

Aus dem Zentrum für Klinische Tiermedizin der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Arbeit angefertigt unter der Leitung von Prof. Dr. Gabriela Knubben-Schweizer

**Multiplate®-Impedanzaggregometrie in der Buiatrik –
Etablierung der Methodik und Ermittlung von
Referenzwerten für Kälber der Rasse Deutsches Fleckvieh**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde der
Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von

Markus Johannes Huber
aus Wasserburg am Inn

München 2013

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Gabriela Knubben-Schweizer

Korreferent: Prof. Dr. Armin M. Scholz

Tag der Promotion: 09. Februar 2013

Meiner Familie

INHALTSVERZEICHNIS

I	EINLEITUNG	1
II	LITERATURÜBERSICHT.....	3
1	Der Thrombozyt	3
1.1	Morphologie	3
1.2	Funktionsweise	5
1.2.1	Adhäsion.....	5
1.2.2	Aktivierung und Sekretion.....	6
1.2.3	Aggregation	7
1.2.4	Inhibition	7
2	Thrombozytenfunktionstests	9
2.1	Schleimhautblutungszeit	9
2.2	Licht Transmissions Aggregometrie nach Born.....	9
2.3	Platelet Function Analyzer PFA100®.....	11
2.4	(Rotations-) Thrombelastographie	13
2.5	Weitere Aggregometrieverfahren.....	15
2.5.1	Aggregationsberechnung.....	15
2.5.2	Impact Cone and Platelet Analyzer.....	16
2.5.3	Durchflusszytometrie	16
3	Multiple Platelet Function Analyzer (Multiplate®)	16
3.1	Aufbau der Gerätschaft	17
3.2	Aufbau der Messzelle	18
3.3	Messprinzip	18
3.4	Thrombozytenaktivatoren	20
3	Multiplate® in der Veterinärmedizin.....	22
3.1	Multiplate® beim Hund	22
3.2	Multiplate® beim Schaf	23
3.3	Multiplate® bei anderen Tierarten	24
III	MATERIAL UND METHODEN.....	26
1	Tiere	26

2	Verwendete Materialien.....	27
3	Probengewinnung.....	27
4	Messablauf	29
4.1	Vorbereitungen	29
4.2	Probenablauf.....	29
5	Etablierung eines standardisierten Verfahrens beim Kalb zur	
	Blutentnahme und Probenuntersuchung bei Rindern am Multiplate®	
	31
5.1	Probenreihe 1: Konzentration von ADP und Col - Messdauer	32
5.2	Probenreihe 2: Kanülenstärken	32
5.3	Probenreihe 3: Aufziehverfahren	32
5.4	Probenreihe 4: Entnahmerichtung	32
6	Bestimmung von Referenzwerten	33
7	Statistische Auswertung.....	33
7.1	Statistische Auswertung der einzelnen Methodenschritte	33
7.2	Graphische Darstellung	33
7.3	Statistische Auswertung der Referenzwerte	34
7.4	Signifikanz und Korrelation	34
IV	ERGEBNISSE	35
1	Konzentration von ADP und Col - Messdauer	35
2	Vergleich verschiedener Kanülenstärken bei der Probenentnahme ..	41
3	Vergleich verschiedener Entnahmesysteme bei der	
	Probenentnahme.....	45
4	Vergleich verschiedener Entnahmerichtungen bei der	
	Probenentnahme.....	48
5	Referenzwerte	49
6	Gruppenvergleiche	51
6.1	Vergleich der Funktionsweise zwischen männlichen und weiblichen	
	Tieren.....	51

6.2	Vergleich der erhaltenen Referenzwerte der Thrombozytenfunktion nach Altersgruppen	53
6.3	Korrelation zwischen der Thrombozytenzahl und der erhaltenen AUC-Werte der Thrombozytenfunktion	55
6.4	Korrelation zwischen der Anzahl an Lebenstagen der Tiere und den gemessenen Aggregationswerten (AUC-Werte)	57
V	DISKUSSION	59
1	Auswahl der Kälber	59
2	Diskussionspunkte bezüglich der Blutentnahme	59
3	Diskussionspunkte bezüglich der Methodenabstimmung	61
4	Referenzwerte	65
5	Signifikanz und Korrelation	66
VI	ZUSAMMENFASSUNG	69
VII	SUMMARY	70
VIII	LITERATURVERZEICHNIS	71
IX	ANHANG	78
1	Einzelwerte	78
2	Tabellenverzeichnis	86
3	Abbildungsverzeichnis	88
X	DANKSAGUNG	92

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Im Text verwendete Abkürzungen:

Abb.	=	Abbildung
ADP	=	Adenosindiphosphat
ASPI	=	Arachidonsäure
ATP	=	Adenosintriphosphat
AU	=	Aggregation Unit
AU*Min	=	Aggregation Units pro Minute (Einheit für AUC-Werte)
AUC	=	Area Under The Curve
BCT®	=	Behring Coagulation Timer
BNP	=	Bovine Neonatale Panzytopenie
BVD/MD	=	Bovine Virus Diarrhoe / Mucosal Disease
bzw.	=	beziehungsweise
Ca	=	Calcium
Ca/DAG-GEFI	=	Calcium Diacylglycerol Guanine Nucleotid Exchange Factor I
cAMP	=	Cyclisches Adenosinmonophosphat
cGMP	=	Cyclisches Guanosinmonophosphat
Col	=	Collagen
COX	=	Cyclooxygenase
CPDA-1	=	Citrat-Phosphat-Dextrose-Adenin-1
CT	=	Clotting Time
d	=	Tage
EDTA	=	Ethyldiamintetraacetat

EP3-Rezeptor	=	Prostaglandin E Rezeptor 3
et al.	=	et alii
G-Protein	=	Guaninnucleotid-bindendes Protein
G α a	=	Guaninnucleotid-bindendes Protein α a
G α i	=	Guaninnucleotid-bindendes Protein α i
GP Ia-IIa	=	Glycoprotein Ia-IIa
GP Ib-IX	=	Glycoprotein Ib-IX
GP Ic-IIa	=	Glycoprotein Ic-IIa
GP IIa	=	Glycoprotein IIa
GP IIa-IIIb	=	Glycoprotein IIa-IIIb
GP IIb-IIIa	=	Glycoprotein IIb-IIIa
GP IV	=	Glycoprotein IV
GO IV-IIb	=	Glycoprotein IV-IIb
GP VI	=	Glycoprotein VI
GP V-IIb	=	Glycoprotein V-IIb
hTF	=	Human Tissue Factor
ID	=	Identifikationsnummer
IMPACT	=	Image analysis, Monitoring, Platelet, Adhesion, Cone & Plate Technology
l	=	Liter
LMU	=	Ludwig-Maximilians-Universität
MCF	=	Maximale Aggregationsamplitude
Min	=	Minuten
mMol	=	Millimol
mRNA	=	Messenger Ribonucleinsäure
Multiplate	=	Multiple Electrode Platelet Analyzer

NaCl	=	Natriumchlorid
NO	=	Stickstoffmonoxyd
P ₂ Y ₁	=	P2Y Purinozeptor 1 (G-Protein gekoppelter Rezeptor)
P ₂ Y ₁₂	=	P2Y Purinozeptor 12 (G-Protein gekoppelter Rezeptor)
PFA 100	=	Platelet Function Analyzer 100
PG	=	Prostaglandin
PGG2	=	Prostaglandin G2
PGH2	=	Prostaglandin H2
pH	=	pH-Wert
PIP2	=	Phosphatidyl-Inositol-4,5-Biphosphat
PLC	=	Phospholipase C
PTFE	=	Poly-Tetra-Fluoro-Ethylen
RAR1-RAR4	=	Protease Activating Receptor
ROTEM	=	Rotationsthrombelastographie
RUO	=	Research Use Only
s	=	Sekunde
SD	=	Standardabweichung
TEG	=	Thrombelastographie
TRAP	=	Thrombin Rezeptor Activating Protein
TXA2	=	Thromboxan A2
U/Min	=	Umdrehungen pro Minute
U*Min	=	Einheit für AUC-Werte (1U*Min = 10 AU*Min)
VC	=	Variationskoeffizient
vWF	=	von Willebrand Faktor

