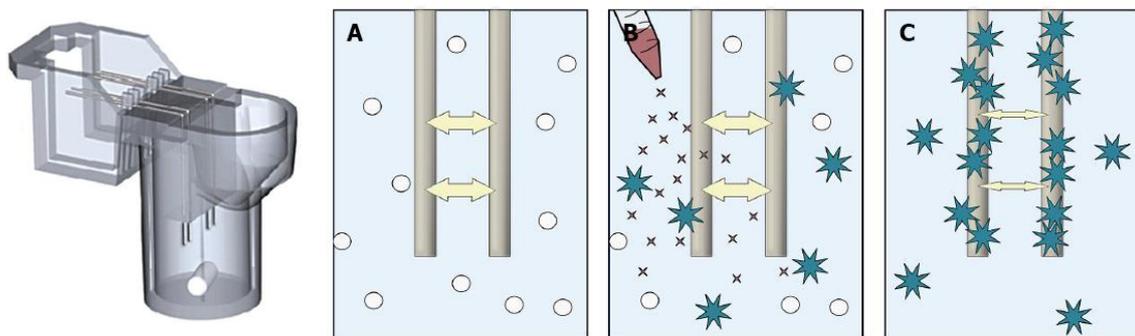
## **1.6.3 Impedanzaggregometrie**

Das impedanzaggregometrische Messprinzip der ThZ-Funktion kann sowohl an verdünntem, antikoaguliertem Vollblut als auch an PRP eingesetzt werden.<sup>15,17</sup> Die Blutprobe wird in einer Messküvette bei 37°C mittels eines magnetischen Rührstabes kontinuierlich bewegt, während der Wechselstromwiderstand (Impedanz) zwischen zwei Platinelektroden gemessen wird.<sup>17</sup> Nach Kontakt der Elektroden mit der Probe, wird diese Fremdoberfläche zunächst durch einen einschichtigen ThZ-Saum ummantelt, wodurch der Widerstand zwischen den Elektroden steigt, während der Stromfluss proportional sinkt. Bleibt eine weitere ThZ-Aggregation aus wird sowohl die Impedanz als auch der Stromfluss konstant gehalten, da unstimulierte ThZ zu keiner ThZ-Aggregation befähigt sind.<sup>17</sup> Kommt es jedoch durch Zugabe von ThZ-Aktivatoren zur Expression der GPIIb/IIIa-Rezeptoren, wird die Ausbildung eines vielschichtigen ThZ-Mantels um beide Elektroden möglich. Folglich steigt die Impedanz zwischen den Elektroden sukzessiv an. Dieser Impedanzzuwachs wird kontinuierlich aufgezeichnet und über die Zeit graphisch erfasst. Er ist proportional zum Ausmaß der Thrombozytenaggregation.<sup>15</sup>

Gegenüber der LTA weist die impedanzaggregometrische Funktionsanalyse der ThZ einige Vorteile auf. Die Messung an Vollblut erspart den zeitlich und technisch aufwändigen Prozess der PRP-Gewinnung, der sich durch Zentrifugations- und Pipettierschritte auch negativ auf die ThZ-Funktion auswirken kann.<sup>18</sup> Die Zentrifugation führt neben der be-

absichtigen Abtrennung von Erythrozyten und Leukozyten auch zum Verlust überdurchschnittlich großer ThZ. Die Zusammensetzung der ThZ in PRP entspricht somit nicht der physiologischen.<sup>15</sup> Weiterhin stellt die ThZ-Analyse im Vollblut gegenüber dem PRP physiologischere Konditionen dar, da sich auch andere Blutelemente an der Aggregation beteiligen können.<sup>14,15</sup> Elektronenmikroskopisch konnte nachgewiesen werden, dass bei der Nutzung von Vollblutproben auch rote und weiße Blutkörperchen im ThZ-Aggregat an den Elektroden eingeschlossen sind.<sup>15,18</sup> Leukozyten beeinflussen die Aggregationsprozesse, indem sie z.B. antiaggregatorisches Prostacyclin produzieren.<sup>15</sup> Der Messablauf ist schnell und einfach durchzuführen, bedarf deutlich weniger Probenmengen und kann leichter standardisiert werden.<sup>14,18</sup> Da die ThZ auf einer festen Oberfläche aggregieren können, kommt dieses Messverfahren im Vergleich zur LTA auch dem physiologischen Ablauf der thrombozytären Hämostase näher.<sup>14</sup>

Cardinal und Flower<sup>15</sup> verglichen 1980 die Thrombozytenfunktionsdiagnostik an PRP mittels Impedanzaggregometrie und LTA. Beide Messprinzipien zeigten vergleichbare Ergebnisse nach Stimulation mit den gleichen ThZ-Agonisten. Weiterhin verglichen sie die impedanzaggregometrische Messung an PRP und mit Citrat antikoaguliernem, verdünnten Vollblut. Auch hier zeigten sich vergleichbare Ergebnisse.<sup>15</sup>

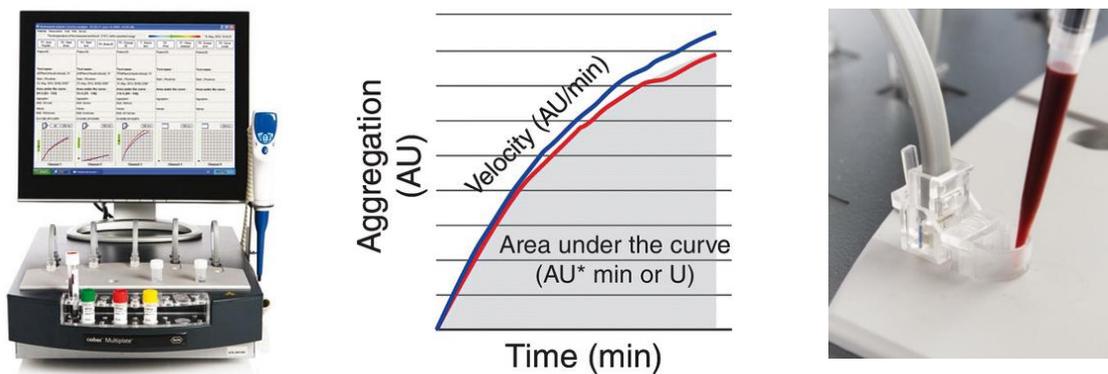


**Abbildung 1.7:** links: Multiplate®-Testzelle mit zwei Elektrodenpaaren und Magnetrührstab, nach<sup>19</sup> rechts: Messprinzip der Impedanzaggregometrie: zwei Elektroden vor Zugabe des ThZ-Agonisten (A), während Aktivierung (B) und während ThZ-Aggregation (C), nach<sup>20</sup>

### „Multiple Elektrode Aggregometry“ – der Multiplate®-Analyser

Der in dieser Arbeit verwendete Multiplate®-Analyser gehört zu einer neuen Generation der Impedanzaggregometrie.<sup>17</sup> Er zählt zu den “Point-of-Care-(POC)-Geräten”, da er aus nur wenigen µl Probematerial eine zügige, unkomplizierte und patientennahe Labordiagnostik erlaubt. Heutzutage kommt er in vielen anästhesiologischen und intensivmedizinischen Abteilungen zum perioperativen Gerinnungsmanagement und zur

Überwachung aggregationshemmender Therapien zum Einsatz. Diese weiterentwickelte Methode unterscheidet sich von der klassischen Impedanzaggregometrie nach Cardinal und Flower dadurch, dass die Impedanzmessung in einem Messkanal zeitgleich an jeweils zwei unabhängigen Elektrodenpaaren stattfindet. Die Nutzung von insgesamt vier Elektroden pro Messkanal verleiht dieser Methodik den Namen “Multiple Electrode Aggregometry” (MEA) und trägt als internes Kontrollsystem zur Reduktion systematischer Fehler bei (vgl. Abb. 1.8).<sup>18</sup> Weichen die Ergebnisse der zwei Einzelmessungen zu stark voneinander ab, wird der Benutzer aufgefordert, die Messung zu wiederholen. Der Name “Multiplate<sup>®</sup>” ist eine Abkürzung für “**m**ultiple **p**latelet function analyzer” und betont die Vielzahl an Kanälen und Sensoren, die ein paralleles Messen von insgesamt fünf Vollblutproben unter Einsatz von verschiedenen Reagenzien ermöglichen.<sup>21</sup> Die Standardmesszeit eines Durchlaufs beträgt nur sechs Minuten.<sup>22</sup>



**Abbildung 1.8:** links: Multiplate<sup>®</sup>-Analyser, nach<sup>19</sup>, mittig: Beispiel eines physiologischen Aggregationsergebnisses im Multiplate<sup>®</sup>, nach<sup>19</sup>, rechts: Nahaufnahme einer platzierten Messküvette in einem der fünf Kanäle, nach<sup>23</sup>

Die Messzellen des Multiplate<sup>®</sup>-Analyzers bestehen aus einem zentralen, zylindrischen Messbereich, einem vorderen, konischen Pipettiereinlass und einem hinteren, eckigen Buchsenbereich, welcher die elektrische Kontaktstelle zum Gerät darstellt (vgl. Abb. 1.8). Sie dienen ausschließlich der Einmalverwendung, um Fehlmessungen aufgrund von möglichen Aggregatrückständen nach dem Reinigen zu vermeiden.<sup>17</sup> In den zylindrischen Messbereich ragen die zwei Sensorpaare aus silberbeschichteten Kupferdrähten mit einem Durchmesser von 0,3mm. Der Kontakt zwischen Vollblutprobe und Sensordraht erstreckt sich über eine Länge von 3mm. Dort finden die oben beschriebenen Aggregationsprozesse statt. Am Boden des Messbereichs liegt ein teflonbeschichteter Magnetührstab, welcher die Probe während der Analyse mit 800 Umdrehungen pro Minute

durchmischt.<sup>21</sup> Die ThZ-Stimulanzen werden entweder mithilfe einer computer-gesteuerten Pipette oder manuell zugegeben. Anschließend wird die Impedanzveränderung über sechs Minuten kontinuierlich registriert und der Mittelwert beider Parallelmessungen in "Aggregation Units" (AU) angegeben.<sup>22</sup> Drei Parameter können zur Beurteilung der Aggregationsfunktion ermittelt werden. Der Anstieg der Impedanz, die Höhe der Aggregationskurve, gibt das Ausmaß der ThZ-Aggregation wieder und wird in [AU] angegeben. Die Steigung des Graphen spiegelt die Geschwindigkeit der Aggregatbildung wider und wird in [AUC/min] angegeben. Der dritte und vom Hersteller empfohlene Parameter ist die AUC, "Area under the aggregation curve", die eine Funktion letzterer beiden ist (vgl. Abb. 1.8, S. 29). Die AUC drückt die Aggregationsantwort über die gemessene Zeit aus und wird in [AU\*min] angegeben.<sup>21,22</sup> Eine eingeschränkte Plättchenaktivierung oder -aggregation präsentiert sich somit durch eine verminderte AUC. Alle Parameter sind durch die Multiplate<sup>®</sup>-Software ermittelte Durchschnittswerte der zwei Graphen, die sich aus den Messergebnissen der beiden unabhängigen Sensorpaare ergeben.<sup>22</sup>

Im Folgenden werden die vier in dieser Arbeit verwendeten Multiplate<sup>®</sup>-Reagenzien und deren Testprinzip erläutert. Sie sind zur Anwendung für 300µl einer Vollblutprobe zugelassen, die vor Analysebeginn in der Messküvette mit 300µl NaCl verdünnt wird.<sup>24</sup> Nach einer Inkubationszeit von 180 Sekunden mit laufendem Magnetrührstab bei 37°C folgt die Zugabe von je 20µl Multiplate<sup>®</sup>-Reagenz pro sechsminütiger Messung. Einige Einflussfaktoren können die Plättchenfunktion stören und die Messergebnisse beeinflussen. Hierzu zählen Medikamente und pflanzliche Arzneimittel, die Verwendung nicht vorgewärmter Kochsalzlösungen oder kürzere Inkubationszeiten.<sup>22</sup> Die Multiplate<sup>®</sup>-Reagenzien führen letztendlich zu den in Abschnitt 1.2.3 erläuterten Prozessen der ThZ-Aktivierung und Aggregation. Die gemeinsame Endstrecke ist die Exposition der GPIIb/IIIa-Rezeptoren und die Ausbildung von GPIIb/IIIa-Fibrinogen-Brücken. Deshalb führt ein Mangel an GPIIb/IIIa-Rezeptoren bzw. deren medikamentöse Hemmung zu einem ausbleibendem Testerfolg.

## **ADPtest**

Das im ADPtest-Reagenz enthaltene ADP stimuliert die ThZ über deren ADP-Rezeptoren P2Y<sub>1</sub> und P2Y<sub>12</sub>.<sup>25</sup> Eine medikamentöse Rezeptor-Hemmung durch ADP-Rezeptor-Antagonisten, bspw. durch Clopidogrel, führt zur reduzierten Aggregationsergebnissen im ADPtest (vgl. Abb. 1.10 mittig, S. 31).

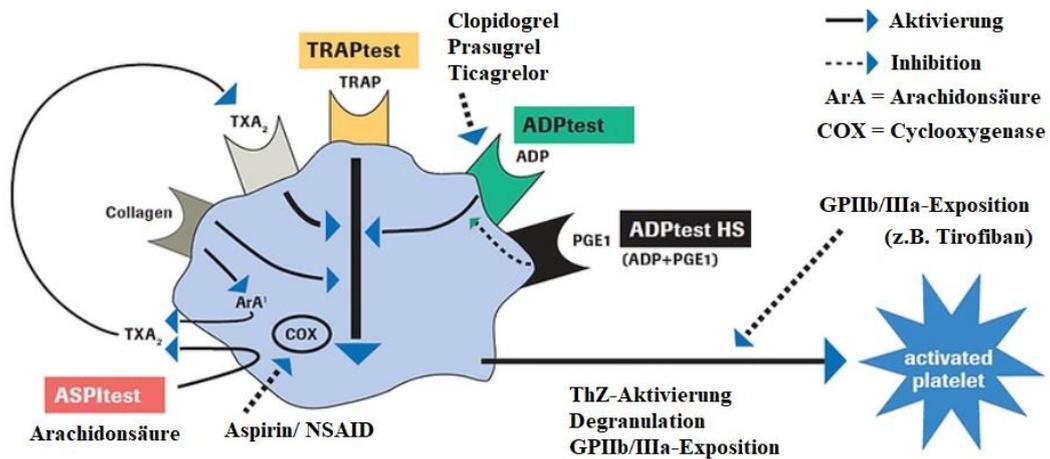


Abbildung 1.9: Darlegung verschiedener Multiplate®-Reagenzien und ihrer Aktivierungswege, nach<sup>26</sup>

### ASPItest

Das ASPItest-Reagenz enthält Arachidonsäure, die von thrombozytärer Cyclooxygenase (COX) zu  $\text{TxA}_2$  umgewandelt wird, einem potenten ThZ-Aktivator. Es eignet sich zur Bestimmung der thrombozytären COX-Aktivität, da die zugeführte Arachidonsäure allein zu keiner ThZ-Aktivierung führt. Sein Testergebnis wird folglich durch medikamentöse COX-Inhibierung mittels NSAR, z.B. Aspirin, beeinflusst (vgl. Abb. 1.10 mittig).<sup>25</sup>

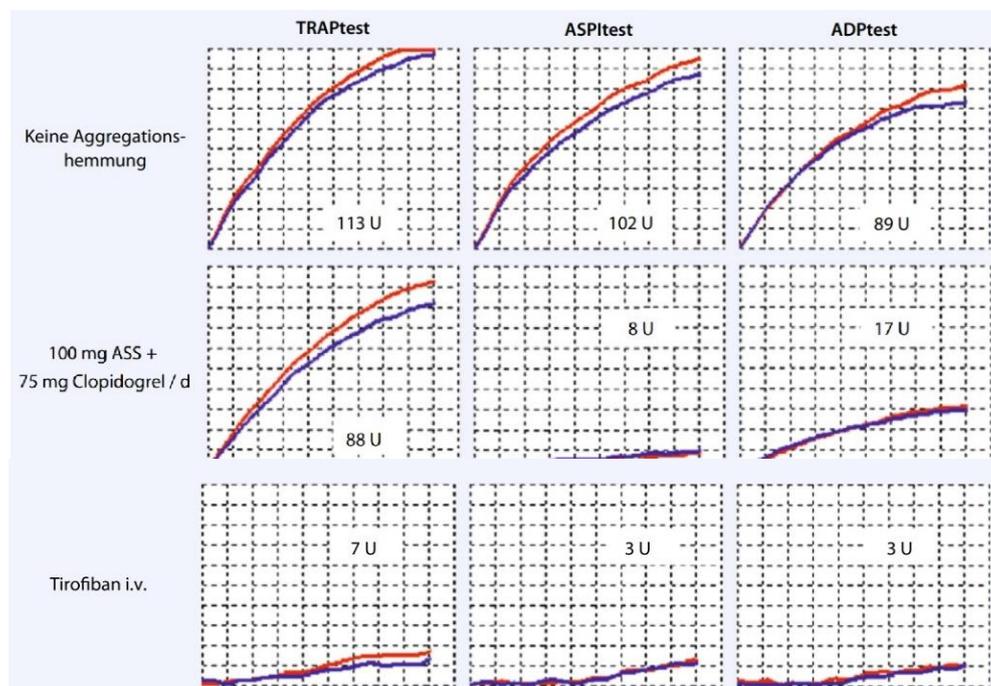


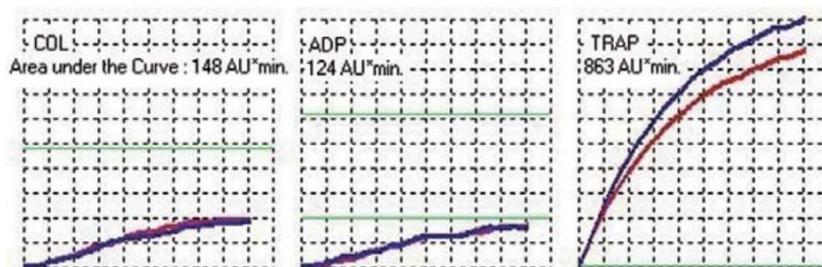
Abbildung 1.10: Beispiele von Multiplate®-Ergebnissen, **oben**: keine ThZ-Hemmung, **mittig**: nach Hemmung durch ASS (AUC im ASPItest vermindert) und Clopidogrel (AUC im ADPtest vermindert), **unten**: nach Hemmung des GPIIb/IIIa-Rezeptors durch den Antagonist Tirofiban (AUC aller Tests vermindert), nach<sup>27</sup>

## TRAPtest

Das TRAPtest-Reagenz enthält „Thrombin-Rezeptor aktivierendes Peptid-6“, TRAP-6 genannt, welches die Thrombin-Rezeptoren PAR1 und PAR4 stimuliert.<sup>25</sup> Thrombin ist der potenteste ThZ-Aktivator. Die Aktivierung über Thrombin wird imitiert und erlaubt die Analyse der GPIIb/IIIa-vermittelten Aggregation auch unter medikamentöser Behandlung mit ASS oder Clopidogrel (vgl. Abb. 1.10 mittig und unten, S. 31).<sup>25</sup>

## COLtest

Das COLtest-Reagenz enthält Kollagen-Typ I, das über die Kollagenrezeptoren zur intensiven ThZ-Aktivierung führt. Es folgt die Potenzierung der Aktivierung u.a. durch ADP-Sekretion und Stimulation der TxA<sub>2</sub> Produktion. Im COLtest vermitteln somit Kollagen, TxA<sub>2</sub> und ADP gemeinsam die ThZ-Aktivierung, weshalb die Einnahme von COX-Inhibitoren sowie ADP-Rezeptor-Antagonisten das Testergebnis beeinflusst.



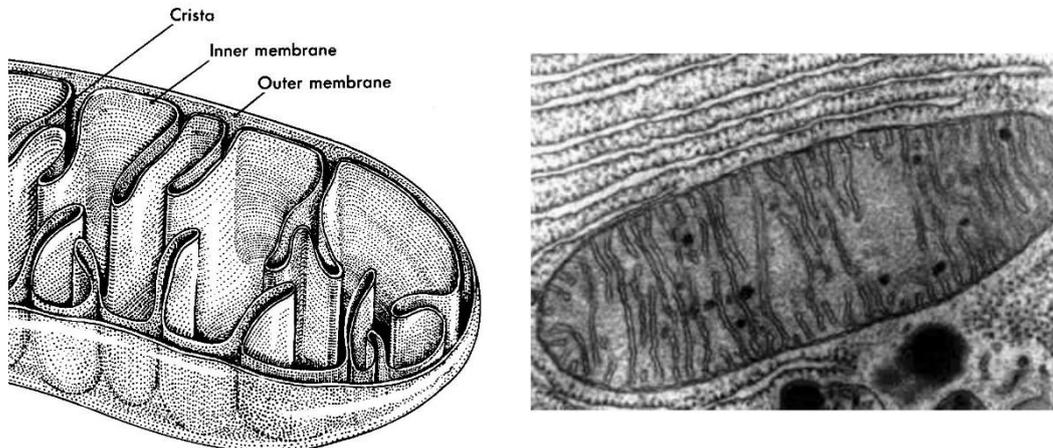
**Abbildung 1.11:** Beispiele eines Multiplate®-Ergebnisses nach medikamentöser Hemmung mit ASS und Clopidogrel, COL- und ADPtest zeigen sich vermindert, der TRAPtest unbeeinflusst, nach<sup>25</sup>

## 1.7 Aufbau und Funktion der Mitochondrien

Mitochondrien, die Kraftwerke der Zelle, stellen die Hauptenergielieferanten in ruhenden und aktivierten ThZ dar.<sup>28</sup> Ein einzelnes ovales Mitochondrium ist mit einem Durchmesser von 200nm in etwa so groß wie ein thrombozytärer „dense body“.<sup>3(p22)</sup> Mit insgesamt 3% nehmen sie aber einen fast doppelt so großen Anteil am thrombozytären Zytoplasmavolumen ein (vgl. Abb. 1.2, S. 13). Mitochondrien organisieren sich zu einem Netzwerk, das sich über das komplette Zytoplasma ausdehnt und die Diffusion mitochondrialer Proteine untereinander ermöglicht.<sup>29</sup> Ähnlich den thrombozytären Membransystemen unterliegt auch dieses einer hohen Dynamik. Durch Zusammenschluss und Abschnürung der Mitochondrien kann das Ausmaß des Netzwerks verändert werden und damit dem aktuellen Energiebedarf und den zellulären Bedingungen angepasst werden.<sup>29</sup>

## 1.7.1 Aufbau und Organisation der Mitochondrien

Die Hülle der Mitochondrien wird durch zwei Phospholipiddoppelschichten gebildet, die äußere und die innere Mitochondrienmembran.<sup>2(p46)</sup> Die Membranen bilden den dazwischen liegenden Intermembranraum (IMR). Die innere Membran bildet Einstülpungen, die sog. Cristae, die sich durch die Mitochondrienmatrix ziehen.



**Abbildung 1.12:** Mitochondrien: Schematische Zeichnung (links), nach<sup>30</sup> EM-Aufnahme (rechts), nach<sup>31</sup>

Die äußere Mitochondrienmembran (engl. OMM) umgibt das Mitochondrium, ähnelt stark der eukaryotischen Plasmamembran und ermöglicht durch Poren einen Transfer niedermolekularer Substanzen zwischen Zytosol und IMR.<sup>2(p507)</sup>

Die innere Mitochondrienmembran (IMM) bildet sich aus einer der OMM von innen anliegenden Grenzmembran und einer sich vielfach ins Mitochondrieninnere kammartig einstülpenden „cristal membrane“, welche die Cristae bildet.<sup>32</sup> Diese schaffen eine ca. sechsfach vergrößerte Oberfläche im Vergleich zur OMM. Die IMM trennt die stark proteinhaltige Matrix vom IMR und ist extrem dicht. Eine große Anzahl von Transportproteinen ermöglicht jedoch den Verkehr von Substanzen zwischen IMR und Matrix und reguliert den mitochondrialen Ionen- und Substratfluss und den Transport wichtiger Membranproteine.<sup>2(p507), 32</sup> Die Cristae bilden ein weites Netzwerk innerhalb der Matrix, in dem vorrangig die Atmungskettenkomplexe lokalisiert sind, was die „cristal membrane“ zum relevanten Kompartiment der oxidativen ATP-Produktion macht.<sup>32</sup>

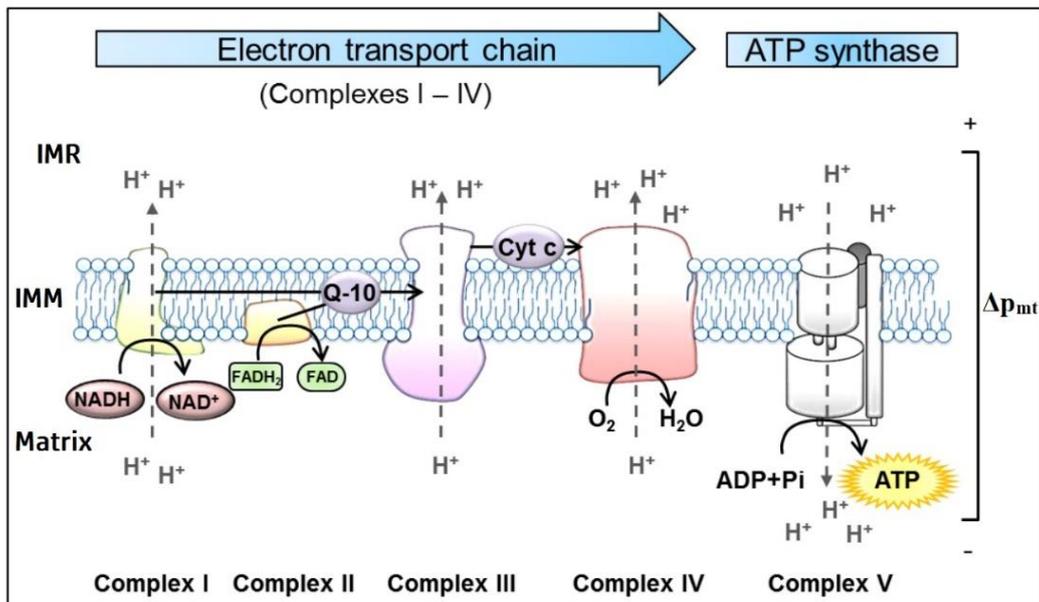
Die mitochondriale Matrix (MM) beinhaltet den Großteil der tausend mitochondrialen Proteine, darunter eine Vielzahl an Enzymen und Ribosomen. Neben den typischen Stoffwechselintermediaten aus Citratzyklus und  $\beta$ -Oxidation findet sich auch eigenständige zirkuläre DNA für 13 mitochondriale Proteine. Der Hauptteil wird im Zellkern synthetisiert und anschließend ins Mitochondrium importiert.<sup>2(p507)</sup>

## 1.7.2 Funktion der Mitochondrien

Im Mitochondrium werden die energiereichen Metabolite aus Glykolyse,  $\beta$ -Oxidation und Aminosäureabbau endgültig oxidativ abgebaut, wodurch effektiv ATP generiert wird.<sup>2(p507)</sup> Dieser Vorgang der oxidativen Phosphorylierung (OXPHOS) wird durch die Enzyme der Atmungskette geleistet. Dabei wird reichlich ADP zu ATP phosphoryliert und gleichzeitig  $O_2$  zu  $H_2O$  reduziert. Aufgrund des mitochondrialen  $O_2$ -Verbrauchs wird die OXPHOS auch als Zellatmung bezeichnet. Schon in ruhenden ThZ ist die OXPHOS mit einem Anteil von etwa 75-85% am totalen ATP-Umsatz beteiligt und etwa  $\frac{2}{3}$  des kompletten  $O_2$ -Verbrauchs sind auf die oxidative ATP-Produktion zurückzuführen.<sup>33,34</sup> Die restlichen 15-25% des ATP-Umsatzes in Ruhe stammen aus der anaeroben Glykolyse mit resultierender Laktatproduktion.<sup>34</sup> Je nach Substrat- und  $O_2$ -Angebot oder Aktivierungszustand ist es den Mitochondrien möglich ihren Stoffwechsel zu adaptieren, den Anteil an Glykolyse oder OXPHOS zu variieren und somit gegenseitig zu kompensieren.<sup>34</sup> In aktivierten Plättchen steigt neben der OXPHOS zusätzlich die Laktatproduktion. Die vielzähligen, energiekonsumierenden, morphologischen und funktionellen Veränderungen erhöhen den ATP-Bedarf. Dieser muss über die Eröffnung weiterer ATP-generierender Stoffwechselwege gestillt werden.<sup>35,36</sup>

### Ablauf der OXPHOS

Während Glykolyse,  $\beta$ -Oxidation und Citratzyklus wird energiereicher Wasserstoff auf die elektronentransportierenden Cofaktoren  $NAD^+$  und FAD übertragen, gespeichert und beim Durchlaufen der Atmungskette letztendlich zur Reduktion von  $O_2$  zu  $H_2O$  genutzt.<sup>2(p507)</sup> Die Atmungskette besteht aus aneinander gereihten Redoxreaktionen, daher auch Elektronentransportkette ("electron transport system", ETS) genannt. Sie finden an den großen membranintegrierten Enzymen, auch als Atmungskettenkomplexe bezeichnet, der mitochondrialen cristallmembran statt (vgl. Abb. 1.13, S. 35). Als OXPHOS wird der zweiphasige Prozess aus der Kombination von Redoxreaktionen in der ersten Phase und Phosphorylierungen in der zweiten Phase bezeichnet. An den Elektronentransport entlang der IMM ist gleichzeitig ein Protonen ( $H^+$ )-Fluss durch die IMM, von der Matrix in den IMR, gekoppelt. In dem hierdurch generierten Protonengradient zwischen Matrix und IMR wird Energie zwischengespeichert. Diese wird schlussendlich durch den Rückstrom von  $H^+$  zur Phosphorylierung von ADP zu ATP genutzt.<sup>2(p508)</sup>



**Abbildung 1.13:** Schematische Zeichnung der Atmungskettenkomplexe I-V und der mobilen Elektronenträger Ubichinon (Q-10) und Cytochrom c (Cyt c) in der IMM und des Ablaufs der OXPHOS, nach<sup>37</sup>

Insgesamt fünf Enzymkomplexe und zwei mobile Elektronenträger, die zwischen den Komplexen vermitteln, sind an der OXPHOS beteiligt (vgl. Abb. 1.13).<sup>37</sup> Davon beteiligen sich die Komplexe I, II und III zusammen mit den Elektronenträgern Ubichinon und Cytochrom c an der Elektronenbelieferung von Komplex IV, der dann die Reduktion von O<sub>2</sub> zu H<sub>2</sub>O vollzieht. Der Elektronenfluss folgt dabei einem Energiegefälle von starken Reduktionsmitteln bis hin zu starken Oxidationsmitteln. Die hierdurch freiwerdende Redoxenergie wird von den Komplexen I, III und IV für den aktiven Transport von H<sup>+</sup> aus der Matrix in den IMR genutzt.<sup>2(p508)</sup> Es bildet sich ein pH-Gradient sowie ein elektrischer Gradient zwischen protonenreichem, positiv geladenem IMR und protonenärmerer, negativ geladener Matrix.<sup>37,38</sup> Dieser elektrochemische Gradient schafft eine Potenzialdifferenz an den beiden Seiten der IMM, die als mitochondriales Membranpotential (Δp<sub>mt</sub>) bezeichnet wird.<sup>38,39</sup> Das Potential speichert Energie, welche im nächsten Schritt der OXPHOS zur ATP-Produktion genutzt wird. Komplex V, die ATP-Synthase, ermöglicht den H<sup>+</sup>-Rückfluss entlang des elektrochemischen Gradienten. Analog dem Prinzip einer Batterie, wird die freiwerdende Energie durch den H<sup>+</sup>-Rückstrom zur ATP-Produktion genutzt. Die ATP-Synthase phosphoryliert ADP der Matrix zu ATP, welches durch ein Transportprotein der IMM im Austausch gegen zytosolisches ADP in den IMR befördert wird.<sup>2(p518-20)</sup> Durch die Poren der OMM kann ATP ins Zytosol diffundieren.

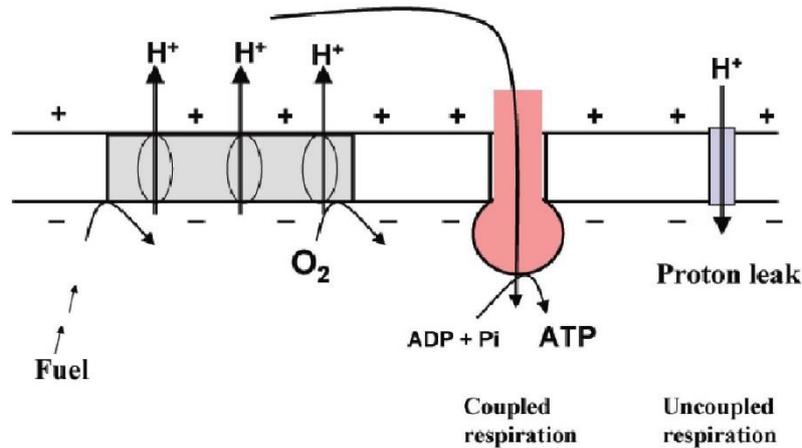
## Steuerung der Atmungskette

Je nach Energieladung und -bedarf der Zelle wird das Ausmaß der oxidativen ATP-Produktion angepasst. Dies wird durch enge Kopplung von Elektronentransport, Protonentranslokation, Redoxreaktionen und ATP-Synthese ermöglicht.<sup>2(p518-521),38</sup> Ist der zytosolische ATP-Gehalt der Zelle hoch und dementsprechend wenig mitochondriales ADP zur Phosphorylierung vorhanden, wird mit der ATP-Synthese auch der Elektronenfluss und folglich die Protonentranslokation dezimiert. Gesteigerter zytosolischer ATP-Verbrauch bei hoher Stoffwechselaktivität führt zur Translokation hoher Mengen an ADP in die Mitochondrienmatrix, wodurch der Ablauf der OXPHOS bis zu zehnfach gesteigert werden kann.<sup>2(p518-521),38</sup> Über das Angebot an Reduktionsmitteln NAD<sup>+</sup> und FAD, die als Vermittler zwischen Glykolyse,  $\beta$ -Oxidation und Citratzyklus und OXPHOS fungieren, werden auch diese Stoffwechselprozesse an die Geschwindigkeit der OXPHOS angepasst.

## Hemmstoffe und Entkoppler der Atmungskette

Nicht jedes zurückfließende H<sup>+</sup> wird im Mitochondrium zur Energieproduktion genutzt. Über Leckstellen in der IMM können H<sup>+</sup> entlang des elektrochemischen Gradienten in die Matrix zurück diffundieren und somit die ATP-Synthase umgehen (vgl. Abb. 1.14, S. 37).<sup>2(p521)</sup> Dieser „Kurzschluss“ führt demnach zur Reduktion von  $\Delta p_{mt}$  ohne dabei zur ATP-Synthese beizutragen. Die Protonen an Komplex I,III und IV werden gegen einen verminderten Gradienten transportiert, was den Elektronentransfer über die Atmungskette auf O<sub>2</sub> erheblich beschleunigt. Demnach steigt der mitochondrialen O<sub>2</sub>-Verbrauch und die gespeicherte Energie wird in Wärme umgewandelt und „verschwendet“.<sup>40</sup> Damit verringert sich die Effizienz der ATP-Produktion. Dieser Weg des mitochondrialen O<sub>2</sub>-Verbrauchs wird als „ungekoppelte“ Respiration bezeichnet. Das Protonenleck (engl. proton leak) ist physiologisch und nimmt über Prozesse der Signaltransduktion Einfluss auf die Zellphysiologie.<sup>41</sup> Die Thermogenese in braunem Fettgewebe funktioniert bspw. durch den Einbau eines Protonenkanals in die IMM, der ein starkes Protonenleck verursacht.<sup>41</sup> Weiterhin beeinflusst das Protonenleck die metabolische Anpassungsfähigkeit der Zelle.<sup>41</sup> Es spielt eine Rolle bei der Regulation des Körpergewichts oder der Prävention von oxidativem Stress und daraus hervorgehenden Mitochondrienschäden.<sup>40</sup> Auch lipophile, schwache Säuren können zur Entkopplung führen, wie bspw. Trif-

luorocarbonylcyanidphenylhydrazon (FCCP).<sup>2(p520-521)</sup> Nach Diffusion durch die Zellmembran und die OMM bindet das anionische FCCP  $H^+$  des IMR, passiert neutral geladen durch die IMM, um in der Matrix wieder in ein  $H^+$  und ein Anion zu dissoziieren.



**Abbildung 1.14:** Darstellung des Protonenlecks (proton leak) und der ungekoppelten mitochondrialen Respiration, nach<sup>40</sup>

Weiterhin existieren Hemmstoffe, die einzelne Komplexe der Atmungskette spezifisch inhibieren, was zur teilweisen bzw. kompletten Hemmung der OXPHOS führt. Diesen Effekt macht sich bspw. das Antibiotikum Antimycin A zu Nutze. Es führt über die Hemmung von Komplex III zum Erliegen der zellulären ATP-Produktion.<sup>2(p516)</sup> Gifte wie Cyanid ( $CN^-$ ) und Kohlenmonoxid ( $CO$ ) bringen den Ablauf der Atmungskette zum Erliegen, indem sie die Bindungsstelle für  $O_2$  an Komplex IV binden und für  $O_2$  unzugänglich machen. Das Antibiotikum Oligomycin hemmt die ATP-Produktion durch direkte Hemmung der ATP-Synthase.<sup>39</sup>

## 1.8 Analyse der mitochondrialen Funktion und Dysfunktion

### 1.8.1 Mitochondriale Dysfunktion

Dysfunktionale Mitochondrien weisen Fehlfunktionen der Atmungskettenkomplexe auf, die zum Versagen der aeroben Energiebereitstellung führen.<sup>42</sup> Die alleinige ATP-Bereitstellung über den anaeroben, glykolytischen Weg ist insbesondere in Zellen mit hohem Energieumsatz, darunter Nerven-, Leber- und Muskelzellen, nicht ausreichend und die Ermangelung an ATP führt zum Zelluntergang.<sup>43</sup> Mitochondriendefekte, sog. Mitochondriopathien, können angeboren sein oder durch Umwelteinflüsse und Erkrankungen im Laufe des Lebens erworben werden. Sie spielen v.a. im Bereich der Pädiatrie und Neurologie eine große Rolle. Ursachen angeborener Defekte sind meist Mutationen der

nukleären oder mitochondrialen DNA, die zu Fehlbildungen der Atmungskettenkomplexe führen.<sup>42</sup> Sie finden sich bspw. in Mitochondrien von Patienten mit Parkinson, Chorea Huntington, Alzheimer Demenz,<sup>43</sup> oder Leigh-Syndrom, einer der häufigsten Mitochondriopathien im Kindesalter.<sup>42</sup> Des Weiteren konnten mitochondriale Dysfunktionen auch im Rahmen der Sepsis<sup>43</sup> oder bei Patienten mit peripherer arterielle Verschlusskrankheit<sup>44</sup> nachgewiesen werden.

## **1.8.2 Analyse der mitochondrialen Funktion**

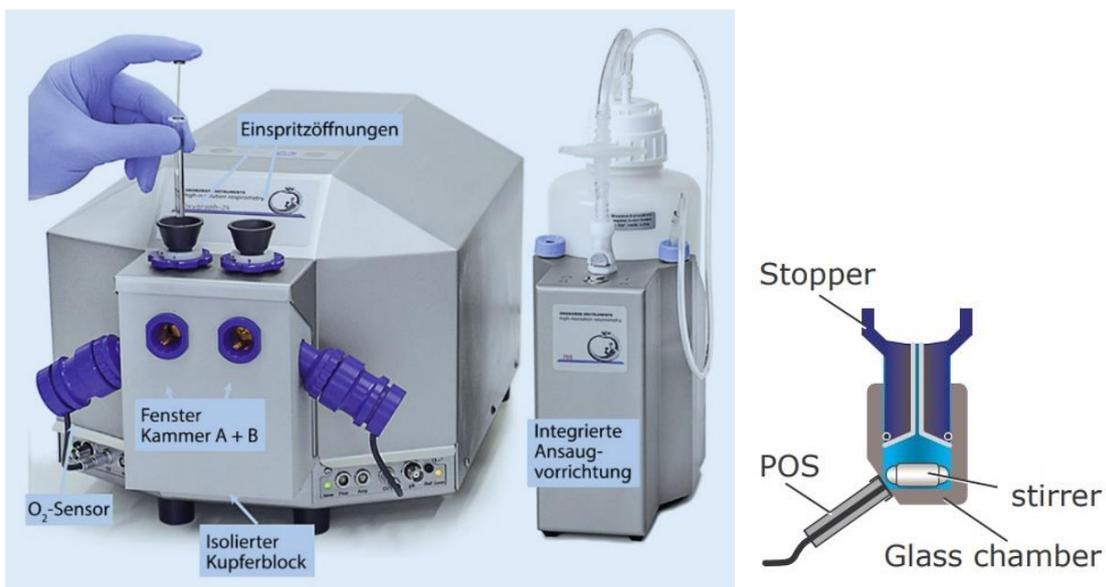
Zur Ermittlung der mitochondrialen Funktion und Dysfunktion ist meist eine Biopsie des betroffenen Gewebes notwendig, das sowohl histologisch als auch biochemisch untersucht wird. Sind Gehirn, Leber, oder Herz betroffen, birgt diese invasive Methode erhebliche Risiken, weshalb auch anderer Gewebetypen, wie bspw. Muskel oder Haut, als Alternative herangezogen werden.<sup>43</sup> Aufgrund der einfachen und minimalinvasiven Probengewinnung eignen sich außerdem Blutzellen gut zur Analyse der Mitochondrienfunktion. Veränderungen der thrombozytären Mitochondrienfunktion zeigen sich in einer Vielzahl von Erkrankungen, die primär andere Organsysteme betreffen.<sup>45</sup> ThZ können demnach als Indikator systemischer Mitochondrienfunktionsstörungen dienen.<sup>43</sup> Weiterhin fand sich ein Zusammenhang zwischen mitochondrialen Dysfunktionen in ThZ und dem physiologischen Alterungsprozess.<sup>46</sup>

Ein weit verbreitetes Verfahren zur Ermittlung der Mitochondrienfunktion und Detektion von Dysfunktionen ist das Prinzip der hochauflösenden Respirometrie mit Hilfe des Oxygraph-2k (O2k) der Firma Oroboros Instruments.<sup>39</sup> Dabei wird die Aktivität der mitochondrialen Atmungskette durch die Bestimmung des O<sub>2</sub>-Verbrauchs in einer mit Probengewebe befüllten Messkammer analysiert. Durch die Zugabe von Substraten, die die Atmungskette beeinflussen, kann deren Integrität und Leistungsfähigkeit beurteilt werden. Der Vorteil dieser Methodik ist die Einsatzmöglichkeit sowohl an isolierten Mitochondrien als auch an intakten Zellen.<sup>47</sup> Die Untersuchung isolierter Mitochondrien ermöglicht, durch Zugabe bestimmter Substrate und Inhibitoren, die getrennte Analyse der Enzymaktivität aller fünf Atmungskettenkomplexe.<sup>48</sup> Mitochondrien funktionieren jedoch nicht als einzeln stehende Zellorganellen, sondern bilden ein zusammengehöriges Netzwerk innerhalb der Zelle.<sup>29</sup> Weiterhin kann der Isolationsprozess der Mitochondrien zu Messwertverfälschungen führen.<sup>49</sup> Möchte man die Gesamtheit des dynamischen Mitochondriennetzwerks, mitsamt den mitochondrialen Interaktionen und deren Einbindung in den Zellorganismus analysieren, muss man die Mitochondrien intakter

Zellen analysieren.<sup>48</sup> Die Wahrung des physiologische Zellmilieus verhindert jedoch die Wirkung einiger mitochondrialer Substrate und Inhibitoren, die durch die intakte und undurchlässige Zellmembran nicht diffundieren können.<sup>49</sup> Die Möglichkeit der differenzierten Analyse der einzelnen Atmungskettenkomplexe entfällt und die ermittelte Mitochondrienfunktion bezieht sich auf die Gesamtheit der zellulären Mitochondrien. Im Folgenden wird der Aufbau und die Funktionsweise des Oxygraph-2k an intakten Zellen erläutert.

