Aus der Abteilung für Transfusionsmedizin und Hämostaseologie

Klinik für Anaesthesiologie Klinikum der Universität München

Vorstand: Prof. Dr. med. Dr. h. c. Wolfgang Schramm

Einführung einer neuartigen Qualitätskontrolle (Multiplate®) für Thrombozytenapheresekonzentrate

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

vorgelegt von

Birgit Berghammer

aus

München

2010

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Michael Spannagl
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. Matthias F. Bauer
	Priv.Doz. Dr. Alexander Faußner
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr. med. Georg Wittmann
Dekan:	Prof. Dr. med. Dr. h.c. Maximilian Reiser, FACR, FRCR
Tag der mündlichen Prüfung:	29.07.2010

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung 1

1.1 Das Hämostasesystem 1

1.2 Plättchenmorphologie und zelluläre Organisation 1

1.3 Die primäre Hämostase 3

1.4 Die sekundäre Hämostase 5

1.5 Die Rolle des Endothels 6

1.6 Regulative Mechanismen 7

1.7 Methoden der Thrombozytenfunktionsdiagnostik 8

1.7.1 Blutungszeit 9

1.7.2 Plättchen-Funktions-Analyzer (PFA-100®) 9

1.7.3 Optische Aggregationsmessung (LTA-Light transmission aggregometry) nach Born 10

1.7.4 Impedanzaggregometrie 11

1.7.5 Durchflußzytometrie 14

1.7.6 Thrombelastographie 14

1.7.7 Impact® Cone and Plate(let) Analyzer 16

1.7.8 Hypotone-Schock-Reaktion (HSR) 17

1.7.9 Testauswahl 17

1.8 Thrombozyten in der Hämotherapie 22

1.9 Bildung von Referenzwerten und deren Konfidenzintervalle 25

1.10 Fragestellung und Zielsetzung 28

2. Material und Methoden 31

2.1 Verwendete Materialien 31

2.1.1 Thrombozytenkonzentrate 31

2.1.2 Citratröhrchen, gepuffert 31

2.1.3 Puffer 31

2.1.4 Weitere Reagenzien und Materialien 33

2.1.5 Verwendete Geräte 34

2.2 Methoden 35

2.2.1 Gewinnung Thrombozytensuspension 35

2.2.2 Beschreibung der Messungen ... 35
2.2.3 Statistische Methoden ... 37
2.3 Durchgeführte Messungen ... 38
2.3.1 Versuchsreihe Puffer ... 38
2.3.2 Versuchsreihe Konzentration Startreagenz ... 38
2.3.3 Versuchsreihe Multiplate® versus Born ... 39
2.3.4 Versuchsreihe Säure-Basen-Status ... 39
3. Ergebnisse ... 40
3.1 Allgemeines ... 40
3.2 Versuchsreihe Puffer ... 41
3.2.1 PBS ... 41
3.2.2 PBS + Probe aus Röhrchen mit gepuffertem Citrat ... 43
3.2.3 TRIS 20 mmol/l + $CaCl_2$ xH_2O 0,4 g/l + Hirudin 2 µg/ml ... 45
3.2.4 TRIS 20 mmol/l + $CaCl_2$ xH_2O 0,6 g/l + $MgCl_2$ 0,2 g/l + Hirudin 2 µg/ml ... 46
3.2.5 TRIS 20 mmol/l + $CaCl_2$ xH_2O 0,6 g/l + Hirudin 2 µg/ml ... 49
3.2.6 TRIS 20 mmol/l + $CaCl_2$ xH_2O 2,0 g/l + Hirudin 2 µg/ml ... 51
3.2.7 Tyrodes + $CaCl_2$ xH_2O 0,3 g/l + $MgCl_2$ 0,2 g/l + Hirudin 2 µg/ml ... 53
3.2.8 AB- Plasma + $CaCl_2$ xH_2O 1,5 g/l + Hirudin 2 µg/ml ... 55
3.2.9 PBS + Hirudin 2 µg/ml ... 57
3.2.10 TRIS 20 mmol/l + $CaCl_2$ xH_2O 25 mmol/l, bzw. 50 mmol/l + Hirudin 2 µg/ml ... 59
3.2.11 Ergebnisse Multiplate Abnahme-Verfall ... 61
3.3 Versuchsreihe Konzentration Startreagenz ... 62
3.3.1 PBS + Kollagen 40 µl ... 62
3.3.2 PBS + Kollagen 60 µl ... 63
3.4 Vergleich ‘Multiplate®‘ mit der Standardmethode ‘Born-Aggregation‘ ... 65
3.4.1 Ergebnisse der Messung nach Born ... 65
3.4.2 Ergebnisse der Multiplate®-Messung mit Kollagen 40 µl ... 66
3.4.3 Darstellung der Unterschiede Born-Multiplate® ... 67
3.5 Ergebnisse der Säure-Basen- Messung ... 70
3.5.1 Messung im Verlauf ... 70
3.5.2 Messung Abnahme-Verfall ... 73
3.6 Gegenüberstellung Säure-Basen-Status-Multiplate® ... 76

3.7 Bildung der Referenzwerte ... 77
3.8 Zusammenfassung der relevanten Ergebnisse ... 78
3.8.1 Versuchsreihe Puffer ... 78
3.8.2 Versuchsreihe Konzentration Startreagenz ... 78
3.8.3 Versuchsreihe Multiplate® versus Born ... 78
3.8.4 Versuchsreihe Säure-Basen-Status versus Multiplate® ... 79
3.8.5 Bildung der Referenzwerte ... 79
4. Diskussion ... 80
4.1 Versuchsreihe Puffer ... 81
4.2 Versuchsreihe Konzentration Startreagenz ... 84
4.3 Versuchsreihe Multiplate® versus Born ... 86
4.4 Versuchsreihe Säure-Basen-Status ... 87
4.5 Andere Einflussfaktoren auf das Ergebnis der Impedanzaggregometrie: Puffersubstanzen, Fibrinogen und vWF-Spiegel in der Probe ... 89
4.6 Normalwertfindung ... 90
4.7 Quervernetzung zum Konzept des Plättchenlagerungsschaden (PSL) ... 90
5. Zusammenfassung ... 92
6. Ergebnisanhang ... 94
7. Literaturverzeichnis ... 141
8. Danksagung ... 151
9. Lebenslauf ... 152

1. Einleitung

1.1 Das Hämostasesystem

Die Hämostaseologie ist die Lehre vom Fließen und Stocken des Blutes [62]. Die Hämostase unterliegt einem fein abgestimmten Gleichgewicht. Einerseits wird das Blut in einem flüssigen Zustand gehalten, andererseits muss bei einer Verletzung die rasche Abdichtung der eröffneten Gefäßwand durch die Aktivität der Thrombozyten und die Gerinnung des Blutes gewährleistet sein. Zugleich muss dieser Vorgang lokal begrenzt sein, um sowohl die weitere Durchblutung sicher zu stellen, als auch eine überschießende Reaktion zu verhindern. Diese Gratwanderung baut auf dem Zusammenspiel der Gefäßwand, der Thrombozyten und dem plasmatischen Systems der Blutgerinnungen auf. Unterteilt wird der Gerinnungsablauf in eine primäre und sekundäre Blutstillung. In der primären Phase kommt es, nach einer reflektorischen Kontraktion des verletzten Gefäßes, zur Bildung eines Thrombozytenpfropfs durch Interaktion von Thrombozyten untereinander und mit der Gefäßwand. Durch Verlust der Endothelintegrität nach Verletzung treten verschiedene Bestandteile des Hämostasesystems und die Thrombozyten in Kontakt mit Matrixproteinen wie Kollagen, Fibronektin oder Laminin, welche einen erheblichen Einfluss auf die Interaktion haben. Darauf folgt die sekundäre Blutstillung, die auf Aktivierung der plasmatischen Gerinnungsfaktoren beruht. Hierbei spielen neben dem Endothel wiederum die Thrombozyten eine zentrale Rolle.

1.2 Plättchenmorphologie und zelluläre Organisation

Thrombozyten sind kleine, kernlose, abgeschnürte Fragmente von Megakaryozyten aus dem Knochenmark, welche sieben bis zehn Tage im Blut zirkulieren [36]. Ein Drittel der Gesamtzahl an Thrombozyten konzentriert sich als Reservepool in den zahlreichen Milzsinus. Der Wert im peripheren Blut von Gesunden variiert interindividuell stark von 150.000-400.000/µl, während intraindividuell die Thrombozytenzahl innerhalb des Normbereichs nur etwa um 30.000/µl schwankt. Die Plättchen sind diskusförmig und haben eine Größe von 2-3,5µm auf 0,5-0,75µm [70]. Bezüglich des Volumens und der Dichte existiert eine beträchtliche Heterogenität [36]. Innerhalb des Thrombozyten existieren morphologisch verschiedene Zonen, die jeweils mit unterschiedlichen physiologischen Funktionen verknüpft sind.

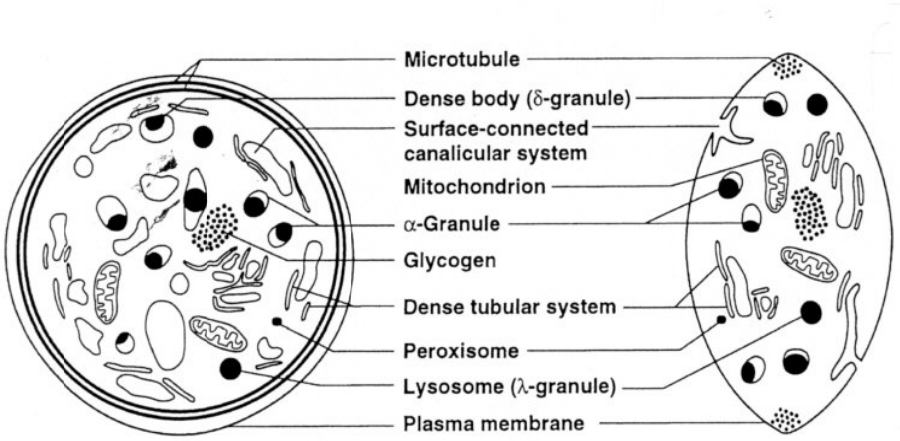


Abbildung 1: Subzelluläre Struktur eines Thrombozyten, nach [36]

Die **periphere Zone** setzt sich aus einer extramembranösen Glykokalix, einer darunterliegenden dreischichtigen Plasmamembran, welche ein System offener Kanälchen bildet, und dem Submembranbereich zusammen, letzter bildet einen Übergang zwischen peripherer Zone und Sol-Gel-Zone [70]. Hier findet sich Platz für Ionenkanäle, regulatorische Enzyme, Rezeptoren für Plättchenagonisten und adhäsive Glykoproteine.

Die **submembranöse Sol-Gel-Zone** birgt das Zytoplasma und das kontraktile Proteinsystem. Das Zytoskelett eines Thrombozyten enthält zwei auf Aktinfilamenten basierende Komponenten [30]. Ein Netzwerk aus Aktinfilamenten füllt das Zytoplasma aus und vermittelt die Kontraktion der Thrombozyten. Den zweiten Bestandteil stellt das membranassoziierte Zytoskelett dar, welches die Kontur und Stabilität des Plättchens reguliert. Das Zytoskelett spielt eine wichtige Rolle, sowohl in der räumlichen Organisation des Thrombozyten, als auch in der Integration von zellulären Aktivitäten, wie in der Bindung von Signalmolekülen, Beeinflussung der Exozytose und Regulation der Sekretion der α-Granula und der elektronendichten Granula [29; 30].

Die **Organell-Zone** besteht aus Mitochondrien, Peroxisomen, Lysosomen und den Plättchengranula.

Einen Überblick über die Inhaltsstoffe der Thrombozytengranula zeigt folgende Tabelle:

α- Granula	**Elektronendichte Granula**	**Lysosomen**
Plasma-Proteine	**Anionen**	**Saure Hydrolasen**
Fibrinogen, Gerinnungsfaktoren	ATP, ADP, GDP, GTP	β-Hexosaminidase
V und VIII,	Anorganische Phosphate	β-Galaktosidase
Fibronektin, Albumin,		β-Glukuronidase
Kallikrein, α_2-Antiplasmin.	**Kationen**	β-Arabinosidase
Thrombospondin, vaskulärer,	Calcium, Serotonin	β-Glycerophosphatase,
endothelialer Wachstumsfaktor		Arylsulfatase
Plättchenspezifische Proteine		
Plättchenfaktor 4,		
β-Thromboglobulin,		
Platelet derived Growth factor		

Tabelle 1: Inhaltsstoffe der Thrombozytengranula, nach [92]

Die Strukturen und die Funktion des Thrombozyten sind eng miteinander verzahnt. Nur ein intakter Thrombozyt kann alle nötigen physiologischen Funktionen erfüllen.

1.3 Die primäre Hämostase

Die primäre Hämostase ist gekennzeichnet durch Plättchenaktivierung und die Prozesse der Adhäsion und Aggregation.

In einem Gefäß ist die Flußgeschwindigkeit in Wandnähe niedriger als im Zentrum (Fahreus-Lindquist-Effekt), dieser Unterschied führt zu unterschiedlichen Scherkräften zwischen benachbarten Flüssigkeitskompartimenten [37]. Besonders hohe Scherraten bestehen in Arterien, Arteriolen und dem Kapillarbett. Die hohen Strömungsgeschwindigkeiten und Scherkräfte erschweren die Adhäsion der Thrombozyten.

Eine zentrale Rolle bei der Anheftung von Thrombozyten unter hohen Scherkräften an die verletzte Gefäßwand hat der **von-Willebrand-Faktor (vWF)**. Der vWF ist das größte Plasmaprotein und zirkuliert im Blut in Form von Multimeren von 500 kDa bis 20.000 kDa. Besonders ist hoch multimerisierter vWF hämostatisch aktiv [34]. Der vWF wird in den Endothelzellen und Megakaryozyten synthetisiert, gespeichert in den α-Granula der Thrombozyten und den Weibel-Palade-Körperchen der Endothelzellen und kommt auch im Subendothel und im Plasma vor [99]. In den beiden terminalen Bereichen des vWF liegen Rezeptorstrukturen für die Thrombozyten. Die A1-Domäne stellt die Bindungsstelle für das thrombozytäre Glykoprotein GpIbα dar, die C1-Domäne für das Gp IIb-IIIa, die Do-

mänen A1 und A3 sind Rezeptoren für Kollagen (insbesondere Typ I und III) [37]. Die **Plättchenadhäsion** basiert auf einer Interaktion der A1-Domäne des vWF mit dem Glykoprotein Ibα, einer Untereinheit des GpIb-IX-V Komplexes, auf der Thrombozytenmembran [42; 60]. Die Bindung unterliegt jedoch einer hohen Dissoziationsrate und ist damit ist zeitlich begrenzt [82; 99].

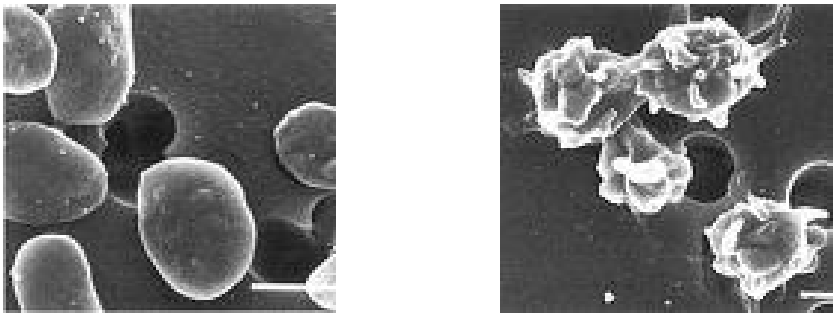


Abbildung 2: Abbildung 2 zeigt ruhende Thrombozyten die nach Aktivierung einer Formveränderung unterliegen, nach [89].

Die Serinprotease **Thrombin** interagiert mit ihrem, durch mittlere Affinität ausgezeichneten Rezeptor, welcher mit ca. 2000 Kopien auf der Plättchenoberfläche vorliegt [37]. Zusätzlich besteht eine Wechselbeziehung des Glykoproteins Ibα mit Thrombin [1; 21; 24; 58]. Die Bindung von Thrombin hat u.a. folgende Wirkungen: TXA_2-Bildung, zytoplasmatischer Calciumionenanstieg, „shape change“, Sekretion granulärer Inhaltsstoffe, Exposition des Fibrinogenrezeptors. **ADP** wird nach Aktivierung der Plättchen freigesetzt. ADP interagiert mit drei purinergen Rezeptoren. Diese spielen beispielsweise eine Rolle in der Formänderung der Plättchen, der TXA_2-Bildung oder auch der Adhäsion an immobilisiertes Fibrin. Als weiterer Agonist ist **Kollagen** zu nennen, das in dieser Arbeit als Hauptstimulanz der Thrombozyten eingesetzt wurde. Clemetson et al. [18] beschreiben zwei wichtige Rezeptoren für Kollagen: Das Integrin alpha2beta1 (GpIa/IIa), bedeutend für Adhäsion und Verankerung der Plättchen und das aus der Ig-Superfamilie stammende Gp IV, hauptsächlich verantwortlich für Signaltransduktion und Plättchenaktivierung. Zusätzlich kann der GpIb-V-IX-Komplex als indirekter Rezeptor für Kollagen betrachtet werden, indem er über den vWF als “Brückenmolekül“ eine tragende Rolle für die Plättcheninteraktion mit Kollagen bei hohen Scherkräften spielt. Dies ist auch durch andere Autoren belegt. [4; 75]. Eine weitere Rolle spielt das **thrombin receptor activating peptide** "TRAP". Unstimulierte Thrombozyten speichern präformiertes TRAP als Transmembranprotein in einem intrazellulären Kompartiment. Nach starker Aktivierung der Thrombozyten wird es rasch in die Oberflächenmembran integriert. Die Expression auf der

Oberfläche führt nach wenigen Stunden zu einer Proteolyse von TRAP, das als lösliche Form (sTRAP) in das Blutplasma abgegeben wird. TRAP hat u.a. einen Einfluss auf die Plättchenaggregation, ATP- und Arachidonsäure- Freisetzung und Calcium- Veränderungen [17; 66].

Die irreversible Thrombozyten-Aggregation kommt durch die Interaktion von Fibrinogen mit seinem thrombozytären Rezeptor zustande. **Fibrinogen** ist in der Interaktion der Plättchen mit der Gefäßwand, insbesondere bei den niedrigen Scherkräften der venösen Zirkulation, bedeutsam [33]. Gp IIb-IIIa ($\alpha_{IIb}\beta_3$), ein Calcium-abhängiges Heterodimer, stellt das Hauptintegrin der Thrombozytenmembran dar [36]. Die Bindung erfolgt nur nach vorheriger Plättchenaktivierung, da diese zu einer Konformationsänderung des Gp IIb-IIIa führt. [32]. Jedes Fibrinogenmolekül ist in der Lage, mit zwei Gp IIb-IIIa-Komplexen zu interagieren [38]. Es kommt u.a. zum Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration, Reorganisation des Zytoskeletts, Sekretion thrombozytärer Granula und zur Freisetzung von prokoagulatorischen Membranvesikeln. Die irreversible Bindung führt zur vollständigen Ausbreitung der Plättchen auf der adhäsiven Oberfläche und zum Wachstum des Thrombozyten-Aggregats.

Receptor for	**Electrophoretic**	**Cluster Differentiation**	**Integrin**
Collagen	GpIa-IIa	CD49b	$\alpha_2\beta_2$
Fibronectin	GpIc-IIA	CD49c	$\alpha_5\beta_1$
Vitronectin	--	--	$\alpha_v\beta_3$
Fibrinogen	GpIIb-IIIA	CD41/61	$\alpha_{IIB}\beta_3$
Laminin	GpIc-IIA	CD49f	$\alpha_6\beta_1$
VWF	GpIb-IX-V	CD42a,b,c,d	--
Thrombospondin	GpIV	CD36	--

Tabelle 2: Übersicht über Rezeptoren auf der Thrombozytenmembran, nach [36]

1.4 Die sekundäre Hämostase

Der Thrombozytenpropf (weißer Abscheidungsthrombus) kann für sich allein größere Gefäßläsionen nicht abdecken, erst durch die sekundäre Hämostase werden die Gefäße mit dem roten Abscheidungsthrombus, der Erythrozyten und Leukozyten enthält, endgültig verschlossen.

Die starre Trennung in ein intrinsisches und extrinsisches System mit gemeinsamer Endstrecke ist überholt, da es zahlreiche Querverbindungen gibt. Der prokoagulatorische Sti-

mulus muss einen gewissen Schwellenwert für die Auslösung der Gerinnungskaskade überschreiten, dieser Wert ist auch vom Ausmaß der Plättchenaktivierung abhängig [109]. Die Reaktionsschritte finden subendothelial und auf Zelloberflächen statt. Letztendlich scheint es, dass Gerinnungsfaktoren, die an Plättchenoberflächen gebunden sind, vor Inhibitoren wie z.B. Antithrombin oder Protein C geschützt sind [36].

Die Aktivierung der Gerinnungskaskade wird durch den **Tissue Factor (TF)** eingeleitet. Der Tissue Factor aktiviert FVII zu FVIIa. Die Faktoren X und IX stellen die Substrate für den enzymatisch aktiven FVIIa/TF-Komplex dar [70]. FXa aktiviert FV zu FVa, zusammen mit Ca^{2+} und Phospholipiden bilden sie den Prothrombinkomplex. Dieser spaltet aus dem inaktiven Proenzym Prothrombin (72 kDa) das enzymatisch aktive Thrombin (35 kDa) ab. Fibrinogen, ein 340 kDa großes Glykoprotein, wird durch Thrombin in die Fibrinopeptide A und B gespalten, die entstandenen Monomere polymerisieren sowohl mit anderen Monomeren als auch mit Fibrinogen [70]. Unter der Wirkung des fibrinstabilisierenden Faktors XIIIa entstehen kovalente Bindungen, die zu einem festen Gerinnsel führen. In diesen Prozessen gibt es zahlreiche Rückkopplungsmechanismen und Querverbindungen.

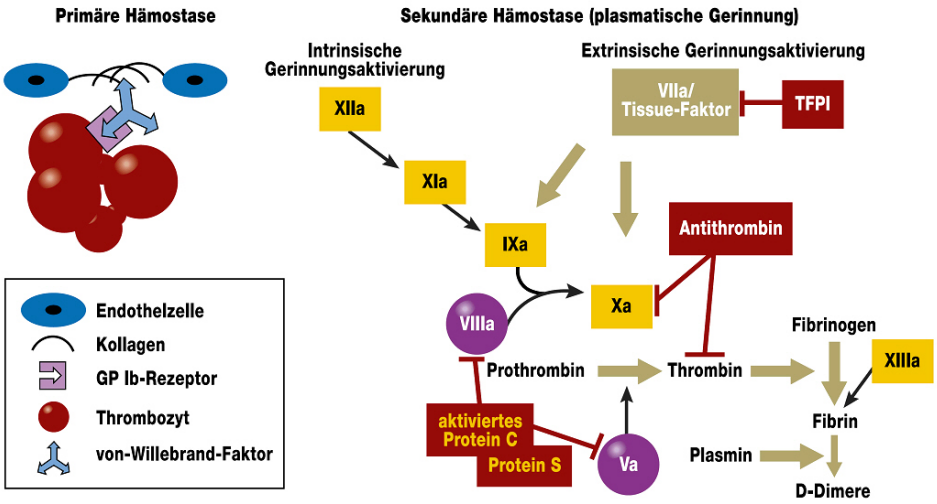


Abbildung 3: vereinfachte schematische Darstellung der primären und sekundären Hämostase, nach [61]

1.5 Die Rolle des Endothels

Unter physiologischen Bedingungen zirkulieren die Thrombozyten unter engem Kontakt mit den Endothelzellen ohne in Wechselwirkung mit ihnen zu treten. Besonders unter arteriellen Strömungsbedingungen kommt es durch sogenannte Axialmigration zu einem wenige Mikrometer dünnen Plasmasaum, der frei von Erythrozyten ist aber zugleich eine ho-

he Konzentration von Thrombozyten aufweist [82]. Mittels der Anhäufung der Plättchen in Wandnähe ist eine ständige „Inspektion der Endothel-Integrität“ gewährleistet.

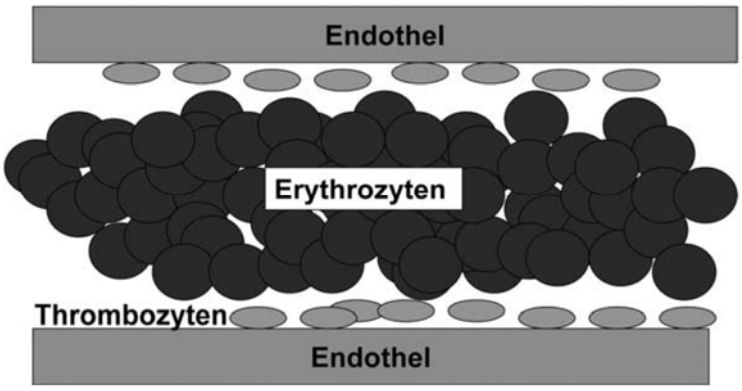


Abbildung 4: Axialmigration der Erythrozyten unter Strömung. An der Gefäßwand bildet sich dadurch ein thrombozytenreicher Plasmasaum, nach [82]

Die thrombophobe Eigenschaft des Endothels kommt durch die negativ geladene Endothelzelloberfläche und durch eine aktive Leistung dieser Zellen zustande, indem sie wichtige Komponenten des Hämostasesystems synthetisieren und sezernieren bzw. auf ihrer Oberfläche exprimieren [70]. Stickstoffmonoxid (NO) wird, besonders unter hohen Scherkräften, vermehrt aus Endothelzellen freigesetzt, hat eine vasodilatatorische Wirkung und inhibiert die Aktivierung der Plättchen und die Plättchenaggregation, fördert die Auflösung kleinerer Thrombozytenaggregate und beeinflusst die Fibrinolyse [20; 77; 91; 108]. Prostacyclin fungiert ebenfalls als potenter Hemmstoff. Endothelzellen wirken prokoagulatorisch, da sich an sie u.a. Gerinnungsfaktoren binden können, sie einen Rezeptor für Faktor IX/IXa besitzen und den Tissue Factor bilden [70].

Ebenso gibt es viele beispielhaft zu nennende antikoagulatorische Effekte [70; 76]: Der Membranrezeptor Thrombomodulin bindet Thrombin mit hoher Affinität. Der ‚tissue factor pathway inhibitor‘, kontinuierlich von der Endothelzelle produziert und sezerniert, inhibiert den ‚extrinsischen‘ Aktivierungsweg. EPCR, ein Rezeptor auf der Zelloberfläche ist an der Aktivierung von Protein C beteiligt.

Es zeigt sich, dass ein vollständiges Zusammenspiel von Endothel, Thrombozyten und plasmatischer Gerinnung vorhanden sein muss, um die Hämostase in ihrer Funktion zu gewährleisten.

1.6 Regulative Mechanismen

Die einmal angestoßene Gerinnung muss einer Regulation unterliegen. Ungestoppt würde der Vorgang der Hämostase zu einem uneingeschränkten Wachstum des Gerinnsels führen.

Die Mehrheit der in der plasmatischen Gerinnung involvierten Proteine zirkulieren als inaktive Proenzyme, die einer proteolytischen Aktivierung bedürfen, z.B. sind nur 1% der Moleküle des zirkulierenden Faktor VII (Proenzym) als Faktor VIIa (aktiviertes Enzym) vorhanden [51].

Thrombomodulin, ein Rezeptor auf der Membran der Endothelzelle, bindet Thrombin mit hoher Affinität. Thrombin, welches an Thrombomodulin gebunden ist, wird von im Plasma befindlichen Proteaseinhibitoren mehr als 20fach schneller inaktiviert als freies Thrombin [26]. Thrombin ist nach Bindung an Thrombomodulin in der Lage das Protein C- eine Serinprotease- zu aktivieren [70]. Das Protein C inhibiert mit seinem Kofaktor Protein S den Faktor VIIIa und Faktor Va an der Oberfläche von negativ geladenen Phospholipidmembranen [19].

Die antikoagulatorische Wirkung von **Antithrombin**, ein von der Leber synthetisiertes Protein, beruht auf einer 1:1 stöchiometrischen Komplexbildung mit Thrombin oder FXa [80]. Mit deutlich niedriger Affinität können auch die Faktoren IXa, XIa, XIIa und Kallikrein inaktiviert werden.

Die Fibrinolyse sorgt, mittels **Plasminogen**, für eine enzymatische Auflösung des Gerinnsels. Die durch den Tissue- Plaminogen- Activator (t-PA) vermittelte Aktivierung von Plasminogen ist vorwiegend in der Auflösung von sich in der Zirkulation befindlichem Fibrin beteiligt, während sich der Urokinase- Plaminogen- Activator (u-PAR) an seinen Rezeptor bindet. Daraus resultiert eine erhöhte Aktivierung von zellgebundenem Plasminogen [105]. Als Folge der Plasmin-induzierten Spaltung entstehen u.a. D-Dimere und E-Fragmente. Die Balance aller Komponenten, Gefäßwand, Thrombozyten, adhäsive- und koagulatorische Proteine und regulative Mechanismen bestimmen die Wirksamkeit des Gerinnsels bezüglich der Erhaltung der strukturellen und funktionellen Integrität des Kreislaufsystems [39].

Folglich sind die Thrombozyten sowohl in der primären, in der sekundären, als auch in der Regulation der Hämostase zentral eingebunden.

1.7 Methoden der Thrombozytenfunktionsdiagnostik

Seit etwa 100 Jahren untersucht man Thrombozyten in ihrer Funktion. Hauptproblem ist dabei die standardisierte Stimulation der Hämostase in vitro. Zugleich sind die Plättchen sehr empfindlich gegenüber Manipulation in der Präanalytik. Erste Methoden bestanden in der Auszählung der Thrombozyten vor und nach Aussetzung an Fremdoberflächen [62]. Beispielhaft werden hier einige Methoden dargestellt:

1.7.1 Blutungszeit

Der älteste Test zur Erfassung der Thrombozyten-Funktion stellt die Bestimmung der Blutungszeit in-vivo dar. Bei einer stich-oder schnittförmigen Verletzung hängt die Dauer der Blutung von der Bildungsgeschwindigkeit und Festigkeit des Plättchenthrombus ab, wird also in erster Linie von der Zahl und Funktion der Thrombozyten bestimmt. Die Blutungszeitbestimmung ist ein in-vivo-Globaltest, der die primäre Hämostase erfasst [6].
Zwei Methoden haben sich durchgesetzt:
Subaquale Blutungszeit nach Marx: Mit einer Lanzette wird eine ca. drei Millimeter tiefe Wunde gesetzt, die Wunde wird in steriles Aqua dest. von Zimmertemperatur eingetaucht. Messung der Zeit bis zum Stillstand der Blutung.
Blutungszeit nach Ivy: Nach Stauung des Oberarms von 40 mm Hg wird ein standardisierter Schnitt gesetzt, Messung der Zeit bis Sistieren der Blutung durch Abtupfen.

1.7.2 Plättchen-Funktions-Analyzer (PFA-100®)

Die Erstbeschreibung datiert aus 1985 [55]. Hierbei handelt es sich um eine Messung der primären Hämostase (Aggregation und Adhäsion der Thrombozyten) bei hohen Scherkräften (5000-6000/sec) [81]. Dabei wird auf 37°C vorgewärmtes Citratblut mittels eines Vakuums durch eine Kapillare gesogen und trifft auf eine Membran mit einer fest definierten Öffnung von 150 µm. Die Membran ist mit Kollagen Typ I, zusätzlich entweder mit ADP oder Epinephrin beschichtet [6]. Die Thrombozyten haften und bilden einen Plättchenpfropf. Die Zeit vom Testbeginn bis zum Verschluss der Öffnung wird in Sekunden gemessen und angegeben.
Die PFA-Messung erfasst also hauptsächlich die Thrombozytenfunktion bei Kontakt an einer prokoagulatorischen Oberfläche.

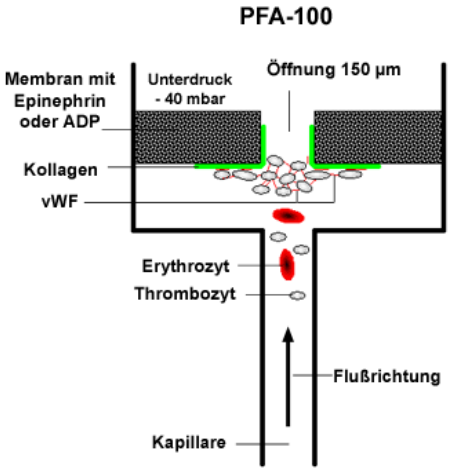


Abbildung 5: Funktionsprinzip der PFA-100®-Messung, das Gerät simuliert in seinem Meßsystem die Verhältnisse in einem verletzten Gefäß, nach [46]

1.7.3 Optische Aggregationsmessung (LTA-Light transmission aggregometry) nach Born

Die von Born 1962 vorgestellte turbidimetrische Methode ist die am häufigsten in Speziallaboratorien gebrauchte Methode und gilt immer noch als Gold-Standard der Thrombozytenaggregationsmessung. Aus einer Vollblutprobe des Patienten wird durch Zentrifugation plättchenreiches Plasma (PRP) und plättchenarmes Plasma (PPP) gewonnen. Beide Proben werden in Küvetten, welche einen Magnetrührer enthalten, bei 37°C inkubiert und anschließend fortlaufend photometriert. Das unbehandelte PRP gilt per Definition als 100%, die durch das PPP als 0%-oder Leerwert. Durch Zugabe eines Agonisten wie z.B. ADP, Kollagen, Epinephrin oder Ristocetin kommt es zur Aggregatbildung der Thrombozyten. Der Prozess der Aggregatbildung verringert die Trübung der Lösung und erhöht somit die Lichtdurchlässigkeit.
Die Formation der Aggregate ist proportional zum Anstieg der Lichtdurchlässigkeit [55]. Gemessen werden:

- maximale Lichtdurchlässigkeit (=Aggregationsmasse der Thrombozyten) in % der Lichtdurchlässigkeit des Leerwertes
- Geschwindigkeit der Aggregatbildung
- qualitative Beurteilung der Form der Aggregationskurve (stufenförmiger, verzögerter Anstieg, Desaggregation) [6]

Die Bestimmung muss 30-60 min nach Entnahme erfolgen. Lipämische und ikterische Proben können naturgemäß nicht verwendet werden [22].
Die optische Aggregometrie nach Born erfasst gut die Plättchenfunktion selbst und die Interaktion zwischen den Plättchen, nicht aber die Aktivierung an Fremdoberflächen.

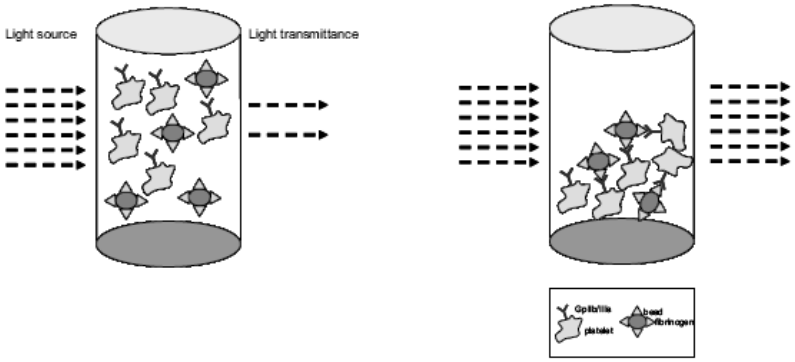


Abbildung 6: Abbildung 6 zeigt das Prinzip der turbidimetrischen Aggregationsmessung, nach [54]

1.7.4 Impedanzaggregometrie

Cardinal und Flower beschrieben 1980 das Prinzip der Widerstandmessung [16].
Hierbei tauchen zwei Platinelekroden in die Probe. Während des initalen Kontaktes des Blutes mit den Elektroden kommt es zu einer Ummantelung mit Thrombozyten (zunächst als Monolayer). Ohne weitere aggregationsfördernde Reagenzien bleiben weitere Interaktionen zwischen den Plättchen aus und die Leitfähigkeit zwischen den Elektroden zeigt sich nahezu konstant. Es wird die Eigenschaft von Thrombozyten genutzt, in unstimulierter Form nicht thrombogen zu sein und bei Aktivierung an der Oberfläche GpIIb/IIIa-Rezeptoren in großer Zahl freizusetzen [13]. Bei Zugabe der entsprechenden Reagenzien aggregieren weitere Thrombozyten mit denjenigen, die bereits an der Elektrode haften. Es kommt sukzessive zu einer zunehmenden Ummantelung der Elektroden.

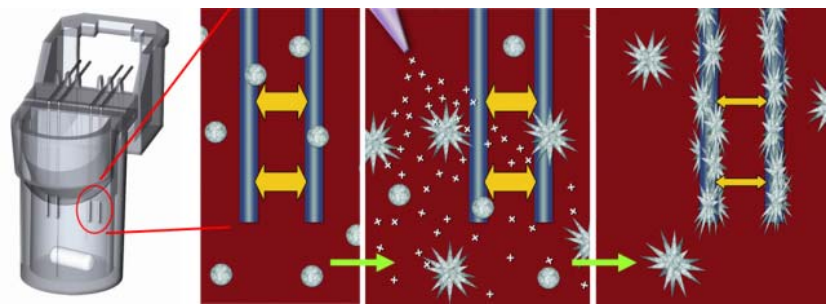


Abbildung 7: Messprinzip der Impedanzaggregometrie, die Abbildung zeigt die Anheftung der Thrombozyten an den Elektroden, nach [71]

Dabei vermindert sich Stromfluß zwischen den Elektroden und der Widerstand, dem Ohmschen Gesetz folgend, erhöht sich. Die Vergrößerung des Widerstandes gilt als Maß für die Aggregation. Da die Meßanordnung nicht mit Gleichstrom betrieben wird, sondern niedrigvoltaige Wechselströme zum Einsatz kommen, wird als Messgröße nicht der Gleichstromwiderstand, sondern der Wechselstromwiderstand, die Impedanz, verwendet. Die Messung kann mit Vollblut oder PRP durchgeführt werden.

Bei der Impedanzaggregometrie wird sowohl die Interaktion mit Fremdoberflächen, als auch die Interaktion der Thrombozyten untereinander erfasst.

Das **Multiplate®-System** ist eine Weiterentwicklung der Vollblutaggregation nach Cardinal und Flower [101].

Der Ausdruck „Multiplate®“ leitet sich ab von „multiple platelet function analyzer“. Die multiple Messung begründet sich durch die bestimmte Anordnung der Elektroden in den Testküvetten, vier Elektroden bilden zwei unabhängige Sensoreinheiten. Die zweifachen Sensoren dienen als interne Kontrolle, dies stellt eine Möglichkeit zur Reduktion des Auftretens von systematischen Fehlern dar [95].

Abbildung 8: Schematische Darstellung der Testküvetten der Firma Dynabyte, nach [72]

Das Gerät verfügt über fünf Kanäle, erlaubt somit ein paralleles Messen. Die Küvetten stellen Einmalprodukte dar, was ein umständliches manuelles Reinigen und somit potentielle Fehlerquellen umgeht. Durch Elektronenmikroskopie wurde gezeigt, dass Plättchen die während des Tests aggregieren, auf der Oberfläche der Elektrode haften bleiben und es wahrscheinlich ist, diese auch durch Waschen nicht vollständig entfernen zu können und es infolgedessen durch den wiederholten Gebrauch der Küvetten zur Beeinflussung des Testergebnisses kommen kann [95].

Die Elektroden bestehen aus leitfähigem, silberummanteltem Kupfer. Sie weisen einen Durchmesser von 0,3 mm und eine Länge von 3 mm auf.

Durch die Anlagerung der Thrombozyten, bzw. der Bildung von Aggregaten an den Elektroden, kommt es zur Verringerung des Stromflusses und somit zur Erhöhung des Widerstandes. Die Änderung des Widerstandes wird im Multiplate® in sogenannten „Aggregations Units“ (AU) ausgedrückt. Ein weiterer aufgeführter Wert stellt die „Velocity“ (Zeit in AU/min) der Aggregationsbildung dar. Beide Werte fließen in die „Area under the curve“ (AUC in AU xmin) ein. Da die AUC eine Funktion der AU und AU/min darstellt, wird die Priorität auf diesen Parameter gelegt. Mittlerweile gibt es eine neue Nomenklatur: 10 AU xmin = 1U. Beide Ausdrücke werden aber noch parallel verwendet.
In dieser Arbeit wird durchgängig die Einheit AU xmin (AUC) verwendet.

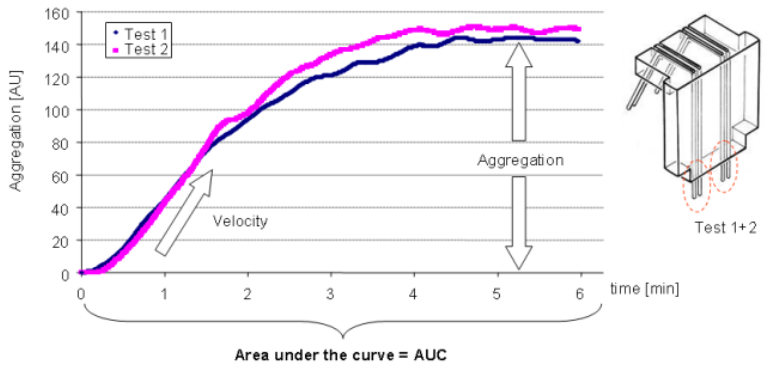


Abbildung 9: Area under the curve = AUC (AU xmin or U) 10 AU xmin = 1 U. Gemessene Parameter am Multiplate®-Gerät, nach [73]

Das Gerät errechnet automatisch den Pearson Korrelationskoeffizienten. Zeigt dieser einen Wert unter 0,98 wird der Untersucher aufgefordert, die Messung zu wiederholen. Des Weiteren werden die AUC’s der zwei Sensoreinheiten verglichen und bei einer Abweichung > 20% sollte die Messung ein erneutes Mal vorgenommen werden.
Mit dem Multiplate® kann elektronisch mit der E-Line Pipette oder manuell pipettiert werden.

Abbildung 10: Multiplate®- Analyzer, nach [23]

1.7.5 Durchflußzytometrie

Mittels der Durchflußzytometrie können primär die physikalischen und biochemischen Merkmale von biologischen Partikeln gemessen werden, wie Zellen als Ganzes oder aufbereitete zelluläre Bestandteile [48]. Dies geschieht prinzipiell durch Registrierung von optischen Signalen seitens der Thrombozyten beim Passieren eines Laserstrahls. Ein fokussierter Laserstrahl aktiviert die fluoreszierenden Konjugate innerhalb ihres entsprechenden Absorptionsspektrums [81]. Die Fluoreszenz und die Lichtstreuung (Vorwärts-und Seitwärtsstreuung) können quantitativ gemessen werden und erlauben so Rückschlüsse auf die Zellbeschaffenheit, die Ausprägung verschiedener Marker und damit auf die Thrombozytenfunktion.
Die Durchflußzytometrie kann dabei sehr gut die Funktion einzelner Thrombozyten erfassen, nicht aber die Interaktion untereinander und die Reaktion auf Kontakt mit Fremdoberflächen.

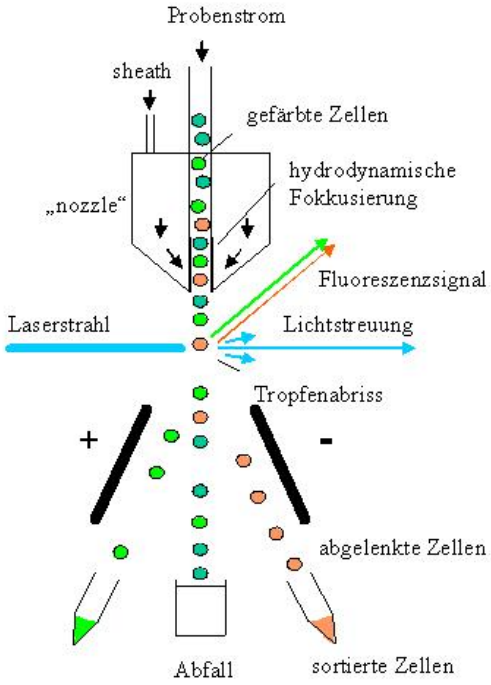


Abbildung 11: Das Prinzip der Durchflußzytometrie wird schematisch dargestellt, nach [47]

1.7.6 Thrombelastographie

Die bereits 1948 beschriebene Thrombelastographie fand in den 80er Jahren Einzug in die Diagnostik, vor allem von perioperativen Gerinnungsstörungen. Sie beschreibt die viskoelastischen Eigenschaften des sich bildenden Thrombus während der Thrombusformation

und- lyse [98]. Erfasst wird neben der Integrität der Plättchenaktivierung auch die Thrombusformation, plasmatische Gerinnung und Fibrinolyse.
Um die Thrombozyten zu aktivieren werden dem Vollblut oder recalcifiziertem Plasma bestimmte Agonisten zugegeben. Die darauffolgende Gerinnselbildung kann in dem oszillierenden Gefäß durch die resultierende Geschwindigkeitsänderung einer feinen Nadel sichtbar gemacht werden.

Beurteilt werden:

- die Zeit bis zur Gerinnselbildung, als Funktion der Thrombinaktivität
- das Ausmaß der Gerinnung
- die maximale Amplitude, als Funktion der Größe des Gerinnsels
- der Grad der Amplitudenreduktion, als Funktion der Lyse [54].

Die rotierende Thrombelastographie (ROTEM/ROTEG), stellt eine weitere Entwicklung der klassischen Thrombelastographie dar. Hierbei ist das Reaktionsgefäß fixiert, während die Nadel rotiert. Aufgezeichnet wird ebenfalls die Geschwindigkeitsänderung.
Die Thrombelastographie erfasst also die Thrombozytenfunktion in Abhängigkeit von der plasmatischen Gerinnung und Fibrinolyse.

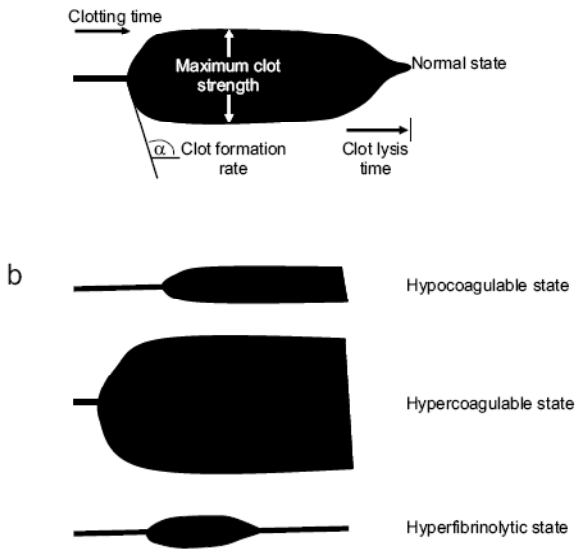


Abbildung 12: Schematische Darstellung der Thrombelastographie. Abbildung a zeigt einen normalen Verlauf, Abbildung b zeigt verschiedene pathologische Verläufe, nach [54]

1.7.7 Impact® Cone and Plate(let) Analyzer

Varon und Savion stellten 1997 eine Methode vor, in der die Abscheidung und Aggregation von Thrombozyten im Vollblut unter definierten Scherbelastungen quantitativ gemessen werden kann [102].

Citratgepuffertes Vollblut wird in das Probengefäß auf die Platte gegeben und nach Zugabe des Konus wird unter definierten Scherkräften (1800/s) die Messung gestartet. Durch die hohe Scherbelastung zwischen Platte und Konus wird die Aktivierung der Thrombozyten ausgelöst. Die aktivierten Plättchen heften sich an der Platte an. Im nächsten Schritt wird die Platte gewaschen und gefärbt. Es folgt die Messung des prozentualen Anteils der gefärbten Thrombozyten und der durchschnittlichen Größe der Gebilde. Unter diesen Bedingungen haften nur Thrombozyten, keine anderen Blutzellen, auf der Oberfläche und bilden längliche Aggregate, die sich anhand der laminaren Flusslinien ausrichten [13; 103]. Diese Methode erfasst also sehr gut die Aktivierung von Thrombozyten unter hohen Scherkräften an einer Fremdoberfläche.

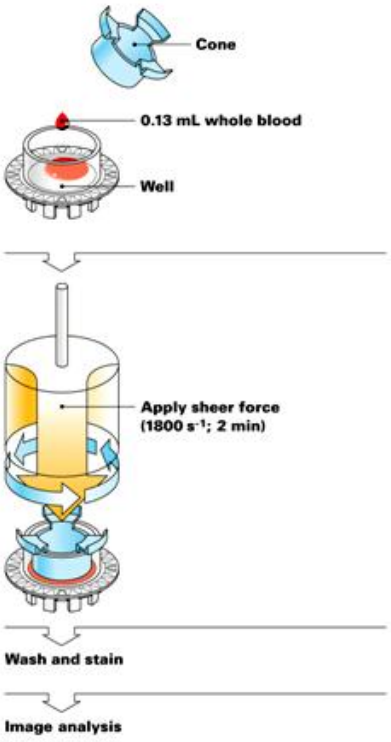


Abbildung 13: Schematische Darstellung des Aufbau eines Impact® Cone and Plate(let) Analyzers, nach [64]

1.7.8 Hypotone-Schock-Reaktion (HSR)

Mittels der Methode der Hypotonen-Schock-Reaktion (hypotonic shock reaction) lässt sich eine Aussage über die Membranintegrität der Thrombozyten treffen [27; 53]. Thrombozyten werden gegenüber destilliertem Wasser exponiert und nehmen dies aufgrund des Konzentrationsgefälles auf. Die Folge ist eine Vergrößerung ihres Volumens und eine im Photometer messbare Zunahme der Lichttransmission. Insofern die Plättchen über eine intakte Membranregulation und einen funktionierenden Energiestoffwechsel verfügen, sind sie in der Lage, das Wasser aktiv wieder heraus zu transportieren. Die Thrombozyten kehren in ihre ursprüngliche Form zurück, dies ist photometrisch erkennbar an einer Abnahme der Lichttransmission. In der Regel wird die Zu- bzw. Abnahme der Lichtransmission bei 610 nm photometrisch gemessen. Diese Methode erlaubt eine Beziehung zwischen dem pH-Wert des Plättchenkonzentrates und der Lebensfähigkeit der Thrombozyten herzustellen [28, 41].
Die HSR erfasst also gut die noch vorhandene Kapazität der Thrombozyten sich einem wechselndem externen Milieu anzupassen, sonst aber keinen funktionellen Aspekt der Thrombozyten.

1.7.9 Testauswahl

Die Vorteile der **Blutungszeit** liegen in der schnellen und einfachen Durchführung und in ihrer Eigenschaft als ‘in vivo-Methode‘. Die Sensitivität ist gering und sie ist schwer standardisierbar, da sie im hohen Maße von z.B. der Fertigkeit des Untersuchers, der Hautdicke oder -temperatur abhängt. Die Testvariabilität ist hoch, die Vorhersagekraft für das Risiko einer Blutung relativ niedrig. Sie liefert aber dem erfahrenen Beobachter einen guten Überblick über die Funktion der primären Hämostase.
Der **PFA-100®** stellt eine schnelle, einfache und reproduzierbare Methode dar, welche in vitro physiologische Bedingungen simuliert. Es wird nur eine kleine Menge an Blut benötigt. Harrison [38] berichtet über einen hohen negativen prädiktiven Wert von > 90% innerhalb 740 getesteter normaler und pathologischer Proben. Der Test ist u.a. indiziert bei Verdacht auf Blutungsleiden, Verlaufskontrolle der Substitutionstherapie bei Thrombozytopathien- oder penien und insbesondere bei Verdacht auf ein **von-Willebrand-Jürgens-Syndrom**, speziell Typ I. Posan et al. zeigten, dass die Sensitivität des PFA-100® für das Erkennen eines von-Willebrand-Jürgens-Syndroms signifikant besser ($p < 0,01$) war, als die Blutungszeit bei gleicher Spezifität [79]. Der PFA-100® erlaubt

eine Einschätzung über die Thrombozytenfunktion und hat im klinischen Alltag die in-vivo-Blutungszeit weitgehend ersetzt.

Die **Aggregation nach Born** ist in Speziallaboratorien nach wie vor die am häufigsten eingesetzte Methode um Defekte in der Thrombozytenfunktion zu identifizieren und weiter abzuklären [38]. Die Methode weist einige Limitationen auf. Diese schließen mangelhafte Reproduzierbarkeit, hohes Probenvolumen, hoher Material-und Zeitaufwand, Bedarf an technisch ausgebildetem Personal und hohe Kosten ein [68]. Da die Aggregometrie in plättchenreichem Plasma nur unter vergleichsweise niedrigen Scherkräften gemessen wird, repräsentiert das Testprinzip die primäre Hämostase nicht ausreichend [54]. Breddin führt einige Regeln auf die, insofern sie allgemein akzeptiert würden, die Aggregometrie vergleichbarer, einfacher und verlässlicher machen [10]. Hierunter fällt z.B. die Präanalytik, die er als die wahrscheinlich wichtigste Komponente betrachtet (u.a. Präparation des PRP, Inkubation bei Raumtemperatur), desweiteren der richtige Einsatz der Agonisten. Das häufig angewandte genaue Justieren der Thrombozytenzahl im PRP ist mühsam, beeinflusst die Plättchenaktivierung und ist oftmals nicht notwendig. Die Aggregation nach Born eignet sich für den Nachweis von Plättchenfunktionsstörungen, wie z.B. dem Bernard-Soulier-Syndrom oder Morbus Glanzmann. Auch das von-Willebrand-Syndrom kann unter Umständen festgestellt werden.

Der Vorteil der **Impedanzaggregometrie** liegt in der Möglichkeit der Verwendung von Vollblut. Sibbin et al. [95] sehen in der weiter entwickelten Methode der ‚multiple electrode platelet aggregometry' (MEA), welcher die Impedanzaggregometrie zugrunde liegt und auch in dieser Arbeit mit dem Multiplate® getestet wurde, folgende Vorzüge gegenüber der Methode der Lichtdurchlässigkeitsmessung (entspricht Born): Es entfallen die benötigten Zentrifugationsschritte, die Einschätzung der Plättchenaggregation kann in etwa zehn Minuten erfolgen und das zelluläre Milieu bleibt unverändert. Die Aggregation an Oberflächen in der MEA entspricht dem Zustand in vivo, in dem sich die Plättchen auch an Oberflächen wie z.B. atheromatösen Plaques oder Gefäßschäden anhaften. Die Messung lipämischer Proben ist möglich, der Test eignet sich naturgemäß jedoch nicht für sehr niedrige Thromboytenzahlen. Riess et al. verglichen die turbidimetrische Methode (PRP) mit der Impedanzaggregometrie (PRP und Vollblut) [85]. In gesunden Kontrollen zeigte sich eine gute Korrelation zwischen den beiden Methoden bei Einsatz von ADP und Kollagen. Es wird daraus geschlossen, dass mittels der Impedanzaggregometrie die Plättchenfunktion in geeigneter Weise im physiologischeren Milieu des Vollblutes untersucht werden kann. Dies wird bereits mit dem Multiplate®-Analyzer erfolgreich durchgeführt [14; 15; 104]

Bei der **Durchflußzytometrie** können die Thrombozyten in ihrem physiologischem Milieu, d.h. Vollblut, untersucht werden und es werden nur geringe Mengen benötigt. Die minimale Manipulation der Proben vor der Untersuchung verhindert weitestgehend sowohl eine artifizielle Aktivierung in vitro, als auch den potentiellen Verlust von thrombozytären Subpopulationen. Es kann ein großes Spektrum an spezifischen Epitopen an der Plättchenoberfläche nachgewiesen werden. Die Durchflußzytometrie schließt andererseits hohe Kosten für die Anschaffung, Erhaltung der Geräte und dem Erwerb der monoklonalen Antikörper ein. Das Laborpersonal muss hochqualifiziert sein. Dies spricht dafür, dass die Technik weiterhin spezialisierten Zentren vorbehalten bleibt. Indikationen für die Durchflußzytometrie ergeben sich in der Untersuchung der Thrombozyten auf Expression der Rezeptoren, Beschaffenheit der Granula, Interaktion mit anderen Plättchen oder ihrer Funktion im Rahmen bestimmter Erkrankungen (z.B. Bernard-Soulier-Syndrom, Morbus Glanzmann). Des Weiteren ist die Überwachung gewisser Therapien möglich (z.B. Wirkung medikamentös eingesetzter GPIIb/IIIa-Anatonisten) [57; 69].

Die Verwendung von Vollblut für die Messung, das Vermögen verschiedene Komponenten der Hämostase zu erfassen und die seit langem bestehende Anwendung in der Blutungsvoraussage zählen zu den Vorzügen der **Thrombelastographie** [66]. Swallow et al. [100] berichten von der Thrombelastographie als einer schnellen verlässlichen Methode zur Beurteilung der zeitabhängigen Effekte der thrombozytenhemmenden Therapie, eine weitere Indikation besteht in der Überwachung einer Fibrinolysetherapie und in der Therapiebeurteilung von Hemmkörperpatienten während einer Therapie mit rFVIIa oder FEIBA. Die Methode verlangt ein schnelles Verarbeiten der Probe. Sie stellt ein artifizielles System dar, in dem z.B. die Strömungsdynamik unberücksichtigt bleibt. So können keine Störungen der primären Hämostase erfasst werden, wie beispielsweise das von-Willebrand-Syndrom [56].

Die Messung mit dem **Impact®** stellt physiologische high-shear Bedingungen nach. Auch in vivo läuft die primäre Hämostase unter hohen Scherkräften ab. Es wird wenig Blut und keine Aufbereitung der Probe benötigt, auch die Durchführung der Messung ist ein einfaches und wenig umständliches Verfahren [103]. Die Datenlage ist jedoch noch eingeschränkt. Der Einsatz liegt in der Erfassung von angeborenen und erworbenen Defekten der primären Hämostase, aber auch im Monitoring der plättchenhemmenden Therapie, wie Aspirin und Clopidogrel.

Der Vorteil der **Hypotonen-Schock-Reaktion** liegt in der einfachen Durchführbarkeit ohne hohen Geräteaufwand. Allerdings stellt die Methode eine Makro- und keine Mikromethode mit Einzelmessung in Quarzküvetten dar und beinhaltet sehr zeitkritisches Arbei-

ten bei Verwendung einer Mikrotiterplattenmethode [28]. Des Weiteren wird die Methode nur bei der Qualitätsbeurteilung von Thrombozytenkonzentraten, nicht aber bei der klinischen Evaluation von Hämostasestörungen verwendet.