$\mu\text{g}/\text{ml}$ = Mikrogramm pro Milliliter

μl = Mikroliter

$\mu\text{mol}/\text{l}$ = Mikromol pro Liter

\bar{x} = Mittelwert

I EINLEITUNG

Beginnend im süddeutschen Raum, dann auch bundesweit ebenso wie nachfolgend in anderen europäischen Ländern konnte seit 2007 eine (vorerst ungeklärte) Häufung von Fällen hämorrhagischer Diathese bei Kälbern beobachtet werden (FRIEDRICH et al., 2011). Im Gegensatz dazu war Blutungsneigung in den Jahren davor ein vergleichsweise seltenes Krankheitsbild: zwischen 1982 und 2007 wurden 89 Rinder unterschiedlichen Alters mit den Symptomen einer hämorrhagischen Diathese, unterschiedlicher Ursachen, in die Klinik für Wiederkäuer der LMU eingeliefert (RACZYNSKI, 2011). Von 2007 bis 2010 dagegen wurden 137 Patienten mit hämorrhagischer Diathese in die Klinik für Wiederkäuer der LMU eingeliefert, bei denen eine Bovine Neonatale Panzytopenie (BNP) nachgewiesen wurde (CARLIN, 2011). Mit BNP wird seit 2009 ein Krankheitsbild bezeichnet, bei welchem Kälber aufgrund fehlender Nachbildung von Blutzellen nach Zerstörung des Knochenmarkes eine Blutungsneigung entwickeln. Ausgelöst wird die Erkrankung durch Antikörper, die über das Kolostrum bestimmter Kühe übertragen werden. Die Bildung dieser Antikörper steht in Zusammenhang mit dem Einsatz der BVD-Impfung PregSure® (Zulassung seit August 2011 erloschen) bei den Muttertieren bzw. den „Kolostrumspendern“. Durch Vermeidung der Verwendung dieses Impfstoffes und der Verfütterung des Erstgemelks von damit geimpften Tieren, wurde die Erkrankungsrate erheblich gesenkt. Jedoch werden immer öfter Patienten aller Altersstufen mit Blutungsneigung unterschiedlichen Ausmaßes bei der Tierärzteschaft vorgestellt. Ob es sich dabei um eine „echte“ Häufung dieser Fälle handelt ist schwer zu beurteilen, da in den letzten Jahren bei den Landwirten eine gesteigerte Sensibilität gegenüber Gerinnungsstörungen bei Rindern eingetreten ist. Im Zuge des Auftretens von „BNP-Kälbern“ häuften sich nun auch Fälle von Kälbern und älteren Rindern der Rasse Deutsches Fleckvieh mit Blutungsneigung ohne Thrombozytopenie und Knochenmarkschaden. Aus der Literatur (STEFICEK et al., 1993; BOUDREAUX et al., 2007; MAPLETOFT et al., 2000) und aufgrund von Untersuchungen an der Klinik für Wiederkäuer in Oberschleißheim gibt es Anlass zur Vermutung, dass es sich dabei um eine genetische Ursache handelt, die eine Thrombozytenfunktionsstörung zur Folge hat. Um dies weiter zu erforschen, bedarf es zuerst einem Verfahren, mit dem man die Thrombozytenfunktion von Rinderblut erfassen und qualitativ bewerten kann, was bisher nur mit sehr kostenaufwendigen und umständlichen Gerätschaften möglich war und aufgrund der geringen Sensitivität wenig etabliert ist. Unter aktuellen Laborstandards in der Buiatrik war derzeit nur eine Beurteilung der Thrombozytenzahl möglich. Da es kein speziell für die Veterinärmedizin entwickeltes

Aggregometrieverfahren gibt, hat man deshalb den aktuellen „Goldstandard“ für die Thrombozytenfunktionsmessung aus der Humanmedizin adaptiert. Hier wird seit 2006 ein Messinstrument namens Multiplate® (Multiple Platelet Function Analyzer; Verum Diagnostica, München, Deutschland) eingesetzt, welches innerhalb weniger Minuten einen Messwert ermittelt, der die Funktion der Blutplättchen widerspiegelt. Vorteil dieser Methode ist die einfache Testdurchführung, das geringe Probenvolumen und die Verwendung von Vollblut, das nicht wie bei anderen Techniken vorbereitet werden muss (CALATZIS, 2007). Somit ist auch der Zeitaufwand deutlich geringer. In der Humanmedizin wird das Multiplate® hauptsächlich dazu genutzt, die Thrombozytenhemmung antikoagulatorischer Substanzen wie z.B. Clopidogrel, Acetylsalycilsäure oder GPIIb/IIIa-Antagonisten nachzuweisen (CALATZIS, 2007). Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, dieses Untersuchungsverfahren in der Rindermedizin zu etablieren.

II LITERATURÜBERSICHT

1 Der Thrombozyt

Die Thrombozyten sind bei Hämostase und Thrombusentstehung ein wichtiger Bestandteil der Blutgerinnung. Im Folgenden wird näher auf die Morphologie und genaue Funktionsweise eingegangen.

1.1 Morphologie

Thrombozyten entstehen im Knochenmark durch Zerfall und Abschnürungen des Zytoplasmas von Megakaryozyten (TABLIN et al., 1990; GEORGE, 2002). Dieser Vorgang wird durch das renale Glykoproteinhormon Thrombopoetin stimuliert. Insgesamt entstehen auf diese Weise 250 Milliarden Blutplättchen pro Stunde. Zwei Drittel der Thrombozyten zirkulieren im Blut und ein Drittel wird in der Milz gespeichert. Nach einer Lebensdauer von ca. 10 Tagen werden die Blutplättchen in Milz, Leber und Lunge abgebaut (GEORGE, 2000). Die diskus- oder ellipsenförmigen Thrombozyten sind zellkernlos und haben ein sehr variables Volumen, welches beim Rind 0,8-2,5 μ l beträgt (KRAMER, 2000). Die physiologische Menge liegt bei $200\text{-}800 \times 10^3$ Thrombozyten pro μ l Blut (STÖBER & GRÜNDER, 1990). Ein Thrombozyt besteht aus einer Plasmamembran, einem Hyaloplasma, einem Zytoskelett und den Organellen (Abb. 1).

a) Die Plasmamembran besteht aus einer Phospholipiddoppelschicht und einer sich darauf befindenden Glykokalix. Diese setzt sich aus Glycoprotein-Rezeptoren zusammen, die essentiell für den ersten Schritt der Thrombozytenfunktion, der Thrombozyten-Adhäsion, sind. Wichtige Vertreter dieser Rezeptoren sind GPIa/IIa, GPVI und GPIV-IIb für Kollagen, GPIIb/IIIa und GPIb-IX für vWF und Kollagen, GP IIa-IIIb für Fibrin, GPIc-IIa für Fibronectin, GPIV für Thrombospondin, P_2Y_{12} für ADP und GPIa, das direkt an das Subendothel bindet. Unter der Lipidmembran befindet sich ein submembranöser Bereich aus Aktinfilamenten, welcher über Filamin mit den Glycoproteinen der Membran verbunden ist und dem nicht aktivierten Blutplättchen seine stabile Form verleiht (KEHREL, 2003). Ebenfalls im submembranösen Bereich sind G-Proteine (Guanin Nucleotid bindende Proteine) lokalisiert, welche Signale der membranständigen Rezeptoren aufnehmen und verarbeiten.

b) Das Hyaloplasma besteht aus einer Salzlösung (WHITE, 2002), in der sich mRNA aus dem Megakaryozyten und einzelnen Mitochondrien befinden (DAVÌ & PATRONO, 2007).

- c) Das Zytoskelett der Thrombozyten setzt sich aus Microtubuli zusammen, die jeweils einen Durchmesser von ca. 25 nm haben und zu je 3-24 Filamenten ringförmig in einer Gruppe angeordnet sind (WHITE, 2002).
- d) Ein Thrombozyt enthält unterschiedliche Organellen. Die Granula zählen zu den Wichtigsten. Abhängig von seinem Volumen befinden sich 40-80 solcher ovaler Bläschen in einer Größe von 200-500 nm in jedem Blutplättchen (WHITE, 2002). Der Inhalt besteht aus in Membran umhüllten Proteinen, die aus den Megakaryozyten stammen, sowie vieler wichtiger Gerinnungsfaktoren wie z.B. den von Willebrand Faktor (vWF), Plättchenfaktor III und IV, Thrombospondin, Fibronectin, Fibrinogen und Growth Factor. Weitere Organellen sind Mitochondrien, Plättchen-Glykosome und dichte Granula (β -Granula). Letztere enthalten wichtige, die Trombozyten aktivierende Stoffe, wie z.B. ADP, Serotonin, Calcium und Thromboxan A₂.

