

# Kaltlagerung von Thrombozyten: Aktuelle Herausforderungen und zukünftige Perspektiven

## Zusammenfassung

Thrombozyten spielen die Schlüsselrolle in der primären Hämostase, daher ist die Thrombozyten(konzentrat)-Transfusion, besonders im Fall von schweren Blutungen, essentiell. Die ersten Versuche Thrombozyten zu lagern erfolgten bei +4 °C. Aufgrund der eingeschränkten Funktionalität wurde jedoch bald die Lagerung bei +22 °C favorisiert. In den letzten Jahren hat sich jedoch die Lagerung von Thrombozyten auf Grund der mehr und mehr eingesetzten Additivlösung als Lagermedium deutlich gewandelt. Durch die Lagerung in Additivlösung scheint die Lagerbarkeit bei +4 °C günstig beeinflusst. Thrombozyten zeigen deutlich weniger Lagerungsschäden und die Lagerungsdauer lässt sich deutlich verlängern, ohne das Risiko für ein bakterielles Keimwachstum zu erhöhen.

## Summary

Platelets play the key role in primary hemostasis, the transfusion of platelet concentrates is therefore essential in case of bleeding. Initially platelet concentrates were stored at +4 °C. Because of better platelet function and viability, platelet concentrates stored at +22 °C were soon favored compared to platelet concentrates stored at +4 °C. In recent years it has become more and more common to store platelets in additive solution. Additive solutions seem to be suitable for storage of platelets at +4 °C with comparable platelet function and properties compared to storage at +22 °C. Platelets have less storage lesions and an extension of the storage time seems possible without increasing the risk of bacterial contamination.

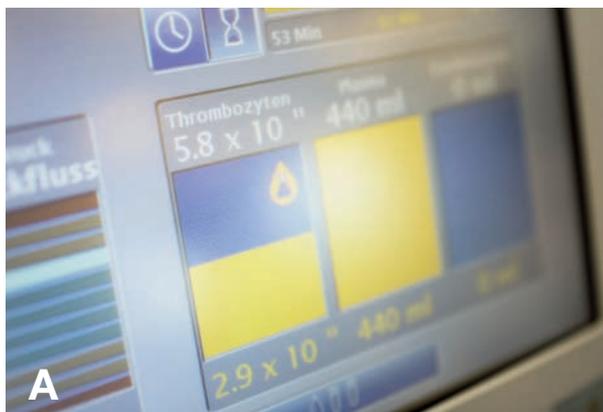
## PHYSIOLOGIE UND PATHOPHYSIOLOGIE DER THROMBOZYTEN

Im Blut eines gesunden Menschen befinden sich 150.000 bis 400.000 Thrombozyten pro  $\mu\text{L}$  Blut. Sie sind die kleinsten korpuskulären Bestandteile des Blutes und ihnen kommt eine Schlüsselfunktion in der primären Hämostase zu. Sie bilden damit eine wichtige Grundlage für die Thrombusformation. Sie besitzen keinen Zellkern, sind jedoch eingeschränkt zur Proteinbiosynthese fähig. Ein Mangel an Thrombozyten kann sowohl durch eine unzureichende Bildung von Thrombozyten oder durch einen verstärkten Abbau derselben entstehen. Beide Formen sind sowohl angeboren als auch erworben möglich. Bisher sind z. B. über 80 Gene bekannt, die zu angeborenen Bildungs- und Funktionsstörungen führen. Es kommen jährlich neue Kandidatengene dazu. Die Knochenmarkssuppression im Rahmen von verschiedenen Chemotherapeutika ist eine der häufigsten Gründe für eine erworbene Bildungsstörung. Bei den erworbenen Thrombozytopenien durch beschleunigten Abbau richten sich meist Antikörper gegen bestimmte Oberflächenstrukturen auf den Thrombozyten und führen zu einem vorzeitigen Abbau dieser (siehe auch Beitrag: *Diagnostik von angeborenen und erworbenen Thrombozyten-Erkrankungen*; hämotherapie 28/2017).

## WIE WERDEN THROMBOZYTEN- KONZENTRATE HERGESTELLT?

Die Thrombozytenkonzentrate werden entweder aus Buffy Coats der Vollblutspenden von vier bis sechs Einzelspendern als Pool-Thrombozytenkonzentrat (PTK) oder mittels Apherese (ATK) aus einer Einzelspende gewonnen (**Abbildung 1**). Anschließend werden sie in 100 % autologem Plasma oder in additiver Lösung gelagert. Pool-Thrombozytenkonzentrate und Apheresekonzentrate in additiver Lösung haben noch einen gewissen Restplasmagehalt. Dieser ist unterschiedlich hoch. In einer Studie aus unserer Arbeitsgruppe konnten wir zeigen, dass bei Lagerung der Thrombozyten in 35 % Restplasma die Thrombozyten eine vergleichbare Qualität in Funktionalität und Überleben im Vergleich zur Lagerung in 100 % Plasma aufweisen. Die Lagerung bei 20 % Restplasma beeinträchtigt jedoch sowohl die Funktion, als auch das Überleben. Eine Lagerung von mehr als fünf Tagen scheint in additiver Lösung möglich, da die Zellen nur wenig von ihrer Funktionalität verlieren, dafür steigt im Zeitverlauf stetig das Risiko der Kontamination.