Methode	Messprinzip	Messwert	Vorteil	Nachteil	Einsatz
Blutungszeit	Messung Sistieren einer Blutung in vivo	Verschlusszeit in Sekunden	physiologische Bedingung, da in vivo	nicht sensitiv, schwer standardisierbar	Screening-Test
PFA-100®	Plättchenadhäsion und Aggregation unter hohen Schwerkräften in vitro	Verschlusszeit in Sekunden	Vollblut, hohe Scherkräfte, kleine Probenvolumina, schnell und einfach	unflexibel, vWF-und Hämatokrit abhängig, nicht sensitiv für Clopidogrel	Feststellung von angeborenen und erworbenen Defekten der primären Hämostase, Monitoring der Aspirin- und DDAVP Therapie
Optische Aggregationsmessung (Born)	Abnehmende Streuung des Lichtes durch die Aggregation der Thrombozyten (unter niedrigen Scherkräften) im PRP	Streuungsabnahme in Prozent der Differenz der Streuung von PRP zu PPP	Goldstandard	unphysiologisch, niedrige Scherkräfte, Probenaufbereitung, zeitaufwendig, teuer, geschultes Personal nötig	Diagnostik einer großen Vielfalt von angeborenen und erworbenen Plättchendefekte
Impedanzaggregometrie	Anheftung und Aggregation aktivierter Thrombozyten an Platinelektroden, bzw. metallischen Sensoren	Widerstandserhöhung in Ohm (Multiplate®: Fläche unter der Aggregationskurve= frei gewählte Einheit)	Verwendung von Vollblut	nicht geeignet für sehr niedrige Thrombozytenzahlen, bei älteren Geräten umständliche Reinigung und Erneuerung der Elektroden	Diagnostik einer großen Vielfalt von angeborenen und erworbenen Plättchen-defekten, Monitoring plättchenhemmender Therapien (z.B., Aspirin, Clopidogrel)
Durchfluß-zytometrie	Messung der Plättchenglykoproteine und Aktivitätsmarker durch Fluoreszenz	Prozentualer Anteil aktivierter Plättchen und Dichte der Aktivierung	Vollblut, kleine Probenvolumina, große Auswahl an Tests und Fragestellungen	teuer, aufwendig, hochqualifiziertes Personal nötig	Diagnostik von Defekten der Plättchenglykoproteine, Quantifizierung der Glykoproteine, Feststellung der Plättchenaktivierung in vivo oder mit Agonisten, Monitoring plättchenhemmender Therapie
Thrombelastographie	Messung des Grads (Geschwindigkeit) und der Beschaffenheit des sich bildenden Thrombus	Clotting time in Abhängigkeit vom Aktivator; Dynamik der Gerinnselfestigung und -festigkeit und Fibrinolyse	Vollblut	misst nur die Eigenschaft des Gerinnsels, weitestgehend plättchenunabhängig, solange keine Agonisten zugegeben werden	Vorhersage perioperativer Blutungen, Monitoring rFVIIa Therapie und plättchenhemmender Therapie (Einfluss auf GpIIb/IIa-Rezeptor)
Impact® Cone and Plate(let) Analyzer	Quantifizierung der Adhäsion und Aggregation aktivierter Thrombozyten unter hohen Scherkräften an (Kunststoff-) Oberflächen	von Thrombozyten bedeckte Fläche [%] („surface coverage, SC) und die durchschnittliche Größe der Gebilde („average size, AS)	kleine Probenvolumina, hohe Scherkräfte, einfache Methode	Hohe Testvariabilität, geringe Reproduzierbarkeit	Ermittlung vererbter und erworbener Defekte in der primären Hämostase, sowie Plättchenüberfunktion, Monitoring plättchenhemmender Therapie
Hypotone-Schock-Reaktion	Messung der Lichttransmission von Plättchen bei Exposition gegenüber destilliertem Wasser	Wiederfindungsrate der Thrombozyten (berechnet aus gemessener Lichtransmission)	einfache Durchführbarkeit ohne hohen Geräteaufwand	Keine Mikrometheode, Einzelmessung in Quarzküvetten, zeitkritisches Arbeiten	Qualitätsbeurteilung von Thrombozytenkonzentraten

Tabelle 3: Übersicht über die einzelnen Verfahren der Thrombozytenfunktionsdiagnostik, mit Methode, Messprinzip- und Wert, Vorteilen, Nachteilen und Indikation, nach [13; 103]

1.8 Thrombozyten in der Hämotherapie

Die Gewinnung von Thrombozyten zur Herstellung einer Konserve kann aus dem Vollblut oder mittels Apheresetechnik erfolgen.

Die Apherese produkte stellten 1994 in den USA zum ersten Mal mehr als 50% aller transfundierten Thrombozytenkonzentrate dar [106]. Die Gewinnung von Thrombozyten aus dem Vollblut geschieht entweder über die Herstellung von plättchenreichem Plasma (PRP) oder seit etwa fünf Jahren zunehmend mit der sogenannten „Buffy-Coat"-Methode.

Bei dem PRP-Verfahren wird das Vollblut zunächst langsam zentrifugiert. Das plättchenreiche Plasma wird in den Thrombozytenbeutel abgepresst und anschließend durch hochtourige Zentrifugation in Thrombozyten (Sediment) und plättchenarmes Plasma getrennt. Die sedimentierten Thrombozyten werden nach 1-2 Stunden vorsichtig resuspendiert [70]. Die Plättchen von 4-6 ABO-gleichen Spendern können anschließend gepoolt werden [40].

Die„buffy-coat"-Methode wird, besonders in Europa, häufiger eingesetzt. Durch Zentrifugation bei sehr hoher g-Zahl werden das Plasma, die Erythrozyten und der buffy coat getrennt. Die Thrombozyten sammeln sich im buffy coat, dieser wird dann gepoolt. Bei einer Apherese werden von einem einzelnen Spender 1-3 Thrombozytenkonzentrate in einer Sitzung gewonnen. Ungefähr 2 - 4 $x10^{11}$ Thrombozyten, d.h. 40- 60% der Plättchen, die diesen Prozess durchlaufen, werden aufgefangen. Für Thrombozytenkonzentrate kommen Beutel aus dem Kunststoff Polyolefin zum Einsatz, der frei von Weichmachern ist und eine im Vergleich zu PVC höhere Gaspermeabilität besitzt [70]. Die nötige Leukodepletion erfolgt bei der Apherese bereits durch technische Maßnahmen während der Separation. Zur Vermeidung einer Graft- versus- Host- Disease (GvHD) kann die Proliferation restlicher Lymphozyten durch Bestrahlung mit 30 Gy unterbunden werden [40]. In den USA darf die Zahl der in einem plättchenreichem Plasma bzw. Aphereseprä parat vorhandenen Leukozyten 5 $x10^6$ nicht überschreiten, während in Europa der Standard bei 1 $x10^6$ liegt. Nach Herstellung dürfen in Apherese-Thrombozytenkonzentraten die Erythrozyten nicht mehr als 3 $x10^9$ betragen, die Grenze bei Pool-Konzentraten liegt bei 0,5 $x10^9$. Beide Grenzwerte bedingen bereits eine intensive lachsrote Färbung des TK, so dass derart hoch kontaminierte Thrombozytenkonzentrate i.d.R. nicht mehr in den Verkehr kommen. Die Lagerung der Thrombozyten erfolgt bei 20-24°C. Bei niedrigeren Temperaturen kommt es zu einem sukzessiven Verlust der Scheibchenform, auch wird die Aggregationsreaktion, insbesondere auf ADP und Kollagen, beeinträchtigt [44; 90]. Es kommt durch eine Konformationsänderung des GpIa zur Bildung eines Neoantigens mit nachfolgender sofortiger Entfernung aus dem Kreislauf durch Milz und Leber im Empfänger.

Die Konserven sollten unter ständiger Agitation aufbewahrt werden. Hunter et.al. zeigten, dass die Unterbrechung der Agitation bis zu 24 Stunden noch zu keiner Schädigung der Plättchen führt, es jedoch nach zwei Tagen zu ersten Beeinträchtigungen kommt [45]. Thrombozyten gewinnen ihre Energie größtenteils über den oxidativen Abbau in der Atmungskette. Die gasdurchlässigen Beutel und die Agitation sorgen für die erforderliche Sauerstoffversorgung. Dies verhindert einen überschießenden pH-Abfall durch Lactatbildung und CO_2-Diffusion. Der pH-Wert muss, um den Qualitätskriterien zu entsprechen, bei einer Messtemperatur von 22°C höher als 6,5 liegen (die obere Grenze von 7,4 aus früheren Arbeiten ist nicht mehr gültig).

Prüfparameter	**Pool-TK**	**Apherese-Tk**
Volumen[a]	abhängig von der Anzahl der gepoolten Einheiten	> 200 ml
Thrombozyten[a]	$> 2 \times 10^{11}$	$> 2 \times 10^{11}$
Leukozyten[a]	$< 1 \times 10^{6}$	$< 1 \times 10^{6}$
Erythrozyten[a]	$< 0{,}5 \times 10^{9}$	$< 3 \times 10^{9}$
pH[b]	> 6,5	> 6,5
visuelle Kontrolle	Beutel unversehrt „swirling“ [b]	Beutel unversehrt „swirling“ [b]
Sterilität[b]	Steril	Steril

[a] Nach Herstellung

[b] Nach Ende der ermittelten Haltbarkeit

Tabelle 4: Die Tabelle zeigt die Qualitätskriterien für Thrombozytenkonzentrate, modifiziert nach [70]

Kilkson et.al. [52] berichten über einen rapiden pH-Abfall unter 7,0 (bei 22°C), sobald bei Absinken der HCO_3-Konzentration die Lactatkonzentration Werte von 20-25 mmol/l erreichte. (Der Verlust von HCO_3 resultiert aus dem Ersatz der Milchsäure und der spontanen CO_2-Diffusion aus dem Beutel). Ein weiterer Anstieg des Lactats auf 40 mmol/l korreliert mit einem Abfall des pH-Wertes auf 5,8. Größere Abweichungen des pH-Wertes über die genannten Grenzen hinaus führen zu einer erhöhten Anzahl an lysierten und kugeligen Thrombozyten, dies führt wiederum zu einem Funktionsverlust der selbigen. Wie einige Studien gezeigt haben [25; 43; 87], ist auch nach sieben Tagen der Lagerung die Funktion der Plättchen noch ausreichend. Ein Problem stellt hierbei aber die Kontamination mit Mikroorganismen dar. Die Häufigkeit einer bakteriell verunreinigten Blutkonserve beträgt etwa 1:3000, während die Anzahl schwerer septischer Episoden nach transfundierten Thrombozytenkonzentraten bei ungefähr 1:50.000 liegt [7]. Eine Studie von Brecher et.al. zeigte, dass nach Inokulation der Thrombozytenkonzentrate am Abnahmetag mit ausgewählten Mikroorganismen, sich diese ab Tag drei nach Beimpfung bereits nachweisen las-

sen [9]. Neuere Entwicklungen beschäftigen sich mit der nach Bestrahlung mit UV-Licht einsetzenden Inaktivierung von Viren und Bakterien nach Zusatz von z.B. Riboflavin oder Psoralen [3; 50; 88]. Picker et.al. [78] zeigten beispielsweise, dass die Riboflavin-UVB-Methode sowohl die anaerobe Glykolyse als auch die oxidative Phosporylierung erhöht. Die auf Psoralen-UVA basierende Methode war mit einer erhöhten mitochondrialen Zellatmung assoziiert. Während der Lagerung ergab sich so eine signifikant niedrigere Menge an ATP und Lebensfähigkeit der Zellen [78].

Die optische Kontrolle der Thrombozytenkonzentrate stellt einen weiteren Bestandteil der Qualitätsprüfung dar. Das sogenannte „Swirling-Phänomen“ beschreibt die Wirbelbildung der Thrombozyten durch Aggregate, sichtbar im Gegenlicht. Die Inspektion des „Swirling-Phänomens“ ist eine verlässliche Methode innerhalb der Qualitätskontrolle, da sie mit der Plättchenfunktion korreliert [63].

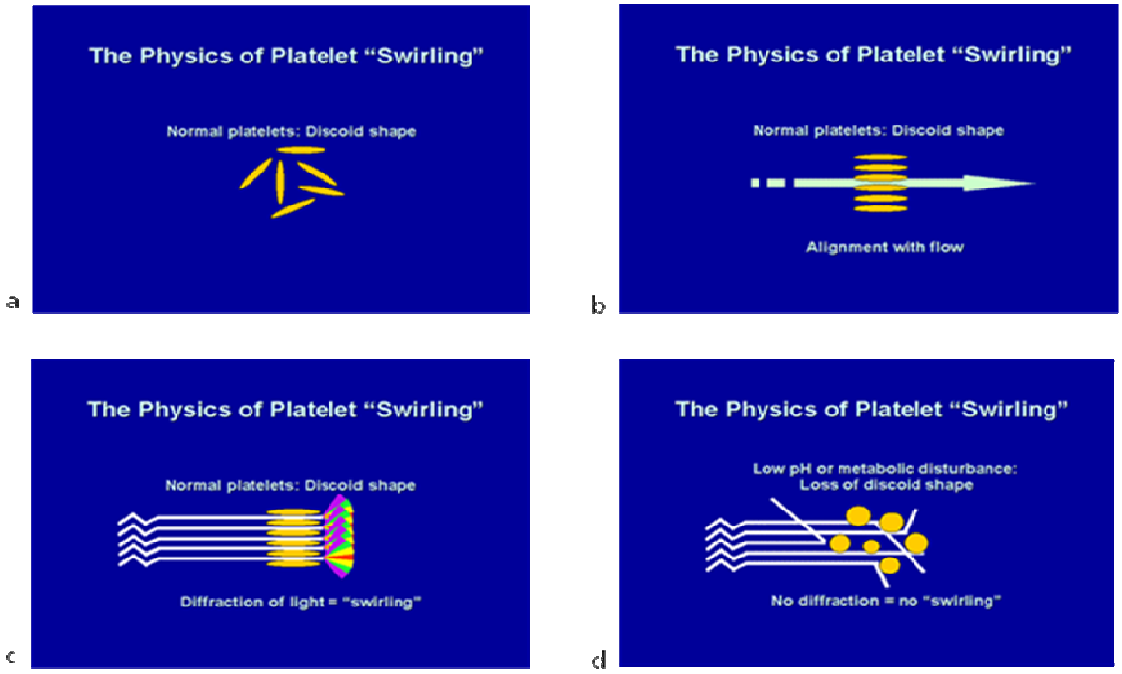


Abbildung 14: Schematische Darstellung des ‘Swirling-Phänomens‘, Abbildungen a-c zeigen funktionstüchtigen Plättchen, ihre Angleichung in der Bewegung und die Zerstreuung des Lichts, zurückzuführen auf ihre typische Scheibchenform. Abbildung d zeigt die veränderte Ablenkung des Lichts durch den Verlust der Form der Plättchen aufgrund metabolischer Veränderungen, nach [2]

Der Ausdruck **Plättchenlagerschaden (PSL-platelet storage lesion)** beschreibt die strukturellen und biochemischen Veränderungen während der Lagerung. Diese können reversibel sein, d.h. es finden sich keine Auswirkungen nach Transfusion durch die Erholung des thrombozytären Stoffwechsels nach Rückführung der Thrombozyten in natürliche in-vivo-Bedingungen (Rejuvenation). Andererseits gibt es den irreversiblen Lagerschaden, der z.B.

bei einer Kühlung von 16° C zustande kommt. Neben den beschriebenen pH-Veränderungen und Formveränderungen akkumulieren z.B. auch Mediatoren der Thrombusbildung wie β-Thromboglobulin oder Plättchenfaktor 4, welche die Plättchendegranulation widerspiegeln.

Schubert et.al. untersuchten die Veränderungen in den Thrombozytenproteomen während der Lagerung [93]. Die mikroskopischen Analysen zeigten Veränderungen in der Lokalisation von GpIIIa, Rap 1 (Ras-like GPTase: u.a. Regulation von Zellproliferation, Adhäsionsmechanismen, Apoptose) und Talin (fungiert u.a. auch als Adhäsionsprotein) während der Lagerung. Rap 1 Aktivierung korreliert mit der Expression des Plättchenaktivators CD62P. Plättchen, die sieben Tage mit einem bestimmten Phosphoinosid-3-Kinase (PI-3) Inhibitor inkubiert wurden, zeigten sowohl eine verminderte Rap 1 Aktivierung als auch eine moderate Reduktion der $\alpha_{IIb}\beta_3$ Aktivierung und der Ausschüttung der Plättchengranula. Die Autoren schließen daraus auf einen Signalweg der zu Lagerschäden führt, in welchem die PI3-Kinase abhängige Rap1 Aktivierung in einer $\alpha_{IIb}\beta_3$ Aktivierung und Plättchendegranulation mündet.

Die Entwicklung geht damit einerseits zu einem möglich lang lagerbaren TK mit einer Laufzeit von sieben Tagen. Andererseits wurde aufgrund der zunehmenden Gefährdung durch transfusionsassoziierte Sepsis, ausgelöst hauptsächlich durch Thrombozytenkonzentrate am letzten Tag der Haltbarkeit, vom AK Blut Votum 38 festgelegt, die Haltbarkeit von fünf Tagen nun auf den Entnahmetag plus vier volle Tage zu beschränken [86]. Die hier vorgestellten Untersuchungen beziehen noch den Zeitraum von sieben Tagen ein.

1.9 Bildung von Referenzwerten und deren Konfidenzintervalle

Um Methoden in die Qualitätskontrolle von Thrombozytenkonzentrate zu übernehmen, müssen für die Messungen Referenz-bzw. Grenzwerte gefunden werden.

Ein gemessener oder beobachteter Laborwert wird mit einem Referenzintervall verglichen, um Abweichungen von der Grundgesamtheit zu erkennen und daraus auf medizinische Diagnosen und Therapieschemata zu schließen oder andere physiologische Beurteilungen zu treffen. Die Interpretation von Labormesswerten ist deshalb ein vergleichender, entscheidungsbezogener Prozess [96]. Die Komponenten des menschlichen Organismus unterliegen Variationen, die durch physiologische Prozesse, genetische Differenzen, Krankheiten und Umweltfaktoren verursacht werden [96].

Die Gewinnung von Referenzwerten benötigt genaue Selektion der Individuen und oftmals Subklassifikation. Die Selektion der Referenzindividuen in dieser Arbeit unterliegt den Richtlinien der Bundesärztekammer [11].

Die folgende Abbildung zeigt die Reihenfolge in der Bildung der Referenzwerte, die einzelnen Begriffe wurden von der EPTRV (Expert Panel on the Theory of Referent Values) der IFCC (International Federation of Clinical Chemistry) vorgeschlagen und von der WHO und anderen Organisationen empfohlen [74].

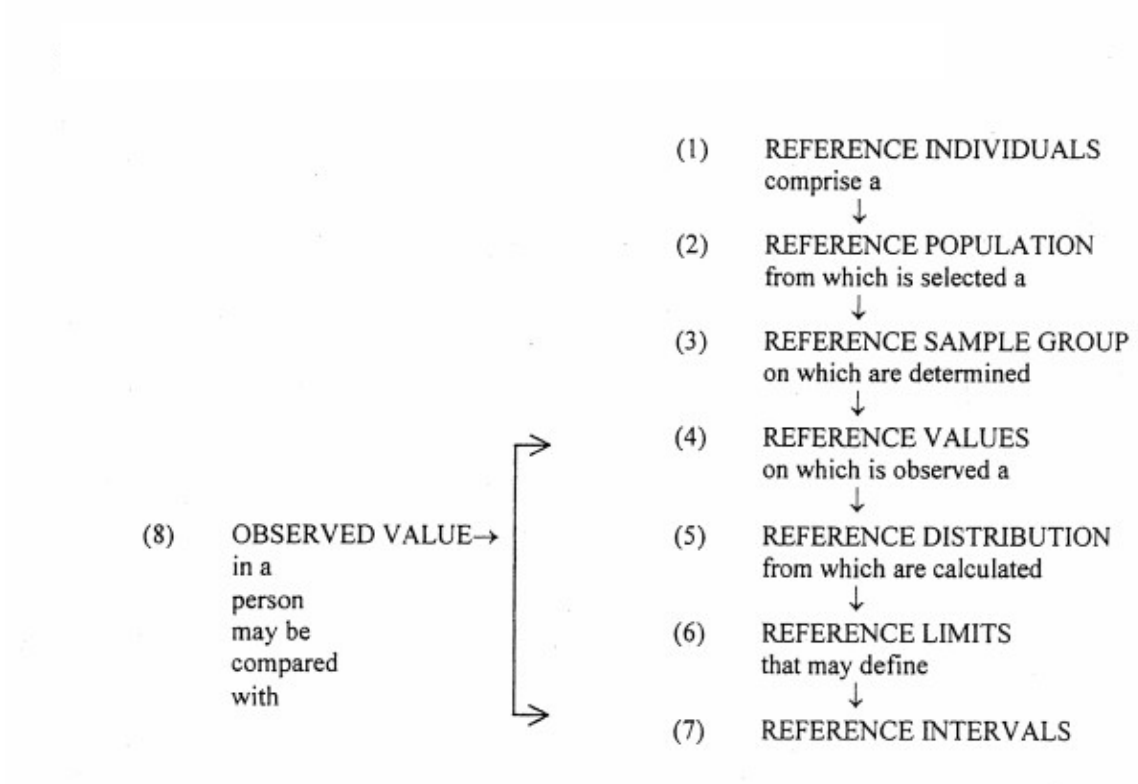


Abbildung 15: Das Schema zeigt die Bildung von Referenzwerten, bzw. die Beziehung der einzelnen Termini, nach [74]

Zunächst müssen das Ziel und der verwendete Zweck der Referenzwerte klar definiert werden. Die analytischen Resultate der Referenzpopulation müssen alle präanalytischen und analytischen Variablen, die die Testergebnisse beeinflussen können, reflektieren. Deshalb müssen alle präanalytischen Faktoren, wie z.B. die Vorbereitung der Testperson, die Probengewinnung-und Verarbeitung, die analytische Methode, usw. genau beschrieben werden [74].

Das Referenzintervall ist definiert als das Intervall zwischen und mit Einschluss zweier Zahlen, ein oberer und unterer Grenzwert, durch welchen, geschätzt, ein gewisser Prozentsatz (normalerweise 95%) der Werte von einer Population, aus der die Referenzindividuen gezogen wurden, liegen, für die meisten Analysen werden daher die 2,5. und die 97,5. Perzentile herangezogen [74].

Die Autoren der NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) [74 = neu C28-A3] beschreiben, in Anlehnung an [96], folgende Methoden um diese Bereiche zu definieren. Die parametrische Methode benötigt Werte, die einer Gauß-schen Verteilung unterliegen. Da die meisten Analysen per se nicht einer Gauß'schen Verteilung folgen, müssen sie in eine andere Skala transformiert werden, welche sie „normalisiert". Dies beinhaltet komplexe statistische Theorien und entsprechende Computerprogramme.

Die nicht-parametrische Methode ist einfacher durchführbar. Sie ist nur abhängig von den Rängen der Referenzdaten, aufgeführt in aufsteigender Größe. Darüber hinaus ist die wichtigste Betrachtung bei der Bildung von verlässlichen Referenzwerten eine sorgfältige Selektion der Testpersonen, eine adäquate Stichprobengröße und ein Vermeiden von präanalytischen Fehlerquellen und nicht die statistische Methode. Deshalb wird in der Regel die nicht-parametrische Methode empfohlen, diese wurde ebenfalls in dieser Arbeit verwendet. Insofern mit der nicht-parametrischen Methode gearbeitet wird, ist es unmöglich zwischen zwei Perzentilen einer Verteilung zu unterscheiden, welche P% entfernt sind, solange nicht die Stichprobe n=(100/P)-1 beträgt (P=Perzentile). Um z.B. die 2,5. Perzentile von der 5.Perzentile, oder die 95. Perzentile von der 97,5.Perzentile zu unterscheiden (d.h. P=2,5), wird ein Minimum von 39 Proben benötigt.

Unter den in der Statistik verwendeten nicht-parametrischen Methoden wird die Rang-basierte Methode als verlässlich und einfach in der Anwendung beschrieben [92]. Die Rangnummern der 2,5. bzw. 97,5. Perzentile werden wie folgt berechnet: 0,025 x (N+1) und 0,975 x (N+1). Insofern das Ergebnis eine ganze Zahl ist, kann der Grenzwert mit dem gemessenen Wert, der der Rangnummer entspricht, gleichgesetzt werden. Andernfalls muss der Grenzwert zwischen zwei Werten interpoliert werden.

Untersuchungen, z.B. Messungen in einer Gruppe, unterliegen einer gewissen Variabilität. Die Subpopulation, die ein Untersucher aus einer Gruppe zufällig auswählt, zeigt nicht unbedingt die gleichen Werte als eine andere zufällig gewählte Subpopulation, genauer gesagt repräsentiert ein aus einer Stichprobe ermittelter Wert vermutlich nicht den tatsächlichen Wert der Grundgesamtheit. Die wahre Sensitivität liegt wahrscheinlich in der näheren Umgebung des Schätzwertes. Ein Weg diese Variabilität zu beurteilen, ist ein Konfidenzintervall für die geschätzte Perzentile der Population mit den Informationen der Gruppe zu errechnen. Ein Konfidenzintervall ist demnach ein Bereich, der die wahre Perzentile (z.B. die 2,5. Perzentile einer Population) mit einer bestimmten Wahrscheinlichkeit, normalerweise 90 oder 95%, enthält [74].

Nicht-parametrische Konfidenzintervalle ergeben sich aus den beobachteten Werten, welchen bestimmten Rangnummern entsprechen.

1.10 Fragestellung und Zielsetzung

Um die Plättchenaggregation im Vollblut zu messen, wurde eine neue technische Anwendung der Impedanzaggregometrie, die sogenannte ‘multiple electrode platelet aggregometry‘ entwickelt [101]. Tóth et al. [101] verglichen diese Methode mit der des ‚single platelet countings‘ im Hinblick auf die Aggregation der Thrombozyten in verdünntem Vollblut. Sie kamen zu dem Ergebnis, dass die ‚multiple electrode platelet aggregometry‘ eine einfache, reproduzierbare und sensitive Methode der spontanen und stimulierten Plättchenaggregation darstellt, welche konvergent zu den mit der‚single platelet counting‘-Methode erhobenen Daten ist. Die globalen Parameter der Thrombozytenfunktion werden in ähnlicher Weise wie die sehr aufwendige Standardmethode (Born) erfasst [13].

Der Multiplate® Analyzer der Firma Dynabyte Medical München arbeitet mit dem Prinzip der ‚multiple electrode platelet aggregometry‘ (genaue Beschreibung unter 1.7.4).

Die Qualitätskontrolle der Thrombozytenkonzentrate umfasst bislang Parameter wie Thrombozyten-Leukozyten-und Erythrozytenzahl. Des Weiteren wird der pH-Wert gemessen und eine optische und mikrobiologische Kontrolle durchgeführt (vgl. Tabelle 4). Es besteht die Überlegung, die Messung der Aggregation der Thrombozyten als Maß ihrer Funktion in die Qualitätskontrolle nicht nur für tiefergehende Untersuchungen bei der arzneimittelrechtlichen Zulassung nach §21 Arzneimittelgesetz (AMG) für die Arzneimittelzulassung erforderlichen Beleg der ausreichenden Erhaltung der Thrombozytenfunktion über die gesamte Lagerzeit hinaus einzusetzen, sondern auch in der Routine als Standarduntersuchung für die monatlich geforderte Qualitätskontrolle zu etablieren. Hierbei wurde die Technik der ‚multiple electrode platelet aggregometry‘ mittels des Multiplate®-Analyzers geprüft. In einer Vorarbeit wurden bereits Parameter der Präanalytik untersucht und mit dem Multiplate® gemessen (u.a. Temperatur, Beutelbeschaffenheit, Agitation vs. keiner Agitation) [107]. Dabei kann die für das Multiplate® etablierte Standardmethode der Antikoagulation durch Verwendung von Hirudin beschichteten Probenröhrchen aus dem Vollblut nicht verwendet werden, da die Thrombozyten im Apheresekonzentrat bereits durch eine Citratzugabe in Form von ACD- A (Adenin- Citrat- Dextrose- Formula A) nach USP (United States Pharmakopoe) antikoaguliert sind. Außerdem fehlt zusätzlich die unterstützende Funktion der anderen Blutpartikel (Erythrozyten und Leukozyten) für die Thrombozytenaggregation mit Herabsetzung des freien Plasmaanteils in der Probe.

Bei der Verwendung von Thrombozytenkonzentraten ergeben sich naturgemäß Unterschiede zur Messung mit Vollblut. In erster Linie stehen gänzlich andere Bedingungen der

Präanalytik im Vordergrund. Im Thrombozytenkonzentrat herrschen nicht physiologische Verhältnisse, da die verschiedenen Komponenten des Vollblutes fehlen. Die Folgen sind:

- andere Ansatzbedingungen
- andere optimierte Präanalytik
- andere Werte / Normalwerte
- fehlende Vergleichbarkeit der Werte mit Vollblutwerten
- Abfall der Messwerte als Ausdruck des reversiblen und irreversiblen Lagerschadens, welcher definitionsgemäß die strukturellen und biochemischen Veränderungen während der Lagerung beschreibt .

Die Untersuchungen und Zielsetzungen in dieser Arbeit lassen sich in fünf Schritte gliedern:

(1) In Ergänzung zur genannten Vorarbeit wird überprüft, ob sich ein besseres Medium zur Inkubation der Thrombozyten vor der Messung findet, als das bereits eingesetzte PBS (phosphate buffered saline). Dabei werden acht Puffer im Vergleich zu PBS eingesetzt.

(2) Nach Ermittlung des optimalen Puffers im Messansatz folgt eine vergleichende Messung mit zwei Konzentrationen des Agonisten Kollagen. Die anderen möglichen Agonisten waren bereits in der Vorstudie als nicht gut geeignet ausgeschieden.

(3) Im nächsten Schritt werden Proben sowohl mit der Multiplate®- als auch mit der Born-Methode, die von vielen Autoren noch als Goldstandard für Thrombozytenfunktionsmessung angesehen wird, im Vergleich gemessen. Aufgrund der aufwendigeren Born-Methode wird nur eine Untersuchungsreihe von 20 Proben an drei Messtagen herangezogen, um die Vergleichbarkeit zu zeigen.

(4) Zusätzlich wird an jedem Tag der Messung ein Säure-Basen-Status der Thrombozytenkonzentrate erhoben. Die Werte der Säure-Basen-Untersuchung sollen mit den Ergebnissen der Multiplate®-Messung in einem Vergleich bezüglich ihrer Korrelation betrachtet werden. Hierbei soll herausgefunden werden, ob sich die Veränderungen im Säure-Basen-Haushalt, die sich während der Lagerung eines Thrombozytenkonzentrats im Beutel ergeben, mit der Messung im Multiplate® nachvollziehen lassen.

(5) Abschließend werden die Ergebnisse der Messungen mit dem Multiplate®-Analyzer der Standardqualitätskontrollen vom Tag der Abnahme und dem Tag nach Ende der Haltbarkeit für die Routine-Qualitätskontrolle der Thrombozyten-Arzneimittelherstellung der Abteilung für Transfusionsmedizin und Hämostaseologie (ATMH) am Standort Großhadern für den Zeitraum von eineinhalb Jahren dargestellt. Mit diesen Werten sollen Referenzwerte mit den zugehörigen Konfidenzintervallen ermittelt werden, um die Methode der Multiplate®-Messung in die Qualitätskontrolle von Thrombozytenapheresekonzentraten einzuführen.

2. Material und Methoden

2.1 Verwendete Materialien

2.1.1 Thrombozytenkonzentrate

Die untersuchten Proben stammen aus der Routineproduktion von Thrombozytenapheresekonzentraten der ATMH im Klinikum Großhadern, gewonnen mittels maschineller Zellseparatoren. Bei den Apheresegeräten handelt sich um Baxter und Trima. Der verwendete Stabilisator in den Beutel ist ACD- A (Adenin- Citrat- Dextrose- Formula A).
Die Vergleichsgruppe besteht aus 81 Proben. Es sind 53 Proben der Blutgruppe A, eine Probe der Blutgruppe B, 22 Proben der Blutgruppe 0 und fünf Proben der Blutgruppe AB getestet worden. Als Spender dienten 44 Männer und 37 Frauen, im Alter zwischen 21 und 56 Jahren. Die Präparate enthalten 200-300 ml Plättchenkonzentrat mit 2-4 $x10^{11}$ Thrombozyten, bzw. 750-1400 $x10^3$ Thrombozyten/µl.

2.1.2 Citratröhrchen, gepuffert

S-Monovette®, 65 x13 mm,
REF 04.1010.001 Sarstedt AG & Co. 51588 Nürnbrecht, Deutschland

2.1.3 Puffer

PBS

NaCl-Lösung 0,81% in Phosphatpuffer 0,0067 mol/l, pH 7,2
In 1000 ml:

NaCl	8,1 g
di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	0,862 g
Kaliumdihydrogenphosphat	0,248 g

Apotheke Klinikum Innenstadt, München, Deutschland
Gebrauchsfertig

TRIS

Tris (hydroxymethyl) methan
$C_4H_{11}NO_3$ MG= 121, 4 g/mol Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

TRIS 20 mmol/l:

TRIS 48,5 g in 250 ml Aqua dest.

+ HCl 84 ml

→ pH-Einstellung auf 7,4

→ Mit Aqua dest. auf 1000 ml aufgefüllt (TRIS-Stock-Solution 400 mmol/l)

TRIS-Stock-Solution 50 ml

+ NaCl 950 ml

Tyrode-Salze

Bestandteile (g/l):

Kalziumchlorid (wasserfrei)	0,2
Magnesiumchlorid (wasserfrei)	0,1
Kaliumchlorid	0,2
Natriumchlorid	8,0
Natriumphosphat, monobasisch (wasserfrei)	0,05
D-Glukose	1,0

Produktnummer T2145 Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

Tyrode´s-Puffer

Tyrode-Salz	9, 6 g
+ BSA	15 ml
+ HEPES	0, 1 g
+ Na_2CO_3	1, 0 g
+ $MgCl_2$	0,2 g
+ $CaCl_2$ x2H_2O	0,3 g

Mit Aqua dest. auf 1000 ml aufgefüllt, pH-Einstellung auf 7,41

HEPES-Na Puffer

$C_8H_{17}N_2NaO_4S$

MG= 260,28 g/mol, MERCK KGaA Darmstadt, Deutschland

BSA

Rinderalbumin 22%, Biotest, Dreieich, Deutschland

AB-Plasma

Gefrorenes Plasmaapherese-Frischplasma, quarantänegelagert TH-S	
Bestandteile, bezogen auf 1 ml:	
gerinnungsaktives Humanplasma aus einer einzelnen Apheresespende	0,90 ± 0,02 ml
Natriumcitratlösung	0,10 ± 0,02 ml
(100 ml Natriumcitratlösung enthalten: Natriumcitrat	4 g
Aqua ad iniectabilia ad	100 ml
Restgehalt Human-Erythrozyten	unter 1 $x10^3$ /ml
Restgehalt Human-Thrombozyten	unter 5 $x10^6$ /ml
Restgehalt Human-Leukozyten, bezogen	
auf eine Packungseinheit (220 ± 20 ml)	unter 1 $x10^6$
Institut für Transfusionsmedizin Suhl gGmbH, Deutschland	

Hirudin

Refludan R 50 mg
Inhalt einer Flasche: 50 mg Lepirudin (ein aus Hefezellen hergestelltes rekombinantes DNA-Produkt)
Weitere Hilfsstoffe:
Mannitol
Natriumhydroxid zur Einstellung auf pH 7
Pharmion Ltd., Cambridge, UK

Hirudin 2 µg/ml

Die 50 mg, enthalten in einer Packung, lösten wir mit 1 ml PBS auf und füllten mit 499 ml PBS auf. So erhielten wir 500 ml mit einer Konzentration von 100 µg/ml. Diese wurden in 250 Nunc‘s a 2 ml abgefüllt und bei -20°C tiefgefroren. Vor Gebrauch wurden jeweils zu 48 ml des jeweiligen Puffers ein Nunc mit 2 ml Hirudin hinzugegeben, um so auf eine Endkonzentration des Hirudins von 2 µg/ml zu kommen

2.1.4 Weitere Reagenzien und Materialien

$CaCl_2$ x2H_2O

MG= 147.02 g/mol, MERCK Darmstadt, Deutschland

$MgCl_2$

MG= 95,22 g/mol, MERCK Darmstadt, Deutschland

Kollagen

Kollagen 1 ml lyophilisiert mit einer Konzentration von 100 µg/ml
Dynabyte Medical, München, Deutschland
Eingesetzt wurden 40 µl = 4 µg Kollagen, bzw. 60 µl = 6 µg Kollagen

Standardlabormaterialien

Spritzen 2ml, 5ml, Kanülen 19 G, Butterfly 19 G, Verbindungsdorn mit Injektionsanschluß (Sampler), Combi-Stopper, Erlenmeyerkolben verschiedener Größe, Messzylinder verschiedener Größe, Bechergläser, Nuncs, Spatel

Pipetten

10-100 µl, 100-1000 µl, Firma Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Glaspipetten 10 ml

Küvetten

Einmalküvetten für Multiplate®, REF MP 0020
Firma Dynabyte Medical, München, Deutschland

2.1.5 Verwendete Geräte

Analysenwaage

Mettler HL 52, Mettlerwaagen GmbH

pH-Meter

pH Meter pH 523 Nr.: 98060019, WTW

Magnetrührer

IKAMAG RCT Nr.: 396220, IKA-Combimag RCH Nr.: 44231
IKA-Werke GmbH & Co.KG

Radiometer pH-Messung

Radiometer Copenhagen ABL^{TM}77 Serie

Born-Aggregometer

APACT AS Plus, Ralf Greiner BioChemica

Multiplate®

Multiplate®-Gerät, Dynabyte Medical, München, Deutschland

2.2 Methoden

2.2.1 Gewinnung Thrombozytensuspension

Anstechen der Beutel mittels Sampling-site-coupler. Mit einer Spritze und Nadel wurden etwa 2 ml unter sanftem Zug entnommen, sofortiger Verschluss mit Combistopper. Ausnahme Versuchsreihe Citratröhrchen: Entnahme über Adapter in Citratröhrchen.
Die Beutel wurden unter ständiger Agitation bei 22°C gelagert.

2.2.2 Beschreibung der Messungen

Die Thrombozytenkonzentrate wurden in ihrer Aktivität, ihrer Aggregationsfähigkeit mit dem Multiplate an d0 (=Abnahmetag)- Dienstag, d1- Mittwoch, d2- Donnerstag, d3- Freitag, d6-Montag und d7-Dienstag gemessen. Die Tage 4 und 5 entsprechen dem Wochenende. Zugleich wurde an jedem der aufgeführten Tage der Säure-Basen-Status der Konzentrate erhoben. (Ausnahme Vergleich Born-Multiplate: Tag 0 / Tag 2 / Tag 6, siehe Testplan Tabelle 6)

Messung des Säure-Basenstatus

Die Messung erfolgt nach der Paul Astrup Methode mit dem Radiometer.
Prinzip:
pCO_2, pO_2, pH werden mit Membran- bzw. Glaselektroden photometrisch gemessen. Standardbicarbonat, aktuelles Bikarbonat und Basenüberschuss (base excess, BE) werden daraus vom Gerät errechnet.
Die Thrombozytensuspension wurde nach Messung mit dem Radiometer in Plastikröhrchen der Firma Sarstedt überführt.

Messung der Born-Aggregation

Die Thrombozyten wurden zunächst aus dem Original in einen Satellitenbeutel überführt um zeitlich unabhängig die Born-Messung vornehmen zu lassen.
Das Thrombozytenkonzentrat wurde nativ in ein Röhrchen gefüllt, welches das sogenannte plättchenreiche Plasma darstellt. Um plättchenarmes Plasma zu gewinnen, wurde ein weiteres Röhrchen zehn Minuten bei 4000 U zentrifugiert. 200 µl des plättchenreichen Plasmas wurden drei Minuten inkubiert, danach erfolgte die Zugabe der Reagenzien. Um die Spontanreaktion zu testen, wurden in eine Küvette 20 µl NaCl pipettiert. In die anderen beiden Küvetten wurde Kollagen mit einer Konzentration von 0,8 µg/ml (entspricht 6,6 µl), bzw. 1,0 µg/ml (entspricht 8,3 µl) hinzugegeben. Messung der Aggregation.

Messung mit dem Multiplate®

Das Prinzip der Impedanzaggregometrie, bzw. das Multiplate®-Gerät wurde bereits unter 1.7.4 beschrieben.

Durchführung der Messung am Multiplate®:

Nach Einschalten des Geräts wird eine automatische, elektronische Kontrolle der Messplätze durchgeführt und dokumentiert. Mit den Messungen wird erst begonnen, sobald die Solltemperatur des Inkubationsblocks von 37°C erreicht ist. Die Thrombozyten werden nach Entnahme in Röhrchen der Firma Sarstedt überführt und sofort verschlossen. Vor Messung werden die Röhrchen mehrmals sanft zwischen den Fingern geschwenkt um eine gleichmäßige Verteilung im Plasma zu gewährleisten. Die Pipettenspitze wird beim Befüllen der Küvette tief eingetaucht, die Probe darf nicht zu oberflächlich hinein pipettiert werden.

<u>Pipettieransatz:</u>
Puffer 450 µl + TK 150 µl
→ Inkubation drei Minuten
+ Kollagen 40, bzw. 60 µl
→ Messzeit acht Minuten

2.2.3 Statistische Methoden

Die deskriptive Statistik wird mit Sigma Plot for Windows Version 10.0 und die vergleichende Statistik mit Sigma Stat. for Windows Version 3,5 durchgeführt.
Systat. Software, Inc., CA95110, USA
Es werden folgende Tests durchführt:
Berechnungen von Mittelwerte, Standardabweichung, Median
Wilkoxon Signed-Rank-Test
Simple Line &Scatter-Error Bars
Vertical Bar-Error Bar
Box Plot
Simple Scatter

Die Ermittlung der Referenzwerte wird mittels der nicht- parametrischen Methode durchgeführt, gemäß dem Vorgehen der NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) [74]. Die Berechnung der Konfidenzintervalle erfolgt bei einer nicht- parametrischen Bestimmung aus den beobachteten Werten die bestimmten Rangnummern entsprechen. Folgende Tabelle dient zur Ermittlung der Konfidenzintervalle in dieser Arbeit:

Sample size	Rank numbers		Sample size	Rank numbers	
	Lower	Upper		Lower	Upper
119 – 132	1	7	566 – 574	8	22
133 – 160	1	8	575 – 598	9	22
161 – 187	1	9	599 – 624	9	23
188 – 189	2	9	625 – 631	10	23
190 – 218	2	10	632 – 665	10	24
219 – 248	2	11	666 – 674	10	25
249 – 249	2	12	675 – 698	11	25
250 – 279	3	12	699 – 724	11	26
280 – 307	3	13	725 – 732	12	26
308 – 309	4	13	733 – 765	12	27
310 – 340	4	14	766 – 773	12	28
341 – 363	4	15	774 – 799	13	28
364 – 372	5	15	800 – 822	13	29
373 – 403	5	16	823 – 833	14	29
404 – 417	5	17	834 – 867	14	30
418 – 435	6	17	868 – 871	14	31
436 – 468	6	18	872 – 901	15	31
469 – 470	6	19	902 – 919	15	32
471 – 500	7	19	920 – 935	16	32
591 – 522	7	20	936 – 967	16	33
523 – 533	8	20	968 – 970	17	33
534 – 565	8	21	971 – 1000	17	34

Tabelle 5: Non-Parametrische Konfidenzintervalle von Referenzwerten. Die Tabelle zeigt die Rangnummern des 90% Konfidenzintervalls der 2,5% Perzentile für eine Stichprobengröße von 119-1000 Werten nach [97].

2.3 Durchgeführte Messungen

Es werden folgende vier Hauptversuchsreihen durchgeführt:

1. Versuchsreihe Puffer = 2.3.1
2. Versuchsreihe Konzentration Startreagenz = 2.3.2
3. Versuchsreihe Multiplate® versus Born = 2.3.3
4. Versuchsreihe Säure-Basen-Status = 2.3.4

2.3.1 Versuchsreihe Puffer

Für die Messung der Thrombozytenaggregation mit dem Multiplate® wird zunächst nach einem geeignetem Medium/ Puffer gesucht, in welchem die Thrombozyten vor der Messung im Multiplate® -Gerät inkubiert werden.

Eingesetzt wurden:

- PBS
- PBS + Probe aus Röhrchen mit gepuffertem Citrat
- TRIS 20 mmol/l + $CaCl_2$ xH_2O 0, 4 g/l + Hirudin 2 µg/ml
- TRIS 20 mmol/l + $CaCl_2$ xH_2O 0, 6 g/l + $MgCl_2$ 0,2 g/l + Hirudin 2 µg/ml
- TRIS 20 mmol/l + $CaCl_2$ xH_2O 0,6 g/l + Hirudin 2 µg/ml
- TRIS 20 mmol/l + $CaCl_2$ xH_2O 2,0 (1,0) g/l + Hirudin 2 µg/ml
- Tyrodes + $CaCl_2$ xH_2O 0,3 g/l + $MgCl_2$ 0,2 g/l + Hirudin 2 µg/ml
- AB- Plasma + $CaCl_2$ xH_2O 1,5 g/l + Hirudin 2 µg/ml
- PBS + Hirudin 2 µg/ml
- TRIS 20 mmol/l + $CaCl_2$ xH_2O 25 mmol/l, bzw. 50 mmol/l + Hirudin 2 µg/ml

Gemessen wird an d0 (Abnahmetag), d1, d2, d3, d6, d7. (d4 und 5 entsprechen dem Wochenende).

Die Anzahl der Stichproben wird bei dem jeweiligen Puffer angegeben.

2.3.2 Versuchsreihe Konzentration Startreagenz

Untersucht wird die Stimulation der Thrombozyten und somit der Aggregation im Multiplate® mit Kollagen als Startreagenz mit einer Menge von 40 µl versus 60 µl.

Gemessen wird ebenfalls an d0, d1, d2, d3, d6, d7.

Die Größe der Stichprobe n beträgt 41.

2.3.3 Versuchsreihe Multiplate® versus Born

Die zufällig ausgewählten Thrombozytenkonzentrate werden an d0, d2 und d6 sowohl mit der Multiplate® - als auch mit der Born-Methode gemessen.
Die Größe der Stichprobe n beläuft sich auf 20.

2.3.4 Versuchsreihe Säure-Basen-Status

Die Messung des Säure-Basen-Status erfolgt an d0, d1, d2, d3, d6, d7. Die untersuchten Parameter stellen pH, pO_2, pCO_2, $cHCO_3$ und Base Excess dar.
Gemessen werden 81 Proben.

Die Tabelle 6 zeigt die zusammengefasste Systematik der Versuchsreihen:

Versuchsreihe Puffer	PBS vs. PBS + Probe aus Röhrchen mit gepuffertem Citrat
	PBS vs. TRIS 20 mmol/l + $CaCl_2$ xH_2O 0,4 g/l + Hirudin 2 µg/ml
	PBS vs. TRIS 20 mmol/l + $CaCl_2$ xH_2O 0,6 g/l + $MgCl_2$ 0,2 g/l + Hirudin 2 µg/ml
	PBS vs. TRIS 20 mmol/l + $CaCl_2$ xH_2O 0,6 g/l + Hirudin 2 µg/ml
	PBS vs. TRIS 20 mmol/l + $CaCl_2$ xH_2O 2,0 (1,0) g/l + Hirudin 2 µg/ml
	PBS vs. Tyrodes + $CaCl_2$ xH_2O 0,3 g/l + $MgCl_2$ 0,2 g/l + Hirudin 2 µg/ml
	PBS vs. AB- Plasma + $CaCl_2$ xH_2O 1,5 g/l + Hirudin 2 µg/ml
	PBS vs. PBS + Hirudin 2 µg/ml
	PBS vs. TRIS 20 mmol/l + $CaCl_2$ xH_2O 25 mmol/l, bzw. 50 mmol/l + Hirudin 2 µg/ml
	Messung der Puffer an d0, d1, d2, d3, d6, d7, Stichprobe: unterschiedlich groß
Versuchsreihe Startreagenz	Kollagen 40 µl vs. Kollagen 60 µl Messung an d0, d1, d2, d3, d6, d7, Stichprobe: 20 Proben
Versuchsreihe Multiplate/Born	Messung an d0, d2, d6, Stichprobe: 20 Proben
Versuchsreihe Säure-Basen Status	Messung an d0, d1, d2, d3, d6, d7 Stichprobe: 81 Proben

Tabelle 6: Übersicht über die Versuchsreihen

3. Ergebnisse

3.1 Allgemeines

Die Ergebnisse der Messungen werden im Folgenden nur in absoluten Werten dargestellt. Eine Ausnahme bildet die Messung mit PBS (3.2.1), hier werden zusätzlich die Messung in relativen Zahlen beispielhaft gezeigt.

Die Messungen werden zunächst beschrieben, relevante Ergebnisse in Diagrammen dargestellt und der statistischer Vergleich, falls möglich, gezeigt. Zum Ende jeder Darstellung der Ergebnisse wird tabellarisch eine etwaige statistischen Signifikanz der Unterschiede in der Messung des neuen Puffers im Vergleich zum Standardpuffer PBS aufgeführt, die Unterschiede kurz beschrieben und ein Fazit über die Eignung des neuen Puffers, bzw. das weitere Vorgehen gezogen. Gleiches wird für die Versuchsreihe ‚Konzentration Startreagenz' vorgenommen. Die nachstehende beispielhafte Tabelle erklärt das Vorgehen:

Signifikanz	1. Unterscheiden sich die Ergebnisse signifikant 2. Wenn ja, an welchen Messtagen
Δ	Beschreibung der Unterschiede in Worten.
Fazit	Schlussfolgerungen für das weitere Vorgehen

Tabelle 7: Beispieltabelle zur Darstellung der signifikanten Unterschiede der Versuchsreihen

Für die Graphiken wurde folgende Aufteilung gewählt: Die x-Achse zeigt die Tage der Messungen, d0 entspricht dem Tag der Abnahme, d1-3 entsprechen Tage im Rahmen der Haltbarkeit, an d4 und d5 wurde nicht gemessen (Wochenende) und d6, bzw., d7 entprechen Tage nach Ende der Haltbarkeit eines Thrombozytenkonzentrates. Die y-Achse stellt die Einheit der Messungen im Multiplate®-Analyzer dar, diese ist die AUC (Area under the Curve), beschrieben unter Punkt 1.7.4. Für die Skalierung wurden zur standardisierten Vergleichbarkeit grundsätzlich Werte von 0 bis 1600 AUC gewählt.

Die Daten werden grundsätzlich für Kollagen 40 µl (= 4 µg) gezeigt. Eine Ausnahme bildet die Versuchsreihe Kollagen 40 µl (= 4 µg) versus Kollagen 60 µl (= 6 µg) (3.3).

Um eine bessere Übersichtlichkeit zu gewährleisten werden nur die Tabellen und Abbildungen im Ergebnisteil aufgeführt, die für das prinzipielle Verständnis der Sachverhalte und der auffälligen Ergebnisse notwendig sind. Die vollständige schematische und gleichartige Auflistung aller gewonnenen Ergebnisse findet sich im Ergebnisanhang unter Punkt 6.

3.2 Versuchsreihe Puffer

In dieser Versuchsreihe wurde der Standardpuffer PBS, der in einer Vorarbeit [107] bereits eingesetzt wurde, im Vergleich zu acht anderen Puffersystemen getestet. Ziel dieser Messungen war es, ein eventuell besseres Inkubationsmedium (Puffer) als PBS für die Messungen der Thrombozytenkonzentrate mit dem Multiplate®-Analyzer zu finden.Das Startreagenz in jeder Messung war Kollagen 40 µl (= 4 µg).

3.2.1 PBS

Für die erste Testreihe wurde lediglich PBS-Puffer verwendet. Die ermittelten Werte aus dieser Messung dienen als Vergleichswerte zu den Messungen mit den anderen Vergleichspuffern.
Dargestellt ist sowohl die Messung in absoluten (Abbildung 16), als auch in relativen (Abbildung 17) Untersucht wurden 81 Proben.

Absolute Werte im Verlauf

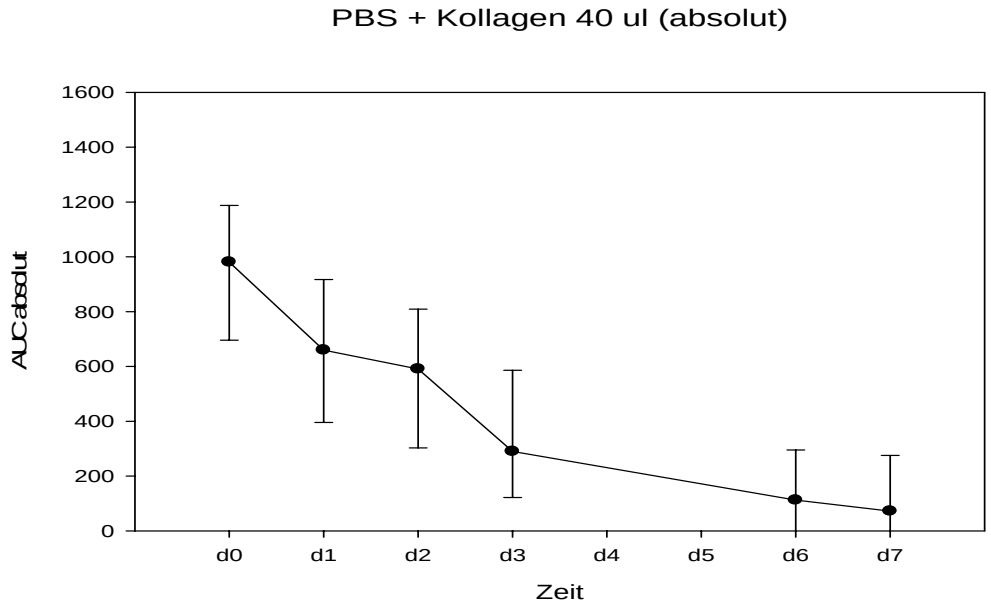


Abbildung 16: Darstellung der AUC, PBS + Kollagen 40 µl, in absoluten Werten mit Mittelwert und +/- Standardabweichung, n= 81

Von einem anfänglich Mittelwert von ca. 1000 (Einheit ‚Area under the Curve' AUC, beschrieben unter 1.7.4) sinken die Werte der Messung und somit die Fähigkeit der Thrombozyten Aggregate an den Elektroden zu bilden im Verlauf deutlich ab, um am Tag 7 (2

Tage nach Ende der Haltbarkeit) auf ein Minimum abzufallen. Die Fähigkeit Aggregate an den Elektroden der Messeinheit des Multiplate® zu bilden, entspricht der Abnahme der Funktionsfähigkeit der Plättchen.

Relative Werte im Verlauf

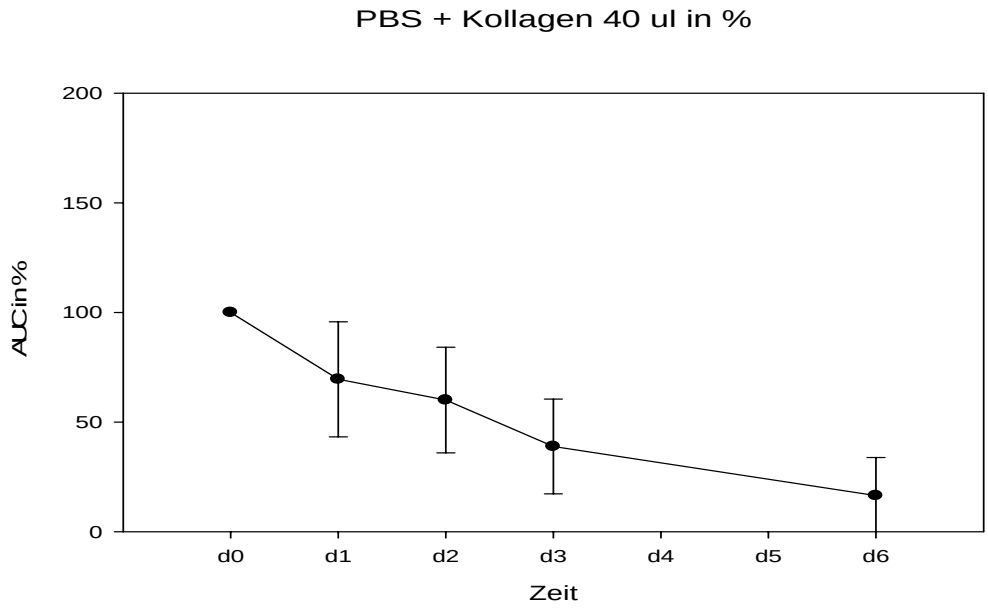


Abbildung 17: Darstellung der AUC, PBS + Kollagen 40 µl, in relativen Werten mit Mittelwert und +/- Standardabweichung, n= 81

Bei einer Auftragung in Prozentwerten entspricht der Messwert vom Tag der Abnahme des Thrombozytenkonzentrates dem 100% Wert, entsprechend stellen sich die restlichen Tage dar. Es zeigt sich, dass die Aggregationsfähigkeit der Plättchen sich nach Ablauf der Haltbarkeit auf knapp unter 20% beläuft.

3.2.2 PBS + Probe aus Röhrchen mit gepuffertem Citrat

Im nächsten Schritt überführten wir die Thrombozyten in Röhrchen mit gepuffertem Citrat. Hierbei sollte der Einfluss von Citrat auf Gerinnung getestet werden. Gezeigt wird die Messung in absoluten Zahlen (Abbildung 18). Anschließend erfolgt die Darstellung des statistischen Vergleichs (Tabelle 8) und in Tabelle 9 werden die Unterschiede beschrieben und ein Fazit gezogen.
Untersucht wurden 8 Proben.

Absolute Werte im Verlauf

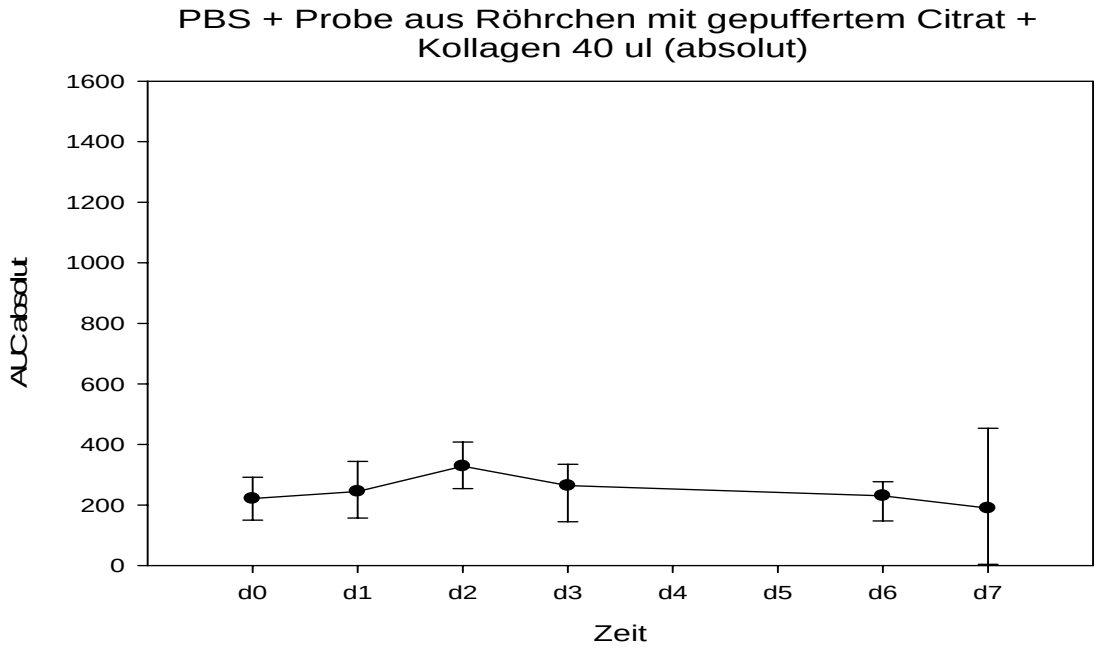


Abbildung 18: Darstellung der AUC, PBS + Probe aus Röhrchen mit gepuffertem Citrat + Kollagen 40 µl, in absoluten Werten mit Mittelwert und +/- Standardabweichung, n= 8

Es zeigt sich ein bereits zu Beginn der Messreihe am d0 ein, im Vergleich zu PBS (s.o.) sehr niedriger Mittelwert von ca. 200 AUC. Die Werte steigen an d2 an um am nächsten Messtag wieder abzufallen. Dieser Abfall zeigt sich bis zum d7, 2 Tage nach Ende der Haltbarkeit. Am d7 findet sich eine große Streubreite der Messwerte.