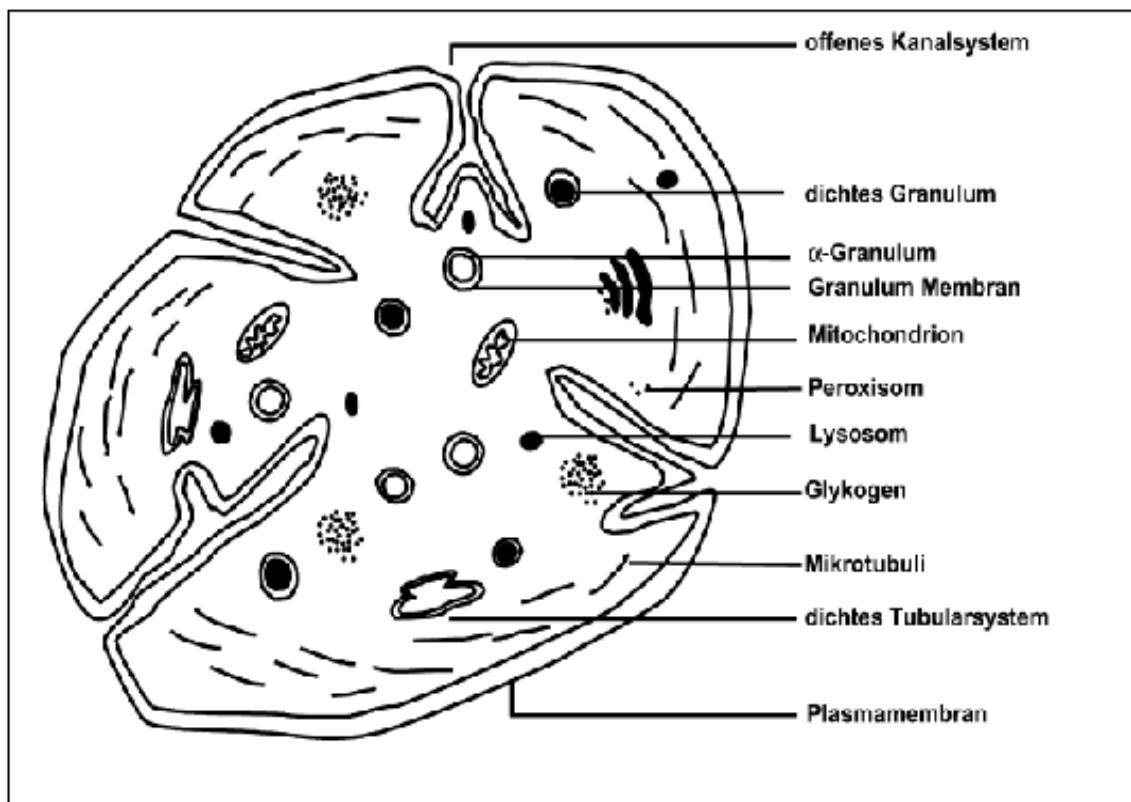


Abbildung 1: Morphologie eines ruhenden Thrombozyten (KEHREL, 2003).

1.2 Funktionsweise

Neben der Unterstützung von Entzündungsprozessen und Wundheilung liegt die Hauptfunktion der Blutplättchen in der Blutgerinnung in Form der primären Hämostase. Der Thrombozyt durchläuft diese in den vier Phasen Adhäsion, Aktivierung und Sekretion, Aggregation und Inhibition. In Tabelle 1 sind die wichtigsten Agonisten der Thrombozytenfunktion und deren Rezeptoren aufgeführt.

1.2.1 Adhäsion

Unter Adhäsion versteht man das Anheften des Thrombozyten an eine defekte Stelle der Gefäßwand, und somit den Beginn der Aktivierungs- und Funktionskaskade. Thrombozyten zirkulieren in inaktiver Form im peripheren Blut, wobei ein Teil an der Gefäßwand entlang rollt („Tethering“). Ist das Gefäßendothel intakt, verbleiben sie in diesem Zustand. Berühren sie jedoch zufällig einen Bereich, an dem das Endothel verletzt und somit die subendothiale

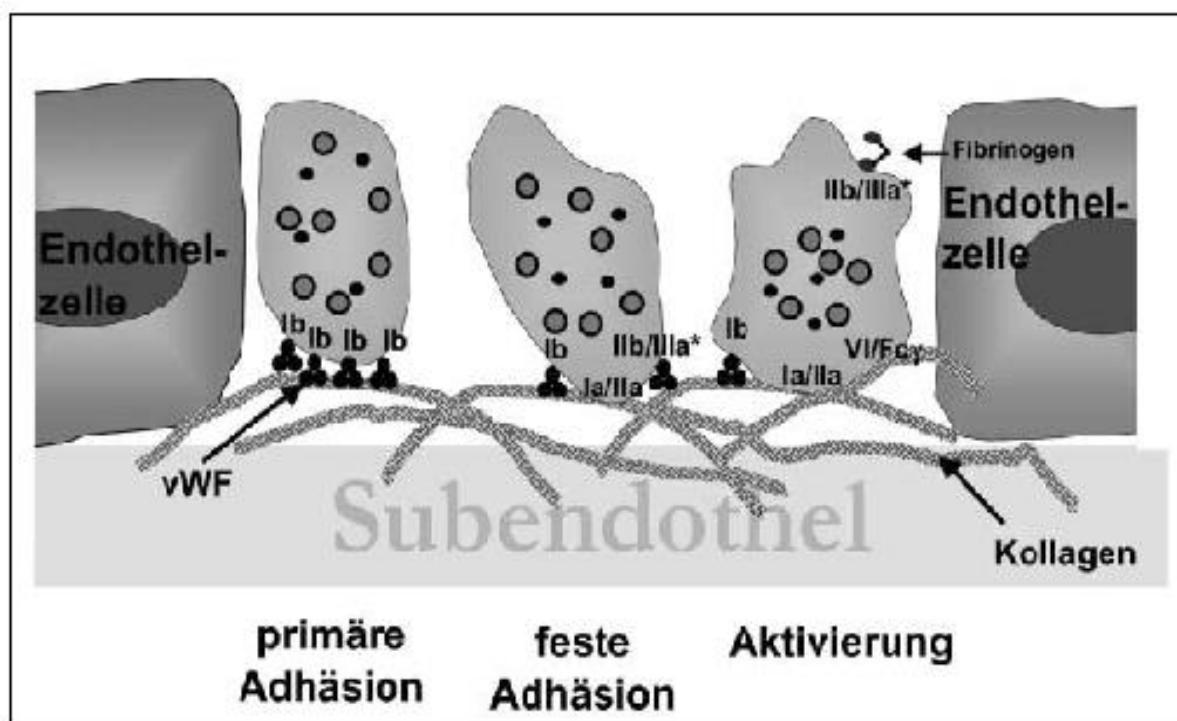


Abbildung 2: Schema zur Thrombozyten-Adhäsion über Glycoproteine am Gefäßendothel mittels Kollagen und vWF (KEHREL, 2003).

Matrix frei gelegt ist, entsteht hier der initiale Kontakt mit den membranständigen Rezeptoren des Blutplättchens. Hier können je nach den Strömungs- und Scherkräften des Blutes verschiedene Verbindungen zwischen den Agonisten, der Matrix und den Rezeptoren der Thrombozytenmembran eingegangen werden (JACKSON, 2007). Bei geringen Scherkräften bindet das Glycoprotein IIb/IIIa an den vWF, Fibronektin und Fibrinogen (JURK &

KEHREL, 2005; JACKSON, 2007). Werden die Scherkräfte stärker, bindet das Glycoprotein IIb/IIIa an Thrombospondin, das Glycoprotein Ib/V/IX an den vWF und das Glycoprotein Ia/IIa und VI an das freigelegte Kollagen (OFFERMANNS, 2006). Glycoprotein VI bindet über die Glycoprotein Ia/IIa (Intergine $\alpha_2 \beta_3$) und Integrine $\alpha_2 \beta_1$ indirekt an Kollagen (OFFERMANNS, 2006). Nach JURK und KEHREL (2005) binden weitere Integrine $\alpha_v \beta_3$ und $\alpha_8 \beta_1$ an Vitronectin und Laminin (Abb. 2).