## Der Aufbau des Oxygraph-2k

Der Oxygraph-2k ermöglicht die simultane Aufzeichnung der O<sub>2</sub>-Konzentration in zwei unabhängigen Messkammern (vgl. Abb. 1.15, Kammer A+B). Die Kammern umfassen ein Volumen von 2ml und sind durch ein Kupfergehäuse isoliert, welches die gewünschte Messtemperatur mittels Thermostat konstant hält. Am Boden der Kammern wird die O<sub>2</sub>-Konzentration durch eine spezielle O<sub>2</sub>-Elektrode ermittelt. Unmittelbar daneben befindet sich ein Magnetrührstab, der die Homogenität der Suspension und den ständigen Kontakt von O<sub>2</sub> mit der Elektrode gewährleistet. Während der Messung wird die Kammer durch einen Kunststoffkolben luftdicht verschlossen. Durch einen feinen Kanal in der Mitte des Kolbens wird das Entweichen restlicher Luft in der Kammer sowie die Zugabe von Substraten gewährleistet.



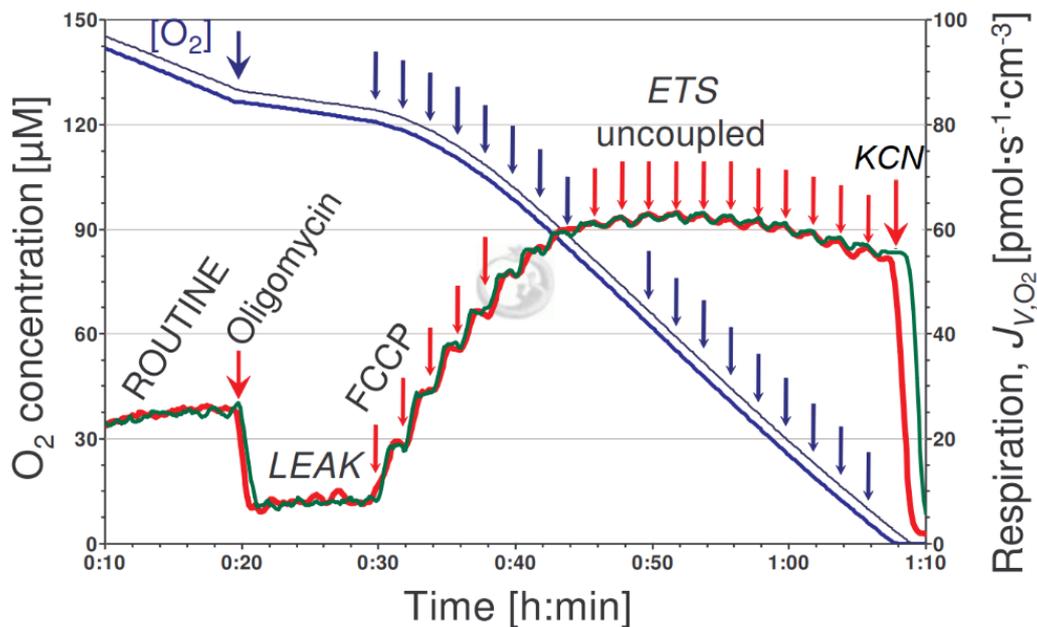
**Abbildung 1.15:** links: OROBOROS Oxygraph-2k (O<sub>2</sub>k), nach<sup>44</sup>, rechts: vergrößerte Zeichnung des Aufbaus einer Messkammer (Glass chamber) mit Magnetrührstab (stirrer), Clark-Elektrode (POS, polarographischer O<sub>2</sub>-Sensor) und Verschlusskolben (Stopper), nach<sup>47</sup>

## Das Prinzip der hochauflösenden Respirometrie mittels Oxygraph-2k

Die O<sub>2</sub>-Konzentration in der Mitochondriensuspension der Messkammer wird über eine sog. Clark-Elektrode ermittelt.<sup>47</sup> Bei Kontakt mit der Elektrode gibt O<sub>2</sub> Elektronen ab. Es entsteht ein Elektronenfluss, der der O<sub>2</sub>-Konzentration in der Messkammer proportional ist.<sup>50</sup> Der mitochondriale O<sub>2</sub>-Verbrauch über die Atmungskette präsentiert sich durch Abnahme der O<sub>2</sub>-Konzentration in der Messkammer. Der O<sub>2</sub>-Verbrauch liefert demnach Rückschlüsse über die mitochondriale Funktion.<sup>39</sup> Die O<sub>2</sub>-Konzentration der Messkammer wird graphisch über den kompletten Messzeitraum dargestellt (vgl. Abb. 1.16, S. 41). Die Dynamik des Graphens gibt Rückschlüsse auf die Aktivität der Atmungskette und demnach auf die Mitochondrienfunktion. Wird die mitochondriale Atmungskettenaktivität durch Zugabe spezieller Substanzen stimuliert, steigt der mitochondriale O<sub>2</sub>-Verbrauch und die O<sub>2</sub>-Konzentration fällt rapide ab.<sup>39</sup> Wird die Atmungskette durch Zugabe von Inhibitoren lahm gelegt, bleibt die O<sub>2</sub>-Konzentration in der Messkammer über die gemessene Zeit konstant. Aus der ermittelten O<sub>2</sub>-Konzentration in der Messkammer, der Probenmenge und dem Messzeitraum in Sekunden, wird eine zweite Größe, der O<sub>2</sub>-Fluss (engl. O<sub>2</sub>-flux), berechnet. Er errechnet sich aus dem O<sub>2</sub>-Verbrauch pro Sekunde [*pmol O<sub>2</sub>/s*], bezogen auf eine bestimmte Probenmenge. Als mögliche Einheit der Probenmenge bietet sich das Volumen der Messkammer in [*ml*], der volumenspezifische O<sub>2</sub>-flux [*pmol O<sub>2</sub>/(s\*ml)*], an. Ist die Zellkonzentration der untersuchten Probe bekannt, kann der O<sub>2</sub>-flux auf eine bestimmte Zellzahl bezogen werden, was den zellspezifischen O<sub>2</sub>-flux [*pmol O<sub>2</sub>/(s\*10<sup>x</sup> Zellen)*] ergibt.<sup>39</sup> Der O<sub>2</sub>-flux gibt die mitochondriale Atmungsrate wieder, die auch als Respirationsrate bezeichnet wird.

Mittels hochauflösender Respirometrie kann die mitochondriale Respirationsrate in verschiedenen Stadien untersucht werden. So gibt bspw. die Respirationsrate in ruhenden, unstimulierten Zellen Auskunft über die mitochondriale Ruheaktivität. Durch maximale Stimulation der Atmungskette kann die maximale mitochondriale Respirationsrate bestimmt werden. Aus den ermittelten Respirationsstadien kann dann die Effektivität der mitochondrialen Respiration ermittelt werden.

Im Folgenden sollen die in dieser Arbeit verwendeten Respirationsstadien erläutert werden. Die Stadien werden in der Reihenfolge ihrer Erzeugung gemäß Abbildung 1.16 erläutert (s. S. 41). Die Ermittlung der Respirationsrate eines bestimmten Stadiums erfolgt stets nach Einstellung eines stabilen Plateaus in der O<sub>2</sub>-flux Kurve.



**Abbildung 1.16:** Ergebnis der hochauflösenden Respirometrie mittels OROBOROS Oxygraph-2k (O2k) an intakten Zellen, **blauer Graph:** Verlauf der O<sub>2</sub>-Konzentration über die Zeit, **roter/grüner Graph:** parallele Aufzeichnung der Respirationsrate in beiden Messkammern; *Plateau-1/ROUTINE:* Basalrate (B); *Plateau-2/LEAK:* LEAK-Rate (L) nach Hemmung der ATP-Synthase durch Oligomycin; *Plateau-3/ETS:* Maximalrate (M) nach mehrfacher Titration des Atmungskettenentkopplers FCCP; zuletzt KCN-Rate/Residualrate (R) nach Zugabe von Kaliumcyanid (KCN), nach<sup>47</sup>

## Die Basalrate (B)

In diesem Stadium wird die mitochondriale Atmungsrate in ruhenden Zellen gemessen. Die Basalrate wird als erste Rate ermittelt und spiegelt die basale Atmungsrate zum Erhalt der Zellhomöostase wider (vgl. „ROUTINE“ in Abb. 1.16). Sie ist von der aktuellen Zellaktivität abhängig.<sup>39</sup> Der zelluläre Energieumsatz wird durch die ATP-Nachfrage, dem Angebot von ADP, der Substrataufnahme ins Zellinnere sowie der Aktivität von Ionenpumpen und Enzymen geprägt.<sup>49</sup> Einer erhöhten Zellaktivität mit gesteigerter Basalrate liegen verschiedene Ursachen zugrunde. Zellwachstum oder Defekte der Zellmembran, die zum Anstieg ATP-verbrauchender Transportprozesse führen, können mögliche Ursachen sein.<sup>49</sup> Eine gesunkene Basalrate kann auf eine geminderte Leistungsfähigkeit der OXPHOS hinweisen oder eine generell gedrosselte Zellaktivität widerspiegeln. Auch eine anaerobe Energiebereitstellung würde sich in einer geminderten Atmungsrate widerspiegeln.

## **Die LEAK – Rate (L)**

Die Zugabe von Oligomycin induziert eine Hemmung der ATP-Synthase und führt zur sofortigen Abnahme der mitochondrialen Respiration (vgl. „LEAK“ in Abb. 1.16, S. 41). Durch den Wegfall des  $H^+$ -Rückstroms in den IMR über die ATP-Synthase wird der Elektronenstrom entlang der Atmungskette und damit der mitochondriale  $O_2$ -Verbrauch gedrosselt. Die verbleibende mitochondriale Respiration, die LEAK-Rate, repräsentiert den Anteil der mitochondrialen Atmung zum Ausgleich des „proton leak“ über die IMM.<sup>49</sup> Wie bereits erwähnt, ist das Protonenleck zu einem gewissen Anteil physiologisch. Eine starke Zunahme der LEAK-Rate kann jedoch ein Hinweis auf Mitochondrienschäden sein.<sup>49</sup>

## **Die Maximalrate (M)/ ETS – Kapazität**

Durch mehrfache Titration des Atmungskettenentkopplers FCCP in die Messkammer des Oxygraphen wird die mitochondriale Respirationsrate der Zellen zunehmend gesteigert bis sie ein Maximum erreicht (vgl. „ETS“-Plateau in Abb. 1.16, S. 41). In diesem Stadium der maximalen Respiration ist der  $O_2$ -Verbrauch und der Elektronentransfer entlang der Komplexe maximal gesteigert.<sup>47</sup> Die im  $\Delta p_{mt}$  gespeicherte Energie wird bis auf ein Minimum verschwendet.<sup>47</sup> Damit kann die Kapazität der Atmungskette evaluiert werden. Im Englischen wird die Atmungskette als „electron transport system“ (ETS) bezeichnet, weshalb die Maximalrate auch als ETS-Kapazität bezeichnet wird. Eine Abnahme der ETS-Kapazität ist ein Hinweis auf mitochondriale Dysfunktionen.<sup>49</sup>

## **Die „freien“ Respirationsraten (B\* und M\*)**

Die Dynamik der Basal- und ETS- Raten allein ist nicht ausreichend, um über die Ursache der Veränderung konkret zu urteilen. Hohe Respirationsraten dürfen nicht direkt als Ausdruck einer hohen mitochondrialen ATP-Produktion interpretiert werden.<sup>51</sup> Die Dynamik beider Respirationsraten muss stets im Kontext der Dynamik der LEAK-Rate beurteilt werden. Steigt das „proton leak“, z.B. im Rahmen eines zunehmenden Mitochondrienschadens, führt dies zu einem konsensuellen Anstieg von LEAK- (L) und Basalrate (B) im Ruhezustand der Zellen. Das steigende „proton leak“ wird durch einen erhöhten basalen  $O_2$ -Verbrauch kompensiert, ohne dass dieser mit einer gesteigerten ATP-Produktion vergesellschaftet ist.<sup>51</sup> Um die Interpretation der rein an die ATP-Produktion gekoppelte Basal-Rate zu ermöglichen, muss B von L durch Subtraktion bereinigt werden.

Diese gekoppelte Basalrate wird als „freie“ Basalrate ( $B^* = B-L$ ) bezeichnet.<sup>39</sup> Dementsprechend muss die maximale Atmungskettenaktivität, die ETS-Kapazität, nach Abzug der LEAK-Rate beurteilt werden. Die entstehende „freie“ ETS-Kapazität ( $M^* = M-L$ ) drückt somit den maximal gesteigerten mitochondrialen  $O_2$ -Verbrauch unter Kompensation des „proton leak“ aus. Im Verlauf dieser Arbeit werden ausschließlich die „freien“ Basal- ( $B^*$ ) und ETS-Raten ( $M^*$ ) präsentiert und interpretiert.

### **Die KCN-Rate/ Residualrate (R)**

Die ermittelte Respirationsrate, nach Zugabe von Kaliumcyanid (KCN), dem Hemmstoff des Komplex IV, am Ende jeder respirometrischen Messung, spiegelt den verbleibenden  $O_2$ -Verbrauch durch oxidative Nebenreaktion wider (vgl. „KCN“ in Abb. 1.16, S. 41).<sup>39</sup> Sie wird auch als Residualrate (R, „residual oxygen consumption“) bezeichnet. Die KCN-Rate liefert somit den nicht-mitochondrialen  $O_2$ -Verbrauch, durch z.B. zelluläre Enzyme wie Monooxygenasen oder NADPH-Oxidasen. Sie scheint weiterhin auch durch die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (reactive oxygen species, ROS) beeinflusst zu werden.<sup>39,49</sup> Der Betrag der KCN-Rate wird schließlich von allen zuvor ermittelten Respirationsraten abgezogen.

### **Die Reservekapazität (RK)**

Durch Subtraktion der Basalrate von der Maximalrate erhält man die Reservekapazität (RK). Sie stellt den Betrag dar, um den die mitochondriale Atmungsrate in Ruhe noch maximal stimuliert werden kann, ohne dabei an die ATP-Produktion gekoppelt zu sein. Sie kann als zusätzliche Informationen zu  $B^*$  und  $M^*$  genutzt werden, um Verschlechterungen in der ATP-Produktion zu erkennen. Reduziert sich z.B.  $B^*$  bei gleichbleibender  $M^*$ , ist dies ein Hinweis auf Defekte im Prozess der ATP-Produktion, bei gleichzeitig unveränderter Funktion des Elektronentransportes entlang der Komplexe.<sup>39</sup>

### **Die Kopplungseffizienzen (KE)**

Die Errechnung der Kopplungseffizienzen dient der Veranschaulichung der mitochondrialen Effizienz. Es wird eine basale KE (Basal-KE) und eine maximale KE (ETS-KE) unterschieden. Sie sind sehr sensitive Parameter zur Evaluation mitochondrialer Dysfunktionen.<sup>49</sup>

Die Basal-KE gibt das Verhältnis zwischen freier Basalrate ( $B^*$ ) und kompletter Basalrate (B) an  $((B-L)/B$ , bzw.  $B^*/B$ ).<sup>39</sup> Damit wird der  $O_2$ -Verbrauch, der unter basalen

Bedingungen an die Produktion von ATP gekoppelt ist, mit dem gesamten basalen O<sub>2</sub>-Verbrauch ins Verhältnis gesetzt. Die Basal-KE kann Werte von 0,0 bis 1,0 annehmen. Ein Wert von 1,0 bedeutet, dass B\* mit B gleichzusetzen ist und kein „proton leak“ in der LEAK-Rate erfasst wird. Das verbrauchte O<sub>2</sub> fließt komplett in die Produktion von ATP. Die „Kopplung“ des O<sub>2</sub>-Verbrauchs an ATP entspricht somit 100%. Wenn die Höhe der LEAK-Rate der Basalrate entspricht, ergibt sich eine Basal-KE von 0,0. Demnach dient die gesamte mitochondriale Respiration unter basalen Bedingungen dem Ausgleich des „proton leak“. Die ATP-Produktion kommt zum Erliegen und die mitochondriale Effizienz ist 0%. Die Basal-KE der Zellen variiert je nach ATP-Nachfrage und erreicht bei den meisten Zellen Anteile zwischen 70-90%.<sup>49</sup> Mitochondrien des braunen Fettgewebes weisen jedoch eine Basale-KE von nahezu 0% auf. Damit wird deutlich, dass fast der gesamte O<sub>2</sub>-Verbrauch zur Produktion von Wärme statt von ATP eingesetzt wird.<sup>49</sup> Die ETS-KE errechnet sich analog zur Basal-KE durch Division der freien ETS-Kapazität (M\*) durch die gesamte Maximalrate (M)  $((M-L)/M$ , bzw.  $M^*/M$ ).<sup>39</sup> Sie beschreibt die mitochondriale Effizienz unter maximaler Stimulation der Atmungskette. Ist die ETS-KE nahe 1,0 hat die Steigerung des Elektronentransports entlang der Atmungskette noch viel Potenzial, was in die ATP-Produktion investiert werden kann. Die „Verschwendung“ des  $\Delta p_{mt}$  durch das „proton leak“ ist gering. Ist die ETS-KE nahe 0 wird der Großteil des Elektronentransports zum Ausgleich der LEAK-Rate benutzt. Die mitochondriale Effizienz ist somit gering.

## **1.9 Thrombozytenkonzentrate: Herstellung, Lagerung, Verwendung**

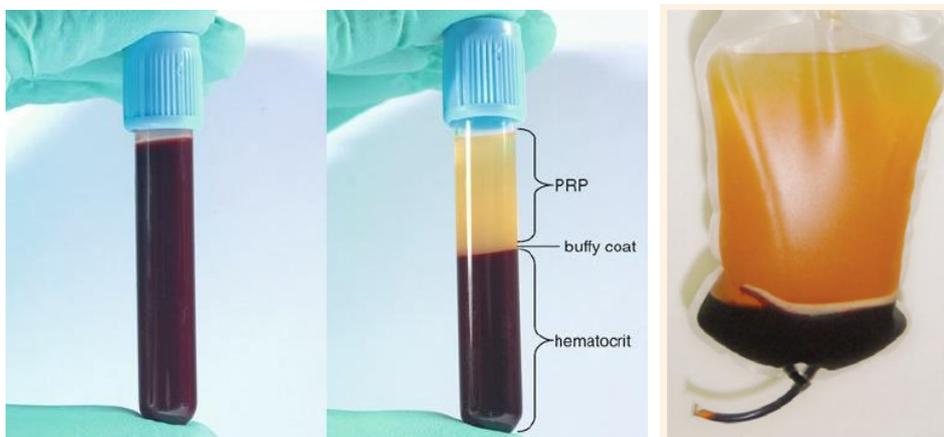
### **1.9.1 Verwendung und Indikation**

Die Transfusion von TK erfolgt prophylaktisch oder therapeutisch bei thrombozytär bedingten Blutungen.<sup>52</sup> Die Transfusionsindikation berücksichtigt neben der ThZ-Zahl und -funktion, die Blutungssymptomatik, das Blutungsrisiko sowie zugrundeliegende und begleitenden Erkrankungen und Therapiemaßnahmen.<sup>52</sup> Die Zahl der TK-Transfusionen ist weltweit steigend.<sup>53</sup> Zu den drei größten Empfängergruppen weltweit zählen hämatologisch-onkologische (67%), kardiochirurgische (10%) und intensivmedizinische Patienten (8%).<sup>53</sup> Die Daten der jährlichen Berichte nach § 21 TFG zeigen, dass in den vergangenen ca. 20 Jahren die Anzahl der jährlich in Deutschland hergestellten TK um ca. 50% gestiegen ist. Wurden im Jahr 2001 insgesamt 385.682 TK produziert, waren es im Jahr 2020 schon 575.608.<sup>54</sup>

## 1.9.2 Herstellungsprozess

Die Herstellung der TK kann auf zwei Wegen erfolgen. Entweder werden sie durch die Apherese während der Blutspende gewonnen oder durch Zentrifugation aus Vollblutspenden. Bei der ThZ-Apherese wird dem Spender ein bestimmtes Blutvolumen entzogen und mittels Zellseparator werden die ThZ vom restlichen Spenderblut getrennt. Unmittelbar im Anschluss wird das restliche Blut dem Spender zurück geführt.<sup>1(p238)</sup> Ein Apherese-TK stammt somit ausschließlich von einem Spender. Die TK-Produktion aus Vollblut kann aus plättchenreichem Plasma (PRP-Methode) oder mittels „Buffy-Coat“ (BC)-Methode erfolgen.<sup>1(p233)</sup> Letztere ist die führend angewandte Methode in Europa. Im Folgenden soll das Prinzip der BC-Methode erläutert werden.

Der BC entsteht als „Nebenprodukt“ bei der Produktion von Erythrozytenkonzentraten (EK) aus Vollblutspenden. Eine erste Phase der hochtourigen Zentrifugation über ca. 15min, bei etwa 3500g (g = Erdbeschleunigung), dient der Auftrennung der initial gewonnenen Vollblutspende in drei Hauptfraktionen: das überstehende gelblich klare Spenderplasma (oben), die sedimentierten rot-braunen Erythrozyten (unten) und eine dazwischen liegende ca. 1-2cm dicke, gelb-bräunliche Zellschicht, der „Buffy Coat“ („buffy“ engl. für „gelblichbraun“, vgl. Abb. 1.17).<sup>55</sup>



**Abbildung 1.17:** Darstellung der verschiedenen Blutbestandteile nach Zentrifugation, **links:** im Blutröhrchen, nach<sup>56</sup>, **rechts:** im Beutel der Vollblutspende, nach<sup>57</sup>

Der BC enthält ca. 70% aller Leukozyten und 90% aller Thrombozyten, enthält aber auch Resterythrozyten sowie -plasma.<sup>1(p232)</sup> Anschließend erfolgt die Separation der drei Fraktionen durch einen Separator (vgl. Abb. 1.18 rechts, S. 46). Die obere Plasmaschicht, ca. 200-250ml, wird nach oben hinaus in einen eigenen Beutel abgepresst. Dies ergibt ein Frischplasmakonzentrat. Gleichzeitig wird die untere Erythrozytenschicht nach unten

weg in einen Transferbeutel gepresst.<sup>55</sup> Das zukünftige Erythrozytenkonzentrat (EK) durchläuft weitere Produktionsprozesse, wie bspw. die Separation von restlichen Leukozyten, Leukozytendepletion genannt, über einen speziellen Filter (vgl. Abb. 1.18 links).



**Abbildung 1.18:** links: 4-fach Beutelsystem mit Vollblutspende, nach<sup>55</sup>, rechts: Separationsprozess durch Abpressen der Blutbestandteile nach Zentrifugation mittels eines automatisierten Blutkomponenten-Extraktors, nach<sup>58</sup>

Der im ersten Beutel verbleibende BC, gemischt mit etwas Restplasma, umfasst ca. 100 ml.<sup>1(p234)</sup> Zur Herstellung eines TK werden vier bis fünf dieser BC in einem Beutel vereint (engl. „pooling“). Die BC stammen dabei von ABO-blutgruppengleichen Vollblutspenden.<sup>1(p234)</sup> Durch erneute niedertourige Zentrifugation des Poolingbeutels bei 480g über 13min werden die im BC enthaltenen Bestandteile weiter aufgetrennt. Der hochkonzentrierte thrombozytenreiche Überstand wird, ähnlich wie bei der EK-Herstellung, über einen Filter leukozytendepletiert und in den endgültigen Lagerungsbeutel überführt.<sup>1(p234)</sup> Das entstandene TK wird als POOL-TK bezeichnet. Zum übrigen Spenderplasma, welches ca. 30 % des TK ausmacht, wird im Verlauf des Herstellungsprozesses eine synthetische Lagerungslösung zugegeben. Hierfür wird entweder ACD- oder CPD-Stabilisatorlösung verwendet. Beide enthalten Citrat, als Antikoagulanzen, sowie Glucose, als Nährstoff. Citrat entfaltet seine antikoagulatorische Wirkung durch Bindung von ionisiertem Kalzium, welches für den Gerinnungsprozess unabdingbar ist. Der CPD-Stabilisator enthält weiterhin Natriumphosphat zur Pufferung des über den Lagerungszeitraum abfallenden pH-Wertes. Außerdem dient die Stabilisatorlösung der Inaktivierung von Bakterien und Viren und ermöglicht eine längere Haltbarkeit des TK.<sup>1(p237)</sup> Die Verwendung von speziellen Lagerungsbeuteln aus Kunststoffen mit erhöhter Gaspermeabilität, wie z.B. Polyolefine, und die Vergrößerung des Verhältnisses zwischen Beutelvolumen und -oberfläche verbessert den CO<sub>2</sub>- und O<sub>2</sub>-

Austausch und wirkt dem pH-Wert-Abfall entgegen.<sup>59</sup> Gemäß den „Richtlinie zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten“ der Bundesärztekammer<sup>60</sup> von 2017 sowie den „Querschnitts-Leitlinien zur Therapie mit Blutkomponenten und Plasmaderivaten“ der Bundesärztekammer<sup>52</sup> von 2020 sollen Pool-TK mindestens  $2-4 \times 10^{11}$  ThZ in 200-400 ml Plasma oder Plasmaersatzlösung enthalten. Weiterhin werden klar definierte Prüfparameter zur Qualitätssicherung vorgegeben, die durch regelmäßige Qualitätskontrollen überprüft werden. Dazu zählt eine Restkonzentration an Erythrozyten von unter  $3 \times 10^6$ /TK, an Leukozyten von unter  $1 \times 10^6$ , ein pH-Wert zwischen 6,4 -7,8 sowie die standardmäßige visuelle Kontrolle der TK auf Unversehrtheit und eine mikrobiologische Kontrolle im Verlauf.<sup>60</sup> Weder die Rückstände von Zellen, Plasma, oder Antikoagulanzen, noch die Plasmaersatz- oder Stabilisatorlösung beeinflussen die klinische Wirksamkeit der TK.<sup>52</sup>

### **1.9.3 Lagerung und Haltbarkeit**

Die Leitlinien der Bundesärztekammer<sup>52,60</sup> schreiben weiterhin vor, dass TK unter kontinuierlicher Agitation, d.h. gleichförmiger Bewegung, bei  $22 \pm 2$  °C in gaspermeablen, sterilen Kunststoffbeuteln gelagert werden müssen, um die Integrität des thrombozytären Zellstoffwechsels und folglich die Qualität zu bewahren. Abweichungen der Lagerungstemperatur können ThZ-Schäden zur Folge haben. Niedrige Temperaturen führen u.a. zum Verlust der diskoiden ThZ-Form, zu Konformationsänderung der Oberflächenrezeptoren und zur Freisetzung der thrombozytären Granula.<sup>61,62</sup> Eine kälteinduzierte ThZ-Aktivierung innerhalb des TK, die Beeinträchtigungen der Aggregationsfähigkeit sowie eine sinkende Überlebensdauer der ThZ sind mögliche Folgen.<sup>63</sup> Temperaturen über 24°C begünstigen das Auftreten bakterieller Kontaminationen und verringern die TK-Haltbarkeit.<sup>1(p237),63</sup> Die kontinuierliche Agitation und die gaspermeablen Kunststoffbeutel fördern die O<sub>2</sub>-Versorgung des Präparates, ermöglichen eine homogene Verteilung der Thrombozyten und der Stoffwechselprodukte und erleichtern den CO<sub>2</sub>-Ausstrom.<sup>64</sup> Auf diese Weise sollen starke pH-Wert-Abfälle, aufgrund einer gesteigerten Laktatproduktion durch mangelhafte Oxygenierung des Präparates, verhindert werden.<sup>65</sup> Das TK soll deshalb möglichst zügig nach Eintreffen am Zielort transfundiert werden.<sup>52</sup>

Erfolgt die Lagerung vorschriftsmäßig, wird aktuell eine Haltbarkeit von vier Tagen, ab 24:00 Uhr des Entnahmetages, vorgegeben.<sup>60</sup> In den vergangenen Jahren wurde eine Verkürzung der TK-Haltbarkeit zugunsten der Transfusionsicherheit vollzogen. Unter allen

Blutprodukten zeigen TK das höchste Risiko für bakterielle Kontamination, wobei transfusionsbedingte Infektionen v.a. durch TK am Ende ihrer Haltbarkeit verursacht wurden.<sup>66</sup> Nur unter bestimmten Auflagen kann die Haltbarkeit auf insgesamt fünf Tage verlängert werden. Es sollte stets auf eine möglichst kurze TK-Lagerungsdauer geachtet werden.<sup>52</sup>

## **1.10 Fragestellung und Zielsetzung**

Die Versorgungsgewährleistung von Krankenhäusern mit qualitativ hochwertigen TK bereitet, aufgrund ihrer kurzen Haltbarkeit und der Notwendigkeit einer ständigen Agitation, den Blutspendediensten und Transfusionszentren einen hohen logistischen Aufwand. So kann bspw. weder die Agitation noch die empfohlene Lagerungstemperatur während der Transportfahrten zur Empfängerklinik eingehalten werden und die TK unterliegen temporären Agitationspausen und Temperaturschwankungen. Zunehmender Personalmangel und Zeitdruck in deutschen Krankenhäusern stellen weitere Hürden bei der Qualitätserhaltung der TK dar. Unwissenheit über den Umgang mit Blutprodukten führen nicht selten zu Lagerungsfehlern der TK, beispielsweise in Kühl- oder Gefrierschränken. Fehlende Organisation im Klinikalltag, z.B. durch Unterlassen einer unmittelbaren Transfusion nach Ankunft des TK auf Station, führt zu Agitationsunterbrechungen. Zudem sind Normalstationen, Operationstrakte und Intensivstationen selten mit Agitationsgeräten ausgestattet, sodass auch die Fortführung der Agitation ein logistisches Problem darstellt. Zur Reduktion von Transportzeiten kann in großen Kliniken der Einsatz von pneumatische Rohrpostanlagen beitragen. Ein Effekt auf die TK-Qualität durch vorherrschende Be- und Entschleunigungsprozesse und Temperaturschwankungen wurde in diesem Zusammenhang allerdings noch nicht untersucht.

Neben Qualitätseinbußen durch unvorschriftsmäßige Lagerung kommt es im Laufe der viertägigen Haltbarkeit, auch unter optimalen Lagerungsbedingungen, zu Verlusten der TK-Qualität. Die Ergebnisse einiger Untersuchungen in der Vergangenheit brachten die Erkenntnis, dass sich sowohl die thrombozytäre Aggregationsfunktion<sup>67,68</sup> als auch die mitochondriale Funktion von ThZ<sup>48,69,70</sup> während der fachgerechten Lagerung von TK zunehmend verschlechtern. Die Expression und Sekretion thrombozytärer Aktivitätsmarker nehmen im Verlauf der TK-Lagerung stetig zu.<sup>70-72</sup> Auch die Veränderungen metabolischer Parameter, darunter der abnehmende pH-Wert, sowie die fallende Glucose- und steigende Lactatkonzentration wurden wiederholt bestätigt<sup>65,72-74</sup>.

Weiterhin belegen Studien eine signifikant verschlechterte metabolische Situation<sup>65,70,73,74</sup>, eine gesteigerte thrombozytäre Grundaktivität<sup>70</sup> sowie die Abnahme der Mitochondrienfunktion<sup>70</sup> in nicht agitiert gelagerten TK gegenüber kontinuierlich agitiert gelagerten TK.

Ziel unserer Arbeit war zum einen, die Funktion des Multiplate<sup>®</sup> Analyzer als in vitro Verfahren zur Kontrolle der Thrombozytenfunktion in TK zu überprüfen und damit die These vorausgegangener Arbeiten zu stützen.<sup>67,68,75,76</sup>

Zum anderen setzten wir uns zum Ziel, den Einfluss einer viertägigen TK-Lagerung ohne Agitation der empfohlenen kontinuierlichen Agitation gegenüberzustellen und hinsichtlich der Entwicklung zweier thrombozytärer Qualitätsmerkmale zu überprüfen: thrombozytärer Aggregationsfunktion und Mitochondrienfunktion. Wir legten hierbei Wert auf die parallele Erhebung beider Qualitätsmerkmale und deren Entwicklung in einer gemeinsamen Studie. Der kombinierte Einsatz des Multiplate<sup>®</sup> Analyzer und des Oxygraph-2k zur Bewertung dieser Qualitätsmerkmale wurde bisher nicht beschrieben und hebt sich als Besonderheit in unserer Arbeit hervor.

Zuletzt galt es die Frage zu klären, welchen Einfluss die temporäre TK-Lagerung bei 4°C bzw. der innerklinische Versand von TK mittels Rohrpostsystem auf die Stimulations- und Aggregationsfähigkeit von ThZ ausüben.

Letztendlich sollen die Ergebnisse dieser Arbeit zur Klärung der Frage beitragen, ob die Qualität von TK nach Episoden der unvorschriftsmäßigen Lagerung derart eingeschränkt ist, dass mit einem reduzierten Transfusionserfolg zu rechnen ist. Den Einsatz des Multiplate<sup>®</sup>, als unkompliziertes und effektives „Point-of-Care“ Verfahren, zur Ermittlung der Thrombozytenqualität vor TK-Transfusion galt es weiterhin zu evaluieren.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Verwendete Materialien**

#### **2.1.1 Thrombozytenkonzentrate und Herstellung**

Alle untersuchten TK wurden vom Institut für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie in Frankfurt am Main als routinemäßig produzierte Pool-TK zur Verfügung gestellt. Dort wurden jeweils vier leukozytendepletierte BC in 0,5-0,9 L/L der Thrombozytenadditivlösung SSP+ und mit Resten (0,1-0,5 L/L) des mit der CPD-Stabilisatorlösung versehenen Spenderplasmas resuspendiert. Die Leukozytenzahl lag pro Präparat bei  $< 1 \times 10^6$ , die Erythrozytenzahl bei  $< 3 \times 10^9$ . Die ThZ-Zahl pro Präparat lag im Bereich von  $2,0-4,5 \times 10^{11}$ . Das Gesamtvolumen der elf Präparate betrug zwischen 250-300 ml, was eine ThZ-Konzentration im Bereich von ca.  $670-1.800 \times 10^3 /\mu\text{l}$  pro Präparat ergab. Damit entsprach die ThZ-Konzentration in den verwendeten TK dem 1,5- bis 12-Fachen der physiologischen ThZ-Konzentration. Verwendet wurden insgesamt elf TK der Blutgruppen 0 (n = 3), B (n = 3) und A (n = 5). Diese Anzahl orientierte sich an einer Vorstudie von Skripchenko et al.<sup>70</sup> an insgesamt zwölf Apherese-TK. Sie untersuchten u.a. die Entwicklung des mitochondrialen Membranpotentials und der Plättchenaktivierung über sieben Lagerungstage hinweg und erzielten bereits bei dieser Stichprobengröße aussagekräftige Ergebnisse. Angaben zu Geschlecht und Alter der Spender ist aufgrund der Herstellung aus vier Buffycoat-Einheiten nicht möglich.

#### **2.1.2 Transferbeutel**

Das CompoFlex® P4224, 4F Transfersystem ist ein Beutelsystem aus jeweils vier Beuteln, welche speziell für die Aufteilung, Lagerung und Transfusion von TK in der Pädiatrie produziert und getestet wurden. Ein System eignet sich für die Aufteilung von einem TK in vier kleine Portionen. Das maximale Füllungsvolumen beträgt jeweils 600ml (vgl. Abb. 2.1, S. 51).

CompoFlex® P4224, 4F Platelet storage system for pediatric platelets

4 x 600 ml, 4 x 20g Leergewicht, Pigtail, PVC/ Hexamoll ® DINCH, ISBT128B,

REF P4224, Fresenius Kabi AG, 61346 Bad Homburg, Germany

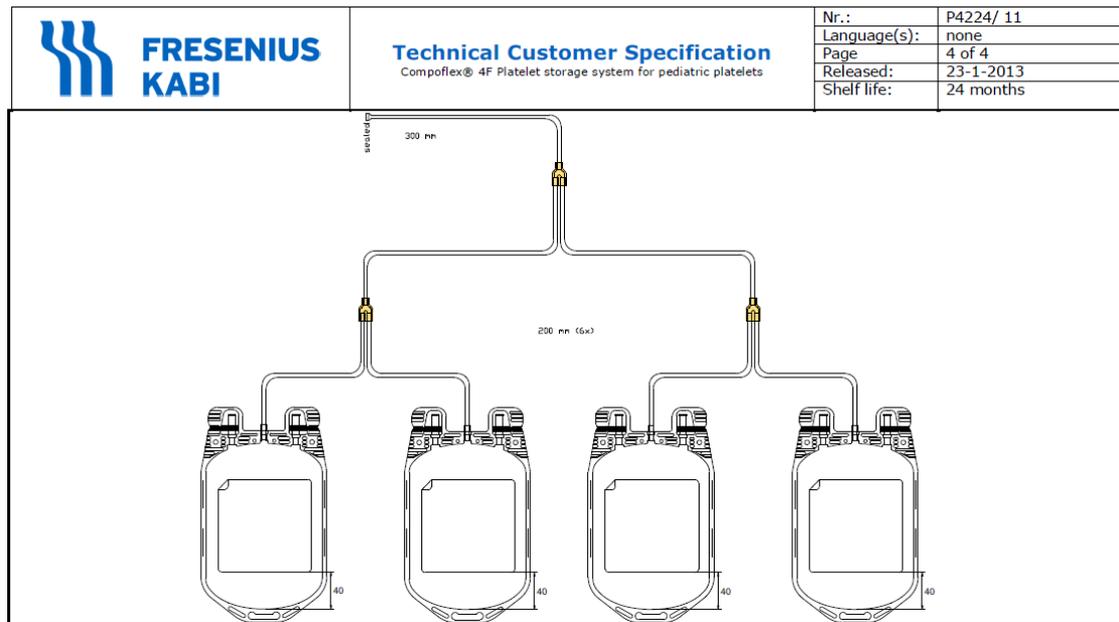


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung der TK-Aufteilung in 4 Transferbeutel, nach<sup>77</sup>

### 2.1.3 Puffer und Suspensionslösungen

#### Fetales Kälberserum (FKS, FCS)

Fetal bovine serum (FBS) for standard applications; Gibco™ Value FBS – Brazil

Endotoxin – Level  $\leq 50$  EU/ml

Gesamtprotein – Gehalt 3,5 – 5,5 g/dL

Hämoglobin – Gehalt  $\leq 30$  mg/dL

pH – Wert 6,9 – 7,8

Osmolalität 280 – 340 mOsm/kgH<sub>2</sub>O

Steril filtriert, negativ getestet auf Viren und Mykoplasmen; Lagerung bei -20 °C

Gibco™, Life Technologies, Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland

#### SSP+ Thrombozytenadditivlösung

Tri-Natriumcitrat Dihydrat: 2,94g

Natriumacetat Trihydrat: 4,06g

Natriumchlorid: 6,75g

Wasser für Injektionszwecke: 1000 ml

pH 7,2

REF SMASSP1020U; LOT 7282 13L05, Macopharma, 59420 Mouvaux, Frankreich

## CPD-Stabilisatorlösung im Spenderplasma

Zusammensetzung nach Ph. Eur.:

Tri-Natriumcitrat Dihydrat:	26,30 g
Citronensäure Monohydrat:	3,27 g
Glucose-Monohydrat:	25,50 g
Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat:	2,51 g
Wasser für Injektionszwecke:	1000 ml

### 2.1.4 Geräte, Labormaterialien und Reagenzien

Bezeichnung	Hersteller
<b>Multiplate® Analyzer</b> REF 06675069001	Roche Diagnostics GmbH, 68305 Mannheim
<b>Multiplate® Test Cells</b> REF 06675590001	
<b>Multiplate® aliquot vials für Reagenzien</b> ADPtest aliquot vials (REF 06675689190) ASPItest aliquot vials (REF 06675689190) TRAPtest aliquot vials (REF 06675727190) COLtest aliquot vials (REF 06675697190)	
<b>Pro Line Platelet Agitator PF48-Pro</b>	Helmer Scientific, Noblesville, Indiana, USA
<b>Oxygraph-2k (O2k)</b> <b>DatLab 5 (O2k-Software)</b>	Firma Oroboros Instruments GmbH, Innsbruck, Österreich
<b>Steriles Verschweißsystem</b> TSCD® - II Sterile Tubing Welder	Terumo BCT
<b>TranspoNet Rohrpostsystem</b> (Langsames System: 2-3 m/sec)	Swisslog Healthcare GmbH
<b>MEDISANA Infrarot Thermometer FTN</b>	Medisana GmbH, Neuss

**Tabelle 2.1:** verwendete Geräte und Zubehör mit Herstellerangaben

Bezeichnung	Hersteller und Besonderheiten
<b>Multiplate®-Reagenzien</b>	Roche Diagnostics GmbH, 68305 Mannheim Lagerung bei -20°C vier Wochen, 2-8°C max. 7 d (ASPItest: bei 2-8°C über max. 24 h)
<b>Oligomycin</b>	Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA aus Streptomyces diastatochromogenes Lagerung bei -20°C
<b>FCCP</b>	Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA Lagerung bei 2-8°C
<b>KCN</b>	Eigenherstellung im Labor Lagerung bei 2-8°C
<b>Spülmitochondrien</b>	Eigenherstellung im Labor Lagerung bei -20°C
<b>Reinigungspuffer</b>	Lagerung bei 2-8°C Eigenherstellung im Labor
<b>Pipetten/ Pipettenspitzen</b>	Firma Eppendorf AG, Hamburg  Eppendorf Research® plus Pipette 10 – 100 µl Eppendorf Reference® 2 Pipette 100 – 1000 µl epT.I.P.S. Motion® Pipettenspitzen, 50 µl/ 300 µl/1000 µl Eppendorf Safe-Lock Tube® farblos, 1,5 – 2,0 mL
<b>Hamilton™ Mikroliterspritzen</b>	Hamilton Company, Reno, Nevada, USA Spritzen zur Injektion in O2k-Messkammer  5 µL Gastight Syringe Model 175 RN, 32-gauge, 51 mm, REF: 80016 10µl Gastight Syringe Model 1701 N, 26-gauge, 51 mm, REF: 80000 1 mL Gastight Syringe Model 1001 RN, 22 gauge, 51mm, REF: 81330
<b>Reaktionsgefäße</b>	Corning GmbH HQ, Wiesbaden  Falcon® 15 ml + 50 ml high-clarity polypropylene (PP) conical centrifuge tubes
<b>Entnahme-/ Verschlussmaterial</b>	B. Braun GmbH & Co. KG, Melsungen  Omnifix ® Luer Lock Solo 5ml (REF 4617053V) Mini-Spike Plus® (REF 4550242) Combi-Stopper rot (REF 4495101)
<b>Desinfektionsmittel</b>	Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt  Octeniderm® farblos 250 ml (Art.-Nr.: 118211)

**Tabelle 2.2:** verwendete Labormaterialien mit Herstellerangabe und Lagerungsbedingungen

Reagenz	Menge pro Messung
<b>ADPtest:</b> Adenosindiphosphat 1ml lyophilisiert: 0,2 mM REF 06675794190	20 µl
<b>ASPItest:</b> Arachidonsäure 1ml lyophilisiert: 15 mM REF 06675816190	20 µl
<b>TRAPtest:</b> Thrombin receptor activating peptide-6 1ml lyophilisiert: 1 mM REF 06675883190	20 µl
<b>COLtest:</b> Kollagen 1 ml lyophilisiert: 100 µg/ml REF 06675832190	40 µl
<b>Oligomycin</b> gelöst in DMSO: 2mg/ml Art.-Nr. O4876	1 µl
<b>FCCP:</b> Pulver gelöst in DMSO: 1mM Art.-Nr. C2920	2 µl
<b>KCN</b> gelöst in H <sub>2</sub> O: 0,5 M	8 µl
<b>Spülmitochondrien:</b> Lösung aus Lebermitochondrienpräparaten	15 µl
<b>Reinigungspuffer</b>	2 ml

**Tabelle 2.3:** verwendete Reagenzien und mit Mengenangabe pro Messdurchlauf

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Generierung vergleichbarer TK-Gruppen

Alle elf TK wurden jeweils in vier gleiche Anteile aufgeteilt, um vergleichbare Gruppen für vier verschiedene Untersuchungsparameter zu generieren. Die Aufteilung in die CompoFlex®-Transferbeutel erfolgte unmittelbar nach der Herstellung, stets zwischen 14:30-16:00 Uhr, im Institut für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie. Mit Hilfe des sterilen Verschweißungsgerätes TSCD®-II wurden jeweils vier Transferbeutel generiert, deren Einzelgewicht zwischen 85-90 g lag. Sowohl die ThZ-Konzentration in den ThZ-Teilkonzentraten (TTK) als auch die Relation zwischen der semipermeablen Beuteloberfläche und TK-Volumen blieb somit zwischen den vier TTK annähernd gleich. Anschließend erfolgte die Zuordnung der TTK zu den vier Probegruppen (s. Kapitel 2.2.2, S. 55). Der Herstellungsprozess resultierte in einer Agitationspause von ca. 40min bevor die vier TTK ihren finalen Lagerungsort (vgl. Kapitel 2.2.5, S. 56-57) stets zwischen

15:00-16:30 Uhr erreichten. Jedes der elf TK wurde einzeln über vier aufeinander folgende Tage untersucht. Der gesamte Untersuchungszeitraum erstreckte sich somit über insgesamt elf Wochen. Zur Vereinfachung werden im Folgenden die Begriffe TTK und TK identisch genutzt.