Die TK werden bei Raumtemperatur ( $+22 \pm 2$  °C) in einem gasdurchlässigen Beutel unter ständiger Agitation gelagert. Sie dürfen i. d. R. max. vier Tage (Entnahme-



**Abbildung 1:** Bei einer Thrombozytapherese (A) wird das Blut in seine Bestandteile aufgetrennt. Aus einer Einzelspende können je nach Thrombozytenzahl und Gewicht des Spenders 1–3 Thrombozytenkonzentrate entstehen. Pool-Konzentrate (B) werden aus 4–6 Einzelspenden gewonnen.

tag + vier Tage) verabreicht werden, wenn nicht eine zusätzliche Testung auf Bakterien (Durchflusszytometrie- oder PCR-Testungen) oder eine Pathogeninaktivierung mittels Zugabe von lichtaktiven Substanzen wie z. B. Amotosalen oder Riboflavin (Vitamin B2) und einer anschließenden UVA- bzw. UVB-Bestrahlung erfolgt, welche die Haltbarkeitsverlängerung um einen Tag zulässt. Aktuell findet sich auch die UVC-Bestrahlung als mögliche Pathogeninaktivierung im Zulassungsverfahren für Thrombozytenkonzentrate.

### WANN SOLLTEN THROMBOZYTEN-KONZENTRATE TRANSFUNDIERT WERDEN?

Die Transfusion von Thrombozytenkonzentraten (TK) ist eine essentielle Intervention zur prophylaktischen und therapeutischen Behandlung von Blutungen bei Störungen der primären Hämostase. Die prophylaktische Behandlung erfolgt zum Beispiel bei bestimmten Erkrankungen mit akut gestörter Bildung von Thrombozyten wie z. B. durch Chemotherapeutika oder chronisch bei hämato-

onkologischen Erkrankungen wie z. B. der aplastischen Anämie oder dem myelodysplastischen Syndrom. Durch einen gesteigerten Umsatz kann es zu einem erhöhten Bedarf an Thrombozyten kommen. Bei den immunvermittelten Thrombozytopenien sollte die Suppression des Antikörpervermittelten Abbaus im Vordergrund stehen und Thrombozyten nur bei lebensbedrohlichen Blutungen verabreicht werden. Bei erhöhtem Verbrauch durch Sepsis und Verbrauchskoagulopathie nach Trauma kann die Anhebung der Thrombozytenzahlen Blutungsneigungen verringern, jedoch steht auch hier die Behandlung der Grunderkrankung und die chirurgische Blutstillung im Vordergrund. Besteht der Verdacht auf eine manifeste thrombozytärbedingte Blutung, kann auch bei normwertigen Thrombozytenzahlen die Gabe eines Thrombozytenkonzentrates indiziert sein, um das Eintreten der Hämostase zu gewährleisten. In **Tabelle 1** finden Sie weitere Beispiele, in denen die Transfusion von TK klinisch indiziert sein kann.

Die klinische Indikation zur Transfusion von Thrombozyten hängt von den Begleitumständen ab. So sollten Patienten mit akuter Leukämie ohne Blutungszeichen erst

Prophylaxe	Therapie
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Patienten mit krankheits- oder therapiebedingter passagerer Thrombozytopenie: 10.000/µl (ohne Risikofaktoren) 20.000/µl (mit Risikofaktoren, wie z. B. Fieber, Infektion, petechiale Blutungen, zusätzliche plasmatische Gerinnungsstörung etc.)</li> <li>• Vor invasiven Eingriffen</li> </ul> <p>(Zielwert: &gt; 20.000/µl kleinere Eingriffe mit niedrigem Blutungsrisiko; &gt; 50.000/µl größere Eingriffe mit mittlerem Blutungsrisiko; 70.000/µl – 100.000/µl mit sehr hohem Blutungsrisiko)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Blutverlust oder Blutungen durch vorbestehende Thrombozytopenie: Zielwert: &gt; 100.000/µl</li> </ul>

**Tabelle 1:** Indikationen der Thrombozytenkonzentrate

ab einer Thrombozytenzahl  $< 10.000$  Plättchen (PLT)/ $\mu\text{L}$  transfundiert werden, wohingegen bei Patienten mit manifesten Blutungen, je nach Schwere und Lokalisation der Blutung, eine Thrombozytenzahl von  $> 50.000$  PLT/ $\mu\text{L}$  oder  $> 100.000$  PLT/ $\mu\text{L}$  bei vital bedrohlichen Blutungen angestrebt wird. Ein TK hebt die Thrombozytenzahl um ca.  $20.000$ – $40.000$  PLT/ $\mu\text{L}$  an. Unsere Milz speichert ca. 30 % der Thrombozyten. Bei Splenomegalie kann der Anstieg der Thrombozytenzahl im peripheren Blut (Inkrement) deutlich geringer ausfallen. Wenn akut keine Blutung vorliegt, können Thrombozyten bis zu sieben Tage zirkulieren, bis sie in der Leber bzw. Milz abgebaut und aus dem Kreislauf eliminiert werden.

## WELCHE ÄNDERUNGEN ERLEBEN DIE THROMBOZYTEN WÄHREND DER LAGERUNG BEI RAUMTEMPERATUR?

Die Thrombozyten verändern sich während der Lagerung in TK sowohl biochemisch, strukturell als auch funktionell. Eigentlich sollten die Thrombozyten während der Lagerung so gut wie möglich ruhen, sodass die Funktion nicht abnimmt. Jedoch findet auch bei der Lagerung unter ständiger Agitation eine Progression der Thrombozytenaktivierung statt. Die Folge ist ein Funktionsverlust, da den kernlosen Zellen die Fähigkeit fehlt, ihre Funktion wiederherzustellen.

Die Aktivierung durch Lagerung führt außerdem zu einer unkontrollierten Freisetzung von Stimulatoren aus den  $\alpha$ -Granula, einer veränderten Glykoproteinexpression sowie zur Steigerung verschiedener prokoagulatorischer Prozesse.

Außerdem kann es zu einer gesteigerten Glykolyse kommen, was zu einer erhöhten Laktatproduktion und demzufolge zu einer pH-Erniedrigung führt. Es ist bekannt, dass Thrombozyten bei einem pH-Wert von 6,8 ihre Morphologie ändern und bei einem pH-Wert von 6,0 ihre Lebensfähigkeit verlieren.

