

Aus der Medizinischen Klinik mit
Schwerpunkt Hämatologie und Onkologie
der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Durchflußzytometrische Analyse von Thrombozytenmembranproteinen in der
Regenerationsphase der Thrombopoese nach Knochenmark- und
Stammzelltransplantation**

**zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)**

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité –
Universitätsmedizin Berlin

von

Annette Klemens
aus Berlin

Gutachter :

- 1. Prof. Dr. med. H. Riess**
- 2. Prof. Dr. med. H. Rüden**
- 3. Priv.-Doz. Dr. M. Spannagel**

Datum der Promotion : 22. Februar 2008

Ich, Annette Klemens, erkläre an Eides statt, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Durchflußzytometrische Analyse von Thrombozytenmembranproteinen in der Regenerationsphase der Thrombopoese nach Knochenmark- und Stammzelltransplantation“, selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Danksagung

Mein besonders herzlicher Dank gilt zunächst Herrn Prof. Dr. H. Riess für die Überlassung des Themas und die weitere Betreuung der Arbeit bis zur Fertigstellung.

Anfangs wurde ich durch Herrn Dr. Matthias Riewald und meiner MTA-Kollegin Christa Isenberg betreut und vom ärztlichen als auch vom pflegerischen Personal der Station 5 a bei der praktischen Durchführung der Arbeit unterstützt.

Ihnen und vor allem den bereitwilligen Patientinnen und Patienten auf den hämatologisch-onkologischen Stationen danke ich für ihre Mithilfe.

Herr Dr. Ulrich Wünsche war maßgeblich an der statistischen Bewertung beteiligt, ihm danke ich sehr herzlich für seine unermüdliche Unterstützung.

Meinen Eltern, meinen Schwestern Frau Uta Billermann und Frau Dr. Inken Klemens und ihren Familien danke ich an dieser Stelle sehr herzlich für ihre immerwährenden Ermutigungen.

Meinen Kindern Alexander und Carolin danke ich ganz herzlich für ihre Liebe und Geduld und meinem Freund Herrn Dr. Hanno Paetsch für seine liebevolle Unterstützung.

1 Inhaltsverzeichnis

1	Inhaltsverzeichnis	5
2	Einleitung	6
2.1	Aufbau der Thrombozyten und ihre Rolle bei der Hämostase	6
2.2	Die Membranglykoproteine der Thrombozyten	7
2.3	Monoklonale Antikörper (AK)	10
2.4	Thrombozytopoese und ihre Regulation	11
2.5	Stammzelltherapie	12
2.6	Akute lymphatische Leukämie (ALL)	16
2.7	Akute myeloische Leukämie (AML)	17
2.8	Chronische myeloische Leukämie (CML)	18
2.9	Myelodysplastisches Syndrom (MDS)	19
2.10	Maligne Lymphome	19
2.11	Keimzelltumoren	20
2.12	Weichteilsarkome	21
2.13	Einsatz von Thrombozytenkonzentraten	22
3	Fragestellung	24
4	Patienten und Methode	25
4.1	Patienten und ihre Diagnosen	25
4.2	Einführung in die Methode	26
4.2.1	Prinzip der Durchflußzytometrie und seine Anwendung	28
4.2.2	Gewinnung und Aufarbeitung der Proben	29
4.2.3	Geräte	30
4.2.4	Materialien und Reagenzien	31
4.2.5	Versuchsdurchführung und Auswertung	32
4.3	Statistische Auswertung	38
5	Ergebnisse	39
5.1	Darstellung der Messwerte	41
5.2	Thrombozytenparameter PDW, MPV und P-LCR	63
5.3	Zellpopulation	65
6	Diskussion	66
6.1	Gruppeneinteilung der Patienten	67
6.2	Die Expression der Thrombozyten-Membranglykoproteine	67
6.3	Die Thrombozytenparameter PDW (platelet distribution width), MPV (mean platelet volume) und P-LCR (platelet-large cell ratio) im Verlauf	71
6.4	Die Membranglykoproteinexpression im nicht aktivierten Probenansatz im Vergleich zum aktivierten Probenansatz	72
6.5	Einfluß der Medikamente auf die Membranglykoproteinexpression	74
6.6	Das Phänomen Zellpopulation	75
7	Zusammenfassende Diskussion	77
8	Literaturverzeichnis	80

Anhang
Lebenslauf

2 Einleitung

2.1 Aufbau der Thrombozyten und ihre Rolle bei der Hämostase

Normal zirkulierende Thrombozyten sind kernlose korpuskuläre Blutbestandteile mit einer Dicke von etwa 0,5-0,75 μm , einem Durchmesser von etwa 1,5-3,5 μm und einem Volumen von 7,4-10,4 fl. Während einer gesteigerten Thrombopoese sind vermehrt große Thrombozyten (12 fl) im peripheren Blut nachweisbar; deshalb wird vermutet, daß es sich dabei um junge Formen handelt (1). Das Innere des Thrombozyten besteht aus dem Granulomer, das alle granulären Strukturen enthält, und ist vom Hyalomer umgeben, dessen wesentliche Aufgaben in der Aufrechterhaltung der Zellform und der Kontraktion liegen. In der Phospholipid-Zellmembran ist als wesentlicher Faktor der thromboplastischen Aktivität der Plättchenfaktor 3 lokalisiert. Dieses Phospholipid dient als Oberfläche für die Aktivierung von Gerinnungsfaktoren. Von den intrazellulären granulären Strukturen konnten mit immunzytochemischen Methoden vier Typen von Granula unterschieden werden (2):

- 1) *Alpha-Granula* enthalten Fibrinogen, Plättchenfaktor 4, β -Thromboglobulin, Plättchen-Wachstumsfaktoren (beispielsweise *platelet derived growth factor-PDGF*) und in ihren Membranen das Glykoprotein (GP) P-Selektin (*CD 62*).
- 2) *Lambda-Granula* oder Lysosomen, die hydrolytische Enzyme wie saure Hydrolase, Kathepsin, Heparinidase und in ihren Membranen das GP 53 (*CD 63*) enthalten,
- 3) *Delta-Granula* oder „dichte Körper“ (*dense bodies*) mit unter anderem ADP, ATP, Guanin-Nukleotiden, Calcium und Serotonin (3) sowie
- 4) *Peroxisomen* mit Katalase (4).

Thrombozyten können je nach Funktionszustand ihre Form charakteristisch verändern. Während inaktive Thrombozyten in elliptischer Form zirkulieren, führt eine Aktivierung durch Mediatoren, Scherkräfte oder eine Gefäßverletzung mit Kontakt zu subendothelialen Strukturen (Kollagen) zur Pseudopodienbildung und im weiteren zur Degranulierung und Sekretion. Dieser Formwandel geht u.a. mit einer Adhäsion am Subendothel einher, die wiederum durch den Brückenbildner von-Willebrand-Faktor zwischen Plättchen und Subendothel ermöglicht wird. Bei der in drei Schritten ablaufenden primären Hämostase nehmen die Thrombozyten die folgenden wichtigen Rollen ein:

Nach Läsion des Blutgefäßes folgt die Gefäßverengung durch Gefäßmuskelkontraktion. Hier ist u.a. Thromboxan oder Serotonin aus den dense bodies der Thrombozyten als Vasokonstriktor beteiligt (5).

Im zweiten Schritt erfolgt die Adhäsion der Plättchen am Subendothel und dann die Aggregation mit Bildung eines hämostatischen Pfropfs. Das primäre Plättchenaggregat ist dabei relativ instabil.

In der nun folgenden sekundären Hämostase wird die Gerinnungskaskade aktiviert und Thrombin und Fibrin werden in der Umgebung des Plättchenaggregats gebildet.

Durch Anlagerung von Fibrin an das Plättchenaggregat werden die Thrombozyten quervernetzt und durch Gerinnselretraktion der hämostatische Blutkuchen verfestigt (6).

Die Aggregation wird unter anderem durch Adenosindiphosphat (ADP), Adrenalin, Thrombin, Collagen, Serotonin, Vasopressin, Plättchenaktivierender Faktor, Arachidonsäure und deren Metabolite ausgelöst. In Reaktion mit dem GP IIb/IIIa-Komplex als Rezeptor auf der Thrombozytenoberfläche zur Fibrinogen-Brückenbildung führen diese Substanzen dann über die Freisetzung von Inhaltsstoffen wie ADP rasch zu dem charakteristischen Formwandel mit Verfügbarmachung von optimalen Phospholipiden (PF 3), an deren Oberfläche die plasmatische Gerinnung abläuft (sekundäre Hämostase).

Im Rahmen der Hämostase übernehmen die Thrombozyten somit v.a. drei wichtige Aufgaben:

1. Sie führen durch Adhäsion und Aggregation zur Bildung eines Plättchenpfropfs,
2. Sie liefern mit dem Plättchenfaktor 3 die für die sekundäre Hämostase notwendigen Phospholipide.
3. Durch Gerinnselretraktion mit Hilfe von Fibrin führen die Thrombozyten zu einer Stabilisation des Blutkuchens.

2.2 Die Membranglykoproteine der Thrombozyten

Das seit 30 Jahren bekannte „fluid mosaic“-Modell der Plasmamembran als Begrenzung der eukaryoten Zelle und seine Weiterentwicklung in einer heutigen Version beschreibt zwei wesentliche Strukturelemente. Neben den in einer Doppelschicht angeordneten Membranlipiden sind sowohl als integraler Bestandteil, als auch in peripherer Position *Membranproteine* zu nennen (7). Dies sind meistens Glykoproteine (GP), deren Zuckerketten mit verschiedenen Aminosäuren verknüpft sind. Darüberhinaus sind in unterschiedlichen Anteilen Glykolipide und Neutralfette in der asymmetrischen und polaren Biomembran verankert.

Die Biomembran ist einem fortlaufenden Umbauprozess unterworfen. Die Synthese einzelner Membranbestandteile erfolgt im rauhen und glatten endoplasmatischen Retikulum und der Membranfluß zwischen diesen innerzytoplasmatischen Elementen und der Plasmamembran wird ständig aufrechterhalten. Als Transportwege von extra- nach intrazellulär und in umgekehrter Richtung existiert neben der Interaktion der Membranproteine mit dem Zytoskelett auch die Möglichkeit des Transports über Vesikel (9). Die Diffusion von Lipiden als Austausch zwischen unterschiedlichen Membranbereichen wird durch ein System von Schlußleisten, sogenannten „*tight junctions*“, verhindert (10). So ist die Lipiddoppelschicht nur für hydrophobe und kleine polare Moleküle durchlässig. Die Membranproteine, als wichtiger Bestandteil des Stoffaustausch- und Informationssystems zwischen dem extra- und dem intrazellulären Raum, übernehmen im funktionellen Ablauf auch die Rolle der Rezeptoren für Hormone und Mediatoren (12).

In dieser Arbeit sind mithilfe monoklonaler Antikörper die Membranglykoproteine Ib (*bekannt als Antigen CD 42 b*), IIb, IIIa (*im Komplex bekannt als Antigen CD 41 a*), IV (*CD 36*), IX, P-Selektin (*CD 62, GMP 140, PADGEM*), und GP 53 (*CD 63*) untersucht worden, welche maßgeblich an der Kommunikation der Thrombozyten mit anderen Zellen, Bestandteilen des Plasmas und der Gefäßwand beteiligt sind und als Rezeptoren für Liganden dienen, die die Adhäsion und Aggregation der Thrombozyten bedingen (13).

Die Membranglykoproteine Ib und IX befinden sich in Form nichtkovalenter Ib-IX-V-Komplexe in der Zellmembran der Thrombozyten (14), deren Zahl in normalen Thrombozyten mit näherungsweise 25.000 angegeben wird (16).

Der GP Ib/IX- Komplex bindet u.a. Thrombin, ist aber vor allem ein Rezeptor für den von-Willebrand-Faktor (vWF), der von Endothelzellen und Megakaryozyten synthetisiert wird. Die Interaktion von GP Ib/IX mit subendotheliale vWF ist essentiell für die Adhäsion von Thrombozyten bei hohen Scherkräften, wie sie in der arteriellen Strombahn herrschen (17). Ein Defekt oder ein Fehlen des GP Ib liegt dem 1948 beschriebenen Bernard-Soulier-Syndrom zugrunde (18). Klinisch ist es durch eine Blutungsneigung bei Thrombozytopenie und vergrößerten Blutplättchen gekennzeichnet.

Der Plättchen-zu-Plättchen-Kontakt, die Plättchenaggregation, ist wesentlich an die Funktion des GP IIb/IIIa- Komplexes gebunden, dessen Ligand Fibrinogen über Calcium interthrombozytär brückenbildend wirkt (3) und zur Zusammenlagerung der Plättchen führt. Ebenfalls als Liganden fungieren Thrombospondin, Fibronectin, Vitronectin und der von-Willebrand-Faktor (vWF), der

in geschädigten Gefäßen im Bereich hoher Scherkräfte in der arteriellen Strombahn aufgrund seiner hohen Bindungsaffinität gegenüber Gefäßendothel und Thrombozyten die entscheidende Rolle bei der Adhäsion spielt und in der Gerinnungskaskade als Carrier des Faktor VIII die Aktivierung der Gerinnungsfaktoren IX und X beschleunigt (22).

Darüberhinaus vermittelt der vWF als Ristocetin-Cofactor die Plättchenaggregation bzw. -agglutination über die Membranrezeptoren GP I b und GP IIb/IIIa (24).

Exprimiert wird der GP IIb/IIIa-Komplex ausschließlich auf der Zelloberfläche von Megakaryozyten, Thrombozyten (23) und auf den Membranen der alpha-Granula innerhalb der Thrombozyten (3). Seine Zahl auf einem normalen Thrombozyten ist mit etwa 50.000 ungewöhnlich hoch (dies entspricht ca. 1-2% des gesamten Plättchenproteins).

In ruhenden Thrombozyten ist die Affinität des GP IIb/IIIa-Komplexes zu Fibrinogen gering, erst durch Stimulation (z.B. durch Adenosindiphosphat) (3) und nachfolgender, meßbarer Konformationsänderung wird der GP IIb/IIIa-Komplex zum aktiven Rezeptor für seine Liganden (26) und die Bindung von Fibrinogen kann in zwei kinetisch unterschiedlichen Prozessen ablaufen (27). Durch Thrombozyten, die auf Stimulation mit verminderter Aggregation reagieren, ist die Thrombasthenie Glanzmann gekennzeichnet, denn thrombasthenische Plättchen besitzen weniger GP IIb/IIIa-Komplexe als die Norm (29).

Ebenfalls als Rezeptor für adhäsive Proteine des Subendothels ist das GP IV (IIIb) - auch bekannt als Antigen CD 36 - auf der Thrombozytenoberfläche zu finden (19). Seine ungefähre Zahl auf einem Thrombozyten wird mit 12.000 angegeben (31). Antikörper gegen GP IV reagieren auch mit der Oberfläche von Monozyten, Retikulozyten, Endothelzellen und verschiedenen Tumorzelllinien (32), aber nicht mit Lymphozyten und Granulozyten. Als Liganden fungieren Kollagen, low-density lipoprotein (LDL) (33), mit Plasmodium falciparum infizierte Erythrozyten und Thrombospondin, das auch vom Endothel produziert wird und in funktionelle Vorgänge der Adhäsion und Aggregation involviert ist (34).

Um aktivierte Thrombozyten in Blutproben zu erkennen, wurden in dieser Arbeit mit monoklonalen Antikörpern die Aktivierungsmarker P-Selektin (*GMP 140*, *PADGEM*, *CD 62*) und das GP 53 (*CD 63*) gemessen. Dabei ist bekannt, daß P-Selektin, ein Membranglykoprotein mit einer ungefähren Molekülmasse von 140 Kilodalton, im ruhenden Thrombozyten mit den Membranen der alpha-Granula assoziiert ist und erst nach Aktivierung der Thrombozyten auf der Zelloberfläche nachgewiesen werden kann (2). Alpha-Granula werden bereits in den megakaryozytären Vorläuferzellen produziert und treten während der Reifungsperiode immer

ausgeprägter in Erscheinung. In den Granula von Endothelzellen, den Weibel-Palade-Körperchen, ist P-Selektin ebenfalls präsent und auch hier wird es erst nach Aktivierung durch Thrombin, Histamin oder Komplementfaktoren (37) auf der Endothelzelloberfläche exprimiert (38). Sowohl auf der Zellmembranoberfläche der Thrombozyten als auch der Endothelzellen übernimmt das P-Selektin die Funktion eines Adhäsionsmoleküls (39) und vermittelt u.a. die Adhäsion von Thrombozyten an verschiedene Typen von Leukozyten (40).

Das Glykomembranprotein 53 (*CD 63*) hat ebenfalls seine Eignung als Marker für die Thrombozytenaktivierung unter Beweis gestellt. Als Bestandteil der innerthrombozytären Lysosomenmembranen mit einem molekularen Gewicht von 30-60 Kilodalton wird es während der Plättchensekretion und der damit verbundenen Verschmelzung der Lysosomen- und Granulamembranen mit der Plasmamembran auf der Zelloberfläche der Thrombozyten zugänglich (38). Diese Expression kann z.B. durch Thrombin hervorgerufen werden und führt dann zu näherungsweise 9000-13.000 Molekülen auf der Oberfläche (42). Darüberhinaus erscheint GP 53 auf der Zelloberfläche von zytotoxischen T-Lymphozyten und aktivierten basophilen Granulozyten (43) sowie Zellen maligner Melanome, Adenokarzinome und neuroendokriner Tumoren (44), aber nicht auf der Oberfläche von Erythrozyten.

2.3 Monoklonale Antikörper (AK)

AK sind definitionsgemäß Immunglobuline (Ig), Moleküle mit einer bestimmten Aminosäuresequenz und Oberflächenkonfiguration, deren Spezifität ihnen die Bindung an ein spezifisches Antigen (Ag) ermöglicht. Die Bindungsbereiche des Ag's für den AK heißen „Ag-Determinanten“ oder „Epitope“ (45).

Die in dieser Arbeit verwendeten monoklonalen AK sind durch Immunisierung von Mäusen mit einem Ag und anschließender Splenektomie der Mäuse und Präparation der Milz in einer Zellsuspension entstanden. Die AK-produzierenden Zellen wurden nach der Hybridom-Technik mit Mäusemyelomzellen fusioniert, die selbst nicht zur AK-Produktion fähig sind und durch Transformation als potentiell unsterblich gelten. So entstanden fusionierte Einzelzellen mit der Fähigkeit zur AK-Produktion, die isoliert werden konnten und jeweils ein Klon monoklonale AK produzierten. Die Vorteile der monoklonalen AK, wie hohe Spezifität und Verfügbarkeit, haben seit ihrer ersten Beschreibung durch Köhler und Milstein 1975 (46) zu einem festen Platz in der Klinik und der Forschung geführt. Neben in dieser Arbeit wichtigen Funktion der monoklonalen

AK zur Charakterisierung von Membranproteinen haben sie unter anderem bei der Identifizierung von Tumorantigenen, in der Serologie von diagnostischen Routinetests zur Messung von Serumspiegeln von Medikamenten und Proteinen und zur Klassifikation von Leukämien, Lymphomen und deren Therapie Eingang gefunden (47).

2.4 Thrombozytose und ihre Regulation

Die Entwicklung der zellulären Elemente des Blutes nimmt ihren Ausgang bei den pluripotenten Stammzellen (SZ), die vor allem im Knochenmark, aber auch im peripheren Blut nachweisbar sind. Sie sorgen durch ständige Reduplikation und Differenzierung für den Erhalt eines funktionierenden hämatopoetischen Systems. Aus den pluripotenten SZ entstehen Vorläuferzellen, die jeweils in nur eine bestimmte Zelllinie differenzieren und zu Granulozyten, Monozyten, Lymphozyten, Erythrozyten oder Thrombozyten mit jeweils spezifischen Enzymsystemen und Zellorganellen führen.

Morphologische und immunologische Charakteristika haben zur Identifizierung von verschiedenen megakaryozytären Vorläuferzellen beigetragen, die über den Megakaryoblasten zum Megakaryozyten reifen. Der Megakaryoblast ist zwar noch zur DNA-Synthese fähig, unterliegt aber keinen Zytoplasmateilungen mehr, so daß im weiteren ein polyploider Chromosomensatz (16 Chromosomensätze im Durchschnitt) resultiert. Die weitere Plasmareifung führt zur Volumenzunahme und zum basophilen Megakaryozyten (Promegakaryozyt), aus dem dann über die Reifungsstufe des granulären der thrombozytenbildende Megakaryozyt entsteht. Gebildet werden die Thrombozyten im Knochenmark (KM) durch Fragmentation aus den Megakaryozyten, deren Plasmamembran in das eigene Zytoplasma invaginiert. Dabei entstehen „Plättchendemarkations-Membranen“, die später die Zellmembranen der Thrombozyten bilden. Als granulähaltige Zytoplasmafragmente gelangen diese sodann in den Markraum oder Sinus.

Über die Regulation der Thrombopoese ist nach heutigem Stand der Forschung bekannt, daß sowohl Thrombozytopenie als auch Thrombozytose über Rückkopplungsmechanismen eine Anpassung der Thrombozytenbildung erwirken, und daß komplexe Mechanismen die Proliferation und anschließende Differenzierung der pluripotenten SZ zu Vorläuferzellen regulieren (48). Koloniestimulierende Faktoren (CSF) oder hämatopoetische Wachstumsfaktoren sind Zytokine, die selbst stimulatorisch oder inhibitorisch wirken und im Zusammenspiel mit

Zellinteraktionen die Thrombopoese beeinflussen. Beispiele für Zytokine mit Wirkung auf die Megakaryozytopoese sind Thrombopoetin, GM (Granulozyten-Makrophagen-)CSF (colony-stimulating factor), Interleukin (IL)-4 und IL-9 (49).

Thrombopoetin, in der Literatur auch als *megakaryocyte growth and development factor (MGDF)* bekannt und identisch mit dem Liganden für das Proto-Onkogen c-mpl, wirkt bereits im frühen Stadium der hämatopoetischen SZ oder der frühen Vorläuferzellen regulatorisch (52). Die Gegenwart von Thrombopoetin erhöht die Anzahl der bei der Thrombopoese gebildeten Plättchen (53) und führt zur gesteigerten Expression sowohl des Membranglykoproteins Ib als auch des Glykomembranproteinkomplexes IIb/IIIa (54).

Beeinflusst wird die Megakaryozytopoese auch durch den Stammzellefaktor (*stem cell factor = SCF*), der dosisabhängig die Anzahl der megakaryozytären Vorläuferzellen (*colony-forming units-megakaryocyte, CFU-MK*) erhöht (55). Die Milz beeinflusst die Zahl der Thrombozyten im peripheren Blut, weil sie als Pool physiologisch bis zu 35% der Thrombozyten speichern kann (bei Splenomegalie bis zu 90 %) und dieser Pool mit dem der Peripherie frei austauschbar ist.

Thrombozyten werden in der Leber und Milz nicht nur abgebaut, sondern die Milz muß auch einen hemmenden Einfluß auf die Produktion haben, denn die nach Splenektomie auftretende Thrombozytose geht weit über das hinaus, was durch Wegfall der Milz als Speicher- und Mauserungsorgan zu erwarten ist. Die fortlaufend ins Blut gelangenden Megakaryozyten werden in der Lunge gefiltert. Nach mechanischer Alteration werden die „Kerneinheiten“ weiter verstoffwechselt, indem aus den Plasmaresten Thrombozytenabspaltungen stattfinden und der Kern von den Makrophagen der Lunge phagozytiert wird.

2.5 Stammzelltherapie

Durch die Transplantation von Stammzellen (Stammzelltransplantation = SZT) nach Hochdosischemotherapie können bestimmte hämatologische und onkologische Erkrankungen unter kurativem Aspekt behandelt werden. Erfolgt die Stammzellgewinnung dabei aus dem Knochenmark (KM), so spricht man von Knochenmarktransplantation (KMT), erfolgt sie aus dem peripheren Blut, so von peripherer Blutstammzelltransplantation (PBSZT).

Bei einer *autologen* SZT werden die Stammzellen dem Patienten wieder reinfundiert.

Bei einer *allogenen* SZT stammen sie von einem anderen Individuum. Entweder wirken Verwandte als Spender, die HLA („human leukocyte antigen system“) - identisch bzw. partiell identisch sind oder HLA-verwandte Personen aus einem der international geführten Spendenregister.

Im ersten Abschnitt der SZT wird eine Konditionierung durchgeführt:

Anhand von verschiedenen Konditionierungsprogrammen, die aus ultrahoch dosierter Chemotherapie und/ oder fraktionierter Ganzkörperbestrahlung bestehen, wird eine vollständige Beseitigung der malignen Zellpopulation angestrebt.

Ein bis zwei Tage nach der Konditionierung werden die SZ dem Patienten dann über einen großvolumigen zentralvenösen Katheter infundiert.

Die periphere Blutstammzelltransplantation (PBSZT) hat in den letzten Jahren die *autologe* Knochenmarktransplantation kontinuierlich ersetzt.

Das schnellere Anwachsen (Engraftment) peripherer Stammzellen sowie die den Spender weniger belastende Stammzellgewinnung sind hierfür die Gründe. Für Thrombozyten und Neutrophile beträgt das Engraftment bei PBSZT normalerweise zehn Tage bis zwei Wochen, erfolgt jedoch bei autologer KMT erst nach zwei bis vier Wochen.

Weitere Vorteile der PBSZT gegenüber der autologen KMT sind die höhere Variabilität der Stammzellgewinnung mit der Möglichkeit, die Stammzellapherese an mehreren aufeinander folgenden Tagen durchzuführen, während bei der autologen KMT die Gewinnung der Standardmenge von ca. 1 Liter Knochenmarkblut einzeitig erfolgt.

Für den Patienten ist darüber hinaus die KM-Entnahme in Vollnarkose durch multiple Punktionen des Beckenkamms weitaus traumatischer als die Sammlung peripherer Stammzellen mittels eines Zellseparators durch Leukapherese.

Der optimale Zeitpunkt zur peripheren Stammzellentnahme kann durch die durchflußzytometrische Bestimmung der Anzahl von CD 34-positiven Zellen im Blut bestimmt werden, da das von den Vorläuferzellen exprimierte Antigen von monoklonalen Antikörpern der CD 34- Gruppe erkannt wird(59). Um eine möglichst gute Ausbeute an Stammzellen zu erzielen, wird die Freisetzung der Blutprogenitorzellen aus dem KM angeregt. Dies erfolgt heute in der Regenerationsphase nach einer KM-Schädigung (z.B. Chemotherapie) mit nachfolgender Stimulation von hämatopoetischen Wachstumsfaktoren (60). Der Anteil CD 34-positiver Zellen

im KM und Blut kann so um mehr als das 20-fache angehoben werden. Hierbei ist die Stammzellmobilisierung aus dem Knochenmark ins periphere Blut am effektivsten.

Jedoch können hämatopoetische Stammzellen auch nur durch Chemotherapie oder nur durch die Gabe von Wachstumsfaktoren ins periphere Blut mobilisiert werden.

Die therapieassoziierte Mortalität der autologen PBSZT liegt heute weit unter 5 %.

Für die *allogene* Transplantation werden periphere Blutstammzellen nach Mobilisierung mit Wachstumsfaktoren oder Knochenmarkstammzellen von gesunden Spendern eingesetzt.

Optimale Erfolgschancen unabhängig von der Art der Erkrankung sind bei der SZT vor allem dann zu erzielen, wenn sich der Patient vor der SZT durch konventionelle Therapie in Remission befindet, er in einem guten Allgemeinzustand ist und andere günstige prognostische Faktoren, wie Alter <40 Jahre, einen verwandten Spender und keine relevanten Begleiterkrankungen aufweist. Auch unverwandte Spender (Fremdspender) können zur SZT herangezogen werden, wenn auf möglichst vollständige HLA-Identität geachtet wird (57).

HLA-Identität bedeutet serologische Gleichheit der auf den Leukozyten lokalisierten Antigene bezüglich der Determinanten A,B und D und ist verantwortlich für Intensität und Dauer von Abstoßungsreaktionen von Transplantaten, da die Lymphozyten von Spender und Empfänger mit ihren jeweiligen HLA-Antigenen interagieren. Das HLA-System besteht aus Gewebsantigenen, die von einem Komplex, bestehend aus eng gekoppelten Genen, kontrolliert werden und der kollektiv als MHC („*major histocompatibility complex*“) bezeichnet wird. Der MHC ist beim Menschen auf dem 6. Chromosom lokalisiert und kodiert über vier weitgehend identifizierte Genloci A,B,C und D die HLA-Antigene. Dabei sind die Antigene, die von A-,B- oder C-Loci kodiert werden, biochemisch ähnlich und werden als Gruppe der Klasse-I-Antigene zusammengefaßt. Sie befinden sich auf den meisten Zellen des Organismus, während die Klasse-II-Antigene, die von dem Genlocus D kodiert werden, fast nur auf Zellen vorkommen, die aus dem KM stammen.

Unter den vielfältig möglichen Komplikationen nach *allogener* SZT mit meist therapie- oder sepsisbedingten Störungen der Organfunktionen ist insbesondere die immunologische Auseinandersetzung des Transplantats mit dem Empfängerorganismus typisch.

Dies ist dann innerhalb der ersten 100 Tage die sogenannte akute GvHD („*graft-versus-host-disease*“) mit Manifestationen an der Haut (Rötungen und Mukositiden), des Gastrointestinaltraktes (Diarrhoe, Erbrechen, Ileus) und der Leber (cholestatische Hepatitis). Bei

HLA-Identität zwischen Spender und Empfänger beträgt die Auftretenswahrscheinlichkeit ca. 50 %, bei HLA-Mismatch sogar ca. 75%.

Die chronische GvHD tritt bei 25-30% der Patienten im weiteren Verlauf auf und zeigt häufig ein sklerodermieartiges Bild mit Kollagenfaservermehrung der Haut. Im Vergleich zur GvHD ist eine Abstoßung des Transplantats durch den Empfänger (HvGD, „*host-versus-graft disease*“) sehr selten.

Zum einen besteht nach allogener SZT Gefahr für den Patienten durch die prolongierte Zytopenie, zum anderen durch die Komplikationen der akuten GvHD, so daß eine Prophylaxe mittels

- immunsuppressiver Medikation (zumeist Cyclosporin A, Tacrolimus, Steroide) (57)
- oder
- T-Zell-Depletion des Grafts (bei der nur die Lymphozyten durch Bestrahlung zerstört werden)

durchgeführt werden muß.

Mit der Zerstörung der Lymphozyten des Grafts wird jedoch auch der sogenannte GvT („Graft-versus-Tumor“) – Effekt bzw. der GvL („Graft- versus-Leukemia“ oder „Graft-versus-Lymphom“) – Effekt nach allogener SZT verhindert (57). Im Mechanismus ähnlich der GvHD zerstören die funktionierenden Lymphozyten des Transplantats die Restmalignomzellen, die die Konditionierung überlebt haben. (58,61).

Die Kombination der Prävention der akuten GvHD auf der einen Seite und des erwünschten GvL-Effekts auf der anderen ist ein wichtiger Faktor bezüglich des Risikos der Relapse-Rate.