### **2.2.2 Beschreibung der Untersuchungsparameter und Messmethoden**

Die ThZ-Funktion der TK wurde hinsichtlich der thrombozytären Aggregationsfähigkeit bzw. der mitochondrialen Funktion mittels Impedanzaggregometrie (Multiplate® Analyzer) bzw. hochauflösender Respirometrie (Oxygraph-2k) beurteilt. Die Prinzipien der jeweiligen Methoden sind in den Kapiteln 1.6.3 (s. S. 27-32) und 1.8.2 (S. 38-44) beschrieben.

Es wurden vier verschiedene Einflussfaktoren auf die ThZ-Funktion untersucht, wobei jedem der vier TTK jeweils ein zu untersuchender Einflussfaktor zugeordnet wurde, sodass vier vergleichbare Probegruppen entstanden:

- 1) Einfluss der viertägigen Lagerung unter kontinuierlicher Agitation (Kontrollgruppe, KG)
- 2) Einfluss der viertägigen Lagerung ohne Agitation (Testgruppe -uA, TG-uA)
- 3) Einfluss der TK-Kühlung bei 4°C über 60min (TG-K)
- 4) Einfluss des TK-Transports mittels pneumatischem Rohrpostsystem bei 2-3 m/sec über ca. 12,5-14 Min (TG-R).

### **2.2.3 Dokumentation und Zuordnung der TK zu den Probegruppen**

Alle elf TK wurden entsprechend der Untersuchungsreihenfolge mit den Buchstaben B bis L gekennzeichnet. Buchstabe A wurde einem Probedurchlauf vor Beginn der Messreihe vorbehalten. Die vier TTK wurden mit den römischen Ziffern I bis IV durchnummeriert, wobei jede Zahl einem der vier zu untersuchenden Einflussfaktoren zugeordnet wurde (vgl. Tab. 2.4, S. 56). An diese Buchstaben-Ziffern-Kombination wurde eine arabische Zahl von eins bis vier angehängt, die dem jeweiligen Messtag entsprach. „1“ markiert hierbei den Herstellungstag und „4“ den letzten Tag der Haltbarkeit. So steht „TK BIII 4“ beispielsweise für das vier Tage alte, kontinuierlich agitierte TK des ersten Messdurchlaufs. Wenn nicht von einer bestimmten Stichprobe die Rede ist, wird der Buchstabe durch eine Leerzeile ersetzt. „TK\_III“ gilt so beispielsweise als Abkürzung für alle kontinuierlich agitierten TK.

Probegruppe	Untersuchungsparameter	Lagerungsart	Messmethode
I (TG-K)	Einfluss 60 Min. Kühlung bei 4°C	kontinuierliche Agitation	Multiplate®
II (TG-R)	Einfluss Rohrpostversand (bei 2-3 m/sec über 12,5 – 14 Min)		
III (KG)	Einfluss viertägige kontinuierliche Agitation		Multiplate® + Oxygraph
IV (TG-uA)	Einfluss unterlassene Agitation	unterlassene Agitation	Multiplate® + Oxygraph

**Tabelle 2.4:** Übersicht über die Zuordnung der Probegruppen zu Untersuchungsparameter, Lagerungsart und Messmethode.

## 2.2.4 Entnahme der Proben

Die CompoFlex® Transferbeutel wurden einmalig mittels Mini-Spike Plus® unter sterilen Kautelen angestochen. Für alle Messungen wurde stets 2ml der ThZ-Suspension per Omnifix® Luer Lock 5ml-Spritze langsam unter sanftem Sog entnommen, um die Scherkräfte möglichst gering zu halten. Zuvor wurde das TK durch zehn leichte Schwenkbewegungen resuspendiert. Der Rest der Spritze wurde mit Luft gefüllt. Die Spitze wurde mittels rotem Combi-Stopper Verschlusskonus versehen. Die Öffnung des Mini-Spike Plus®-Systems wurde vor und nach jeder Entnahme mit Octeniderm® farblos desinfiziert.

## 2.2.5 Lagerungsmethoden

### Lagerung der Thrombozyten

Sämtliche TTK wurden über den kompletten viertägigen Untersuchungszeitraum bei klimatisierter Raumtemperatur (RT) von ca. 23°C gelagert, sodass die Temperaturen aller TTK im Bereich von 20,8-24,0 °C lagen. Die „TK\_I-III“ wurden hierbei kontinuierlich mittels Agitator agitiert, während die „TK\_IV“ auf einem entnommenen Ablagefach links neben dem Agitator über vier Tage ruhten. Jeder Gruppe wurde ein fester Ablageplatz zugeteilt (vgl. Tab. 2.5, S. 57). Unmittelbar nach den notwendigen Messungen wurden die entnommenen TK wieder auf ihren zugeteilten Platz gelegt, um sowohl die Agitationspausen als auch die Zeiten außerhalb des klimatisierten Raumes möglichst gering zu halten. Die Messungen an „TK\_I“ und „TK\_II“ erfolgten ausschließlich am zweiten Lagerungstag. Beide Probegruppen wurden deshalb, analog zu „TK\_III“, nach der

Herstellung bis zum Messzeitpunkt kontinuierlich agitiert und bei RT gelagert. Die gekühlte Lagerung von „TK\_I 2“ über 60min bei 4°C erfolgte ohne Agitation und führte zu einer mittleren Temperaturreduktion von 17°C auf ca. 5-6 °C. Der Rohrposttransport von „TK\_II 2“ dauerte, nach zweimaligem Durchlaufen eines zirkulären Rohrpostsystems mit Transportgeschwindigkeiten zwischen 2-3 m/sec, 12,5-14min. Innerhalb des Rohrpostsystems herrschte RT. Die TK-Erwärmung während des Transports betrug maximal 1,5 °C, sodass die empfohlene Obergrenze von 24 °C nicht überschritten wurde.

Probegruppe	Ablageplatz	Agitation	Messzeitpunkt
I (TG-K)	Ablagefach 1	kontinuierlich	Tag-2
II (TG-R)	Ablagefach 2		Tag-2
III (KG)	Ablagefach 3		Tag-1 bis -4
IV (TG-uA)	Ablageblech links neben Agitator	keine	Tag-2 bis -4

**Tabelle 2.5:** Übersicht über Lagerung der Probegruppen und deren Messzeitpunkte

## Lagerung der Reagenzien und Puffer

Portionen von jeweils 5ml FCS wurden in 15-ml-Falcons aliquotiert und bei -20°C gelagert. Die Multiplate®-Reagenzien wurden nach Suspension mit destilliertem Wasser in Portionen von ca. 200µl (ADP-, ASPI- und TRAP-Reagenz) bzw. 300µl (COL-Reagenz) in die vorgesehenen aliquot vials aufgeteilt. Jeweils 1ml Oligomycin, FCCP, KCN und Spülmitochondrien wurden in 1,5-ml-Eppendorf Safe-Lock Tube® farblos verteilt. Die vorgeschriebenen Lagerungsbedingungen wurden berücksichtigt. Falls die im Kühlschrank vorrätigen Mengen der Multiplate®-Reagenzien nicht ausreichend waren, wurden 1,5-2h vor Messbeginn weitere Reagenzien für die Multiplate®-Messungen im Kühlschrank bei 2-8 °C aufgetaut. Für das FCS geschah dies im Wasserbad bei 37°C. Nach dem Messtag übriges FCS, Oligomycin, FCCP, KCN und Spülmitochondrien wurden erneut eingefroren. Die Reste der anderen Multiplate®-Reagenzien und der Reinigungspuffer wurden für die Messungen an den Folgetagen im Kühlschrank deponiert.

## 2.2.6 Organisation der Messabläufe und Messtage

Es wurden Ablaufpläne für jeden Messtag erstellt, um alle Messungen etwa zur gleichen Tageszeit durchzuführen und Transport- und Wartezeiten sowie Agitationspausen möglichst kurz und konstant zu halten. Folgendes wurde festgelegt:

- 1) Der tägliche Messablauf startet mit den Messungen am Oxygraph-2k in Haus-9 des Uniklinikums, um während der anschließenden Reinigungszeit des Geräts (ca. 45min) die entsprechenden Messungen am Multiplate<sup>®</sup> Analyzer in Haus 23 durchzuführen.
- 2) Die Messungen an Tag-1 werden stets an „TK\_III 1“ durchgeführt, nachdem dieses zunächst für etwa zwei Stunden nach Aufteilung in die Transferbeutel kontinuierlich agitiert gelagert wurde.
- 3) Die Multiplate<sup>®</sup>-Messungen nach Kühlung bzw. Rohrpostversand an „TK\_I“ bzw. „TK\_II“, werden stets an Tag-2 durchgeführt. Im Anschluss daran werden gemäß Absatz 1) die Messungen von „TK\_III 2“ und „TK\_IV 2“ durchgeführt.
- 4) Der ca. fünfminütige Transport der TTK vom Agitator in Haus-9 des Uniklinikums zum Multiplate<sup>®</sup> in Haus-23 erfolgt stets in derselben wiederverschließbaren Plastiktüte. Als Transportmittel dient das Fahrrad.

Im Folgenden sind die standardisierten Abläufe der einzelnen Messtage beschrieben:

### Messablauf – Tag-1

Zwischen 17:15-18:00 Uhr erfolgte die Ausgangsmessung am Oxygraph an „TK\_III1“. Während der Messung wurde „TK\_III 1“ stets weiter kontinuierlich agitiert. Nach einer ca. 45-minütigen Messdauer (inklusive Beginn der Reinigung) wurde „TK\_III 1“ für die Multiplate<sup>®</sup>-Messung vom Agitator genommen und zwischen 18:30-19:00 Uhr nach einer ca. 40-minütigen Messdauer erneut gelagert.

### Messablauf – Tag-2

Nach den Messvorbereitungen wurde gegen 15:00 Uhr „TK\_I 2“ für 60min bei 4°C im Labor befindlichen Kühlraum gelagert. Die Platzierung erfolgte stets am selben Ort. Zwischenzeitlich durchlief „TK\_II 2“ gegen 15:40 zweimalig die zirkulär geschaltete pneumatische Rohrpostanlage in Haus-40. Umgehend nach Rohrpostversand erfolgte gegen 16:00 Uhr die Multiplate<sup>®</sup>-Messung an „TK\_II 2“, während „TK\_I 2“ neben dem Gerät ruhte. Im direkten Anschluss wurde „TK\_I 2“, welches sich in der ca. 40-minütigen Ruhezeit erneut auf RT erwärmte, mittels Multiplate<sup>®</sup> untersucht. Die gesamten Agitationspausen bis zum Messbeginn lagen bei etwa 30min (TK\_II 2), bzw. 90min

(TK\_I 2). Danach erfolgten die Messungen an „TK\_III 2“ und „TK\_IV 2“. Analog zum Messablauf an Tag-1 wurde zwischen 17:00-18:00 Uhr die Untersuchung am Oxygraph begonnen. Anschließend wurde zwischen 18:00-19:00 Uhr am Multiplate® untersucht.

### **Messablauf – Tag-3 und Tag-4**

Die Untersuchungen von „TK\_III“ und „TK\_IV“ an Tag-3 und Tag-4 fanden analog zum Messablauf der „TK\_III“ „TK\_IV“ an Tag-2 statt. Der standardisierte Ablaufplan ermöglichte zügige Messabläufe. Agitationspausen, bedingt durch die unterschiedliche Lokalisation der Geräte, konnten somit auf maximal 50min beschränkt werden. Transportbedingte Temperaturänderungen betragen durchschnittlich 1,3°C, sodass der empfohlene Temperaturbereich von 20-24 °C stets eingehalten wurde.

### **2.2.7 Statistische Methoden**

Die Sammlung der Ergebnisse und die übersichtlichen tabellarischen Darstellungen erfolgte mittels Microsoft Excel 2010.

Die deskriptive und vergleichende Statistik wurde mittels „BiAS. für Windows“, ein an die medizinisch-biologische Forschung speziell angepasstes Statistikprogramm, durchgeführt.

BiAS. für Windows TM (Biometrische Analyse von Stichproben), Version 10, 1989-2016 Epsilon-Verlag, Frankfurt, Deutschland.

Die Datenreihen der elf untersuchten TK wurden zunächst mittels Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung überprüft. Diesen Ergebnissen zur Folge wurde eine Normalverteilung ausgeschlossen. Es wurde der Median der Messwerte mit zugehörigem 1. und 3. Quartil, Interquartilabstand, Minimum, Maximum sowie die Range angegeben. Anschließend wurden folgende nicht-parametrische Tests durchgeführt:

- 1) Friedman-Test mit Post-Hoc-Test: zum Vergleich der Ergebnisse im Verlauf der vier Messtage innerhalb einer Gruppe.
- 2) Wilcoxon-Matched-Pairs-Test: zum Vergleich der Ergebnisse an den jeweiligen Messtagen zwischen beiden Gruppen.

Ein signifikanter Unterschied wurde bei  $p \leq 0,05$  angenommen. Weiterhin wurde zwischen hoch signifikant ( $p \leq 0,01$ ) und höchst signifikant ( $p \leq 0,001$ ) unterschieden.

Die Graphen wurden mittels „GraphPad Prism“ Version 7 entwickelt.

GraphPad Software, San Diego, CA 92108, USA

## 2.3 Durchgeführte Messungen

Im Folgenden werden die Systematik der Messabläufe am Multiplate® sowie am Oxygraph-2k inklusive der verwendeten Materialien exakt erläutert werden.

### 2.3.1 Messablauf am Multiplate®

#### Messvorbereitung

Die benötigten Mengen an Puffer und Reagenzien sind abhängig von der Anzahl der Messdurchläufe am Multiplate® und unterscheiden sich zwischen den Messtagen. Ein Messdurchlauf beinhaltet die gleichzeitige Nutzung von vier der fünf Messküvetten. Hierfür werden die in Tabelle 2.6 unter „Messtag-1“ gelisteten Multiplate®-Reagenzien und Puffermengen benötigt. Die Tabelle liefert weiterhin eine Übersicht über die Summe der pro Messtag verbrauchten Substanzen.

Messtage	Messdurchläufe	Benötigte Reagenzien und Puffer
Messtag-1	1x	2100 µl FCS
		400 µl „TK_III 1“
		je 20 µl ADP, ASPI, TRAP
		40 µl Kollagen
Messtag-2	4x	8400 µl FCS
		4 x 400 µl TK ( 400 µl je „TK_I-IV 2“)
		je 80 µl ADP, ASPI, TRAP
		160 µl Kollagen
Messtag-3 + Messtag-4	2x	4200 µl FCS
		2 x 400 µl TK (400µl je „TK_III/IV“)
		je 40 µl ADP, ASPI, TRAP
		80 µl Kollagen

**Tabelle 2.6:** Übersicht über den Substanzverbrauch pro Messtag

Nach Ankunft am Multiplate® ruhten die ausgewählten TTK für zehn Minuten neben dem betriebsbereiten Multiplate®. Währenddessen erfolgte die Vorbereitung der notwendigen Materialien für den ersten Messdurchlauf:

- 1) Entnahme der Multiplate®-Reagenzien aus dem Kühlschrank
- 2) Platzierung eines 15ml-FCS-Falcons auf dem Inkubationsblock des Geräts bei 37 °C
- 3) Befüllen eines 2ml-Eppendorf Safe-Lock Tube® mit 1200µl FCS und Platzierung in eine der vier Vertiefungen für Reagenzflaschen auf dem Inkubationsblock
- 4) Öffnen des Programms, Zuordnung der Messplätze 1-4 (beginnend von links) zu den Kanälen 1-4 im Analyseprogramm, Bestückung der Messplätze mit vier Testzellen
- 5) Desinfektion der Mini-Spike Plus®-Öffnungen der TTK, bzw. Anstechen der noch geschlossenen Beutel („TK\_I 2“ und „TK\_II 2“)
- 6) Entnahme von 2ml eines TTK nach Ende der zehnmütigen Ruhezeit in eine 5ml-Spritze, Entfernen des Spritzenkolbens und Verschluss mittels Combi-Stopper
- 7) Herstellung des TK-FCS-Gemisches im 1:3-Verhältnis durch Zugabe von 400µl TK in den gemäß 3) befüllten 2ml-Eppendorf Tube; 3-maliges Durchmischen des Inhalts mittels Pipette; anschließend 5-minütige Inkubationszeit bei RT
- 8) währenddessen Befüllen der Küvetten 1-3 mit je 300µl FCS
- 9) Zugabe von je 300µl des TK:FCS-Gemisches in die Messküvetten-1 bis -3, Zugabe von 600µl in Messküvette-4
- 10) 1-minütige Inkubationszeit in den Messküvetten bei 37°C unter kontinuierlicher Durchmischung mittels Magnetrührstab

### **Messdurchführung**

Der Messdurchlauf wurde stets in Messküvette-1 begonnen. Die Zugabe der Substanzen erfolgte mit Eppendorf-Pipetten der Größe 10-100µl. Alle verwendeten Substanzen wurden vor und nach Zugabe jeweils dreimal mittels Eppendorf-Pipette langsam durchmischt. Die Entstehung von Luftblasen wurde vermieden. Bei der Befüllung der Küvetten musste die Pipettenspitze tief eingetaucht werden und mittig zwischen den Messdrähten liegen. Diese durften jedoch keinesfalls berührt werden. Bei Zugaben unterschiedlicher Substanzen musste sorgfältig auf die Erneuerung der Pipettenspitzen geachtet werden.

- 1) Zugabe von 20 µl ADP-Reagenz und Start der Messung in Kanal 1
- 2) Zugabe von 20 µl ASPI-Reagenz und Start der Messung in Kanal 2
- 3) Zugabe von 20 µl TRAP-Reagenz und Start der Messung in Kanal 3
- 4) Zugabe von 40 µl COL-Reagenz und Start der Messung in Kanal 4

Die Messung verlief in allen vier Küvetten simultan über sechs Minuten. Zwischen dem Start der einzelnen Messungen lagen Verzögerungen von jeweils etwa 45 Sekunden,

sodass der COLtest in Küvette-4 mit einem zeitlichen Abstand von ca. 2,5min zum ADPtest startete. Zwischenzeitlich erfolgt die Vorbereitung eines neuen TK-FCS-Gemisches für weiterer Multiplate<sup>®</sup>-Messungen an den noch ausstehenden TK.

### **2.3.2 Messablauf am Oxygraph-2k**

#### **Messvorbereitung**

Die Messungen am Oxygraph wurden stets nach Abschluss des Einsatzes im Laboralltag durchgeführt, um zeitliche Überschneidungen mit anderen Nutzern zu vermeiden. Aufgrund der räumlichen Nähe von Agitator und Oxygraph-2k konnte die Agitation der TTK nach der Probenentnahme direkt fortgesetzt werden. Für die Ausgangsmessung an Tag-1 wurde die linke Messkammer genutzt. An den Messtagen-2 bis -4 wurden beide Messkammern gleichzeitig genutzt, wobei die linke Kammer stets für die Messung an „TK\_III“ die Rechte für „TK\_IV“ bestimmt war.

Die Vorbereitungen der Messungen am Oxygraph-2k verliefen gemäß folgendem Plan:

- 1) Entnahme von 3ml der jeweiligen TTK in eine 5ml - Spritze
- 2) Einschalten des Oxygraphen und Öffnen des Analyse-Programms DatLab 5
- 3) Absaugen des Wassers in den beiden 2ml-Messkammern, welches die Elektroden im Ruhezustand feucht hält
- 4) Zugabe von insgesamt 2ml SSP-TTK-Gemisch in die entsprechende Messkammer und Einschalten des elektromagnetischen Rührers
- 5) vorsichtiger, luftdichter Verschluss der Messkammer mit den vorgesehenen Stöpseln
- 6) Absaugen des Überstands von der Oberfläche der Stöpsel, sobald durch die Fenster der Messkammer keine Luftblasen mehr zu sehen sind
- 7) Start der Messung unter Durchmischung mittels Magnetrührstab bei 30°C

Während den ersten Minuten der Messung wurden die im Anschluss benötigten Substanzen vorbereitet. Die Reinigungsmitochondrien und das KCN wurden, auf Eis gelagert, langsam aufgetaut. Oligomycin, FCCP und der Reinigungspuffer wurden dem Kühlschrank entnommen und verblieben ungekühlt.

#### **Messdurchführung**

Anhand Abbildung 2.2 (s. S. 64) wird der Messablauf am Oxygraph-2k beispielhaft erläutert werden. Nach zehn bis 15min stellte sich ein Plateau in der Kurve des O<sub>2</sub>-Flux ein, welches die basale Respirationsrate bzw. „Basalrate“ darstellt (vgl. Abschnitt 01, Abb.

2.2, S. 64). Für qualitativ hochwertige Messbedingungen sollte dieses in einem Bereich von 80-100 [ $pmol O_2/(s*ml)$ ] liegen und keinesfalls 30 [ $pmol O_2/(s*ml)$ ] unterschreiten. Um den Zielbereich zu erreichen, musste die ThZ-Konzentration in den Kammern häufig durch Verdünnung mit SSP angepasst werden. SSP wird üblicherweise in den TK als Konservierungslösung eingesetzt und wurde deshalb problemlos als Verdünnungsmittel in unseren Versuchen angesehen. Es wurden drei verschiedene TTK-SSP-Verdünnungsverhältnisse eingesetzt:

- 1) 1:1-Verhältnis: 1 ml TTK + 1 ml SSP
- 2) 3:1-Verhältnis: 1,5 ml TTK + 0,5ml SSP
- 3) 1:0-Verhältnis: 2ml TTK unverdünnt

In beide 2ml-Kammern wurde stets zuerst das SSP und anschließend die TK-Probe mittels einer 100-1000  $\mu$ l Eppendorf-Pipette zugegeben. Durch die gesammelten Vorerfahrungen während des Probelaufs mit „TK\_A“ konnten die benötigten Verhältnisse meist im Voraus abgeschätzt werden. Lag das Plateau jedoch unerwartet in einem ungünstigen Messbereich wurde die Messung mit einem angepassten Verhältnis wiederholt.

Sobald sich das initiale Plateau eingestellt hatte, erfolgte die Messung des  $O_2$ -Flux nach Zugabe der folgenden Substrate:

- 1) Zugabe von 1  $\mu$ l Oligomycin

Durch Hemmung der ATP-Synthase sank der  $O_2$ -Verbrauch in der Messkammer rapide. Es bildete sich ein Plateau mit den niedrigsten  $O_2$ -Flux-Werten aus, welches die LEAK-Rate darstellt (vgl. Abschnitt 02, Abb. 2.2, S. 64).

- 2) Titration von je 2  $\mu$ l FCCP

Der  $O_2$ -Fluss in der Messkammer wurde durch Titration von FCCP in 2  $\mu$ l-Schritten sukzessiv gesteigert. Vor jeder FCCP-Zugabe wurde stets auf die Ausbildung einer sauberen Titrationsstufe gewartet (vgl. Abschnitte 03-07, Abb. 2.2). Es wurde so lange titriert bis der  $O_2$ -Flux durch weitere Zugaben nicht mehr gesteigert werden konnte bzw. abfiel (vgl. Abschnitt 08, Abb. 2.2). Das Plateau des maximal gesteigerten  $O_2$ -Flux (vgl. Abschnitt 07, Abb. 2.2) spiegelt die maximale Respirationsrate bzw. „ETS-Kapazität“ wider.

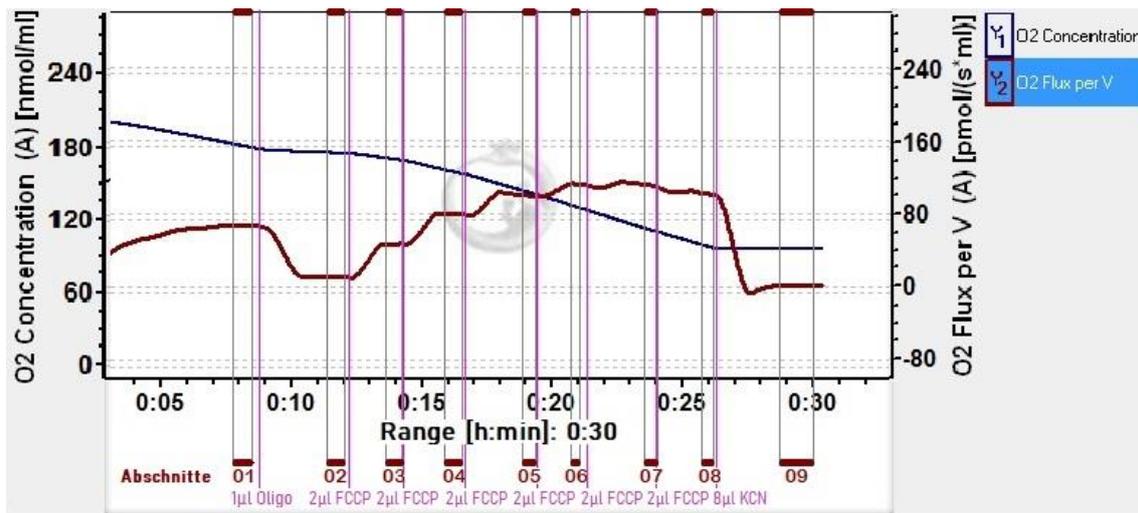
- 3) Zugabe von 8  $\mu$ l KCN

Durch die KCN-bedingte Hemmung der Atmungskette kam es zum abrupten Absinken des  $O_2$ -Verbrauchs in der Kammer und zur Ausbildung einer annähernden

Nulllinie (vgl. Abschnitt 09, Abb. 2.2). Dieses Plateau stellt die KCN- bzw. Residualrate dar.

- 4) Beendigung der Messung, Markierung aller Plateaubereiche (vgl. roter Balken, Abb. 2.2) und Ermittlung des Mittelwerts eines jeden Plateaus mithilfe des zugehörigen Analyseprogramms DatLab 5.

Die Zugabe der Substrate erfolgte jeweils mit drei verschiedenen Hamilton-Spritzen, um Kontaminationen zu verhindern.



**Abbildung 2.2:** Beispiel einer respirometrischen Messung am Oxygraph-2k; Erläuterung der Abschnitte 01-09; **01:** Plateau der Basalrate, **02:** LEAK-Rate nach Zugabe von 1µl Oligomycin, **03-07:** Anstieg der Respirationsraten durch Titration von je 2 µl FCCP, **07:** Plateau der Maximalrate, **08:** Fall der Respirationsrate durch weitere FCCP-Titration, **09:** Residualrate nach Zugabe von 8µl KCN

## 2.4 Beschreibung der Ergebnisauswertung

### 2.4.1 Auswertung der Ergebnisse am Multiplate®

Nach Ende der sechsinütigen Multiplate®-Messung wurden die vom Gerät ermittelten AUC-Werte der vier verschiedenen Multiplate-Tests in der Einheit „AU\*min“ den jeweiligen Excel-Tabellen zugeordnet. Für jede der vier Lagerungsmethoden – Kühlung, Rohrpost, Agitation und unterlassene Agitation – wurde eine eigenständige Tabelle erstellt. Konnte durch ausbleibenden Kurvenanstieg, oder initial fallenden Kurvenverlauf kein AUC-Wert bestimmt werden, zeigte das Gerät einen Wert von 0 an. Dieser wurde ebenfalls in die Statistik aufgenommen.

## 2.4.2 Auswertung der Ergebnisse am Oxygraph

Die Ermittlung folgender Respirationsraten am Oxygraph bot die Grundlage für die weiteren respirometrischen Analysen:

**KCN-/Residualrate (R):** Mittelwert des Plateaus nach Hemmung der Atmungskette (vgl. Abschnitt 09, Abb. 2.2, S. 64). Dieser Wert spiegelt den residualen O<sub>2</sub>-Verbrauch durch oxidative Hintergrundreaktionen wider.<sup>39</sup> Alle weiteren Respirationsraten werden durch Subtraktion der Residualrate vom residualen O<sub>2</sub>-Verbrauch bereinigt .

**Basalrate (B):** Mittelwert des ersten Plateaus (vgl. Abschnitt 01, Abb. 2.2) nach Abzug der Residualrate.

**Oligomycin-/LEAK-Rate (L):** Mittelwert des zweiten Plateaus (vgl. Abschnitt 02, Abb. 2.2) nach Abzug der Residualrate.

**Maximalrate (M):** Mittelwert des Plateaus des höchsten O<sub>2</sub>-Flux (vgl. Abschnitt 07, Abb. 2.2) nach Abzug der Residualrate.

Die Funktion der mitochondrialen Atmung wird in dieser Arbeit anhand folgender Parameter beurteilt:

„Freie“ **Basalrate (B\*)**: Subtraktion der LEAK-Rate von der Basalrate [**B-L = B\***]

„Freie“ **Maximalrate/ ETS-Kapazität (M\*)**: Subtraktion der LEAK-Rate von der Maximalrate [**M-L = M\***]

**Reservekapazität (RK)**: Subtraktion der „freien“ Basalrate (B\*) von der Maximalrate (M\*) [**RK = M\* - B\***]

**Basale Kopplungseffizienz (Basal-KE)**: Division der „freien“ Basalrate (B\*) durch die Basalrate (B) [**Basal-KE = (B-L) /B**]

**ETS-Kopplungseffizienz (ETS-KE)**: Division der „freien Maximalrate“ (M\*) durch die Maximalrate (M) [**ETS-KE = (M-L) /M**]

Alle genannten Respirationsraten orientieren sich an der Fachliteratur zum Oroboros Oxygraph-2k von Erich Gnaiger.<sup>39</sup>

### 3 Ergebnisse

Im Folgenden werden zunächst die Ergebnisse der ThZ-Aggregationstestung durch den Multiplate<sup>®</sup> Analyzer und anschließend die Ergebnisse der mitochondrialen Atmungsra-ten durch den Oxygraph-2k dargestellt. Die Messwerte resultieren aus der Analyse von elf Pool-TK, die über einen Zeitraum von vier Tagen untersucht wurden.

#### 3.1 Allgemeines Vorgehen

Alle Messergebnisse werden in Absolutwerten angegeben. Eine Ausnahme bildet die Darstellung der Kopplungseffizienzen (KE), die als Relativwerte ohne Einheit angegeben werden (vgl. Kapitel 2.4.2, S. 64-65). Die Ergebnisse werden durch die Angaben der Me-diane, dem 1. und 3. Quartil, dem Interquartilabstand und der Range präsentiert. Zusätz-lich sind alle Einzelmesswerte als „dot plots“ graphisch dargestellt. Der Verlauf der Mess-werte der KG und der zugehörigen TG, über den viertägigen Messzeitraum, wird hierbei in einer Grafik vereint dargestellt. Signifikante Unterschiede werden mit dem zugehöri-gen Signifikanzniveau anhand von “ \* “ über dem Graphen gekennzeichnet. Die Anzahl der “ \* “ entspricht dem Signifikanzniveau: \* ( $p \leq 0,05$ ); \*\* ( $p \leq 0,01$ ), \*\*\* ( $p \leq 0,001$ ). Signifikante Unterschiede werden sowohl innerhalb einer Gruppe im Verlauf der Mess-tage als auch zwischen der KG und der TG untersucht und entsprechend angegeben.

Für die Graphiken wurden die Achsen folgendermaßen gewählt:

**x-Achse:** Beobachtungszeitraum der TK über deren viertägige Haltbarkeit in Tagen. Messtag-1 entspricht dem Herstellungstag, Messtag-4 dem Ende der Haltbarkeit. Eine Ausnahme bilden die Versuchsreihen „Kühlung“ und „Rohrpostversand“. Hier sind die vier verschiedenen Multiplate<sup>®</sup>-Tests in der x-Achse aufgetragen.

**y-Achse:** Einheit der aggregometrischen oder respirometrischen Messungen.

Bei dem Multiplate<sup>®</sup> Analyzer wird die AUC (Area under the Curve) in  $[AU*min]$  dar-gestellt. Es wurde eine einheitliche Skalierung zwischen Werten von 0 bis 500AUC ge-wählt. Lediglich in der Graphik der COLtest-Ergebnisse wurde die Skalierung auf Werte von -10 bis zu 1600AUC erweitert, um auch Extremwerte zur Darstellung zu bringen.

Die im Oxygraph-2k ermittelten mitochondrialen Respirationsraten sowie die errechne-ten Kapazitäten werden mit der Einheit  $[pmol O_2/(s*ml)]$  angegeben. Die errechneten KE werden ohne Einheit angegeben. Die Achsenskalierung wurde jeweils an die Höhe der Ergebnisse angepasst und liegt in einem Bereich zwischen 0 und maximal 400.

Vor der Ergebnispräsentation wird Ablauf und Ziel der jeweiligen Versuchsreihe zusammengefasst. Anschließend werden die Ergebnisse der KG und TK gemeinsam in einem Graphen präsentiert und signifikante Unterschiede hervorgehoben. Auf eine ausführliche Listung aller Messergebnisse sowie der vollständigen statistischen Daten wird, zugunsten der besseren Übersicht, in diesem Teil der Arbeit verzichtet. Die vollständige deskriptive und analytischen Statistik findet sich im Ergebnisanhang (vgl. Kapitel 7, S. 129-128). Am Ende der Ergebnispräsentation jeder Testreihe werden die signifikanten Unterschiede tabellarisch zusammengefasst, um bedeutende Ergebnisse hervorzuheben.

### **3.2 Versuchsreihe Multiplate<sup>®</sup> Analyzer**

Es wurde das Aggregationsverhalten der ThZ nach deren Stimulation mit den Aktivatoren ADP, Arachidonsäure (ASPI), TRAP-6 (TRAP) und Kollagen (COL) ermittelt. Verglichen wurde die Entwicklung der thrombozytären Aggregationsfähigkeit in vorschriftsmäßig gelagerten TK (KG) mit der in ruhenden TK (TG-uA) über einen Zeitraum von vier Tagen (Tag-1 bis Tag-4). Das Ausmaß der ThZ-Aggregation wird als AUC ausgedrückt und im Folgenden in  $[AU*in]$  angegeben. In einer zusätzlichen Messreihe wurde die Auswirkung einer temporären Kühlung der TK (TG-K) sowie deren Versand mittels Rohrpostsystemen (TG-R) auf die ThZ-Aggregationsfunktion untersucht.

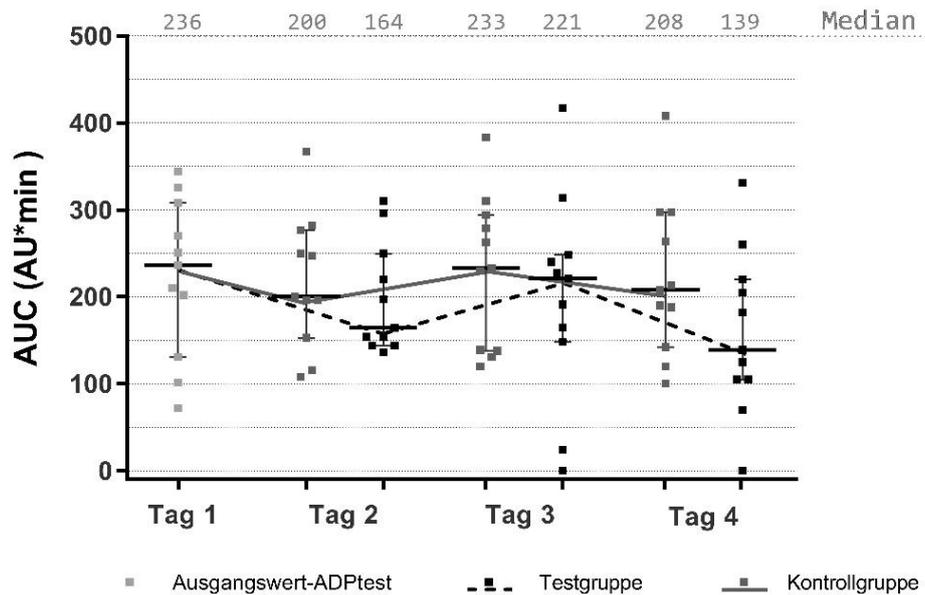
#### **3.2.1 Kontinuierliche versus unterlassene Agitation (KG vs. TG-uA)**

Ziel dieser Versuchsreihe war die Eignungsprüfung des Multiplate<sup>®</sup> Analyzers, als zuverlässiges Testprinzip zur in vitro Qualitätskontrolle von TK, sowie die Quantifizierung des Einflusses von Agitationsunterbrechungen während der TK-Lagerung auf die ThZ-Aggregation und folglich die TK-Qualität. Alle Messwerte der KG und TG-uA werden mit den zugehörigen Medianen gemeinsam in einem Graphen dargestellt und deren Entwicklung über den viertägigen Beobachtungszeitraum veranschaulicht. Eine detaillierte Auf-führung der deskriptiven Statistik und der einzelnen Signifikanzen sind dem Ergebnisanhang unter Kapitel 7.1 zu entnehmen (vgl. Tab. 7.1-7.4, S. 119 - 121).

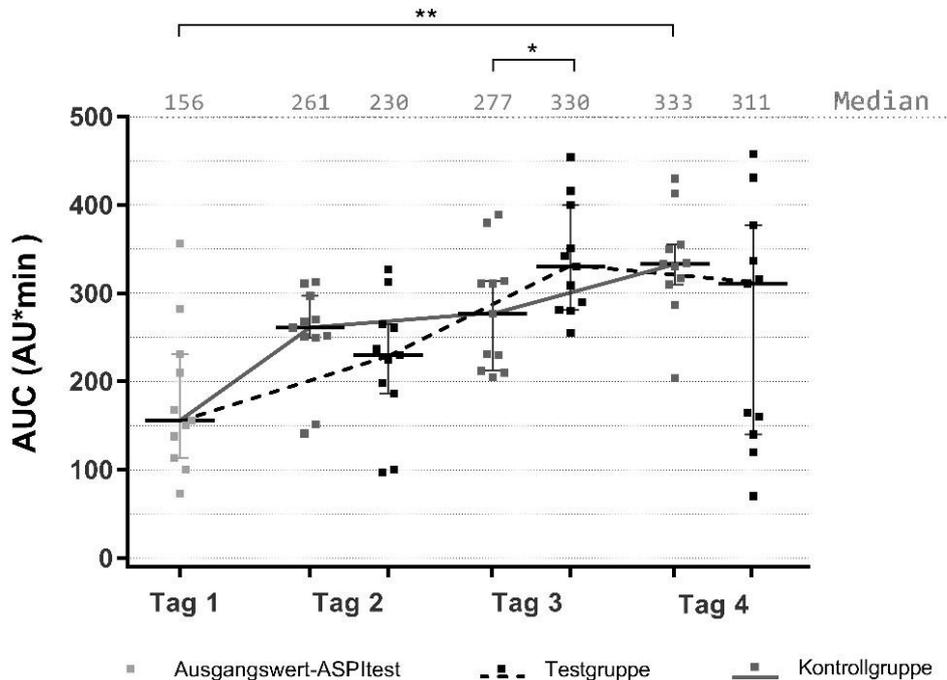
#### **Ergebnisse der ADPtests**

Die ADPtest-Ergebnisse zeigen sich über den viertägigen Lagerungszeitraum in beiden Gruppen nur gering dynamisch (vgl. Abb. 3.1, S. 68). Der initiale Medianwert von 236 AUC an Tag-1 sinkt im Verlauf nur geringfügig auf 208 (KG), bzw. 139 (TG-uA) an Tag-4. Weder in der KG noch in der TG-uA erweisen sich die Medianwerte als signifikant

unterschiedlich zum Vortag oder Tag-1. Auch zwischen beiden Gruppen unterscheiden sie sich an keinem Tag signifikant.



