

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik III  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Direktor: Prof. Dr. med. W. Hiddemann

**Mikropartikelmessungen im Knochenmarkspirat  
gesunder Spender und bei Patienten vor  
Stammzelltransplantation**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Anton Köhler  
aus Weiden i. d. Opf.  
2012

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Ludwigs-Maximilians-Universität München**

Berichterstatter: Prof. Dr. Erhard Hiller

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Bernd Engelmann

Prof. Dr. Michael Spannagl

Mitbetreuung durch den

promovierten Mitarbeiter: Dr. med. Andreas Rank

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 24.05.2012

---

Ergebnisse dieser Arbeit wurden im Oktober 2010 im Journal „Thrombosis Research“ unter dem Titel „Cellular origin of platelet-derived microparticles in vivo“ veröffentlicht.

Rank A, Nieuwland R, Delker R, Köhler A, Toth B, Pihusch V, Wilkowski R, Pihusch R. Cellular origin of platelet-derived microparticles in vivo. *Thromb Res.* 2010; 126(4):e255-9.

---

**In Dankbarkeit meinen Eltern gewidmet.**

---

---

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1. Die hämatopetische Stammzelltransplantation.....	1
1.1.1. Entwicklung der hämatopoetischen Stammzelltransplantation.....	1
1.1.2. Grundprinzipien und Verfahrensweisen .....	2
1.1.2.1. Gewinnung hämatopoetischer Stammzellen .....	3
1.1.2.2. Konditionierungstherapie .....	5
1.1.3. Toxizität und Risiken .....	5
1.2. Mikropartikel .....	10
1.3. Fragestellungen.....	12
<b>2. Material und Methoden</b> .....	<b>13</b>
2.1. Material.....	13
2.1.1. Reagenzien zum Mikropartikelnachweis .....	13
2.1.2. Chemikalien .....	15
2.1.3. Pufferlösungen .....	15
2.1.3.1. Phosphat gepufferte Kochsalzlösung (PBS-Puffer) .....	15
2.1.3.2. Calciumpuffer und Citratpuffer.....	15
2.1.4. Geräte und Software .....	16
2.1.5. Verarbeitungszubehör .....	16
2.2. Patientenkollektiv.....	17
2.2.1. Gesunde Knochenmarksspender.....	17
2.2.2. Patienten während Konditionierungstherapie vor HSCT .....	18
2.2.2.1. Konditionierung mit FLAMSA-Protokoll .....	19
2.2.2.1.1. Entnahmezeitpunkte für Probengewinnung .....	20
2.2.2.1.2. Patientencharakteristika.....	20
2.2.2.2. Konditionierung mit 12 Gy Ganzkörperbestrahlung.....	23
2.2.2.2.1. Entnahmezeitpunkte für Probengewinnung .....	23
2.2.2.2.2. Patientencharakteristika.....	23
2.3. Methoden.....	25
2.3.1. Aufbereitung der Proben .....	25
2.3.2. Isolation und Analyse von Mikropartikeln .....	25
2.3.2.1. Reinigen und Isolation der Mikropartikel.....	25
2.3.2.2. Herstellung der Antikörper-Proben und der Annexin-Leerproben..	26
2.3.2.3. Mikropartikel Messung mit FACScan flow cytometer.....	27
2.3.3. Funktionsprinzip der Durchflusszytometrie.....	28
2.3.4. Statistische Methoden .....	32
<b>3. Ergebnisse</b> .....	<b>33</b>
3.1. Studiengruppe gesunder Knochenmarksspender .....	33
3.1.1. Charakteristika der Studiengruppe .....	33
3.1.2. Laborparameter.....	33
3.1.3. Ergebnisse der Durchflusszytometrie.....	34
3.1.3.1. Annexin positive Mikropartikel .....	34
3.1.3.2. Mikropartikel von hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen	35
3.1.3.3. Mikropartikel thrombo-/megakaryozytären Ursprungs .....	35
3.1.3.4. Mikropartikel endothelialen Ursprungs .....	37

---

---

3.2. Studiengruppe von Patienten mit hochdosierter Chemotherapie versus 12 Gy Ganzkörperbestrahlung (TBI) .....	39
3.2.1. Studienkollektiv mit hochdosierter Chemotherapie.....	39
3.2.1.1. Charakteristika der Studiengruppe .....	39
3.2.1.2. Ergebnisse der Studienpatienten 1-6 .....	40
3.2.1.2.1. Studienpatient 1 .....	40
3.2.1.2.2. Studienpatient 2 .....	42
3.2.1.2.3. Studienpatient 3 .....	44
3.2.1.2.4. Studienpatient 4 .....	46
3.2.1.2.5. Studienpatient 5 .....	47
3.2.1.2.6. Studienpatient 6 .....	50
3.2.1.2.7. Zusammenfassung der Ergebnisse der Studienpatienten 1-6 ....	52
3.2.2. Studienkollektiv mit 12Gy-TBI .....	58
3.2.2.1. Charakteristika der Studiengruppe .....	58
3.2.2.2. Ergebnisse der Studienpatienten 7-10 .....	58
3.2.2.2.1. Studienpatient 7 .....	58
3.2.2.2.2. Studienpatient 8 .....	60
3.2.2.2.3. Studienpatient 9 .....	62
3.2.2.2.4. Studienpatient 10 .....	64
3.2.2.2.5. Zusammenfassung der Ergebnisse der Studienpatienten 7-10 ..	66
<b>4. Diskussion.....</b>	<b>71</b>
4.1. Mikropartikel .....	71
4.1.1. Entstehung und Aufbau von Mikropartikeln .....	71
4.1.2. Ursprung und Nachweis von Mikropartikeln .....	73
4.1.3. Funktion von Mikropartikeln .....	75
4.1.4. Mikropartikel bei unterschiedlichen Krankheitsbildern.....	77
4.2. Verwendete Methode zum Nachweis von Mikropartikeln .....	83
4.3. Knochenmarkmikropartikel .....	86
4.4. Einfluss einer Konditionierungstherapie auf zirkulierende MP .....	93
4.5. Stärken und Schwächen.....	99
<b>5. Zusammenfassung .....</b>	<b>102</b>
<b>6. Ausblick .....</b>	<b>103</b>
<b>7. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>104</b>
<b>8. Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>119</b>
<b>9. Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>122</b>
<b>10. Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>123</b>
<b>11. Danksagung .....</b>	<b>124</b>
<b>12. Lebenslauf .....</b>	<b>125</b>

---

## **1. Einleitung**

### **1.1. Die hämatopoetische Stammzelltransplantation**

#### **1.1.1. Entwicklung der hämatopoetischen Stammzelltransplantation**

Die Grundlagen für die Entwicklung der hämatopoetische Stammzelltransplantation (HSCT) wurden von L.O. Jacobson, E. Lorenz und J.J. Trentin entdeckt. Jacobson zeigte, dass mit einer normalerweise letalen Strahlendosis bestrahlte Mäuse nach Infusion von vorher entnommenem, eigenem Knochenmark (autologe Transplantation) überleben können [1]. Lorenz erbrachte den Nachweis, dass das Überleben der bestrahlten Mäuse auch durch Infusion von Knochenmark anderer Mäuse (allogene Transplantation) gesichert werden kann [2]. Später bewies Trentin in seinen Experimenten, dass die Infusion von Knochenmarkzellen eines Spender-Mäusestammes das Überleben eines Hauttransplantates vom gleichen Spenderstamm beim Empfängertier bewirkt [3]. Diese Ergebnisse führten zu der Erkenntnis, dass hämatopoetische Zellen zur Repopulierung des Knochenmarks und zu einer Toleranz gegenüber Xenotransplantaten führen können.

Thomas E. Donnall entwickelte die hämatopoetische Stammzelltransplantation (HSCT) als lebensrettende Therapie bei Erkrankungen des blutbildenden Systems beim Menschen. Er führte im Jahre 1956 die erste Knochenmarkstransplantation am Menschen durch. Es handelte sich dabei um eine syngene Transplantation; d.h. Spender und Empfänger waren eineiige Zwillinge [4]. Für seine Arbeit erhielt er zusammen mit Joseph E. Murray, der die erste Nierentransplantation an einem Menschen durchführte, den Nobelpreis für Medizin/ Physiologie für die Einführung der Methode der Übertragung von Gewebe und Organen als klinische Behandlungspraxis in die Humanmedizin.

Bis zur heutigen Zeit hat sich die HSCT zu einem festen Bestandteil der Behandlung vieler schwerer erworbener oder angeborener Erkrankungen des blutbildenden Systems und für chemosensitive, radiosensitive oder immunosensitive maligne Erkrankungen weiterentwickelt.

So wurden im Jahr 2002 insgesamt 20207 hämatopoetische Stammzelltransplantationen an 586 Zentren in 39 europäischen Ländern durchgeführt. Darunter waren 6915 allogene (34%) und 13292 autologe (66%) HSCTs. Die

Hauptindikationen (Abb. 1) waren Leukämien (6523 (32%; 76% allogene)), Lymphome (10760 (53%; 92% autolog)), solide Tumoren (1913 (9%; 92% autolog)) und nichtmaligne Erkrankungen des blutbildenden Systems (874 (4%; 92% allogene)) [5].

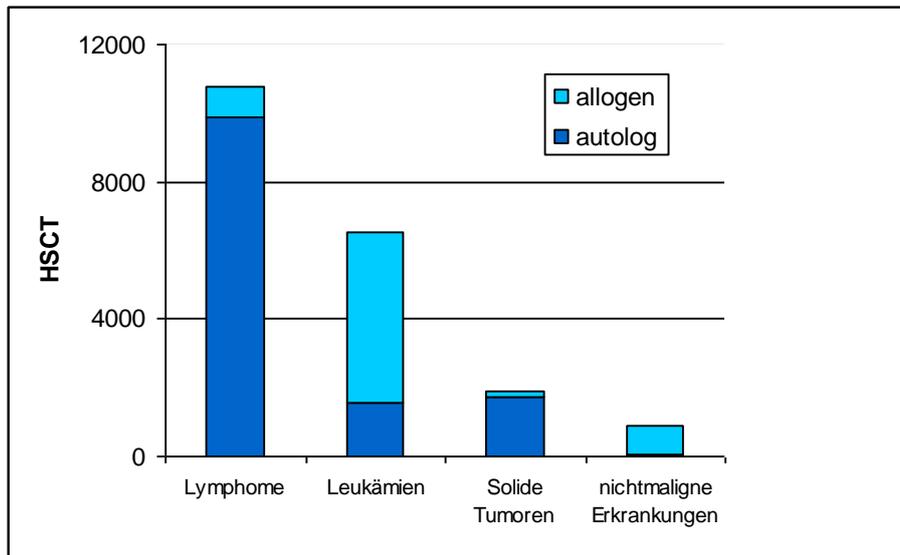


Abb. 1 Hauptindikationen für eine HSCT im Jahre 2002 in Europa [5]

### 1.1.2. Grundprinzipien und Verfahrensweisen

Die HSCT ist eine Transfusion hämatopoetischer Stammzellen nach einer Konditionierungstherapie mit der Absicht das hämatopoetische System durch injizierte hämatopoetische Stammzellen zu ersetzen [6]. Dabei siedeln sich die transfundierten hämatopoetischen Stammzellen über einen als „Homing“ beschriebene Mechanismus in den Markräumen des Empfängers an und ersetzen nach Proliferation und Differenzierung die Blutbildung. So wird die Möglichkeit einer stammzelltoxischen Therapie verschiedener Erkrankungen geschaffen, die ohne Reinfusion von gesunden hämatopoetischen Stammzellen nicht möglich wäre [7]. Je nach Herkunft der Stammzellen unterscheidet man zwischen der autologen (Eigenspende) und der allogenen (Familien- und Fremdspender) bzw. syngenen (identischer Zwilling) Transplantation von Knochenmark bzw. peripherer Blutstammzellen.

#### **1.1.2.1. Gewinnung hämatopoetischer Stammzellen**

Bei der autologen Transplantation werden vom Patienten entnommene, eigene Stammzellen transplantiert. Diese werden entweder durch Knochenmarkentnahme oder Stammzellapherese gewonnen.

Zur Knochenmarkentnahme werden multiple Knochenmarkaspirationen an der Spina iliaca anterior et posterior durchgeführt. Erst ab einem Volumen von 1000-1500ml gewonnenem Knochenmarkblut erhält man mehr als  $2 \times 10^8$ /kg KG mononukleäre Zellen. Das Knochenmarkspirat wird im Anschluß heparinisiert und zur Entfernung von Knochensplittern und Fettpartikeln filtriert. Zur Kryokonservierung werden die hämatopoetischen Stammzellen mit DMSO (Dimethylsulfoxyd)-haltigen Einfriermedien versetzt, tiefgefroren und können anschließend in flüssigem Stickstoff ( $-196^\circ\text{C}$ ) aufbewahrt werden [7].

Für die Gewinnung von hämatopoetischen Stammzellen mittels Stammzellapherese müssen die Stammzellen aus dem Knochenmark in das periphere Blut mobilisiert werden. Dies kann mit Hilfe von hämatopoetischen Wachstumsfaktoren wie G-CSF (Granulocyte-Colony Stimulating Factor) erfolgen oder im Rahmen der Erholung von einer Myelosuppression nach Chemotherapie geschehen, da in der Regenerationsphase die Anzahl zirkulierender hämatopoetischer Stammzellen stark ansteigt. Die Anzahl der CD34-positiven Zellen, welche als Maß für eine erfolgreiche Mobilisation dient, sollte mehr als  $10/\mu\text{l}$  betragen. Für ein sicheres Transplantat werden mehr als  $2 \times 10^6$  CD34-positive Zellen pro Kilogramm Körpergewicht des Empfängers gefordert [8]. Die Kryokonservierung erfolgt im Anschluß auf dieselbe Weise wie bei der Knochenmarkentnahme.

Die autologe Transplantation mit peripher gewonnenen Stammzellen ist, im Gegensatz zur autologen Knochenmarktransplantation, durch eine geringere transplantationsassoziierte Morbidität und Mortalität ausgezeichnet. Dies ist durch eine schnellere hämatopoetische Regeneration (8-14 Tage) und eine schnellere Rekonstruktion des Immunsystems bedingt. Aus genannten Gründen wird fast ausschließlich die autologe Blutstammzelltransplantation durchgeführt [9].

Bei der allogenen Transplantation wird die erkrankte Hämatopoese des Patienten durch die Hämatopoese eines gesunden Spenders ersetzt. Dabei sind Geschwister, die in den transplantationsrelevanten HLA (Human Leukocyte Antigen)-Merkmalen, HLA-A, HLA-B und HLA-DR mit den Patienten identisch sind, Spender erster Wahl. Steht kein Spender erster Wahl zur Verfügung, ist ein HLA-haploidentisches Familienmitglied oder ein HLA-kompatibler Fremdspender zu suchen. Die hämatopoetischen Stammzellen können, analog der Gewinnung zur autologen Stammzelltransplantation, durch Knochenmarkentnahme oder Stammzellapherese gewonnen werden. Bei der Stammzellapherese werden die hämatopoetischen Stammzellen des gesunden Spenders, im Gegensatz zur autologen Spende, nur mit Hilfe von hämatopoetischen Wachstumsfaktoren wie G-CSF ins periphere Blut mobilisiert. Eine weitere potentielle Stammzellquelle ist Nabelschnurblut, welches in diversen Nabelschnurblutbanken kryokonserviert und gelagert wird [7].

Wie nach der autologen kommt es auch nach der allogenen Stammzelltransplantation mit Blutstammzellen zu einer schnelleren hämatopoetischen Regeneration. Deswegen bietet dieses Verfahren bei Risikopatienten, die auf eine schnelle Regeneration des blutbildenden Systems angewiesen sind, einen Vorteil. Dennoch kann derzeit keinem Verfahren uneingeschränkt der Vorzug gegeben werden [7].

Bei den 20207 Stammzelltransplantationen die im Jahr 2002 an 586 Zentren in 39 europäischen Ländern durchgeführt wurden, wurden die hämatopoetischen Stammzellen durch Knochenmarkentnahme, Stammzellapherese oder aus Nabelschnurblut gewonnen. Von den 13292 autologen Ersttransplantaten wurden 395 (4%) der Transplantate durch Knochenmarkpunktion, 12795 (97%) durch Stammzellapheresen oder durch eine Kombination von Stammzellapherese und Knochenmarkpunktion gewonnen. Von den 6915 allogenen Ersttransplantaten wurden 38% der Transplantate aus Knochenmark und 62% durch Stammzellmobilisation aus dem peripheren Blut gewonnen. Insgesamt stammten nur 162 der im Jahr 2002 transplantierten allogenen Transplantate aus Nabelschnurblut, was einem Anteil von 2% an den allogenen Transplantaten entspricht [5].

### **1.1.2.2. Konditionierungstherapie**

Vor der hämatopoetischen Stammzelltransplantation muss bei den Patienten eine Konditionierungstherapie durchgeführt werden. Bei dieser Vorbehandlung handelt es sich in der Regel um eine Hochdosis Chemotherapie oder eine Strahlentherapie, bzw. eine Kombination aus beidem. Dabei verfolgt die Konditionierung zwei wesentliche Ziele. Zum einen wird durch eine myeloablative Therapie eine Intensivierung der üblichen Chemotherapie erreicht und zum anderen ermöglicht die, mit der Konditionierung verbundene, lang anhaltende Immunsuppression ein Anwachsen des Transplantats [7].

Bei der Therapie von malignen Erkrankungen des blutbildenden Systems, speziell der Leukämien, beruht die antileukämische Potenz auf der zytotoxischen Wirkung der Konditionierungstherapie. Bei der allogenen Transplantation hat der so genannte Graft-versus-Leukämie-Effekt einen zusätzlichen antileukämischen Effekt. Der Graft-versus-Leukämie-Effekt beschreibt die Potenz der im Transplantat enthaltenen Immunzellen, noch vorhandene, residuelle leukämische Zellen zu eliminieren [10]. Dieser Effekt ist am deutlichsten bei der CML (chronisch myeloische Leukämie) ausgeprägt, lässt sich aber auch bei der AML (akute myeloische Leukämie) und selten auch bei der ALL (akute lymphatische Leukämie) nachweisen. Somit konnte die Intensität der Konditionierungstherapie bei der allogenen Stammzelltransplantation reduziert werden, so dass der antileukämische Effekt nahezu ausschließlich auf dem Graft-versus-Leukämie-Effekt beruht. Die Konditionierung dient hierbei dem Zweck einer massiven Immunsuppression, die ein Anwachsen des Transplantates ermöglicht. Trotz einer verminderten Organtoxizität ist auch eine dosisreduzierte Konditionierungstherapie keineswegs frei von Nebenwirkungen [11, 12].

### **1.1.3. Toxizität und Risiken**

Bei einer hämatopoetischen Stammzelltransplantation kann es zu einer Vielzahl von Nebenwirkungen kommen. Zum einen sind diese bedingt durch die Toxizität und den immunsuppressiven Effekt der unterschiedlichen Konditionierungstherapien und zum anderen durch die Übertragung immunkompetenter Zellen. Diese können nach allogener Stammzelltransplantation mit dem

immungenetisch fremden Empfänger reagieren und das Krankheitsbild der Graft-versus-Host Erkrankung (GvHD) auslösen.

Bei der GvHD handelt es sich um die klinische Manifestation einer immunologischen Auseinandersetzung von T-Lymphozyten des Spenders mit Organen des Empfängers. Dabei sind vor allem die Haut, die Leber und der Darm betroffen. Bei der GvHD unterscheidet man eine akute und eine chronische Form. Die akute GvHD tritt ab Beginn der hämatopoetischen Regeneration auf, während die chronische GvHD sich erst nach dem 100. Tag der Transplantation ausbildet. So entwickeln bei der allogenen Stammzelltransplantation vom HLA-identischen Geschwisterspender etwa 30-40% der Patienten eine akute, meist gut behandelbare GvHD und etwa 10% der Patienten eine chronische und schwer beherrschbare GvHD [7].

Die Inzidenz einer GvHD korreliert dabei mit der Intensität der Konditionierungstherapie. Je toxischer diese im Sinne von entzündlichen und apoptotischen Affektionen ist, desto höher ist die Rate an GvHD nach der Transplantation. Pathogenetisch liegt dieser Beobachtung zugrunde, dass bereits vor der Transplantation vermehrt empfängereigene Antigene auf Antigen-präsentierenden Zellen exprimiert werden, welche mittransplantierte Spender T-Lymphozyten aktivieren. Aktivierte zytotoxische T-Zellen attackieren schließlich die entsprechenden Zielorgane des zuvor präsentierten Antigens [13].

Ein häufiges Krankheitsbild, welches durch die Organotoxizität der Konditionierungstherapie hervorgerufen wird, ist die Mukositis. Hierbei handelt es sich um eine entzündliche Veränderung der Schleimhäute, die bei den Patienten regelmäßig den Bedarf einer parenteralen Ernährung und Schmerztherapie mit Opiaten zur Folge hat. Die gestörte Schleimhautbarriere bedeutet eine zusätzliche Infektionsgefährdung. Durch Einschwemmung bakterieller Toxine und Lipopolysaccharide aus dem Darm in den Blutkreislauf kommt es zum so genannten „cytokine storm“, einer massiven Zytokinausschüttung, welche das Auftreten einer schweren Graft-versus-Host-Erkrankung begünstigt [14].

Neben der Mukositis, kann es durch den toxischen Effekt der Konditionierungstherapie, auch zu einer Schädigung der Lunge kommen. Diese kann sich in unterschiedlichen Krankheitsbildern äußern. Die wichtigsten hierbei sind die

diffuse alveoläre Hämorrhagie (DAH), die Bronchilitis obliterans mit organisierender Pneumonie (BOOP) und die idiopathische, interstitielle Pneumonie (IP). Die BOOP und die DAH haben eine relativ gute Prognose wohingegen die idiopathische IP unter dem klinischen Bild eines ARDS (acute respiratory distress syndrome) mit entsprechend schlechter Prognose verläuft [15].

Ebenfalls eine Folge der Toxizität der Konditionierungstherapien, vor allem mit zytoreduktiven Substanzen wie Busulfan und Cyclophosphamid, ist die VOD (venoocclusive disease) [16]. Hierbei handelt es sich um einen thrombotischen Verschluss der kleinen Lebervenen auf dem Boden einer Mikroangiopathie. In hepatischen Terminalvenen oder kleinen sublobulären Venen kommt es zu einer konzentrischen subendothelialen Verdickung und Einengung des Gefäßlumens durch ödematöse Retikulumfasern oder Kollagen [17]. Das Risiko einer VOD ist nach einer allogenen Stammzelltransplantation höher als nach einer autologen Stammzelltransplantation [18, 19]. Zur Diagnose einer VOD haben McDonald et al. 1984 und Jones et al. 1987 klinische Symptome zu Diagnosekriterien zusammengefasst. So müssen zwei der folgenden Kriterien vor dem 30. Tag nach der Stammzelltransplantation auftreten: Ikterus (Bilirubin > 2.0 mg/dl), Hepatomegalie mit Schmerzen im rechten oberen Quadranten und Aszites oder unerklärte Gewichtszunahme von > 2% des Ausgangsgewichts [20, 21]. Die Schwere der Erkrankung spiegelt sich in der Letalität wieder, die bei der VOD mit 20-50% sehr hoch ist [22].

In der Phase der Panzytopenie ist das Risiko für Infektionen erhöht. Dabei tragen systemische Mykosen bei KMT-Patienten noch mehr zur transplantationsbedingten Mortalität bei als bakterielle Infekte. Vor allem eine Infektion mit *Pneumocystis jiroveci*, die zu einer *Pneumocystis-jiroveci*-Pneumonie führen kann, ist eine potenziell letale Komplikation.

Bei den viralen Infektionen ist bereits in den ersten Wochen nach Transplantation das Risiko einer Herpes-simplex Reaktivierung gegeben. Etwa 4 Monate nach der Transplantation treten relativ häufig Varizella-Zoster-Infektionen auf. Die größte Gefahr für allogene transplantierte Patienten geht von einer Reaktivierung einer latenten Zytomegalie (CMV)-Infektion aus, die in der Regel 6 bis 10 Wochen nach der Transplantation, also nach Regeneration der Blutbildung,

auftritt. Die CMV-Infektion verläuft bei diesen Patienten unter dem Bild einer interstitiellen Pneumonie oder Kolitis und besitzt eine hohe Mortalität. Daneben sind respiratorische Viren, wie das respiratorische Synzytialvirus (RSV), das Influenza- und das Parainfluenzavirus Erreger für viral bedingte Pneumonien [23].

Nach allogenen Transplantationen ist die hämorrhagische Zystitis eine der häufigsten Komplikation, die als Nebenwirkung der Chemo- oder Bestrahlungstherapie auftritt und durch eine akute GvHD oder eine Infektion mit Adeno- oder Polyomaviren ausgelöst werden kann [24].

Komplikationen nach einer der hämatopoetischen Stammzelltransplantation können klinisch unterschiedlich schwer verlaufen. So müssen zwischen 11% und 40% der Patienten nach einer HSCT auf einer Intensivstation behandelt werden. Diese besonders schweren Komplikationen haben ihren Ursprung hauptsächlich in der Toxizität der Konditionierungstherapie, der Immunsuppression und der GvHD. Über 60% dieser Patienten müssen beatmet werden, was mit einer sehr hohen Mortalität verbunden ist [25, 26].

Im Jahr 2006 veröffentlichte Ayman O. Soubani [26] eine Literaturübersicht über die häufigsten und schwerwiegendsten Komplikationen bei Patienten nach Stammzelltransplantation. Die Komplikationen wurden in dieser Arbeit den verschiedenen Organen zugeordnet. Als pulmonale Komplikationen treten bei 7-35% der Patienten ein Engraftment Syndrome, bei 5% (Spannweite 2-14%) eine diffuse alveoläre Hämorrhagie (DAH), bei 10% (3-15%) eine Idiopathische interstitielle Pneumonie (IPS) und bei 1,4 % eine Bronchilitis obliterans mit organisierender Pneumonie (BOOP) auf. Die CMV-Pneumonie ist ein Beispiel für schwere Infektionen als Komplikation nach HSCT. Heutzutage wird die frühe Form der CMV-Pneumonie (in den ersten 100 Tagen nach Transplantation), dank routinemäßiger Prophylaxe, nur noch bei 6% der Patienten gesehen. Die Prävalenz der späten Form der CMV-Pneumonie ist hingegen von 4% auf 15% gestiegen. Bei den Pilzinfektionen beträgt die Prävalenz invasiver Candida Spezies-Infektionen 1,3-10% und von Aspergillus-Infektionen zwischen 2-26%. Durch die Einführung einer effektiven Prophylaxe mit Trimethoprim-Sulfamethoxacolen zur Verhinderung einer Pneumocystis jiroveci-Pneumonie, ist deren

Prävalenz heutzutage vernachlässigbar gering. Kardiale Komplikationen treten bei 2% bis 28% der HSCT-Patienten auf. Dabei handelt es sich vor allem um kongestive Herzinsuffizienzen, Perikardergüsse, Endokarditiden (Prävalenz von 1,3%) und Arrhythmien. Supraventrikuläre Tachykardien werden bei 4,1% der Patienten nach HSCT beschrieben.

Zu den Gastrointestinales Komplikationen zählen die GvHD des Intestinums, die intestinale Pseudoobstruktion, die akute Pankreatitis mit einer Prävalenz von 3,5%, die Enteritiden, welche nach allogener Stammzelltransplantation mit einer Prävalenz von 43% auftreten und gastrointestinale Blutungen mit einer Prävalenz von 7-18%. Hauptvertreter der hepatischen Komplikationen ist wie oben näher beschrieben die VOD, welche laut dem Autor mit einer Prävalenz von 20-50% aufgeführt wird. Akutes Nierenversagens mit einer Prävalenz zwischen 9% und 53% ist eine häufige renale Komplikation. Als weitere Komplikation der Niere und der ableitenden Harnwege wird die hämorrhagische Zystitis aufgeführt, welche bei 25% der Patienten nach allogener Stammzelltransplantation auftritt. Die Prävalenz klinisch relevanter neurologische Komplikationen nach einer HSCT beträgt 11%-18%. Neurologische Komplikationen sind häufiger nach einer allogenen HSCT zu beobachten. So treten zum Beispiel Schlaganfälle bei allen HSCT-Patienten mit einer Prävalenz von 3% auf, nach allogener HSCT mit 5% und nach autologer HSCT nur mit 1,2%. 10% der neurologischen Komplikationen sind auf Infektionen des zentralen Nervensystems zurückzuführen. Aspergillosen sind hierbei die Hauptursache und wurden bei 4,4% der HSCT-Patienten, die nach dem Tode einer Autopsie unterzogen wurden, gefunden. Metabolische Enzephalopathien werden vor allem nach allogener HSCT gesehen und kommen unter allen HSCT mit einer Prävalenz zwischen 3% und 13% vor. Die Thrombozytisch Thrombozytopenische Purpura (TTP) ist die schwerste hämatologische Komplikation und tritt vor allem nach allogener HSCT mit einer Prävalenz von 5-15% auf.

## 1.2. Mikropartikel

Im Jahr 1946 beschrieben Chargaff und West einen „Faktor“, der in thrombozytenfreien Plasma zu einer Beschleunigung der Thrombinbildung führt [27]. Erst 1967 wurde dieser „Faktor“ zum ersten Mal von P. Wolf unter dem Elektronenmikroskop entdeckt und als thrombozytäre Membranfragmente mit thrombotischer Aktivität beschrieben. Wolf nannte diese thrombozytären Zellfragmente, die heute unter dem Begriff Mikropartikel (MP) bekannt sind, „platelet dust“ [28]. 1972 konnte B.A. Warren eine weitere Eigenschaft der thrombozytären MP, nämlich die Adhäsion an Gefäßwänden, nachweisen [29].

Aber nicht nur Thrombozyten, sondern nahezu alle Zellen sind in der Lage MP zu bilden. Diese sind äußerst heterogen und unterscheiden sich in ihrer Größe (0,1 -1 $\mu$ m) [30], der Lipid- und Proteinzusammensetzung und den exprimierten Antigenen und Adhäsionsmolekülen. Der Aufbau von MP scheint vom Aktivierungsgrad der Ursprungszelle und der Art des Reizes, welcher zur Bildung führt, abhängig zu sein [31]. Von Exosomen, ebenfalls kleinen Partikeln mit einer durchschnittlichen Größe von 0,04-0,1 $\mu$ m, die durch Exozytose zuvor mit der Zellmembran fusionierter, intraluminal gelegener und membrangebundener multivesikulärer Körper (MVBs) entstehen, können sie durch spezifische Merkmale, wie dem Membranaufbau, unterscheiden werden [32]. Bei größeren Partikeln (>1,5 $\mu$ m), die ebenfalls im Plasma gefunden werden können, handelt es sich um apoptotische Körper [33]. Diese werden bei der Apoptose von Blut- und Gefäßzellen gebildet und besitzen einen ähnlichen Membranaufbau wie MP. Durch ihre Größe und die Tatsache, dass sie im Gegensatz zu MP DNA enthalten, können apoptotische Körper von MP unterschieden werden [34].

Die am weitesten verbreitete Methode zur Bestimmung von MP ist die Durchflusszytometrie. Dabei können MP anhand ihrer Größe und ihrer exprimierter Antigene, durch Bindung spezifischer Antikörper, analysiert werden. So kann sowohl die Anzahl als auch der Ursprung von MP einer Probe ermittelt werden. Die (patho-)physiologische Bedeutung der MP verschiedener Ursprungszellen ist noch nicht vollständig geklärt und weiterhin Bestandteil der Forschung. Die Untersuchung des Scott Syndroms, einer seltenen erblich bedingten Erkrankung aus dem Bereich der hereditären Hämostasedefekte, hat viel zum Ver-

ständnis der (patho-)physiologie von MP beigetragen. Die essentielle Bedeutung der MP für eine normale Hämostase konnte dadurch nachgewiesen werden. Bisher wurde bereits eine Vielzahl von Erkrankungen auf Veränderungen der Gesamtzahl, des Aufbaus oder des Ursprungs zirkulierender MP hin untersucht. Die Ergebnisse dieser Studien deuten an, dass MP in Zukunft als Biomarker zur Diagnosefindung oder zum Erkennen von Komplikationen, die mit einer bestehenden Erkrankung in Verbindung stehen, benutzt werden könnten.

### **1.3. Fragestellungen**

1) Die Konditionierungstherapie führt durch die toxische Wirkung der Chemotherapie, bzw. der Bestrahlung zu Zellaktivierung und Zelluntergang im Organismus. Dies sollte auch zu einer vermehrten Freisetzung von MP führen. Als Surrogatmarker für eine Endothelaktivierung soll die Höhe endothelialer MP während der Konditionierung mit Hochdosischemotherapie bzw. Ganzkörperbestrahlung mit 12 Gray bestimmt werden.

2) Gibt es zwischen der Konditionierung mit 12 Gy Ganzkörperbestrahlung bzw. Hochdosischemotherapie einen Unterschied in der Anzahl freigesetzter MP bzw. in deren zeitlichen Verlauf?

3) Die für die HSCT durch Knochenmarkpunktion gesunder Spender gewonnenen hämatopoetischen Stammzellen wurden bisher noch nicht auf MP untersucht. Es stellt sich die Frage nach Anzahl, Ursprung und Verteilung der MP im Knochenmarkspirat im Vergleich zum peripheren Blut. Da im Knochenmark eine Vielzahl von Zellaktivierungs- und Apoptosevorgänge ablaufen, liegt die Vermutung nahe, dass auch die Anzahl der MP im Knochenmarkspirat höher ist.

4) Außerdem ist immer noch nicht abschließend geklärt, welchen Ursprungs die zirkulierenden thrombozytären MP sind. Der Vergleich zwischen Knochenmarkspirat und peripherem Blut könnte einen wichtigen Hinweis darauf geben, ob zirkulierende MP mit thrombozytären und megakaryozytären Oberflächenantigenen zum größten Teil megakaryozytären oder thrombozytären Ursprungs sind.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1. Material**

#### **2.1.1. Reagenzien zum Mikropartikelnachweis**

**Annexin V FITC** (IQP-120F), **Annexin VR-PE**, (IQP-120R) Immuno Quality Products, Groningen, The Netherlands

Annexin V bindet spezifisch an Phosphatidylserin. Im Lipid-Bilayer von MP sind negativ geladene Phospholipide, wie Phosphatidylethanolamine und Phosphatidylserine, enthalten [35]. Somit kann FITC- (Fluorescein Isothiocyanate) oder PE- (Phycoerythrin) markiertes Annexin V zum Nachweis von MP mittels FACS (fluorescence-activated cell sorting) verwendet werden.

**IgG1 R-PE** (IQP-191R) monoklonaler, Fluorochrom-markierter Antikörper der Firma Immuno Quality Products, Groningen, The Netherlands; **IgG-FITC** monoklonaler, Fluorochrom-markierter Antikörper der Firma, Immunotech, Marseille, Frankreich

Die monoklonalen Antikörper IgG-PE und IgG-FITC binden unspezifisch an MP und dienen als Negativkontrolle für die Messung.

**CD34-PE**, monoklonaler, Fluorochrom-markierter Antikörper der Firma Biosciences, Heidelberg, Deutschland

Das CD34-Antigen ist ein membranständiges Glykoprotein (Ligand für L-Selectin), welches auf hämatopoetische Vorläufer- und Stammzellen vorhanden ist. Die genaue Funktion dieses Proteins ist noch nicht bekannt. Es ist aber naheliegend, dass es eine wichtige Rolle bei der Steuerung der Hämatopoese spielt. Fluorochrom (PE) markierte monoklonale Antikörper gegen CD34 können somit zum Nachweis von MP aus hämatopoetischen Vorläufer- und Stammzellen mittels FACS verwendet werden.

**CD61-PE**, monoklonaler, Fluorochrom-markierter Antikörper der Firma Biosciences, Heidelberg, Deutschland

Das CD61-Antigen ist das membranständige Glykoprotein IIIa (beta 3 integrin chain) welches auf der Zellmembran von Megakaryozyten und ruhenden Thrombozyten exprimiert wird. Es ist mit ein bis zwei Prozent des Gesamtproteingehalts und ca. 80.000 Kopien pro Zelle das häufigste Membranglykoprotein der Thrombozyten. Die wesentliche Funktion des gp IIb/IIIa

Rezeptors ist die Bindung von Fibrinogen an die Oberfläche des aktivierten Thrombozyten und damit die Initiierung der Plättchenaggregation. Fluorochrom (PE) markierte monoklonale Antikörper gegen CD61 können somit zum Nachweis von MP thrombozytären oder megakaryozytären Ursprungs mittels FACS verwendet werden.

**CD62E-PE**, monoklonaler, Fluorochrom-markierter Antikörper der Firma Biosciences, Heidelberg, Deutschland

Das CD62E Antigen ist das membranständige Glykoprotein E-Selectin (endothelial-leukocyte adhesion molecule-1; ELAM-1). Es wird spezifisch auf aktivierten Endothelzellen exprimiert [36, 37] und dient der Adhäsion von Leukozyten an aktiviertem Endothel [38]. Fluorochrom (PE) markierte monoklonale Antikörper gegen CD62E können somit zum Nachweis von MP endothelialen Ursprungs mittels FACS verwendet werden.

**CD62P-PE**, monoklonaler, Fluorochrom-markierter Antikörper der Firma Immunotech, Marseille, Frankreich

Das CD62P Antigen ist das membranständige Glykoprotein P-Selectin (platelet activation-dependent granule external membrane protein; PADGEM) in thrombozytären Granula. Es wird auf aktivierten Thrombozyten und in geringem Ausmaß auf aktivierten Endothelzellen exprimiert und vermittelt die Adhäsion von Leukozyten an aktivierte Thrombozyten und Endothelzellen. Fluorochrom (PE) markierte monoklonale Antikörper gegen CD62P werden vor allem zum Nachweis von MP aktivierter Thrombozyten mittels FACS verwendet.

**CD63-PE**, monoklonaler, Fluorochrom-markierter Antikörper der Firma Immunotech, Marseille, Frankreich

Das CD63 Antigen ist das membranständige Glykoprotein Granulophysin thrombozytärer Lysosomen (lysosomal-membrane-associated glycoprotein 3; LAMP-3) und wird auf aktivierten Thrombozyten und Monozyten exprimiert. Eine genaue Funktion dieses Proteins ist noch nicht bekannt.

Fluorochrom (PE) markierte monoklonale Antikörper gegen CD63 können somit ebenfalls zum Nachweis von MP aktivierter Thrombozyten mittels FACS verwendet werden.

**CD144–FITC**, monoklonaler, Fluorochrom-markierter Antikörper der Firma Acris Antibodies GmbH, Hiddenhausen, Deutschland

Das CD144 Antigen ist das membranständige Glykoprotein Cadherin-5 (VE-Cadherin=Vascular Endothelial-cell-specific Cadherin), ein essentielles Adhäsions-molekül für die Integrität der Endothelzellbarriere und spezifisch für Adhärens Junctions in Endothelzellen [39]. Fluorochrom (FITC) markierte monoklonale Antikörper gegen CD144 können somit zum Nachweis von Endothelzell-MP mittels FACS verwendet werden.

### **2.1.2. Chemikalien**

- $\text{CaCl}_2$  (Calciumchlorid), Merck, Darmstadt, Deutschland
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (Dinatriumhydrogenphosphat), Merck, Darmstadt, Deutschland
- $\text{NaCl}$  (Natriumchlorid), Merck, Darmstadt, Deutschland
- $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$  (Trinatriumcitrat), Merck, Darmstadt, Deutschland
- $\text{NaOH}$  (Natronlauge) 1mol/l, Merck, Darmstadt, Deutschland
- $\text{HCl}$  (Salzsäure)1mol/l, Merck, Darmstadt, Deutschland

### **2.1.3. Pufferlösungen**

#### **2.1.3.1. Phosphat gepufferte Kochsalzlösung (PBS-Puffer)**

Zur Herstellung der Phosphat gepufferte Kochsalzlösung (PBS=Phosphate buffered Saline), des PBS-Puffers, werden 9g  $\text{NaCl}$  (=154mmol/l  $\text{NaCl}$  0,9%) und 0,25 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (=1,4mmol/l  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) in 1000ml Aqua dest. aufgelöst. Dieser Puffer wird bei Raumtemperatur gelagert und kann maximal 2 Wochen verwendet werden.

#### **2.1.3.2. Calciumpuffer und Citratpuffer**

Vor der Verwendung der unten aufgeführten Calcium- bzw. Citratpuffer werden diese mit dem PH-Meter inolab PH720 mit Temperaturfühler TFK 325 der Firma WTW (Weilheim, Deutschland) gemessen. Abweichungen vom physiologischen PH-Wert (7,36-7,43) können durch Zugabe von  $\text{HCl}$  (1mol/l) oder  $\text{NaOH}$  (1mol/l) ausgeglichen werden. Anschließend werden die Pufferlösungen mit Hilfe des Spritzenvorsatzfilter Minisart NML (0,2 $\mu\text{m}$ ) gefiltert.

Zur Herstellung des Calciumpuffers werden 39ml PBS und 1ml Calciumgrundlösung vermischt. Für die Calciumgrundlösung (=0,1mol/l  $\text{CaCl}_2$ ) werden 1,47g  $\text{CaCl}_2$  in 100ml Aqua dest. aufgelöst. Die Calciumgrundlösung wird bei 2 bis 8°C gelagert und kann maximal 12 Monate verwendet werden.

Zur Herstellung des Citratpuffers werden 27ml PBS und 3ml Citratgrundlösung vermischt. Für die Citratgrundlösung (=124mmol/l  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ ) werden 3,2 g  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$  in 100ml Aqua dest. aufgelöst. Die Citratgrundlösung wird bei 2 bis 8°C gelagert und kann maximal 2 Monate verwendet werden.

#### **2.1.4. Geräte und Software**

- FACScan flow cytometer mit Cell Quest Software der Firma Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
- Zentrifuge Mikro 22R der Firma Hettich, Tutting, Deutschland
- Zentrifuge Hermle ZK380, Gosheim, Deutschland
- PH-Meter inolab PH720 mit Temperaturfühler TFK 325 der Firma WTW, Weilheim, Deutschland
- Vortex Genie 2<sup>TM</sup> der Firma Bender&Hobein AG, Zürich, Schweiz

#### **2.1.5. Verarbeitungszubehör**

- Mikro Schraubröhre 1,5ml PP (RF 72.692.005), Firma Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
- Reagiergefäße 1,5ml PP (RF 72.690) Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
- BD Falcon 5 ml Polystyren Round-Bottom-Tube, 12x27mm (RF 352052) Firma BD Biosciences, Bedford (USA)
- BD Falcon 15ml Polystyren Conical Tube 17x20mm der Firma BD Biosciences, Bedford, USA
- Pipettenspitzen epT.I.P.S. Standard in den Größen 0,5-20µl, 2-200µl und 200-1000µl der Firma Eppendorf AG aus Hamburg, Deutschland
- Costar Stripetten in den Größen 10ml und 5ml der Firma Corning, New York, USA
- Spritzenvorsatzfilter Minisart NML 0,2µm der Firma Vitaris AG, Baar, Schweiz

- 20ml Spritzen BD Discardit II der Firma Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
- EDTA-Röhrchen, S-Monovetten 2,3ml K3E (1,6 mg EDTA/ml Blut) der Firma Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
- Citrat-Röhrchen, S-Monovetten 5ml 9NC (Tri-Natriumcitrat-Lösung 0,106 mol/l; 0,50 ml Citrat-Lösung) der Firma Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

## **2.2. Patientenkollektiv**

Für die vorliegende Arbeit wurden insgesamt 20 Patienten aus der Medizinischen Klinik III des Klinikum Großhaderns rekrutiert. Zum einen zehn gesunde Knochenmarkspender und zum anderen zehn Patienten mit malignen Erkrankungen des hämatopoetischen Systems in der Phase der Konditionierung vor Stammzelltransplantation.

Die Patienten wurden vor der Durchführung studienbezogener Probengewinnungen ausführlich über Inhalte und Ziele der Studie informiert und aufgeklärt, erhielten ein Informationsblatt ausgehändigt und unterzeichneten eine Einverständniserklärung. Ein zustimmendes Votum der zuständigen Ethikkommission wurde eingeholt.

### **2.2.1. Gesunde Knochenmarkspender**

Insgesamt wurden 10 gesunde Freiwillige in diese Gruppe im Zeitraum von Oktober 2005 bis März 2007 aufgenommen. Das Kollektiv bestand aus sieben weiblichen (Median 48.0 (42.0-51.5) Jahre) und drei männlichen (Median 26.0 (25.0-37.5) Jahre) Knochenmarkspendern im Alter von 24 bis 56 Jahre (Median 45.5 (40.3-49.8) Jahre). Die Patientencharakteristika der zehn gesunden Knochenmarkspender sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Alle Freiwilligen, welche die Voraussetzungen für eine Knochenmarkspende erfüllten, wurden in diese Gruppen aufgenommen. Hierbei handelt es sich um gesunde Spender zwischen 18 bis 60 Jahren ohne Grunderkrankungen des Herz-, Kreislauf- und Nervensystems und ohne Lungen- oder Stoffwechselerkrankungen. Des Weiteren mussten die Spender frei von Tumorerkrankungen und akuten Infektionen, sowie Infektion mit HAV, HBV, HCV, HIV sein und ein un-

auffälliges Blut- und Differentialblutbild aufweisen. Zusätzlich mussten die Spender der Probenentnahme zustimmen, die zum Zeitpunkt der Knochenmarkspende erfolgte.

<b>Geschlecht</b>	<b>Alter(Jahre)</b>	<b>Erythrozyten</b>	<b>Thrombozyten</b>
Weiblich	40	4,15 T/l	299G/l
Weiblich	53	4,12 T/l	164 G/l
Weiblich	41	3,80 T/l	287 G/l
Weiblich	48	4,07 T/l	162 G/l
Weiblich	56	3,84 T/l	271 G/l
Weiblich	43	3,56 T/l	322 G/l
Weiblich	50	4,44 T/l	181 G/l
Männlich	24	5,46 T/l	230 G/l
Männlich	49	4,89 T/l	244 G/l
Männlich	26	4,66 T/l	236 G/l

**Tab. 1** Gesunde Knochenmarksspender

Es wurden vor Beginn der Knochenmarkentnahme zwei Citratröhrchen und ein EDTA-Röhrchen peripheres venöses Blut mit einer 20G-Nadel entnommen.

Das EDTA-Blut wurde zur Bestimmung der Blutparameter der klinischen Chemie des Klinikums Großhaderns zugesandt. Das Citrat-Blut wurde wie unten beschrieben weiterbehandelt und zur Mikropartikelmessung verwendet.