Hinzu kommt, dass Thrombozyten nach der Aktivierung eine Vielzahl von Chemokinen und proinflammatorischen Faktoren wie den löslichen CD40-Liganden (sCD40L) ausschütten, als Zeichen der Immunantwort.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass durch vorzeitige Aktivierung während der Lagerung von TK bei Raumtemperatur eine Vielzahl von Funktionen der Thrombozyten in der primären Hämostase und Immunantwort nicht mehr ausreichend vorhanden sind. Ferner werden

durch Lagerungsläsionen der Thrombozyten auch Zytokine freigesetzt, welche Nebenwirkungen nach der Gabe von Thrombozyten fördern können.

## WAS PASSIERT MIT DEN THROMBOZYTEN NACH TRANSFUSION?

Lagerungsschäden von Thrombozyten, die zu einer verstärkten Voraktivierung und dem damit verbundenen vorzeitigen Abbau führen, verringern die Zirkulationsdauer. Bei Thrombozyten, die bei Raumtemperatur gelagert werden, kommt es zu einer verstärkten Granulaausschüttung mit dem damit verbundenen Funktionsverlust. Dagegen steht bei kaltgelagerten Thrombozyten die Bildung von Mikropartikeln im Vordergrund. Diese Mikropartikel führen zu einer verstärkten Aktivierung und damit zu einem beschleunigten Abbau nach Transfusion. Doch nicht nur Lagerungsschäden im Konzentrat oder aktive Blutungen können zu einem vorzeitigen Verbrauch von Thrombozytenkonzentraten führen. Liegt an diesen Stellen eine Läsion der Blutgefäßinnenwand vor, oder ist der Patient an einen Extrakorporalkreislauf angeschlossen, kommt es zur Thrombozytenaktivierung. Dieser Prozess wird als Initiierung der primären Hämostase bezeichnet. Durch die Verletzung des Endothels treten subendotheliale extrazelluläre Matrixproteine wie Kollagen, von-Willebrand-Faktor (vWF), Laminin etc. mit Thrombozyten in Kontakt, sodass letztere sich an den Ort der Läsion anheften. Die Thrombozyten adhären über die Membranrezeptorglykoproteine (GP Ia/IIa, GP Ib/IX) entweder direkt oder indirekt an die Subendothelschicht. Dies führt zuerst zur Aktivierung von Thrombozyten und zur Degranulation. Hierdurch werden aktivierende Substanzen wie ADP, Thrombin, CD63, Lamp 1 und Serotonin aus den dichten Granula ( $\gamma$ -Granula) freigesetzt. Diese Botenstoffe bedienen eine positive Feedbackkaskade in den Thrombozyten und rekrutieren wiederum weitere Thrombozyten aus der Zirkulation. Anschließend werden der Oberflächenrezeptor P-Selektin (CD62P) sowie die (prothrombotische) Faktoren V, XI und XIII für die Einleitung der Thrombozytenaktivierung und verschiedene Cytokine für die Immunreaktion aus den  $\alpha$ -Granula ausgeschüttet. Daraufhin ändert der diskoidale Thrombozyt seine Konformation, indem er Mikrotubuli auf die Oberfläche umlagert und Pseudopodien aus Aktin-Myosinfilamenten bildet. Die Zelle schwillt an und die Organellen sammeln sich in die Zellmitte, wo sie von Mikrotubuli und Mikrofilamenten umgeben werden. Die Ausläufer mehrerer Thrombozyten verbinden sich über GPIIb/IIIa-Rezeptor und Fibrinogenbrücken zu einem dichten zellulären Netzwerk, dem sogenannten „Thrombozyten-Pfropf“ oder „weißen Thrombus“. In der

sekundären Hämostase wird ein stabiles Fibrinnetzwerk um den weißen Thrombus gebildet, sodass der Plaque stabilisiert wird. Zusammen mit der sekundären Hämostase dienen die Thrombozyten somit der Blutgerinnung.

## WELCHE HERAUSFORDERUNGEN GIBT ES BEI DER VERSORGUNG MIT THROMBOZYTENKONZENTRATEN?

Die Kontaminationsgefahr mit Bakterien steigt deutlich ab dem Lagerungstag vier bei Raumtemperatur (RT) an. Eine gesteigerte Laktatkonzentration im Präparat sowie das Temperaturverhältnis bei der Lagerung begünstigen die Vermehrung der Keime. Daher ist die Haltbarkeit von TK auf vier Tage beschränkt. Trotz der beschränkten Lagerungsdauer wird in 1–20 pro 50.000 Fälle im Jahr eine bakterielle Kontamination beobachtet. In einer von Hong et al. 2016 in *Blood* veröffentlichten Studie verursachten ein Viertel aller kontaminierten Thrombozytenkonzentrate, die transfundiert wurden, eine febrile Transfusionsreaktion.

Ein weiteres Problem ist, wie auch bei anderen Blutprodukten, dass Angebot und Nachfrage schlecht kalkuliert werden können, sodass es schwierig ist, adäquate Reserven vorrätig zu haben, ohne dass es zu massivem Verwurf kommt. Dazu kommt, dass die kurze Haltbarkeit der TK eine große Herausforderung für kleinere Einrichtungen in ländlichen Regionen darstellt.

## WIE KÖNNTE DIE HALTBARKEIT DER THROMBOZYTENKONZENTRATE VERLÄNGERT WERDEN?

Aktuell gibt es drei mögliche Optionen, von denen man sich erhofft, das Infektionsrisiko, welches das größte Problem darstellt, zu senken (**Tabelle 2**): Pathogeninaktivierung durch UV-Strahlung (wurde in der hämotherapie-Ausgabe 17/2011 bereits ausführlich behandelt), Kryokonservierung und Lagerung bei +4 °C.