1.2.2 Aktivierung und Sekretion

In der Phase der Aktivierung und Sekretion durchläuft der Thrombozyt eine G-Protein gekoppelte Signaltransduktion, welche typischerweise mit der Aktivierung der verschiedenen Formen von Phospholipase C (PLC) durch die einzelnen Agonisten beginnt (WIINBERG & KRISTENSEN, 2010). ADP, Tromboxan A₂ und Thrombin aktivieren hier PLC β , und Collagen das PLC γ_2 , welches auf einem Mechanismus, der vom Protein Tyrosinkinase abhängig ist, beruht. Anschließend hydrolyseren die PLC's Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate (PIP2) zu Inositol-1,4,5-Triphosphate (IP3), was die Mobilisation von Calcium bewirkt (WIINBERG et al., 2012). Die Aktivierung wird jedoch hauptsächlich durch Thromboplastin und Thrombin eingeleitet. Thromboplastin, welches auch Tissue Factor oder Faktor III genannt wird, findet man auf Subendothel und ist ein Bestandteil der plasmatischen Gerinnung, in der es Prothrombin in Thrombin katalisiert. Thrombin, das auch Faktor IIa genannt wird, aktiviert den Protease-Activate-Receptor 1 und Protease-Activate-Receptor 4 (PAR 1-PAR4), welche mit den G-Proteinen IV/XII und XIII gekoppelt sind (HEEMSKERK et al., 2002; OFFERMANNS, 2006). Der durch die Signaltransduktion ausgelöste Anstieg der Ca-Ionen hat eine Veränderung in eine kugelige Thrombozytenform (Shape Change), eine Bildung von Pseudopodien und Sezernierung der Granula zur Folge. Die dadurch entleerten und von den verletzten Endothelzellen sezernierten Agonisten führen zu einer Aktivierung weiterer Blutplättchen. Eine wichtige Rolle spielt hier ADP und ATP, welches in hoher Konzentration aus den dichten Granula sezerniert wird (OFFERMANNS, 2006). Dieses bindet an die P₂Y₁- und P₂Y₁₂-Rezeptoren, welche wiederum an die G-Proteine G α_q und G α_i gekoppelt sind (OFFERMANNS, 2006; KULKARNI et al., 2000; JACKSON, 2007). Ein weiterer Agonist ist Tromboxan A₂, welcher kompatibel zum G α_q Rezeptor ist und die Freisetzung von Prostaglandinen wie PGG₂ und PGH₂ verursacht. Dieser Einfluss auf den Entzündungsprozess ist jedoch aufgrund seiner kurzen Halbwertszeit zeitlich begrenzt (OFFERMANNS, 2006). Serotonin, das ebenfalls aus den dichten Granula freigesetzt wird, wirkt vasokonstriktorisch und hat somit einen positiven Einfluss auf die Blutstillung (JACKSON, 2007). Die Faktoren V/VIII aktivieren die plasmatische Gerinnung.

Prostaglandin E₂ verstärkt die Plättchenaktivität über EP₃-Rezeptoren, die mit Gi-Proteinen gekoppelt sind, über die auch Chemokine, Plättchenfaktor IV und Lysophospholipide die Thrombozyten aktivieren (OFFERMANNS, 2006). Die Sekretion ist in Abbildung 3 vereinfacht dargestellt.

1.2.3 Aggregation

In dieser Phase wird eine feste Bindung zwischen den adhäsierten Thrombozyten mit der beschädigten Gefäßwand und den Blutplättchen untereinander ausgebildet. Durch die Adhäsion und Signaltransduktion kommt es im Cytosol des Thrombozyten zu einer Erhöhung der Calciumkonzentration. Diese löst einen sekundären Einstrom von Ca-Ionen aus, wodurch die Bindung verstärkt wird. Calcium aktiviert daraufhin Talin, das GPIIb/IIIa durch eine Konformationsänderung zu einer Bindungsstelle für Fibrinogen macht, welches auch mit Fibrin, vWF und Fibronectin ausgetauscht werden kann (WIINBERG et al., 2012). Durch die Strukturveränderung der Glykoprotein IIb/IIIa-Rezeptoren werden feste Fibrinbrücken zu Fibrinogen und vWF ausgebildet (KULKARNI et al., 2000; WAGNER et al., 1996; JACKSON, 2007).

1.2.4 Inhibition

Das angrenzende intakte Endothel hat die Fähigkeit, die Thrombozytenaktivierung zu hemmen, um eine übermäßige Gerinnung zu vermeiden. Dies geschieht hauptsächlich über Stickstoff-Monoxyd (NO), welches zu einem Anstieg von cGMP führt. Die erhöhte cGMP-Konzentration bewirkt die Senkung der Calciumkonzentration, die die Strukturänderung der Glycoprotein IIb/IIIa-Rezeptoren hemmt. Ebenso greifen Ecto-ADPAsen in das System ein, indem sie ADP und ATP abbauen und somit die Thrombozytenaktivierung stören (OFFERMANNS, 2006; DAVÌ & PATRONO, 2007). Prostaglandin-I-Synthetasen führen zu einem Anstieg der cAMP-Konzentration, wodurch Gefäßspasmen aufgelöst werden.

Tabelle 1: Agonisten und deren Rezeptoren beim Menschen (JURK & KEHREL, 2005).

Wichtige Agonisten und Rezeptoren für die Thrombozytenfunktion		
Adhäsion	vWF TSP1 Collagen Heparinogen Fibronectin Vitronectin Laminin High shear stress	GP1b/V/IX GP1b/V/IX, CD36 $\alpha_2\beta_1$, GPVI, CD36 $\alpha_{IIb}\beta_3$ $\alpha_5\beta_1$ ⁷³ $\alpha_v\beta_3$ ⁷⁷ $\alpha_6\beta_1$ ⁷⁴ GP1b/V/IX
Aktivierung	Thrombin ADP Tx Λ_2 Epinephrine Serotonin MMP-2, MMP-1 ^{76,76} Immune complexes Complement factors Plasmin Streptokinase	PAR1, PAR4, GP1b/V/IX P2Y ₁ , P2Y ₁₂ TP α , TP β α_2A 5-HT2A ? Fc γ IIa C1q, C3a, C5a receptors ? ?
Aggregation	Fibrin vWF TSP-1 ⁷⁷ Fibronectin sCD40L Gαs6 SDF-1, TARC, MDC	Activated $\alpha_{IIb}\beta_3$ Activated $\alpha_{IIb}\beta_3$, GP1b/V/IX Activated $\alpha_{IIb}\beta_3$, CD36, IAP Activated $\alpha_{IIb}\beta_3$ Activated $\alpha_{IIb}\beta_3$ α_1 ^{78,79} CXCR4, CCR4 ⁸⁰⁻⁸²
vWF, von Willebrand factor; TSP1, thrombospondin-1; ADP, adenosine diphosphate; Tx Λ_2 , thromboxane A ₂ ; MMP, matrix metalloproteinase; IAP, integrin associated protein; SDF, stromal cell-derived factor; TARC, thymus and activation-regulated chemokine; MDC, macrophage-derived chemokine.		

2 Thrombozytenfunktionstests

Die Bestimmung der Thrombozytenfunktion spielt hauptsächlich in der Humanmedizin eine große Rolle. Dabei werden unterschiedliche Verfahren eingesetzt. Die Indikation besteht meist darin, Patienten, die aus therapeutischen Gründen antikoagulatorische Substanzen wie z.B. Acetylsalycilsäure oder Clopidogrel erhalten, zu überwachen. In der Veterinärmedizin sind viele Methoden aufgrund des hohen Aufwandes oder neuere Verfahren aufgrund mangelnder Erfahrung noch wenig im Einsatz. Publiziert sind bisher vor allem Erfahrungen bei Hunden und Schafen. Auf den folgenden Seiten sind die wichtigsten Thrombozyten-Funktions-Analysen aufgeführt, welche in der Tiermedizin mehr oder weniger etabliert sind.