Des Weiteren wurden zwei Citratröhrchen mit Knochenmarkspirat als Probe genommen. Das Knochenmarkspirat wurde durch Punktion der Spina iliaca anterior und Spina iliaca posterior gewonnen. Hierzu wurde mit einer Hohlnadel, unter sterilen Bedingungen, der Knochen punktiert und anschließend mit einer leeren 10ml Spritze aspiriert. Das Aspirat wurde direkt aus der Spritze in die Citratröhrchen umgefüllt. Dadurch wurde eine Vermischung der Proben mit Heparin, welches dem Aspirat nach Entnahme durch das Mischen im Sammelbehälter zugesetzt wird, vermieden. Die Befüllung der Citratröhrchen erfolgte bis zur vorgeschriebenen Volumenmarkierung (5ml), so dass das Citrat-Knochenmarkspirat-Verhältnis in allen Proben gleich war.

### **2.2.2. Patienten während Konditionierungstherapie vor HSCT**

In diese Gruppe wurden 10 Patienten mit unterschiedlichen malignen Erkrankungen, deren kurative Therapie eine hämatopoetische Stammzelltransplantation erforderte, im Zeitraum von März 2006 bis Juni 2007 aufgenommen.

Davon wurden vier Patienten mit 12Gy TBI + Cyclophosphamid (Cy) / Antithy-  
mozytenglobulin (ATG) konditioniert. Sechs Patienten wurden mit einer  
Hochdosischemotherapie nach dem sogenannten FLAMSA-Protokoll (30mg/m<sup>2</sup>  
Fludarabin, 2000 mg/m<sup>2</sup> Cytarabin, 100 mg/m<sup>2</sup> Amsacrin) + 4Gy oder 12Gy TBI  
+ Cy/ATG bzw. FLAMSA + Busulfan (Bu) + Cy/ATG konditioniert. Die  
Charakteristika der 10 Studienpatienten sind in Tabelle 2 zusammengefasst.  
Patienten die der Entnahme nicht zustimmten oder einen Thrombozytenwert  
unter 50 G/l zu Beginn der Konditionierungsphase hatten wurde nicht in die  
Studie aufgenommen.

Die Probenentnahmen wurden immer zur selben Tageszeit im Rahmen der  
geplanten Laborkontrollen durchgeführt, um etwaige tageszeitliche Schwan-  
kungen der Mikropartikelkonzentration zu vermeiden. Zu jedem Entnahmezeit-  
punkt wurden zwei Citratröhrchen zentralvenöses Blut über einen Hickmanka-  
theter abgenommen. Laufende Infusionen wurden für die Abnahme unterbroch-  
en. Um eine Verunreinigung der Proben mit Infusionsrückständen zu vermeiden  
wurden vor der Probenentnahme 20ml Blut mit einer Spritze aus dem zentralen  
Venenkatheter entnommen. Zusätzlich entnommenes EDTA-Blut, als Teil der  
täglichen Laborkontrolle, wurde zur Bestimmung der Blutparameter der klinisch-  
en Chemie des Klinikums Großhaderns zugesandt.

Patient	Geschlecht	Erkrankung	Therapie
1	Männlich	AML	FLAMSA, 4Gy TBI, Cy, ATG
2	Weiblich	AML	FLAMSA, 4Gy TBI, Cy, ATG
3	Weiblich	AML	FLAMSA, 4Gy TBI, Cy, ATG
4	Weiblich	AML	FLAMSA, Bu, Cy, ATG
5	Männlich	T-NHL	FLAMSA, 12Gy TBI, Cy, ATG
6	Männlich	AML	FLAMSA, Bu, Cy, ATG
7	Männlich	ALL	12Gy TBI, Cy, ATG
8	Männlich	NHL	12Gy TBI, Cy, ATG
9	Männlich	ALL	12Gy TBI, Cy, ATG
10	Weiblich	B-NHL	12Gy TBI, Cy, ATG

Tab. 2 Patienten während Konditionierungstherapie

### 2.2.2.1. Konditionierung mit FLAMSA-Protokoll

Es wurden sechs Patienten (Median 51.5 (40.0-57.3) Jahre), Studienpatient 1-  
6, in die Gruppe der Konditionierungstherapie mit dem FLAMSA-Protokoll  
(30mg/m<sup>2</sup> Fludarabin, 2000mg/m<sup>2</sup> Cytarabin, 100mg/m<sup>2</sup> Amsacrin)

aufgenommen. Darunter waren drei weibliche (51, 52 und 59 Jahre) und drei männliche Patienten (27, 29 und 68 Jahre).

### 2.2.2.1.1. Entnahmezeitpunkte für Probengewinnung

Nach Anlage eines Hickman-Katheters wurde die erste Probe (P0) einen Tag vor Beginn der Konditionierung nach dem FLAMSA-Protokoll (Tag 0) entnommen. An jedem Tag des viertägigen FLAMSA-Protokolls (Tag 1-4) wurde jeweils eine weitere Probe (P1, P2, P3, P4) entnommen. Die sechste Probe (P6) wurde zwei Tage nach dem letzten FLAMSA-Zyklus (Tag 6) entnommen. Am Tag nach der 4Gy-TBI bzw. Bu-Gabe (Tag 8) wurde die letzte Probe (P8) entnommen. Bei Patienten, die zum Zeitpunkt der Probenentnahme P8, eine Thrombozytenwert größer als 100 G/l aufwiesen, wurden die Probeentnahmen im zweitägigen Abstand weitergeführt, bis der Thrombozytenwert unter 100 G/l gefallen war.

### 2.2.2.1.2. Patientencharakteristika

**Studienpatient 1** ist männlich, 27 Jahre alt, 174cm groß, 87kg schwer und besitzt eine Körperoberfläche von 2,0m<sup>2</sup>. Bei diesem Patienten wurde eine AML M1 (mit Übergang zu M2) diagnostiziert. In kurativer Absicht wurde der Patient für eine Knochenmarktransplantation vom HLA-haploidentischen Familienspender konditioniert. Zum Beginn der Konditionierungstherapie befand sich der Patient in kompletter Remission. Das Konditionierungsschema bestand aus FLAMSA (4x30mg/m<sup>2</sup> Fludarabin, 4x2000mg/m<sup>2</sup> Cytarabin, 4x100mg/m<sup>2</sup> Amsacrin), 4 Gy TBI, 4x50mg/kg KG Cy und 5x20mg/kg KG ATG.

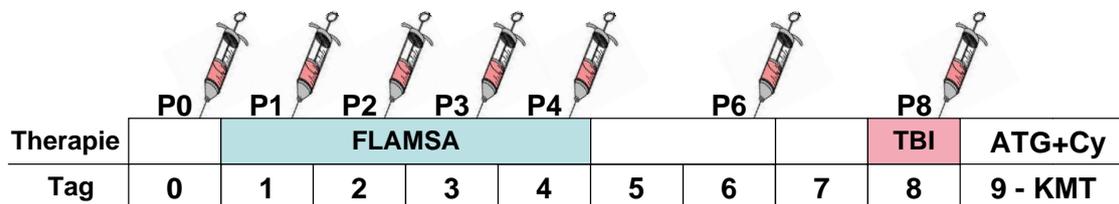


Abb. 2 Zeitpunkte der Probenentnahme bei Studienpatient 1

**Studienpatient 2** ist weiblich, 52 Jahre alt, 174cm groß, 58kg schwer und besitzt eine Körperoberfläche von 1,7m<sup>2</sup>. Bei dieser Patientin wurde eine AML M2 diagnostiziert. In kurativer Absicht wurde die Patientin für eine allogene Stamm-

zelltransplantation vom HLA-identischen Fremdspender konditioniert. Zum Beginn der Konditionierungstherapie befand sich die Patientin in kompletter Remission. Das Konditionierungsschema bestand aus FLAMSA (4x30mg/m<sup>2</sup> Fludarabin, 4x2000mg/m<sup>2</sup> Cytarabin, 4x100mg/m<sup>2</sup> Amsacrin), 4 Gy TBI, 2x60mg/kg KG Cy und 3x20mg/kg KG ATG.

Die Probe P2 konnte bei der Patientin nicht gewonnen werden.

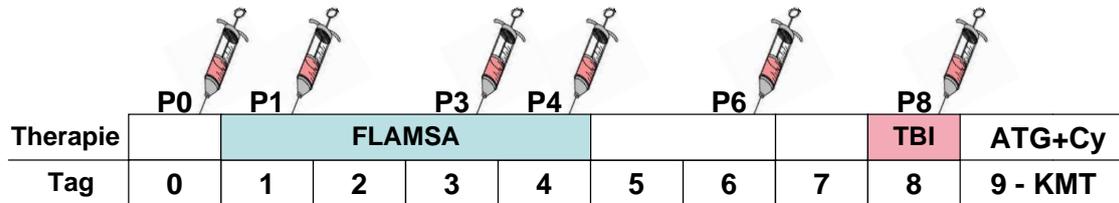


Abb. 3 Zeitpunkte der Probenentnahme bei Studienpatient 2

**Studienpatient 3** ist weiblich, 51 Jahre alt, 168cm groß, 65kg schwer und besitzt eine Körperoberfläche von 1,7m<sup>2</sup>. Bei dieser Patientin wurde eine AML M1, ein Rezidiv einer zuvor mit autologer Stammzelltransplantation therapierten AML M4, diagnostiziert. In kurativer Absicht wurde die Patientin für eine allogene Stammzelltransplantation vom HLA-identischen Familienspender konditioniert. Zum Beginn der Konditionierungstherapie befand sich die Patientin in kompletter Remission. Das Konditionierungsschema bestand aus FLAMSA (4x30mg/m<sup>2</sup> Fludarabin, 4x2000mg/m<sup>2</sup> Cytarabin, 4x100mg/m<sup>2</sup> Amsacrin), 4 Gy TBI, 2x40mg/kg KG Cy und 3x10mg/kg KG ATG.

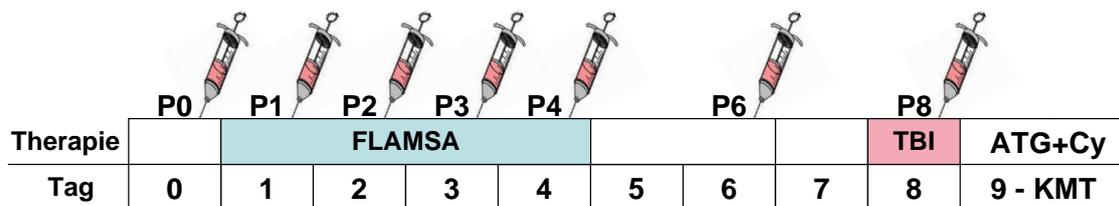


Abb. 4 Zeitpunkte der Probenentnahme bei Studienpatient 3

**Studienpatient 4** ist weiblich, 59 Jahre alt, 166cm groß, 68kg schwer und besitzt eine Körperoberfläche von 1,8m<sup>2</sup>. Bei dieser Patientin wurde eine AML M1/M0, ein Rezidiv einer AML M1, diagnostiziert. In kurativer Absicht wurde die Patientin für eine allogene Stammzelltransplantation vom HLA-identischen Familienspender konditioniert. Zum Beginn der Konditionierungstherapie befand sich die Patientin in kompletter Remission. Das Konditionierungsschema be-

stand aus FLAMSA (4x30mg/m<sup>2</sup> Fludarabin, 4x2000mg/m<sup>2</sup> Cytarabin, 4x100mg/m<sup>2</sup> Amsacrin), 10x0.8mg/kg KG Bu, 2x60mg/kg KG Cy und 3x20mg/kg KG ATG.

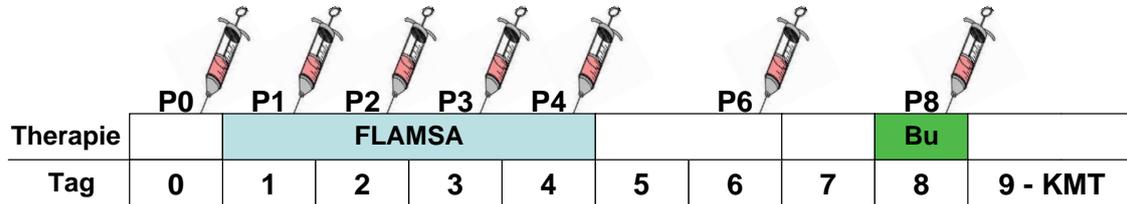


Abb. 5 Zeitpunkte der Probenentnahme bei Studienpatient 4

**Studienpatient 5** ist männlich, 29 Jahre alt, 177cm groß, 73kg schwer und besitzt eine Körperoberfläche von 1,9m<sup>2</sup>. Bei diesem Patienten wurde die Diagnose eines peripheren T-Zell-Lymphoms vom Typ eines ALK negativen, großzellig anaplastischen T-Zell-Lymphoms im Stadium Ia gestellt. Dabei handelt es sich um ein Rezidiv nach multimodaler Chemotherapie und autologer Stammzelltransplantation. Zur Erreichung einer längerfristigen Remission der Grunderkrankung wurde der Patient für eine allogene Stammzelltransplantation vom HLA-identischen Fremdspender konditioniert. Zum Beginn der Konditionierungstherapie befand sich der Patient in kompletter Remission. Das Konditionierungsschema bestand aus FLAMSA (4x30mg/m<sup>2</sup> Fludarabin, 4x2000mg/m<sup>2</sup> Cytarabin, 4x100mg/m<sup>2</sup> Amsacrin), 12 Gy TBI, 2x60mg/kg KG Cy und 3x20mg/kg KG ATG. Die Probe P8 konnte bei diesem Patienten nicht gewonnen werden.

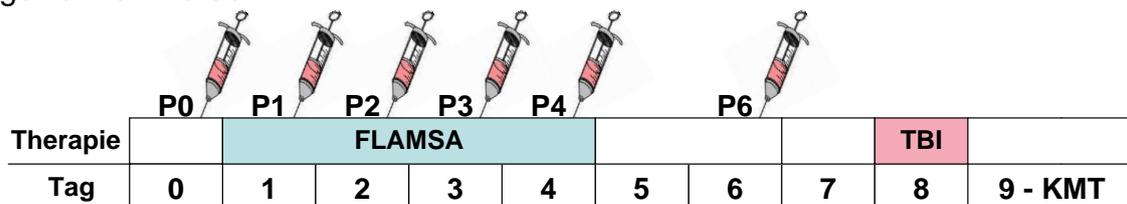


Abb. 6 Zeitpunkte der Probenentnahme bei Studienpatient 5

**Studienpatient 6** ist männlich, 68 Jahre alt, 170cm groß, 62kg schwer und besitzt eine Körperoberfläche von 1,7m<sup>2</sup>. Bei diesem Patienten wurde die Diagnose eines Übergangs eines myelodysplastischen Syndroms in eine akute myeloische Leukämie M1 gestellt. In kurativer Absicht wurde der Patient für eine allogene Stammzelltransplantation vom HLA-identischen Fremdspender konditioniert. Zum Beginn der Konditionierungstherapie befand sich der Patient in kom-

pletter Remission. Das Konditionierungsschema bestand aus FLAMSA (4x30mg/m<sup>2</sup> Fludarabin, 4x2000mg/m<sup>2</sup> Cytarabin, 4x100mg/m<sup>2</sup> Amsacrin), 10x0.8mg/kg KG Bu, 2x60mg/kg KG Cy und 3x20mg/kg KG ATG.

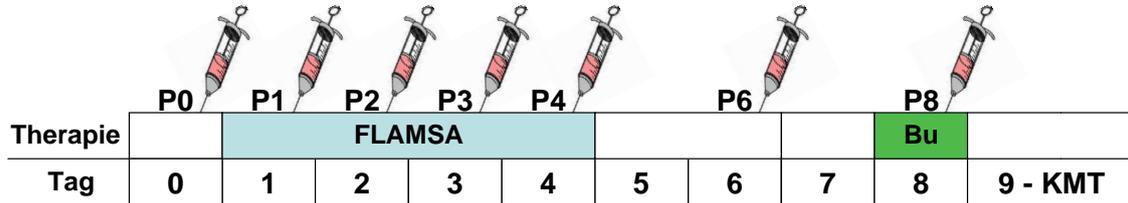


Abb. 7 Zeitpunkte der Probenentnahme bei Studienpatient 6

### 2.2.2.2. Konditionierung mit 12 Gy Ganzkörperbestrahlung

Es wurden vier Patienten (Median 41.0 (37.0-45.5) Jahre), Studienpatient 7-10, in die Gruppe der Konditionierungstherapie mit fraktionierter 12Gy TBI aufgenommen. Darunter waren eine weibliche (37 Jahre) und drei männliche Patienten (20, 45 und 47 Jahre).

#### 2.2.2.2.1. Entnahmezeitpunkte für Probengewinnung

Nach Anlage eines Hickman-Katheters wurde die erste Probe (P0) am Tag vor Beginn der fraktionierten 12Gy TBI (Tag 0) entnommen. Die Proben zwei bis vier (P1, P2, P3) wurden an den drei Bestrahlungstagen (Tag 1-3) nach erfolgter TBI entnommen. Zwei Tage nach Abschluss der fraktionierten 12Gy TBI (Tag 5) wurde die fünfte Probe (P5) entnommen.

Bei Patienten, die zum Zeitpunkt der Probenentnahme P5, eine Thrombozytenwert größer als 100 G/l aufwiesen, wurden die Probeentnahme im täglichen Rhythmus weitergeführt, bis der Thrombozytenwert unter 100 G/l gefallen war.

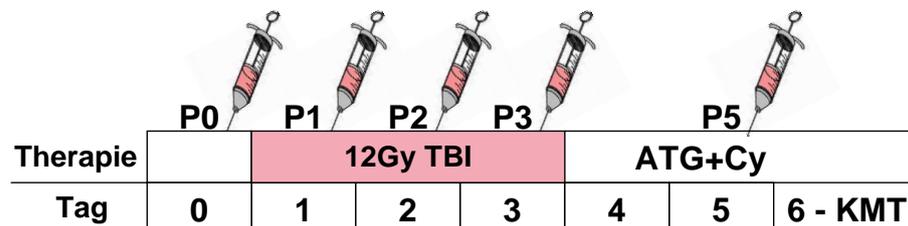


Abb. 8 Zeitpunkte der Probenentnahme der Studienpatient 7-10

#### 2.2.2.2.2. Patientencharakteristika

**Studienpatient 7** ist männlich, 20 Jahre alt, 180cm groß, 64kg schwer und besitzt eine Körperoberfläche von 1,8m<sup>2</sup>. Bei diesem Patienten wurde eine Phila-

delphia-Chromosom positive c-ALL diagnostiziert. In kurativer Absicht wurde der Patient für eine Knochenmarktransplantation vom HLA-haploidentischen Familienspender konditioniert. Zum Beginn der Konditionierungstherapie befand sich der Patient in kompletter Remission. Das Konditionierungsschema bestand aus 12 Gy TBI, 4x50 mg/kg KG Cy und 5x20 mg/kg KG ATG.

**Studienpatient 8** ist männlich, 47 Jahre alt, 180cm groß, 75kg schwer und besitzt eine Körperoberfläche von 1,92m<sup>2</sup>. Bei diesem Patienten wurde ein follikuläres Lymphom im Stadium IVB diagnostiziert. Nach initialer Therapie mit sechs Zyklen nach dem R-CHOP-Protokoll und Erreichen einer kompletten Remission folgte eine zwei monatige Interferon Erhaltungstherapie. Dennoch kam es bereits sechs Monate nach Remission zu einem Rezidiv. Darauf folgte eine Mobilisierungstherapie mit 2 Zyklen R-DHAP zur anschließenden Stammzellsammlung. In kurativer Absicht wurde der Patient für eine autologe Stammzelltransplantation konditioniert. Zum Beginn der Konditionierungstherapie befand sich der Patient in kompletter Remission. Das Konditionierungsschema bestand aus 12 Gy TBI, 4x50 mg/kg KG Cyclophosphamid und 5x10 mg/kg KG Antithymozytenglobulin (ATG).

**Studienpatient 9** ist männlich, 45 Jahre alt, 178cm groß, 69kg schwer und besitzt eine Körperoberfläche von 1,9m<sup>2</sup>. Bei diesem Patienten wurde eine pro-B-ALL mit Co-Expression des myeloischen Markers CD15 diagnostiziert. In kurativer Absicht wurde der Patient für eine Knochenmarktransplantation von einem HLA-identischen Fremdspender konditioniert. Zu Beginn der Konditionierungstherapie befand sich der Patient in kompletter Remission. Das Konditionierungsschema bestand aus 12 Gy TBI, 2x60mg/kg KG Cy und 3x20mg/kg KG ATG.

**Studienpatient 10**, ist weiblich, 37 Jahre alt, 163cm groß, 50kg schwer und besitzt eine Körperoberfläche von 1,5m<sup>2</sup>. Bei dieser Patientin wurde ein diffus großzelliges B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphom im Stadium IV<sub>E</sub> B diagnostiziert. Es handelt sich bei der Patientin um eine Rezidivsituation nach autologer Stammzelltransplantation. Zum Erreichen einer längerfristigen Remission der Grunderkrankung wurde die Patientin für eine allogene Stammzelltransplantation vom HLA-differenten Fremdspender konditioniert. Zu Beginn der Konditionierungs-

therapie befand sich die Patientin in kompletter Remission. Das Konditionierungsschema bestand aus 12 Gy TBI, 2x 60mg/kg KG Cy und 3x 20mg/kg KG ATG.

Die Proben P0-P5 wurden wie in Tabelle 3 aufgeführt gewonnen. P6 wurde zusätzlich am dritten Tag nach der letzten TBI gewonnen, da die Patientin am Entnahmezeitpunkt P5 einen Thrombozytenwert größer als 100 G/l aufwies.

## **2.3. Methoden**

### **2.3.1. Aufbereitung der Proben**

Nach Entnahme der zentralvenösen Blutproben wurden die Citratröhrchen durch mehrmaliges vorsichtiges Schwenken vermischt. Die Proben wurden innerhalb von 15min nach Abnahme ins Labor gebracht und weiterverarbeitet. Um eine Zellaktivierung durch Scherkräfte zu vermeiden wurde auf einen erschütterungsarmen Transport geachtet. Deswegen wurde auf das Rohrpostsystem verzichtet und die Proben wurden per pedes und auf Eis gelagert transportiert. Im Labor wurden die Citratröhrchen für 20 Minuten, bei 20°C mit 2900 RPM und Bremse 1, in der Zentrifuge Mikro 22R der Firma Hettich, zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Serumüberstand bis zu einem Abstand von 1cm über dem Sediment abpipettiert. Das abpipettierte Serum wurde in einem Sammelröhrchen (BD Falcon 15ml Polystyren Conical Tube) gesammelt und durch langsamen Schwenken vermischt. Anschließend wurden jeweils 300µl Serum in Mikro Schraubröhrchen (1,5ml PP) der Firma Sarstedt pipettiert. Die Schraubröhrchen wurden zum Schockgefrieren für 20 Sekunden senkrecht in Flüssigstickstoff getaucht und anschließend, um die Proben zu stabilisieren, für mindestens 15 Minuten im Stickstoffbad belassen. Nach dem Schockgefrieren wurden die Proben bei -80°C im Tiefkühlschrank vor der Weiterverarbeitung mindestens 48 Stunden gelagert.

### **2.3.2. Isolation und Analyse von Mikropartikeln**

#### **2.3.2.1. Reinigen und Isolation der Mikropartikel**

Die Proben wurden im Eiswasserbad über mindestens eine Stunde langsam aufgetaut. Nach dem Auftauen wurde die jetzt flüssige Probe durch vortexen

gemischt. Anschließend wurden 250 µl der Probe in eine Mikro Schraubröhre (1,5ml PP) der Firma Sarstedt gefüllt und bei 13000 RPM, Bremse 1 und 20°C für 30 Minuten in der Zentrifuge Mikro 22R, der Firma Hettich, zentrifugiert. Nach Entfernung von 225 µl Überstand von der dem Pellet fernen Wandseite, wurde das verbliebene Mikropartikelpellet mit 225 µl Citratpuffer (3,2% Tri-Natrium-Citrat) resuspendiert und anschließend für 30 Minuten bei 13000 RPM, Bremse 1 und 20°C erneut zentrifugiert. Der erneut zentrifugierten Probe wurden wiederum 225 µl entnommen und das belassene Mikropartikelpellet wurde mit 75 µl Citratpuffer wiederum resuspendiert. Somit wurden 100 µl Mikropartikellösung für die Mikropartikelmessung gewonnen.

### 2.3.2.2. Herstellung der Antikörper-Proben und der Annexin-Leerproben

Die sieben verwendeten Antikörper wurden im jeweiligen Mischungsverhältnis (siehe Tabelle 4) mit Calciumpuffer versehen und anschließend für 5 Minuten bei 13000 RPM, 18°C und Bremse 0 zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurden jeweils 10 µl der Antikörperlösung abgenommen und in Reagiergefäße (1,5ml PP) der Firma Sarstedt zur Weiterverarbeitung gegeben. Die Annexin-FITC- und Annexin-PE-Lösungen wurden ebenfalls im jeweiligen Mischungsverhältnis (siehe Tabelle 3) mit Calcium-Puffer versehen, aber nicht zentrifugiert.

Färbung	Mischungsverhältnis	Menge	Ansatz für 1 Probe
Annexin-FITC	1:10	60 µl	6 µl Annexin-FITC + 54 µl Calcium-Puffer
IgG-PE	1:10	20 µl	2 µl IgG-PE + 18 µl Calcium-Puffer
CD 34-PE	1:1	15 µl	15 µl CD 34-PE
CD 61-PE	1:10	20 µl	2 µl CD 61-PE + 18 µl Calcium-Puffer
CD 63-PE	1:2	20 µl	10 µl CD 63-PE + 10 µl Calcium-Puffer
CD 62P-PE	1:10	20 µl	2 µl CD 62P-PE + 18 µl Calcium-Puffer
CD 62E-PE	1:2	20 µl	10 µl CD 62E-PE + 10 µl Calcium-Puffer
Annexin-PE	1:20	40 µl	2 µl Annexin-PE + 38 µl Calcium-Puffer
IgG-FITC	1:10	20 µl	2 µl IgG-FITC + 18 µl Calcium-Puffer
CD 144-FITC	1:2	20 µl	10 µl CD 144-FITC + 10 µl Calcium-Puffer

Tab. 3 Mischungsverhältnisse für Annexin- und Antikörper-Ansätze

Im Anschluss wurden neun FACS-Röhrchen für die Proben der Patienten während Konditionierungstherapie, bzw. zehn FACS-Röhrchen für die Proben der freiwilligen Knochenmarkspender bereitgestellt und mit dem Namen des jeweiligen Farbstoffes bzw. Antikörpers beschriftet. In zwei FACS-Röhrchen wurde nun für die beiden Annexin-Leerproben (Annexin-FITC-Probe/Annexin-

PE-Probe) jeweils 35 µl Citrat-Puffer gegeben. In die übrigen sieben bzw. acht FACS-Röhrchen, wurden für die Antikörperproben jeweils mit 35 µl Calcium-Puffer gefüllt. Zu den FACS-Röhrchen der Annexin-FITC-Leerprobe, der IgG-PE-Probe, der CD34-PE-Probe, der CD61-PE-Probe, der CD62E-PE-Probe, der CD62P-PE-Probe und der CD63-PE-Probe wurden jeweils 5 µl Annexin-FITC zugegeben. Zu den FACS-Röhrchen der Annexin-PE-Leerprobe, der IgG-FITC-Probe und der CD144-FITC-Probe wurden jeweils 5 µl Annexin-PE zugegeben. Zu den Antikörper-FACS-Röhrchen wurden im nächsten Schritt jeweils 5 µl des entsprechenden aufbereiteten Antikörpers zugefügt. Im letzten Schritt wurde nun noch in jedes der neun bzw. zehn vorbereiteten FACS-Röhrchen jeweils 5 µl Mikropartikellösung zugegeben. Vor dem Pipetieren wurde die Mikropartikellösung nochmals 1-3 Sekunden gevortext. Der Inhalt der einzelnen FACS-Röhrchen ist in Tabelle 4 dargestellt. Die Proben wurden anschließend bei Raumtemperatur in Dunkelheit für 15 Minuten inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Reaktion durch Zugabe von jeweils 900 µl Calcium-Puffer zu den Antikörper-Proben und jeweils 900 µl Citrat-Puffer zu den beiden Annexin-Leerproben gestoppt.

<b>Proben</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Annexin-FITC	5 µl MP+ 35 µl Citrat-Puffer + 5 µl Annexin FITC
IgG-PE	5 µl MP+ 35 µl Calcium-Puffer + 5 µl Annexin FITC+ 5 µl IgG-PE
CD 34-PE	5 µl MP+ 35 µl Calcium-Puffer + 5 µl Annexin FITC+ 5 µl CD 34-PE
CD 61-PE	5 µl MP+ 35 µl Calcium-Puffer + 5 µl Annexin FITC+ 5 µl CD 61-PE
CD 62E-PE	5 µl MP+ 35 µl Calcium-Puffer + 5 µl Annexin FITC+ 5 µl CD 62E-PE
CD 62P-PE	5 µl MP+ 35 µl Calcium-Puffer + 5 µl Annexin FITC+ 5 µl CD 62P-PE
CD 63-PE	5 µl MP+ 35 µl Calcium-Puffer + 5 µl Annexin FITC+ 5 µl CD 63-PE
Annexin-PE	5 µl MP+ 35 µl Citrat-Puffer + 5 µl Annexin PE
IgG-FITC	5 µl MP+ 35 µl Calcium-Puffer + 5 µl Annexin PE+ 5 µl IgG-FITC
CD 144-FITC	5 µl MP+ 35 µl Calcium-Puffer + 5 µl Annexin PE+ 5 µl CD 144-FITC

**Tab. 4** Zusammensetzung der Annexin- und der Antikörperproben

### **2.3.2.3. Mikropartikel Messung mit FACScan flow cytometer**

Die so aufbereiteten Proben wurden mit dem FACScan flow cytometer, der Firma Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland) mit zugehöriger Cell Quest Software der Firma Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland) gemessen und ausgewertet. Vor der Messung wurden die Proben durch vortexen erneut gemischt. Alle Proben wurden für eine Minute bei höchstem Einzug gemessen.

Der Wassereinzug, der dem Volumen entspricht, welches in einer Minute vom Gerät eingezogen wird, wurde täglich vor den Messungen neu bestimmt und betrug im Durchschnitt 90 µl. Dieser wurde durch den Gewichtsunterschied einer Probe mit destilliertem Wasser vor und nach einer Minute Messung errechnet. Der Forward Scatter (FSC, Vorwärtsstreulicht) und der Side Scatter (SSC, Seitwärtsstreulicht) wurden nach logarithmischen Parametern eingestellt (Tabelle 5). Die MP wurden zum einen anhand ihrer Größe (FSC) und ihrer Dichte (SSC) und zum anderen durch ihre Bindungsfähigkeit mit Annexin V und mit monoklonalen, Fluoreszenz markierten Antikörper gegen zellspezifische Antigene detektiert.

Die Anzahl der MP pro µl Plasma wurde über folgende Formel, entsprechend Berckmans RJ et al. (2001) errechnet [40, 41].

$$\text{Mikropartikel/l} = N \times (100 \mu\text{l} / 5 \mu\text{l}) \times (950 \mu\text{l} / V) \times 10^6 / 250 \mu\text{l}$$

Dabei entspricht **N** der absoluten Anzahl an MP, welche über die FACS-Analyse ermittelt werden. **100µl** ist das Gesamtvolumen der aufbereiteten MP und **5µl** ist die Menge der für die Messung verwendeten Mikropartikellösung. Das Gesamtvolumen der Probe vor der Messung betrug **950 µl** (Mikropartikel-lösung+Antikörper+Puffer). **V** entspricht dem Wassereinzug pro Minute. Das ursprüngliche Volumen der Probe vor der Mikropartikelisolation betrug **250 µl**.

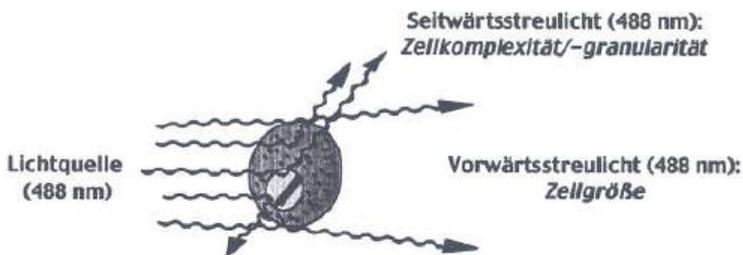
Param	Detector	Voltage	AmpGain	Mode	Compensation	Threshold
P1	FSC	E00	1.00	Log	FL1 - 2.6% FL2	Parameter: FSC Value: 96
P2	SSC	300	1.00	Log	FL2 - 6.3% FL1	
P3	FL1	625	1.00	Log	FL2 - 0.0% FL3	
P4	FL2	630	1.00	Log	FL3 - 0.0% FL2	
P5	FL3	925	1.00	Lin		

**Tab. 5** Geräteeinstellung FACScan flow cytometer

### **2.3.3. Funktionsprinzip der Durchflusszytometrie**

Die Durchflusszytometrie, auch FACS genannt, beruht im Wesentlichen auf der Messung optischer Signale unterschiedlicher Qualität wie Lichtstreuung und Fluoreszenz. Eine Suspension von Zellen oder Partikeln wird dafür durch einen Hüllstrom verdünnt und anschließend fokussiert, in einer Sequenz von Einzelzellen/-partikeln („im Gänsemarsch“), im rechten Winkel an einer Lichtquelle vorbei geführt. Als Lichtquelle dient ein luftgekühlter Argon-Ionenlaser ( $\lambda = 488$

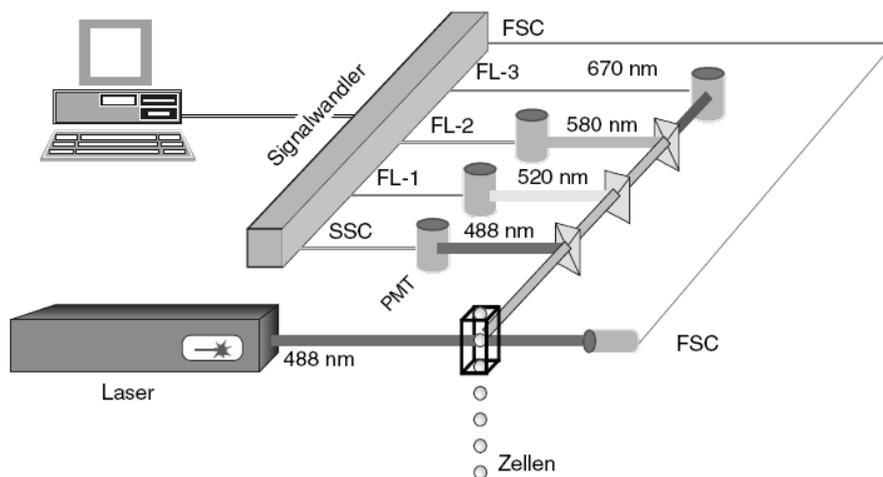
nm). Dabei werden Lichtstreuung und Fluoreszenzen in dem Moment detektiert, in dem die Zellen oder Partikel den rechtwinklig zum Probenfluss angeordneten Laserstrahl passieren. Die im Moment des Durchtritts durch den Fokus des Lasers gemessene Lichtstreuung wird in Abhängigkeit zum Winkel in Vorwärtsstreulicht (FSC: forward scatter) und Seitwärtsstreulicht (SSC: sideward scatter) unterteilt (Abb. 8). Dabei entspricht FSC der Lichtstreuung in einem engen Winkel (Kleinwinkelbereich von 0 – 10°) zum Laserlicht und ist das durchflusszytometrische Korrelat zur Querschnittsfläche der Zelle bzw. des Partikels und liefert demnach Informationen über die Größe des detektierten Objekts. Dagegen wird Lichtstreuung in einem Winkel von 90° als SSC bezeichnet, welches dem Refraktionsindex entspricht und Informationen über Granularität, Membranfaltung, innere Komplexität und äußere Form des detektierten Objekts liefert.



**Abb. 9** Entstehung von SSC und FSC im FACS [42]

Bei Zellen oder Partikeln, die mit fluoreszierenden Farbstoffen oder Antikörpern markiert wurden, kann im Moment des Durchtritts durch den Laserstrahl, zusätzlich die Fluoreszenz bestimmt werden. Dabei werden Fluorochrome durch das Laserlicht angeregt und emittieren Licht eines für sie charakteristischen Wellenlängenspektrums. Die unterschiedlichen Lichtsignale können mit Hilfe von Photomultiplier (PMT) detektiert werden. Diese wandeln das Licht in elektrische Signale um. Einer üblichen Nomenklatur folgend, werden die Detektoren, mit zunehmendem spektralem Abstand vom Anregungslicht, aufsteigend nummeriert (FL1-530nm, FL2-585nm, FL3->650nm). Bei Anregung mit dem blau-grünen Licht eines 488-nm-Argon-Lasers erkennt beispielsweise der FL1-Detektor grünes Licht, der FL2-Detektor oranges Licht und der FL3-Detektor rotes Licht (Abb. 10).

In der vorliegenden Arbeit kamen zwei verschiedene Fluorochrome zum Einsatz. Zum einen FITC, welches bei 492nm angeregt wird und dessen Absorptionsmaximum nahe der Wellenlänge des Argonlasers (488nm) liegt. Das Emissionsmaximum liegt bei 520nm. Der Nachteil von FITC ist, dass es unter Lichteinwirkung schnell ausbleicht und deswegen die Proben möglichst zeitnah nach der Anfärbung gemessen werden müssen. Zum anderen PE, welches zur Familie der Phycobiliproteine aus Cyanobakterien und eukaryonten Algen gehört. PE besitzt drei Absorptionsmaxima bei 480, 546 und 565nm und kann mit dem Argonlaser bei 488 nm sehr gut angeregt werden. Das Emissionsspektrum von PE hat sein Maximum bei 578 nm. PE-Konjugate haben eine 10fach höhere Sensitivität als die Fluorescein-Konjugaten und sind relativ unempfindlich bezüglich des pH-Wertes und des Ionen-Milieus.



**Abb. 10** Genereller Aufbau eines Durchflusszytometers [43]

Am Kreuzungspunkt eines Laser-Strahls mit dem Probenstrom wird während der Passage einzelner Zellen/Partikel Licht gestreut und es werden Fluoreszenzen angeregt. Das FSC wird als Maß der Zellgröße detektiert. Farbteilerspiegel und Filter trennen SSC als Maß der Granularität und Fluoreszenzen (FL1, FL2, FL3). Das von Photomultipliern (PMTs) detektierte Licht wird für jede Einzelzelle / jeden Einzelpartikel in digitaler Form gespeichert.

Die gemessenen Daten werden für jede einzelne Zelle/Partikel gespeichert und können später zur Auswertung aufgerufen werden. Um aus dem kontinuierlichen „Hintergrundrauschen“ die den einzelnen Zellen/Partikeln zuzuordnenden Signale herausfiltern zu können, wird während der Datenaufnahme auf einem führenden Parameter, dem Triggerparameter, ein Schwellenwert oder „threshold“ definiert. Bei überschreiten des Schwellenwertes werden die Aufnahmen und das Abspeichern jeweils eines Datensatzes ausgelöst.

Zur Darstellung der gemessenen Fluoreszenzsignale ist in der Regel eine logarithmische Darstellung erforderlich, da z.B. die Färbung mit monoklonalen Antikörpern häufig zu 100- oder 1000-fachen Unterschieden zwischen den Signalen von stark positiven und negativen Zellen führt. Demnach ist eine Erkennung von schwachen Signalen nur bei einer logarithmischen Darstellung der Messdaten möglich. Die Darstellung der Datensätze erfolgt als zweidimensionale Punktediagramme (Dot-Plots) und gibt Aufschluss über die Assoziation von zwei verschiedenen Messparametern. Dabei werden in einem Dot-Plot auf der x- und y-Achse jeweils die Intensitätsverteilungen von zwei Messparametern aufgetragen. Jede gemessene Zelle/Partikel wird dann als Punkt an der x- und y-Position entsprechend ihrer Intensität aufgetragen [43].

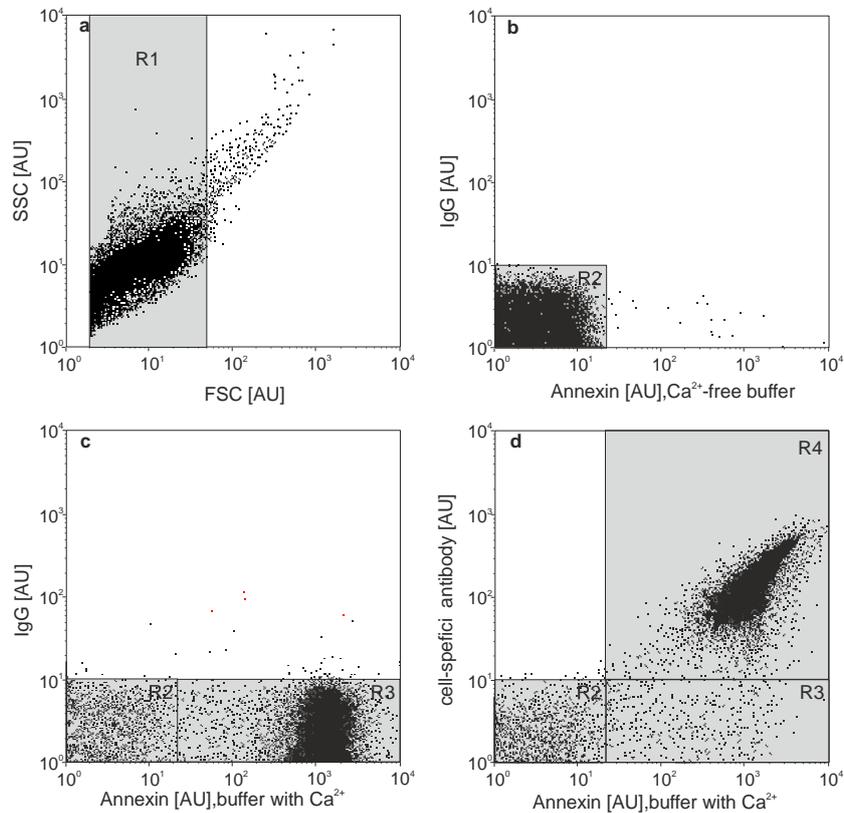


Abb. 11 Mikropartikelmessung mittels Durchflusszytometrie [40]

In der durchflusszytometrischen Analyse der Proben erfolgte zuerst die Identifikation der MP anhand ihrer Größe durch Messung des FSC (a). In einer Negativkontrolle wurden die Proben mit unspezifischem IgG und Annexin V in Ca-freiem Puffer inkubiert (b). Die Zugabe von Ca, welches die Bindung von

Annexin V an die MP ermöglicht, identifizierte die Gesamtzahl der MP einer Probe (c, R3). Die Inkubation der Proben mit Annexin V und zellspezifischen Antikörpern in Ca-Puffer ermöglichte die Bestimmung von Untergruppen aus der Gesamtheit der Annexin-positiven MP (d, R4) [40].

#### **2.3.4. Statistische Methoden**

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des SPSS-Programms (Statistical Package for Social Science 17.0, für Windows XP). Dabei wurden die Auswertung der beiden Proben der gesunden Knochenmarkspendender (zirkulierende MP und MP im Knochenmarkspirat) mit Hilfe des nicht-parametrischen Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test für gepaarte Stichproben durchgeführt.

Ergebnisse mit einem p-Wert  $< 0.05$  wurden als statistisch signifikant definiert.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Studiengruppe gesunder Knochenmarkspender

Der Vergleich von peripher venösen Blut und Knochenmarkaspirat aller Knochenmarkspender zeigte statistisch signifikante Unterschiede bezüglich der Gesamtzahl und der Zahl endothelialer und thrombo-/megakaryozytärer MP sowie der Zahl von MP hämatopoetischer Zellen (Tab. 6). Alle Messergebnisse sind als Median und Interquartilsabstand angegeben.

MP	Zirkulierende MP (/µl)		Knochenmark MP (/µl)		p
	Anzahl	% der Annexin pos. MP	Anzahl	% der Annexin pos. MP	
Annexin	8618.40 (7352.40-11386.53)		13792.37 (10286.66-20491.36)		<b>0.022</b>
CD34	211.68 (174.82-311.81)	2.5%	413.13 (257.60-748.40)	3.0%	<b>0.037</b>
CD61	7889.37 (6334.03-10206.13)	91.5%	2060.38 (1227.37-4188.99)	14.9%	<b>0.005</b>
CD62P	313.74 (216.20-371.04)	3.6%	26.13 (18.36-131.31)	0.2%	<b>0.007</b>
CD63	300.63 (183.14-670.58)	3.5%	2031.84 (944.25-5325.32)	14.7%	<b>0.005</b>
CD144	2381.42 (2141.42-2675.32)	27.8%	5986.93 (4558.22-8757.82)	43.4%	<b>0.005</b>
CD62E	732.96 (565.18-877.89)	8.5%	1528.85 (958.92-1838.04)	11.1%	<b>0.005</b>

Tab. 6 Messergebnisse der gesunden Knochenmarkspender

##### 3.1.1. Charakteristika der Studiengruppe

Insgesamt wurden zehn gesunde Knochenmarkspender mit einem Medianalter von 45.5 (40.3-49.8) Jahren in unsere Studie aufgenommen. Das Kollektiv bestand aus sieben Frauen (Median 48.0 (42.0-51.5) Jahre) und drei Männern (Median 26.0 (25.0-37.5) Jahre).

##### 3.1.2. Laborparameter

Für die Auswertung der Mikropartikelmessungen wurden in den peripher venösen Blutproben die Konzentration der Thrombozyten und Erythrozyten bestimmt (Tabelle 1). Bei den 10 Knochenmarkspendern betrug der Median der Erythrozytenkonzentration 4.14 (3.90-4.61) T/l. und der Median der Thrombozytenkonzentration 240.0 (193.3-283.0) G/l.

### 3.1.3. Ergebnisse der Durchflusszytometrie

Die Proben des peripher venösen Blutes und die Proben des Knochenmarkaspirats wurden bezüglich der Gesamtzahl und der Anzahl endothelialer, thrombozytärer/megakaryozytärer und hämatopoetischer MP untersucht. Die Gesamtzahl der MP einer Probe wurde durch Messung der Annexin-positiven MP bestimmt. Antikörper gegen CD34 wurden zur Detektion von MP aus hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen verwendet. Antikörper gegen die Oberflächenantigene CD61, CD62P und CD63 wurden zum Nachweis von MP thrombozytären/megakaryozytären Ursprungs verwendet. Zur Detektion endothelialer MP, wurden Antikörper gegen die Oberflächenantigene CD62E und CD144 eingesetzt.