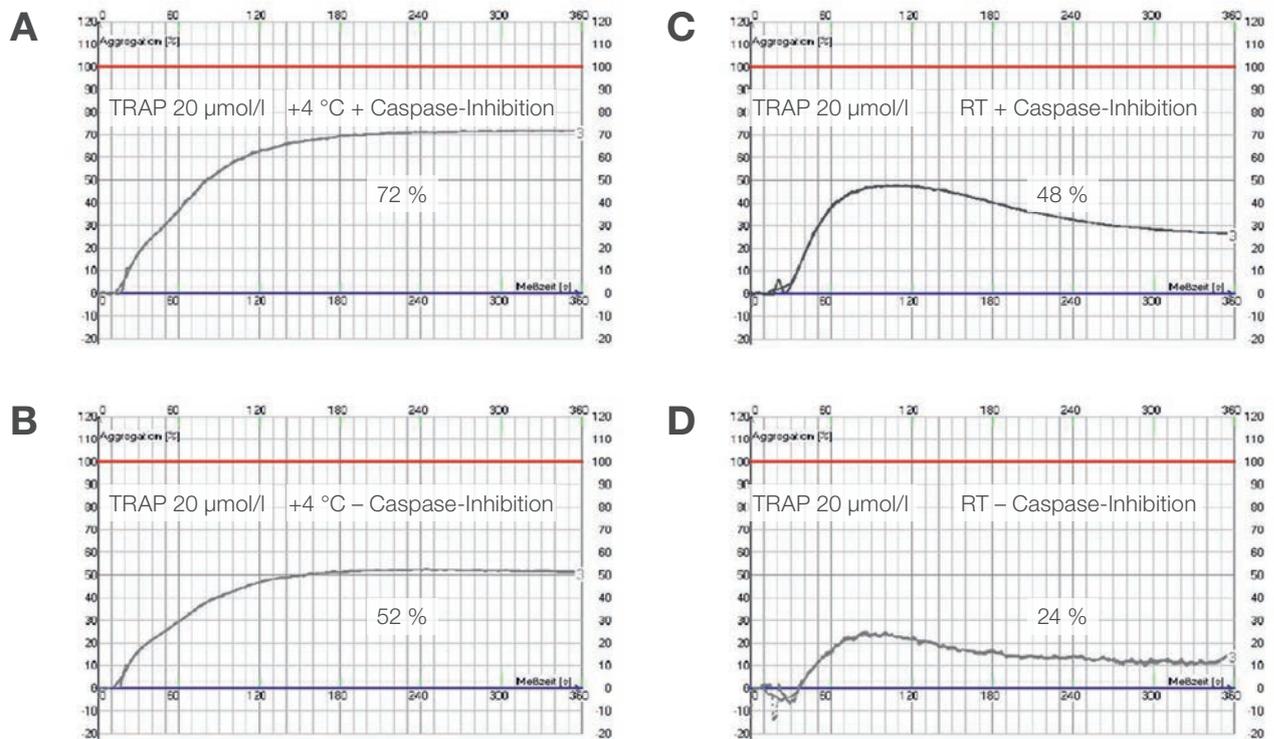
## KRYOKONSERVIERUNG VON THROMBOZYTENKONZENTRATEN

Bereits 1976 wurden die ersten klinischen Erfahrungen mit der Transfusion von kryokonservierten Thrombozytenkonzentrat publiziert. Zum TK wird 5 % Dimethylsulfoxid (DMSO) hinzugefügt. Nach der Inkubation mit dem Schutzmittel wird der Überstand entfernt, bevor das TK bei –80 °C eingefroren wird. Die Haltbarkeit der eingefrorenen TK beträgt in der Regel zwei Jahre. Das Konzentrat kann nun nach Bedarf aufgetaut werden. Nach dem Auftauen sollte es allerdings innerhalb von sechs Stunden transfundiert werden. Auch wenn das DMSO unter Reiraumbedingungen in das System appliziert wurde, gilt dieses als eröffnet und somit als potentiell kontaminiert. Momentan laufen Versuche, um die Haltbarkeit nach dem Auftauen auf 24 Stunden zu verlängern.

Die lange Haltbarkeit im gefrorenen Zustand kann in vielen Situationen von Vorteil sein. Außerdem wurde gezeigt,

		konventionell	Kaltlagerung	Kryokonservierung
<b>Haltbarkeit</b>		4–5 Tage	bis 21 Tage	2 Jahre
<b>Kontaminationsgefahr</b>		–	↓	↓
<b>Metabolismus</b>	Glykolyse	↑	↓	↓
	pH	↓ / unverändert	↑ / unverändert	↑ / ↓ / unverändert
<b>Aktivierung</b>	CD62P	↓ / unverändert	↑ / unverändert	↑
	Phosphatidylserin	↓ / unverändert	↑	↑
	aktiviertes Integrin $\alpha$ IIb $\beta$ 3	↓ / unverändert	↑	↓
<b>Funktion</b>	ADP-induzierte Aggregation	↓ / unverändert	↑	↓ / ↑
	Kollagen-induzierte Aggregation	↓ / unverändert	↑	↓