Statistischer Vergleich

Vergleich PBS versus PBS + Probe aus Röhrchen mit gepuffertem Citrat (Startreagenz jeweils Kollagen 40 µl)										
n	Zeit	PBS			PBS + Probe aus gepuffertem Citratröhrchen			Test	p-Wert	Signifikanz
		Median	25%	75%	Median	25%	75%		p <	
8	d0	890,00	819,50	979,50	221,00	177,00	283,50	Wilcoxon signed rank test	0,008	s.
8	d1	660,00	585,00	803,00	244,50	183,00	263,50	Wilcoxon signed rank test	0,008	s.
8	d2	531,50	453,50	783,50	328,00	317,50	371,00	Wilcoxon signed rank test	0,008	s.
8	d3	511,50	394,00	595,50	264,00	150,50	322,00	Wilcoxon signed rank test	0,008	s.
8	d6	501,50	307,00	602,50	230,50	180,50	243,00	Wilcoxon signed rank test	0,008	s.
8	d7	462,00	212,50	586,00	189,50	67,00	267,50	Wilcoxon signed rank test	0,25	n.s.

Tabelle 8: Statistischer Vergleich der Messung PBS versus PBS + Probe aus Röhrchen mit gepuffertem Citrat + Kollagen 40 µl im Verlauf

Vergleich PBS versus Probe aus Röhrchen mit gepuffertem Citrat (Startreagenz jeweils Kollagen 40 µl)

Signifikanz	1. Es liegen signifikante Unterschiede vor. 2. Die Unterschiede betreffen d0-d6
Δ	• Es findet sich eine geringere Stimulierbarkeit der Thrombozyten mit Citratzusatz • Die Messung mit PBS weist einen stetigen Abfall der Kurve und einen harmonischeren Kurvenverlauf auf. • Bei der Messung mit Citrat zeigt sich ein Anstieg der AUC an d1 und d2, dann einen stetigen Abfall. Es finden sich große Standardabweichungen bei Citrat, besonders an d7.
Fazit	• Aufgrund der statistischen Signifikanz und des besseren Kurvenverlaufs wird PBS als Standardpuffer beibehalten. • PBS + Citrat 3,8 ml NC als Puffer ersetzt den Standardpuffer PBS nicht.

Tabelle 9: Darstellung der Unterschiede der Messung PBS versus Probe aus Röhrchen mit gepuffertem Citrat

3.2.3 TRIS 20 mmol/l + $CaCl_2$ xH_2O 0,4 g/l + Hirudin 2 µg/ml

Im nächsten Schritt testeten wir Tris(hydroxymethyl)methan (TRIS) als mögliches Inkubationsmedium für die Thrombozytenkonzentrate. Bei einem pK_s 8,3 (bei 20 C) besitzt TRIS eine gute Pufferkapazität zwischen pH7,2–9,0.
Zusätzlich wurde Calcium eingesetzt, um zu sehen, ob sich der Einfluss auf die Gerinnung auch im Multiplate® widerspiegelt.
Dargestellt ist die Messung in absoluten (Abbildung 19) Werten, der statistische Vergleich (Tabelle 10) und erneut die Auflistung der Unterschiede mit Bildung eines Fazits (Tabelle 11).

Absolute Werte im Verlauf

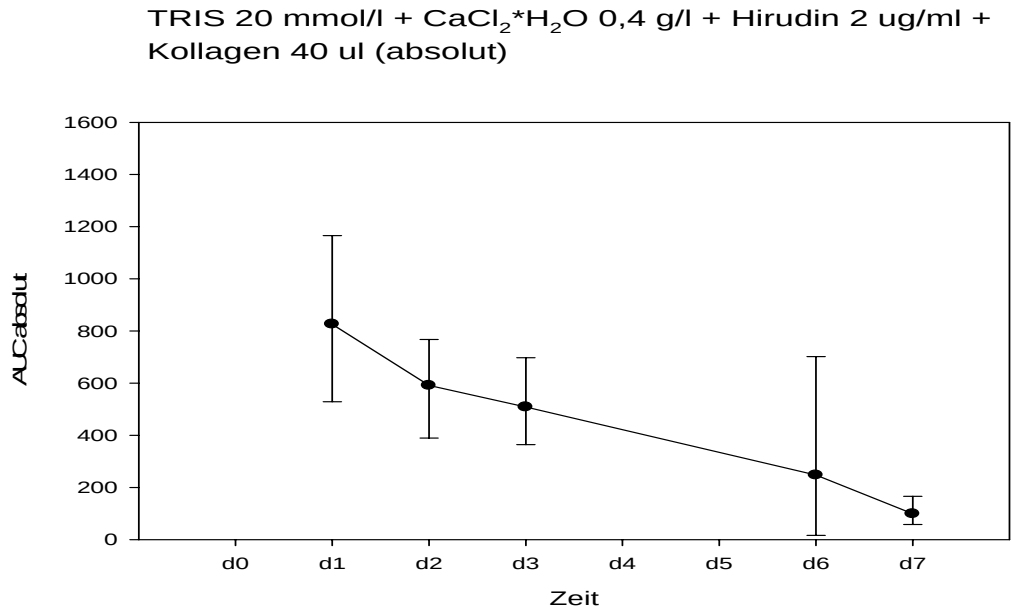


Abbildung 19: Darstellung der AUC, TRIS + $CaCl_2$ xH_2O 0,4 g/l + Hirudin 2 µg/ml + Kollagen 40 µl, in absoluten Werten mit Mittelwert und +/- Standardabweichung, n= 4

Von einem anfänglichen Mittelwert von ca. 800 AUC sinken die Werte der Messung und folglich die Funktion der Thrombozyten ab, um am Tag 7 (2 Tage nach Ende der Haltbarkeit) auf Werte unter 100 AUC abzufallen. Die Messungen zeigen hohe Standardabweichungen, besonders deutlich an d6.

Statistischer Vergleich

Vergleich PBS versus TRIS 20 mmol/l + $CaCl_2$*H_2O 0,4 g/l + Hirudin 2 µg/ml (Startreagenz jeweils Kollagen 40 µl)									
n	Zeit	PBS			TRIS 20 mmol/l + $CaCl_2$*H_2O 0,4 g/l + Hirudin 2 µg/ml			Test	p-Wert	Signifikanz
		Median	25%	75%	Median	25%	75%		p <	
4	d0	/	/	/	/	/	/			
4	d1	586,50	583,00	687,00	826,00	615,50	1080,00	Wilcoxon signed rank test	0,250	n.s.
4	d2	623,50	519,00	713,50	591,50	462,00	695,00	Wilcoxon signed rank test	0,375	n.s.
4	d3	445,50	391,00	535,00	508,50	415,50	646,50	Wilcoxon signed rank test	0,250	n.s.
4	d6	118,50	75,50	145,50	247,50	111,00	607,50	Wilcoxon signed rank test	0,375	n.s.
4	d7	23,00	15,50	71,50	99,00	73,00	151,50	Wilcoxon signed rank test	0,250	n.s.

Tabelle 10: Statistischer Vergleich der Messung PBS versus TRIS 20 mmol/l + $CaCl_2$ xH_2O 0,4 g/l + Hirudin 2 µg/ml + Kollagen 40 µl im Verlauf

Vergleich PBS versus TRIS 20 mmol/l + $CaCl_2$ xH_2O 0,4 g/l + Hirudin 2 µg/ml (Startreagenz jeweils Kollagen 40 µl)

Signifikanz	1. Es zeigen sich keine statistisch signifikanten Unterschiede 2. --
Δ	• In der Messung mit TRIS 20 mmol/l + $CaCl_2$ xH_2O 0,4 g/l + Hirudin 2 µg/ml findet sich an d1 und d6 eine größere Streuung als in der Messung mit PBS. • Im Mittelwert zeigt sie an den Tagen d1, d3 und d7 eine tendenziell bessere Stimulierbarkeit der Thrombozyten, wobei sich die Ergebnisse an d7 wieder angleichen.
Fazit	• Die Messreihe TRIS 20 mmol/l + $CaCl_2$ xH_2O 0,4 g/l + Hirudin 2 µg/ml zeigt kein signifikantes oder in der deskriptiven Statistik überzeugend besseres Ergebnis. • Der Standardpuffer PBS wird hierdurch nicht ersetzt.

Tabelle 11: Darstellung der Unterschiede der Messung PBS versus TRIS 20 mmol/l + $CaCl_2$ xH_2O 0,4 g/l + Hirudin 2 µg/ml

3.2.4 TRIS 20 mmol/l + $CaCl_2$ xH_2O 0,6 g/l + $MgCl_2$ 0,2 g/l + Hirudin 2 µg/ml

Es folgte nun sowohl eine Erhöhung der Calcium-Konzentration als auch die Zugabe von Magnesium, um zu prüfen, ob dieser Ansatz als Trigger für die Aggregation funktioniert. Dargestellt ist die Messung in absoluten Werten (Abbildung 20), anschließend werden der statistische Vergleich (Tabelle 12) und zuletzt eine abschließende Beurteilung des Vergleichs gezeigt (Tabelle 13).
Untersucht wurden 5 Proben.

Absolute Werte im Verlauf

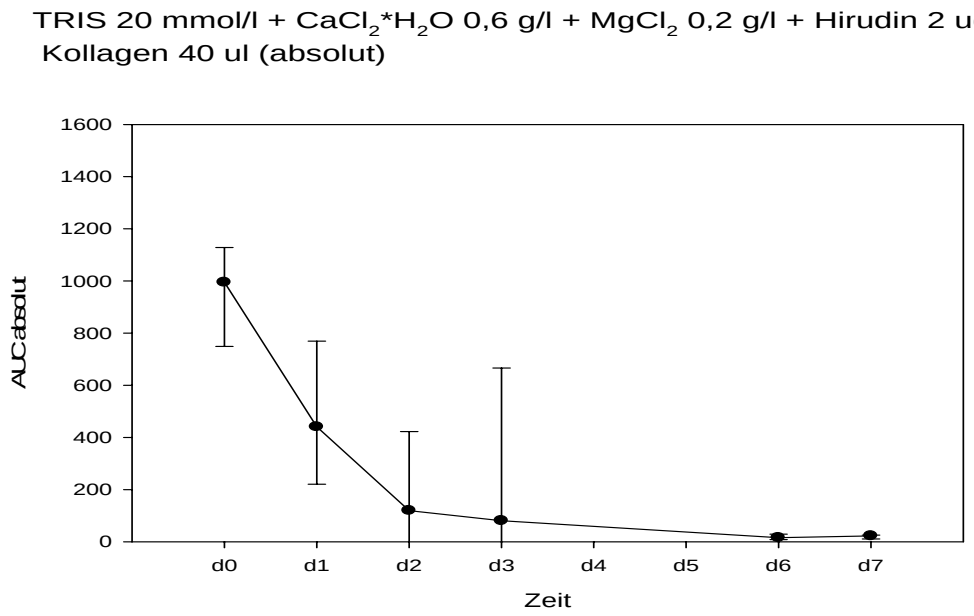


Abbildung 20: Darstellung der AUC, TRIS 20 mmol/l + $CaCl_2$ xH_2O 0,6 g/l + $MgCl_2$ 0,2 g/l + Hirudin 2 µg/ml + Kollagen 40 µl, in absoluten Werten, mit Mittelwert und +/- Standardabweichung, n= 5

Der Mittelwert am Tag der Abnahme (d0) beläuft sich auf ca. 1000 AUC, die Werte sinken im Verlauf der Messung deutlich ab. Die Werte an d2 und d3 befindlichen sich auf ähnlichem Niveau, um dann bis d7 noch einmal deutlich abzufallen. An d0-d3 zeigen sich hohe Standardabweichungen, insbesondere an d3.

Statistischer Vergleich

Vergleich PBS versus TRIS 20 mmol/l+ $CaCl_2*H_2O$ 0,6 g/l + $MgCl_2$ 0,2 g/l + Hirudin 2 µg/ml (Startreagenz jeweils Kollagen 40 µl)										
n	Zeit	PBS			TRIS + $CaCl_2*H_2O$ 0,6 g/l + $MgCl_2$ 0,2 g/l + Hirudin 2 µg/ml			Test	p-Wert	Signifikanz
		Median	25%	75%	Median	25%	75%		p <	
5	d0	856,00	673,50	901,00	995,00	854,50	1042,00	Wilcoxon signed rank test	0,063	n.s.
5	d1	739,00	544,00	955,75	441,00	293,25	723,00	Wilcoxon signed rank test	0,063	n.s.
5	d2	549,00	276,50	689,25	120,00	98,00	256,25	Wilcoxon signed rank test	0,063	n.s.
5	d3	157,00	98,75	279,50	81,00	59,00	315,00	Wilcoxon signed rank test	0,625	n.s.
5	d6	141,00	84,50	152,75	16,00	12,00	23,50	Wilcoxon signed rank test	0,063	n.s.
5	d7	77,00	49,75	198,50	23,00	11,25	24,25	Wilcoxon signed rank test	0,063	n.s.

Tabelle 12: Statistischer Vergleich der Messung PBS versus TRIS 20 mmol/l + $CaCl_2$ xH_2O 0,6 g/l + $MgCl_2$ 0,2 g/l + Hirudin 2 µg/ml + Kollagen 40 µl im Verlauf

Vergleich PBS versus TRIS 20 mmol/l + $CaCl_2$ xH_2O 0,6 g/l + $MgCl_2$ 0,2 g/l + Hirudin 2 µg/ml (Startreagenz jeweils Kollagen 40 µl)

Signifikanz	1. Es findet sich kein statistisch signifikanter Unterschied 2. --
Δ	• Auffällig ist im Kurvenverlauf die reduzierte Stimulierbarkeit der Thrombozyten mit TRIS 20 mmol/l + $CaCl_2$ xH_2O 0,6 g/l + $MgCl_2$ 0,2 g/l + Hirudin 2 µg/ml nach Verfall, d.h. d6 und d7.
Fazit	• Aufgrund der mangelnden Stimulierbarkeit nach Verfall und des nicht vorhandenden signifikanten Unterschieds wird TRIS 20 mmol/l + $CaCl_2$ xH_2O 0,6 g/l + $MgCl_2$ 0,2 g/l + Hirudin 2 µg/ml nicht als Puffer akzeptiert. • Der Standardpuffers PBS wird nicht ersetzt.

Tabelle 13: Darstellung der Unterschiede der Messung PBS versus TRIS 20 mmol/l + $CaCl_2$ xH_2O 0,6 g/l + $MgCl_2$ 0,2 g/l + Hirudin 2 µg/ml

3.2.5 TRIS 20 mmol/l + $CaCl_2$ xH_2O 0,6 g/l + Hirudin 2 µg/ml

Da die Messung mit $MgCl_2$ zu keiner ausreichende Stimulierbarkeit der Thrombozyten führte, wurde aus diesem Grund bei der nächsten Versuchsreihe auf $MgCl_2$ verzichtet. Die Calciumkonzentration $CaCl_2$ xH_2O 0,6 g/l aus der letzten Versuchsreihe wurde aber beibehalten.

Dargestellt ist die Messung in absoluten Werten (Abbildung 21), der statistische Vergleich (Tabelle 14) und erneut der abschließende Vergleich in Worten und somit eine Beurteilung über die Eignung des neu getesteten Puffers (Tabelle 15).

Untersucht wurden 4 Proben.

Absolute Werte im Verlauf

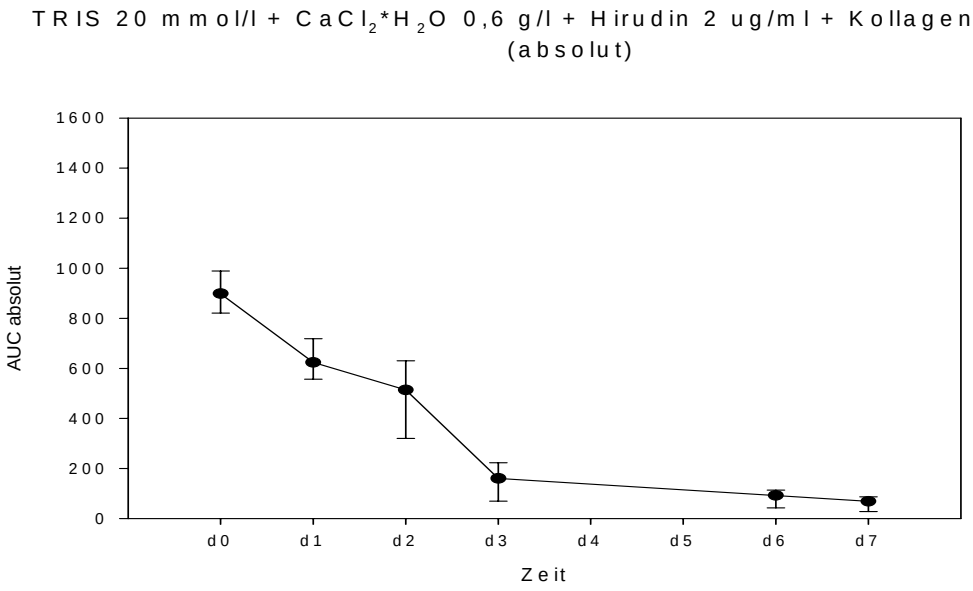


Abbildung 21: Darstellung der AUC, TRIS 20 mmol/l + $CaCl_2$ xH_2O 0,6 g/l + Hirudin 2µg/ml + Kollagen 40 µl, in absoluten Werten mit Mittelwert und +/- Standardabweichung, n=4

In dieser Messung zeigt sich ein rapider Abfall der Messwerte, d.h. der Aggregationsfähigkeit der Plättchen an den Elektroden des Multiplate®-Analyzers. Die Werte gehen nach Ende der Haltbarkeit (d6, d7) gegen 0.

Statistischer Vergleich

Vergleich PBS versus TRIS 20 mmol/l + $CaCl_2$*H_2O 0,6 g/l + Hirudin 2 µg/ml (Startreagenz jeweils Kollagen 40 µl)										
n	Zeit	PBS			TRIS 20 mmol/l + $CaCl_2$*H_2O 0,6 g/l + Hirudin 2 µg/ml			Test	p-Wert	Signifikanz
		Median	25%	75%	Median	25%	75%		p <	
4	d0	922,00	818,00	1096,50	898,50	843,50	966,00	Wilcoxon signed rank test	0,625	n.s.
4	d1	527,50	415,00	658,00	624,00	571,00	704,00	Wilcoxon signed rank test	0,250	n.s.
4	d2	375,50	303,50	629,00	513,50	383,50	567,50	Wilcoxon signed rank test	0,875	n.s.
4	d3	139,00	103,00	400,50	160,50	89,50	203,50	Wilcoxon signed rank test	0,625	n.s.
4	d6	52,00	37,50	109,00	92,50	56,00	100,50	Wilcoxon signed rank test	1,000	n.s.
4	d7	70,50	41,50	75,00	69,00	40,00	75,00	Wilcoxon signed rank test	1,000	n.s.

Tabelle 14: Statistischer Vergleich der Messung PBS versus TRIS 20 mmol/l + $CaCl_2$ xH_2O 0,6 g/l + Hirudin 2 µg/ml + Kollagen 40 µl im Verlauf

Vergleich PBS versus TRIS 20 mmol/l + $CaCl_2$ xH_2O 0,6 g/l + Hirudin 2 µg/ml (Startreagenz jeweils Kollagen 40 µl)

Signifikanz	1. Es liegen keine statistisch signifikanten Unterschiede vor. 2. --
Δ	• Es zeigt sich in der Messung mit TRIS 20 mmol/l + $CaCl_2$ xH_2O 0,6 g/l + Hirudin 2 µg/ml eine tendenziell geringere Stimulierbarkeit der Thrombozyten nach Verfall, bzw. bereits nach an d3 im Kurvenverlauf
Fazit	• Der Ansatz TRIS 20 mmol/l + $CaCl_2$ xH_2O 0,6 g/l + Hirudin 2 µg/ml ist der Stimulierbarkeit der Thrombozyten im Kurvenverlauf PBS unterlegen. • Der Standardpuffer PBS wird nicht durch diesen Ansatz ersetzt.

Tabelle 15: Darstellung der Unterschiede der Messung PBS versus TRIS 20 mmol/l + $CaCl_2$ xH_2O 0,6 g/l + Hirudin 2 µg/ml

3.2.6 TRIS 20 mmol/l + $CaCl_2$ xH_2O 2,0 g/l + Hirudin 2 µg/ml

Die Versuchsreihe mit TRIS 20 mmol/l + $CaCl_2$ xH_2O 0,6 g/l + Hirudin 2 µg/ml zeigte ebenfalls keine Verbesserung zum Standardpuffer PBS. Die Calcium-Konzentration wurde ein weiteres Mal erhöht. Gedanklicher Hintergrund war, durch die Erhöhung der Calciumkonzentration die Aggregation steigern zu können, da Calcium generell als Trigger für die Plättchenaggregation agiert.
Dargestellt ist die Messung in absoluten (Abbildung 22) Werten. Tabelle 16 zeigt den statistischen Vergleich und Tabelle 17 beschreibt die Unterschiede in Worten und zeigt ein abschließendes Fazit der Versuchsreihe auf.
Untersucht wurden 8 Proben.

Absolute Werte im Verlauf

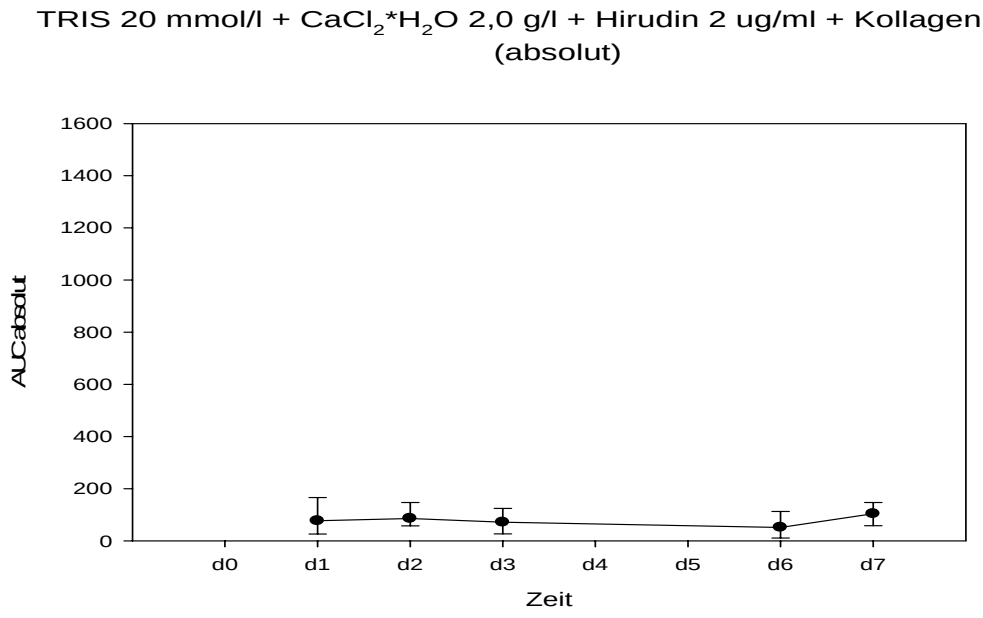


Abbildung 22: Darstellung der AUC, TRIS 20 mmol/l + $CaCl_2$ xH_2O 2,0 g/l + Hirudin 2 µg/ml + Kollagen 40 µl, in absoluten Werten mit Mittelwert und +/- Standardabweichung, n=8

Es zeigt sich bereits zu Beginn der Messung eine nahezu kaum messbare Aggregation der Thrombozyten an den Elektroden des Multiplate®-Geräts. Die Plättchen lassen sich im Verlauf nicht weiter stimulieren.

Statistischer Vergleich

Vergleich PBS versus TRIS 20 mmol/l + $CaCl_2$*H_2O 2,0g/l + Hirudin 2 µg/ml (Startreagenz jeweils Kollagen 40 µl)									
n	Zeit	PBS			TRIS 20 mmol/l + CaCl2*H2O 2,0g/l + Hirudin 2 µg/ml			Test	p-Wert	Signifikanz
		Median	25%	75%	Median	25%	75%		p <	
8	d0	/	/	/	/	/	/	Wilcoxon signed rank test		
8	d1	633,50	300,00	875,00	77,00	49,00	112,50	Wilcoxon signed rank test	0,008	s.
8	d2	608,00	222,50	828,50	86,00	66,50	138,50	Wilcoxon signed rank test	0,008	s.
8	d3	288,00	164,50	526,00	71,50	36,00	99,00	Wilcoxon signed rank test	0,008	s.
8	d6	28,00	25,50	57,00	51,50	20,50	96,50	Wilcoxon signed rank test	0,547	n.s.
8	d7	58,00	32,00	86,00	104,00	69,50	135,50	Wilcoxon signed rank test	0,078	n.s.

Tabelle 16: Statistischer Vergleich der Messung PBS versus TRIS 20 mmol/l + $CaCl_2$ xH_2O 2,0 g/l + Hirudin 2 µg/ml + Kollagen 40 µl im Verlauf

Vergleich PBS versus TRIS 20 mmol/l + $CaCl_2$ xH_2O 2,0 g/l + Hirudin 2 µg/ml (Startreagenz jeweils Kollagen 40 µl)

Signifikanz	1. Es liegen statistisch signifikante Unterschiede vor. 2. Die Unterschiede zeigen sich an d1-d3.
Δ	• Die Thrombozyten zeigen mit TRIS 20 mmol/l + $CaCl_2$ xH_2O 2,0 g/l + Hirudin 2 µg/ml eine deutlich eingeschränkte Stimulierbarkeit der Thrombozyten • Es findet sich in der Messung mit TRIS 20 mmol/l + $CaCl_2$ xH_2O 2,0 g/l + Hirudin 2 µg/ml ein durchgehend flacher Kurvenverlauf.
Fazit	• Aufgrund des flachen Kurvenverlaufs und der statistischen Signifikanz wird TRIS 20 mmol/l + $CaCl_2$ xH_2O 2,0 g/l + Hirudin 2 µg/ml als Inkubationsmedium für die Messung im Multiplate®-Analyzer für als nicht geeignet betrachtet • Kein Ersatz des Standardpuffers PBS.

Tabelle 17: Darstellung der Unterschiede der Messung PBS versus TRIS 20 mmol/l + $CaCl_2$ xH_2O 2,0 g/l + Hirudin 2 µg/ml

3.2.7 Tyrodes + $CaCl_2$ xH_2O 0,3 g/l + $MgCl_2$ 0,2 g/l + Hirudin 2 µg/ml

Um eine Messung unter signifikant physiologischen Elektrolytbedingungen zu gewährleisten, wurde die nächste Messreihe mit Tyrode Puffer durchgeführt.
Dargestellt sind sowohl die Messung in absoluten Werten (Abbildung 23) und der statistische Vergleich (Tabelle 18). Des Weiteren wird der Unterschied der Messung mit dem Tyrodepuffer im Vergleich zum Standardpuffer PBS beschrieben und ein Resultat zum weiteren Vorgehen gezogen (Tabelle 19).
Untersucht wurden 3 Proben.

Absolute Werte im Verlauf

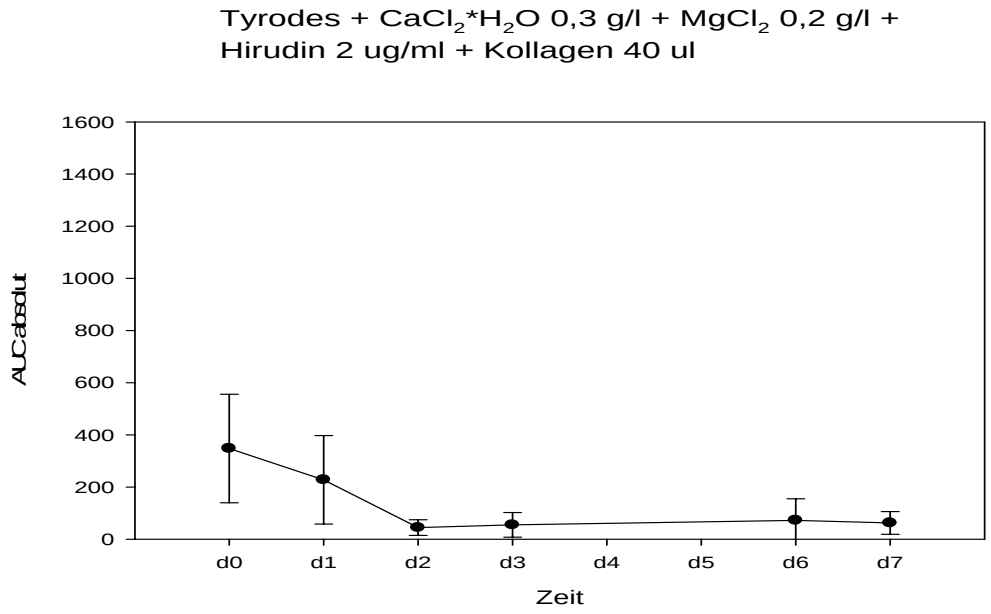


Abbildung 23: Darstellung der AUC, Tyrode + CaCl2 xH2O 0,3 g/l + MgCl2 0,2 g/l + Hirudin 2 µg/ml + Kollagen 40 µl, in absoluten Werten mit Mittelwert und +/- Standardabweichung, n=3

Schon zu Beginn der Messreihe (Tag der Abnahme, d0) zeigen sich niedrigere Werte als in der Messung mit PBS Puffer. Die Werte fallen bereits an d2 auf Werte nahe 0 ab, diese bleiben ähnlich bis d7, d.h. 2 Tage nach Ende der Haltbarkeit.

Statistischer Vergleich

Vergleich PBS versus Tyrode+ $CaCl_2*H_2O$ 0,3g/l + $MgCl_2$ 0,2 g/l + Hirudin 2 µg/ml (Startreagenz jeweils Kollagen 40 µl)										
n	Zeit	PBS			Tyrode +$CaCl_2*H_2O$ 0,3g/l + $MgCl_2$0,2g/l Hirudin 2 µg/ml			Test	p-Wert	Signifikanz
		Median	25%	75%	Median	25%	75%		p <	
3	d0	981,00	836,25	986,25	410,00	189,50	491,00	Wilcoxon signed rank test	0,250	n.s.
3	d1	660,00	605,25	945,00	131,00	129,50	350,75	Wilcoxon signed rank test	0,250	n.s.
3	d2	840,00	676,50	871,50	54,00	21,75	65,25	Wilcoxon signed rank test	0,250	n.s.
3	d3	279,00	268,50	447,75	46,00	21,25	91,00	Wilcoxon signed rank test	0,250	n.s.
3	d6	197,00	167,00	218,00	27,00	23,25	132,75	Wilcoxon signed rank test	0,500	n.s.
3	d7	114,00	77,25	196,50	74,00	29,00	92,75	Wilcoxon signed rank test	0,500	n.s.

Tabelle 18: Statistischer Vergleich der Messung PBS versus Tyrode 20 mmol/l + $CaCl_2$ xH_2O 0,3 g/l + $MgCl_2$ 0,2 g/l + Hirudin 2 µg/ml + Kollagen 40 µl im Verlauf

Vergleich PBS versus Tyrode + $CaCl_2$ xH_2O 0,3 g/l + $MgCl_2$ xH_2O 0,2 g/l + Hirudin 2µg/ml
(Startreagenz jeweils Kollagen 40 µl)

Signifikanz	1. Es finden sich keine statistisch signifikanten Unterschiede der beiden Messreihen. 2. --
Δ	• Der Messung mit Tyrode + $CaCl_2$ xH_2O 0,3 g/l + $MgCl_2$ xH_2O 0,2 g/l + Hirudin 2 µg/ml zeigt bereits an d0 und d1 eine geringe Stimulierbarkeit, die in einen flachen Kurvenverlauf gegen Null (bereits ab d2) mündet.
Fazit	• Aufgrund der deskriptiven Statistik wird sich gegen Tyrode + $CaCl_2$ xH_2O 0,3 g/l + $MgCl_2$ xH_2O 0,2 g/l + Hirudin 2 µg/ml entschieden. • Dieser Ansatz ersetzt den Standardpuffer PBS nicht.

Tabelle 19: Darstellung der Unterschiede der Messung PBS versus Tyrode + $CaCl_2$ xH_2O 0,3 g/l + $MgCl_2$ xH_2O 0,2 g/l + Hirudin 2µg/ml

3.2.8 AB- Plasma + $CaCl_2$ xH_2O 1,5 g/l + Hirudin 2 µg/ml

Folgende Ansätze wurden bislang getestet:

PBS + Probe aus Röhrchen mit gepuffertem Citrat

TRIS 20 mmol/l + $CaCl_2$ xH_2O 0,4 g/l + Hirudin 2 µg/ml

TRIS 20 mmol/l + $CaCl_2$ xH_2O 0,6 g/l + $MgCl_2$ 0,2 g/l + Hirudin 2 µg/ml

TRIS 20 mmol/l + $CaCl_2$ xH_2O 0,6 g/l + $MgCl_2$ 0,2 g/l + Hirudin 2 µg/ml

TRIS 20 mmol/l + $CaCl_2$ xH_2O 0,6 g/l + Hirudin 2 µg/ml

TRIS 20 mmol/l + $CaCl_2$ xH_2O 2,0 (1,0) g/l + Hirudin 2 µg/ml

Tyrodes + $CaCl_2$ xH_2O 0,3 g/l + $MgCl_2$ 0,2 g/l + Hirudin 2 µg/ml

Diese Ansätze zeigten keine überlegenen Ergebnisse zum Standardpuffer PBS. Die bislang erprobten Testmedien stellen per se keine physiologische Umgebung für die Plättchen dar. Aus diesem Grund testeten wir in der nächsten Versuchsreihe die Aggregation der Thrombozyten in einem hochgradig physiologischen Milieu. Hierbei setzten wir gefrorenes Plasmaapherese-Frischplasma der Blutgruppe AB ein.

Dargestellt ist die Messung in absoluten (Abbildung 24) Werten. Tabelle 20 zeigt den statistischen Vergleich und in der Tabelle 21 findet sich die Beschreibung der Unterschiede und eine abschließende Wertung über die Eignung dieses Ansatzes als künftiges Inkubationsmedium für die Messung im Multiplate®-Analyzer.

Untersucht wurden 8 Proben.

Absolute Werte

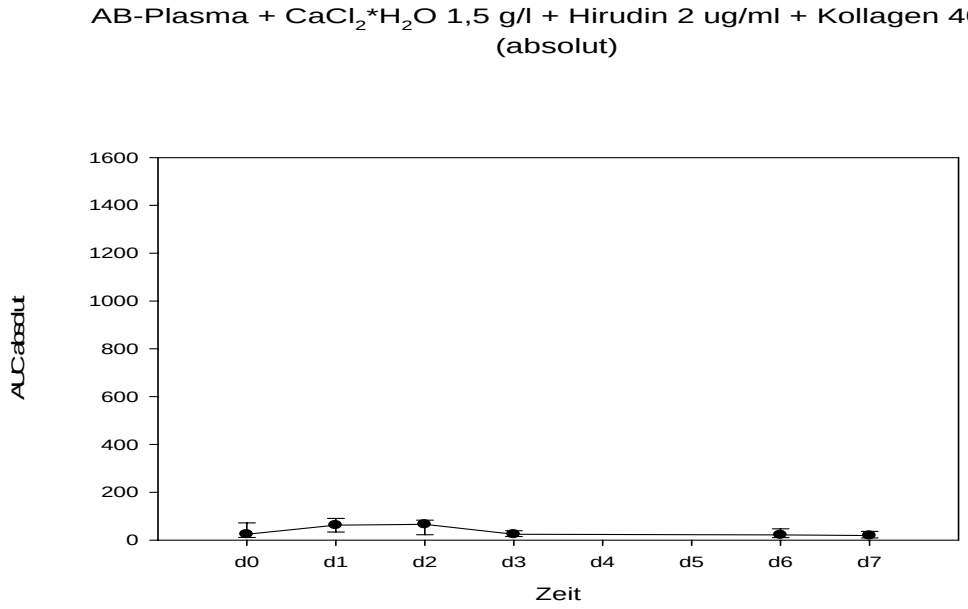


Abbildung 24: Darstellung der AUC, AB-Plasma + $CaCl_2$ xH_2O 1,5 g/l + Hirudin 2 µg/ml + Kollagen 40 µl, in absoluten Werten mit Mittelwert und +/- Standardabweichung, n=8

Es zeigt sich bereits am Tag der Abnahme der Thrombozyten (d0) eine gewissermaßen nicht messbare Stimulierbarkeit der Plättchen. Die Werte gehen am d0 gegen 0 und nehmen im Lauf der Messung nicht zu.

Statistischer Vergleich

Vergleich PBS versus AB-Plasma + $CaCl_2$*H_2O 1,5 g/l + Hirudin 2 µg/ml (Startreagenz jeweils Kollagen 40 µl)										
n	Zeit	PBS			AB-Plasma + $CaCl_2$*H_2O 1,5 g/l + Hirudin 2 µg/ml			Test	p-Wert	Signifikanz
		Median	25%	75%	Median	25%	75%		p <	
8	d0	1117,00	649,00	1291,50	24,50	19,00	72,00	Wilcoxon signed rank test	0,008	s.
8	d1	633,50	300,00	875,00	62,50	49,00	79,00	Wilcoxon signed rank test	0,008	s.
8	d2	608,00	222,50	828,50	65,50	20,50	74,50	Wilcoxon signed rank test	0,008	s.
8	d3	288,00	164,50	526,00	24,00	18,50	30,50	Wilcoxon signed rank test	0,008	s.
8	d6	28,00	25,50	57,00	22,00	18,00	35,50	Wilcoxon signed rank test	0,250	n.s.
8	d7	58,00	32,00	86,00	19,00	14,00	31,00	Wilcoxon signed rank test	0,039	s.

Tabelle 20: Statistischer Vergleich der Messung PBS versus AB-Plasma + $CaCl_2$ xH_2O 1,5 g/l + Hirudin 2 µg/ml + Kollagen 40 µl im Verlauf

Vergleich PBS versus AB-Plasma + $CaCl_2$ xH_2O 1,5 g/l + Hirudin 2 µg/ml (Startreagenz jeweils Kollagen 40 µl)

Signifikanz	1. Es zeigt sich ein statistisch signifikanter Unterschied in den Messansätzen. 2. Die Unterschiede finden sich an den Tagen do-d3 und an d7.
Δ	• Die Thrombozyten lassen in dem Puffersystem AB-Plasma + $CaCl_2$ xH_2O 1,5 g/l + Hirudin 2 µg/ml so gut wie nicht stimulieren, die Kurve bewegt sich nahe Null. • In der relativen Auswertung (siehe Ergebnisanhang) zeigen sich große Standardabweichungen.
Fazit	• Aufgrund der statischen Signifikanz in Kombination mit der deskriptiven Statistik wird der Ansatz AB-Plasma + $CaCl_2$ xH_2O 1,5 g/l + Hirudin 2 µg/ml nicht als Inkubationsmedium eingesetzt • Kein Ersatz des Standardpuffers PBS.

Tabelle 21: Darstellung der Unterschiede der Messung PBS versus AB-Plasma + $CaCl_2$ xH_2O 1,5 g/l + Hirudin 2 µg/ml

3.2.9 PBS + Hirudin 2 µg/ml

Hirudin findet bei der Messung von Vollblutproben im Multiplate® breiten Einsatz. Deshalb bestand die Überlegung, Hirudin auch in der Messung mit Thrombozytenkonzentraten einzusetzen und zu sehen, welche Auswirkungen Hirudin auf die Messung der Plättchenfunktion im Multiplate® hat.
Dargestellt ist die Messung in absoluten (Abbildung 25) Werten. Ebenfalls gezeigt wird der statistische Vergleich (Tabelle 22) und erneut die Unterschiede der Messungen in Worten und ein Fazit über den Einsatz von Hirudin (Tabelle 23).
Getestet wurden 5 Proben.

Absolute Werte im Verlauf

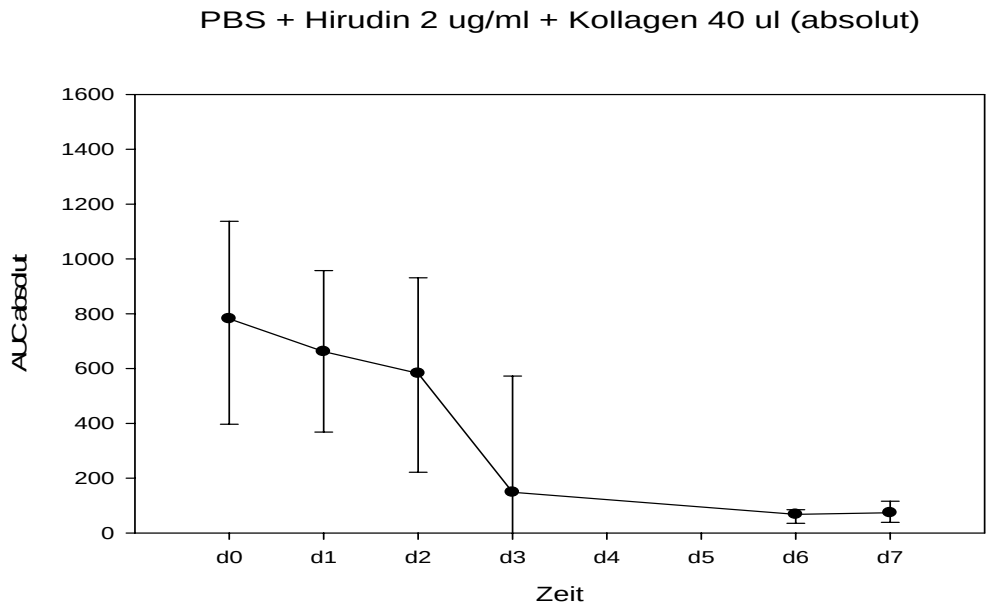


Abbildung 25: Darstellung der AUC, PBS + Hirudin 2 µg/ml + Kollagen 40 µl, in absoluten Werten mit Mittelwert und +/- Standardabweichung, n= 5

Die Plättchen lassen sich vom Tag der Abnahme bis d2 gut stimulieren, nach d2 lässt sich allerdings ein rapider Abfall der Aggregationsfähigkeit erkennen. Nach Ende der Haltbarkeit lassen sich die Thrombozyten nicht mehr stimulieren.

Statistischer Vergleich

Vergleich PBS versus PBS + Hirudin 2 µg/ml (Startreagenz jeweils Kollagen 40 µl)										
n	Zeit	PBS			PBS + Hirudin 2 µg/ml			Test	p-Wert	Signifikanz
		Median	25%	75%	Median	25%	75%		p <	
5	d0	782,00	612,75	1039,25	739,00	544,00	955,75	Wilcoxon signed rank test	1,000	n.s.
5	d1	739,00	544,00	955,75	662,00	381,75	947,00	Wilcoxon signed rank test	0,125	n.s.
5	d2	549,00	276,50	689,25	583,00	272,50	840,25	Wilcoxon signed rank test	0,313	n.s.
5	d3	157,00	98,75	279,50	149,00	110,00	423,25	Wilcoxon signed rank test	0,625	n.s.
5	d6	141,00	84,50	152,75	68,00	34,50	82,50	Wilcoxon signed rank test	0,125	n.s.
5	d7	77,00	49,75	198,50	74,00	46,00	101,00	Wilcoxon signed rank test	0,813	n.s.

Tabelle 22: Statistischer Vergleich der Messung PBS versus , PBS + Hirudin 2 µg/ml + Kollagen 40 µl im Verlauf

Vergleich PBS versus PBS + Hirudin 2µg/ml (Startreagenz jeweils Kollagen 40 µl)

Signifikanz	1. Es finden sich keine statistisch signifikanten Unterschiede. 2. --
Δ	• Die Messung mit Hirudin zeigt einen steileren Abfall der AUC von d2 auf d3. In der Darstellung der relativen Werte (Ergebnisanhang) zeigen sich größeren Spannen in der Standardabweichung als bei der Messung ohne Hirudin.
Fazit	• Aufgrund der weniger großen Streubreite in der Messung ohne Hirudin wird auf Hirudin als Zusatz verzichtet. • Kein Ersatz des Standardpuffer PBS.

Tabelle 23: Darstellung der Unterschiede der Messung PBS versus PBS + Hirudin 2µg/ml

3.2.10 TRIS 20 mmol/l + $CaCl_2$ xH_2O 25 mmol/l, bzw. 50 mmol/l + Hirudin 2 µg/ml

Die insgesamt überwiegend schlechten Ergebnisse der Messungen mit Verwendung von $CaCl_2$ xH_2O führten zu der Überlegung, den Einfluss von $CaCl_2$ xH_2O durch Austausch des Puffersystems zu untersuchen. Der Messansatz lautete: TRIS 20 mmol/l und zwei verschiedenen Calcium-Konzentrationen versus PBS. Da der Ansatz PBS + $CaCl_2$ xH_2O zur Ausfällung führt, wurde TRIS 20 mmol/l eingesetzt. Die Darstellung erfolgt in absoluten Werten (Abbildung 26). In den Tabellen 24 und 25 wird der statistische Vergleich gezeigt. Untersucht wurden 12 Proben. Die Tabelle 26 beschreibt die Unterschiede der Resultate und das weitere Vorgehen.

Absolute Werte

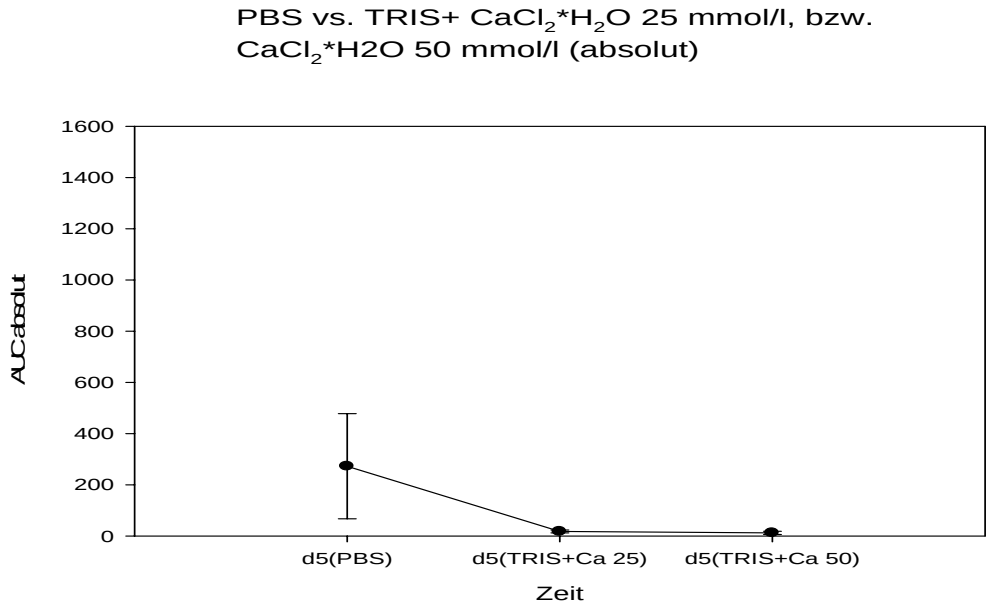


Abbildung 26: Darstellung der AUC, PBS, TRIS + Ca 25 mmol/l, TRIS + 50 mmol/l + Kollagen 40 µl, in absoluten Werten mit Mittelwert und +/- Standardabweichung, n=12

Während sich in der Messung im Multiplate® an d5 mit PBS noch eine gewisse Aggregationsfähigkeit der Plättchen zeigt, lassen sich die Thrombozyten im Ansatz mit TRIS und Calcium nicht mehr stimulieren.

Statistischer Vergleich

Vergleich PBS versus TRIS 20 mmol/l + $CaCl_2$*H_2O 25 mmol/l (Startreagenz jeweils Kollagen 40 µl)										
n	Zeit	PBS			TRIS 20 mmol/l + $CaCl_2$*H_2O 25 mmol/l			Test	p-Wert	Signifikanz
		Median	25%	75%	Median	25%	75%		p <	
12	d5	201,00	128,00	330,00	17,50	15,50	22,00	Wilcoxon signed rank test	0,001	s.

Tabelle 24: Statistischer Vergleich der Messung PBS versus TRIS 20 mmol/l + $CaCl_2$ xH_2O 25 mmol/l + Hirudin 2 µg/ml, n=12

Vergleich PBS versus TRIS 20 mmol/l + $CaCl_2$*H_2O 50 mmol/l (Startreagenz jeweils Kollagen 40 µl)										
n	Zeit	PBS			TRIS 20 mmol/l + $CaCl_2$*H_2O 50 mmol/l			Test	p-Wert	Signifikanz
		Median	25%	75%	Median	25%	75%		p <	
12	d5	201,00	128,00	330,00	13,00	9,00	15,50	Wilcoxon signed rank test	0,001	s.

Tabelle 25: Statistischer Vergleich der Messung PBS versus TRIS 20 mmol/l + $CaCl_2$ xH_2O 50 mmol/l + Hirudin 2 µg/ml, n=12

Vergleich PBS versus TRIS 20 mmol/l + $CaCl_2$ xH_2O 25 mmol/l, bzw. $CaCl_2$ xH_2O 50 mmol/l + Hirudin 2 µg/ml (Startreagenz jeweils Kollagen 40 µl)

Signifikanz	1. Es zeigt sich ein statistisch signifikanter Unterschied. 2. Der Unterschied findet sich am Tag der Messung (einmalige Testung an d5)
Δ	• Je größer der $CaCl_2$ xH_2O-Einfluß wird, desto schlechter lassen sich die Thrombozyten stimulieren.
Fazit	• $CaCl_2$ xH_2O erscheint als Zusatz zu einem Puffersystem nicht geeignet. • Der Ansatz ersetzt den Standardpuffer PBS nicht.

Tabelle 26: Darstellung der Unterschiede der PBS versus TRIS 20 mmol/l + $CaCl_2$ xH_2O 25 mmol/l, bzw. $CaCl_2$ xH_2O 50 mmol/l + Hirudin 2 µg/ml

3.2.11 Ergebnisse Multiplate Abnahme-Verfall

Nachdem PBS als Puffer die besten Ergebnisse zeigte, wurde dieser Ansatz für die Messung im Multiplate® übernommen. Im nächsten Schritt wird die Messung der AUC vom Tag der Abnahme und nach Verfall dargestellt, so wie es auch von anderen Parametern in der Qualitätskontrolle von Thrombozytenapheresekonzentraten gefordert wird.
Ausgewertet wurden über eineinhalb Jahre gesammelte Daten, die Stichprobengröße beträgt 268 Proben.

Absolute Werte

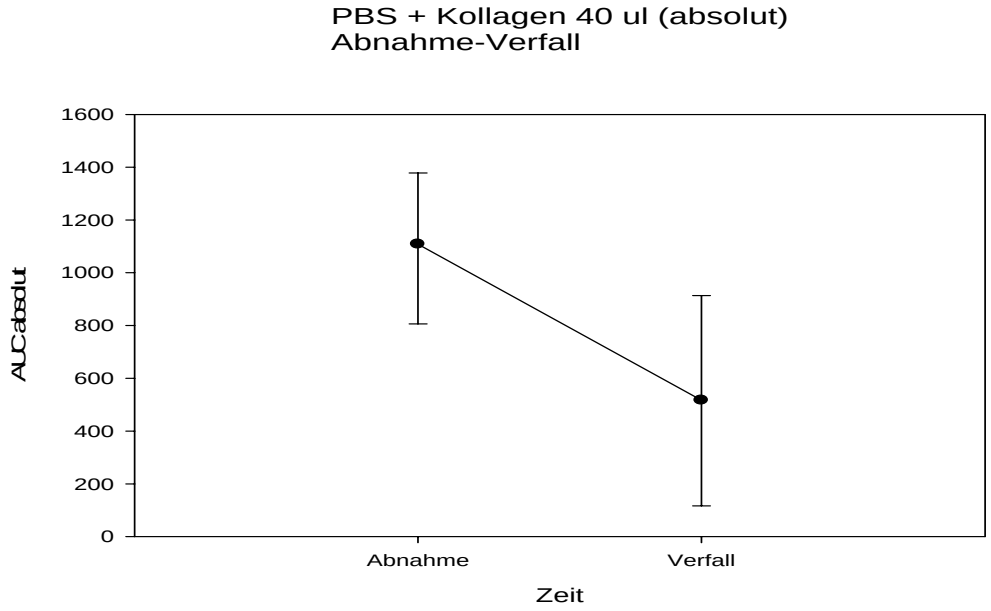


Abbildung 27: Darstellung der AUC, Abnahme-Verfall, PBS + Kollagen 40 µl, in absoluten Werten mit Mittelwert und +/- Standardabweichung, n=268

Es zeigt sich, dass die Aggregationsfähigkeit der Thrombozyten im Verlauf zwischen Abnahme und Verfall um ca. die Hälfte der Ausgangswerte abnimmt.

3.3 Versuchsreihe Konzentration Startreagenz

Die zweite Säule der Arbeit bestand in der Untersuchung des Startreagenz. Es wurde ausschließlich Kollagen eingesetzt. In der Vorarbeit von Frau Anne Romann [107] wurden bereits verschiedene Reagenzien getestet. Der TRAP-Test erfasst die Thrombozytenaktivierung über den Thrombinrezeptor, ist aber von Bestandteilen des Vollbluts abhängig und beschreibt die prinzipielle Stimulierbarkeit der Thrombozyten. Die Messung mit ADP erfasst nur den ADP-Rezeptor und die Untersuchung mit Arachidonsäure ist auf die Erfassung Cyclooxygenase beschränkt. Kollagen hingegen beschreibt die physiologische Stimulierbarkeit der Plättchen innerhalb des nicht physiologischen Systems Thrombozytenapheresekonzentrat und wurde in dieser Arbeit verwendet.
Gemessen wurde am Multiplate in der Versuchsreihe 40 µl (= 4 µg) vs. 60 µl (= 6 µg).
Dargestellt sind die Messungen in absoluten Zahlen (Abbildungen 28, 29). Tabelle 27 zeigt den statistischen Vergleich. Am Ende findet sich erneut eine Beschreibung der Unterschiede und eines Fazits über das weitere Vorgehen (Tabelle 28).
Untersucht wurden 41 Proben.

3.3.1 PBS + Kollagen 40 µl

Absolute Werte

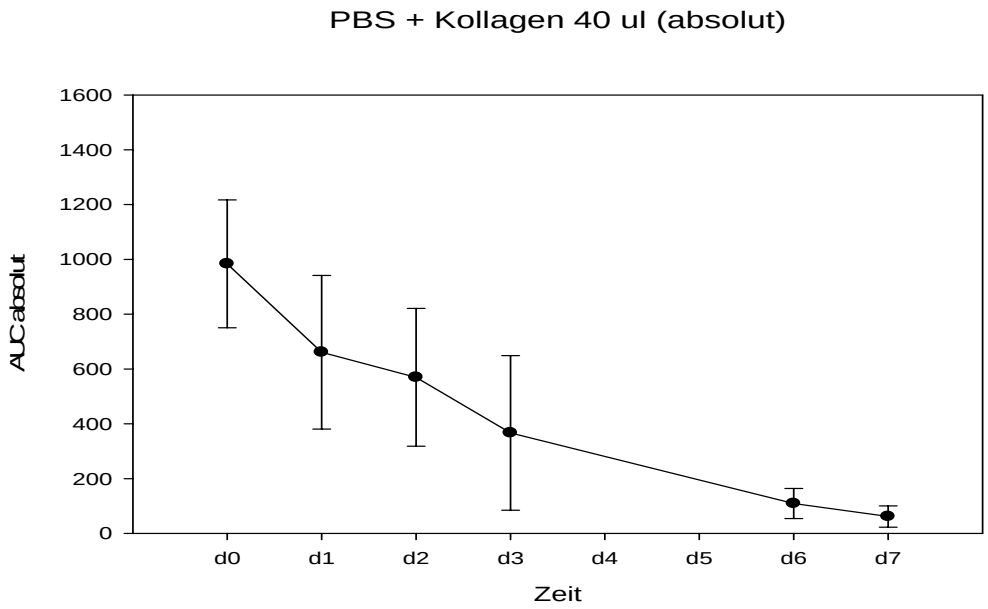


Abbildung 28: Darstellung der AUC, PBS + Kollagen 40 µl, in absoluten Werten mit Mittelwert und +/- Standardabweichung, n=41

Von einem anfänglich Mittelwert von ca. 1000 AUC sinken die Werte der Messung und somit die Fähigkeit der Thrombozyten Aggregate an den Elektroden zu bilden im Verlauf deutlich ab, um am Tag 7 (2 Tage nach Ende der Haltbarkeit) auf ein Minimum abzufallen.

3.3.2 PBS + Kollagen 60 µl

Absolute Werte

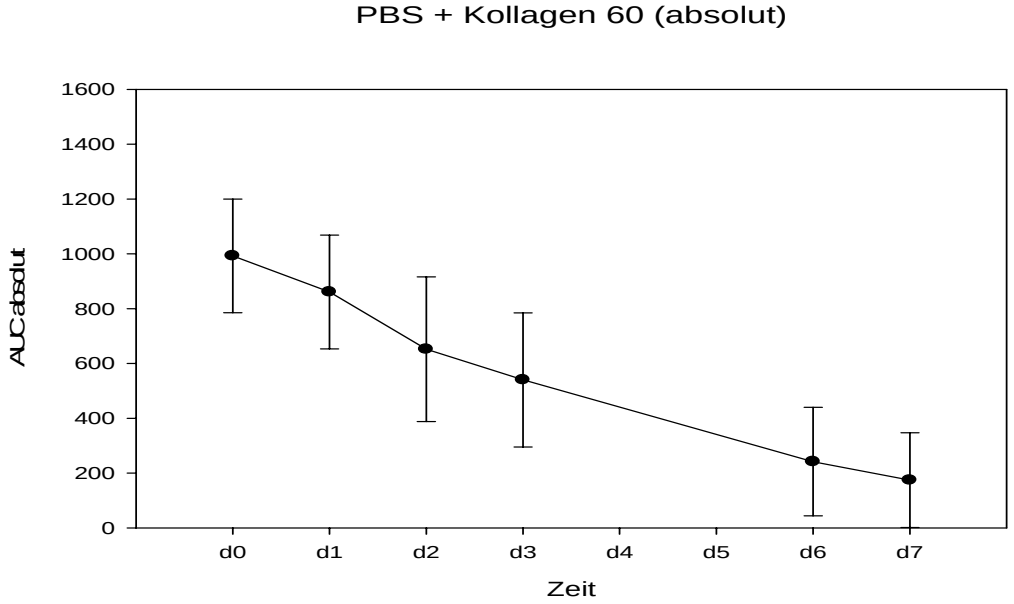


Abbildung 29: Darstellung der AUC in absoluten Werten, PBS + Kollagen 60 µl, mit Mittelwert und +/- Standardabweichung, n=41

Auch in dieser Messreihe liegen die anfänglichen Messwerte bei ca. 1000 AUC, die Thrombozyten lassen sich mit der höheren Kollagenkonzentration deutlich länger besser stimulieren.