Große Fortschritte in der Reduktion der Relapse-Rate konnten mit der zusätzlichen Gabe von Spender-Lymphozyteninfusionen erzielt werden (58).

Darüberhinaus hängen Relapse-Rate und krankheitsfreie Langzeitremissionen sowohl von der Art der Neoplasie als auch von Art und Zeitpunkt der SZT ab.

Die transplantationsassoziierte Mortalität bei *allogener* SZT liegt somit sehr variabel zwischen 10 und 40 %.

Der erste Versuch allogener SZT fand 1989 an einem Patienten mit akuter lymphatischer Leukämie statt (62), woraufhin weitere Studien folgten (63,64).

Bei der *autologen* SZT ist im Vergleich zur *allogenen* SZT der Vorteil des Fehlens der Abstoßung und GvHD mit dem Nachteil des ebenfalls fehlenden GvT-Effektes verbunden (65).

Zusätzlich besteht das Problem der Kontamination des Stammzellkonzentrats mit restlichen Tumorzellen, wenn das KM dem Patienten in Remission der Erkrankung entnommen und nach Hochdosistherapie reinfundiert wird (57).

Neuere Verfahren der SZT beschäftigen sich mit der ex vivo-Vermehrung mobilisierter und im peripheren Blut angereicherter Vorläuferzellen, die durch Einwirkung von verschiedenen hämatopoetischen Wachstumsfaktoren in vitro zu einem vielfachen Anstieg dieser Zellen führt (61).

Als Indikation zur Stammzelltherapie werden unter anderem folgende Grundkrankheiten betrachtet:

- Akute lymphatische Leukämie
- Akute myeloische Leukämie
- Aplastische Anämie
- Chronische myeloische Leukämie
- Myelodysplastisches Syndrom
- Hodgkin-Lymphom
- Non-Hodgkin-Lymphom
- Keimzelltumoren
- Weichteilsarkome

2.6 Akute lymphatische Leukämie (ALL)

Die ALL ist eine hämatologische Neoplasie lymphatischer Vorläuferzellen mit generalisierter Ausbreitungsform und einem Befall des Knochenmarks mit mehr als 25 % lymphatischer Zellen (66). Je nach Ausgangszelle für die Proliferation des leukämischen Zellklons werden verschiedene Formen unterschieden. Die ALL ist die häufigste Leukose des Kindesalters und 20% der akuten Leukämien bei Erwachsenen sind lymphatisch (67), wobei ein relativ seltenes Auftreten im mittleren Lebensalter von einem zweiten Altersmaximum jenseits des 40. Lebensjahres abgelöst wird. Als ätiologische Faktoren werden neben einer Strahlenexposition (68) eine genetische Disposition (69) sowie eine Belastung mit Chemikalien

und bei der T-ALL Viren (70) diskutiert. Nach der FAB (*französisch-amerikanisch-britische*)-Klassifikation führt die morphologische Unterteilung und die immunologische Charakterisierung u. a. mit Oberflächenmarkern zur definitiven Zuordnung der ALL zu den Formen L 1, L 2, L 3 und klärt die Zugehörigkeit zur B- oder T-Reihe. Während der Knochenmarkausstrich eine dichte Blasteninfiltration mit Verdrängung der einzelnen Zellreihen zeigt, fällt im peripheren Blut bei 90 % der Patienten ein Hiatus leucaemicus (Blasten und segmentkernige Granulozyten) auf. Die Thrombozyten sind in über 80 % der Fälle erniedrigt.

Die Therapie der ALL erfolgt mit kurativer Intention durch Chemotherapie mit Induktions-, Reinduktions-, Konsolidierungszyklen und einer nachfolgenden Erhaltungstherapie.

Als zusätzliche therapeutische Maßnahme wird die allogene SZT in zweiter Remission, bei Hochrisikopatienten in erster Remission durchgeführt (71). Die Langzeitremissionen liegen dann bei ca. 10 – 40 %.

Die Therapie u.a. mit autologer SZT sollte in laufenden Studien erfolgen.

2.7 Akute myeloische Leukämie (AML)

Wie die ALL, so entsteht auch die AML durch maligne Transformation einer hämatopoetischen Stammzelle und die Verdrängung des normalen Knochenmarks durch einen Blasten-Klon verläuft meist rasch progredient. Die Diagnose der akuten myeloischen Leukämie, auch bezeichnet als akute nicht-lymphatische Leukämie, wird ebenfalls ermittelt durch die Charakterisierung der Blasten im Knochenmark und im peripheren Blut (72). Die Thrombozytenwerte im peripheren Blut sind in über 90 % der Fälle erniedrigt. Nach der FAB-Klassifikation erfolgt die morphologische Einordnung der AML in die Formen M₀ bis M₇. Weitere Unterteilungen sind möglich durch Zytochemie, Zytogenetik, Immunzytologie und Molekularbiologie. In allen Altersstufen kommt die AML vor und ist im Vergleich zur ALL die häufigere Leukämie bei Erwachsenen. Die schnelle Progredienz der Erkrankung zwingt zu unverzüglichen therapeutischen Maßnahmen, die heute in hämatologischen Zentren zur Heilung der Patienten (Langzeitremissionen >20 %) führen können. Dieses Ziel kann einerseits durch eine intensive kombinierte Chemotherapie und andererseits durch eine allogene Stammzelltransplantation nach erster oder zweiter Remission erreicht werden (73,74).

2.8 Chronische myeloische Leukämie (CML)

Die CML wurde erstmals von Rudolf Virchow 1845 beschrieben und gehört zum Formenkreis der chronischen myeloproliferativen Erkrankungen (75). Die neoplastische Erkrankung beruht auf der Mutation einer pluripotenten Stammzelle, die einen pathologischen Zellklon hervorruft, in mehr als 90 % der Fälle mit einem positiven Philadelphia-Chromosom (Translokation zwischen den Chromosomen 9 und 22). Infolgedessen wird das bcr-abl Gen exprimiert, welches die Produktion von Tyrosinkinasen induziert. Ein Auftreten in allen Lebensabschnitten wird von einem Altersmaximum im fünften Lebensjahrzehnt begleitet. Weitgehend ungeklärt ist die Ätiologie, jedoch ist nach Strahlenexposition ein erhöhtes Krankheitsrisiko beschrieben worden. 48 % der Patienten weisen eine Thrombozytose auf. Die CML lässt sich in drei Stadien einteilen:

Nach einer stabilen chronischen Phase führt die Krankheit meist über eine akzelerierte Phase in ein akutes Stadium und geht dann in eine Blastenkrise über. 10-15 % der Patienten entwickeln keine Blastenkrise sondern eine terminale Myelofibrose.

Die zahlreichen Therapieempfehlungen für die Behandlung der CML beinhalten sowohl das Abwarten ohne Therapie bei niedrigen Leukozytenzahlen, als auch die sofortige hochdosierte Chemotherapie, kombiniert mit Bestrahlung. Bei sehr hohen Zellzahlen wird auch die Leukapherese (Verfahren zur Abtrennung von Leukozyten aus dem zirkulierenden Blut) zur Vermeidung eines Hyperviskositätssyndroms empfohlen. Die allogene Stammzelltransplantation ist die einzig gesicherte kurative Form (76). Hier kommt es auf eine möglichst frühzeitige Durchführung der Transplantation nach Diagnosestellung an, da die krankheitsfreie Überlebensrate bei KMT in der chronischen Phase der CML über 50 % beträgt (78) und, bedingt durch hohe Relapse-Raten, über die akzelerierte Phase (20-30 %) bis hin zur Blastenkrise auf 15% abfällt.

In den letzten Jahren wird die Krankheit auch sehr erfolgreich mit Medikamenten behandelt, die die durch das bcr-abl Gen induzierte Tyrosinkinase inhibieren (77).

Die Behandlung mit autologer SZT für die Patienten, für die keine Spender zur Verfügung stehen, wird in Studien durchgeführt (79). Von den Risikofaktoren und dem Fortschreiten der Erkrankung hängen die Prognose und der Erfolg ab.

2.9 Myelodysplastisches Syndrom (MDS)

Diese heterogene Gruppe erworbener klonaler Knochenmarkerkrankungen hat als gemeinsames Charakteristikum die gestörte Proliferation und Differenzierung pluripotenter Stammzellen mit der Folge eines normo- oder hyperzellulären Knochenmarks und einer peripheren Zytopenie einer oder mehrerer hämatopoetischer Zellreihen. Nach der FAB-Klassifikation (80) werden fünf Subtypen unterschieden: *die refraktäre Anämie, die refraktäre Anämie mit Ringsideroblasten, die refraktäre Anämie mit Blastenexzess, die refraktäre Anämie mit Blastenexzess in Transformation (RAEB-T) und die chronisch-myelomonozytäre Leukämie*. Im Vergleich zur akuten Leukämie besteht ein häufigeres Auftreten im höheren Lebensalter (81). Hinweise auf die Ursache geben Defekte von DNS-Reparaturmechanismen sowie Stammzellschäden infolge Strahleneinwirkung und zytotoxischer Chemikalien (82). Im Hinblick auf die Thrombozyten zeigen 50 % der Patienten eine Zytopenie, Riesenplättchen mit abnormen Granula und funktionelle Thrombozytenstörungen mit Verlängerung der Blutungszeit und gelegentlichem Auftreten von hämorrhagischen Diathesen. Wichtige Prognoseparameter sind die Knochenmarksinfiltration mit Blasten und die Ausprägung der peripheren Zytopenie. Als Haupttodesursachen sind Infektionen, Blutungen infolge der Thrombozytopenie und Transformation in eine akute Leukämie beschrieben (83). Die Behandlung von Symptomen und Komplikationen (Gabe von Antibiotika bei Infekten (84)) ist obligat, jedoch kurativ wirkt nur eine allogene Stammzelltherapie.

Mit einer Chemotherapie können nur selten Langzeitremissionen erzielt werden. Die Ergebnisse nach SZT zeigen je nach Alter und Spender–HLA-Identität krankheitsfreie Überlebensraten von ca. 25 % bzw. ca. 20 % (85).

2.10 Maligne Lymphome

Die Unterteilung der malignen Lymphome erfolgt in den Morbus Hodgkin und die NHL (Non-Hodgkin-Lymphome). Die NHL sind definiert als eine heterogene Gruppe von Erkrankungen mit neoplastischer Proliferation lymphatischer Zellelemente und – je nach Stadium - generalisierter Ausbreitung. Dabei teilt man die NHL in der 1990 aktualisierten und modifizierten Kiel-Klassifikation nach ihrer Zugehörigkeit zur B- bzw. T- Reihe sowie nach Dignität und zytologischen Befunden ein (87). Erst vor einigen Jahren wurde die auf

immunologischen, morphologischen und genetischen Kriterien basierende R.E.A.L. (*revised European-American lymphoma classification* - Einteilung vorgestellt (88)). Diese Einteilung verzichtet auf Malignitätskriterien, weil biologisch einheitliche Lymphome eine unterschiedliche Dignität haben können. Sie unterteilt in B- und T-Zell-Lymphome sowie in periphere und Vorläufer-Neoplasien. Die kombinierte Betrachtung der Kiel- und der REAL-Klassifikation ermöglicht die Auswahl der optimalen Therapie der NHL im Rahmen des Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project, dem Untersuchungen von über 1400 Lymphom-Patienten in den Jahren 1988-1990 zugrunde liegen.

Diagnostisches Ziel ist die möglichst genaue Charakterisierung der NHL in Bezug auf: Zugehörigkeit zur B- oder T-Reihe, Bestimmung des lokalen Ausbreitungsgrades (Staging), Reifegrad der Lymphomzellen und Diagnosen von komplizierenden Begleiterkrankungen. Das Staging erfolgt nach der modifizierten Ann-Arbor-Klassifikation der NHL (86,90). In der siebten Lebensdekade zeigt die Gruppe der NHL ein Altersmaximum (91). Ätiologisch sind neben Immunsuppressionen, chronisch entzündlichen Erkrankungen und einer Infektion mit z.B. HIV-Viren (92) auch eine Strahlenexposition sowie genetische Ursachen (93) beschrieben worden.

Die Therapie hängt von der Dignität, dem Staging und der Zugehörigkeit zur B- oder T-Reihe ab. Es kommen Chemotherapeutika (94), Zytokine, Strahlen (95), Antikörpertherapien und Supportivmaßnahmen in Frage. Patienten sowohl mit niedrigmalignen als auch mit hochmalignen NHL werden heute auch meist im Rahmen vergleichender Studien mit Hochdosistherapie und autologer PBSZT behandelt (94).

Es hat sich in Studien gezeigt, daß die Therapieergebnisse mit autologer KMT bei B-Zell-Lymphomen und maligneren T-Zell-Lymphomen vergleichbar sind. Dauerhafte Remissionen mit autologer PBSZT bei Patienten mit hochmalignen T-Zell-Lymphomen lassen sich in 36 % der Fälle nachweisen (96).

2.11 Keimzelltumoren

In 90 % der Fälle sind die Hodenkarzinome Keimzelltumoren, die aufgrund ihrer Histologie in Seminome und Nicht-Seminome unterteilt werden und gonadal oder extragonadal in Erscheinung treten können. Während die Seminome zu 45 % vorkommen (100), beträgt die Häufigkeit bei den Nicht-Seminomen im Falle der reinen Teratome ca. 45 % und im Falle der Kombinationstumoren aus Seminom und Teratomanteilen ca. 15 %. Die malignen

Hodentumoren sind in der Altersgruppe der 20-35-Jährigen die häufigste Krebserkrankung des Mannes. Das maligne Teratom tritt im Vergleich zum Seminom eher in jüngeren Jahren auf. Als einziger gesicherter Risikofaktor ist der maldeszendierte oder vergrößerte Hoden (97) zu nennen, diskutiert werden darüber hinaus Infektionen, Trauma, Leistenhernie und genetische Disposition (98).

Wichtig für die Prognose und Therapie ist die lokale Ausbreitung, die international durch das TNM-System der UICC (*Union internationale contre le cancer*) und in Europa durch die Lugano-Klassifikation erfaßt wird.

Bei Nicht-Seminomen wird neben der chirurgischen Therapie als retroperitoneale Lymphadenektomie die Chemotherapie (99) empfohlen. Auch werden Hochdosischemotherapien mit autologen Knochenmark- oder Stammzelltransplantationen durchgeführt. Die Seminome gelten als strahlensensibel, die Heilungsrate über alle Stadien beträgt etwa 85 % (100).

2.12 Weichteilsarkome

Der Begriff „Weichteil“ umfaßt alle Bindegewebe des Körpers mit Ausnahme des Knochens. Von diesen Bindegeweben nehmen die seltenen Sarkome ihren Ausgang; sie sind in weniger als 1 % der Malignome bei Erwachsenen zu finden, treten jedoch bei Kindern häufiger auf. Die histologische Untersuchung des Gewebes spielt bei Erkrankung im Erwachsenenalter im Hinblick auf Therapie und Prognose, mehr noch bei Erkrankung im Kindes- und Jugendalter eine bedeutende Rolle (101). Zu den häufigsten Typen gehört das Synovialsarkom, das an zweiter Stelle mit einer Auftretenswahrscheinlichkeit von 9 % bei den pädiatrischen Malignomen mit Chemotherapiesensibilität hinter dem Rhabdomyosarkom steht. Die Stadieneinteilung erfolgt bei den pädiatrischen Malignomen postchirurgisch. Weitgehend beeinflußt wird die Prognose durch die Lokalisation des Primärtumors und das Stadium. Erste therapeutische Maßnahme ist der chirurgische Versuch einer lokalen Sanierung. Auch die Strahlentherapie, zumeist in Kombination mit der Operation, wird eingesetzt. Die Weichteilsarkome im Kindesalter sprechen recht gut auf Zytostatikatherapien an (102).

Therapieversuche mit einer autologen KMT bzw. autologen PBSZT werden experimentell durchgeführt.

2.13 Einsatz von Thrombozytenkonzentraten

Die in dieser Arbeit untersuchten Patienten erfuhren bei maligner Grunderkrankung nach einer Hochdosischemotherapie und Applikation von Knochenmark bzw. Stammzellen eine Zeit der Zellaplasie.

Aufgrund des Blutungsrisikos waren sie auf Thrombozytenkonzentrate angewiesen. Während der letzten 30 Jahre sind bemerkenswerte Fortschritte bezüglich der Therapie mit Thrombozytenkonzentraten gemacht worden, doch sind weitere Untersuchungen zum Einsatz von prophylaktischen Thrombozytentransfusionen erforderlich.

Als verfügbare Präparate stehen durch Apherese gewonnene Einzelspender-Thrombozyten den gepoolten Konzentraten aus Vollblutspenden gegenüber.

Beide Arten von Konzentraten weisen bei Gabe gleich hohe Effektivität auf (126), jedoch enthielten früher Einzelspender-Thrombozytenkonzentrate mit $2,0-5,4 \times 10^{11}$ Thrombozyten mehr Thrombozyten als die gepoolten Konzentrate, die weniger als 10^{11} Thrombozyten aufwiesen.

Ein Vorteil der Einzelspender-Konzentrate besteht in der Möglichkeit der Auswahl eines Spenders mit HLA-Kompatibilität, wenn nach mehreren Transfusionen beim Empfänger eine Alloimmunisierung eingetreten ist. In Studien zeigten Einzelspender-Konzentrate bei den Empfängern weniger septische Reaktionen, sind jedoch fast doppelt so teuer wie die gepoolten Konzentrate.

Neben der Kostenfrage und der Gefahr der Kontamination ist der Patient bei Erhalt eines Konzentrates der Gefahr des Auftretens von allergischen Reaktionen und der Bildung von Antikörpern ausgesetzt (127).

Durch Alloimmunisierung bei Übertragung von Thrombozyten zwischen genetisch nicht verwandten Menschen besteht bei Thrombozyten- und Einzelspender-Thrombozytenkonzentraten ein Allergisierungspotential (121).

Darüberhinaus bedeuten die Transfusionen für die Patienten ein Infektionsrisiko (105).

Während früher die Transfusionsgrenze bei klinisch stabilen Patienten ohne Risikofaktoren für Blutungen bei 10.000 Zellen pro μl angenommen wurde (128), werden heute größere Blutungskomplikationen bei einer Thrombozytenzahl von mehr als 5.000 als unwahrscheinlich angesehen (129). Bestehen allerdings Risikofaktoren wie Gefäßläsionen, ein Mangel an

Gerinnungsfaktoren oder Refraktäreigenschaften gegen Thrombozytentransfusionen, so gehen mehrere größere Studien von einer Grenze von 10.000 Zellen pro μl aus (129).

Andere Studien haben ergeben, dass nicht allein die Thrombozytenzahl, sondern vielmehr das Auftreten von Blutungen in den letzten fünf Tagen ausschlaggebend für eine rasche prophylaktische Thrombozytengabe sein soll.

Richten sich Autoantikörper gegen Glykomembranproteine (GP Ib/IX, GP IIb/ IIIa) der Thrombozyten wie bei der Idiopathischen Thrombozytopenischen Purpura (ITP), so besteht eine Thrombozytopenie mit kürzerer Plättchenüberlebenszeit.

Die plättchenassoziierten IgG-Antikörper führen in der Folge zum Abbau im reticuloendothelialen System (130).

Bei diesen Patienten kommt es meist erst bei Werten < 30.000 Zellen pro μl zu Blutungserscheinungen, jedoch werden Plättchentransfusionen erst bei schweren Blutungen gegeben. Denn auch die transfundierten Plättchen zeigen aufgrund der Autoantikörper eine verkürzte Überlebenszeit und wiederholte Transfusionen induzieren die Bildung von Isoantikörpern gegen Thrombozyten. So stehen therapeutisch in erster Linie Kortikoide, intravenöses Immunglobulin und der CD-20-Antikörper Rituximab zur Verfügung.

Bei der Kortikoid-refraktären ITP gilt die Splenektomie als effektive Therapiemethode (131).

3 Fragestellung

Das Blutungsrisiko für den Patienten und damit der Bedarf an Thrombozytenkonzentraten hängen von der Thrombozytenzahl, der Thrombozytenfunktion und von klinischen Faktoren ab. Thrombozytenkonzentrate sind jedoch teuer, limitiert verfügbar und bergen auch Risiken für den Empfänger (104).

Über den Funktionszustand der nach Knochenmarktransplantation (KMT) und peripherer Blutstammzelltransplantation (PBSZT) gebildeten Thrombozyten ist wenig bekannt. Knochenmark- und stammzelltransplantierte Patienten befinden sich nach der Hochdosischemotherapie in einer zeitlich variablen Phase der peripheren Aplasie, in der sie anfällig für Infektionen und Blutungen sind (103).

Daher sollen in dieser Arbeit phänotypische Veränderungen in der Ausprägung der Membranglykoproteine auf der Zelloberfläche von Thrombozyten im zeitlichen Verlauf nach Stammzelltherapie untersucht werden.

Mit dem Verfahren der Durchflußzytometrie kann der genaue Zelltypus bzw. die Membranglykoproteinexpression einzelner Zellen analysiert werden. Damit ist auch eine Abschätzung über den aktuellen Funktionszustand der Thrombozyten möglich und die Indikation für die Gabe eines Thrombozytenkonzentrates könnte präziser gestellt werden.

4 Patienten und Methode

4.1 Patienten und ihre Diagnosen

Das für diese Arbeit rekrutierte Patientengut setzt sich aus 18 Patienten (**Gruppen 1-3**) zusammen, die von Januar 1993 bis zum März 1994 in der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Hämatologie und Onkologie, Campus Virchow-Klinikum/Charité mit einer allogenen Knochenmarktransplantation (KMT), einer autologen KMT oder einer peripheren Blutstammzelltransplantation (PBSZT) behandelt wurden. Untersucht wurde das Blut von Patienten mit folgenden Grundkrankheiten:

akuter lymphatischer Leukämie,
akuter myeloischer Leukämie,
chronisch myeloproliferativer Erkrankung,
myelodysplastischem Syndrom,
malignem Lymphom,
Keimzelltumor
und Weichteilsarkom.

Die Einteilung der 18 untersuchten Patienten erfolgte nach Art der Therapie in die drei Gruppen „allogen Knochenmarktransplantierte“ (**Gruppe 1**), „autolog Knochenmarktransplantierte“ (**Gruppe 2**) und „autolog peripher Blutstammzelltransplantierte“ (**Gruppe 3**) Patienten (**Tabelle 1**).

Tabelle 1: Darstellung der Diagnose von 10 allogenen Knochenmarktransplantierten Patienten (Gruppe 1), 3 autolog Knochenmark- (Gruppe 2) und 5 autolog Blutstammzelltransplantierten Patienten (Gruppe 3)

Patient, Geschlecht, Geburtsdatum (Alter)			Diagnose
G r u p p e 1			
Nr. 1	männlich	08.08.1972 (21 Jahre)	RAEB-T
Nr. 2	weiblich	12.03.1950 (43 Jahre)	CML
Nr. 3	männlich	15.03.1946 (47 Jahre)	CML
Nr. 4	weiblich	07.05.1960 (33 Jahre)	T-ALL
Nr. 5	männlich	31.12.1964 (29 Jahre)	NHL : großzell. anaplast. B-Zell-Lymp.
Nr. 6	weiblich	17.10.1974 (19 Jahre)	c-ALL
Nr. 7	männlich	11.11.1975 (18 Jahre)	CML
Nr. 8	männlich	13.03.1950 (43 Jahre)	CML
Nr. 9	männlich	18.07.1969 (24 Jahre)	AML (M 4)
Nr.10	männlich	11.08.1981 (12 Jahre)	CML
G r u p p e 2			
Nr. 11	weiblich	02.03.1979 (14 Jahre)	c-ALL
Nr. 12	männlich	20.01.1939 (54 Jahre)	Keimzell- Tm :Teratom
Nr. 13	männlich	20.03.1963 (30 Jahre)	Keimzell- Tm : Misch tumor
G r u p p e 3			
Nr. 14	männlich	06.06.1952 (41 Jahre)	NHL : Zentrozytom
Nr. 15	männlich	10.09.1968 (25 Jahre)	NHL : hochmalignes T-Zell-Lymphom
Nr. 16	männlich	09.08.1955 (38 Jahre)	Keimzell- Tm : extragonadal
Nr. 17	weiblich	19.08.1978 (15 Jahre)	Synovial- Carcinom
Nr. 18	weiblich	03.12.1973 (20 Jahre)	NHL : pleomorphes, kleinzell. T-Zell-L

Die Patienten wiesen ein Durchschnittsalter von 28 Jahren auf. Es gab sechs Patienten weiblichen und zwölf Patienten männlichen Geschlechts. Die Nummerierung von 1-18 ist dann im Text als geschlechtsunabhängig zu sehen.

In den im Anhang der Arbeit aufgeführten **Tabellen 9-26** sind für jeden Patienten neben der Diagnose und den Behandlungsdaten als Meßparameter die Zahl der Thrombozyten und die Thrombozytenparameter PDW (platelet distribution width), MPV (mean platelet volume) und P-LCR (platelet – large cell ratio) zum jeweiligen Messzeitpunkt aufgeführt.

4.2 Einführung in die Methode

Mit Hilfe einer durchflußzytometrischen Analyse wurden in der vorliegenden Arbeit die Membranglykoproteine der Thrombozyten in der Regenerationsphase der Thrombozytopenose

untersucht. Die untersuchten Blutproben stammen von 18 Patienten, die nach einer Hochdosischemotherapie mit einer Knochenmark- bzw. einer Stammzelltransplantation behandelt worden waren. Nach erfolgter Aufklärung gaben die Patienten ihr Einverständnis zu der zusätzlichen Blutentnahme. Diese erfolgte direkt nach der täglichen Routineblutentnahme, um bei den Patienten in ihrem immunsupprimierten Zustand möglichst wenig Blutentnahmen außer der Reihe vorzunehmen.

Nach der Probenentnahme am Patienten und vor der Inkubation jeder Probe mit Fluoreszenzfarbstoff-markierten monoklonalen Antikörpern wurde jeweils ein Teil der Proben mit Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) versetzt, um die in der Probe vorhandenen Thrombozyten zu aktivieren und so mit der anschließenden Analyse am Durchflußzytometer das Aktivierungspotential zu erfassen.

Bei der durchgeführten durchflußzytometrischen Analyse der Thrombozyten-Membranglykoproteine unter Einsatz fluoreszenzfarbstoff-markierter monoklonaler Antikörper ist die von Tschöpe und anderen entwickelte Methode (106) übernommen worden.

Diese standardisierte Methode beinhaltet die Materialgewinnung, Probenaufbereitung und den Messvorgang selbst, denn auf jegliche Voraktivierung während dieser Prozesse reagieren die Thrombozyten sensibel. So können die gewonnenen Plättchen nur dann weitestgehend die im Blut befindlichen repräsentieren, wenn sie möglichst wenig Aktivierung bei der Probengewinnung und -verarbeitung erfahren.

Hierbei muß beachtet werden, daß die Blutabnahme an sich durch die Gefäßpunktion per definitionem eine Aktivierung der Thrombozyten darstellt und die gleiche Gefahr bei der Aufarbeitung der Probe besteht, die zur Messung am Durchflußzytometer als Einzelsuspension in einer Konzentration von etwa einer Million Partikel/ ml vorliegen muß. Aufgrund ihrer geringen Größe ist beim Messvorgang die Erfassung der Thrombozyten im Vergleich zu anderen Blutzellen schwieriger: einerseits durch ihre Trennung von Rauschimpulsen am Gerät und andererseits durch die geringere Intensität ihrer Lichtemission.

Granulozyten-Take:

Die erste Messung der Thrombozyten-Membranglykoproteine erfolgte bei jedem Patienten zu Beginn der Regenerationsphase der Thrombopoese nach Knochenmark- bzw. Stammzelltransplantation. Hierbei diente das *Take der Granulozyten* (der Tag, an dem die Granulozyten erstmals einen Wert von über 500 Zellen/ μ l Blut erreichen) als

Orientierungsparameter, da gewöhnlich der Thrombozytanstieg in Korrelation zum *Granulozyten-Take* steht und wenige Tage nach Beginn der Granulozytopoese einsetzt.

Bei zwei von 18 Patienten setzte die Thrombozytopoese schon vor der Granulozytopoese ein, aber durch tägliche Messung der Thrombozytenzahl konnte der Beginn der Thrombozytenregeneration auch in diesen beiden Fällen mit der ersten Messung erfaßt werden.

Messzeitpunkte :

Im weiteren zeitlichen Verlauf erfolgte die Messung der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI = mean fluorescence intensity) der Patienten zu multiplen Zeitpunkten, aus denen zur statistischen Auswertung wie folgt die drei Messzeitpunkte primär definiert wurden (Auflistung für jeden Patienten im Anhang Tabellen 9-26) :

Messzeitpunkt 1: erfolgte zum Zeitpunkt der spontan ansteigenden Thrombozytenzahl (zumeist nach dem Granulozyten-Take) im Rahmen der körpereigenen Zellproduktion mehrere Tage nach der letzten Thrombozytenkonzentratgabe.

Messzeitpunkt 2: entspricht der Messung zum Zeitpunkt der maximalen Expression (höchster gemessener MFI-Wert für das entsprechende Membranglykoprotein)

Messzeitpunkt 3: wurde festgelegt auf den Zeitpunkt des niedrigsten MFI-Wertes nach der maximalen Expression (Messzeitpunkt 2). In wenigen Fällen war ein Anstieg und ein darauffolgender Abfall der Werte nicht erkennbar, hier wurde die Messung erfaßt, die kontinuierlich auf die maximale Expression folgte.

4.2.1 Prinzip der Durchflußzytometrie und seine Anwendung

Das Prinzip der Durchflußzytometrie ist die Analyse von Einzelzellen in freier Suspension auf der Grundlage von physikalischen und chemischen Zelleigenschaften. Mit Hilfe von fluoreszenzfarbstoff-markierten monoklonalen Antikörpern ist eine Zelltypisierung auf der Basis spezifischer Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften der einzelnen Zellen möglich. Dies eröffnete der Durchflußzytometrie sowohl in der klinischen Forschung als auch in der Routinediagnostik ein breites Anwendungsgebiet (107).

Die vor der Messung mit fluoreszenzfarbstoff-konjugierten Antikörpern inkubierten und in freier Suspension befindlichen Zellen werden durch Druck über eine Stahlkapillare in die Meßküvette eingeführt, wobei sie aufgrund der starken Beschleunigung aneinandergereiht und einzeln den

Analysenpunkt erreichen. An diesem führt die hydrodynamische Fokussierung zur Erfassung jeder einzelnen Zelle durch einen Laserstrahl. Die Anregungslichtquelle verkörpert ein Argon-Laser, der Licht der Wellenlänge 488 nm emittiert. Im Gegensatz zur Mehrfarbenfluoreszenzanalyse (Anwendung bei der Immunphänotypisierung) wurde in dieser Arbeit für die Messungen allein der Farbstoff Fluorescein-isothiocyanat (FITC) verwandt, dessen Anregungsmaximum in seinem Absorptionsspektrum nahe der 488 nm-Linie liegt.