**Tabelle 2:** Vergleich der Eigenschaften der Thrombozyten bei verschiedenen Lagerungstypen



**Abbildung 2:** TRAP-6 Aggregation im Thrombozytenkonzentrat am Ende der Lagerung. Durch die Zugabe eines Caspaseinhibitors, der die Apoptose hemmt, kommt es am Ende der Lagerung zu einer deutlich besseren Funktionalität der Thrombozyten. (A) TRAP (thrombin receptor-activating peptide)-Aktivierung der Thrombozyten mit Lagerung bei +4 °C mit Caspaseinhibitor; (B) TRAP-Aktivierung der Thrombozyten mit Lagerung bei +4 °C ohne Caspaseinhibitor; (C) TRAP-Aktivierung der Thrombozyten mit Lagerung bei  $22 \pm 2$  °C (Raumtemperatur (RT)) mit Caspaseinhibitor (D) TRAP-Aktivierung der Thrombozyten mit Lagerung bei  $22 \pm 2$  °C ohne Caspaseinhibitor

dass die Thrombozyten trotz der drastischen biochemischen Veränderung ihre Hämostasefunktion nicht verloren haben. In vitro Studien zeigten z. B., dass die Thrombozyten sogar eine bessere Funktionalität als bei RT gelagerte Thrombozyten aufweisen. Die bessere Aktivierung der Thrombozyten ist wahrscheinlich zum einen durch die vermehrte Oberflächenexpression von CD62P, Phosphatidylserin und Ablösung von Mikropartikeln zu erklären. Aber auch die Gerinnungsfaktoren sind im gefrorenen Zustand stabiler. So haben kryokonservierte Konzentrate neben der erhöhten Menge an prokoagulatorischen Mikropartikeln auch signifikant höhere Konzentrationen an Gerinnungsfaktoren.

### Klinische Erfahrung mit der Kryokonservierung von Thrombozytenkonzentraten

In einer von Schiffer et al. 1983 veröffentlichten Studie wurden 155 Patienten unter Chemotherapie mit mehr als 700 autologen, kryokonservierten TK-Einheiten zwischen 1974 und 1981 transfundiert. Die Studie ergab, dass diese sicher und effektiv sind. Durch die rasche Einführung der HLA-typisierten TK auf den Markt stagnierte jedoch die Nachfrage nach autologen kryokonservierten TK.

Aktuell sind die kryokonservierten TK aufgrund der extrem langen Haltbarkeit unter anderem für das Militär attraktiv.

Das niederländische Militär setzt seit 2001 bei  $-80$  °C eingefrorene und bis zu zwei Jahre gelagerte Blutprodukte ein. Der TK-Einsatz von 2006 bis 2010 in Afghanistan wurde retrospektiv untersucht. Die Konzentrate wurden in fünf bis sieben Minuten auf  $+37$  °C aufgetaut, und in AB-Plasma resuspendiert, bevor sie mehr als 1.000 Patienten transfundiert wurden. Die Ergebnisse zeigen, dass diese Produkte hämostatisch effektiv und sicher sind. Der vermeintliche Nachteil ist hier von Vorteil, da sich die verstärkte Ausschüttung von Mikropartikeln günstig auf den blutenden Patienten auswirkt. Bei diesen Patienten ist die hämostatische Kapazität durch Blutverlust und EK-Transfusion eingeschränkt. Neben der erhöhten Anzahl an Mikropartikeln trägt auch die Resuspension der kryokonservierten Produkte in AB-Plasma zur verbesserten hämostatischen Funktion bei. So stellt die niederländische Gruppe ein Massivtransfusionsprotokoll vor (vier Erythrozytenkonzentrate (EK), drei Plasmen, ein TK), welches ohne kryokonservierte Produkte niemals den Bedarf an Thrombozytenkonzentraten decken könnte.

### LAGERUNG BEI +4 °C

In den 70er Jahren war die Kalllagerung im Kühlschrank zwischen  $+2$ – $4$  °C der Standard für TK-Konservie-