Statistischer Vergleich

Vergleich Stimulation mit zwei Kollagenkonzentrationen									
n	Zeit	Kollagen 40 µl (= 4 µg)			Kollagen 60 µl (= 6 µg)			Test	p-Wert	Signifikanz
		Median	25%	75%	Median	25%	75%		p <	
37	d0	1069,00	856,50	1139,75	1015,00	888,25	1121,75	Wilcoxon signed rank test	0,433	n.s.
25	d1	668,00	391,25	908,75	853,00	797,50	984,50	Wilcoxon signed rank test	0,001	s.
41	d2	631,00	410,50	805,25	708,00	483,00	828,75	Wilcoxon signed rank test	0,003	s.
25	d3	209,00	117,00	668,75	512,00	350,75	728,75	Wilcoxon signed rank test	0,001	s.
41	d6	107,00	61,50	154,75	149,00	87,75	360,50	Wilcoxon signed rank test	0,001	s.
25	d7	51,00	31,75	93,25	98,00	63,75	190,00	Wilcoxon signed rank test	0,001	s.

Tabelle 27: Statistischer Vergleich der Messung mit zwei verschiedenen Kollagenkonzentrationen (40 µl= 4 µg versus 60 µl = 6 µg)

Versuchsreihe Konzentration Startreagenz

Signifikanz	1. Es zeigt sich ein statistisch signifikanter Unterschied. 2. Die Unterschiede finden sich an den Tagen d1-d7.
Δ	• Die Thrombozyten zeigen eine vergleichbare Stimulierbarkeit an d0, bereits ab d1 lassen sich die Thrombozyten mit Kollagen 60 µl besser stimulieren. • Kollagen 60 µl zeigt im Kurvenverlauf einen geringeren Abfall und eine noch vorhandene Stimulierbarkeit nach Verfall, wohingegen sich Stimulierbarkeit der Thrombozyten mit Kollagen 40 µl nach Verfall nahe Null zeigt.
Fazit	• Aufgrund der statistischen Signifikanz und des Kurvenverlaufs kann Kollagen 60 µl alternativ zu Kollagen 40 µl eingesetzt werden, wenn eine geringere Sensitivität gegenüber den Lagereinflüssen und dem Lagerschaden über den Verlauf von 7 Tagen gewünscht wird. • Kollagen 40 µl ist dagegen für die sensitive Erfassung des Lagerschadens und anderer negativer Einflüsse besser geeignet.

Tabelle 28: Darstellung der Unterschiede der Messung mit zwei verschiedenen Kollagenkonzentrationen (40 µl= 4 µg versus 60 µl = 6 µg)

3.4 Vergleich ‘Multiplate®‘ mit der Standardmethode ‘Born-Aggregation‘

Der dritte Teil der Arbeit bestand in einem Vergleich der Multiplate®-Technik mit der bislang als Goldstandard geltenden Methode in der Messung der Thrombozytenaggregation. Diese stellt die Messung nach Born dar.

Untersucht wurden 20 Proben. Die Ansatz nach Born wurde mit zwei verschieden Konzentrationen des Kollagens durchgeführt [0,8 µg/ml (Abbildung 30), bzw. 1,0 µg/ml (Abbildung 31)]. Die Multiplate®-Messung hierzu im Vergleich lief mit Kollagen 40 µl. Dargestellt sind die Ergebnisse erneut in absolut Zahlen (Abbildung 32). Die Tabellen 29-34 stellen die Unterschiede der beiden Methoden dar.

3.4.1 Ergebnisse der Messung nach Born

Kollagen 0,8 µg/ml

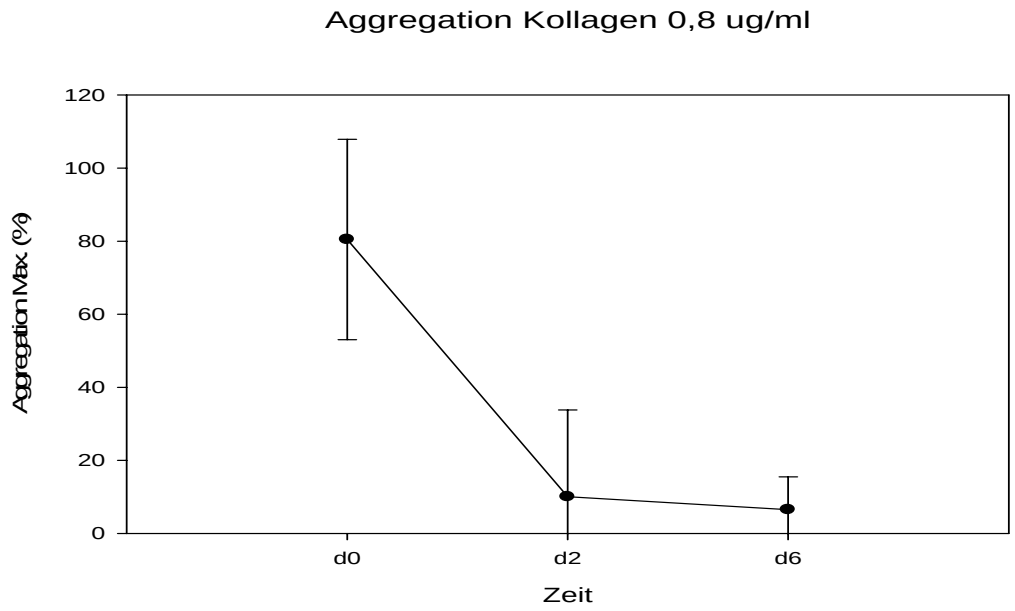


Abbildung 30: Darstellung der Aggregation nach Born, Kollagen 0,8 µg/ml, mit Mittelwert und +/- Standardabweichung, n=20

Kollagen 1,0 µg/ml

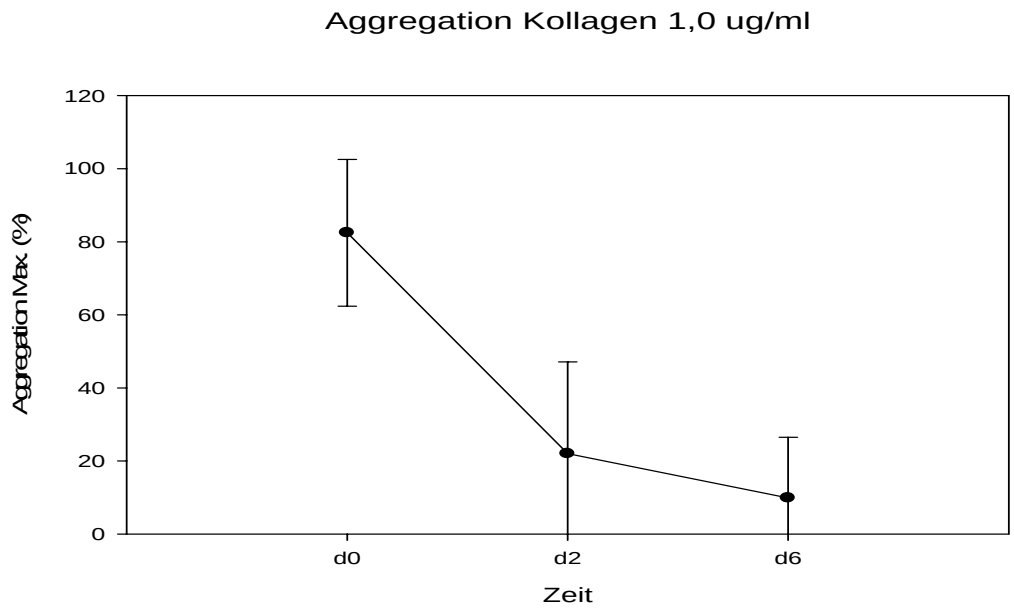


Abbildung 31: Darstellung der Aggregation nach Born, Kollagen 1,0 µg/ml, mit Mittelwert und +/- Standardabweichung, n=20

3.4.2 Ergebnisse der Multiplate®-Messung mit Kollagen 40 µl

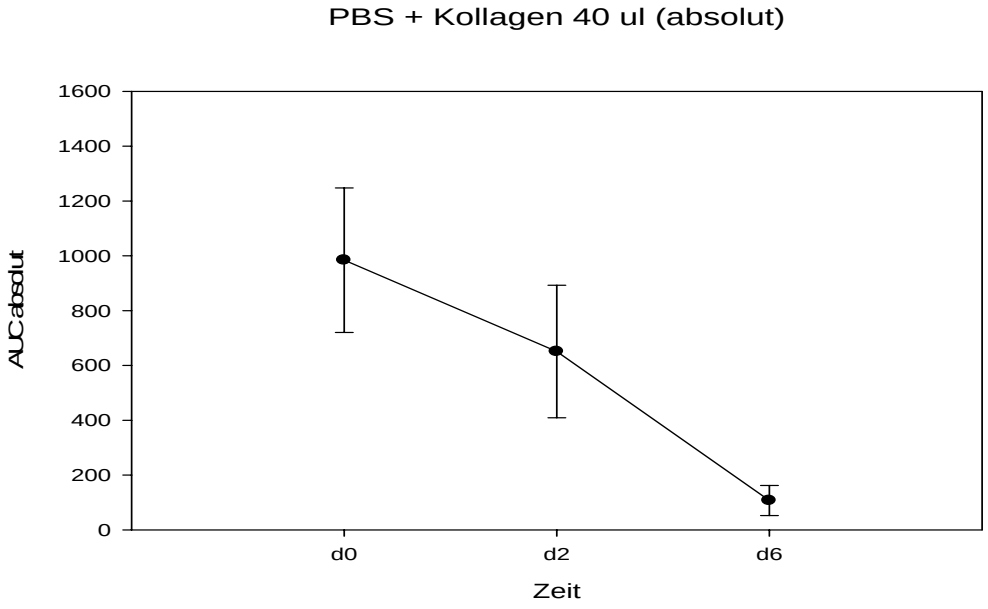


Abbildung 32: Darstellung der AUC in absoluten Werten, PBS + Kollagen 60 µl, mit Mittelwert und +/- Standardabweichung, n=20

Die Messungen zeigen im Kurvenverlauf eine gleichsinnige Abnahme der Thrombozytenfunktion. Daraus wird eine prinzipielle Vergleichbarkeit der Methoden angenommen.
Eine statistische Analyse mit Erhebung des p-Wertes und somit einer statistischen Signifikanz war nicht möglich, da die Messergebnisse beider Methoden unterschiedliche Einheiten aufweisen. Um die Vergleichbarkeit zu zeigen, werden die Ergebnisse nicht nur in absoluten Zahlen, sondern auch in relativen Zahlen im Folgenden dargestellt.

3.4.3 Darstellung der Unterschiede Born-Multiplate®

Born:

Kollagen 0,8 µg/ml	**d0**	**d2**	**d6**
Mittelwert	80,45	10,03	6,53
Standardabweichung	27,41	23,78	8,97
Median	88,97	3,27	4,00
Range min	1,40	0,83	1,95
max	98,53	106,77	40,55

Tabelle 29: Darstellung der statistischen Parameter der Born-Messung mit Kollagen 0,8 µg/ml in absoluten Zahlen, n=20

Kollagen 0,8 µg/ml	**d0**	**d2**	**d6**
Mittelwert	100 %	12,47 %	8,12 %
Standardabweichung	100 %	86,76 %	32,73 %
Median	100 %	3,68 %	4,50 %
Range min	100 %	59,29 %	139,29 %
max	100 %	108,36 %	41,15 %

Tabelle 30: Darstellung der statistischen Parameter der Born-Messung mit Kollagen 0,8 µg/ml in relativen Zahlen, n=20

Kollagen 1,0 µg/ml	d0	d2	d6
Mittelwert	82,45	22,01	9,87
Standardabweichung	20,11	25,08	16,64
Median	87,69	16,82	3,85
Range min	4,64	0,81	1,55
max	100,43	99,89	48,15

Tabelle 31: Darstellung der statistischen Parameter der Born-Messung mit Kollagen 1,0 µg/ml in absoluten Zahlen, n=20

Kollagen 1,0 µg/ml	d0	d2	d6
Mittelwert	100 %	26,69 %	11,97 %
Standardabweichung	100 %	124,71 %	82,74 %
Median	100 %	19,18 %	4,39 %
Range min	100 %	17,46 %	33,41 %
max	100 %	99,46 %	47,94 %

Tabelle 32: Darstellung der statistischen Parameter der Born-Messung mit Kollagen 1,0 µg/ml in relativen Zahlen, n=20

Multiplate®:

Kollagen 40 µl	d0	d2	d6
Mittelwert	984,15	651,05	107,25
Standardabweichung	263,86	242	54,75
Median	1014,5	727	107,5
Range min	711	130	24
max	1352	898	184

Tabelle 33: Darstellung der statistischen Parameter der Multiplate®-Messung mit Kollagen 40 µl in absoluten Zahlen, n=20

Kollagen 40 µl	**d0**	**d2**	**d6**
Mittelwert	100 %	66,15 %	10,90 %
Standardabweichung	100 %	91,72 %	20,75 %
Median	100 %	71,66 %	10,60 %
Range min	100 %	18,28 %	3,38 %
max	100 %	66,42 %	13,61 %

Tabelle 34: Darstellung der statistischen Parameter der Multiplate®-Messung mit Kollagen 40 µl in relativen Zahlen, n=20

Es zeigt sich im Rahmen der Haltbarkeit eines Thrombozytenkonzentrates ein bessere Stimulierbarkeit mit dem Multiplate®-Analyzer und ein geringere Abweichung der Messwerte der Proben.

3.5 Ergebnisse der Säure-Basen- Messung

Die Thrombozyten wurden jeden Messtag einer Säure-Basen-Untersuchung unterzogen. Diese Werte sollten in einem nächsten Schritt mit der Messung am Multiplate® verglichen werden. Es interessierte uns, ob sich die Veränderungen im Säure-Basen-Haushalt, die sich bei der Lagerung eines Thrombozytenkonzentrates ergeben, in der Messung im Multiplate®-Gerät widerspiegeln.

Dargestellt sind die Messungen im Verlauf (Abbildungen 33-37), hierfür wurden 81 Proben untersucht. Ebenfalls dargestellt sind die Messungen vom Tag der Abnahme und nach Verfall (Abbildungen 38-42), so wie es auch in der Qualitätskontrolle vorgeschrieben ist. Hierfür wurden die Daten von 268 Proben ausgewertet, die im Zeitraum von eineinhalb Jahren der ATMH im Klinikum Großhadern gesammelt wurden.

3.5.1 Messung im Verlauf

pH-Messung

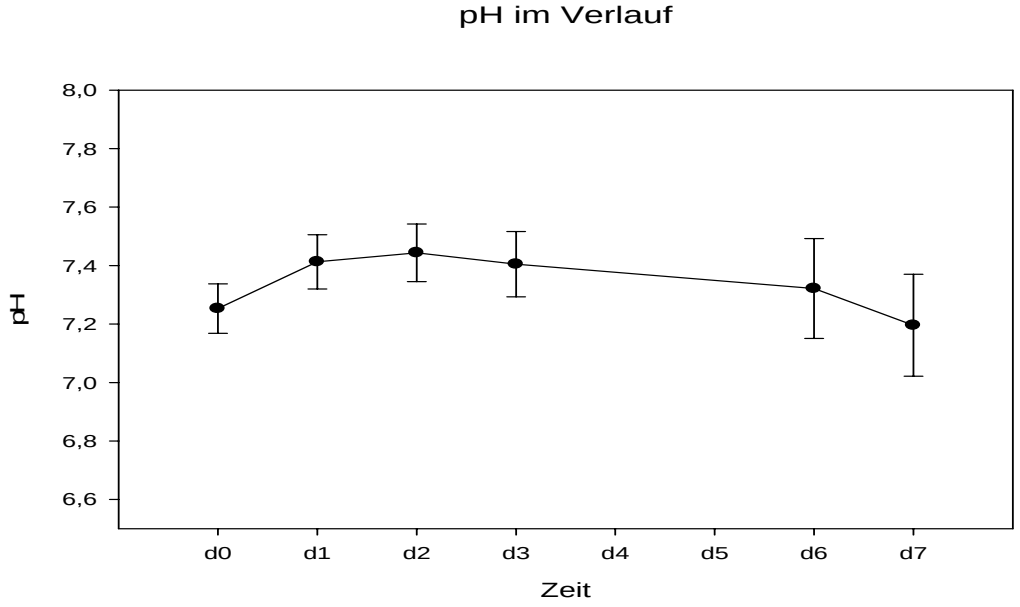


Abbildung 33: Darstellung des pH-Werts im Verlauf in absoluten Werten, mit Mittelwert und +/- Standardabweichung, n=81

Der pH-Wert, anfangs bei knapp über 7,2 steigt im Verlauf etwas an, um gegen Ende der Haltbarkeit wieder auf die Ausgangswerte zurück zu fallen.

pCO_2-Messung

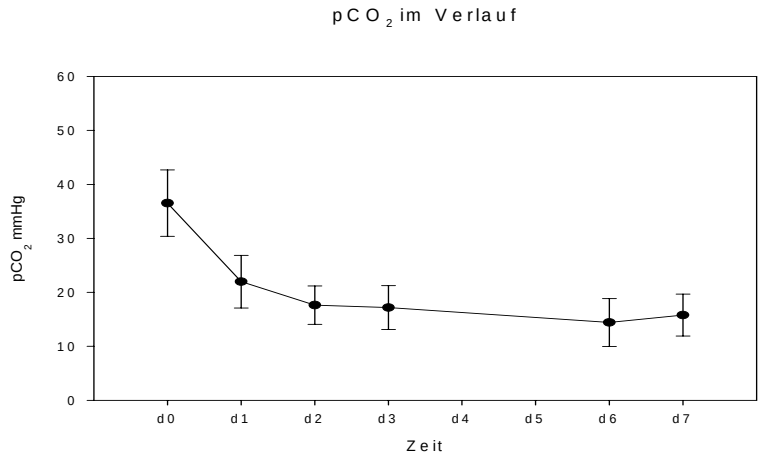


Abbildung 34: Darstellung des pCO_2-Werts im Verlauf in absoluten Werten, mit Mittelwert und +/- Standardabweichung, n=81

Der pCO_2-Wert anfangs knapp unter 40 mmHg sinkt bis d2 auf Werte unter 20 mmHg ab, um dann relativ konstante Werte beizubehalten.

pO_2- Messung

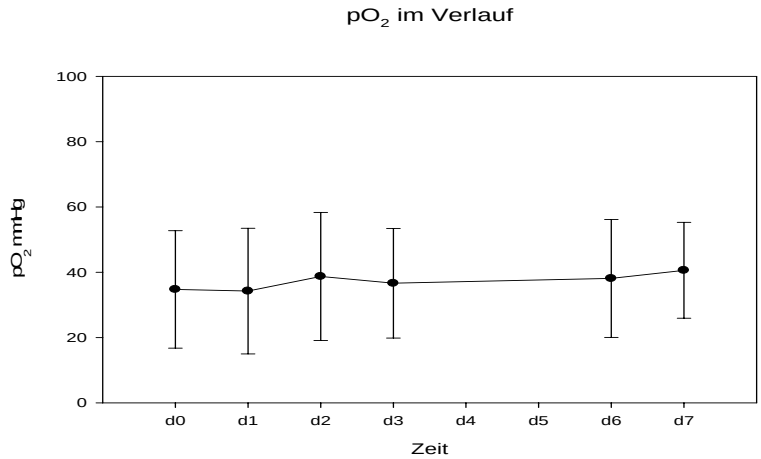


Abbildung 35: Darstellung des pO_2-Werts im Verlauf in absoluten Werten, mit Mittelwert und +/- Standardabweichung, n=81

Der pO2-Wert liegt anfangs bei knapp unter 40 mmHg und zeigt im Verlauf der Lagerung relativ gleichbleibende Werte.

$cHCO_3$- Messung

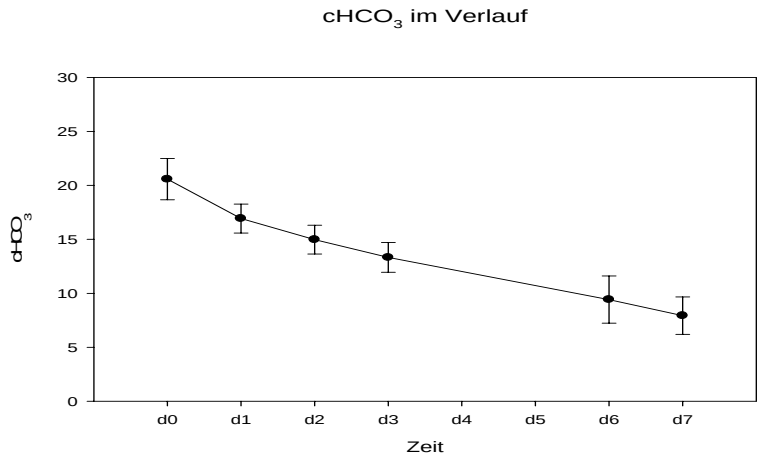


Abbildung 36: Darstellung des $cHCO_3$-Werts im Verlauf in absoluten Werten, mit Mittelwert und +/- Standardabweichung, n=81

Die Messung zeigt eine kontinuierlich Abnahme des $cHCO_3$-Wertes im Thrombozytenbeutel während der Lagerung. Die Werte fallen von ca. 20 mmol/l am Tag der Abnahme bis auf Werte unter 10 mmol/l nach Ende der Haltbarkeit.

Base Excess- Messung

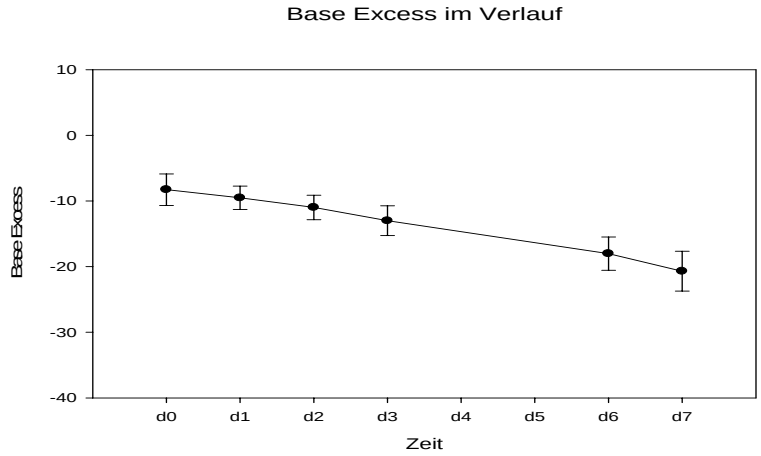


Abbildung 37: Darstellung des Base-Excess-Werts im Verlauf in absoluten Werten, mit Mittelwert und +/- Standardabweichung, n=81

Die Base-Excess, anfangs bei Werten knapp über – 10, fällt im Verlauf der Messung auf Werte unter -20. Dies bedeutet einen Basenverlust im Beutel während der Lagerung des Thrombozytenkonzentrats.

3.5.2 Messung Abnahme-Verfall

pH- Messung

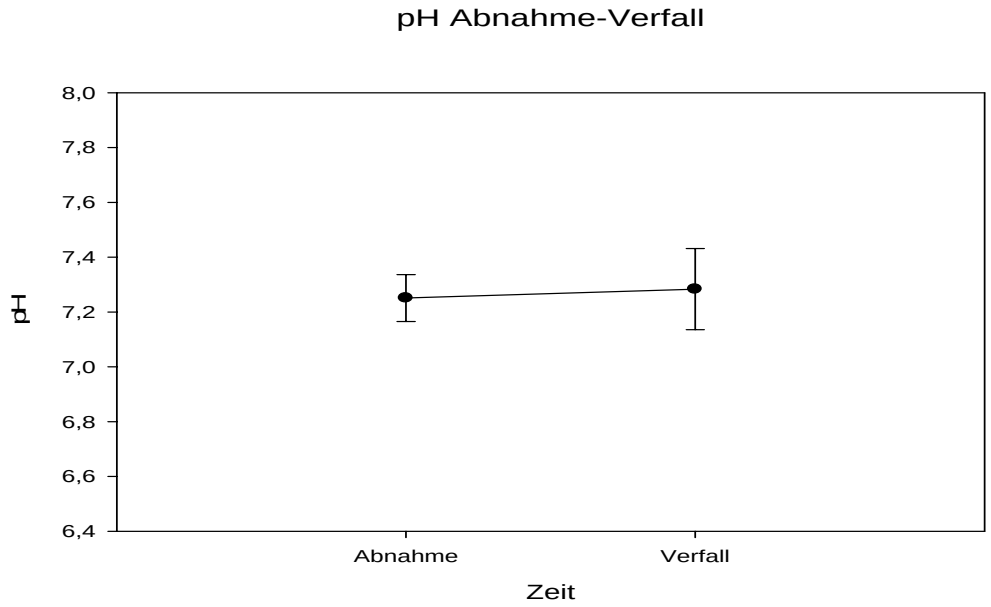


Abbildung 38: Darstellung des pH-Werts Abnahme-Verfall in absoluten Werten, mit Mittelwert und +/- Standardabweichung, n=268

Der pH-Wert zeigt relativ konstante Werte zwischen 7,2 und 7,3 im Verlauf der Lagerung eines Thrombozytenkonzentrats.

pCO_2- Messung

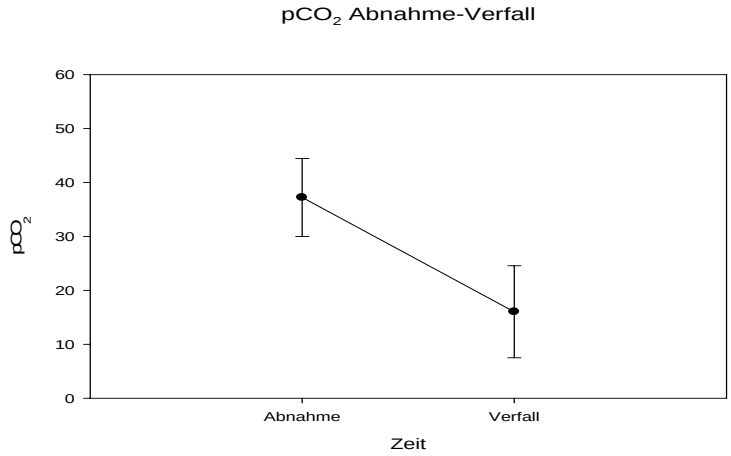


Abbildung 39: Darstellung des pCO_2-Werts Abnahme-Verfall in absoluten Werten, mit Mittelwert und +/- Standardabweichung, n=268

In der Messung des pCO_2-Werts kann eine starke Abnahme des pCO_2-Werts vom Tag (knapp unter 40 mmHg) der Abnahme bis zum Verfall des Plättchenkonzentrats (knapp unter 20 mmHg) gesehen werden.

pO_2- Messung

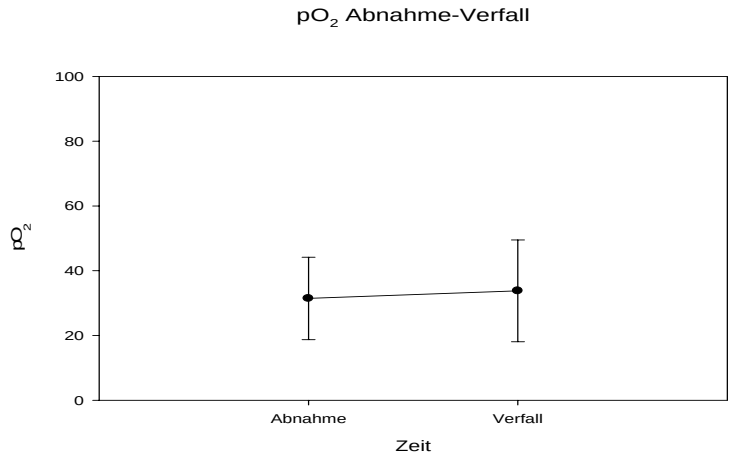


Abbildung 40: Darstellung des pO_2-Werts Abnahme-Verfall in absoluten Werten, mit Mittelwert und +/- Standardabweichung, n=268

Der pO_2 im Beutel zeigt ähnlich Werte am Tag der Abnahme und des Verfalls des Konzentrats (ca. 30 mmHg).

$cHCO_3$- Messung

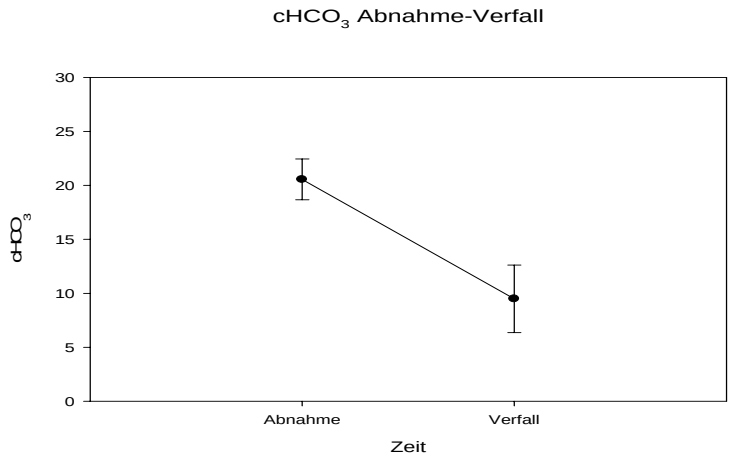


Abbildung 41: Darstellung des $cHCO_3$-Werts Abnahme-Verfall in absoluten Werten, mit Mittelwert und +/- Standardabweichung, n=268

Der cHCO3-Wert fällt von ca. 20 mmol/l am Tag der Abnahme auf Werte von ca. 10 mmol/l ab.

Base Excess- Messung

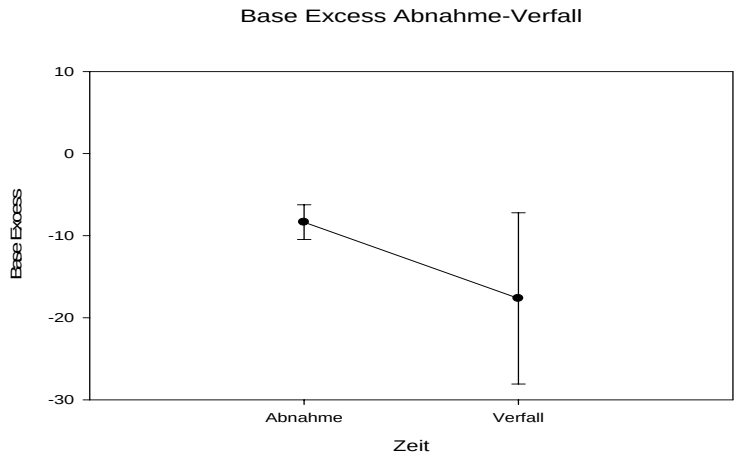


Abbildung 42: Darstellung des Base-Excess-Werts Abnahme-Verfall in absoluten Werten, mit Mittelwert und +/- Standardabweichung, n=268

Der Base-Excess-Wert fällt nach Ende der Haltbarkeit auf stärker negative Werte ab, zeigt also einen erhöhten Basenverlust an.

3.6 Gegenüberstellung Säure-Basen-Status-Multiplate®

Im letzten Schritt sollte überprüft werden, ob sich die Veränderungen im Säure-Basen-Status eines Thrombozytenkonzentrates, die sich bis zum Verfall ereignen, in der Messung mit dem Multiplate® widerspiegeln und sich somit Rückschlüsse auf den Plättchenlagerungsschaden ziehen lassen. Da die Veränderungen der pCO_2- und pO_2-Werte ein Ausdruck des Beutelmaterials sind, werden nur die Vergleiche AUC vs. pH, $cHCO_3$ und Base Excess gegenübergestellt

An dieser Stelle soll nur das Ergebnis in Abbildung 43 exemplarisch dargestellt werden. Es findet sich in der Untersuchung keine gegenseitige Abhängigkeit der Ergebnisse der Multiplate®-Messung und der Resultate der Säure-Basen-Messung. Aus diesem Grund wird an dieser Stelle auf die weitere Darstellung verzichtet, die zugehörigen Abbildungen der weiteren Messungen finden sich im Ergebnisanhang unter Punkt 6.

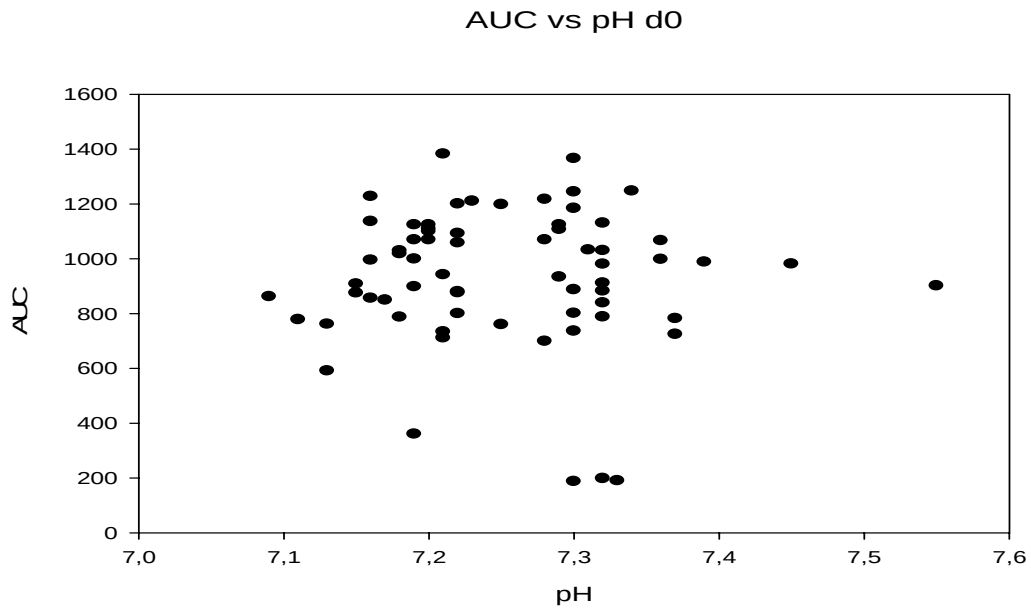


Abbildung 43: Gegenüberstellung der AUC und des pH-Werts, d0, im Simple Scatter Plot, n=81

In dieser Abbildung lässt sich erkennen, dass es keine Korrelation zwischen der Messung des pH-Werts und der Aggregationsfähigkeit der Plättchen (ausgedrückt durch die AUC) gibt.

Versuchsreihe Säure-Basen-Status versus Multiplate®

Es lässt sich keine ausreichende Korrelation zwischen den Ergebnissen der Messung mit dem Multiplate®-Analyzer und der Säure-Basen-Messung feststellen. Der gesamte Säure-Basen-Status innerhalb der zulässigen Intervalle scheint keinen direkten Einfluss auf den Lagerschaden, in Form der abnehmenden Stimulierbarkeit im Multiplate® zu nehmen. Das bedeutet, dass sich der Plättchenlagerungsschaden nicht in gleicher Weise mit dem Multiplate®-Analyzer abbilden lässt, da dieser nicht allein durch Veränderungen im Säure-Basen-Haushalt entsteht.
Deswegen wird hier auf eine weitere Darstellung verzichtet (Auflistung aller Graphiken im Ergebnisanhang unter Punkt 6).

3.7 Bildung der Referenzwerte

Für die Erstellung der Referenzwerte wurden die Ergebnisse von 221 Proben über einen Zeitraum von eineinhalb Jahren herangezogen. Relevant für die Qualitätskontrolle am Ende der Haltbarkeit sind nur die unteren Grenzwerte, d.h. das 2,5 % Intervall.

Referenz/Grenzwerte

d0:

2,5% Intervall: 0,025 x (N+1) → 0,025 x (221+1) = 5,55 ≈ 6. **Unterer Grenzwert bei 518.**

d6:

2,5% Intervall: 0,025 x (N+1) → 0,025 x (221+1) = 5,55 ≈ 6. **Unterer Grenzwert bei 27.**

Konfidenzintervalle

Es ergeben sich folgende 90%-Konfidenzintervalle für das 2,5% Intervall (s. Tabelle 5 unter Punkt 2.2.3)

d0:

2,5%: untere Rangnummer: 2 → 216 AUC
obere Rangnummer: 11 → 660 AUC

d6:

2,5%: untere Rangnummer: 2 → 17 AUC
obere Rangnummer: 11 → 55 AUC

Der **untere Referenzwert (2,5% Intervall)** mit seinem **90%- Konfidenzintervall** kann wie folgt ausgedrückt werden:

d0: AUC 518 (216-660)

d6: AUC 27 (17-55)

3.8 Zusammenfassung der relevanten Ergebnisse

Es ergaben sich folgende relevante Ergebnisse:

3.8.1 Versuchsreihe Puffer

In dieser Versuchsreihe sollte zur bereits bestehenden Vorarbeit [107] überprüft werden, ob sich ein besser geeignetes Inkubationsmedium für die Thrombozyten zur Messung im Multiplate® findet.
Der Standardpuffer PBS 7,2 zeigte gegenüber allen anderen getesteten Puffern zumindest gleichwertige oder überlegene Ergebnisse und wird daher in der Messung der Thrombozytenkonzentrate im Weiteren standardmäßig mit dem Multiplate® eingesetzt.

3.8.2 Versuchsreihe Konzentration Startreagenz

Die Zielsetzung dieser Versuchsreihe bestand darin, die geeignete Konzentration des Startreagenz Kollagen (Kollagen 40 µl vs. Kollagen 60 µl) herauszufinden. Andere mögliche Agonisten waren bereits in der Vorarbeit als nicht ideal ausgeschieden.
Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied an d1-d7. Somit kann Kollagen 60 µl alternativ zu Kollagen 40 µl eingesetzt werden, wenn eine geringere Sensitivität gegenüber den Lagereinflüssen und dem Lagerschaden über den Verlauf von 7 Tagen gewünscht wird. Kollagen 40 µl erscheint dagegen für die sensitive Erfassung des Lagerschadens und anderer negativer Einflüsse besser geeignet.

3.8.3 Versuchsreihe Multiplate® versus Born

In dieser Versuchsreihe sollte ein Vergleich der Multiplate®-Methode mit der bisherigen Goldstandardmethode der Thrombozytenfunktionsmessung durchgeführt werden.
An den Ergebnissen der Messungen bzw. des Kurvenverlaufs lässt sich eine gleichsinnige Abnahme der Thrombozytenfunktion ablesen. Somit scheinen die Methoden miteinander vergleichbar zu sein. Die Proben lassen sich mit dem Multiplate®-Analyzer besser stimulieren und haben eine geringere Streubreite (Range). Wir gehen davon aus, dass die Born-

Methode nur der Goldstandard für Messungen der Thrombozytenfunktion ex vivo ist, nicht aber für die Messung im Thrombozytenkonzentrat.

3.8.4 Versuchsreihe Säure-Basen-Status versus Multiplate®

Mit Hilfe dieser Versuchsreihe sollte herausgefunden werden, ob es einen Zusammenhang zwischen den Veränderungen im Säure-Basen-Haushalt, die sich während der Lagerung eines Thrombozytenkonzentrates im Beutel ergeben, mit der Messung im Multiplate® nachvollziehen lassen.
Es zeigte sich kein Zusammenhang. Die messbaren Veränderungen im Säure-Basen-Status eines Thrombozytenkonzentrates lassen sich nicht in der Messung mit dem Multiplate® widerspiegeln. Der gesamte Säure-Basen-Status innerhalb der zulässigen Intervalle scheint, dargestellt durch die abnehmende Stimulierbarkeit im Multiplate, nicht in gleicher Weise den Lagerschaden abzubilden.

3.8.5 Bildung der Referenzwerte

Als Referenzwerte mit ihren zugehörigen Konfidenzintervallen ergaben sich folgende Bereiche:

d0: AUC 518 (216-660)

d6: AUC 27 (17-55)

4. Diskussion

Die Qualitätskontrolle von Thrombozytenapheresekonzentraten beinhaltet laut der Richtlinien der Bundesärztekammer gegenwärtig folgende Parameter:

- Volumen
- Thrombozytengehalt
- Restleukozyten
- Resterythrozyten
- pH-Wert
- visuelle Kontrolle
- Sterilität [12].

Derzeit gibt es keinen vorgeschriebenen Parameter, der die Funktion, bzw. die Aggregationsfähigkeit der Plättchen darstellt.

Der Multiplate®-Analyzer der Firma Dynabyte (ausführlich beschrieben unter 1.7.4) wird derzeit zum Monitoring einer ASS-oder Clopidogreltherapie eingesetzt [14; 15; 104]. Des Weiteren ist der perioperative Einsatz, z.B. in der Herzchirurgie, beschrieben [35; 67; 84]. In beiden Bereichen wird für die Untersuchung mit dem Multiplate®-Analyzer Vollblut eingesetzt.

Ziel dieser Arbeit war es, Thrombozyten aus Apheresekonzentraten mit dem Multiplate®-Analyzer in ihrer Funktion, bzw. Aggregationsfähigkeit, zu testen, um diese Methode in der Qualitätskontrolle von Thrombozytenkonzentraten zu etablieren.

Bei der Verwendung von Thrombozytenkonzentraten ergeben sich naturgemäß Unterschiede zur Messung mit Vollblut. In erster Linie stehen gänzlich andere Bedingungen der Präanalytik im Vordergrund. Im Thrombozytenkonzentrat herrschen nicht physiologische Verhältnisse, da die verschiedenen Komponenten des Vollblutes fehlen. Die Folgen sind:

- andere Ansatzbedingungen
- andere optimierte Präanalytik
- andere Werte / Normalwerte
- fehlende Vergleichbarkeit der Werte mit Vollblutwerten
- Abfall der Messwerte als Ausdruck des reversiblen und irreversiblen Lagerschadens, welcher definitionsgemäß die strukturellen und biochemischen Veränderungen während der Lagerung beschreibt .

Die einzelnen Versuchsreihen sollen im Folgenden einer Bewertung unterzogen werden.

4.1 Versuchsreihe Puffer

In einer Vorarbeit zu dieser Arbeit wurden bereits Thrombozytenkonzentrate aus der Qualitätskontrolle mit dem Multiplate®-Analyzer getestet [107]. Eingesetzt wurde als Inkubationsmedium PBS-Pufferlösung (phosphate buffered saline) mit einem pH von 7,4 welche ein Arbeiten bei konstantem pH-Wert ermöglicht. Wir interessierten uns dafür, ob es für Thrombozyten aus Thrombozytenapheresekonzentraten ein geeigneteres Inkubationsmedium als die PBS-Pufferlösung gibt. Grundsätzlich ist festzuhalten, dass sich im Arzneimittel Thrombozytenkonzentrat bereits Citrat als Antikoagulanz in Form von ACD-A (Adenin-Citrat- Dextrose- Formula A) befindet und zusätzlich das spendereigene Plasma als Standardlagermedium benutzt wird. Es kommt daher bei der Bewertung der Ergebnisse der Impedanzaggregometrie auf den Summeneffekt zwischen gelagerten Thrombozyten, dem Antikoagulanz ACD-A und den sich im Plasma befindlichen Faktoren (z.B. Fibrinogen, vWF, sonstige interferierende Stoffwechselprodukte) einerseits und dem zugegebenen Inkubationsmedium und dem Startreagenz Kollagen andererseits bei der Messung an.
Aufgrund des hohen apparativen und zeitlichen Aufwands für parallele Messungen und der hohen Kosten wurde in den Ansätzen zum Vergleich der neun verschiedenen (8 + PBS) Puffermedien jeweils nur eine relativ geringe Anzahl an Proben getestet. Dabei wurden nicht nur ein statisch signifikanter Unterschied, sondern auch die Form und die Entwicklung des Reaktionsgraphen, der möglichst typisch im Vergleich zu den Stimulationen im Vollblut verlaufen sollte, zur Beurteilung herangezogen. Daraus ergab sich dann die Entscheidung über die grundsätzliche Eignung des Puffers und ob dieser dem als anfänglich verwendeten Standardpuffer PBS vorgezogen werden sollte.
Im ersten Schritt verglichen wir die Aggregationsfähigkeit von nativem Thrombozyten im PBS-Medium mit der Aggregationsfähigkeit von Plättchen aus Röhrchen mit gepuffertem Citrat, ebenfalls inkubiert in der PBS-Pufferlösung. Hierbei interessierte der Einfluss von Citrat auf die Gerinnung. Es zeigte sich in der statistischen Auswertung ein signifikanter Unterschied an den Tagen d0-d6. Das Ergebnis war eine deutlich geringere Stimulierbarkeit der Plättchen mit einer daraus folgenden geringeren Aggregation der Thrombozyten in der Probe aus dem Citratröhrchen. Getestet wurden acht Proben. Die geringe Stichprobenanzahl könnte durchaus einen systematischen Fehler darstellen, jedoch sind alle Proben aus der Nativ-Probe mit PBS gut zu stimulieren gewesen. Ein Überführen des Thrombozytenkonzentrates in Citratröhrchen stellt zudem eine Fehlerquelle dar, au-

ßerdem ergeben sich zusätzliche Kosten durch den Einsatz der Citratröhrchen. Wir entschieden uns somit gegen den Gebrauch der Citratröhrchen.

Für die nächsten vier Messreihen wurde jeweils TRIS 20 mmol/l eingesetzt. Einen festen Bestandteil stellte Hirudin 2 µg/ml dar. Als allgemeiner Kritikpunkt ist die geringe Stichprobenanzahl anzumerken. In der ersten dieser vier Messreihen wurde $CaCl_2$ xH_2O 0,4 g/l zugesetzt. Die Ergebnisse der Messung mit TRIS 20 mmol/l + $CaCl_2$ xH_2O 0,4 g/l + Hirudin 2 µg/ml zeigten in der statistischen Auswertung keinen signifikanten Unterschied zu den Ergebnissen der Messung mit PBS. Als weiterer Schwachpunkt gilt die fehlende Messung an d0, was eine Darstellung der relativen Werte verhindert. Auch der nächste Versuch mit TRIS 20 mmol/l + $CaCl_2$ xH_2O 0,4 g/l + $MgCl_2$ 0,2 g/l zeigte keinen statistisch signifikanten Unterschied zu der Messung mit PBS. Im Kurvenverlauf jedoch zeigte sich, dass sich die Thrombozyten unter diesen Bedingungen im Vergleich zu PBS kaum stimulieren lassen. Im nächsten Schritt versuchten wir mit TRIS 20 mmol/l + $CaCl_2$ xH_2O 0,6 g/l, d.h. mit einer weiteren Erhöhung der Calciumkonzentration im Ansatz, eine bessere Stimulierbarkeit der Plättchen zu erzielen. Auch hier fand sich kein statistisch signifikanter Unterschied zur Messung mit PBS. In der nächsten Versuchsreihe erhöhten wir ein letztes Mal die Calcium-Konzentration, der Messansatz lautete nun TRIS 20 mmol/l + $CaCl_2$ xH_2O 2,0 g/l + Hirudin 2 µg/ml. Auch hier war der Gedanke, durch eine ausreichend hohe Calciumkonzentration die Funktion zu steigern. Die Messung zeigte an den Tagen d1-d3 einen statistisch signifikanten Unterschied, an den Tagen d6-d7 fand sich kein Unterschied. Damit ist davon auszugehen, dass unter den im Multiplate® herrschenden Messbedingungen eine alleinige Erhöhung der Calcium-Konzentration keine signifikante Verbesserung der Stimulierbarkeit der Thrombozyten erbringt.

Unter der Berücksichtigung dieser Ergebnisse könnte vermutet werden, dass die Calciumzugabe evtl. einen negativen Einfluss auf die Messung der Thrombozytenfunktion unter unseren Bedingungen hat. Wir testeten daher 12 Proben exemplarisch an d5 der Lagerung mit TRIS 20 mmol/l und der Zugabe von $CaCl_2$ xH_2O 25 mmol/l und 50 mmol. Es ergab sich ein statistisch signifikanter Unterschied in der Messung mit Calcium und der Messung mit reinem PBS, dieser Unterschied fiel überrachenderweise zugunsten des reinen PBS aus. Die Kurven mit Calcium zeigten einen flacheren Verlauf, d.h. eine verminderte Aggregationsfähigkeit der Thrombozyten unter dem Einfluss von Calcium.

Wir gehen nach den Ergebnissen davon aus, dass sich unter den gegebenen Messbedingungen keine Verbesserungen der Darstellung der Thrombozytenfunktion gelagerter Thrombozytenkonzentrate durch Erhöhung der Calciumkonzentration im Ansatz erzielen lassen. Somit wird auf eine Zugabe von Calcium in den Messansatz verzichtet, da über die

bereits vorhandenen Calciumkonzentrationen hinaus keine zusätzlich stimulativen Effekte durch Calcium festzustellen waren, auch überphysiologische Spiegel hier keine Verbesserung der Messwerte bedingten.

TRIS besitzt eine gute Pufferkapazität bei einem pH zwischen 7,2- 9,0. Thrombozytenkonzentrate zeigen aber im Verlauf der Lagerung aufgrund der Stoffwechselaktivität der Thrombozyten pH-Werte unter 7,2 [52]. Außerdem besteht eine relativ starke Temperaturabhängigkeit der Säurekonstante. Aufgrund der chemischen Eigenschaften des TRIS-Puffers und des statistisch nicht signifikanten Unterschiedes in der Messung mit PBS-Puffer sehen wir im Einsatz von TRIS als Inkubationsmedium für die Messung mit dem Multiplate®-Analyzer ebenfalls keine Verbesserung.

Im nächsten Schritt setzten wir Tyrode Puffer ein (Tyrode + $CaCl_2$ xH_2O 0,3 g/l + $MgCl_2$ xH_2O 0,2 g/l + Hirudin 2µg/ml). Die Elektrolytlösung findet Anwendung in der Gewebezüchtung- und konservierung. Die Messung zeigt in der statistischen Auswertung keinen statistisch signifikanten Unterschied zu der Messung mit PBS. Die Messung mit Tyrode zeigt in der deskriptiven Darstellung einen sehr flachen Kurvenverlauf, die Thrombozyten lasen sich nicht ausreichend stimulieren. Die Messung mit nur drei Proben könnte durchaus ein Bias darstellen, jedoch ließen sich die Proben mit PBS wiederum gut stimulieren. Tyrode-Puffer ersetzt somit den Standardpuffer PBS nicht.

Als weiteres Inkubationsmedium wurde AB-Plasma untersucht. Unser Gedanke war, die Thrombozyten einem hoch physiologischen Milieu zuzugeben. Der Ansatz lautete AB-Plasma + $CaCl_2$ xH_2O 1,5 g/l + Hirudin 2 µg/ml. Die Ergebnisse der statistischen Auswertung zeigen an den Tagen d0-d6 einen signifikanten Unterschied zu der Messung mit PBS-Puffer. An d7 wird der Unterschied als nicht signifikant gewertet. Die Thrombozyten zeigen in der deskriptiven Statistik einen flachen Kurvenverlauf, sie sind nicht ausreichend in ihrer Aggregationsfähigkeit zu stimulieren. Der Einsatz von AB-Plasma würde hohe Kosten verursachen. Des Weiteren ist aufgrund der biologischen Variabilität der AB-Plasmen die Messung nicht gut standardisierbar. Da die Thrombozyten in diesem Milieu jedoch nicht optimal stimulierbar sind, wird aus diesen Gründen auf den Einsatz von AB-Plasma zugunsten des Standardpuffers PBS verzichtet.

Hirudin findet bei der Messung von Vollblutproben im Multiplate® breiten Einsatz. Deshalb bestand die Überlegung, Hirudin auch in der Messung mit Thrombozytenkonzentraten einzusetzen. Gemessen wurde die Aggregation der Plättchen in nativem PBS versus PBS + Hirudin 2 µg/ml. In den Ergebnissen der statistischen Auswertung findet sich kein signifikanter Unterschied. Die Thrombozyten zeigen mit Hirudin 2 µg/ml eine gute Stimulierbarkeit bis d3, dann kommt es zu einer ausgeprägten Verschlechterung der

Thrombozytenaggregation. Bei fehlenden Vorteilen der Hirudinzugabe entschieden wir uns gegen einen Ansatz mit Hirudin.
In der Gesamtschau der Ergebnisse ergibt sich kein Vorteil einer zusätzlichen Gabe von gepuffertem Citrat, kein Vorteil des Wechsels von PBS auf TRIS-Puffer, kein Vorteil einer Erhöhung des Calciumspiegels und kein Vorteil einer Hirudinzugabe. Auch die Nachbildung eines möglichst physiologischen Elektrolytmilieus mit Tyrode-Puffer als auch die Herstellung eines höchst physiologischen Milieus bezüglich der Plasmaproteine durch Zugabe von AB-Plasma zeigt keine Vorteile gegenüber dem Standardpuffer PBS.
Zusammenfassend ist festzuhalten, dass unter den besonderen Meßbedingungen in der Meßzelle des Multiplate® im Gegensatz zu den Überlegungen die in einem physiologischen in vivo-Milieu angestellt werden können, der einfach herzustellende und anzuwendende PBS-Puffer gleichwertige und teilweise überlegende Ergebnisse gegenüber den acht Vergleichspuffern bietet und aufgrund seiner günstigen Anschaffungskosten und Lagerung als gebrauchsfertige Lösung als das zurzeit optimale Inkubationsmedium angesehen werden kann.

4.2 Versuchsreihe Konzentration Startreagenz

Kollagen als physiologischer Stimulus der Thrombozyten wird für die Messung mit Vollblut [13; 101] eingesetzt und zeigte auch in den vorausgegangenen Ansätzen zum Thema ‘Qualitätskontrolle von Thrombozytenkonzentraten mittels der Impedanzaggregometrie‘ gute Ergebnisse [107].
Wir verglichen erneut die Stimulierbarkeit im Verlauf mit Kollagen 40 µl (4, bzw. 6,4 µg Endkonzentration) versus 60 µl (6, bzw. 9,6 µg Endkonzentration) mit 41 Proben. Es zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied an den Tagen d1-d7, am d0 fand sich kein Unterschied. Die Stimulation mit Kollagen 60 µl ergab einen gleichmäßigeren Abfall der Aggregationsfähigkeit als mit Kollagen 40 µl und eine deutlich bessere Stimulierbarkeit der Plättchen an den Tagen d6 und d7. Es ist eine logische Schlussfolgerung, dass umso höher die Konzentration des Stimulus ist, desto höher auch die numerischen Werte für die Aggregationsfähigkeit der Thrombozyten sind. Kollagen 60 µl kann alternativ zu Kollagen 40 µl eingesetzt werden, wenn eine geringere Sensitivität gegenüber den Lagereinflüssen und dem Lagerschaden über den Verlauf von sieben Tagen gewünscht wird. Kollagen 40 µl erscheint dagegen für die sensitive Erfassung des Lagerschadens und anderer negativer Einflüsse besser geeignet. Da nach neuesten Erkenntnissen vom AK Blut Votum 38 der Bundesärztekammer ein Lagerzeitraum von fünf Tagen (Entnahmetag + vier Tage) für die Zukunft festgelegt wird, kann weiterhin, vor allem aus Kostengründen, Kollagen 40 µl

eingesetzt werden. Die Messung mit Kollagen 60 µl kann gleichberechtigt daneben stehen bleiben. Es ist aufgrund der höheren Messwerte an den folgenden Lagertagen auch eine geringere Schwankungsbreite zu vermuten. Derzeit läuft der Vergleich an den Thrombozytenkonzentraten der Qualitätskontrolle Kollagen 40µl / Kollagen 60 µl an d0 und d6 (nach Ende der Haltbarkeit), der jedoch nicht mehr Gegenstand dieser Arbeit ist.

In der Vorarbeit zu dieser Arbeit [107] wurde Kollagen als das am ehesten geeignete Reagenz angesehen. Ristocetin bildet nur die Funktion des von Willebrand Faktors ab, während Arachidonsäure lediglich die Wirksamkeit von Acetylsalicylsäure darstellt, d.h. es besteht eine Abhängigkeit zur Cyclooxygenase. Jilma-Stohlawetz et.al. [49] zeigten, dass TRAP als potenter Plättchenaktivator in der Messung mit dem Multiplate® fungiert. Der TRAP-Test erfasst die Thrombozytenaktivierung über den Thrombinrezeptor, ist aber von Bestandteilen des Vollbluts abhängig und beschreibt die prinzipielle Stimulierbarkeit der Thrombozyten. Kollagen hingegen beschreibt die physiologische Stimulierbarkeit der Plättchen innerhalb des nicht physiologischen Systems Thrombozytenapheresekonzentrat.

Sowohl aus Kosten- und Verfügbarkeitsgründen als auch aufgrund der guten Ergebnisse der Messungen mit Kollagen entschieden wir uns in der Gesamtschau für den Einsatz von Kollagen in der Messung der Thrombozytenkonzentrate mit dem Multiplate®-Analyzer.