Die Zellen bewirken eine Streuung des Lichts. Hierbei bedingt die Zellgröße in erster Linie eine Vorwärtsstreuung des Lichts (**FSC= forward light scatter**) und die intrazelluläre Granularität eine Seitwärtsstreuung (**SSC= side scatter**). So können die Thrombozyten aufgrund ihrer Streulichteigenschaften von Zelldetritus, Erythrozyten und Leukozyten getrennt werden. Wenn die Zelle den Analysenpunkt passiert, werden die Parameter FSC, SSC und Fluoreszenzintensität als elektronische Signale gemessen. Diese Werte werden anhand einer linearen und logarithmischen Skala einem Kanal zugeordnet, wobei je nach Software für diesen Gerätetyp 256 oder 1024 Kanäle nutzbar sind. Für diese Arbeit war das Gerät auf 256 Kanäle eingestellt.

Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI = mean fluorescence intensity): In jedem Fluoreszenzkanal wird die Zahl der mit dieser Intensität fluoreszierenden Thrombozyten dargestellt. Die mittlere (Log)-Fluoreszenz wird angegeben als Nummer des Kanals, in dem die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI = mean fluorescence intensity) über alle Thrombozyten liegt. Sie stellt ein Maß für die Expression der Membranglykoproteine auf der Zelloberfläche dar.

Bei der Auswertung werden die Signale als Datenpunkte in der Einpunkt- (Histogramm) und der Zweipunktkorrelation („DOT-PLOT“) graphisch dargestellt und die zu messende Zellpopulation durch Setzen von Markern (Histogramm) bzw. „Gates“ (Dot-Plot) eingegrenzt. So kann die Fluoreszenzintensität innerhalb einer Zellpopulation quantifiziert werden (108-110).

4.2.2 Gewinnung und Aufarbeitung der Proben

Um eine Voraktivierung der Thrombozyten möglichst zu reduzieren, erfolgte die standardisierte, venöse Blutabnahme am Patienten besonders vorsichtig. Die ersten 5-10 ml Vollblut wurden für Routineparameter bestimmt, dann wurde in eine vorher präparierte 10 ml-Spritze, die 1 ml Antikoagulanzen (Ansatz siehe unter Materialien und Reagenzien) enthielt, 9 ml Vollblut langsam aspiriert. Durch vorsichtiges Schwenken der Spritze vermischten sich Probe und Antikoagulanzen. Nach der Blutbildbestimmung mit einem automatischen Zellzählgerät „Sysmex E-500“ der

Firma Digitana AG wurde die Probe bis zur Analyse bei Raumtemperatur (bis maximal zwei Stunden) auf einem Agitator gelagert.

Lag nach erfolgreichem Engraftment bei späteren Verlaufsmessungen der am Zellzählgerät ermittelte Thrombozytenwert über 50.000 Zellen pro μl , so lieferte dieser Wert den Bezugspunkt, um die Thrombozytenzahl mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS), die 3,8 % Na-Citrat enthielt, auf 50.000 Zellen pro μl einzustellen.

Von dieser Mischung wurde 1 ml mit 10 μl Phorbolmyristat Acetat (PMA) zur Thrombozytenaktivierung versetzt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. PMA war dabei mit PBS im Verhältnis 1:100 verdünnt worden. Die Endkonzentration von PMA für den Testansatz war 160 nanomolar.

Sowohl die mit PBS eingestellte Lösung als auch die mit PMA versetzte fungierten nun als Probe für den Testansatz, bei dem jeweils 10 Teile Probe (100 μl) und 1 Teil (10 μl) fluoreszenzfarbstoff-markierter Antikörper gemischt wurden. Als Negativ-Kontrollen dienten jeweils im nicht aktivierten und im aktivierten Probenansatz eine Probe ohne Zugabe eines Antikörpers (im folgenden mit Leerwert (LW) bezeichnet) und eine mit FITC gekoppelten Antikörper gegen Glycophorin A, welches auf Thrombozyten nicht exprimiert wird. Da aber der Antikörper vom gleichen Isotyp wie die spezifischen Antikörper ist, dient die Bindung als Maß für die unspezifische Bindung, z.B. über Eisen-Rezeptoren auf der Thrombozytenoberfläche. Bei Dunkelheit und Raumtemperatur wurde der Testansatz sodann 30 min inkubiert (nach den ersten 15 min wurde nochmals kurz und vorsichtig durchmischt) und dann nach Zugabe von jeweils 2 ml PBS am Durchflußzytometer analysiert.

4.2.3 Geräte

- Automatisches Zellzählgerät für die Blutbildbestimmung, das zusätzlich zur Zellzahl die Erfassung der Parameter PDW - platelet distribution width (Verteilungsbreite), MPV - mean platelet volume (mittleres Thrombozyten-Volumen), P-LCR - platelet-large cell ratio (Prozentanteil großer Thrombozyten > 12 fl) gestattet, *Sysmex E- 500*, Firma Digitana AG, Hamburg,
- Agitator: Typ 3016, GfL (Gesellschaft für Labortechnik), Hannover/Vlinhorst,

- Durchflußzytometer: *FACScan, Firma Becton Dickinson, Heidelberg*, mit Datenauswerteeinheit: Bildschirm, Tastatur und Drucker (Hewlett Packard)
- Software: Grafikprogramm Consort 30, Firma Becton Dickinson, Heidelberg

4.2.4 Materialien und Reagenzien

Für die Blutentnahme:

- sterile Injektionskanüle mit einem Durchmesser von 0,9 mm und einer Länge von 40 mm
- sterile Einmalspritze - 10 ml, beides *Fa. B. Braun, Melsungen*

Für den Testansatz:

- Polypropylen- Röhren , 12 x 75 mm, Falcon, Fa. Becton Dickinson, Heidelberg
- Pipetten mit den Volumina 10, 100, 1000, 100-1000 µl und Pipettenspitzen gelb und blau, *Fa. Eppendorf, Hamburg*

Für das Durchflußzytometer:

- *CaliBRITE*: Beads zur Fluoreszenzkomensationseinstellung, Sensitivität und Justierung, Nr. 95-0002, *Fa. Becton Dickinson, Heidelberg*
- FACSFlow: Sheath- Fluid, Nr. 952003, Fa. Becton Dickinson, Heidelberg

Als Testmaterial fungierte antikoaguliertes Vollblut.

Das Antikoagulanz bestand aus folgenden Reagenzien (die unten angegebenen Komponenten ergaben pro Ansatz eine Gesamtmenge von 2,5 ml, von der 1 ml mit 9 ml Vollblut gemischt wurde):

- 1) *1,3 ml Natrium-Citrat*: 36,7625 g Tri-Natriumcitrat-Dihydrat aufgefüllt auf 500 ml mit Aqua dest.: 0,25M = 3,8 %, Fa. Merck, Nr.6448
Endkonzentration in der Gesamtmenge: 0,13M

- 2) *1,1 ml PBS* (phosphat buffered saline): 1,084 g KH₂PO₄ Fa. Merck, Nr.4873, 4,510 g Na₂HPO₄ Fa. Merck, Nr. 6580, 4,510 g NaCl Fa. Merck, Nr. 6404, aufgefüllt auf 1l mit Aqua dest., eingestellt auf einen pH- Wert von 7,22 und verwendet mit einem Zusatz von 27,25 ml 3,8%-iger Na- Citrat-Lösung
- 3) *0,025 ml Aspisol*: 1 g Trockensubstanz aufgelöst mit 5 ml Aqua dest. = 5.55 mM, Fa. Bayer, Leverkusen
Endkonzentration in der Gesamtmenge: 0.0555mM
- 4) *0,075 ml PGE 1* (Prostaglandin E 1): Fläschchen mit 1 mg Inhalt, aufgelöst mit 2,82 ml absolutem Ethanol =1 mM , Fa. Sigma, Prod.- Nr. P 5515, Deisenhofen
Endkonzentration in der Gesamtmenge: 0.03mM

Für die Aktivierung der Thrombozyten:

- *PMA* : 12-myristat-13-acetat (Phorbol ester), Fa. Sigma Chemie, Prod.-Nr. 8139

Monoklonale Antikörper:

- *FITC-(Fluorescein- isothiocyanat) gekoppelte Antikörper*: GP, CD 36, CD 41a, CD 42b, CD 62, CD 63: gelöste, monoklonale Maus Ig G-AK der Klasse 1, Fa. Dianova, Hamburg
- GP:Klon D2.10, Konzentration: 4 µg/1.000.000 Zellen
- CD 36: Klon FA6-152, Konzentrationen von CD 36, CD41a, CD42, CD62, CD63:
20 µl/5.000.000 Zellen
- CD 41a: Klon P2, CD 42b: Klon SZ2, CD 62: Klon CLB-thromb/6, CD 63: Klon CLB-gran/12

4.2.5 Versuchsdurchführung und Auswertung

Die Analyse der Proben am Durchflußzytometer erfolgte für die Parameter FSC (=forward light scatter), SSC (side scatter) und Fluoreszenzintensität (im folgenden als Fl 1 bezeichnet) im logarithmischen Modus. Um nur die Thrombozyten als gemessene Datenpunkte zu berücksichtigen, wurde mittels der graphischen Darstellung eine Eingrenzung der Thrombozytenpopulation vorgenommen.

In der korrelierten Zweiparameterdarstellung von FSC gegen SSC (auch als „DOT-PLOT“ bezeichnet, **Abbildung 1**) wurde um die Thrombozytenpopulation ein „LIVE-Gate“ gezogen. Dieses LIVE-Gate, in dem für jede gemessene Zelle ein Punkt erscheint, umfaßte bei jeder Messung 10.000 Datenpunkte, entsprechend 10.000 Zellen, und wurde für jeden Patienten neu definiert.

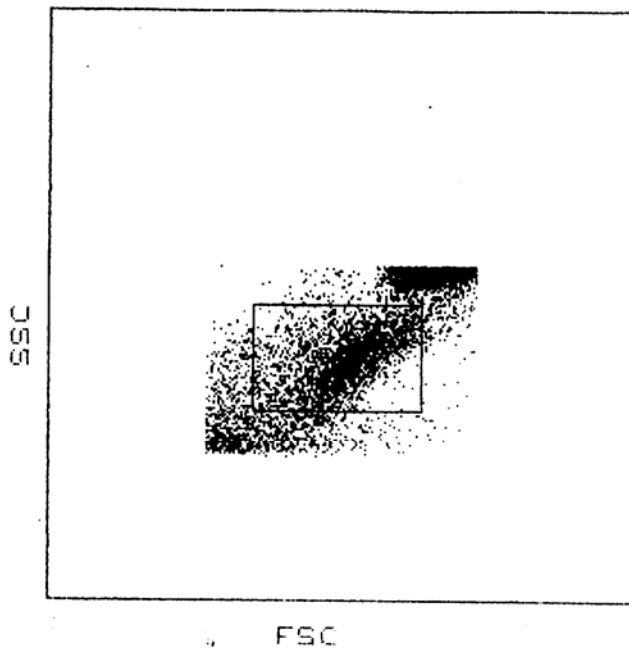


Abbildung 1: Markierung der Thrombozytenpopulation mit einem „LIVE-Gate“ in der korrelierten Zweiparameterdarstellung von FSC gegen SSC

Eine weitere Eingrenzung der Thrombozytenpopulation erlaubte das Setzen eines „Analysen-Gates“ in der Einparameterdarstellung (auch als „Histogramm“ bezeichnet). Hierbei wurde sowohl der Parameter FSC als auch SSC gegen die Anzahl der Zellen aufgetragen (**Abbildung 2** und **Abbildung 3**) und damit die Verteilung des Parameters in einer großen Population beschrieben.

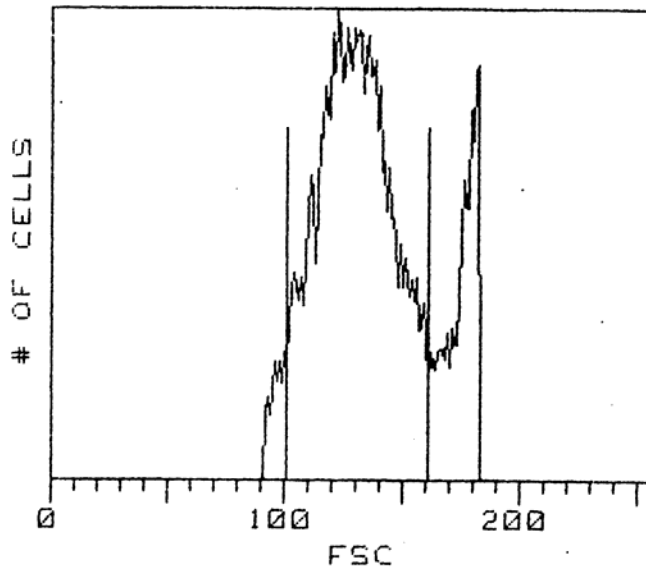


Abbildung 2: Gesetztes „Analysen-Gate“ in der Einparameterdarstellung von FSC gegen die Anzahl der Zellen

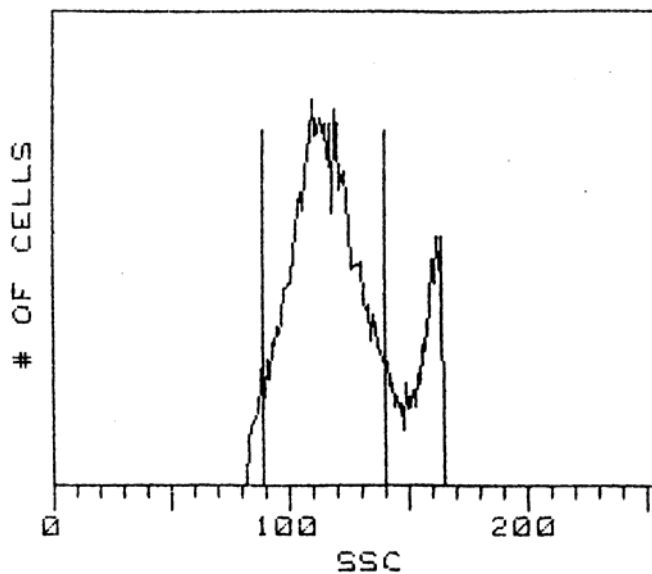


Abbildung 3: Gesetztes „Analysen-Gate“ in der Einparameterdarstellung von SSC gegen die Anzahl der Zellen

Im Anschluß daran wurden der Parameter Fl 1 in der Histogrammdarstellung gewählt und „Marker“ gesetzt, um die Fluoreszenzintensität innerhalb der Thrombozytenpopulation zu quantifizieren. Da zunächst als Negativ-Kontrolle eine ungefärbte Probe und eine mit einem Kontroll-Antikörper (GP= Glycophorin) inkubierte gemessen wurde, konnten die hier erfaßte unerwünschte Autofluoreszenz (mit „Autofluoreszenz“ wird Fluoreszenzlicht beschrieben, das

von ungefärbten Zellen aufgrund ihrer eigenen chemischen Zusammensetzung emittiert wird) und unspezifische Bindung mit ihrem höchsten Kanalwert als „Fluoreszenz-negative“ Zellen von den ab diesem Kanalwert erfaßten „Fluoreszenz-positiven“ Zellen abgegrenzt werden. Die Eingabe am Gerät für die Definition „negativ“ oder „positiv“ erfolgte durch das Setzen von Markern, so daß 99% aller Zellen bei der Färbung mit anti-GP als negativ qualifiziert wurden.

Abbildung 4 zeigt die Histogrammdarstellung einer mit dem Kontroll-Antikörper GP (Glycophorin A) inkubierten Probe mit der Auftragung der Fluoreszenzintensität gegen die Anzahl der Zellen und gesetzten Markern bei 10^0 , 10^1 und 10^4 .

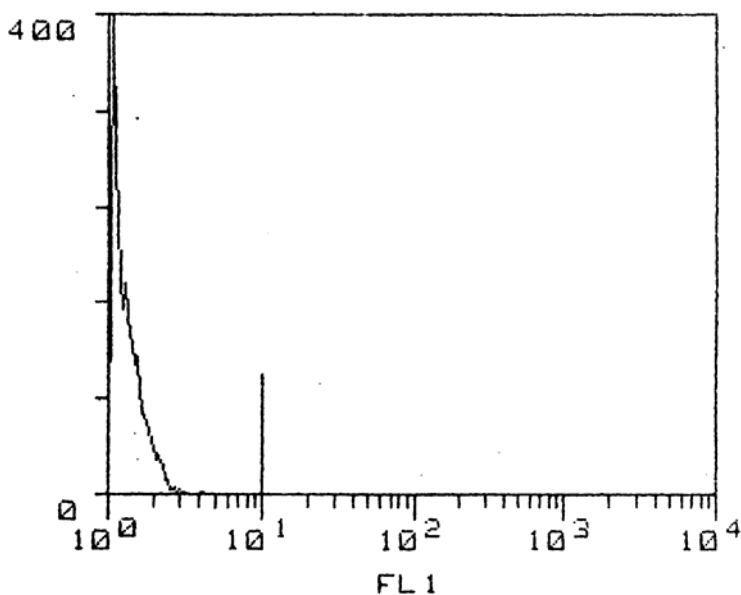


Abbildung 4: Histogrammdarstellung einer mit GP (= Glycophorin A) gefärbten Probe mit gesetzten Markern bei 10^0 , 10^1 und 10^4 (relative Skala bei FL 1= Fluoreszenzintensität)

Als Beispiel für die Bindung der Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörper an die zu messenden Membranglykoproteine der Thrombozyten kann aus **Abbildung 5** die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI=mean fluorescence intensity) der „Fluoreszenz-positiven“ Zellen als Maß für die Antikörperbindung einer Probe mit dem Antikörper CD 41a entnommen werden.

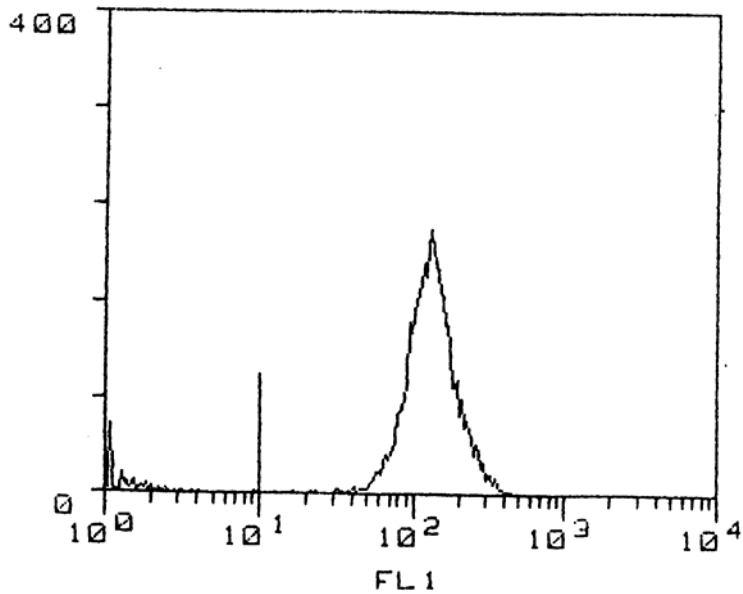


Abbildung 5: Darstellung der FL 1 (= Fluoreszenzintensität) einer Probe, inkubiert mit dem Antikörper 41 a

Aktivierte Thrombozyten werden durch die Aktivierungs-Antikörper CD 62 und CD 63 erfaßt. Mit Hilfe dieser Aktivierungsmarker kommt die Fluoreszenzintensität aktivierter Thrombozyten ohne gesetzte Marker für „Fluoreszenz-positive“ und „Fluoreszenz-negative“ Zellen in **Abbildung 6** zur Darstellung.

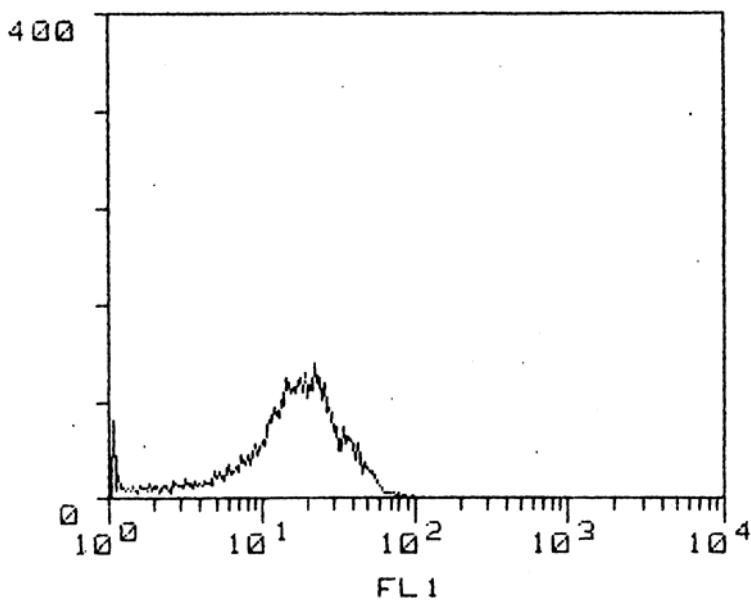


Abbildung 6: Histogramm- Darstellung einer Probe, inkubiert mit dem Antikörper CD 62, ohne gesetzte Marker

Im Ergebnisteil dieser Arbeit ist die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der nicht aktivierten Proben und der mit PMA (Phorbol ester) aktivierten Proben der untersuchten Patienten tabellarisch dargestellt (**Tabellen 3 – 7**).

Bei neun von 18 Patienten aus allen drei Gruppen konnte in der korrelierten Zweiparameterdarstellung („DOT-PLOT“) von FSC gegen SSC eine **Zellpopulation** neben der „klassischen“ Thrombozytenpopulation beobachtet werden. Je nach Patient trat sie mehr oder weniger stark in Erscheinung und ihre Ausprägung nahm im Verlauf der Messungen zu oder ab. Sie befand sich in der Darstellung von FSC gegen SSC links von der Thrombozytenpopulation (**Abbildung 7**), aber im Hinblick auf SSC auf gleicher Höhe mit den Thrombozyten. Da SSC eine Einteilung von Zellen hinsichtlich ihrer Granularität und FSC hinsichtlich ihrer Größe erlaubt, handelt es sich scheinbar um Zellen, die einerseits kleiner sind als die erfaßten Thrombozyten, andererseits um solche, die eine ähnliche innerzelluläre Struktur wie Thrombozyten aufweisen. Um die Zellpopulation weiter zu charakterisieren, wurde bei diesen Patienten die Zellpopulation mit einem LIVE-Gate eingerahmt und die mittlere Fluoreszenzintensität für jeden Antikörper ermittelt. Das Ergebnis ist im Ergebnisteil beschrieben.

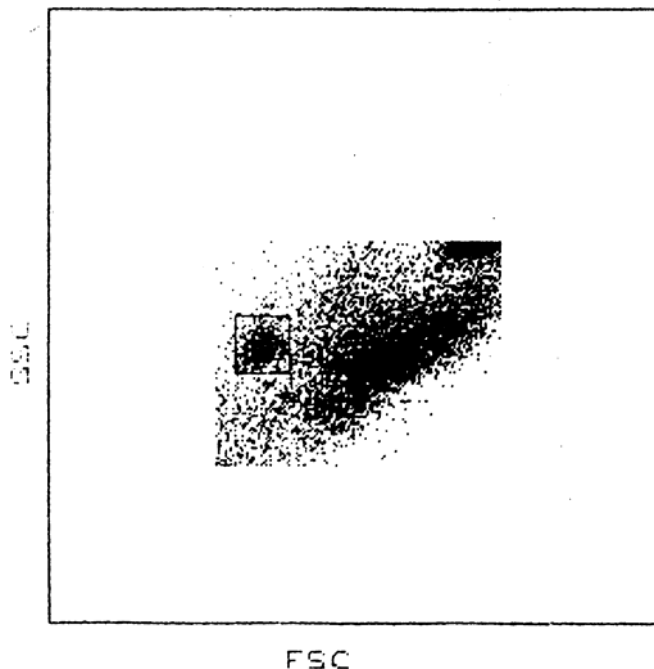


Abbildung 7: Markierung einer unbekanntnen Zellpopulation mit einem „LIVE-Gate“ in der Zweiparameterdarstellung von FSC gegen SSC

4.3 Statistische Auswertung

Für den statistischen Vergleich der Patientenwerte stellt sich die Frage, ob jeweils zwischen dem Ausgangsmesswert (Messzeitpunkt 1) und dem zweiten Messzeitpunkt ein signifikanter Anstieg zu verzeichnen ist und ob zwischen dem zweiten und dem dritten Messzeitpunkt wieder ein signifikanter Abfall zu beobachten ist.

Dazu wurde der sogenannte t-Test für verbundene Werte eingesetzt, der jeweils zwei Stichproben überprüft und damit zeigt, ob es wahrscheinlich ist, dass die Mittelwerte der jeweiligen Messgruppen übereinstimmen.

Anhand von Mittelwert, Streuung und Losgröße für einen Zustand lässt sich mit Hilfe der t-Verteilung angeben, wie groß das Vertrauensintervall ist, außerhalb dessen der Mittelwert einer zweiten Probe liegen muß, wenn sich beide Proben signifikant unterscheiden. Wenn also umgekehrt der Mittelwert eines zweiten Loses innerhalb dieses ermittelten Vertrauensintervalls um den ersten Mittelwert liegt, ist mit einer Wahrscheinlichkeit von 95 % davon auszugehen, dass beide Lose sich nicht signifikant unterscheiden ($p > 0,05$).

In den Tabellen 3-1 bis 7-4 sind die zeitabhängigen Veränderungen in der Expression der Membranglykoproteine jeweils anhand der drei Messzeitpunkte dokumentiert.

Statistische Signifikanz ($p < 0,05$) ist dann im folgenden gegeben: Liegt also beispielsweise jeweils der Ausgangswert mit 100 % (=Messzeitpunkt 1) unterhalb des Vertrauensintervalls um Zustand zwei, so ist von einem signifikanten Anstieg auszugehen. Liegt der Mittelwert aus Zustand zwei oberhalb des Vertrauensintervalls von Zustand drei, so ist ein signifikanter Abfall festzustellen.

5 Ergebnisse

Als Maß für die Expression der Membranglykoproteine auf der Zelloberfläche ist die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI = mean fluorescence intensity) für jeden Antikörper (CD 36, CD 41a, CD 42b, CD 62, CD 63) aufgelistet (**Tabellen 9-26** im Anhang), wobei eine Spalte in den Tabellen die Messdaten der mit PMA (Phorbol ester) aktivierten Proben und eine andere die der nicht aktivierten zeigt.

Der Beginn der Messungen der Patientenproben erfolgte nach dem Tag der letzten Gabe von Thrombozytenkonzentraten, bei drei Patienten auch direkt nach der letzten Thrombozytenkonzentratgabe und ist dem jeweiligen Messdatum sowie dem Tag des Granulozyten-Takes (der Tag, an dem die Granulozyten erstmals einen Wert von über 500 Zellen pro μ l Blut erreichen) gegenübergestellt.

Für die Auswertung wurde jedoch der erste Messzeitpunkt (MZP 1) frühestens zwei Tage nach der letzten Gabe von Thrombozytenkonzentrat gewählt. Das dokumentiert, daß der Zeitpunkt der ersten Messung im Zeitraum der Wiederaufnahme der körpereigenen Zellproduktion liegt. Damit wird verhindert, daß in erster Linie transfundierte Zellen durch die Messung erfaßt werden (**Tabelle 2**).

Tabelle 2: Darstellung der Patienten, der Granulozyten-Takes und der Messzeitpunkte (jeweils als Tage nach KMT / PBSZT)

Patienten	Granulozyten-Take (Tag nach KMT/ PBSZT)	Messzeitpunkt (Tag nach KMT/PBSZT) 1	Messzeitpunkt (Tag nach KMT/PBSZT) 2	Messzeitpunkt (Tag nach KMT/PBSZT) 3
1	23	23	29	49
2	21	21	28	34
3	15	14	18	19
4	19	22	24	29
5	17	21	23	25
6	16	21	26	33
7	19	23	28	30
8	12	15	20	34
9	20	29	40	43
10	29	28	30	33
11	13	17	23	24
12	12	21	26	33
13	24	24	32	38
14	9	13	15	28
15	14	16	23	25
16	29	37	43	49
17	12	13	14	15
18	21	27	29	30

5.1 Darstellung der Messwerte

Um die MFI (mean fluorescence intensity)-Werte, die ein Maß für die Expression der Membranglykoproteine auf der Zelloberfläche sind, miteinander vergleichen zu können, wurde eine statistische Darstellung der Messzeitpunkte (MZP) für alle drei Patientengruppen und den jeweiligen Antikörper gewählt (CD 36, CD 41a, CD 42b, CD 62, CD 63) (**Tabellen 3-1 bis 7-4** und zugehörige **Graphiken**).

Der Ausgangswert wurde in den Graphiken und Tabellen aufgrund der großen Streuung jeweils auf 100% festgesetzt (MZP 1) und die Darstellung der Werte zu den folgenden zwei Messzeitpunkten erfolgte dazu in Relation.

Die Skalierung der Höhenachse wurde den Messwerten angepasst. Um die Vergleichbarkeit zu gewährleisten, wurden in allen Graphiken die Abstände der Gitternetzlinien auf 20% festgesetzt.

Die gemessenen Werte sind im Anhang in den **Tabellen 9 – 26** ausgewiesen.

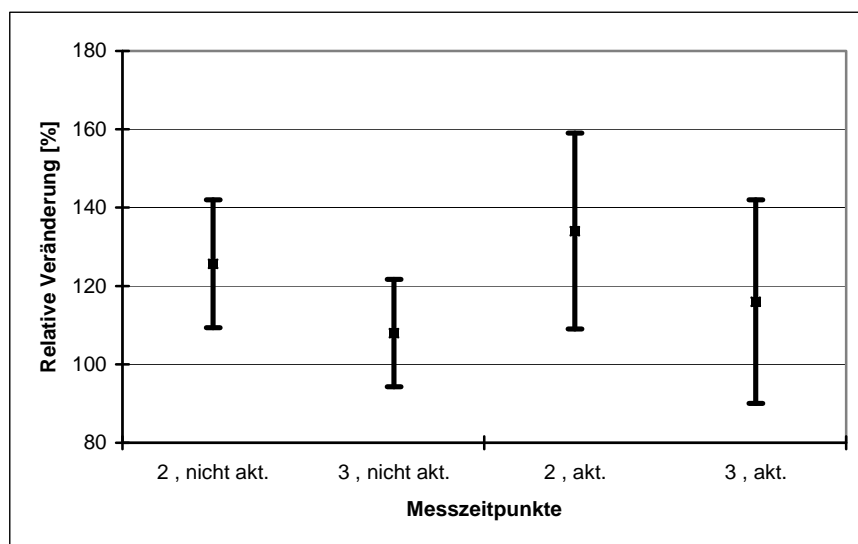
CD 36: Bei Verwendung des Antikörpers **CD 36** in der Gruppe der 10 allogenen Knochenmarktransplantierten Patienten (**Gruppe 1**) zeigt sich sowohl bei den nicht aktivierten Proben als auch bei den aktivierten Proben im Vergleich des MZP 2 mit dem Ausgangswert eine signifikante Zunahme ($p < 0,05$).