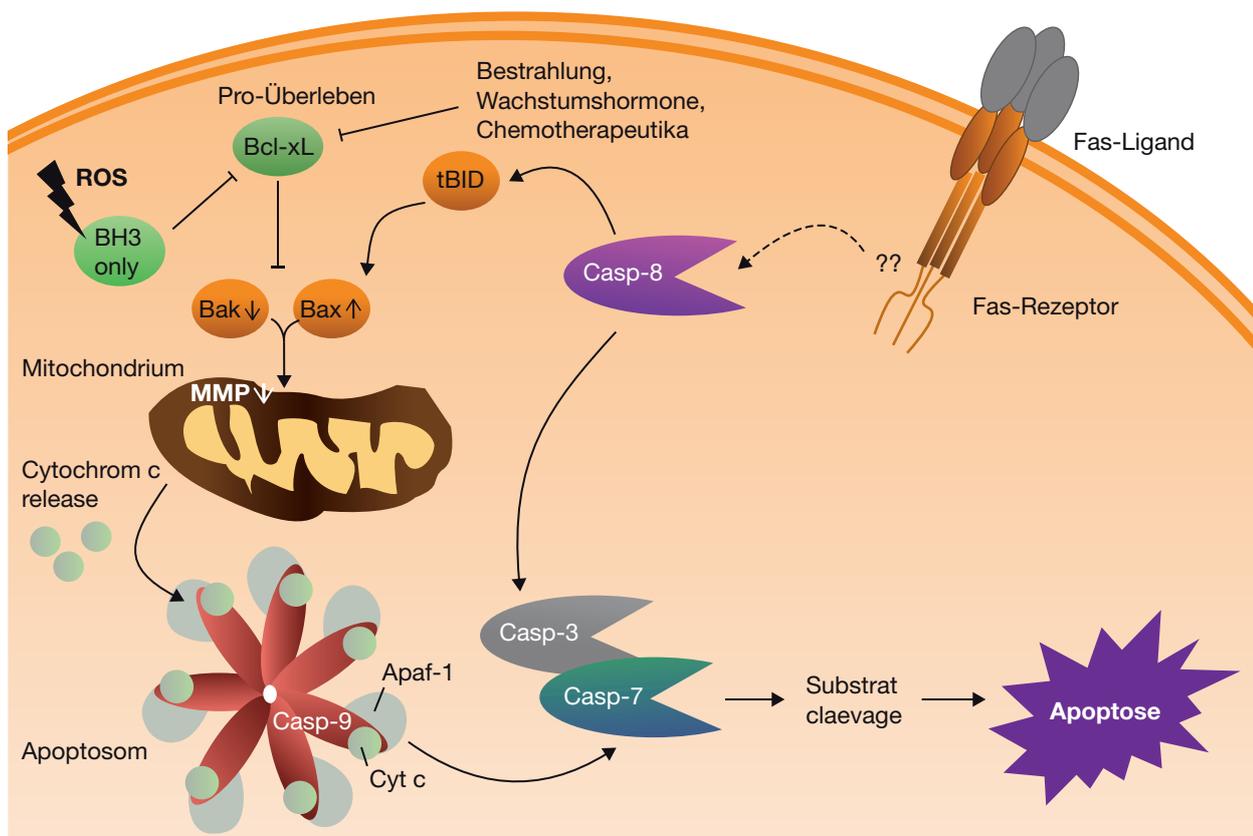
rung. Da jedoch bei dieser Methode die Lebensdauer der Thrombozyten auf zwei bis vier Tage im Blutkreislauf beschränkt war, wurde sie durch die Lagerung in Agitation bei  $+22 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$  ersetzt. Der Mechanismus, auf den die schnelle Elimination beruht, ist anscheinend durch die lagerungsinduzierte Anhäufung (Clustering) des Glykoproteins GPIIb $\alpha$  zu erklären. Diese Clustering führt zur Spaltung der Sialinsäure (Desialylierung) und Exposition der N-Acetylglucosamin (GlcNAc), welches einen Phagozytosemarker für die Makrophagen in der Leber darstellt. Unsere Untersuchungen haben gezeigt, dass nach sieben Tagen Lagerung bei kaltgelagerten PLT die Plättchenfunktion besser als bei Raumtemperatur erhalten bleibt, allerdings wird dadurch die Überlebensdauer der Zellen verkürzt. So konnten wir feststellen, dass durch die Kaltlagerung der intrinsische Apoptoseweg induziert wird, was auch eine Rolle bei der Elimination der Thrombozyten spielt. Dieser kann mit Caspaseinhibitoren gehemmt werden (**Abbildung 2**). Die Frage, ob die Apoptoseinhibition die Zirkulation der Thrombozyten im Körper verlängern kann, trägt womöglich zum besseren Verständnis des ablaufenden Prozesses nach der Transfusion bei,

aber auch möglicherweise zur Verhinderung der Zellelimination aus dem Blutkreislauf (**Abbildung 3**).

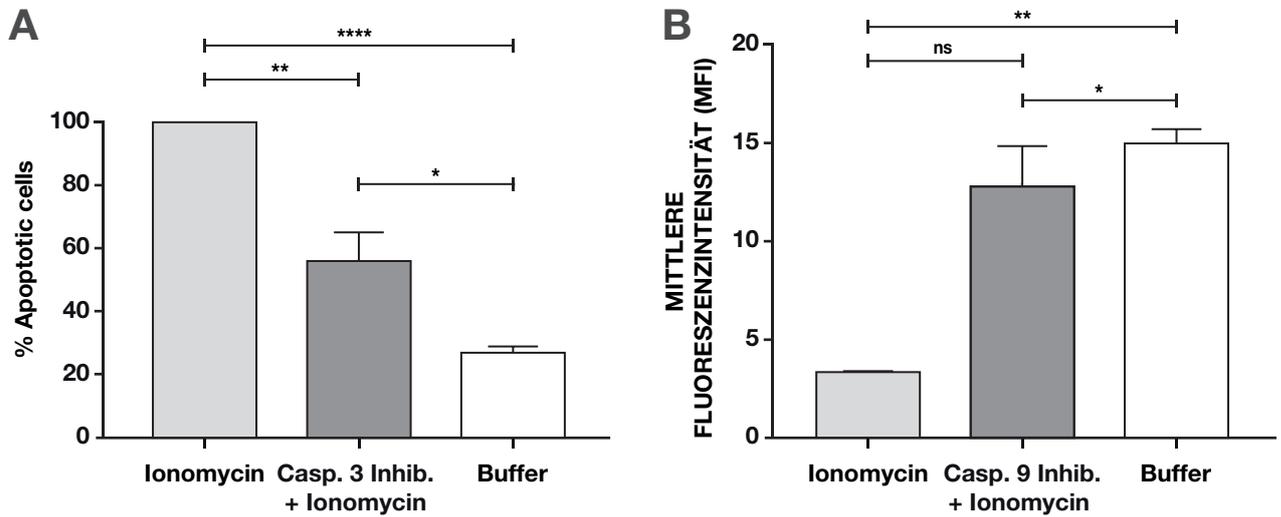
### FUNKTION DER THROMBOZYTEN-KONZENTRATE BEI $+4 \text{ }^\circ\text{C}$

Ein interessanter Aspekt ist, dass die Thrombozyten durch die Kaltlagerung eine neue Funktion gewinnen. Diese führt dazu, dass die kaltgelagerten Thrombozyten in vitro eine bessere Aktivierung als bei  $+22 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$  aufweisen.