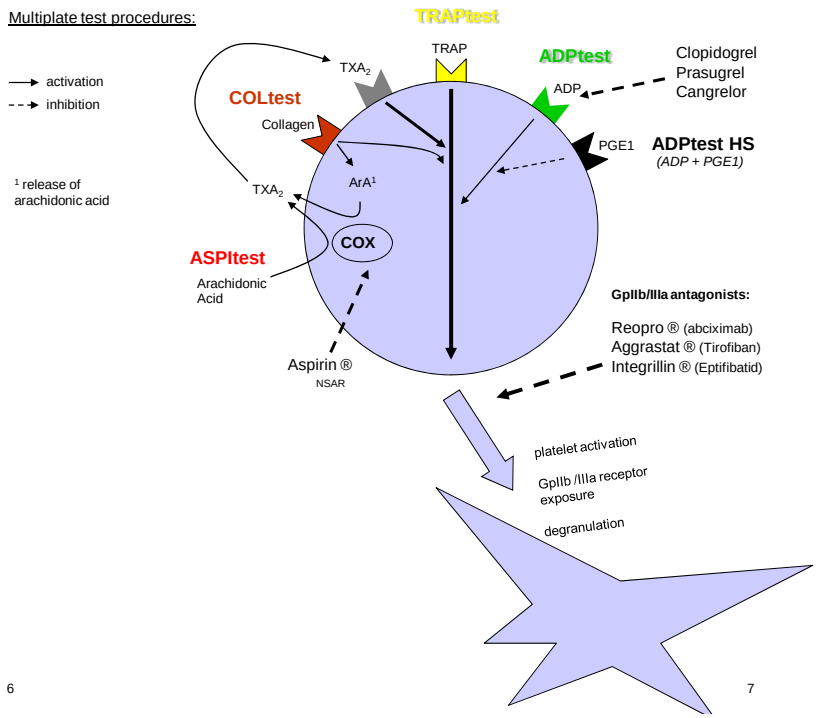


Abbildung 44: Übersicht über die verschiedenen Thrombozytenaktivierungswege, nach [13, 73]

4.3 Versuchsreihe Multiplate® versus Born

Die Aggregation nach Born gilt derzeit immer noch als Goldstandard in der Messung der Thrombozytenfunktion bei ex vivo Proben [38]. Die Vor- und Nachteile sind unter 1.7.9 beschrieben. Die Messung mit dem Multiplate®-Analyzer umgeht die Fehlerquellen der aufwändigen Präanalytik des Born-Gerätes, da die Thrombozyten ohne vorherige Verarbeitung aus dem Beutel getestet werden können. Außerdem bildet die Aggregation nach Born schwerpunktmäßig nur die Interaktion zwischen den Thrombozyten untereinander nach entsprechender Stimulation ab, während die Multiplate®-Messung noch als zusätzliche, die Thrombozytenfunktion beschreibende Komponente der Aktivierung an Fremdoberflächen unter low-shear-stress Bedingungen hinzunimmt. Eine Aktivierung unter high-stress Bedingungen kann nicht mit diesen beiden Methoden, sondern beispielsweise mit dem PFA-100 oder dem Platelet-Cone-Analyzer dargestellt werden. Die Impedanzaggregometrie, nach dessen Prinzip die Multiplate®-Messung funktioniert, zeigt die Adhäsionsfähigkeit der Plättchen an die Sensordrähte und die darauffolgende Plättchenaggregation, während die Aggregation nach Born mit dem Prinzip der optischen Aggregationsmessung die Aggregation in der sogenannten flüssigen Phase zeigt. Des Weiteren scheint es, dass die optische Aggregationsmessung sensitiver gegenüber unbekannten verfahrenstechnischen Einflüssen ist [49].

Es muss bedacht werden, dass die beiden Methoden nicht untereinander auswechselbar sind, da sie prinzipiell verschiedene Aspekte der Plättchenfunktion messen.

Dennoch interessierte uns, ob die Thrombozyten mit dem Multiplate®-Analyzer einen vergleichbaren Verlauf, bzw. Abfall ihrer Aggregationsfähigkeit, wie in der Messung nach Born zeigen.

Wir verglichen 20 Proben an den Tagen d0, d2 und d6. Die Proben im Multiplate®-Analyzer wurden mit Kollagen 40 µl stimuliert, die Proben in der Born-Messung mit Kollagen 0,8 µg/ml, bzw. 1,0 µg/ml. Eine statistische Analyse mit Erhebung des p-Wertes und somit der Aussage über eine statistischen Signifikanz der Unterschiede der Resultate war nicht möglich, da die Messergebnisse beider Methoden unterschiedliche Einheiten an den absoluten Messwerten selbst aufweisen.

In der deskriptiven Statistik, d.h. im Kurvenverlauf zeigen sich gleichsinnige Verläufe im Abfall der Aggregationsfähigkeit.

In der Auswertung der Messergebnisse in relativen Zahlen (Ergebnisanhang) können wir im Rahmen der Haltbarkeit der Plättchenkonzentrate eine deutlich bessere Stimulierbarkeit der Thrombozyten mit der Multiplate®-Methode erkennen. An d2 nach Entnahme zeigt

sich eine deutliche Abnahme der Aktivität der Plättchen in der Born-Methode. Die Messwerte (relativ) beider Methoden gleichen sich allerdings nach Ende der Haltbarkeit (d6) wieder an.
Wie bereits oben beschrieben, spiegeln die beiden Methoden prinzipiell andere Aspekte der Plättchenfunktion wider. Die Messung mit der Methode nach Born ist der Goldstandard für Messungen von Patientenproben ex vivo, aber sicher nicht für Thrombozytenkonzentrate. Die Messung mit dem Multiplate®-Analyzer ist einfacher und schneller in der Durchführung. Sie beinhaltet weniger Fehlerquellen als die Born-Methode, diese potentiellen Fehlerquellen spielen vor allem in der Präanalytik der Born-Methode eine Rolle. Die Schritte der aufwendigen Präanalytik entfallen bei der Messung im Multiplate®-Analyzer, da die Plättchen direkt aus dem Beutel in die Messzelle des Multiplate®-Geräts überführt werden können. Wir sehen die Multiplate®-Methode deshalb als hervorragende Möglichkeit, die Aggregation und somit Funktion der Thrombozyten aus einem Thrombozytenkonzentrat zu messen.

4.4 Versuchsreihe Säure-Basen-Status

Während der Lagerung von Thrombozytenkonzentraten kommt es zu Veränderungen im Säure-Basen-Haushalt [52]. Die Plättchen gewinnen ihre Energie größtenteils über oxidativen Abbau in der Atmungskette, hierbei kann es durch die CO_2-bzw H_2CO_3-Bildung zu einem kritischen Abfall des pH-Wertes im Beutel kommen [70]. Die Kontrolle des pH-Wertes ist deshalb ein fester Bestandteil der Qualitätskontrolle von Thrombozytenkonzentraten [12; 70]. Größere Abweichungen des pH-Wertes resultieren in einer erhöhten Anzahl an lysierten und kugelig veränderten Plättchen, diese sind dementsprechend nicht mehr funktionstüchtig, es kommt zu einer Abnahme der Aggregation.
Uns interessierte nun, ob diese durch den Säure-Basen-Haushalt verursachte Veränderung der Aggregationsfähigkeit mit dem Multiplate®-Analyzer messbar ist. Dies würde die Möglichkeit der Abbildung des sogenannten Plättchenlagerungsschaden im Multiplate®-Analyzer bedeuten.
Wir stellten zunächst den Verlauf im Säure-Base-Status an 81 gemessenen Proben (d0-d7) dar. Retrospektiv betrachteten wir 268 Proben an den Tagen der Abnahme und des Verfalls und zeigten diese Ergebnisse auf. Die 81 Proben wurden gleichzeitig mit dem Multiplate®-Analyzer gemessen und die Ergebnisse im Simple Scatter Plot gegeneinander aufgetragen.
Der **pH-Wert** stieg im Verlauf der Lagerung an, um ab d3 wieder abzufallen. In der Darstellung Abnahme-Verfall zeigte sich ein leicht gestiegener pH-Wert. Die Ergebnisse mit dem Multiplate® zeigten einen kontinuierlichen Abfall der Aggregationsfähigkeit. In der

Graphik und in der statistischen Auswertung pH-versus Multiplate® ließ sich allerdings kein Zusammenhang feststellen. Im nächsten Schritt logarithmierten wir die Werte der Multiplate®-Messung, da der pH auch eine logarithmische Größe darstellt. Aber auch hier konnten wir keine Korrelation nachweisen.

Der **pCO_2-Wert** sank im Verlauf der Lagerung, in der Darstellung Abnahme-und Verfallstag zeigte sich eine deutliche Abnahme des pCO_2-Werts. Diese Abnahme ließ sich wiederum nicht mit der Messung im Multiplate® nachweisen. Zwar zeigte die Messung im Multiplate® einen ähnlichen Verlauf, jedoch fand sich in der gegensinnigen Darstellung kein statistischer Zusammenhang.

Der **pO_2-Wert** zeigte sowohl im Verlauf als auch in der Untersuchung Abnahme-Verfall relativ konstante Werte. Die Schwankungen korrelierten auch hier nicht mit dem Multiplate®. Es lässt sich kein Zusammenhang nachweisen.

Der **$cHCO_3$-Wert** Verlauf sank gleichmäßig bis zu d7. Auch in der Untersuchung Abnahme-Verfall zeigte sich eine deutlich Reduktion der $cHCO_3$-Konzentration nach Verfall des Thrombozytenkonzentrates. In der Gegenüberstellung der $cHCO_3$-Werte mit der AUC der Multiplate®-Messung ließ sich weder in der einfachen, noch in der logarithmierten Darstellung ein Zusammenhang erkennen. Somit erlaubt die Untersuchung mit dem Multiplate® keine Schlussfolgerung auf entsprechende $cHCO_3$-Werte.

Der **Base-Excess** sank im Verlauf der Lagerung, in der Darstellung Abnahme-Verfall zeigte sich am Tag des Verfalls des Konzentrates deutlich erniedrigte Werte, allerdings mit einer hohen Standardabweichung. Auch ließ sich dieser Verlauf nicht in der Messung mit dem Multiplate® nachvollziehen. Wir können also mit der Multiplate®-Messung auch keine Rückschlüsse auf den Base-Excess ziehen.

Es lässt sich zusammenfassend feststellen, dass sich die Veränderungen im Säure-Basen-Haushalt, die sich im Zeitraum der Lagerung ergeben, nicht in der Messung mit dem Multiplate®-Gerät widerspiegeln. Die Werte für den Säure-Basen-Haushalt bewegten sich innerhalb der anerkannten Toleranzgrenzen und scheinen innerhalb dieser Grenzen keine Auswirkung auf die Messung der Aggregation der Thrombozyten mit dem Multiplate® zu nehmen.

Der in der Literatur beschriebene Plättchenlagerungsschaden [93] ist mit dem Multiplate®-Messverfahren unabhängig vom Status quo des Säure-Basen-Haushaltes nachweisbar.

4.5 Andere Einflussfaktoren auf das Ergebnis der Impedanzaggregometrie: Puffersubstanzen, Fibrinogen und vWF-Spiegel in der Probe

Die Untersuchungen haben gezeigt, dass der Einfluss der Puffersubstanzen auf das Ergebnis der Impedanzaggregometrie wesentlich ist. Überraschenderweise stellt sich die einfachste Puffersubstanz PBS als sehr gutes Verdünnungsmedium dar, während andere Puffersubstanzen und das Hinzufügen von Serum, Citratplasma oder Hirudinplasma keinen verbesserten Effekt zeigen. Andere Substanzen die auch klinisch Verwendung finden wie HAES oder Ringerlactat, zeigen negative Effekte auf die Thrombozytenfunktion in der Impedanzaggregometrie [8]. Zusätzlich ist noch der Einfluß der bekannten notwendigen Substanzen zur Thrombozytenaggregation zu überprüfen. Von Fibrinogen ist seit längerem bekannt, dass es für die Thrombozytenfunktion und Interaktion essentiell ist und Einflüsse auf die Bindung an Biomaterialien, Fremdoberflächen und Polystyrol (wie die verwendete Testkammer beim Multiplate) vor allem bei kleinen und mittleren Scherraten hat [5; 83; 110;]. Der vWF ist das zentrale Kontaktprotein zwischen Thrombozyt, Kollagen, Fibrinogen und Fremdoberfläche überhaupt und hat eine zentrale Bedeutung für die Anheftung von Thrombozyten untereinander und auf Fremdoberflächen und geschädigtem Endothel. Die hauptsächlichen Effekte werden dabei üblicherweise bei hohen Scherraten isoliert beobachtet, sind aber auch bei mittleren und niedrigen Scherraten vorhanden und in Betracht zu ziehen [31; 82; 94]. Veränderungen bei Fibrinogen und vWF während der Lagerung der Thrombozytenkonzentrate in Form von Abbau, Funktionsverlust, Degradation, Aktivierung usw. können natürlich damit auch das Ergebnis der Impedanzaggregometrie beeinflussen. Messungen auf Antigenbasis und auf funktioneller Basis dieser beiden Gerinnungsproteine konnten in der vorliegenden Arbeit nicht durchgeführt werden, sind aber Gegenstand weiterer Untersuchungen unseres Labors. Gegen eine massive Beeinträchtigung durch Veränderungen von Fibrinogen und vWF sprechen:

Die biologische Halbwertszeit von vWF beträgt etwa 6-12 h, es müsste also bereits am Tag 1, spätestens am Tag 2 zu signifikant messbaren Effekten kommen. Andere Untersuchungen unseres Labors zeigen, dass die Impedanzaggregometrie noch relativ unsensitiv gegenüber quantitativen und qualitativen Veränderungen des vWF beim vWJS im Vergleich zum PFA sind, solange keine speziellen Ansatzbedingungen gewählt werden [59]. Die biologische Halbwertszeit von Fibrinogen beträgt dazu im Gegensatz etwa 96-120 h und hat als Akut-Phase-Protein interindividuell und intraindividuell stark schwankende Spiegel zwischen 1,5 und 4g/l Plasma. Es ist also erst am Ende der Lagerzeit mit signifikant mess-

baren Effekten zu rechnen. Aufgrund der erhobenen Werte ist ein Fibrinogeneffekt auf die Multiplatemessung nicht auszuschließen und derzeit Gegenstand weiterer Untersuchungen.

4.6 Normalwertfindung

Die gemessenen Werte im Multiplate®-Analyzer müssen, um sie interpretieren zu können mit einem Referenzintervall verglichen werden. So können Abweichungen von der Grundgesamtheit erkannt werden und es lassen sich Rückschlüsse auf die Qualität, bzw. noch vorhandene Funktion der Thrombozyten ziehen. Die Normalwerte aus der Vollblutmessung dürfen naturgemäß nicht einfach auf die Messung der Thrombozytenkonzentrate übertragen werden. Die Plättchen sind aus ihrem physiologischen Milieu herausgenommen worden, die Komponenten des Vollblutes fehlen. Aus diesem Grund müssen für die Messung von Thrombozytenkonzentraten mit dem Multiplate®-Analyzer eigene Normwerte gefunden werden.
Die Bildung der Referenzwerte wird unter 1.9 und 3.7 beschrieben. Wir bestimmten nur den unteren Referenzwert mit seinem 90%-Konfidenzintervall [**d0:** AUC 518 (216-660), **d6:** AUC 27 (17-55)]. Ein unterer Grenzwert ist notwendig, um nicht ausreichend aggregationsfähige Thrombozyten auszumustern, wohingegen ein oberer Grenzwert nicht sinnvoll ist, da die AUC umso höher ist, je besser die Aggregationsfähigkeit der Plättchen ist. Die von uns erstellten Referenzwerte gelten nur für die Randbedingungen unserer Produkte. Die Thrombozytenapheresekonzentrate, die der Routineproduktion der ATMH im Klinikum Großhadern der Universität München entstammen, enthalten 200-300 ml Plättchenkonzentrat mit 2-4 $x10^{11}$ Thrombozyten, bzw. 750-1400 $x10^{3}$ Thrombozyten/µl. Das bedeutet, dass Normwerte für die Qualität eines Konzentrates definiert werden können, diese aber abhängig sind von der pharmakologischen Zusammensetzung. Jedes Institut, das die Thrombozytenfunktion in (Qualitätskontroll-) Thrombozyten-apheresekonzentraten in ähnlicher Weise überprüfen möchte, ist aufgerufen, seine eigenen Normwerte zu finden.

4.7 Quervernetzung zum Konzept des Plättchenlagerungsschaden (PSL)

Die Messung am Multiplate® aus gelagerten Thrombozytenkonzentraten spiegelt als in-vitro Methode die Thrombozytenfunktion innerhalb des Systems „gelagertes Thrombozytenkonzentrates“ wider. Sie ist kein Ausdruck einer guten oder schlechten Funktion der Thrombozyten in vivo nach Transfusion, sondern repräsentiert nur das Ausmaß des Plättchenlagerungschadens im jeweiligen Thrombozytenkonzentrat, nicht aber die Funktion dieser gelagerten Thrombozyten nach Transfusion in vivo. Eine schlechte in-vivo Funk-

tion könnte auf einen irreversiblen Lagerungsschaden zurückzuführen sein, die Messwerte die hier vorliegen beschreiben aber den reversiblen und eventuell irreversiblen Lagerungsschaden in Summe. Die Höhe der Messwerte ist u.a. von der Präanalytik, dem gewählten Inkubationsmedium, den gewählten Stimulantien (Kollagen 40 µl und 60 µl), der Messzeit und anderen Faktoren abhängig. Die Messwerte verschiedener Messreihen sind zahlenmäßig nicht miteinander vergleichbar, ein hoher Wert in der Stimulation mit Kollagen 60 µl im Vergleich zu Kollagen 40 µl zeigt natürlich keine bessere in-vitro Funktion. Ein relativ niedriger Wert im Vergleich zu Vollblutmessungen an frischen Proben zeigt ebenfalls keine schlechtere Thrombozytenfunktion im Thrombozytenkonzentrat gegenüber dem Vollblut. Alle erhobenen Messwerte lassen sich nur im Verlauf der Lagerung untereinander vergleichen.

Mit dem Multiplate® kann man einen Aspekt des Plättchenlagerungsschadens erfassen. Andere Aspekte des Plättchenlagerungsschadens sind durch die Veränderungen im Säure-Basen-Haushalt oder im abnehmenden Swirling-Phänomen oder auch durch die Messung der Akkumulation freigesetzter Thrombozytenstoffwechselprodukte oder Inhaltsstoffe zu erfassen. Das Multiplate®-Gerät gibt also eine zusätzliche Möglichkeit der Erfassung der Thrombozytenfunktion im gelagerten Thrombozytenkonzentrat. Dieses Einsatzgebiet ist vollkommen unabhängig von anderen Anwendungen wie der Detektion einer ASS-oder Clopidogrelresistenz oder beim intraoperativen Gerinnungsmonitoring oder bei der Diagnostik von Thrombozytenfunktionsstörungen aus ex-vivo Proben.

Davon unabhängig müssen Veränderungen im Fibrinogen- und von-Willebrand-Faktor-Spiegel oder qualitative Veränderungen dieser beiden Proteine während der Lagerung der Thrombozytenapheresekonzentrate gesehen und weiter untersucht werden.

5. Zusammenfassung

Die Qualitätskontrolle von Thrombozytenapheresekonzentraten beinhaltet derzeit die Parameter Thrombozytengehalt, Restleukozyten, Resterythrozyten, pH-Wert, visuelle Kontrolle und Sterilität der Konzentrate. Eine Messung der Funktion, bzw. Aggregationsfähigkeit der Plättchen, ist bisher nicht vorgeschrieben.

Der Multiplate®-Analyzer (Fa. Dynabyte), der die Aggregationsfähigkeit der Thrombozyten mittels Impedanzaggregometrie im Vollblut misst und der derzeit hauptsächlich zum Monitoring einer Aspirin-oder Clopidogreltherapie und perioperativ eingesetzt wird, sollte in dieser Arbeit Thrombozytenapheresekonzentrate in ihrer Funktion testen, um diese Methode zur Messung der Aggregationsfähigkeit der Plättchen in die Qualitätskontrolle einzuführen.

In **fünf Arbeitsschritten** wurde als **erstes** nach einem geeigneten Inkubationsmedium für die Thrombozyten zur Messung im Multiplate ® gesucht. Hier untersuchten wir acht verschiedene Puffer, stets im Vergleich zum PBS-Puffer (phosphat buffered saline), an 81 Spendern von Thrombozytenapheresekonzentraten aus der Qualitätskontrolle. Im **zweiten** Schritt erfolgte eine vergleichende Messung mit zwei verschiedenen Konzentrationen des Agonisten Kollagen an 41 Proben. In der **dritten** Versuchsreihe führten wir eine Vergleichsmessung mit der Methode nach Born, derzeit Goldstandard in der Thrombozytenfunktionsmessung, mit 20 Proben durch. Im **vierten** Arbeitsschritt wurde der Säure-Basen-Status der Proben untersucht, mit der Frage, ob sich die Veränderungen im Stoffwechsel bezüglich des Plättchenlagerungsschadens in der Messung mit dem Multiplate® widerspiegeln. Abschließend wurden **fünftens** die Ergebnisse der Multiplate®-Messung von 221 Proben der Routinequalitätskontrolle über eineinhalb Jahre zu Referenzwerten für die Messung mit dem Multiplate®-Analyzer verdichtet.

Es fanden sich folgende **Ergebnisse:**

1. In der Versuchsreihe mit dem Standardpuffer PBS zeigte dieser gegenüber allen anderen getesteten Puffern zumindest gleichwertige oder überlegene Ergebnisse.
2. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied der beiden Kollagenkonzentrationen.
3. Es fand sich eine gleichsinnige Abnahme der Thrombozytenfunktion bei beiden Methoden, jedoch eine prinzipiell bessere Stimulierbarkeit mit dem Multiplate®-Analyzer und eine geringere Streubreite als mit der Born-Methode.
4. Es zeigte sich kein Zusammenhang zwischen den Ergebnissen des Säure-Basen-Status und der Stimulierbarkeit im Multiplate®-Analyzer.

5. Entsprechende Referenzwerte konnten gebildet werden.

Aus den Ergebnissen lassen sich folgende **Schlussfolgerungen** ziehen:

1. Der Standardpuffer PBS wird aufgrund der guten Ergebnisse, der einfachen Handhabung (gebrauchsfertig) und der kostengünstigen Anschaffung in der Routine eingesetzt.
2. Kollagen 60 µl kann alternativ zu Kollagen 40 µl eingesetzt werden, wenn eine geringere Sensitivität gegenüber den Lagereinflüssen und dem Lagerschaden über den Verlauf von sieben Tagen gewünscht wird. Für die sensitive Erfassung des Lagerschadens und anderer negativer Einflüsse ist Kollagen 40 µl dagegen besser geeignet. Aus diesem Grund und wegen des kostengünstigeren Einsatzes wird in der Messung der Thrombozytenkonzentrate mit dem Multiplate®-Analyzer Kollagen 40 µl verwendet.
3. Es ist anzunehmen, dass die Born-Methode nur der Goldstandard für Messungen der Thrombozytenfunktion ex vivo ist, nicht aber für die Messung im Thrombozytenkonzentrat. Die Messung mit dem Multiplate®-Analyzer erscheint als gute Methode, die Funktion der Plättchen aus dem Apheresekonzentrat abzubilden.
4. Die Veränderungen im Säure-Basen-Haushalt und die Werte im Multiplate®-Analyzer korrelieren nicht. Die Säure-Basen-Messung, insbesondere die geforderte pH-Messung in der Qualitätskontrolle, lässt sich durch die Messung mit dem Multiplate®-Analyzer ergänzen, nicht ersetzen.
5. Die gebildeten Referenzwerte gelten nur für die Randbedingungen der ATMH im Klinikum Großhadern. Jedes Institut, welches ähnliche Messungen durchführen möchte, ist aufgefordert, seine eigenen Referenzwerte zu bilden.

Derzeit laufen weitere Untersuchungen an Thrombozytenkonzentraten innerhalb der Qualitätskontrolle mit Kollagen 40 µl / Kollagen 60µl an d0 und d5 (nach Ende der Haltbarkeit) und zur Möglichkeit der Beeinflussung durch wechselnde Fibrinogen und vWF-Spiegel. Die Ergebnisse müssen noch abgewartet werden. Denkbar wären auch nachfolgende Untersuchungen zu Themen wie dem perioperativen Einsatz des Multiplate®-Analyzers für Plättchenkonzentrate oder weitere Vergleichsmessungen zu bereits vorhandenen Methoden der Thrombozytenfunktionsdiagnostik.

6. Ergebnisanhang

Im Folgenden wird eine Zusammenstellung aller analytischen Ergebnisse präsentiert. Die Erklärung der relevanten Graphiken und Ergebnisse findet sich im Ergebnisteil unter Punkt 3. Hier soll der Leser lediglich eine Auflistung aller erstellten Graphiken finden.

PBS

Absolute Werte im Verlauf

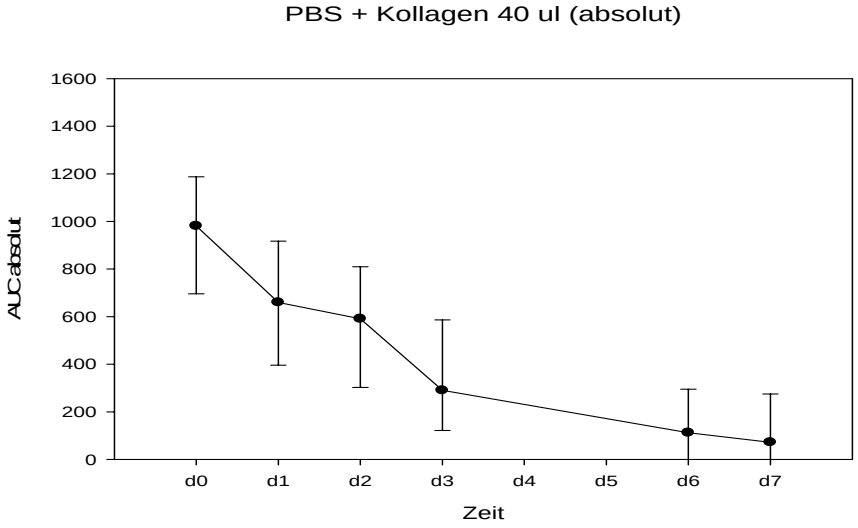


Abbildung A1: Darstellung der AUC, PBS + Kollagen 40 µl, in absoluten Werten mit Mittelwert und +/- Standardabweichung, n= 81

Relative Werte im Verlauf

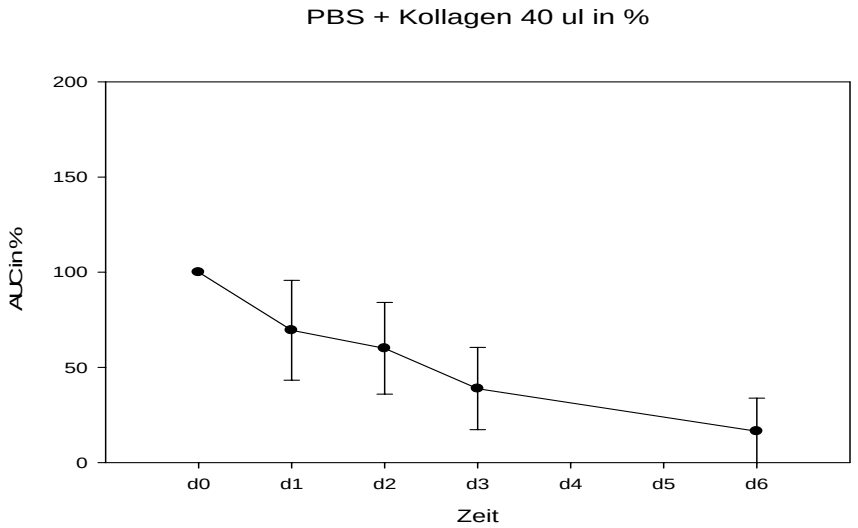


Abbildung A2: Darstellung der AUC, PBS + Kollagen 40 µl, in relativen Werten mit Mittelwert und +/- Standardabweichung, n= 81

Absolute Werte d0, d3, d7

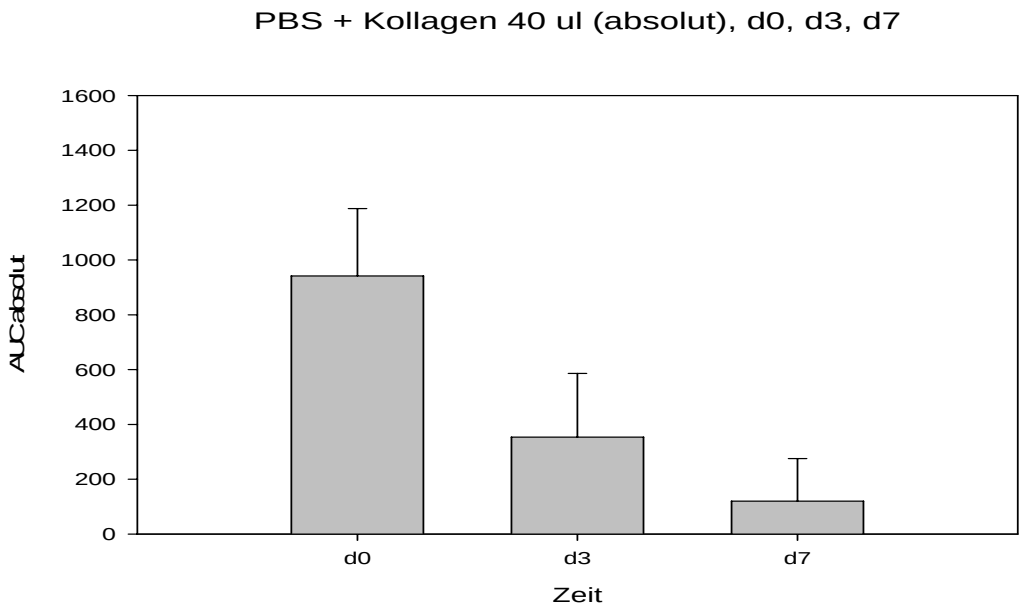


Abbildung A3: Darstellung der AUC, PBS + Kollagen 40 µl in absoluten Werten an d0, d3, d7, n= 81

Relative Werte im Verlauf

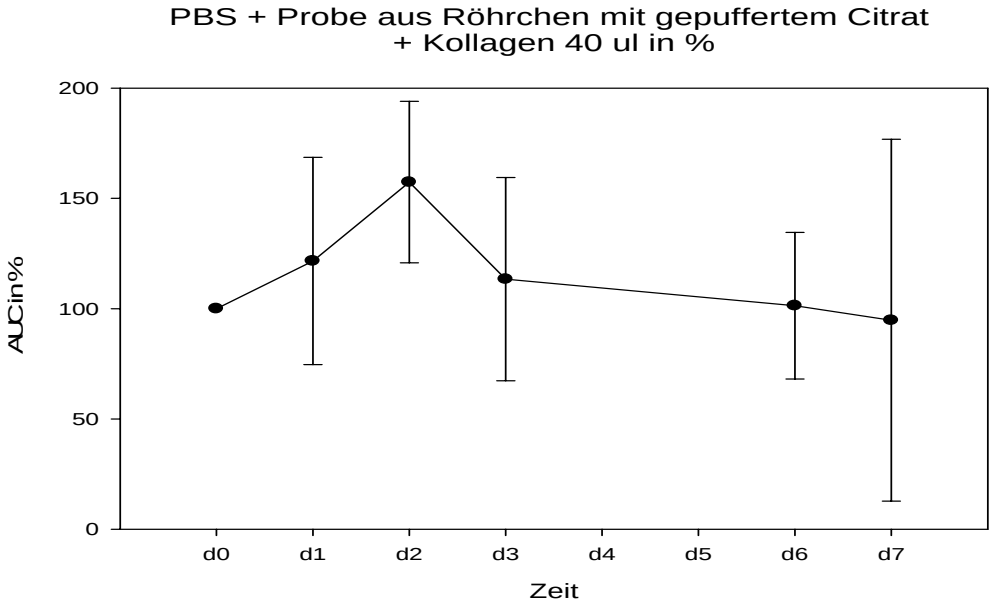


Abbildung A5: Darstellung der AUC, PBS + Probe aus Röhrchen mit gepuffertem Citrat+ Kollagen 40 µl, in relativen Werten mit Mittelwert und +/- Standardabweichung, n= 8

PBS + Probe aus Röhrchen mit gepuffertem Citrat

Absolute Werte im Verlauf

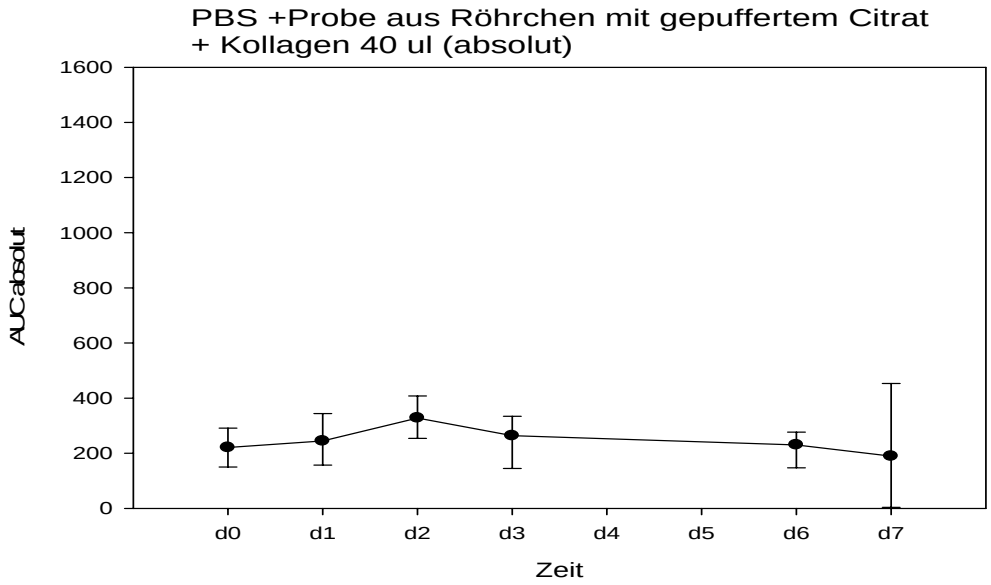


Abbildung A4: Darstellung der AUC, PBS + Probe aus Röhrchen mit gepuffertem Citrat + Kollagen 40 µl, in absoluten Werten mit Mittelwert und +/- Standardabweichung, n= 8

Absolute Werte d0, d3, d7

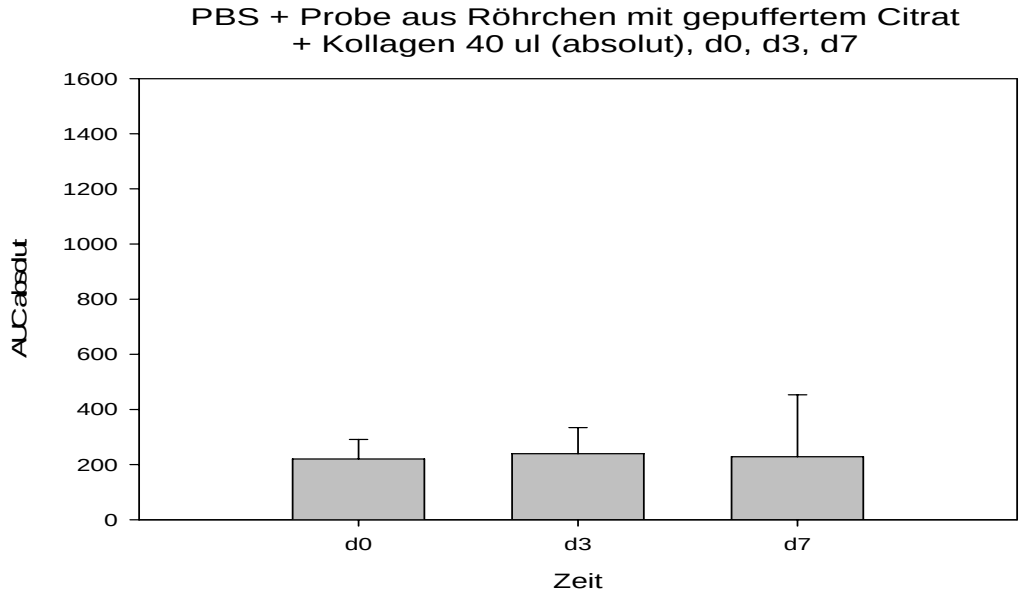


Abbildung A6: Darstellung der AUC, PBS + Probe aus Röhrchen mit gepuffertem Citrat+ Kollagen 40 µl, in absoluten Werten an d0, d3, d7, n= 8

Statistischer Vergleich

Vergleich PBS versus PBS + Probe aus Röhrchen mit gepuffertem Citrat (Startreagenz jeweils Kollagen 40 µl)									
n	Zeit	PBS			PBS + Probe aus gepuffertem Citratröhrchen			Test	p-Wert	Signifikanz
		Median	25%	75%	Median	25%	75%		p <	
8	d0	890,00	819,50	979,50	221,00	177,00	283,50	Wilcoxon signed rank test	0,008	s.
8	d1	660,00	585,00	803,00	244,50	183,00	263,50	Wilcoxon signed rank test	0,008	s.
8	d2	531,50	453,50	783,50	328,00	317,50	371,00	Wilcoxon signed rank test	0,008	s.
8	d3	511,50	394,00	595,50	264,00	150,50	322,00	Wilcoxon signed rank test	0,008	s.
8	d6	501,50	307,00	602,50	230,50	180,50	243,00	Wilcoxon signed rank test	0,008	s.
8	d7	462,00	212,50	586,00	189,50	67,00	267,50	Wilcoxon signed rank test	0,25	n.s.

Tabelle A1: Statistischer Vergleich der Messung PBS versus PBS + Probe aus gepuffertem Citratröhrchen + Kollagen 40 µl im Verlauf

TRIS 20 mmol/l + $CaCl_2$ xH_2O 0,4 g/l + Hirudin 2 µg/ml

Absolute Werte im Verlauf

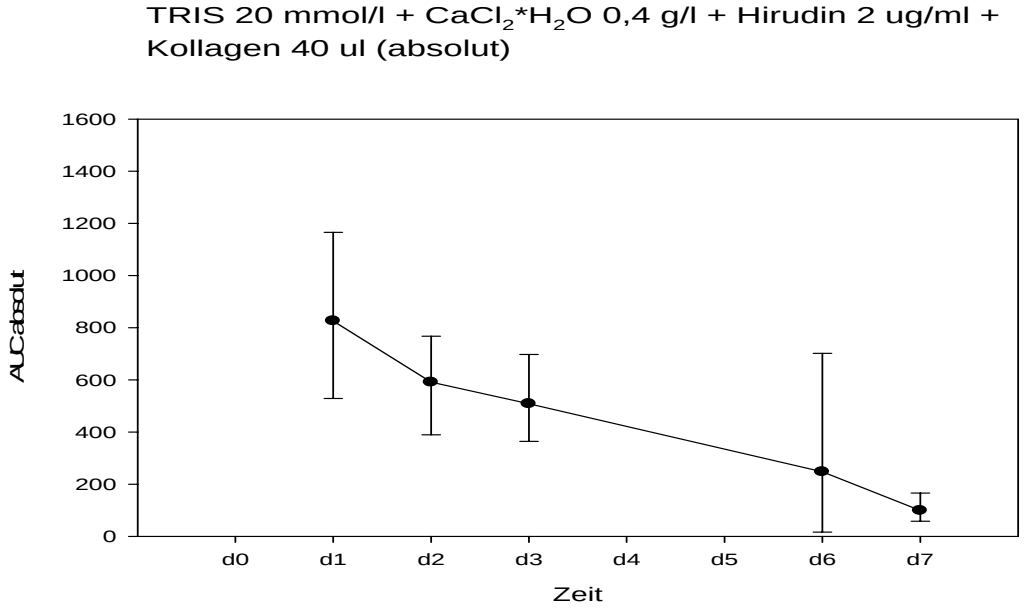


Abbildung A7: Darstellung der AUC, TRIS + $CaCl_2$ xH_2O 0,4 g/l + Hirudin 2 µg/ml + Kollagen 40 µl, in absoluten Werten mit Mittelwert und +/- Standardabweichung, n= 4

Statistischer Vergleich

Vergleich PBS versus TRIS 20 mmol/l + $CaCl_2$*H_2O 0,4 g/l + Hirudin 2 µg/ml (Startreagenz jeweils Kollagen 40 µl)										
n	Zeit	PBS			TRIS 20 mmol/l + $CaCl_2$*H_2O 0,4 g/l + Hirudin 2 µg/ml			Test	p-Wert	Signifikanz
		Median	25%	75%	Median	25%	75%		p <	
4	d0	/	/	/	/	/	/			
4	d1	586,50	583,00	687,00	826,00	615,50	1080,00	Wilcoxon signed rank test	0,250	n.s.
4	d2	623,50	519,00	713,50	591,50	462,00	695,00	Wilcoxon signed rank test	0,375	n.s.
4	d3	445,50	391,00	535,00	508,50	415,50	646,50	Wilcoxon signed rank test	0,250	n.s.
4	d6	118,50	75,50	145,50	247,50	111,00	607,50	Wilcoxon signed rank test	0,375	n.s.
4	d7	23,00	15,50	71,50	99,00	73,00	151,50	Wilcoxon signed rank test	0,250	n.s.

Tabelle A2: Statistischer Vergleich der Messung PBS versus TRIS 20 mmol/l + $CaCl_2$ xH_2O 0,4 g/l + Hirudin 2 µg/ml + Kollagen 40 µl im Verlauf

TRIS 20 mmol/l + $CaCl_2$ xH_2O 0,6 g/l + $MgCl_2$ 0,2 g/l + Hirudin 2 µg/ml

Absolute Werte im Verlauf

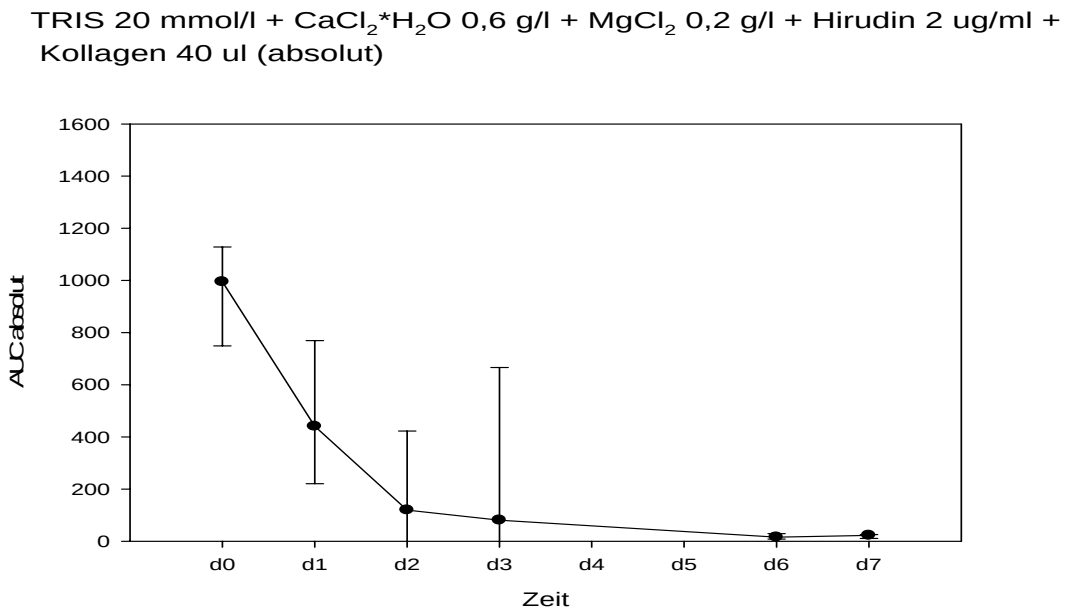


Abbildung A8: Darstellung der AUC, TRIS 20 mmol/l + $CaCl_2$ xH_2O 0,6 g/l + $MgCl_2$ 0,2 g/l + Hirudin 2 µg/ml + Kollagen 40 µl, in absoluten Werten, mit Mittelwert und +/- Standardabweichung, n= 5

Relative Werte im Verlauf

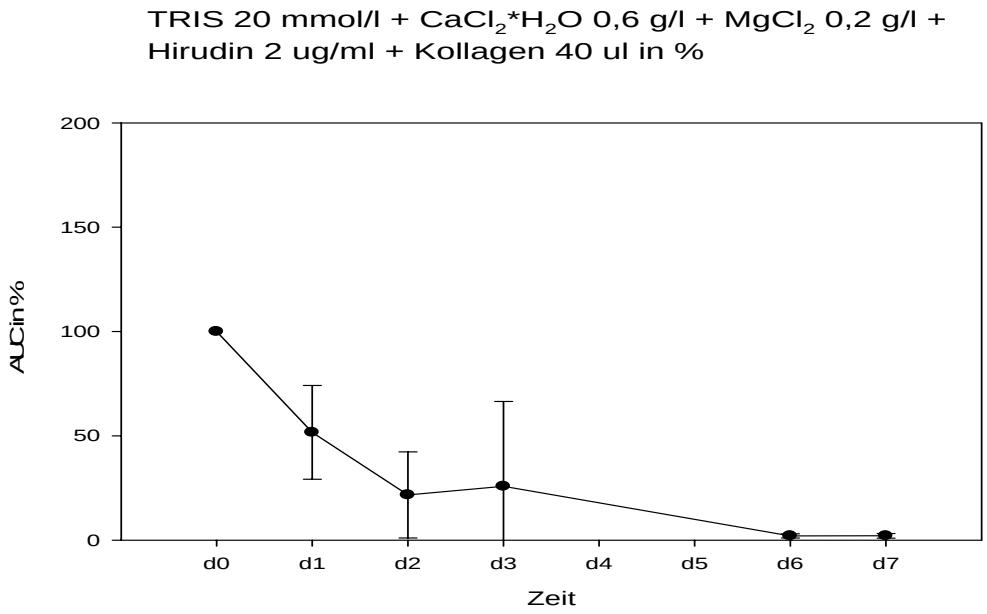


Abbildung A9: Darstellung der AUC, TRIS 20 mmol/l + $CaCl_2$ xH_2O 0,6 g/l + $MgCl_2$ 0,2 g/l + Hirudin 2 µg/ml + Kollagen 40 µl, in relativen Werten mit Mittelwert und +/- Standardabweichung, n= 5

Absolute Werte d0, d3, d7

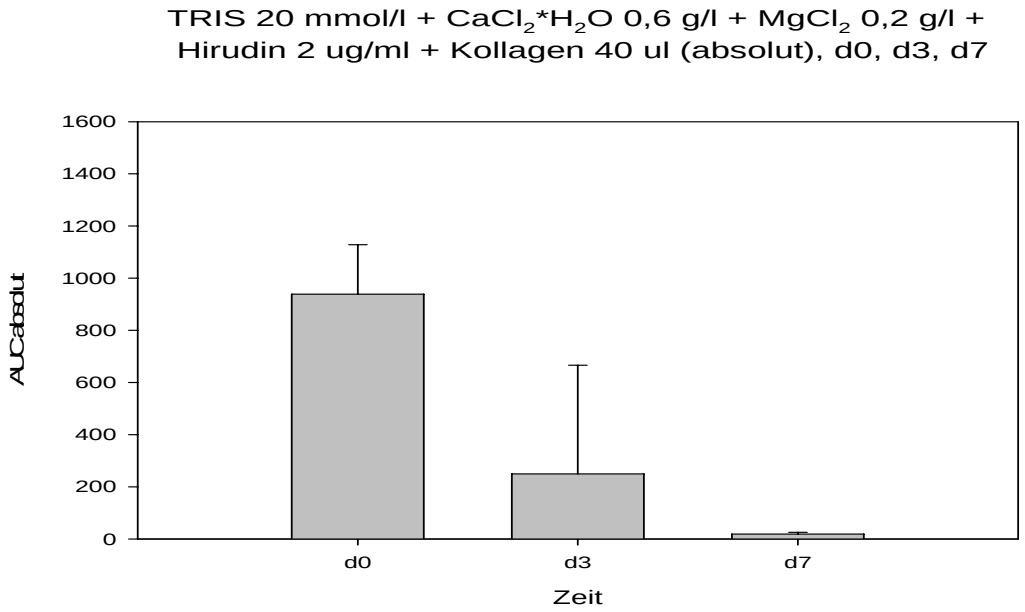


Abbildung A10: Darstellung der AUC, TRIS 20 mmol/l + $CaCl_2$ xH_2O 0,6 g/l + $MgCl_2$ 0,2 g/l + Hirudin 2 µg/ml + Kollagen 40 µl, in absoluten Werten, d0, d3, d7

Statistischer Vergleich

Vergleich PBS versus TRIS 20 mmol/l+ $CaCl_2$*H_2O 0,6 g/l + $MgCl_2$ 0,2 g/l + Hirudin 2 µg/ml (Startreagenz jeweils Kollagen 40 µl)										
n	Zeit	PBS			TRIS + $CaCl_2$*H_2O 0,6 g/l + $MgCl_2$ 0,2 g/l + Hirudin 2 µg/ml			Test	p-Wert	Signifikanz
		Median	25%	75%	Median	25%	75%		p <	
5	d0	856,00	673,50	901,00	995,00	854,50	1042,00	Wilcoxon signed rank test	0,063	n.s.
5	d1	739,00	544,00	955,75	441,00	293,25	723,00	Wilcoxon signed rank test	0,063	n.s.
5	d2	549,00	276,50	689,25	120,00	98,00	256,25	Wilcoxon signed rank test	0,063	n.s.
5	d3	157,00	98,75	279,50	81,00	59,00	315,00	Wilcoxon signed rank test	0,625	n.s.
5	d6	141,00	84,50	152,75	16,00	12,00	23,50	Wilcoxon signed rank test	0,063	n.s.
5	d7	77,00	49,75	198,50	23,00	11,25	24,25	Wilcoxon signed rank test	0,063	n.s.

Tabelle A3: Statistischer Vergleich der Messung PBS versus TRIS 20 mmol/l + $CaCl_2$ xH_2O 0,6 g/l + $MgCl_2$ 0,2 g/l + Hirudin 2 µg/ml + Kollagen 40 µl im Verlauf

TRIS 20 mmol/l + $CaCl_2$ xH_2O 0,6 g/l + Hirudin 2 µg/ml

Absolute Werte im Verlauf

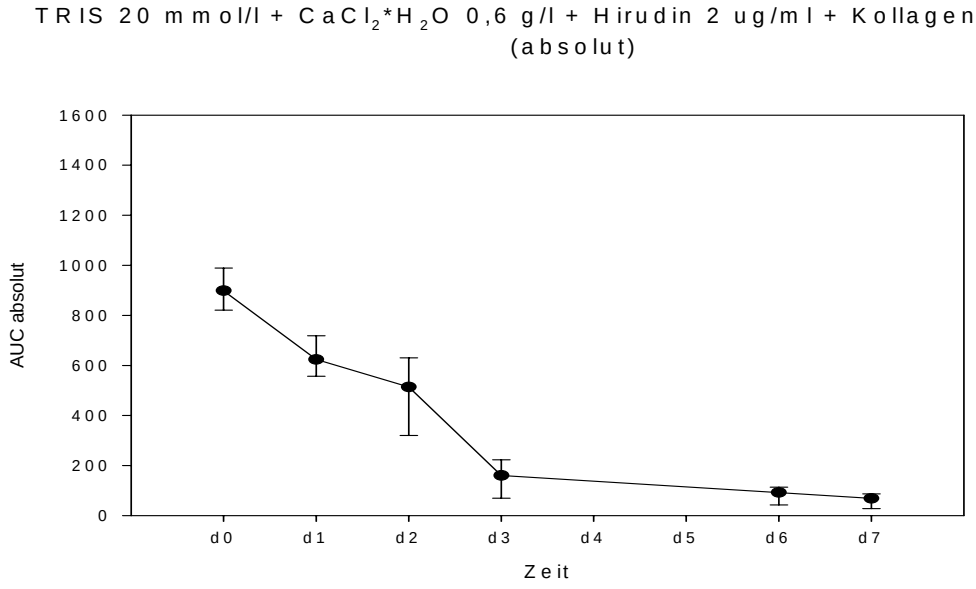


Abbildung A11: Darstellung der AUC, TRIS 20 mmol/l + $CaCl_2$ xH_2O 0,6 g/l + Hirudin 2µg/ml + Kollagen 40 µl, in absoluten Werten mit Mittelwert und +/- Standardabweichung, n=4

Relative Werte im Verlauf

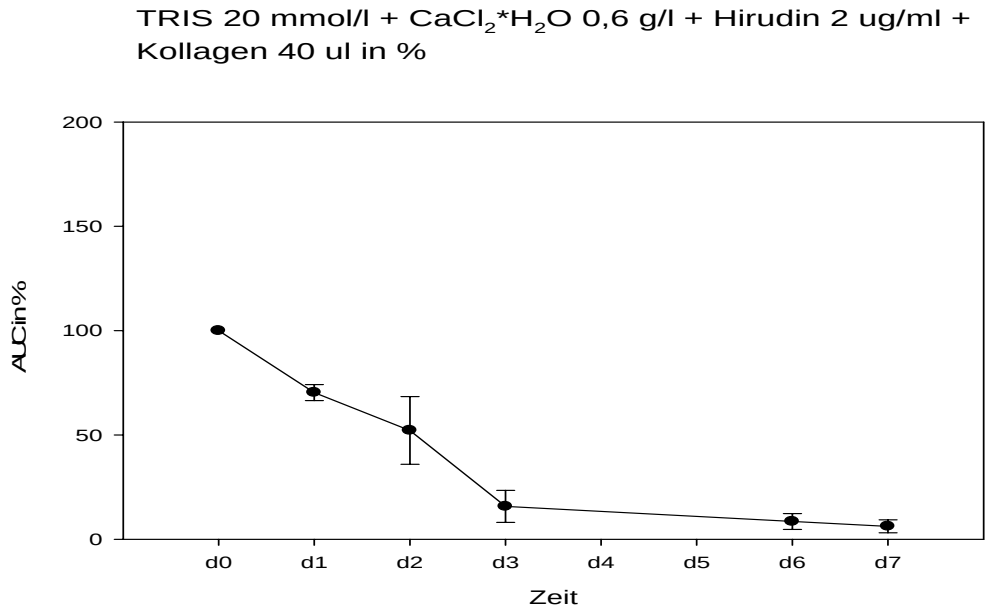


Abbildung A12: Darstellung der AUC, TRIS 20 mmol/l + $CaCl_2$ xH_2O 0,6 g/l + Hirudin 2µg/ml + Kollagen 40 µl, in relativen Werten mit Mittelwert und +/- Standardabweichung, n=4

Absolute Werte d0, d3, d7

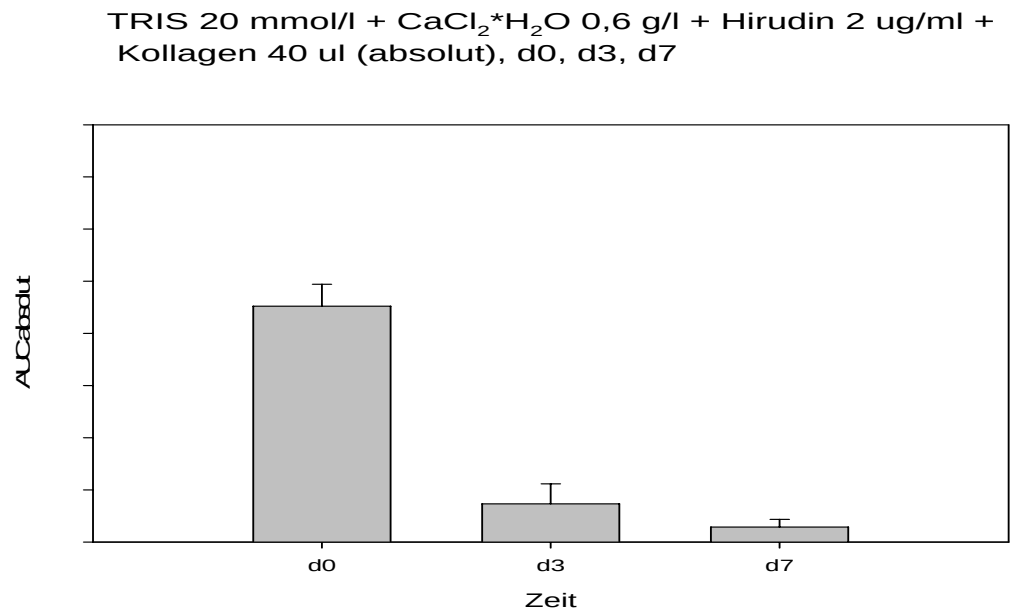


Abbildung 13: Darstellung der AUC, TRIS 20 mmol/l + $CaCl_2$ xH_2O 0,6 g/l + Hirudin 2µg/ml + Kollagen 40 µl, in absoluten Werten, n=4, d0, d3, d7

Statistischer Vergleich

Vergleich PBS versus TRIS 20 mmol/l + $CaCl_2$*H_2O 0,6 g/l + Hirudin 2 µg/ml (Startreagenz jeweils Kollagen 40 µl)										
n	Zeit	PBS			TRIS 20 mmol/l + $CaCl_2$*H_2O 0,6 g/l + Hirudin 2 µg/ml			Test	p-Wert	Signifikanz
		Median	25%	75%	Median	25%	75%		p <	
4	d0	922,00	818,00	1096,50	898,50	843,50	966,00	Wilcoxon signed rank test	0,625	n.s.
4	d1	527,50	415,00	658,00	624,00	571,00	704,00	Wilcoxon signed rank test	0,250	n.s.
4	d2	375,50	303,50	629,00	513,50	383,50	567,50	Wilcoxon signed rank test	0,875	n.s.
4	d3	139,00	103,00	400,50	160,50	89,50	203,50	Wilcoxon signed rank test	0,625	n.s.
4	d6	52,00	37,50	109,00	92,50	56,00	100,50	Wilcoxon signed rank test	1,000	n.s.
4	d7	70,50	41,50	75,00	69,00	40,00	75,00	Wilcoxon signed rank test	1,000	n.s.

Tabelle A4: Statistischer Vergleich der Messung PBS versus TRIS 20 mmol/l + $CaCl_2$ xH_2O 0,6 g/l + Hirudin 2 µg/ml + Kollagen 40 µl im Verlauf

TRIS 20 mmol/l + $CaCl_2$ xH_2O 2,0 g/l + Hirudin 2 µg/ml

Absolute Werte im Verlauf

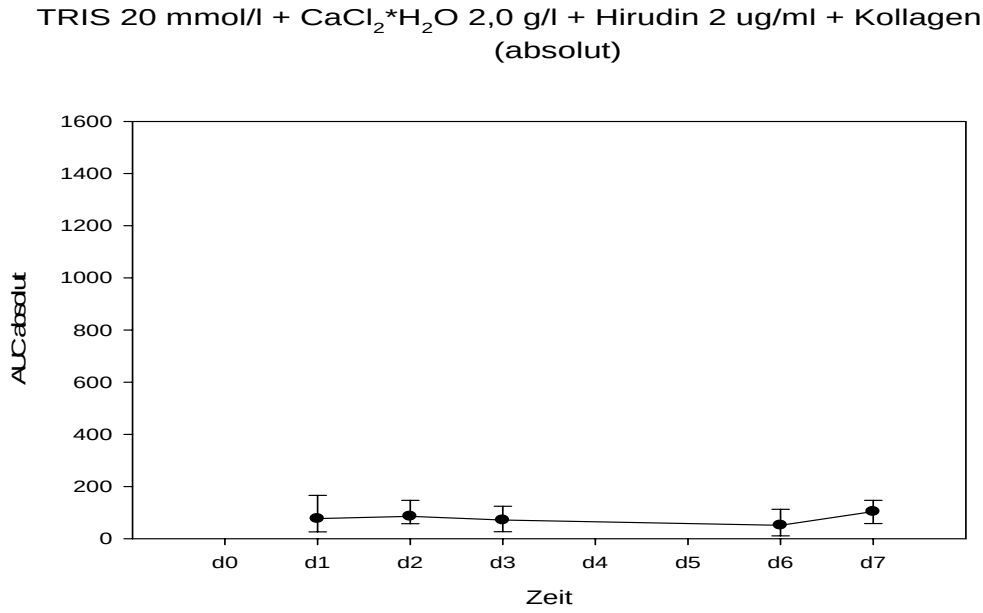


Abbildung A14: Darstellung der AUC, TRIS 20 mmol/l + $CaCl_2$ xH_2O 2,0 g/l + Hirudin 2 µg/ml + Kollagen 40 µl, in absoluten Werten mit Mittelwert und +/- Standardabweichung, n=8

Statistischer Vergleich

Vergleich PBS versus TRIS 20 mmol/l + $CaCl_2$*H_2O 2,0g/l + Hirudin 2 µg/ml (Startreagenz jeweils Kollagen 40 µl)									
n	**Zeit**	**PBS**			**TRIS 20 mmol/l + CaCl2*H2O 2,0g/l + Hirudin 2 µg/ml**			**Test**	**p-Wert**	**Signifikanz**
		Median	**25%**	**75%**	**Median**	**25%**	**75%**		p <	
8	d0	/	/	/	/	/	/	Wilcoxon signed rank test		
8	d1	633,50	300,00	875,00	77,00	49,00	112,50	Wilcoxon signed rank test	0,008	s.
8	d2	608,00	222,50	828,50	86,00	66,50	138,50	Wilcoxon signed rank test	0,008	s.
8	d3	288,00	164,50	526,00	71,50	36,00	99,00	Wilcoxon signed rank test	0,008	s.
8	d6	28,00	25,50	57,00	51,50	20,50	96,50	Wilcoxon signed rank test	0,547	n.s.
8	d7	58,00	32,00	86,00	104,00	69,50	135,50	Wilcoxon signed rank test	0,078	n.s.