**Abbildung 3.1:** Darstellung der AUC von KG und TG-uA im ADPtest über den viertägigen Beobachtungszeitraum; Absolutwerte mit Medianen sowie 1. und 3. Quartilen



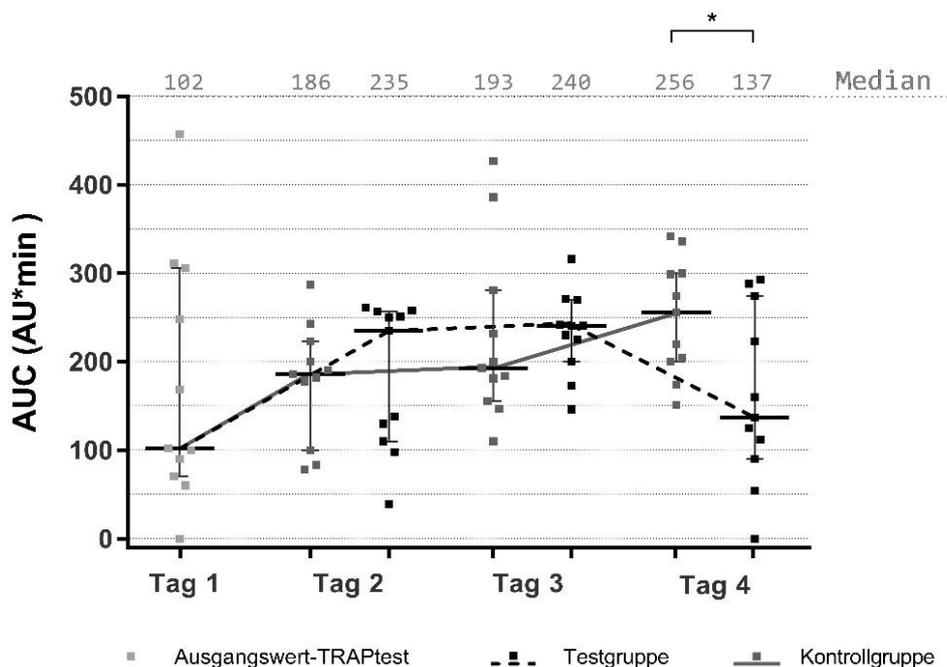
**Abbildung 3.2:** Darstellung der AUC von KG und TG-uA im ASPItest über den viertägigen Beobachtungszeitraum; Absolutwerte mit Medianen sowie 1. und 3. Quartilen, signifikante Unterschiede vermerkt, \*\* ( $p = 0,006$ ), \* ( $p = 0,042$ )

## Ergebnisse der ASPItests

Die Mediane im ASPItest verzeichnen im Verlauf der TK-Lagerung einen nahezu kontinuierlichen Zuwachs in beiden Gruppen (vgl. Abb. 3.2, S. 68). Von initial 156 AUC steigen sie auf 333 (KG) und 311 (TG-uA) an Tag-4 an. In der KG erweist sich dieser Anstieg als hoch signifikant an Tag-4 verglichen mit Tag-1 ( $p \leq 0,01$ ). In der TG-uA zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zu den Vortagen. Gegenüber der KG erweist sich der Medianwert der TG-uA an Tag-3 gering signifikant höher ( $p \leq 0,05$ ). An Tag-4 gleicht sich der Unterschied aus, sodass beide Mediane nahezu identisch sind.

## Ergebnisse der TRAPtests

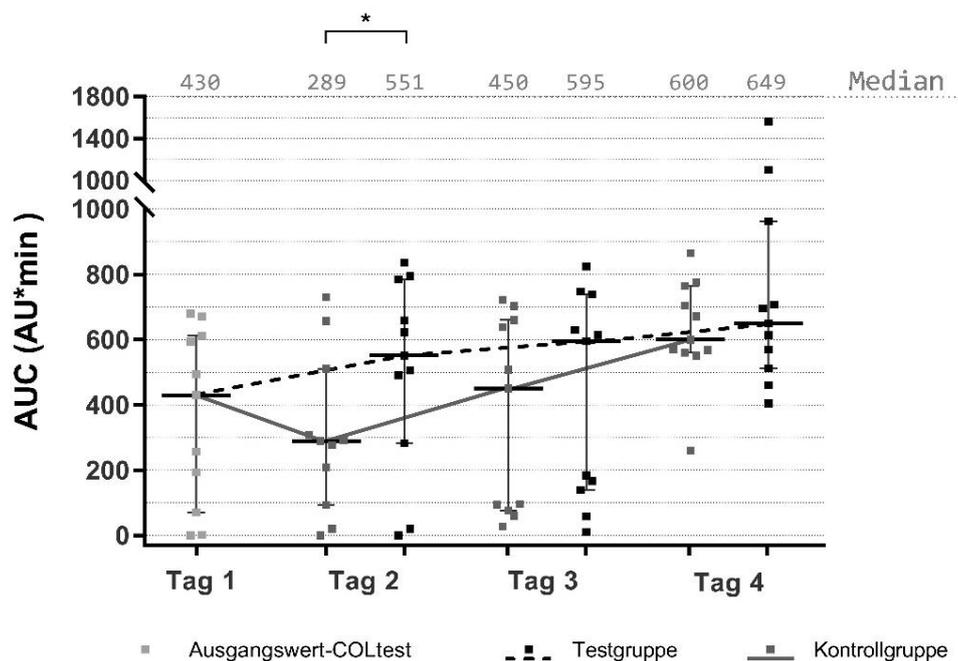
Die Medianwerte entwickeln sich in den ersten drei Versuchstagen in beiden Gruppen zunächst ähnlich (vgl. Abb. 3.3). Nach einem ersten steilen Anstieg von initial 102 AUC auf 186 (KG), bzw. 235 (TG-uA) an Messtag-2 stagniert die Dynamik in beiden Gruppen bis zum Messtag-3 nahezu vollständig. Der weitere Verlauf variierte stark zwischen den Gruppen: verzeichnet die KG einen weiteren Anstieg auf 256 (Tag-4) sinkt der Medianwert in der TG-uA auf 137, was zu einem signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen an Tag-4 führt ( $p \leq 0,05$ ). Es findet sich kein signifikanter Unterschied innerhalb einer Gruppe zwischen den vier Messtagen.



**Abbildung 3.3:** Darstellung der AUC von KG und TG-uA im TRAPtest über den viertägigen Beobachtungszeitraum; Absolutwerte mit Medianen sowie 1. und 3. Quartilen, signifikante Unterschiede vermerkt, \* ( $p = 0,042$ )

## Ergebnisse der COLtests

Innerhalb des viertägigen Versuchszeitraums zeigt sich in beiden Gruppen ein Anstieg der Mediane von initial 430AUC auf 600 (KG) und 649 (TG-uA) an Tag-4 (vgl. Abb. 3.4). Ein signifikanter Unterschied im Vergleich zum Messtag-1 oder zum Vortag ist weder innerhalb der KG noch der TG-uA nachzuweisen. Während die Mediane der TG-uA täglich kontinuierlich steigen, fällt die KG zunächst auf 289 an Tag-2 ab, um dann an den Folgetagen wieder kontinuierlich anzusteigen. Durch diesen Abfall zeigt sich die KG an Messtag-2 gering signifikant gegenüber der TG-uA erniedrigt ( $\leq 0,05$ ). Die Medianwerte der restlichen Tage differieren zwischen beiden Gruppen nicht signifikant.



**Abbildung 3.4:** Darstellung der AUC von KG und TG-uA im COLtest über den viertägigen Beobachtungszeitraum; Absolutwerte mit Medianen sowie 1. und 3. Quartilen, signifikante Unterschiede vermerkt, \* ( $p = 0,042$ )

## Zusammenfassung – Multiplate®: KG versus TG-uA über 4 Tage

Signifikante Unterschiede	Es zeigen sich signifikante Unterschiede <i>innerhalb einer Gruppe</i> (KG bzw. TG-uA) im Verlauf der Messtage 1-4: ASPItest Tag-1 versus 4 in der KG ( $p \leq 0,01$ )
	Es zeigen sich signifikante Unterschiede <i>zwischen KG und TG-uA</i> : ASPItest Tag-3, TRAPtest Tag-4, COLtest Tag-2 ( $p \leq 0,05$ )
Beschreibung der	Die Entwicklung der Multiplate®-Tests über vier Lagerungstage <i>innerhalb einer Gruppe</i> erweist sich nur in einem Test als signifikant unterschiedlich (ASPItest); hierbei ergeben sich in der KG an Tag-4 signifikant höhere Werte gegenüber Tag-1

<b>Unterschiede</b>	Signifikante Unterschiede <i>zwischen KG und TG-uA</i> zeigen sich an drei verschiedenen Messtagen und in jeweils drei verschiedenen Multiplate-Tests: COLtest (Tag-2), ASPItest (Tag-3), TRAPtest (Tag-4). In zwei dieser drei Multiplate-Tests weist die TG signifikant höhere Messwerte gegenüber der KG (ASPI- und COLtest)
<b>Fazit</b>	Es zeigen sich bei beiden Lagerungsmethoden während der viertägigen Lagerung mehrheitlich keine signifikant veränderten Ergebnisse <i>zwischen den Messtagen</i>
	Es zeigen sich an keinem der vier Messtage eindeutige signifikante Unterschiede <i>zwischen den Lagerungsmethoden</i>

**Tabelle 3.1:** Die bedeutenden Unterschiede der Multiplate®- Ergebnisse im Verlauf der viertägigen TK-Lagerung unter kontinuierlicher Agitation (KG) und unterlassener Agitation (TG-uA)

### 3.2.2 Temporäre Kühlung (KG vs. TG-K)

Ziel dieser Versuchsreihe war die Untersuchung, ob die 60-minütige Lagerung eines zuvor vorschriftsmäßig gelagerten TK bei 4°C ohne Agitation (TG-K) die ThZ-Aggregationsfähigkeit beeinflusst. Diese wurde analog zur vorherigen Versuchsreihe mittels ADP-, ASPI-, TRAP-, und COLtests am Multiplate® Analyzers eruiert. Die Messungen der TG-K erfolgten an allen elf TK an Messtag-2 und deren Ergebnisse wurden entsprechend mit den Ergebnissen der KG an Messtag-2 verglichen. In Abb. 3.5 (s. S. 72) sind alle Messwerte der vier Multiplate®-Testreihen von KG und TG-K mit den zugehörigen Medianen sowie den Werten des 1. und 3. Quartil vereint dargestellt. Die Tabelle 7.5 im Ergebnisanhang (s. S. 121) gibt eine vollständige Listung der Messdaten und zugehörigen statistischen Einzelheiten.

In drei der insgesamt vier Multiplate®-Tests erweisen die Medianwerte zwischen den beiden Gruppen keine signifikanten Unterschiede (ADP-, TRAP-, COLtest). Hierbei zeigen der ADP- sowie der TRAPtest ähnlich hohe Mediane in beiden Gruppen. Im COLtest liegt der Medianwert der TG-K deutlich, aber nicht signifikant höher verglichen mit der KG. Der ASPItest erweist eine gering signifikant geminderte AUC in der TG-K (170) gegenüber der KG (261) ( $\leq 0,05$ ).

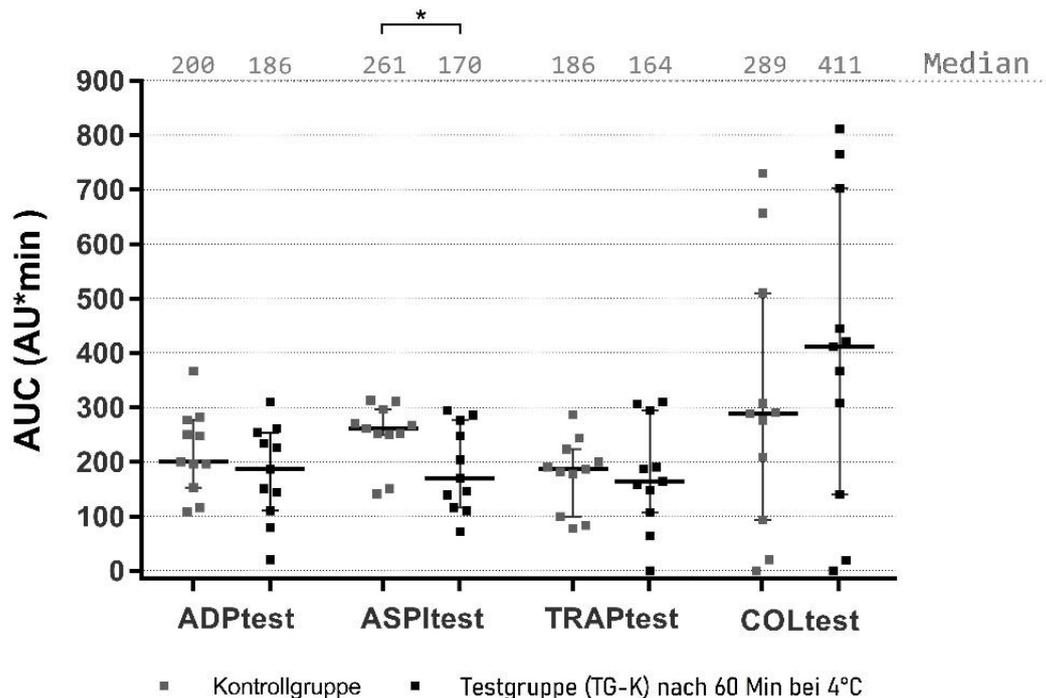


Abbildung 3.5: Darstellung der AUC von KG und TG-K in allen vier Multiplate®-Tests, \* (p = 0,032)

### 3.2.3 Versand mittels pneumatischer Rohrpostanlage (KG vs. TG-R)

Diese Versuchsreihe sollte den Einfluss des Rohrpostversands von TK auf die thrombozytäre Aggregationsfähigkeit untersuchen. Die Nutzdauer des Rohrpostsystems betrug hierbei durchschnittlich 13,5min. Die Transportgeschwindigkeit betrug zwischen 2-3 m/sec. Analog zur Versuchsreihe „temporäre Kühlung“ erfolgten die Untersuchungen stets an Messtag-2 und die Multiplate®-Ergebnisse nach Rohrpostversand (TG-R) wurden mit den entsprechenden Ergebnissen der vorschriftsmäßig gelagerten KG verglichen. Ein Fehldurchlauf im Rohrpostversand führte an einem Messtag dazu, dass eines der elf TK im System verschwand und erst am Folgetag zurückgesendet wurde. Deshalb beruhen die folgenden statistischen Daten auf einer Fallzahl von zehn TK, statt der sonst elf TK. Die Abbildung 3.6 (s. S. 73) veranschaulicht alle Einzelmesswerte sowie Mediane und Werte des 1. und 3. Quartils der KG und TG-R in den vier Multiplate®-Testreihen.

Keiner der vier Testreihen zeigt einen signifikanten Unterschied zwischen KG und TG-R. Zwei Multiplate®-Tests erweisen nahezu identische Werte in beiden Gruppen: ADPtest: 223,5 (KG); 225,0 (TG-R) und TRAPtest: 184,0 (KG); 182,5 (TG-R). Im ASPItest zeigt sich in der TG-R ein Abfall der AUC-Werte. Im COLtest verzeichnen sich nach Rohrposttransport deutlich höhere Werte. Beide Unterschiede sind nicht signifikant. In

Tab. 7.6 im Ergebnisanhang können die vollständigen statistischen Daten eingesehen werden (s. S. 122).

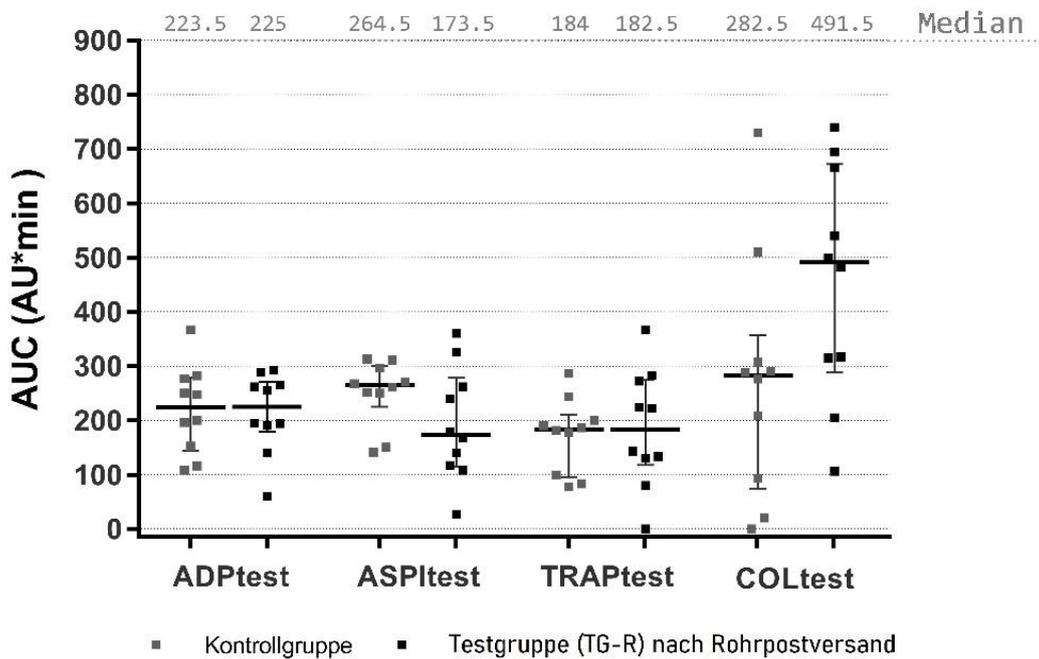


Abbildung 3.6: Darstellung der AUC von KG und TG-R in allen vier Multiplate®-Tests

### Zusammenfassung: KG versus TG-K und TG-R

Signifikante Unterschiede	Es ist ein signifikanter Unterschied zwischen KG und TG-K (“temporäre Kühlung”) zu verzeichnen
	Nach Rohrposttransport zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen KG und TG-R
Beschreibung der Unterschiede	Die TK-Kühlung führt nur in einem Test (ASPItest) zu einer signifikanten Abnahme der AUC-Werte im Vergleich zur KG; das Signifikanzniveau beträgt $p < 0,05$
Fazit	Weder die gekühlte Lagerung noch der Rohrposttransport zeigen signifikante Veränderungen in der Mehrheit der Multiplate®-Tests

Tabelle 3.2: Die bedeutenden Unterschiede der Multiplate®-Ergebnisse zwischen der KG und TG-K sowie TG-R (Versuchsreihe „temporäre Kühlung“ und „Rohrpostversand“)

### 3.3 Versuchsreihe Oxygraph-2k

Die Versuchsreihe am Oxygraph beinhaltet die Ermittlung der mitochondrialen Respirationsraten in den ThZ der elf getesteten TK und deren Entwicklung im Verlauf ihrer vier-tägigen Haltbarkeit. Verglichen wurde die Entwicklung vorschriftsmäßig gelagerter TK

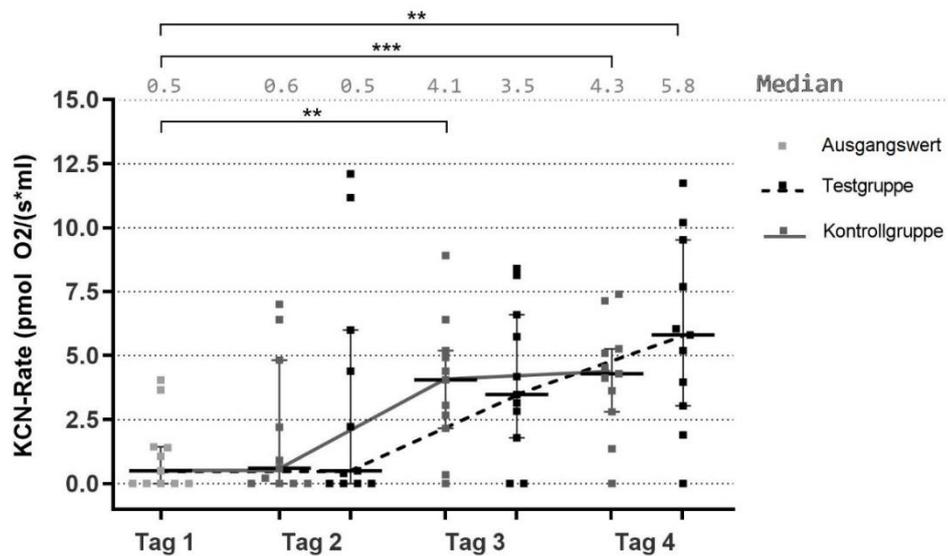
unter kontinuierlicher Agitation (KG) mit der von TK, die ohne jegliche Agitation gelagert wurden (TG-uA). Ziel der Messungen war es, einen eventuellen Unterschied in den mitochondrialen Atmungsraten beider Gruppen festzustellen, um mögliche qualitätsmindernde Einflüsse der TK-Lagerung auf die Mitochondrienfunktion zu detektieren. Die Ergebnisse einer Respirationsrate werden meist in jeweils zwei Graphiken dargestellt. Die erste Graphik visualisiert den Verlauf der Messwerte über die kompletten vier Versuchstage. Die zweite Graphik stellt die Ergebnisse des Messtag-1 dem Messtag-4 der KG und TG-uA gegenüber. Es werden in den Graphiken nur die wesentlichen signifikanten Unterschiede mit dem zugehörigen Signifikanzniveau vermerkt. Die vollständigen statistischen Daten aller Messungen am Oxygraph können im Ergebnisanhang unter Kapitel 7.2 eingesehen werden (vgl. Tab. 7.7 - 7.15, s. S.122 - 128).

### **3.3.1 Mitochondriale Atmungsraten**

Zunächst wird die Entwicklung der verschiedenen Respirationsraten der KG und TG-uA in folgender Reihenfolge aufgeführt: KCN-, Oligomycin-, „freie“ Basalrate und „freie“ ETS-Kapazität. Im nächsten Abschnitt folgt die Präsentation der Reservekapazitäten sowie der Kopplungsfaktoren. Zur ausführlichen Erläuterung der Respirationsraten, Kapazitäten und Kopplungsfaktoren und deren Ermittlung siehe Kapitel 1.8.2 (s. S. 38-44).

#### **Entwicklung der KCN-Rate/ Residualrate (R)**

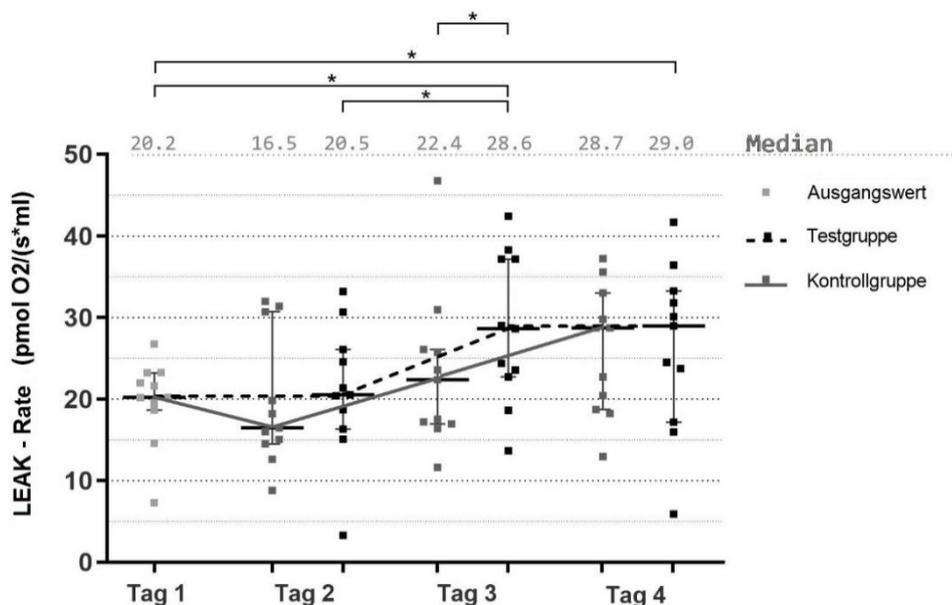
Am Ende jeder respirometrischen Messung wurde die Höhe des nicht-mitochondrialen O<sub>2</sub>-Verbrauchs, die Residualrate (R), ermittelt. Sie wurde anschließend von allen zuvor ermittelten Atmungsraten eines Messdurchlaufs subtrahiert, sodass diese ausschließlich den reinen mitochondrialen O<sub>2</sub>-Verbrauchs darstellen. Alle nachfolgenden Respirationsraten, sind bereits durch den Abzug der KCN-Rate korrigiert. Die Abb. 3.7 (s. S. 75) veranschaulicht einen kontinuierlichen Anstieg von R in beiden Gruppen über den vier-tägigen Untersuchungszeitraum. Ausgehend von einer anfänglichen KCN-Rate bei 0,5 [*pmol O<sub>2</sub>/(s\*ml)*] verzeichnet am Messtag-4 sowohl die KG mit einem Medianwert von 4,3 ( $p \leq 0,001$ ) als auch die TG-uA mit 5,8 ( $p \leq 0,01$ ) einen signifikanten Anstieg gegenüber dem Messtag-1. In der KG ist ein erster signifikanter Unterschied zum Tag-1 bereits an Tag-3 mit einem Median von 4,1 festzustellen ( $p \leq 0,01$ ). Es erweist sich an keinem Messtag ein signifikanter Unterschied zwischen der KG und der TG.



**Abbildung 3.7:** Darstellung der KCN-Raten von KG und TG-uA über den viertägigen Beobachtungszeitraum; Absolutwerte mit Medianen sowie 1. und 3. Quartilen, signifikante Unterschiede vermerkt

### Entwicklung der LEAK-Rate (L)

Die LEAK-Rate (L) spiegelt den O<sub>2</sub>-Verbrauch trotz gehemmter ATP-Produktion wider. Damit gibt sie ein Bild über die Höhe des O<sub>2</sub>-Verbrauchs zum Ausgleich des „proton leak“ über die IMM. Sie wird als Bezugswert bei der Errechnung der Kopplungseffizienzen verwendet und zur Ermittlung der ATP-gekoppelten, „freien“ Basalrate (B\*) benötigt (vgl. Kap. 1.8.2, S. 38-44). Insgesamt lässt sich über die vier Messtage in beiden Gruppen ein deutlicher Anstieg der LEAK-Rate erkennen (vgl. Abbildung 3.8).



**Abbildung 3.8:** Darstellung der LEAK-Raten von KG und TG-uA über den viertägigen Beobachtungszeitraum; Absolutwerte mit Medianen sowie 1. und 3. Quartilen, signifikante Unterschiede vermerkt

Von einem initialen Medianwert bei 20,2 ausgehend fällt die LEAK-Rate am Messtag-2 in der KG zunächst leicht ab, bzw. hält sich in der TG konstant, um anschließend über die folgenden zwei Lagerungstage anzusteigen. Dieser Anstieg führt in der TG-uA zu einem signifikanten Unterschied zwischen Messtag-2 (Median: 20,5) und Messtag-3 (Median: 28,6) ( $p \leq 0,05$ ), sowie zwischen Messtag-3, bzw. Messtag-4 (Median: 29,0) und dem Ausgangstag (jeweils  $p \leq 0,05$ ). In der KG bleibt der Anstieg ohne Signifikanz. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen stellt sich am Tag-3 dar, an dem die LEAK – Rate der TG – uA mit einem Median von 28,6 gering signifikant höher ist als die der KG mit 22,4 ( $p \leq 0,05$ ). Am Tag-4 gleichen sich die Medianwerte der beiden Gruppen weitestgehend an, sodass kein weiterer signifikanter Unterschied besteht.

### Entwicklung der „freien“ Basal-Rate (B\*)

Die Basalrate (B) spiegelt die mitochondriale Atmungsrate im Ruhezustand der Zelle wider. In Abbildung 3.9a und b (s. S. 77) sind die “freien” Basalraten (B\*) dargestellt, die sich aus  $[B - L]$  errechnen. Sie stellen ausschließlich die an die ATP-Produktion gekoppelte Respiration dar. Im weiteren Verlauf der Arbeit wird sich stets auf die “freie” Basalrate bezogen. Die Messwerte der initialen Basalraten (B) und deren statistische Analyse sind der Tabelle 7.9. im Ergebnisanhang (s. S. 124) zu entnehmen.

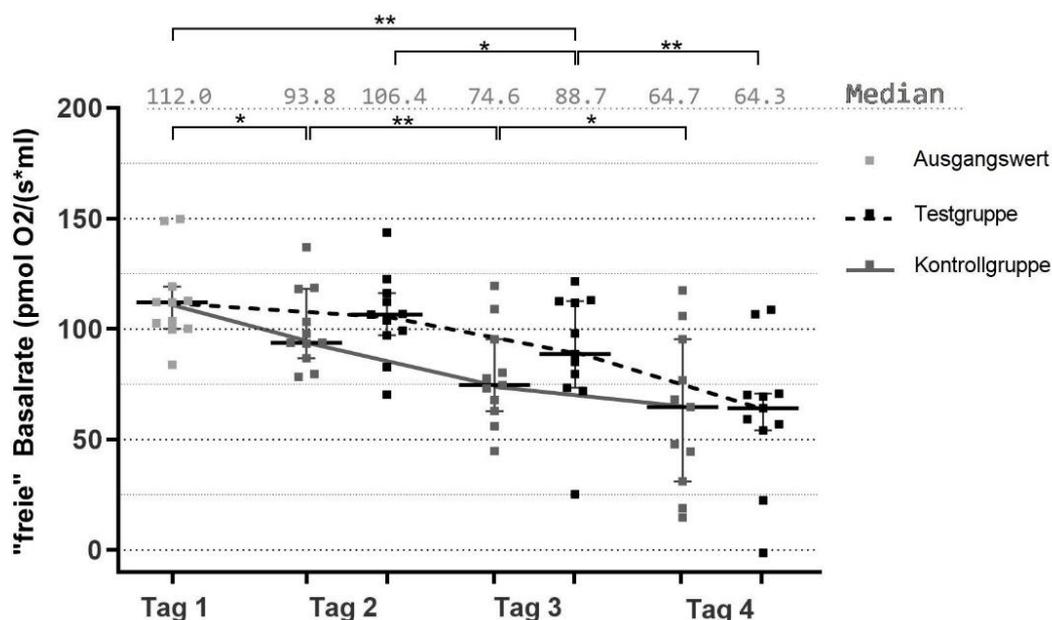
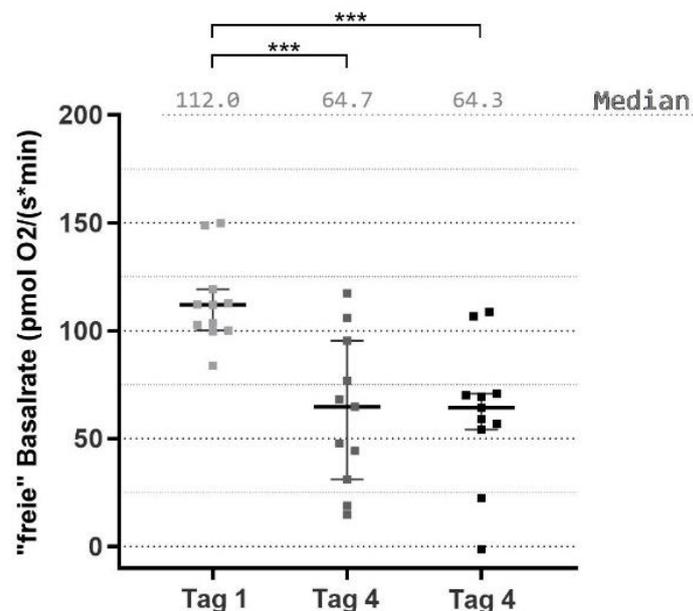


Abbildung 3.9a: Darstellung von B\* der KG und TG-uA über den viertägigen Beobachtungszeitraum

Aus Abb. 3.9a (s. S. 76) wird ersichtlich, dass B\* im Verlauf der viertägigen Lagerungsperiode in beiden Gruppen kontinuierlich abnimmt. Ausgehend von einem initialen Medianwert bei 112,0 zeigt die KG bereits am Messtag-2 eine gering signifikant geminderte “freie” Basalrate von 93,8 ( $p \leq 0,05$ ). Im weiteren Verlauf stellt sich jede weitere Abnahme signifikant gegenüber dem Vortag dar ( $p \leq 0,01$  bzw.  $p \leq 0,05$ ). In der TG verzeichnet sich die erste signifikante Abnahme der “freien” Respirationsrate am Messtag-3 (Median 88,7) gegenüber dem Ausgangswert ( $p \leq 0,01$ ). Abb. 3.9b stellt B\* beider Gruppen an Messtag-4 dem Ausgangswert gegenüber. Es verzeichnen sich an Messtag-4 in beiden Gruppen nahezu identische Medianwerte (KG: 64,7 TG: 64,3), die sich beide höchst signifikant reduziert gegenüber dem Ausgangswert darstellen ( $p \leq 0,001$ ). Der Unterschied zwischen den Gruppen ist an keinem der Messtage signifikant.



**Abbildung 3.9b:** Vergleich der B\* von KG und TG-uA an Tag-1 mit Tag-4, Absolutwerte mit Medianen sowie 1. und 3. Quartilen, signifikante Unterschiede vermerkt

### Entwicklung der „freien“ ETS – Kapazität (M\*)

Die Maximalrate, auch ETS – Kapazität genannt, wurde ausgehend von L durch Titration des Atmungskettenentkopplers FCCP ermittelt. Sie stellt den maximal gesteigerten O<sub>2</sub> – Verbrauch bei maximalem Elektronentransport entlang der IMM dar. Ebenso wie B wird auch M in dieser Arbeit durch Abzug von L als “freie” ETS – Kapazität (M\*) dargestellt. Die Ergebnisse von M und den zugehörigen statistischen Daten können in Tabelle 7.11 im Ergebnisanhang (s. S. 125) eingesehen werden.

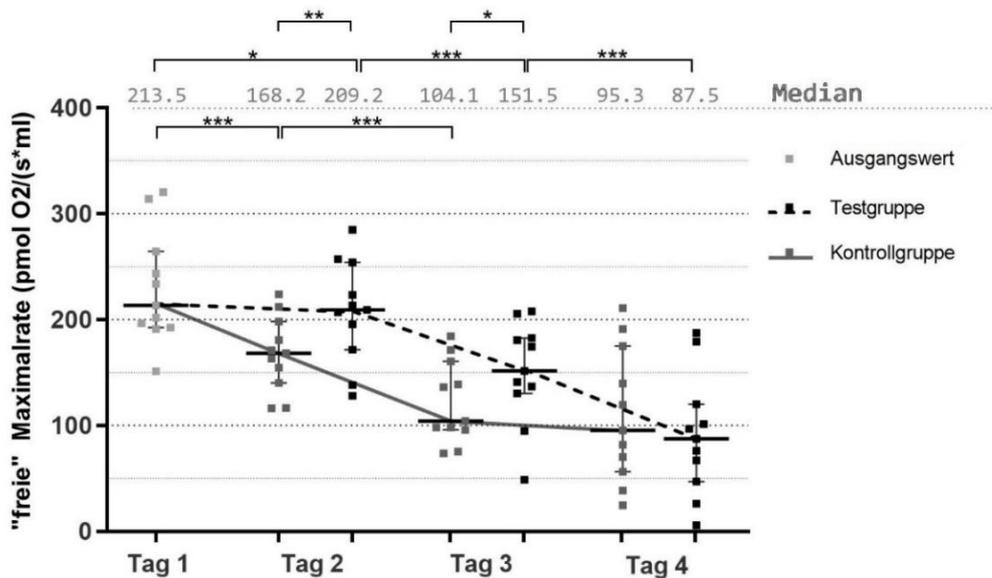


Abbildung 3.10a: Darstellung von M\* der KG und TG-uA über den viertägigen Beobachtungszeitraum

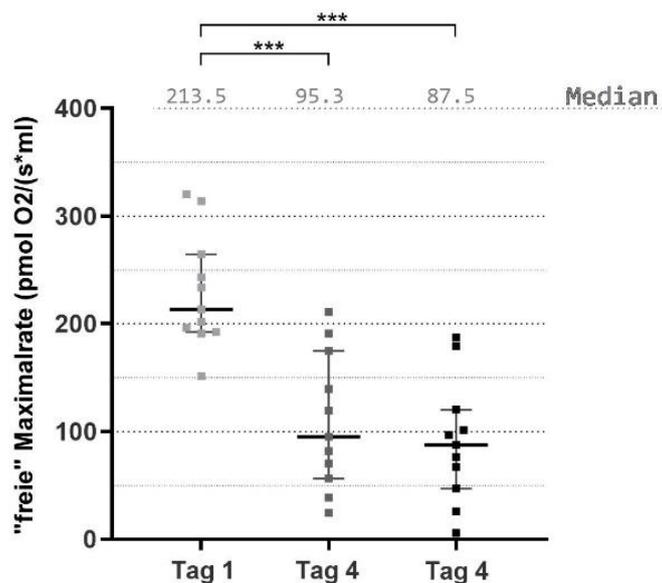


Abbildung 3.10b: Vergleich der M\* von KG und TG-uA an Tag-1 mit Tag-4, Absolutwerte mit Medianen sowie 1. und 3. Quartilen, signifikante Unterschiede vermerkt

M\* beider Gruppen nehmen über die viertägige Lagerungszeit kontinuierlich ab und verzeichnen einen höchst signifikanten Unterschied zwischen Messtag-4 und dem Ausgangstag (vgl. Abb. 3.10a und 3.10b,  $p \leq 0,001$ ). Von einem Medianwert bei 213,5 am Messtag-1 sinken sie auf 168,2 (KG) und 209,2 (TG-uA) am Messtag-2. Bereits diese erste Abnahme erweist sich in beiden Gruppen als signifikant (KG:  $p \leq 0,001$ ; TG:  $p \leq 0,05$ ). Auch die weitere Reduktion auf 104,1 (KG) sowie 151,5 (TG) am Tag-3 erweist sich als höchst signifikant gegenüber dem Vortag ( $p \leq 0,001$ ). An Messtag-4 zeigt die TG

mit einem Medianwert von 87,5 erneut eine höchst signifikante Reduktion gegenüber Messtag-3 ( $p \leq 0,001$ ). In der KG verläuft die Abnahme auf 95,3 ohne Signifikanz ( $p = 0,1013$ ). In der KG fällt  $M^*$  über die ersten zwei Messtage deutlich steiler ab als in der TG. Diese Entwicklung führt zu signifikant geminderten Respirationsraten in der KG gegenüber der TG an Tag-2 ( $p \leq 0,01$ ) und Tag-3 ( $p \leq 0,05$ ). Dieser Unterschied gleicht sich am Messtag-4 nahezu vollständig aus (KG: 95,3; TG: 87,5), sodass sich KG und TG nicht mehr signifikant unterscheiden ( $p = 0,7646$ )

### Zusammenfassung – $B^*$ und $M^*$ : KG versus TG-uA über 4 Tage

Signifikante Unterschiede	Im Verlauf der Messtage 1-4 zeigen beide „freien“ Respirationsraten signifikante Unterschiede <i>innerhalb einer Gruppe</i> (KG bzw. TG-uA); nahezu jeder Messtag zeigt signifikant reduzierte Medianwerte im Vergleich zum Vortag
	Es zeigen sich signifikante Unterschiede <i>zwischen KG und TG-uA</i> : an Messtag-2 und 3 weist die TG-uA signifikant höhere $M^*$ als die KG auf ( $p \leq 0,01$ und $p \leq 0,05$ ).
Beschreibung der Unterschiede	Beide Gruppen zeigen eine kontinuierliche und signifikante Abnahme von $B^*$ und $M^*$ im Verlauf der Lagerungszeit
	Die Abnahme beider „freien“ Respirationsraten verzeichnet sich in der KG zwischen Tag-1 und Tag-3 zunächst intensiver als in der TG
	Dies hat signifikant niedrigere $M^*$ an Tag-2 und Tag-3 in der KG gegenüber der TG zur Folge (Tag-2: $p \leq 0,01$ ; Tag-3: $p \leq 0,05$ )
	Am Tag-4 gleichen sich die „freien“ Respirationsraten in beiden Gruppen an, sodass kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen zu verzeichnen ist
Fazit	Bei beiden Lagerungsmethoden zeigen sich fallende Respirationsraten im Verlauf der Lagerungszeit. Es gibt keine signifikanten Unterschiede der Respirationsraten zwischen den Lagerungsmethoden nach vier Tagen
	Die Lagerung der TK ohne Agitation (TG-uA) führt zunächst bis zum Tag-3 zu höheren Respirationsraten im Vergleich zur KG, wobei nur die „freie“ Maximalrate signifikante Unterschiede präsentiert.

**Tabelle 3.3:** Die bedeutenden Unterschiede von  $B^*$  und  $M^*$  über Messtage 1-4 in der KG und TG-uA

### 3.3.2 Reservekapazität und Kopplungseffizienzen

Im Folgenden werden die Reservekapazitäten mit der Einheit [ $pmol O_2/(s \cdot ml)$ ] und die Kopplungseffizienzen, als Verhältnis zweier Atmungsraten, ohne Einheit angegeben.

## Entwicklung der Reservekapazität (RK)

Die Reservekapazität ( $RK = M^* - B^*$ ) repräsentiert den Anteil, um den die Respirationsrate, ausgehend vom Ruhezustand, noch maximal gesteigert werden kann. In beiden Gruppen zeigt sich eine kontinuierliche und signifikante Abnahme der RK im Verlauf des viertägigen Beobachtungszeitraums (vgl. Abbildung 3.11a). Ausgehend von einem Medianwert von 113,4, sinkt die RK schon am Messtag-2 auf 70,2 (KG) und 105,5 (TG-uA) signifikant ab (KG:  $p \leq 0,001$ ; TG-uA:  $p \leq 0,01$ ). Am Messtag-3 zeigen sich die Medianwerte beider Gruppen (KG: 42,1; TG-uA: 59,1) weiter höchst signifikant reduziert gegenüber dem Vortag ( $p \leq 0,001$ ). Die folgende Abnahme der RK am Tag-4 auf 34,0 (KG) und 19,1 (TG) erweist sich nur in der TG als signifikant ( $p \leq 0,001$ ). Die Abnahme der RK erfolgt in der KG über die ersten zwei Messtage deutlich stärker als in der TG-uA, sodass letztere an Tag-2 und Tag-3 signifikant höhere RK gegenüber der KG aufweist (Tag-2:  $p \leq 0,001$ ; Tag-3:  $p \leq 0,05$ ). Dieser signifikante Unterschied zwischen den Gruppen findet sich am Messtag-4 nicht mehr ( $p = 0,2402$ ).