2.1 Schleimhautblutungszeit

Eine einfache und schnell durchführbare Möglichkeit ist die 1910 von Duke entwickelte Messung der Schleimhautblutungszeit, welche bis in die frühen 1990er Jahre die am meisten genutzte Methode zur Messung der Gerinnungsfunktion war (HARRISON, 2005). Bei diesem in vivo Verfahren wird die Schleimhaut an der Lippeninnenseite, die Haut am Ohr oder einer rasierten Stelle an einer Zehe des Vorderfußes beim Hund mit einer Nadel angestochen und das Blut regelmäßig mit einer Gaze oder einem Filterpapier abgetupft (JERGENS et al., 1987; FORSYTHE & WILLIS, 1989; NOLTE et al., 1997; BAUMGARTNER, 2005). Beurteilt wird der Zeitraum zwischen Einsetzen und Sistieren der Blutung, welcher beim Menschen 2-10 Minuten (HARRISON, 2005), beim Hund zwischen 2,14 und 3,5 und bei Schwein, Pferd und Rind 1-3 Minuten beträgt (BAUMGARTNER, 2005). Nachteile sind neben der Invasivität hauptsächlich die gegenüber häufigen Blutungsstörungen fehlende Sensitivität (HARRISON, 2005).

2.2 Licht Transmissions Aggregometrie nach Born

Dieses System wurde 1962 von Born und O'Brian beschrieben und wird in der Humanmedizin als „Goldstandard“ in diversen Modifikationen gebraucht (HARRISON, 2005; KLOUCHE, 2007). Das Prinzip ist es, mithilfe eines Aggregometers über einen Lichtstrahl, der die Blutprobe durchquert, die Dichte von aktiviertem plättchenreichem Plasma zu messen und somit eine Aussage über den Aggregationszustand der darin befindlichen Thrombozyten zu erhalten. Dies geschieht mittlerweile vollautomatisch mit verschiedenen Geräten wie z.B. dem „Behring Coagulation Timer®“ BCT® (Dade Behring, Düdingen, Schweiz). Nach Blutprobennahme wird zur Antikoagulation 10% Citrat zugegeben und daraufhin das Vollblut unter 150 g 15 Minuten zentrifugiert (VELIK-SALCHNER et al., 2008). Es entsteht durch Thrombozyten getrübtes, plättchenreiches Plasma

(ca. $250 \times 10^9/L$), welches frühestens nach 30-60 Min nach Inkubation bei ca. 37 °C weiter verarbeitet werden kann (BUDDE, 2002; HARRISON, 2005; VELIK-SALCHNER et al., 2008; HAYWARD et al., 2009). Zur Kontrollmessung ist eine Probe mit plättchenarmen Plasma herzustellen, welches eine 100%ige Lichtdurchlässigkeit darstellt. Danach werden die sich im Plasma befindlichen Thrombozyten mit einem Agonisten wie z.B. ADP, Epinephrin, Kollagen, Thrombin oder Thromboxananaloga aktiviert (HARRISON, 2005; KLOUCHE, 2007). Die entstehenden Thrombozytenaggregate sinken zu Boden und die Trübung der Probe nimmt ab. Das Aggregometer bestimmt die Dichte des noch nicht aktivierte plättchenreichen Plasmas zu Beginn der Messung und die Dichteveränderung nach der Aktivierung der Thrombozyten und berechnet somit die Aggregationsrate, maximale Amplitude und Aggregationsmaximum zu einer bestimmten Zeit (HARRISON, 2005; KLOUCHE, 2007). In Verbindung mit Luminometrie kann dieser Funktionstest auch die Degranulation der Thrombozyten darstellen (INGERMAN-WOJENSKI & SILVER, 1984). BUDDE (2002) zeigte jedoch einige Nachteile dieses Systems auf. So können Veränderungen in der Blutzusammensetzung wie z.B. bei Bilirubinämie oder Lipidämie sowie bei der Zentrifugation beigemischte Zellen das Ergebnis verfälschen. Ebenfalls sei in dem mit Citrat angereichertem Plasma der pH-Wert höher, die Calciumkonzentration niedriger und es würden für die Plättchenaggregation wichtige Blutbestandteile fehlen, was sich auf die Thrombozytenfunktion auswirken könnte. Des Weiteren wurde die Methode wenig standardisiert und es darf nur plättchenreiches Plasma beprobt werden (LINNEMANN et al., 2008; CATTANEO et al., 2009). Dadurch werden hohe Probenmengen vorausgesetzt, und die Methode wird zu einem zeit- und kostenaufwändigen Verfahren (HERKOMMER et al., 2010). In Abbildung 3 ist eine Aggregationskurve nach Born dargestellt.

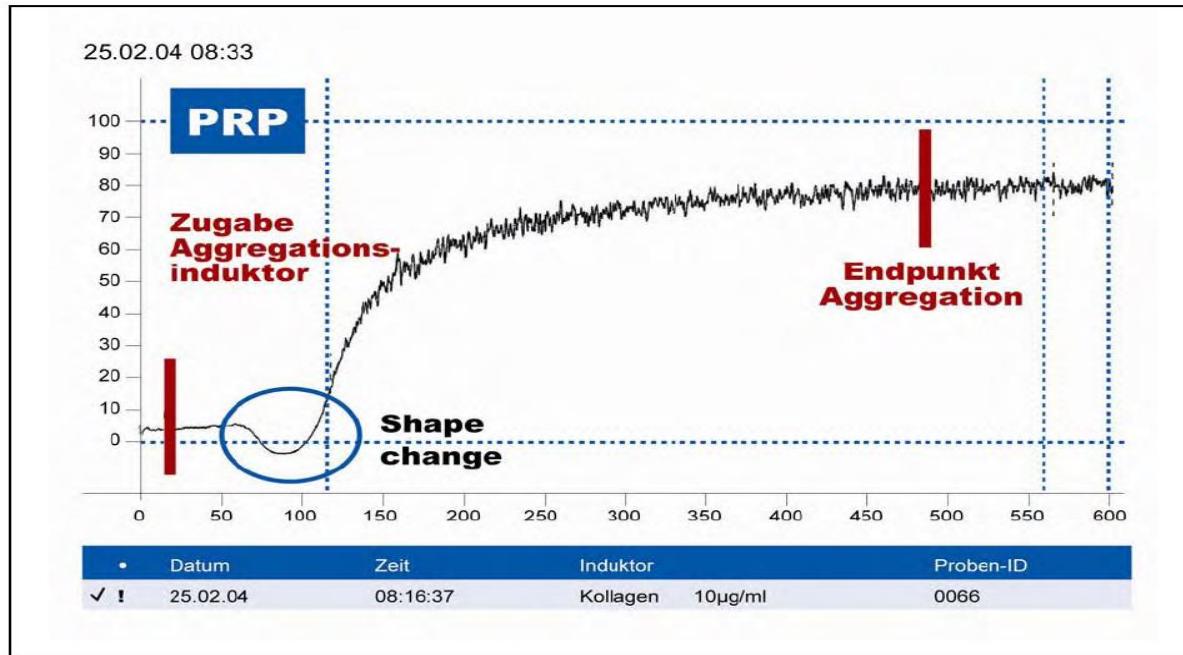


Abbildung 3: Beispiel einer Aggregationskurve nach Born. Ersichtlich ist die Aggregationsrate im zeitlichen Verlauf von Zugabe von 10µg/ml Kollagen bis Endpunkt der Aggregation (SIMON, 2009).

2.3 Platelet Function Analyzer PFA100®

Ein weiteres wichtiges Gerät zur in vitro Messung der primären Hämostase von Vollblut ist der „Platelet Function Analyzer“, kurz genannt PFA-100® (Dade Behring, Düdingen, Schweiz). Bei der Probengewinnung ist zu beachten, dass das Blut zur Antikoagulation mit Citrat anzureichern und innerhalb von vier Stunden zu verwenden ist (HARRISON, 2002). Das Messprinzip ist, dass Vollblut mithilfe eines konstanten negativen Drucks durch ein kleines Loch einer Kapillare mit einem Durchmesser von 150 µm gesaugt wird, wobei Scherkräfte von 5000-6000 s entstehen (KUNDU et al., 1995; CARCAO et al., 1998; WUILLEMIN et al., 2002). Die Kapillare besteht aus einer Membran, die entweder aus einer Kombination von Kollagen und ADP, oder Kollagen und Epinephrin besteht und ein verletztes Gefäß simuliert (Abb. 4). Unter Vorbild der physiologischen primären Hämostase in vivo dient das Kollagen zusammen mit dem im Vollblut befindlichem vWF der Adhäsion, ADP oder Epinephrin der Aktivierung und Degranulation der Thrombozyten (BADE, 2007). Die Aktivierung wird durch die hohen Scherkräfte unterstützt, so dass es bald zu einer Thrombozytenaggregation und Pfropfbildung kommt. Dies bewirkt den Verschluss der Kapillare und das Sistieren des Blutflusses. Beurteilt wird die Zeit in Sekunden zwischen Probenbeginn und Verschluss der Kapillare, welche beim Menschen 82-159 s bei Epinephrin-

und 62,5 s bei ADP-Membranen beträgt (WUILLEMIN et al., 2002). Vorteil dieses Funktionstests für Thrombozyten ist die schnelle, einfache und kostengünstige Durchführbarkeit unter Verwendung kleiner Probenmengen Vollblut (BRAUNWALD et al., 2008; HERKOMMER et al., 2010). Aufgrund fehlender Sensitivität bestimmter Störungen ist der Test nicht als globales Verfahren anzuwenden (HERKOMMER et al., 2010). In der Veterinärmedizin wurde die oben beschriebene Methode 1998 von KEIDEL und MISCHKE bei Hunden getestet. Unter Verwendung beider Membranen, kam es bei ADP-Kollagen mit einer Blutmenge von 223-303 µl zu einer Verschlusszeit von 47-81 s und bei Epinephrin-Kollagen mit einem Probenvolumen von 269-611 µl zu einer Verschlusszeit von 67-210 s. Die Verwendung von ADP-Kollagen Membranen zeigte eine höhere Sensitivität auf (KEIDEL & MISCHKE, 1998).