#### 3.1.3.1. Annexin positive Mikropartikel

Die zehn Knochenmarkspender hatten im Median 8618.40 (7352.40-11386.53) / $\mu$ l Annexin-positive MP im peripher venösen Blut und 13792.37 (10285.66-20491.36) / $\mu$ l Annexin-positive MP im Knochenmarkaspirat ( $p=0.022$ ). Die Zahl Annexin-positiver MP entspricht der Gesamtzahl der MP einer Probe. Demnach ist die Anzahl der MP im Knochenmarkaspirat etwa um den Faktor 1.6 höher als im peripher venösen Blut (Abb. 12). Der erhöhte Zellumsatz während der Hämatopoese stellt eine mögliche Erklärung hierfür dar.

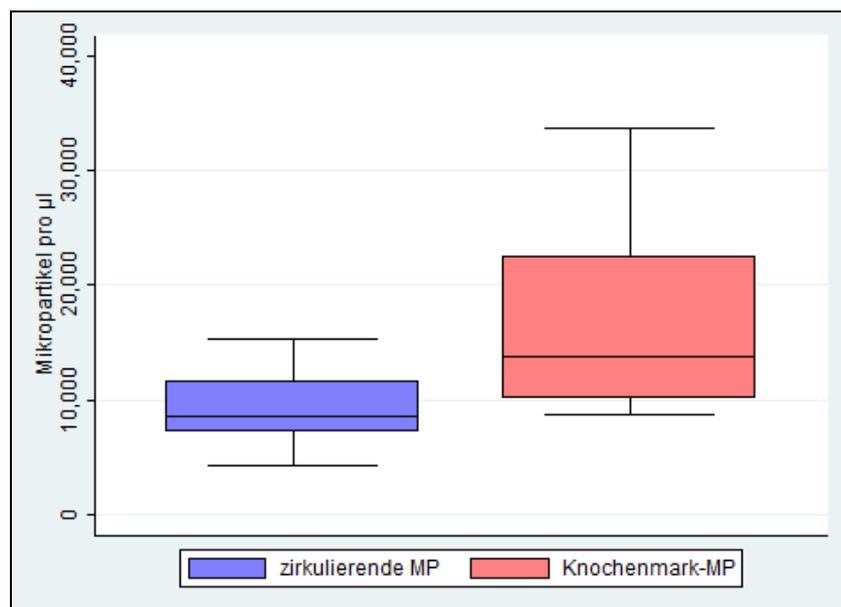


Abb. 12 Annexin-positive MP bei gesunden Knochenmarkspendern

### 3.1.3.2. Mikropartikel von hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen

Die Anzahl der CD34-positiver MP (Abb. 13) ist im Knochenmarkaspirat, Median 413.13 (257.60-748.40) / $\mu$ l, in etwa doppelt so hoch wie im peripher venösen Blut, Median 211.68 (174.82-311.81) / $\mu$ l ( $p=0.037$ ). Im peripher venösen Blut tragen im Verhältnis zu der Zahl Annexin-positiver MP etwa 2.5% und im Knochenmarkaspirat etwa 3% der MP das CD34-Antigen.

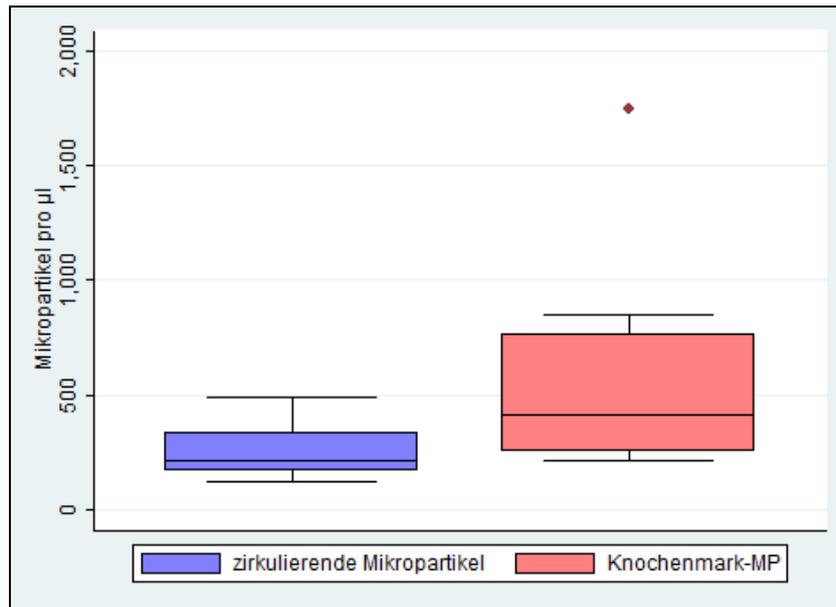


Abb. 13 CD34-positive MP bei gesunden Knochenmarkspendern

### 3.1.3.3. Mikropartikel thrombo-/megakaryozytären Ursprungs

Die Anzahl der CD61-positiven MP (Abb. 14) ist im peripher venösen Blut, Median 7889.37 (6334.03-10206.13) / $\mu$ l, um etwa das vierfache höher als im Knochenmarkaspirat, Median 2060.38 (1227.37-4189.99) / $\mu$ l ( $p=0.005$ ). Im peripher venösen Blut sind im Verhältnis zu den Annexin-positiven MP etwa 91.5% und im Knochenmarkaspirat etwa 14.9% der MP CD61-positiv. Mit 91.5% ist der größte Teil der zirkulierenden MP thrombo-/megakaryozytären Ursprungs. Bezogen auf die Anzahl der Thrombozyten im peripher venösen Blut ergibt sich, dass im Knochenmarkaspirat im Median 0.0087 (0.0052-0.0213) und im peripher venösen Blut im Median 0.0342 (0.0253-0.0489) CD61-positive MP pro Thrombozyt vorhanden sind.

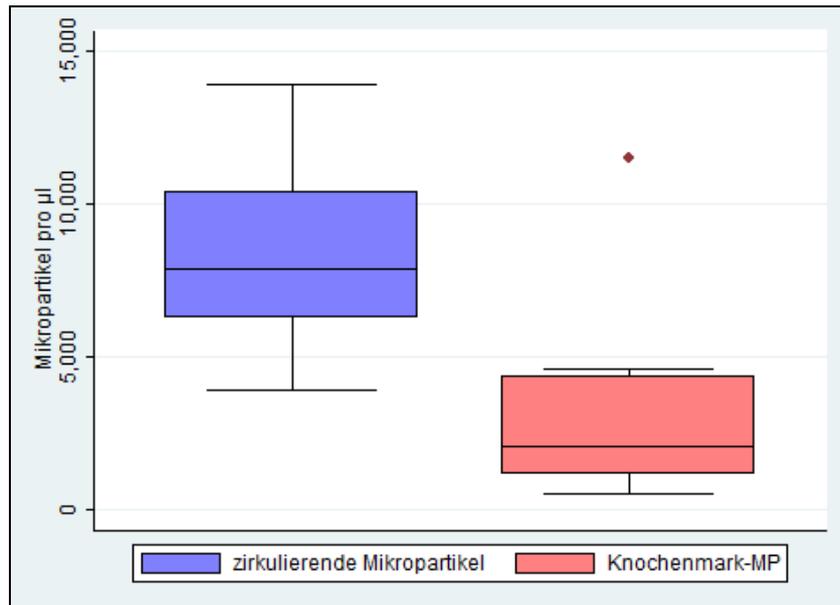


Abb. 14 CD61-positive MP bei gesunden Knochenmarkspendern

Die Anzahl CD62P-positiver MP (Abb. 15) ist im peripher venösen Blut, Median 313.74 (216.20-371.04) /µl, um etwa das zwölfwache höher als im Knochenmarkaspirat, Median 26.13 (18.36-131.31) /µl ( $p=0.007$ ). Im peripher venösen Blut tragen im Verhältnis zu der Zahl Annexin-positiver MP 3.6% und im Knochenmarkaspirat 0.2% der MP das CD62P-Antigen.

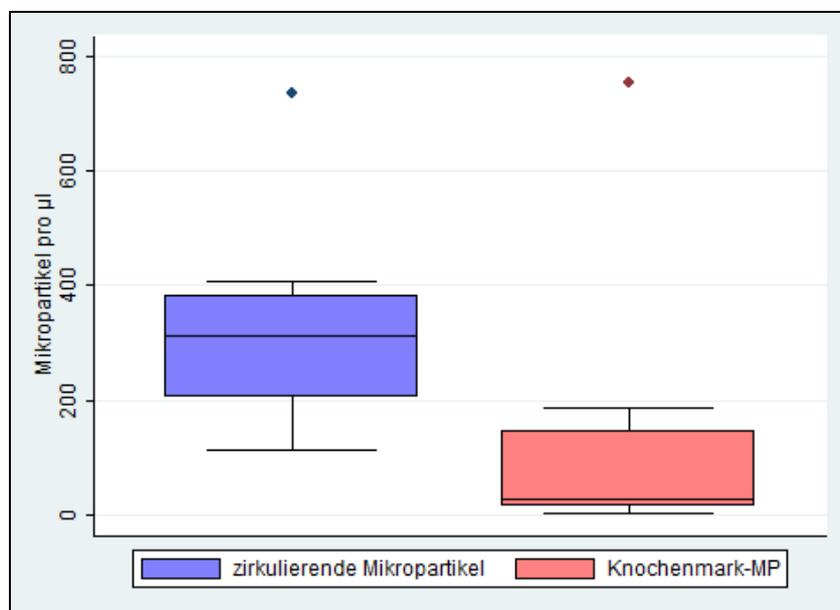


Abb. 15 CD62P-positive MP bei gesunden Knochenmarkspendern

Diese Zahlen erscheinen realistisch, da das CD62P-Antigen vor allem auf aktivierten Thrombozyten exprimiert wird. Die geringe Zahl CD62P-positiver MP im Knochenmarkaspirat schließt darüber hinaus Fehler bei der Probengewinnung

weitgehend aus. Bei fehlerhafter Abnahme müssten die Werte für CD62P-positive MP durch eine dadurch bedingte Thrombozytenaktivierung deutlich höher sein. Im Gegensatz zum CD61-Antigen wird das CD62P-Antigen vor allem auf aktivierten Thrombozyten exprimiert. Bezogen auf die Anzahl CD61-positiver MP, die der Gesamtzahl der MP thrombo-/megakaryozytären Ursprungs entspricht, fanden sich im peripher venösen Blut etwa 4.0% und im Knochenmarkaspirat etwa 1.3% CD62P-positive MP.

Im Knochenmarkaspirat, Median 2031.84 (944.25-5325.32) / $\mu$ l, fanden sich fast siebenmal mehr CD63-positive MP als im peripher venösen Blut, Median 300.63 (183.14-670.58) / $\mu$ l ( $p=0.005$ ) (Abb. 16). Im Verhältnis zu den Annexin-positiven MP binden im Knochenmarkaspirat 14.7% und im peripher venösen Blut 3.5% der MP den Antikörper gegen das CD63-Antigen. Neben aktivierten Thrombozyten exprimieren aber auch Monozyten und Makrophagen das CD63-Antigen. Bezogen auf die Anzahl CD61-positiver MP waren im Knochenmarkaspirat 98.6% und im peripher venösen Blut 3.8% CD63-positive MP.

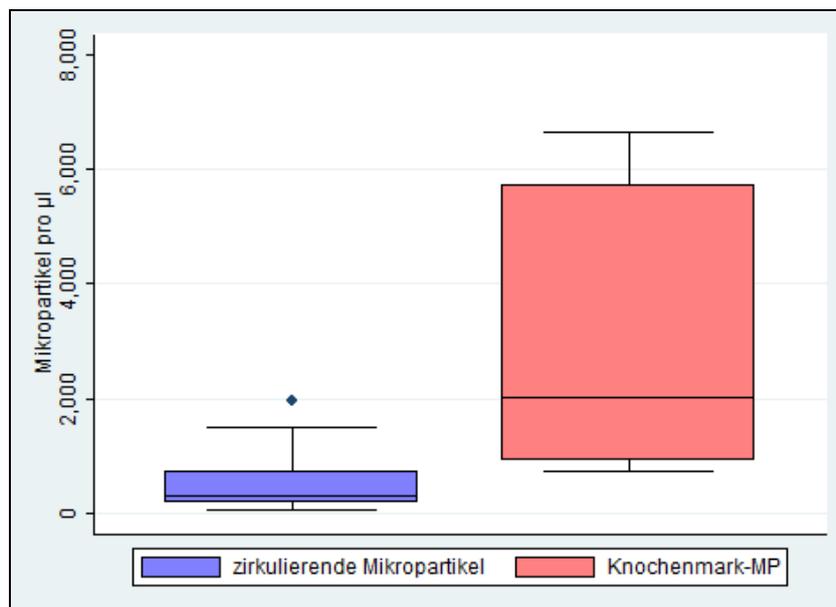


Abb. 16 CD63-positive MP bei gesunden Knochenmarkspendern

#### 3.1.3.4. Mikropartikel endothelialen Ursprungs

Im Knochenmarkaspirat, Median 5986.93 (4558.22-8757.82) / $\mu$ l, befindet sich eine etwa um den Faktor 2.5 höhere Anzahl CD144-positiver MP als im peripher venösen Blut, Median 2391.42 (2141.12-2675.32) / $\mu$ l ( $p=0.005$ ) (Abb. 17). Der Anteil CD144-positiver MP im Verhältnis zu der Zahl Annexin-positiver MP

beträgt im Knochenmark 43.4% und im peripher venösen Blut 27.7%.

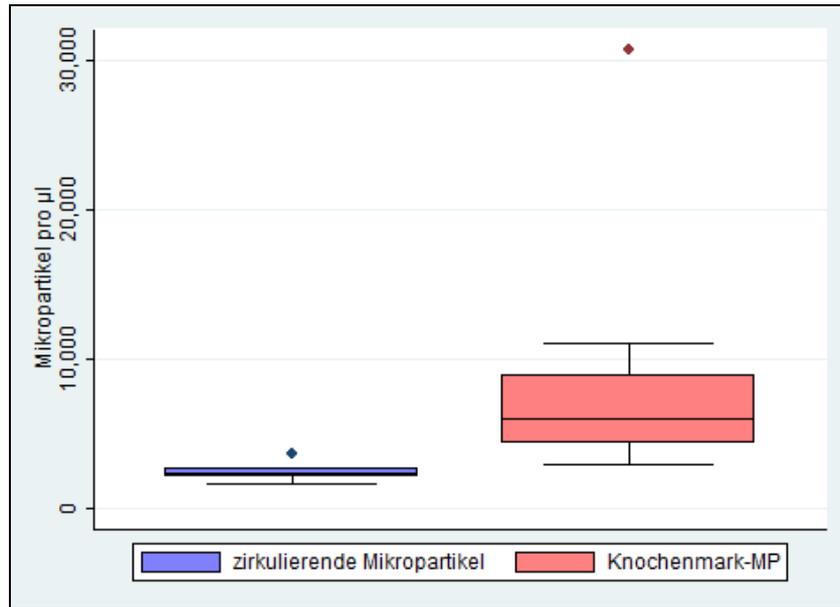


Abb. 17 CD144-positive MP bei gesunden Knochenmarkspendern

Die Anzahl CD62E-positive MP ist im Knochenmarkspirat, Median 1528.85 (958.92-1838.04) /µl, etwa doppelt so hoch wie im peripher venösen Blut, Median 732.96 (565.18-877.89) /µl ( $p=0.005$ ) (Abb. 18). Im Verhältnis zu der Zahl Annexin-positiver MP tragen 11.1% der MP aus Knochenmarkspirat und 8.5% der MP aus peripher venösen Blut das CD62E-Antigen. Bezogen auf die Zahl CD144-positiver MP sind im peripher venösen Blut im 30.7% und im Knochenmarkspirat 25.5% der MP CD62E-positiv.

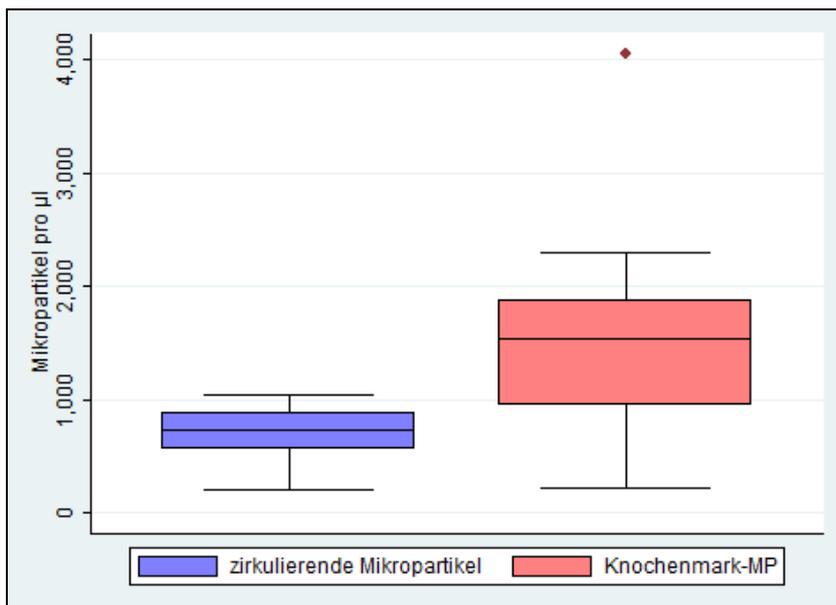


Abb. 18 CD62E-positive MP bei gesunden Knochenmarkspendern

### **3.2. Studiengruppe von Patienten mit hochdosierter Chemotherapie versus 12 Gy Ganzkörperbestrahlung (TBI)**

Als Probanden wurden Patienten während der Konditionierungsphase vor hämatopoetischer Stammzelltransplantation aufgenommen. Die Studienpatienten wurden in zwei Gruppen unterteilt. Die erste Gruppe wurde von Studienpatienten gebildet, die mit einer Hochdosischemotherapie nach dem FLAMSA-Protokoll plus 4 Gy TBI oder Buslufan konditioniert wurden (Studienpatient 1-6). In der zweiten Gruppe wurden Studienpatienten zusammengefasst, die mit 12Gy TBI und Cyclophosphamid plus Antithymozytenglobulin konditioniert wurden (Studienpatient 7-10).

Aufgrund der geringen Anzahl an Probanden und der großen interindividuellen Unterschiede bezüglich der Blutparameter und der Messwerte, erfolgte eine descriptive Auswertung der Ergebnisse.

Die Proben der beiden Studienkollektive wurden auf die Zahl der Thrombozyten und auf die Veränderungen der Anzahl thrombozytärer/megakaryozytärer und endothelialer MP zu den verschiedenen Entnahmezeitpunkten hin untersucht. Des Weiteren wurde das Verhältnis thrombozytärer/megakaryozytärer MP zur Zahl zirkulierender Thrombozyten im Verlauf betrachtet. Dazu wurde zu den verschiedenen Entnahmezeitpunkten die Anzahl CD61-, CD62P- und CD63-positiver MP pro zirkulierenden Thrombozyt errechnet. Die erhobenen Parameter wurden zum Vergleich der beiden Gruppen zusätzlich noch durch Ermittlung der relativen Veränderung der Messwerte bezogen auf Tag 0 (P0), vor Beginn der Konditionierungstherapie, zusammengefasst und ausgewertet.

#### **3.2.1. Studienkollektiv mit hochdosierter Chemotherapie**

##### **3.2.1.1. Charakteristika der Studiengruppe**

In die Studiengruppe der Patienten mit hochdosis Chemotherapie nach dem FLAMSA-Protokoll wurden im Zeitraum von März 2006 bis Juni 2007 sechs Patienten im Alter von 27 bis 68 Jahren aufgenommen (Median 51.5 (40.0-57.3) Jahre). Darunter befanden sich drei Frauen und drei Männer (Siehe Kapitel 2.2.2.1.).

### 3.2.1.2. Ergebnisse der Studienpatienten 1-6

#### 3.2.1.2.1. Studienpatient 1

**Studienpatient 1** wurde im März 2006 in die Studie aufgenommen. Zum Zeitpunkt der Probenentnahme P0 war die Zahl der Thrombozyten bei 196 G/l. Die Thrombozytenzahl nahm bis zur Probeentnahme P8 (73 G/l), dem Minimum der Messwerte, im Verlauf ab. (Abb. 19)

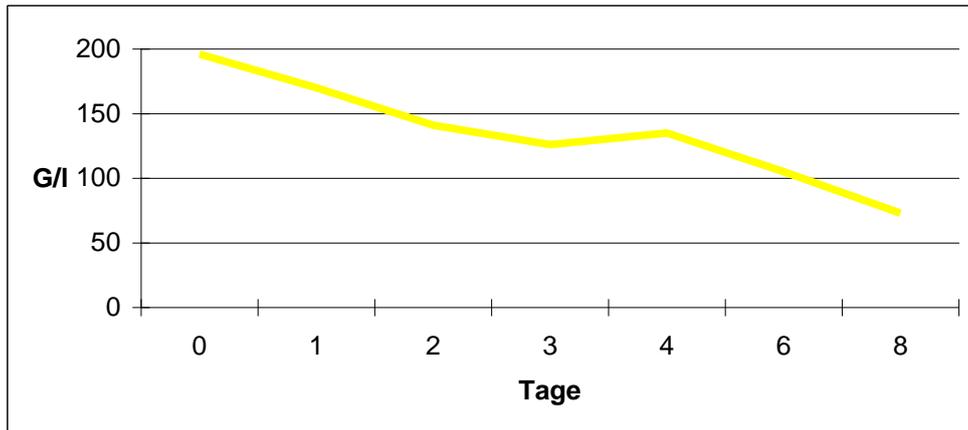


Abb. 19 Thrombozytenverlauf von Studienpatient 1

Die Messung der thrombo-/megakaryozytären MP zeigte bei **Studienpatient 1** in der Probe zum Entnahmezeitpunkt P0 das Maximum der Messwerte der CD61- (6741.01/ $\mu$ l), der CD62P- (1267.40/ $\mu$ l) und der CD63-positiven MP (1944.57/ $\mu$ l). Zu P3 erreichten sowohl die CD61- (995.93/ $\mu$ l), als auch die CD62P- (170.39/ $\mu$ l) und die CD63-positiven MP (396.12/ $\mu$ l) das Minimum der Messwerte. Die Anzahl der CD61-positiven MP stieg im weiteren Verlauf zu P8 auf 4844.18/ $\mu$ l, die der CD62P-positiven auf 811.44/ $\mu$ l und die der CD63-positiven auf 1289.61/ $\mu$ l. (Abb. 20)

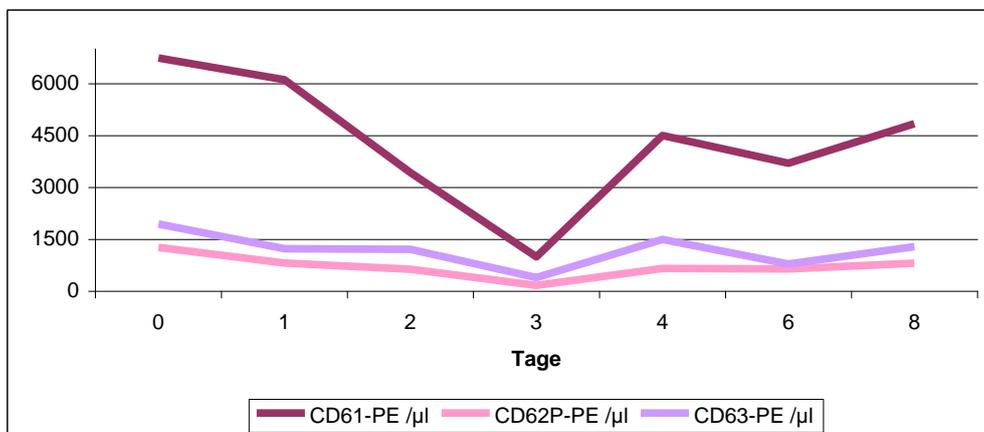
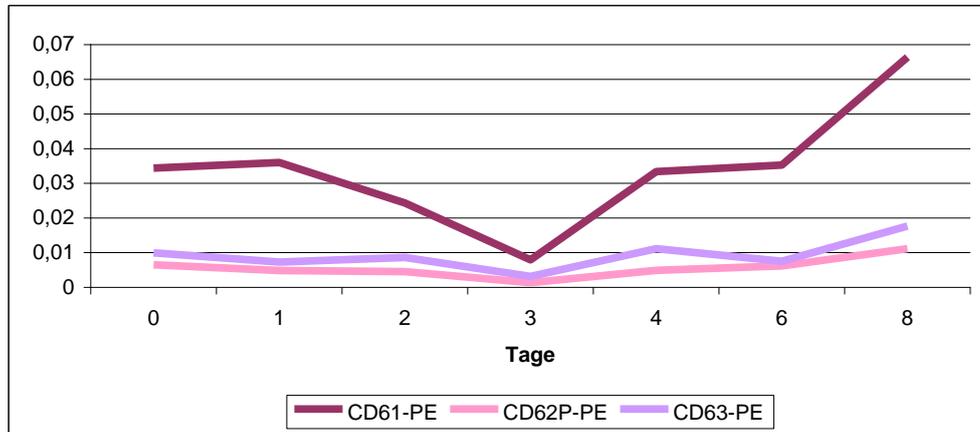


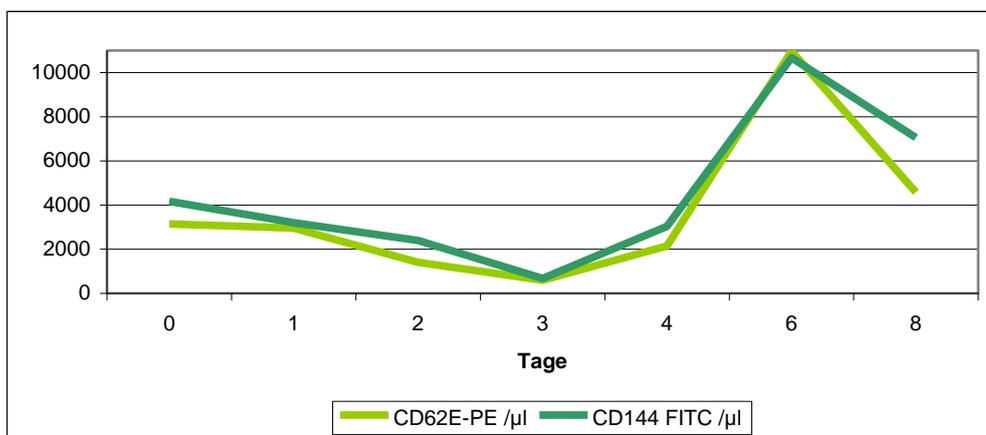
Abb. 20 Thrombo-/megakaryozytäre MP von Studienpatient 1

Die Anzahl CD61-, CD62P- und CD63-positiver MP in Abhängigkeit zur Anzahl zirkulierender Thrombozyten von **Studienpatient 1** erreicht jeweils zu P3 das Minimum und zu P8, etwa mit einer Verdoppelung des Ausgangswertes, das Maximum im Beobachtungszeitraum. (Abb. 21)



**Abb. 21** Thrombo-/megakaryozytäre MP pro Thrombozyt von Studienpatient 1

In der durchflusszytometrischen Messung der endothelialen MP konnten zu P0 bei **Studienpatient 1** 3144.34/ $\mu$ l CD62E- und 4169.33/ $\mu$ l CD144-positiv MP nachgewiesen werden. Sowohl die CD62E- (591.10/ $\mu$ l) als auch die CD144-positiven MP (674.54/ $\mu$ l) erreichten zu P3 das Minimum im Beobachtungszeitraum. Das Maximum der Messwerte zeigte sich sowohl bei den CD62E- (10969.14/ $\mu$ l) als auch bei den CD144-positiven MP (10676.17/ $\mu$ l) zu P6. Die Anzahl CD62E-positiver MP war zu P6 mehr als dreifach und die Anzahl CD144-positiver MP mehr als zweifach so hoch wie zu P0. (Abb. 22)



**Abb. 22** Endotheliale MP von Studienpatient 1

### 3.2.1.2.2. Studienpatient 2

**Studienpatient 2** wurde ebenfalls im März 2006 in die Studie aufgenommen. Die Probenentnahme P2 konnte bei diesem Studienpatienten nicht durchgeführt werden. Zum Zeitpunkt der Probenentnahme P0 war die Zahl der Thrombozyten bei 168 G/l, nahm im weiteren Verlauf ab und erreichte zur Probeentnahme P8 (44 G/l) das Minimum der Messwerte. (Abb. 23)

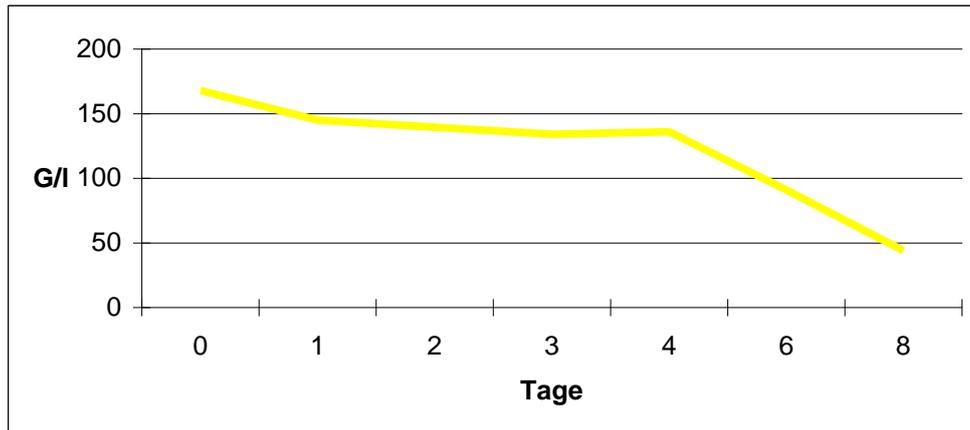


Abb. 23 Thrombozytenverlauf von Studienpatient 2

Bei der Messung der thrombo-/megakaryozytären MP wurden bei **Studienpatient 2** zum Entnahmezeitpunkt P0 15705.34/ $\mu$ l CD61-, 1745.14/ $\mu$ l CD63- und 1413.68/ $\mu$ l CD62P-positive MP bestimmt. Die Anzahl CD61-positiver MP erreichte zu P1 (17954.91/ $\mu$ l) das Maximum und zu P8 (5359.49/ $\mu$ l) das Minimum der Messwerte. Die CD63- (1771.40/ $\mu$ l) und die CD62P-positiven MP (1675.41/ $\mu$ l) hatten zu P3 jeweils das Maximum der Messwerte. Das Minimum der Messwerte wurde bei den CD62P-positiven MP zu P1 (773.40/ $\mu$ l) und bei den CD63-positiven MP zu P8 (1011.58/ $\mu$ l) gemessen. (Abb. 24)

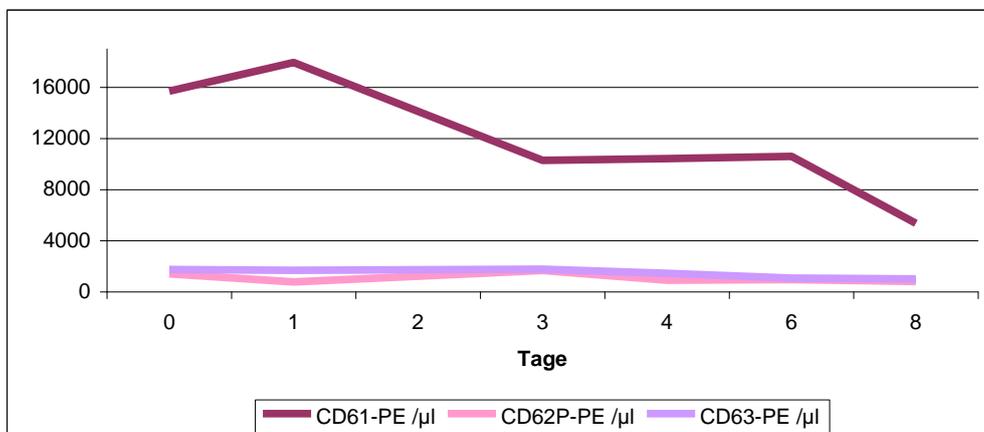


Abb. 24 Thrombo-/megakaryozytäre MP von Studienpatient 2

Die Anzahl CD61-, CD62P- und CD63-positiver MP in Abhängigkeit zur Anzahl zirkulierender Thrombozyten von **Studienpatient 2** ist in Abbildung 25 dargestellt. Dabei findet sich zu P1 ein Maximum und an zu P4 ein Minimum der Anzahl CD61-positiver MP pro Thrombozyt. Die Anzahl der CD62P- und der CD63-positiven MP pro Thrombozyt erreicht jeweils zu P1 das Minimum und zu P8, jeweils mit mehr als dem doppelten Ausgangswert, das Maximum der Messwerte im Beobachtungszeitraum.

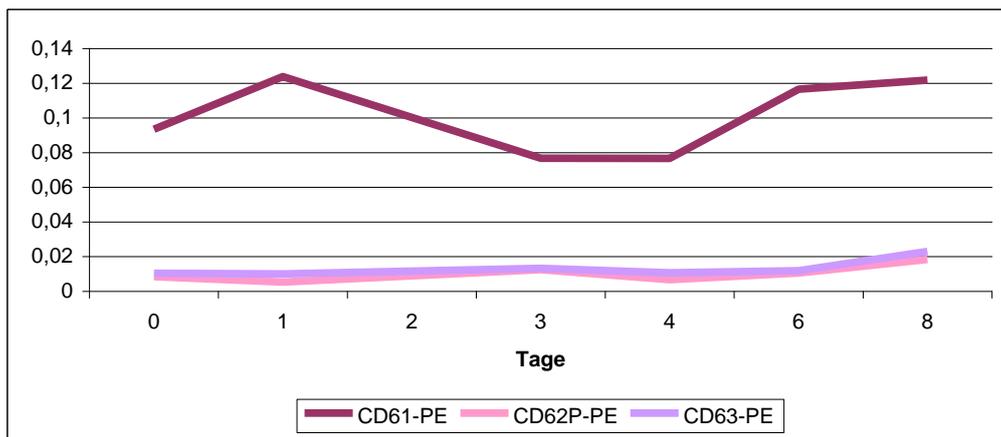


Abb. 25 Thrombo-/megakaryozytäre MP pro Thrombozyt von Studienpatient 2

In der durchflusszytometrischen Messung der endothelialen MP bei **Studienpatient 2** zeigte sich das Maximum der Messwerte der CD144-positiven MP bereits zu P0 (7017.68/ $\mu$ l) und das der CD62E-positiven MP, nach initial 5051.57/ $\mu$ l, zu P1 (5773.36/ $\mu$ l). Sowohl die CD62E- (2259.53/ $\mu$ l) als auch die CD144- positiven MP (3437.75/ $\mu$ l) erreichten zu P8 das Minimum im Beobachtungszeitraum. (Abb. 26)

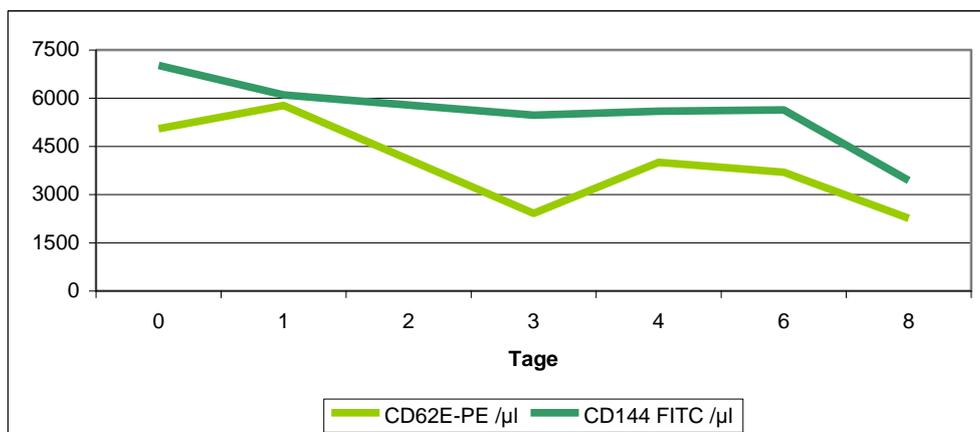


Abb. 26 Endotheliale MP von Studienpatient 2

### 3.2.1.2.3. Studienpatient 3

**Studienpatient 3** wurde im Februar 2007 in die Studie aufgenommen. Zum Zeitpunkt der Probenentnahme P0 betrug die Zahl der Thrombozyten 56 G/l. Die Anzahl der Thrombozyten zeigte zu P1 (68 G/l) das Maximum der Messwerte, nahm im weiteren Verlauf ab und erreichte zu P8 (14 G/l) das Minimum der Messwerte. (Abb. 27)

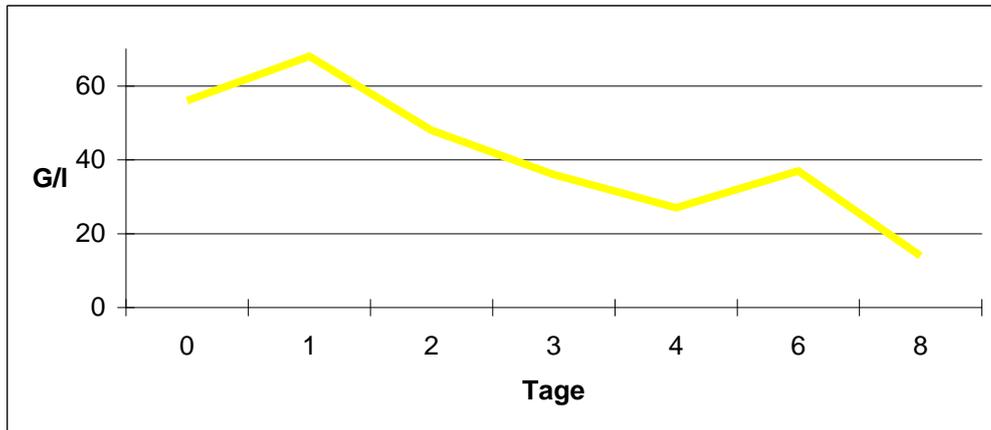


Abb. 27 Thrombozytenverlauf von Studienpatient 3

In der Messung der thrombo-/megakaryozytären MP zeigte sich bei **Studienpatient 3** zu P0 sowohl bei den CD61- (7979.40/ $\mu$ l) als auch bei den CD63-positiven MP (2094.71/ $\mu$ l) das Maximum der Messwerte. Bei den CD62P-positiven MP wurde das Maximum der Messwerte hingegen zu P1 (660.97/ $\mu$ l) erreicht. Zu P8 erreichten die CD61- (278.76/ $\mu$ l), die CD62P- (45.80/ $\mu$ l) und die CD63-positiven MP (110.56/ $\mu$ l) das Minimum der Messwerte. (Abb. 28)

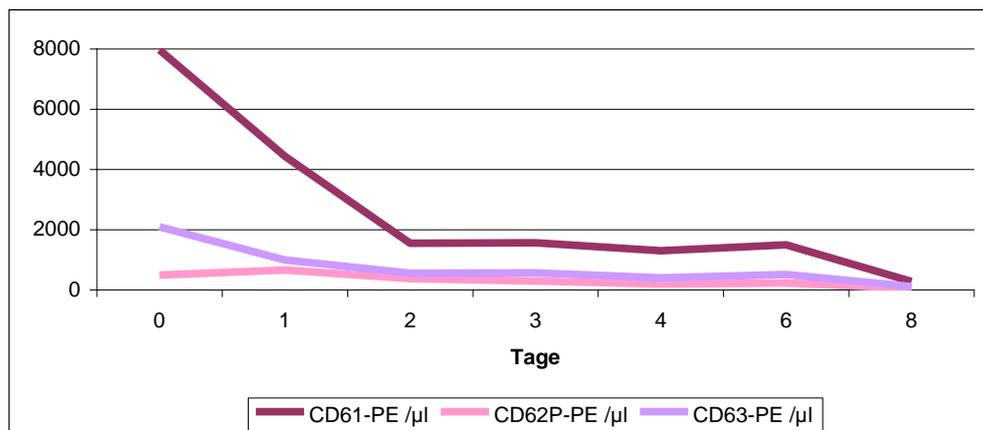
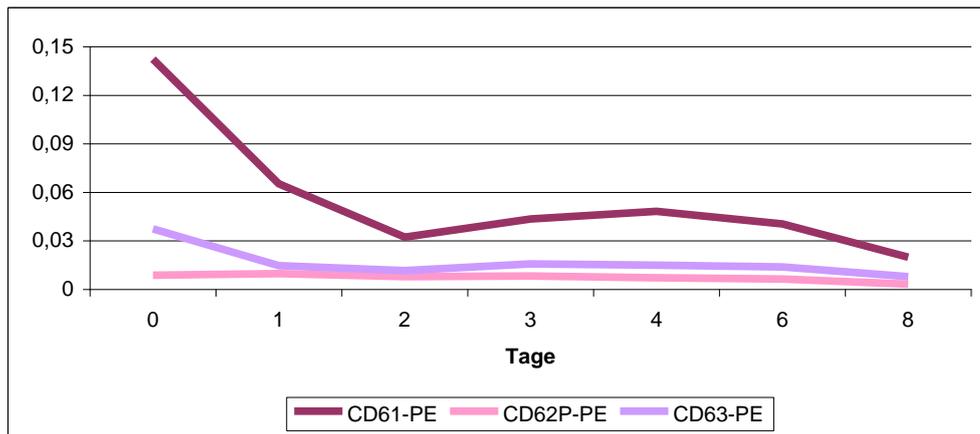


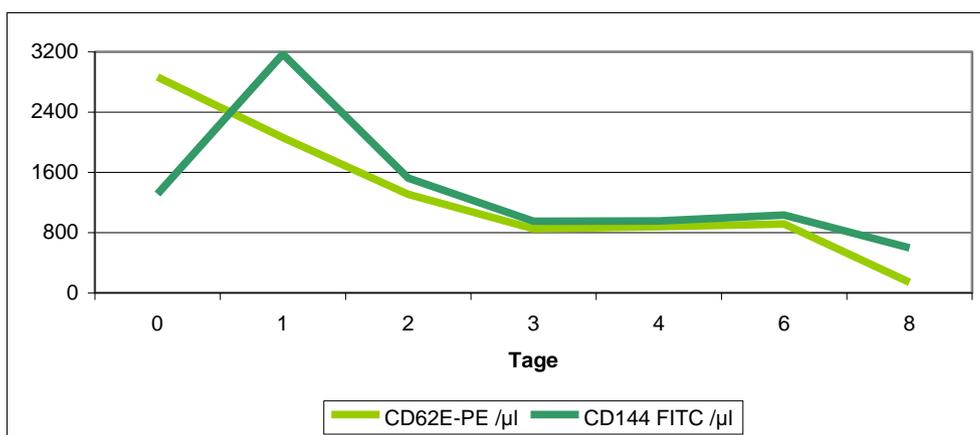
Abb. 28 Thrombo-/megakaryozytäre MP von Studienpatient 3

Die Anzahl thrombozytärer/megakaryozytärer MP in Abhängigkeit zur Anzahl zirkulierender Thrombozyten bei **Studienpatient 3** ist in Abbildung 29 dargestellt. Es zeigt sich zu P0 ein Maximum sowohl der CD61- als auch der CD63-positiven MP pro Thrombozyt. Die Anzahl CD62P-positiven MP pro Thrombozyt hat das Maximum der Messwerte erst zu P1 und das Minimum, ebenso wie die CD61- und CD63- positiven MP pro Thrombozyt, zu P8.



**Abb. 29** Thrombo-/megakaryozytäre MP pro Thrombozyt von Studienpatient 3

In der durchflusszytometrischen Messung der endothelialen MP bei **Studienpatient 3** zeigte die Anzahl CD62E-positiver MP zu P0 (2865.40/ $\mu$ l), die der CD144-positiven MP erst zu P1 (31370.62/ $\mu$ l) das Maximum der Messwerte. Sowohl die CD62E- (140.57/ $\mu$ l) als auch die CD144-positiven (596.22/ $\mu$ l) MP erreichten zu P8 das Minimum der Messwerte. (Abb. 30)



**Abb. 30:** Endotheliale MP von Studienpatient 3

### 3.2.1.2.4. Studienpatient 4

**Studienpatient 4** wurde im Mai 2007 in die Studie aufgenommen. Zum Zeitpunkt der Probenentnahme P0 zeigte die Zahl der Thrombozyten (84 G/l) das Maximum der Messwerte. Die Anzahl der Thrombozyten nahm im Verlauf ab und erreichte zu P6 (16 G/l) das Minimum der Messwerte. (Abb. 31)

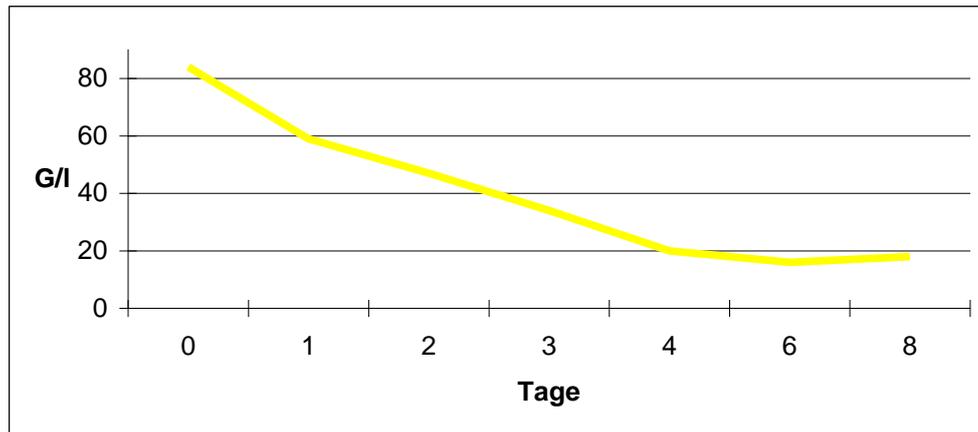


Abb. 31 Thrombozytenverlauf von Studienpatient 4

In der Messung der thrombo-/megakaryozytären MP bei **Studienpatient 4** zeigte sich zu P0 sowohl für die CD61- (6479.94/ $\mu$ l), als auch für die CD62P- (994.28/ $\mu$ l) und CD63- positiven MP (1355.69/ $\mu$ l) das Maximum der Messwerte im Beobachtungszeitraum. Die CD61-positiven MP hatten zu P4 (823.49/ $\mu$ l), die CD62P- (89.69/ $\mu$ l) und CD63- positiven MP (233.02/ $\mu$ l) jeweils zu P8 das Minimum der Messwerte. (Abb. 32)

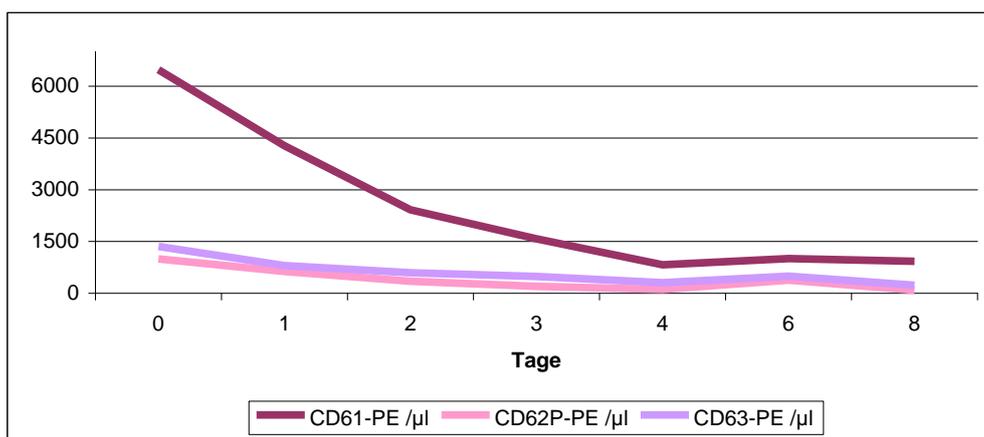


Abb. 32 Thrombo-/megakaryozytäre MP von Studienpatient 4

Die Anzahl CD61-, CD62P- und CD63-positiver MP in Abhängigkeit zur Anzahl zirkulierender Thrombozyten von **Studienpatient 4** ist in Abbildung 33 darge-

stellt. Dabei findet sich zu P1 ein Maximum und zu P4 ein Minimum der Anzahl CD61-positiver MP pro Thrombozyt. Die Anzahl der CD62P- und der CD63-positiven MP pro Thrombozyt erreicht zu P7 jeweils das Maximum und zu P8 jeweils das Minimum der Werte im Beobachtungszeitraum.