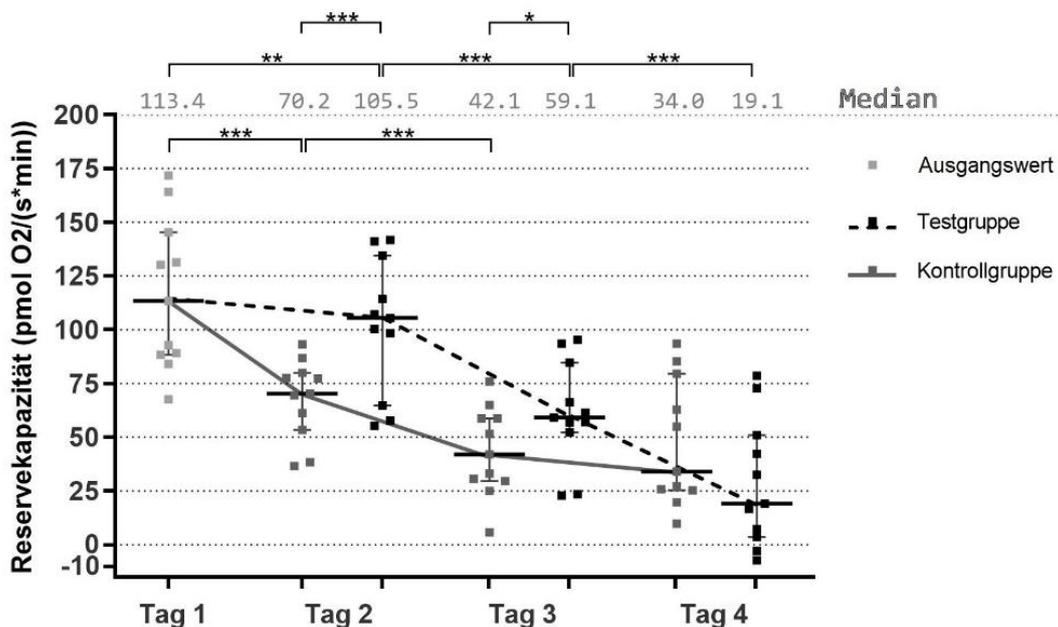
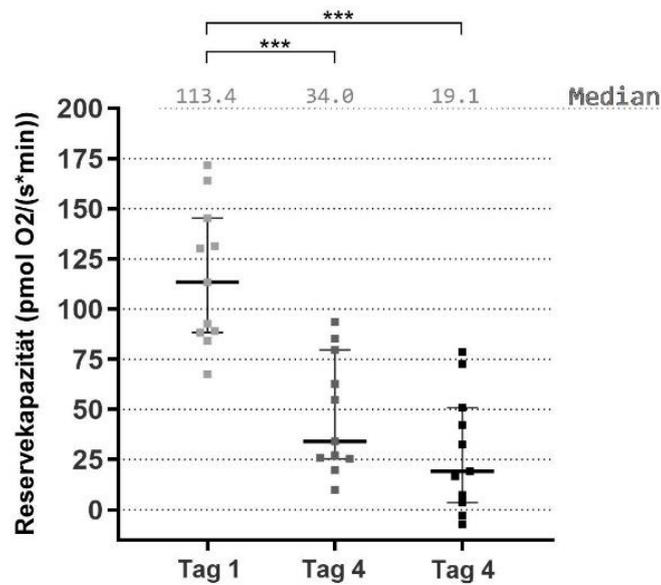


Abbildung 3.11a: Darstellung der RK von KG und TG-uA über den viertägigen Beobachtungszeitraum



**Abbildung 3.11b:** Vergleich der RK von KG und TG-uA an Tag-1 mit Tag-4, Absolutwerte mit Medianen sowie 1. und 3. Quartilen, signifikante Unterschiede vermerkt

### Entwicklung der basalen Kopplungseffizienz (Basal – KE)

Die Basal-KE errechnet sich durch Division von  $B^*$  durch die initial ermittelten Basalrate (B) und dient der Beurteilung, wie effizient die mitochondriale Respiration unter basalen Bedingungen an die ATP-Produktion gekoppelt ist [ $\text{Basal-KE} = B^*/B$ ]. Eine maximal effiziente ATP-Kopplung entspricht dem Wert 1,0. Führt die mitochondriale Respiration zu keiner ATP-Produktion, ist also völlig entkoppelt, liegt eine KE von 0 vor. Die Abbildung 3.12a (s. S. 82) veranschaulicht die Abnahme der Basal-KE im Verlauf der vier Messtage in beiden Gruppen. Ausgehend von einer ursprünglichen Basal-KE bei 0,85 hält sich diese bis zum Messtag-2 in der KG (0,85) und TG (0,83) nahezu konstant, um dann im Verlauf der anschließenden Lagerungstage kontinuierlich zu sinken. Bereits an Tag-3 präsentieren die KG mit 0,79 und die TG-uA mit 0,75 höchst signifikant reduzierte Werte gegenüber dem Ausgangstag ( $p \leq 0,001$ ). In beiden Gruppen zeigt sich an Tag-4 eine weitere Abnahme der Basal-KE auf 0,73 (KG) und 0,70 (TG-uA). In der TG-uA erweist sich diese erneut signifikant gegenüber dem Vortag ( $p \leq 0,05$ ). In Abb. 3.12b (s. S. 82) ist die Basal-KE beider Gruppen an Tag-4 gegenüber dem Ausgangswert an Tag-1 graphisch dargestellt. Sie zeigt sich in beiden Gruppen an Tag-4 höchst signifikant gegenüber Tag-1 reduziert ( $p \leq 0,001$ ). Der Verlauf der Basal-KE gestaltet sich in beiden Gruppen nahezu identisch und es zeigt sich an keinem Messtag ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen.

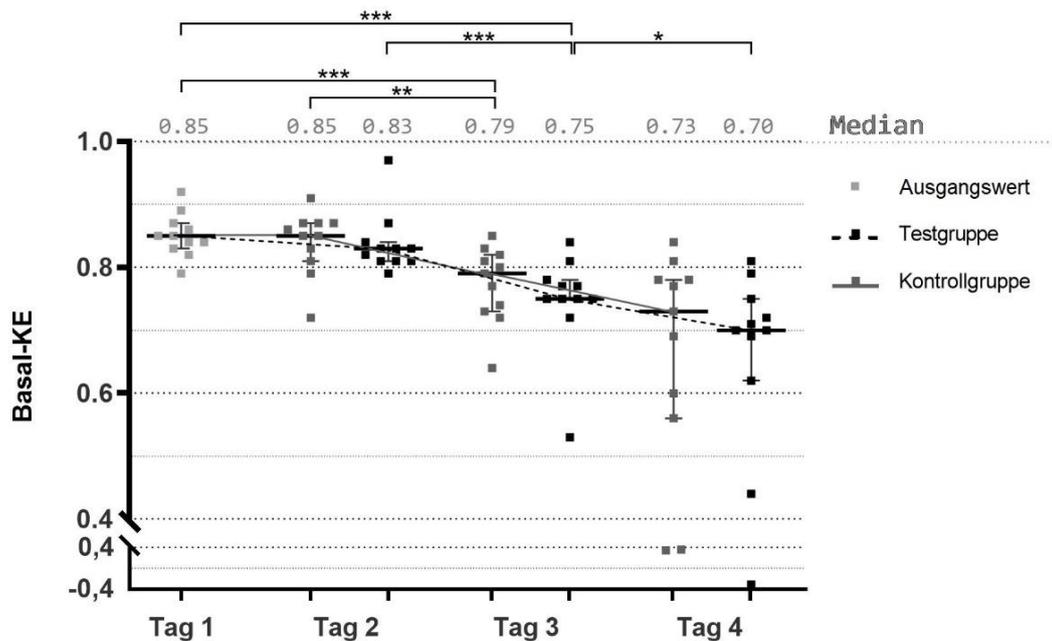


Abbildung 3.12a: Darstellung der Basal-KE von KG und TG-uA im Verlauf der Messtage 1-4

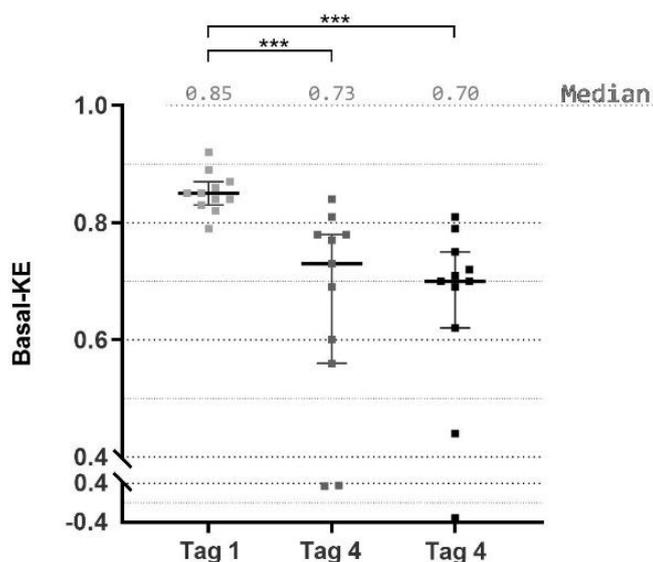
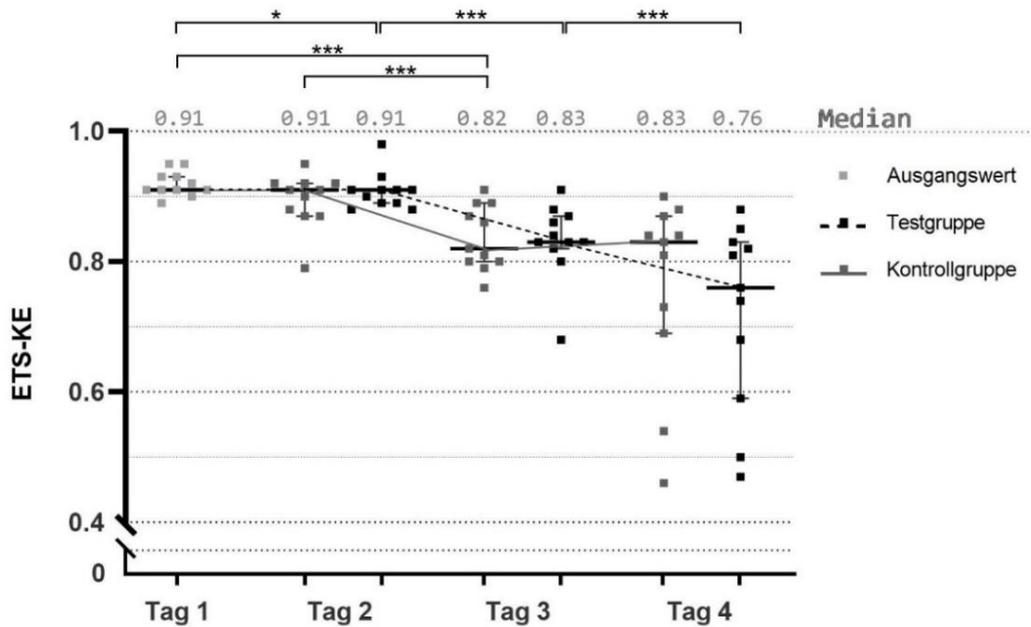


Abbildung 3.12b: vergleichende Darstellung der Basal-KE von KG und TG-uA an Tag-1 mit Tag-4, Absolutwerte mit Medianen sowie 1. und 3. Quartilen, signifikante Unterschiede vermerkt

### Entwicklung der ETS – Kopplungseffizienz (ETS – KE)

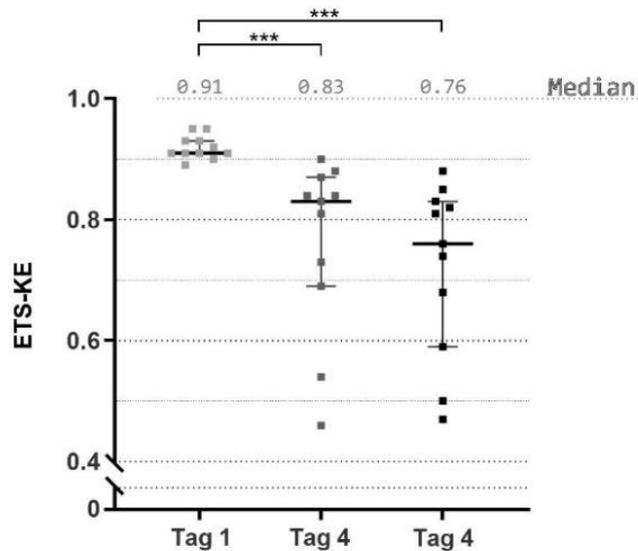
Die ETS – KE wird durch Division von  $M^*$  durch die initialen Maximalrate (M) ermittelt und dient, wie die Basal-KE, zur Abschätzung der Atmungsketteneffizienz. Sie repräsentiert den Anteil des mitochondrialen  $O_2$ -Verbrauchs, der nach maximaler Stimulation der Atmungskette für die ATP-Produktion zur Verfügung steht. Ein Wert nahe an 1,0 spricht für eine enge Kopplung der mitochondrialen Respiration an die ATP – Produktion. Ein

niedriger Wert spricht für eine wenig effiziente ATP – Kopplung, bei der ein Großteil des O<sub>2</sub>-Verbrauchs dem Ausgleich des „proton leak“ über die IMM dient.



**Abbildung 3.13a:** Darstellung der ETS-KE von KG und TG-uA im Verlauf der Messtage 1-4

Wie in Abbildung 3.13a ersichtlich, vermindert sich die ETS-KE über die vier Lagerungstage in beiden Gruppen signifikant. Bis zum Messtag-2 hält sich die ETS-KE in beiden Gruppen zunächst konstant bei 0,91, um anschließend am Messtag-3 mit Werten von 0,82 (KG) und 0,83 (TG) höchst signifikant gegenüber dem Vortag zu fallen ( $p \leq 0,001$ ). In der TG verzeichnet sich nachfolgend an Tag-4 ein weiterer höchst signifikanter Abfall der ETS – KE auf 0,76 im Vergleich zum Vortag ( $p \leq 0,001$ ). In der KG liegt die ETS-KE an Tag-4 bei 0,83 und fällt damit nicht weiter ab ( $p= 0,136$ ). Zwischen den ETS-KE beider Gruppen finden sich an keinem Messtag signifikante Unterschiede.



**Abbildung 3.13b:** vergleichende Darstellung der ETS – KE von KG und TG-uA an Tag-1 mit Tag-4, Absolutwerte mit Medianen sowie 1. und 3. Quartilen, signifikante Unterschiede vermerkt

### Zusammenfassung – RK und KE: KG versus TG-uA über 4 Tage

<b>Signifikante Unterschiede</b>	Im Verlauf der Messtage 1-4 zeigen RK und KE signifikante Unterschiede <i>innerhalb einer Gruppe (KG bzw. TG-uA)</i> : nahezu jeder Messtag zeigt signifikant reduzierte Werte im Vergleich zum Vortag
	Es zeigen sich signifikante Unterschiede <i>zwischen KG und TG-uA</i> : an Messtag-2 und Messtag-3 weist die TG-uA signifikant höhere RK als die KG auf.
<b>Beschreibung der Unterschiede</b>	Beide Gruppen zeigen fast ausschließlich kontinuierliche und signifikante Abnahmen der RK und KE im Verlauf der Lagerungszeit.
	Die Abnahme der RK verzeichnet sich in der KG im Verlauf von Tag-1 bis Tag-3 intensiver als in der TG, was zu signifikant höheren Werten in der TG gegenüber der KG führt (Tag-2: $p \leq 0,001$ ; Tag-3 $p \leq 0,05$ ).
	Am Tag-4 haben sich die RK in beiden Gruppen so weit angeglichen, dass kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen nachzuweisen ist.
	Basal- und ETS-KE zeigen in beiden Gruppen nahezu identische Verläufe, sodass zu keinem Messtag signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen entstehen.
<b>Fazit</b>	Bei beiden Lagerungsmethoden zeigen sich Verluste der RK und KE im Verlauf der Lagerungszeit. Es gibt keine signifikanten Unterschiede in der RK und KE zwischen den Lagerungsmethoden nach vier Tagen.
	Die Lagerung der TK ohne Agitation (TG-uA) führt zunächst bis zum Tag-3 zu höheren RK im Vergleich zur KG. Nach 4 Lagerungstagen zeigt sich kein Unterschied mehr zwischen den Gruppen.

**Tabelle 3.4:** Die bedeutenden Unterschiede von RK und KE über Messtage 1-4 in der KG und TG-uA

### 3.4 Streubreiten der Einzelmessungen

Allen aufgezeigten Graphiken können die Einzelmesswerte entnommen werden. Der Interquartilabstand ist durch eine Verbindungslinie zwischen dem 1. und 3. Quartil gekennzeichnet. Den Tabellen 7.1 – 7.15 im Ergebnisanhang (s. S. 119 - 128) kann weiterhin die exakte Spannweite zwischen den Minimal- und Maximalwerten (Range) aller Messungen entnommen werden. Die Ergebnisse des Multiplate<sup>®</sup> und des Oxygraph-2k in der KG sowie der TG zeigen alle eine große Streubreite zwischen den einzelnen Messwerten.

Der geringste Interquartilabstand der Multiplate<sup>®</sup>-Ergebnisse beträgt 45 AUC, der größte 600 AUC. Die kleinste Spannweite liegt bei 170 AUC, die größte bei 1158 AUC. Die kleinsten Streubreiten findet sich hierbei vor allem im ASPItest, die größten Streubreiten im COLtest.

Bei den "freien" Respirationsraten beträgt der geringste Interquartilabstand 16,6 [ $\mu\text{mol O}_2/(\text{s} \cdot \text{ml})$ ] und der größte 118,5. Die kleinste Spannweite liegt bei 58,8 und die größte bei 186,2. Die Streubreiten der errechneten Kopplungseffizienzen vergrößern sich im Verlauf der Lagerung kontinuierlich.

## 4 Diskussion

Die Transfusion von TK erfolgt zur Therapie oder Prävention von Hämorrhagien bei kritisch kranken Patienten. Für die schnelle und effektive Therapie traumatischer Blutungen, oder zur Blutungsprophylaxe bei hämorrhagischen Diathesen ist eine gesicherte Funktionalität und Qualität der TK von zentraler Bedeutung. Ebenso sind beide Merkmale für die Patientensicherheit unabdingbar.

Im täglichen Routinebetrieb von Kliniken kommt es zu temporären Abweichungen von den durch die Bundesärztekammer<sup>52,60</sup> empfohlenen Lagerungsbedingungen der TK unter RT (20-24 °C) und ständiger Agitation. Diese sind bspw. durch organisatorische oder logistische Hürden, Transportphasen sowie Unwissenheit des Personals bedingt. Folglich können Temperaturschwankungen, längeres Liegen oder transportbedingte Beschleunigungen und Erschütterungen der TK die ThZ-Funktion beeinflussen.

Ziel dieser Arbeit war, Abweichungen von den empfohlenen TK-Lagerungsbedingungen sowie den TK-Transport via Rohrpostsystem hinsichtlich ihrer Einflüsse auf thrombozytäre Funktionsparameter zu ermitteln. Zu den angewandten Lagerungsmethoden zählten die richtlinienkonforme Lagerung<sup>60</sup> unter ständiger Agitation (KG), eine Lagerung ohne jegliche Agitation (TG-uA) und eine einstündige Lagerung bei 4°C (TG-K). Es wurde die thrombozytäre Aggregationsfähigkeit mittels Impedanzaggregometrie am Multiplate<sup>®</sup> Analyzer ermittelt sowie die mitochondriale Funktion durch Analyse der Respirationsleistung mittels hochauflösender Respirometrie am Oxygraph-2k.

Von Interesse war zudem, ob der an Vollblutproben erprobte und dafür zugelassene Multiplate<sup>®</sup> Analyzer zuverlässige und reproduzierbare Ergebnisse an TK liefert und zur in vitro Qualitätskontrolle von TK vor deren Transfusion herangezogen werden kann.

Unsere Ergebnisse zeigen kein signifikant vermindertes Aggregationsausmaß nach viertägiger Lagerung unter kontinuierlicher Agitation bei RT. Die mitochondriale Funktion der ThZ erweist sich am vierten Tag, sowohl in den kontinuierlich agitierten TK als auch in den nicht agitierten TK, signifikant reduziert. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass die TK eine temporäre Unterbrechung der kontinuierlichen Agitation ohne signifikante Abnahme der ermittelten in vitro Funktionsparameter tolerieren. Bezüglich einer signifikanten Qualitätsminderung durch Rohrpostversand oder einer vorübergehenden Kühlung bei 4°C fanden sich keine Hinweise.

Der Multiplate<sup>®</sup> Analyzer kann in Kombination mit den eingesetzten Medien und Mischungsverhältnissen zu einer reproduzierbaren Testung der thrombozytären

Stimulations- und Aggregationsfähigkeit von TK herangezogen werden. Eine Auswirkung der in vitro TK-Qualität auf die tatsächliche in vivo Funktionalität der ThZ kritisch kranker Patienten wurde im Rahmen dieser Studienarbeit nicht untersucht.

In einigen Studien<sup>67,76,78</sup> wurde die ThZ-Aggregations- und Stimulationsfähigkeit von TK mittels Multiplate® bereits näher untersucht. Auch existieren Forschungsdaten<sup>48,69</sup> über die thrombozytäre mitochondriale Funktion und deren Veränderung im Verlauf der Lagerung von TK. Die kombinierte Erhebung beider Funktionsparameter in einer Studie war bislang noch nicht erfolgt und gilt als Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit.

Im Folgenden werden die Resultate der einzelnen Versuchsreihen bewertet.

#### **4.1 Einsatz des Multiplate® Analyzers zur TK-Funktionstestung**

In vorausgegangenen Arbeiten<sup>67,68,75,79</sup> wurde der Multiplate® bereits zur ThZ-Funktionsdiagnostik an TK getestet und als geeignet empfunden. Als Inkubationsmedium während des Messvorgangs wurde hauptsächlich PBS („phosphate buffered saline“) eingesetzt. Berghammer<sup>67</sup> verglich in ihrer Arbeit acht Inkubationsmedien mit PBS. Unter den untersuchten Medien befand sich neben den industriell hergestellten Pufferlösungen auch humanes AB-Plasma. Berghammers Überlegung hierzu war, ein möglichst physiologisches Inkubationsmedium für die ThZ zu nutzen. Ihre Ergebnisse lieferten jedoch eine unzureichende ThZ-Stimulation unter Verwendung aller acht Medien gegenüber PBS. Sie beschrieb eine gute Anwendbarkeit des Multiplate® zur Messung an TK unter der Verwendung des Inkubationsmediums PBS.

In Anlehnung an die erwähnten Studien war die Suche nach einem noch geeigneteren Suspensionsmedium für die ThZ der TK während der Multiplate®-Messungen von Interesse. Bis dato lagen noch keine Untersuchungen an FCS („fetal calf serum“) vor, weshalb wir uns der Untersuchung dessen widmeten. FCS ist ein zentraler Bestandteil von Nährmedien in Zellkulturen und gilt als „Goldstandard“ in der Gewebezüchtung und -konservierung.<sup>78</sup> Es enthält eine Vielzahl von Proteinen, Aminosäuren, Hormonen, Wachstumsfaktoren und Mineralstoffen, wie bspw. Calcium.<sup>78</sup> Die exakte Zusammensetzung aller Inhaltsstoffe ist bis heute nicht bekannt und kann Schwankungen unterliegen. Unser Gedanke war, die TK mit FCS zu verdünnen und damit ein physiologisches, dem Vollblut ähnelndes, Milieu zu generieren. Das Mischungsverhältnis sollte so gewählt werden, dass die resultierende ThZ-Konzentration im Bereich der humanen Referenzwerte von Vollblut liegt. Durch die Verdünnung von je 75 µl TK mit 525 µl FCS

(Verhältnis 1:7) im ADP-, ASPI- und TRAPtest und 150 µl TK mit 450 µl FCS (Verhältnis 1:3) im COLtest entstanden ThZ-Konzentrationen zwischen 90-450 x 10<sup>3</sup> ThZ/µl, welche den physiologischen Referenzwerten ähneln. Zusätzlich orientierten wir uns damit an bereits erprobten Mischungsverhältnissen aus Vorarbeiten.<sup>67,68,75</sup>

Berghammer<sup>67</sup> beschrieb in ihrer Arbeit verlässliche Ergebnisse nach Stimulation der ThZ mit 40 µg Kollagen. Diese Konzentration schien von besonders hoher Sensitivität für die Detektion lagerungsbedingter ThZ-Schäden. Auch andere Forscher<sup>68,79</sup> bestätigten die Eignung des Reagenz Kollagen zur ThZ-Funktionsanalyse von TK mittels Multiplate<sup>®</sup>. Eine weitere Studie<sup>76</sup> bewies die impedanzaggregometrische Beurteilbarkeit der ThZ-Funktion von TK durch Stimulation mit dem Reagenz TRAP.

Uns beschäftigte weiterhin die Frage, ob verwertbare Resultate auch durch Stimulation mit anderen, im Klinikalltag gängigen, Reagenzien wie ADP (ADPtest) und Arachidonsäure (ASPItest) zu erzielen sind. Im Vorfeld dieser Arbeit wurden Versuchsreihen mit diversen Mischungsverhältnissen und Reagenzienkonzentrationen gestartet. Konstante Kurvenverläufe zeigten sich in den ADP-, TRAP- und ASPItests vor allem unter Verwendung von je 20 µl Reagenz bei einem Verdünnungsverhältnis von 1:7 (TK : FCS). Im COLtest erzielte der Einsatz von 40 µl Reagenz bei einem Verhältnis von 1:3 (TK : FCS) konstante Kurven. Die genannten Verdünnungsverhältnisse und Reagenzienmengen wurden demnach für die folgenden Multiplate<sup>®</sup>-Messversuche übernommen.

Auch in dieser Arbeit zeigten sich verlässliche Ergebnisse im COLtest. Wir bestätigten somit die Eignung des Multiplate<sup>®</sup> Analyzers zur Ermittlung der in vitro Aggregationsfunktion von ThZ in gelagerten POOL-TK unter der Verwendung von FCS als Inkubationsmedium und Kollagen als Reagenz. Weiterhin erbrachten auch die übrigen Tests (ADPtest, ASPItest, TRAPtest) gute Ergebnisse. Auffällig waren die deutlich niedrigeren numerischen AUC-Werte in allen drei Tests gegenüber dem COLtest. Es liegt nahe, dass dieser Effekt durch die Verwendung einer geringeren ThZ-Konzentration sowie den Zusatz geringerer Reagenzienmengen bedingt ist. Der Zusammenhang zwischen dem Einsatz höherer Reagenzienkonzentrationen und dem Anstieg der numerischen AUC-Werte wurde bereits von Berghammer,<sup>67</sup> Wittmann et al.<sup>68</sup> und Jámbor et al.<sup>75</sup> beschrieben. Insgesamt schlussfolgern wir aus diesen Ergebnissen, dass alle vier Multiplate<sup>®</sup>-Tests zur Bestimmung der ThZ-Aggregationsfunktion in TK herangezogen werden können. Der Multiplate<sup>®</sup> Analyzer kann somit als „Point-of-Care“-Verfahren zur Ermittlung der TK-Qualität eingesetzt werden.

## **4.2 ThZ-Aggregationsfunktion während TK-Transport und - Lagerung**

In den nächsten Abschnitten werden die Multiplate®-Ergebnisse der vier Versuchsreihen - Rohrposttransport, Kühlung, kontinuierliche und unterlassene Agitation - diskutiert.

### **4.2.1 Auswirkung des TK-Transports mittels Rohrpostsystemen**

Pneumatische Rohrpostanlagen sind in großen Kliniken mittlerweile weit verbreitet. Sie dienen u.a. dem Versand von Medikamenten, Dokumenten, Blutproben und Blutprodukten. Durch Verkürzung langer Transportwege und -zeiten sind sie von großem, logistischen Vorteil und tragen insbesondere in der operativen Akut- und Intensivmedizin zur Reduktion der Behandlungszeit bei. Mehrere Studien untersuchten bereits die Auswirkungen des Rohrpostversands auf Medikamente und Blutproben. Cakirca und Erdal<sup>80</sup> sowie Phelan et al.<sup>81</sup> beobachteten beispielsweise keine signifikant vermehrten Hämolyseparameter in transportierten Serumblutproben. Im Differentialblutbild fanden sich nach Rohrpostversand veränderte Erythrozytenindices und erhöhte ThZ-Zahlen.<sup>82</sup> Eine mögliche Fragmentation der ThZ durch abrupt wechselnde Kräfte während des Transports wurde diskutiert. Beide Veränderungen wurden allerdings als klinisch nicht signifikant erachtet. Unbeeinflusst zeigten sich weiterhin die Gerinnungsparameter in Zitratröhrchen.<sup>82</sup> Der Rohrposttransport von Blutröhrchen wurde demnach bezüglich der Auswirkungen auf Differentialblutbild, Gerinnungsdiagnostik und klinischer Chemie als sicher erachtet.<sup>80,81</sup>

Nur wenige Studien untersuchten bislang den Effekt des Rohrpostversands auf die Qualität von Blutprodukten. Mittlerweile ist bekannt, dass bereits der Herstellungsprozess von Apherese-TK die ThZ-Funktion durch deren Aktivierung temporär beeinflusst.<sup>71,76</sup> Verantwortlich sind u.a. der enge Kontakt der ThZ miteinander und mit den Kunststoffoberflächen der Sammelsysteme sowie Zentrifugations- und Scherkräfte.<sup>71,76</sup> Die Beeinträchtigung der Plättchenaggregation zeigte sich abhängig von der angewandten Apherese-Technik. Sanftere Apherese-Techniken mit Zentrifugationszeiten von unter 15 min und größeren Transferbeuteln zeichneten sich durch eine deutlich geringer beeinträchtigte ThZ-Aggregation aus.<sup>76</sup> Jilma-Stohlawetz et al.<sup>76</sup> berichteten über eine verminderte Aggregationsfunktion auch noch einen Tag nach den Separationsprozessen. Sie begründeten diese durch eine verstärkte Grundaktivität der ThZ nach den Herstellungsprozessen, die eine weitere Plättchenstimulation limitieren.

Auch während des Versands mittels pneumatischen Rohrpostsystemen sind die Produkte Akzeleration und Dezeleration ausgesetzt. Nach Ankunft am Zielort werden sie häufig durch den Aufprall in die Annahmeboxen erschüttert. Wir stellten uns demzufolge die Frage, ob bereits die in den Rohrpostanlagen wirkenden Kräfte zu messbaren Veränderungen des thrombozytären Aktivierungs- und Aggregationsverhalten führen. Um den Einfluss produktionsbedingter Beeinträchtigungen der Plättchenfunktion möglichst auszuschließen, führten wir die Rohrpostversuche erst einen Tag nach der TK-Herstellung durch. Dies entsprach gleichzeitig dem Vorgehen von Jilma-Stohlawetz et al.<sup>76</sup> Nach zweimaligem Durchlaufen einer zirkulär geschalteten Rohrpoststrecke über insgesamt 12,5-14 min, mit einer Geschwindigkeit von 2-3 m/sec und einer Umgebungstemperatur von 20-25 °C, wurden die TK am Multiplate<sup>®</sup> untersucht. Keiner der Multiplate<sup>®</sup>-Tests zeigte signifikante Veränderungen nach Rohrpostversand (vgl. Abb. 3.6, S. 73). Es verzeichnete sich weder eine übermäßig gesteigerte noch drastisch reduzierte Plättchenaggregation. Das verwendete Swisslog TranspoNet System zeichnet sich durch besonders weiche Be- und Entschleunigungsphasen aus.<sup>83</sup> Wir schlussfolgern aus unseren Ergebnissen, dass sowohl die Dauer als auch die Intensität der wirkenden Kräfte während des Rohrpostversands von zu geringem Ausmaß sind, als dass sie zu einer relevanten ThZ-Aktivierung führen könnten. Demnach führt der Transport mittels Swisslog TranspoNet System zu keinem negativen Einfluss auf die in-vitro Aggregationsfunktion von POOL-TK. Somit kann dieses System als sichere und schnelle Transportmöglichkeit zum innerklinischen Versand von TK eingesetzt werden.

Im Einklang mit unseren Erkenntnissen stehen auch die Studienergebnisse von Sandgren et al.<sup>83</sup> Sie untersuchten die metabolische Aktivität von ThZ und das Sekretionsausmaß thrombozytärer Aktivierungsmarker nach TK-Transport durch das Swisslog TranspoNet System. Keiner der Parameter zeigte sich nach Transport signifikant beeinträchtigt. Da sich die verschiedenen Rohrpostsysteme in ihrem Design, den genutzten Transportverpackungen sowie der Transportgeschwindigkeit und -zeit unterscheiden, sind unsere Resultate allerdings nicht auf andere Systeme übertragbar.

#### **4.2.2 Auswirkung der temporären TK-Kühlung bei 4°C**

Im täglichen Klinikgeschehen ist es keine Seltenheit, dass TK zusammen mit anderen Blutprodukten versehentlich in Kühlschränken bis zu ihrer Transfusion zwischengelagert werden. Meist ist die Fehllagerung nur von kurzer Dauer. Dennoch erfordert sie die Frage,

ob die Kälteeinwirkung zur Minderung der TK-Qualität führt und eine anschließende Transfusion die Patientensicherheit gefährdet. Verschiedene Studien<sup>63,84</sup> beschäftigten sich bislang mit der Auswirkung einer gekühlter Lagerung auf TK. Die Argumente für eine alternative Lagerung bei 4 °C sind dabei u.a. eine längere Haltbarkeit durch eine reduzierte bakterielle Kontaminationsgefahr mit höherer Transfusionssicherheit, die verminderte Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren, ein herabgesetzter Metabolismus sowie ein geringerer logistischer Aufwand.<sup>63,84</sup> Dem gegenüber stehen sogenannte kälteinduzierte Lagerungsschäden, wie irreversible Formveränderungen, die vermehrte Ausschüttung von thrombozytären Vesikelinhalten, eine Kälteaktivierung der ThZ sowie eine gesteigerte Sensitivität bezüglich ihrer Stimulation durch Aktivatoren.<sup>63</sup>

Von besonderem Interesse war für uns der Effekt der Kälteeinwirkung auf die Aggregationsfunktion der Plättchen. Im Vorfeld bestätigten wir bereits den möglichen Einsatz des Multiplate<sup>®</sup> zur Analyse der TK-Funktion. Unser Gedanke war es, mittels Multiplate<sup>®</sup> nachzuweisen, ob eine Fehllagerung der TK im Kühlschrank zu Einbußen der Aggregationsfunktion führt. Zukünftig könnte auf diese Weise anhand einer schnellen „bedside“ Qualitätskontrolle entschieden werden, ob ein versehentlich gekühltes TK transfundiert werden kann oder nicht.

Eine Studie von Reddoch et al.<sup>84</sup> an Apherese-TK verglich bereits die Auswirkung einer fünftägigen Lagerung der TK unter kontinuierlicher Agitation bei 22 °C und 4 °C auf die thrombozytäre Aggregationsantwort mittels Impedanzaggregometrie. Sie stimulierten die ThZ mit ADP, TRAP und Kollagen. Nach drei Tagen zeigten kühl gelagerte ThZ eine signifikant gesteigerte Aggregationsreaktion nach Stimulation mit ADP und Kollagen gegenüber den bei RT gelagerten TK. Die TRAP-induzierte Stimulation zeigte sich nach drei Tagen unabhängig der Lagerungstemperatur signifikant reduziert. Die Autoren<sup>84</sup> vermuteten eine kälteinduzierte Plättchenaktivierung als Ursache der verstärkten thrombozytären Aggregationsbereitschaft. Zusätzlich beobachteten sie eine schnellere Thrombusformation und eine erhöhte Thrombusfestigkeit und -stabilität.<sup>84</sup>

In unserer Arbeit lieferte die Mehrheit der Multiplate<sup>®</sup>-Tests keine signifikant veränderten Ergebnisse. Die ADP-, TRAP- und kollageninduzierte Plättchenaggregation zeigte sich nach einstündiger Lagerung bei 4°C nicht signifikant beeinflusst (vgl. Abb. 3.5, S. 72). Unsere Ergebnisse sind damit konträr zu denen von Reddoch et al.,<sup>84</sup> was durch die deutlich kürzere Kühlungsphase in unserer Studie begründet sein kann. Nur die Stimulation mit Arachidonsäure im ASPItest war nach Kühlung signifikant reduziert. Dies ist gerade

deshalb interessant, da Reddoch et al.<sup>84</sup> die ASPI-induzierte Aggregation nicht untersuchten. Eine kältebedingte Spontanaggregation der ThZ mit resultierender Einschränkung der weiteren Stimulierbarkeit könnte ursächlich für diese verminderte Aggregationsleistung sein. Betont werden muss jedoch, dass es sich bei der Arachidonsäure nur um einen gering potenten ThZ-Stimulator im Vergleich zu TRAP oder Kollagen handelt. Da die restlichen drei Wege der ThZ-Stimulation nicht signifikant beeinträchtigt waren, schließen wir aus der Gesamtheit der Multiplate<sup>®</sup>-Ergebnisse, dass sich eine einstündige Kühlung bei 4 °C nicht wesentlich auf das thrombozytäre Aggregationsverhalten auswirkt. Kurze Phasen der gekühlten Lagerung sollten unseren Ergebnissen zufolge kein Ausschlusskriterium für eine Transfusion von TK sein. Eine längere Lagerung von TK bei Werten unter 15 °C führte in vivo zu einer rascheren Elimination der ThZ aus dem Blutkreislauf und somit zu einer eingeschränkten Wirksamkeit.<sup>63</sup> Die Transfusionssicherheit und -effektivität von temporär gekühlten TK muss im Rahmen künftiger in vivo Studien unbedingt näher ergründet werden.

Im Rahmen unserer Studie führten wir keine respirometrischen Untersuchungen an den gekühlten oder mittels Rohrpostsystem transportierten TK durch. Eine Studie von Sjövall et al.<sup>48</sup> erforschte die Auswirkung einer 72-stündigen Kühlung bei 4 °C auf die mitochondrialen Respirationsraten von ThZ. Die Kontrollgruppe wurde bei RT gelagert. Beide Gruppen wurden kontinuierlich agitiert, allerdings erfolgte die Lagerung in EDTA-Vollblutproben. Unmittelbar vor der respirometrischen Messung wurden die ThZ über Zentrifugation aus den EDTA-Proben separiert. Unabhängig der Umgebungstemperatur verzeichnete sich eine signifikante Abnahme der Respirationsraten nach 72-stündiger Lagerung, während sie zunächst über die ersten 24h stabil blieben. Die gekühlte Lagerung im Vollblutmilieu schien die thrombozytäre Mitochondrienfunktion nicht stärker zu mindern als die Lagerung bei RT.<sup>48</sup>

Für den Klinikalltag sind allerdings vor allem die Effekte kurzzeitiger Kühlungsphasen von höherer Relevanz, da gelieferte Konzentrate üblicherweise binnen weniger Stunden verabreicht werden und nicht lange auf den Stationen oder im OP verweilen. Außerdem ist die Konservierung der ThZ im Milieu des EDTA-Vollbluts nicht mit der in TK zu vergleichen. Ob eine einstündige TK-Kühlung oder der Rohrpostversand die Respirationsraten der thrombozytären Mitochondrien reduzieren, gilt es in Anschlussstudien zu dieser Arbeit zu untersuchen.

### **4.2.3 Aggregationsfähigkeit im Verlauf der TK-Lagerung unter kontinuierlicher Agitation**

Neben der Gefahr einer bakteriellen Kontamination ist die Haltbarkeit der TK auch begrenzt durch das Auftreten sogenannter thrombozytärer Lagerungsschäden („platelet storage lesions“, PSLs). Darunter versteht man die Gesamtheit aller morphologischen, biochemischen und funktionellen Veränderungen, die vom Beginn der Blutspende über die TK-Produktion und Lagerung bis hin zur Transfusion entstehen.<sup>85</sup> Initiiert werden sie bereits durch den Kontakt mit Fremdoberflächen und durch hohe Zentrifugationskräfte während der Herstellung. Die initialen PSLs präsentieren sich in einer gesteigerten thrombozytären Fragmentation sowie in einer vorzeitigen Aktivierung.<sup>69,72,85,86</sup> Es wurde eine vermehrte Freisetzung thrombozytärer Aktivitätsmarker beobachtet.<sup>71,72</sup> Während der Lagerungszeit folgen morphologische Veränderungen, wie der Verlust der Scheibenform und die Freisetzung von Granula, zytosolischer Proteine und prokoagulatorischer Bestandteile.<sup>63</sup> Eine Modifikation von Oberflächenmolekülen, wie dem Thrombin-Rezeptor oder den Glykoproteinen, führt zu einer Abnahme der Aggregationsfunktion. Eine gesteigerte Glykolyse, durch fortschreitende Schäden der mitochondrialen Funktion, resultiert in einem vermehrten Laktatanfall und einem abfallenden pH-Wert.<sup>63,72,84</sup> Der stetige Verlust energieliefernder Prozesse führt zu einem ATP-Mangel und zu einer Einschränkung von Stressresistenz, Stimulations- und Aggregationsfähigkeit.<sup>69,72,84,85</sup> PSLs sind auch unter optimalen Lagerungsbedingungen nicht vermeidbar und führen insgesamt zu einer im Verlauf der Lagerungsperiode stetig abnehmenden Plättchenfunktion.<sup>63,84,86</sup>

Interessanterweise treten einige der morphologischen Veränderungen ebenso bei den physiologischen Aktivierungsprozessen der ThZ auf.<sup>63</sup> Demnach lässt sich annehmen, dass schädigende und aktivierende Vorgänge in den Plättchen über teilweise ähnliche Signalwege gesteuert werden. Eine Zunahme der PSLs im Verlauf der TK-Lagerung könnte mit einer zunehmenden thrombozytären Grundaktivität einhergehen. Ein kontinuierlicher Anstieg thrombozytärer Aktivitätsmarker im Verlauf der TK-Lagerung unter Agitation wurde bereits mehrfach beschrieben.<sup>70,71</sup> Eine weitere ThZ-Aktivierung im Multiplate<sup>®</sup> würde folglich geringer ausfallen und niedrigere Aggregationsergebnisse erzeugen. Eben diese Veränderungen diskutierten auch Sahler et al.<sup>86</sup> Sie sahen in der zunehmenden spontanen Plättchenaktivierung im Laufe der Lagerungszeit einen möglicherweise eingeschränkten Transfusionserfolg. Wittmann et al.<sup>68</sup> belegten bei

Apherese-TK deutlich verringerte Aggregationsreaktionen im COLtest am dritten und sechsten Lagerungstag unter Agitation. Ebenso beobachteten Jámbor et al.<sup>75</sup> signifikant reduzierte Aggregationsreaktionen im Multiplate<sup>®</sup> nach Stimulation von POOL-TK mit Kollagen am vierten Lagerungstag. Perales Villarroel et al.<sup>69</sup> ermittelten die Expression des thrombozytären Aktivitätsmarkers P-Selectin in agitiert gelagerten TK nach Stimulation über den Thrombin-Rezeptor. Auch sie detektierten einen signifikanten Rückgang der Plättchenaktivierung nach Stimulation am dritten Lagerungstag der TK.

Unsere Ergebnisse verzeichneten jedoch bei einer viertägigen Lagerung, gemäß der empfohlenen kontinuierlichen Agitation bei RT, keine signifikante Abnahme der Plättchenaktivierung und -aggregation. Vielmehr zeigten sich tendenziell steigende Multiplate<sup>®</sup>-Ergebnisse, verglichen mit den Ergebnissen am Produktionstag. Im ASPItest erwies sich dieser Anstieg am vierten Tag signifikant gegenüber dem Produktionstag (vgl. Abb. 3.2, S. 68). Diese Beobachtungen könnten möglicherweise dafürsprechen, dass es nach der TK-Produktion zunächst zu temporären Einbußen der Aggregationsfähigkeit kommt. Wie schon in Kapitel 4.2.1 erwähnt, belegten Jilma-Stohlawetz et al.<sup>76</sup> eine eingeschränkte thrombozytäre Aggregationsfunktion bis zu einem Tag nach Herstellung von Apherese-TK (vgl. S. 89-90). Auch eine temporär eingeschränkte ThZ-Funktion nach dem Einsatz von Herz-Lungen-Maschinen während herzchirurgischen Operationen ist schon seit mehreren Jahrzehnten bekannt.<sup>87</sup> Als Ursache wird eine Reduktion diverser Glykoproteine der ThZ-Oberfläche und eine daraus resultierende Abnahme der Plättchenaktivierbarkeit diskutiert. Eine Erholung der ThZ von den herstellungsbedingten Funktionseinschränkungen wäre im Laufe der Lagerung denkbar und könnte die zunehmende Stimulationsfähigkeit und Aggregationsleistung in den Multiplate<sup>®</sup>-Ergebnissen gegen Ende der Lagerungszeit erklären.