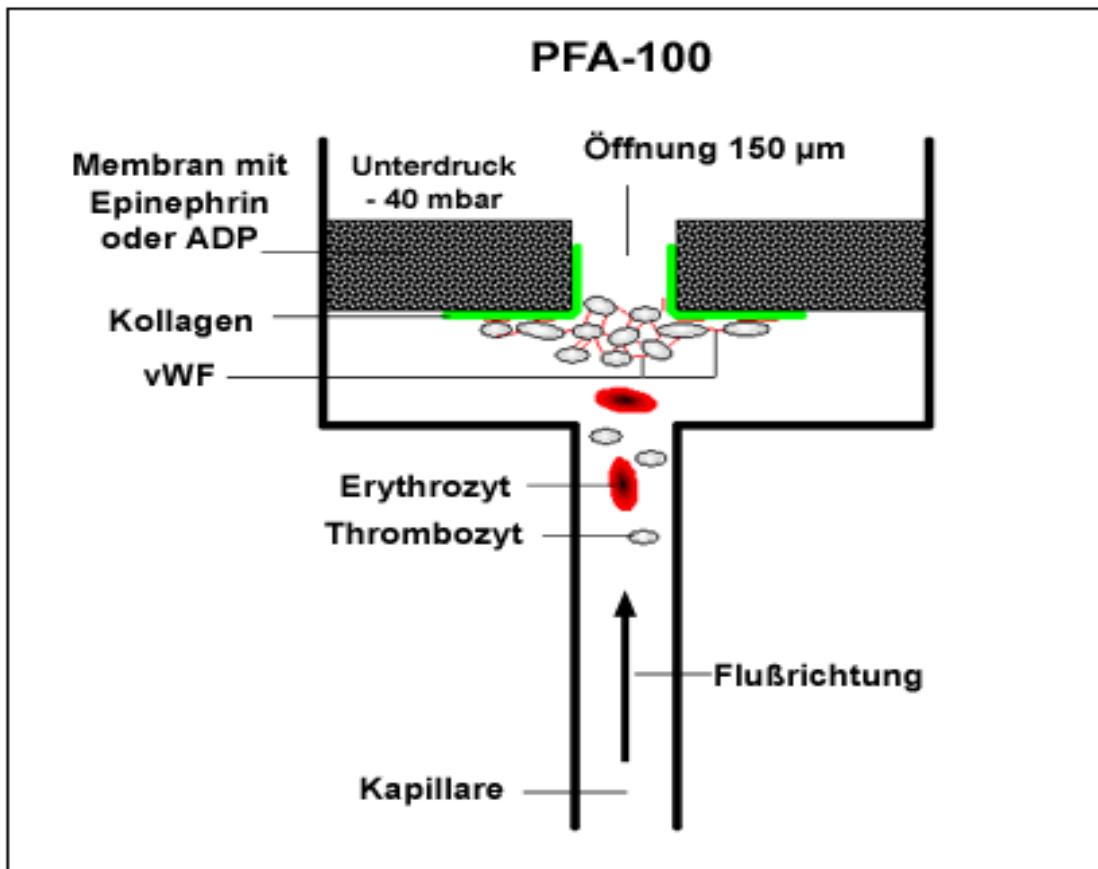


Abbildung 4: Messprinzip eines PFA 100®. Thrombozyten adhäsieren an einer ADP/Kollagen- oder Epinephrin-Kollagen-Membran über vWF und verschließen die 150 µm große Öffnung. (<http://www.medizin.uni-koeln.de>).

2.4 (Rotations-) Thrombelastographie

Die Thrombelastographie (TEG) kann man in zwei Verfahren einteilen. Diese sind die klassische TEG und deren Weiterentwicklung, die Rotations-TEG.

- a) Die klassische Thrombelastographie wurde 1948 von HARTERT in Heidelberg entwickelt (HARTERT, 1948). Dieses System liefert einen Gesamtüberblick über die Gerinnungsfunktion, wobei neben der Thrombozytenfunktion auch die Funktionalität der Gerinnungsfaktoren und der Fibrinolyse erfasst wird. Als Probenmaterial kann Vollblut, mit Citrat angereichertes Blut und rekalzifiziertes Plasma verwendet werden (KLOUCHE, 2007). Optional können Kaolin oder humaner Tissue Factor (hTF) als Aggregationsaktivatoren benutzt werden. Ohne diese Agonisten kommt es zu einer verlängerten Gerinnungszeit, was in der Auswertung zu beachten ist (WIINBERG & KRISTENSEN, 2010). In der Veterinärmedizin, in der es hauptsächlich Erfahrungen bei Hunden und Pferden gibt (WIINBERG & KRISTENSEN, 2010), gebraucht man meist 3,2 % oder 3,8 % antikoaguliertes Citratblut da nicht antikoaguliertes Vollblut oder antikoaguliertes Blut ohne Aktivator aufgrund unakzeptabler hoher Variabilität nicht praktikabel sind (KOL & BORJESSON, 2010; WIINBERG & KRISTENSEN, 2010). Die Gerätschaft besteht aus einer sich drehenden zylindrischen Metallküvette, in der ein starrer Stempel hängt. Pipettiert man Probenmaterial in die Küvette, werden durch den Stempel entstehende geringe Scherkräfte die Thrombozyten aktiviert. Optional zugeführte Agonisten verstärken den Prozess. Es kommt zur Hämostase, bei der sich Fibrinfäden zwischen der Küvettenwand und dem Stempel ausbilden und die Drehbewegung an diesen weitergegeben wird. Dies wird als Funktion pro Zeit über einen Graph aufgezeichnet. Die Übertragung der Drehung der Küvette auf den Stempel ist proportional zur Stärke der Fibrinverbindungen. So entstehen Parameter wie Gerinnungszeit CT (Zeit bis die Aggregation einsetzt), Aggregationsstärke MCF (Wert der Maximalen Aggregationsamplitude), Aggregationsrate über den α -Winkel (Winkel zwischen Mittellinie und Initialtrasse) und maximale Aggregatlyse ML.
- b) Eine Weiterentwicklung ist die Rotationsthrombelastographie ROTEM® (Pentapharm, München, Deutschland) welches 1996 von CALAZIS und FITSCHE (HÄNECKE & KLOUCHE, 2007; KLOUCHE, 2007) eingeführt wurde. Eine Veränderung zur klassischen Version ist, dass die Küvette fixiert ist und der Stempel darin rotiert, indem er sich abwechselnd in beide Richtungen um je $4,75^\circ$ dreht. Beide Bestandteile sind aus Kunststoff gefertigt und so konstruiert, dass sie weniger stoßempfindlich sind. Als Agonisten können Ellagsäure, rodent Tissue Factor oder Fibrinogen verwendet werden (KLOUCHE, 2007). Nach Plättchenaggregation und Fibrinbindung kommt es zu einer eingeschränkten

Drehbewegung des Stempels und Aufzeichnung über das Thrombelastogramm (Abb. 5).