Die Physiologie dahinter wird noch erforscht. Es wird vermutet, dass die Oberflächenvergrößerung durch die Konformationsänderung und die bessere Funktionsaufrechterhaltung dabei eine große Rolle spielen. Man weiß, dass die Thrombozyten eine irreversible Konformationsänderung vollziehen, wenn sie auf  $+4 \text{ }^\circ\text{C}$  heruntergekühlt werden. Nach zehn Minuten Kälteexposition unter  $+15 \text{ }^\circ\text{C}$  verändern die Thrombozyten ihre diskoidale Struktur durch den Verlust der Mikrotubuli in der Zellwand, wie bei der



**Abbildung 3:** Apoptoseweg eines Thrombozyten: Extrazelluläre Signale oder das durch Reactive Oxygen Species (ROS) aktivierte pro-apoptische BH3-only-Proteininhibitoren hemmen das Bcl-xL Protein (anti-apoptotic B-cell lymphoma-extra large). Dieses leitet die Bcl (B-cell lymphoma 2)-Familienproteinenkaskade ein. Die Zunahme der Bax- und Abnahme der Bak-Proteine führen zur Erniedrigung des Mitochondrienmembranpotentials (MMP). Es kommt zur Cytochrom-C-Freisetzung. Zusammen mit dem Apoptose-auslösenden Faktor 1 (Apaf-1) und Caspase 9 bildet Cytochrom C ein Apoptosekomplex, das Apoptosom. Dieses aktiviert wiederum Caspase 3 und 7, wodurch es schließlich zur Apoptose kommt. Caspase 8 kann sowohl direkt über die Caspasen 3 und 7 als auch indirekt über die Bcl-2 die Apoptose einleiten. Dabei ist es jedoch noch unklar, ob Caspase 8 im Thrombozyten durch den extrinsischen Weg (Fas-Rez.) aktiviert werden kann.



**Abbildung 4:** Anteil der apoptotischen Thrombozyten nach Caspase 3 Inhibitor-Behandlung mit einem Apoptoseinduktor Ionomycin als Positivkontrolle. 2b: Mittlere Fluoreszenzintensität des Markers für das Mitochondrienmembranpotential, Tetramethylrhodamin-methylester bei Thrombozyten nach Caspase 9 Inhibitorbehandlung mit Ionomycin als Positivkontrolle.

Aggregation. Kaltlagerung induziert den Zusammenbau von Aktin durch eine Entdeckung der Enden des Aktins.

Kaltgelagerte Plättchen sezernieren Granulainhalte und exprimieren die Phosphatidylserine auf der Oberfläche, schnüren Mikropartikel ab, wie bei einer Aktivierung. Es wird vermutet, dass die Kälteexposition den intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Anstieg triggert, sodass es zur Mediatorenausschüttung kommt. Die Eigenschaften der kaltgelagerten Thrombozyten ähneln dadurch denen frischer Thrombozyten. Die intrazelluläre Antwort bei kaltgelagerten Thrombozyten unterscheidet sich jedoch von derjenigen bei bei  $+22\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagerter Thrombozyten. Die Zellorganellen kaltgelagerter Thrombozyten sind in der Zelle verstreut, wogegen frische Thrombozytenkonzentrate oder bei Raumtemperatur gelagerte Thrombozyten ihre Organellen nach der Aktivierung in die Zellmitte bewegen, welche von den Mikrotubuli und Mikrofilamenten umringt werden. Diese diffuse, ungeordnete Anordnung der Organellen nach Aktivierung führt zur Vergrößerung der Oberfläche, was zur Folge hat, dass die Oberflächenrezeptoren besser mit den Liganden interagieren können und damit auch besser aggregieren können, was eine schnelle Aktivierbarkeit der Thrombozyten bedingt.

Des Weiteren wurde beobachtet, dass die Lagerungsassoziierten Läsionen bei  $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$  im Vergleich zu RT geringer sind: Der Metabolismus wird herunterreguliert, was zu einem verminderten Glukoseverbrauch und einer reduzierten Laktatbildung führt und der pH-Wert wird aufrechterhalten. Eine hohe Laktatkonzentration verursacht den Verlust der Plättchenfunktion. Kaltgelagerte Thrombozyten haben insgesamt einen reduzierten Metabolismus und produzieren somit auch weniger Laktat, sodass die Mitochondrien weniger belastet werden. Demzu-

folge zeigen die kaltgelagerten Thrombozyten eine bessere mitochondriale Funktion bei der Aktivierung. Die beste Aggregationsantwort lässt sich bei den Thrombozyten mit der besten Mitochondrienfunktion beobachten. Kaltgelagerte Thrombozyten produzieren weniger reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und besitzen die Fähigkeit, mehr ROS zu produzieren, wenn sie von Thrombin getriggert werden. Laktat scheint die ROS-Produktion zu ermöglichen. Dies ist wiederum wichtig, um die Thrombozyten zu aktivieren, Phosphatidylserine auf der Membranoberfläche zu exponieren und die Gerinnungskaskade zu aktivieren. Allerdings zeigen kaltgelagerte Thrombozyten einen beschleunigten Abbau. Die verstärkte apoptotische Kapazität ist eine Ursache hierfür. **Abbildung 3** zeigt hierzu typische Apoptosewege im Thrombozyten. Nur wenn es gelingt, diese Wege zu inhibieren, lässt sich die Zirkulation von kaltgelagerten Thrombozyten verbessern. Ein vielversprechender Ansatz ist hier die Inhibition der Caspase 3 im Thrombozyten. Hier wird durch Suppression der Caspase 3 die Apoptose unterdrückt und dadurch gleichzeitig das Mitochondrienmembranpotential verbessert (**Abbildung 4**).