Wir schlussfolgern deshalb, dass die thrombozytäre Aggregationsreaktion von POOL-TK innerhalb ihrer viertägigen Haltbarkeit nicht bedeutend abnimmt, wenn sie gemäß den aktuellen Empfehlungen gelagert werden.

#### **4.2.4 Aggregationsfähigkeit im Verlauf der TK-Lagerung ohne Agitation**

Die Auswirkung einer unterlassenen Agitation während der Lagerung von TK auf die thrombozytärer Funktion wird schon seit Jahren vielfach untersucht. Mit dem Agitationsverzicht gehen eindeutige Verluste der in vitro Qualität von TK einher.<sup>65,70,74</sup>

Es zeigen sich diverse metabolische und morphologische Veränderungen, die mit steigender Unterbrechungsdauer an Intensität gewinnen.<sup>64,65,74</sup> Dazu zählen ein verstärkter Glucoseverbrauch,<sup>70,74</sup> eine eingeschränkte O<sub>2</sub>-Verwertung<sup>65</sup> mit höheren O<sub>2</sub>- und CO<sub>2</sub>- Partialdrücken<sup>70,73</sup> und eine erhöhte Laktatproduktion<sup>65,70,74</sup> mit resultierendem Abfall des pH-Werts.<sup>64,70,73,74,88</sup> Die Gesamtheit dieser Veränderungen spricht für die Umstellung des thrombozytären Metabolismus auf eine anaerobe Energiegewinnung.<sup>65,74</sup> Es verzeichnet sich ein Anstieg der Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) mit zunehmender Dauer der Agitationsunterbrechungen.<sup>70</sup> Als morphologische Änderungen wurde der Verlust der diskoiden Plättchenform beobachtet.<sup>65</sup> Auch wurde eine vermehrte Expression von Aktivitätsmarkern<sup>64,74</sup> sowie eine erhöhte Apoptoseneigung beschrieben.<sup>70</sup> Hunter et al.<sup>65</sup> beobachteten keine bedeutenden morphologischen und metabolischen Veränderungen, solange der pH-Wert im TK nicht unter 6,5 fiel. In der Literatur<sup>65,70,73,74</sup> finden sich bezüglich des Zeitpunktes, ab wann diese kritische Schwelle unterschritten wird, Angaben zwischen 16-24 h ohne Agitation. Innerhalb dieser Zeit verzeichneten sich keine bedeutsamen Einschränkungen der ThZ-Funktion. Längere Pausen führten zu irreversibel erniedrigten pH-Werten, erhöhter Plättchenaktivität und verschlechterter Zellmorphologie.<sup>74</sup> TK mit einem geringeren ThZ-Gehalt, von 0,75 bzw.  $1,25 \times 10^{11}$  ThZ pro Präparat, konnten den pH-Wert sogar bis zu zwei bzw. drei Tage stabil halten.<sup>65</sup> Die in dieser Arbeit untersuchten TK lagen, nach Aufteilung in vier gleiche Transferbeutel mit ThZ-Zahlen von  $0,5-1,2 \times 10^{11}$  pro Präparat, stets im Bereich dieses geringen ThZ-Gehalts. Hunter et al.<sup>65</sup> sahen weitere Einflüsse, wie z.B. den nahezu vollständigen Verbrauch der Glucosevorräte in den TK, als zusätzliche Ursachen für induzierte Plättchenschäden. In einer der Studien von Van der Meer et al.<sup>74</sup> hatte die erneute Agitation nach vorausgegangener, temporärer Unterbrechung einen rehabilitierenden Effekt auf den thrombozytären Metabolismus. Durch einen Rückgang des anaeroben Metabolismus mit Wiederanstieg der O<sub>2</sub>-Verwertung verzeichneten sich eine Abnahme des Glucoseverbrauchs sowie der Laktatproduktion und fallende CO<sub>2</sub>- und O<sub>2</sub>-Partialdrücke.<sup>74</sup> Dies spricht dafür, dass kürzere Agitationspausen zunächst potenziell reversible Veränderungen mit sich bringen. Mit zunehmender Dauer der Agitationspause verzeichneten sich ein vermehrter Verlust der Scheibenform sowie eine gesteigerte basale Plättchenaktivität.<sup>70,74</sup>

Die beschriebenen Qualitätseinbußen durch Agitationspausen sind v.a. im Zusammenhang längerer Transportphasen interessant. Weiterhin sind sie auch im

Klinikalltag von Bedeutung, wenn logistische Probleme verantwortlich für Unterbrechungsphasen vor Transfusionsbeginn sind. Trotz der vielen Untersuchungen gibt es noch keine klaren Aussagen über zeitliche Grenzwerte, ab deren Überschreitung mit Qualitätsverlusten der TK zu rechnen ist. Auch sind noch keine Studien über die Entwicklung der Aggregationsfähigkeit von ThZ in nicht agitierten TK im Verlauf der Lagerung publiziert. Wir setzten uns deshalb als weiteres Ziel, die ThZ-Aggregation im Verlauf der TK-Lagerungszeit ohne Agitation mittels Multiplate® zu ermitteln. Von besonderem Interesse war die Ergründung eines zeitlichen Limits, nach dessen Überschreitung mit kritischen Störungen der Plättchenaggregation zu rechnen ist.

Im Verlauf der TK-Lagerung ohne jegliche Agitation beobachteten wir an keinem Lagerungstag und in keinem der vier Multiplate®-Tests signifikante Veränderungen der thrombozytären Aggregationsfähigkeit, verglichen mit den frischen TK am Produktionstag (vgl. Abb. 3.1-3.4, S. 68-70). Auch die bereits bei den kontinuierlich agitierten TK diskutierte mögliche Erholung der TK von produktionsbedingten Einschränkungen der ThZ-Funktion ließ sich beobachten. Es verzeichnete sich ein tendenzieller Anstieg der Aggregationsneigung im Verlauf der ersten drei Lagerungstage in der Mehrheit der Multiplate®-Tests. Demzufolge gehen wir davon aus, dass die thrombozytäre Aggregationsfähigkeit durch eine Lagerung ohne Agitation nicht bedeutend eingeschränkt ist.

Der Vergleich zwischen nicht agitierten und regelrecht agitierten TK ergab nur in drei der vier Multiplate®-Tests (ASPI-, TRAP-, bzw. COLtest) und jeweils nur an einem der vier Messtage (Tag-3, Tag-4, bzw. Tag-2) signifikante Unterschiede:

Der TRAPtest erwies am letzten Lagerungstag signifikant niedrigere Aggregationsantworten in der Gruppe der nicht agitierten TK (TG-uA) verglichen mit den kontinuierlich agitierten TK (KG). ADP-, ASPI- und COLtest zeigten am vierten Lagerungstag jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Die Tatsache, dass TRAP, als einer der stärksten ThZ-Stimulatoren, am Ende der TK-Haltbarkeit eine signifikant höhere ThZ-Aggregation in den kontinuierlich agitierten TK erzeugte, spricht für den positiven Effekt der Agitation während längerfristiger TK-Lagerung. Eine ungleichmäßige O<sub>2</sub>-Verteilung innerhalb des Konzentrats durch die fehlende Agitation könnte bedeutend für diesen signifikanten Unterschied sein. Eine O<sub>2</sub>-Unterversorgung der ThZ durch eine längerfristige Lagerung ohne Agitation wäre als Ursache einer eingeschränkten ThZ-Funktion denkbar.

Weiterhin entwickelte die Gruppe der unterlassenen Agitation gegenüber den kontinuierlich agitierten TK am zweiten Messtag eine signifikant verstärkte Aggregationsreaktion im COLtest und am dritten Tag im ASPItest. Durch die Agitation geraten die ThZ häufiger in Kontakt sowohl miteinander als auch mit der Plastikoberfläche des semipermeablen Beutels. Dieser stetige Kontakt könnte zu einer gesteigerten Spontanaktivität der ThZ innerhalb der agitierten TK führen, welche wiederum ursächlich für eine verminderte Stimulationsantwort im Multiplate<sup>®</sup>-Test innerhalb der ersten Tage sein könnte. Es ist allerdings hervorzuheben, dass sich signifikante Unterschiede nie in mehreren Multiplate<sup>®</sup>-Testreihen eines Messtages gleichzeitig zeigten. Andererseits führt der gehäufte ThZ-Kontakt mit der Beutelinnenfläche zu einer nachgewiesenen verbesserten O<sub>2</sub>-Versorgung,<sup>64</sup> welche essenziell für den Erhalt der ThZ-Funktion ist und die ThZ-Funktion über eine längerfristige Lagerungszeit positiv beeinflusst.

Unseren Daten entnehmen wir, dass die Plättchenaggregation in POOL-TK durch Agitationspausen von 1-2 Tagen nicht signifikant beeinträchtigt wird. Längere Agitationspausen könnten jedoch zu Einbußen in der Stimulations- und Aggregationsfähigkeit der Thrombozyten führen.

#### **4.2.5 Einschränkungen der Multiplate<sup>®</sup>-Ergebnisinterpretation**

Im Folgenden werden Einschränkungen der Interpretation der Multiplate<sup>®</sup>-Ergebnisse und Verbesserungsmöglichkeiten diskutiert.

Die große Streubreite der Multiplate<sup>®</sup>-Einzelmessungen (vgl. Kapitel 3.4, S. 85) gibt Hinweise auf bestehende Messungenauigkeiten und Schwankungen innerhalb der Ergebnisse einer Testreihe. Ob solche Schwankungen durch die noch nicht endgültig ausgereiften Testbedingungen begründet sind oder tatsächlich einer variablen ThZ-Funktion zu Grunde liegen, kann allein aus den Ergebnissen dieser Arbeit nicht geschlossen werden. Durch die Verwendung eines tierischen Produktes wie FCS, dessen Zusammensetzung und Qualität interindividuellen Differenzen unterliegt, wurden Einbußen in der Standardisierbarkeit der Messmethoden in Kauf genommen. Da jedoch stets das FCS derselben Charge benutzt wurde, sind Messwertschwankungen aufgrund der biologischen Variabilität des FCS unwahrscheinlich.

In diesem Zusammenhang ist das Unterlassen von Referenzmessungen mit dem bereits mehrfach erprobten PBS-Medium als ein Kritikpunkt dieser Arbeit zu erwähnen. Der direkte Vergleich beider Messergebnisse könnte Informationen bezüglich der Relevanz

der biologischen Variabilität von FCS liefern. Zusätzlichen Informationsgewinn würden auch Vergleichsmessungen an Apherese-TK bringen. Es ist denkbar, dass die Vereinigung der Buffy-Coats von vier verschiedenen Spendern zu Interaktionen zwischen den ThZ oder restlichen Plasmabestandteilen führt. Derartige Einflüsse könnten sowohl zu einer gegenseitigen Aktivierung der ThZ als auch zu einem verfrühten Zelluntergang führen und zu Ergebnisschwankungen beitragen.

Weiterhin könnte eine Erhöhung der Fallzahl sowie der Anzahl an Messdurchläufen, durch mehrmalige Kontrollmessungen, Rückschlüsse auf mögliche Ursachen der Messwertabweichungen in der Thrombozytenfunktionsdiagnostik mittels Multiplate® liefern. Diesen Ursachen sollte in zukünftigen Studien nachgegangen werden.

Zu diskutieren ist zudem der Einfluss der gewählten Verhältnisse zwischen Reagenz- und ThZ-Konzentration. Einige Forschungsarbeiten<sup>67,68,75</sup> belegen, dass der Einsatz größerer Reagenzmengen zu höheren AUC-Werten und folglich zu einer verstärkten thrombozytären Stimulation und Aggregation führt. Die ThZ zeigten im Laufe der TK-Alterung eine deutlich frühere und stärker Einschränkung ihrer Reaktionsfähigkeit auf Stimulation, wenn diese mit geringeren Reagenzdosen erfolgten.<sup>68</sup> Höhere Dosen an Stimulanzien zeigten verspätet signifikant reduzierte Aggregationsantworten.<sup>75</sup> Auf diese Weise konnten Aggregationsantworten auch noch nach sechs Lagerungstagen ausgelöst werden.<sup>67,75</sup> Berghammer<sup>67</sup> folgerte daraus, dass der Einsatz geringerer Konzentrationen an Stimulanzien Verluste der Aggregationsfähigkeit im Verlauf der Lagerungsperiode mit höherer Sensitivität erfasst.

Für die Multiplate®-Messungen benutzten wir stärker verdünnte TK-Proben als in den meisten Vergleichsarbeiten. Die erreichte ThZ-Konzentration in den Messküvetten ist folglich geringer und die Verwendung ähnlich hoher Dosen an Stimulanzien hätte eine stärkere Aggregationsantwort zur Folge. Das in dieser Arbeit eingesetzte ThZ-Reagenz-Verhältnis könnte demnach möglicherweise nicht sensitiv genug für eine frühe Detektion signifikanter Veränderung der ThZ-Funktion gewesen sein. Auch dies ist eine mögliche Ursache der wenigen, signifikanten Unterschiede unserer Ergebnisse.

Durch den Einsatz unterschiedlich hoher Reagenzkonzentrationen, angelehnt an die Arbeiten von Wittmann et al.<sup>68</sup> und Jámbor et al.,<sup>75</sup> sollte dieser Zusammenhang in Zukunft näher untersucht werden.

### **4.3 Mitochondriale Respirationsraten während TK-Lagerung mit und ohne Agitation**

Die hochauflösende Respirometrie analysiert in Echtzeit den mitochondrialen O<sub>2</sub>-Verbrauch, der als wichtiger mitochondrialer Funktionsparameter gilt.<sup>39</sup> Sie ermöglicht sowohl die Untersuchung isolierter Mitochondrien als auch die Ermittlung der mitochondrialen Respirationsfunktion in intakten Zellen. Mitochondrien dürfen nicht als isolierte Zellbestandteile gesehen werden. Sie unterliegen einer hohen Dynamik, vereinen sich zu Netzwerken und kommunizieren mit anderen Zellbestandteilen.<sup>48</sup> Die respirometrischen Analysen an intakten Zellen, statt an isolierten und permeabilisierten Mitochondrien, zeigen einen klaren Vorteil bezüglich der Aussagekraft über das dynamische Zusammenspiel von Mitochondrien mit anderen Zellkompartimenten. Zur Wahrung der Zellintegrität entschieden wir uns für die Durchführung der Oxygraph-Messungen direkt am verdünnten TK.

Mitochondrien spielen eine zentrale Rolle in der Homöostase von ThZ. Ihre Unversehrtheit ist wichtig für den Erhalt der Plättchenfunktion.<sup>69,70</sup> Über den Weg der anaeroben Glykolyse können ThZ ohne Sauerstoff ATP produzieren. Diese Form der Energiegewinnung ist allerdings auf Dauer nicht ausreichend, um die hohe metabolische Aktivität der ThZ aufrecht zu erhalten.<sup>28</sup> Steht den ThZ ausreichend Sauerstoff zur Verfügung, können ihre Mitochondrien durch den Prozess der OXPHOS deutlich effizienter höhere Mengen an ATP produzieren.<sup>28,72</sup> Wird einer der Wege in seiner Aktivität eingeschränkt, kann die Steigerung des anderen Weges die ATP-Generierung zumindest temporär kompensieren.<sup>28,34</sup> In ruhenden Plättchen wird 85% der Energie mittels OXPHOS bereitgestellt.<sup>48</sup> Sie spielt demnach für den thrombozytären Metabolismus eine außerordentliche Rolle.<sup>28</sup> Anhand der mitochondrialen Atmungsraten kann die Leistung der OXPHOS visualisiert werden. Demnach sehen wir die mitochondrialen Respirationsraten als Surrogatparameter der TK-Qualität.

Die mitochondrialen Respirationsraten von ThZ scheinen über längere Lagerungsdauer zunehmend zu sinken, was zur Reduktion der intrazellulären ATP-Level führt.<sup>48,69,72</sup> Zwei Studien<sup>48,69</sup> untersuchten mittels hochauflösender Respirometrie die Entwicklung der mitochondrialen Atmungsraten von ThZ in plättchenreichem Plasma (PRP) während ihrer Lagerung. Perales Villarroel et al.<sup>69</sup> ermittelten die mitochondrialen Respirationsraten von ThZ in PRP über einen Zeitraum von sieben Tagen unter kontinuierlicher Agitation bei RT. Die ThZ-Konzentration der ca. 60-80 ml umfassenden PRP-Beutel lag mit 10<sup>3</sup>-10<sup>5</sup>

ThZ/ $\mu\text{l}$  deutlich unter der in unsere Arbeit verwendeten Konzentration der POOL-TK ( $90\text{-}450 \times 10^3$  ThZ/ $\mu\text{l}$ ). Alle ermittelten Respirationsraten verzeichneten eine signifikante Abnahme bereits innerhalb der ersten zwei Lagerungstage und blieben im weiteren Verlauf der insgesamt sieben Tage signifikant erniedrigt. Sjövall et al.<sup>48</sup> untersuchten die Respirationsraten von Plättchen, welche über insgesamt 72 h unter kontinuierlicher Agitation in EDTA-Vollblutröhrchen gelagert wurden. Die Messungen wurden ebenfalls an PRP durchgeführt, welches vor Messbeginn aus dem EDTA-Vollblut gewonnen wurde. Nach 72 h zeigten sich alle Respirationsraten, außer der LEAK-Rate, signifikant vermindert.<sup>48</sup>

Angelehnt an diese Studien untersuchten wir die Entwicklung der Respirationsraten im Verlauf der TK-Lagerung unter der empfohlenen Agitation bei RT, um die eben beschriebenen Veränderungen auch an POOL-TK zu bestätigen. Des Weiteren interessierte uns, ob und in welchem Ausmaß die Respirationsrate durch eine Lagerung von bis zu vier Tagen ohne Agitation beeinflusst wird.

Die Auswirkung der fehlenden TK-Agitation auf die metabolischen Parameter und ThZ-Morphologie wurde bereits in Kapitel 4.2.4 erläutert (s. S. 94-97). Die Funktion der Mitochondrien, als Hauptenergielieferanten der ThZ, ist dabei besonders relevant. Die beschriebene Abnahme der mitochondrialen Respirationsraten während der Lagerung lässt zunehmende Funktionseinbußen der OXPHOS annehmen.<sup>48,69</sup> Der thrombozytäre Metabolismus wäre zunehmend von der Energiebereitstellung durch anaerobe Glykolyse abhängig. Dieser Verlust der effektiven  $\text{O}_2$ -Verwertung wurde durch erhöhte  $\text{pO}_2$ -Level in nicht agitierten TK gegenüber agitierten TK von Hunter et al.<sup>65</sup> und Van der Meer et al.<sup>74</sup> bestätigt. Hervorgehoben werden muss, dass die  $\text{pO}_2$ -Werte jedoch nur während der Agitationspausen erhöht waren und sich nach erneuter Agitation rückläufig zeigten. Hunter et al.<sup>65</sup> schlossen daraus, dass die verminderte  $\text{O}_2$ -Verwertung durch die fehlende Agitation bedingt ist und diskutierten dafür folgende zwei potenzielle Gründe. Zum einen sahen sie durch die Agitation den  $\text{O}_2$ -Transport innerhalb des TK sowie die  $\text{O}_2$ -Diffusion durch die Mitochondrienmembran erleichtert. Zum anderen machten sie den durch die Agitationspause bedingten Kontakt der ThZ zueinander verantwortlich für einen Anreiz zum Wechsel zur anaeroben Glykolyse. Die Folgen einer anaeroben Energiebereitstellung, wie steigende Laktat-Konzentrationen und fallende Glukose- und pH-Werte, verschlechtern die metabolische Situation zunehmend mehr. Energiekonsumierende Prozesse, wie die ThZ-Aktivierung und -aggregation sowie ihre Degranulation, können nicht mehr in ausreichendem Maß aufrecht erhalten werden, was Lagerungsschäden

induziert.<sup>69</sup> In einer Studie von Skripchenko et al.<sup>70</sup> wurde die Entwicklung der thrombozytären Mitochondrienfunktion in nicht agitierten Apherese-TK anhand der Ermittlung von  $\Delta p_{mt}$  beobachtet. Die Autoren beschrieben eine signifikante Reduktion von  $\Delta p_{mt}$  in TK, die Agitationspausen von länger als 24 h ausgesetzt waren, gegenüber kontinuierlich agitierten TK.<sup>70</sup> Jedoch fehlt bislang eine exakte Analyse der OXPHOS mittels hochauflösender Respirometrie in nicht agitierten TK.

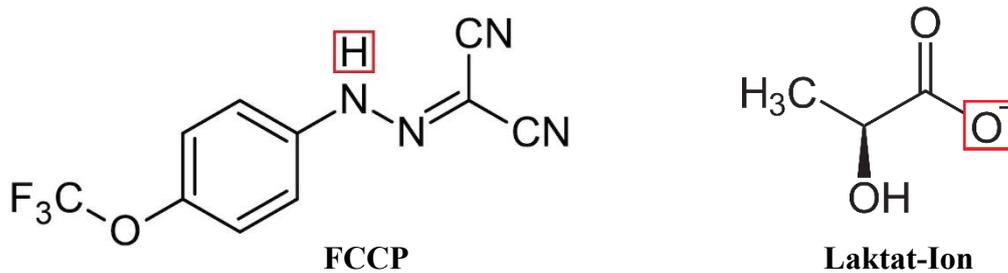
In den folgenden Abschnitten werden die Oxygraph-Ergebnisse der kontinuierlich agitierten und nicht agitierten TK diskutiert und gegenübergestellt. Zunächst wird die Entwicklung der LEAK-Rate, anschließend der Verlauf der „freien“ Basal- und Maximalraten sowie die Reservekapazitäten interpretiert. Zuletzt wird auf die Entwicklung der Kopplungseffizienzen eingegangen.

### **4.3.1 Entwicklung der LEAK-Rate während der TK-Lagerung**

Die LEAK-Rate (L) spiegelt den Anteil der mitochondrialen Respiration wider, der unabhängig der ATP-Produktion für die Aufrechterhaltung des  $\Delta p_{mt}$  über die IMM geleistet wird.<sup>39,48</sup> Da sie nicht an die ATP-Produktion gekoppelt ist, zählt sie zu den „ungekoppelten“ Atmungsraten.<sup>39</sup> Alle  $H^+$ -Rückströme vom IMR in die Matrix, die zur Reduktion von  $\Delta p_{mt}$  beitragen, ohne über die ATP-Synthase Energie zu generieren, werden als „proton leak“ oder „LEAK“ bezeichnet.<sup>39,49</sup> Durch das LEAK geht ein Bruchteil der im  $\Delta p_{mt}$  steckenden Energie als Wärme verloren.<sup>41</sup> Die Respirationsraten und  $\Delta p_{mt}$  sind eng miteinander verbunden. Je höher  $\Delta p_{mt}$  desto größer ist der  $H^+$ -Rückstrom in die Matrix und somit das LEAK.<sup>89</sup> Ist die mitochondriale Respiration im Ruhezustand der Zelle gering, fällt auch  $\Delta p_{mt}$  und somit das LEAK geringer aus. Steigt der zelluläre Energiebedarf und somit die mitochondriale Respiration, führt dies gleichzeitig zum Anstieg von  $\Delta p_{mt}$  und folglich zu einem vermehrten LEAK über die IMM.<sup>89</sup> Gleichzeitig wird versucht, das LEAK über einen mehr als proportionalen Anstieg der Respirationsraten zu kompensieren.<sup>51</sup> Je höher das LEAK desto höher ist die vom Mitochondrium geleistete kompensatorische LEAK-Respirationsrate (L). Solange dieser Kompensationsmechanismus von der Zelle gewährleistet werden kann, resultieren aus einer hohen LEAK-Rate gleichzeitig gesteigerte Basal- und Maximalraten.<sup>90</sup> Demnach leistet „L“ einen großen Beitrag zur Gesamtrespirationsrate, beeinflusst die Effizienz der Atmungskette und darüber wiederum die metabolische Kapazität der gesamten Zelle.<sup>51,90</sup> „L“ visualisiert, wie metabolische und funktionelle Veränderungen die mitochondriale

Leistung und Integrität beeinträchtigen.<sup>91</sup> Steigende LEAK-Raten sind somit Ausdruck einer zunehmenden “Verschwendung” der im  $\Delta p_{mt}$  gespeicherten Energie.

Folgende Parameter können zu einem Anstieg des mitochondrialen LEAK beitragen: Chemische „Entkoppler“, wie z.B. FCCP, binden  $H^+$  des IMR, diffundieren anschließend durch die IMM und schleußen somit  $H^+$  in die Matrix.<sup>2,41</sup> Bei einem verstärkten Anfall von Laktat in den TK, könnte auch das Laktat-Ion, durch Bindung von  $H^+$  des IMR, als Entkoppler wirken (vgl. Abb. 4.1)



**Abbildung 4.1:** Strukturformel von FCCP (**links**) und Laktat-Ion (**rechts**), die roten Umrandungen symbolisieren die Stellen für Protonierung bzw. Deprotonierung; modifiziert nach<sup>92</sup> (links) und<sup>93</sup> (rechts)

Der während der TK-Lagerung nachgewiesene Anstieg von Laktat in den TK<sup>72,84</sup> könnte auf diese Weise zu einer zunehmenden mitochondrialen Entkopplung und steigenden LEAK-Raten führen. Passend dazu wurde in temporär nicht agitierten TK ein Zusammenhang zwischen sinkenden Glucose-Konzentrationen, sinkenden pH-Werten und steigenden Laktat-Konzentrationen bei gleichzeitiger Reduktion von  $\Delta p_{mt}$  festgestellt.<sup>70</sup> Generell kann die Strömung jeglicher positiv geladener Teilchen in die MM, wie  $K^+$  oder  $Ca^{2+}$ , zur Erhöhung des LEAKs führen.<sup>41</sup> Ein Anstieg der  $K^+$ -Konzentration in den TK, durch vermehrten Zelluntergang während der Lagerung, oder steigende zytosolische  $Ca^{2+}$ -Konzentrationen, infolge ThZ-Aktivierung, könnten somit die LEAK-Rate ebenfalls erhöhen.<sup>34,41</sup>

Neben der Hauptenergiequelle der Zelle sind Mitochondrien auch Hauptproduktionsort von Reaktiven Sauerstoffspezies (ROS).<sup>89</sup> Während des Elektronentransfers werden Elektronen gelegentlich direkt auf  $O_2$  übertragen, wodurch ROS generiert werden.<sup>89</sup> Die genauen Mechanismen sind allerdings noch unklar. In hypoxischen Muskelzellen, Fibroblasten und Neuronen ist die ROS-Produktion durch die Induktion der NADPH-Oxidase gesteigert.<sup>70</sup> Auch in ThZ stellt die NADPH-Oxidase einen Hauptproduzenten von ROS dar. Es ist deshalb anzunehmen, dass ThZ in hypoxischen Bereichen der TK über eine Aktivierung der NADPH-Oxidase die mitochondriale ROS-Produktion

fördern.<sup>70</sup> Einerseits spielen ROS eine Rolle in zellulären Signalwegen. Andererseits scheint eine Überproduktion die mitochondriale Funktion und Integrität negativ zu beeinflussen und Zellschäden zu verursachen.<sup>89,91</sup> So können sie bspw. durch oxidative Modifikationen die Funktion von Proteinen, wie den Atmungskettenkomplexen, beeinträchtigen.<sup>91</sup> Dranka et al.<sup>91</sup> stimulierten die ROS-Produktion in Endothelzellen und bewiesen einen resultierenden signifikanten Anstieg der LEAK-Rate. Skripchenko et al.<sup>70</sup> wiesen eine erhöhte ROS-Produktion in nicht agitierten TK nach, die mit zunehmender Dauer der Agitationsunterbrechung anstieg. Eine denkbare Ursache hierfür wäre das vermehrte Vorkommen hypoxischer Bereiche in den nicht agitierten TK. Außerdem demonstrierten sie eine starke Korrelation zwischen steigenden ROS-Konzentrationen und dem zunehmenden Verlust von  $\Delta p_{mt}$ .<sup>70</sup> Aber auch in kontinuierlich agitierten TK war ein signifikanter Anstieg der ROS-Produktion zu sehen.<sup>94,95</sup> In der Studie von Perales Villarroel et al.<sup>69</sup> an PRP zeigte sich nach drei Lagerungstagen unter kontinuierlicher Agitation eine 18-Fache, und damit signifikant, gesteigerte ROS-Produktion.

Zur Reduktion von  $\Delta p_{mt}$  kann weiterhin die Öffnung sogenannter „permeability transition pores“ (PTP), Poren der IMM, beitragen. Diese öffnen sich u.a. durch stark erhöhte Konzentrationen von ROS oder  $Ca^{2+}$  und ermöglichen einen massiven  $H^+$ -Rückstrom.<sup>34,41</sup>

In unserer Arbeit stieg die LEAK-Rate beider Gruppen mit zunehmender Lagerungsdauer an (vgl. Abb. 3.8, S. 75). Standen die TK unter ständiger Agitation, erwies sich dieser Anstieg zu keiner Zeit als signifikant. Die LEAK-Rate der nicht agitierten TK hingegen zeigte sich am Lagerungstag-3 und -4 signifikant gegenüber Tag-1 gesteigert. Weiterhin zeigt sie sich an Tag-3 signifikant gegenüber den kontinuierlich agitierten TK gesteigert. Wir nehmen an, dass die Zunahme der LEAK-Rate im Laufe der TK-Lagerung höchstwahrscheinlich Ausdruck einer steigenden Permeabilität der IMM gegenüber Protonen ist. Der zunehmende Verlust der mitochondrialen Membranintegrität resultiert in einem vermehrten  $H^+$ -Rückstrom in die Matrix, der durch eine gesteigerte Atmungskettenaktivität kompensiert wird. Eine gesteigerte LEAK-Rate und wiederum erhöhte basale Respirationsrate sind die Folgen.<sup>91</sup> Letztlich geht dies jedoch zu Lasten der mitochondrialen Effizienz, da die zur Aufrechterhaltung von  $\Delta p_{mt}$  geleistete Arbeit nicht zur ATP-Produktion genutzt werden kann. Ein starker Anstieg der LEAK-Raten kann auf einen ernsten Mitochondrienschaden hinweisen.<sup>49</sup>

Aus den Ergebnissen der LEAK-Raten in unserer Arbeit schlussfolgern wir, dass bei beiden Lagerungsmethoden im Laufe der Lagerungszeit mit Membranveränderungen zu

rechnen ist, die das LEAK über die IMM verstärken. Die Zunahme des LEAKs verzeichnete sich jedoch nur in der Gruppe der nicht agitierten TK als signifikant. Betrachtet man diese Entwicklung im Kontext der nachgewiesenen, signifikant verstärkten ROS- und Laktatproduktion durch Agitationsunterbrechungen,<sup>70</sup> so lässt sich vermuten, dass die Membranveränderungen durch eine Lagerung ohne Agitation beschleunigt werden. Letztlich resultiert aus dem gesteigerten LEAK eine Abnahme der mitochondrialen Effizienz, die in Kapitel 4.3.3 genauer diskutiert wird (s. S. 107-110).

### **4.3.2 Basal-/Maximalraten und Reservekapazitäten während TK-Lagerung**

Die Beurteilung der Basal- und Maximalraten beider Gruppen sollte stets im Kontext der LEAK-Rate erfolgen, da hohe Respirationsraten nicht ohne Weiteres mit einer erhöhten ATP-Produktion gleichzusetzen sind.<sup>51</sup> Im Folgenden bewerten wir die Entwicklung der, von der LEAK-Rate durch Subtraktion bereinigten, „freien“ Basal- bzw. Maximalraten und damit nur die direkt an die ATP-Produktion gekoppelte Respiration.<sup>39</sup>

Die „freie“ Basalrate ( $B^* = B-L$ ) spiegelt die mitochondriale Grundaktivität zur Deckung des Energiebedarfs wider, der im Ruhezustand zum Erhalt der thrombozytären Homöostase nötig ist.<sup>39,48</sup> Sie ist demnach abhängig von der Zellaktivität.

In unseren Ergebnissen zeigte sich  $B^*$  im Verlauf der TK-Lagerung, signifikant rückläufig. Zwischen kontinuierlich agitierten und nicht agitierten TK bestand zu keiner Zeit ein signifikanter Unterschied (vgl. Abb. 3.9, s. S. 76-77). Allerdings erwies sich  $B^*$  der regelrecht gelagerten TK bereits an Tag-2 gering signifikant gegenüber Tag-1 reduziert und damit einen Tag früher, als  $B^*$  der nicht agitierten TK. Ein Grund hierfür könnte eine gesteigerte Spontanaktivität der ThZ in den nicht agitierten TK sein, die einen erhöhten ATP-Bedarf im Ruhzustand erfordert.

Die maximale Atmungsrate kann an isolierten und permeabilisierten Mitochondrien durch Zugabe von ADP und Aufsättigung mit Brennstoffen stimuliert werden.<sup>39</sup> Bei der Messung an intakten Zellen ist dies schwierig, da sich die Substanzen nicht ausreichend und gleichmäßig über die Plasmamembranen der Zellen verteilen.<sup>39</sup> Um eine sonst notwendige Permeabilisierung der Zellmembran zu vermeiden, kann man stattdessen die maximale Kapazität des ETS ermitteln, die der maximalen Respirationsrate (M) entspricht. Nach Abzug von „L“ wird sie auch als „freie“ ETS-Kapazität oder „freie“ Maximalrate ( $M^* = M-L$ ) bezeichnet.<sup>39</sup> Sie demonstriert die maximal gesteigerte

mitochondriale Atmung durch einen maximal gesteigerten Elektronentransfer entlang der Atmungskettenkomplexe. Die Atmungskette wird durch Zugabe von FCCP entkoppelt. Das bedeutet, dass  $\Delta p_{mt}$  bis auf ein Minimum abgebaut wird und nicht mehr zur ATP-Produktion eingesetzt werden kann. Da der Protonentransport folglich nicht mehr gegen den starken elektrochemischen Gradienten zwischen IMR und MM erfolgen muss, läuft er in einer maximal gesteigerten Form ab. Dies beschleunigt den Elektronentransfer von  $NADH+H^+$  zu  $O_2$  und steigert den  $O_2$ -Verbrauch maximal.<sup>2(p520)</sup>

Die Ergebnisse der  $M^*$  unserer Arbeit verzeichneten in beiden Gruppen eine signifikante und kontinuierliche Abnahme über die Lagerungszeit (vgl. Abb. 3.10, s. S. 78). Die Signifikanz trat bereits am zweiten Lagerungstag auf. Nicht agitierte TK erwiesen am Lagerungstag-2 und -3 signifikant höhere maximale Atmungsraten gegenüber regelrecht gelagerten TK.

Der Betrag, um den die mitochondriale Respiration im Ruhezustand maximal gesteigert werden kann, wird durch die mitochondriale Reservekapazität (RK) beschrieben. Die Steigerungsfähigkeit nimmt in beiden Gruppen mit zunehmender Lagerungsdauer signifikant ab, hält sich jedoch in den nicht agitierten TK am Lagerungstag-2 und -3 signifikant höher als in der Gruppe der kontinuierlich agitierten TK (vgl. Abb. 3.11, S. 80-81). Am letzten Lagerungstag zeigen sich sowohl  $B^*$  und  $M^*$ , als auch die RK in beiden Gruppen nahezu identisch.

Im Folgenden soll der Unterschied der freien Respirationsraten und Reservekapazitäten zwischen agitierten und ruhenden TK am Lagerungstag-2 und -3 näher beleuchtet werden. Eine eventuell erhöhte ThZ-Aktivität mit gesteigertem ATP-Bedarf, als Grund der erhöhten freien Basalrate in der Gruppe der ruhenden TK, wurde bereits erwähnt. Folgende Überlegung ist für uns als Ursache der signifikant erhöhten freien Maximalrate und Reservekapazität in den nicht agitierten TK plausibel:

Durch die fehlende gleichmäßige Suspension der ThZ innerhalb der nicht agitierten TK geraten die ThZ in engeren Kontakt miteinander, der zu einem Zusammenschluss mehrerer ThZ miteinander führen könnte. Die höhere Dichte der aggregierte ThZ würde deren Herabsinken in Richtung des Beutelbodens fördern und damit ThZ-Konzentrationen am Boden des TK-Beutels erhöhen. Wir versuchten die TK vor den Probeentnahmen durch manuelles Schwenken zu resuspendieren. Dennoch scheint es uns wahrscheinlich, dass die entnommenen Proben aus den nicht agitierten TK erhöhte ThZ-Konzentrationen enthalten. Ein höherer ThZ-Gehalt innerhalb der Oxygraph-Messezelle

würde dann auch mit höheren Respirationsraten verbunden sein. Dazu würden auch die teilweise signifikant erhöhten LEAK-Raten der nicht agitierten TK an Messtag-2 und -3 passen. Auf die Effizienz der mitochondrialen Respiration hat die ThZ-Konzentration allerdings keinen Einfluss, da zu deren Berechnung beide Raten ins Verhältnis gesetzt werden. Deshalb zeigten weder die Basal-KE noch die ETS-KE Unterschiede zwischen beiden Gruppen an Tag-2 und -3 (vgl. Abb. 3.12+3.13, S. 82-84). Am vierten Lagerungstag könnte sich eine vermehrte ThZ-Aggregation und -Ansammlung am Beutelboden auch in den kontinuierlich agitierten TK zeigen. Dies könnte ursächlich für den Angleich der Respirationsraten und KE am vierten Lagerungstag sein. Da in unseren Studien die genauen ThZ-Konzentrationen weder in den TK noch in den entnommenen Proben bekannt waren, kann dieser Zusammenhang nur spekuliert werden.

Letztlich weisen unsere Ergebnisse der freien Atmungsraten sowie der Reservekapazitäten auf deutliche Funktionsabnahmen der mitochondrialen Atmungskette im Verlauf der TK-Lagerung hin. Mitochondrien älterer TK demonstrierten wesentlich geringere Atmungsraten in Ruhe und konnten ihre Respirationsraten auch deutlich weniger maximal steigern als Mitochondrien frischer TK. Nicht agitierte TK zeigten allerdings keine verstärkten Einbußen der maximalen ETS-Kapazität gegenüber kontinuierlich agitierten TK. Daraus schließen wir, dass eine zunehmende Lagerungsdauer der TK mit einer mitochondrialen Leistungsminderung einhergeht und eine Lagerung ohne Agitation diese nicht zusätzlich verstärkt.

Einen signifikanten Rückgang der mitochondrialen Atmung von ThZ während ihrer Lagerung beschrieben bereits vorausgegangene Studien.<sup>48,69</sup> Perales Villarroel et al.<sup>69</sup> erforschte an kontinuierlich agitiertem PRP ähnliche Entwicklungen der Respirationsraten. Basal- und Maximalraten zeigten sich ab dem zweiten bis zum letzten Lagerungstag (Tag-7) signifikant reduziert gegenüber Tag-1. Die LEAK-Rate zeigte sich allerdings ebenfalls nach einem Lagerungstag signifikant und bleibend erniedrigt und entwickelte sich damit anders als in unseren Untersuchungen an POOL-TK. Diese Diskrepanz können wir nicht abschließend erklären. Eventuell könnte die deutlich erhöhte ThZ-Konzentration in POOL-TK gegenüber dem verwendeten PRP zu intensiveren metabolischen Veränderungen führen, die die Integrität der IMM und damit das LEAK stärker beeinflussen. Einhergehend mit dem drastischen Rückgang der mitochondrialen Respiration, bewiesen die Forscher weiterhin eine eingeschränkte Plättchenantwort auf Stimulation mit TRAP sowie eine vermehrte Apoptose und ROS-Produktion.<sup>69</sup> Weiterhin

berichteten sie über eine signifikante Korrelation zwischen der Entwicklung der mitochondrialen Respirationsraten und der Aktivierungsfähigkeit der ThZ und folgerten aus ihren Ergebnissen, dass die eingeschränkte thrombozytäre Stimulationsantwort durch die mitochondrialen Funktionsverluste verursacht sein könnte.<sup>69</sup>

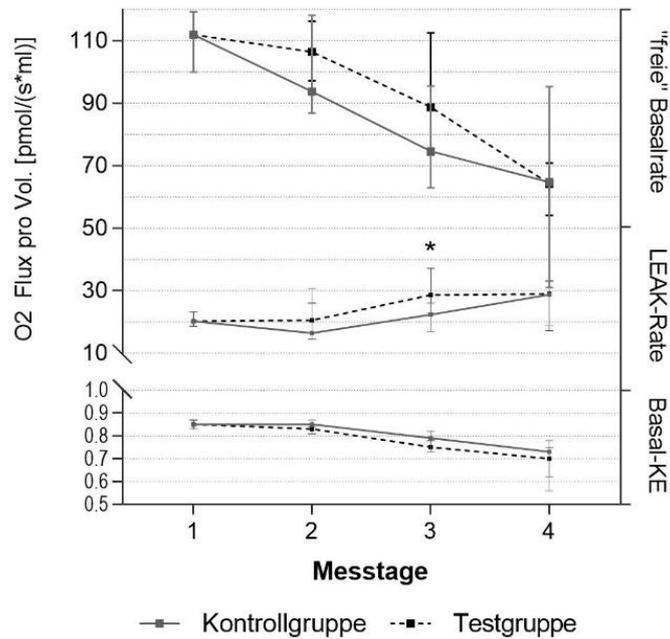
Sjövall et al.<sup>48</sup> bewiesen einen signifikanten Rückgang der Maximalrate in ThZ aus PRP, welche nach 72-stündiger Lagerung unter kontinuierlicher Agitation aus EDTA-Vollblutproben gewonnen wurde. Die LEAK-Rate blieb über 72 h nahezu stabil.

Diab et al.<sup>72</sup> untersuchten u.a. die Aktivität des Atmungskettenkomplexes IV sowie den thrombozytären ATP-Gehalt in Apherese-TK über einen Lagerungszeitraum von sieben Tagen unter kontinuierlicher Agitation. Sie beobachteten ab dem zweiten Lagerungstag eine signifikante Reduktion der Aktivität von Komplex IV sowie des thrombozytären ATP-Gehalts. Als mögliche Gründe des Funktionsverlusts diskutierten sie oxidativen Stress durch Nitrit, Kohlenmonoxid und ROS.