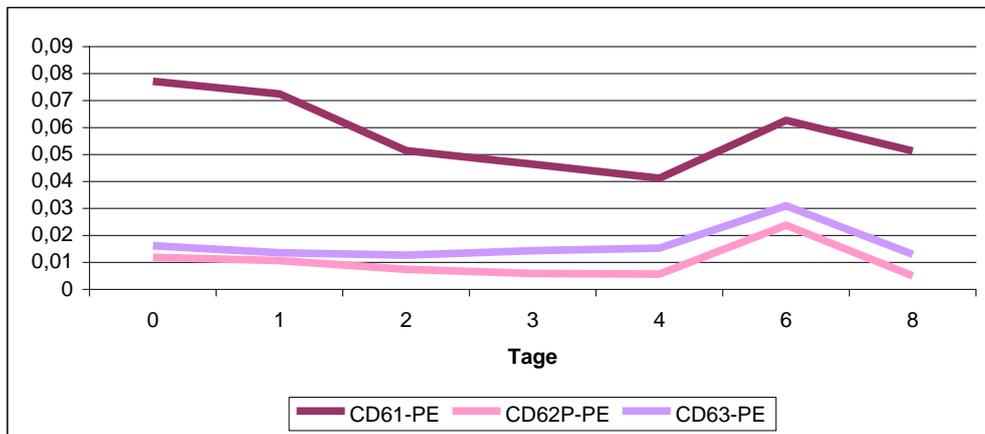


Abb. 33 Thrombo-/megakaryozytäre MP pro Thrombozyt von Studienpatient 4

In der durchflusszytometrischen Messung der endothelialen MP bei **Studienpatient 4** zeigte sich zu P0 sowohl für die CD62E- (2756.76/ $\mu$ l) als auch für die CD144-positiven MP (3583.07/ $\mu$ l) das Maximum der Messwerte. Das Minimum der Messwerte erreichten die CD62E-positiven MP zu P8 (876.76/ $\mu$ l) und die CD144-positiven MP zu P4 (970.11/ $\mu$ l). (Abb. 34)

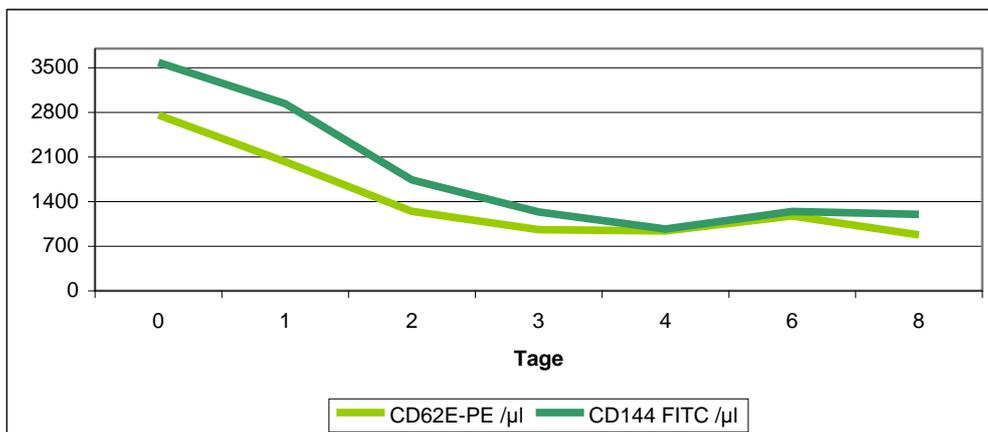


Abb. 34 Endotheliale MP von Studienpatient 4

### 3.2.1.2.5. Studienpatient 5

**Studienpatient 5** wurde im Juni 2007 in die Studie aufgenommen. Die Probe P8 konnte bei diesem Studienpatienten nicht gewonnen werden. Zum Zeitpunkt der Probenentnahme P0 zeigte die Zahl der Thrombozyten mit 143 G/l das

Maximum der Messwerte. Die Anzahl der Thrombozyten nahm im weiteren Verlauf kontinuierlich ab und erreichte zu P6 (70 G/l) das Minimum der Messwerte. (Abb. 35)

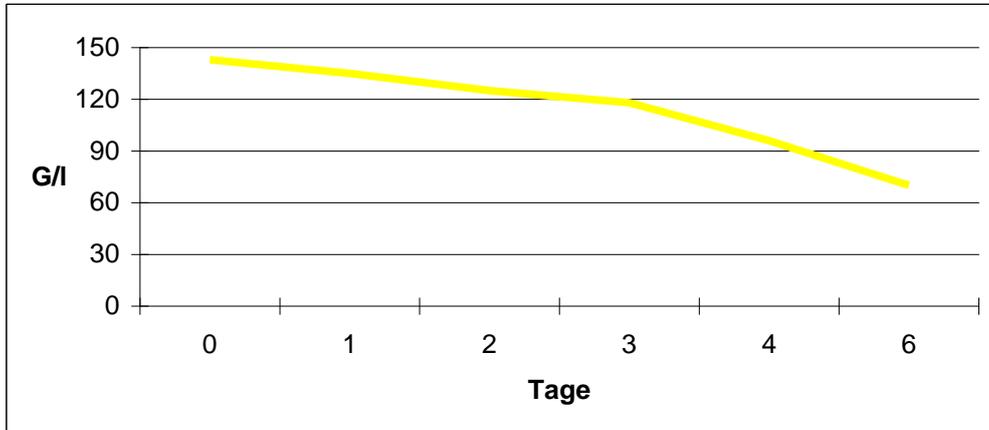


Abb. 35 Thrombozytenverlauf von Studienpatient 5

In der Messung der thrombo-/megakaryozytären MP bei **Studienpatient 5** wurden zum Messzeitpunkt P0 6304.97/ $\mu$ l CD61-positive MP bestimmt. Die Anzahl CD61-positiver MP erreichte zu P1 (5864.08/ $\mu$ l) das Minimum und zu P4 (13199.54/ $\mu$ l) das Maximum der Messwerte. Zu P2 zeigten sowohl die CD63- (1269.04/ $\mu$ l) als auch die CD62P-positiven MP (1771.96/ $\mu$ l) das Maximum der Messwerte. Das Minimum wurde sowohl bei den CD63- (381.23/ $\mu$ l) als auch bei den CD62P-positiven MP (866.28/ $\mu$ l) zu P6 erreicht. (Abb. 36)

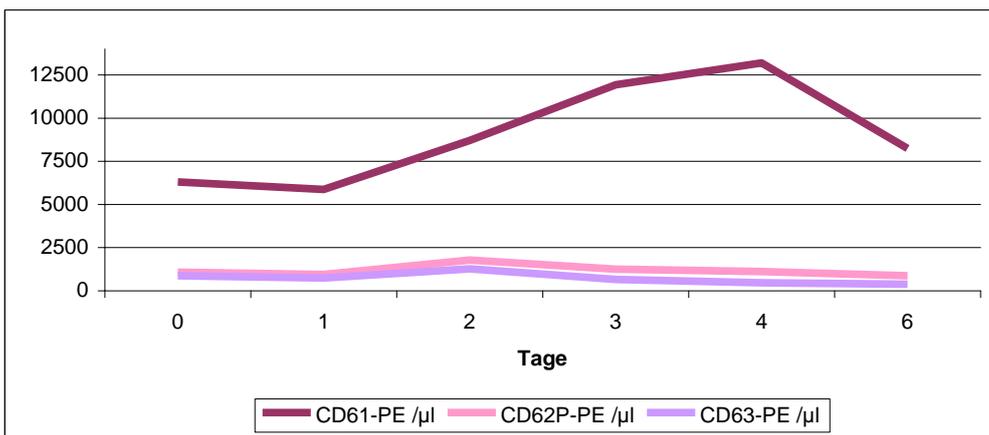


Abb. 36 Thrombo-/megakaryozytäre MP von Studienpatient 5

Die Anzahl CD61-, CD62P- und CD63-positiver MP in Abhängigkeit zur Anzahl zirkulierender Thrombozyten von **Studienpatient 5** ist in Abbildung 37 dargestellt. Dabei findet sich für die Anzahl CD61-positiver MP pro Thrombozyt zu P1

ein Minimum und zu P4 ein Maximum im Beobachtungszeitraum, wobei es zu einer Steigerung um mehr als das dreifache des Ausgangswertes kommt. Das Minimum der CD62P-positiven MP pro Thrombozyt liegt zu P1 und das der CD63-positiven MP pro Thrombozyt zu P4, wohingegen das Maximum im Beobachtungszeitraum jeweils zu P2 erreicht wurde.

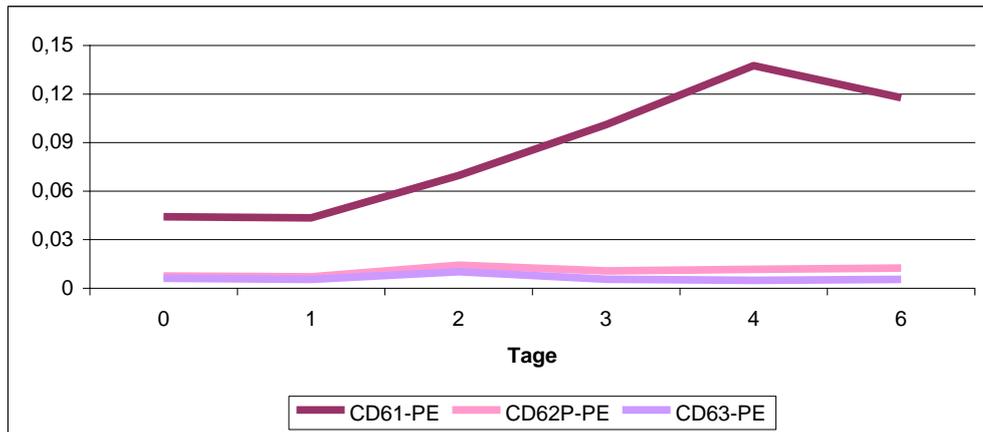


Abb. 37 Thrombo-/megakaryozytäre MP pro Thrombozyt von Studienpatient 5

**Studienpatient 5** hatte in der durchflusszytometrischen Messung der endothelialen MP zum Entnahmezeitpunkt P0 2755.18/ $\mu$ l CD62E- und 3174.28/ $\mu$ l CD144-positiv MP. Sowohl die CD62E- (2413.19/ $\mu$ l) als auch die CD144-positiven MP (2972.27/ $\mu$ l) erreichten zu P1 das Minimum im Beobachtungszeitraum. Das Maximum zeigte sich bei den CD62E- (3387.46/ $\mu$ l) zu P3 und bei den CD144-positiven MP (5054.37/ $\mu$ l) zu P2. (Abb. 38)

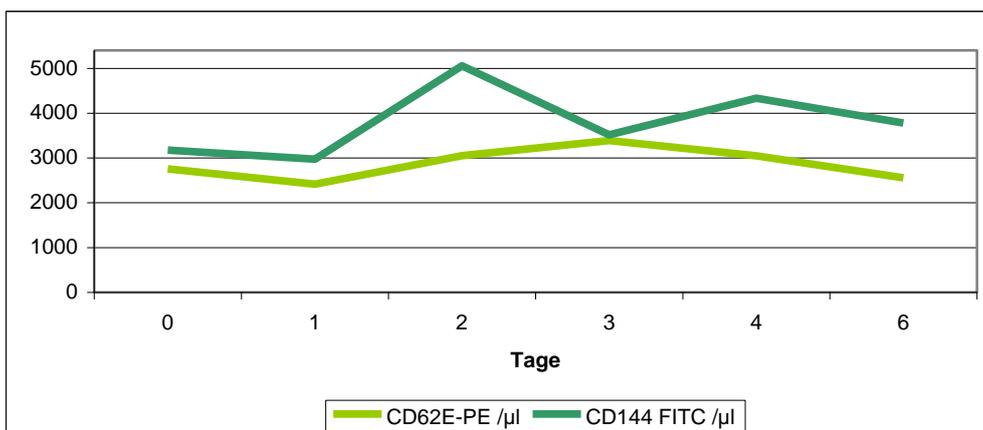


Abb. 38 Endotheliale MP von Studienpatient 5

### 3.2.1.2.6. Studienpatient 6

**Studienpatient 6** wurde im Juni 2007 in die Studie aufgenommen. Zum Zeitpunkt der Probenentnahme P0 zeigte sich für die Zahl der Thrombozyten mit 81 G/l das Maximum der Messwerte. Die Anzahl der Thrombozyten erreichte zu P6 (24 G/l) das Minimum der Messwerte. (Abb. 39)

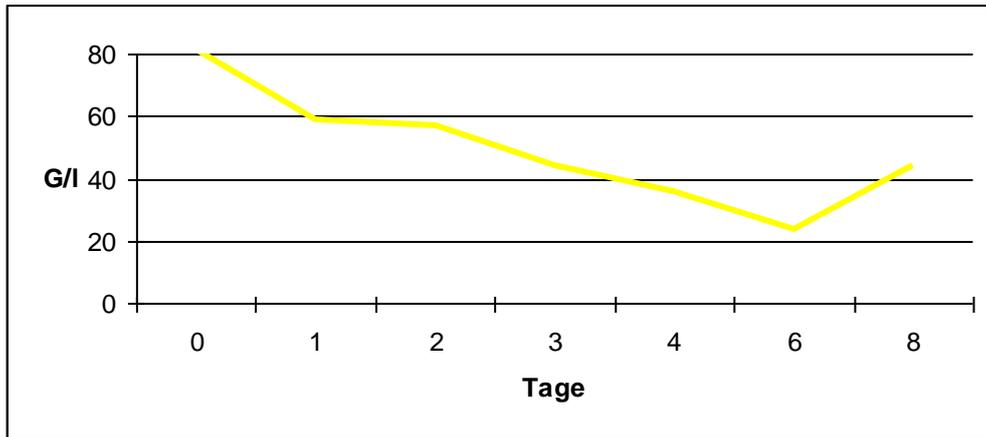


Abb. 39 Thrombozytenverlauf von Studienpatient 6

In der Messung der thrombo-/megakaryozytären MP bei **Studienpatient 6** zeigte die Anzahl CD61-positive MP zu P0 (6315.78/ $\mu$ l) das Maximum und zu P3 (2749.98/ $\mu$ l) das Minimum der Messwerte und stieg im Verlauf bis zu P8 (4916.77/ $\mu$ l) wieder an. Die Anzahl CD63-positiver MP zeigte nach initial 977,46 / $\mu$ l zu P0 das Minimum der Messwerte zu P3 (341.66/ $\mu$ l) und das Maximum zu P8 (1009.18/ $\mu$ l). Bei den CD62P-positiven MP erreichten die Messwerte, nach initial 526.45/ $\mu$ l zu P0, zu P4 (136.14/ $\mu$ l) das Minimum und ebenfalls zu P8 (642.92/ $\mu$ l) das Maximum. (Abb. 40)

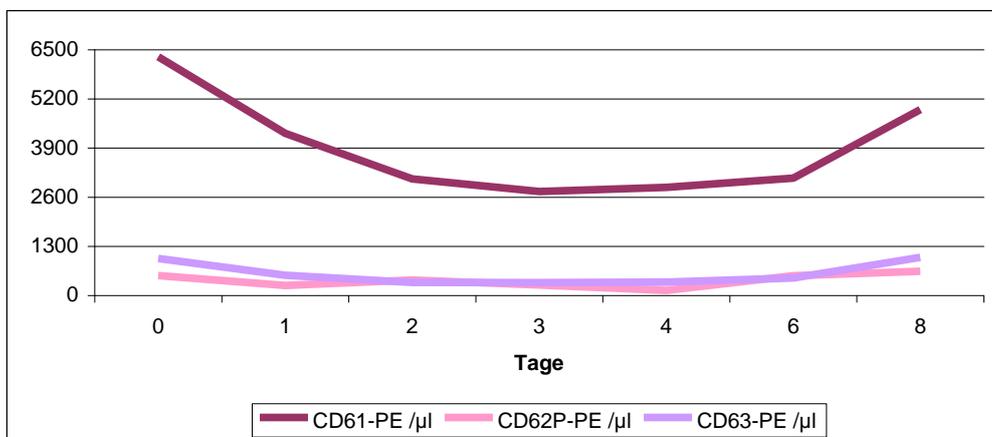


Abb. 40 Thrombo-/megakaryozytäre MP von Studienpatient 6

Die Anzahl thrombozytärer/megakaryozytärer MP in Abhängigkeit zur Anzahl zirkulierender Thrombozyten von **Studienpatient 6** ist in Abbildung 41 dargestellt. Zu P6 erreicht sowohl die Zahl der CD61- als auch der CD62P-positiven MP pro Thrombozyt das Maximum im Beobachtungszeitraum. Das Minimum zeigt sich bei den CD61- zu P2 und bei den CD62P-positiven MP pro Thrombozyt zu P6. Die Anzahl CD63-positiver MP steigt nach einem Minimum zu P2 kontinuierlich bis zum Maximum der Messwerte zu P8 an.

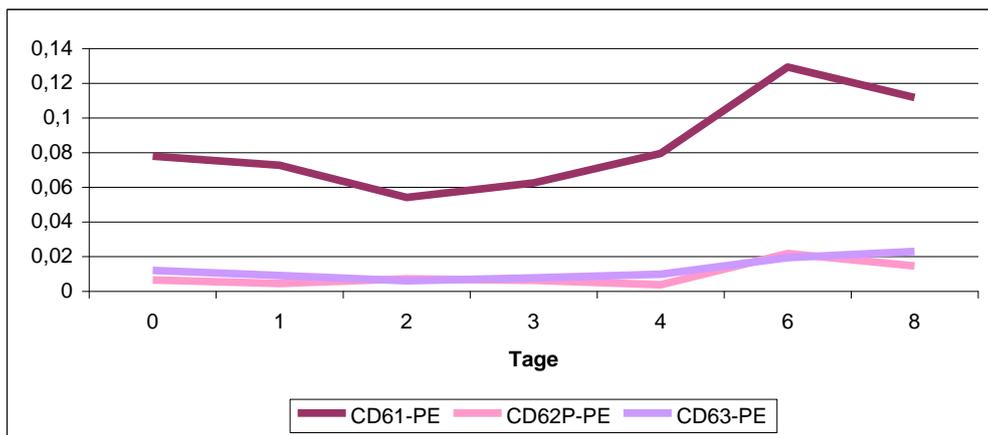


Abb. 41 Thromb-/megakaryozytären MP pro Thrombozyt von Studienpatient 6

**Studienpatient 6** zeigte in der durchflusszytometrischen Messung der endothelialen MP zu P0 für die CD62E- (3141.31/ $\mu$ l) und die CD144-positiven MP (3566.62/ $\mu$ l) jeweils das Maximum und zu P3 das Minimum der Messwerte (CD62E 1341.18/ $\mu$ l, CD144 1890.12/ $\mu$ l). Bis P8 stieg die Zahl der CD62E- (2497.91/ $\mu$ l) und der CD144-positiven MP (2954.63/ $\mu$ l) wieder an. (Abb. 42)

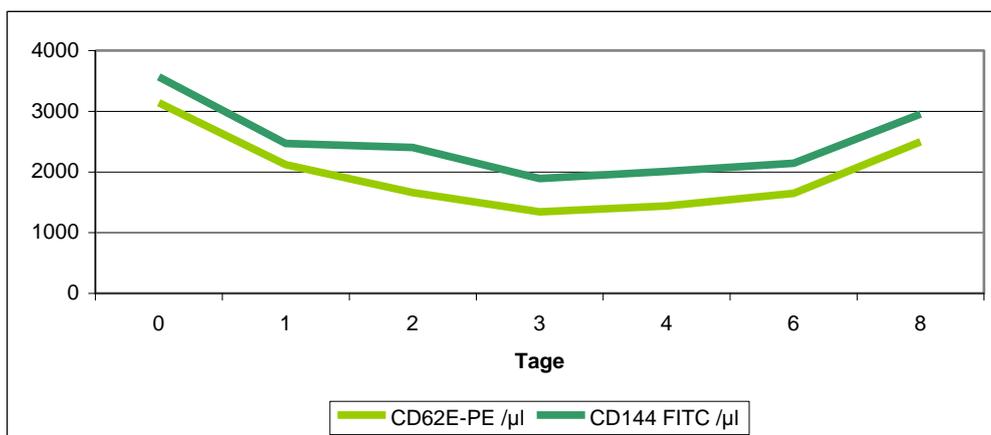


Abb. 42 Endotheliale MP von Studienpatient 6

### 3.2.1.2.7. Zusammenfassung der Ergebnisse der Studienpatienten 1-6

Um den Einfluss einer Konditionierung mit einer hochdosis Chemotherapie nach FLAMSA-Protokoll mit dem einer 12Gy TBI vergleichen zu können, wurden für die einzelnen Patienten die relativen Veränderungen der Messwerte bezogen auf den Wert zu P0 errechnet. Hierfür wurden die Messwerte zu den einzelnen Entnahmezeitpunkten durch die Werte aus der Probe P0 geteilt. Demnach errechnet sich bei allen Studienpatienten zum Zeitpunkt P0 der Werte 1 und im Verlauf einen Wert kleiner als 1, wenn es zu einem Abfall, oder einen Werte größer als eins, wenn es zu einem Anstieg der Messwerte im Vergleich zum Messzeitpunkt P0 kommt. Für die verschiedenen Zeitpunkte der Probengewinnung (P0-P8) wurden anschließend der Median, der Interquartilsabstand und das Minimum und Maximum der relativen Veränderung der Messwerte der Studienpatienten 1-6 zu den Entnahmezeitpunkten bestimmt. Die Darstellung erfolgt als Boxplot.

Dabei zeigte sich, dass es im Verlauf der Konditionierung zu einem starken Absinken der Thrombozytenzahl kommt. Eine Erklärung hierfür liegt in der durchschnittlichen Überlebenszeit der verschiedenen Blutbestandteile. Die normale Lebensdauer der zirkulierenden Thrombozyten beträgt etwa 9-10 Tagen. Demnach macht sich eine Schädigung der blutbildenden Stammzellen des Knochenmarks durch eine hochdosis Chemotherapie nach dem FLAMSA-Protokoll bereits zu einem frühen Zeitpunkt in einer Abnahme der Thrombozytenzahl im Blutbild bemerkbar. (Abb. 43)

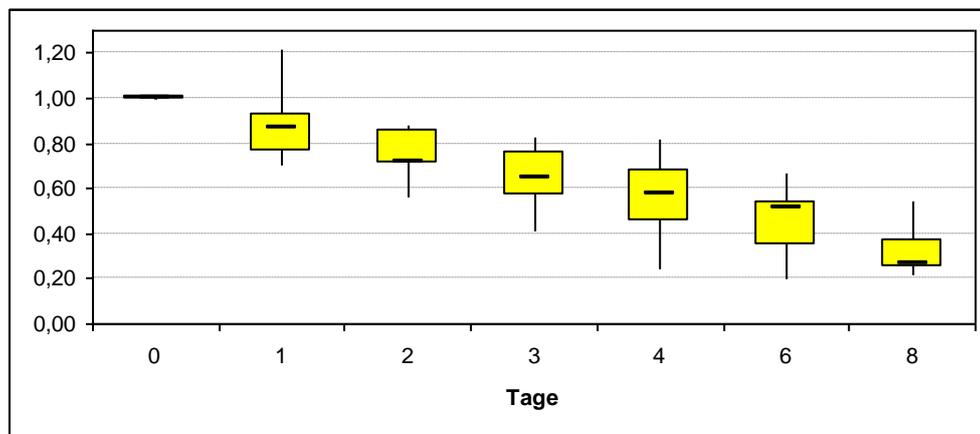


Abb. 43 Relative Veränderung der Thrombozytenzahl der Studienpatienten 1-6

Die Analyse der relativen Veränderung der thrombo-/megakaryozytären MP der Studienpatienten 1-6 zu den verschiedenen Entnahmezeitpunkten zeigt, dass es im Verlauf zu einem Absinken der Zahl aller thrombozytärer MP kommt. Das Minimum der relativen Veränderung der thrombo-/megakaryozytären MP bezogen zu P0 liegt bei den CD61-positiven MP zu P8, bei den CD63-positiven MP zu P8, bei den CD62P-positiven MP zu P3 und bei den CD62P-positiven MP zu P4. Demnach scheint es durch eine hochdosis Chemotherapie nach dem FLAMSA-Protokoll zu keiner Zunahme der thrombo-/megakaryozytären MP, weder in der Gesamtzahl noch in der Zahl der MP mit Antigenen, die eine Aktivierung anzeigen, zu kommen. Da es durch die Konditionierung aber zu einem Absinken der Anzahl von Megakaryozyten und damit auch der zirkulierenden Thrombozyten kommt, ist ein Anstieg der absoluten Zahl thrombo/megakaryozytären MP ohne weitere Aktivierung auch nicht zu erwarten. (Abb. 44-46)

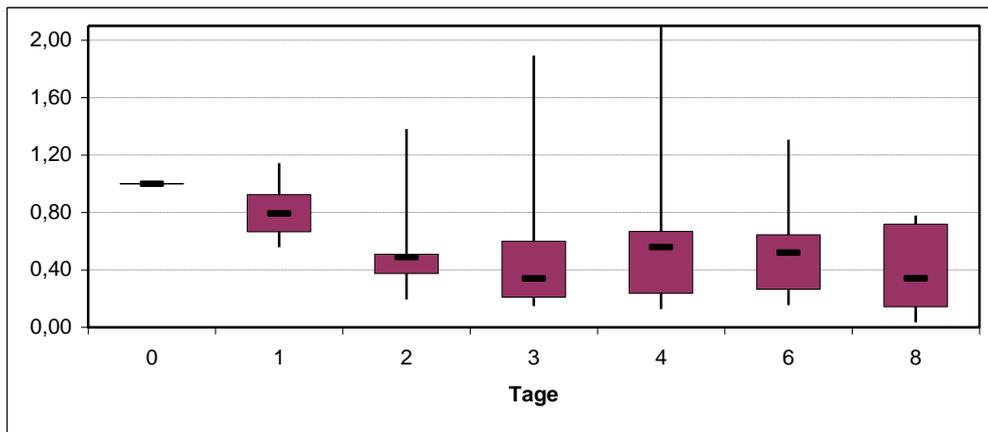


Abb. 44 Relative Veränderung der CD61-positiven MP der Studienpatienten 1-6

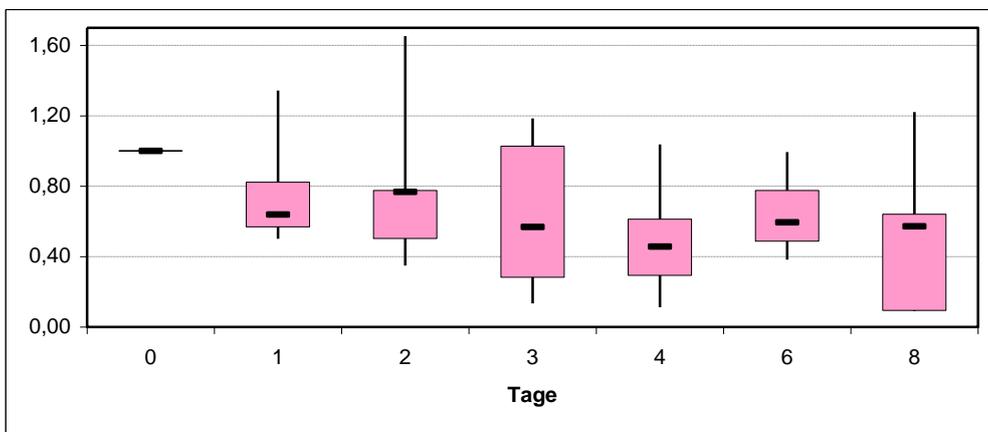


Abb. 45 Relative Veränderung der CD62P-positiven MP der Studienpatienten 1-6

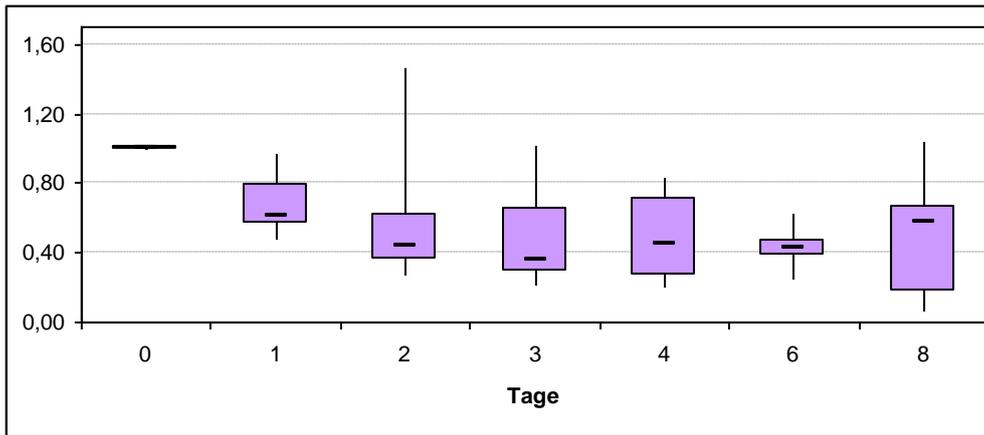


Abb. 46 Relative Veränderung der CD63-positiven MP der Studienpatienten 1-6

Die relative Veränderung der Anzahl zirkulierender thrombo-/ megakaryozytärer MP pro Thrombozyt bezogen auf P0 hingegen zeigt einen Anstieg über das Ausgangsniveau vor allem zu den letzten Entnahmezeitpunkten. Im Median steigen sowohl die CD61- als auch die CD62P- und CD63-positiven MP zu P8 zu einem Höchstwert an. Demnach kommt es zum Ende des Beobachtungszeitraums zu einem leichten Anstieg der Zahl zirkulierender MP aus aktivierten Thrombozyten pro Thrombozyt. (Abb. 47-49)

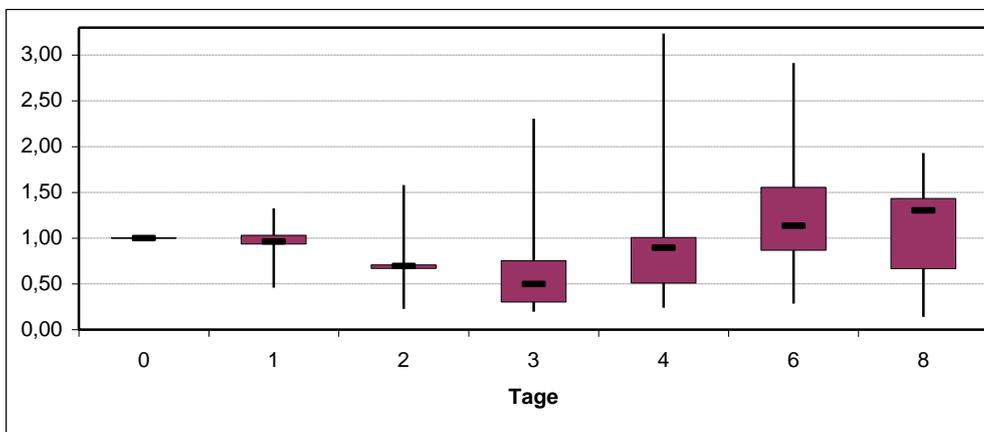


Abb. 47 Rel. Veränderung der CD61-pos. MP pro Thrombozyt der Studienpatienten 1-6

Diese Beobachtung steht im Einklang mit der absoluten Zahl thrombo/megakaryozytärer MP pro Thrombozyt der einzelnen Studienpatienten. Auch hier zeigt sich im Median zu P6 ein Maximum der CD61- und CD62P-positiven MP pro Thrombozyt und zu P8 ein Maximum der CD63-positiven MP pro Thrombozyt. (Abb. 50-52)

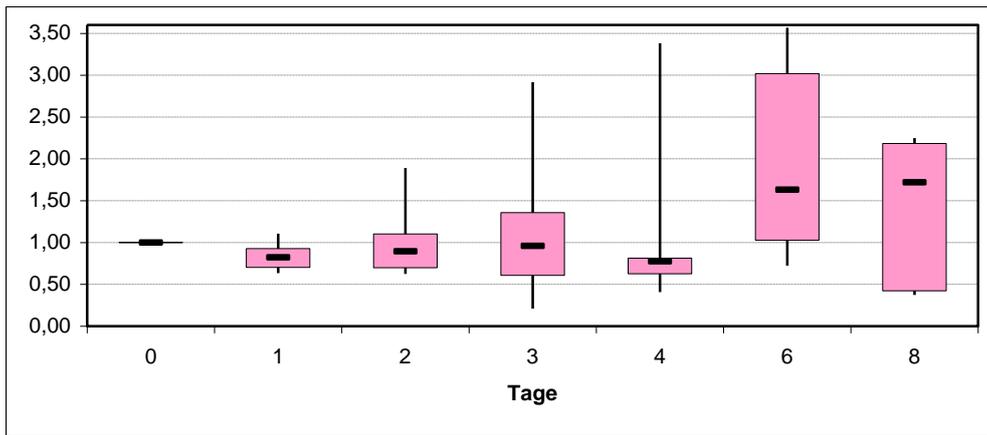


Abb. 48 Rel. Veränderung der CD62P-pos. MP pro Thrombozyt der Studienpatienten 1-6

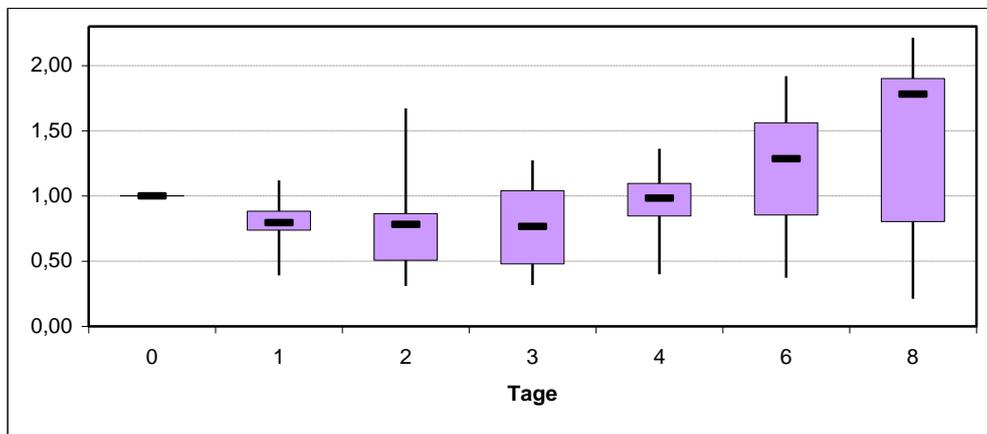


Abb. 49 Rel. Veränderung der CD63-pos. MP pro Thrombozyt der Studienpatienten 1-6

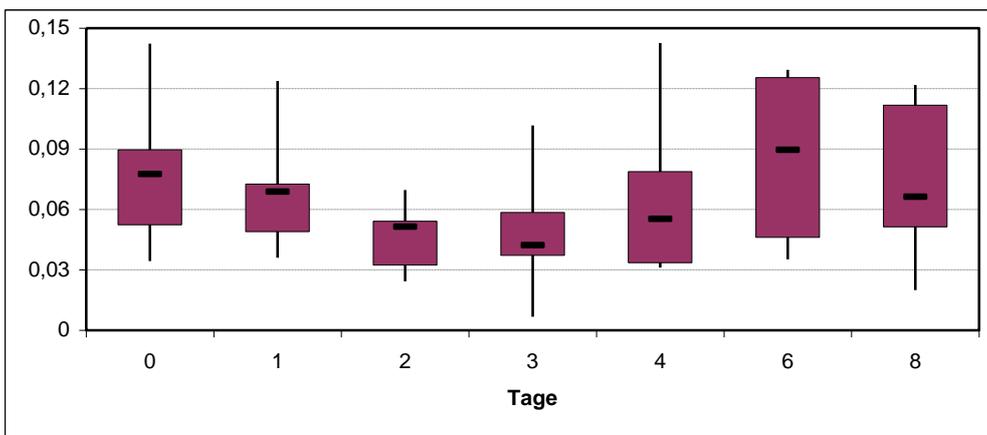


Abb. 50 Anzahl der CD61-positiven MP pro Thrombozyt der Studienpatient 1-6

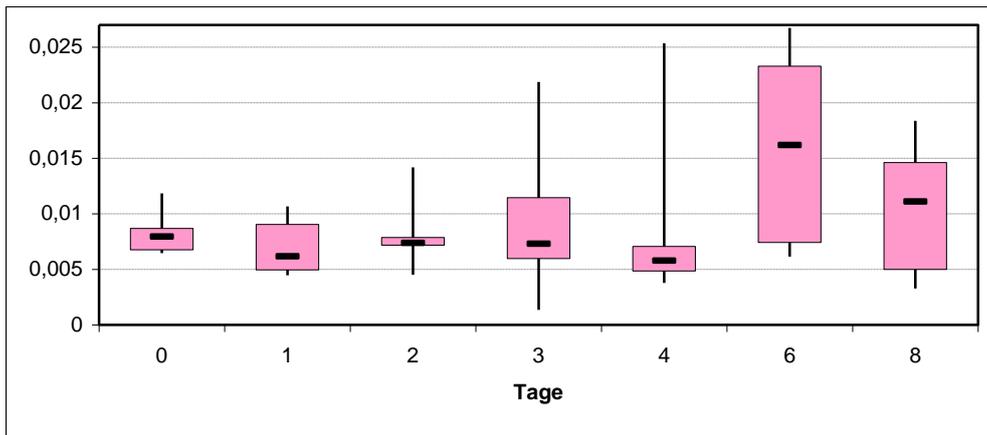


Abb. 51 Anzahl der CD62P-positiven MP pro Thrombozyt der Studienpatient 1-6

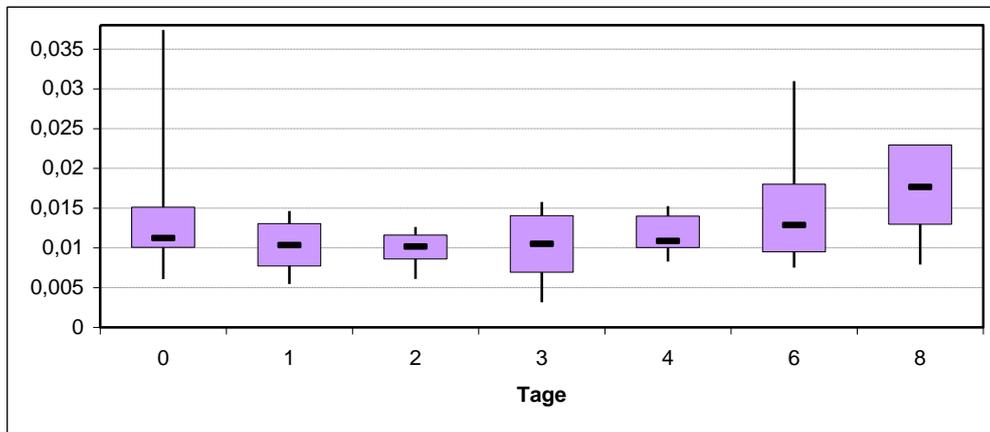


Abb. 52 Anzahl der CD63-positiven MP pro Thrombozyt der Studienpatient 1-6

Bei der Betrachtung der relativen Veränderung der endothelialen MP bezogen auf P0 der Studienpatienten 1-6 zeigt sich, dass sowohl die CD62E- als auch die CD144-positiven MP bis zu P3 abfallen und im Anschluß bis zu P6 erneut ansteigen. Den niedrigsten Median erreichen die CD144-positiven MP zu P8 und die CD62E-positiven MP zu P3. Insgesamt scheint es durch die hochdosis Chemotherapie nach dem FLAMSA-Protokoll zu keiner massiven Zunahme der endothelialen MP im Beobachtungszeitraum zu kommen. Nur Studienpatient 1 zeigt zu P6 einen Anstieg um mehr als doppelte des Ausgangsniveaus zu P0. (Abb. 53-54)

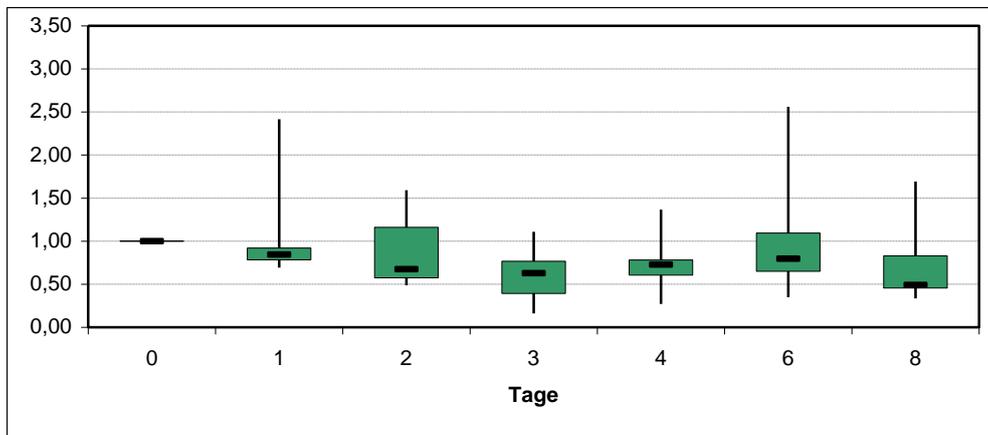


Abb. 53 Relative Veränderung der CD144-positiven MP der Studienpatienten 1-6

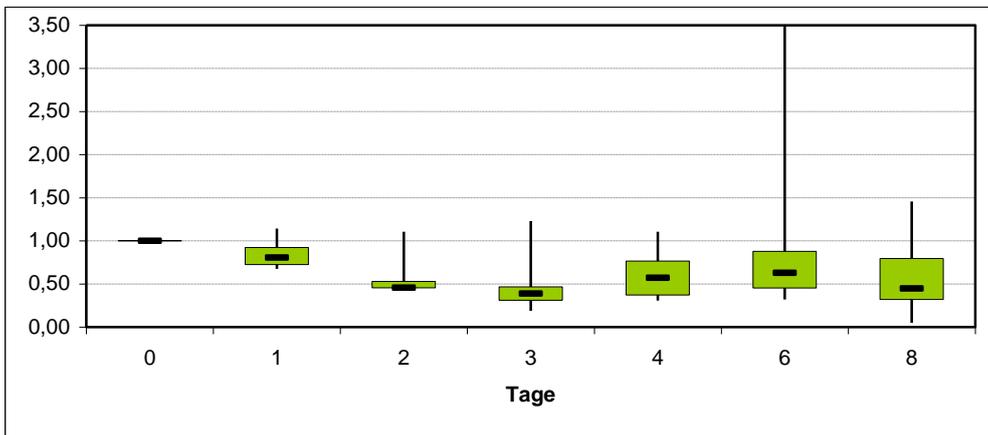


Abb. 54 Relative Veränderung der CD62E-positiven MP der Studienpatienten 1-6

### 3.2.2. Studienkollektiv mit 12Gy-TBI

#### 3.2.2.1. Charakteristika der Studiengruppe

In die Studiengruppe der Patienten mit 12Gy TBI wurden im Zeitraum von März 2006 bis Juni 2007 vier Patienten im Alter von 20 bis 47 Jahren aufgenommen (Median 41.0 (37.0-45.5) Jahre). Darunter befanden sich drei Männer und eine Frau (Siehe Kapitel 2.2.2.2.).