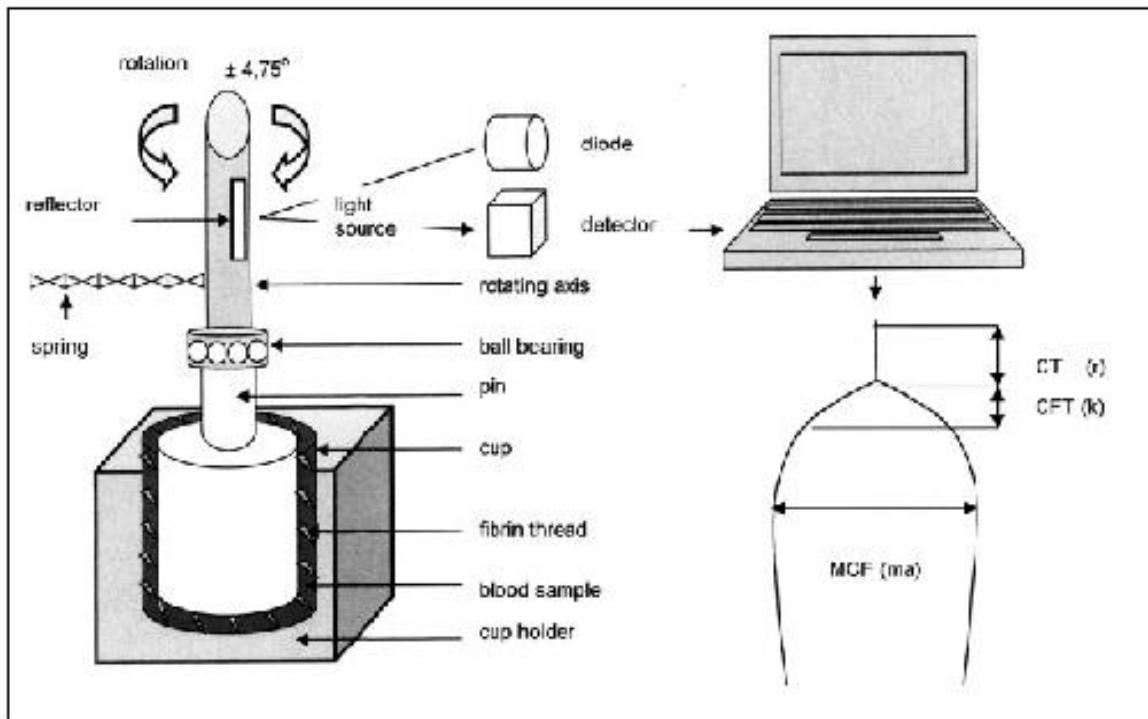


Abbildung 5: ROTEM-Aufbau: Stempel rotiert zu $4,75^\circ$ in beide Richtungen. Aggregation wird in einem Computer berechnet und über ein Thrombelastogramm aufgezeichnet (HÄNECKE & KLOUCHE, 2007).

Vorteil dieser Methode ist die Erfassung der Funktion des kompletten Gerinnungsprozesses im Vollblut, dessen Bedingungen den Umständen in vivo am nächsten kommt (KLOUCHE, 2007). Ein Nachteil ist, dass die vorliegenden Referenzwerte nicht standardisiert sind (WIINBERG & KRISTENSEN, 2010). Ebenso ist die Spezifität sehr gering, da die Ergebnisse von Thrombozyten- und Fibrin- Konzentration und Funktion beeinflusst werden (KOL & BORJESSON, 2010). Bei Hunden ist zu beachten, dass bei einer Messung nach mehr als 120 Min post Probenabnahme Werte erfasst werden, die fälschlicherweise eine Hyperkoaguläratät vermuten lassen (KOL & BORJESSON, 2010; WIINBERG & KRISTENSEN, 2010). Referenzwerte für die verschiedenen Tierarten werden von WIIBERG & KRISTENSEN (2010) zitiert. In Abbildung 6 ist eine Messkurve mit den verschiedenen Parametern dargestellt.

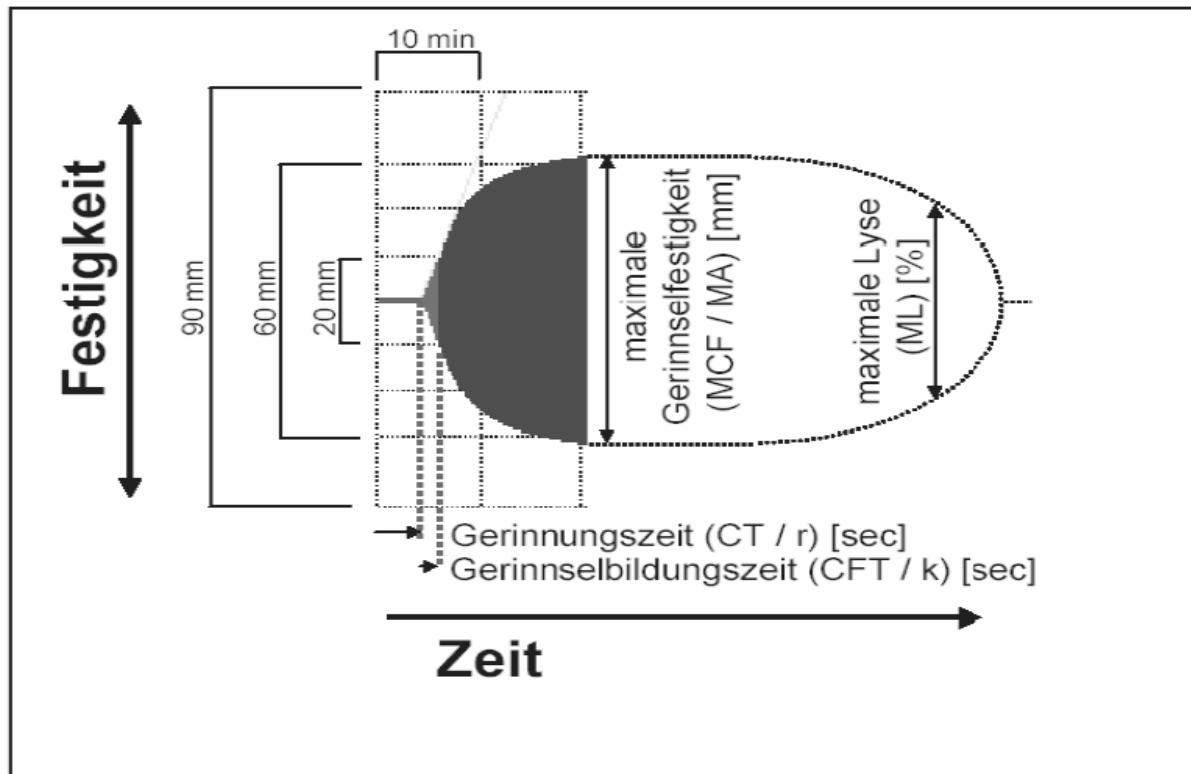


Abbildung 6: Parameter ROTEML® und Messkurve im Thrombozytenfunktionsverlauf (DARAKTCHIEV, 2009).

2.5 Weitere Aggregometrieverfahren

Eine der wichtigsten Methoden ist derzeit die Impedanzaggregometrie, welche später im Multiplate®-Kapitel als Vertreter der Gruppe genauer beschrieben wird. Weitere Aggregometrieverfahren werden aufgrund des spärlichen Einsatzes in der Tiermedizin nur oberflächlich genannt.

2.5.1 Aggregationsberechnung

Eine dieser Methoden ist die Aggregationsberechnung. Hier wird mithilfe einer Gerätschaft namens H*1 Hematology Analyzer (Bayer) die Thrombozytenzahl zum Zeitpunkt 0 und 8 Min nach Zugabe des Aggregationsaktivators ADP bestimmt. Die Berechnung zur Aggregation bedarf folgender Formel (SIMON, 2009):

$$\frac{\text{Thrombozyten } t(0 \text{ min}) - \text{Thrombozyten } t(8 \text{ min})}{\text{Thrombozyten } (0 \text{ min})} \times 100 = \text{Prozent der Aggregation}$$

2.5.2 Impact Cone and Platelet Analyzer (IMPACT)

Ebenfalls möglich ist die Messung mit dem Impact Cone and Platelet Analyzer IMPACT (Diamed, Cressier, Schweiz), wobei antikoaguliertes Vollblut auf eine Polysystrol-Oberfläche aufgetragen wird und darauf durch einen Kegel Scherkräfte von ca. 1800 s-1 imitiert werden (KLOUCHE, 2007). Die Beschichtung imitiert die extrazelluläre Matrix, worauf es nach Zugabe von ADP als Agonisten und unter Einfluss der Scherkräfte zur Aggregation kommt, die gemessen wird. Trotz der kurzen Messdaten von 6-10 Min und den geringen Probenmengen von 120-200 µl gibt es noch sehr wenig Erfahrung in diesem Verfahren (HARRISON, 2005; KLOUCHE, 2007).