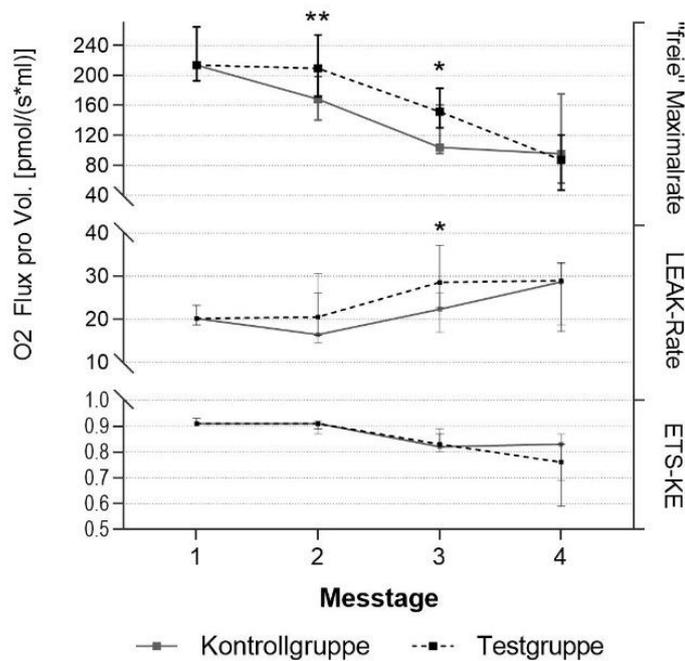
### **4.3.3 Kopplungseffizienz während der TK-Lagerung**

Neben den absoluten Respirationsraten muss die mitochondriale Funktion v.a. anhand ihrer Effizienz beurteilt werden. Darunter versteht man den Anteil der Respirationsraten, der allein an die ATP-Produktion gekoppelt ist. Diese sogenannte Kopplungseffizienz (KE) beschreibt, wie effizient der Elektronen- und Protonentransport der Atmungskette abläuft.<sup>39</sup> Da die LEAK-Rate, durch Reduktion von  $\Delta p_{mt}$ , die Effizienz der mitochondrialen Energiebereitstellung mindert, spielt sie eine große Rolle bei der Bestimmung der KE. Es kann eine basale und eine maximale Kopplungseffizienz (Basal-KE und ETS-KE) ermittelt werden.<sup>39</sup> Die Basal-KE wird durch das Verhältnis zwischen freier Basalrate ( $B^* = B-L$ ) und der totalen Basalrate (B) ausgedrückt ( $\text{Basal-KE} = B^*/B$ ). Die ETS-KE ( $M^*/M$ ) ist das Verhältnis aus freier Maximalrate ( $M^* = M-L$ ) und der totalen Maximalrate (M). Ein Wert von 1,0 beschreibt eine KE von 100%. Dies bedeutet, dass die komplette mitochondriale Respiration in Ruhe (Basal-KE) bzw. unter maximaler Stimulation der Atmungskette (ETS-KE) in die Produktion von ATP investiert werden kann, weil kein Protonen-Leck existiert.<sup>39,49</sup> Andersherum spricht eine KE von 0 für eine völlige Entkopplung der mitochondrialen Atmung, bei der jeglicher Protonentransport

nur zur Aufrechterhaltung des Membranpotentials und zum Ausgleich des mitochondrialen Protonenlecks dient.<sup>39</sup> In diesem Zustand wäre das Mitochondrium nicht mehr zur Energieversorgung der Zelle befähigt.



**Abbildung 4.2:** vergleichende Darstellung des Verlaufs von B\* (**oben**), LEAK-Rate (**mittig**) und Basal-KE (**unten**) über vier Lagerungstage in der KG und TG-uA , \* markiert signifikante Unterschiede zw. KG und TG ( $p < 0,05$ )



**Abbildung 4.3:** vergleichende Darstellung des Verlaufs von M\* (**oben**), LEAK-Rate (**mittig**) und ETS-KE (**unten**) über vier Lagerungstage in der KG und TG-uA , signifikante Unterschiede zw. KG und TG: \* ( $p < 0,05$ ); \*\* ( $p < 0,01$ )

Betrachtet man die Entwicklung der Basal- und ETS-KE der TK während der vier Lagerungstage, stellt man einen nahezu identischen Verlauf in den Gruppen der agitierten und nicht agitierten TK fest (vgl. Abb. 4.2 + 4.3, s. S. 108). Die initiale Basal-KE mit 85% sowie ETS-KE mit 91% am Herstellungstag hielt sich bis zum zweiten Lagerungstag zunächst konstant (Basal-KE: 85% (KG); 83% (TG) und ETS-KE: 91% (KG + TG)). Am dritten Lagerungstag beobachteten wir in beiden Gruppen eine hoch signifikante Reduktion der Basal-KE (KG: 79%; TG: 75%) sowie der ETS-KE (KG: 82%; TG: 83%), die sich bis zum Tag-4 zunehmend verstärkte.

Signifikante Unterschiede der KE zwischen kontinuierlich agitierten und nicht agitierten TK konnten zu keiner Zeit detektiert werden. Dies spricht für eine vergleichbar hohe thrombozytäre Mitochondrienfunktion der TK beider Gruppen an jedem Lagerungstag.

Die Entwicklung der KE macht deutlich, dass die maximalen und basalen Respirationsraten sowie die Reservekapazität allein nicht zur Interpretation der mitochondrialen Funktion ausreichen. KE und Respirationsraten müssen im Kontext miteinander betrachtet werden.<sup>49</sup> Sind beispielsweise erniedrigte Basal- oder ETS-Raten bei unveränderten LEAK-Raten ursächlich für eine Abnahme der KE, ist dies als Zeichen eines Funktionsverlusts der Oxidationsprozesse und des Elektronentransports in den Atmungskettenkomplexen zu verstehen. Bei konstanten Respirationsraten wäre ein Anstieg der LEAK-Rate ursächlich für den Verlust der KE und gäbe Hinweise auf Schäden der Membranintegrität und den Verlust des  $\Delta p_{mt}$ .<sup>49</sup> In den TK unserer Arbeit führten sowohl sinkende Respirationsraten als auch steigende LEAK-Raten im Verlauf der Lagerung zur Reduktion der KE.

Nach Berücksichtigung der KE dürfen die erhöhten freien Basal- und Maximalraten in der Gruppe der nicht agitierten TK an Tag-2 und -3 nicht per se als Zeugnis einer besseren Mitochondrienfunktion betrachtet werden. In den Abbildungen 4.2 und 4.3 (s. S. 108) sind die Verläufe von B\* und M\*, der LEAK-Raten sowie der daraus errechneten Basal- und ETS-KE dargestellt und signifikante Unterschiede zwischen der KG und TG mit „\*“ markiert. Nachdem die Respirationsraten mit den LEAK-Raten ins Verhältnis gesetzt wurden, demonstrierten beide Graphiken eine nahezu identische Entwicklung der KE in beiden Gruppen. Ab dem dritten Lagerungstag der TK zeigten sowohl die Basal-KE als auch die ETS-KE eine signifikante Abnahme, unabhängig der Lagerung unter kontinuierlicher oder unterlassener Agitation. Die vorher teilweise signifikanten Unterschiede der B\* und M\* an Tag-2 und -3 zwischen den Gruppen sind in den

Ergebnissen der Basal- und ETS-KE nicht mehr nachweisbar (vgl. Abb. 3.12 + 3.13, S. 82-84).

Die Gesamtheit unserer Ergebnisse der Respirationsraten und Kopplungseffizienzen impliziert, dass sich die mitochondriale Funktion der ThZ über die viertägige Lagerung der TK zunehmend verschlechtert. Wir kamen damit zur gleichen Schlussfolgerung wie auch Perales Villarroel et al.<sup>69</sup> und Sjövall et al.<sup>48</sup> in ihren Untersuchungen an PRP. Sie bewiesen signifikante Abnahmen der mitochondrialen Effizienz nach einer zweitägigen Lagerung unter kontinuierlicher Agitation. Die aerobe mitochondriale ATP-Produktion schien nach 48-stündiger Lagerung völlig unterbunden.<sup>69</sup> Diese Entwicklung zeigt sich unabhängig von der empfohlenen stetigen Agitation der TK. ThZ nicht agitierter TK erwiesen in dieser Arbeit zu keiner Zeit eine reduzierte mitochondriale Leistungsfähigkeit oder eine signifikant verringerte Effizienz des Atmungskettensystems gegenüber den ThZ agitierter TK. Wir nehmen deshalb an, dass sich durch die kontinuierliche Agitation von TK der Verlust der thrombozytären Atmungsketteneffizienz nicht hinauszögern lässt.

Ferner konnten wir im Laufe der Lagerungszeit in agitierten sowie nicht agitierten TK durch den kontinuierlichen Anstieg der LEAK-Rate ein zunehmendes Protonen-Leck über die mitochondriale Membran aufzeigen (vgl. Abb. 3.8, s. S. 75). Dieser Anstieg erwies sich nur in der Gruppe der nicht agitierten TK als signifikant. Auf die Entwicklung der KE in kontinuierlich agitierten sowie nicht agitierten TK hat dieser Unterschied zwischen den Gruppen allerdings keine Auswirkung. Diesen Fakten entnehmen wir, dass die metabolischen Veränderungen während der Lagerung von TK einen schädigenden Einfluss auf die Stabilität der thrombozytären Mitochondrienmembran ausüben, was die Effizienz der Atmungskette mit zunehmender Alterung der TK beeinträchtigt. Eine unterlassene Agitation über die gesamte viertägige Haltbarkeit der TK scheint weder die mitochondriale Effizienz noch die maximale Respirationsleistung der ThZ im Vergleich zu regelrecht gelagerten TK zu beeinträchtigen. Folglich sind durch eine Lagerung der TK ohne Agitation keine verstärkten Einbußen der Mitochondrienfunktion bewiesen.

Abschließend soll das eingesetzte Verdünnungsverhältnis von SSP und TK in der Oxygraph-2k-Messkammer genauer betrachtet werden. An den Messtagen 1 und 2 war meist ein ausgeglichenes Verdünnungsverhältnis von 1:1 (1 ml SSP + 1 ml TK) nötig, um eine Basalrate im optimalen Messbereich zu erreichen. Am Messtag-3 und -4 überwog der Einsatz geringerer Verdünnungen im Verhältnis von 1:3 (0,5 ml SSP + 1,5 ml TK) bzw. unverdünnter TK im 0:1-Verhältnis (2 ml reines TK). Um mit drei oder vier Tage

alten TK ausreichend hohe Basalraten zu generieren, war demnach ein höherer Anteil an TK in der Oxygraph-Messkammer erforderlich als an den vorherigen Messtagen. Diese Entwicklung zeigte sich sowohl in kontinuierlich agitierten als auch ruhenden TK und bekräftigt die Annahme einer sinkenden mitochondrialen Effizienz im Verlauf der TK-Alterung, unabhängig der Lagerungsmethode.

#### **4.4 Limitationen und Optimierungsansätze für Folgestudien**

In diesem Abschnitt soll auf Limitationen unserer Arbeit und Optimierungsmöglichkeiten für zukünftige Studien eingegangen werden.

##### **Bestimmung von ThZ-Konzentration, Mitochondriengehalt und Parameter des Zellmetabolismus**

In einigen bereits zitierten Vorgängerstudien wurden neben der Mitochondrienfunktion auch die Konzentration der ThZ bzw. der thrombozytäre Mitochondriengehalt in den Proben untersucht.<sup>48,69,70,72</sup> Dabei kam die Durchflusszytometrie, ein Verfahren zur Quantifizierung von Oberflächenmolekülen oder intrazellulären Proteinen, zum Einsatz. Die Bestimmungen von ThZ-Konzentration und Mitochondriengehalt in den TK sowie in den entnommenen Proben bringen einen deutlichen Informationsgewinn.

Der vom DRK versicherte ThZ-Gehalt in TK liegt zwischen  $2,0-4,5 \times 10^{11}$  ThZ pro TK, welcher einer ThZ-Konzentration von  $0,5-2,0 \times 10^9$  ThZ/ml entspricht. Eine starke Varianz der ThZ-Konzentration zwischen den elf untersuchten TK wäre demnach eine mögliche Ursache von Messwertschwankungen im Multiplate<sup>®</sup> und Oxygraph. Ein höherer ThZ-Gehalt in den Messzellen würde zu stärkeren Aggregationsantworten bzw. zu höheren Respirationsraten führen. Mittels durchflusszytometrischer Bestimmung der ThZ-Konzentration vor Messbeginn könnten die Respirationsraten auf eine bestimmte Anzahl an ThZ bezogen werden, statt auf den Milliliter der Probe [ $pmol/(s*ml)$ ]. Die Angabe in [ $pmol/(s*10^8ThZ)$ ], wie in den Studien von Perales Villarroel et al.<sup>69</sup> und Sjövall et al.,<sup>48</sup> ist wesentlich genauer und stellt die Respirationsraten unabhängig der ThZ-Konzentration in der Messzelle dar. Auch die Multiplate<sup>®</sup>-Messungen könnten durch ein an die ThZ-Konzentration angepasstes Verdünnungsverhältnis optimiert werden. Auf diese Weise könnten Ergebnisschwankungen minimiert werden.

Neben der Mitochondrienfunktion beeinflusst auch der thrombozytäre Mitochondriengehalt die Höhe der Respirationsraten im Oxygraph. Dieser unterliegt starken interindividuellen Schwankungen.<sup>39</sup> Studien<sup>96,97</sup> beschrieben einen erhöhten Mitochondriengehalt im Fettgewebe sportlich aktiver gegenüber inaktiver Menschen und eine Steigerung des Mitochondriengehalts in Muskelzellen durch Intervalltraining. Weiterhin zeigten sich Veränderungen durch fettreiche Ernährung, Typ-2 Diabetes oder Fettleibigkeit.<sup>96</sup> Ein unterschiedlich hoher Gehalt an thrombozytären Mitochondrien kann zu Schwankungen zwischen den Respirationsraten der einzelnen TK führen. Zellen mit hoher mitochondrialer Dichte demonstrieren höhere Respirationsraten und umgekehrt. Stammen die ThZ bspw. von einem sportlich aktiven und ausgewogen ernährten Spender, sind höhere Respirationsraten zu erwarten als bei einem übergewichtigen, sportlich inaktiven Spender. Die Ermittlung des thrombozytären Mitochondriengehalts könnte mögliche Differenzen zwischen den TK aufzeigen.<sup>69,72</sup>

Eine weitere Ergänzung für zukünftige Studien wäre die Ermittlung von Parametern des Zellmetabolismus. Einige vorausgehende Arbeiten<sup>70,72</sup> ermittelten die Entwicklung wichtiger metabolischer Größen, wie die Laktat- und Glucosekonzentration sowie den pH-Wert im Verlauf der TK-Lagerung. Deren regelmäßige Analyse über die Lagerungszeit ermöglicht die Darstellung des Zusammenhangs zwischen metabolischer Situation innerhalb der TK und der ThZ-Funktion. Hinsichtlich der Entwicklung der ROS-Produktion in nicht agitierten TK existieren bislang nur wenige Daten.<sup>70</sup> Die zukünftige Ermittlung der ROS-Konzentration im Zeitverlauf würde bezüglich der Korrelation zwischen fehlender TK-Agitation, prolongierter Lagerungszeit und den Einflüssen erhöhter ROS-Konzentrationen auf die ThZ-Funktion mehr Aufschluss bringen.

### **Vergleichsmessungen an Apherese-TK**

Auch die ThZ-Funktion unterliegt interindividuellen Schwankungen. In einem erheblichen Anteil der gespendeten ThZ zeigten sich deutlich verlängerte Aggregationszeiten im Vergleich zu gesunden Kontroll-ThZ.<sup>79</sup> Gleichzeitig fanden sich in den Spender-ThZ stark verringerte TxB<sub>2</sub>-Level, welche mit einer Einnahme von Cyclooxygenase-Hemmern (COX-Hemmer) vereinbar sind. Weiterhin waren die ThZ regelmäßiger Spender stärker in ihrer Aggregationsfunktion eingeschränkt.<sup>79</sup> Die verschwiegene Einnahme von COX-Hemmern oder die vermehrte Produktion funktionseingeschränkter ThZ, aufgrund einer angeregten Thrombopoese durch häufige

Blutspenden, könnten Einfluss auf die verminderte ThZ-Qualität haben. Diese interindividuellen Schwankungen der ThZ-Funktion könnten die Messergebnisse der Aggregationsfähigkeit und Respirationsleistung in den TK unserer Arbeit beeinflussen und zu Abweichungen zwischen den Messergebnissen führen. Es ist allerdings anzunehmen, dass der Zusammenschluss von vier Buffy-Coats unterschiedlicher Spender zu einem POOL-TK die Varianz zwischen den Spendern ausgleicht und zur Homogenisierung der Produktqualität beiträgt.<sup>98</sup> Bereits in Abschnitt 4.2.5 (s. S. 97-98) wurde die mögliche Interaktion zwischen ThZ unterschiedlicher Spender in POOL-TK mit negativen Folgen auf die ThZ-Aktivität diskutiert.

Die Durchführung von Vergleichsuntersuchungen an Apherese-TK brächte mehr Informationen bzgl. der Varianz der ThZ-Funktion zwischen den einzelnen Spendern.

### **Quantifizierung thrombozytärer Aktivitätsmarker**

Die simultane Untersuchung der thrombozytären Mitochondrienfunktion und Aggregationsfähigkeit zeichnet die Methode dieser Forschungsarbeit besonders aus. Unsere Ergebnisse lassen vermuten, dass die abnehmende mitochondriale Leistung im Verlauf der TK-Lagerung ohne Einfluss auf die *in vitro* Aggregationsfähigkeit der ThZ bleibt. Ein direkter Zusammenhang beider Funktionen lässt sich allerdings nur mutmaßen, da eine Korrelation beider Funktionen nicht untersucht wurde.

Gegensätzlich zu unseren Vermutungen beweisen Perales Villarreal et al.<sup>69</sup> eine starke Korrelation zwischen fallenden Respirationsraten und einer signifikant verminderter Thrombozytenaktivierbarkeit. Die Expression des thrombozytären Aktivitätsmarkers P-Selectin nach ThZ-Stimulation zeigte sich im Verlauf der Lagerung signifikant reduziert.<sup>69</sup> Diab et al.<sup>72</sup> ermittelten die Aktivität des Atmungsketten-Komplex IV, die thrombozytäre ATP-Konzentration, die Thrombozytenaggregation nach Stimulation sowie die Spontanaktivität der ThZ mittels Quantifizierung des Aktivitätsmarkers sCD40L. Sie untersuchten kontinuierlich agitierte Apherese-TK über einen Lagerungszeitraum von sieben Tagen. Die Ergebnisse ergaben signifikante Abnahmen der Komplex-IV-Aktivität, des ATP-Gehalts und der Plättchenaggregation sowie eine erhöhte basale Sekretion von sCD40L.<sup>72</sup> Auch diese Ergebnisse weisen auf einen Zusammenhang zwischen thrombozytärer Mitochondrienfunktion und Aggregationsfähigkeit hin. Die zunehmende Spontanexpression des Aktivitätsmarkers auf der ThZ-Oberfläche kommt als Ursache für die verminderte, zusätzliche Aktivierungsfähigkeit nach provozierte ThZ-Stimulation in Frage.

In Folgestudien zu dieser Arbeit sollte, durch die Einbeziehung der Ermittlung thrombozytärer Aktivitätsmarker, der Zusammenhang zwischen thrombozytärer Mitochondrien-, Aktivierungs- und Aggregationsfunktion näher untersucht werden. Auch hierfür eignet sich der Einsatz der Durchflusszytometrie.<sup>69-71</sup> Weiterhin sollte die Korrelation dieser drei Parameter unbedingt ermittelt werden.

### **Einsatz des Oxygraph an TK nach Kühlung und Rohrposttransport**

In unserer Arbeit kam der Oxygraph nur zum Vergleich zwischen agitiert und nicht agitiert gelagerten TK zum Einsatz. Ein weiterer Optimierungsansatz für zukünftige Studien wäre die zusätzliche respirometrische Analyse der temporär gekühlten bzw. mit Rohrpost transportierten TK (TG-K bzw. TG-R), um auch hier einen eventuellen Zusammenhang zwischen Mitochondrien- und Aggregationsfunktion zu erforschen. Sjövall et al.<sup>48</sup> beschrieb eine signifikante Reduktion der thrombozytären mitochondrialen Respirationsraten erst nach 72-stündiger gekühlter Lagerung bei 4°C. Allerdings fand die Kühlung unter kontinuierlicher Agitation von EDTA-Vollblutröhrchen statt. Erst im Anschluss der Kühlung wurde PRP durch Zentrifugation gewonnen und mittels Oxygraph analysiert. Eine Untersuchung der Respirationsraten von temporär gekühlt gelagerten und nicht agitierten POOL-TK wurde bislang nicht näher untersucht.

### **Einbezug der Thrombelastographie sowie in vivo Funktion**

Eine Aussage über den tatsächlichen Transfusionseffekt der TK ist uns allein anhand der Daten dieser Arbeit nicht gewährt. Unsere Ergebnisse deuten an, dass die kontinuierliche Lagerung in den ersten zwei Tagen nach Produktion keinen zusätzlichen Benefit auf die Aggregationsneigung der ThZ hat. Mittels Multiplate<sup>®</sup> wird allerdings lediglich die Aggregationsneigung beurteilt und keine Aussage über die Qualität und Festigkeit des gebildeten Thrombus getroffen. Eine reduzierte in vitro Thrombusfestigkeit bei gleichbleibender in vitro Aggregationsreaktion würde trotzdem mit denkbar schweren Folgen auf die in vivo Funktion der TK einhergehen. Die erhaltene Aggregationsfunktion am letzten Tag der Haltbarkeit eines TK wäre dann nur von untergeordneter Wichtigkeit. Diesen Überlegungen nach müsste in Folgestudien zu unserer Arbeit unbedingt die Untersuchung der Thrombusfestigkeit, bspw. mittels Thrombelastographie, aufgenommen werden. Außerdem sind zukünftige in vivo Studien nötig, die das klinische Outcome, einschließlich Blutungs- oder Thromboseneigung und Mortalität, nach Transfusion in vitro getesteter TK näher beleuchten.

## 5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden zur Funktionsanalyse gelagerter ThZ zwei ex vivo Messverfahren verwendet, die unterschiedliche Qualitäten der ThZ-Funktion quantifizieren. Die in vitro Aggregationsfunktion der ThZ wurde mittels Multiplate® Analyzer untersucht, die Mitochondrienfunktion mittels Oxygraph-2k.

Der Multiplate® Analyzer ist eine wohl etablierte und gut zugängliche POC-Methode, die zeitnah verlässliche Daten zur ThZ-Aggregationsfähigkeit in Vollblutproben liefert. Von Interesse war zunächst die Frage nach der Durchführbarkeit valider Multiplate®-Messungen an POOL-TK. Das für Vollblutproben konzipierte Multiplate® kann unseren Ergebnissen zufolge zur in vitro Testung von POOL-TK herangezogen werden. Die Kombination der verwendeten Mischungsverhältnisse, Suspensionsmedien und Reagenzien eignen sich zur ThZ-Stimulation außerhalb der physiologischen Umgebung des Vollbluts. In zukünftigen Studien mit höheren Fallzahlen sollte jedoch die Messgenauigkeit des Multiplate® an TK durch Anpassungen der Suspensionsmedien, sowie der ThZ- und Reagenzienkonzentration überprüft und optimiert werden.

Die Entwicklung der ThZ-Funktion im Verlauf der viertägigen TK-Haltbarkeit wurde hinsichtlich der thrombozytären Aggregations- und Mitochondrienfunktion beurteilt. Weiterhin wurde der Einfluss einer kontinuierlichen Agitation durch Vergleich mit der TK-Lagerung ohne Agitation untersucht. Während die Aggregationsfähigkeit der ThZ über den viertägigen Beobachtungszeitraum überwiegend erhalten blieb, verzeichnet die mitochondriale Funktion einen signifikanten Rückgang.

Unter kontinuierlicher Agitation der TK verzeichnete sich keine signifikante Abnahme der thrombozytären Aggregationsfähigkeit im Laufe der TK-Haltbarkeit. Wurden die TK ohne Agitation gelagert zeigte das Aggregationsausmaß in den ersten Tagen gegenüber den richtlinienkonform gelagerten TK keine signifikante Verschlechterung. Am vierten Tag resultierte lediglich die ThZ-Stimulation mit TRAP in einer signifikant verminderten Plättchenaggregation in der Gruppe der nicht agitierten TK. Eine Toleranz der TK bezüglich temporären Agitationspausen von ein bis zwei Tagen ist demnach anzunehmen. Nach längeren Agitationspausen ist mit signifikanten Beeinträchtigungen der Aggregationsfunktion zu rechnen.

Der Oxygraph-2k ist ein anerkanntes Messgerät zur Analyse der mitochondrialen Leistungsfähigkeit mittels hochauflösender Respirometrie. Die Daten dieser Arbeit demonstrieren eine signifikante Abnahme der mitochondrialen Leistungsfähigkeit mit

zunehmendem Alter der TK. Es zeigten sich keine Unterschiede zwischen kontinuierlich agitierten und ruhenden TK am Ende der Lagerungsperiode. Auch an den restlichen Lagerungstagen waren ruhende TK nicht verstärkt in ihrer mitochondrialen Leistung eingeschränkt, als stetig agitierte TK. Dies impliziert, dass sich die mitochondriale Leistungsfähigkeit im Laufe der TK-Alterung reduziert, ungeachtet dessen, ob die Lagerung unter der empfohlenen kontinuierlichen oder unterlassenen Agitation erfolgt. Aus den Multiplate<sup>®</sup>- und Oxygraph-Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass ein TK den für die Transfusion erforderlichen Qualitätsanspruch nicht durch kurzzeitige Agitationspausen verliert. Im Klinikalltag kann es, irrtümlich sowie durch Organisationsversagen bedingt, zu unterbrochener oder gar unterlassener Agitation vor TK-Transfusion kommen. Gemäß den Ergebnissen dieser Arbeit zufolge, wird darunter jedoch die TK-Qualität nicht nennenswert negativ beeinflusst.

Ein weiterer Teil dieser Arbeit befasste sich mit der Untersuchung des Einflusses von Extrembedingungen, wie Kälte von 4°C oder Be- und Entschleunigungen sowie Turbulenzen beim Transport durch Rohrpostsysteme. Die Mehrzahl der Testergebnisse verzeichnete keine signifikante Beeinträchtigung der ThZ-Aggregationsfunktion. Die vorübergehende, fehlerhafte Deposition eines TK im Kühlschrank und der Rohrpostversand können somit als unbedenklich für die mittels Multiplate<sup>®</sup> und Oxygraph gemessenen TK-Qualitätsparameter angesehen werden.

Die Gesamtheit der Ergebnisse zeigt, dass kurzfristige Abweichungen von der richtlinienkonformen TK-Lagerung keine negativen Auswirkungen auf die thrombozytäre Aggregationsfähigkeit und Mitochondrienfunktion ausüben. Die Berücksichtigung dieser Erkenntnisse könnte verhindern, dass kurzzeitig fehlgelagerte TK verworfen werden, was sich positiv auf die Nutzung dieser begrenzten Ressource auswirken würde. Als Einschränkung ist zu erwähnen, dass die dargebotenen Veränderungen lediglich ex vivo ermittelt wurden. Aufgrund der Nutzung etablierter Verfahren kann angenommen werden, dass sich unsere Ergebnisse gleichsinnig auf die tatsächliche in vivo ThZ-Funktion auswirken. Der Effekt auf die in vivo ThZ-Funktion muss in zukünftigen Studien verifiziert werden. Insbesondere bleibt die Frage offen, inwiefern ein Zusammenhang zwischen einer eingeschränkten mitochondrialen Respirationsleistung und der Aggregationsfunktion besteht. Weitere in vitro und v.a. in vivo Studien sind von zentraler Bedeutung, die den Fragen bezüglich des klinischen Outcomes der Patienten nach Transfusion in vitro getesteter TK nachgehen.

## 6 Summary

### **Characterisation of the effect of continuous agitation during storage of platelet concentrates on platelet function – an in vitro study**

In this work, two ex vivo measurement methods that quantify different qualities of platelet function were used for functional analysis of stored platelets. In vitro aggregation function was analysed using Multiplate<sup>®</sup> Analyzer, mitochondrial function using Oxygraph-2k .

The Multiplate<sup>®</sup> Analyzer is a well-established and easily accessible "point-of-care" method that provides timely and reliable data on platelet aggregation capacity in whole blood samples. Of initial interest was the question of the feasibility of valid Multiplate<sup>®</sup> measurements on buffy coat pooled platelet concentrates (PPC). According to our results, the Multiplate<sup>®</sup> designed for whole blood samples can be used for in vitro testing of PPC. The combination of the used mixing ratios, suspension media and reagents are suitable for platelet stimulation, even outside the physiological environment of whole blood. However, in further studies with a higher number of cases, the measurement accuracy of the Multiplate<sup>®</sup> on platelet concentrates (PC) should be further verified and optimized by further adjustments of the suspension media, platelet concentration as well as reagent concentration.

The development of platelet function during the four-day PC storage period was assessed regarding platelet aggregation and mitochondrial function. Furthermore, the influence of continuous agitation was investigated by comparison PC storage with and without agitation. Whereas the aggregability of platelet was predominantly preserved over the four-day observation period, mitochondrial function recorded a significant decrease.

Under continuous agitation of PC, no significant decrease in platelet aggregation capacity was recorded over the course of PC shelf life. If the PC were stored without agitation, the aggregation extent showed no significant deterioration in the first days compared with the PC stored according to the guidelines. On the fourth day, only platelet stimulation with TRAP revealed a significantly decreased platelet aggregation in the group of PC held without agitation. A tolerance of the PC concerning temporary breaks of agitation from one to two days can therefore be assumed. After longer breaks of agitation, significant impairment of the aggregation function is to be expected.

The Oxygraph-2k is an approved measurement device for the analysis of mitochondrial performance using high-resolution respirometry. The data of this work demonstrate a

significant decrease in mitochondrial performance with increasing age of the PC. There were no differences between continuously agitated and resting PC at the end of the storage period. Also, on the remaining days of storage, resting PC were not higher impaired in their mitochondrial performance compared to continuously agitated PC. This implies that mitochondrial performance is reduced during PC-aging regardless of whether storage is under the recommended continuous or omitted agitation.

The Multiplate<sup>®</sup> and Oxygraph results lead to the conclusion that a PC does not lose the required quality standard for transfusion due to brief breaks in agitation. In everyday clinical practice, interrupted or even omitted agitation prior to PC transfusion may occur by mistake or due to organizational failure. According to the results of this study, however, this should not have a significant negative impact on PC quality.

Another part of this work dealt with the investigation of the influence of extreme conditions such as cold of 4°C or acceleration and deceleration as well as turbulences during transport by pneumatic tube systems. Most test results recorded no significant impairment of the platelet's aggregation function. Thus, the transient, erroneous deposition of a PC in the refrigerator and their pneumatic tube shipment can be considered harmless concerning PC quality parameters measured by Multiplate<sup>®</sup> and Oxygraph.

In summary, our results show that short term deviations from the recommended PC storage do not exert negative effects on platelet's aggregation capacity and mitochondrial function. Considering these findings could prevent the disposal of short term incorrectly stored PCs, which would have a positive impact on the use of this restricted resource. As a limitation, it should be mentioned that the presented changes were only determined *ex vivo*. Based on the use of established procedures, it can be assumed that our results have the same effect on the actual *in vivo* platelet function. The effect on *in vivo* platelet function needs to be verified in future studies. In particular, the extent to which there is a relationship between impaired mitochondrial respiratory performance and aggregation function remains an open question. Further *in vitro* and especially *in vivo* studies are of central importance to address the questions regarding the clinical outcome of patients after transfusion of *in vitro* tested PC.

## 7 Ergebnisanhang

### 7.1 Deskriptive und analytische Statistik – Multiplate®

ADPtest	KG			TG-uA		
Messtag	Median	1. / 3. Quartil	Interquartilabstand/ Range	Median	1. / 3. Quartil	Interquartilabstand/ Range
Tag1	236	131/ 308	177/ 272			
Tag2	200	153/ 277	124/ 259	164	144/ 250	106/ 174
Tag3	233	138/ 294	156/ 263	221	148/ 248	100/ 417
Tag4	208	142/ 297	155/ 308	139	105/ 220	115/ 331
Friedmann-Test für multiple Vergleiche mit Post-Hoc-Test						
verglichene Messtage	p-Wert	Signifikanz	p-Wert	Signifikanz		
Tag1 vs. Tag2	1,00	nicht signifikant	1,00	nicht signifikant		
Tag1 vs. Tag3	1,00	nicht signifikant	1,00	nicht signifikant		
Tag1 vs. Tag4	1,00	nicht signifikant	0,77	nicht signifikant		
Tag2 vs. Tag3	1,00	nicht signifikant	1,00	nicht signifikant		
Tag2 vs. Tag4	1,00	nicht signifikant	1,00	nicht signifikant		
Tag3 vs. Tag4	1,00	nicht signifikant	1,00	nicht signifikant		
Wilcoxon-Matched-Pairs Test						
Messtag	KG - Median	TG-uA - Median	p-Wert	Signifikanz		
Tag2	200	164	0,413	nicht signifikant		
Tag3	233	221	0,175	nicht signifikant		
Tag4	208	139	0,278	nicht signifikant		

**Tabelle 7.1:** oben: deskriptive Statistik der ADPtest-Ergebnisse; Mitte: vergleichende Statistik innerhalb der KG und TG-uA von Tag-1 bis -4; unten: Vergleich KG und TG-uA an Tag-2 bis -4; n = 11

ASPItest	KG			TG-uA		
Messtag	Median	1. / 3. Quartil	Interquartilabstand/ Range	Median	1. / 3. Quartil	Interquartilabstand/ Range
Tag1	156	113/ 231	118/ 283			
Tag2	261	250/ 297	47/ 172	230	186/ 265	79/ 230
Tag3	277	212/ 314	102/ 184	330	281/ 400	119/ 199
Tag4	333	310/ 355	45/ 226	311	140/ 377	237/ 388
Friedmann-Test für multiple Vergleiche mit Post-Hoc-Test						
verglichene Messtage	p-Wert	Signifikanz	p-Wert	Signifikanz		
Tag1 vs. Tag2	0,332	nicht signifikant	1,000	nicht signifikant		
Tag1 vs. Tag3	0,332	nicht signifikant	0,074	nicht signifikant		
Tag1 vs. Tag4	0,006	signifikant (**)	1,000	nicht signifikant		

Tag2 vs. Tag3	0,850	nicht signifikant	0,207	nicht signifikant
Tag2 vs. Tag4	0,332	nicht signifikant	1,000	nicht signifikant
Tag3 vs. Tag4	0,332	nicht signifikant	0,241	nicht signifikant
<b>Wilcoxon-Matched-Pairs Test</b>				
Messtag	KG - Median	TG-uA - Median	p-Wert	Signifikanz
Tag2	261	230	0,365	nicht signifikant
Tag3	277	330	0,042	signifikant (*)
Tag4	333	311	0,083	nicht signifikant

**Tabelle 7.2:** oben: deskriptive Statistik der ASPItest-Ergebnisse; Mitte: vergleichende Statistik innerhalb der KG und TG-uA von Tag-1 bis -4; unten: Vergleich KG und TG-uA an Tag-2 bis -4; n = 11

<b>TRAPtest</b>	<b>KG</b>			<b>TG-uA</b>		
Messtag	Median	1. / 3. Quartil	Interquartilabstand/ Range	Median	1. / 3. Quartil	Interquartilabstand/ Range
Tag1	102	70/ 306	236/ 457			
Tag2	186	100/ 223	123/ 209	235	110/ 257	147/ 222
Tag3	193	155/ 281	126/ 317	240	200/ 270	70/ 170
Tag4	256	200/ 300	100/ 191	137	90/ 274	184/ 293
<b>Friedmann-Test für multiple Vergleiche mit Post-Hoc-Test</b>						
verglichene Messtage	p-Wert	Signifikanz	p-Wert	Signifikanz		
Tag1 vs. Tag2	1,000	nicht signifikant	1,000	nicht signifikant		
Tag1 vs. Tag3	1,000	nicht signifikant	0,435	nicht signifikant		
Tag1 vs. Tag4	0,342	nicht signifikant	1,000	nicht signifikant		
Tag2 vs. Tag3	1,000	nicht signifikant	0,744	nicht signifikant		
Tag2 vs. Tag4	0,342	nicht signifikant	1,000	nicht signifikant		
Tag3 vs. Tag4	1,000	nicht signifikant	0,435	nicht signifikant		
<b>Wilcoxon-Matched-Pairs Test</b>						
Messtag	KG - Median	TG-uA - Median	p-Wert	Signifikanz		
Tag2	186	235	0,831	nicht signifikant		
Tag3	193	240	0,922	nicht signifikant		
Tag4	256	137	0,024	signifikant (*)		

**Tabelle 7.3:** oben: deskriptive Statistik der TRAPtest-Ergebnisse; Mitte: vergleichende Statistik innerhalb der KG und TG-uA von Tag-1 bis -4; unten: Vergleich KG und TG-uA an Tag-2 bis -4; n = 11

<b>COLtest</b>	<b>KG</b>			<b>TG-uA</b>		
Messtag	Median	1. / 3. Quartil	Interquartilabstand/ Range	Median	1. / 3. Quartil	Interquartilabstand/ Range
Tag1	430	70/ 611	541/ 679			

Tag2	289	93/ 510	417/ 730	551	282/ 784	502/ 835
Tag3	450	76/ 660	584/ 695	595	138/ 738	600/ 814
Tag4	600	560/ 765	205/ 605	649	512/ 963	451/ 1158
Friedmann-Test für multiple Vergleiche mit Post-Hoc-Test						
verglichene Messtage	p-Wert	Signifikanz	p-Wert	Signifikanz		
Tag1 vs. Tag2	1,000	nicht signifikant	0,291	nicht signifikant		
Tag1 vs. Tag3	1,000	nicht signifikant	0,959	nicht signifikant		
Tag1 vs. Tag4	0,207	nicht signifikant	0,070	nicht signifikant		
Tag2 vs. Tag3	1,000	nicht signifikant	0,660	nicht signifikant		
Tag2 vs. Tag4	0,074	nicht signifikant	0,959	nicht signifikant		
Tag3 vs. Tag4	0,241	nicht signifikant	0,291	nicht signifikant		
Wilcocon-Matched-Pairs Test						
Messtag	KG - Median	TG-uA - Median	p-Wert	Signifikanz		
Tag2	289	551	0,042	signifikant (*)		
Tag3	450	595	0,365	nicht signifikant		
Tag4	600	649	0,465	nicht signifikant		

**Tabelle 7.4:** oben: deskriptive Statistik der COLtest-Ergebnisse; Mitte: vergleichende Statistik innerhalb der KG und TG-uA von Tag-1 bis -4; unten: Vergleich KG und TG-uA an Tag-2 bis -4; n = 11

Multiplate®-Test „Kühlung“	KG			TG-K		
	Median	1. / 3. Quartil	Interquartilabstand/ Range	Median	1. / 3. Quartil	Interquartilabstand/ Range
ADPtest	200	153/ 277	124/ 259	186	110/ 254	144/ 290
ASPItest	261	250/ 297	47/ 172	170	116/ 276	160/223
TRAPtest	186	100/ 223	123/ 209	164	107/ 295	188/ 310
COLtest	289	93/ 510	417/ 730	411	140/ 702	562/ 811
Wilcocon-Matched-Pairs Test						
Messtag	KG - Median	TG-K - Median	p-Wert	Signifikanz		
ADPtest	200	186	0,520	nicht signifikant		
ASPItest	261	170	0,032	signifikant (*)		
TRAPtest	186	164	0,831	nicht signifikant		
COLtest	289	411	0,365	nicht signifikant		

**Tabelle 7.5:** obere Tabelle: deskriptive Statistik der Multiplate®-Ergebnisse der Versuchsreihe „temporäre Kühlung“; untere Tabelle: vergleichende Statistik von KG und TG-K; n = 11

Multiplate®-Test „Rohrpost“	KG			TG-R		
	Median	1. / 3. Quartil	Interquartilabstand/ Range	Median	1. / 3. Quartil	Interquartilabstand/ Range

ADPtest	223,50	143,75/ 278,25	134,5/ 259	225,00	178,25/ 271,00	92,75/ 233
ASPItest	264,50	225,25/ 300,50	75,25/ 172	173,50	114,75/ 278,00	163,25/ 333
TRAPtest	184,00	95,75/ 210,75	115,00/ 209	182,50	117,50/ 274,75	157,25/ 367
COLtest	282,50	74,75/ 357,50	282,75/ 730	491,50	287,50/ 672,25	384,75/ 634
<b>Wilcocon-Matched-Pairs Test</b>						
Messtag	KG - Median	TG-K - Median	p-Wert	Signifikanz		
ADPtest	223,50	225,00	1,000	nicht signifikant		
ASPItest	264,50	173,50	0,105	nicht signifikant		
TRAPtest	184,00	182,50	0,770	nicht signifikant		
COLtest	282,50	491,50	0,105	nicht signifikant		

**Tabelle 7.6:** obere Tabelle: deskriptive Statistik der Multiplate®-Ergebnisse der Versuchsreihe „Rohrpostversand“; untere Tabelle: vergleichende Statistik von KG und TG-R; n = 10

## 7.2 Deskriptive und analytische Statistik – Oxygraph-2k

KCN-Rate	KG			TG-uA		
Messtag	Median	1. / 3. Quartil	Interquartilabstand/ Range	Median	1. / 3. Quartil	Interquartilabstand/ Range
Tag1	0,50	0,00/1,43	1,43/4,05			
Tag2	0,60	0,00/4,83	4,83/ 7,00	0,50	0,00/ 6,00	6,00/ 12,10
Tag3	4,06	2,16/5,20	3,04/ 8,91	3,48	1,78/ 6,60	4,82/ 8,41
Tag4	4,29	2,80/5,27	2,47/7,40	5,81	3,04/ 9,53	6,49/ 11,74
<b>Friedmann-Test für multiple Vergleiche mit Post-Hoc-Test</b>						
verglichene Mess-tage	p-Wert	Signifikanz		p-Wert	Signifikanz	
Tag1 vs. Tag2	0,2068	nicht signifikant		0,3050	nicht signifikant	
Tag1 vs. Tag3	0,0087	signifikant (**)		0,1125	nicht signifikant	
Tag1 vs. Tag4	0,0002	signifikant (***)		0,0013	signifikant (**)	
Tag2 vs. Tag3	0,2615	nicht signifikant		0,4081	nicht signifikant	
Tag2 vs. Tag4	0,0218	signifikant (*)		0,0529	nicht signifikant	
Tag3 vs. Tag4	0,2615	nicht signifikant		0,2064	nicht signifikant	
<b>Wilcocon-Matched-Pairs Test</b>						
Messtag	KG - Median	TG-uA – Median	p-Wert	Signifikanz		
Tag2	0,60	0,50	0,4131	nicht signifikant		
Tag3	4,06	3,48	0,8984	nicht signifikant		
Tag4	4,29	5,81	0,2402	nicht signifikant		

**Tabelle 7.7:** Statistik der KCN-Raten; oben: deskriptive Statistik der Raten der KG und TG-uA im Verlauf des viertägigen Beobachtungszeitraums; Mitte: vergleichende Statistik innerhalb der KG und TG-uA von Tag-1 bis -4; unten: vergleichende Statistik von KG versus TG-uA an Tag-2 bis -4; n = 11

<b>LEAK-Rate</b>	<b>KG</b>			<b>TG-uA</b>		
Messtag	Median	1. / 3. Quartil	Interquartilabstand/ Range	Median	1. / 3. Quartil	Interquartilabstand/ Range
Tag1	20,22	18,67/ 23,22	4,55/ 19,45			
Tag2	16,47	14,51/ 30,70	16,19/ 23,19	20,54	16,34/ 26,06	9,72/ 29,86
Tag3	22,37	16,95/ 26,07	9,12/ 35,13	28,61	22,74/ 37,18	14,44/ 28,79
Tag4	28,71	18,72/ 33,01	14,29/24,29	28,96	17,19/ 33,23	16,04/ 35,77
<b>Friedmann-Test für multiple Vergleiche mit Post-Hoc-Test</b>						
verglichene Mess-tage	p-Wert	Signifikanz		p-Wert	Signifikanz	
Tag1 vs. Tag2	0,7217	nicht signifikant		1,0000	nicht signifikant	
Tag1 vs. Tag3	0,6537	nicht signifikant		0,0117	signifikant (*)	
Tag1 vs. Tag4	0,1314	nicht signifikant		0,0272	signifikant (*)	
Tag2 vs. Tag3	0,4644	nicht signifikant		0,0272	signifikant (*)	
Tag2 vs. Tag4	0,0682	nicht signifikant		0,0433	signifikant (*)	
Tag3 vs. Tag4	0,6537	nicht signifikant		1,0000	nicht signifikant	
<b>Wilcoxon-Matched-Pairs Test</b>						
Messtag	KG - Median		TG-uA - Median	p-Wert	Signifikanz	
Tag2	16,47		20,54	0,4648	nicht signifikant	
Tag3	22,37		28,61	0,0420	signifikant (*)	
Tag4	28,71		28,96	0,7646	nicht signifikant	