Sowohl bei den aktivierten als auch bei den nicht aktivierten Proben ist die statistische Signifikanz bezogen auf den MZP 2 im Vergleich zum MZP 3 nicht gegeben. Alle zugehörigen Werte sind in der **Tabelle 3.1** aufgeführt.

Jedoch ist innerhalb des Verlaufs vom Messzeitpunkt 2 zum Messzeitpunkt 3 eine deutlich fallende Tendenz der Messwerte erkennbar.

Tabelle 3-1: Darstellung der MFI-Werte (in % bezogen auf den Ausgangswert 100%) des Antikörpers **CD 36** zu den jeweiligen Meßzeitpunkten von 10 allogenen Knochenmarktransplantierten Patienten (**Gruppe 1**). CIM = confidence interval for mean

Gruppe 1	MZP 1	MZP 2 nicht akt. Proben	MZP 3 nicht akt. Proben	MZP 2 aktivierte Proben	MZP 3 aktivierte Proben
1	100	142	95	125	88
2	100	178	146	191	163
3	100	119	108	125	115
4	100	111	110	112	105
5	100	139	131	193	189
6	100	106	83	109	90
7	100	120	114	120	116
8	100	112	103	149	121
9	100	129	90	112	103
10	100	101	95	108	65
	Mittelwerte CIM	125,7 16,3	107,5 13,7	134,4 23,3	115,5 26
	Signifikanz zum Ausgangswert/ Vorwert	p < 0,05	P > 0,05	p < 0,05	p > 0,05

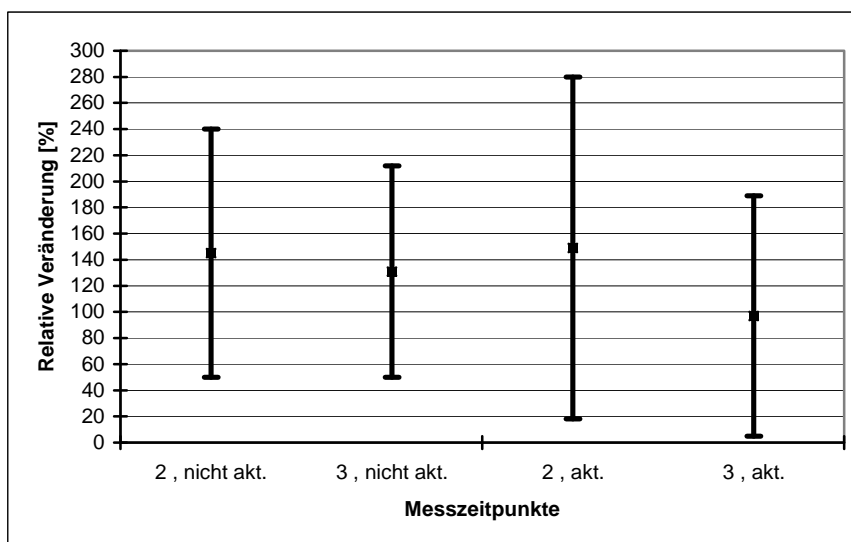


Graphik 3-1: Darstellung der allogenen Knochenmarktransplantierten Patienten aus **Tabelle 3.1** zum MZP 1 (=100 %) und zum MZP 2 und MZP 3 jeweils für die nicht aktivierten und die aktivierten Proben

Tabelle 3-2: Darstellung der MFI-Werte (in % bezogen auf den Ausgangswert 100%) des Antikörpers **CD 36** zu den jeweiligen Meßzeitpunkten von drei autolog Knochenmarktransplantierten Patienten (**Gruppe 2**). CIM = confidence interval for mean

Gruppe 2	MZP 1	MZP 2 nicht akt. Proben	MZP 3 nicht akt. Proben	MZP 2 aktivierte Proben	MZP 3 aktivierte Proben
11	100	130	99	114	103
12	100	189	164	210	57
13	100	117	129	124	130
	Mittelwerte CIM	145 95	131 81	149 131	97 92
	Signifikanz zum Ausgangswert/ Vorwert	p > 0,05	P > 0,05	p > 0,05	p > 0,05

Unten ist **Tabelle 3-2** graphisch wiedergegeben und bei den nicht aktivierten als auch bei den aktivierten Proben erkennt man aufgrund der geringen Gruppengröße zu keinem Zeitpunkt der Messung eine statistische Signifikanz.



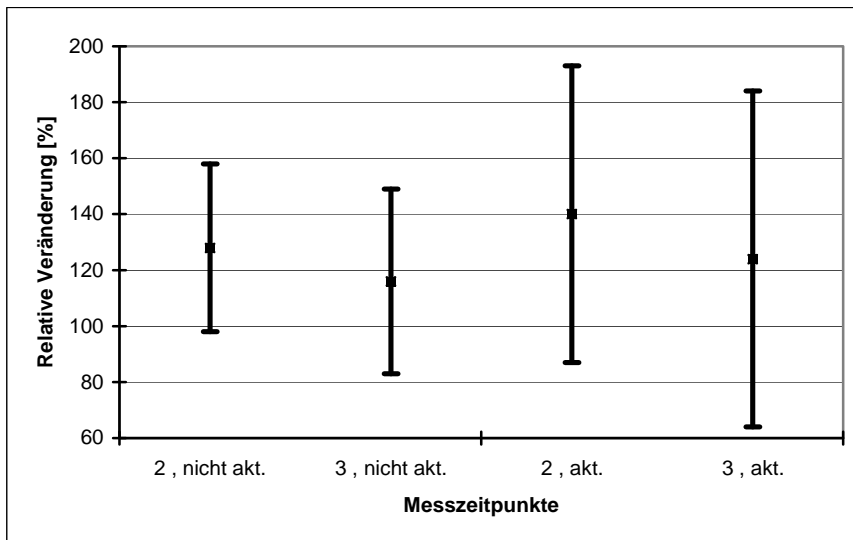
Graphik 3-2: Darstellung der autolog Knochenmarktransplantierten Patienten aus **Tabelle 3-2** zum MZP 1 (=100 %) und zum MZP 2 und MZP 3 jeweils für die nicht aktivierten und die aktivierten Proben

Tabelle 3-3: Darstellung der MFI-Werte (in % bezogen auf den Ausgangswert =100%) des Antikörpers **CD 36** zu den jeweiligen Meßzeitpunkten von fünf Blutstammzelltransplantierten Patienten (**Gruppe 3**). CIM = confidence interval for mean

Gruppe 3	MZP 1	MZP 2 nicht akt. Proben	MZP 3 nicht akt. Proben	MZP 2 aktivierte Proben	MZP 3 aktivierte Proben
14	100	121	119	126	108
15	100	162	159	212	211
16	100	143	106	145	99
17	100	102	87	104	98
18	100	112	109	114	105
	Mittelwerte CIM	128 30	116 33	140 53	124 60
	Signifikanz zum Ausgangswert/ zum Vorwert	p > 0,05	P > 0,05	p > 0,05	p > 0,05

Folgende **Graphik 3-3** enthält die Werte der **Tabelle 3-3** und lässt erkennen, dass zu keinem Messzeitpunkt eine statistische Signifikanz gegeben ist, da die 100%-Marke als Messzeitpunkt 1 jeweils im CIM (= confidence interval for mean), d.h. im 95%- Vertrauensbereich der Werte liegt als auch der Mittelwert vom MZP 3 jeweils im CIM von MZP 2 liegt.

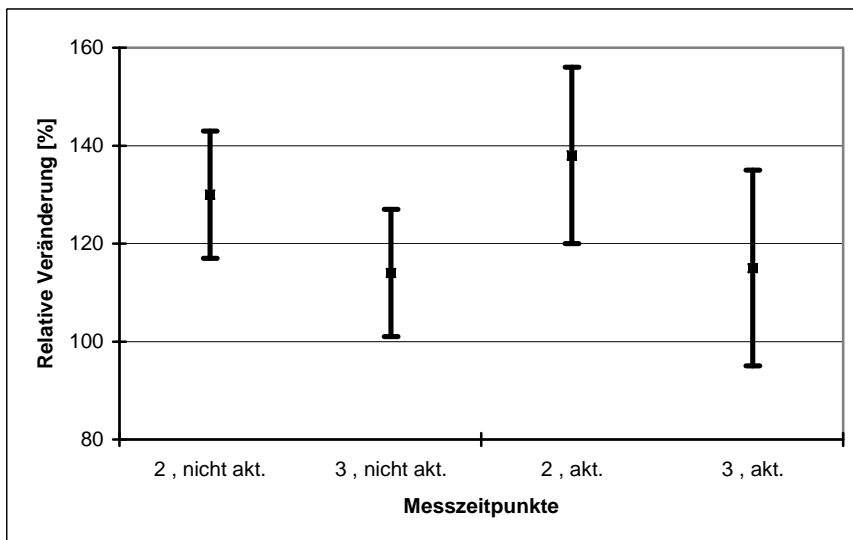
Jedoch erkennt man eindeutig sowohl bei den nicht aktivierten Proben als auch bei den aktivierten Proben eine zunächst steigende und dann wieder fallende Tendenz der Messwerte.



Graphik 3-3: Darstellung der autolog Blutstammzelltransplantierten Patienten aus **Tabelle 3-3** zum MZP 1 (=100 %) und zum MZP 2 und MZP 3 jeweils für die nicht aktivierten und die aktivierten Proben

Folgende **Graphik 3-4** zeigt die MFI-Werte aller 18 Patienten bei Verwendung des Antikörpers **CD 36** aus den **Tabellen 3-1 bis 3-3**.

Hieraus ist ersichtlich, dass statistische Signifikanz sowohl vom Ausgangswert zum MZP 2 als auch vom MZP 2 zum MZP 3 gegeben ist.



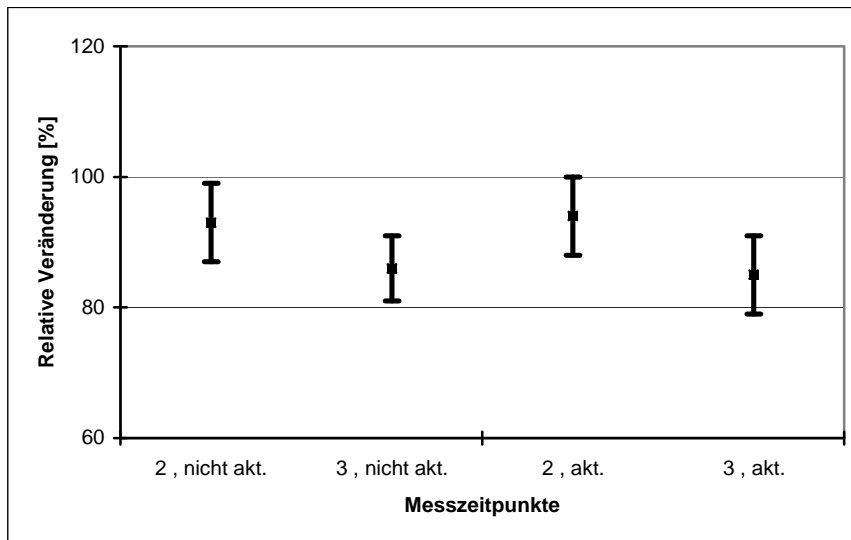
Graphik 3-4: Darstellung aller Patienten zum MZP 1 (=100%) und zum MZP 2 und MZP 3 jeweils für die nicht aktivierten und die aktivierten Proben bei Verwendung des Antikörpers CD 36

Tabelle 4-1: Darstellung der MFI-Werte (in % bezogen auf den Ausgangswert 100%) des Antikörpers **CD 41 a** zu den jeweiligen Meßzeitpunkten von 10 allogenen Knochenmarktransplantierten Patienten (**Gruppe 1**). CIM = confidence interval for mean

Antikörper **CD 41 a** :

Gruppe 1	MZP 1	MZP 2 nicht akt. Proben	MZP 3 nicht akt. Proben	MZP 2 aktivierte Prob.	MZP 3 aktivierte Prob.
1	100	99	87	97	92
2	100	95	82	77	73
3	100	91	87	100	98
4	100	93	90	101	84
5	100	82	76	95	94
6	100	97	79	97	79
7	100	98	97	91	85
8	100	76	76	80	71
9	100	100	91	103	86
10	100	97	94	96	90
	Mittelwerte CIM	93 6	86 5	94 6	85 6
	Signifikanz zum Ausgangswert Zum Vorwert	$p < 0,05$	$p < 0,05$	$p < 0,05$	$p < 0,05$

Diese MFI-Werte in folgende **Graphik 4-1** eingetragen, so ergibt sich eine statistische Signifikanz sowohl bei den nicht aktivierten Proben als auch bei den aktivierten Proben im Vergleich des MZP 2 zum Ausgangswert und im Vergleich des MZP 2 zum MZP 3.



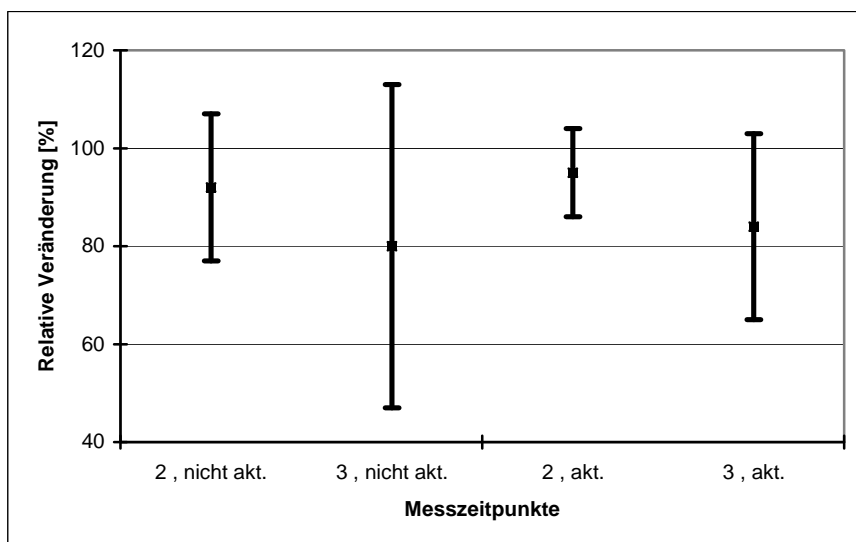
Graphik 4-1: Darstellung der allogen Knochenmarkstransplantierten Patienten aus **Tabelle 4-1** zum MZIP 1 (=100 %) und zum MZIP 2 und MZIP 3 jeweils für die nicht aktivierten und die aktivierten Proben

Tabelle 4-2: Darstellung der MFI-Werte (in % bezogen auf den Ausgangswert = 100%) des Antikörpers **CD 41 a** zu den jeweiligen Messzeitpunkten von drei autolog Knochenmarkstransplantierten Patienten (**Gruppe 2**). CIM = confidence interval for mean.

Gruppe 2	MZIP 1	MZIP 2 nicht akt. Proben	MZIP 3 nicht akt. Proben	MZIP 2 aktivierte Prob.	MZIP 3 aktivierte Prob.
11	100	91	84	99	89
12	100	86	65	93	75
13	100	98	91	92	87
	Mittelwerte	92	80	95	84
	CIM	15	33	9	19
	Signifikanz zum Ausgangswert zum Vorwert	p > 0,05	p > 0,05	P > 0,05	p > 0,05

Die folgende **Graphik 4-2** zeigt die Werte aus **Tabelle 4-2** und man erkennt, dass weder bei den nicht aktivierten noch bei den aktivierten Proben aufgrund der kleinen Gruppengröße und der damit verbundenen großen Streubreite zu keinem Zeitpunkt statistische Signifikanz besteht.

Vom Ausgangswert (=100 %) aus jedoch betrachtet fallen die Werte zum MZIP 3 hin kontinuierlich ab.



Graphik 4-2: Darstellung der autolog Knochenmarktransplantierten Patienten aus **Tabelle 4-2** zum MZP 1 (=100 %) und zum MZP 2 und MZP 3 jeweils für die nicht aktivierten und die aktivierten Proben

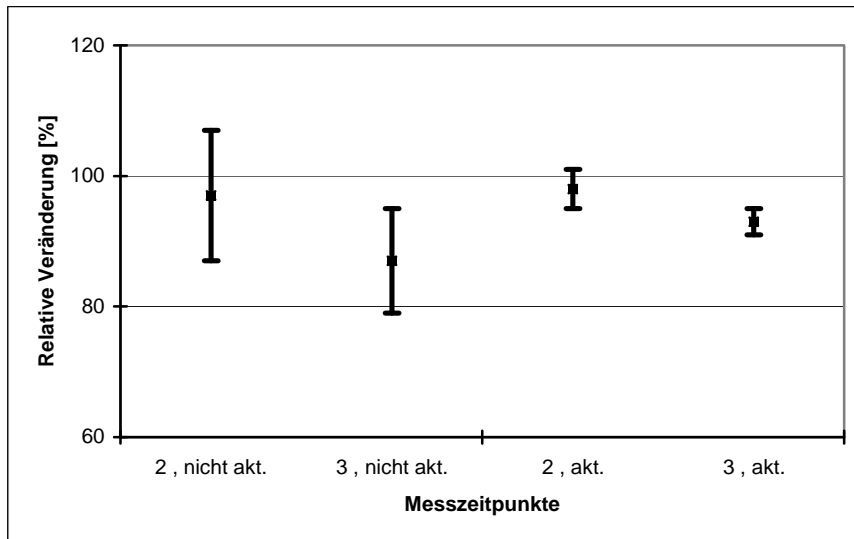
Tabelle 4-3: Darstellung der MFI-Werte (in % bezogen auf den Ausgangswert = 100%) des Antikörpers **CD 41 a** zu den jeweiligen Messzeitpunkten von fünf Blutstammzelltransplantierten Patienten (**Gruppe 3**). CIM = confidence interval for mean.

Gruppe 3	MZP 1	MZP 2 nicht akt. Proben	MZP 3 nicht akt. Proben	MZP 2 aktivierte Prob.	MZP 3 aktivierte Prob.
14	100	104	88	101	94
15	100	83	77	97	95
16	100	101	86	101	92
17	100	99	90	97	93
18	100	98	93	96	92
	Mittelwerte	97	87	98	93
	CIM	10	8	3	2
	Signifikanz zum Ausgangswert/ Zum Vorwert	p > 0,05	p < 0,05	P > 0,05	p < 0,05

Die Werte aus obiger Tabelle befinden sich in folgender **Graphik 4-3**. Vom Ausgangswert (= 100 %) aus betrachtet fallen die Werte deutlich im Verlauf.

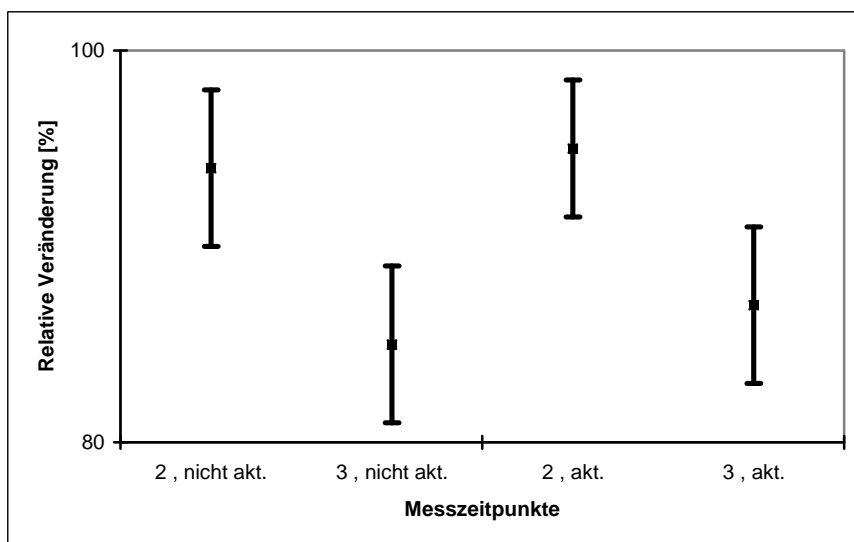
Statistische Signifikanz ist vom Ausgangswert zum MZP 2 hin sowohl bei den nicht aktivierten als auch bei den aktivierten Proben nicht gegeben, da die 100 %-Marke im CIM, d.h. im 95%-

Vertrauensbereich liegt. Vom 2. zum 3. MZP hin besteht jedoch bei beiden Arten von Proben Signifikanz.



Graphik 4-3: Darstellung der autolog Blutstammzelltransplantierten Patienten aus **Tabelle 4-3** zum MZP 1 (=100 %) und zum MZP 2 und MZP 3 jeweils für die nicht aktivierten und die aktivierten Proben

Folgende **Graphik 4-4** zeigt die MFI-Werte aller 18 Patienten aus den **Tabellen 4-1 bis 4-3**. Hieraus ist ersichtlich, dass statistische Signifikanz sowohl vom Ausgangswert zum MZP 2 als auch vom MZP 2 zum MZP 3 gegeben ist.



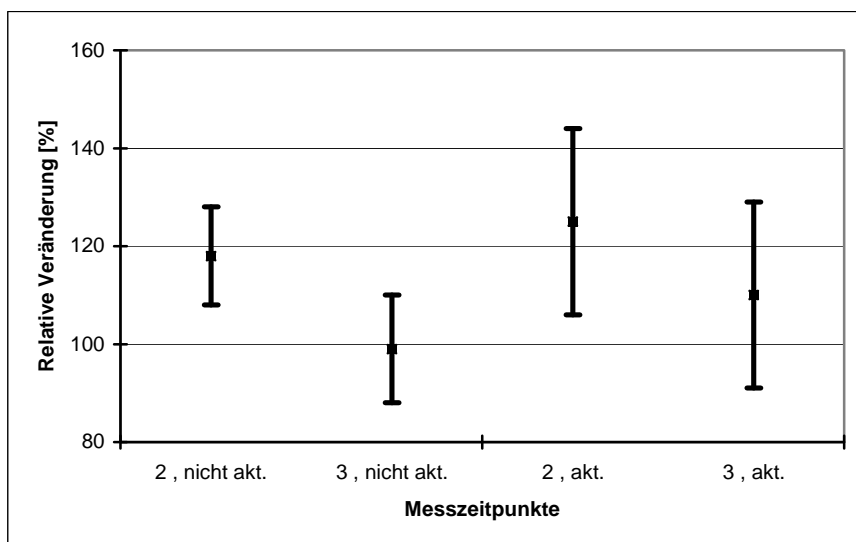
Graphik 4-4: Darstellung aller Patienten zum MZP 1 (=100%) und zum MZP 2 und MZP 3 jeweils für die nicht aktivierten und die aktivierten Proben bei Verwendung des Antikörpers CD 41a

Tabelle 5-1: Darstellung der MFI-Werte (in % bezogen auf den Ausgangswert = 100%) des Antikörpers **CD 42b** zu den jeweiligen Meßzeitpunkten von 10 allogenen Knochenmarktransplantierten Patienten (**Gruppe 1**) CIM = confidence interval for mean.

Antikörper **CD 42 b** :

Gruppe 1	MZP 1	MZP 2 nicht akt. Proben	MZP 3 nicht akt. Proben	MZP 2 aktivierte Prob.	MZP 3 aktivierte Prob.
1	100	130	84	136	107
2	100	145	131	195	183
3	100	106	77	100	92
4	100	110	95	122	101
5	100	106	101	115	104
6	100	108	88	111	98
7	100	111	105	101	99
8	100	134	100	133	98
9	100	117	111	111	101
10	100	116	98	125	108
	Mittelwerte CIM	118 10	99 11	125 19	110 19
	Signifikanz zum Ausgangswert/ zum Vorwert	p < 0,05	p < 0,05	p < 0,05	p > 0,05

Folgende **Graphik 5-1** lässt erkennen, dass die Werte aus der **Tabelle 5-1** beim Vergleich der nicht aktivierten und der aktivierten Proben des MZP 2 mit dem Ausgangswert jeweils eine statistische Signifikanz ergeben, jedoch dies beim Vergleich des MZP 3 mit dem Vorwert MZP 2 nur bei den nicht aktivierten Proben der Fall ist.



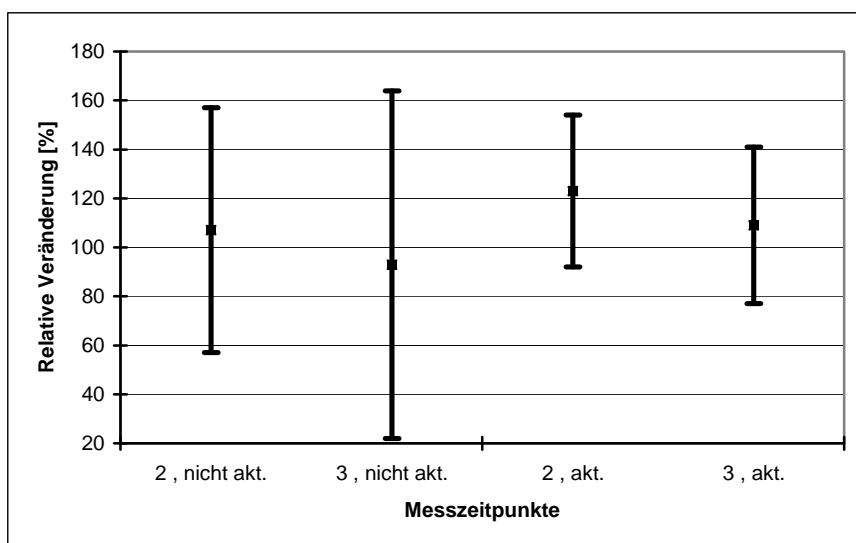
Graphik 5-1: Darstellung der allogen Knochenmarktransplantierten Patienten aus **Tabelle 5-1** zum MZP 1 (=100 %) und zum MZP 2 und MZP 3 jeweils für die nicht aktivierten und die aktivierten Proben

Tabelle 5-2: Darstellung der MFI-Werte (in % bezogen auf den Ausgangswert = 100%) des Antikörpers **CD 42b** zu den jeweiligen Meßzeitpunkten von drei autolog Knochenmarktransplantierten Patienten (**Gruppe 2**). CIM = confidence interval for mean.

Gruppe 2	MZP 1	MZP 2 nicht akt. Proben	MZP 3 nicht akt. Proben	MZP 2 aktivierte Prob.	MZP 3 aktivierte Prob.
11	100	104	90	134	117
12	100	128	123	125	117
13	100	88	66	109	94
	Mittelwerte	107	93	123	109
	CIM	50	71	31	32
	Signifikanz zum Ausgangswert/ zum Vorwert	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$

In der folgenden **Graphik 5-2** sind die Werte aus der **Tabelle 5-2** abgebildet und es lässt sich erkennen, dass die 100 %-Marke als Ausgangswert verglichen mit dem MZP 2 und auch der Mittelwert MZP 3 verglichen jeweils mit dem MZP 2 im CIM, d.h. im 95 %-Vertrauensintervall liegt, also keine statistische Signifikanz, wahrscheinlich aufgrund der kleinen Gruppengröße, gegeben ist.

Doch ist über den gesamten Verlauf hin eine steigende gefolgt von einer fallenden Tendenz der Werte erkennbar.

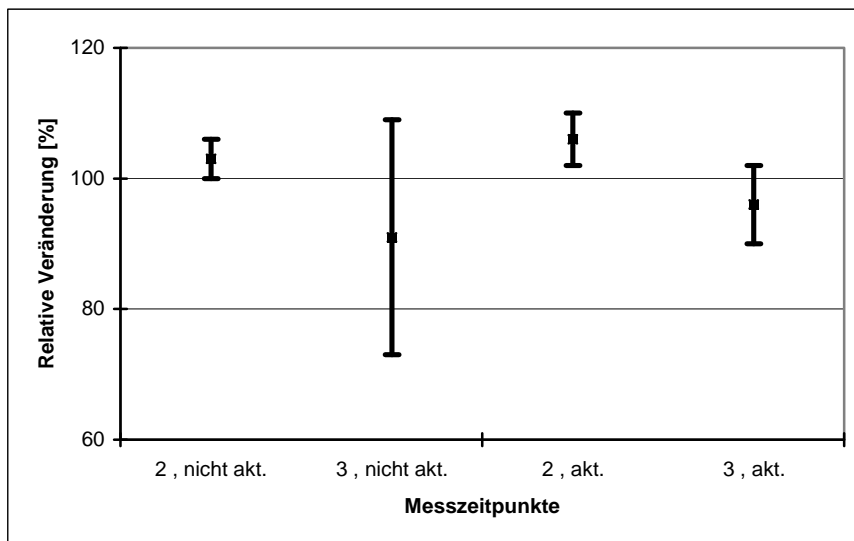


Graphik 5-2: Darstellung der autolog Knochenmarktransplantierten Patienten aus **Tabelle 5-2** zum MZP 1 (=100 %) und zum MZP 2 und MZP 3 jeweils für die nicht aktivierten und die aktivierten Proben

Tabelle 5-3: Darstellung der MFI-Werte (in % bezogen auf den Ausgangswert = 100%) des Antikörpers **CD 42b** zu den jeweiligen Messzeitpunkten von fünf Blutstammzelltransplantierten Patienten (**Gruppe 3**). CIM = confidence interval for mean.

Gruppe 3	MZP 1	MZP 2 nicht akt. Proben	MZP 3 nicht akt. Proben	MZP 2 aktivierte Prob.	MZP 3 aktivierte Prob.
14	100	100	71	108	94
15	100	106	106	104	97
16	100	102	83	109	89
17	100	102	98	102	97
18	100	103	99	105	101
	Mittelwerte CIM	103 3	91 18	106 4	96 6
	Signifikanz zum Ausgangswert/ zum Vorwert	p < 0,05	p > 0,05	p < 0,05	p < 0,05

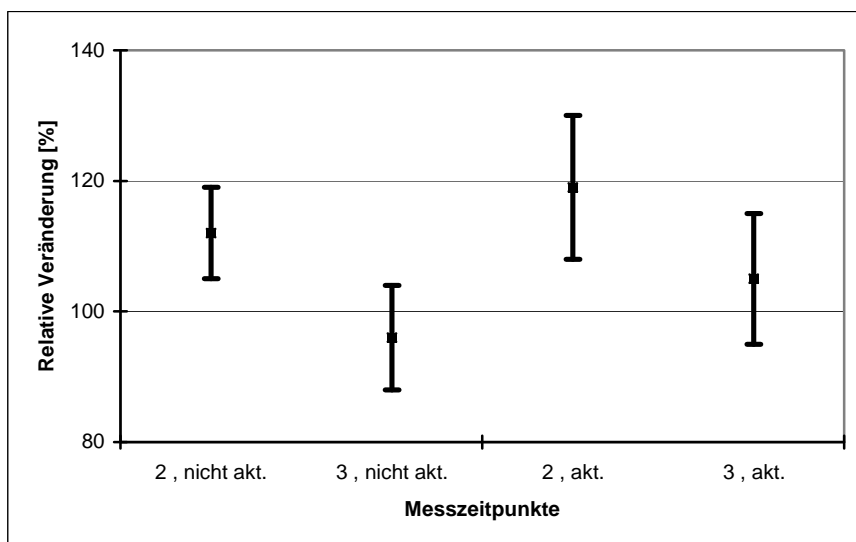
Die Werte aus der **Tabelle 5-3** sind in unten stehender **Graphik 5-3** eingetragen und zeigen, dass sowohl bei den nicht aktivierten als auch bei den aktivierten Proben eine statistische Signifikanz vom Ausgangswert (= 100%) zum MZP 2 gegeben ist, jedoch vom MZP 2 zum MZP 3 nur bei den aktivierten Proben. Eine deutlich steigende Tendenz der Werte und dann im Verlauf fallende ist aus der Graphik jedoch ersichtlich.