#### 3.2.2.2. Ergebnisse der Studienpatienten 7-10

##### 3.2.2.2.1. Studienpatient 7

**Studienpatient 7** wurde im April 2006 in die Studie aufgenommen. Zum Zeitpunkt der Probenentnahme P0 betrug die Zahl der Thrombozyten 119 G/l. Die Anzahl der Thrombozyten erreichte zu P2 (130 G/l) das Maximum und, im weiteren Verlauf abnehmend, zu P5 (38 G/l) das Minimum der Messwerte. (Abb. 55)

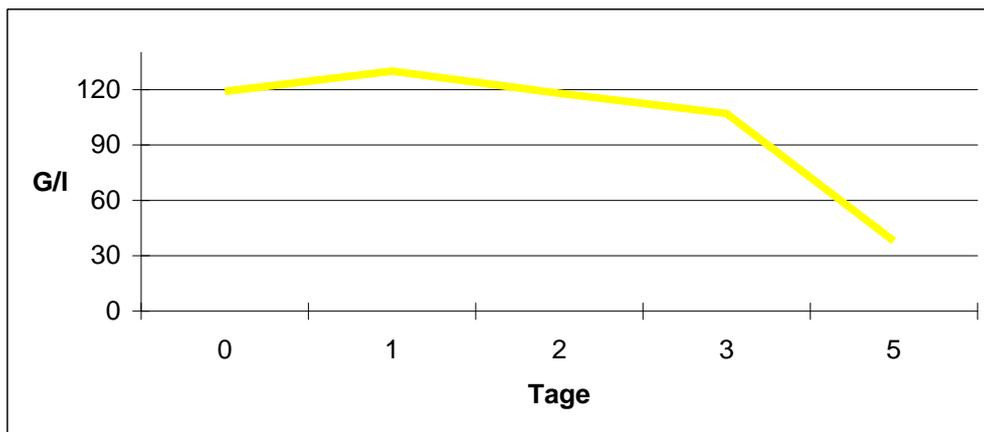


Abb. 55 Thrombozytenverlauf von Studienpatient 7

In der Messung der thrombo-/megakaryozytären MP fanden sich bei **Studienpatient 7** zu P0 5276.71/ $\mu$ l CD61-positive MP. Die Anzahl der CD61-positiven MP erreichte zu P1 (7018.15/ $\mu$ l) das Maximum und nach kontinuierlich Abnahme zu P5 (1297.08/ $\mu$ l) das Minimum der Messwerte. Die CD63-positiven MP erreichte nach Initial 653.86/ $\mu$ l zu P0, das Maximum der Messwerte zu P2 (787.25/ $\mu$ l) und das Minimum zu P5 (256.96/ $\mu$ l). Das Maximum im Beobachtungszeitraum der CD62P-positiven MP zeigte sich bereits zu P0 (418.99/ $\mu$ l), das Minimum ebenfalls zu P5 (65.47/ $\mu$ l). (Abb. 56)

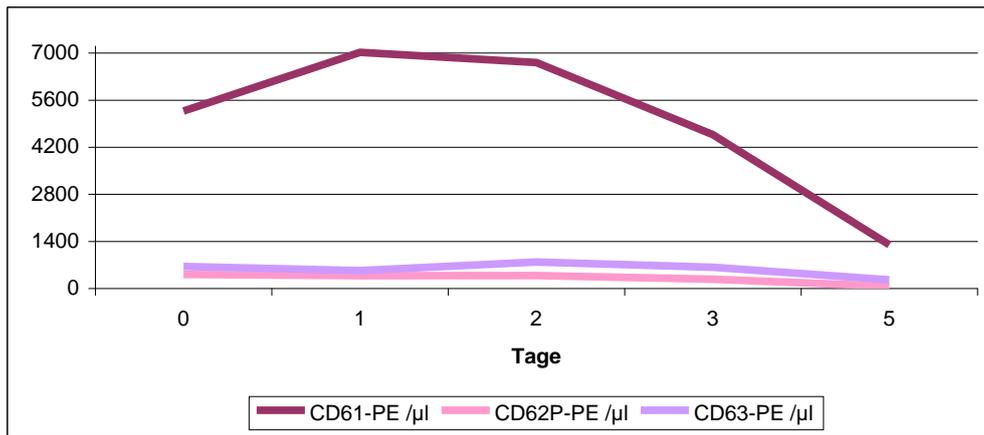


Abb. 56 Thrombo-/megakaryozytäre MP von Studienpatient 7

Die Anzahl CD61-, CD62P- und CD63-positiver MP in Abhängigkeit zur Anzahl zirkulierender Thrombozyten bei **Studienpatient 7** ist in Abbildung 57 dargestellt. Dabei hat die Anzahl der CD61-positiven MP pro zirkulierenden Thrombozyten zu P2 das Maximum und zu P5 das Minimum der Werte. Die Anzahl CD62P-positiver MP pro Thrombozyt erreichte zu P1 das Maximum zu P5 das Minimum der Messwerte. Die CD63-positiven MP pro Thrombozyten hingegen zeigten das Maximum der Messwerte zu P5 und das Minimum zu P1.

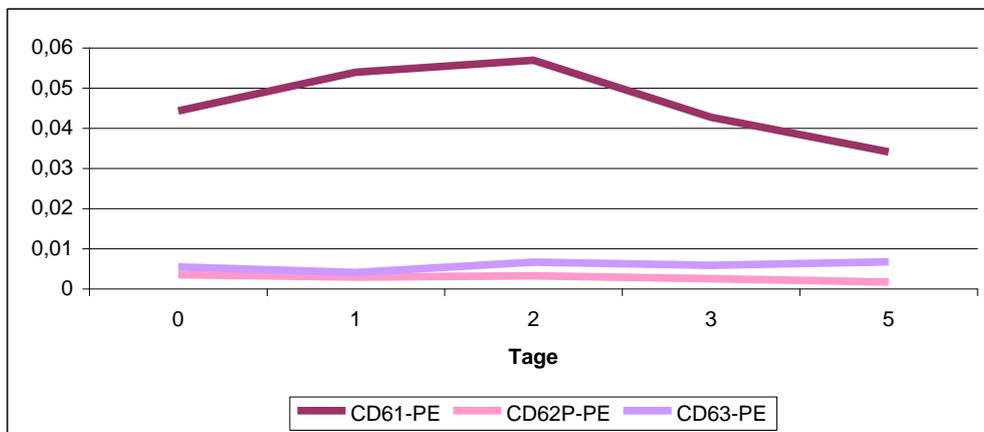


Abb. 57 Thrombo-/megakaryozytäre MP pro Thrombozyt von Studienpatient 7

In der durchflusszytometrischen Messung der endothelialen MP hatte **Studienpatient 7** zum Entnahmezeitpunkt P0 1272.53/µl CD62E- und 2099.06/µl CD144-positiven MP. Die CD62E- erreichten zu P2 (1464.84/µl) und die CD144-positiven MP zu P1 (2364.21/µl) das Maximum der Messwerte. Das Minimum der Messwerte erreichten sowohl die CD62E- (743.88/µl) als auch die CD144-positiven MP (797.89/µl) zu P5. (Abb. 58)

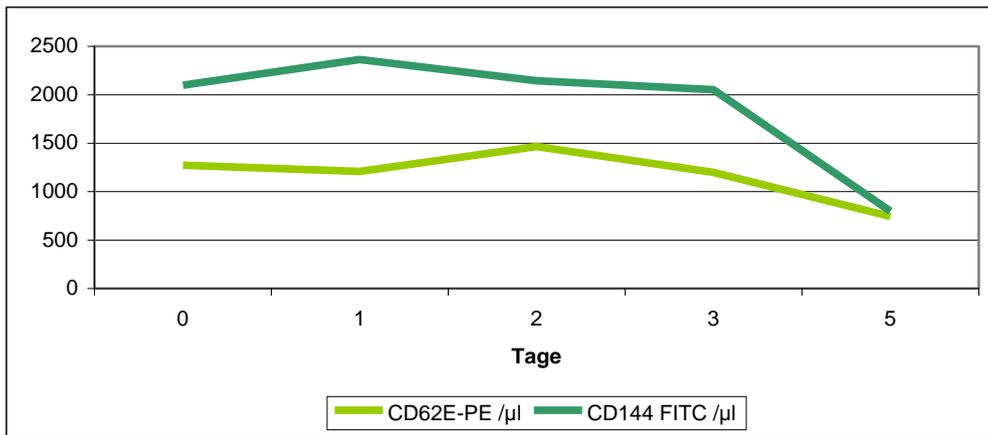


Abb. 58 Endotheliale MP von Studienpatient 7

### 3.2.2.2.2. Studienpatient 8

**Studienpatient 8** wurde im Mai 2006 in die Studie aufgenommen. Zum Zeitpunkt der Probenentnahme P0 wurde für die Zahl der Thrombozyten mit 305 G/l das Maximum der Messwerte bestimmt. Nach kontinuierlicher Abnahme erreichte zu P5 die Anzahl der Thrombozyten mit 109 G/l das Minimum der Messwerte. (Abb. 59)

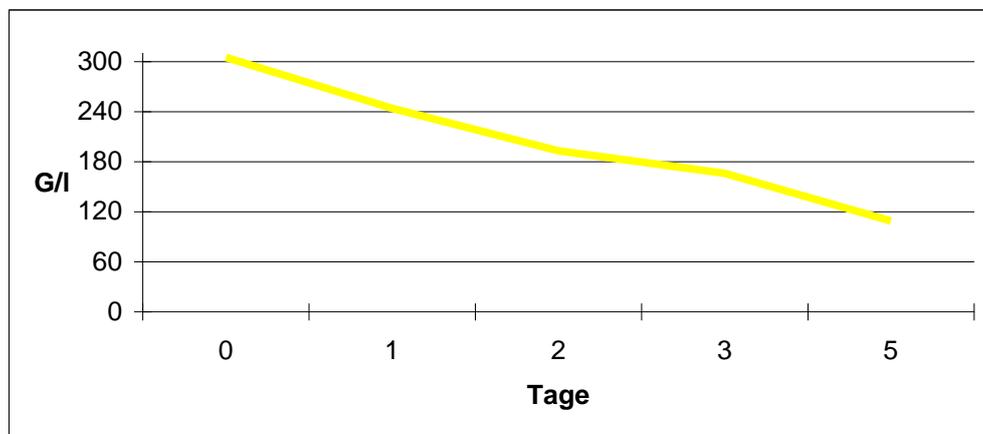


Abb. 59 Thrombozytenverlauf von Studienpatient 8

In Messung der thrombo-/megakaryozytären MP zeigte **Studienpatient 8** zu P0 (39371.70/µl) das Maximum der CD61-positiven MP und zu P5 (5225.39/µl) das Minimum im Beobachtungszeitraum. Sowohl die CD62P-(1819.45/µl) als auch die CD63-positiven (4076.39/µl) MP erreichten zu P1 das Maximum der Messwerte. Das Minimum zeigte sich bei den CD62P- (733.62/µl) und bei den CD63-positiven (1221.65/µl) MP zu P3. (Abb. 60)

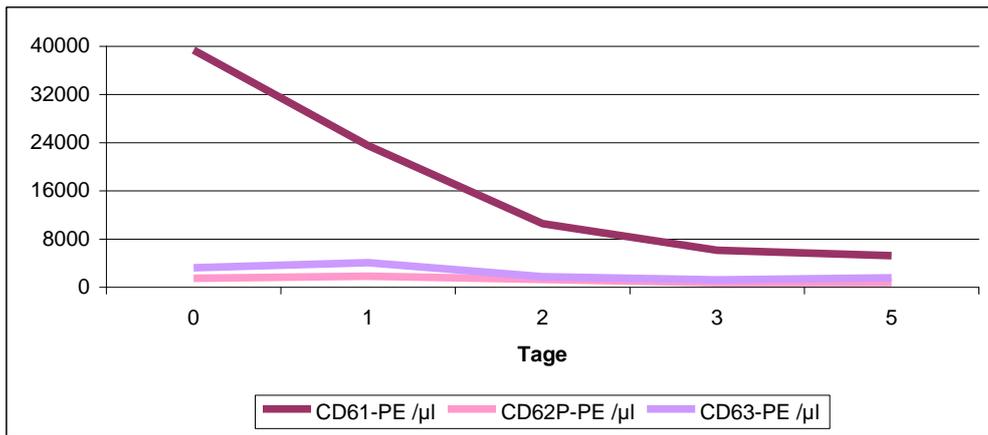


Abb. 60 Thrombo-/megakaryocytären MP von Studienpatient 8

Bei **Studienpatient 8** fand sich zu P0 das Maximum und zu P3 das Minimum der Anzahl CD61-positiver MP pro Thrombozyt im Beobachtungszeitraum. Die Anzahl CD62P- und CD63-positiver MP pro Thrombozyt zeigte zu P1 das Maximum und zu P3 das Minimum der Werte. (Abb. 61)

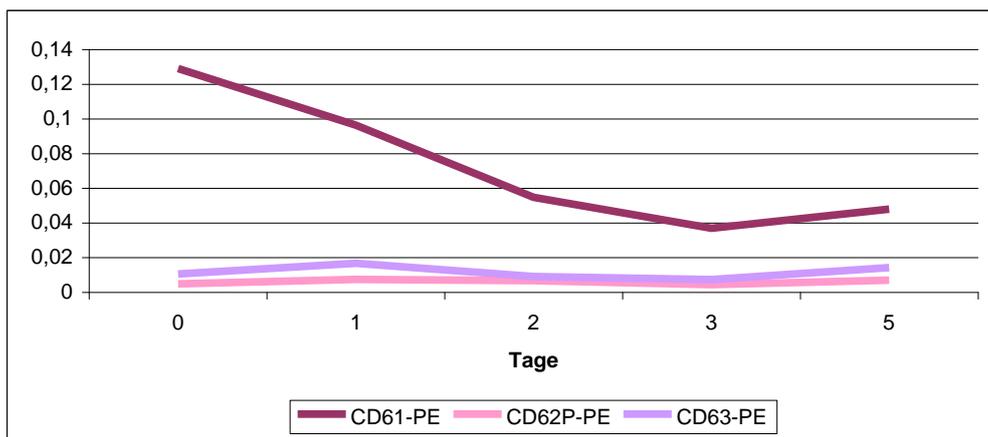


Abb. 61 Thrombo-/megakaryocytären MP pro Thrombozyt von Studienpatient 8

In der durchflusszytometrischen Messung der endothelialen MP zeigte sich bei **Studienpatient 8** zu P0 sowohl für die CD62E- (5854.78/µl) als auch für die CD144-positiven (8409.43/µl) MP das Maximum der Messwerte. Im weiteren Verlauf nahm die Anzahl sowohl der CD62E- als auch der CD144-positiven MP kontinuierlich ab. Zu P5 erreichten die CD62E- (1656.77/µl) und die CD144-positiven (2205.61/µl) MP jeweils das Minimum der Messwert. (Abb. 62)

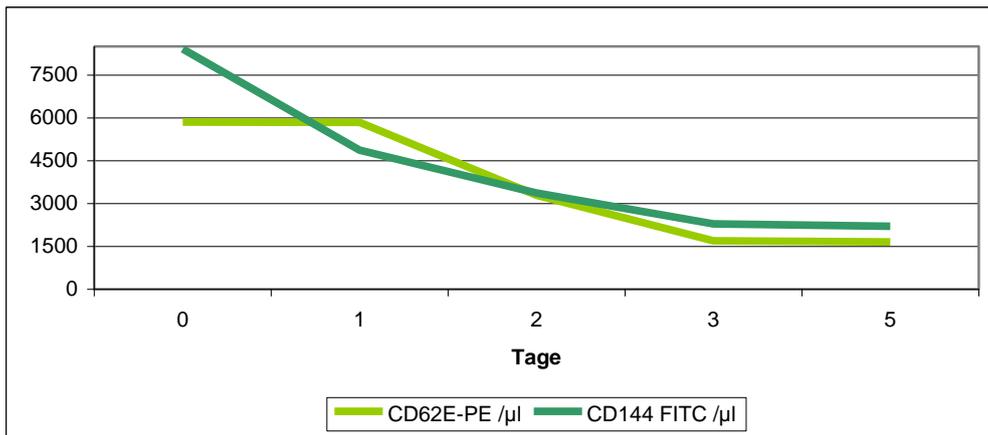


Abb. 62 Endotheliale MP von Studienpatient 8

### 3.2.2.2.3. Studienpatient 9

**Studienpatient 9** wurde im März 2007 in die Studie aufgenommen. Die Zahl der Thrombozyten betrug zu P0 153 G/l und erreichte zu P1 (159 G/l) das Maximum und zu P5 (35 G/l) das Minimum der Messwerte. (Abb. 63)

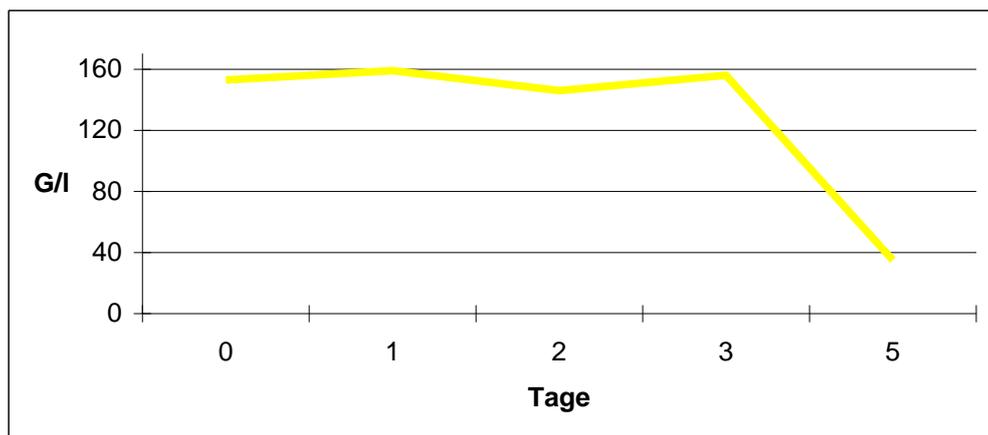
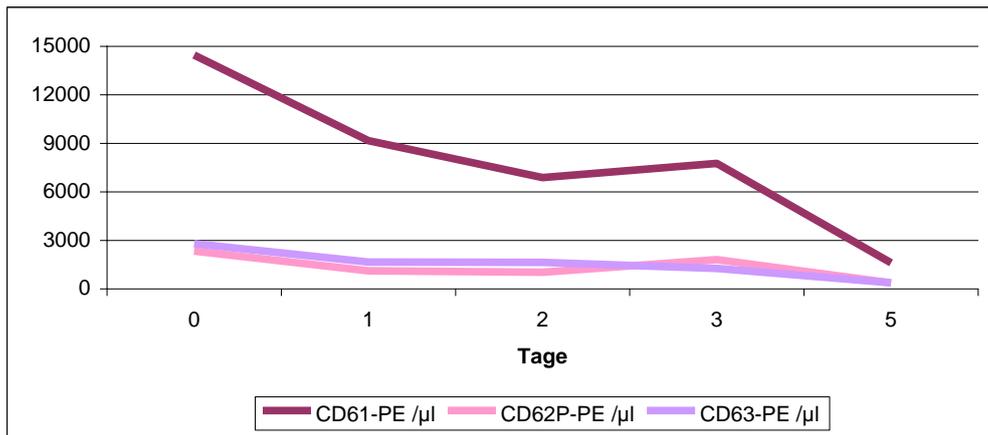


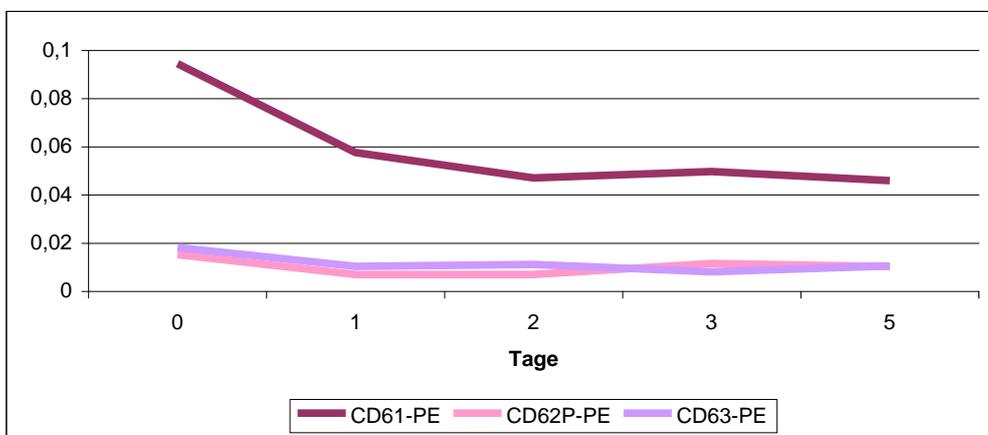
Abb. 63 Thrombozytenverlauf von Studienpatient 9

In der Messung der thrombo-/megakaryozytären MP zeigte sich bei **Studienpatient 9** zu P0 sowohl für die CD61- (14458.48/µl) als auch für die CD62P- (2335.12/µl) und CD63-positiven MP (2787.61/µl) das Maximum der Messwerte. Das Minimum der Messwerte erreichten die CD61- (1607.93/µl), CD62P- (361.98/µl) und CD63-positiven (370.52/µl) MP je zu P5. (Abb. 64)

Die Anzahl der CD61-, CD62P- und CD63-positiven MP pro Thrombozyt zeigt jeweils zu P0 das Maximum. Das Minimum erreicht die Zahl der CD61-positiven MP pro Thrombozyt zu P5, die der CD62P-positiven MP pro Thrombozyt zu P2 und die der CD63-positiven MP pro Thrombozyt zu P3. (Abb. 65)

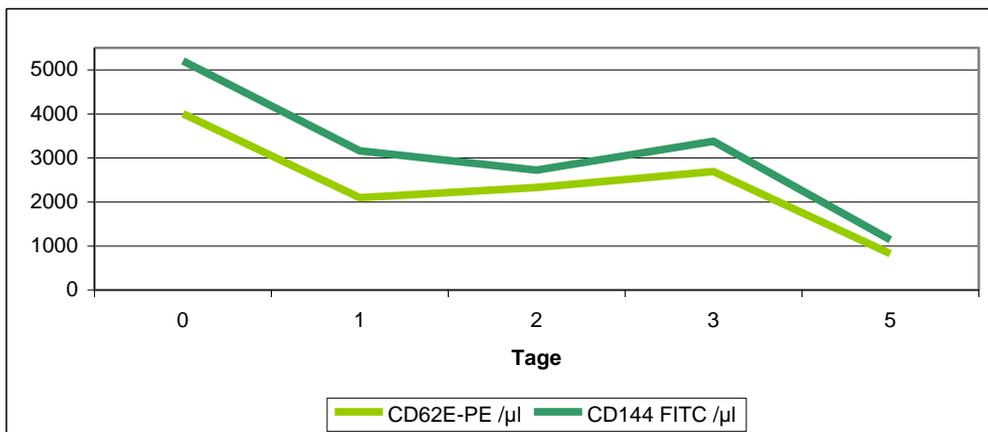


**Abb 64** Thrombo-/megakaryozytären MP von Studienpatient 9



**Abb. 65** Thrombo-/megakaryozytären MP pro Thrombozyt von Studienpatient 9

In der durchflusszytometrischen Messung der endothelialen MP hatte **Studienpatient 9** zum Entnahmezeitpunkt P0 sowohl für die CD62E- (4006.11/µl) als auch für die CD144-positiven (5201.70/µl) MP das Maximum der Messwerte. Das Minimum erreichten sowohl die CD62E- (825.72/µl) als auch die CD144-positiven MP (1139.53/µl) zu P5. (Abb. 66)



**Abb. 66** Endotheliale MP von Studienpatient 9

### 3.2.2.2.4. Studienpatient 10

**Studienpatient 10** wurde im Mai 2007 in die Studie aufgenommen. Da zur Probenentnahme P5 die Anzahl der Thrombozyten mit 131 G/l größer als 100 G/l war, wurde nach Protokoll eine weitere Abnahme an Tag 6 (P6) durchgeführt. Zum Zeitpunkt der Probenentnahme P0 betrug die Zahl der Thrombozyten 153 G/l und erreichte zu P2 (171 G/l) das Maximum und nach Abnahm im Verlauf zu P6 (36 G/l) das Minimum der Messwerte. (Abb. 67)

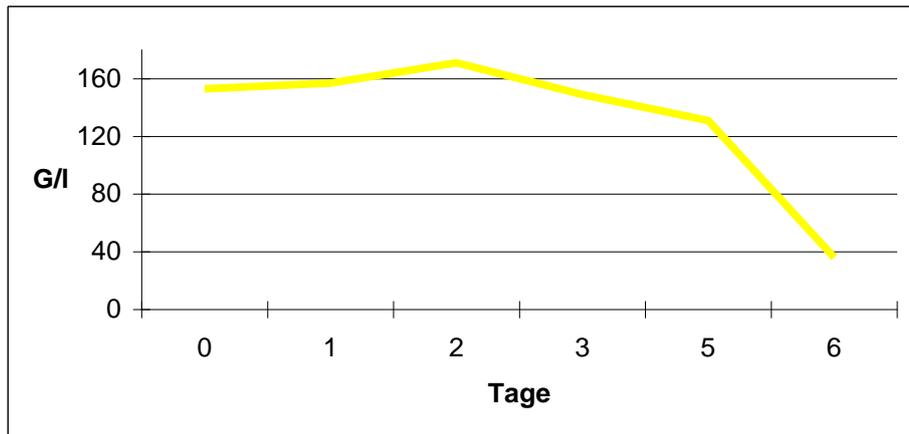


Abb. 67 Thrombozytenverlauf von Studienpatient 10

Die Messung der thrombo-/megakaryozytären MP von **Studienpatient 10** zeigte das Maximum der Messwerte der CD61-positiven MP (8487.86/ $\mu$ l) zu P0 und der CD62P-(798.53/ $\mu$ l) und CD63-positiven (347.22/ $\mu$ l) MP jeweils zu P3. Das Minimum der Messwerte erreichten sowohl die CD61- (644.73/ $\mu$ l) als auch die CD62P- (142.93/ $\mu$ l) und CD63-positiven (50.49/ $\mu$ l) MP zu P6. (Abb. 68)

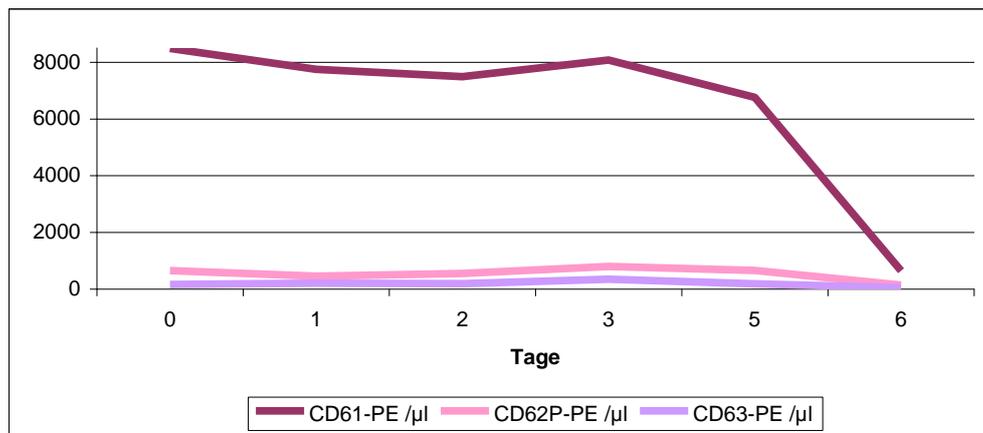
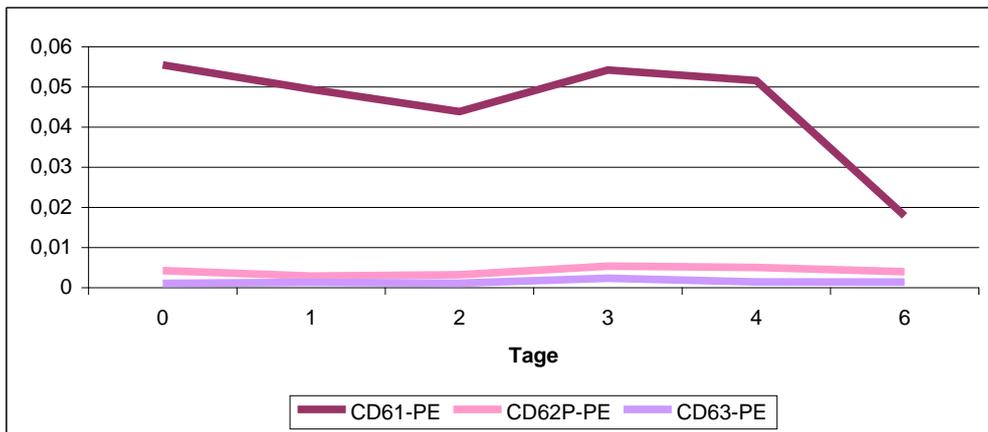


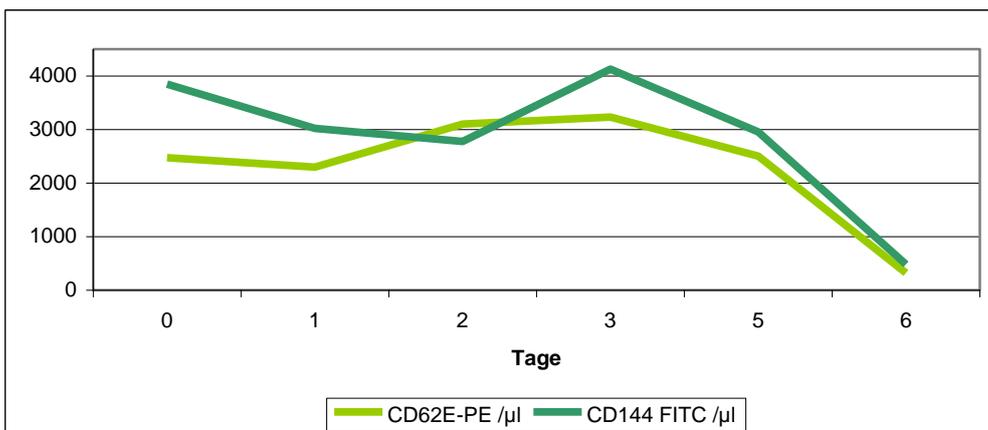
Abb. 68 Thrombo-/megakaryozytären MP von Studienpatient 10

Die Anzahl CD61-, CD62P- und CD63-positiver MP in Abhängigkeit zur Anzahl zirkulierender Thrombozyten bei **Studienpatient 10** ist in Abbildung 69 dargestellt. Dabei findet sich zu P0 für die CD61- und zu P3 für die CD62P- und die CD63-positiven MP pro Thrombozyt das Maximum der Werte. Das Minimum im Beobachtungszeitraum erreichen die CD61- zu P6, die CD62P- zu P1 und die CD63-positiven MP pro Thrombozyt zu P0.



**Abb. 69** Thrombo-/megakaryozytären MP pro Thrombozyt von Studienpatient 10

In der Messung der endothelialen MP wurden bei **Studienpatient 10** zum Entnahmezeitpunkt P0 2472.49/ $\mu$ l CD62E- und 3848.16/ $\mu$ l CD144-positive MP nachgewiesen. Die CD62E- (3232.95/ $\mu$ l) und die CD144-positiven (4129.35/ $\mu$ l) MP zeigten zu P3 jeweils das Maximum der Messwerte. Das Minimum erreichten sowohl die CD62E- (322.36/ $\mu$ l) als auch die CD144-positiven (482.38/ $\mu$ l) MP zu P6. (Abb. 70)



**Abb. 70** Endotheliale MP von Studienpatient 10

### 3.2.2.2.5. Zusammenfassung der Ergebnisse der Studienpatienten 7-10

Um die Auswirkungen einer Konditionierung mit 12Gy-TBI mit einer Hochdosischemotherapie nach dem FLAMSA-Protokoll zu vergleichen wurden analog zu Kapitel 3.2.1.2.7 die relativen Veränderungen der Messwerte bezogen auf den Entnahmezeitpunkt P0 errechnet.

Dabei zeigte sich, dass es im Verlauf nach 12Gy TBI ebenfalls zu einem Absinken der Thrombozytenzahl kommt. Eine Erklärung hierfür liefert wiederum die durchschnittliche Überlebenszeit der verschiedenen Blutbestandteile mit einer Halbwertszeit der Thrombozyten von 4-5 Tagen. Scheinbar kommt es aber im Vergleich zu einer Konditionierung nach FLAMSA-Protokoll bei einer myeloablativen Konditionierung mit 12Gy-TBI erst mit einer gewissen Verzögerung zu einer Abnahme der Zahl zirkulierender Thrombozyten. (Abb. 71)

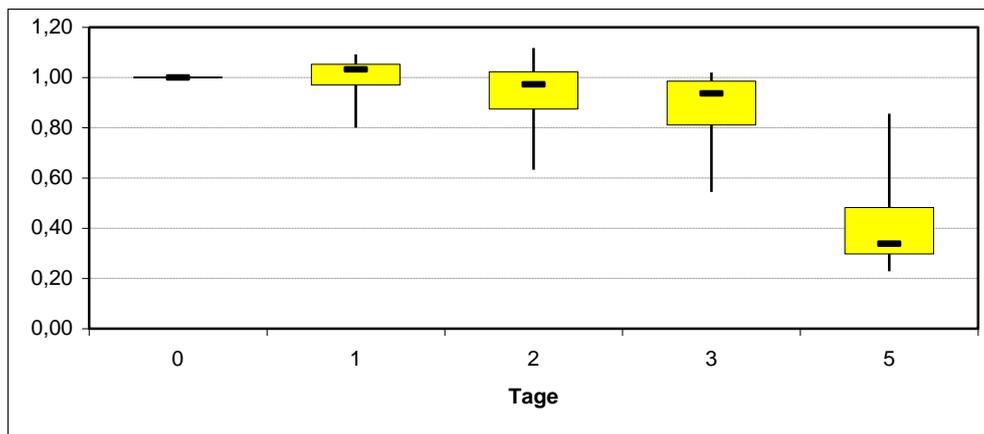


Abb. 71 Relative Veränderung der Thrombozytenzahl der Studienpatient 7-10

Die Analyse der relativen Veränderung der thrombo-/megakaryozytären MP der Studienpatienten 7-10 zu den verschiedenen Entnahmezeitpunkten zeigt, dass es im Verlauf im Median zu einer kontinuierlichen Abnahme aller thrombozytärer MP, mit einem Minimum der Werte zu P5, kommt. Demnach scheint es durch eine Konditionierung mit 12Gy-Ganzkörperbestrahlung, ähnlich wie bei einer Konditionierung nach dem FLAMSA-Protokoll zu keiner Zunahme der thrombo-/megakaryozytären MP zu kommen. Dies ist durch die Abnahme der Anzahl an Megakaryozyten und der damit verbunden Anzahl an zirkulierenden Thrombozyten zu erklären. (Abb. 72-74)

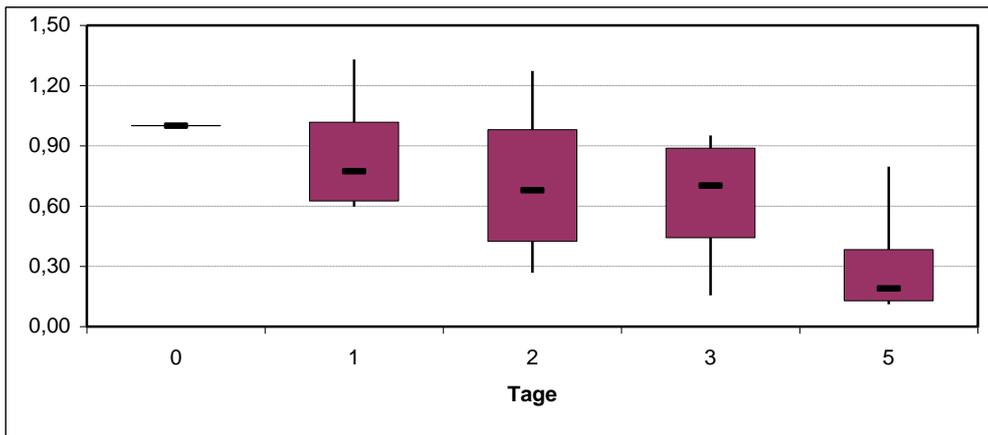


Abb. 72 Relative Veränderung der CD61-positiven MP der Studienpatienten 7-10

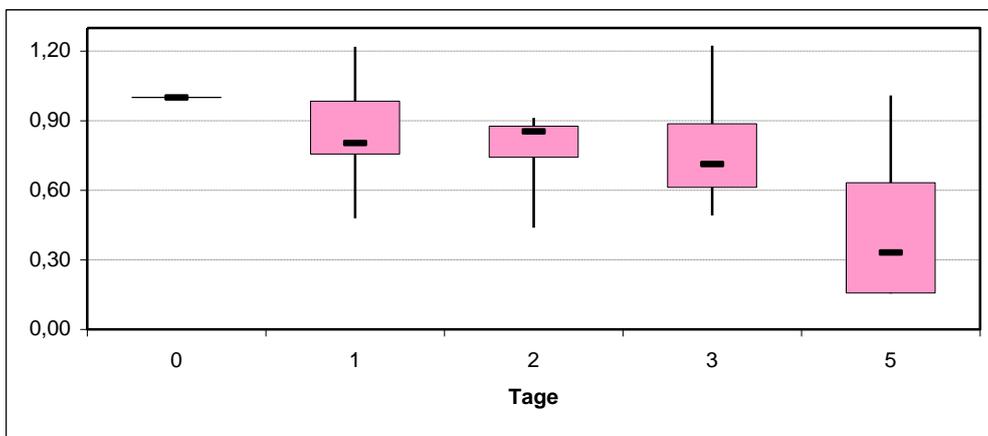


Abb. 73 Relative Veränderung der CD62P-positiven MP der Studienpatienten 7-10

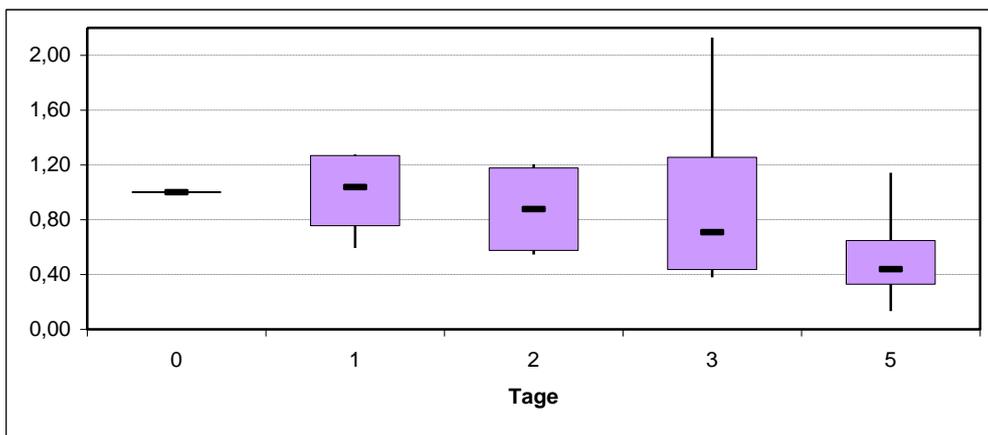


Abb. 74 Relative Veränderung der CD63-positiven MP der Studienpatienten 7-10

Die Analyse der relative Veränderung der Anzahl zirkulierender thrombo-/mega-karyozytärer MP pro Thrombozyt bezogen auf die Werte zu P0 hingegen zeigt, dass es, verglichen mit den Werten des Studienkollektivs mit hochdosis Chemotherapie nach dem FLAMSA-Protokoll, nur bei den CD62P- und CD63-positiven MP pro Thrombozyt zu einem Anstieg über das Ausgangsniveau

kommt. Dabei haben die CD62-P positiven MP pro Thrombozyt den höchsten Median zu P2, wohingegen die CD63-positiven MP pro Thrombozyt den höchsten Median erst zu P5 haben. Im Median sinkt die Anzahl der CD61-positiver MP pro Thrombozyt und erreicht zu P4 ein Minimum. (Abb. 75-77)

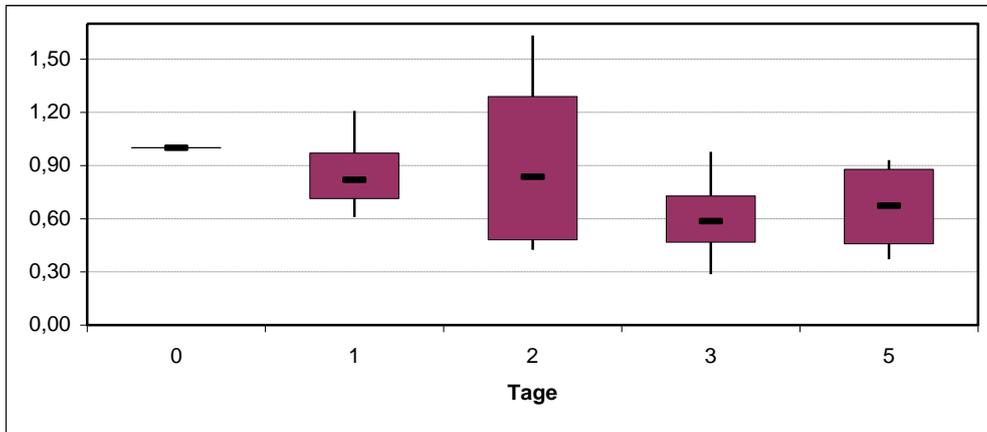


Abb. 75 Rel. Veränderung der CD61-pos. MP pro Thrombozyt der Studienpatienten 7-10

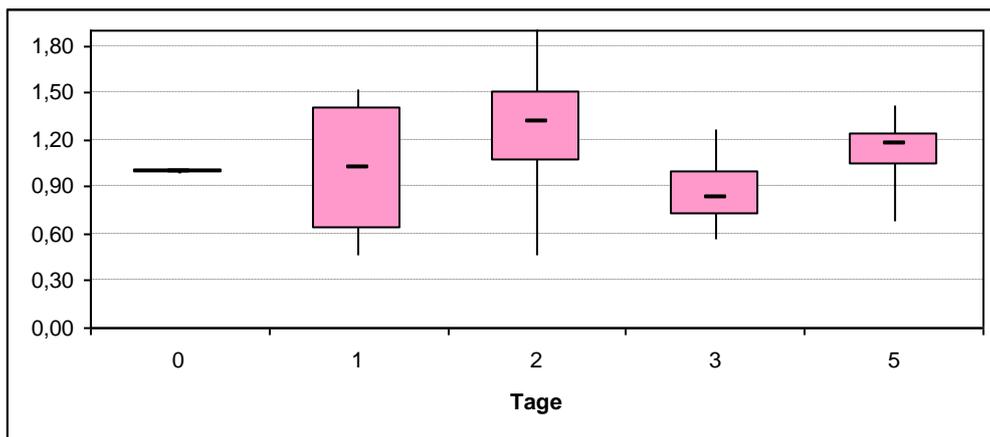


Abb. 76 Rel. Veränderung der CD62P-pos. MP pro Thrombozyt der Studienpatienten 7-10

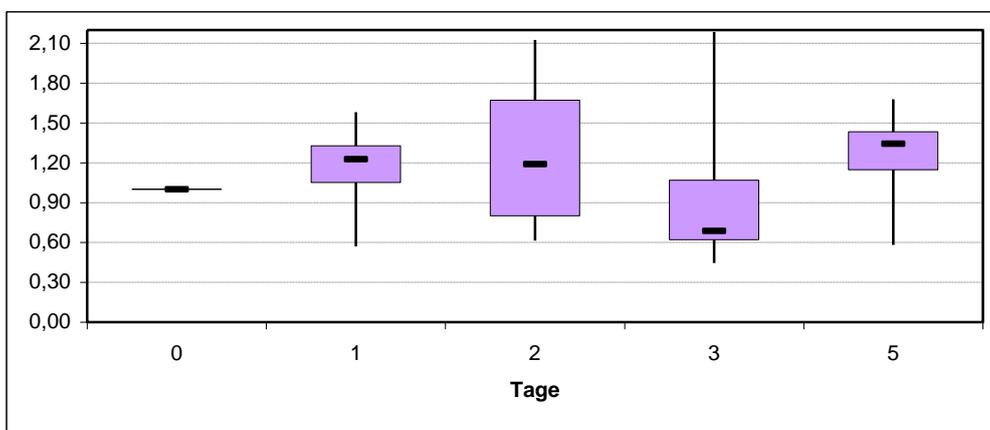
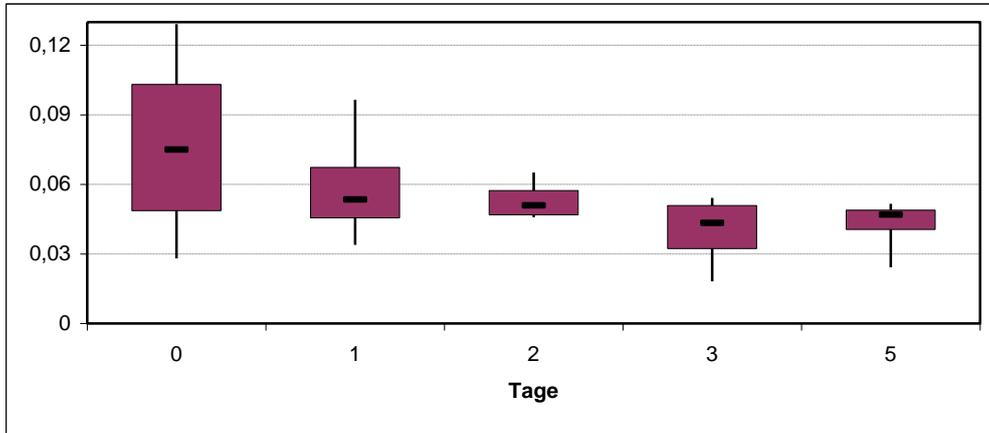
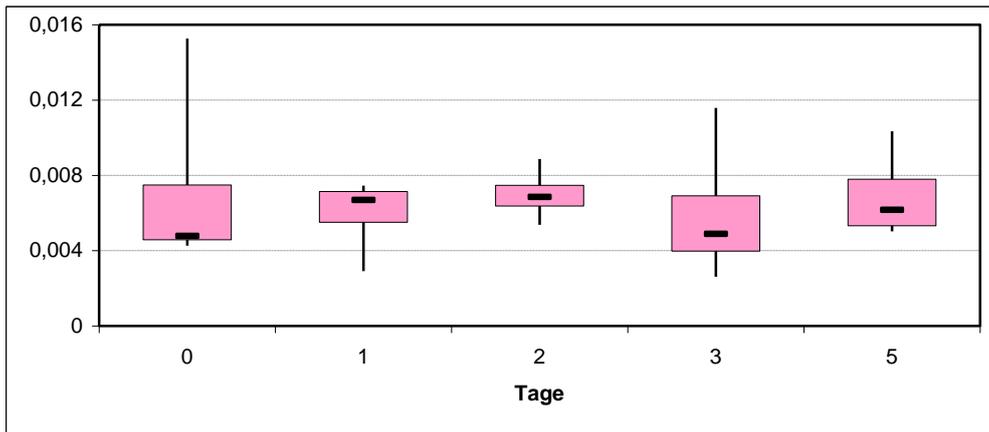


Abb. 77 Rel. Veränderung der CD63-pos. MP pro Thrombozyt der Studienpatienten 7-10