#### TK-Recyclingsystem (RT gefolgt von $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ )

Bei diesem Konzept sollen bei RT für den maximal erlaubten Zeitraum gelagerte TK abgekühlt und für weitere Tage kaltgelagert werden. Dabei werden die Vorteile der beiden Lagerungstypen kombiniert, um einen Verwurf der TK zu vermeiden. Hier wurde die hypotone Schockreaktion, pH, Laktatproduktion und Glucoseverbrauch im Konzentrat untersucht. Funktionell wurde die CD62P-Expression verglichen und die Anzahl an Mikropartikeln im Produkt bestimmt. Die TK bei RT könnten aufgrund ihrer verlängerten Zirkulationsdauer präventiv eingesetzt werden. Kaltgelagerte TK wären ggf. für Patienten geeignet,

die direkte Hämostaseverstärker bei zum Beispiel starken Blutungen benötigen. Im klinischen Bereich müssten noch mehr Studien erfolgen, die die unterschiedlich gelagerten Thrombozyten zur Transfusion je nach Indikation unterschiedlich einsetzen. Durch den Einsatz je nach Klinik des Patienten könnte die Thrombosegefahr durch die Kaltlagerung verringert werden.

### Klinische Erfahrung mit der TK-Lagerung bei +4 °C

In der Mayo Klinik in den USA werden bereits seit 2015 kaltgelagerte Thrombozyten bei Patienten mit aktiver Blutung eingesetzt. Dabei werden ausschließlich in 100 % Plasma gelagerte Thrombozyten verwendet. Bis Sommer 2016 wurden letztendlich 21 (19,1 %) von 119 kaltgelagerten Thrombozytenkonzentraten an Patienten transfundiert. Die Kurzlagerung über drei Tage resultierte in einer gesteigerten Aggregatbildung in den Konzentraten, sodass 80,9 % aller Konzentrate verworfen werden mussten. Es wird suggeriert, dass die Plasmakonzentration der Konzentrate dies beeinflusst hat, denn die kaltgelagerten Thrombozyten neigen aufgrund ihrer besseren Aktivierbarkeit dazu, sich leichter an Fibrinogen zu binden. Deshalb wird bevorzugt eine Additivlösung aus Plasma und PAS verwendet, bei der die Fibrinogenkonzentration geringer ist, um der Aggregatbildung vorzubeugen und die hämostatische Funktion aufrechtzuerhalten. In unserer Studie wurde kein signifikanter Unterschied zwischen TK in 100 % Plasma im Vergleich zu TK in 35 % Plasma / 65 % PAS festgestellt. Ferner haben wir keine Beeinträchtigung der Thrombozytenfunktion durch Plasma-Reduktion auf 35 % beobachtet.

Erste Ergebnisse aus einer laufenden randomisierten klinischen Studie zeigen, dass die Transfusion von kaltgelagerten Thrombozyten genauso wirksam bei der Behandlung postoperativer Blutungen von Herz-OP-Patienten ist wie bei Raumtemperatur gelagerte TK. Es gab weniger lebensbedrohliche Blutung bei den kaltgelagerten TK. Darüber hinaus traten nicht mehr Komplikationen bei den bei +4 °C gelagerten Thrombozyten auf als bei den bei RT gelagerten. Außerdem wurden bessere Aggregation und geringere postoperative Blutung nach Erhalt von kaltgelagerten Thrombozytenkonzentraten beobachtet.

## ZUSAMMENFASSUNG

### Vorteile der Kaltlagerung

Die Kaltlagerung von Thrombozytenkonzentraten verbessert die Verfügbarkeit von Thrombozyten zur Transfusion. So könnten logistische Engpässe an Wochenenden und Feiertagen sowie bei Massivtransfusion von mehreren

Polytraumen gleichzeitig vermieden werden. Die hämostatische Funktion erscheint durch die erhöhte Anzahl an Mikropartikeln verbessert, sodass sich ein Einsatz gerade am blutenden Patienten als günstig erweist. Während der Kaltlagerung wird das Keimwachstum verlangsamt bzw. verhindert, sodass sich das Risiko einer transfusionsassoziierten Sepsis minimiert.

### Nachteile der Kaltlagerung

Für die Thrombozytenkonzentrate gibt es bis jetzt noch keine alternative Lösung als Raumtemperlagerung, die evidenzbasiert und sicher ist. Auch für die Kaltlagerung gibt es keine standardisierte Richtlinie. Man steht noch sehr am Anfang der Forschung. Unterschiedliche Arbeitsgruppen versuchen die verschiedensten möglichen Settings, um die optimalen Bedingungen herauszufinden, weshalb der Vergleich und die richtige Interpretation verschiedener Studien erschwert sind. Folglich wird das erste Ziel sein, dass man ein Standardsetting mit optimaler Plasmakonzentration, Aufbereitungsmethode, Lagerungsdauer, Temperatur usw. findet, sodass Studien und die klinischen Phasen erfolgen können. Thrombozyten in Kaltlagerung werden beschleunigt über den Apoptoseweg abgebaut, sodass sie zur Grundversorgung von hämatoonkologischen Patienten aktuell nicht geeignet sind. Um dieses Ziel zu erreichen, bedarf es wiederum vieler Experimente. Denn der mögliche Einsatz der kaltgelagerten Plättchen könnte einen großen Fortschritt für die Transfusionsmedizin bedeuten.

## Die Autoren



**Dr. rer. nat. Irene Marini**

Transfusionsmedizin-Universitätsklinikum  
Tübingen (UKT)  
irene.marini@med.uni-tuebingen.de



**Yoko Tamamushi**

Doktorandin  
Zentrum für Klinische Transfusionsmedizin  
Tübingen gGmbH (ZKT)  
yoko.tamamushi@student.uni-tuebingen.de



**Dr. med. Karina Althaus**

Fachärztin für Transfusionsmedizin,  
Zusatzbezeichnung Hämostaseologie  
Zentrum für Klinische Transfusionsmedizin  
Tübingen gGmbH (ZKT)  
karina.althaus@med.uni-tuebingen.de

Die Literaturhinweise zu diesem Artikel finden Sie im Internet zum Download unter: [www.drk-haemotherapie.de](http://www.drk-haemotherapie.de)