Graphik 5-3: Darstellung der autolog Blutstammzelltransplantierten Patienten aus **Tabelle 5-3** zum MZP 1 (=100 %) und zum MZP 2 und MZP 3 jeweils für die nicht aktivierten und die aktivierten Proben

Folgende **Graphik 5-4** zeigt die MFI-Werte aller 18 Patienten aus den **Tabellen 5-1 bis 5-3**.

Hieraus ist ersichtlich, dass wohl nun aufgrund der größeren Gruppengröße statistische Signifikanz sowohl vom Ausgangswert zum MZP 2 als auch vom MZP 2 zum MZP 3 gegeben ist.



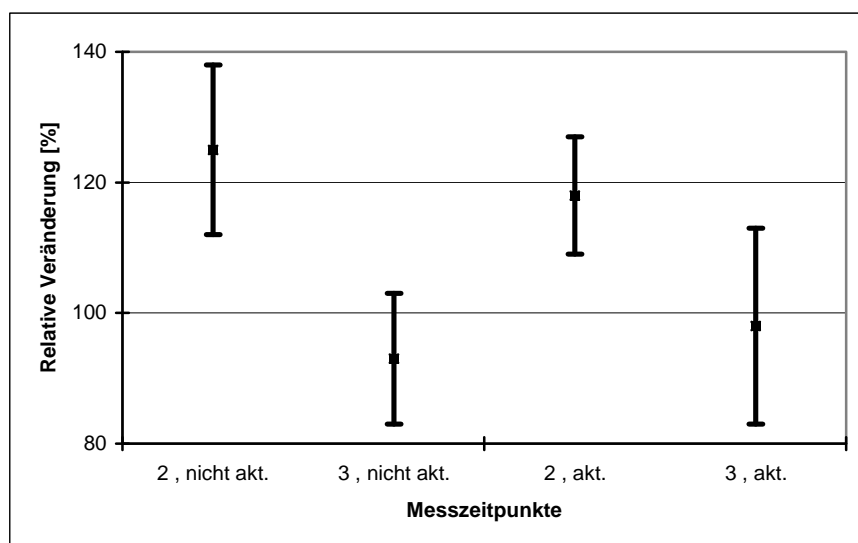
Graphik 5-4: Darstellung aller Patienten zum MZP 1 (=100%) und zum MZP 2 und MZP 3 jeweils für die nicht aktivierten und die aktivierten Proben bei Verwendung des Antikörpers CD 42b

Tabelle 6-1: Darstellung der MFI-Werte (in % bezogen auf den Ausgangswert = 100%) des Antikörpers **CD 62** zu den jeweiligen Meßzeitpunkten von 10 allogenen Knochenmarktransplantierten Patienten (**Gruppe 1**). CIM = confidence interval for mean.

Antikörper CD 62 :

Gruppe 1	MZP 1	MZP 2 nicht akt. Proben	MZP 3 nicht akt. Proben	MZP 2 aktivierte Prob.	MZP 3 aktivierte Prob.
1	100	106	89	107	87
2	100	132	106	115	103
3	100	123	91	120	119
4	100	126	101	108	79
5	100	126	95	149	137
6	100	124	74	101	69
7	100	126	116	112	105
8	100	115	72	124	83
9	100	169	90	122	110
10	100	105	97	117	84
	Mittelwerte CIM	125 13	93 10	118 9	98 15
	Signifikanz zum Ausgangswert/ zum Vorwert	p < 0,05	p < 0,05	p < 0,05	p < 0,05

Folgende **Graphik 6-1** zeigt die Werte aus der **Tabelle 6-1** und zeigt beim Vergleich der Messzeitpunkte untereinander statistische Signifikanz bei beiden Arten von Proben.



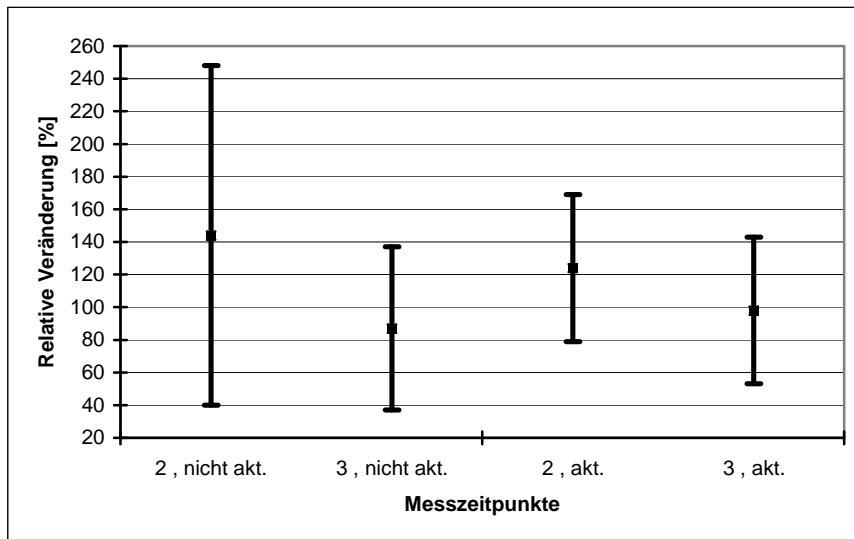
Graphik 6-1: Darstellung der allogenen Knochenmarktransplantierten Patienten aus **Tabelle 6-1** zum MZP 1 (=100 %) und zum MZP 2 und MZP 3 jeweils für die nicht aktivierten und die aktivierten Proben

Tabelle 6-2: Darstellung der MFI-Werte (in % bezogen auf den Ausgangswert = 100%) des Antikörpers **CD 62** zu den jeweiligen Meßzeitpunkten von drei autolog Knochenmarktransplantierten Patienten (**Gruppe 2**) CIM = confidence interval for mean.

Gruppe 2	MZP 1	MZP 2 nicht akt. Proben	MZP 3 nicht akt. Proben	MZP 2 aktivierte Prob.	MZP 3 aktivierte Prob.
11	100	106	68	103	88
12	100	189	84	133	87
13	100	137	108	136	119
	Mittelwerte	144	87	124	98
	CIM	104	50	45	45
	Signifikanz zum Ausgangswert/ zum Vorwert	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05

In der folgenden **Graphik 6-2** sind die Werte aus der **Tabelle 6-2** abgebildet und es lässt sich erkennen, dass - wahrscheinlich aufgrund der kleinen Gruppengröße – keine statistische Signifikanz gegeben ist.

Doch ist über den gesamten Verlauf hin eine steigende gefolgt von einer fallenden Tendenz der Werte erkennbar.



Graphik 6-2: Darstellung der autolog Knochenmarktransplantierten Patienten aus **Tabelle 6-2** zum MZP 1 (=100 %) und zum MZP 2 und MZP 3 jeweils für die nicht aktivierten und die aktivierten Proben

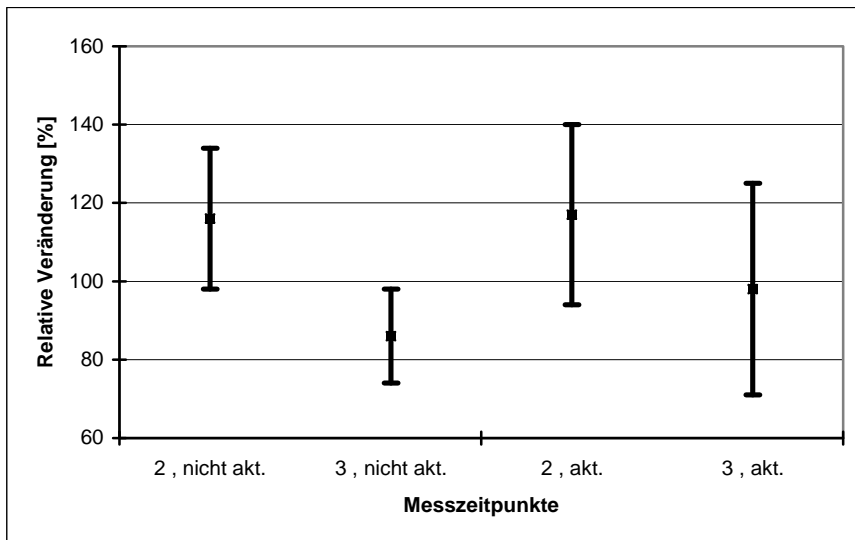
Tabelle 6-3: Darstellung der MFI-Werte (in % bezogen auf den Ausgangswert = 100%) des Antikörpers **CD 62** zu den jeweiligen Meßzeitpunkten von fünf Blutstammzelltransplantierten Patienten (**Gruppe 3**). CIM = confidence interval for mean.

Gruppe 3	MZP 1	MZP 2 nicht akt. Proben	MZP 3 nicht akt. Proben	MZP 2 aktivierte Prob.	MZP 3 aktivierte Prob.
14	100	103	87	109	89
15	100	120	96	148	137
16	100	120	81	117	82
17	100	102	73	103	87
18	100	136	95	106	95
	Mittelwerte CIM	116 18	86 12	117 23	98 27
	Signifikanz zum Ausgangswert/ zum Vorwert	p > 0,05	p < 0,05	p > 0,05	p > 0,05

In der folgenden **Graphik 6-3** sind die Werte aus der **Tabelle 6-3** abgebildet und es lässt sich erkennen, dass die 100 %-Marke im Vergleich zum MZP 2 im CIM, d.h. im 95 %-Vertrauensintervall liegt, hier also keine statistische Signifikanz, gegeben ist.

Nur bei den nicht aktivierten Proben besteht vom MZP 2 zum MZP 3 statistische Signifikanz.

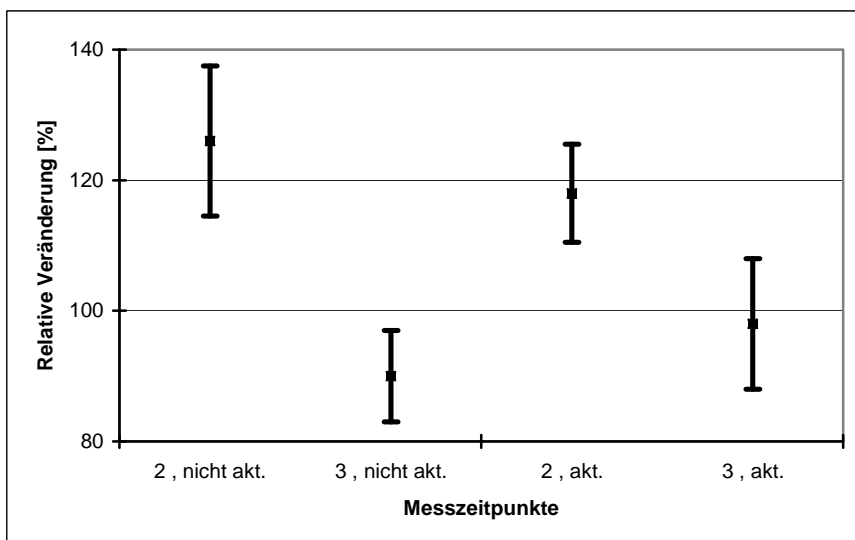
Doch ist über den gesamten Verlauf hin eine steigende gefolgt von einer fallenden Tendenz der Werte sowohl bei den nicht aktivierten als auch bei den aktivierten Proben erkennbar.



Graphik 6-3: Darstellung der autolog Blutstammzelltransplantierten Patienten aus **Tabelle 6-3** zum MZP 1 (=100 %) und zum MZP 2 und MZP 3 jeweils für die nicht aktivierten und die aktivierten Proben

Folgende **Graphik 6-4** zeigt die MFI-Werte aller 18 Patienten aus den **Tabellen 6-1 bis 6-3**.

Hieraus ist ersichtlich, dass wohl nun aufgrund der größeren Gruppengröße statistische Signifikanz sowohl vom Ausgangswert zum MZP 2 als auch vom MZP 2 zum MZP 3 gegeben ist.



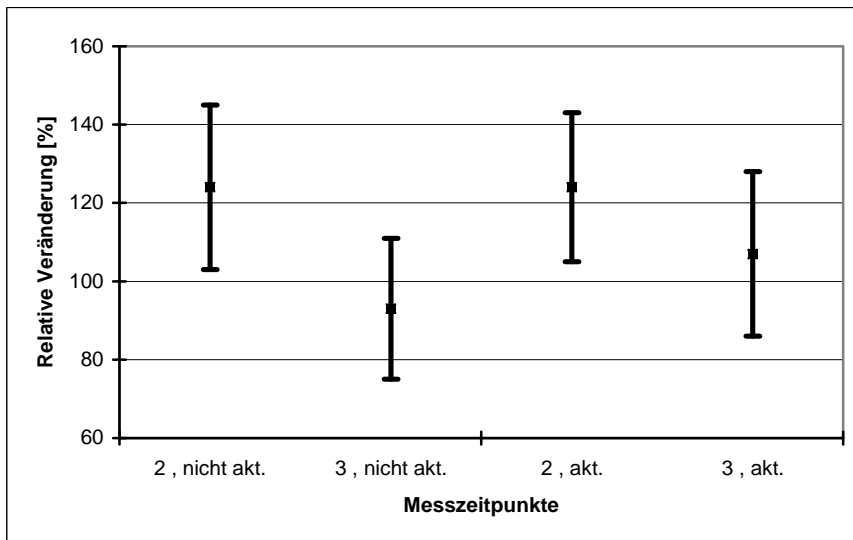
Graphik 6-4: Darstellung aller Patienten zum MZP 1 (=100%) und zum MZP 2 und MZP 3 jeweils für die nicht aktivierten und die aktivierten Proben bei Verwendung des Antikörpers CD 62

Tabelle 7-1: Darstellung der MFI-Werte (in % bezogen auf den Ausgangswert = 100%) des Antikörpers **CD 63** zu den jeweiligen Meßzeitpunkten von 10 allogenen Knochenmarktransplantierten Patienten (**Gruppe 1**). CIM = confidence interval for mean.

Antikörper CD 63 :

Gruppe 1	MZP 1	MZP 2 nicht akt. Proben	MZP 3 nicht akt. Proben	MZP 2 aktivierte Prob.	MZP 3 aktivierte Prob.
1	100	119	109	185	173
2	100	109	99	107	110
3	100	92	83	114	92
4	100	142	108	109	102
5	100	111	64	149	108
6	100	85	51	95	84
7	100	140	124	116	104
8	100	119	77	110	62
9	100	133	124	128	120
10	100	186	93	126	115
	Mittelwerte CIM	124 21	93 18	124 19	107 21
	Signifikanz zum Ausgangswert/ zum Vorwert	$p < 0,05$	$p < 0,05$	$p < 0,05$	$p > 0,05$

In der unten stehende **Graphik 7-1** ist statistische Signifikanz bei den aktivierten Proben jeweils vom Ausgangswert zum MZP 2 gegeben, jedoch nicht vom MZP 2 zum MZP 3, bei den nicht aktivierten Proben jeweils vom MZP 1 zum MZP 2 und vom MZP 3.



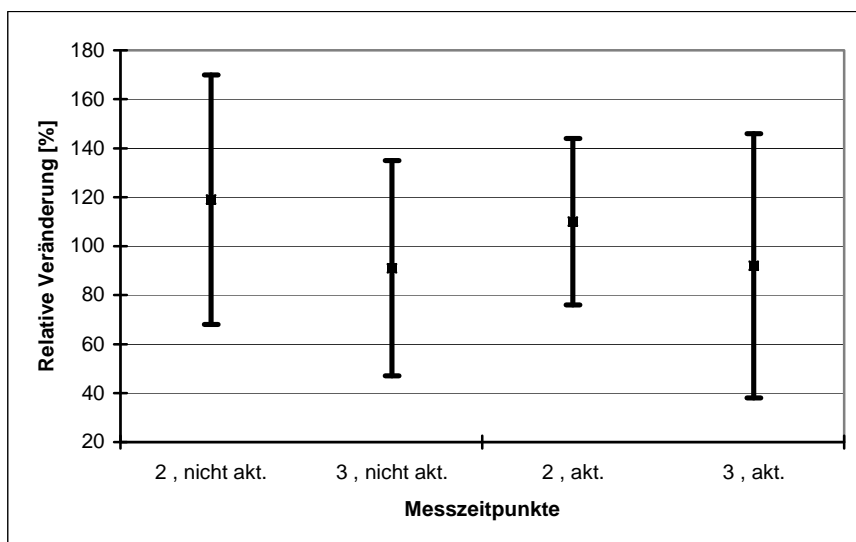
Graphik 7-1: Darstellung der allogen Knochenmarktransplantierten Patienten aus **Tabelle 7-1** zum MZP 1 (=100 %) und zum MZP 2 und MZP 3 jeweils für die nicht aktivierten und die aktivierten Proben

Tabelle 7-2: Darstellung der MFI-Werte (in % bezogen auf den Ausgangswert = 100%) des Antikörpers **CD 63** zu den jeweiligen Meßzeitpunkten von drei autolog Knochenmarktransplantierten Patienten (**Gruppe 2**). CIM = confidence interval for mean.

Gruppe 2	MZP 1	MZP 2 nicht akt. Proben	MZP 3 nicht akt. Proben	MZP 2 aktivierte Prob.	MZP 3 aktivierte Prob.
11	100	106	79	102	73
12	100	143	111	126	116
13	100	109	82	103	88
	Mittelwerte CIM	119 51	91 44	110 34	92 54
	Signifikanz zum Ausgangswert zum Vorwert	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05

In der folgenden **Graphik 7-2** sind die Werte aus der **Tabelle 7-2** abgebildet und es lässt sich erkennen, dass keine statistische Signifikanz, wahrscheinlich aufgrund der kleinen Gruppengröße, gegeben ist.

Doch ist über den gesamten Verlauf hin eine steigende gefolgt von einer fallenden Tendenz der Werte erkennbar.



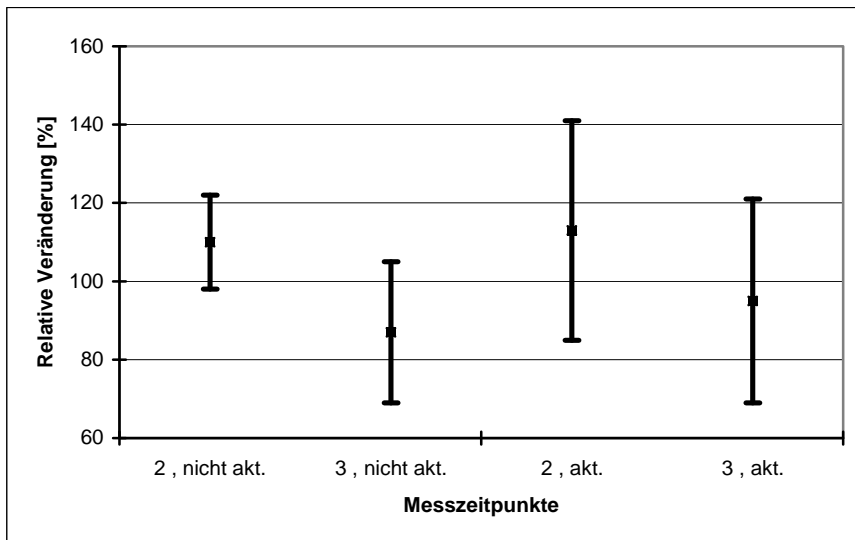
Graphik 7-2: Darstellung der autolog Knochenmarktransplantierten Patienten aus **Tabelle 7-2** zum MZP 1 (=100 %) und zum MZP 2 und MZP 3 jeweils für die nicht aktivierten und die aktivierten Proben

Tabelle 7-3: Darstellung der MFI-Werte (in % bezogen auf den Ausgangswert = 100%) des Antikörpers **CD 63** zu den jeweiligen Meßzeitpunkten von fünf Blutstammzelltransplantierten Patienten (**Gruppe 3**) CIM = confidence interval for mean.

Gruppe 3	MZP 1	MZP 2 nicht akt. Proben	MZP 3 nicht akt. Proben	MZP 2 aktivierte Prob.	MZP 3 aktivierte Prob.
14	100	103	74	100	77
15	100	125	94	153	126
16	100	106	71	103	85
17	100	104	89	101	82
18	100	114	106	107	105
	Mittelwerte	110	87	113	95
	CIM	12	18	28	26
	Signifikanz zum Ausgangswert zum Vorwert	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05

In der folgenden **Graphik 7-3** sind die Werte aus der **Tabelle 7-3** abgebildet und es lässt sich erkennen, dass keine statistische Signifikanz gegeben ist.

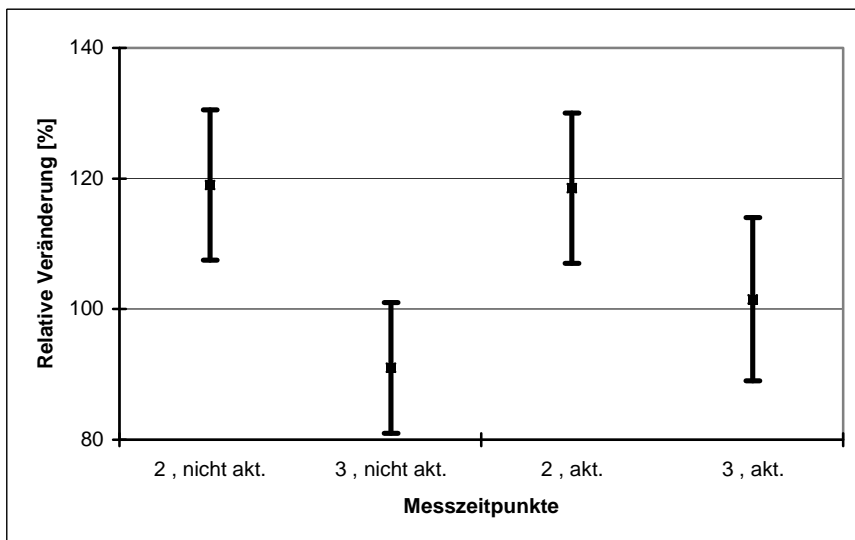
Doch ist über den gesamten Verlauf hin erkennt man zunächst steigende Werte, die dann im weiteren Verlauf wieder sinken.



Graphik 7-3: Darstellung der autolog Blutstammzelltransplantierten Patienten aus **Tabelle 7-3** zum MZP 1 (=100 %) und zum MZP 2 und MZP 3 jeweils für die nicht aktivierten und die aktivierten Proben

Folgende **Graphik 7-4** zeigt die MFI-Werte aller 18 Patienten aus den **Tabellen 7-1 bis 7-3**.

Hieraus ist ersichtlich, dass hier nun statistische Signifikanz sowohl vom Ausgangswert zum MZP 2 als auch vom MZP 2 zum MZP 3 gegeben ist.



Graphik 7-4: Darstellung aller Patienten zum MZP 1 (=100%) und zum MZP 2 und MZP 3 jeweils für die nicht aktivierten und die aktivierten Proben bei Verwendung des Antikörpers CD63

5.2 Thrombozytenparameter PDW, MPV und P-LCR

Die Thrombozytenparameter *PDW* (platelet distribution width), *MPV* (mean platelet volume) und *P-LCR* (platelet- large cell ratio) wurden für jeden Patienten zu jedem Messzeitpunkt erfaßt (Tabelle 8).

Da die Werte während der Messungen meistens die Tendenz zeigten, abzusinken oder – in wenigen Fällen – in der Höhe gleich blieben, wurden jeweils der erste Messwert (Ausgangswert) und der jeweils letzte Messwert tabellarisch und graphisch dargestellt.

Hierbei bedeutet *MPV* das mittlere Thrombozyten-Volumen mit einem Referenzbereich von 9-13 fl für das benutzte Analysengerät der Firma Sysmex,

der Parameter *PDW* die Thrombozyten-Volumenverteilungsbreite, deren Referenzwerte im Bereich 9-13 fl liegen und

der Parameter *P-LCR* den Prozentanteil der Thrombozyten mit einem Volumen von mehr als 12 fl an der Gesamtzahl der Thrombozytenzahl. Hier wird der Referenzbereich mit 13-43 % eingegrenzt.

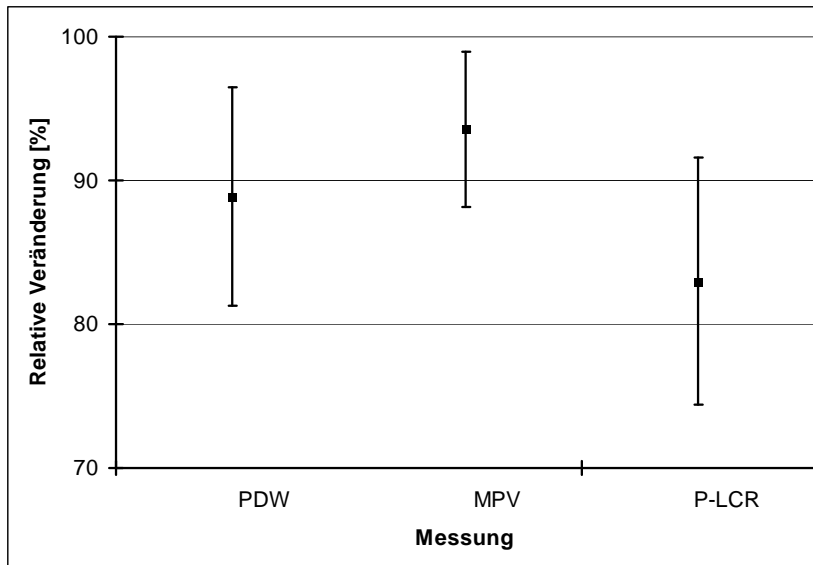
Tabelle 8: Darstellung der Thrombozytenparameter PDW, MPV und P-LCR für die Patienten der Gruppen 1, 2 und 3 in Absolutwerten. Der erste Messwert (Ausgangswert) zum MZP 1 erscheint jeweils links in der Spalte, der zuletzt gemessene zum MZP 3 rechts;
 PDW = platelet distribution width, MPV = mean platelet volume, P-LCR = platelet-large cell ratio

Gruppe 1	PDW		MPV		P-LCR	
1	14,6	8,9	10,8	9,4	32,4	19,5
2	13,8	13,4	10,1	10,0	28,9	28,6
3	14,2	14,5	11,6	11,3	37,2	37,5
4	14,2	15,7	12,8	12,6	46,6	40,0
5	12,1	12,0	10,0	10,0	25,7	25,1
6	21,7	17,2	13,7	13,2	52,6	45,4
7	11,6	10,2	10,2	9,5	33,1	23,2
8	10,6	10,6	8,1	9,5	28,5	22,2
9	23,6	19,3	13,2	12,2	44,6	33,2
10	13,6	10,8	11,6	10,4	36,8	25,5
Gruppe 2						
11	12,2	13,0	13,8	9,8	33,8	25,8
12	10,6	9,9	13,2	9,4	28,2	20,7
13	13,4	14,5	10,9	11,2	33,0	33,7
Gruppe 3						
14	14,7	10,4	11,7	9,8	48,2	22,9
15	15,0	13,7	9,9	9,9	27,6	27,2
16	18,6	13,0	12,0	11,7	43,7	35,6
17	17,3	11,2	11,1	10,4	40,0	27,6
18	16,4	15,9	12,4	12,2	36,2	42,2

Folgende Graphik zeigt für die Parameter PDW, MPV und P-LCR alle 18 Patienten im statistischen Vergleich. Der erste Messwert als Ausgangswert wurde hier auf 100 % gesetzt und der zeitlich letzte Messwert dazu in Relation. Diese beiden Messwerte liegen bei jedem Patienten in dem Zeitraum, der jeweils die drei Messzeitpunkte (MZP 1 bis MZP 3) umfasst.

Aus der unten stehenden **Graphik 8** für alle drei Parameter ist statistische Signifikanz der Messwerte zum Ausgangswert gegeben, da die 100 %-Marke (Ausgangswert) außerhalb des CIM, d.h. des 95%-Vertrauensbereichs, des jeweiligen Parameters PDW, MPV und P-LCR liegt.

Auffallend ist bei allen drei Parametern ein Absinken der Werte über die Zeit.



Graphik 8: Darstellung der Parameter PDW, MPV und P-LCR für alle 18 Patienten zum MZP 1 (Ausgangswert = 100 %) und zum MZP 3

5.3 Zellpopulation

Die Analyse der bei neun von 18 Patienten beobachteten *Zellpopulation* wurde bereits im Methodikteil (unter 4.2.5 *Versuchsdurchführung und Auswertung*) beschrieben und zeigte folgende Ergebnisse:

- 1) für 89,8 % der eingeteten Zellen lag eine positive Fluoreszenz für das Membranglykoprotein IV (*CD 36*) vor,
- 2) auf 85,6 % der eingeteten Zellen befanden sich Membranglykoprotein-IIb-IIIa-Komplexe (*CD 41a*)
- 3) und 90,2 % der Zellen exprimierten das Membranglykoprotein Ib (*CD 42b*).
- 4) 8,5 % der Zellen zeigten eine positive Fluoreszenz für Glycophorin (GP).
- 5) 1,7 % der eingeteten Zellen exprimierten den Aktivierungsmarker P-Selektin
- 6) und 0,4 % der Zellen zeigten eine positive Fluoreszenz für das Membranglykoprotein GP 53.

6 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden die Membranglykoproteine der Thrombozyten in der Regenerationsphase der Thrombozytopoese untersucht. Die durchflußzytometrische Analyse erfolgte bei 18 Patienten, die mit einer Hochdosischemotherapie und anschließender Knochenmark- oder peripheren Blutstammzelltransplantation behandelt worden waren. Somit wurde ein Patientengut ausgewählt, das sich in einer pancytopenischen Phase befand und mit Hilfe des Transplantats die körpereigene Zellproduktion wieder aufnahm. Zu diesem Zeitpunkt wurden bei jedem Patienten unter der ansteigenden Thrombozytenzahl Verlaufsmessungen verschiedener Thrombozytenfunktionsparameter durchgeführt.

Methodenvergleich:

Wenn auch definierte Thrombozytenfunktionen (Adhäsion, Aggregation, Sekretion, Formänderung) mit klinischen Tests beschrieben werden können (z.B. turbidimetrische Aggregationsmessung), so haben diese Verfahren den Nachteil, daß verschiedene Thrombozytenpopulationen in einer Probe das Gesamtuntersuchungsergebnis unterschiedlich beeinflussen, jedoch nicht voneinander getrennt werden können. Demgegenüber bietet die Durchflußzytometrie den Vorteil, in Kombination mit einer Immunfluoreszenzmarkierung von antigenen Epitopen den genauen Zelltypus bzw. den aktuellen Rezeptorstatus der einzelnen Zelle zu erkennen.