**Tabelle 7.8:** Statistik der Oligomycin-/LEAK-Raten; oben: deskriptive Statistik der Raten der KG und TG-uA im Verlauf des viertägigen Beobachtungszeitraums; Mitte: vergleichende Statistik innerhalb der KG und TG-uA von Tag-1 bis -4; unten: vergleichende Statistik von KG versus TG-uA an Tag-2 bis -4; n = 11

<b>Basal-Rate</b>	<b>KG</b>			<b>TG-uA</b>		
Messtag	Median	1. / 3. Quartil	Interquartilabstand/ Range	Median	1. / 3. Quartil	Interquartilabstand/ Range
Tag1	132,28	120,30/ 133,79	13,49/ 81,10			
Tag2	110,42	102,60/ 138,00	35,40/ 74,72	126,97	107,09/146,87	39,78/ 90,29
Tag3	96,61	86,47/ 112,37	25,90 /109,89	117,74	96,34/ 150,82	54,48/ 110,77
Tag4	86,86	51,87/ 130,91	79,04/ 96,63	85,37	81,45/ 101,88	20,43/ 145,88
<b>Friedmann-Test für multiple Vergleiche mit Post-Hoc-Test</b>						
verglichene Messtage	p-Wert	Signifikanz		p-Wert	Signifikanz	
Tag1 vs. Tag2	0,1960	nicht signifikant		0,5984	nicht signifikant	
Tag1 vs. Tag3	0,0002	signifikant (***)		0,4487	nicht signifikant	
Tag1 vs. Tag4	< 0,0001	signifikant (***)		0,0004	signifikant (***)	
Tag2 vs. Tag3	0,0105	signifikant (*)		0,6756	nicht signifikant	

Tag2 vs. Tag4	0,0020	signifikant (**)	0,0058	signifikant (**)
Tag3 vs. Tag4	0,4699	nicht signifikant	0,0140	signifikant (*)
Wilcoxon-Matched-Pairs Test				
Messtag	KG - Median	TG-uA - Median	p-Wert	Signifikanz
Tag2	110,42	126,97	0,0186	signifikant (*)
Tag3	96,61	117,74	0,0673	nicht signifikant
Tag4	86,86	85,37	0,9658	nicht signifikant

**Tabelle 7.9:** Statistik der Basal-Raten; oben: deskriptive Statistik der Raten der KG und TG-uA im Verlauf des viertägigen Beobachtungszeitraums; Mitte: vergleichende Statistik innerhalb der KG und TG-uA von Tag-1 bis -4; unten: vergleichende Statistik von KG versus TG-uA an Tag-2 bis -4; n = 11

„freie“ Basal-Rate	KG			TG-uA		
	Median	1. / 3. Quartil	Interquartilabstand/ Range	Median	1. / 3. Quartil	Interquartilabstand/ Range
Messtag						
Tag1	111,95	100,08/ 119,23	19,15/ 66,13			
Tag2	93,80	86,83/ 118,16	31,33/ 58,77	106,42	97,21/ 116,21	19,00/ 73,46
Tag3	74,63	62,98/ 95,42	32,52/ 74,77	88,74	73,49/ 112,52	39,03/ 96,33
Tag4	64,71	31,03/ 95,35	64,32/ 102,65	64,30	54,16/ 70,82	16,66/ 110,11
Friedmann-Test für multiple Vergleiche mit Post-Hoc-Test						
verglichene Messtage	p-Wert	Signifikanz		p-Wert	Signifikanz	
Tag1 vs. Tag2	0,0123	signifikant (*)		0,1637	nicht signifikant	
Tag1 vs. Tag3	<0,0001	signifikant (***)		0,0015	signifikant (**)	
Tag1 vs. Tag4	<0,0001	signifikant (***)		<0,0001	signifikant (***)	
Tag2 vs. Tag3	0,0014	signifikant (**)		0,0308	signifikant (*)	
Tag2 vs. Tag4	< 0,0001	signifikant (***)		<0,0001	signifikant (***)	
Tag3 vs. Tag4	0,0291	signifikant (*)		0,0025	signifikant (**)	
Wilcoxon-Matched-Pairs Test						
Messtag	KG - Median	TG-uA - Median	p-Wert	Signifikanz		
Tag2	93,80	106,42	0,0537	nicht signifikant		
Tag3	74,63	88,74	0,1748	nicht signifikant		
Tag4	64,71	64,30	1,0000	nicht signifikant		

**Tabelle 7.10:** Statistik der „freien“ Basal-Raten; oben: deskriptive Statistik der Raten der KG und TG-uA im Verlauf des viertägigen Beobachtungszeitraums; Mitte: vergleichende Statistik innerhalb der KG und TG-uA von Tag-1 bis -4; unten: vergleichende Statistik von KG versus TG-uA an Tag-2 bis -4; n = 11

Maximal-Rate	KG			TG-uA		
Messtag	Median	1. / 3. Quartil	Interquartilabstand/ Range	Median	1. / 3. Quartil	Interquartilabstand/ Range
Tag1	233,72	214,24/ 279,08	64,84/ 185,06			
Tag2	179,77	152,85/ 218,01	65,16/ 123,20	227,34	192,94/280,11	87,17/ 173,62
Tag3	129,13	119,59/ 186,41	66,82/ 144,15	175,01	143,96/217,88	73,92/ 176,31
Tag4	119,0	76,79/ 210,49	133,70/180,21	114,00	80,26/ 136,32	50,06/ 217,26
Friedmann-Test für multiple Vergleiche mit Post-Hoc-Test						
verglichene Messtage	p-Wert	Signifikanz		p-Wert	Signifikanz	
Tag1 vs. Tag2	<0,0001	signifikant (***)		0,0090	signifikant (**)	
Tag1 vs. Tag3	<0,0001	signifikant (***)		<0,0001	signifikant (***)	
Tag1 vs. Tag4	<0,0001	signifikant (***)		<0,0001	signifikant (***)	
Tag2 vs. Tag3	<0,0001	signifikant (***)		<0,0001	signifikant (***)	
Tag2 vs. Tag4	<0,0001	signifikant (***)		<0,0001	signifikant (***)	
Tag3 vs. Tag4	0,1013	nicht signifikant		<0,0001	signifikant (***)	
Wilcoxon-Matched-Pairs Test						
Messtag	KG - Median		TG-uA - Median	p-Wert	Signifikanz	
Tag2	179,77		227,34	0,0009	signifikant (***)	
Tag3	129,13		175,01	0,0137	signifikant (**)	
Tag4	119,0		114,00	0,7002	nicht signifikant	

**Tabelle 7.11:** Statistik der Maximal-Raten: oben: deskriptive Statistik der Raten der KG und TG-uA im Verlauf des viertägigen Beobachtungszeitraums; Mitte: vergleichende Statistik innerhalb der KG und TG-uA von Tag-1 bis -4; unten: vergleichende Statistik von KG versus TG-uA an Tag-2 bis -4; n = 11

„freie“ Maximal-Rate	KG			TG-uA		
Messtag	Median	1. / 3. Quartil	Interquartilabstand/ Range	Median	1. / 3. Quartil	Interquartilabstand/ Range
Tag1	213,51	192,52/ 264,52	72,00/ 169,10			
Tag2	168,17	140,23/ 198,17	57,94/ 107,60	209,24	171,58/ 254,05	82,47/ 156,80
Tag3	104,12	96,02/ 160,67	64,65/ 110,71	151,45	130,31/ 182,69	52,38/ 158,97
Tag4	95,33	56,38/ 174,92	118,54/186,22	87,48	47,03/ 120,33	73,30/ 181,47
Friedmann-Test für multiple Vergleiche mit Post-Hoc-Test						
verglichene Messtage	p-Wert	Signifikanz		p-Wert	Signifikanz	
Tag1 vs. Tag2	< 0,0001	signifikant (***)		0,0112	signifikant (*)	
Tag1 vs. Tag3	< 0,0001	signifikant (***)		< 0,0001	signifikant (***)	

Tag1 vs. Tag4	< 0,0001	signifikant (***)	< 0,0001	signifikant (***)
Tag2 vs. Tag3	< 0,0001	signifikant (***)	< 0,0001	signifikant (***)
Tag2 vs. Tag4	< 0,0001	signifikant (***)	< 0,0001	signifikant (***)
Tag3 vs. Tag4	0,1013	nicht signifikant	< 0,0001	signifikant (***)
<b>Wilcoxon-Matched-Pairs Test</b>				
Messtag	KG - Median	TG-uA - Median	p-Wert	Signifikanz
Tag2	168,17	209,24	0,0020	signifikant (**)
Tag3	104,12	151,45	0,0322	signifikant (*)
Tag4	95,33	87,48	0,7646	nicht signifikant

**Tabelle 7.12:** Statistik der „freien“ Maximal-Raten; oben: deskriptive Statistik der Raten der KG und TG-uA im Verlauf des viertägigen Beobachtungszeitraums; Mitte: vergleichende Statistik innerhalb der KG und TG-uA von Tag-1 bis -4; unten: vergleichende Statistik von KG versus TG-uA an Tag-2 bis -4; n = 11

Reservekapazität	KG			TG-uA		
	Median	1. / 3. Quartil	Interquartilabstand/ Range	Median	1. / 3. Quartil	Interquartilabstand/ Range
Messtag						
Tag1	113,4	88,4/ 145,3	103,9			
Tag2	70,2	53,4/ 80,0	56,7	105,5	64,8/ 135,0	86,4
Tag3	42,1	29,5/ 58,8	70,0	59,1	52,4/ 84,6	72,4
Tag4	34,0	25,4/ 79,6	83,6	19,1	3,6/ 51,0	85,7
<b>Friedmann-Test für multiple Vergleiche mit Post-Hoc-Test</b>						
verglichene Messtage	p-Wert	Signifikanz		p-Wert	Signifikanz	
Tag1 vs. Tag2	< 0,0001	signifikant (***)		0,0090	signifikant (**)	
Tag1 vs. Tag3	< 0,0001	signifikant (***)		< 0,0001	signifikant (***)	
Tag1 vs. Tag4	< 0,0001	signifikant (***)		< 0,0001	signifikant (***)	
Tag2 vs. Tag3	< 0,0001	signifikant (***)		< 0,0001	signifikant (***)	
Tag2 vs. Tag4	< 0,0001	signifikant (***)		< 0,0001	signifikant (***)	
Tag3 vs. Tag4	1,000	nicht signifikant		< 0,0001	signifikant (***)	
<b>Wilcoxon-Matched-Pairs Test</b>						
Messtag	KG - Median	TG-uA - Median	p-Wert	Signifikanz		

Tag2	70,2	105,0	0,0001	signifikant (***)
Tag3	42,1	59,1	0,0244	signifikant (*)
Tag4	34,0	19,1	0,2402	nicht signifikant

**Tabelle 7.13:** Statistik der Reservekapazitäten; oben: deskriptive Statistik der Raten der KG und TG-uA im Verlauf des viertägigen Beobachtungszeitraums; Mitte: vergleichende Statistik innerhalb der KG und TG-uA von Tag-1 bis -4; unten: vergleichende Statistik von KG versus TG-uA an Tag-2 bis -4; n = 11

Basal-KE	KG			TG-uA		
	Median	1. / 3. Quartil	Interquartilabstand/ Range	Median	1. / 3. Quartil	Interquartilabstand/ Range
Messtag						
Tag1	0,85	0,83/ 0,87	0,04/ 0,13			
Tag2	0,85	0,81/ 0,87	0,06/ 0,19	0,83	0,81/ 0,84	0,03/ 0,18
Tag3	0,79	0,73/ 0,82	0,09/ 0,21	0,75	0,75/ 0,78	0,03/ 0,31
Tag4	0,73	0,56/ 0,78	0,22/ 0,50	0,70	0,62/ 0,75	0,13/ 1,12
<b>Friedmann-Test für multiple Vergleiche mit Post-Hoc-Test</b>						
verglichene Messtage	p-Wert	Signifikanz		p-Wert	Signifikanz	
Tag1 vs. Tag2	0,7891	nicht signifikant		0,1526	nicht signifikant	
Tag1 vs. Tag3	0,0009	signifikant (***)		< 0,0001	signifikant (***)	
Tag1 vs. Tag4	< 0,0001	signifikant (***)		< 0,0001	signifikant (***)	
Tag2 vs. Tag3	0,0015	signifikant (**)		0,0002	signifikant (***)	
Tag2 vs. Tag4	< 0,0001	signifikant (***)		< 0,0001	signifikant (***)	
Tag3 vs. Tag4	0,0780	nicht signifikant		0,0410	Signifikant (*)	
<b>Wilcoxon-Matched-Pairs Test</b>						
Messtag	KG - Median	TG-uA - Median	p-Wert	Signifikanz		
Tag2	0,85	0,83	0,8203	nicht signifikant		
Tag3	0,79	0,75	0,4316	nicht signifikant		
Tag4	0,73	0,70	0,5771	nicht signifikant		

**Tabelle 7.14:** Statistik der Basalen-Kopplungseffizienzen: oben: deskriptive Statistik der Raten der KG und TG-uA im Verlauf des viertägigen Beobachtungszeitraums; Mitte: vergleichende Statistik innerhalb der KG und TG-uA von Tag-1 bis -4; unten: vergleichende Statistik von KG versus TG-uA an Tag-2 bis -4; n = 11

ETS-KE	KG			TG-uA		
	Median	1. / 3. Quartil	Interquartilabstand/ Range	Median	1. / 3. Quartil	Interquartilabstand/ Range
Tag1	0,91	0,91/ 0,93	0,02/ 0,06			
Tag2	0,91	0,87/ 0,92	0,05/ 0,16	0,91	0,89/ 0,91	0,02/ 0,10
Tag3	0,82	0,80/ 0,89	0,09/ 0,15	0,83	0,82/ 0,87	0,05/ 0,23
Tag4	0,83	0,69/ 0,87	0,18/ 0,44	0,76	0,59/ 0,83	0,24/ 0,41
Friedmann-Test für multiple Vergleiche mit Post-Hoc-Test						
verglichene Messtage	p-Wert	Signifikanz		p-Wert	Signifikanz	
Tag1 vs. Tag2	0,2001	nicht signifikant		0,0385	signifikant (*)	
Tag1 vs. Tag3	< 0,0001	signifikant (***)		< 0,0001	signifikant (***)	
Tag1 vs. Tag4	< 0,0001	signifikant (***)		< 0,0001	signifikant (***)	
Tag2 vs. Tag3	0,0009	signifikant (***)		< 0,0001	signifikant (***)	
Tag2 vs. Tag4	< 0,0001	signifikant (***)		< 0,0001	signifikant (***)	
Tag3 vs. Tag4	0,1363	nicht signifikant		< 0,0001	signifikant (***)	
Wilcoxon-Matched-Pairs Test						
Messtag	KG - Median	TG-uA - Median	p-Wert	Signifikanz		
Tag2	0,91	0,91	0,3222	nicht signifikant		
Tag3	0,82	0,83	1,0000	nicht signifikant		
Tag4	0,83	0,76	0,6523	nicht signifikant		

**Tabelle 7.15:** Statistik der ETS-Kopplungseffizienzen: obere Tabelle: deskriptive Statistik der Raten der KG und TG-uA im Verlauf des viertägigen Beobachtungszeitraums; mittlere Tabelle: vergleichende Statistik innerhalb der KG und TG-uA von Tag-1 bis -4; untere Tabelle: vergleichende Statistik von KG versus TG-uA an Tag-2 bis -4; n = 11

## 8 Literaturverzeichnis

1. Kiefel V. *Transfusionsmedizin Und Immunhämatologie*. 4. Auflage. Springer-Verlag GmbH; 2010.
2. Müller-Esterl W. *Biochemie: Eine Einführung Für Mediziner Und Naturwissenschaftler*. Korrigierter Nachdruck der 1. Auflage 2004. Spektrum Akademischer Verlag; 2009.
3. Pötzsch B, Madlener K. *Hämostaseologie: Grundlagen, Diagnostik, Therapie*. 2. Auflage. Springer-Verlag GmbH; 2010.
4. Bauer F, Gary T, Gattringer T, et al. *Gerinnung Im Klinischen Alltag*. 8th ed. Interdisziplinäre Gerinnungsgruppe Steiermark
5. Neumüller J, Ellinger A, Wagner T. *Transmission Electron Microscopy of Platelets FROM Apheresis and Buffy-Coat-Derived Platelet Concentrates, The Transmission Electron Microscope - Theory and Applications*, Khan Maaz. IntechOpen; 2015. Accessed December 20, 2021. <https://www.intechopen.com/chapters/48569>
6. Gawaz MP. *Das Blutplättchen : Physiologie, Pathophysiologie, Membranrezeptoren, Antithrombozytäre Wirkstoffe Und Antithrombozytäre Therapie Bei Koronarer Herzerkrankung*. 1. Auflage. Thieme Stuttgart; 1999.
7. Clemetson KJ. Platelets and primary haemostasis. *Thromb Res*. 2012;129(3):220-224. doi:10.1016/j.thromres.2011.11.036
8. Flaumenhaft R, Dilks JR, Rozenvayn N, Monahan-Earley RA, Feng D, Dvorak AM. The actin cytoskeleton differentially regulates platelet alpha-granule and dense-granule secretion. *Blood*. 2005;105(10):3879-3887. doi:10.1182/blood-2004-04-1392
9. Gawaz M. Role of platelets in coronary thrombosis and reperfusion of ischemic myocardium. *Cardiovasc Res*. 2004;61(3):498-511. doi:10.1016/j.cardiores.2003.11.036
10. Broos K, Feys HB, De Meyer SF, Vanhoorelbeke K, Deckmyn H. Platelets at work in primary hemostasis. *Blood Rev*. 2011;25(4):155-167. doi:10.1016/j.blre.2011.03.002

11. Clemetson KJ, Clemetson JM. Chapter 9 - Platelet Receptors. In: Michelson AD, ed. *Platelets (Third Edition)*. Academic Press; 2013:169-194. doi:10.1016/B978-0-12-387837-3.00009-2
12. Reininger AJ, Spannagl M. Interaktion des von Willebrand Faktors mit Thrombozyten und der Gefäßwand. Interaction of von Willebrand factor and platelets at the vessel wall. *LaboratoriumsMedizin*. 2004;28(6):514-520. doi:10.1515/LabMed.2004.068
13. Kehrel BE. Platelets: biochemistry and physiology. *Hamostaseologie*. 2008;28(5):289-298.
14. Paniccia R, Priora R, Liotta AA, Abbate R. Platelet function tests: a comparative review. *Vasc Health Risk Manag*. 2015;11:133-148. doi:10.2147/VHRM.S44469
15. Cardinal DC, Flower RJ. The electronic aggregometer: A novel device for assessing platelet behavior in blood. *J Pharmacol Methods*. 1980;3(2):135-158. doi:10.1016/0160-5402(80)90024-8
16. Linnemann B, Schwonberg J, Mani H, Prochnow S, Lindhoff-Last E. Standardization of light transmittance aggregometry for monitoring antiplatelet therapy: an adjustment for platelet count is not necessary. *J Thromb Haemost JTH*. 2008;6(4):677-683. doi:10.1111/j.1538-7836.2008.02891.x
17. Calatzis A. Vollblutverfahren zur Erfassung der primären Hämostase / Analysis of primary hemostasis in whole blood. *LaboratoriumsMedizin*. 2007;31(6):239-247. doi:10.1515/JLM.2007.041
18. Sibbing D, Braun S, Jawansky S, et al. Assessment of ADP-induced platelet aggregation with light transmission aggregometry and multiple electrode platelet aggregometry before and after clopidogrel treatment. *Thromb Haemost*. 2008;99:121-126. doi:10.1160/TH07-07-0478
19. Orban M, Sibbing D. Multiplate Analyzer. Thoracic Key Fastest Thoracic Insight Engine. Published December 31, 2021. <https://thoracickey.com/multiplate-analyzer/>
20. Clareus A, Fredriksson I, Wallén H, Gordon M, Stark A, Sköldenberg O. Variability of platelet aggregation in patients with clopidogrel treatment and hip fracture: A retrospective case-control study on 112 patients. *World J Orthop*. 2015;6(5):439-445. doi:10.5312/wjo.v6.i5.439

21. Tóth O, Calatzis A, Penz S, Losonczy H, Siess W. Multiple electrode aggregometry: A new device to measure platelet aggregation in whole blood. *Thromb Haemost.* 2006;96:781-788. doi:10.1160/TH06-05-0242
22. Roche Diagnostics. Multiplate® analyzer SW Version 2.04: Operator's Manual. Accessed December 31, 2021. [https://diapharma.com/wp-content/uploads/2016/03/MP0010\\_Multiplate\\_Operator\\_Manual\\_V2.04.pdf#:~:text=The%20Multiplate%20analyzer%20is%20an%20instrument%20designed%20for,options%2C%20and%20duplicate%20sensors%20in%20each%20test%20cell.](https://diapharma.com/wp-content/uploads/2016/03/MP0010_Multiplate_Operator_Manual_V2.04.pdf#:~:text=The%20Multiplate%20analyzer%20is%20an%20instrument%20designed%20for,options%2C%20and%20duplicate%20sensors%20in%20each%20test%20cell.)
23. Roche Diagnostics. Multiplate® Analyzer für die Thrombozytenfunktionstestung. Accessed December 31, 2021. <https://assets.cwp.roche.com/f/94122/x/a37dea3c02/02-multiplate-analyzer-pdf-broschuere.pdf>
24. Roche Diagnostics. Multiplate® analyzer Quick Start Guide: Multiplate is for Research Use Only. Accessed December 31, 2021. [https://diapharma.com/wp-content/uploads/2016/08/MP0010\\_Roche\\_Multiplate\\_Analyzer\\_RUO\\_Quick\\_Start\\_Guide\\_V1.0.pdf](https://diapharma.com/wp-content/uploads/2016/08/MP0010_Roche_Multiplate_Analyzer_RUO_Quick_Start_Guide_V1.0.pdf)
25. Görlinger K, Jámbor C, Dirkmann D, et al. Platelet function analysis with point-of-care methods. *Herz.* 2008;33:297-305. doi:10.1007/s00059-008-3130-4
26. Roche Deutschland Holding GmbH. Multiplate® Analyzer. Roche. Published December 31, 2021. <https://www.roche.de/diagnostik-produkte/produktkatalog/systeme/multiplate-analyzer/>
27. Jámbor C, Spannagl M, Zwissler B. Perioperatives Management von Patienten mit Koronarstents bei nichtherzchirurgischen Eingriffen. *Anaesthesist.* 2009;58(10):971-985. doi:10.1007/s00101-009-1628-7
28. Salganicoff L, Fukami MH. Energy metabolism of blood platelets: I. Isolation and properties of platelet mitochondria. *Arch Biochem Biophys.* 1972;153(2):726-735. doi:10.1016/0003-9861(72)90391-8
29. Jakobs S. Mitochondrien - Dynamische Kraftwerke der Zelle. *Max-Planck-Inst Für Biophys Chem Karl-Friedrich-Bonhoeffer-Inst MPIbpc News.* 2004;(12). Accessed December 31, 2021. [https://pure.mpg.de/rest/items/item\\_598939/component/file\\_860994/content](https://pure.mpg.de/rest/items/item_598939/component/file_860994/content)

30. Mitochondrien. Homepage der Familie Bahnsen. Accessed December 31, 2021. <https://www.bahnsen.de/medizin/zell/orga/mito.htm>
31. McQuibban GA. Mitochondrial Quality Control Pathways and Human Neurodegenerative Disease. Biochemistry University of Toronto. Accessed December 31, 2021. <http://biochemistry.utoronto.ca/person/g-angus-mcquibban/>
32. Gilkerson RW, Selker JML, Capaldi RA. The cristal membrane of mitochondria is the principal site of oxidative phosphorylation. *FEBS Lett.* 2003;546(2-3):355-358. doi:10.1016/S0014-5793(03)00633-1
33. Kilkson H, Holme S, Murphy S. Platelet metabolism during storage of platelet concentrates at 22 degrees C. *Blood.* 1984;64(2):406-414.
34. Garcia-Souza LF, Oliveira MF. Mitochondria: biological roles in platelet physiology and pathology. *Int J Biochem Cell Biol.* 2014;50:156-160. doi:10.1016/j.biocel.2014.02.015
35. Detwiler TC. Control of energy metabolism in platelets. The effects of thrombin and cyanide on glycolysis. *Biochim Biophys Acta BBA - Bioenerg.* 1972;256(2):163-174. doi:10.1016/0005-2728(72)90049-7
36. Donabedian R, Nemerson Y. Fatty acid oxidation by human platelets and its stimulation by thrombin. *Am J Physiol-Leg Content.* 1971;221(5):1283-1286. doi:10.1152/ajplegacy.1971.221.5.1283
37. Szabo L, Eckert A, Grimm A. Insights into Disease-Associated Tau Impact on Mitochondria. *Int J Mol Sci.* 2020;21:6344. doi:10.3390/ijms21176344
38. Korla K, Mitra C. Modelling the Krebs cycle and oxidative phosphorylation. *J Biomol Struct Dyn.* 2013;32. doi:10.1080/07391102.2012.762723
39. Gnaiger E. *Mitochondrial Pathways and Respiratory Control: An Introduction to OXPHOS Analysis.* 4th ed. OROBOROS INSTRUMENTS Corp; 2014.
40. The leaky mitochondrion. The Physiological Society. Accessed January 2, 2022. <https://www.physoc.org/magazine-articles/the-leaky-mitochondrion/>
41. Berry BJ, Trewin AJ, Amitrano AM, Kim M, Wojtovich AP. Use the Protonmotive Force: Mitochondrial Uncoupling and Reactive Oxygen Species. *J Mol Biol.* 2018;430(21):3873-3891. doi:10.1016/j.jmb.2018.03.025

42. Mitochondriale Erkrankungen. LMU Klinik der Universität München: Friedrich-Baur-Institut. Accessed January 2, 2022. [http://www.klinikum.uni-muenchen.de/Friedrich-Baur-Institut/de/krankheitsbilder/mitochondriale\\_erkrankungen/](http://www.klinikum.uni-muenchen.de/Friedrich-Baur-Institut/de/krankheitsbilder/mitochondriale_erkrankungen/)
43. Sjövall F, Hansson MJ, Elmér E. Platelet mitochondrial function in sepsis. *Crit Care Med.* 2012;40(1):357; author reply 357-358. doi:10.1097/CCM.0b013e318232949c
44. Frese JP, Gratl A, Raude B, Speichinger F, Pesta D, Greiner A. Hochauflösende Respirometrie zur Beurteilung der Mitochondrienfunktion bei PAVK. *Gefäßchirurgie.* 2020;25(4):226-231. doi:10.1007/s00772-020-00652-1
45. Hauptmann S, Keil U, Scherping I, Bonert A, Eckert A, Müller WE. Mitochondrial dysfunction in sporadic and genetic Alzheimer's disease. *Exp Gerontol.* 2006;41(7):668-673. doi:10.1016/j.exger.2006.03.012
46. Merlo Pich M, Bovina C, Formigini G, et al. Inhibitor sensitivity of respiratory complex I in human platelets: A possible biomarker of ageing. *FEBS Lett.* 1996;380(1):176-178. doi:10.1016/0014-5793(96)00037-3
47. Gnaiger E. Polarographic Oxygen Sensors, the Oxygraph, and High-Resolution Respirometry to Assess Mitochondrial Function. In: *Mitochondrial Dysfunction in Drug-Induced Toxicity.* ; 2008:325-352. doi:10.1002/9780470372531.ch12
48. Sjövall F, Ehinger JKH, Marelsson SE, et al. Mitochondrial respiration in human viable platelets--methodology and influence of gender, age and storage. *Mitochondrion.* 2013;13(1):7-14. doi:10.1016/j.mito.2012.11.001
49. Brand MD, Nicholls DG. Assessing mitochondrial dysfunction in cells. *Biochem J.* 2011;435(2):297-312. doi:10.1042/BJ20110162
50. Polarographic apparatus for measurement of dissolved oxygen (oxygraph for mitochondria studies). Accessed January 3, 2022. <http://www.ruf.rice.edu/~bioslabs/studies/mitochondria/oxygraph.html>
51. Brand MD. The proton leak across the mitochondrial inner membrane. *Biochim Biophys Acta.* 1990;1018(2-3):128-133.
52. Bundesärztekammer. *Querschnitts-Leitlinien zur Therapie mit Blutkomponenten und Plasmaderivaten: Gesamtnovelle 2020.*; 2020:287. Accessed October 20, 2021. [https://www.bundesaerztekammer.de/fileadmin/user\\_upload/downloads/pdf-](https://www.bundesaerztekammer.de/fileadmin/user_upload/downloads/pdf-)

- Ordner/MuE/Querschnitts-  
Leitlinien\_BAEK\_zur\_Therapie\_mit\_Blutkomponenten\_und\_Plasmaderivaten-  
Gesamtnovelle\_2020.pdf
53. Estcourt LJ. Why has demand for platelet components increased? A review. *Transfus Med.* 2014;24(5):260-268. doi:10.1111/tme.12155
  54. Henseler O, Heiden M, Haschberger B, Hesse J, Seitz R. Bericht zur Meldung nach § 21 TFG für das Jahr 2007. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz.* 2009;52(7):715-731. doi:10.1007/s00103-009-0901-x
  55. Suck G, Brixner V, Müller M, Zeiler T. Herstellung von Blutkomponenten aus Vollblutspenden aus der Perspektive großer Blutspendedienste. *Hämotherapie.* 2019;(33).
  56. Downing S, Klement G. Isolation and proteomic analysis of platelets by SELDI-TOF MS. *Methods Mol Biol Clifton NJ.* 2012;818:153-170. doi:10.1007/978-1-61779-418-6\_12
  57. Mohr H. Plasmareduzierte Thrombozytenkonzentrate aus gepoolten Buffy Coats. *Hämotherapie.* 2004;Regionalteil Niedersachsen, Sachsen-Anhalt,Thüringen, Bremen(3).
  58. Was passiert mit dem Blut nach einer Blutspende? Deutsches Rotes Kreuz DRK-Blutspendedienst: DRK Blutspende-Magazin. Accessed January 8, 2022. <https://magazin.blutspende.de/von-a-bis-0/was-passiert-mit-dem-blut-nach-einer-blutspende>
  59. Carmen R. The selection of plastic materials for blood bags. *Transfus Med Rev.* 1993;7(1):1-10. doi:10.1016/s0887-7963(93)70027-9
  60. Bundesärztekammer. *Richtlinie Zur Gewinnung von Blut Und Blutbestandteilen Und Zur Anwendung von Blutprodukten (Richtlinie Hämotherapie). Aufgestellt Gemäß §§ 12a Und 18 Transfusionsgesetz von Der Bundesärztekammer Im Einvernehmen Mit Dem Paul-Ehrlich-Institut. Gesamtnovelle 2017, Umschriebene Fortschreibung 2021.*; 2017. Accessed October 20, 2021. [https://www.bundesaerztekammer.de/fileadmin/user\\_upload/downloads/pdf-Ordner/RL/Richtlinie\\_Haemotherapie\\_AEV.pdf](https://www.bundesaerztekammer.de/fileadmin/user_upload/downloads/pdf-Ordner/RL/Richtlinie_Haemotherapie_AEV.pdf)

61. Holme S, Sawyer S, Heaton A, Sweeney JD. Studies on platelets exposed to or stored at temperatures below 20°C or above 24°C. *Transfusion (Paris)*. 1997;37(1):5-11. doi:10.1046/j.1537-2995.1997.37197176944.x
62. Hoffmeister KM, Falet H, Toker A, Barkalow KL, Stossel TP, Hartwig JH. Mechanisms of cold-induced platelet actin assembly. *J Biol Chem*. 2001;276(27):24751-24759. doi:10.1074/jbc.M011642200
63. Egidi MG, D'Alessandro A, Mandarello G, Zolla L. Troubleshooting in platelet storage temperature and new perspectives through proteomics. *Blood Transfus Trasmfus Sangue*. 2010;8(Suppl 3):73-81. doi:10.2450/2010.012S
64. Murphy S, Gardner FH. Platelet storage at 22 degrees C: role of gas transport across plastic containers in maintenance of viability. *Blood*. 1975;46(2):209-218.
65. Hunter S, Nixon J, Murphy S. The effect of the interruption of agitation on platelet quality during storage for transfusion. *Transfusion (Paris)*. 2001;41(6):809-814. doi:10.1046/j.1537-2995.2001.41060809.x
66. Mitteilung des Arbeitskreises Blut des Bundesministeriums für Gesundheit. Festlegung der Haltbarkeitsfrist von Thrombozytenkonzentraten mit dem Ziel der Reduktion lebensbedrohlicher septischer Transfusionsreaktionen durch bakterielle Kontamination. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz*. 2008;51:1484.
67. Berghammer B. *Einführung Einer Neuartigen Qualitätskontrolle (Multiplate®) Für Thrombozytenapheresekonzentrate*. (Dissertation, Medizin). Klinik für Anaesthesiologie Klinikum der Universität München; 2010.
68. Wittmann G, Romann A, Conell B, Becker G, Calatzis A, Schramm W. Functional quality control of platelet concentrates using multiple electrode aggregometry. *50th Annual Meeting of the Society of Thrombosis and Haemostasis*. Published online 2006:363.
69. Perales Villarroel JP, Figueredo R, Guan Y, et al. Increased platelet storage time is associated with mitochondrial dysfunction and impaired platelet function. *J Surg Res*. 2013;184(1):422-429. doi:10.1016/j.jss.2013.05.097
70. Skripchenko A, Myrup A, Thompson-Montgomery D, Awatefe H, Moroff G, Wagner SJ. Periods without agitation diminish platelet mitochondrial function

- during storage. *Transfusion (Paris)*. 2010;50(2):390-399. doi:10.1111/j.1537-2995.2009.02450.x
71. Skripchenko A, Kurtz J, Moroff G, Wagner SJ. Platelet products prepared by different methods of sedimentation undergo platelet activation differently during storage. *Transfusion (Paris)*. 2008;48(7):1469-1477. doi:10.1111/j.1537-2995.2008.01733.x
72. Diab YA, Thomas A, Luban NLC, Wong ECC, Wagner SJ, Levy RJ. Acquired cytochrome C oxidase impairment in apheresis platelets during storage: a possible mechanism for depletion of metabolic adenosine triphosphate. *Transfusion (Paris)*. 2012;52(5):1024-1030. doi:10.1111/j.1537-2995.2011.03446.x
73. Dumont LJ, Gulliksson H, Van Der Meer PF, et al. Interruption of agitation of platelet concentrates: a multicenter in vitro study by the BEST Collaborative on the effects of shipping platelets. *Transfusion (Paris)*. 2007;47(9):1666-1673. doi:10.1111/j.1537-2995.2007.01339.x
74. Van Der Meer PF, Liefiting LAE, Pietersz RNI. The effect of interruption of agitation on in vitro measures of platelet concentrates in additive solution. *Transfusion (Paris)*. 2007;47(6):955-959. doi:10.1111/j.1537-2995.2007.01226.x
75. Jámbor C, Weber CF, Beesel K van, Mueller M, Zwissler B. In vitro platelet function of platelet concentrates transfused to high risk cardiac surgery patients as determined bedside by the Multiplate impedance aggregometry: 6AP2-1. *Eur J Anaesthesiol*. 2008;25:83.
76. Jilma-Stohlawetz P, Eichelberger B, Horvath M, Jilma B, Panzer S. In vitro platelet function of PC prepared using three different apheresis devices determined by impedance and optical aggregometry. *Transfusion (Paris)*. 2009;49:1564-1568. doi:10.1111/j.1537-2995.2009.02171.x
77. Blutbeutelssysteme und Zubehör: Transferbeutel für die sichere, einfache, schnelle, standardisierte und moderne Blutverarbeitung. Fresenius Kabi caring for life. Accessed January 23, 2019. <https://www.fresenius-kabi.com/de/medizinprodukte/transferbeutel>

78. Rauch C, Feifel E, Amann EM, et al. Alternatives to the Use of Fetal Bovine Serum: Human Platelet Lysates as a Serum Substitute in Cell Culture Media. *ALTEX*. 2011;28:305-316. doi:10.14573/altex.2011.4.305
79. Shams Hakimi C, Hesse C, Wallén H, Boulund F, Grahn A, Jeppsson A. In vitro assessment of platelet concentrates with multiple electrode aggregometry. *Platelets*. 2015;26(2):132-137. doi:10.3109/09537104.2014.898141
80. Cakirca G, Erdal H. The Effect of Pneumatic Tube Systems on the Hemolysis of Biochemistry Blood Samples. *J Emerg Nurs*. 2017;43(3):255-258. doi:10.1016/j.jen.2016.09.007
81. Phelan MP, Reineks EZ, Hustey FM, et al. Does Pneumatic Tube System Transport Contribute to Hemolysis in ED Blood Samples? *West J Emerg Med*. 2016;17(5):557-560. doi:10.5811/westjem.2016.6.29948
82. Subbarayan D, Choccalingam C, Lakshmi CKA. The Effects of Sample Transport by Pneumatic Tube System on Routine Hematology and Coagulation Tests. *Adv Hematol*. 2018;2018:6940152-6940152.
83. Sandgren P, Larsson S, Wai-San P, Aspevall-Diedrich B. The effects of pneumatic tube transport on fresh and stored platelets in additive solution. *Blood Transfus*. 2014;12(1):85-90. doi:10.2450/2013.0097-13
84. Reddoch KM, Pidcoke HF, Montgomery RK, et al. Hemostatic function of apheresis platelets stored at 4°C and 22°C. *Shock Augusta Ga*. 2014;41(Suppl 1):54-61. doi:10.1097/SHK.0000000000000082
85. Ng MSY, Tung JP, Fraser JF. Platelet Storage Lesions: What More Do We Know Now? *Transfus Med Rev*. Published online April 17, 2018. doi:10.1016/j.tmr.2018.04.001
86. Sahler J, Grimshaw K, Spinelli SL, Refaai MA, Phipps RP, Blumberg N. Platelet storage and transfusions: New concerns associated with an old therapy. *Drug Discov Today Dis Mech*. 2011;8(1):e9-e14. doi:https://doi.org/10.1016/j.ddmec.2011.06.001
87. Rinder C, Mathew J, Rinder H, Bonan J, Ault K, Smith B. Modulation of platelet surface adhesion receptors during cardiopulmonary bypass. *Anesthesiology*. 1991;75(4):563—570. doi:10.1097/00000542-199110000-00004

88. Van Der Meer PF, Gulliksson H, AuBuchon JP, et al. Interruption of agitation of platelet concentrates: effects on in vitro parameters. *Vox Sang.* 2005;88(4):227-234. doi:10.1111/j.1423-0410.2005.00621.x
89. Zhao R, Jiang S, Zhang L, Yu Z. Mitochondrial electron transport chain, ROS generation and uncoupling (Review). *Int J Mol Med.* 2019;44(1):3-15. doi:10.3892/ijmm.2019.4188
90. Salin K, Auer SK, Rudolf AM, Anderson GJ, Selman C, Metcalfe NB. Variation in Metabolic Rate among Individuals Is Related to Tissue-Specific Differences in Mitochondrial Leak Respiration. *Physiol Biochem Zool.* 2016;89(6):511-523. doi:10.1086/688769
91. Dranka BP, Hill BG, Darley-USmar VM. Mitochondrial reserve capacity in endothelial cells: The impact of nitric oxide and reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med.* 2010;48(7):905-914. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2010.01.015
92. FCCP, mitochondrial oxidative phosphorylation uncoupler (ab120081). Abcam. Accessed October 20, 2021. <https://www.abcam.com/fccp-mitochondrial-oxidative-phosphorylation-uncoupler-ab120081.html>
93. Lactate. Wikipedia. Accessed October 20, 2021. <https://de.wikipedia.org/wiki/Lactate>
94. Ghasemzadeh M, Hosseini E. Platelet granule release is associated with reactive oxygen species generation during platelet storage: A direct link between platelet pro-inflammatory and oxidation states. *Thromb Res.* 2017;156:101-104. doi:10.1016/j.thromres.2017.06.016
95. Ghasemzadeh M, Hosseini E, Shahbaz Ghasabeh A, Mousavi Hosseini K. Reactive Oxygen Species Generated by CD45-Cells Distinct from Leukocyte Population in Platelet Concentrates Is Correlated with the Expression and Release of Platelet Activation Markers during Storage. *Transfus Med Hemother.* 2018;45(1):33-41. doi:10.1159/000475845
96. Larsen S, Nielsen J, Hansen CN, et al. Biomarkers of mitochondrial content in skeletal muscle of healthy young human subjects. *J Physiol.* 2012;590(14):3349-3360. doi:10.1113/jphysiol.2012.230185

97. MacInnis MJ, Gibala MJ. Physiological adaptations to interval training and the role of exercise intensity. *J Physiol.* 2017;595(9):2915-2930. doi:10.1113/JP273196
98. Schrezenmeier H, Seifried E. Buffy-coat-derived pooled platelet concentrates and apheresis platelet concentrates: which product type should be preferred? *Vox Sang.* 2010;99(1):1-15. doi:10.1111/j.1423-0410.2009.01295.x

## **Lebenslauf**

### **Persönliche Daten**

Geburtsdatum/-ort: 30. Juli 1993, Bayreuth  
Nationalität: Deutsch

### **Akademischer Werdegang**

10/2011 – 11/2018 Studium der Humanmedizin, Goethe-Universität Frankfurt  
11/2018 Approbation als Ärztin  
09/2003 – 07/2011 Graf-Münster-Gymnasium, Bayreuth  
07/2011 Allgemeine Hochschulreife

### **Beruflicher Werdegang**

Seit 04/2019 Assistenzärztin im Bereich der Anästhesiologie und  
Intensivmedizin im Klinikum Frankfurt Höchst

Seit 09/2021 Zusatzbezeichnung Notfallmedizin

Seit 11/2016 ACLS-Instruktor,  
regelmäßige Zertifizierungen und Durchführen von Trainings

11/2017 – 10/2018 Anästhesie Tertial: Sana Klinikum, Offenbach  
Innere Tertial: Sana Klinikum, Offenbach  
Chirurgie Tertial: Sana Klinikum, Offenbach  
Hospital Civil Nuevo/ Hospital Civil Viejo,  
Guadalajara, Mexiko

Famulaturen ZNA, Allgemeinmedizin, Radiologie, IMC/ICU,  
Rheumatologie, Plastische Chirurgie

Nebentätigkeiten Mitarbeit im Simulationszentrum für Notfallmedizin der Uniklinik  
Frankfurt (2015-2018), OP-Assistenz und Tutor in Anatomie/  
Histologie (2013-2015)

Frankfurt, den 25.01.2022



Sarah Kübel