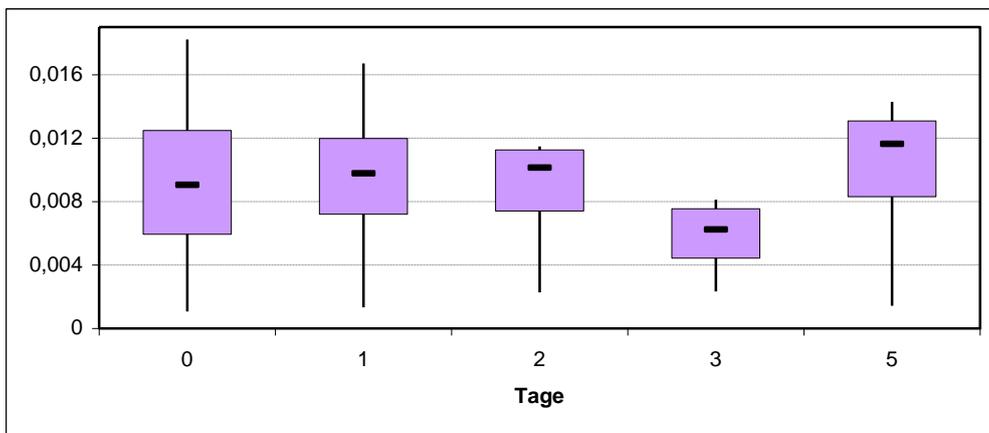
Diese Beobachtung steht im Einklang mit dem Median der Anzahl thrombo-/megakaryozytärer MP pro Thrombozyt zu den einzelnen Entnahmezeitpunkten der Studienpatienten 7-10. (Abb. 78-80)



**Abb. 78** Anzahl der CD61-positiven MP pro Thrombozyt der Studienpatient 7-10



**Abb. 79** Anzahl der CD62P-positiven MP pro Thrombozyt der Studienpatient 7-10



**Abb. 80** Anzahl der CD63-positiven MP pro Thrombozyt der Studienpatient 7-10

Bei der Betrachtung der relativen Veränderung der endothelialen MP bezogen auf P0 der Studienpatienten 7-10 zeigt sich, dass sowohl die Zahl der CD62E- als auch die der CD144-positiven MP im Verlauf abnimmt und zu P5 jeweils den niedrigsten Median erreicht. Im Gegensatz zu den Befunden einzelner Studienpatienten zeigt sich in der Zusammenfassung im Median zu keinem Zeitpunkt ein Anstiegen über das Ausgangsniveau. Demnach scheint es durch eine Konditionierung mit 12Gy-TBI zu keiner Zunahme der endothelialen MP im Beobachtungszeitraum zu kommen. Im Vergleich zum letzten Tag der Bestrahlung (P3) kam es bei den vier Studienpatienten nochmals zu einem deutlichen Abfall der endothelialen MP bis zu P5. (Abb. 81-82)

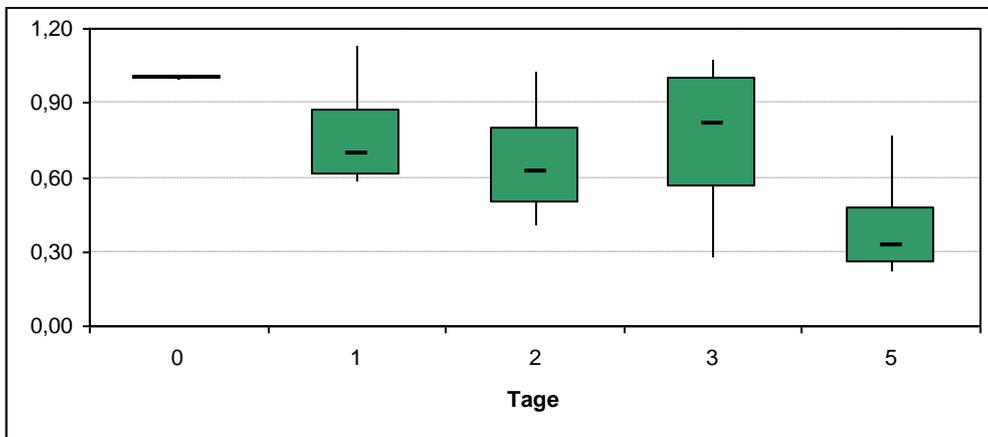


Abb. 81 Relative Veränderung der CD144-positiven MP der Studienpatienten 7-10

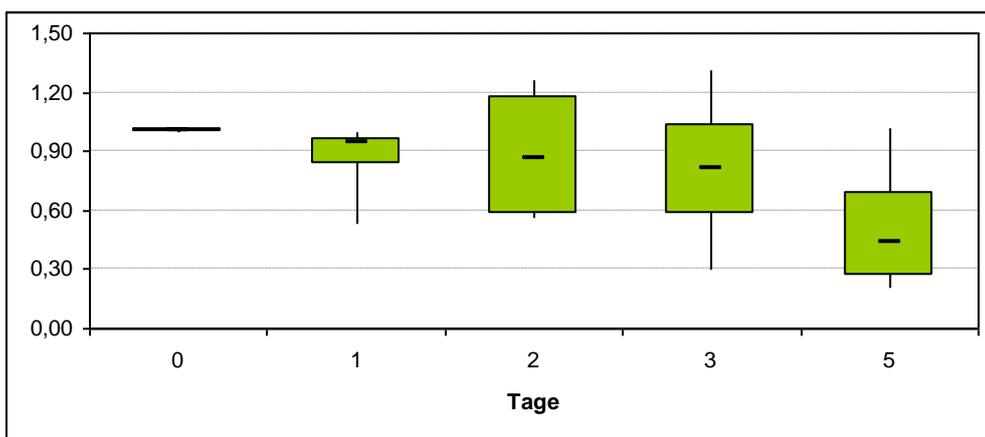


Abb. 82 Relative Veränderung der CD62E-positiven MP der Studienpatienten 7-10

## **4. Diskussion**

### **4.1. Mikropartikel**

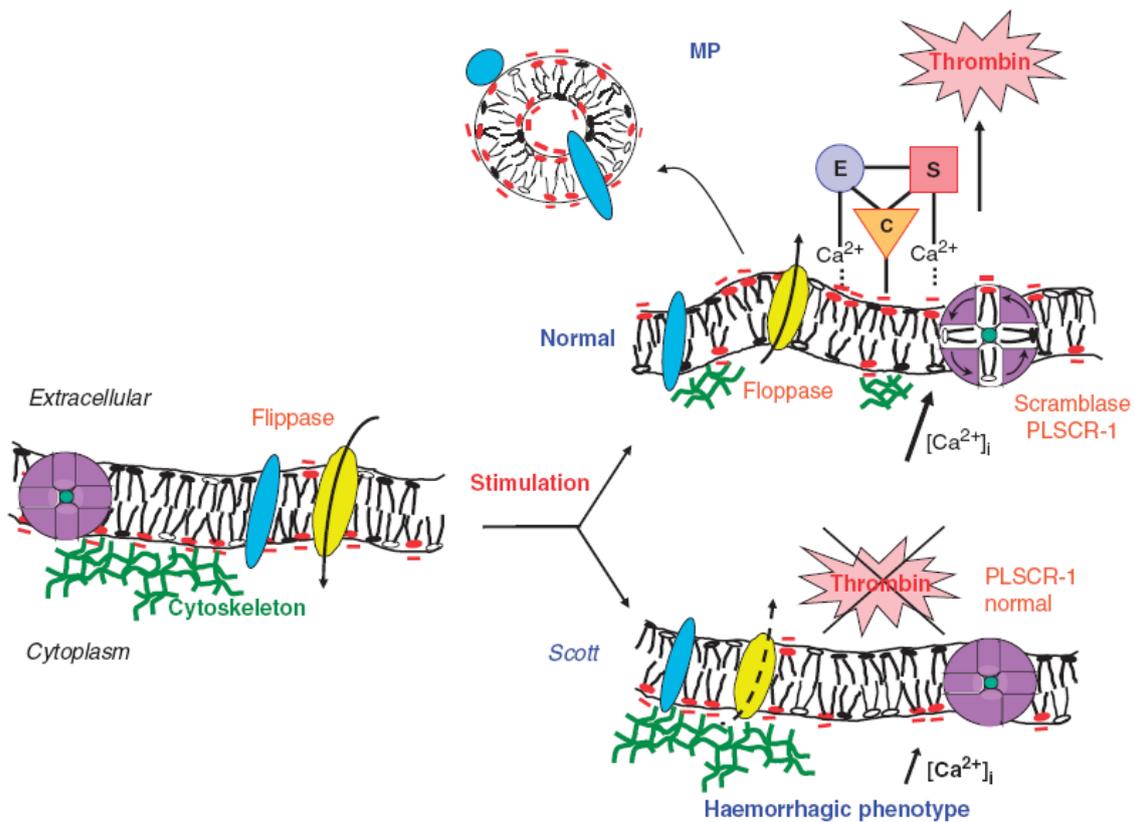
#### **4.1.1. Entstehung und Aufbau von Mikropartikeln**

MP entstehen durch Abschnürung von Zellmembranblasen nahezu aller Zellen, wenn diese einem bestimmten Reiz ausgesetzt werden. Die gebildeten MP sind äußerst heterogen und unterscheiden sich in ihrer Größe (0,1 -1µm), der Lipid- und Proteinzusammensetzung und den exprimierten Antigenen und Adhäsionsmolekülen [30]. Die Freisetzung von MP ist zudem ein wesentlicher Bestandteil der Umbauvorgänge der Zellmembran. Dabei geht die asymmetrische Verteilung der membranbildenden Phospholipide zwischen der zytoplasmatischen und der exoplasmatischen Seite der Zellmembran verloren [44]. In ruhenden Zellen von Säugetieren sind die negativ geladenen Aminophospholipide Phosphatidylserin (PS) und Phosphatidylethanolamin (PE) vor allem in der inneren, der zytoplasmatischen Seite der Zellmembran gelegen. Die Cholinphospholipide Sphingomyelin (SM) und Phosphatidylcholin (PC) bilden den Hauptbestandteil der äußeren, der exoplasmatischen Seite der Zellmembran [45, 46]. Diese asymmetrische Verteilung der membranbildenden Phospholipide wird durch spezifische und unspezifische Transporter Aufrecht erhalten. Zu den spezifischen Aminophospholipid-Translokasen zählen die nach zytosolisch hin transportierende Flippase und die nach exoplasmatisch hin transportierende Floppase [46]. Beides sind  $Mg^{2+}$ - und ATP-abhängige Phospholipidtranslokasen [47, 48]. In der ruhenden Zellmembran steht die Aktivität der Flippase im Vordergrund, was zu der typische Verteilung der Phospholipide in der Zellmembran ruhender Zellen führt [49].

Wird eine Zelle einem prokoagulatorischen, einem proinflammatorischen, einem apoptotischen Reiz, dem Komplementsystem, oder einer Scherbeanspruchung ausgesetzt, so zeigt diese, je nach Art der Zelle und Qualität des Reizes, eine spezifische Antwort. Bei allen Zellen gleich, kommt es aber meist zu einem spontanen Zusammenbruch der Membranasymmetrie, wobei PS an die exoplasmatische Seite der Zellmembran gelangt [50]. Dabei kommt es zu einer Reduktion der Flippaseaktivität und einer Steigerung der Floppaseaktivität. Dies führt zu einem vorübergehenden Massenungleichgewicht zwischen den beiden

Seiten der Zellmembran, da PS nun vermehrt an die Außenseite der Zellmembran gelangt. Das Zusammenbrechen der Membranasymmetrie ist aber auch eine Folge der Aktivierung der Skrambelase, einem kalziumabhängigen, nicht spezifischen, beiderseits gerichteten Phospholipidtransporter. Dieser begünstigt den Austausch von Phospholipiden zwischen den beiden Membranseiten ungeachtet der Polarität und der chemischen Struktur der Phospholipide [49].

Die Wanderung von PS an die exoplasmatische Seite der Zellmembran führt im Folgenden zu der Entstehung von Plasmamembranblasen (sog. membrane blebbing). Als Ursache des „membrane blebbing“ wird eine vorübergehende Überladung der exoplasmatischen Seite mit Phospholipiden auf Kosten der zytoplasmatischen Seite gesehen. Dadurch kommt es zu einer Zunahme der Oberflächenspannung der Zellmembran. Sobald das Zytoskelett nicht mehr in der Lage ist der wachsenden Oberflächenspannung entgegenzuwirken, werden MP von den Zellmembranblasen abgeschnürt (Abb. 83) [51]. Nach der Abschnürung tragen die MP die Oberflächenmerkmale ihrer Ursprungszellen. Dadurch erlangen die MP deren Funktionen und können durch Nachweis dieser Strukturen ihren Ursprungszellen zugeordnet werden. PS, das auf der exoplasmatischen Seite der Zellmembran von aktivierten Zellen und MP vorhanden ist, kann durch Interaktion mit Gerinnungsfaktoren zu Thrombinbildung führen [49]. Voraussetzung für die beschriebenen Vorgänge ist ein Anstieg der zytosolischen Kalziumkonzentration der Zelle, ausgelöst z. B. durch Zellaktivierung oder Apoptose [46]. Dem Anstieg der zytosolischen Kalziumkonzentration folgt zum einen eine Veränderung des Zytoskelettes [52], zum anderen bewirkt der Kalziumanstieg einen Aktivitätsverlust der Flippase und eine Aktivitätszunahme der Floppase [53]. Außerdem führt der zytosolische Kalziumanstieg zur Aktivierung der Skrambelase und von kalziumabhängigen Proteasen wie Calpain. Eine Calpain abhängige Spaltung von Proteinen des Zellmembrangerüsts bewirkt wiederum den Verlust der Adhäsion zwischen Zellmembran und Zytoskelett und ist somit ebenfalls an der Abschnürung von MP beteiligt [54].



**Abb. 83** Darstellung der Mikropartikelbildung

In der ruhenden Zellmembran (Mitte links) ist vor allem die Flippase aktiv, die zu einer Ansammlung negativ geladener Aminophospholipide (rote Köpfe) in der zytosolischen Seite der Zellmembran führt. Bei Aktivierung der Zelle kommt es normalerweise zu einer Zunahme der Floppase- und der Scramblaseaktivität (oben rechts) und damit zu einer Überladung der extrazellulären Seite der Zellmembran auf Kosten der zytosolischen Seite. MP werden abgeschnürt und tragen ebenso wie die aktivierte Zelle PS auf der extrazellulären Seite, was durch Interaktion mit Gerinnungsfaktoren zu einer Thrombinbildung führen kann. Beim Scott Syndrom (unten rechts) kann PS nach der Zellaktivierung nicht an die extrazelluläre Seite der Zellmembran transportiert werden. Somit kann auch keine Abschnürung von MP oder eine Thrombinbildung durch Interaktion der Gerinnungsfaktoren mit PS stattfinden [49].

#### 4.1.2. Ursprung und Nachweis von Mikropartikeln

Die am weitesten verbreitete Methode zur Analyse von MP ist die Durchflusszytometrie. Diese ist zum einen wegen ihrer Einfachheit und zum anderen wegen der Fülle an bereits vorhandenen Informationen, durch eine Vielzahl publizierter Studien, anerkannt. Dabei gelingt der Nachweis von MP zum einen durch Messung der Größe und der Annexin-V-Bindung mit PS. Zum anderen können die detektierten MP durch Antikörperbindung an die spezifischen Oberflächenantigene den Ursprungszellen zugeordnet werden [55]. Diese Oberflächenantigene sind zum Teil bereits auf der ruhenden Zellmembran der Ursprungszelle enthalten oder werden erst im Rahmen einer Zellaktivierung oder eines

Apoptoseprozesses exprimiert [56]. So können als Beispiel unterschiedliche Adhäsionsproteine oder prokoagulatorisch wirkende Faktoren, wie der Tissue Faktor, auf der Oberfläche von MP gefunden werden [57].

In einer Studie über Patienten mit Diabetes mellitus Typ II wurden die MP-Konzentrationen im peripher venösen Blut gesunder männlicher und weiblicher Probanden gemessen. Es zeigte sich, dass die meisten MP thrombozytären Ursprungs sind ( $79,9\% \pm 11,3\%$ ). Des Weiteren wurden MP von T-Helfer- und T-Suppressorzellen, Monozyten, B-Lymphozyten, Granulozyten, Erythrozyten und Endothelzellen gefunden [58]. Diese Erkenntnis bestätigten auch weitere Arbeiten bei denen unter anderem MP gesunder männlicher Probanden bestimmt wurden. Auch hier zeigte sich, dass zirkulierende MP hauptsächlich thrombozytären Ursprungs sind und zu einem kleineren Teil aus Erythrozyten, Granulozyten und Endothelzellen endstehen [40, 41]. Auch bei weiblichen gesunden Probanden konnte gezeigt werden, dass mit Abstand die meisten zirkulierenden MP (87,1%) thrombozytären Ursprungs sind [41].

Die Ergebnisse einer aktuellen Studie am Mausmodell deuten darauf hin, dass bisher in der Literatur als thrombozytär bezeichnete MP in Wahrheit nicht nur von Thrombozyten, sondern auch von Megakaryozyten abstammen könnten. So werden thrombozytäre MP scheinbar kontinuierlich von Megakaryozyten in einem aktiven, geregelten Prozess gebildet. Dieser findet ohne Stimulation und unter denselben Bedingungen statt, in denen prothrombozytenbildende Megakaryozyten wachsen und sich differenzieren. In dieser Studie fand sich zudem kein Anzeichen für die Bildung von MP aus ruhenden Thrombozyten. Bei der Messung zirkulierender MP bei Mäusen konnte gezeigt werden, dass der Hauptteil der thrombozytären MP CD41 positiv und CD62P negativ ist und Filamin A in voller Länge exprimiert. Somit können diese nicht von aktivierten Thrombozyten abstammen, da diese MP CD41 negativ und CD62P positiv sind und Filamin A nicht in voller Länge exprimieren [59].

Über die Halbwertszeit von zirkulierenden MP und deren Schicksal im Blutkreislauf ist bisher nur wenig bekannt. Im Mausmodell wurden thrombozytäre MP 30min nach Infusion aus dem Blutkreislauf vom Organismus entfernt [60]. In einer Studie an Hasen wurden thrombozytäre MP bereits innerhalb weniger

Minuten nach Infusion aus dem Blutkreislauf eliminiert [61]. Ergebnisse aus unserer Forschungsgruppe durch Messungen am Menschen zeigen, dass nach Transfusion von Thrombozytenkonzentraten bei Patienten mit schwerer Thrombozytopenie dort enthaltene Annexin V-positive MP eine Halbwertszeit von 5,8 Stunden und CD61-positive MP eine Halbwertszeit von 5.3 Stunden haben [62]. Demnach scheint es einen geregelten Prozess des kontinuierlichen Abbaus bzw. Einbaus zirkulierender MP in andere Zellen zu geben.

#### **4.1.3. Funktion von Mikropartikeln**

Lange Zeit wurden MP in der Forschung nur als „cell dust“ oder als „Zellfragmente“ mit prokoagulatorischen Eigenschaften gesehen. In den letzten Jahren hat sich dieses Bild grundlegend geändert. In zahlreichen Studien traten MP als diagnostische und prognostische Hilfsmittel in den Mittelpunkt des Interesses. In Zukunft könnten MP ein wichtiger Bestandteil in der medizinischen Diagnostik und Therapie sein.

So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass MP sowohl einen Marker für Zellstimulierung *in vitro* als auch für Zellaktivierung und/oder Gewebeuntergang *in vivo* darstellen. Zudem deuten zahlreiche Studien darauf hin, dass MP eine Reihe von Funktionen im Organismus erfüllen. Sie fungieren als wichtige Vektoren im transzellulären Austausch biologischer Informationen [44] und können durch die Verteilung zahlreicher bioaktiver Effektoren, die von den Ursprungszellen abstammen, unter anderem die Gefäßfunktion verändern und biologische Reaktionen hervorrufen [35, 63].

Das Scott Syndrom hat viel zur Erforschung der physiologischen und pathophysiologischen Bedeutungen von MP beigetragen. Hierbei handelt es sich um die mit Abstand seltenste, erblich bedingte Erkrankung aus dem Bereich der hereditären Hämostasedefekte, bei der im Verlauf schwer beherrschbare hämorrhagische Episoden auftreten. Bisher wurden nur drei klar identifizierte Fälle beschrieben. Bei Patienten mit Scott Syndrom sind Thrombozyten und die übrigen Blutzellen nicht in der Lage PS an die exoplasmatische Seite der Zellmembran zu transportieren und können demnach auch keine MP bilden [64]. Das exoplasmatisch gelegene PS auf der Oberfläche aktivierter Zellen oder von

MP kann mit zirkulierenden Blutgerinnungsfaktoren interagieren und besitzt eine katalytische Wirkung auf den Prothrombinase-Enzymkomplex. So fördert PS durch die Interaktion mit Enzymen, Kofaktoren und Substraten die Aggregation der charakteristischen Enzymkomplexe der Gerinnungskaskade, dass bereits lokal vorhandene Konzentration die kinetischen Anforderungen für optimale Aktivität erfüllen und eine ausreichende Menge Thrombin für eine effiziente Hämostase gebildet werden kann. Die Thrombinbildung kann mit Hilfe von PS als Katalysator ohne den Einfluss von tissue factor (TF) stattfinden [65]. Das Scott Syndrom zeigt eindrucksvoll die essentielle Bedeutung der MP für eine normale Hämostase und die enge Verknüpfung zwischen der PS Verlagerung auf die exoplasmatische Seite der Zellmembran und der MP-Bildung [64]. Auch der nachgewiesene prokoagulatorische Effekt und die Fähigkeit einer Thrombinbildung in vitro bei MP aus peripher venösem Blut gesunder Probanden, ist ein weiteres Indiz für deren Bedeutung in der Hämostase [40, 41].

MP sind aber nicht nur in der Hämostase von Bedeutung. Sie haben je nach Ursprungszelle unterschiedliche Funktionen z.B. im Rahmen von Entzündungsvorgängen oder der Gefäßregulation [41]. So aktivieren thrombozytäre MP unter anderem Thrombozyten und Endothelzellen [66], modulieren die Interaktionen von Monozyten mit Endothelzellen [67] und vermitteln, durch eine Zunahme der Expression von CD11b, eine vermehrte Interaktion zwischen Leukozyten im Blutfluss. Dabei kommt es zu einer vermehrten Bindung unter den Leukozyten und einer Zunahme ihrer Phagozytoseaktivität [68]. Außerdem können thrombozytäre MP an Neutrophile Zellen binden, diese aktivieren und zur Bildung traubenartiger Gebilde, bestehend aus Komplexen thrombozytärer MP und Neutrophiler Zellen, führen [69]. Thrombozytären MP tragen zudem den größten Anteil an plasmatischem Tissue Faktor auf ihrer Oberfläche [70]. Es wird vermutet, dass ein Transfer von Tissue Faktor von Thrombozyten auf Monozyten mittels thrombozytärer MP stattfindet und dieser von P-Selektin (CD62 P) abhängig ist [71]. Neben den negativ geladenen Aminophospholipiden auf ihrer Oberfläche, die eine Bindungsstelle für die aktivierten Gerinnungsfaktoren Va, VIIIa, IXa und Xa darstellen [53], trägt auch ihre Fähigkeit Tissue Faktor zu aktivieren, diesen an andere Zellen weiterzugeben und selbst

zu tragen, zur Thrombinbildung in vivo bei [52]. In einer aktuellen Studie konnte zudem eine um bis zu 50-100-fach höhere spezifische prokoagulatorische Aktivität thrombozytärer MP im Vergleich zu aktivierte Thrombozyten nachgewiesen werden [72]. Des Weiteren wurde ihre Funktion als ein Haupttransporter von PAF (platelet activating factor), einem Phospholipid, welches als Aktivator und Vermittler unter anderem an der Plättchenaggregation und Entzündungsprozessen beteiligt ist, aufgedeckt [73].

Monozyten schnüren, wenn sie durch Lipopolysaccharide stimuliert werden, MP ab. Diese tragen auf ihrer Oberfläche TF und aktivierte Adhäsionskomplexe, was den so entstandenen MP einen „doppelt“ prokoagulatorischen Effekt verleiht [57]. Im Gegensatz dazu scheint Thrombomodulin von MP nicht stimulierter Monozyten dem prokoagulatorischen Effekt des PS zumindest teilweise entgegenzuwirken [74].

Leukozytäre MP aktivieren Endothelzellen und stimulieren die Induktion von TF [75, 76]. Es konnte zudem gezeigt werden, dass leukozytäre MP TF zu Thrombozyten transportieren und Thrombosen auslösen können [57].

Endotheliale MP können Monozyten aktivieren und zu einer Expression von TF führen [76]. Des Weiteren aktivieren sie Neutrophile Zellen [77] und fördern die Bindung von Monozyten an Endothelzellen [78]. Darüber hinaus bewirken endotheliale MP eine chemotaktische Anlockung von Leukozyten [75] und enthalten Metalloproteinasen welche die Angiogenese beeinflussen [79]. Erst kürzlich konnte zudem ihre Funktion als Transporter von mRNA zwischen Endothelzellen nachgewiesen werden [80].

#### **4.1.4. Mikropartikel bei unterschiedlichen Krankheitsbildern**

Eine Vielzahl von Erkrankungen wurde bereits auf Veränderungen der Gesamtzahl, des Aufbaus oder des Ursprungs zirkulierender MP hin untersucht. Dabei zeigte sich, dass nicht nur die Anzahl, sondern auch der zelluläre Ursprung und die Zusammensetzung zirkulierender MP von der Art der Erkrankung, dem Stadium der Erkrankung und der medikamentösen Therapie abhängig ist [52]. In Versuchen mit Zellkulturen konnte eine Korrelation zwischen der MP-Anzahl und dem Grad apoptotischer Zellen nachgewiesen werden [81]. Demnach

können MP als ein *in vivo* Marker für Apoptosevorgänge dienen. Ein direkter Nachweis der apoptotischen Zellen ist wegen der effizienten Phagozytosesysteme nur sehr schwer möglich. Die sehr viel kleineren und in einem höheren Grad diffusionsfähigeren MP hingegen, scheinen einer Phagozytose leichter entgehen zu können und somit länger nachweisbar zu bleiben. Wie bereits aufgeführt gibt es über die Halbwertszeit und den Ab-/Einbau von MP im menschlichen Organismus nur wenige Daten [62]. MP könnten in Zukunft als Biomarker zur Diagnosefindung oder zum Erkennen von Komplikationen, die mit einer bestehenden Erkrankung in Verbindung stehen, benutzt werden [53].

### **Arteriosklerose und MP**

In der Pathogenese der Arteriosklerose hat die Adhäsion von Monozyten an Endothelzellen gefolgt von einer subendothelialen Migration der Monozyten eine zentrale Bedeutung. Eine Studie konnte bei Monozyten und Endothelzellen nach Inkubation sowohl mit thrombozytären als auch mit leukozytären MP eine Zunahme der Expression von Adhäsionsmolekülen nachweisen. Thrombozytäre und leukozytäre MP fördern zudem die Rekrutierung von Entzündungszellen und könnten demnach maßgeblich zu arteriosklerotischen Gefäßveränderungen beitragen [67, 82]. In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass thrombozytäre MP zudem sowohl *in vitro* als auch *in vivo* an die subendotheliale Matrix binden und somit als Substrat für weitere Plättchenbindung agieren können. Diese Interaktion thrombozytärer MP mit der subendothelialen Matrix scheint bei der Plättchenadhäsion an Stellen mit Endotheldefekten ein entscheidender Faktor zu sein [83]. Die Proliferation der glatten Muskelzellen der Gefäße, ein weiterer wichtiger Bestandteil in der Pathogenese der Arteriosklerose, scheinen thrombozytären MP ebenfalls direkt verursachen zu können [75]. Ein Risikofaktor für die Entstehung einer Arteriosklerose ist unter anderem ein bestehender Hypertonus. Dieser ist meist mit hohen Konzentrationen zirkulierender MP assoziiert, speziell monozytärer und thrombozytärer MP. Bei Patienten mit arterieller Hypertonie führte eine Behandlung mit Kalziumantagonisten zu einer signifikanten Reduktion der Anzahl zirkulierender MP [84]. In einer Studie über zirkulierende leukozytäre MP wurde deren Fähigkeit zum Transport biologischer Effektoren, die zu einer Entzündung des Gefäßbettes,

einer Endotheldysfunktion, Leukozytenadhäsion und Leukozytenanlockung führen können, aufgezeigt. Demnach scheinen sie förderlich für das Wachstum von Plaques zu sein [85]. Die Bildung arteriosklerotischer Plaques ist mit Apoptosevorgängen verbunden. Dies erklärt die Anwesenheit einer signifikanten Anzahl prokoagulatorischer MP in Plaques [86]. Verglichen mit zirkulierenden MP finden sich in Plaques MP in höherer Konzentration und mit stärkerem thrombogenem Potential. Der größte Teil dort gemessener MP ist leukozytären oder erythrozytären Ursprungs. Die MP-Bildung von aktivierten Leukozyten ist ein Hinweis für ablaufende Entzündungsprozesse, wo hingegen erythrozytäre MP ein Indiz für Hämorrhagien in Plaques sind und somit einen Marker für Plaqueinstabilität darstellen [87]. Neben ihren Beitrag zur Thrombogenität von Plaques tragen MP auch zur Instabilität der Plaques bei und vermitteln zusätzlich die Anlockung von Entzündungszellen.

#### **Kardiale Erkrankungen und MP**

Patienten mit instabiler Angina Pectoris oder kurz nach einem Myokardinfarkt zeigen im Vergleich zu gesunden Probanden höhere Konzentrationen an thrombozytäre MP [88]. Dies bestätigte auch eine Studie, die bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom, im Gegensatz zu Patienten mit stabiler Angina Pectoris oder ohne kardiale Erkrankung, eine erhöhte Anzahl zirkulierender MP mit prokoagulatorischer Eigenschaft nachweisen konnte. Dabei konnten vor allem MP endothelialer Herklunft bestimmt werden [89]. Bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt konnte zudem gezeigt werden, dass isolierte MP dieser Patienten an Rattenarterien zu einer Verminderung der endothelabhängigen Relaxation führen [90]. Auch zirkulierende MP von Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz bewirken eine Störung der endothelialen Funktion [91], wobei deren gesundheitsschädliches Potential und deren Anzahl durch eine adäquate Therapie signifikant verringert werden konnte [92]. Außerdem konnte eine Assoziation der meisten kardiovaskulären Risikofaktoren, wie Hypertonus, Apipositas, erhöhte Cholesterinwerte oder Dislipoproteinämie mit einer erhöhten Anzahl zirkulierender thrombozytärer, monozytärer oder endothelialer MP nachgewiesen werden. Bei Patienten mit einer kardiovaskulären Erkrankung scheinen erhöhte Werte zirkulierender MP für ein schlechtes klinischen Outcome zu sprechen. So

konnte aber auch bei einigen Therapieregimen, die einen nachweislich positiven Effekt auf kardiovaskuläre Erkrankungen haben, wie Statine, Thrombozytenaggregationshemmer, Antioxidanzien, Betablocker, AT-II-Rezeptorblocker oder Kalziumkanalblocker, eine Verminderung sowohl der Anzahl als auch der prokoagulatorischen Aktivität zirkulierender MP nachgewiesen werden [63]. MP wurden aber auch bei chirurgischen und interventionellen Eingriffen am Herzen bestimmt. So konnte in perikardialen Blut, welches bei herzchirurgischen Eingriffen aus der Herzhöhle gewonnen wurde, eine hohe Anzahl thrombozytärer und erythrozytärer MP nachgewiesen werden, die in vitro einen stark prokoagulatorischen Effekt besaßen [93]. Auch bei Patienten die sich einer Koronarangiographie unterziehen mussten, konnte ein Anstieg, vor allem der zirkulierenden thrombozytären MP, nachgewiesen werden [88].

### **Diabetes mellitus und MP**

In einer Studie an Patienten mit Diabetes mellitus (DM) Typ I oder Typ II konnte in beiden Fällen, im Vergleich zu einem gesunden Kollektiv, eine erhöhte Anzahl zirkulierender MP nachgewiesen werden [94]. Dabei korreliert die Anzahl thrombozytärer und monozytärer MP mit dem Auftreten diabetischer Komplikationen, wie zum Beispiel dem Ausmaß einer diabetischen Retinopathie [52]. Vor allem die Konzentration monozytärer MP war bei Patienten mit DM assoziierten Erkrankungen wie diabetische Nephropathie, Retinopathie oder Neuropathie im Vergleich zu Patienten ohne Auftreten diabetesspezifischer Erkrankungen, deutlich erhöht [95]. Bei Patienten mit schlecht eingestellten DM Typ II und zusätzlichen mikrovaskulären Komplikationen, wie einer diabetischen Nephropathie, konnte eine erhöhte Anzahl thrombozytärer MP nachgewiesen werden [96]. Aber auch bei Patienten mit gut eingestellten DM Typ II wurde, trotz ähnlicher Gesamtzahl zirkulierender MP, im Vergleich zu einer Kontrollgruppe, eine Veränderung im Aufbau und der Zusammensetzung der MP nachgewiesen. So zeigten diese Patienten eine erhöhte Expression von TF auf MP von T-Helferzellen, Granulozyten, Thrombozyten und Endothelzellen [58]. Als Prognoseparameter für Diabetes assoziierte Erkrankungen scheinen endotheliale MP aussagekräftig zu sein. So hat eine erhöhte Anzahl endothelialer MP einen prädiktiven Wert über das Vorhandensein von Läsionen der Koronar-

arterien und ist einen unabhängigen Risikofaktor, mit einer höheren Signifikanz als Diabetestyp, Blutfettwerte oder Hypertonus [97].

### **Thrombozytopenie und MP**

Bei einer Vielzahl von Erkrankungen kann eine Thrombozytopenie auftreten. So ist zum Beispiel eine Heparin-induzierten-Thrombozytopenie (HIT) durch Bildung von Antikörper gegen Heparin (HIT-Antikörper) gekennzeichnet. Diese HIT-Antikörper sind starke Plättchenaktivatoren und führen zu einer vermehrten Plättchenaggregation, die sich klinisch durch thrombotische Komplikationen und einer Thrombozytopenie äußert. Zudem verursachen HIT-Antikörper die Abschnürung prokoagulatorischer thrombozytärer MP [98]. Dieser Effekt konnte aber nicht für alle HIT Antikörper nachgewiesen werden [99].

Die Thrombotisch-Thrombozytopenische Purpura (TTP) ist eine seltene und lebensbedrohliche Erkrankung. Dabei kommt es zur Entstehung thrombozytenreicher Thromben, die Kapillaren, besonders von Gehirn und Niere verstopfen und somit zu schwerwiegenden Organschäden führen können. Je nach Grad der Erkrankung konnte bereits ein An- und Abstieg der Anzahl thrombozytärer MP nachgewiesen werden [100]. Patienten mit einer erhöhten Konzentration an zirkulierenden thrombozytärer MP litten vermehrt unter ischämischen Ereignissen der kleinen Gefäße des zentralen Nervensystems. Dies zeigte sich klinisch als rezidivierende transitorische ischämische Attacken (TIA) [101]. Des Weiteren konnten bei Patienten mit aktiver TTP erhöhte Spiegel von Calpain im Serum und auf thrombozytären MP nachgewiesen werden. Diese waren nach Heilung des Patienten nicht mehr nachweisbar [102]. In Versuchen konnte gezeigt werden, dass Plasma von Patienten mit aktiver TTP bei Endothelzellen des Gehirns und der Niere zu einer vermehrten Bildung von MP führt [103].

Bei der paroxysmalen nächtlichen Hämoglobinurie handelt es sich um eine seltene erworbene Erkrankung der blutbildenden Stammzellen, die mit anfallsartigen hämolytischen Krisen einhergeht. Hugel et al. (1999) zeigten, dass unter anderem die Anzahl der MP vom Status der Erkrankung und der Zellzahl abhängig ist. Bei Patienten mit Panzytopenie schien eine erhöhte MP-Anzahl einen protektiven Effekt gegen Blutungen zu haben, wo hingegen eine niedrige MP-Anzahl mit einem erhöhten Risiko für hämorrhagische Komplikationen as-

soziiert war. Patienten mit normaler Zellzahl und einer erhöhten MP-Anzahl hatten ein größeres Risiko für Thrombosen, wohingegen eine normale und niedrige MP-Anzahl bei Patienten mit normaler Zellzahl einen Stillstand der Erkrankung anzeigte [104].

### **Maligne Erkrankungen und MP**

Patienten mit einer malignen Erkrankung haben ein erhöhtes Risiko für venöse thrombembolische Ereignisse. Diese gilt vor allem für Tumore des Gehirns, der Ovarien, des Pankreas und für Lymphome [105]. Zudem wird das Risiko für venöse Thrombembolien durch den Einsatz zytotoxischer Chemotherapeutika [106] oder antiangiogenetischer und hormoneller Therapienstrategien [107, 108] zusätzlich gesteigert. Es konnte bereits gezeigt werden, dass MP aus kultivierten Mammakarzinomen und Hepatozellulären Karzinomen prokoagulatorische Eigenschaften besitzen [109, 110]. Auch bei kolorektalen Karzinomen, Magenkarzinomen, Melanomen und Spinaliomen konnten bereits prokoagulatorisch wirkende MP nachgewiesen werden, welche TF exprimieren [111]. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass TF auf der Oberfläche von Mammakarzinom-MP auch in geringen Konzentrationen bereits in der Lage ist, in vivo die Gerinnungskaskade zu aktivieren [112].

Eine erhöhte Anzahl zirkulierender MP allein ist noch keinen Risikofaktor für die Entstehung von Thrombosen. Bei gesunden Probanden mit erhöhten Konzentrationen zirkulierender MP, konnte diesen nämlich nur einen gering prothrombogener Effekt nachgewiesen werden [40]. Aber im Vergleich zu einem gesunden Kollektiv exprimieren bei Patienten mit kolorektalem Karzinom etwa doppelt so viele der zirkulierenden thrombozytären MP TF [113]. Bei Patienten mit metastasiertem Mamma- und Pankreaskarzinomen und venösen thrombembolischen Komplikationen konnte ebenfalls, im Gegensatz zu einem Kollektiv aus Tumorpatienten ohne venöse Thrombembolien und Patienten mit idiopathischen Thrombembolien, ein Anstieg der zirkulierenden MP um den Faktor 2-4 und ein höherer Gehalt an zirkulierenden TF-exprimierender MP gemessen werden [114].

### **Infektionen und MP**

Bakterielle und virale Infektionen sind mit Zellaktivierung und Apoptose assozi-

iert. Bei schweren Infektionen kann es zu, zum Teil lebensbedrohlichen Komplikationen wie einer DIC (diffused intravasl coagulation) kommen. Die pathophysiologische Bedeutung der MP ist dabei Gegenstand der Forschung. Die Bildung thrombozytärer, endothelialer und leukozytärer MP ist bei entzündlichen Prozessen, wie Sepsis oder Vaskulitis, gesteigert [115, 116]. So konnten bei Patienten mit Meningokokkensepsis erhöhte Konzentrationen zirkulierender thrombozytärer, granulozytärer, monozytärer und endothelialer MP detektiert werden. Diese MP fördern die Thrombinbildung und könnten an der Entstehung einer DIC beteiligt sein [117].

Aber MP könnten bei Infektionskrankheiten auch die Rolle eines Prognosemarkers einnehmen. Bei Patienten mit HIV-1 Infektion ist die Anzahl CD4-positiver MP, die von T-Helferzellen abstammen, erhöht. Diese könnten als Marker für den programmierten Zelltod von CD4-positiven Zellen durch eine HIV-Infektion genutzt werden und somit, neben der Viruslast und der Zahl an T-Helferzellen, eine Auskunft über die Aktivität der Erkrankung geben [81].

#### **4.2. Verwendete Methode zum Nachweis von Mikropartikeln**

Die Werte für die Zahl zirkulierender MP unterschiedlicher Ursprungszellen unterscheiden sich in der Literatur erheblich [118]. Eine mögliche Ursache für diese breite Streuung der Ergebnisse liegt in interindividuellen Unterschieden, aber möglicherweise ist diese auch auf das Fehlen einer geeigneten und standardisierten Methode zum Nachweis von MP zurückzuführen. Das verwendete Messprotokoll, die Antikörperverdünnung und auch die Quelle der Probe haben großen Einfluss auf die Ergebnisse der MP-Analyse [118]. Aber auch die Art der Probengewinnung wirkt sich auf die Konzentration von MP einer Probe aus. Laut Shet et al. (2008) sind die Größe der verwendeten Nadel zur Probengewinnung, die Abnahme aus gestauter oder ungestauter Vene, die Verwendung von Vakutainern oder Spritzen und die Art der Antikoagulation (Citrat oder EDTA) Faktoren, welche die Messergebnisse beeinflussen [119]. Die Methodik zum Nachweis von MP in der vorliegenden Arbeit entspricht der von Beckermans et al. (2001) [40] und, aus unserer eigenen Forschungsgruppe, von Pihusch et al. (2006) [120]. Toth et al. (2007) konnten bei einer Untersu-

chung auf geschlechts- und zyklusabhängige Unterschiede bei 27 weiblichen und 18 männlichen gesunden Probanden im peripher venösen Blut bei Frauen im Median  $6.5 (4.3-7.8) \times 10^9/l$  und bei Männern  $3.5 (2.3-6.1) \times 10^9/l$  Annexin V-positive MP nachweisen [121]. Das verwendete Kollektiv bei Toth et al. war jünger, hatte einen  $BMI < 25$  und bestand aus Nichtrauchern und Patientinnen ohne orale Kontrazeption. Unsere weiblichen Studienpatienten sind im Schnitt um etwa 14 und die männlichen um etwa 4 Jahre älter. Rauchen und oral Kontrazeption waren keine Ausschlusskriterien in unserer Studie. Aufgrund dieser Unterschiede lassen sich die im Vergleich zu unseren Messergebnissen niedrigeren Werte für die Gesamtzahl zirkulierender MP erklären. In einer Studie an Patienten mit systemischer Sklerose, wurde in einem Kollektiv bestehend aus 15 gesunden Probanden mit einem Durchschnittlichen Alter von  $56 \pm 14$  Jahren eine Gesamtzahl von  $8.80 \pm 0.48 \times 10^9/l$  MP in peripher venösen Blut gemessen [122]. Diese Daten weisen darauf hin, dass die Maßnahmen zur Knochenmarkentnahme wie Narkose und Infusionen keinen relevanten Einfluss auf die Zahl zirkulierender MP haben und die in unsere Studie verwendete Methode zur MP-Messung plausible Werte liefert.

Die Proben der gesunden Knochenmarkspender und der Patienten während Konditionierungstherapie wurden bis zum Zeitpunkt der Messung bei  $-80^\circ\text{C}$  für einen Zeitraum von bis zu 2 Jahre gelagert. Unveröffentlichte Daten aus unserer Forschungsgruppe und Daten aus einem Review von Simak et al. (2006) [117] deuten darauf hin, dass die in den Proben enthaltenen MP bei diesen Bedingungen stabil bleiben. Dennoch ist nicht auszuschließen, dass das Einfrieren und Auftauen von Proben ein hohes Risiko in der Erzeugung von Artefakten beinhaltet. So konnte nachgewiesen werden, dass die Auftautemperatur der Proben die Messergebnisse beeinflusst. Auftauen in Eis führte zu einer Abnahme der MP-Gesamtzahl einer Probe und zur Abnahme der Zahl thrombozytärer MP, wohingegen die Zahl endothelialer MP unbeeinflusst blieb. Es zeigte sich, dass das Auftauen bei Zimmertemperatur oder bei  $37^\circ\text{C}$  zu keiner Veränderung der Messergebnisse führt [123]. Unsere Proben wurden laut Protokoll eine Stunde lang im Eiswasserbad aufgetaut. Ob dies tatsächlich zu einer Reduktion der MP-Gesamtzahl und der Zahl

thrombozytärer MP führt, sollte neben der Frage nach optimaler Aufbereitung und Lagerung von Proben Bestandteil zukünftiger Studien sein.

Als weitere mögliche Fehlerquelle bei der Auswertung der Messergebnisse sind die verwendeten Farbstoffe und Antikörper zum Nachweis der MP zu nennen. So wird in der vorliegenden Arbeit zur Bestimmung der Gesamtzahl der MP einer Probe die Zahl Annexin V-positiver MP verwendet. Mit Hilfe von Annexin V werden Partikel nachgewiesen, welche in der exoplasmatischen Seite der Zellmembran das negativ geladene Phospholipid PS tragen. Der Großteil der MP aus aktivierten Endothelzellen hat aber kein exoplasmatisches PS und bindet demnach auch kein Annexin V [52]. Mit Hilfe von spezifischen Antikörpern gegen CD62E und CD144 können MP aus aktivierten Endothelzellen besser detektiert werden als durch Bindung an Annexin V. Selbst bei MP aus apoptotischen Endothelzellen zeigte sich, dass nur etwa die Hälfte der CD 31-positiven (endotheliales Thrombozytenadhäsionsmolekül) MP auch Annexin V binden [103, 124]. Annexin V ist zudem weder spezifisch noch sensitiv für MP, da auch Zellfragmenten negativ geladene Phospholipide in der exoplasmatischen Seite der Zellmembran tragen [125]. Eine weitere Einschränkung in der Bestimmung der Gesamtzahl der MP einer Probe ergibt sich durch die Verwendung der Durchflusszytometrie. Der größte Nachteil der Durchflusszytometrie besteht darin, dass mit dieser Methode MP mit einem Durchmesser <500nm, nur schwer von Zelltrümmern unterschieden werden können [52]. Zudem können MP mit einem Durchmesser <300nm mittels Durchflusszytometrie nicht detektiert werden [118]. Trotz der genannten Einschränkungen werden im Folgenden die Annexin V-positiven MP mit der Gesamtzahl der MP einer Probe gleichgesetzt. Wegen fehlender Alternativen ist die Durchflusszytometrie weiterhin der Goldstandard für die MP-Analyse.

Der Nachweis zellspezifischer Antigene auf MP ist kein Beweis für den Ursprung der detektierten MP. So kann ein MP, nach Freisetzung von der Ursprungszelle durch Fusion wieder in die Zellmembran einer andern Zelle eingebaut werden. Diese Zelle exprimiert in der Folge zusätzlich die Antigene der Ursprungszelle des MP. Führt nun ein Reiz zur Bildung von MP aus dieser Zelle, können die neu erworbenen Antigene Bestandteil der abgeschnürten MP

sein. Somit ist der Nachweis von MP mittels zellspezifischen Antikörpern ebenfalls nicht frei von möglichen Fehlern.