Kritisch muß hier angemerkt werden, dass mit einer geringen Thrombozytenzahl zunächst die Messung an sich länger dauert und sich einige Zellen am Boden des Röhrchens absetzen können. Während des Messvorgangs ist kein Aufschütteln der Probe möglich.

Dann stellt sich die Frage, inwieweit alle Zellen in der Probe beim Ansaugen wirklich erfaßt werden, denn das Kapillarloch des Durchflußzytometers ist ca. 200 µm groß und die Thrombozyten werden durch den Laserstrahl wohl nicht alle einzeln erfasst. Je höher die Thrombozytenzahl in der Probe, desto repräsentativer ist auch das Ergebnis.

Mit anderen Messmethoden verglichen steht die Durchflußzytometrie immer noch an vorderster Stelle, was die Spezifität und Sensitivität der Messung der Thrombozytenmembranproteine betrifft und ist verantwortlich für eine vergleichsweise geringe künstliche Aktivierung der Thrombozyten während der Messung (125).

Wenngleich demzufolge Thrombozytenzahlen von 10.000 pro μl Blut und geringer kaum Aussagen über den momentanen Rezeptorstatus zulassen, ist in dieser Arbeit darauf geachtet worden, dass bei der ersten Messung die Gesamtzahl über diesem Wert lag. Die genauen Thrombozytenzahlen zu jedem Messzeitpunkt und die weiteren Messparameter sind im Anhang ausgewiesen.

Seit mehreren Jahren sind Aufbau und Funktion der in dieser Arbeit näher untersuchten Thrombozytenmembranglykoproteine bekannt (15,16,21,23,26,32,41,42) und werden die Vorteile der Durchflußzytometrie als Verfahren zur raschen Aufdeckung von geringen Funktionsänderungen der Blutplättchen genutzt (44,106,107,108,117). In Anlehnung an diese Möglichkeiten kann auch ein veränderter Rezeptorstatus der Thrombozyten bei bestimmten Erkrankungen, so beispielsweise bei Diabetikern (110) oder Tumorkranken (109), zur Klärung der Ätiopathogenese beitragen.

6.1 Gruppeneinteilung der Patienten

Die Gruppeneinteilung erfolgte in allogene Knochenmark- (**Gruppe 1**), autologe Knochenmark- (**Gruppe 2**) und autologe peripher Blutstammzelltransplantierte Patienten (**Gruppe 3**).

Hierbei handelt es sich um drei Verfahren zur kurativ intendierten Behandlung hämatologischer Neoplasien und solider Tumoren nach einer Hochdosischemotherapie. Im Hinblick auf die signifikanten Veränderungen bzw. Tendenzen in der Membranglykoproteinexpression kann festgestellt werden, daß alle Patienten, unabhängig von der allogenen oder autologen Stammzelltransplantation, vergleichbare Änderungen in dem Rezeptorstatus ihrer Thrombozyten erfuhren.

6.2 Die Expression der Thrombozyten-Membranglykoproteine

Im Ergebnisteil sind zu verschiedenen Messzeitpunkten die Expressionen der betreffenden Membranglykoproteine aller Patienten als MFI (mean fluorescence intensity)–Werte dokumentiert. Die statistische Signifikanz lässt sich tabellarisch und graphisch ablesen und gibt einen eindeutigen Hinweis darauf, dass bei den meisten Thrombozyten die Expression der Membranglykoproteine pro Zelle im Verlauf zunächst steigt, um dann wieder zu sinken.

Bei denjenigen Patienten, bei denen die Expression einzelner Parameter keine signifikanten Unterschiede zum Vorwert aufwies, war eine Tendenz im Anstieg und Abfall der Werte erkennbar, so daß angenommen werden muß, daß auch in diesen Fällen die untersuchten Membranglykoproteine zeit- und damit ereignisabhängig reagierten.

Hier war der geringe Stichprobenumfang der einzelnen Patientensubgruppen mit der entsprechend größeren Variabilität einzelner Werte verbunden und vermutlich wurde deshalb das Signifikanzniveau nicht erreicht.

Betrachtet man jedoch die Graphiken, in denen für jeden Antikörper alle 18 Patienten dargestellt wurden, so ergaben sich für jeden Antikörper statistisch signifikante Veränderungen der MFI-Werte, die im folgenden bei den einzelnen Membranglykoproteinen besprochen werden.

Diese statistisch signifikanten Veränderungen der MFI -Werte der jeweils betrachteten Membranglykoproteine aller Patienten repräsentieren eine Änderung der Anzahl der Membranglykoproteine als Rezeptoren - und damit Vermittler der Funktionen - auf der Zelloberfläche der Thrombozyten und geben somit Aufschluß über den aktuellen Rezeptorstatus der Zelle.

Membranglykoproteinkomplex Ib/IX (CD 42 b) :

Alle 18 Patienten zusammen betrachtet zeigen sich statistisch signifikante Veränderungen in folgendem Sinne (**Graphik 5-4**): einer zeitweisen Erhöhung der Expression des GP Ib/IX-Komplexes folgt ein Absinken der Werte.

Wenn man die Patientengruppen 1 bis 3, die sich in der Art der Therapie unterscheiden, jede für sich einzeln betrachtet, zeigen die Ergebnisse bezüglich der signifikant veränderten Expression des GP Ib/IX-Komplexes sowohl im nicht aktivierten als auch im aktivierten Probenansatz vornehmlich bei den Patienten der Gruppen 1 und 3 eine Erhöhung der Expression. Hierauf folgt ein Abfall der Werte in diesen Gruppen, der jedoch nicht signifikant ist, denn aufgrund der kleinen Gruppengröße liegt eine größere Streubreite vor. In Gruppe 2 sind die Veränderungen zwar nicht signifikant, aber tendenziell zu erkennen, so daß hier aufgrund der mit dem GP Ib/IX-Komplex verbundenen Funktion der Adhäsion zeitweise von einer Verbesserung der Adhäsionsfähigkeit (112) und Erhöhung der Reaktionsbereitschaft im plasmatischen Gerinnungssystem (113) der Thrombozyten gesprochen werden kann.

Das Maß der Membranglykoproteinexpression könnte als Parameter für die Funktionsfähigkeit der Thrombozyten im Hinblick auf die klinische Gesamtsituation dieses Patientenguts herangezogen werden (Werte in den Tabelle 5-1 bis 5-3)

Membranglykoproteinkomplex I Ib/IIIa (CD 41 a) : Die Ausprägung des GP I Ib/IIIa-Komplexes auf der Thrombozytenoberfläche zeigt sowohl im nicht aktivierten als auch im aktivierten Probenansatz kontinuierlich fallende Werte bei allen 18 Patienten.

In den Gruppen 2 und 3 besteht aufgrund der geringen Gruppengröße nicht immer statistische Signifikanz wie aus den Tabellen 4-1 bis 4-3 ersichtlich, jedoch zeigen die Werte über den Verlauf hin ebenfalls eine kontinuierlich fallende Tendenz, so daß davon ausgegangen werden kann, daß die Thrombozytenfunktion, die an den GP I Ib/IIIa-Komplex geknüpft ist, bei allen Patienten über den Messzeitraum hin abgenommen hat. Hauptsächlich über den Liganden Fibrinogen kommt es mit Hilfe von Calcium zur interthrombozytären Brückenbildung und somit zur Zusammenlagerung der Plättchen (23,24). Durch Defekte oder Fehlen von GP I Ib/IIIa-Komplexen gekennzeichnete Thrombozyten führen zu hämorrhagischen Diathesen und werden bei der Thrombasthenie Glanzmann beschrieben (28). Da der GP I Ib/IIIa-Komplex die Plättchenaggregation vermittelt, bedeutet die kontinuierlich fallende Expression der Membranglykoproteine vor allem im Hinblick auf die statistisch signifikanten Ergebnisse alle 18 Patienten gemeinsam betrachtend (Graphik 4-4) eine Abnahme der Aggregationsbereitschaft der gemessenen Thrombozyten während der Regenerationsphase der Thrombopoese.

Membranglykoprotein (GP) IV (CD 36): Alle 18 Patienten zusammen betrachtet, sind folgende Veränderungen in der Membranglykoproteinexpression statistisch signifikant:

der Zunahme der Expression des GP IV in allen Patientengruppen im nicht aktivierten Probenansatz folgt ein erkennbarer Abfall. Aktiviert man den Probenansatz mit PMA (Phorbolster), so zeigt die Expression gleiche tendenzielle Ergebnisse zunächst im Anstieg und dann im Abfall (Tabelle 3-1 bis 3-3). Statistische Signifikanz besteht aufgrund der kleinen Gruppengröße nur in Gruppe 1 für den Vergleich des MZP 2 mit dem Ausgangswert.

Schon Simak, Hollada und Janota (19) erkannten 1999 die Funktion des GP IV als Rezeptor für adhäsive Proteine des Subendothels. Die Zunahme und Abnahme des GP IV auf der Thrombozytenoberfläche in der Regenerationsphase der Thrombozytose bedeutet eine

zeitweise Erhöhung der Adhäsionsfähigkeit der Plättchen an das Subendothel. Dabei spielen als Liganden im Endothel sowohl Collagen als auch Thrombospondin (33) eine Rolle. Wenn auch Englyst im Jahr 2003 (34) die Rolle von Thrombospondin in der Plättchenaggregation noch einmal hervorhob, so scheint mit dem Liganden Collagen und der durch GP IV vermittelten Thrombospondin-abhängigen Adhäsion von Monozyten an Thrombozyten (114) die Funktion von GP IV vornehmlich in der Plättchenadhäsion zu bestehen.

Membranglykoprotein (GP) P-Selektin (=GMP 140, PADGEM) – CD 62: Die Ergebnisse aller drei Gruppen (Tabelle 6-1 bis 6-3) sowohl im nicht aktivierten als auch im aktivierten Probenansatz zeigen eine Zunahme der Expression des P-Selektins gefolgt von einer Abnahme.

Statistische Signifikanz ist hierbei gegeben in Gruppe 1 vom Ausgangswert zum MZP 2 und in Gruppe 3 vom MZP 2 zum MZP 3. Dies betrifft den aktivierten und auch den nicht aktivierten Ansatz und ist in der geringen Gruppengröße und der damit verbundenen größeren Streubreite begründet.

An die Funktion des P-Selektins, das mit Endothelzellen und den alpha-Granula von ruhenden Thrombozyten (35) assoziiert ist und erst nach Aktivierung auf der Zelloberfläche exprimiert wird (36,37), ist die Adhäsion von Thrombozyten an verschiedene Typen von Leukozyten geknüpft (39,40). Da die in dieser Arbeit untersuchten Membranglykoproteine in ihrer hauptsächlichen Funktion als Adhäsionsmoleküle (GP Ib/IX-Komplex und GP IV) das gleiche Phänomen im Verlauf ihrer Expression zeigen wie das P-Selektin und das GP 53 (siehe unten), kann hier die Behauptung gefestigt werden, daß während der Regenerationsphase der Thrombopoese die Adhäsionsbereitschaft der Thrombozyten zeitweise erhöht ist und dieses Phänomen als Faktor für die Beurteilung der Diagnostik und Therapie dieses Patientenguts herangezogen werden sollte. Zudem sind diese Veränderungen in der Expression der Membranglykoproteine in Betrachtung aller 18 Patienten statistisch signifikant.

Membranglykoprotein GP 53 (CD 63): Alle 18 Patienten gemeinsam betrachtet bestehen Veränderungen in der Expression der Membranglykoproteine von statistischer Signifikanz:

bei allen drei Patientengruppen (Tabellen 7-1 bis 7-3) sowohl im nicht aktivierten als auch im aktivierten Probenansatz ist zunächst ein Anstieg der Expression des GP 53, gefolgt von einer Abnahme zu erkennen. Dies ist als eine entsprechende Tendenz erkennbar. Jedoch besteht

statistische Signifikanz, wenn man jede Gruppe einzeln betrachtet, nur in Gruppe 1 im Vergleich des MZP 2 mit dem Ausgangswert.

Auch hier kann festgehalten werden, daß die an das GP 53 geknüpfte Thrombozytenfunktion wahrscheinlich zeitweise „erhöht“ war. Diese ist gekoppelt mit der durch Stimulation der Plättchen auf deren Oberfläche erscheinenden Membranglykoproteinen, die in ruhenden Thrombozyten Bestandteil der innerthrombozytären Lysosomenmembranen sind (41). Nach Aktivierung verschmelzen die Lysosomenmembranen mit der Plasmamembran und die GP's 53 können eine maßgebliche Rolle bei der Adhäsion der Thrombozyten am Endothel spielen (49). So zeigt GP 53 als Adhäsionsmolekül wie auch GP IV, der GP Ib/IX-Komplex und P-Selektin zu einem bestimmten Zeitpunkt der regenerierenden Thrombopoese eine erhöhte Funktionsbereitschaft der Thrombozyten und unterstützt damit seine Wichtigkeit bei der Beurteilbarkeit des klinischen Gesamtzustandes.

6.3 Die Thrombozytenparameter PDW (platelet distribution width), MPV (mean platelet volume) und P-LCR (platelet-large cell ratio) im Verlauf

Hinsichtlich ihrer Thrombozytenparameter PDW, MPV und P-LCR zeigen die untersuchten Thrombozyten aller drei Patientengruppen im Meßzeitraum ähnliche Veränderungen dahingehend, daß - mit wenigen Ausnahmen (Patienten 3, 4, 8, 11 und 13 beim Parameter PDW, die Patienten 8 und 13 beim Parameter MPV und die Patienten 3, 8, 13 und 18 beim Parameter P-LCR)- die Werte im Verlauf gleich bleiben oder, wie in den meisten Fällen, sinken (Tabelle 8). Unabhängig von der Behandlung der Patienten zeigen die Thrombozyten in der Regenerationsphase der Poese nach einer Knochenmarkaplasie über den Zeitverlauf hin abfallende Werte bezüglich ihres Volumens (MPV und P-LCR) und die Volumenverteilungsbreite (PDW) nimmt im Meßzeitraum bei den meisten Patienten ebenfalls ab.

Diese Ergebnisse sind – alle 18 Patienten gemeinsam betrachtet – statistisch signifikant (Graphik 8).

Dies bedeutet, daß die von den Patienten gebildeten Thrombozyten über die Zeit hinweg kleiner werden und die Streuung ihrer Volumina abnimmt bis die Werte für PDW, MPV und P-LCR im Normalbereich gesunder Thrombozyten liegen (siehe Werte in Tabelle 8). Die Veränderungen der Thrombozytenparameter in dieser Form stimmen mit Mielkes Veröffentlichung von 1976 (1)

überein, daß während einer gesteigerten Thrombopoese zunächst vermehrt große Thrombozyten im peripheren Blut nachweisbar sind und es sich dabei um die jungen Formen handeln dürfte. Da bei den meisten Parametern die Expression der Glykoproteine im zeitlichen Verlauf zunächst steigt und dann wieder sinkt, gleichzeitig aber die Größe der Zellen abnimmt, lässt sich daraus schlussfolgern, dass größere und damit jüngere Zellen nicht unbedingt eine vermehrte Glykoproteinexpression auf ihrer Zelloberfläche zeigen.

Darüberhinaus gibt die Literatur Hinweise darauf, dass für Voraussagen über den Aktivierungszustand von Thrombozyten die Zahl und das mittlere Thrombozyten-Volumen nicht als aussagekräftige Parameter zur Verfügung stehen (124).

6.4 Die Membranglykoproteinexpression im nicht aktivierten Probenansatz im Vergleich zum aktivierten Probenansatz

In dieser Arbeit wurden die zu messenden Thrombozyten in einem zweiten Probenansatz mit PMA (Phorbol ester) aktiviert, um Veränderungen in der Membranglykoproteinexpression bei ex vivo aktivierten Thrombozyten darstellen zu können. Die in 6.2 diskutierten Beobachtungen belegen, daß sowohl die nicht aktivierten als auch die aktivierten Proben bei jedem untersuchten Membranglykoprotein im gleichen Maße im Verlauf entweder steigende oder fallende Werte präsentieren. Insofern zeigt dies die Unabhängigkeit der veränderten Ausprägung der Membranglykoproteine im Untersuchungszeitraum in Bezug auf eine vorherige ex vivo - Aktivierung und damit Stimulierung. Betrachtet man jedoch bei jedem untersuchten Membranglykoprotein die Höhe der Fluoreszenzmesswerte (die Fluoreszenzintensität ist der Membranglykoproteinexpression direkt proportional) vergleichsweise im nicht aktivierten und im aktivierten Probenansatz in allen Patientengruppen (Tabellen 3-7), so fallen einige Besonderheiten auf :

GP Ib/IX- Komplex: die Meßwerte der aktivierten Proben sind am entsprechendem Messzeitpunkt höher als die der nicht aktivierten Proben, betrachtet man jeweils die Mittelwerte der Gruppen.

Dies ist ein Hinweis darauf, daß während der Regeneration der Poese nicht aktivierte Thrombozyten den GP Ib/IX- Komplex in geringerem Maße auf ihrer Oberfläche exprimieren als Thrombozyten im aktivierten Zustand. Dies könnte bedeuten, daß eine an den GP Ib/IX-

Komplex gekoppelte erhöhte Funktion und damit erhöhte Adhäsionsbereitschaft von aktivierten Thrombozyten eher als bei nicht aktivierten an das Subendothel vorliegt.

GP IV, P-Selektin, GP 53: Die Fluoreszenzmeßwerte der aktivierten Proben sind zu jedem Meßzeitpunkt höher als die der nicht aktivierten Proben („Ausreißer“ Patient Nr. 12 beim GP IV und 11 und 12 beim P-Selektin sowie die Patienten Nr. 11,12 und 13 beim GP 53 nicht mit betrachtet).

Hier muß festgehalten werden, daß eine vermehrte Ausprägung der Adhäsionsmoleküle GP IV, P-Selektin und GP 53 zu einer erhöhten Adhäsionsbereitschaft der aktivierten Thrombozyten im Vergleich zu den nicht aktivierten führt .

GP IIb/IIIa-Komplex: Betrachtet man auch hier die Mittelwerte, so zeigen die Fluoreszenzwerte der aktivierten Proben in den Gruppen 2 und 3 zum entsprechendem Messzeitpunkt höhere Werte als die der nicht aktivierten Proben. Da der GP IIb/IIIa-Komplex die Aggregation der Thrombozyten vermittelt, kann hier von einer verbesserten Plättchenaggregationsbereitschaft der aktivierten Plättchen gegenüber den nicht aktivierten in der Regenerationsphase der Thrombopoese ausgegangen werde. Einschränkend muß hier jedoch angezeigt werden, dass sieben von 18 Patienten bei den nicht aktivierten Proben höhere Werte aufweisen als bei den aktivierten Proben.

Eine mögliche Erklärung für die vermehrte Expression des P-Selektin, des GP 53 und des GP IIb/IIIa-Komplexes auf der Thrombozytenoberfläche von aktivierten Zellen gegenüber nicht aktivierten Zellen liefert die Herkunft der einzelnen Membranglykoproteine.

Der GP IIb/IIIa-Komplex und das P-Selektin sind u.a. mit den Membranen der innerthrombozytären alpha-Granula assoziiert, die erst nach Stimulation der Zelle mit der Plasmamembran fusionieren und zur Ausprägung der Membranproteine auf der Zelloberfläche führen (39). Desgleichen erklärt erst die Zellaktivierung das verstärkte Vorhandensein des sonst im ruhenden Thrombozyten mit der Lysosomenmembran assoziierten GP 53 auf der Zelloberfläche, denn die Stimulation führt zur Verschmelzung der Lysosomen mit der Plasmamembran (45).

6.5 Einfluß der Medikamente auf die Membranglykoproteinexpression

Die auf die Hochdosismethotherapie und anschließende Knochenmark- bzw. Stammzelltransplantation folgende Phase der Panzytopenie gefährdet den Patienten gegenüber Infektionen, anämischen Zuständen und thrombozytopenischen Blutungen. Bis die körpereigene Blutzellproduktion wieder in ausreichendem Maße einsetzt, müssen dem Patienten supportive Erythrozyten- und Thrombozytenkonzentrate, Immunsuppressiva zur Verhinderung der Transplantatabstoßung bei allogenen Knochenmarktransplantierten Patienten, hämatopoetische Wachstumsfaktoren und Chemotherapeutika zur Infektionsprophylaxe sowie zur Infektbehandlung verabreicht werden. Zur Unterstützung der humoralen Abwehr, insbesondere in Ergänzung zur antibakteriellen Chemotherapie, kann auch die Substitution von Antikörpern erfolgen.

Alle Patienten, deren Blut in dieser Arbeit untersucht worden war, erhielten Antibiotika und Immunsuppressiva (bei allogenen Knochenmark-transplantierten Patienten der Gruppe 1) zum Zeitpunkt ihrer regenerierenden Thrombopoese. Für die zur Infektprophylaxe sowie zur Infektbehandlung applizierten Antibiotika sind neben panzytopenischen Effekten (zutreffend für Sulfamethoxazol-Trimetoprim, Cefotaxim, Tobramycin), thrombozytopenische und gleichzeitig leukozytopenische (Piperacillin, Imipenem, Vancomycin) und allein thrombozytopenische Nebenwirkungen (Amphotericin B, Antihistaminika, Ganciclovir) beschrieben worden. Als Immunsuppressivum zur Verhinderung der Transplantatabstoßung erhielten die allogenen Knochenmarktransplantierten Patienten (Gruppe 1) zumeist Cyclosporin, unter dessen Behandlung sehr selten Thrombozytopenien auftreten können.

Vor diesem Hintergrund kann demnach die regenerierende Thrombozytopenie des Patienten in der Hinsicht beeinflusst werden, daß die verabreichten Substrate die absolute Zahl der Thrombozyten supprimieren. Demgegenüber muß beachtet werden, daß die einsetzende Poese aller Patienten im erwarteten Zeitraum aus der Phase der Panzytopenie herausführte und es stellt sich die Frage, ob die in der Literatur aufgeführten potentiellen Nebenwirkungen bei diesem Patientengut überhaupt bemerkenswert in Erscheinung getreten sind. Wie sich der Einsatz der oben genannten Substanzen auf die bereits gebildeten einzelnen Thrombozyten hinsichtlich der Expression ihrer Membranglykoproteine auswirkt, kann in dieser Arbeit nicht geklärt werden und muß weiteren Untersuchungen vorbehalten bleiben. Da aber in allen Patientengruppen bei Betrachtung jedes einzelnen Antikörpers gleiche Tendenzen im Verlauf der Membranglykoproteinexpression zu erkennen bzw. - bis auf wenige Ausnahmen - signifikante

Unterschiede aufgetreten sind und die Patienten - egal welcher Gruppe zugehörig - je nach Bedarf zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Poese und in unterschiedlichem Maße die oben genannten Substanzen verabreicht bekamen, scheint die Ausprägung der Membranglykoproteine auf der Zelloberfläche durch die Substanzen nicht wesentlich beeinflusst worden zu sein.

6.6 Das Phänomen Zellpopulation

Bei neun der insgesamt 18 Patienten wurde während der Messungen folgendes Phänomen beobachtet:

89,8% der Zellen exprimierten GP (Membranglykoprotein) IV (CD 36), 85,6% der Zellen GP IIB/IIIa-Komplex (CD 41a) und 90,2% der Zellen GP Ib (CD 42b). Jedoch nur 1,7 % der Zellen exprimierten den Aktivierungsmarker P-Selektin (CD 62) und nur 0,4 % das Membranglykoprotein GP 53 (CD 63).

Während GP IV nicht nur auf der Thrombozytenoberfläche nachgewiesen werden kann, repräsentieren die Zellen mit GP Ib und dem GP IIB/IIIa-Komplex eindeutig thrombozyten-spezifische Marker. Der Annahme, daß es sich deshalb um Thrombozyten handelt, steht zunächst die atypische Lokalisation der Zellpopulation entgegen, die, wie im Ergebnisteil beschrieben, viel kleinere Zellen, als es Thrombozyten sind, erkennen läßt (**Abbildung 7**). Es könnte sich bei den hier beobachteten Zellen somit um bisher noch nicht näher charakterisierte handeln, die die bisher als „thrombozyten-spezifisch“ titulierten Marker exprimieren und damit eine neue Zellart repräsentieren. Dann wäre die Spezifität der oben genannten Marker in Frage gestellt.

Wahrscheinlicher jedoch ist, dass es sich bei diesen Zellen um von Thrombozyten abgespaltene Zellfragmente handelt, sogenannte „platelet-derived microparticles“.

Diese sind in den letzten Jahren charakterisiert worden als Zellfragmente, die von Thrombozyten abgespalten werden, wenn diese in der Blutbahn aktiviert werden (116). Sie sind kleiner als ein μm groß und können mit dem Antikörper gegen das Antigen CD 41 a durchflusszytometrisch identifiziert werden (117). Zutreffen würden diese Fakten auch auf die hier genannte Zellpopulation. Sie trat bei fünf allogenen Knochenmarktransplantierten Patienten (Patientennummern 1-4 und 9), bei zwei autolog Knochenmarktransplantierten Patienten

(Patientennummern 11 und 12) sowie bei zwei peripher Blutstammzelltransplantierten Patienten (Nummern 15 und 18) auf.

Nur in sehr geringem Maße exprimieren diese Zellen die Aktivierungsmarker P-Selektin und GP 53. Dies stimmt überein mit Hinweisen in der neueren Literatur, dass die „platelet-derived microparticles“ sowohl von aktivierten Thrombozyten als Zellfragmente abgespalten werden können als auch während der Megakaryozytopoese normalerweise generiert werden können (132).

Diese Zellfragmente haben selbst koagulatorische Eigenschaften und sind fähig zur Adhäsion an traumatisiertes Endothel und zur Aggregation (116). Mit gesunden Kontrollpersonen verglichen wurden Patienten nach Herzinfarkt, mit KHK und Nierenversagen, die eine signifikant höhere Zahl an „platelet-derived microparticles“ aufwiesen als die Kontrollgruppe (118). Hierbei gilt die Durchflußzytometrie immer noch als die standardisierte Untersuchungsmethode (117).

So übernehmen im Blut zirkulierende Fragmente anderer Zelllinien wie auch die Thrombozytenfragmente Schlüsselpositionen in den Bereichen Entzündung und Signalfunktionen in immunologischen Vorgängen. Weitere Untersuchungen werden zeigen, wie diese näher spezifiziert werden können (119).

7 Zusammenfassende Diskussion

Diese Arbeit beschäftigt sich mit durchflußzytometrischen Untersuchungen der Membranglykoproteine von Blutplättchen aus Patienten, denen bei maligner Grunderkrankung in kurativer Absicht Stammzellen oder Knochenmark zur Beschleunigung der Regeneration von Blutzellen nach Hochdosistherapie appliziert wurden. In solchen Situationen befinden sich die Patienten für eine bestimmte Zeit in einer Zellaplasie und sind auf fremde (Allergisierungspotential) Erythrozyten-, Thrombozytenkonzentrate und Granulozytenwachstumsfaktoren angewiesen.

Die Substitution mit Thrombozyten stellt bei einem Knochenmarktransplantierten Patienten einen wesentlichen Kostenfaktor dar (120). Gerade für einen solchen Patienten, aber auch für die Thrombozytentransfusion im allgemeinen beeinflußt die Alloimmunisierung als die Bildung von Antikörpern gegen die transfundierten Plättchen den Wirkungsgrad der Transfusion in einem hohen Maß (121,122).

Um den Bedarf von Thrombozytenkonzentraten möglichst gering zu halten, müssen verlässliche Parameter zur Indikationsstellung herangezogen werden können. Neben klinischen Faktoren (Blutung, Fieber, Infektion) (123) steht bisher lediglich die Thrombozytenzahl routinemäßig zur Verfügung.

In der vorliegenden Arbeit sind nach der Stammzelltransplantation in drei Patientensubgruppen (peripher Blutstammzell-, autolog und allogene Knochenmarktransplantierte) wiederholt die Membranglykoproteine als Rezeptoren auf der Oberfläche der Thrombozyten untersucht und die Expression innerhalb der Patientengruppen im zeitlichen Verlauf miteinander verglichen worden.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, daß mit den statistisch signifikanten Veränderungen der Membranglykoproteinexpression eine 2 -10 Tage andauernde veränderte Funktionsfähigkeit der Thrombozyten in der Regenerationsphase der Myelopoese einherging, die durch die Auswertung der Adhäsionsmoleküle GP Ib, GP IV, P-Selektin und GP 53 erkennbar wird. Diese Zunahme der Expression, gefolgt von einer Abnahme bis fast zum Ausgangsniveau vermag in der thrombozytopenischen Situation der hier untersuchten Patienten eine Verbesserung der Funktionalität der Thrombozyten bedingen, deren klinische Bedeutung für die Diagnostik und Therapie thrombozytopenischer Zustände in weiteren Untersuchungen erforscht werden sollte.

Demgegenüber zeigte der GP IIb/IIIa-Komplex eine über den zeitlichen Verlauf hin statistisch signifikante kontinuierliche Abnahme der Expression. Bezogen auf die Funktion des GP IIb/IIIa-Komplexes könnte dies eine Verminderung der Funktionalität in Bezug auf die Aggregation der Thrombozyten in der Regenerationsphase bedeuten.

Um zu klären, inwieweit dies Einfluß auf die Beurteilung des klinischen Gesamtzustandes der Patienten hat, muß dieses Phänomen im Zusammenhang mit der Thrombozytopenie gesehen werden.

Der methodisch durch Aktivierung veränderte Probenansatz präsentiert im gleichen Maße wie der nicht aktivierte Probenansatz bei jedem Membranglykoprotein gleiche Tendenzen in den Verlaufsmessungen, jedoch im Vergleich der Membranglykoproteine untereinander fallen die höheren Fluoreszenzwerte der aktivierten Proben beim GP IV, beim P-Selektin und GP 53 gegenüber den nicht aktivierten Proben auf. Erklärungen hierfür liefert die jeweilige Lokalisation der Membranglykoproteine, denn die Assoziation derselben mit innerthrombozytären Bestandteilen (P-Selektin mit den alpha- Granula und GP 53 mit den Lysosomen) ruft bei Stimulation der Thrombozyten die vermehrte Expression der Membranglykoproteine auf der Zelloberfläche hervor.

Bei etwa der Hälfte der regenerierenden Patienten ist eine Zellpopulation identifiziert worden, die mit großer Wahrscheinlichkeit Thrombozytenfragmenten entspricht, da sie thrombozytentypische Oberflächenmarker aufweist. Als deren Charakteristika sind in der Literatur koagulatorische Eigenschaften beschrieben, die dazu beitragen könnten, den optimalen Zeitpunkt der Thrombozytenkonzentratgabe bei zytopenischen Patienten mit zu bestimmen.