Tabelle A5: Statistischer Vergleich der Messung PBS versus TRIS 20 mmol/l + $CaCl_2$ xH_2O 2,0 g/l + Hirudin 2 µg/ml + Kollagen 40 µl im Verlauf

Tyrodes + $CaCl_2$ xH_2O 0,3 g/l + $MgCl_2$ 0,2 g/l + Hirudin 2 µg/ml

Absolute Werte im Verlauf

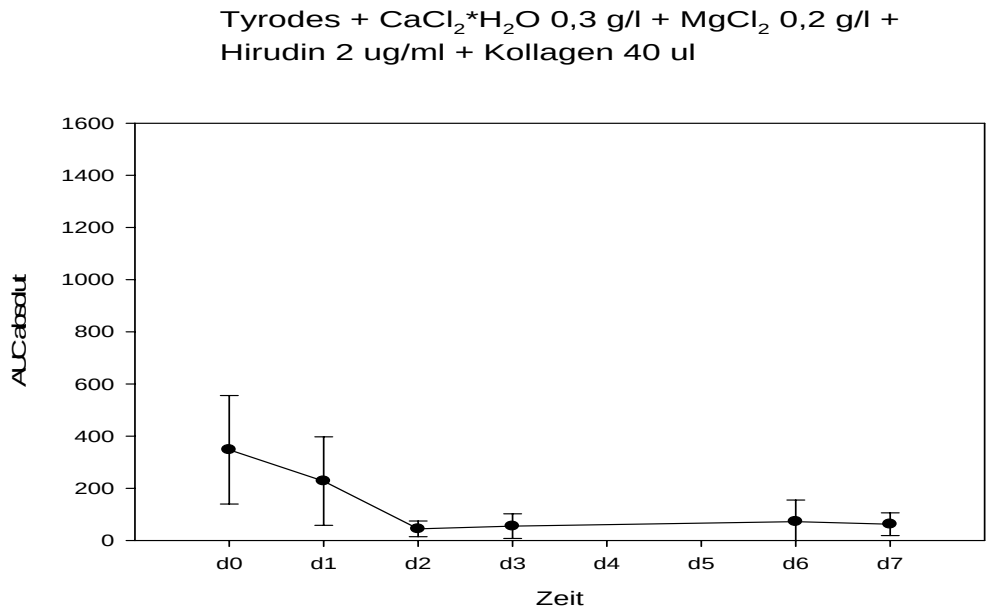


Abbildung A15: Darstellung der AUC, Tyrode + CaCl2 xH2O 0,3 g/l + MgCl2 0,2 g/l + Hirudin 2 µg/ml + Kollagen 40 µl, in absoluten Werten mit Mittelwert und +/- Standardabweichung, n=3

Relative Werte im Verlauf

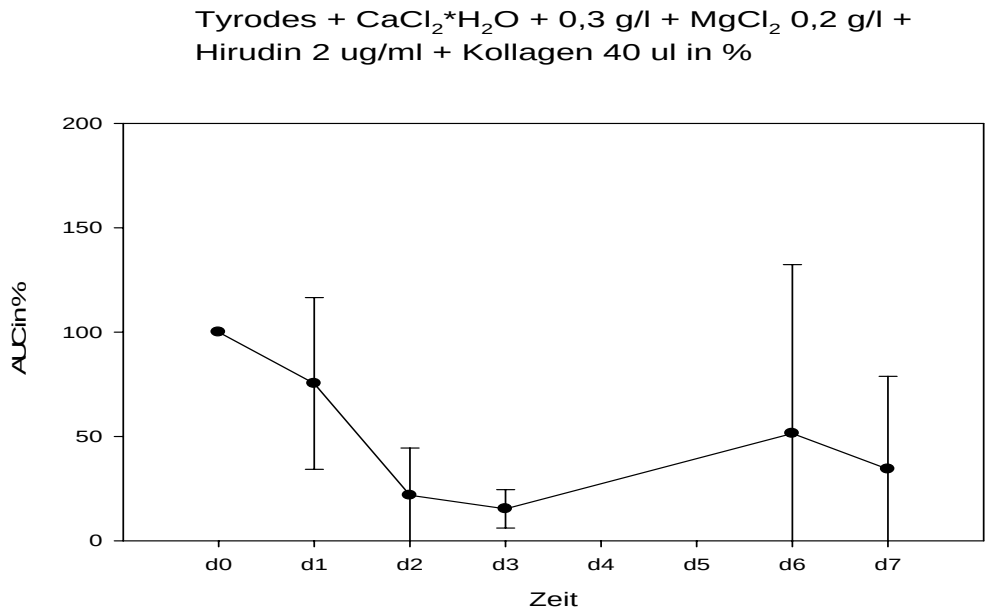


Abbildung A16: Darstellung der AUC, Tyrode + $CaCl_2$ xH2O 0,3 g/l + $MgCl_2$ 0,2 g/l + Hirudin 2 µg/ml + Kollagen 40 µl, in relativen Werten mit Mittelwert und +/- Standardabweichung, n=3

Absolute Werte d0, d3, d7

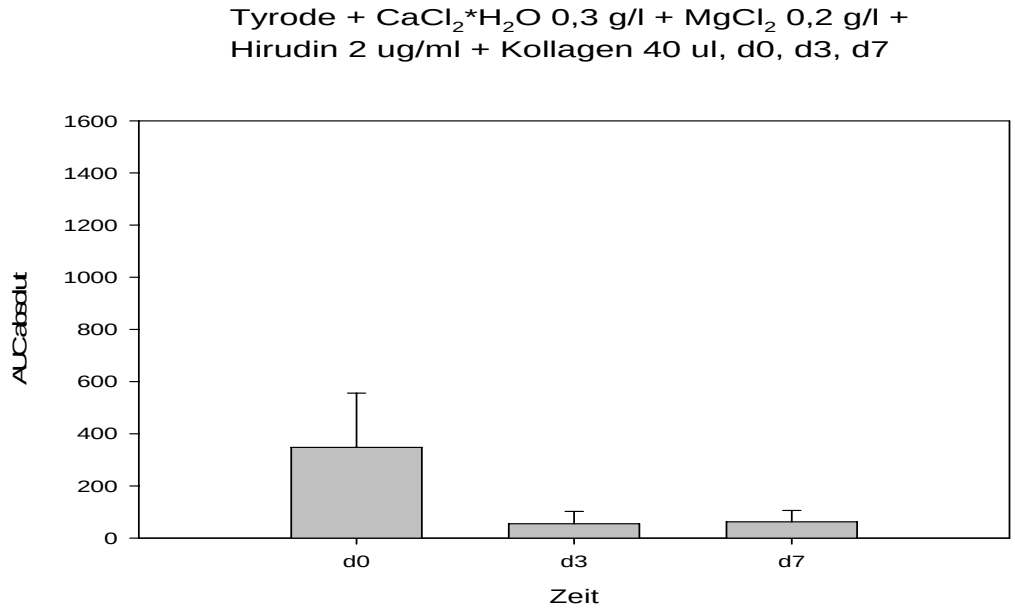


Abbildung A17: Darstellung der AUC, Tyrode + $CaCl_2$ xH_2O 0,3 g/l + $MgCl_2$ 0,2 g/l + Hirudin 2 µg/ml + Kollagen 40 µl, in absoluten Werten, n=3, d0, d3, d7

Statistischer Vergleich

Vergleich PBS versus Tyrode+ $CaCl_2$*H_2O 0,3g/l + $MgCl_2$ 0,2 g/l + Hirudin 2 µg/ml (Startreagenz jeweils Kollagen 40 µl)										
n	Zeit	PBS			Tyrode +$CaCl_2$*H_2O 0,3g/l + $MgCl_2$0,2g/l Hirudin 2 µg/ml			Test	p-Wert	Signifikanz
		Median	25%	75%	Median	25%	75%		p <	
3	d0	981,00	836,25	986,25	410,00	189,50	491,00	Wilcoxon signed rank test	0,250	n.s.
3	d1	660,00	605,25	945,00	131,00	129,50	350,75	Wilcoxon signed rank test	0,250	n.s.
3	d2	840,00	676,50	871,50	54,00	21,75	65,25	Wilcoxon signed rank test	0,250	n.s.
3	d3	279,00	268,50	447,75	46,00	21,25	91,00	Wilcoxon signed rank test	0,250	n.s.
3	d6	197,00	167,00	218,00	27,00	23,25	132,75	Wilcoxon signed rank test	0,500	n.s.
3	d7	114,00	77,25	196,50	74,00	29,00	92,75	Wilcoxon signed rank test	0,500	n.s.

Tabelle A6: Statistischer Vergleich der Messung PBS versus Tyrode 20 mmol/l + $CaCl_2$ xH_2O 0,3 g/l + $MgCl_2$ 0,2 g/l + Hirudin 2 µg/ml + Kollagen 40 µl im Verlauf

AB- Plasma + $CaCl_2$ xH_2O 1,5 g/l + Hirudin 2 µg/ml

Absolute Werte

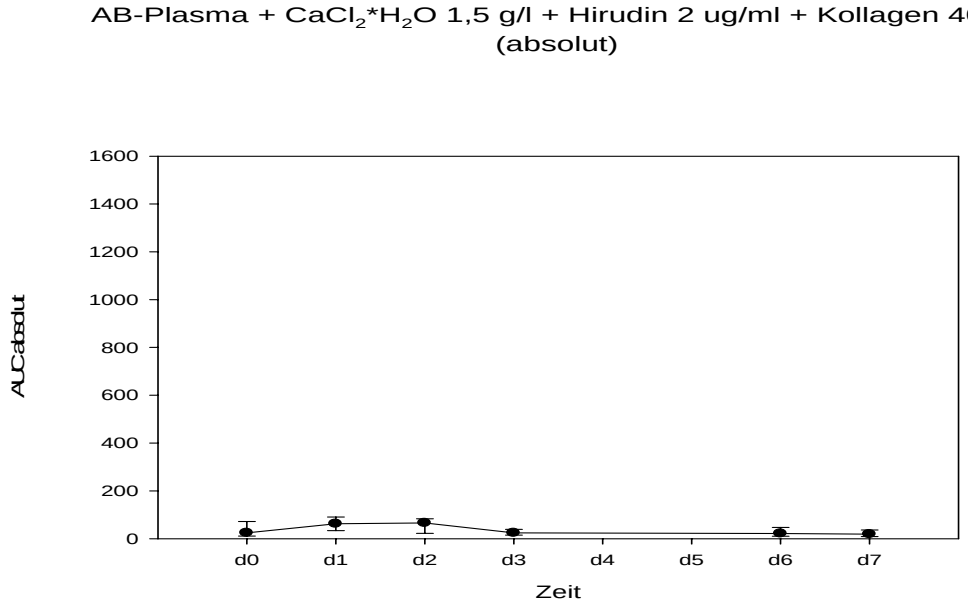


Abbildung A18: Darstellung der AUC, AB-Plasma + $CaCl_2$ xH_2O 1,5 g/l + Hirudin 2 µg/ml + Kollagen 40 µl, in absoluten Werten mit Mittelwert und +/- Standardabweichung, n=8

Relative Werte

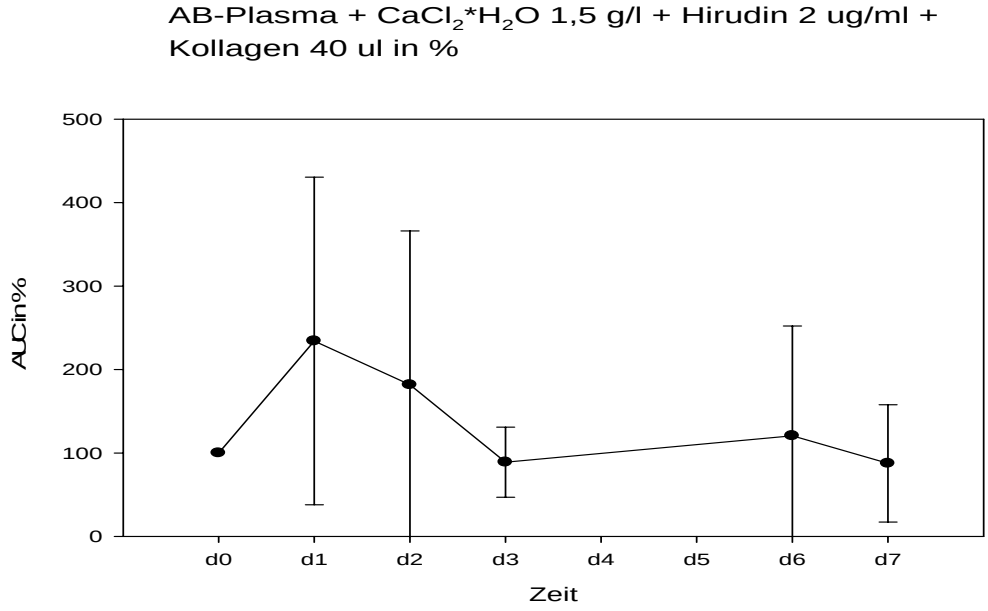


Abbildung A19: Darstellung der AUC, AB-Plasma + $CaCl_2$ xH_2O 1,5 g/l + Hirudin 2 µg/ml + Kollagen 40 µl, in relativen Werten mit Mittelwert und +/- Standardabweichung, n=8

Absolute Werte d0, d3, d7

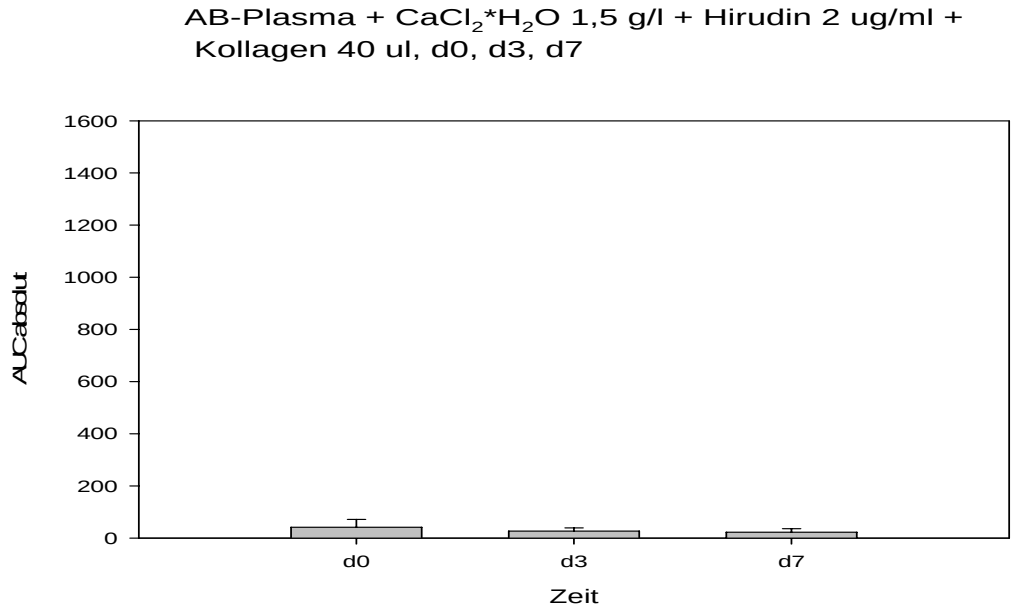


Abbildung A20: Darstellung der AUC, AB-Plasma + $CaCl_2$ xH_2O 1,5 g/l + Hirudin 2 µg/ml + Kollagen 40 µl, in absoluten Werten, n=8, d0, d3, d7

Statistischer Vergleich

Vergleich PBS versus AB-Plasma + $CaCl_2$*H_2O 1,5 g/l + Hirudin 2 µg/ml (Startreagenz jeweils Kollagen 40 µl)										
n	**Zeit**	**PBS**			**AB-Plasma + $CaCl_2$*H_2O 1,5 g/l + Hirudin 2 µg/ml**			**Test**	**p-Wert**	**Signifikanz**
		Median	**25%**	**75%**	**Median**	**25%**	**75%**		p <	
8	d0	1117,00	649,00	1291,50	24,50	19,00	72,00	Wilcoxon signed rank test	0,008	s.
8	d1	633,50	300,00	875,00	62,50	49,00	79,00	Wilcoxon signed rank test	0,008	s.
8	d2	608,00	222,50	828,50	65,50	20,50	74,50	Wilcoxon signed rank test	0,008	s.
8	d3	288,00	164,50	526,00	24,00	18,50	30,50	Wilcoxon signed rank test	0,008	s.
8	d6	28,00	25,50	57,00	22,00	18,00	35,50	Wilcoxon signed rank test	0,250	n.s.
8	d7	58,00	32,00	86,00	19,00	14,00	31,00	Wilcoxon signed rank test	0,039	s.

Tabelle A7: Statistischer Vergleich der Messung PBS versus AB-Plasma + $CaCl_2$ xH_2O 1,5 g/l + Hirudin 2 µg/ml + Kollagen 40 µl im Verlauf

PBS + Hirudin 2 µg/ml

Absolute Werte im Verlauf

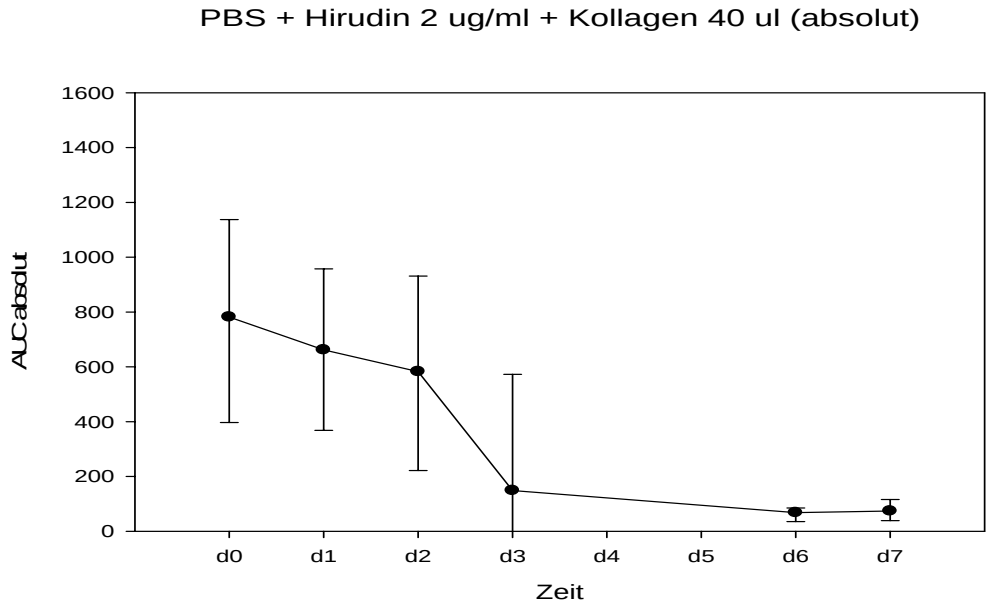


Abbildung A21: Darstellung der AUC, PBS + Hirudin 2 µg/ml + Kollagen 40 µl, in absoluten Werten mit Mittelwert und +/- Standardabweichung, n= 5

Relative Werte im Verlauf

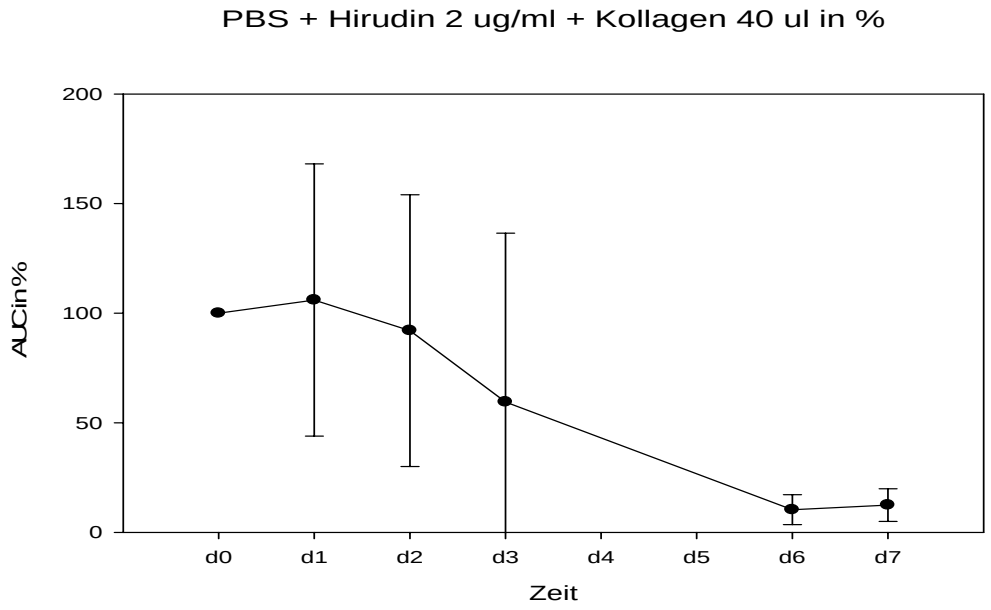


Abbildung A22: Darstellung der AUC, PBS + Hirudin 2 µg/ml + Kollagen 40 µl, in relativen Werten mit Mittelwert und +/- Standardabweichung, n= 5

Absolute Werte d0, d3, d7

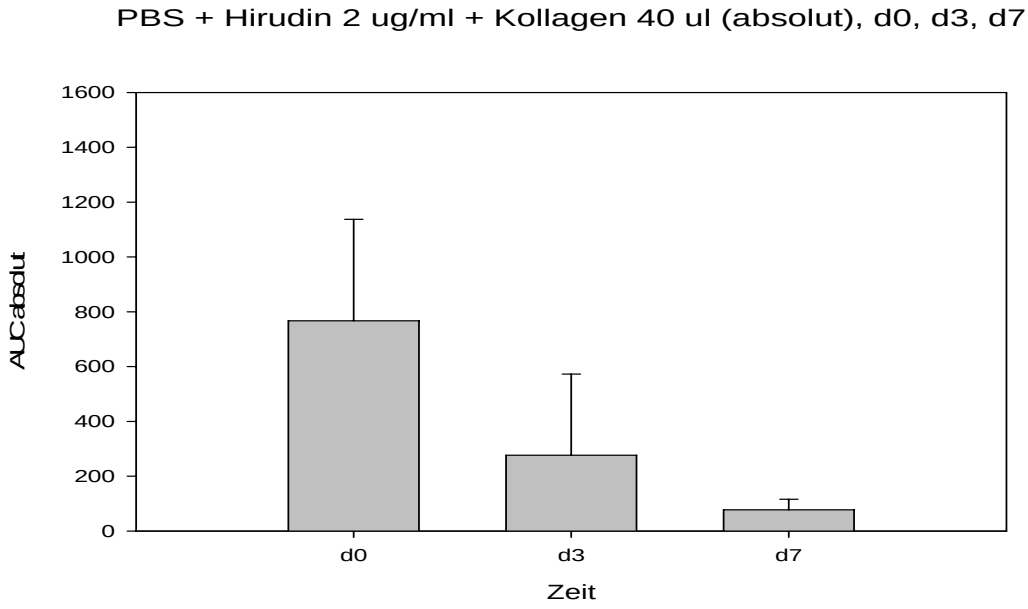


Abbildung A23: Darstellung der AUC, PBS + Hirudin 2 µg/ml + Kollagen 40 µl, in absoluten Werten, d0, d3, d7, n= 5

Statistischer Vergleich

Vergleich PBS versus PBS + Hirudin 2 µg/ml (Startreagenz jeweils Kollagen 40 µl)										
n	Zeit	PBS			PBS + Hirudin 2 µg/ml			Test	p-Wert	Signifikanz
		Median	25%	75%	Median	25%	75%		p <	
5	d0	782,00	612,75	1039,25	739,00	544,00	955,75	Wilcoxon signed rank test	1,000	n.s.
5	d1	739,00	544,00	955,75	662,00	381,75	947,00	Wilcoxon signed rank test	0,125	n.s.
5	d2	549,00	276,50	689,25	583,00	272,50	840,25	Wilcoxon signed rank test	0,313	n.s.
5	d3	157,00	98,75	279,50	149,00	110,00	423,25	Wilcoxon signed rank test	0,625	n.s.
5	d6	141,00	84,50	152,75	68,00	34,50	82,50	Wilcoxon signed rank test	0,125	n.s.
5	d7	77,00	49,75	198,50	74,00	46,00	101,00	Wilcoxon signed rank test	0,813	n.s.

Tabelle A8: Statistischer Vergleich der Messung PBS versus , PBS + Hirudin 2 µg/ml + Kollagen 40 µl im Verlauf

TRIS 20 mmol/l + $CaCl_2$ xH_2O 25 mmol/l, bzw. 50 mmol/l + Hirudin 2 µg/ml

Absolute Werte

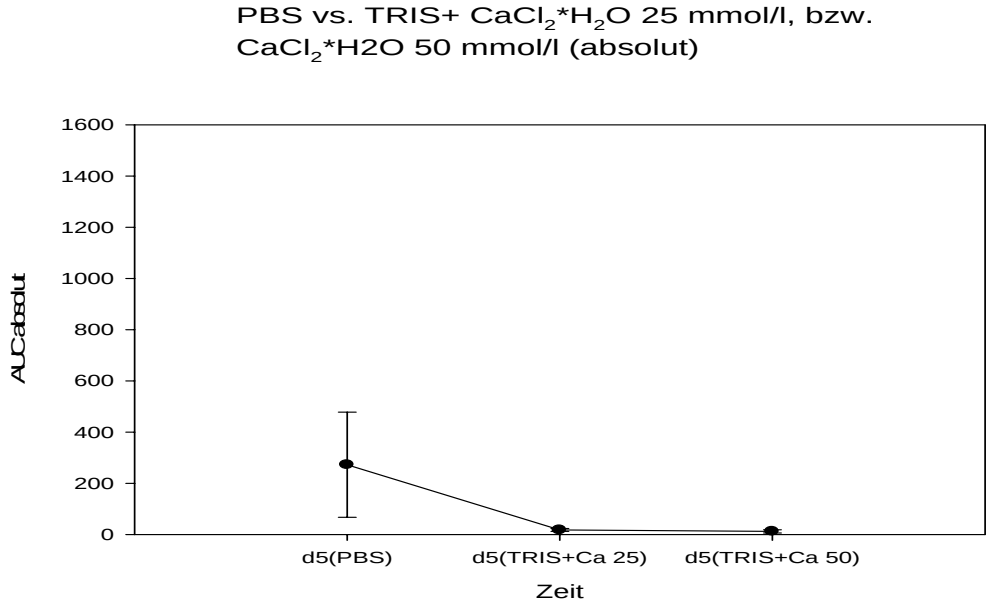


Abbildung A24: Darstellung der AUC, PBS, TRIS + Ca 25 mmol/l, TRIS + 50 mmol/l + Kollagen 40 µl, in absoluten Werten mit Mittelwert und +/- Standardabweichung, n=12

Statistischer Vergleich

Vergleich PBS versus TRIS 20 mmol/l + $CaCl_2$*H_2O 25 mmol/l (Startreagenz jeweils Kollagen 40 µl)										
n	Zeit	PBS			TRIS 20 mmol/l + $CaCl_2$*H_2O 25 mmol/l			Test	p-Wert	Signifikanz
		Median	25%	75%	Median	25%	75%		p <	
12	d5	201,00	128,00	330,00	17,50	15,50	22,00	Wilcoxon signed rank test	0,001	s.

Tabelle A9: Statistischer Vergleich der Messung PBS versus TRIS 20 mmol/l + $CaCl_2$ xH_2O 25 mmol/l + Hirudin 2 µg/ml, n=12

Vergleich PBS versus TRIS 20 mmol/l + $CaCl_2$*H_2O 50 mmol/l (Startreagenz jeweils Kollagen 40 µl)										
n	Zeit	PBS			TRIS 20 mmol/l + $CaCl_2$*H_2O 50 mmol/l			Test	p-Wert	Signifikanz
		Median	25%	75%	Median	25%	75%		p <	
12	d5	201,00	128,00	330,00	13,00	9,00	15,50	Wilcoxon signed rank test	0,001	s.

Tabelle A10: Statistischer Vergleich der Messung PBS versus TRIS 20 mmol/l + $CaCl_2$ xH_2O 50 mmol/l + Hirudin 2 µg/ml, n=12

Ergebnisse Multiplate Abnahme-Verfall

Absolute Werte

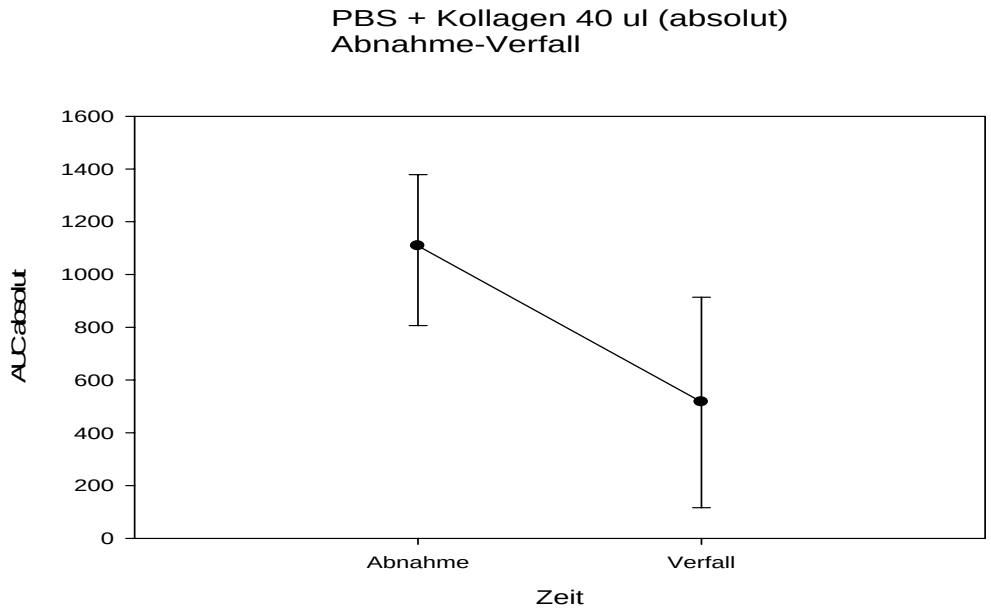


Abbildung A25: Darstellung der AUC, Abnahme-Verfall, PBS + Kollagen 40 µl, in absoluten Werten mit Mittelwert und +/- Standardabweichung, n=268

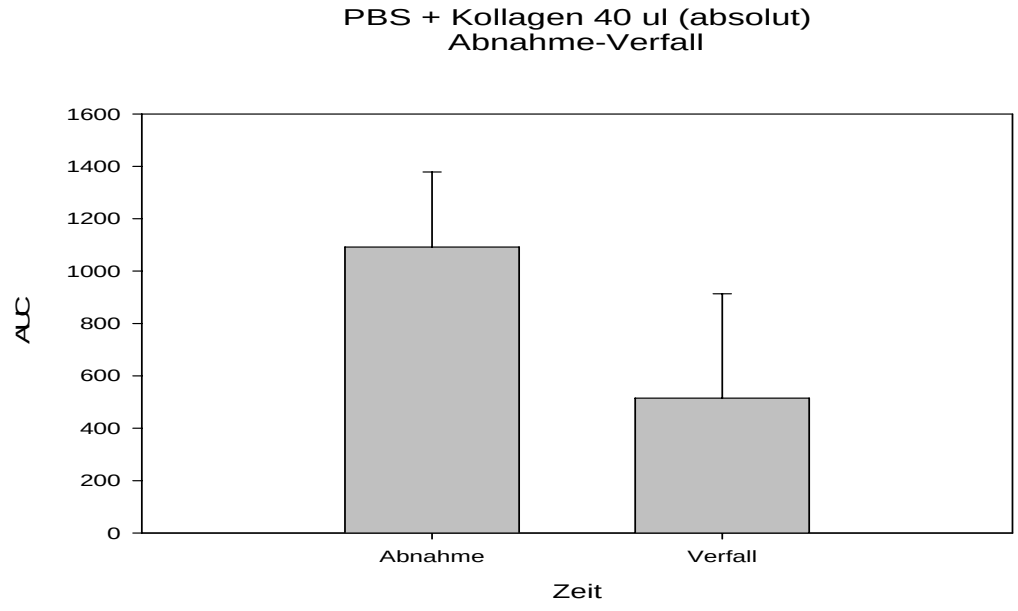


Abbildung A26: Darstellung der AUC, Abnahme-Verfall, PBS + Kollagen 40 µl, in absoluten Werten mit Mittelwert und +/- Standardabweichung, n=268

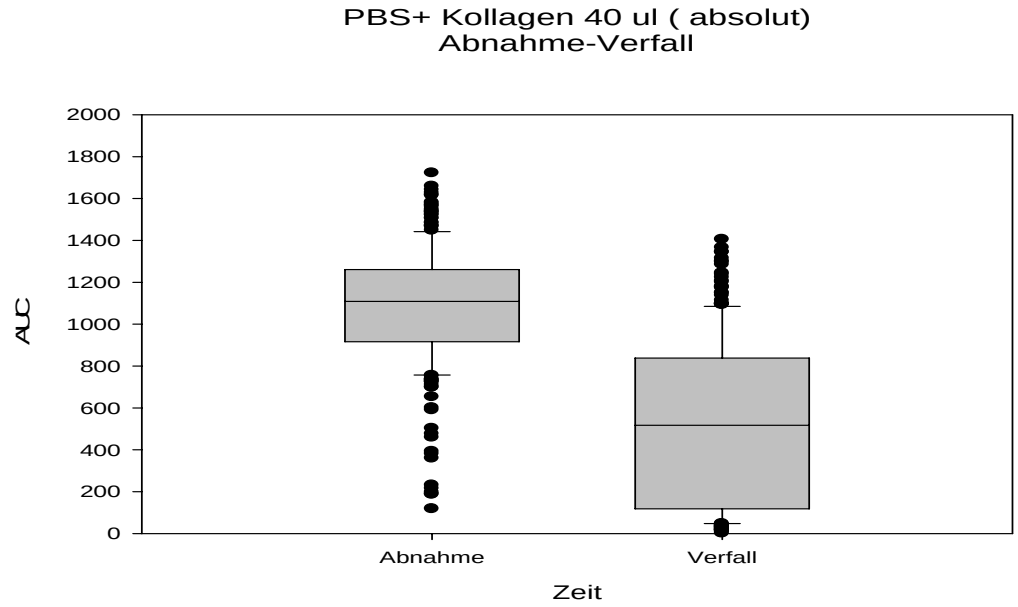


Abbildung A27: Darstellung der AUC, Abnahme-Verfall, PBS + Kollagen 40 µl, in absoluten Werten mit Mittelwert und +/- Standardabweichung, n=268

Relative Werte

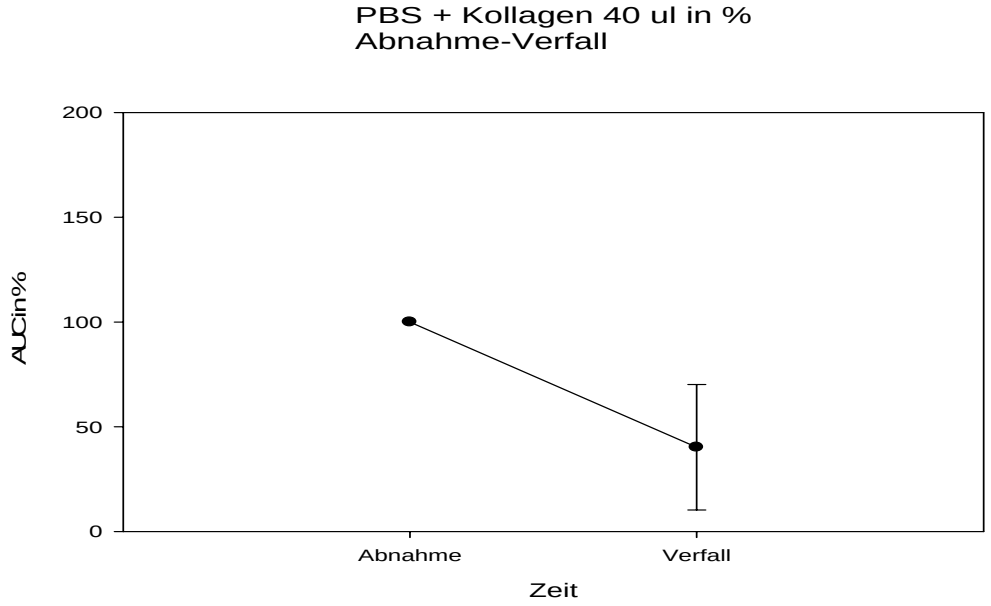


Abbildung A28: Darstellung der AUC, Abnahme-Verfall, PBS + Kollagen 40 µl, in relativen Werten mit Mittelwert und +/- Standardabweichung, n=268

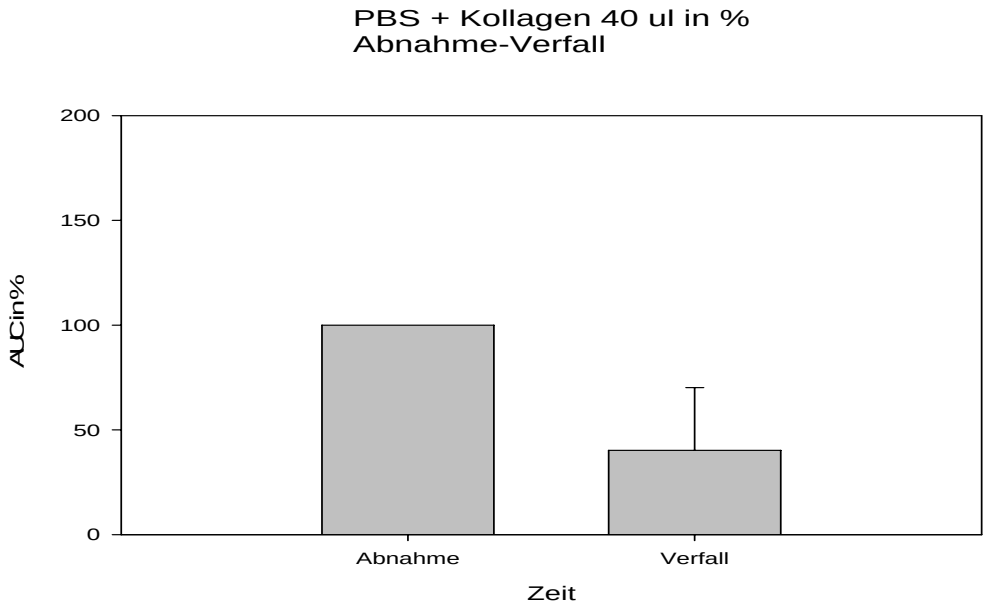


Abbildung A29: Darstellung der AUC, Abnahme-Verfall, PBS + Kollagen 40 µl, in relativen Werten mit Mittelwert und +/- Standardabweichung, n=268

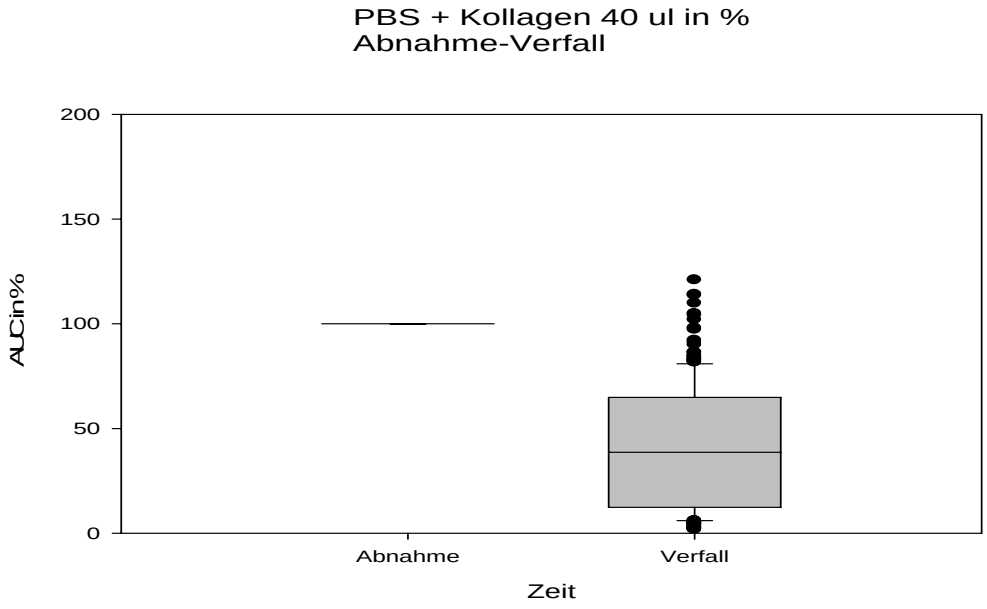


Abbildung A30: Darstellung der AUC, Abnahme-Verfall, PBS + Kollagen 40 µl, in relativen Werten mit Mittelwert und +/- Standardabweichung, n=268

Versuchsreihe Konzentration Startreagenz

PBS + Kollagen 40 µl

Absolute Werte

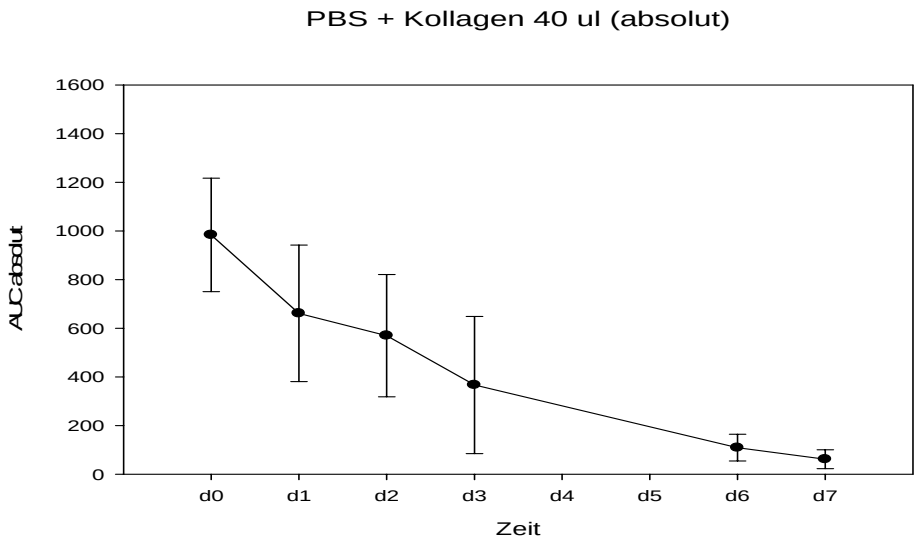


Abbildung A31: Darstellung der AUC, PBS + Kollagen 40 µl, in absoluten Werten mit Mittelwert und +/- Standardabweichung, n=41

Relative Werte

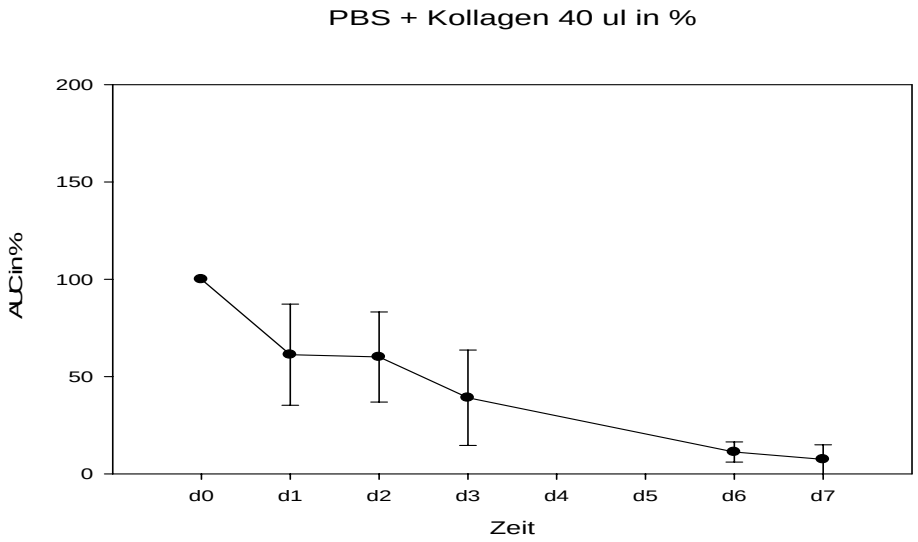


Abbildung A32: Darstellung der AUC, PBS + Kollagen 40 µl, in relativen Werten mit Mittelwert und +/- Standardabweichung, n=41

Absolute Werte d0, d3, d7

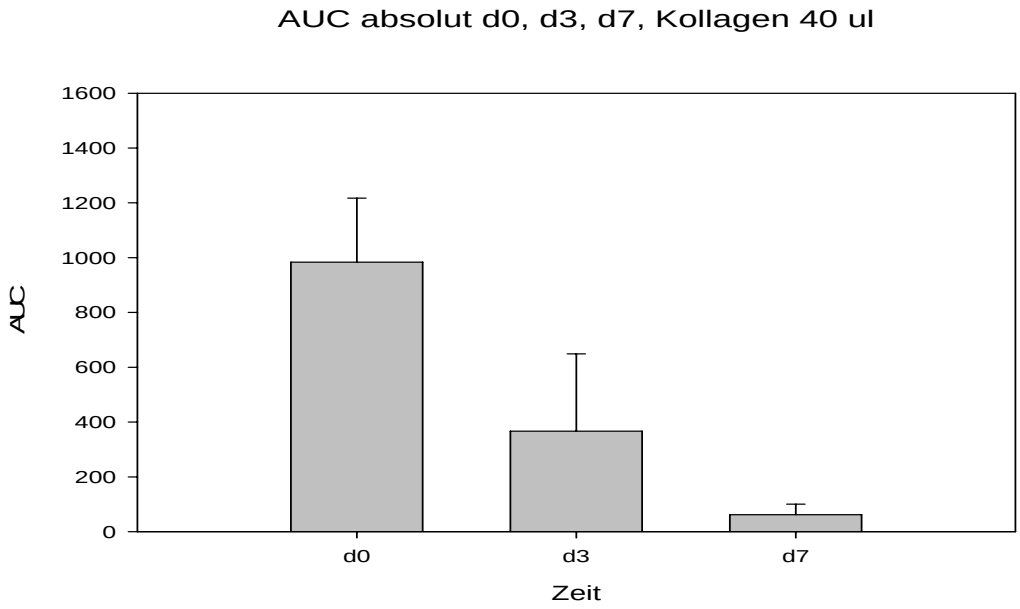


Abbildung A33: Darstellung der AUC, PBS + Kollagen 40 µl an d0, d3, d7mit Mittelwert und +/- Standard-abweichung, n=41

PBS + Kollagen 60 µl

Absolute Werte

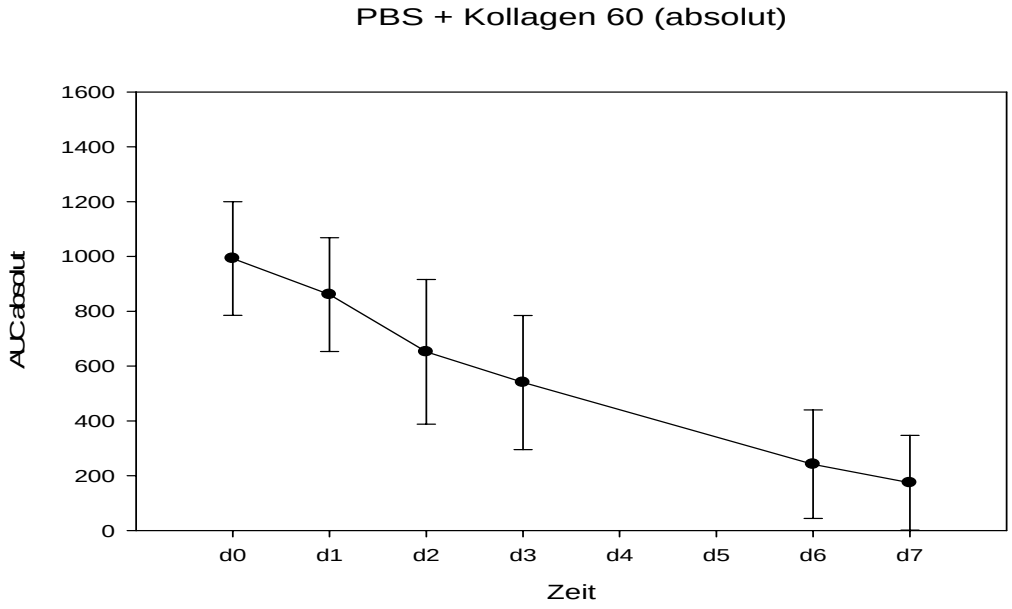


Abbildung A34: Darstellung der AUC in absoluten Werten, PBS + Kollagen 60 µl, mit Mittelwert und +/- Standardabweichung, n=41

Relative Werte

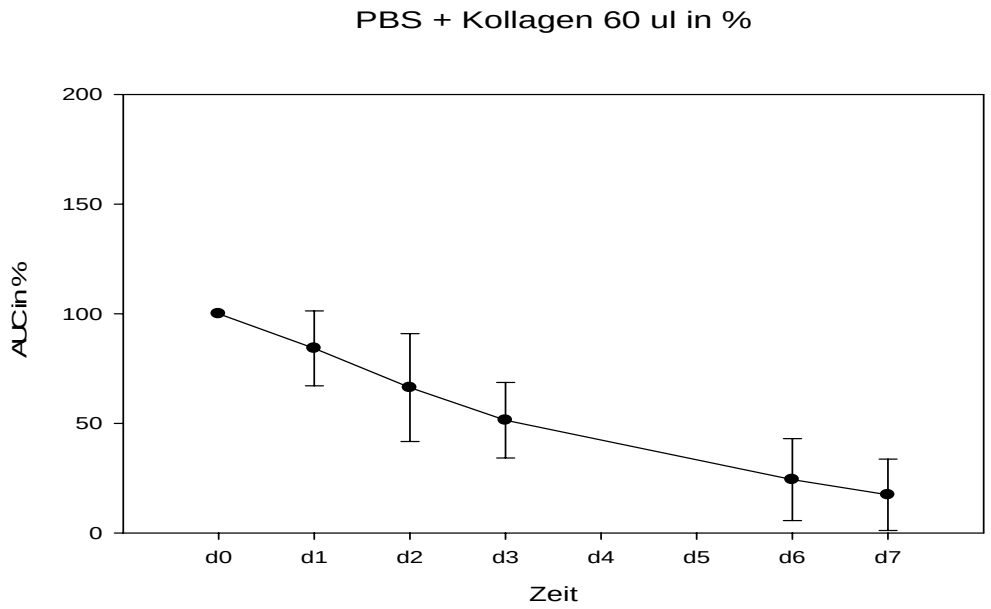


Abbildung A35: Darstellung der AUC, PBS + Kollagen 60 µl, in relativen Werten mit Mittelwert und +/- Standardabweichung, n=41

Absolute Werte d0, d3, d7

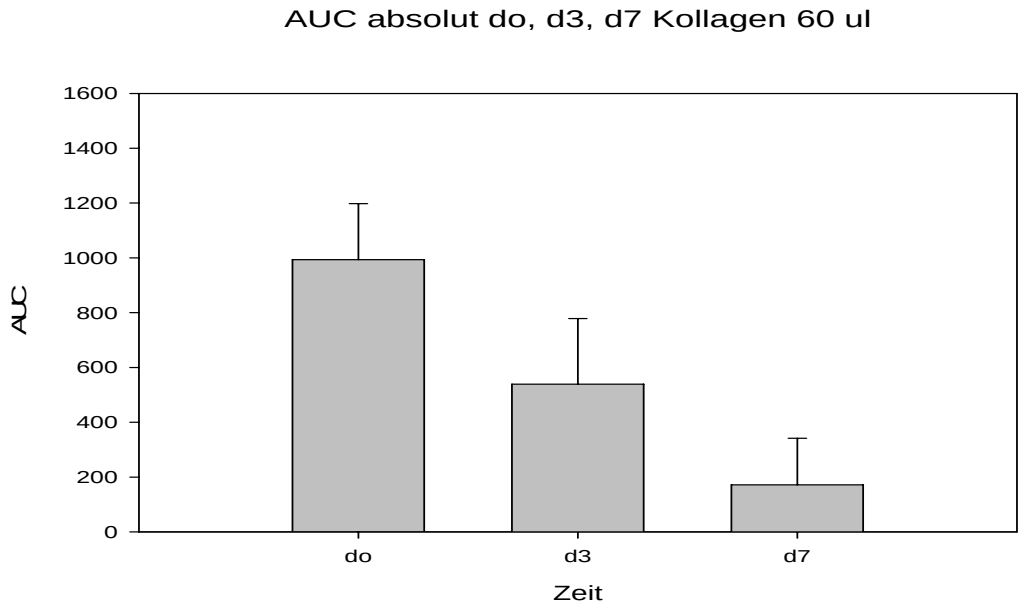


Abbildung A36: Darstellung der AUC, PBS + Kollagen 60 µl an d0, d3, d7mit Mittelwert und +/- Standard-abweichung, n=41

Statistischer Vergleich

Vergleich Stimulation mit zwei Kollagenkonzentrationen									
n	Zeit	Kollagen 40 µl (= 4 µg)			Kollagen 60 µl (= 6 µg)			Test	p-Wert	Signifikanz
		Median	25%	75%	Median	25%	75%		p <	
37	d0	1069,00	856,50	1139,75	1015,00	888,25	1121,75	Wilcoxon signed rank test	0,433	n.s.
25	d1	668,00	391,25	908,75	853,00	797,50	984,50	Wilcoxon signed rank test	0,001	s.
41	d2	631,00	410,50	805,25	708,00	483,00	828,75	Wilcoxon signed rank test	0,003	s.
25	d3	209,00	117,00	668,75	512,00	350,75	728,75	Wilcoxon signed rank test	0,001	s.
41	d6	107,00	61,50	154,75	149,00	87,75	360,50	Wilcoxon signed rank test	0,001	s.
25	d7	51,00	31,75	93,25	98,00	63,75	190,00	Wilcoxon signed rank test	0,001	s.