### **4.3. Knochenmarkmikropartikel**

#### **Annexin-positive MP**

Die zehn gesunden Knochenmarkspender unserer Studie hatten um den Faktor 1.6 mehr MP im Knochenmarkspirat als im peripher venösen Blut. Apoptose und Proliferation stellen im Rahmen einer funktionsgerechten Regelung der Hämatopoese einen integralen Bestandteil für die Aufrechterhaltung des zellulären Gleichgewichts im Knochenmark dar. Die Hämatopoese beinhaltet die Erythropoese, Granulopoese, Lymphopoese, Thrombozytopoese und Monozytopoese. Wie Eingangs beschrieben stellen Zellaktivierung und Apoptose wichtige Mechanismen zur Bildung von MP dar. Demnach liefert der erhöhte Zellumsatz während der Hämatopoese eine Erklärung für die, im Vergleich zum peripheren Blut, höhere Konzentration an MP im Knochenmarkspirat. Es konnten bereits MP von verschiedenen Ursprungszellen (Thrombozyten, Erythrozyten, Endothelzellen, Monozyten, Granulozyten, Lymphozyten und Tumorzellen) nachgewiesen werden. Es ist aber nicht restlos geklärt, ob alle Zellen in der Lage sind MP zu bilden. Vor allem über Zellen, welche in der Regel nicht im Blutkreislauf zirkulieren, gibt es bisher keine Daten. Diese Fragen werden in kommenden Studien zu klären sein.

Die im Vergleich zum peripher venösen Blut hohe MP-Konzentration im Knochenmark könnte zudem ein weiterer Beleg für die vielfältigen Funktionen der MP sein. Wie bereits geschildert scheinen MP in der Zell-Zell Interaktion und Kommunikation eine bedeutende Rolle zu spielen. Neben dem Transfer von Oberflächenstrukturen und Zellmembran, wird auch Zytoplasma und RNA der Ursprungszelle übertragen [126]. Welche Einfluss MP auf die Regulation der Hämatopoese und des Immunsystems haben, muss noch erforscht werden.

Das Knochenmark ist ein abgeschlossenes Kompartiment mit einer strengen Kontrolle der Zellmigration in und aus dem peripheren Blut. Das Endothel der Knochenmarksinus ist eine durchgehende Schicht, mit selektivem zellulärem Transport und fungiert dadurch als Knochenmark-Blut-Barriere. Die erhöhte

MP-Konzentration im Knochenmark könnte Folge einer eingeschränkten Passage durch das Endothel der Knochenmarksinus in den Blutkreislauf sein. Dadurch könnte ein Gradient zwischen MP im Knochenmark und im peripher venösen Blut aufrechterhalten werden. In wieweit eine mögliche Verdünnung im Blutkreislauf durch das höhere zirkulierende Volumen oder Unterschiede in der Halbwertszeit von zirkulierenden und KM-MP die Ausbildung dieses Gradienten beeinflussen, muss noch geklärt werden. Des Weiteren werden die Fragen ob, in welchem Umfang und welche Art von Knochenmark-MP in den Blutkreislauf übergehen, Bestandteil zukünftiger Studien sein.

Die höhere Zahl von MP im Knochenmarkaspirat könnte aber auch von klinischer Bedeutung für Knochenmarkspender und Empfänger sein. MP interagieren durch die exoplasmatisch gelegenen, negativ geladenen Phospholipide mit verschiedenen Gerinnungsfaktoren und besitzen somit eine hohes thrombogenes Potential. Patienten nach Knochenmarktransplantation zeigen in den ersten Wochen nach der Transplantation eine erhöhte Inzidenz von katheterassoziierten Thrombosen [127]. Diese Beobachtung könnte eine Folge der Transfusion MP-reichen Materials sein. Aber nicht nur für Knochenmarkempfänger, auch für Knochenmarkspender könnte das thrombogene Potential des Knochenmarkaspirats ein Risiko darstellen. Während der Knochenmarkgewinnung durch Punktion des Beckenkammes kann es zu einer Auswaschung des Knochenmarkblutes in den Blutkreislauf kommen. Tatsächlich zeigt sich bei Patienten nach KM-Entnahme eine erhöhte Inzidenz für thrombotische Komplikationen [128].

### **Stammzellmikropartikel**

Die Anzahl CD34-positiver MP ist im Knochenmarkaspirat etwa doppelt so hoch wie im peripher venösen Blut. Das CD34-Antigen wird auf hämatopoetischen Vorläufer- und Stammzellen und auf vaskulärem Endothel- und Stromazellen exprimiert [129]. Demnach stammen nicht alle detektierten CD34-positiven MP von hämatopoetischen Vorläufer- und Stammzellen ab. Die im Vergleich zum peripher venösen Blut etwa um den Faktor 2 höhere Zahl CD34-positiver MP im Knochenmarkaspirat scheint plausibel, da beim gesunden Erwachsenen hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen vorwiegend im Knochenmark

lokalisiert sind. Warum die Zahl der CD34-positiven MP hingegen relativ gering ist, was auf eine geringe MP-Bildung durch Vorläufer- und Stammzellen hinweist, muss noch näher erforscht werden. Die geringe Zahl der zirkulierenden Stammzellen ist als Quelle der CD34-positiven MP im peripher venösen Blut zu vernachlässigen. Ein möglicher Transfer der MP aus dem Knochenmark ins peripher venöse Blut muss als Quelle in Betracht gezogen werden, welcher aber wie bereits beschrieben noch nachzuweisen ist. Wiederum zeigt sich aber ein Gradient zwischen der Zahl CD34-positiver MP im Knochenmark im Vergleich zum Blutkreislauf, was die These einer eingeschränkten Passage durch das Endothel der Knochenmarksinus unterstützen würde. Die geringe Anzahl CD34-positiver MP im peripher venösen Blut scheint aber durch MP-Bildung aus vaskulärem Endothel hinreichend erklärbar zu sein.

#### **Thromb-/megakaryozytäre MP**

Die Anzahl CD61-positiver MP ist im peripher venösen Blut um den Faktor 3.8 höher als im Knochenmarkspirat. Demnach tragen 91.5% der zirkulierenden und 14.9% der Knochenmark-MP das CD61-Antigen auf ihrer Zellmembran. Die Beobachtung, dass der größte Teil der zirkulierenden MP thrombo-/ megakaryozytären Ursprungs ist, steht im Einklang mit in der Literatur angegebenen Werten [40]. Das CD61-Antigen ist aber kein spezifischer Marker für thrombo-/megakaryozytäre MP, da dieses Integrin auch auf Monozyten exprimiert wird und demnach sowohl auf thrombozytäre, als auch monozytäre MP nachweisbar ist [33]. Ungeklärt ist bisher die Frage, ob alle zirkulierenden CD61-positiven MP thrombozytären Ursprungs sind.

Zirkulierende Thrombozyten sind in der Lage MP zu bilden, wenn sie im Blutstrom hohen Scherkräften ausgesetzt sind [130]. Ob dieser Prozess zu einer Aktivierung der Thrombozyten und demnach zu einer Expression von CD62P- noch CD63-Antigenen führt oder die Thrombozyten durch hohe Scherkräfte nicht aktiviert werden ist bisher unbekannt. Scherkräfte scheinen aber nur im Blutkreislauf an prädisponierenden Lokalisationen wie Gefäßabgänge oder Strömungshindernisse zu entstehen. Im Knochenmark scheint dieser Mechanismus aufgrund der geringen Strömungsgeschwindigkeiten zur Bildung thrombozytärer MP eher unwahrscheinlich. Im Mausmodell konnte zudem

gezeigt werden, dass ruhende Thrombozyten keine MP freisetzen [59]. Die einzigen Zellen die neben Thrombozyten im Knochenmark noch das CD61-Antigen tragen sind Megakaryozyten. Die Oberflächenantigene von Megakaryozyten unterscheiden sich nicht von denen ruhender Thrombozyten [131]. Demnach können auch die MP der beiden Zellen nicht voneinander unterschieden werden.

Die Hämatopoese ist für die verschiedenen Blutbestandteile an zum Teil anatomisch voneinander getrennten Orten im Knochenmark lokalisiert. So sind die erythropoetischen Stammzellen im Knochenmark zu Erythroblasteninseln zusammengefasst, wobei die Granulozytopoese nicht örtlich abzugrenzen ist. Die Megakaryopoese hingegen findet in direkter Nähe zum Endothel der Knochenmarksinus statt. Die Megakaryozyten strecken dünne Zytoplasmafortsätze durch die Lücken der Sinuswand in das Sinuslumen und schnüren von diesen Thrombozyten ab [132]. Demnach durchbrechen die Megakaryozyten das abgeschlossene Kompartiment und könnten neben Thrombozyten auch MP in den Blutkreislauf abgeben. Im Mausmodell konnte bereits gezeigt werden, dass prothrombozytenbildende Megakaryozyten in einem aktiv geregelten Prozess MP bilden. Dabei bestand der Hauptteil der thrombozytären MP aus CD62P-negativen MP [59]. Unsere Beobachtungen an gesunden Knochenmarkspendern bestätigen, dass 96,4% der zirkulierenden und 97,9% der CD61-positiven MP aus Knochenmarkspirat CD62P-negativ sind. Demnach scheinen die MP im Knochenmarkspirat megakaryozytären Ursprungs zu sein. In wieweit megakaryozytäre MP tatsächlich in den Blutkreislauf abgegeben werden, welchen Anteil sie an den zirkulierenden CD61-positiven MP ausmachen und ob sie sich in Funktion und Aufbau von thrombozytären CD62P-negativen-MP unterscheiden, muss in weiteren Studien genauer untersucht werden.

Zum Nachweis von MP aus aktivierten Thrombozyten wird das CD62P-Antigen verwendet. Die CD62P- (P selectin) Expression wird nach Stimulation sowohl auf der Zellmembran von Thrombozyten als auch von Endothelzellen aus intrazellulären Speichern hochreguliert. Demnach ist CD62P ebenfalls kein zellspezifischer Marker. Setzt man die Zahl CD61-positiver MP mit der Gesamtzahl thrombo-/megakaryozytärer MP gleich, so ergibt sich, dass im peripher venösen

Blut im Median 4.0% und im Knochenmarkaspirat 1.3% der thrombo/megakaryozytären MP von aktivierten Thrombozyten entstammen. Der geringe Anteil CD62P-positiver MP an der Zahl CD61-positiver MP schließt Fehler bei der Probengewinnung zudem weitgehend aus. Bei fehlerhafter Abnahme müssten die Werte für CD62P-positive MP durch eine dadurch bedingte Thrombozytenaktivierung deutlich höher ausfallen. Die hohe Zahl an endothelialen (CD144-positiven) MP im Knochenmarkaspirat, könnte zudem ein Hinweis dafür sein, dass ein Teil der CD62P-positiven MP im Knochenmarkaspirat, endothelialen Ursprungs ist. Dies wäre ein weiterer Beleg, dass die CD61-positiven MP im Knochenmarkaspirat am ehesten megakaryozytären Ursprungs sind.

Als weiteren Marker für MP aus aktivierten Thrombozyten dient das CD63-Antigen. Im peripher venösen Blut zeigte sich auch hierbei, dass nur etwa 3.8% der CD61-positiven MP ebenfalls CD63-positiv sind. Dieser Befund steht im Einklang mit den 4.0% CD62P-positiven thrombo-/megakaryozytären MP. Neben aktivierten Thrombozyten exprimieren aber auch Monozyten und Makrophagen das CD63-Antigen. Monozyten werden im Knochenmark gebildet und aus ihnen gehen in der Folge die Makrophagen hervor. Nach einer zwei- bis dreitägigen Verweildauer treten Monozyten aus dem Blut in das Gewebe über, in dem sie zu Makrophagen ausreifen. Demnach ist die Monozyten-/Makrophagenkonzentration im Knochenmark höher anzusetzen als im peripher venösen Blut. So ist die Zahl der Monozyten im peripher venösen Blut etwa bei 800/ $\mu$ l. Im Knochenmark sind hingegen zwischen 0,4-4,1% aller Zellen Monozyten [133]. Da im Knochenmark im Rahmen der Hämatopoese auch ständig Zellen in Apoptose übergehen und diese in der Folge von Makrophagen abgebaut werden müssen, verwundert es nicht, dass die Zahl der CD63-positiven MP im Knochenmarkaspirat um etwa das siebenfache höher ist als im peripher venösen Blut. Bezogen auf die Zahl Annexin V-positiver MP im Knochenmarkaspirat tragen demnach 14.7% das CD63-Antigen auf ihrer Oberfläche. Bezogen auf die Zahl CD62P-positiver MP stammt wahrscheinlich nur eine kleine Zahl dieser MP von aktivierten Thrombozyten ab. Das CD63-Protein ist zudem ein Protein, das sich in den inneren Vesikeln multivesikulärer Endosomen und in Lysosomen anderer Zellarten befindet. Es ist an vielen zellulären Prozessen wie Zellaktivierung,

-adhäsion, -differenzierung und sogar der Tumorinvasion beteiligt. Durch Fusion der Vesikel mit der Zellmembran gelangt CD63 an die exoplasmatische Seite der Zellmembran [134]. Demnach könnten CD63-positive MP, welche in großer Zahl im Knochenmark vorkommen, von einer Vielzahl lysosomenreichen Zellen, neben Monozyten und Makrophagen auch aus Neutrophilen, Eosinophilen, T- und B-Lymphozyten, dendritische Zellen und Endothelzellen, hervorgehen [135].

### **Endotheliale MP**

Im Knochenmarkspirat zeigten sich in unseren Messungen um den Faktor 2.5 mehr CD144-positive MP als im peripher venösen Blut. Das CD144-Antigen gilt als spezifischer Marker für Endothelzellen, da bisher noch keine Expression dieses Markers auf andern Blutzellen des Menschen nachgewiesen werden konnte [33]. Die hohe Zahl endothelialer MP im Knochenmark könnte durch das ausgedehnte Endothel der Sinus erklärt werden und ist zudem Ausdruck eines hohen Aktivitätsgrades des Endothels. Außerdem finden sich im Knochenmarkspirat im Vergleich zum peripher venösen Blut um den Faktor 2.1 mehr CD62E-positive MP. Das CD62E-Antigen ist ein essentielles Adhäsionsmolekül für die Integrität der Endothelzellbarriere und wird spezifisch auf aktivierten Endothelzellen exprimiert [36,37]. Bezogen auf die Zahl CD144-positiver MP tragen im peripher venösen Blut 30.7% und im Knochenmarkspirat 25.5% der MP das CD62E-Antigen auf ihrer Oberfläche. Demnach ist bezogen auf den Aktivierungsgrad nur ein geringer Unterschied zwischen zirkulierenden und Knochenmark-MP. Der Gradient, der sowohl für CD144-positive MP als auch für CD62E-positive MP zwischen Knochenmark und peripher venösem Blut besteht, spricht wiederum für eine eingeschränkte Passage der MP aus dem Knochenmarksinus in den Blutkreislauf. Wiederum ist ungeklärt, ob zirkulierende endotheliale MP ausschließlich von Gefäßen des Blutkreislaufs gebildet werden, bzw. welcher Anteil vom Endothel der Knochenmarksinus in den Blutkreislauf freigegeben wird. Dies und die Fragen nach Unterschieden in Funktion und Aufbau sind in folgenden Studien zu klären.

Von klinischer Bedeutung für Spender und Empfänger von Knochenmark ist neben der hohen Gesamtzahl an MP auch der hohe Anteil an endothelialen MP im Knochenmarkspirat (43.4%). Eine erhöhte Konzentration an endothelialen MP

wird vor allem bei Patienten mit Gefäßerkrankungen und endothelialer Dysfunktion beobachtet und besitzen ein hohes prokoagulatorisches und proinflammatorisches Potential [125].

### **Ursprungszellen der MP im Knochenmark bzw. im Blutkreislauf**

Die Zahl Annexin-positiver MP im peripher venösen Blut ist durch die Summe thrombozytärer und endothelialer und Stammzell-MP erklärt. So errechnet sich, dass 121.8% der Annexin-positiven MP von den genannten Zellen abstammen. Wie bereits beschrieben können nicht alle endothelialen MP mit Hilfe von Annexin V nachgewiesen werden. Inwieweit dies für weitere MP gilt ist nicht bekannt. Außerdem besteht die Möglichkeit, dass auf einzelnen MP mehrere zellspezifische Antigene exprimiert werden. Diese Aspekte erklären die Tatsache, dass durch Antikörpernachweis mehr MP detektiert wurden als nach Annexin-V-Färbung erwartet.

Im Knochenmarkspirat zeigten sich hingegen mehr Annexin positive MP als die durch Antikörpernachweis gemessene Summe aus Stammzell-, thrombozytären-, endothelialen- und CD63-positive MP. Die Lücke von 24% Annexin-positiver MP unklarer Herkunft ist dadurch zu erklären, dass keine erythrozytären und lymphozytären MP bestimmt wurden. Das KM als hämatopoetisches Organ und primäres lymphatisches Gewebe ist maßgeblich an der Bildung der Ursprungszellen der nicht detektierten MP beteiligt. Verwunderlich ist die Tatsache, dass scheinbar wenige dieser MP ins periphere Blut übertragen werden, da hier keine Lücke bezogen auf die Zahl Annexin-positiver MP gesehen wurde. Entweder passieren erythrozytäre und lymphozytäre MP das Endothel der Knochenmarksinus schlechter als die übrigen MP, oder sie werden im Blutkreislauf schneller abgebaut, oder der MP Austausch zwischen KM und Blutkreislauf ist zu vernachlässigen und alle MP werden im betreffenden Kompartiment von den vorhandenen Zellen gebildet. Weitere Studien sind nötig um die aufgeführten Fragen über die Verteilung und den Ursprung von MP im Knochenmark zu klären.

Zusammenfassend zeigte sich in der Analyse des Knochenmarkspirats im Vergleich zum peripher venösen Blut bei 10 gesunden Knochenmarkspendern

folgendes: (a) Das Knochenmarkaspirat enthält im Vergleich zum peripher venösen Blut deutlich mehr MP. Dabei ist (b) die Anzahl der thrombo-/megakaryozytären MP im Knochenmarkaspirat geringer als im peripher venösen Blut, in dem diese den Hauptbestandteil der MP ausmachen. Dafür (c) ist die Zahl der Stammzell-, endothelialen und CD63-positiven MP im Knochenmarkaspirat höher. (d) Zudem sind etwa ein Viertel der Annexin positiven MP im Knochenmarkaspirat unklarer Herkunft.

#### **4.4. Einfluss einer Konditionierungstherapie auf zirkulierende MP**

Ziel einer Konditionierungstherapie ist zum einen die Elimination oder zumindest die Reduktion der Zahl leukämischer Zellen und zum anderen eine Supprimierung des Immunsystems, um eine Abstoßungsreaktion gegen das Transplantat zu verhindern. Die unterschiedlichen Konditionierungsregime lassen sich in myeloablative und nicht myeloablative (dosisreduzierten) Konditionierungsregime unterteilen.

Das am häufigsten verwendete myeloablative Konditionierungsregime bei allogener Stammzelltransplantation besteht aus einer fraktionierten Ganzkörperbestrahlung (TBI) mit einer Gesamtdosis von 12Gy und einer zusätzlichen Gabe von Cyclophosphamid (Cy) [136]. Insgesamt wurden 4 Studienpatienten in die Gruppe der Konditionierung mit 12Gy TBI eingeschlossen, wobei bei diesen Patienten zusätzlich Antithymozytenglobulin (ATG) verabreicht wurde.

Wegen der immunsuppressiven Wirkung, der Aktivität gegen ein breites Spektrum von malignen, selbst chemotherapieresistenten Erkrankungen und der Wirkung an, für systemische Chemotherapie schwer zugänglichen Organen, wie das ZNS, ist die TBI seit mehr als 35 Jahren ein wichtiger Bestandteil der Konditionierungsregime von Patienten vor einer hämatopoetischen Stammzelltransplantation. Die Gesamtdosis der TBI wird heutzutage fraktioniert verabreicht, also in tägliche kleine Einzeldosen aufgeteilt. Dadurch wird die Toxizität außerhalb des Zielgewebes im Vergleich zu einer einmaligen Hochdosisbestrahlung reduziert. Da hämatopoetische Stammzellen und Tumorzellen nur eine schlechte Reparaturfähigkeit für DNA-Schäden besitzen, hat die fraktionierte Bestrahlung einen knochenmarktoxischen und antineoplastischen Effekt.

Trotz Fraktionierung kommt es als Folge einer TBI zu Zellschädigungen im Organismus. So konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass die Zahl zirkulierender Endothelzellen nach Bestrahlung, als Zeichen der endothelialen Schädigung, ansteigt [137]. Diese Schädigung könnte eine mögliche Ursache späterer Komplikationen, wie einer VOD, sein. Ein zusätzlicher Anstieg der Zahl zirkulierender endothelialer MP nach TBI konnten in den bisherigen Studien jedoch nicht nachgewiesen werden [120, 138].

Heutzutage werden vorwiegend dosisreduzierte, nicht myeloablative Konditionierungsregime verwendet. Dabei erfolgt die Elimination der Tumorzellen immunvermittelt durch Spenderlymphozyten im Rahmen der Graft-versus-Leukemia- (GVL) Reaktion [139]. Durch den Einsatz dosisreduzierter Konditionierungsregime ist eine Stammzelltransplantation auch bei älteren Patienten (>50 Lebensjahre) und bei Patienten mit schweren Begleiterkrankungen möglich. Insgesamt wurden 5 Studienpatienten mit einer dosisreduzierten Konditionierungstherapie behandelt. Dabei erhielten 3 Studienpatienten eine Chemotherapie nach dem FLAMSA-Protokoll bestehend aus Fludarabin, Cytarabin und Amsacrin, gefolgt von einer fraktionierten TBI mit 4Gy Gesamtdosis und zusätzlicher Gabe von Cy und ATG [140]. 2 Studienpatienten erhielten anstelle der 4Gy TBI und Cy das Zytostatikum Busulfan (Bu). 1 Studienpatient, der ebenfalls in die Gruppe der Konditionierung nach dem FLAMSA-Protokoll aufgenommen wurde, erhielt anstelle der dosisreduzierten 4Gy TBI eine fraktionierte myeloablative TBI mit einer Gesamtdosis von 12Gy.

In den meisten Konditionierungsregimen ist Cy zusammen mit Bu oder einer TBI enthalten. Cy wirkt wenig knochenmarktoxisch dafür stark immunsuppressiv und antineoplastisch [141]. Bei einer Konditionierung mit Bu im Vergleich zu einer Konditionierung mit TBI kommt es häufiger zu einer frühen Toxizität und zu Komplikationen wie einer VOD oder einer hämorrhagischen Cysitis [142]. Um das Risiko einer Abstoßungsreaktion zu reduzieren und zur Prophylaxe einer GvHD wird zusätzlich ATG verabreicht. In Kombination mit Cy konnte für ATG eine Reduktion der Transplantatabstoßungen und der Mortalität nachgewiesen werden [143]. Der Einsatz von ATG führt jedoch zu einem erhöhten thrombotischen Risiko [138].

Ziel der Chemotherapie nach dem FLAMSA-Protokoll ist es die Anzahl der leukämischen Zellen durch eine intensiviertere Chemotherapie zu reduzieren um dadurch einen besseren Langzeiteffekt nach dosisreduzierter Konditionierung mit 4Gy TBI zu erreichen [140, 144]. Auch bei Patienten die zur Konditionierung eine Chemotherapie erhalten zeigt sich als Zeichen der endothelialen Schädigung eine Zunahme der Zahl zirkulierender Endothelzellen [137].

Die unterschiedlichen Konditionierungsregime können ebenso wie die verschiedenen malignen Grunderkrankungen zu zahlreichen Komplikationen führen. So haben Patienten mit einer malignen Erkrankung ein erhöhtes Risiko für das Auftreten thrombotischer Komplikationen. Ursachen sind unter anderem die prokoagulatorische Aktivität der Tumorzellen und eine durch Tumorzellen vermittelte Aktivierung des Gerinnungssystems. Das Risiko für thrombotische Komplikationen steigt unter Chemotherapie bei diesen Patienten weiter an [145, 146, 147]. Fraglich ist, ob dies durch eine Zunahme der zirkulierenden MP, die eine nachgewiesene prothrombotische Wirkung besitzen, verursacht wird. Eine Therapie mit Fludarabin führt zum Beispiel zu einer Aktivierung und Schädigung endothelialer und epithelialer Zellen [148]. Wie bei anderen Chemotherapeutika oder einer TBI könnte die Epithelzellschädigung zur Bildung prothrombotischer und proinflammatorischer endothelialer und anderer zellulärer MP führen.

Inbal et al. (2004) fanden jedoch keinen signifikanten Unterschied bei zellulären MP in der Zeit vor Beginn der Konditionierungsbehandlung und Tag 0 der Stammzelltransplantation. In dieser Studie wurden 11 Patienten mit einem auf Fludarabin basierenden Regime, 6 mit Bu/Cy und 4 mit einem auf TBI basierendem Regime, konditioniert. Die Studienpatienten wurden in zwei Gruppen unterteilt, eine mit zusätzlicher ATG-Gabe und eine ohne ATG-Gabe. Innerhalb der beiden Gruppen konnten keine signifikanten Unterschiede in der Gesamtzahl zirkulierender MP oder der Zahl endothelialer MP nachgewiesen werden. Zudem gab es keine Unterschiede zwischen Patienten die mit einem auf Fludarabin basierendem Regime konditioniert wurden, verglichen mit Patienten die mit einem Standard myeloablativen Verfahren konditioniert wurden [138]. Ähnliche Ergebnisse publizierten auch Pihusch et al (2006) bei der Untersuchung zirkulierender endothelialer MP von Patienten während Konditionierungstherapie.

Die Zahl zirkulierender endothelialer MP wurde weder durch Konditionierung mit einer nicht-myeloablativen Chemotherapie und 4GY TBI noch mit einem myeloablativen Regime mit 12 GY TBI signifikant beeinflusst. Hingegen konnte bei Patienten mit akuter GvHD Grad II oder höher, nach KMT signifikant mehr von endotheliale MP detektiert werden als bei Patienten ohne akute GvHD. Infektionen als Komplikationen nach einer HSCT beeinflussten hingegen die Zahl endothelialer MP nicht. Diese Erkenntnisse wurden als Hinweis gewertet, dass in Zukunft endotheliale MP als diagnostische Marker und zur frühen Differenzierung einer akuten GvHD von anderen transplantationsbezogenen Komplikationen eingesetzt werden könnten [120].

In unserem Studienkollektiv kam es von den 6 Studienpatienten aus der Gruppe mit Konditionierung nach dem FLAMSA-Protokoll nach der Chemotherapie bei nur einem Studienpatienten (Patient 1) zu einem starken Anstieg der Zahl endothelialer MP (CD144- auf 256% und CD62E-positive MP auf 349% des Ausgangswertes). Zusammengefasst zeigte sich nach der Hochdosis-chemotherapie jedoch nur eine geringe Erhöhung der zirkulierenden CD144- und CD62E-positiven MP. Diese Daten bestätigen die Beobachtungen von Inbal et al. (2004) und Pihusch et al. (2006). Nach einer Hochdosischemotherapie nach dem FLAMSA-Protokoll kommt es zu keinem Anstieg der Zahl zirkulierender endothelialer MP, vielmehr zu einer Abnahme, welche bei den übrigen 5 Studienpatienten aus der Gruppe mit Konditionierung nach dem FLASMA-Protokoll beobachtet wurde. Zudem sank im gesamten Studienkollektiv nach 4Gy TBI die Zahl der CD144- auf 76% und die Zahl der CD62E-positiven MP auf 61% des Ausgangswertes. Ebenso zeigte sich bei allen 4 Studienpatienten in der Gruppe mit Konditionierung mit 12 Gy TBI eine Abnahme der Zahl zirkulierender endothelialer MP. In diesem Studienkollektiv sanken 2 Tage nach der letzten Bestrahlung die Zahl CD144- (auf 41%) und die CD62E-positiver MP (auf 52%).

Unsere Messungen bestätigen, dass weder ein myeloablatives Konditionierungsregime mit 12Gy TBI noch ein dosisreduziertes Konditionierungsregime mit 4Gy TBI und Chemotherapie nach dem FLAMSA-Protokoll zu einem Anstieg der zirkulierenden endothelialen MP führt. Die erhobenen Daten deuten

darauf hin, dass es vor allem nach einer TBI zu einer Reduktion der Zahl zirkulierender endothelialer MP kommt. Ob die Zahl endothelialer MP wie in der Literatur beschrieben durch verschiedene Konditionierungsregime unbeeinflusst bleibt, oder ob es, wie es unsere Daten vermuten lassen, Unterschiede zwischen den verschiedenen Regimen gibt, muss in weiteren Studien untersucht werden. Für eine valide Aussage ist die Zahl der untersuchten Patienten in der vorliegenden Arbeit zu gering. Zudem unterscheidet sich der Beobachtungszeitraum in unserer Studie von den zitierten Studien von Inbal et al. (2004) und Pihusch et al (2006).

Die verschiedenen Konditionierungsregime vor hämatopoetischer Stammzelltransplantation führen zu einer Schädigung der Hämatopoese und verursachen einen schnellen Abfall der Thrombozytenzahl. Über 90% der zirkulierenden zellulären MP sind jedoch thrombo-/megakaryozytären Ursprungs. Bei einer Untersuchung von Patienten während Konditionierungstherapie vor HSCT zeigte sich nach Chemotherapie ein signifikanter Anstieg der Zahl zirkulierender MP. Dabei gab es keinen Unterschied zwischen einer myeloablativen Therapie mit Busulfan oder einer dosisreduzierten Therapie nach dem FLAMSA-Protokoll. Eine TBI und eine Therapie mit ATG/CY führten hingegen in dieser Studie zu keiner Veränderung der Anzahl zirkulierender MP [149]. Im Gegensatz dazu wurde ein Abfall der Anzahl zirkulierender endothelialer und thrombozytärer MP bei einer Reihe von Tumorpatienten nach einer Cisplatin-Chemotherapie beobachtet [150].

Bei den 6 Studienpatienten in der Gruppe der Konditionierungstherapie nach dem FLAMSA-Protokoll zeigte sich nur bei einem Studienpatienten (Patient 5) nach der Chemotherapie ein Ansteigen der Zahl CD61-positiver MP auf 131% des Ausgangswertes. Im Durchschnitt hingegen kam es zu einem stetigen Absinken der Zahl zirkulierender CD61-, CD62P- und CD63-positiver MP und damit der Anzahl thrombozytärer MP. Jedoch zeigte sich bei allen Patienten ebenso eine stetige Abnahme der Thrombozytenzahl. Bezogen auf die Thrombozytenzahl kam es nach der Chemotherapie zu einer Zunahme der Zahl CD61- (um 28%), der CD62P- (um 39%) und der CD63- (um 11%) positiven MP pro Thrombozyt. Nach TBI mit 4Gy stieg die Zahl CD62P- auf 166% und die der

CD63-positiven MP pro Thrombozyt auf 138% bezogen auf den Ausgangswert weiter an. Demnach konnten unsere Messungen eine Abnahme der Zahl zirkulierender thrombozytärer MP nachweisen, die am ehesten auf die Abnahme der Thrombozytenzahl zurückzuführen ist. Die Zunahme der Zahl CD62P-positiven MP pro Thrombozyt spiegelt aber einen erhöhten Aktivierungsgrad der Thrombozyten wieder und könnte somit ein Risiko für thrombotische Komplikationen darstellen, welches nach Chemotherapie bekanntlich erhöht ist. Die Zunahme der Zahl CD63-positiver MP pro Thrombozyt könnte zum einen ebenfalls Ausdruck des höheren thrombozytären Aktivierungsgrades sein, zum anderen aber auch durch eine Zunahme der Aktivität des Monozyten-Makrophagen-Systems erklärt werden. Zellen des Monozyten-Makrophagen-Systems exprimieren ebenfalls das CD63-Antigen. Durch Chemotherapie und TBI, Maßnahmen welche zelltoxisch wirken, kommt es in erhöhtem Maße zu Apoptose und Zelluntergang. Diese Vorgänge führen zu einer Aktivierung des Monozyten-Makrophagen-Systems mit anschließender Phagozytose der geschädigten Zellen.

Bei der Gruppe der Patienten mit Konditionierung mit 12 Gy zeigte sich ebenfalls eine stete Abnahme der Zahl der zirkulierenden CD61-, CD62P und CD63-positiven MP. Bezogen auf die Zahl zirkulierender Thrombozyten kam es bei den Patienten nach 12Gy TBI nur zu einem Anstieg der Zahl CD63-positiver MP pro Thrombozyt auf 113% des Ausgangswertes. Dies wäre aber ebenfalls durch eine Aktivierung des Monozyten-Makrophagen-Systems zu erklären. Unsere Daten deuten darauf hin, dass es nach TBI zu keiner Thrombozytenaktivierung und zu einer Abnahme der Anzahl zirkulierender thrombozytärer MP kommt.

Eventuell kommt es als Folge der Konditionierungstherapie erst verzögert zu einem Anstieg der Anzahl zirkulierender MP. Es konnte bereits gezeigt werden, dass es nach Stammzelltransplantation zu einem signifikanten Anstieg der zellulären MP kommt. Dabei zeigte sich ein Anstieg thrombozytärer, endothelialer und monozytärer MP bis zu 4 Wochen nach Transplantation [151]. Demnach ist das Ansteigen der Zahl zirkulierender MP unterschiedlicher Herkunft auch nicht durch Transfusion von im Transplantat enthaltenen MP verursacht, da deren Halbwertszeit viel geringer einzuschätzen ist. Fraglich ist, ob die Konditionierungstherapie oder die Stammzelltransplantation dafür ursächlich sind. Bei der

Untersuchung von Patienten mit Komplikationen nach allogener Stammzelltransplantation, wie VOD, pulmonaler Vaskulopathie und thrombotischer Mikroangiopathie konnte ebenfalls ein Anstieg der thrombozytären, endothelialen und monozytären MP beobachtet werden [151].

Es sind jedoch weitere Studien zur Erforschung der Ursachen des MP-Anstiegs bei diesen Patienten nötig. Erst dann könnten in Zukunft MP als diagnostische Marker bei Patienten nach Stammzelltransplantation Bedeutung erlangen.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass es nach FLAMS-Chemotherapie zu einer geringen Erhöhung der Zahl zirkulierender endothelialer MP kommt, wobei diese bei Patienten nach 12Gy TBI um etwa die Hälfte abnahm. Die Zahl zirkulierender thrombozytärer MP nahm sowohl nach FLAMSA-Chemotherapie, als auch nach 12 Gy TBI kontinuierlich ab. Jedoch konnte nur bei den Studienpatienten mit Konditionierung mit FLAMSA-Chemotherapie ein Anstieg der Zahl CD62P-positiver MP pro Thrombozyt nachgewiesen werden, was auf einen höheren Aktivierungsgrad der Thrombozyten schließen lässt.

#### **4.5. Stärken und Schwächen**

Die vorliegende Arbeit besitzt aus Sicht des Autors Stärken und Schwächen. Zu den Stärken der Arbeit zählt unter anderem die zur Gewinnung, Aufbereitung und Nachweis der MP verwendete Methode. Diese wurde unter anderem von Beckermans et al. und Nieuwland et al. in zahlreichen Arbeiten, die viel zum Verständnis und der Erforschung der MP beigetragen haben, ebenfalls zum Nachweis von MP bei unterschiedlichen Fragestellungen herangezogen und ist als etablierte Methode anerkannt. Durch die Verwendung zellspezifischer Antikörper konnte zudem belegt werden, dass es durch die Probengewinnung zu keiner Zellaktivierung mit hieraus resultierender MP-Bildung gekommen ist. Eine weitere Stärke der vorliegenden Arbeit liegt in der engmaschigen Probengewinnung in der Studiengruppe mit Konditionierungstherapie. Diese ermöglicht eine Untersuchung einer möglichen Zellaktivierung mit Erhöhung der MP-Zahl im Verlauf in Abhängigkeit von der Anzahl der unterschiedlichen Konditionierungsmaßnahmen. Ebenfalls als Stärke der Arbeit ist die Tatsache zu Werten,

dass eine Probengewinnung erst nach Zustimmung des Patienten und parallel zu den geplanten Probengewinnungen zur Therapiekontrolle (Studiengruppe mit Konditionierungstherapie) bzw. Knochenmarkgewinnung (Studiengruppe der gesunden Knochenmarkspender) erfolgte. Die zur Bestimmung der MP gewonnen Proben waren zudem von geringen Volumen und damit von geringer Belastung für den Patienten. So wurden insgesamt nur 10ml Knochenmarkaspirat bzw. 10ml venöses Blut je Patient für die MP-Bestimmung zusätzlich entnommen, da die Proben für die Bestimmung der Blutbestandteile Teil der geplanten Diagnostik des jeweiligen Patienten waren.

Eine Schwäche der vorliegenden Arbeit stellt unter anderem die geringe Fallzahl in der Patientengruppe während Konditionierung dar. Diese erlaubt nur eine descriptive statistische Auswertung der Daten, welche aber teilweise die in der Literatur bereits beschriebenen Erkenntnisse bestätigen konnte. Mögliche Fehlerquellen, liegen zudem in der noch weitgehend unerforschten Halbwertszeit der MP im menschlichen Organismus. Bei einer Halbwertszeit von fünf bis sechs Stunden, wie von unserer Forschungsgruppe beschrieben [62], wären die Unterschiede zwischen Konditionierungsmaßnahme und Zeitpunkt der Probengewinnung zwischen den verschiedenen Patienten und bei den einzelnen Patienten im Verlauf von Bedeutung. Obwohl die Proben der einzelnen Patienten jeweils zum gleichen Tageszeitpunkt entnommen wurden, variieren diese interindividuell und intraindividuell stark in der Zeitspanne zwischen Zeitpunkt der Konditionierungsmaßnahme und der Probengewinnung. Des Weiteren ist nicht hinreichend geklärt wie sich die Ergebnisse durch unterschiedlich lange Lagerung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  und den Auftauprozess zur Probenanalyse von einer direkten Messung unterscheiden. Daten unserer Forschungsgruppe deuten zwar an, dass die Proben bei  $-80^{\circ}\text{C}$  stabil bleiben und die Ergebnisse vom Auftauprozess unbeeinflusst sind, valide Daten fehlen aber bislang. Eine Schwäche zeigt sich zudem in der Inhomogenität der Studiengruppe in Konditionierungstherapie bezüglich der Grunderkrankung und Therapie. Diese Inhomogenität erschwert zudem eine Wertung der gewonnen Daten.

Auch bei der Studiengruppe der gesunden Knochenmarkspender ist die geringe Zahl an Studienpatienten kritisch zu werten. Des Weiteren wurden in dieser Studiengruppe mögliche Einflussfaktoren auf die Zahl zirkulierender MP, wie z.B. Nikotinabusus, arterielle Hypertonie oder arteriosklerotische Erkrankungen nicht näher erfasst. Faktoren, welche einen Einfluss auf die Zahl der Knochenmarkmikropartikel haben, wurden bisher in der Literatur noch nicht beschrieben. Die zum Nachweis der MP verwendeten Farbstoffe und Antikörper sind zum größten Teil nicht spezifisch und beinhalten damit, wie bereits beschrieben, eine zu beachtende Fehlerquelle. Zudem können Oberflächenstrukturen durch MP auf Zellen übertragen werden. MP aus diesen Zellen exprimieren somit nicht nur die zellspezifischen Antigene, sondern auch zellfremde, zuvor übertragene Oberflächenstrukturen.

## **5. Zusammenfassung**

Die vorliegende Arbeit untersuchte zum einen MP im Knochenmarkaspirat bezüglich ihrer Gesamtzahl und ihres Ursprungs und zum anderen den Einfluss einer Konditionierungstherapie auf die Anzahl zirkulierender thrombozytärer und endothelialer MP.

Bei gesunden Knochenmarkspendern enthält das Knochenmarkaspirat eine signifikant höhere Gesamtzahl an MP als das peripher venöse Blut. Die Anzahl der thrombo-/megakaryozytären MP ist im Knochenmarkaspirat geringer als im peripher venösen Blut, wo diese den Hauptbestandteil der MP ausmachen. Die Zahl der stammzell-, endothelialen und CD63-positiven MP ist im Knochenmarkaspirat hingegen signifikant höher. Etwa ein Viertel der in dieser Arbeit bestimmten Annexin-positiven MP im Knochenmarkaspirat sind unklarer Herkunft. Es ist anzunehmen, dass es sich hierbei um erythrozytäre und lymphozytäre MP handelt.

Unbekannt ist, ob das Knochenmark als abgeschlossenes Kompartiment dort gebildete MP freigegeben kann. Eine eingeschränkte Passage der MP könnte aber die beobachteten erhöhten MP-Konzentrationen im Knochenmarkaspirat erklären. Megakaryozyten strecken dünne Zytoplasmafortsätze in das Sinuslumen. An einem Mausmodell wurde gezeigt, dass Megakaryozyten neben Thrombozyten auch MP abschnüren können. Zu welchen Teilen die zirkulierenden CD61-positiven MP thrombo- oder megakaryozytären Ursprungs sind wird in zukünftigen Studien geklärt werden müssen.

Die Analyse der Proben von Patienten während der verschiedenen Konditionierungstherapien zeigte, dass es sowohl nach einer Chemotherapie nach dem FLAMSA-Protokoll als auch nach 12Gy TBI zu einer Abnahme der Zahl zirkulierender endothelialer und CD61-positiver MP kommt. Insgesamt war die Studiengruppe zu klein und inhomogen für eine inferenzstatistische Auswertung. Die erhobenen Daten stehen aber im Einklang mit publizierten Daten. Bevor MP in Zukunft im klinischen Alltag für die Diagnostik und Therapie verschiedener Erkrankungen bedeutsam werden können, müssen verbleibende Fragen nach der patho- und physiologischen Funktion, der Herkunft und den Entstehungsmechanismen geklärt werden.

## **6. Ausblick**

Es gibt bereits eine Reihe von Hinweisen für das Potential von MP als therapeutisches Hilfsmittel im Bereich der Stammzelltransplantation.

So können Stammzellen, die durch Stammzellapherese gewonnen wurden, zu einer schnelleren hämatopoetischen Regeneration führen als Stammzellen, die durch Knochenmarkpunktion gewonnen wurden [152]. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung lautet wie folgt: Durch Stammzellapherese gewonnene Stamm- und Vorläuferzellen weisen eine höhere Zahl thrombozytärer MP auf ihrer Oberfläche auf [153]. Im Rahmen der Stammzellapherese kommt es unter anderem zu einer Aktivierung von Thrombozyten und zur Bildung von thrombozytären MP [82]. Diese können an hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen binden und dabei thrombozytären Adhäsionsmoleküle wie CXCR4 und CD62P übertragen [154]. Die übertragenen thrombozytären Antigene führen zu einer verbesserten Adhäsion am Endothel und könnten somit das sogenannte Homing fördern, das die Wanderung der Zellen aus dem Blut ins Knochenmark beschreibt.

Zudem konnte gezeigt werden, dass thrombozytäre MP das Überleben von menschlichen hämatopoetischen CD34-positiven Vorläuferzellen verlängern und die Proliferation von Stammzellen stimulieren [155]. Nach Transplantation von Stammzellen aus Nabelschnurblut kam es zu einer Verkürzung der Zeitspanne bis zur hämatopoetischen Regeneration bei hoher Expression der beschriebenen Adhäsionsmoleküle auf den Spenderzellen [156, 157].

Eventuell könnte in Zukunft eine Behandlung von Stamm- und Vorläuferzellen mit thrombozytären MP zu einer Beschleunigung des Anwachsens des Transplantats und damit zu einer schnelleren Regeneration der Hämatopoese und Wiederherstellung des Immunsystems führen. Vor einer klinischen Erforschung der beschriebenen Zusammenhänge gibt es noch eine Vielzahl von Fragen für die Grundlagenforschung. So ist zum Beispiel noch zu klären welche Oberflächenproteine auf den thrombozytären MP exprimiert werden müssen, um das Homing zu beschleunigen, wie diese MP gewonnen werden können und welche Mechanismen zu einer Bindung der MP an die Stammzellen führen.