Die Auswertung der Thrombozytenparameter ergibt bei den von den Patienten gebildeten Thrombozyten im Untersuchungszeitraum eine Größenreduktion und eine Abnahme der Streuung ihrer Volumina. Dies stimmt mit Veröffentlichungen überein, die die während einer gesteigerten Thrombopoese vermehrt nachgewiesenen großen Thrombozyten für die jungen Formen halten.

Zu dem Einfluß der den Patienten während der regenerierenden Thrombopoese verabreichten Medikamente auf die Thrombozyten ist in der Literatur nur eine mögliche Supprimierung der absoluten Thrombozytenzahl beschrieben. Die Auswirkung auf die Membranglykoproteinexpression ist hiermit nicht beurteilbar und die potentiellen Nebenwirkungen verabreichter Substrate sind wahrscheinlich nicht in nennenswerter Weise in

Erscheinung getreten, da die einsetzende Poese aller Patienten im erwarteten Zeitraum aus der Phase der Panzytopenie herausführte.

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, daß in einer bestimmten Phase der Thrombozytenbildung nach totaler Aplasie durch Hochdosischemotherapie trotz geringer Thrombozytenzahl ihre Funktionalität, zumindest die der Adhäsion zeitweise gesteigert ist, so daß, würde man dies in weiteren Untersuchungen bestätigen, der Bedarf an fremden Thrombozytenkonzentraten geringer und ihre Indikationsstellung mit größerer Zurückhaltung gestellt werden könnte.

8 Literaturverzeichnis

- 1 Balduini CL., Noris, P., Spedini P., Beletti S., Zambelli A., Da Prada GA.: Relationship between size and thiazole orange fluorescence of platelets in patients undergoing high-dose chemotherapy. *Br J Haematol* 106 (1), 1999, 202-7
- 2 King SM, Reed GL : Development of platelets secretory granules. *Semin Cell Dev Biol* ,13 (4), 2002, 293-302
- 3 Naimushin YA, Mazurov AV.: Role of glycoprotein IIb-IIIa in stimulation of secretion from platelet granules. *Biochemistry (Mosc)*, 68 (2), 209-216
- 4 Breton-Gorius J., Guichard J.: Ultrastructural localization of peroxidase activity in human platelets and megakaryocytes. *Am. J. Path.*, 66, 1972, 277-286
- 5 Rand M., Reid G.: Source of serotonin in serum. *Nature (London)*, 168, 385-393
- 6 Jurk K., Kehrel BE.: Platelets: physiology and biochemistry. *Seminars in thrombosis und hemostasis*, Vol 31 (4), 2005,381-392
- 7 Damjanovich S, Vamosi G, Bodnar A, Bene L: New trends in studying structure and function of biological membranes. *Acta Physiol Hung* 89 (4), 2002, 415-25
- 8 Blanchard D., Dahr W., Hummel M., Latron F., Beyreuther K., Cartron J.-P.: Glycophorins B and C from human erythrocyte membranes. *J. Biol. Chem.*, 260, 1987, 5808-5811
- 9 Spiliotis ET, Nelson WJ : Spatal control of exocytosis. *Curr Opin Cell Biol* ,15 (4), 2003, 430-7
- 10 Tsukita S, Furuse M, Itoh M.: Multifunctional strands in tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2(4), 2001, 285-93
- 11 Van Meer G., Simons K.: The functions of tight junctions in maintaining differences in lipid composition between the apical and the basolateral cell-surface domains of MDCK cells. *EMBO J.*, 5, 1986, 1455-1464
- 12 Takakuwa Y : Regulation of red cell membrane protein interactions : implications for red cell function. *Curr Opin Haematol*, 8(2), 2001, 80-4
- 13 Rosenberg N, Zivelin A, Chetrit A, Dardik R, Kornbrot N, Freimark D, Inbal A.: Effects of platelet membrane glycoprotein polymorphisms on the risk of myocardial infarction in young males. *Isr Med Assoc J*, 4(6), 2002, 411-4
- 14 Dong J , Ye P, Schade AJ, Gao S, Romo GM, Turner NT, McIntire LV, Lopez JA : Tyrosine sulfation of glycoprotein I(b) alpha. Role of electrostatic interactions in von Willebrand factor binding. *J Biol Chem* 276 (20), 2001, 16690-4
- 15 Collier B.S., Peerschke E.I., Scudder I.E., Sullivan C.A.: Studies with a murine monoclonal antibody that abolished the ristocetin-induced binding of von Willebrand factor to platelets: Additional evidence in support of GP Ib as a platelet receptor for von Willebrand factor. *Blood*, 61, 1983, 99-112
- 16 Berndt M.C., Gregory C., Kabral A., Zola H., Fournier D., Castaldi P.A.: Purification and preliminary characterization of the GP Ib complex on the human platelet membrane. *Eur. J. Biochem.*, 151, 1985, 637-640

- 17 Englund GD, Bodnar RJ, Li Z, Ruggeri ZM, Du X : Regulation of von Willebrand factor binding to the platelet glycoprotein Ib-IX by a membrane skeleton-dependent inside-out signal. *J Biol Chem* , 276 (20), 2001, 16952-9
- 18 Bernard J., Soulier J.-P.: Sur une nouvelle variété de dystrophie thrombocytaire-hémorragique congénitale. *Semin. Hop.*, 24, Paris, 1948, 3217-3226
- 19 Simak , Holada K , Janota J, : Surface expression of major membrane glycoproteins on resting and TRAP-activated neonatal platelets. *Pediatr Res* , 46 (4), 1999, 445-449
- 20 Hawinger J.: Formation and regulation of platelet and fibrin hemostatic plug. *Hum. Path.*, 18, 1987, 111-122
- 21 Phillips D.R., Charo J.F., Parise L.V., Fitzgerald L.A.: The platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa complex. *Blood*, 71 (4), 1988, 831-843
- 22 Federici AB : The factor VIII/ von Willebrand factor complex: basic and clinical issues. *Haematologica* , 88(6), 2003, EREP 02
- 23 Gowda RM, Khan IA, Vasavada BC, Sacci TJ : Therapeutics of platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor antagonism. *Am J Ther*, 11(4),, 2004, 302-7
- 24 Turecek PL, Siekmann J, Schwarz HP : Comparative study on collagen-binding enzyme-linked immunosorbent assay and ristocetin cofactor activity assays for detection of functional activity of von willebrand factor. *Semin Thromb Hemost*, 28(2), 2002, 149-60
- 25 Frojmovic M.M., Mooney R.F., Wong T.: Dynamics of platelet glycoprotein IIb-IIIa receptor expression and fibrinogen binding. I. Quantal activation of platelet subpopulations varies with adenosine diphosphate concentration. *Biophys. J.*, 67 (5), 1994, 2060-2068
- 26 Frelinger AL, Furman MI, Krueger LA, Barnard MR, Michelson AD : Dissociation of glycoprotein IIb/IIIa antagonists from platelets does not result in fibrinogen binding or platelet aggregation. *Circulation* , 104(12); 2001, 1374-9
- 27 Huber W., Hurst J., Schlatter D., Barner R., Hubscher J., Kouns W.C., Steiner B.: Determination of kinetic constants for the interaction between platelet glycoprotein IIb-IIIa and fibrinogen means of surface plasmon resonance. *Eur. J. Biochem.*, 227 (3), 1995, 647-656
- 28 Monrigal C, Beurrier P, Mercier FJ, Boyer-Neumann C, Gillard P: Glanzmann's thrombasthenia and pregnancy: a case and review of the literature. *Ann Fr Anesth Reanim* 22(9),2003, 826-30
- 29 Onley DJ, Knight CG, Tuckwell DS : Micromolar Ca²⁺ concentrations are essential for Mg²⁺ dependent binding of collagen by the integrin alpha 2 beta 1 in human platelets. *J Biol Chem*, 275 (32), 2000, 24560-4
- 30 Nurden A.T., Rosa J.P., Fournier D., Legrand C., Didry D., Parquet A., Pidard D.: A variant of Glanzmann's thrombasthenia with abnormal Glycoprotein IIb-IIIa complexes in the platelet membrane. *J. Clin. Invest.*, 79, 1987, 962-967
- 31 Bennett J.S.: The molecular biology of platelet membrane proteins. *Seminars in Hematology*, 27 (2), 1990, 186-204
- 32 Daviet L., Morel-Kopp M.C., Kaplan C., Mc Gregor J.L.: A structural / functional domain on human CD 36 is involved in the binding of anti-NaK(a) antibodies. *Thromb. Haemost.*, 73 (3), 1995, 543-545

- 33 Podrez EA, Poliakov E, Shen Z, Zhang R, Deng Y, Sun M, Finton PJ: Identification of a novel family of oxidized phospholipids that serve as ligands for the macrophage scavenger receptor CD 36. *J Biol Chem* 277(41), 2002, 38503-16
- 34 Englyst NA, Taube JM, Aitman TJ, Baglin TP, Byrne CD: A novel role for CD 36 in VLDL- enhanced platelet activation. *Diabetes* 52(5), 2003, 1248-55
- 35 Furie B, Furie BC, Flaumenhaft R: A journey with platelet P-selectin: the molecular basis of secretion, signalling and cell adhesion. *Thromb Haemost*, 86(1), 2001, 214-21
- 36 Libersan D, Rousseau G, Merhi Y : Differential regulation of P-selectin expression by protein kinase A and protein kinase G in thrombin-stimulated human platelets. *Thromb Haemost*, 89(2), 2003, 310-7
- 37 Hattori R., Hamilton K.K., Mc Ever R.P., Sims P.J.: Complement proteins C 5b-9 induce secretion of high molecular weight multimers of endothelial von Willebrand factor and translocation of granule membrane protein GMP-140 to the cell surface. *J. Biol. Chem.* 264, 9053-9060
- 38 Arribas M, Cutler DF : Weibel-Palade body membrane proteins exhibit differential trafficking after exocytosis in endothelial cells. *Traffic*, 1(10), 2000, 783-93
- 39 Guidollet J, Chignier E, Pillot R, Gayet O, Mac Gregor J : Enhanced expression of P-selection (CD 62 P) by endothelial cells seeded onto synthetic arterial prostheses (PET, Dacron) is correlated with leukocyte interactions. *J Biomed Mater Res*, 44 (2), 1999, 156-61
- 40 Taylor ML, Brummet ME, Hudson SA, Miura K, Bochner BS : Expression and function of P-selectin glycoprotein ligand 1 (CD 162) on human basophils. *J Allergy Clin Immunol* , 106 (5), 2000, 918-24
- 41 Sirolli V, Ballone E, Garofalo D, Merciaro G: Platelet activation markers in patients with nephrotic syndrome. A comparative study of different platelet function tests. *Nephron* , 91(3), 2002 , 424-30
- 42 Nieuwenhuis H.K., van Oosterhout J.J.G., Rozemuller E.: Studies with a monoclonal antibody against activated platelets: evidence that a secreted 53.000-MW lysosome-like granule protein is expressed on the surface of activated platelets in the circulation. *Blood*, 70, 1987, 838-845
- 43 Saporta M, Kamei S, Persi L, Bousquet J, Arnoux B : Basophil activation during pollen season in patients monosensitized to grass pollens. *Allergy* , 56(5), 2001, 442-5
- 44 Sainte-Laudy J., Vallon C., Guerin J.C.: Analysis of membrane expression of the CD 63 human basophil activation marker. Applications to allergologic diagnosis. *Allerg. Immunol.*, Paris, Bd. 26 (6), 1994,211-214
- 45 Rahman A., Kumar S., Potter KN.: Anti-DNA antibodies- structure and function. *Lupus*, 11 (12),2002, 776-9
- 46 Köhler G., Milstein C.: Continous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 256, 1975, 495-496
- 47 Ahmed S, Singh A, Krauss J, Wentz T, Gunaratnam NT : Successful treatment of refractory low grade duodenal lymphoma with rituximab, an anti-CD 20 monoclonal antibody. *Am J Clin Oncol*, 26(4), 2003, 408-10

- 48 Bertolini F, Battaglia M, Lanza A, Palermo B : Control of stem cell proliferation and differentiation to achieve stable gene transfer and expression. *Bone Marrow Transplant*, 21 Suppl 3:S 75-76, 1998
- 49 Wang XY, Gelfanov V, Sun HB, Tsai S, Yang YC : Distinct actions of interleukin-9 and interleukin-4 on a hematopoietic stem cell line. *Exp Hematol*, 27 (1), 1999, 139-46
- 50 Till J.E., Mc Gulloch E.A., Siminovitch L.: A stochastic model of stem cell proliferation, based on the growth of spleen colony forming cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 51, 1964, 29-36
- 51 Chang M.S., Hsu R.Y., Mc Ninch J., Copeland N.G., Jenkins N.A.: The gene for murine megakaryocyte growth and development factor (thrombopoietin, Thpo) is located on mouse chromosome 16. *Genomics*, 26 (3), Apr. 10, 1995, 636-637
- 52 Muench MO, Barcena A : Megacaryocyte growth and Development factor is a potent growth factor for primitive hematopoietic Progenitors in the human fetus. *Pediatr Res*, Apr 7, 2004, S0031-3998
- 53 Ravandi F.: Role of cytokines in the treatment of acute leukemias : a review. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research* 20 (4), 2006, 563-571
- 54 Kaushansky K.: The mpl ligand: Molecular and cellular biology of the critical regulator of megakaryocyte development. *Stem. Cells. Dayt.*, 12, Suppl.1, 1994, 91-96
- 55 Grossi A., Vannuchi A.M., Bacci P. Longo G., Rafanelli D., Alterini R., Rossi-Ferrini P.: In vivo administration of stem cell factor enhances both proliferation and maturation of murine megakaryocytes. *Haematologica*, 80 (1), 1995, 18-24
- 56 Crosby W.H.: Normal platelet numbers. *Pulmonary-platelet interactions. Ser. Haematol.*, 8, 1976, 89-92
- 57 Basara N., Kiehl MG., Fauser AA.: New therapeutic modalities in the treatment of graft-versus- host disease. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* ,38 (2), 2001,129-138
- 58 Cornelissen JJ., Lowenberg B.: Developments in T-cell depletion of allogeneic stem cell grafts. *Curr Opin Hematol.*, 7(6), 2000, 348-352
- 59 Serke S., Säuberlich S., Abe Y., Huhn D.: Analysis of CD 34-positive hemopoietic progenitor cells from normal human adult peripheral blood: flux-cytometrical studies and in-vivo colony (CFU-GM, BFU-E) assays. *Ann. Hematol.*, 62, 1991, 45-53
- 60 Neben S., Marcus K., Mauch P.: Mobilization of hematopoietic stem and progenitor cell subpopulations from the marrow to the blood of mice following cyclophosphamide and/or granulocyte colony-stimulating factor. *Blood*, 81, 1993, 1960-1967
- 61 Dreger P., Schmitz N.: Allogeneic transplantation of blood stem cells: coming of age ? *Ann. Hematol.*, 80(3), 2001,127-136
- 62 Kessinger A., Smith D.M., Standjord S.E.: Allogeneic transplantation of blood-derived T-cell-depleted hemopoietic stem cells after myeloablative treatment in a patient with acute lymphoblastic leukemia. *Bone Marrow Transplant*, 4, 1989, 643-646
- 63 Dreger P., Suttorp M., Haferlach T., Loeffler H., Schmitz N., Schroyens W.: Allogeneic granulocyte-colony-stimulating-factor mobilized peripheral blood progenitor cells for treatment of engraftment failure after bone marrow transplantation. *Blood*, 81, 1993, 1404-1407

- 64 Nemunitis J., Rosenfeld C., Collins R., Pineiro L., Ohr S., Pallansch P., Schadduck R., Stone M., Fay J.: Pilot trial of allogeneic transplant combining peripheral blood and bone marrow in patients with refractory hematologic malignancy. *Blood*, 82, Suppl. 1, 1993, 417 a-423 a
- 65 Porrata LF., Litzow MR., Markovic SN.: Immune reconstitution after autologous hematopoietic stem cell transplantation . *Mayo Clin Proc.*, 76 (4), 2001, 407-412
- 66 Brittinger C., Bartels H., Common H.: Clinical and prognostic relevance of the Kiel Classification of non-Hodgkin lymphomas, results of a prospective multicenter study by the Kiel Lymphoma group. *Hematol. Oncol.*, 2, 1984, 269-306
- 67 Clarkson B., Ellis C., Little C., Gee T., Arlin Z.: Acute lymphoblastic leukemia in adults. *Semin. Oncol.*, 12, 1985, 160-179
- 68 Guizard A.V., Boutou O., Pottier D., Troussard X., Pheby D.: The incidence of childhood leukaemia around the La Hague nuclear waste reprocessing plant (France): a survey for the years 1978-1989. *J Epidemiol Community Health*, 55, 2001, 469-474
- 69 Sazawal S., Gurbuxani S., Bhatia K., Khattar A., Raina V., Arya L.S., Vats T.: Incidence, clinical characteristics and early treatment outcome in Indian patients of childhood acute lymphoblastic leukemia with ALL-1 gene rearrangement. *Leuk Res*, 25, 2001, 693-698
- 70 Matutes E., Taylor G.P., Cavenagh J., Pagliuca A., Bareford D., Domingo A., Hamblin M., Kelsey S., Mir N., Reilly J. T.: Interferon alpha and zidovudine therapy in adult T-cell leukaemia lymphoma : response and outcome in 15 patients. *Br J Haematol*, 113 (3), 2001, 779-784
- 71 Uderzo C.: Indications and role of allogeneic bone marrow transplantation in childhood very high risk acute lymphoblastic leukemia in first complete remission. *Haematologica*, 85 (11 Suppl), 2000, 9-11
- 72 Ludwig W.D., Thiel E.: Diagnostik der akuten Leukämien mit morphologischen, immunologischen und zytogenetischen Verfahren. *Internist*, 34, 1993, 498-510
- 73 Woods WG : Curing childhood acute myeloid leukemia (AML) at the half-way point: promises to keep and miles to go before we sleep. *Pediatric blood & cancer*, 46 (5), 2006, 565-9
- 74 Sanz Rodriguez C., Steegmann J.L., Granda A., de la Camara R., Figuera A., Arranz R.: Treatment of leukemia relapsed after allogeneic bone marrow transplantation with donor lymphocyte infusion: report of 11 cases, *Sangre (Barc)*, 44(6), 1999, 456-463
- 75 Dameshek W.: Some speculations on the myeloproliferative syndromes. *Blood*, 6, 1951, 372-375
- 76 Campbell J.D., Cook G., Holyoake T.L.: Evolution of bone marrow transplantation- the original immunotherapy. *Trends Immunol*, 22(2), 2001, 88-92
- 77 O'Hare T., Corbin AS., Druker BJ: Targeted CML therapy: controlling drug resistance, seeking cure. *Current opinion in genetics & development*. Bd. 16 (1), 2006, 92-99
- 78 Hill J.M.: Chronic myelogenous leukemia. Curable with early diagnosis and treatment. *Postgrad Med*, 106 (3), 1999, 149-152
- 79 Sacha T., Hawrylecka D., Skotnicki AB: Autologous hemopoietic stem cell transplantation in treatment of chronic myelogenous leukemia. *Przegl Lek.*, 56 Suppl 1, 1999, 62-66

- 80 Bennett J.M., Catovsky D., Daniel M.T., Flandrin G., Galton D.A.G., Gralnick H.R., Sultan C.: Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. *Br. J. Haematol.*, Bd. 51, 1982, 189-199
- 81 Aul C., Gattermann N., Germing U., Runde V., Heyll A.: Myelodysplastisches Syndrom. Epidemiologische und ätiologische Aspekte. *Dtsch. Med. Wochenschr.*, Bd. 117, 1992, 1223-1231
- 82 Imai Y., Kurokawa M., Izutsu K., Hangaishi A., Takeuchi K., Maki K.: Mutations of the AML 1 gene in myelodysplastic syndrome and their functional implications in leukemogenesis. *Blood*, 96 (9), 2000, 3154-3160
- 83 Shimazaki K., Oshima K., Suzumiya J., Kawasaki C., Kikuchi M.: Evaluation of apoptosis as a prognostic factor in myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol*, 110 (3), 2000, 584-590
- 84 Raza A., Meyer P., Dutt D., Zorat F., Lisak L., Nascimben F., du Randt M., Kaspar C., Goldberg C., Loew J., Dar S., Gezer S., Venugopal P., Zeldis J.: Thalidomide produces transfusion independence in longstanding refractory anemias of patients with myelodysplastic syndromes. *Blood*, 98 (4), 2001, 958-965
- 85 De Witte T., Suci S., Verhoef G., Labar B., Archimbaud E., Aul C., Selleslag D., Ferrant A., Wijermans P., Mandelli F., Amadori S., Jehn U., Muus P.: Intensive chemotherapy followed by allogeneic or autologous stem cell transplantation for patients with myelodysplastic syndromes (MDSs) and acute myeloid leukemia following MDS. *Blood*, 98(8), 2001, 2326-2331
- 86 Petera J., Macharova H., Pohankova R., Malir A., Coupek P., Konecny M., Pecina J.: Radiotherapy of early stages Hodgkin's disease. 10 years experience of the Masaryk Memorial Cancer Institute. *Neoplasma*, 47(2), 2000, 129-132
- 87 Lennert A., Feller K.: *Histopathologie der Non-Hodgkin-Lymphome (nach der aktualisierten Kiel-Klassifikation)*. Ed. 2nd, 1990, Springer Verlag, Berlin
- 88 Harris N.L., Jaff E.S., Stein H., Banks P.M., Chan J.K.C., Cleary M.L., Delsol G., de Wolf-Peters C., Falin B., Gatter K.C., Grogan T.M., Isaacson P.G., Knowles D.M., Mason D.Y., Müller-Hermelink H.K., Pileri S.A., Piris M.A., Ralfkiaer E., Warnke R.A.: A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma study group. *Blood*, 84, 1994, 1361-1392
- 89 Diebold J., Weisenburger D., Mac Lennan K.A., Muller-Hermelink H.K., Nathwani B.N., Harris N.L., Anderson J.R., Roy P., Armitage J.O.: Reproducibility and prognostic value of histopathological classifications of malignant lymphomas. Prolegomena for the first international classification proposed by WHO. Group of the non-Hodgkin's Malignant Lymphoma Classification project. *Bull Acad Natl Med*, 182(7), 1998, 1537-1548
- 90 Musshoff K., Schmidt-Vollmer H.: Prognosis of non-Hodgkin's lymphomas with special emphasis on the staging classification. *Z Krebsforsch.*, 83, 1975, 323-341
- 91 Peters F.P., Lasilang R.I., Fickers M.M., Erdkamp F.L., Wils J.A., Houben S.G., Wals J., Schouten H.C.: Treatment of elderly patients with intermediate – and high – grade non-Hodgkin's lymphoma : a retrospective population-based study. *Ann Hematol*, 80 (3), 2001, 155-159
- 92 Rabkin C.S.: AIDS and cancer in the era of highly active antiretroviral therapy (HAART). *Eur J Cancer*, 37 (10), 2001, 1316-1319

- 93 Takahashi K., Akiniwa K., Narita K.: Regression analysis of cancer incidence rates and water fluoride in the U.S.A. based on IACR/IARC (WHO) data (1978). International agency for Research on Cancer. *J Epidemiol*, 11(4), 2001, 170-179
- 94 Ogura M.: Recent progress in the treatment of malignant lymphoma. *Gan To Kagaku Ryoho*, 28 (9),2001, 1213-1235
- 95 Ha CS., Tucker SL., Blanco AI., Wilder RB., Mc Laughlin P., Cabanillas F., Cox JD.: Hematologic recovery after central lymphatic irradiation for patients with stage I-III follicular lymphoma. *Cancer* , 92 (5), 2001, 1074-1079
- 96 Rodriguez J., Munsell M., Yazji S., Hagemester FB., Younes A., Andersson B., Giralt S., Gajewski J., de Lima M., Couriel D., Romaguera J.: Impact of high-dose chemotherapy on peripheral T-cell lymphomas. *J Clin Oncol*, 19(17),2001, 3766-3770
- 97 Micallef M., Torregiani WC., Hurley M.: The ultrasound investigation of scrotal swelling. *Int J STD AIDS*, 11(5), 2000, 297-302
- 98 Niwakawa M., Tobisu K.: The role of tumor markers in the treatment of germ cell tumor, *Gan To Kagaku Ryoho*, 28 (8), 2001, 1159-1165
- 99 Kormann KU.: Treatment of testicular cancer- is quality management possible ?, *Onkologie*, 24 (2), 2001, 177-179
- 100 Classen J., Souchon R., Hehr T., Bamberg M.: Treatment of early stage testicular seminoma, *J Cancer Res Clin Oncol*, 127 (8), 2001, 475-481
- 101 Potter D.A., Kinsella T., Glatstein E.: High-grade soft tissue sarcomas of the extremities. *Cancer*, 58, 1986, 190-205
- 102 Wozniak W., Rychlowska M., Izbicki T., Lorkowska M., Kuczabski M.: Results in treatment of osteogenic sarcoma ; chemotherapy with children with ADM and CDDP. *Med Wieku Rozwoj*, IV (1 Suppl 2): 2000, 97-102
- 103 Jansen AJ, Caljouw MA, Hop WC, Van Rhenen DJ, Schipperus MR : Feasibility of a restrictive red-cell transfusion policy for patients treated with intensive chemotherapy for acute myeloid leukaemia. *Transfus Med* , 14 (1), 2004, 33-38
- 104 MacLennan S, Williamson LM: Risks of fresh frozen plasma and platelets. *The Journal of trauma*, 60 (6 Suppl.), 2006, 46-50
- 105 Katayama T., Kamiya M., Hoshina S., Masuoka H., Nishiwaki K., Sano K., Hagino T.,: Fatal septic shock and rhabdomyolysis following transfusion of platelet concentrates contaminated with *Streptococcus pneumoniae*. *Rinsho Ketsueki*, 44 (6), 2003, 381-5
- 106 Tschoepe D., Roesen P., Schwippert B., Kehrel B., Schauseil S., Esser J., Gries F.A.: Platelet analysis using flowcytometric procedures. *Platelets*, 1, 1990, 127-133
- 107 Raffael A.: Grundlagen der analytischen Durchflußzytometrie. *Labor Medizin*, 11, 1988, 89-97
- 108 Shattil S.J., Cunningham M., Hoxie J.A.: Detection of activated platelets in whole blood using activation-dependant monoclonal antibodies and flow cytometry. *Blood*, 70, 1987, 307-315
- 109 Kappelmayer J, Nagy B, Miszti-Blasius K, Hevessy Z, Setiadi H : The emerging value of P-Selectin as a disease marker. *Clin Chem Lab Med* ,42(5),2004,475-86

- 110 Cabeza N, Li Z, Schulz C, Kremmer E, Massberg S, Bultmann A, Gawaz M : Surface expression of collagen receptor Fc receptor-gamma/glycoproteinVI is enhanced on platelets in type 2 diabetes and mediates release of CD 40 ligand and activation of endothelial cells. *Diabetes*,53(8),2004,2117-21
- 111 Wallenstein S., Zucker C.J., Fleiss F.L.: Some statistical methods useful in circulation research. *Circ. Res.*, 49, 1980, 1-9
- 112 Arya M, Lopez JA, Romo,GM, Cruz MA, Kasirer-Friede A, Shattil SJ, Anvari B: Glycoprotein Ib-IX-mediated activation of integrin alpha (IIb) beta (3): effects of receptor clustering and von Willebrand factor adhesion. *J Thromb Haemost*, 1(6), 2003,1150-7
- 113 Kasirer-Friede A, Cozzi MR, Mazzucato M, De Marco L, Ruggeri ZM, Shattil SJ: Signaling through GP Ib-IX-V activates alpha IIb beta 3 independently of other receptors. *Blood* 103(9), 2004, 3403-11
- 114 Yamauchi Y, Kuroki M, Imakiire T, Uno K, Abe H, Beppu R, Yamashita Y, Shirakusa T : Opposite effects of thrombospondin-1 via CD 36 and CD 47 on homotypic aggregation of monocytic cells. *Matrix Biol*, 21(5), 2002,441-8
- 115 Greenwalt D.E., Lipsky R.H., Ockenhouse C.F., Ikeda I., Tandon N.N., Jamieson G.A.: Membrane Glycoprotein CD 36: A review of its roles in adherence, signal transduction and transfusion medicine. *Blood*, 80, 1105-1115
- 116 Keuren JF, Magdeleyns EJ, Govers-Riemslog JW et al.: Effects of storage-induced platelet microparticles on the initiation and propagation phase of blood coagulation. *British journal of haematology*, 134 (3), 2006, 307-13
- 117 Xiong G, Aras O, Shet A, Key NS, Arriaga EA: Analysis of individual platelet-derived microparticles, comparing flow cytometry and capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *Analyst*,128(6), 2003, 581-8
- 118 Cui W, Ma W, Han Y, Lin Q: Detection of platelet-derived microparticles using flow cytometry and its clinical application. *Chin Med Sci*, 18(1), 2003, 26-30
- 119 Horstman LL, Jy W, Jimenez JJ, Bidot C, Ahn YS: New horizons in the analysis of circulating cell-derived microparticles. *Keio J Med* , 53(4), 2004, 210-30
- 120 Lill M., Snider C., Calhoun L.: Analysis of utilization and cost of platelet transfusions in refractory hematology/oncology patients. *Transfusion*, 37, Suppl. 26, Abstract, 1997
- 121 Masters R., Taaning E.: Three cases of platelet alloimmunisation associated with the presence of a novel platelet-specific antibody. *Vox Sang*, 75(3), 1998, 242-6
- 122 Vadhan –Rai S, Kavanagh JJ, Freedman RS, Folloder J, Currie LM, Bueso-Ramos C, Verschraegen CF : Safety and efficacy of transfusions of autologous cryopreserved platelets derived from recombinant human thrombopoietin to support chemotherapy-associated severe thrombocytopenia: a randomized crossover study. *Lancet* , 359(9324), 2002, 2145-52
- 123 Benjamin RJ, Anderson KC: What is the proper threshold for platelet transfusion in patients with chemotherapy-induced thrombocytopenia ? *Crit Rev Oncol Hematol*, 42(2), 2002,163-71
- 124 Zeiger F, Stephan S, Hoheisel G, Pfeiffer D, Ruehlmann C, Kokschi M : P-Selectin expression, platelet aggregates, and platelet-derived microparticle formation are increased in peripheral arterial disease. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 11(8),2000,723-8