Tabelle A11: Statistischer Vergleich der Messung mit zwei verschiedenen Kollagenkonzentrationen (40 µl= 4 µg versus 60 µl = 6 µg)

Vergleich ‘Multiplate®‘ mit der Standardmethode ‘Born-Aggregation‘

Ergebnisse der Messung nach Born

Kollagen 0,8 µg/ml

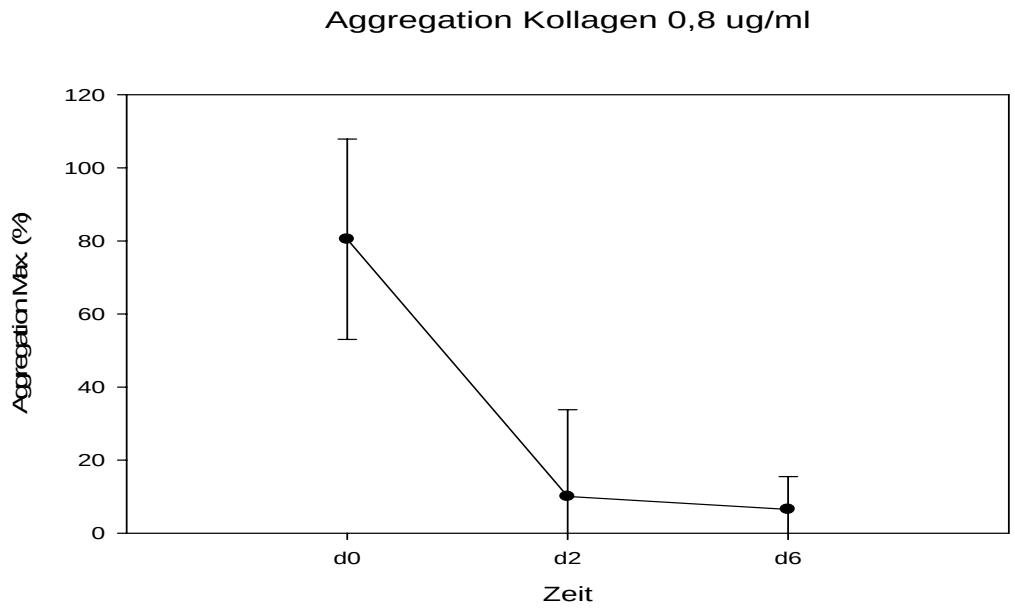


Abbildung A37: Darstellung der Aggregation nach Born, Kollagen 0,8 µg/ml, mit Mittelwert und +/- Standardabweichung, n=20

Kollagen 1,0 µg/ml

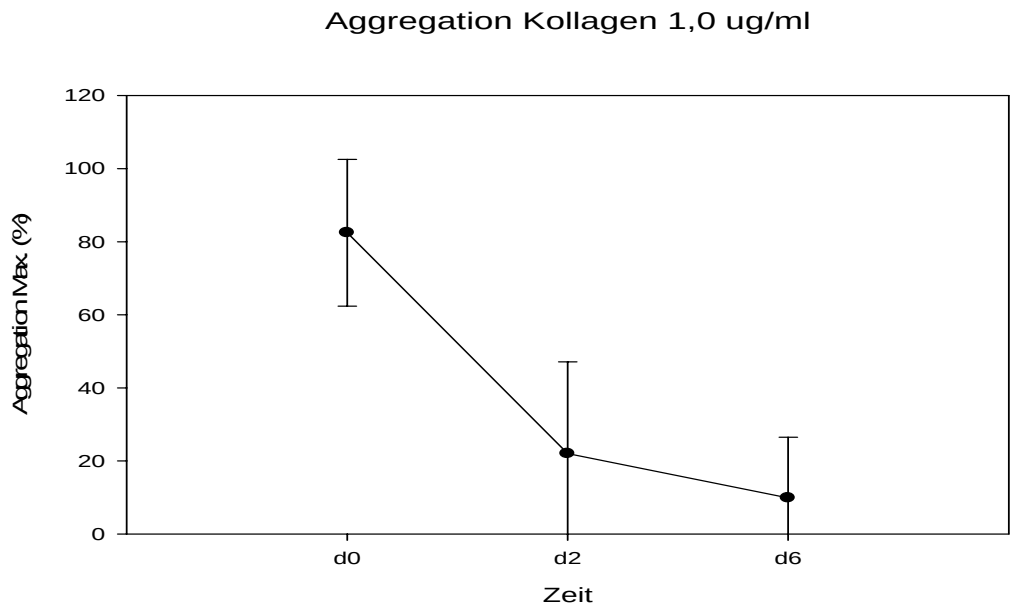


Abbildung A38: Darstellung der Aggregation nach Born, Kollagen 1,0 µg/ml, mit Mittelwert und +/- Standardabweichung, n=20

Ergebnisse der Multiplate®-Messung mit Kollagen 40 µl

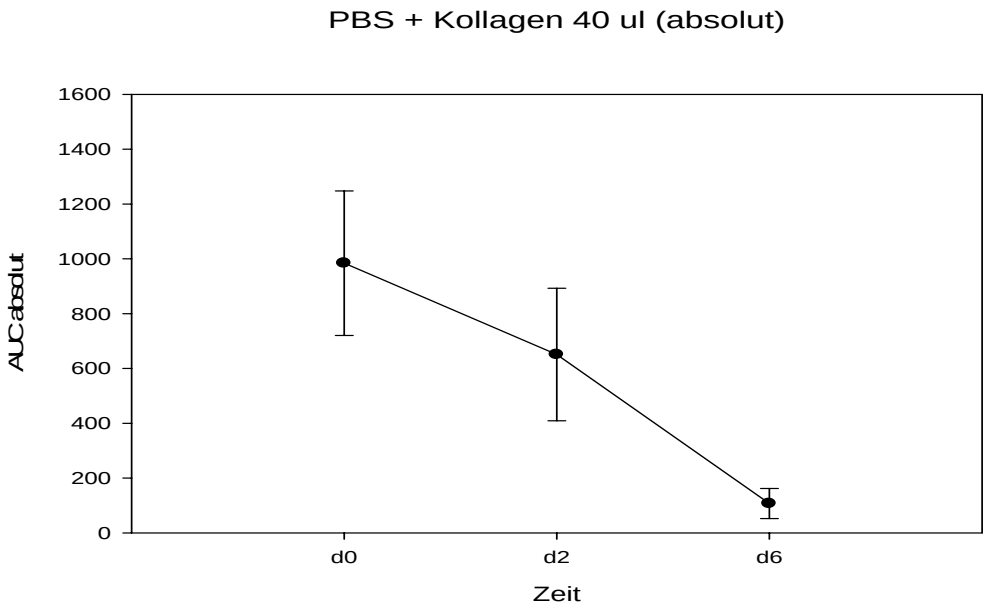


Abbildung A39: Darstellung der AUC in absoluten Werten, PBS + Kollagen 60 µl, mit Mittelwert und +/- Standardabweichung, n=20

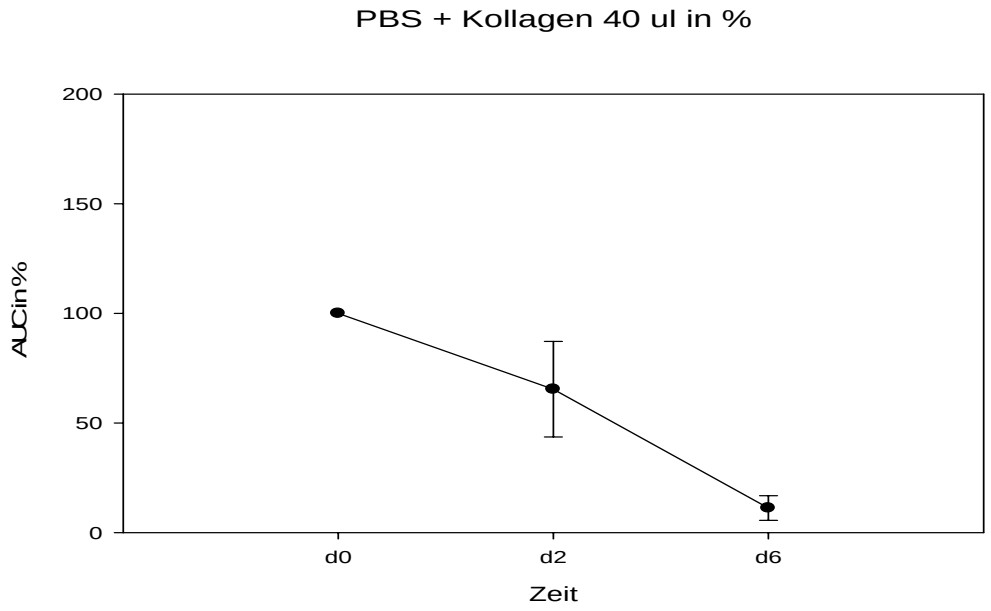


Abbildung A40: Darstellung der AUC in absoluten Werten, PBS + Kollagen 60 µl, mit Mittelwert und +/- Standardabweichung, n=20

Darstellung der Unterschiede Born-Multiplate®

- Born:

Kollagen 0,8 µg/ml	d0	d2	d6
Mittelwert	80,45	10,03	6,53
Standardabweichung	27,41	23,78	8,97
Median	88,97	3,27	4,00
Range min	1,40	0,83	1,95
max	98,53	106,77	40,55

Tabelle A11: Darstellung der statistischen Parameter der Born-Messung mit Kollagen 0,8 µg/ml in absoluten Zahlen, n=20

Kollagen 0,8 µg/ml	d0	d2	d6
Mittelwert	100 %	12,47 %	8,12 %
Standardabweichung	100 %	86,76 %	32,73 %
Median	100 %	3,68 %	4,50 %
Range min	100 %	59,29 %	139,29 %
max	100 %	108,36 %	41,15 %

Tabelle A12: Darstellung der statistischen Parameter der Born-Messung mit Kollagen 0,8 µg/ml in relativen Zahlen, n=20

Kollagen 1,0 µg/ml	d0	d2	d6
Mittelwert	82,45	22,01	9,87
Standardabweichung	20,11	25,08	16,64
Median	87,69	16,82	3,85
Range min	4,64	0,81	1,55
max	100,43	99,89	48,15

Tabelle A13: Darstellung der statistischen Parameter der Born-Messung mit Kollagen 1,0 µg/ml in absoluten Zahlen, n=20

Kollagen 1,0 µg/ml	d0	d2	d6
Mittelwert	100 %	26,69 %	11,97 %
Standardabweichung	100 %	124,71 %	82,74 %
Median	100 %	19,18 %	4,39 %
Range min	100 %	17,46 %	33,41 %
max	100 %	99,46 %	47,94 %

Tabelle A14: Darstellung der statistischen Parameter der Born-Messung mit Kollagen 1,0 µg/ml in relativen Zahlen, n=20

- Multiplate®:

Kollagen 40 µl	d0	d2	d6
Mittelwert	984,15	651,05	107,25
Standardabweichung	263,86	242	54,75
Median	1014,5	727	107,5
Range min	711	130	24
max	1352	898	184

Tabelle A15: Darstellung der statistischen Parameter der Multiplate®-Messung mit Kollagen 40 µl in absoluten Zahlen, n=20

Kollagen 40 µl	d0	d2	d6
Mittelwert	100 %	66,15 %	10,90 %
Standardabweichung	100 %	91,72 %	20,75 %
Median	100 %	71,66 %	10,60 %
Range min	100 %	18,28 %	3,38 %
max	100 %	66,42 %	13,61 %

Tabelle A16: Darstellung der statistischen Parameter der Multiplate®-Messung mit Kollagen 40 µl in relativen Zahlen, n=20

Ergebnisse der Säure-Basen- Messung

Messung im Verlauf

pH-Messung

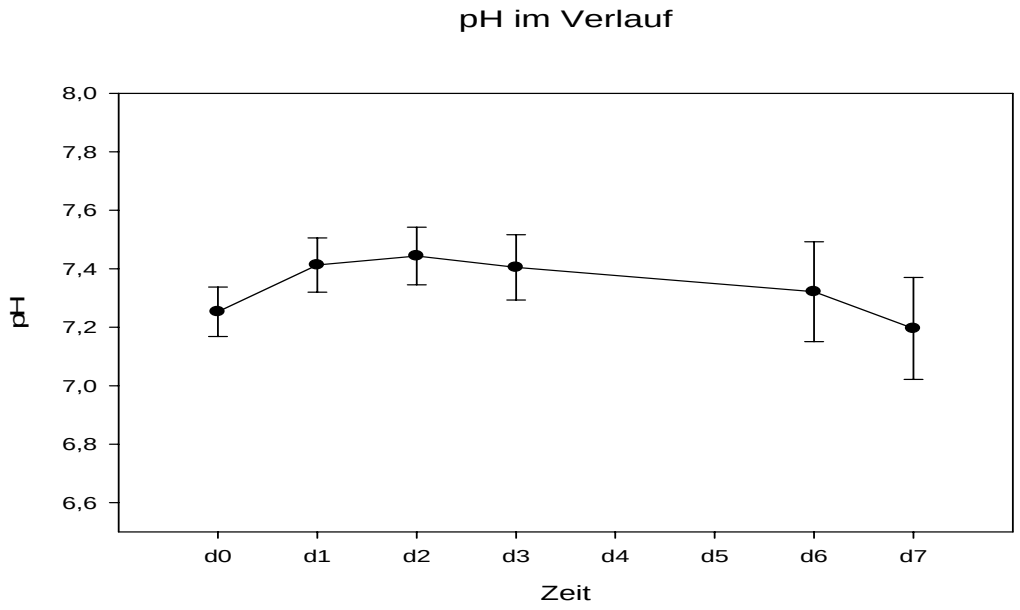


Abbildung A41: Darstellung des pH-Werts im Verlauf in absoluten Werten, mit Mittelwert und +/- Standardabweichung, n=81

pCO_2-Messung

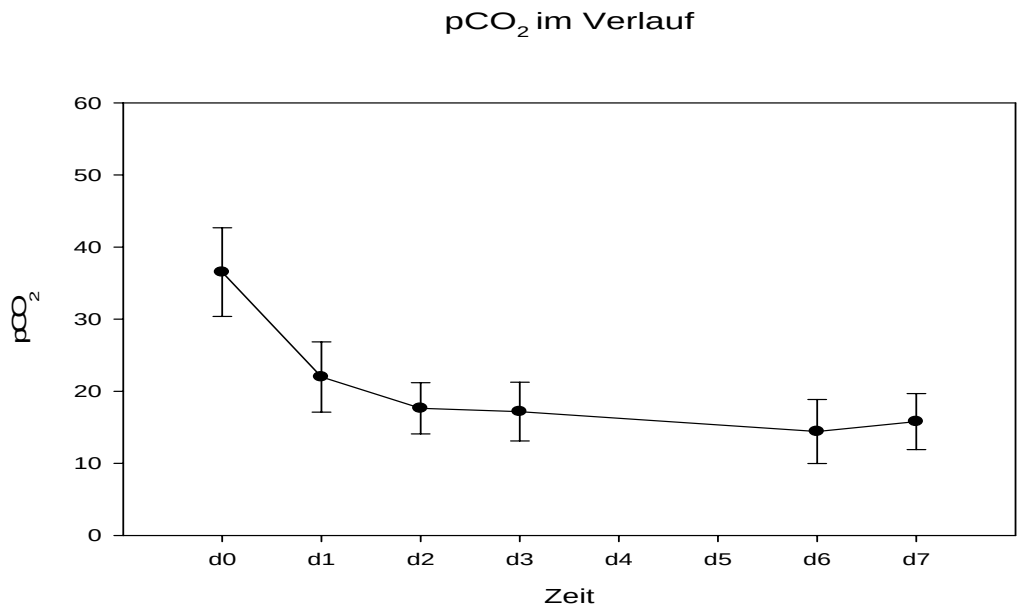


Abbildung A42: Darstellung des pCO_2-Werts im Verlauf in absoluten Werten, mit Mittelwert und +/- Standardabweichung, n=81

pO_2- Messung

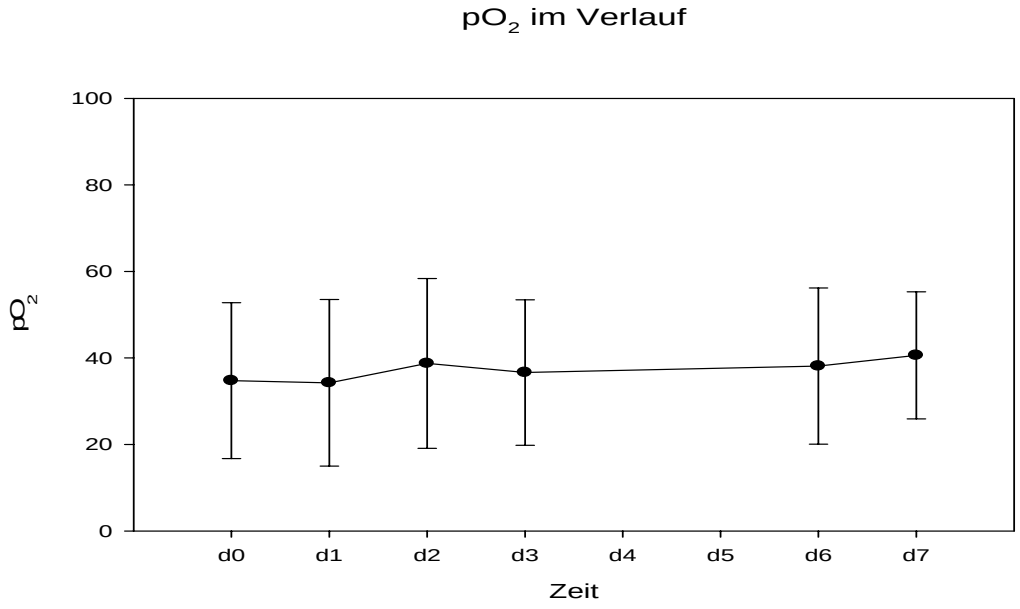


Abbildung A43: Darstellung des pO_2-Werts im Verlauf in absoluten Werten, mit Mittelwert und +/- Standardabweichung, n=81

cHCO$_3$- Messung

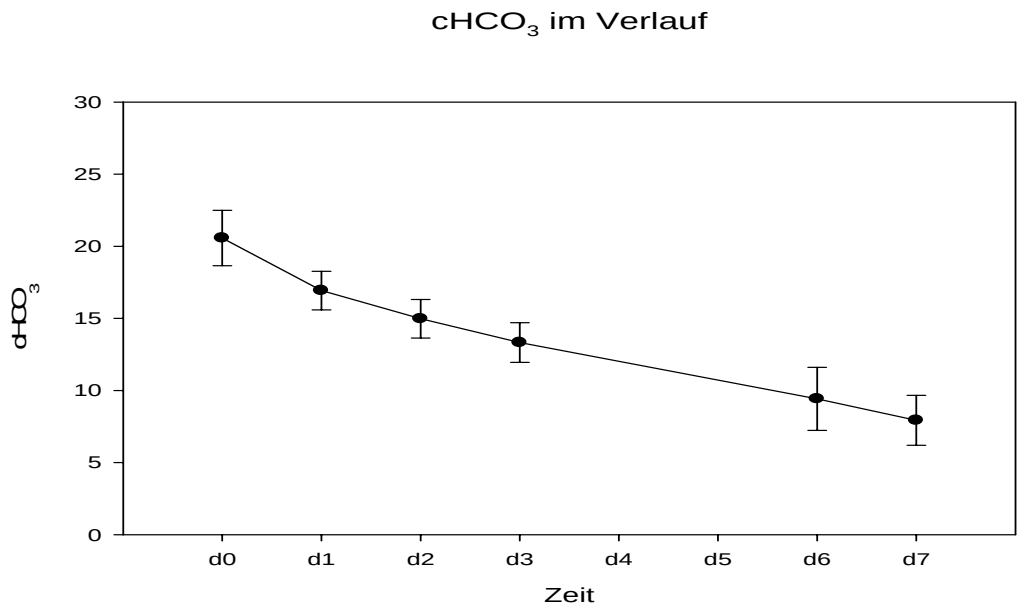


Abbildung A44: Darstellung des cHCO$_3$-Werts im Verlauf in absoluten Werten, mit Mittelwert und +/- Standardabweichung, n=81

Base Excess- Messung

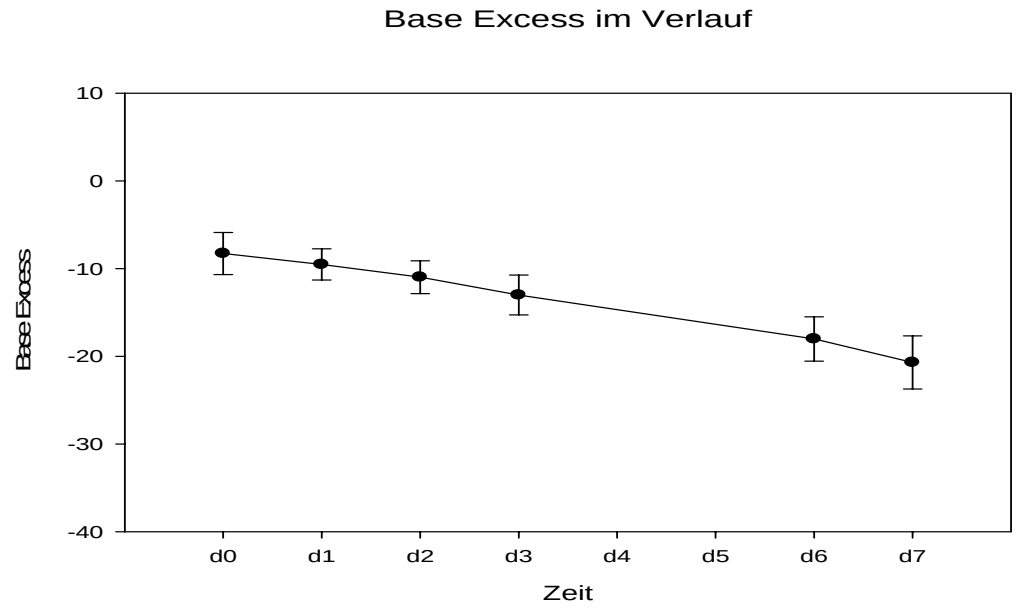


Abbildung A45: Darstellung des Base-Excess-Werts im Verlauf in absoluten Werten, mit Mittelwert und +/- Standardabweichung, n=81

Messung Abnahme-Verfall

pH- Messung

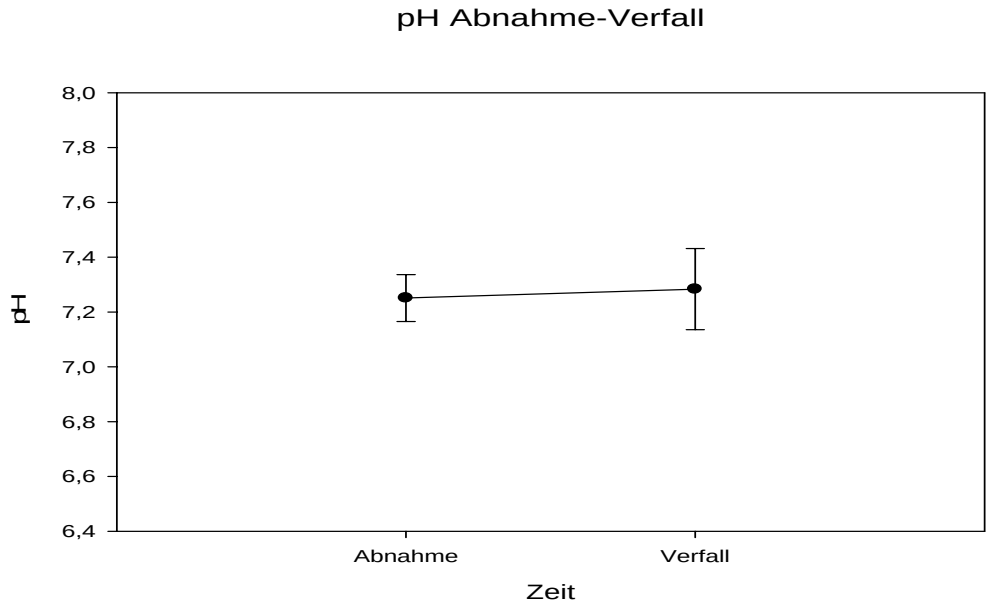


Abbildung A46: Darstellung des pH-Werts Abnahme-Verfall in absoluten Werten, mit Mittelwert und +/- Standardabweichung, n=268

pCO_2- Messung

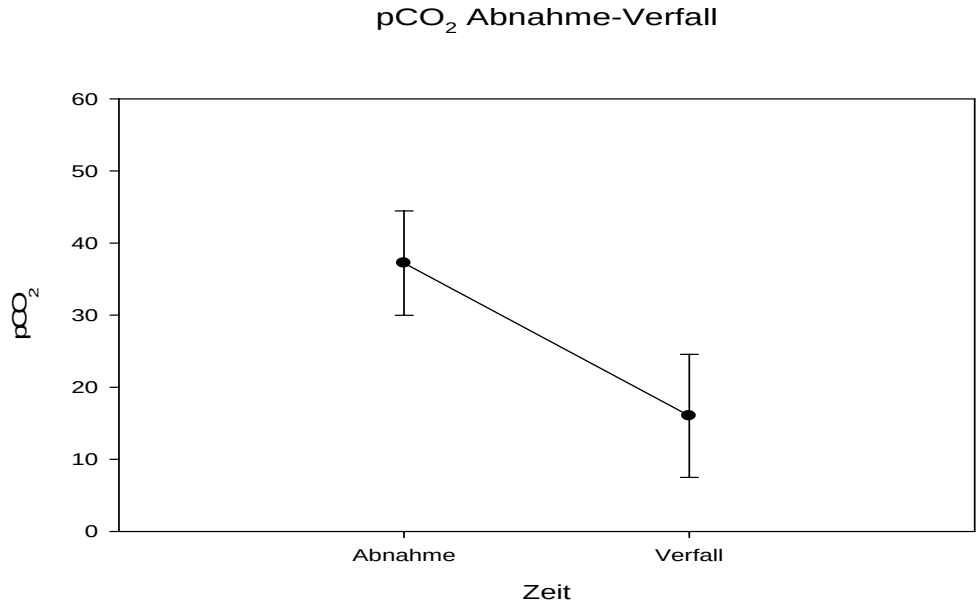


Abbildung A47: Darstellung des pCO_2-Werts Abnahme-Verfall in absoluten Werten, mit Mittelwert und +/- Standardabweichung, n=268

pO_2- Messung

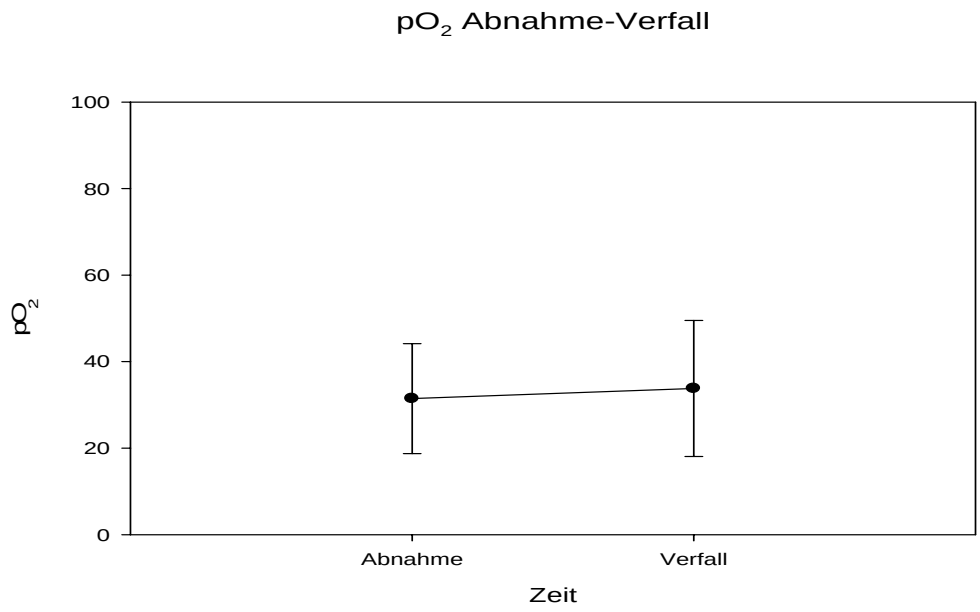


Abbildung A48: Darstellung des pO_2-Werts Abnahme-Verfall in absoluten Werten, mit Mittelwert und +/- Standardabweichung, n=268

$cHCO_3$- Messung

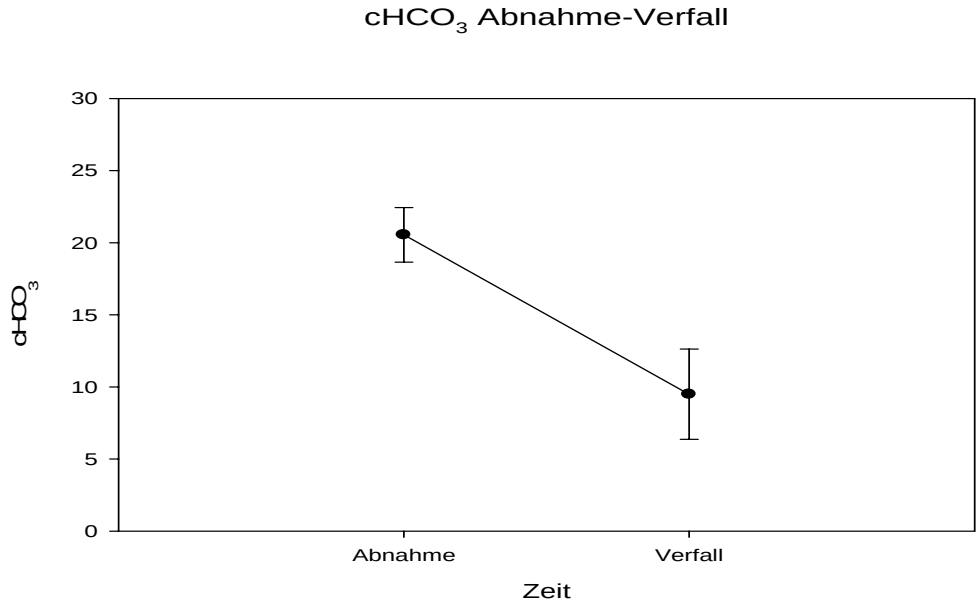


Abbildung A49: Darstellung des $cHCO_3$-Werts Abnahme-Verfall in absoluten Werten, mit Mittelwert und +/- Standardabweichung, n=268

Base Excess- Messung

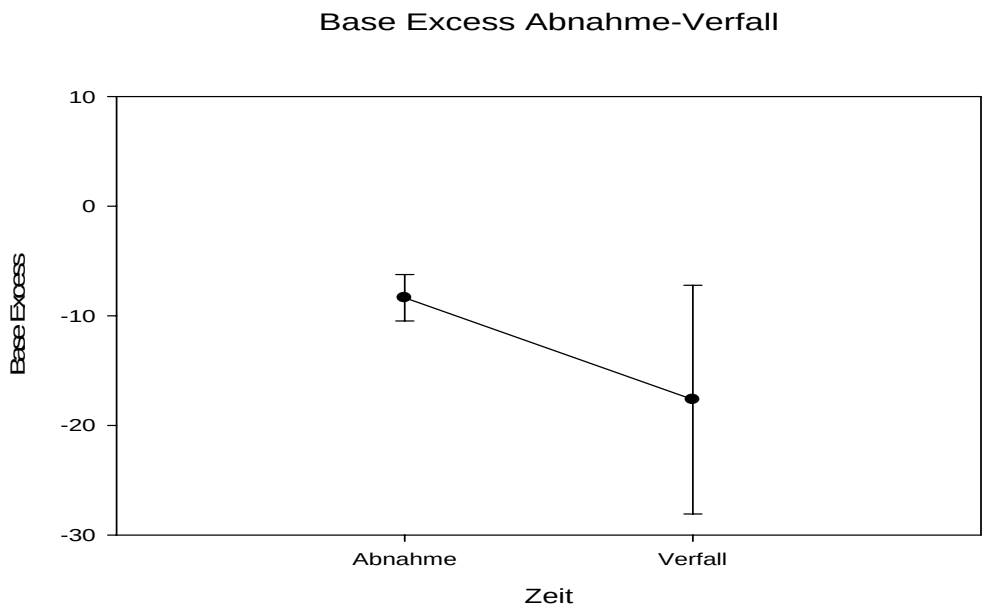
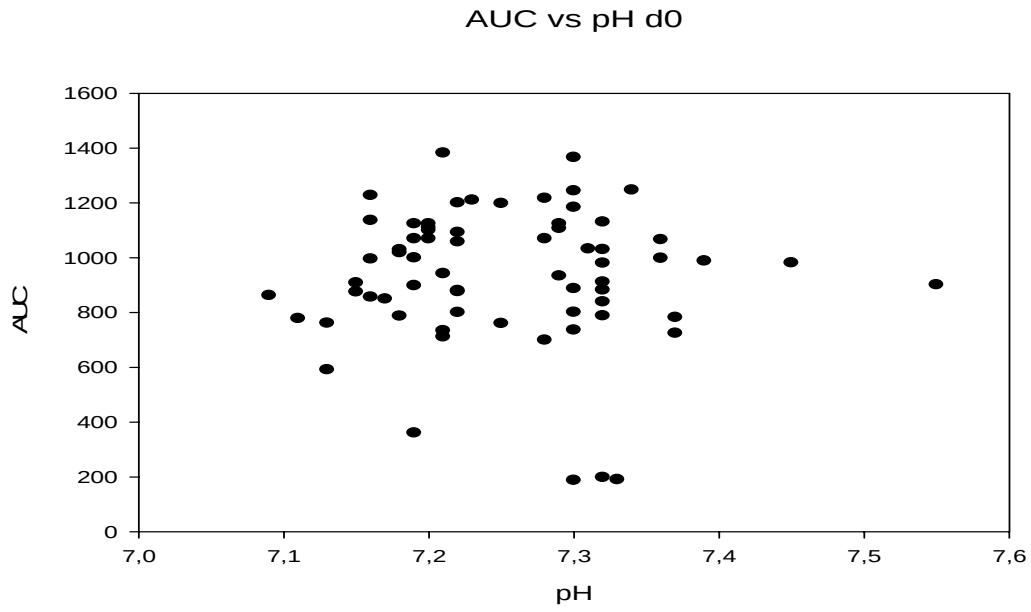


Abbildung A50: Darstellung des Base-Excess-Werts Abnahme-Verfall in absoluten Werten, mit Mittelwert und +/- Standardabweichung, n=268

Gegenüberstellung Säure-Basen-Status-Multiplate®



AbbildungA51: Gegenüberstellung der AUC und des pH-Werts, d0, im Simple Scatter Plot, n=81

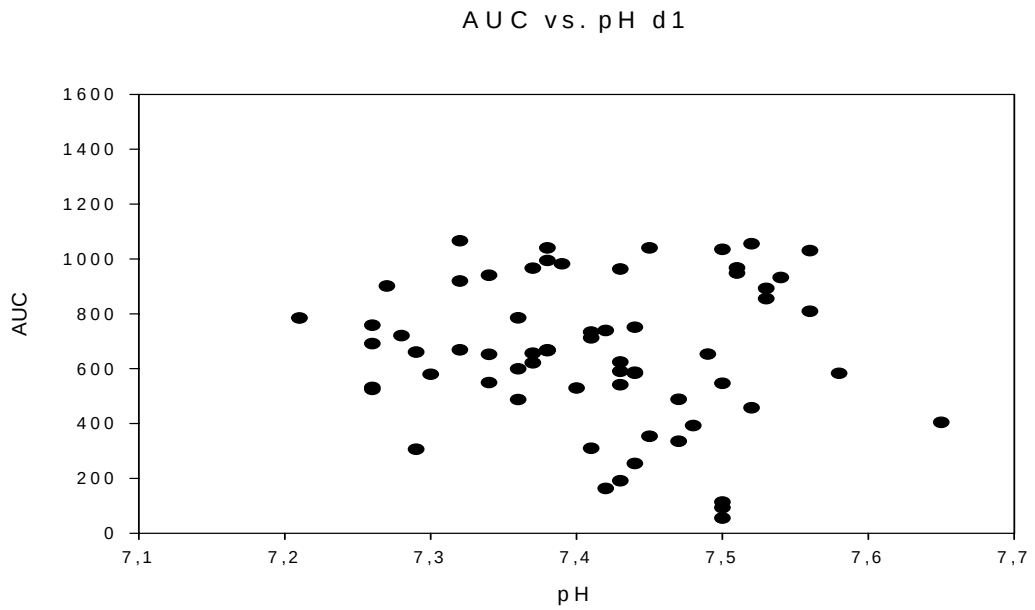


Abbildung A52: Gegenüberstellung der AUC und des pH-Werts, d1, im Simple Scatter Plot, n=81

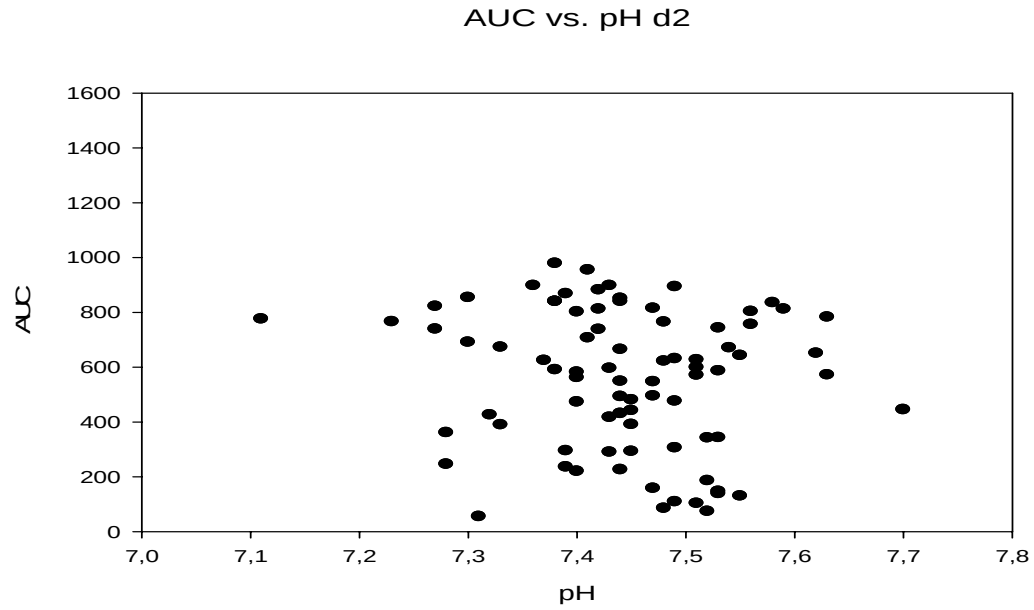


Abbildung A53: Gegenüberstellung der AUC und des pH-Werts, d2, im Simple Scatter Plot, n=81

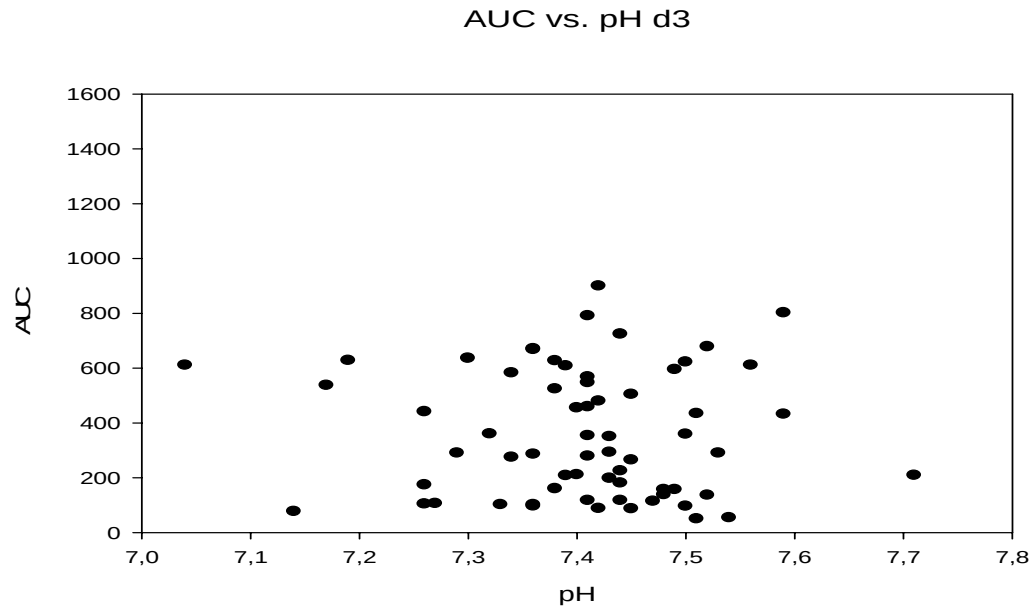


Abbildung A54: Gegenüberstellung der AUC und des pH-Werts, d3, im Simple Scatter Plot, n=81

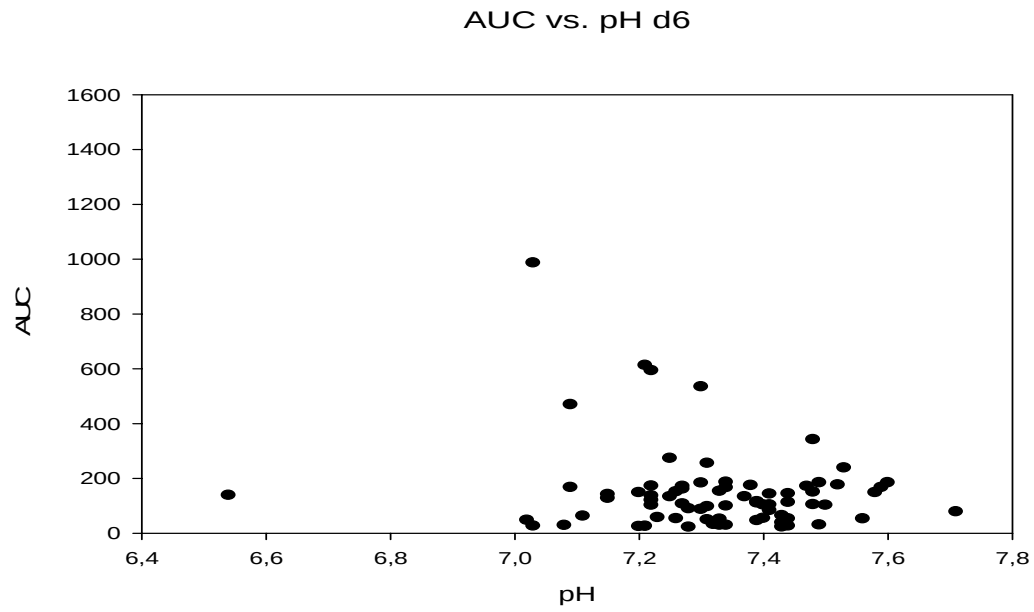


Abbildung A55: Gegenüberstellung der AUC und des pH-Werts, d6, im Simple Scatter Plot, n=81

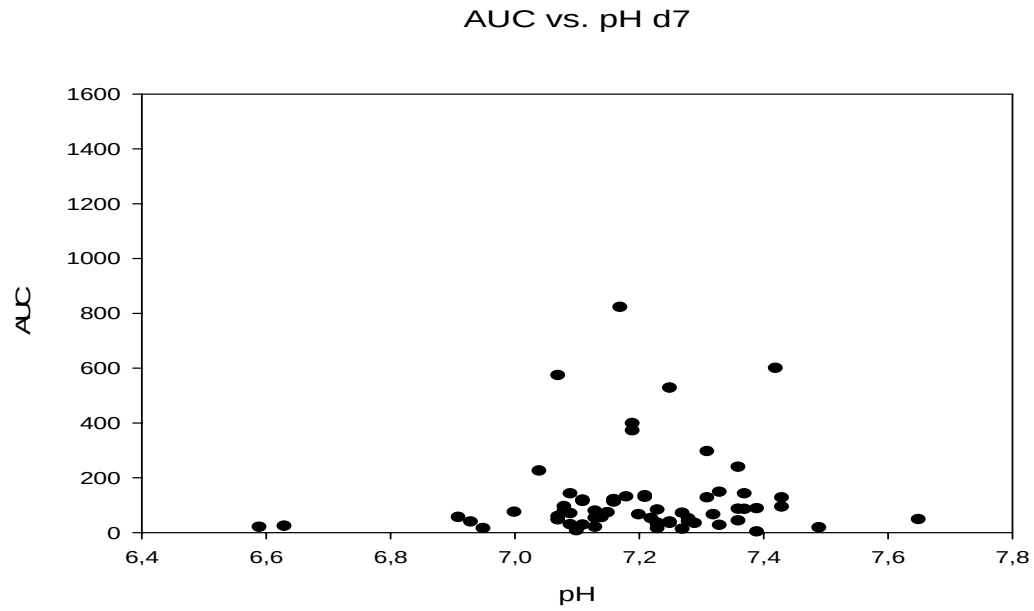


Abbildung A56: Gegenüberstellung der AUC und des pH-Werts, d7, im Simple Scatter Plot, n=81

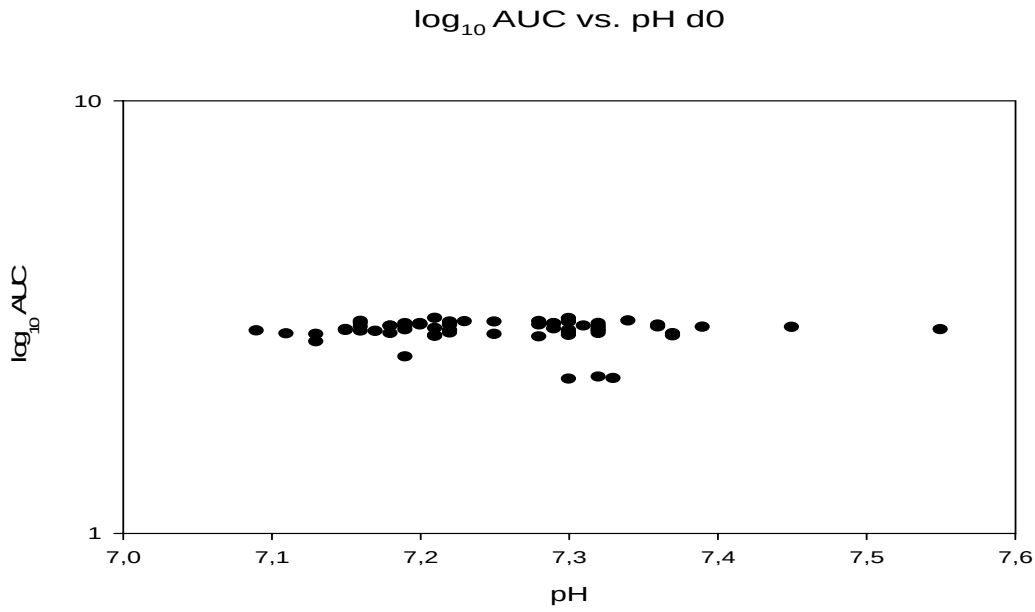


Abbildung A57: Gegenüberstellung der logAUC und des pH-Werts, d0, im Simple Scatter Plot, n=81

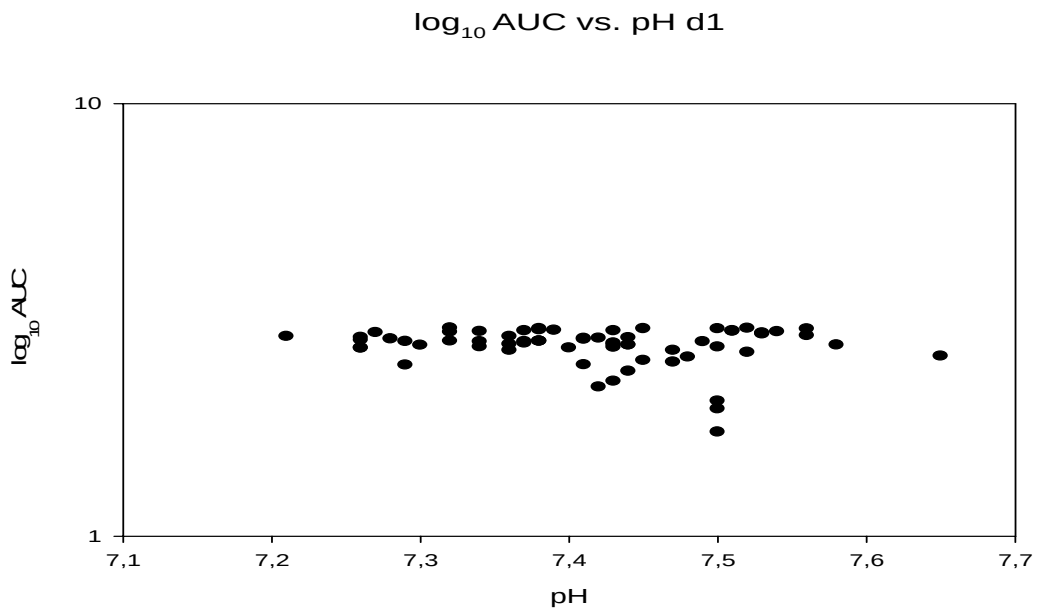


Abbildung A58: Gegenüberstellung der logAUC und des pH-Werts, d1, im Simple Scatter Plot, n=81

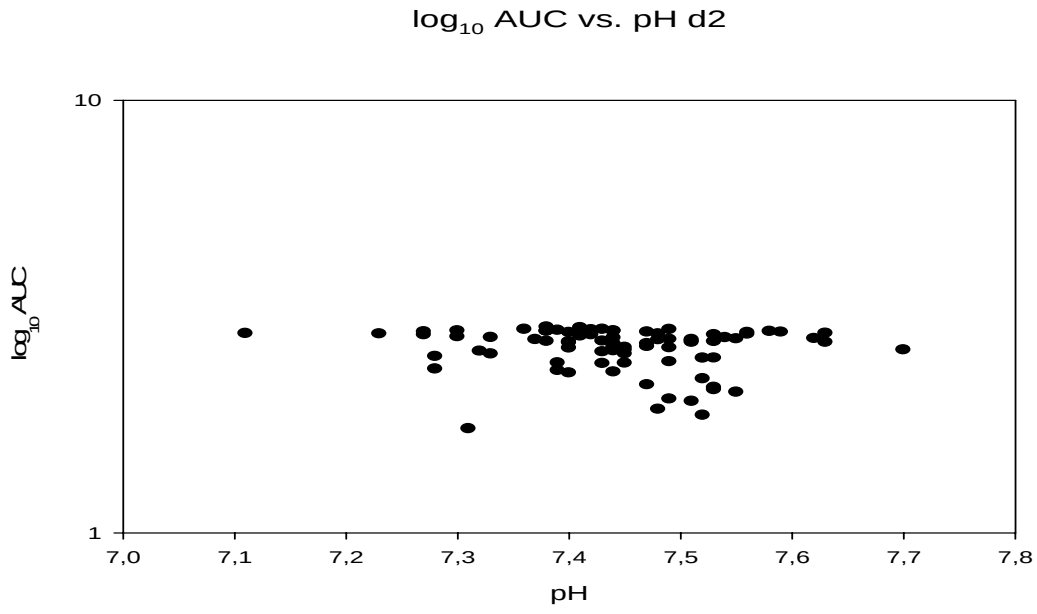


Abbildung A59: Gegenüberstellung der logAUC und des pH-Werts, d2, im Simple Scatter Plot, n=81

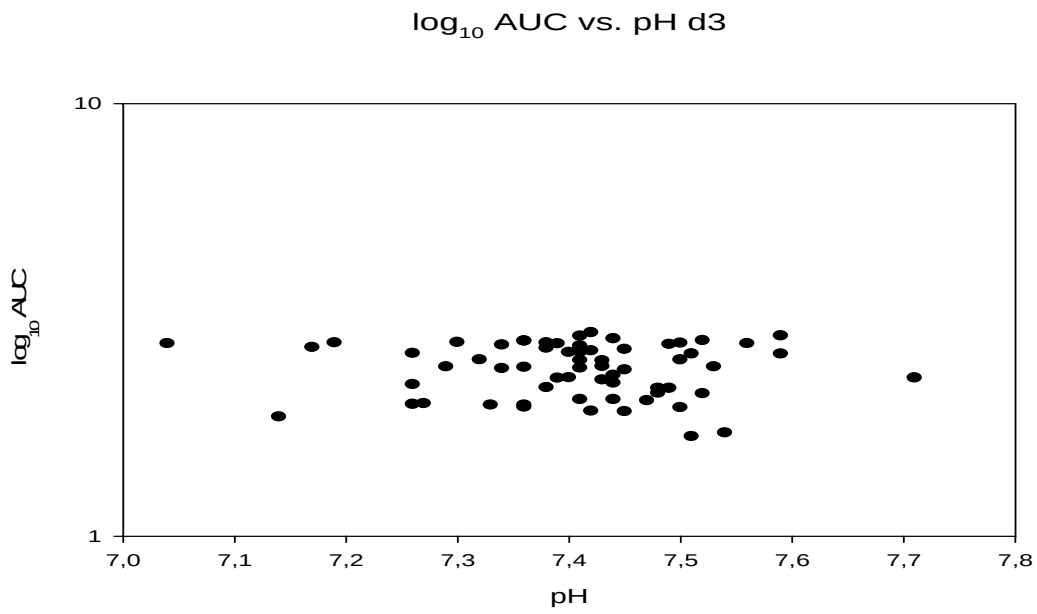


Abbildung A60: Gegenüberstellung der logAUC und des pH-Werts, d3, im Simple Scatter Plot, n=81

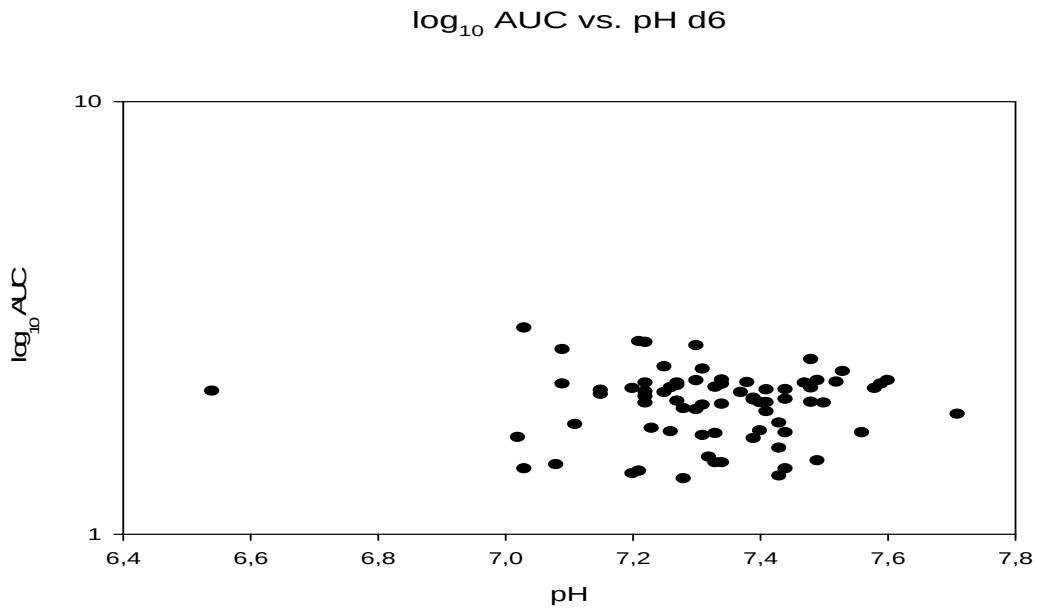


Abbildung A61: Gegenüberstellung der logAUC und des pH-Werts, d6, im Simple Scatter Plot, n=81

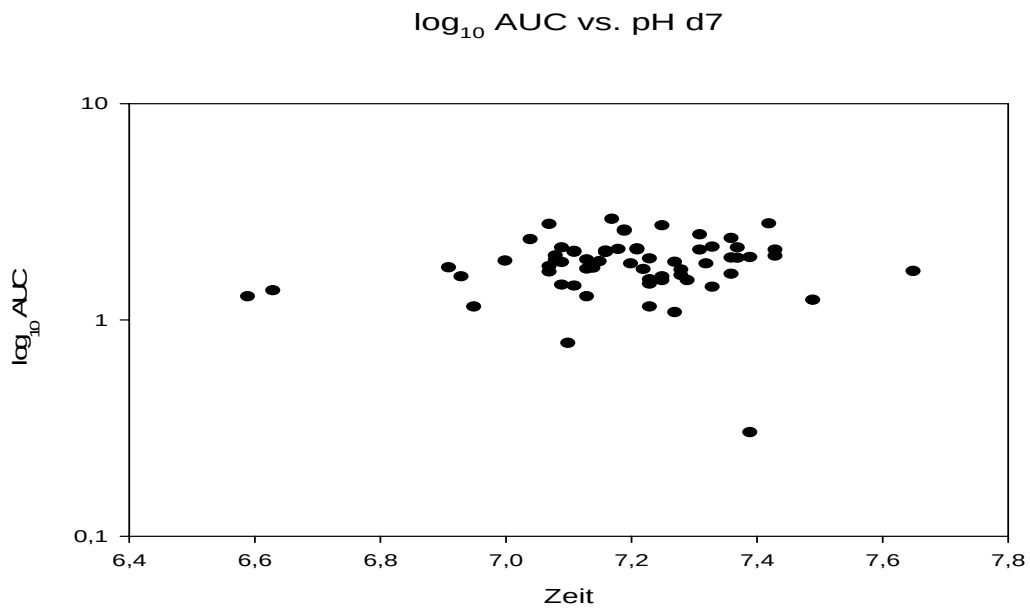


Abbildung A62: Gegenüberstellung der logAUC und des pH-Werts, d7, im Simple Scatter Plot, n=81

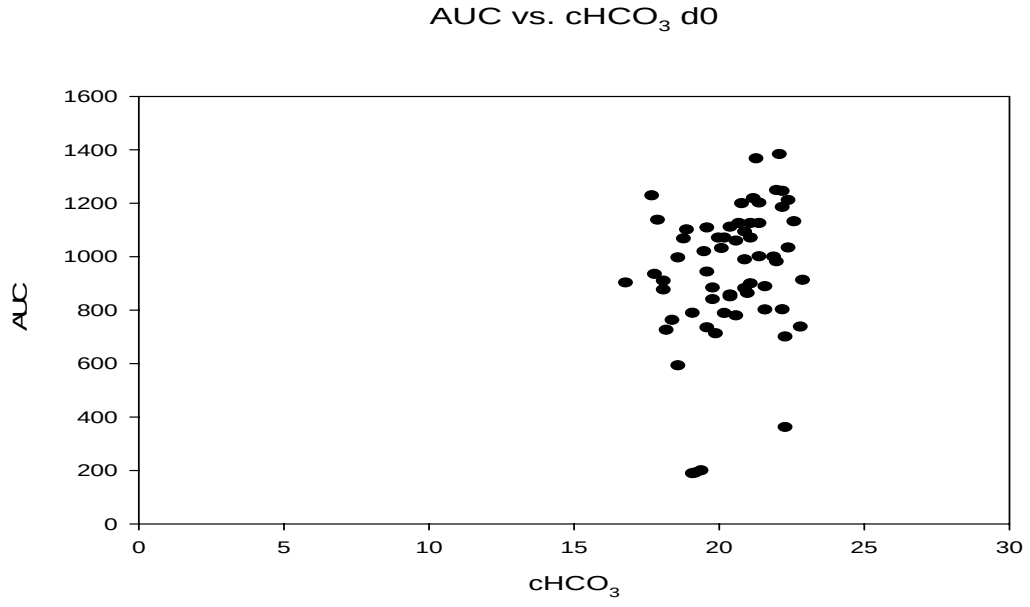


Abbildung A63: Gegenüberstellung der AUC und des $cHCO_3$-Werts, d0, im Simple Scatter Plot, n=81

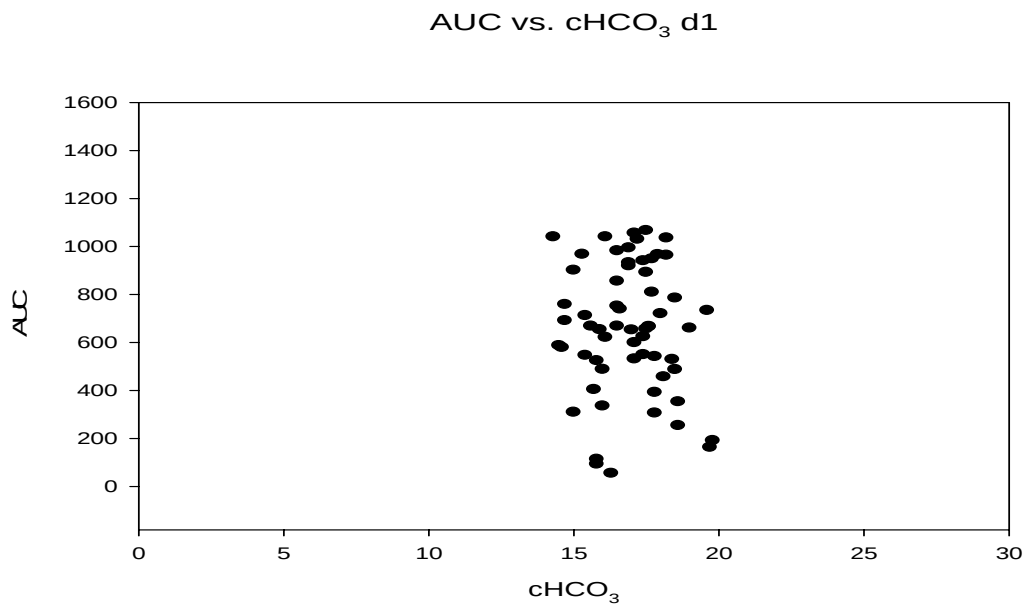


Abbildung A64: Gegenüberstellung der AUC und des $cHCO_3$-Werts, d1, im Simple Scatter Plot, n=81

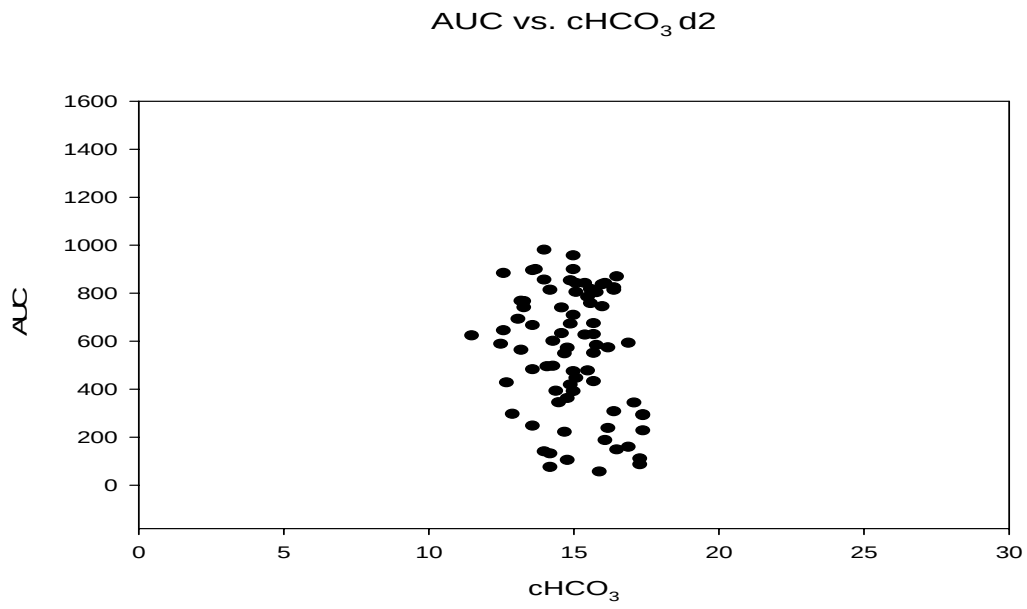


Abbildung A65: Gegenüberstellung der AUC und des $cHCO_3$-Werts, d2, im Simple Scatter Plot, n=81