## 7. Literaturverzeichnis

- (1) Jacobson LO, Simmons EL, Marks EK, Eldredge JH: Recovery from radiation injury. *Science* 1951;113: 510-511.
- (2) Lorenz E, Uphoff D, Reid TR, Shelton E: Modification of irradiation injury in mice and guinea pigs by bone marrow injections. *J Natl Cancer Inst* 1951; 12: 197-201.
- (3) Trentin JJ: Mortality and skin transplantability in X-irradiated mice receiving isologous, homologous or heterologous bone marrow. *Proc Soc Exp Biol Med* 1956;92: 688-693.
- (4) Thomas ED, Lochte HL, Lu WC., Ferrebee JW: Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy. *New Eng J Med* 1957; 257: 491-496.
- (5) Gratwohl A, Schmid O, Baldomero H, Horisberger B, Urbano-Ispizua A: Haematopoietic stem cell transplantation (HSCT) in Europe 2002. Changes in indication and impact of team density. A report of the EBMT activity survey. *Bone Marrow Transplantation* 2004; 34: 855-875.
- (6) Gratwohl A: Bone marrow transplantation activity in Europe 1990. Report from the European Group for Bone Marrow Transplantation (EBMT). *Bone Marrow Transplant* 1991; 8: 197-201.
- (7) Schleuning M, Kolb HJ, Waterhouse C, Holler E: Hämatopoetische Stammzelltransplantation. Manual Leukämien, myelodysplastische und myeloproliferative Syndrome 2003; 169-184.
- (8) Siena S, Schiavo R, Pedrazzoli P, Carlo-Stella C: Therapeutic relevance of CD34 cell dose in blood cell transplantation for cancer therapy. *J Clin Oncol* 2000; 18(18): 3319-3320.
- (9) Gratwohl A, Passweg J, Baldomero H, Hermans J: Blood and marrow transplantation activity in Europe 1997. European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). *Bone Marrow Transplant* 1999; 24(3): 231-245.
- (10) Schleuning M: Adoptive allogeneic immunotherapy - history and future perspectives. *Transfus Sci* 2000; 23: 133-150.
- (11) Storb R, Yu C, Wagner JL: Stable mixed hematopoietic chimerism in DLA identical littermate dogs given sublethal total body irradiation before and pharmacological immunosuppression after marrow transplantation. *Blood* 1997; 89: 3048-3054.
- (12) McSweeney PA, Niederwieser D, Shizuru JA: Hematopoietic cell transplantation in older patients with hematologic malignancies:

- Replacing high-dose cytotoxic therapy with graft-versus-tumor effects. *Blood* 2001; 97: 3390-3400.
- (13) Ferrara JL, Levine JE, Reddy P, Holler E: Graft-versus-host disease. *Lancet* 2009; 373: 1550-1561.
- (14) Carella AM, Champlin R, Slavin S, McSweeney P, Storb R: Mini-allografts: ongoing trials in humans. *Bone Marrow Transplant* 2000; 25: 345-350.
- (15) Crawford SW: Noninfectious lung disease in the immunocompromised host. *Respiration* 1999; 66: 385-395.
- (16) Srivastava A, Poonkuzhali B, Shaji RV, George B, Mathews V, Chandy M, Krishnamoorthy R: Glutathione S-transferase M1 polymorphism: a risk factor for hepatic venoocclusive disease in bone marrow transplantation. *Blood* 2004; 104(5): 1574-1577.
- (17) Shulman HM, McDonald GB, Matthews D: An analysis of hepatic venoocclusive disease and centrilobular hepatic degeneration following bone marrow transplantation. *Gastroenterology* 1980; 79: 1178-1191.
- (18) Bearman SI, Appelbaum FR, Buckner CD, Petersen FB, Fisher LD, Clift RA, Thomas ED: Regimen-related toxicity in patients undergoing bone marrow transplantation. *J Clin Oncol* 1988; 6: 1562-1568.
- (19) Dulley FL, Kanfer EJ, Appelbaum FR, Amos D, Hill RS, Buckner CD, Shulman HM, McDonald GB, Thomas ED: Venoocclusive disease of the liver after chemoradiotherapy and autologous bone marrow transplantation. *Transplantation* 1987; 43: 870-873.
- (20) McDonald GB, Hinds MS, Fisher LD, Schoch HG, Woldford JL, Banaji M: Veno-occlusive disease of the liver and multiorgan failure after bone marrow transplantation: a cohort study of 355 patients. *Ann Intern Med* 1993; 118: 255-267.
- (21) Jones RJ, Lee KSK, Beschoner WE, Vogel VG, Grochow LB, Braine HG: Veno-occlusive disease of the liver following bone marrow transplantation. *Transplantation* 1987; 44: 778-783.
- (22) Kalayoglu-Besisik S, Yenerel MN, Caliskan Y: Time-related changes in the incidence, severity, and clinical outcome of hepatic veno-occlusive disease in hematopoietic stem cell transplantation patients during the past 10 years. *Transplant Proc* 2005; 37: 2285-2289.
- (23) Soubani AO: Critical care considerations of hematopoietic stem cell transplantation. *Crit Care Med* 2006; 34(9): 251-267.

- (24) Ordemann R, Naumann R, Geissler G, Bornhauser M, Schuler U, Ehninger G: Encouraging results in the treatment of haemorrhagic cystitis with estrogen - report of 10 cases and review of the literature. *Bone Marrow Transplantation* 2000; 25: 981-985.
- (25) Afessa B, Tefferi A, Hoagland HC: Outcome of recipients of bone marrow transplants who require intensive-care unit support. *Mayo Clin Proc* 1992; 67: 117-122.
- (26) Soubani AO, Kseibi E, Bander JJ: Outcome and prognostic factors of hematopoietic stem cell transplantation recipients admitted to a medical ICU. *Chest* 2004; 126: 1604-1611.
- (27) Chargaff E, West R: The biological significance of the thromboplastic protein of blood. *J Biol Chem* 1946; 166: 189-197.
- (28) Wolf P: The nature and significance of platelet products in human plasma. *Br J Haematol* 1967; 13(3): 269-288.
- (29) Warren BA, Vales O: The release of vesicles from platelets following adhesion to vessel walls in vitro. *Br J Exp Pathol* 1972; 53(2): 206-15.
- (30) Heijnen HF, Schiel AE, Fijnheer R, Geuze HJ, Sixma JJ: Activated platelets release two types of membrane vesicles: microvesicles by surface shedding and exosomes derived from exocytosis of multivesicular bodies and alpha-granules. *Blood* 1999; 94: 3791-3799.
- (31) Sims PJ, Wiedmer T, Esmon CT, Weiss HJ, Shattil SJ: Assembly of the platelet prothrombinase complex is linked to vesiculation of the platelet plasma membrane: studies in Scott syndrome: an isolated defect in platelet procoagulant activity. *J Biol Chem* 1989; 264: 17049-17057.
- (32) Thery C, Zitvogel L, Amigorena S: Exosomes: Composition, biogenesis and function. *Nat Rev Immunol* 2002; 3: 569-579.
- (33) Shet AS: Characterizing blood microparticles: Technical aspects and challenges. *Vascular Health and Risk Management* 2008; 4(4): 769-774.
- (34) Hristov M, Erl W, Linder S, Weber PC: Apoptotic bodies from endothelial cells enhance the number and initiate the differentiation of human endothelial progenitor cells in vitro. *Blood* 2004; 104(9): 2761-2766.
- (35) VanWijk MJ, VanBavel E, Sturk A, Nieuwland R: Microparticles in cardiovascular diseases. *Cardiovasc Res* 2003; 59: 277-287.
- (36) Munro JM, Pober JS, Cotran RS: Recruitment of neutrophils in the local endotoxin response: association with de novo endothelial expression of

- endothelial leukocyte adhesion molecule-1. *Lab Invest* 1991; 64: 295-299.
- (37) Newman W, Beall LD, Carson CW, Hunder GG, Graben N, Randhawa ZI, Gopal TV, Wiener-Kronish J, Matthay MA: Soluble E-selectin is found in supernatants of activated endothelial cells and is elevated in the serum of patients with septic shock. *J Immunol* 1993; 150: 644-654.
- (38) Bevilacqua MP, Nelson RM: Selectins. *J Clin Invest* 1993; 91(2): 379-387.
- (39) Lampugnani MG, Resnati M, Raiteri M, Pigott R, Pisacane A, Houen G, Ruco LP, Dejana E: A Novel Endothelial-Specific Membrane Protein Is a Marker of Cell-Cell Contacts. *The Journal of Cell Biology* 1992; 118(6): 1511-1522.
- (40) Berckmans RJ, Nieuwland R, Boing AN: Cell-derived microparticles circulate in healthy humans and support low grade thrombin generation. *Thromb Haemost* 2001; 85(4): 639-646.
- (41) VanWijk MJ, Nieuwland R, Boer K: Microparticle subpopulations are increased in pre-eclampsia: possible involvement in vascular dysfunction? *Am J Obstet Gynecol* 2002; 187: 450-456.
- (42) Benutzerhandbuch Becton Dickinson 1999: 2
- (43) Sack U, Tárnok A, Rothe G (Hrsg): Zelluläre Diagnostik: Grundlagen, Methode und klinische Anwendung der Durchflusszytometrie. Basel, Karger 2007; 27-70.
- (44) Freyssinet JM: Cellular microparticles: what are they bad or good for? *J Thromb Haemost* 2003; 1: 1655-1662.
- (45) Devaux PF: Static and dynamic lipid asymmetry in cell membranes. *Biochemistry* 1991; 30: 1163-1173.
- (46) Zwaal RFA, Schroit AJ: Pathophysiologic implications of membrane phospholipid asymmetry in blood cells. *Blood* 1997; 89: 1121-1132.
- (47) Seigneuret M, Devaux PF: ATP-dependent asymmetric distribution of spin-labeled phospholipids in the erythrocyte membrane: Relation to shape changes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81: 3751-3755.
- (48) Connor J, Pak CH, Zwaal RF: Bidirectional transbilayer movement of phospholipid analogs in human red blood cells. Evidence for an ATP-dependent and protein-mediated process. *J Biol Chem* 1992; 267: 19412-19417.

- (49) Morel O, Morel N, Freyssinet JM, Toti F: Platelet microparticles and vascular cells interactions: a checkpoint between the haemostatic and thrombotic responses. *Platelets* 2008; 19(1): 9-23.
- (50) Sims PJ, Wiedmer T: Unraveling the mysteries of phospholipid scrambling. *Thromb Haemost* 2001; 86: 266-275.
- (51) Basse F, Gaffet P, Bienvenue A: Correlation between inhibition of cytoskeleton proteolysis and anti-vesiculation effect of alpeptin during A23187-induced activation of human platelets: are vesicles shed by filopod fragmentation? *Biochim Biophys Acta* 1994; 1190: 217-224.
- (52) Nomura S, Ozaki Y, Ikeda Y: Function and role of microparticles in various clinical settings. *Thrombosis Research* 2008; 123(1): 8-23.
- (53) Tesse A, Martínez MC, Meziani F, Hugel B, Panaro MA, Mitolo V, Freyssinet JM, Andriantsitohaina R: Origin and biological significance of shed-membrane microparticles. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets* 2006; 6(3): 287-294.
- (54) Fox JE, Austin CD, Reynolds CC, Steffen PK: Evidence that agonist-induced activation of calpain causes the shedding of procoagulant-containing microvesicles from the membrane of aggregating platelets. *J Biol Chem* 1991; 266: 13289-13295.
- (55) Freyssinet JM, Toti F, Hugel B, Gidon-Jeangirard C, Kunzelmann C, Martinez MC, Meyer D: Apoptosis in vascular disease. *Thromb Haemost* 1999; 82: 727-735.
- (56) Combes V, Simon AC, Grau GE: In vitro generation of endothelial microparticles and possible prothrombotic activity in patients with lupus anticoagulant. *J Clin Invest* 1999; 104(1): 93-102.
- (57) Satta N, Toti F, Feugeas O, Bohbot A, Dachary-Prigent J, Eschwege V, Hedman H, Freyssinet JM: Monocyte vesiculation is a possible mechanism for dissemination of membrane-associated procoagulant activities and adhesion molecules after stimulation by lipopolysaccharide. *J Immunol* 1994; 153: 3245-3255.
- (58) Diamant M, Nieuwland R, Pablo RF, Sturk A, Smit JW, Radder JK: Elevated Numbers of Tissue-Factor Exposing Microparticles Correlate With Components of the Metabolic Syndrome in Uncomplicated Type 2 Diabetes Mellitus. *Circulation* 2002; 106(19): 2442-2447.
- (59) Flaumenhaft R, Dilks JR, Richardson J, Alden E, Patel-Hett SR, Battinelli E, Klement GL, Sola-Visner M, Italiano JE Jr: Megakaryocyte-derived microparticles: direct visualization and distinction from platelet-derived microparticles. *Blood* 2009; 113(5): 981-982.

- (60) Flaumenhaft R: Formation and fate of platelet microparticles. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* 2006; 36: 182-187.
- (61) Rand ML, Wang H, Bang KW, Packham MA, Freedman J: Rapid clearance of procoagulant platelet-derived microparticles from the circulation of rabbits. *J Thromb Haemost* 2006; 4: 1621-1623.
- (62) Rank A, Nieuwland R, Crisp A, Grützner S, Iberer M, Toth B, Pihusch R. Clearance of platelet microparticles in vivo. *Platelets* 2011; 22(2): 111-116.
- (63) Morel O, Toti F, Hugel B, Bakouboula B, Camoin-Jau L, Dignat-George F, et al. Procoagulant microparticles: disrupting the vascular homeostasis equation? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26: 2594-2604.
- (64) Toti F, Satta N, Fressinaud E, Meyer D, Freyssinet JM: Scott syndrome, characterized by impaired transmembrane migration of procoagulant phosphatidylserine and hemorrhagic complications, is an inherited disorder. *Blood* 1996; 87: 1409-1415.
- (65) Mann KG: Biochemistry and physiology of blood coagulation. *Thromb Haemost* 1999; 82: 165-174.
- (66) Barry OP, Pratico D, Lawson JA, FitzGerald GA: Transcellular activation of platelets and endothelial cells by bioactive lipids in platelet microparticles. *J Clin Invest* 1997; 99: 2118-2127.
- (67) Barry OP, Pratico D, Savani RC, FitzGerald GA: Modulation of monocyte-endothelial cell interactions by platelet microparticles. *J Clin Invest* 1998; 102: 136-144.
- (68) Forlow SB, McEver RP, Nollert MU: Leukocyte-leukocyte interactions mediated by platelet microparticles under flow. *Blood* 2000; 95: 1317-1323.
- (69) Jy W, Mao WW, Horstman LL, Tao J, Ahn YS: Platelet microparticles bind, activate and aggregate neutrophils in vitro. *Blood Cells Molecules Dis* 1995; 21: 217-231.
- (70) Müller I, Klocke A, Alex M, Kotzsch M, Luther T, Morgenstern E, Zieseniss S, Zahler S, Preissner K, Engelmann B: Intravascular tissue factor initiates coagulation via circulating microvesicles and platelets. *FASEB J* 2003; 17: 476-478.
- (71) Scholz T, Temmler U, Krause S, Heptinstall S, Losche W: Transfer of tissue factor from platelets to monocytes: Role of platelet-derived microvesicles and CD62P. *Thromb Haemost* 2002; 88: 1033-1038.

- (72) Sinauridze EI, Kireev DA, Popenko NY, Pichugin AV, Panteleev MA, Krymskaya OV: Platelet microparticle membranes have 50- to 100-fold higher specific procoagulant activity than activated platelets. *Thromb Haemost* 2007; 97: 425-434.
- (73) Iwamoto S, Kawasaki T, Kambayashi J, Ariyoshi H, Shinoki N, Sakon M, Ikeda Y, Monden M: The release mechanism of platelet-activating factor during shear-stress induced platelet aggregation. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 239(1): 101-105.
- (74) Satta N, Freyssinet JM, Toti F: The significance of human monocyte hrombomodulin during membrane vesiculation and after stimulation by ipopolysaccharide. *Br J Haematol* 1997; 96: 534-542.
- (75) Mesri M, Altieri DC: Endothelial cell activation by leukocyte microparticles. *J Immunol* 1998; 161(8): 4382-4387.
- (76) Mesri M, Altieri DC: Leukocyte microparticles stimulate endothelial cell cytokine release and tissue factor induction in a JNK1 signaling pathway. *J Biol Chem* 1999; 274: 23111-23118.
- (77) Patel KD, Zimmerman GA, Prescott SM, McIntyre TM: Novel leukocyte agonists are released by endothelial cells exposed to peroxide. *J Biol Chem* 1992; 267(21):15168-15175.
- (78) Huber J, Vales A, Mitulovic G: Oxidized membrane vesicles and blebs from apoptotic cells contain biologically active oxidized phospholipids that induce monocyte-endothelial interactions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22(1): 101-107.
- (79) Taraboletti G, D'Ascenzo S, Borsotti P, Giavazzi R, Pavan A, Dolo V: Shedding of the matrix metalloproteinases MMP-2, MMP-9, and MT1-MMP as membrane vesicle-associated components by endothelial cells. *Am J Pathol* 2002; 160: 673-680.
- (80) Deregibus MC, Cantaluppi V, Calogero R: Endothelial progenitor cell derived microvesicles activate an angiogenic program in endothelial cells by a horizontal transfer of mRNA. *Blood* 2007; 110: 2440-2448.
- (81) Aupeix K, Hugel B, Martin T, Bischoff P, Lill H, Pasquali J-L, Freyssinet J-M: The significance of shed membrane particles during programmed cell death in vitro and in vivo in HIV-1 infection. *J Clin Invest* 1997; 99(7): 1546-1554.
- (82) Barry OP, FitzGerald GA: Mechanisms of cellular activation by platelet microparticles. *Thromb Haemost* 1999; 82: 794-800.

- (83) Merten M, Pakala R, Thiagarajan P, Benedict CR: Platelet microparticles promote platelet interaction with subendothelial matrix in a glycoprotein IIb/IIIa-dependent mechanism. *Circulation* 1999; 99: 2577-2582.
- (84) Nomura S, Kanazawa S, Fukuhara S: Effects of efonidipine on platelet and monocyte activation markers in hypertensive patients with and without type 2 diabetes mellitus. *J Hum Hypertens* 2002; 16(8): 539-547.
- (85) Chironi G, Simon A, Hugel B, Del Pino M, Gariepy J, Freyssinet JM: Circulating leukocyte-derived microparticles predict subclinical atherosclerosis in asymptomatic subjects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26: 2775-2780.
- (86) Mallat Z, Hugel B, Ohan J, Leseche G, Freyssinet JM, Tedgui A: Shed membrane microparticles with procoagulant potential in human atherosclerotic plaques. *Circulation* 1999; 99: 348-353.
- (87) Leroyer AS, Isobe H, Lesèche G, Castier Y, Wassef M, Mallat Z: Cellular origins and thrombogenic activity of microparticles isolated from human atherosclerotic plaques. *J Am Coll Cardiol* 2007; 49: 772-777.
- (88) Katopodis JN, Kolodny L, Jy W, Horstman LL, De Marchena EJ, Tao JG: Platelet microparticles and calcium homeostasis in acute coronary ischemias. *Am J Hematol* 1997; 54: 95-101.
- (89) Bernal-Mizrachi L, Jy W, Jimenez JJ, Pastor J, Mauro LM, Horstman LL: High levels of circulating endothelial microparticles in patients with acute coronary syndromes. *Am Heart J* 2003; 145: 962-970.
- (90) Boulanger CM, Scoazec A, Ebrahimian T, Henry P, Mathieu E, Tedgui A: Circulating microparticles from patients with myocardial infarction cause endothelial dysfunction. *Circulation* 2001; 104: 2649-2652.
- (91) Rössig L, Haendeler J, Mallat Z, Hugel B, Freyssinet JM, Tedgui A, Dimmeler S, Zeiher AM: Congestive heart failure induces endothelial cell apoptosis: protective role of carvedilol. *J Am Coll Cardiol* 2000; 36: 2081-2089.
- (92) Rössig L, Hoffmann J, Hugel B, Mallat Z, Haase A, Freyssinet JM, Tedgui A, Aicher A, Zeiher AM, Dimmeler S: Vitamin C inhibits endothelial cell apoptosis in congestive heart failure. *Circulation* 2001; 104: 2182-2187.
- (93) Nieuwland R, Berckmans RJ, Rotteveel-Eijkman RC, Maquelin KN, Roozendaal KJ, Jansen PGM, ten Have K, Eijssman L, Hack CE, Sturk A: Cell-derived microparticles generated in patients during cardiopulmonary bypass are highly procoagulant. *Circulation* 1997; 96: 3534-3541.

- (94) Sabatier F, Darmon P, Hugel B, Combes V, Sanmarco M, Velut JG, Arnoux D, Charpiot P, Freyssinet JM, Oliver C, Sampol J, Dignat-George F: Type 1 and type 2 diabetic patients display different patterns of cellular microparticles. *Diabetes* 2002; 51(9): 2840-2845.
- (95) Omoto S, Nomura S, Shouzu A, Nishikawa M, Fukuhara S, Iwasaka T: Detection of monocyte-derived microparticles in patients with Type II diabetes mellitus. *Diabetologia* 2002; 45(4): 550-555.
- (96) Omoto S, Nomura S, Shouzu A: Significance of platelet-derived microparticles and activated platelets in diabetic nephropathy. *Nephron* 1999; 81: 271-277.
- (97) Koga H, Sugiyama SD, Kugiyama K, Watanabe K, Fukushima H, Tanaka T: Elevated levels of VE-cadherin-positive endothelial microparticles in patients with type 2 diabetes mellitus and coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 2005; 45: 1622-1630.
- (98) Warkentin TE, Hayward CPM, Boshkov LK, Santos AV, Sheppard JA, Bode AP: Sera from patients with heparin-induced thrombocytopenia generate platelet-derived microparticles with procoagulant activity: an explanation for the thrombotic complications of heparin-induced thrombocytopenia. *Blood* 1994; 84: 3691-3699.
- (99) Greinacher A, Juhl D, Strobel U, Wessel A, Lubenow N, Selleng K: Heparin-induced thrombocytopenia: a prospective study on the incidence, platelet-activating capacity and clinical significance of antiplatelet factor 4/ heparin antibodies of the IgG, IgM, and IgA classes. *J Thromb Haemost* 2007; 5: 1666-1673.
- (100) Galli M, Grassi A, Barbui T: Platelet-derived microparticles in thrombotic thrombocytopenic purpura and hemolytic uremic syndrome. *Thromb Haemost* 1996; 75: 427-431.
- (101) Jy W, Horstman LL, Arce M, Ahn YS: Clinical significance of platelet microparticles in autoimmune thrombocytopenias. *J Lab Clin Med* 1992; 119: 334-345.
- (102) Kelton JG, Warkentin TE, Hayward CPM, Murphy WG, Moore JC: Calpain activity in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura is associated with platelet microparticles. *Blood* 1992; 80: 2246-2251.
- (103) Jimenez JJ, Jy W, Mauro LM, Soderland C, Horstman LL, Ahn YS: Endothelial cells release phenotypically and quantitatively distinct microparticles in activation and apoptosis. *Thromb Res* 2003; 109: 175-180.
- (104) Hugel B, Socie G, Vu T, Toti F, Gluckman E, Freyssinet JM, Scrobohaci ML: Elevated levels of circulating procoagulant microparticles in patients

- with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and aplastic anemia. *Blood* 1999; 93: 3451-3456.
- (105) Zwicker JI, Furie BC, Furie B: Cancer-associated thrombosis. *Crit Rev Oncol Hematol* 2007; 62: 126-136.
- (106) Otten HM, Mathijssen J, ten Cate H, Soesan M, Inghels M, Richel DJ, Prins MH: Symptomatic venous thromboembolism in cancer patients treated with chemotherapy: an underestimated phenomenon. *Arch Intern Med* 2004; 164: 190-194.
- (107) Zangari M, Anaissie E, Barlogie B, Badros A, Desikan R, Gopal AV, Morris C, Toor A, Siegel E, Fink L, Tricot G: Increased risk of deep-vein thrombosis in patients with multiple myeloma receiving thalidomide and chemotherapy. *Blood* 2001; 98: 1614-1615.
- (108) Pritchard KI, Paterson AH, Paul NA, Zee B, Fine S, Pater J: Increased thromboembolic complications with concurrent tamoxifen and chemotherapy in a randomized trial of adjuvant therapy for women with breast cancer. National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group Breast Cancer Site Group. *J Clin Oncol* 1996; 14: 2731-2737.
- (109) Dvorak HF, Quay SC, Orenstein NS, Dvorak AM, Hahn P, Bitzer AM, Carvalho AC: Tumor shedding and coagulation. *Science* 1981; 212: 923-924.
- (110) Dvorak HF, Van DeWater L, Bitzer AM, Dvorak AM, Anderson D, Harvey VS, Bach R, Davis GL, DeWolf W, Carvalho AC: Procoagulant activity associated with plasma membrane vesicles shed by cultured tumor cells. *Cancer Res* 1983; 43: 4434-4442.
- (111) Yu JL, Rak JW: Shedding of tissue factor (TF)-containing microparticles rather than alternatively spliced TF is the main source of TF activity released from human cancer cells. *J Thromb Haemost* 2004; 2: 2065-2067.
- (112) Davila M, Amirkhosravi A, Coll E, Desai H, Robles L, Colon J, Baker CH, Francis JL: Tissue factor-bearing microparticles derived from tumor cells: impact on coagulation activation. *J Thromb Haemost* 2008 ;6: 1517-1524.
- (113) Hron G, Kollars M, Weber H, Sagaster V, Quehenberger P, Eichinger S, Kyrle PA, Weltermann A: Tissue factor-positive microparticles: cellular origin and association with coagulation activation in patients with colorectal cancer. *Thromb Haemost* 2007; 97: 119-123.

- (114) Tesselaar ME, Romijn FP, Van Der Linden IK, Prins FA, Bertina RM, Osanto S: Microparticle-associated tissue factor activity: a link between cancer and thrombosis? *J Thromb Haemost* 2007; 5: 520-527.
- (115) Joop K, Berckmans RJ, Nieuwland R, Berkhout J, Romijn FP, Hack CE: Microparticles from patients with multiple organ dysfunction syndrome and sepsis support coagulation through multiple mechanisms. *Thromb Haemost* 2001; 85: 810-820.
- (116) Daniel L, Fakhouri F, Joly D, Mouthon L, Nusbaum P, Grunfeld JP: Increase of circulating neutrophil and platelet microparticles during acute vasculitis and hemodialysis. *Kidney Int* 2006; 69: 1416-1423.
- (117) Nieuwland R, Berckmans RJ, McGregor S, Böing AN, Romijn FP, Westendorp RGJ, Hack CE, Sturk A: Cellular origin and procoagulant properties of microparticles in meningococcal sepsis. *Blood* 2000; 95: 930-935.
- (118) Simak J, Gelderman MP: Cell membrane microparticles in blood and blood products: potentially pathogenic agents and diagnostic markers. *Transfus Med Rev* 2006; 20(1): 1-26.
- (119) Shet AS, Characterizing blood microparticles: Technical aspects and challenges. *Vascular Health and Risk Management* 2008; 4(4): 769-774.
- (120) Pihusch V, Rank A, Steber R, Pihusch M, Pihusch R, Toth B, Hiller E, Kolb HJ: Endothelial cell-derived microparticles in allogeneic hematopoietic stem cell recipients. *Transplantation* 2006; 81(10): 1405-1409.
- (121) Toth B, Nikolajek K, Rank A, Nieuwland R, Lohse P, Pihusch V, Friese K, Thaler CJ: Gender-specific and menstrual cycle dependent differences in circulating microparticles. *Platelets* 2007; 18(7): 515-521.
- (122) Guiducci S, Distler JH, Jüngel A, Huscher D, Huber LC, Michel BA, Gay RE, Pisetsky DS, Gay S, Matucci-Cerinic M, Distler O: The relationship between plasma microparticles and disease manifestations in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheu.* 2008; 58(9): 2845-2853.
- (123) Trummer A, De Rop C, Tiede A, Ganser A, Eisert R. Recovery and composition of microparticles after snap-freezing depends on thawing temperature: *Blood Coagulation & Fibrinolysis* 2009; 20(1): 52-56.
- (124) Horstman LL, Jy W, Jimenez JJ, Ahn YS: Endothelial microparticles as markers of endothelial dysfunction. *Frontiers Bioscience* 2004; 9: 1118-1135.

- (125) Chironi GN, Boulanger CM, Simon A, Dignat-George F, Freyssinet JM, Tedgui A: Endothelial microparticles in diseases. *Cell Tissue Res* 2009; 335(1): 143-151.
- (126) Chen TS, Lai RC, Lee MM, Choo AB, Lee CN, Lim SK: Mesenchymal stem cell secretes microparticles enriched in pre-microRNAs. *Nucleic Acids Res* 2010; 38(1): 215-224.
- (127) Pihusch R, Salat C, Schmidt E, Göhring P, Pihusch M, Hiller E, Holler E, Kolb HJ: Hemostatic complications in bone marrow transplantation: a retrospective analysis of 447 patients. *Transplantation* 2002; 74(9): 1303-1309.
- (128) Sletnes KE, Holte H, Halvorsen S, Jakobsen E, Wisløff F, Kvaløy S: Activation of coagulation and deep vein thrombosis after bone marrow harvesting and insertion of a Hickman-catheter in ABMT patients with malignant lymphoma. *Bone Marrow Transplant* 1996; 17(4): 577-581.
- (129) Baumheuter S, Singer MS, Henzel W, Hemmerich S, Renz M, Rosen SD, Lasiky LA: Binding of L-selection to the vascular sialomucin CD34. *Science* 1993; 262: 436-438.
- (130) Reininger AJ, Heijnen HF, Schumann H, Specht HM, Schramm W, Ruggeri ZM: Mechanism of platelet adhesion to von Willebrand factor and microparticle formation under high shear stress. *Blood* 2006; 107(9): 3537-3545.
- (131) Cramer EM: Megakaryocyte structure and function. *Curr Opin Hematol* 1999; 6(5): 354-361.
- (132) Travlos GS: Normal structure, function, and histology of the bone marrow. *Toxicol Pathol* 2006; 34(5): 548-565.
- (133) Mahlberg R, Giller A, Lösch A: Hämatologie Theorie und Praxis für medizinische Arztberufe. WILEY-VCH Verlag GmbH & kGaA, Weinheim 2005.
- (134) Pols MS, Klumperman J: Trafficking and function of the tetraspanin CD63. *Exp Cell Res* 2009; 315(9): 1584-1592.
- (135) Berditchevski F, Odintsova E: Tetraspanins as regulators of protein trafficking. *Traffic* 2007; 8(2): 89-96.
- (136) Adkins DR, DiPersio JF: Total body irradiation before an allogeneic stem cell transplantation: is there a magic dose? *Curr Opin Hematol* 2008; 15(6): 555-560.

- (137) Woywodt A, Scheer J, Hambach L, Buchholz S, Ganser A, Haller H, Hertenstein B, Haubitz M: Circulating endothelial cells as a marker of endothelial damage in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 2004; 103(9): 3603-3605.
- (138) Inbal A, Lubetsky A, Shimoni A, Dardik R, Sela BA, Eskaraev R, Levi I, Tov NS, Nagler A: Assessment of the coagulation profile in hematological patients receiving ATG-based conditioning treatment for allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2004; 34(5): 459-463.
- (139) Champlin R, Khouri I, Anderlini P, Gajewski J, Kornblau S, Molldrem J, Shimoni A, Ueno N, Giralt S: Nonmyeloablative preparative regimens for allogeneic hematopoietic transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2001; 27(2): 13-22.
- (140) Schmid C, Schleuning M, Schwerdtfeger R, Hertenstein B, Mischak-Weissinger E, Bunjes D, Harsdorf SV, Scheid C, Holtick U, Greinix H, Keil F, Schneider B, Sandherr M, Bug G, Tischer J, Ledderose G, Hallek M, Hiddemann W, Kolb HJ: Long-term survival in refractory acute myeloid leukemia after sequential treatment with chemotherapy and reduced-intensity conditioning for allogeneic stem cell transplantation. *Blood* 2006; 108(3): 1092-1099.
- (141) Aschan J: Risk assessment in haematopoietic stem cell transplantation: Conditioning. *Best Practice & Research Clinical Haematology* 2007; 20(2): 295-310.
- (142) Ferry C, Socie G: Busulfan-cyclophosphamide versus total body irradiation-cyclophosphamide as preparative regimen before allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia: What have we learned? *Experimental Hematology* 2003; 31: 1182-1186.
- (143) Storb R, Etzioni R, Anasetti C, Appelbaum FR, Buckner CD, Bensinger W, Bryant E, Clift R, Deeg HJ, Doney K, et al. Cyclophosphamide combined with antithymocyte globulin in preparation for allogeneic marrow transplants in patients with aplastic anemia. *Blood* 1994; 84(3): 941-949.
- (144) Schmid C, Schleuning M, Ledderose G, Tischer J, Kolb HJ: Sequential regimen of chemotherapy, reduced-intensity conditioning for allogeneic stem-cell transplantation, and prophylactic donor lymphocyte transfusion in high-risk acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome. *J Clin Oncol* 2005; 23(24): 5675-5687.
- (145) Hoffman R, Haim N, Brenner B: Cancer and thrombosis revisited. *Blood Rev* 2001; 15(2): 61-67.

- (146) von Tempelhoff GF, Dietrich M, Hommel G, Heilmann L: Blood coagulation during adjuvant epirubicin/cyclophosphamide chemotherapy in patients with primary operable breast cancer. *J Clin Oncol* 1996; 14(9): 2560-2568.
- (147) Levine MN: Prevention of thrombotic disorders in cancer patients undergoing chemotherapy. *Thromb Haemost* 1997; 78: 133-136.
- (148) Eissner G, Multhoff G, Gerbitz A, Kirchner S, Bauer S, Haffner S, Sondermann D, Andreesen R, Holler E: Fludarabine induces apoptosis, activation, and allogenicity in human endothelial and epithelial cells: protective effect of defibrotide. *Blood* 2002; 100(1): 334-340.
- (149) Pihusch R, Höhnberg B, Salat C, Pihusch M, Hiller E, Kolb HJ: Platelet flow cytometric findings in patients undergoing conditioning therapy for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Ann Hematol* 2002; 81(8): 454-461.
- (150) Periard D, Boulanger CM, Eyer S, Amabile N, Pugin P, Gerschheimer C, Hayoz D: Are circulating endothelial-derived and platelet-derived microparticles a pathogenic factor in the cisplatin-induced stroke? *Stroke* 2007; 38: 1636–1638.
- (151) Nomura S, Ishii K, Kanazawa S, Inami N, Uoshima N, Ishida H, Yoshihara T, Kitayama H, Hayashi K: Significance of elevation in cell-derived microparticles after allogeneic stem cell transplantation: transient elevation of platelet-derived microparticles in TMA/TTP. *Bone Marrow Transplant* 2005; 36(10): 921-922.
- (152) Champlin RE, Schmitz N, Horowitz MM, Chapis B, Chopra R, Cornelissen JJ, Gale RP, Goldman JM, Loberiza FR Jr, Hertenstein B, Klein JP, Montserrat E, Zhang MJ, Ringdén O, Tomany SC, Rowlings PA, Van Hoef ME, Gratwohl A: Blood stem cells compared with bone marrow as a source of hematopoietic cells for allogeneic transplantation. IBMTR Histocompatibility and Stem Cell Sources Working Committee and the European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). *Blood* 2000; 95(12): 3702-3709.
- (153) Janowska-Wieczorek A, Majka M, Kijowski J, Baj-Krzyworzeka M, Reza R, Turner AR, Ratajczak J, Emerson SG, Kowalska MA, Ratajczak MZ: Platelet-derived microparticles bind to hematopoietic stem/progenitor cells and enhance their engraftment. *Blood* 2001; 98(10): 3143-3149.
- (154) Horstman LL, Ahn YS: Platelet microparticles: a wide-angle perspective. *Crit Rev Oncol Hematol* 1999; 30(2): 111-142.
- (155) Baj-Krzyworzeka M, Majka M, Pratico D, Ratajczak J, Vilaire G, Kijowski J, Reza R, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak MZ: Platelet-derived

microparticles stimulate proliferation, survival, adhesion, and chemotaxis of hematopoietic cells. *Exp Hematol* 2002; 30(5): 450-459.

- (156) Liu B, Liao C, Chen J, Gu S, Wu S, Xu Z: Significance of increasing adhesion of cord blood hematopoietic cells and a new method: platelet microparticles. *Am J Hematol* 2003; 74(3): 216-217.
- (157) Liu B, Chen JS, Cao M, Gu SL, Liao C, Li DZ, Zhong HZ: Platelet characteristic antigens of CD34+ cells in cryopreserved cord blood: a study of platelet-derived microparticles in transplant processing. *Vox Sang* 2004; 87(2): 96-104.

## 8. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Hauptindikationen für eine HSCT im Jahre 2002 in Europa .....	2
Abb. 2	Zeitpunkte der Probenentnahme bei Studienpatient 1 .....	20
Abb. 3	Zeitpunkte der Probenentnahme bei Studienpatient 2 .....	21
Abb. 4	Zeitpunkte der Probenentnahme bei Studienpatient 3 .....	21
Abb. 5	Zeitpunkte der Probenentnahme bei Studienpatient 4 .....	22
Abb. 6	Zeitpunkte der Probenentnahme bei Studienpatient 5 .....	22
Abb. 7	Zeitpunkte der Probenentnahme bei Studienpatient 6 .....	23
Abb. 8	Zeitpunkte der Probenentnahme der Studienpatient 7-10 .....	23
Abb. 9	Entstehung von SSC und FSC im FACS .....	29
Abb. 10	Genereller Aufbau eines Durchflusszytometer .....	30
Abb. 11	Mikropartikelmessung mittels Durchflusszytometrie .....	31
Abb. 12	Annexin-positive MP bei gesunden Knochenmarkspendern .....	34
Abb. 13	CD34-positive MP bei gesunden Knochenmarkspendern .....	35
Abb. 14	CD61-positive MP bei gesunden Knochenmarkspendern .....	36
Abb. 15	CD62P-positive MP bei gesunden Knochenmarkspendern .....	36
Abb. 16	CD63-positive MP bei gesunden Knochenmarkspendern .....	37
Abb. 17	CD144-positive MP bei gesunden KM-Spendern .....	38
Abb. 18	CD62E-positive MP bei gesunden KM-Spendern .....	38
Abb. 19	Thrombozytenverlauf von Studienpatient 1 .....	40
Abb. 20	Thrombo- /megakaryozytäre MP von Studienpatient 1 .....	40
Abb. 21	Thrombo- /megakaryozytäre MP pro Thrombozyt von Studienpatient 1 .....	41
Abb. 22	Endotheliale MP von Studienpatient 1 .....	41
Abb. 23	Thrombozytenverlauf von Studienpatient 2 .....	42
Abb. 24	Thrombo- /megakaryozytäre MP von Studienpatient 2 .....	42
Abb. 25	Thrombo- /megakaryozytäre MP pro Thrombozyt von Studienpatient 2 .....	43
Abb. 26	Endotheliale MP von Studienpatient 2 .....	43
Abb. 27	Thrombozytenverlauf von Studienpatient 3 .....	44
Abb. 28	Thrombo- /megakaryozytäre MP von Studienpatient 3 .....	44
Abb. 29	Thrombo- /megakaryozytäre MP pro Thrombozyt von Studienpatient 3 .....	45
Abb. 30	Endotheliale MP von Studienpatient 3 .....	45
Abb. 31	Thrombozytenverlauf von Studienpatient 4 .....	46
Abb. 32	Thrombo- /megakaryozytäre MP von Studienpatient 4 .....	46
Abb. 33	Thrombo- /megakaryozytäre MP pro Thrombozyt von Studienpatient 4 .....	47
Abb. 34	Endotheliale MP von Studienpatient 4 .....	47
Abb. 35	Thrombozytenverlauf von Studienpatient 5 .....	48
Abb. 36	Thrombo- /megakaryozytäre MP von Studienpatient 5 .....	48
Abb. 37	Thrombo- /megakaryozytäre MP pro Thrombozyt von Studienpatient 5 .....	49
Abb. 38	Endotheliale MP von Studienpatient 5 .....	49
Abb. 39	Thrombozytenverlauf von Studienpatient 6 .....	50
Abb. 40	Thrombo- /megakaryozytäre MP von Studienpatient 6 .....	50
Abb. 41	Thrombo- /megakaryozytäre MP pro Thrombozyt von Studienpatient 6 .....	51

---

*Abbildungsverzeichnis*

---

Abb. 42	Endotheliale MP von Studienpatient 6 .....	51
Abb. 43	Relative Veränderung der Thrombozytenzahl der Studienpatienten 1-6 .....	52
Abb. 44	Relative Veränderung der CD61-positiven MP der Studienpatienten 1-6 .....	53
Abb. 45	Relative Veränderung der CD62P-positiven MP der Studienpatienten 1-6 .....	53
Abb. 46	Relative Veränderung der CD63-positiven MP der Studienpatienten 1-6 .....	54
Abb. 47	Rel. Veränderung der CD61-pos. MP pro Thrombozyt der Studienpatienten 1-6 .....	54
Abb. 48	Rel. Veränderung der CD62P-pos. MP pro Thrombozyt der Studienpatienten 1-6 .....	55
Abb. 49	Rel. Veränderung der CD63-pos. MP pro Thrombozyt der Studienpatienten 1-6 .....	55
Abb. 50	Anzahl der CD61-positiven MP pro Thrombozyt der Studienpatienten 1-6 .....	55
Abb. 51	Anzahl der CD62P-positiven MP pro Thrombozyt der Studienpatienten 1-6 .....	56
Abb. 52	Anzahl der CD63-positiven MP pro Thrombozyt der Studienpatienten 1-6 .....	56
Abb. 53	Relative Veränderungen der CD144-positiven MP der Studienpatienten 1-6 .....	57
Abb. 54	Relative Veränderungen der CD62E-positiven MP der Studienpatienten 1-6 .....	57
Abb. 55	Thrombozytenverlauf von Studienpatient 7 .....	58
Abb. 56	Thrombo- /megakaryozytäre MP von Studienpatient 7 .....	59
Abb. 57	Thrombo- /megakaryozytäre MP pro Thrombozyt von Studienpatient 7 .....	59
Abb. 58	Endotheliale MP von Studienpatient 7 .....	60
Abb. 59	Thrombozytenverlauf von Studienpatient 8 .....	60
Abb. 60	Thrombo- /megakaryozytäre MP von Studienpatient 8 .....	61
Abb. 61	Thrombo- /megakaryozytäre MP pro Thrombozyt von Studienpatient 8 .....	61
Abb. 62	Endotheliale MP von Studienpatient 8 .....	62
Abb. 63	Thrombozytenverlauf von Studienpatient 9 .....	62
Abb. 64	Thrombo- /megakaryozytäre MP von Studienpatient 9 .....	63
Abb. 65	Thrombo- /megakaryozytäre MP pro Thrombozyt von Studienpatient 9 .....	63
Abb. 66	Endotheliale MP von Studienpatient 9 .....	63
Abb. 67	Thrombozytenverlauf von Studienpatient 10 .....	64
Abb. 68	Thrombo- /megakaryozytäre MP von Studienpatient 10 .....	64
Abb. 69	Thrombo- /megakaryozytäre MP pro Thrombozyt von Studienpatient 10 .....	65
Abb. 70	Endotheliale MP von Studienpatient 10 .....	65
Abb. 71	Relative Veränderung der Thrombozytenzahl der Studienpatienten 7-10 .....	66

---

---

*Abbildungsverzeichnis*

---

Abb. 72	Relative Veränderung der CD61-positiven MP der Studienpatienten 7-10 .....	67
Abb. 73	Relative Veränderung der CD62P-positiven MP der Studienpatienten 7-10 .....	67
Abb. 74	Relative Veränderung der CD63-positiven MP der Studienpatienten 7-10 .....	67
Abb. 75	Rel. Veränderung der CD61-pos. MP pro Thrombozyt der Studienpatienten 7-10 .....	68
Abb. 76	Rel. Veränderung der CD62P-pos. MP pro Thrombozyt der Studienpatienten 7-10 .....	68
Abb. 77	Rel. Veränderung der CD63-pos. MP pro Thrombozyt der Studienpatienten 7-10 .....	68
Abb. 78	Anzahl der CD61-positiven MP pro Thrombozyt der Studienpatienten 7-10 .....	69
Abb. 79	Anzahl der CD62P-positiven MP pro Thrombozyt der Studienpatienten 7-10 .....	69
Abb. 80	Anzahl der CD63-positiven MP pro Thrombozyt der Studienpatienten 7-10 .....	69
Abb. 81	Relative Veränderungen der CD144-positiven MP der Studienpatienten 7-10 .....	70
Abb. 82	Relative Veränderungen der CD62E-positiven MP der Studienpatienten 7-10 .....	70
Abb. 83	Darstellung der Mikropartikelbildung .....	73

**9. Tabellenverzeichnis**

Tab. 1 Gesunde Knochenmarksspender .....	18
Tab. 2 Patienten während Konditionierungstherapie .....	19
Tab. 3 Mischungsverhältnisse für Annexin- und Antikörper-Ansätze .....	26
Tab. 4 Zusammensetzung der Annexin- und der Antikörperproben .....	27
Tab. 5 Geräteeinstellung FACScan flow cytometer .....	28
Tab. 6 Messergebnisse der gesunden Knochenmarksspender .....	33

## 10. Abkürzungsverzeichnis

ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
ARDS	Acute respiratory distress syndrom
ATG	Antithymozytenglobulin
BOOD	Bronchiolitis obliterans mit organisierender Pneumonie
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
CML	Chronisch myeloische Leukämie
CMV	Cytomegalievirus
Cy	Cyclophosphamid
DAH	Diffuse alveoläre Hämorrhagie
DIC	Diffused intravasl coagulation
DM	Diabetes mellitus
DMSO	Dimethylsulfoyd
FACS	flourescence-activated cell sorting
FITC	Fluorescein Isothiocyanate
FSC	Forward scatter
G-CSF	Granulocyte-Colony Stimulating Factor
GvHD	Graft-versus Host Disease
Gy	Gray
HCl	Salzsäure
HIT	Heparininduzierte Thrombozytopenie
HLA	Human Leukocyte Antigen
HSCT	Hämatopoetische Stammzelltransplantation
IP	Interstitielle Pneumonie
KG	Körpergewicht
MP	Mikropartikel
MVB	Membrangebundene multivesikuläre Körper
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dinatriumhydrogenphosphat
Na <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub>	Trinatriumcitrat
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natronlauge
PAF	Platelet activating factor
PBS	Phosphate buffered Saline
PC	Phosphatidylcholin
PE	Phosphatidylethanolamin
PE	Phycoerythrin
PMT	Photomultiplier
PS	Phosphatidylserin
RSV	Respiratory Syncytial Virus
SM	Sphingomyelin
SSC	Sideward scatter
TBI	Ganzkörperbestrahlung
TF	Tissue factor
TIA	Transitorische ischämische Attacke
TTP	Thrombotisch thrombozytopenische Purpura
VOD	Venoocclusive disease

## **11. Danksagung**

Herrn Prof. Dr. med. Hiller danke ich für die Überlassung des Themas dieser Arbeit. Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer Dr. med. Andreas Rank für die kompetente und engagierte Betreuung und für die Anteilnahme und konstruktive Kritik an den Fortschritten dieser Arbeit.

Ruth Steber danke ich für ihre geduldige Einarbeitung in die Methoden der Mikropartikelmessung. Zudem möchte ich mich bei Michael Iberer für die gute Zusammenarbeit im Labor bedanken. Ein besonderer Dank geht an das Team der Abteilung für Knochenmarkstransplantation der Medizinischen Klinik III für die freundliche Unterstützung bei der Probengewinnung.

Mein herzlicher Dank geht an Rebecca Ermecke für die stetige moralische Unterstützung und Motivation.

Nicht zuletzt gilt mein besonderer Dank meiner Familie und meinen Eltern für Ihre stetige Unterstützung während der langen Ausbildung und Anfertigung dieser Arbeit.

## 12. Lebenslauf

**Anton Köhler**

geboren am 18.04.1981 in Weiden i. d. Opf.

### Schulbildung, Zivildienst

09/87 – 08/91	Ludwig-Thoma Grundschule in Traunstein
09/91 – 06/01	Chiemgau-Gymnasium in Traunstein
07/01 - 04/02	Diakoniestation des Diakonischen Werks Traunstein <i>Häusliche Alten- und Krankenpflege, Essen auf Rädern</i>

### Medizinstudium

10/02	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München
09/04	Ärztliche Vorprüfung
11/08	Ärztliche Prüfung

### Praktisches Jahr

08/07 – 12/07	Neurologie, Friedrich-Baur-Institut, München
12/07 – 03/08	Chirurgie, Klinikum Neuperlach, München
03/08 – 07/08	Innere Medizin, Klinikum Traunstein

### Beruf

seit 04/09	Assistent in der Medizinischen Klinik Innenstadt, Ludwig-Maximilians-Universität München
------------	--