- 125 Chen LB, Dong WR, Dong F: Methodology of platelet membrane glycoproteins detection in whole blood by flow cytometry. *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao*, 22(5),2002,456-7
- 126 Schmidt M, Weis C, Heck J et al: Optimized Scansystem platelet kit for bacterial detection with enhanced sensitivity: detection with 24 h after spiking. *Vox sanguinis*, 89 (3),2005,135-9
- 127 Brecher ME, Hay SN: Improving platelet safety: bacterial contamination of platelets. *Curr Hematol Rep*, 3(2), 2004, 121-7
- 128 Callow CR, SwindellR, Randall W, Chopra R: The frequency of bleeding complications in patients with haematological malignancy following the introduction of a stringent prophylactic platelet transfusion policy. *Br J Haematol* , 118(2), 2002,677-82
- 129 Slichter SJ.: Relationship between platelet count and bleeding risk in thrombocytopenic patients. *Transfus Med Rev*, 18(3), 2004, 153-67
- 130 Bussel J.: Treatment of immune thrombocytopenic purpura in adults. *Seminars in hematology*. 43 (3 Suppl 5),2006, 3-10
- 131 Johannsson E, Engervall P, Landgren O, Grimfors G et al: Response to splenectomy is durable after a certain point in time in adult patients with chronic immune thrombocytopenic purpura. *European journal of haematology*, 77 (1), 2006, 61-66
- 132 Flaumenhaft R.: Formation and fate of platelet microparticles. *Blood cells, molecules & diseases*, 36 (2), 2006, 182-187

Anhang

Tabelle 9:Diagnose und Darstellung von Behandlungsdaten und Messparametern

Patient	Diagnose	KMT allogen	Letzte Gabe von TK/EK	Messdatum / Tag nach KMT / Granulocyten- Take	Thr.- Zahl / μ l	PDW MPV P-LCR	MFI nicht aktivierte Proben	MFI aktiv. Proben
1 MZP 1	RAEB-T	16.02.93	07.03.93 / 28.02.93	11.03.93 / 23 / 11.03.93 (23.Tag n. KMT)	43.000	14,6 10,8 32,4	36: 124,4 41a: 351,2 42b: 86,99 62: 3,08 63: 2,72	175,1 490,24 57,68 52,74 6,59
MZP 2				17.03.93/ 29	110.000	11,2 10,1 28,6	36: 176,33 41a:346,51 42b:113,26 62: 3,27 63: 3,24	218,6 475,22 78,68 56,23 12,2
MZP 3				07.04.93/ 49	142.000	8,9 9,4 19,5	36: 118,18 41a:303,96 42b: 73,4 62: 2,75 63: 2,96	153,72 451,68 61,63 45,68 11,38

Tabelle 10:Diagnose und Darstellung von Behandlungsdaten und Messparametern

Patient	Diagnose	KMT allogen	Letzte Gabe von TK/EK	Messdatum / Tag nach KMT / Granulocyten- Take	Thr.- Zahl / μ l	PDW MPV P-LCR	MFI nicht aktivierte Proben	MFI aktiv. Proben
2 MZP 1	CML	21.07.93	05.08.93 / 26.08.93	05.08.93 / 15 / 11.08.93 (21.Tag n. KMT)	8.000	techn. nicht zu best.	36: 71,79 41a:227,22 42b: 67,26 62: 2,99 63: 2,4	5,37 344,9 36,99 38,62 5,93
MZP 1				11.08.93./ 21	3.000	techn. nicht zu best.	36:115,91 41a:214,9 42b:97,15 62: 3,94 63: 2,61	139,48 264,92 61,02 39,93 6,33
MZP 2				18.08.93 / 28	14.000	13,8 10,1 28,9	36:127,66 41a:194,14 42b:97,39 62:3,3 63: 2,47	162,98 272,36 72,28 44,39 6,52
MZP 3				24.08.93 / 34	14.000	13,4 10,0 28,6	36:105,07 41a:186,21 42b:88,34 62:3,17 63: 2,38	139,26 250,81 67,71 39,94 5,6

Tabelle 11: Diagnose und Darstellung von Behandlungsdaten und Messparametern

Patient	Diagnose	KMT allogen	Letzte Gabe von TK/EK	Messdatum / Tag nach KMT / Granulocyten- Take	Thr.- Zahl / μ l	PDW MPV P-LCR	MFI nicht aktivierte Proben	MFI aktiv. Proben
3 MZP 1	CML	30.06.93	11.07.93 / 12.07.93	14.07.93 / 14 / 15.07.93 (15.Tag n. KMT)	15.000	techn. nicht zu best.	36:216,98 41a:369,67 42b:100,19 62: 3,14 63: 2,98	285,48 568,43 57 62: 54,4 63: 9,51
MZP 2				18.07.93 / 18	22.000	14,2 11,6 37,2	36:258,51 41a:336,46 42b:106,43 62: 3,87 63: 2,75	355,98 569,51 57,23 65,11 10,88
MZP 3				19.07.93 / 19	43.000	14,5 11,3 35,5	36:233,69 41a:320,88 42b: 77,03 62: 2,85 63: 2,47	328,03 555,48 52,57 64,74 8,71

Tabelle 12: Diagnose und Darstellung von Behandlungsdaten und Messparametern

Patient	Diagnose	KMT allogen	Letzte Gabe von TK/EK	Messdatum / Tag nach KMT / Granulocyten- Take	Thr.- Zahl / μ l	PDW MPV P-LCR	MFI nicht aktivierte Proben	MFI aktiv. Proben
4 MZP 1	T-ALL	25.08.93	11.09.93 / 19.09.93	16.09.93/ 22 / 13.09.93 (19.Tag n. KMT)	12.000	techn. nicht zu best.	36:168,02 41a:251,7 42b: 67,5 62: 3,27 63: 2,99	220,34 388,32 50,64 44,95 6,9
MZP 2				18.09.93/ 24	37.000	14,2 12,8 46,6	36:183,84 41a:235,3 42b:74,28 62: 3,54 63: 2,63	246,43 391,06 60,51 48,61 7,01
				22.09.93/ 28	72.000	13,5 11,1 32,8	36:185,78 41a:234,7 42b: 73 62: 4,11 63:4,26	237,68 360,59 61,9 44,82 7,54
MZP 3				23.09.93/ 29	73.000	15,7 12,6 40	36:184,01 41a:227,0 42b:63,88 62:3,31 63: 3,22	230,51 327,36 51,2 35,3 7,02

Tabelle 13: Diagnose und Darstellung von Behandlungsdaten und Messparametern

Patient	Diagnose	KMT allogen	Letzte Gabe von TK/EK	Messdatum / Tag nach KMT / Granulocyten- Take	Thr.- Zahl / μ l	PDW MPV P-LCR	MFI nicht aktivierte Proben	MFI aktiv. Proben
5 MZP 1	NHL	24.08.93	01.09.93/ 31.08.93	14.09.93./ 21 / 10.09.93 (17.Tag n. KMT)	41.000	12,1 10,0 25,7	36: 109,87 41a:218,3 42b: 53,48 62: 1,86 63: 2,69	115,24 330,1 43,12 25,6 4,3
MZP 2				16.09.93/ 23	93.000	11,9 10,6 28,9	36:152,63 41a:179,1 42b:56,76 62:2,34 63: 2,98	222,33 313,56 49,62 38,24 6,42
MZP 3				18.09.93/ 25	137.000	12 10 25,1	36:143,82 41a:165,12 42b: 53,84 62: 1,76 63:1,72	217,26 310,98 44,68 35,16 4,64

Tabelle 14: Diagnose und Darstellung von Behandlungsdaten und Messparametern

Patient	Diagnose	KMT allogen	Letzte Gabe von TK/EK	Messdatum / Tag nach KMT / Granulocyten- Take	Thr.- Zahl / μ l	PDW MPV P-LCR	MFI nicht aktivierte Proben	MFI aktiv. Proben
6 MZP 1	c-ALL	03.11.93	20.11.93/ 23.11.93	24.11.93./ 21/ 19.11.93 (16.Tag n. KMT)	31.000	techn. nicht zu best.	36:178,34 41a:296,75 42b: 69,21 62: 2,76 63: 2,46	232,18 421,9 56,46 64,21 7,77
MZP 2				29.11.93/ 26	71.000	21,7 13,7 52,6	36:186,13 41a:287,32 42b:74,82 62: 3,43 63: 2,03	246,8 411,03 62,56 64,57 7,38
				01.12.93/ 28	59.000	20,4 13 49,1	36:189,3 41a:274,93 42b: 73,12 62: 3,19 63: 2,09	253,41 396,33 60,03 62,28 7,4
MZP 3				06.12.93/ 33	64.000	17,2 13,2 45,4	36:147,72 41a:234,16 42b: 60,88 62: 2,04 63: 1,26	209,48 332,81 55,48 44,09 6,5

Tabelle 15: Diagnose und Darstellung von Behandlungsdaten und Messparametern

Patient	Diagnose	KMT allogen	Letzte Gabe von TK/EK	Messdatum / Tag nach KMT / Granulocyten- Take	Thr.- Zahl / μ l	PDW MPV P-LCR	MFI nicht aktivierte Proben	MFI aktiv. Proben
7 MZP 1	CML	24.02.93	11.03.93/ 08.03.93	19.03.93/ 23/ 15.03.93 (19.Tag n. KMT)	28.000	11,6 10,2 33,1	36:141,64 41a:235,01 42b: 69,36 62: 2,63 63: 2,49	198,81 383,56 67,77 47,46 7,29
MZP 2				24.03.93/ 28	42.000	10,8 9,7 23,8	36:169,94 41a:230,47 42b: 76,82 62: 3,32 63: 3,48	238,58 348,08 68,46 53,3 8,47
MZP 3				26.03.93/ 30	66.000	10,2 9,5 23,2	36:161,02 41a:227,78 42b:72,87 62: 3,06 63: 3,08	229,99 326,1 67,26 50,03 7,58

Tabelle 16: Diagnose und Darstellung von Behandlungsdaten und Messparametern

Patient	Diagnose	KMT allogen	Letzte Gabe von TK/EK	Messdatum / Tag nach KMT / Granulocyten- Take	Thr.- Zahl / μ l	PDW MPV P-LCR	MFI nicht aktivierte Proben	MFI aktiv. Proben
8	CML	02.11.93	15.11.93 (17.00 Uhr) / 14.11.93	15.11. (13.00Uhr)/13/ 14.11.93 (12.Tag n. KMT)	17.000	10,6 8,1 28,5	36:122,59 41a:294,3 42b: 55,05 62: 5,29 63: 2,89	140,78 433,0 49,83 46,71 6,6
MZP 1				17.11.93/ 15	18.000	techn. nicht zu best.	36:123,68 41a:223,6 42b: 70,32 62: 5,50 63: 3,55	151,45 348,14 57,1 48,63 7,23
				21.11.93/ 19	44.000	12,1 8,9 20,5	36:133,48 41a:243,6 42b: 73,66 62: 5,77 63: 3,04	191,42 337,08 66,5 56,81 5,37
MZP 2				22.11.93/ 20	56.000	14,0 10,0 27,6	36:134,51 41a:228,3 42b: 68,6 62: 6,09 63:2,35	193,49 307,49 61,51 58,03 4,06
				27.11.93/ 25	69.000	10,6 9,5 22,2	36:137,02 41a:246,09 42b: 60,81 62: 4,03 63: 2,71	209,67 380,67 54,03 45,22 4,7
MZP 3				06.12./ 34	33.000	17,0 10,9 36,3	36:126,16 41a:224,9 42b:54,9 62:3,82 63: 2,3	170,88 336,7 49,0 38,63 4,27

Tabelle 17: Diagnose und Darstellung von Behandlungsdaten und Messparametern

Patient	Diagnose	KMT allogen	Letzte Gabe von TK/EK	Messdatum / Tag nach KMT / Granulocyten- Take	Thr.- Zahl / μ l	PDW MPV P-LCR	MFI nicht aktivierte Proben	MFI aktiv. Proben
9 MZP 1	AML (M 4)	11.01.94	03.02.94 /31.01.94	09.02.94./ 29/ 31.01.94 (20.Tag n. KMT)	34.000	23,6 13,2 44,6	36:158,63 41a:286,31 42b: 66,43 62: 2,74 63: 2,63	187,36 312,68 57,23 45,1 7,74
				11.02.94/ 31	35.000	21,7 12,4 42,1	36:160,01 41a:285,6 42b: 66,68 62: 2,95 63: 2,75	191,12 320,99 58,8 47,91 8,23
MZP 2				20.02.94/ 40	36.000	21,5 12,4 41,9	36:204,19 41a:278,3 42b: 77,9 62:4,63 63: 3,5	209,98 308,72 63,32 55,2 9,9
				21.02.94/ 41	41.000	19,3 12,2 33,2	36:197,36 41a:263,67 42b: 76,81 62:3,78 63: 3,48	207,3 281,43 62,7 53,98 9,81
MZP 3				23.02.94/ 43	44.000	19,1 11,8 33,6	36:142,8 41a:261,77 42b: 74,01 62: 2,46 63: 3,26	193,61 268,71 57,7 49,63 9,26

Tabelle 18: Diagnose und Darstellung von Behandlungsdaten und Messparametern

Patient	Diagnose	KMT allogen	Letzte Gabe von TK/EK	Messdatum / Tag nach KMT / Granulocyten- Take	Thr.- Zahl / μ l	PDW MPV P-LCR	MFI nicht aktivierte Proben	MFI aktiv. Proben
10 MZP 1	CML	15.12.93	03.01.94/ 03.01.94	12.01.94/ 28/ 13.01.94 (29.Tag n. KMT)	47.000	13,6 11,6 36,8	36: 56,66 41a:151,01 42b: 29,39 62:1,58 63: 1,79	73,2 190,41 28,85 19,3 5,05
MZP 2				14.01.94/ 30	73.000	12,1 9,9 25,6	36: 57,34 41a:146,31 42b: 33,96 62: 1,58 63: 1,77	79,34 182,43 36,0 19,61 5,24
				16.01.94/ 32	103.000	11,0 9,9 24,5	36: 53,85 41a:145,68 42: 29,63 62: 1,66 63: 3,33	78,66 181,96 32,57 22,6 6,38
MZP 3				17.01.94/ 33	95.000	10,8 10,4 25,5	36:53,66 41a:141,77 42b: 28,67 62: 1,54 63: 1,66	64,69 172,05 31,2 16,12 5,79

Tabelle 19: Diagnose und Darstellung von Behandlungsdaten und Messparametern

Patient	Diagnose	KMT autolog	Letzte Gabe von TK/EK	Messdatum / Tag nach KMT / Granulocytentake	Thr.-Zahl / μ l	PDW MPV P-LCR	MFI nicht aktivierte Proben	MFI aktiv. Proben
11 MZP 1	c-ALL	27.09.93	06.10.93/ 21.10.93	14.10.93/ 17/ 10.10.93 (13.Tag n. KMT)	16.000	12,2 13,8 33,8	36:171,68 41a:246,2 42b: 69,64 62: 4,74 63: 3,3	203,9 328,96 54,05 55,1 8,45
MZP 2				20.10.93/ 23	33.000	12,4 12,3 38,9	36:223,67 41a:224,83 42b: 72,57 62: 5,03 63: 3,49	231,91 327,2 72,35 56,91 8,65
MZP 3				21.10.93/ 24	20.000	13,0 9,8 25,8	36:170,45 41a:206,33 42b: 62,37 62: 3,24 63: 2,61	210,26 294,15 63,47 48,62 6,19

Tabelle 20: Diagnose und Darstellung von Behandlungsdaten und Messparametern

Patient	Diagnose	KMT autolog	Letzte Gabe von TK/EK	Messdatum / Tag nach KMT / Granulocytentake	Thr.-Zahl / μ l	PDW MPV P-LCR	MFI nicht aktivierte Proben	MFI aktiv. Proben
12	Keimzelltu- mor	06.10.93	21.10. u. 23.10.93/ 22.10.93	21.10.93(vor TK)/ 15/ 18.10.93/ (12.Tag n. KMT)	3.000	techn. nicht zu best.	36: 61,96 41a:241,09 42b: 61,77 62: 1,76 63: 2,49	71,88 329,17 56,88 51,91 5,4
MZP 1				27.10.93/ 21	19.000	10,6 13,2 28,2	36:111,9 41a:207,99 42b: 78,91 62:3,33 63: 3,39	133,57 305,76 67,74 69,26 6,53
MZP 2				01.11.93/ 26	59.000	12,0 10,4 27,3	36: 117,06 41a:206,26 42b: 79,34 62:2,88 63: 3,57	151,16 303,05 71,35 62,6 6,8
MZP 3				08.11.93/ 33	151.000	9,9 9,4 20,7	36:101,53 41a:157,62 42b: 75,86 62: 1,47 63: 2,77	40,95 246,58 66,61 45,04 6,28

Tabelle 21: Diagnose und darstellung von Behandlungsdaten und Messparametern

Patient	Diagnose	KMT autolog	Letzte Gabe von TK/EK	Messdatum / Tag nach KMT / Granulocyten-Take	Thr.-Zahl / μ l	PDW MPV P-LCR	MFI nicht aktivierte Proben	MFI aktiv. Proben
13 MZP 1	Keimzelltumor	18.10.93	08.11.93/ 30.10.93	11.11.93/ 24/ 11.11.93 (24.Tag n. KMT)	10.000	techn. nicht zu best.	36:175,88 41a:274,18 42b: 75,52 62: 2,38 63: 2,93	245,68 427,92 55,68 38,32 7,47
MZP 2				19.11.93/ 32	37.000	13,4 10,9 33,0	36:206,55 41a:268,28 42b: 66,54 62:3,27 63: 3,18	304,26 393,64 60,86 51,97 7,7
MZP 3				25.11.93/ 38	100.000	14,5 11,2 33,7	36:226,51 41a:249,81 42b: 50,03 62: 2,58 63: 2,39	318,57 372,3 52,26 45,71 6,59

Tabelle 22: Diagnose und Darstellung von Behandlungsdaten und Messparametern

Patient	Diagnose	PBSZT autolog	Letzte Gabe von TK/EK	Messdatum / Tag nach KMT / Granulocyten-Take	Thr.-Zahl / μ l	PDW MPV P-LCR	MFI nicht aktivierte Proben	MFI aktiv. Proben
14 MZP 1	NHL	19.10.93	27.10.93/ 26.10.93	01.11.93/ 13/ 28.10.93 (9.Tag n.PBSZT)	20.000	14,7 11,7 48,2	36:117,13 41a:198,24 42b: 71,4 62: 2,41 63: 2,34	160,13 324,67 51,35 44,41 8,82
MZP 2				03.11.93/ 15	53.000	13,9 11,0 33,4	36:141,54 41a:205,28 42b: 71,13 62: 2,49 63: 2,41	201,89 326,69 55,59 48,31 8,85
MZP 3				16.11.93/ 28	164.000	10,4 9,8 22,9	36:139,78 41a:173,46 42b: 50,91 62: 2,09 63: 1,74	172,77 304,63 48,25 39,68 6,8

Tabelle 23: Diagnose und Darstellung von Behandlungsdaten und Messparametern

Patient	Diagnose	PBSZT autolog	Letzte Gabe von TK/EK	Messdatum / Tag nach KMT / Granulocyten-Take	Thr.-Zahl / μ l	PDW MPV P-LCR	MFI nicht aktivierte Proben	MFI aktiv. Proben
15 MZP 1	NHL	22.11.93	04.12.93/ 05.12.93	08.12.93/ 16/ 06.12.93 (14.Tag n.PBSZT)	10.000	15,0 9,9 27,6	36: 79,86 41a:220,08 42b:52,47 62:1,78 63: 2,08	94,16 332,31 48,23 25,8 3,86
MZP 2				15.12.93/ 23	24.000	14,4 10,9 32,9	.36:129,62 41a:181,71 42b: 55,87 62: 2,14 63: 2,61	199,59 321,03 50,06 38,14 5,89
MZP 3				17.12.93/ 25	34.000	13,7 9,9 27,2	36:126,9 41a:169,83 42b: 55,55 62: 1,7 63: 1,95	199,16 317,05 46,82 35,34 4,88

Tabelle 24: Diagnose und Darstellung von Behandlungsdaten und Messparametern

Patient	Diagnose	PBSZT autolog	Letzte Gabe von TK/EK	Messdatum / Tag nach KMT / Granulocyten-Take	Thr.-Zahl / μ l	PDW MPV P-LCR	MFI nicht aktivierte Proben	MFI aktiv. Proben
16 MZP 1	Keimzelltm.	29.12.93	14.01.94/ 10.01.94	04.02.94/ 37/ 27.01.94 (29.Tag n.PBSZT)	10.000	techn. nicht zu best.	36: 82,4 41a:222,8 42b: 47,3 62: 1,82 63:2,06	98,96 296,73 36,5 36,43 7,3
MZP 2				10.02.94/ 43	26.000	18,6 12,0 43,7	36:118,03 41a:224,31 42b: 48,36 62: 2,19 63: 2,18	143,67 299,86 39,65 42,5 7,54
MZP 3				16.02.94/ 49	52.000	13,0 11,7 35,6	36: 87,65 41a:192,62 42b: 39,32 62: 1,47 63: 1,46	97,82 273,04 32,32 30,03 6,21

Tabelle 25: Diagnose und Darstellung von Behandlungsdaten und Messparametern

Patient	Diagnose	PBSZT autolog	Letzte Gabe von TK/EK	Messdatum / Tag nach KMT / Granulocyten-Take	Thr.-Zahl / μ l	PDW MPV P-LCR	MFI nicht Aktivierte Proben	MFI aktiv. Proben
17 MZP 1	Synovial-tumor	17.01.94	23.01.94/ 24.01.94	30.01.94/ 13/ 29.01.94 (12.Tag n.PBSZT)	27.000	17,3 11,1 40,0	36:194,96 41a:233,67 42b: 73,86 62: 4,39 63: 3,07	212,36 257,3 66,5 53,61 8,17
MZP 2				31.01.94/ 14	45.000	13,8 10,9 33,1	36:198,2 41a:232,03 42b: 74,98 62: 4,48 63: 3,18	219,89 248,86 67,73 54,99 8,26
MZP 3				01.02.94/ 15	82.000	11,2 10,4 27,6	36:170,03 41a:211,17 42b: 72,63 62:3,21 63: 2,72	207,34 238,61 64,3 46,52 6,68

Tabelle 26: Diagnose und Darstellung von Behandlungsdaten und Messparametern

Patient	Diagnose	PBSZT autolog	Letzte Gabe von TK/EK	Messdatum / Tag nach KMT / Granulocyten-Take	Thr.-Zahl / μ l	PDW MPV P-LCR	MFI nicht aktivierte Proben	MFI aktiv. Proben
18 MZP 1	T-Zell-Lymphom	24.01.94	jeweils am 15.02.94	20.02.94/ 27/ 14.02.94 (21.Tag nach PBSZT)	12.000	techn. nicht zu best.	36: 74,92 41a:260,03 42b: 62,66 62: 1,75 63: 2,37	87,03 329,36 56,82 49,9 5,42
				21.02.94/ 28	26.000	16,4 12,4 36,2	36: 79,9 41a:255,67 42b: 64,03 62: 2,24 63: 2,66	95,87 316,41 58,36 52,67 5,75
MZP 2				22.02.94/ 29	35.000	16,3 11,1 34,6	36: 83,65 41a:253,84 42b: 64,83 62: 2,38 63: 2,69	99,01 316,86 59,55 51,8 5,78
MZP 3				23.02.94/ 30	49.000	15,9 12,2 42,2	36: 81,76 41a:241,18 42b: 62,04 62: 1,66 63: 2,51	91,44 301,43 57,5 47,53 5,67

Die Patienten mit ihren Diagnosen und Begleittherapien

Von den *drei untersuchten Patienten mit einer ALL* litten zwei an einer c-ALL und eine an einer T-ALL.

Patient Nr.11 mit einer c-ALL erhielt eine autologe KMT. Febrile Temperaturen am Tag der KMT zwangen zur antibiotischen Therapie, die zum Zeitpunkt der regenerierenden Thrombozytose Imipenem, Ciprofloxacin und Vancomycin beinhaltete.

Der zweite Patient (Nr.6) mit einer c-ALL erhielt eine allogene KMT. Trotz GvHD (Graft versus host disease)-Prophylaxe mit Cyclosporin A und Methotrexat erlitt der Patient 23 Tage nach KMT und zu dem Zeitpunkt, als die Thrombozyten bereits den zweiten Tag stabil über 25.000 Zellen/ μ l Blut lagen, eine GvHD der Haut 1.-2. Grades. Diese wurde mit Prednisolon behandelt. Darüberhinaus erhielt der Patient bis zum Tag des Granulozyten-Takes (der Tag, an dem die Granulozyten erstmals einen Wert über 500 Zellen/ μ l Blut erreichen) wegen einer Herpes-Zoster-Infektion Aciclovir und ab diesem Tag zur CMV-Prophylaxe zwei Wochen lang Ganciclovir. Febrile Temperaturen machten eine antibiotische und antimykotische Behandlung mit Cefotaxim, Piperacillin, Imipenem, Vancomycin und Amphotericin B notwendig.

Der dritte Patient (Nr. 4) mit der Diagnose einer *T-ALL* wurde nach einer Chemotherapie im ersten Rezidiv mit immer noch 50% Blasten im Knochenmark einer allogenen KMT zugeführt. Trotz GvHD-Prophylaxe mit Methotrexat erlitt der Patient eine stärkere GvHD mit Beteiligung des Darmes, die mit Prednisolon bis zur Entlassung behandelt wurde. Febrile Temperaturen veranlaßten zur Gabe von Cefotaxim, Tobramycin und Ciprofloxacin. Mit Aciclovir, humanem Immunglobulin und Amphotericin B wurde eine intensive Infektionsprophylaxe betrieben. 23 Tage nach Eintritt des Granulozyten-Takes und 26 Tage nach Erreichen einer stabilen Thrombozytenzahl über 25.000 Zellen/ μ l trat eine komplizierende CMV-Infektion auf, die mit Ganciclovir und humanem Immunglobulin behandelt wurde.

Patient Nr.9 erhielt nach Diagnose einer *AML* und Typisierung der Unterform M_4 (myelomonozytäre Form) eine allogene KMT. Der komplikationsreiche Verlauf nach der Knochenmarktransplantation umfaßte pulmonische Infiltrate in Begleitung von antibiotikarefraktärem Fieber, welches drei Tage vor dem Erreichen stabiler Thrombozytenwerte $> 20.000/\mu$ l mit 3 mg/kg Körpergewicht liposomalen Amphotericin B täglich behandelt wurde. Zur Zeit der beginnenden Thrombopoese erhielt der Patient zur Prophylaxe von Pilzinfektionen Amphotericin B per os täglich und zur Prophylaxe einer *Pneumocystis carinii*-Pneumonie Cotrimoxazol.

Für diese Untersuchung wurden *fünf Patienten mit der Diagnose CML* rekrutiert, die sich einer allogenen Knochenmarktransplantation unterzogen haben.

Der Patient Nr.3 sowie der Patient Nr.2 erhielten mit Aciclovir, humanem Immunglobulin, Amphotericin B und Cotrimoxazol Infektionsprophylaxe bis zur Entlassung.

Bei dem Patienten Nr.8 betrug die Thrombozyten schon am 10. Tag nach KMT über 20.000/ μ l Blut und am 35. Tag nach KMT mußte eine GvHD mit Prednisolon behandelt werden. Ab dem ersten Tag nach KMT erhielt der Patient zur Prophylaxe von Infektionen Amphotericin B, Aciclovir und humanes Immunglobulin sowie ab dem 17. Tag nach KMT Cotrimoxazol.

Ein Anstieg der Thrombozytenzahl von über 25.000/ μ l Blut erfolgte bei dem Patienten Nr. 7 am 20. Tag nach KMT. Der am sechsten Tag nach KMT auftretende fieberhafte Infekt wurde bis zum 21. Tag nach KMT erfolgreich mit Cefotaxim, Tobramycin, Imipenem und Vancomycin behandelt.

In der Zeit der Regenerationsphase der Thrombopoese erhielt der Patient Nr.10 zur Therapie einer GvHD Prednisolon und zeigte bei Entlassung keine Anzeichen der Erkrankung mehr.

Der Patient Nr.1 litt an einer *RAEB-t*. Er war mit einer allogenen KMT behandelt worden und erhielt während seines stationären Aufenthaltes wegen seines allergischen Asthma bronchiale Theophyllin. Darüber hinaus wurde mit Aciclovir, humanem Immuglobulin, Amphotericin B und nach dem Erreichen einer stabilen Granulozytenzahl von über 500 Zellen/ μ l Blut (einen Tag später lagen die Thrombozyten stabil über 50.000 Zellen/ μ l Blut) mit Cotrimoxazol Infektionsprophylaxe betrieben.

In dieser Arbeit untersucht wurde ferner das Blut von dem Patienten Nr.14, der an einem *zentrozytischen Lymphom* erkrankt war und bei dem eine autologe Stammzellreinfusion vorgenommen worden war. An antimykotischer und antibakterieller Prophylaxe erhielt der Patient Amphotericin B und Ciprofloxacin.

Komplikationslos konnte bei dem Patienten Nr.5 mit der Diagnose eines großzelligen, anaplastischen *B-Zell-Lymphoms* eine allogene KMT vorgenommen werden. Prophylaktisch erhielt er Cyclosporin, Aciclovir und Amphotericin B.

Zur Therapie des kleinzelligen, pleomeorphen *T-Zell-Lymphoms* erhielt Patient Nr.18 eine autologe Stammzelltransplantation. Ein fieberhafter Infekt wurde auch noch zu Beginn der Thrombopoese mit Imipenem, Metronidazol, Humanalbumin, Amphotericin B und Metamizol abgedeckt.

Der Patient Nr.15 erhielt wegen seines hochmalignen T-Zell-Lymphoms eine autologe Stammzellreinfusion. Außer einer unklaren Temperaturerhöhung, die bis zu dem Tag, an dem die Thrombozyten erstmals stabil über 20.000 Zellen/ μ l Blut betrug, mit Vancomycin behandelt werden mußte, bekam der Patient prophylaktisch Amphotericin B und Ciprofloxacin.

Drei Patienten wurden in der Gruppe der *Keimzelltumoren* rekrutiert.

Der Patient Nr.12 mit der Diagnose beta-HCG-positives Teratom vom trophoblastären Typ erhielt komplikationslos eine autologe Knochenmarkreinfusion und wurde lediglich prophylaktisch mit Aciclovir, Ciprofloxacin und Amphotericin B behandelt.

Erkrankt war der Patient Nr.13 an einem rechtsgonadalen Teratom, einem histologischen Misch tumor aus embryonalem und Chorion-Karzinom. Nach der autologen Knochenmarktransplantation erhielt der Patient zum Zeitpunkt der regenerierenden Thrombozytopenie Imipenem, Antihistaminika, Erythromycin und Amphotericin B.

Mit einer autologen Stammzellreinfusion wurde der Patient Nr.16 wegen eines extragonadalen Keimzelltumors behandelt, bei dem es sich um ein großzelliges, entdifferenziertes Karzinom handelte. Erst nach Entlassung konnte bei weiteren Kontrollterminen eine Überwindung der thrombozytopenischen Phase festgestellt werden. Zu diesem Zeitpunkt erhielt der Patient keine die Thrombopoese beeinflussenden Medikamente mehr.

Der Patient Nr.17 war an einem pulmonal metastasiertem *Synovialsarkom* im Extremitätenbereich erkrankt und wurde mit einer autologen Stammzelltransplantation behandelt. Zum Zeitpunkt der Wiederaufnahme der eigenen Thrombopoese erhielt der Patient wegen fieberhafter Temperaturen Cefotaxim, Piperacillin, Vancomycin und Imipenem.

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.