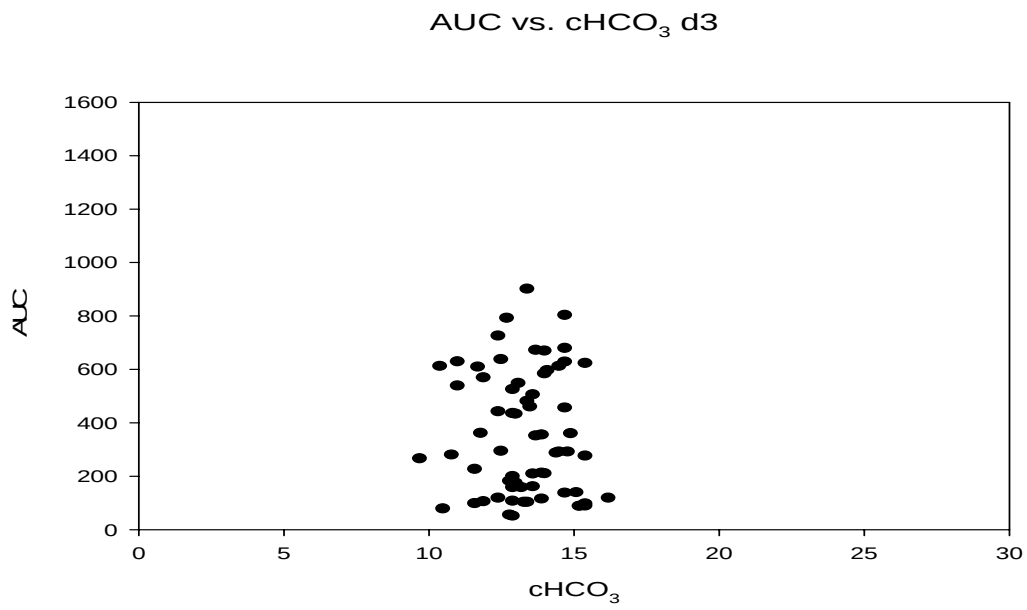


Abbildung A66: Gegenüberstellung der AUC und des $cHCO_3$-Werts, d3, im Simple Scatter Plot, n=81

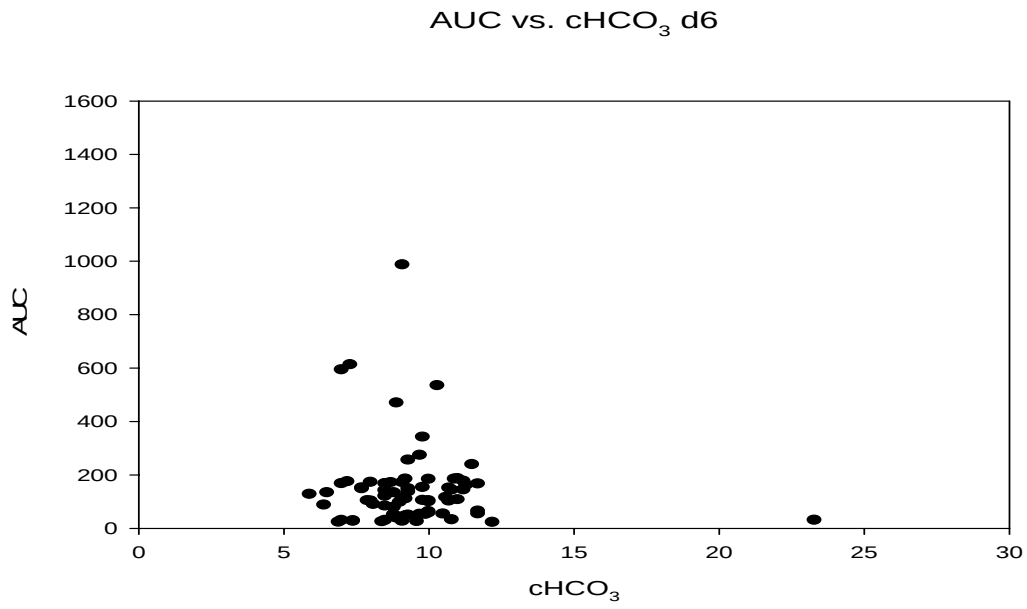


Abbildung A67: Gegenüberstellung der AUC und des $cHCO_3$-Werts, d6, im Simple Scatter Plot, n=81

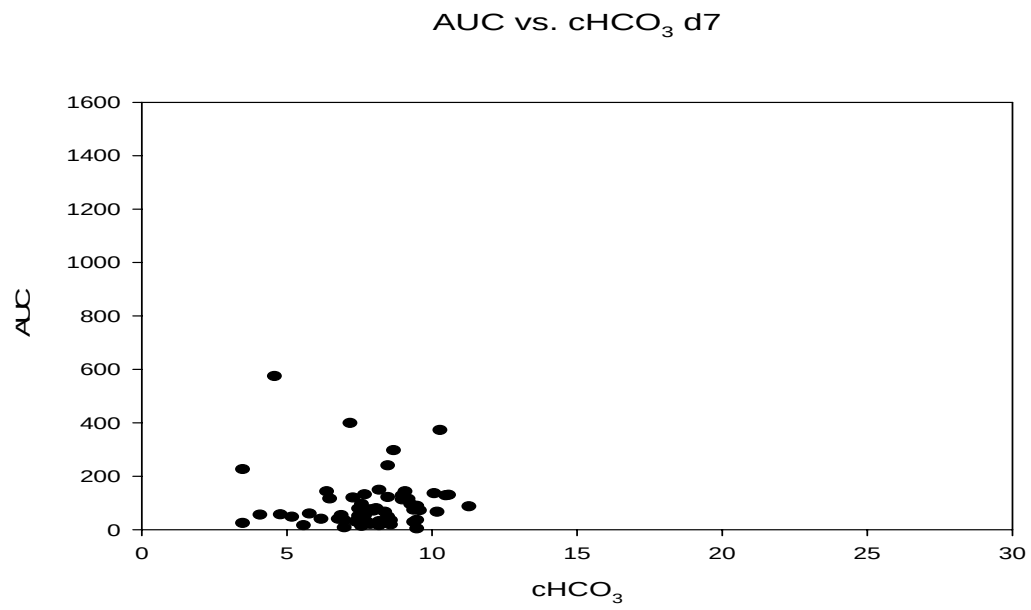


Abbildung A68: Gegenüberstellung der AUC und des $cHCO_3$-Werts, d7, im Simple Scatter Plot, n=81

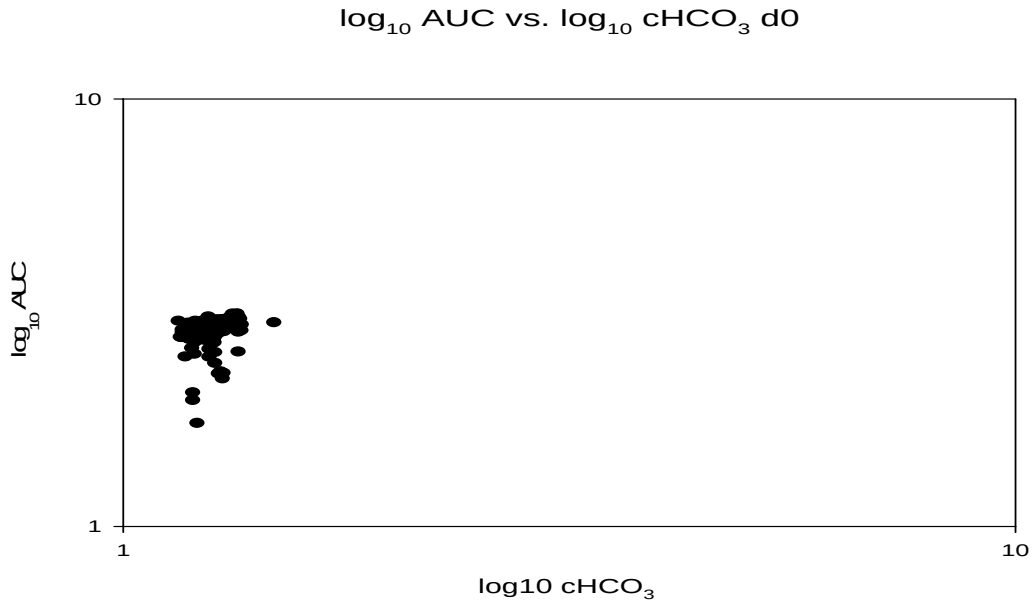


Abbildung A69: Gegenüberstellung der logAUC und des log$cHCO_3$-Werts, d0, im Simple Scatter Plot, n=81

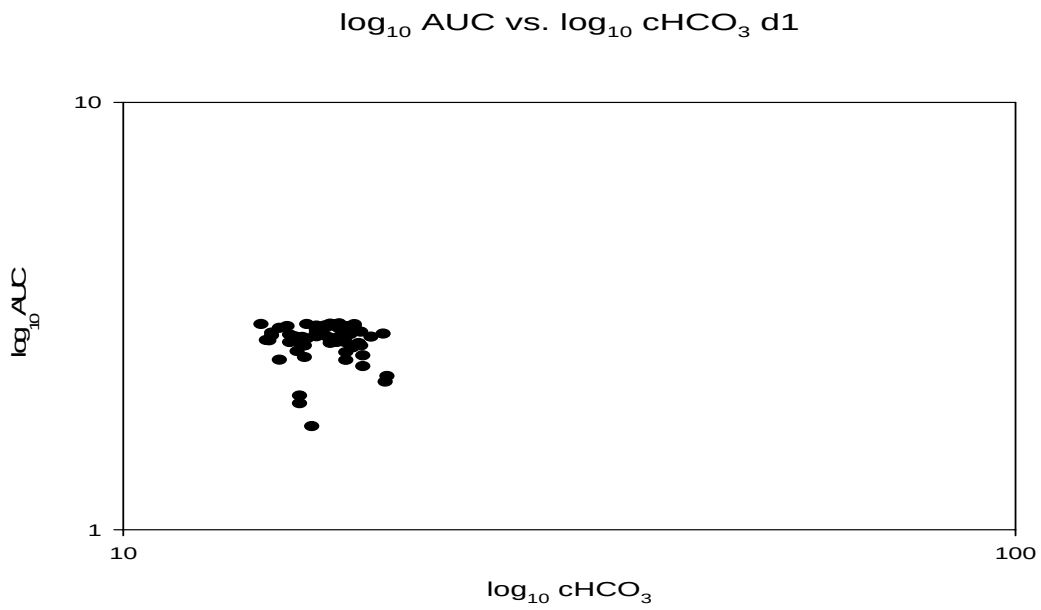


Abbildung A70: Gegenüberstellung der logAUC und des log$cHCO_3$-Werts, d1, im Simple Scatter Plot, n=81

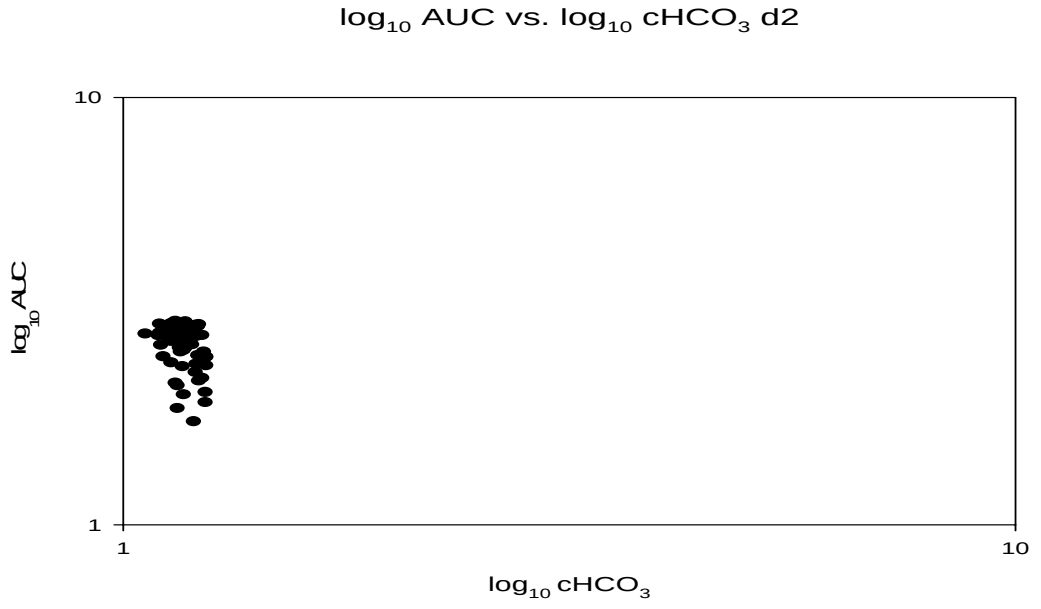


Abbildung A71: Gegenüberstellung der logAUC und des log$cHCO_3$-Werts, d2, im Simple Scatter Plot, n=81

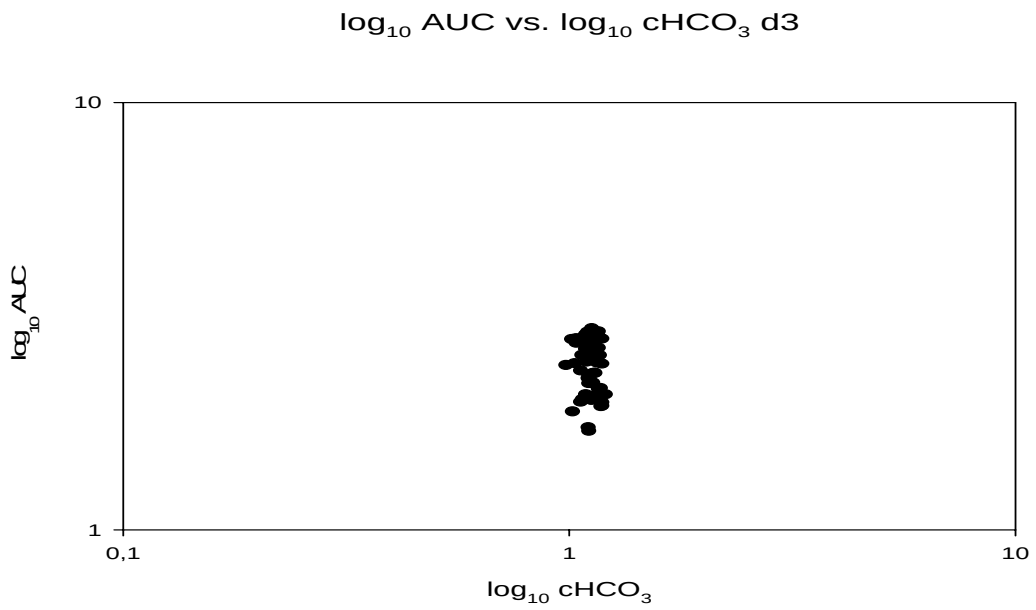


Abbildung A72: Gegenüberstellung der logAUC und des log$cHCO_3$-Werts, d3, im Simple Scatter Plot, n=81

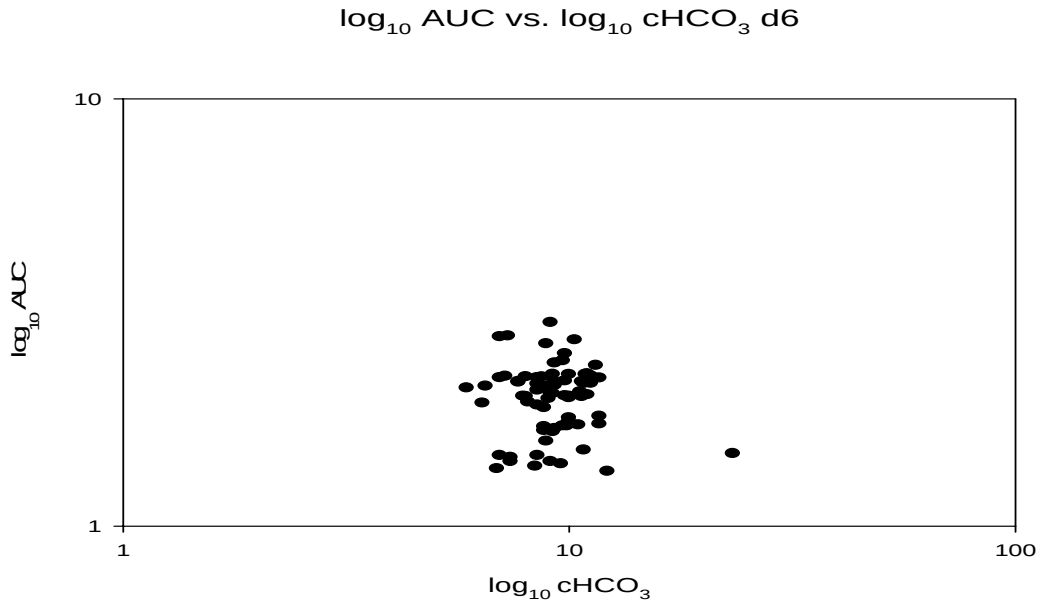


Abbildung A73: Gegenüberstellung der logAUC und des log$cHCO_3$-Werts, d6, im Simple Scatter Plot, n=81

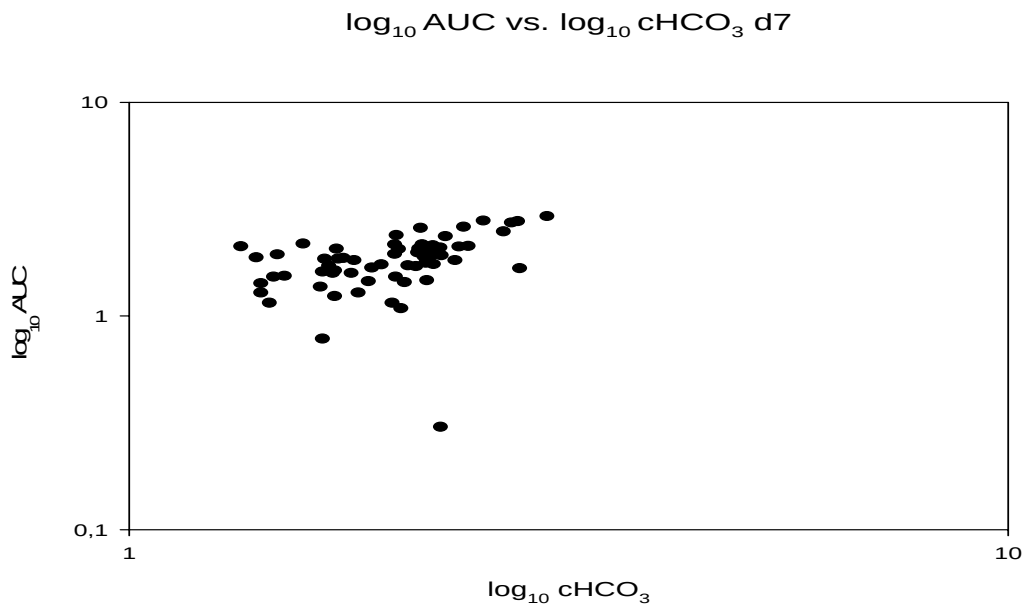


Abbildung A74: Gegenüberstellung der logAUC und des log$cHCO_3$-Werts, d7, im Simple Scatter Plot, n=81

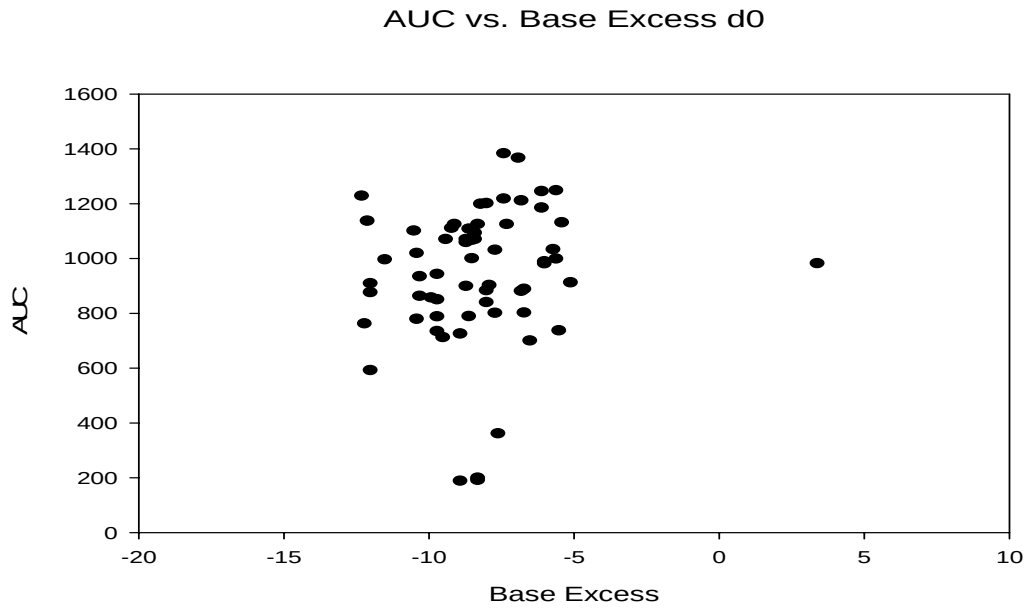


Abbildung A75: Gegenüberstellung der AUC und des Base Excess-Werts, d0, im Simple Scatter Plot, n=81

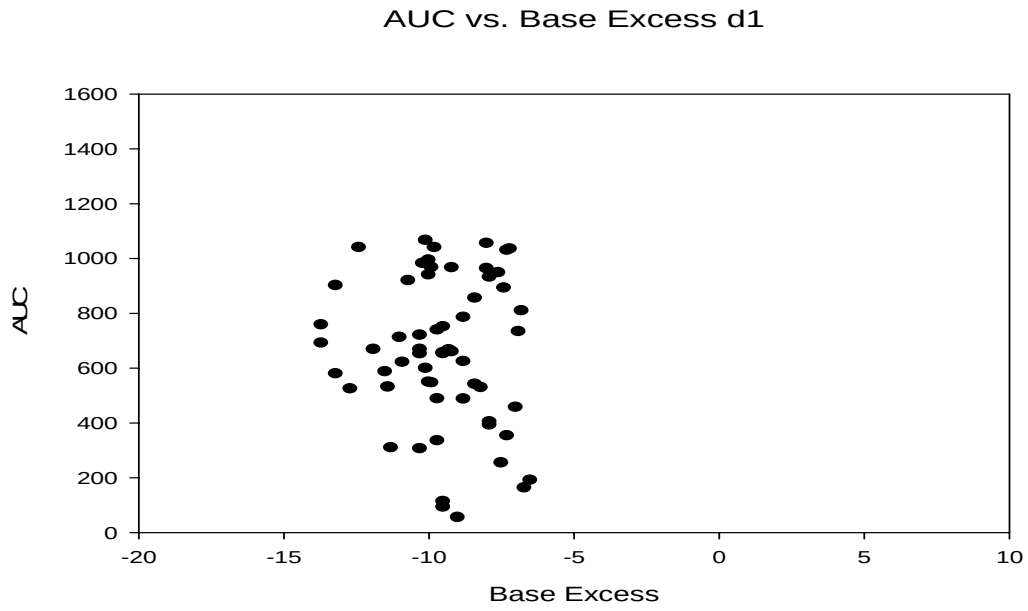


Abbildung A76: Gegenüberstellung der AUC und des Base Excess-Werts, d1, im Simple Scatter Plot, n=81

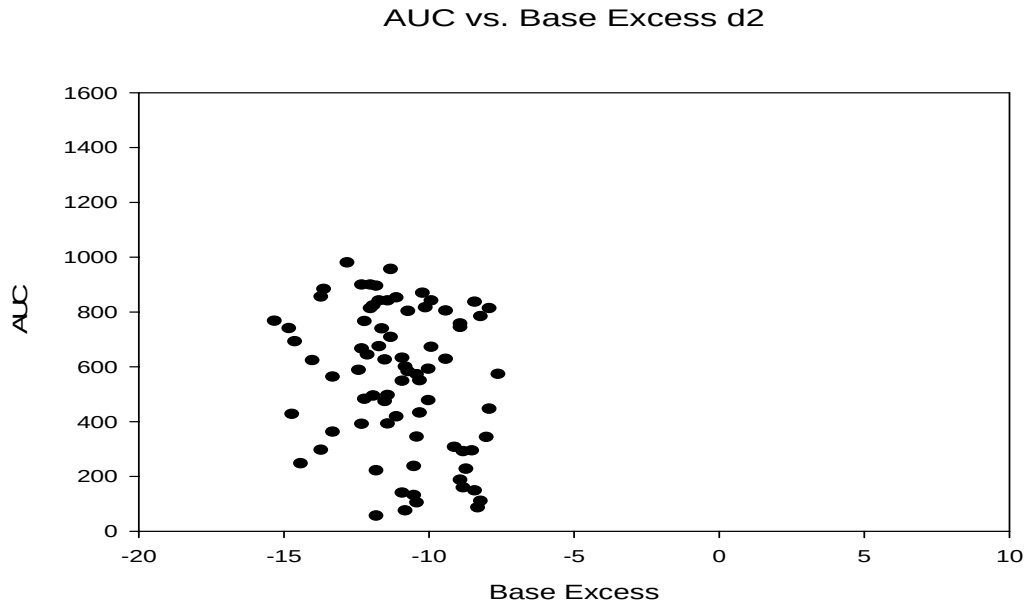


Abbildung A77: Gegenüberstellung der AUC und des Base Excess-Werts, d2, im Simple Scatter Plot, n=81

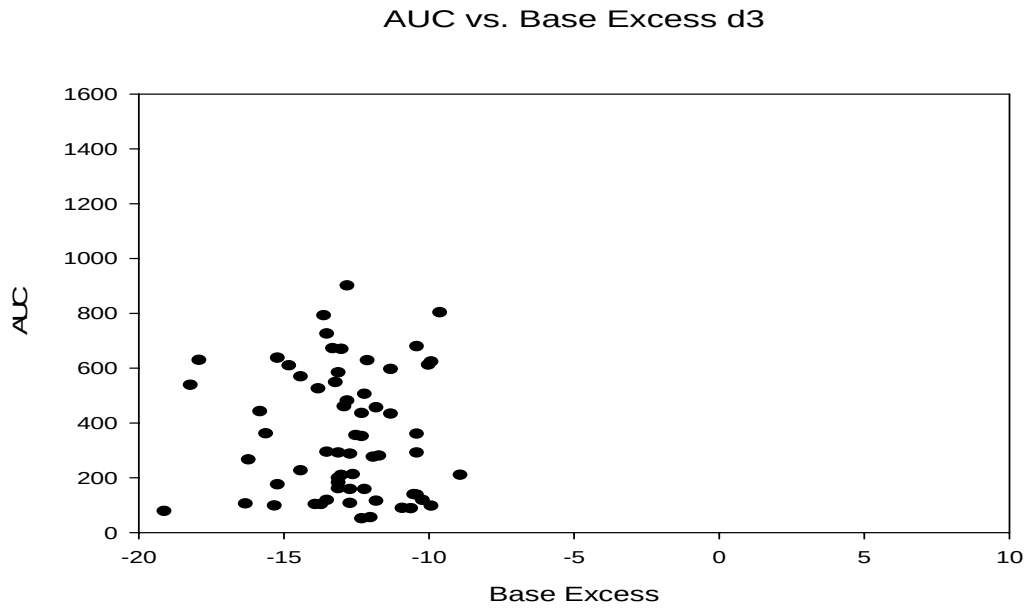


Abbildung A78: Gegenüberstellung der AUC und des Base Excess-Werts, d3, im Simple Scatter Plot, n=81

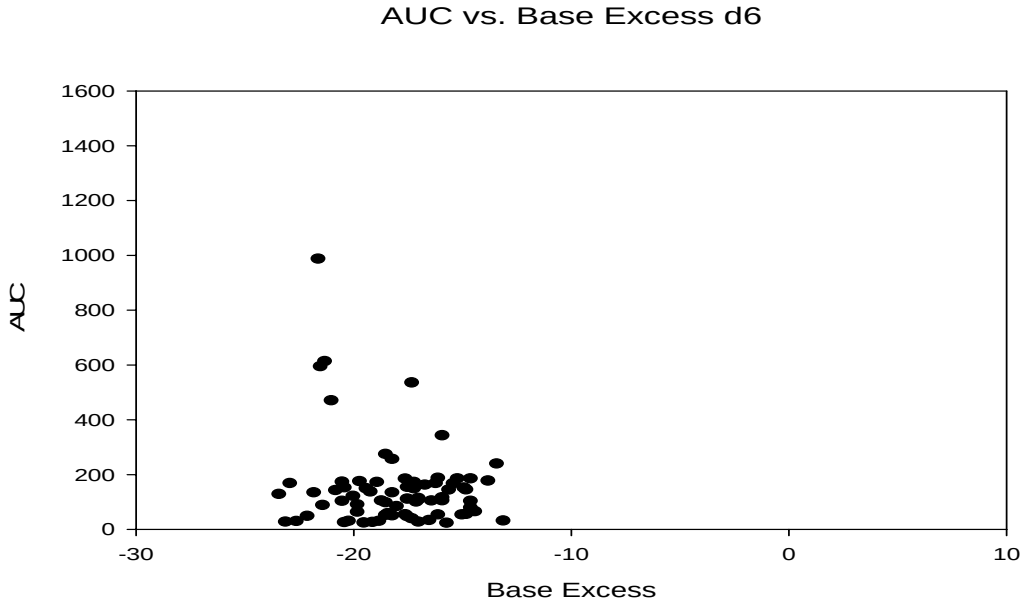


Abbildung A79: Gegenüberstellung der AUC und des Base Excess-Werts, d6, im Simple Scatter Plot, n=81

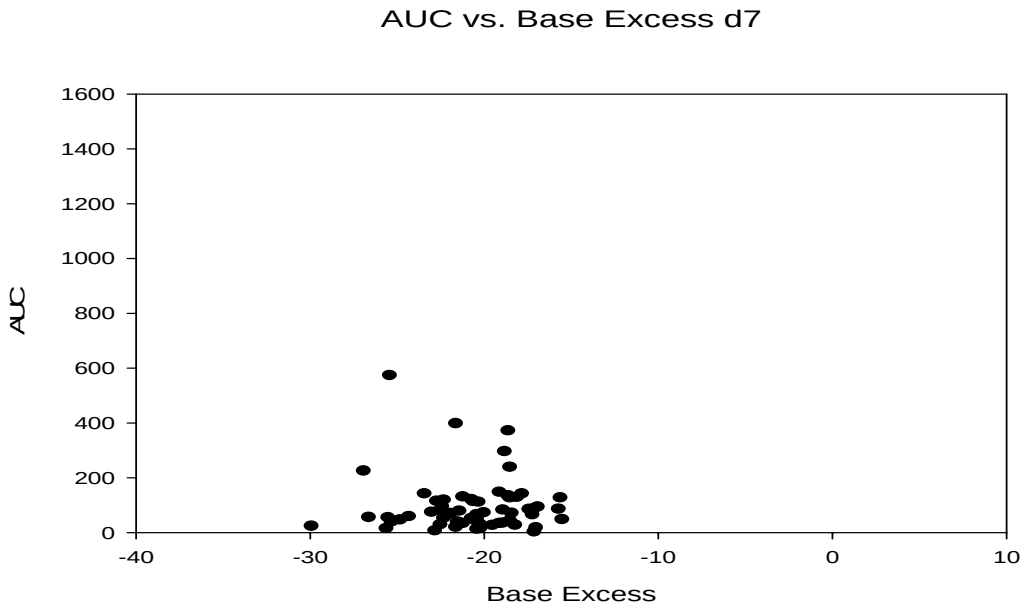


Abbildung 80: Gegenüberstellung der AUC und des Base Excess-Werts, d7, im Simple Scatter Plot, n=81

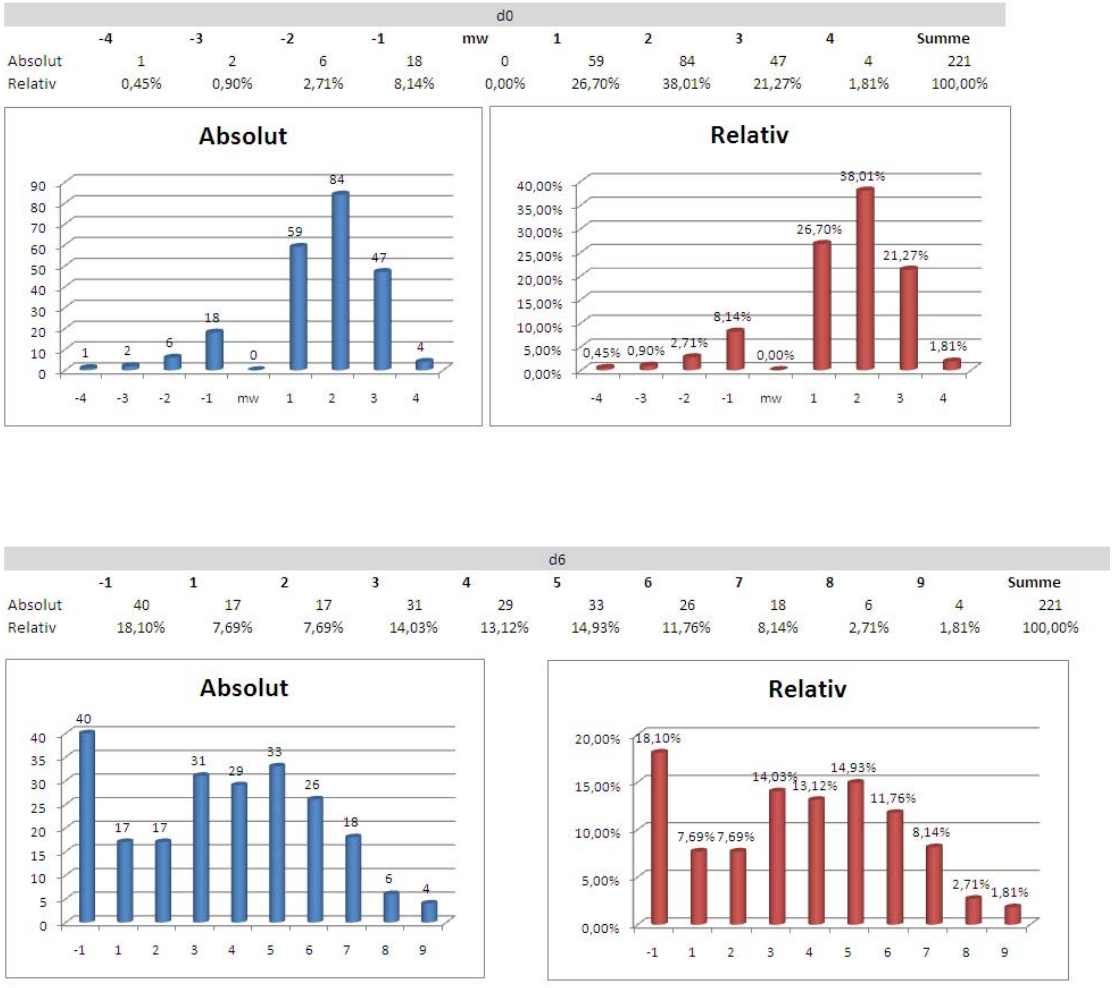


Abbildung A81: Übersicht über die Verteilung der gemessenen Werte im Multiplate® über 1,5 Jahre

7. Literaturverzeichnis

[1] Adam F.et.al: Glycoprotein Ib-mediated platelet activation. A signaling pathway triggered by thrombin. Eur J Biochem. 2003 Jul; 270 (14): 2959-70.

[2] Advancing Transfusion and Cellular Therapies Worldwide: The Physics of Swirling, 11.01.2010, http://www.aabb.org/Content/News_and_Media/Topics_of_Interest/swirl.htm

[3] AuBuchon JP.et.al: Efficacy of apheresis platelets treated with riboflavin and ultra-violet light for pathogen reduction. Transfusion.2005 Aug; 45 (8):1335-41

[4] Baker J. et.al: GPIb potentiates GPVI-induced responses in human platelets. Platelets. 2004 Jun; 15 (4): 207-14

[5] Balasubramanian V et al: Effects of Fibrinogen Residence Time and Shear rate on the Morphology and Procoagulant activity of Human Platelets Adherent to Polymeric Biomaterials, ASAIO J. 2001; July-Aug; 47(4): 354-360

[6] Barthels M. et.al: Das Gerinnungskompendium; Schnellorientierung, Befundinterpretation, klinische Konsequenzen, Georg Thieme Verlag, 2003: 605-625

[7] Blajchman MA et.al: Bacterial contamination of platelet concentrates: incidence, significance and prevention. Semin Hematol. 2001 Oct; 38 (4 Suppl 11): 20-6

[8] Boldt J. et. al: The impact of a medium molecular weight, low molar substitution hdyroxyethyl starch dissolved in a physiologically balanced electrolyte solution on blood coagulation and platelet function in vitro, Vox Sang. 2007 Aug; 93(2): 139-144

[9] Brecher ME et.al: Growth of bacteria in inoculated platelets: implications for bacteria detection and the extension of platelet storage. Transfusion.2000 Nov; 40 (11): 1308-12

[10] Breddin HK.: Can platelet aggregometry be standardized? Platelets. 2005 May-Jun; 16 (3-4): 151-8

[11] Bundesärztekammer: Richtlinien zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten (Hämotherapie) gemäß §§ 12 und 18 des Transfusionsgesetzes (Novelle 2005), Stand 05.11.2005, 11.01.2010, http://bundesaerztekammer.de/page.asp?his=0.7.45.3242

[12] Bundesärztekammer: Richtlinien zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten (Hämotherapie) gemäß §§ 12 und 18 des Transfusionsgesetzes (Novelle 2005), Stand 05.11.2005, Kapitel 3: Herstellung, Lagerung und Transport von Blutprodukten, 11.01.2010, http://www.baek.de/page.asp?his=0.745.3242.3245

[13] Calatzis A.: Vollblutverfahren zur Erfassung der primären Hämostase (Analysis of primary hemostasis in whole blood) J Lab Med 2007; 31(6): 239-247

[14] Calatzis et.al.: Monitoring of Clopidogrel Using Multiplate Electrode Aggregometry Blood, Volume 108, Issue 11, November 16, 2006 Abstract 883

[15] Calatzis et.al.: Prevalence of Aspirin Non-Response in Out-Patients and In-Patients as determined by Multiplate Electrode Aggregometry, Blood, Volume 108, Issue 11, November 16, 2006 Abstract 879

[16] Cardinal David C. et.al: A Novel Device for Assessing Platelet Behavior in Blood J Pharmacol Methods 1980; 3: 135-58

[17] Chow TW. et.al.: Thrombin receptor activating peptide (SFLLRN) potentiates shear-induced platelet microvesiculation. J Lab Clin Med. 2000 Jan;135(1):66-72

[18] Clemetson KJ. et.al: Platelet collagen receptors. Thromb Haemost. 2001 Jul; 86 (1): 189-97

[19] Dahlback B. et.al: Regulation of blood coagulation by the protein C anticoagulant pathway: novel insights into structure-function relationships and molecular recognition. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2005 Jul: 25 (7): 1311-20

[20] de Graaf JC. et.al: Nitric oxide functions as an inhibitor of platelet adhesion under flow conditions. Circulation. 1992 Jun; 85 (6): 2284-90

[21] Dormann D. et.al: The GPIb thrombin-binding site is essential for thrombin-induced platelet procoagulant activity. Blood. 2000 Oct 1; 96 (7): 2469-78

[22] Douglas J.C. et.al:Clinical and Laboratory Standard Institute, Platelet Function Testin by Aggregometry; Proposed Guideline, Volume 27, Number 19, 2007: 1-30

[23] DRG MedTech: Point of Care Aggregometry, 11.01.2010, http://www.drgmedtek.pl/cms/node/93

[24] Dubois C. et.al: Thrombin binding to Gp Ibalpha induces platelet aggregation and fibrin clot retraction supported by resting alphaIIbeta3 interaction with polymerized fibrin. Thromb Haemost. 2003 May; 89 (5): 853-65

[25] Dumont LJ. et.al: Seven day storage of single-donor platelets: recovery and survival in an autologous transfusion study Transfusion. 2002 Jul; 42 (7): 847-54

[26] Esmon CT: The protein C pathway. Chest. 2003 Sept; 124 (3 Suppl): 26S-32S

[27] Fantl P.: Osmotic stability of blood platelets. J Physiol. 1968 Sep;198(1):1-16

[28] Farrugia A. et. al.: Microtitre plate measurement of platelet response to hypotonic stress. J Clin Pathol. 1989 Dec;42(12):1298-301

[29] Flaumenhaft R. et.al: The actin cytoskeleton differentially regulates platelet alpha-granula and dense-granule secretion. Blood. 2005 May 15; 105 (10): 3879-87

[30] Fox JE.: The platelet cytoskeleton. Thromb Haemost. 1993 Dec 20; 70 (6): 884-93

[31] Frojmovic MM et al: Surface-secreted von Willebrand factor mediates aggregation of ADP-activated platelets at moderate shear stress: facilitated by GPIb but controlled by GPIIb-IIIa, Thromb Haemost. 1997 Mar; 77(3): 568-76

[32] Fullard JF: The role of the platelet glycoprotein IIb/IIIa in thrombosis and haemostasis. Curr Pharm Des. 2004; 10(14): 1567-76

[33] Furie B. et.al: Thrombus formation in vivo J. Clin. Invest. 2005; 115: 3355-3362

[34] Furlan M.: Von Willebrand factor: molecular size and functional activity Ann Hematol. 1996 Jun; 72 (6): 341-8

[35] Görlinger K. et al.: Perioperative Coagulation Management and Control of Plaelet Transfusion by Point-of-Care Platelet Function Analysis. TransFus Med Hemother 2007;34:396-411

[36] Handin R. I.: Blood Platelets and the Vessel Wall In Hemostasis. In Nathan and Oski's hematology of infancy and childhood, Band 2, Saunders 2003, S 1457-1474

[37] Harbrecht U.: Die Thrombozytenaggregation: Physiologie und Biochemie. In Müller-Berghaus G (2001) Grundlagen der Hämostaseologie. In Greten H (Hrsg) Innere Medizin, Thieme, Stuttgart, S 27-35

[38] Harrison P.: Measuring platelet function? The Hematology Journal (2004) 5, S164-169

[39] Hawiger J: Formation and regulation of platelet and fibrin hemostatic plug. Hum Pathl. 1987 Feb; 18 (2): 111-22

[40] Hellstern P. et.al: Rationelle Therapie mit Blutkomponenten mit Blutkomponenten und Plasmaderivaten (Hämotherapie) 2. Auflage- Bremen Uni- Med 2005: 19-29

[41] Hesse J. et al: Beurteilung der Thrombozytenfunktion in Zulassungsunterlagen. Infus Ther Transfus Med 2001;28:44-50

[42] Huizinga EG. et.al: Structures of glycoprotein Ibalpha and its complex with von Willebrand factor A1 domain. Science. 2002 Aug 16; 297 (5584): 1128-9

[43] Hogge DE. et.al: Platelet storage for 7 days in second- generation blood bags. Transfusion 1986, Mar-Apr; 26 (2): 131-5

[44] Holme S. et.al: Studies on platelets exposed to or stored at temperatures below 20 degrees C or above 24 degrees C. Transfusion. 1997 Jan; 37(1): 5-11

[45] Hunter S. et.al: The effect of the interruption of agitation on platelet quality during storage for transfusion. Transfusion. 2001 Jun; 41(6):890-14

[46] Institut für klinische Chemie des Universitätsklinikums Köln: Aufbau und Funktionsweise des PFA-100®, 11.01.2010, http://www.uk-koeln.de/institute/kchemie/Diagnostik/Parameter/Daten/PFA/PFA_Aufbau.html

[47] Institut für Toxikologie der Johannes-Gutenberg Universität Mainz: Was ist Durchflußzytometrie? 11.01.2010, http://www.toxikologie.uni-mainz.de/FACS/Zytometrie.jsp

[48] Jaroszeski MJ. et.al: Fundamentals of flow cytometry Mol Biotechnol. 1999 Feb; 11 (1): 37-53

[49] Jilma-Stohlawetz P. et.al.: In vitro platelet function of platelet concentrates prepared using three different apheresis devices determined by impedance and optical aggregometry. Transfusion 2009 Apr 17. [Epub ahead of print]

[50] Jordan CT. et.al: Photochemical treatment of platelet Concentrates with Amotosalen hydrochloride and ultraviolet A light inactivates free and latent cytomegalovirus in a murine transfusion model. Transfusion. 2004 Aug; 44 (8): 1159-65

[51] Kalafatis M. et.al: The regulation of clotting factors. Crit Rev Eukaryot Gene Expr. 1997; 7 (3): 241-80

[52] Kilkson H. et.al: Platelet metabolism during storage of platelet concentrates at 22 degress C. Blood. 1984 Aug; 64 (29): 406-14

[53] Kim BK. et.al: The platelet response to hypotonic shock. Its value as an indicator of platelet viability after storage. Transfusion. 1974 Mar-Apr;14(2):130-8

[54] Klouche M. et.al: Diagnostic Methods for Platelet Function Analysis Transfus Med Hemother 2007; 34: 20-32

[55] Kratzer MA. Et.al.: Simulation of primary haemostasis in vitro. Haemostasis. 1985;15(6):357-62

[56] Lang T. et.al: Diagnostische Möglichkeiten und Grenzen der Thrombelastometrie/-graphie. Hämostaseologie 2006; (Suppl.1): S20-S29

[57] Linden MD. et.al: Application of flow cytometry to platelet disorders. Semin Thromb Hemost. 2004 Oct; 30 (5): 501-11

[58] Lisman T. et.al: Platelet aggregation: involvement of thrombin and fibrin(ogen). Front Biosci. 2005 Sept 1; 10: 2504-17

[59] Lison et. al: Multiple electrode platelet aggregometry for the evaluation of Von Willebrand disease, Journal of Thrombosis and Haemostasis 2009; Volume 7, Supplement 2: Abstract PP-WE-039

[60] Lopez JA. et.al: Shear stress and the role of high molecular weight von Willebrand factor multimers in thrombus formation. Blood Coagul Fibrinolysis. 2005 Apr; 16 Suppl 1: S11-6

[61] Luxembourg B. et.al: Basiswissen Gerinnnungslabor. Dtsch Arztebl 2007; 104(21): A-1489 / B-1320 / C-1260

[62] Marx R.: Studien und Streiflichter zum Problemkreis der Hämostase mit besonderer Berücksichtigung der Effektoren der 4 Phasen der Blutgerinnung, zugleich ein Beitrag zur Hämozytentherapie. Habilitationsschrift, Universität München, 1953

[63] Mathai J. et.al: Suitability of measurement of swirling as a marker of platelet shape change in concentrates stored for transfusion. Platelets. 2006 Sept; 17 (6): 393-6

[64] Matis Medical: The Cone and Plate(let) Analyzer, 11.01.2010, http://www.matis-medical.com/the_cone_and_plate_analyzer.html

[65] McKenzie M.E. et.al: Clinical Utility of Available Methods for Determining Platelet Function Cardiology 1999; 92: 240-47

[66] McNicol A. et.al.; Thrombin Receptor-Activating Peptide Releases Arachidonic Acid from Human Platelets: A Comparison with Thrombin and Trypsin. J Pharmalcol Exp Ther. 1997 May;281(2):861-7

[67] Mengistu AM.et al.: Evaluation of a New Platelet Function Analyzer in Cardiac Surgery: A Comparison of Modified Thromboelastography and Whole-Blood Aggregometry. J Cardiothorac Vasc Aneasth. 2008 Feb;22(1): 40-6

[68] Michelson A.D. et.al: Current options in platelet function testing. Am J Cardiol.2006 Nov 20; 98 (10A): 4N-10N. Epub 2006 Sep 29.

[69] Michelson A.D. et.al: Evaluation of platelet function by flow Cytometry. Methods. 2000 Jul; 21 (3): 259-70

[70] Müller-Eckhardt C. et.al: Transfusionsmedizin; Grundlagen, Therapie, Methodik 3. Auflage, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 2004: 51-78

[71] Multiplate ® Comprehensive platelet diagnostics: Messprinzip, 11.01.2010 http://www.multiplate.net/de/detection.php

[72] Multiplate ® Comprehensive platelet diagnostics: Multiplate®-Messzelle, 11.01.2010, http://www.multiplate.net/de/testcell.php

[73] Multiplate ® Comprehensive platelet diagnostics: Multiplate®-Parameter, 11.01.2010, http://www.multiplate.net/de/testcell.php

[74] NCCLS.: How to Define and Determine Reference Intervals in the Clinical Laboratory; Approved Guideline-Second Edition. NCCLS document C28-A3 (ISBN 1-56238-406-6)

[75] Nieswandt B. et.al: Platelet-collagen interaction: is GPVI the central receptor? Blood. 2003 Jul 15; 102: 449-61

[76] Owen WG: The control of hemostasis: Role of endothelium in the regulation of inhibitory and catabolic pathways. Arch Path lab Med. 1982 May; 106 (5): 209-13

[77] Pearson JD: The control of production and release of haemostatic factors in the endothelial cell. Baillieres Clin Haematol. 1993 Sep; 6(3): 629-51

[78] Picker et.al.: Cell viability during platelet storage in corellation to cellular metabolism after different pathogen reduction technologies. Transfusion 2009, Nov; 49(11): 2311-8

[79] Posan E. et.al: Comparison of PFA-100 testing and bleeding time- Detecting platelet hypofunction and von Willebrand disease in clinical practice. Thromb Haemost. 2003 Sep; 90 (3): 483-90

[80] Pötzsch B. et.al: Gerinnungskonsil; Rationelle Diagnostik und Therapie von Gerinnungsstörungen, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2002: 192-221

[81] Rand M.L. et.al: Platelets function assays Transfusion and Apheresis Science 2003; 28: 307-317

[82] Reininger A.J. et.al: Interaktion des von Willebrand Faktors mit Thrombozyten und der Gefäßwand J Lab Med 2004; 28 (6): 514-20

[83] Reininger AJ. et. al.: Effect of fibrinogen substitution in afribrinogenemia on hemorheology and platelet function, Thromb Haemost. 1995 Sep;74(3): 853-8

[84] Rha-Meyer N. et al.: Platelet concentrates transfusion in cardiac surgery and platelet function assessment by multiple electrode aggregometry. Acta Anaesthesiol Scand. 2009 Feb;53(2): 168-75

[85] Riess H. et.al: Critical evaluation of platelet aggregation in whole blood. Am J Clin Pathol. 1986 Jan; 85 (1): 50-6

[86] Robert Koch Institut, Arbeitskreis Blut, Votum 38, Bundesgesundheitsbl- Gesundheitsforsch- Gesundheitsschutz 12, 2008, 51: 1484 , 11.01.2010, http://www.rki.de/cln_091/nn_206138/DE/Content/Infekt/Blut/AK__Blut/Voten/Uebersicht/V__38/V38,templateId=raw,property=publicationFile.pdf/V38.pdf

[87] Rock G. et al: Seven-day storage of random donor concentrates PLT Transfusion. 2003 43: 1374

[88] Ruane PH.et.al: Photochemical inactivation of selected viruses and bacteria in platelet concentrates using riboflavin and light. Transfusion. 2004 Jun; 44 (6): 877-85

[89] Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg: Neuer Ansatzpunkt im Kampf gegen Herzinfarkt und Schlaganfall, 11.01.2010, http://www.uni-heidelberg.de/presse/news/2310thro.html

[90] Scharbert G.et.al: The Effects of Test Temperature and Storage Temperature on Platelet Aggregation: A Whole Blood in Vitro Study. Anesth Analg.2006;102:1280-4

[91] Schini-Kerth VB: Vascular biosynthesis of nitric oxide; effect on hemostasis and fibrinolysis. Transfus Clin Biol. 1999 Dec;6(6): 355-63

[92] Schmidt, Lang, Thews: Physiologie des Menschen 29. Auflage, Springer Medizin Verlag Heidelberg, 2005: 524

[93] Schubert et.al.: A signaling pathway contributing to platelet storage lesion developement: targeting PI3-kinase-dependent Rap 1 activation slows storage-induced platelet deterioration. Transfusion 2009 Sep;49(9):1944-55.

[94] Shenkman B. et. al: Testing of Platelet Deposition on Polystrene Surface Under Flow Conditions by the Cone and Plate(let) Analyzer: role of Platelet Activation, Fibrinogen and von Willebrand Factor, Thrombosis Res. 2000 Aug 15; 99(4): 353-61

[95] Sibbing Dirk. et.al: Assessment of ADP-induced platelet aggregation with light transmission aggregrometry and multiple electrode platelet aggregometry before and after clopidogrel treatment Thromb Haemost 2008; 99(1):121-6

[96] Solberg HE.: Approved recommendation (1986) on the theory of reference values. Part 1. The concept of Reference Values. J. Clin.Chem. Clin. Biochem. 1987;25: 337-342

[97] Solberg HE.: Approved recommendation (1987) on the theory of reference values. Part 5. Statistical treatment of Collected Reference Values. Determination of Reference Limits. J. Clin.Chem. Clin. Biochem. 1987;25: 645-656

[98] Spiel AO. et.al: Validation of rotation thrombelastography in a model of systemic activation of fibrinolysis and coagulation in humans. J Thromb Haemost. 2006 Feb; 4 (2); 411-6

[99] Sugimoto M. et.al: Functional property of von Willebrand factor under flowing blood. Int J Hematol. 2002 Jan; 75 (1): 19-24

[100] Swallow RA. et.al: Thromboelastography: potential beside tool to assess the effects of antiplatelet therapy Platelets. 2006 Sep; 17 (6): 385-92

[101] Tóth O. et.al: Multiple electrode aggregometry: A new device to measure platelet aggregation in whole blood. Thromb Haemost 2006; 96: 781-8

[102] Varon D. et.al. A new method for quantitative analysis of whole blood platelet interaction with extracellular matrix under flow conditions. Thromb Res.1997 Feb 15;85(4): 283-94

[103] Varon D., Savion N. :Impact Cone and Platelet Analyzer; Chapter 29, Platelets, Elsevier 2007; 535

[104] Velik-Sacher C. et al.: Point-of-Care whole blood impedance aggregometry versus classical light transmission aggregometry for detecting aspirin and Clopidogrel: the results of a pilot study. Anesth Analg.2008 Dec;107(6):1798-806

[105] Wagner OF. et.al: Interaction between plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1) bound to fibrin and either tissue-type plasminogen activator (t-PA) or urokinase-type plasminogen activator (u-PA). Binding of t-PA/PAI-1 complexes to fibrin mediated by both the finger and the kringle-2 domain of t-PA. J Clin Invest. 1989 Aug; 84 (2): 647-55

[106] Wallace EL et.al: Collection and transfusion of blood and blood components in the Unites States 1994. Transfusion 1998 Jul; 38(7): 622-4

[107] Wittmann G. et.al: Functional quality control of platelet concentrates using multiple electrode Aggregometry; 50th annual meeting of the Society of Thrombosis and Haemostasis Research 15.-18. Feb. 2006; Basel: P363

[108] Wu K.K. et.al: Role of endothelium in thrombosis and hemostasis. Annu Rev Med. 1996; 47: 315-31 Transfus Clin Biol. 1999 Dec; 6 (6): 355-63

[109] Xu C.O. et.al: Dynamic model of the role of platelets in the blood coagulation system. Med Eng Phys. 2002 Nov: 24 (9): 587-93

[110] Zaidi TN et. al: Adhesion of platelets to surface-bound fibrinogen under flow, Blood, 1996, Oct15, 88(8): 2967-72

8. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Michael Spannagl für die Bereitstellung des interessanten Themas und der konstruktiven Verbesserungsvorschläge bei der Korrektur.

Herrn Prof. Dr. med. Dr. h. c. Wolfgang Schramm gebührt herzlichen Dank für die Nutzung der Einrichtung und der Materialien der Laboratorien im Klinikum Großhadern, was die Durchführung der Arbeit erst ermöglichte.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Betreuer Dr. med. Georg Wittmann, der mich in dieser Zeit mit sehr viel fachlicher Kompetenz, Geduld und Humor unterstützt hat, mir wertvolle Anregungen gab und dessen Tür für mich stets offen stand.

Ich danke allen Mitarbeitern der Abteilung Transfusionsmedizin und Hämostaseolgie (Standort Großhadern und Innenstadt), insbesondere Fr. Angelika Harbodt.

Meinen Eltern danke ich für die unermüdliche Unterstützung während der Zeit meiner Ausbildung, des Studiums und der Durchführung der Dissertation.

Meinem Freund danke ich für die kompromisslose Unterstützung und vor allem für seine Geduld während der Erstellung dieser Arbeit.

9. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Birgit Berghammer
Geburtsdatum	16.01.1977
Geburtsort:	München

Schulausbildung

09/93-07/95	Fachoberschule für Sozialwesen der Friedrich-Oberlin-Stiftung, München, Fachgebundene Hochschulreife
09/02-07/03	Städtische Berufsoberschule Würzburg, Allgemeine Hochschulreife

Berufsausbildung

09/99-07/02	Staatliche Berufsfachschule für technische Assistenten in der Medizin an der Universität Würzburg, MTLA

Studium

10/97-07/99	Studium der Sozialen Arbeit an der Fachhochschule Würzburg, Vordiplom
10/03-12/09	Studium der Humanmedizin an der LMU, München
08/08-07/09	PJ-Tertial Chirurgie Spital Saanen (Universität Bern), Schweiz PJ-Tertial Innere Medizin, Medizinische Klinik Innenstadt, München PJ-Tertial Anästhesie, Klinikum Großhadern, München
12/09	Approbation als Ärztin

Praktische Berufserfahrung

10/03-12/09	Durchführung von Blutspendeterminen im Raum Oberbayern, Blutspendedienst des Bayrischen Roten Kreuzes, München
10/06-07/08	Qualitätskontrolle von Thrombozytenapheresekonzentraten, Abteilung Transfusionsmedizin und Hämostaseologie, Klinikum Großhadern, München
Seit 01/08	Mitarbeit im Simulationszentrum an der Klinik für Anaesthesiologie, Klinikum Großhadern, München
Famulaturen:	Radiologie, Innere Medizin, Anästhesiologie, Allgemeinmedizin

Berufliche Tätigkeit

seit 01.02.2010	Assistenzärztin an der Klinik für Anaesthesiologie am Klinikum der Universität München