2.5.3 Durchflusszytometrie

In der Durchflusszytometrie wird mit Hilfe eines Laserstrahls die Oberfläche von Thrombozyten oder durch Zellaktivierung sichtbar gemachte Marker gemessen, welche durch eine Kapillare fließen. Ein Vertreter dieses Systems ist das vollautomatische Gerät ADVIA 120™ (Siemens Healthcare Diagnostics GmbH, Eschborn, Deutschland), welches über den Parameter „mittlere interne Thrombozytenbestandteile“ die Granularität und somit die Aktivität der Thrombozyten misst (SIMON, 2009).

3 Multiple Platelet Function Analyzer (Multiplate®)

Das Aggregationsmessgerät Multiplate® ist ein Vertreter der Impedanzaggregometrie und wird in der Humanmedizin immer häufiger eingesetzt. Der Name leitet sich aus „Multiple Platelet Function Analyzer“ ab, das den Geräte- und Messzellaufbau beschreibt. Durch die vier „multiplen“ Elektroden der „multiplen“ Messzellen (fünf Stück) werden je zwei unabhängige Aggregationswerte ermittelt. Das 2005 eingeführte und 2006 von CALATZIS (2006) zum ersten Mal in einer Publikation beschriebene Instrument kann die Thrombozytenfunktion im Vollblut messen, was die Anwendung deutlich vereinfacht und die Vorbereitungszeit massiv verkürzt. Es wird sowohl zur Diagnostik von angeborenen Thrombozytenfunktionsstörungen, hauptsächlich aber zur Messung von Effekten therapeutisch eingesetzter antikoagulatorischer Substanzen wie z.B. Clopidogrel, Aspirin® und GpIIb/IIIa-Antagonisten (ReoPro®, Aggrastat®) gebraucht. Auch die Wirkung neuerer Medikamente wie die der direkten ADP Rezeptor-Antagonisten, kann damit nachgewiesen werden (CALATZIS et al., 2006; TÓTH et al., 2006; CALATZIS, 2007). In der Tiermedizin dient es fast ausschließlich der Diagnostik bzw. dem Ausschluss von

Thrombozytenfunktionsstörungen, was bisher nur bei Hunden von KALBANTER et al. (2010) und Schafen von BAUMGARTEN et al. (2010) genauer untersucht worden ist.

Die Informationen in den nachfolgenden Abschnitten wurden dem Benutzerhandbuch des Instruments und den Leitlinien „Thrombozytenfunktionsanalyse mit dem Multiplate®-System: Anwendung und Interpretation“ von CALATZIS et al. (2006) entnommen.

3.1 Aufbau der Gerätschaft

Das Multiplate® Messgerät ist ein kompaktes System (30 x 47 x 10 cm) in das fünf Messkanäle und ein Computer mit Windows XP-Betriebssystem integriert sind (Abb. 7). Die Messkanäle und die für mit NaCl gefüllten Reagenzröhrchen vorgesehene Aussparungen befinden sich in einem Wärmeblock, der in Betrieb konstant auf 37,4 °C erwärmt ist. Hinter den einzelnen Messzellen befindet sich je ein Kabel, welches mit Steckverbindungen an zwei Buchsen angeschlossen ist. Eine stellt die Verbindung mit dem Gerät dar, die andere fungiert als Parkposition für das zweite Kabelende, wenn dies nicht mit dafür vorgesehener Messzelle verbunden ist. Die Bedienung erfolgt über Maus, Tastatur und elektronische Pipette. Interaktive Benutzerführung, Messverlauf und Messergebnisse werden auf einem Monitor dargestellt. Optional kann ein Drucker angeschlossen werden.



Abbildung 7: Multiplate®-Messgerät mit Monitor, elektronischer Pipette, verschiedenen Reagenzien und eingelegten Einwegmesszellen. (www.multiplate.net).

3.2 Aufbau der Messzelle

Eine Einwegmesszelle besteht aus Kunststoff und vier integrierten silberbeschichteten 3,2 cm langen und 0,3 mm dicken Kupferdrähten (Abb. 8). Je zwei Drähte bilden einen der zwei voneinander unabhängigen Sensoren. Die Messzelle besitzt einen konusförmigen Pipetteneinlass, einen zylindrischen Messbereich in den die Drähte hineinragen und einen Buchsenbereich, der die elektronische Verbindung mit dem Instrument ermöglicht. Am Boden der Messzelle befindet sich ein magnetisierter PTFE (Poly-Tetra-Fluoro-Ethylen) beschichteter Rührstab, der über das Instrument gesteuert wird und in einer Frequenz von 800 U/Min den Inhalt durchmischt.

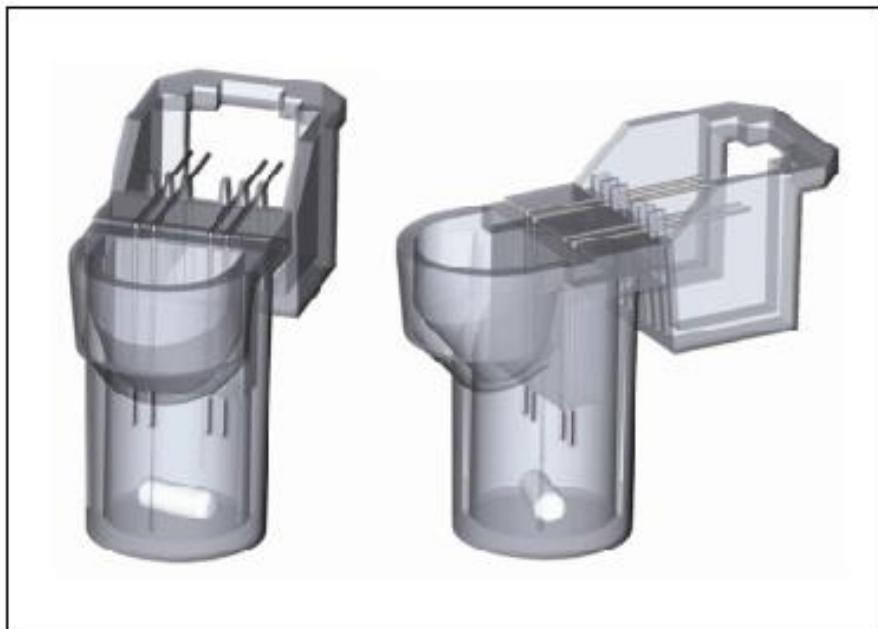


Abbildung 8: Messzelle in Front- und Seitenansicht mit 4 Messdrähten und Rührstab (www.multiplate.net).

3.3 Messprinzip

Das Messprinzip liegt der 1980 von Cardinal und Flower beschriebenen Impedanzaggregometrie zugrunde. Hierbei haften Thrombozyten an einer fremden Oberfläche und aggregieren dort nach Zugabe von Reagenzien. Dadurch entsteht ein Anstieg des elektrischen Widerstandes an den Sensoren, der gemessen wird. Dies ist vereinfacht in Abbildung 9 veranschaulicht. Dieser Widerstand wird „Impedanz“ genannt und ist proportional zur Zahl der Thrombozyten, welche an den Elektroden haften (CALATZIS et al., 2006).

Bei der klassischen Impedanzaggregometrie erfolgt dies in Mehrwegmesszellen, die nach jeder Benutzung gereinigt werden müssen. Dies stellt eine potentielle Fehlerquelle für die nachfolgenden Messungen dar. Im Multiplate werden in eine Einwegmesszelle 0,3 ml NaCl-Lösung, 0,3 ml durch Citrat, Heparin oder Hirudin antikoaguliertes Vollblut und ein Thrombozytenaktivator pipettiert. Hier überziehen unter nahezu physiologischen Bedingungen Proteine wie z.B. Fibrinogen die metallische Oberfläche der Sensordrähte. Ebenfalls haften sich Thrombozyten mit bei der Aktivierung exponierten GpIIb/IIIa-Rezeptoren an die Sensoren. Somit steigt die Impedanz zwischen den zwei Sensordrähten jeder Messeinheit, welche kontinuierlich pro Sensoreinheit (zwei je Messzelle) unabhängig voneinander aufgezeichnet wird (CALATZIS et al., 2006).

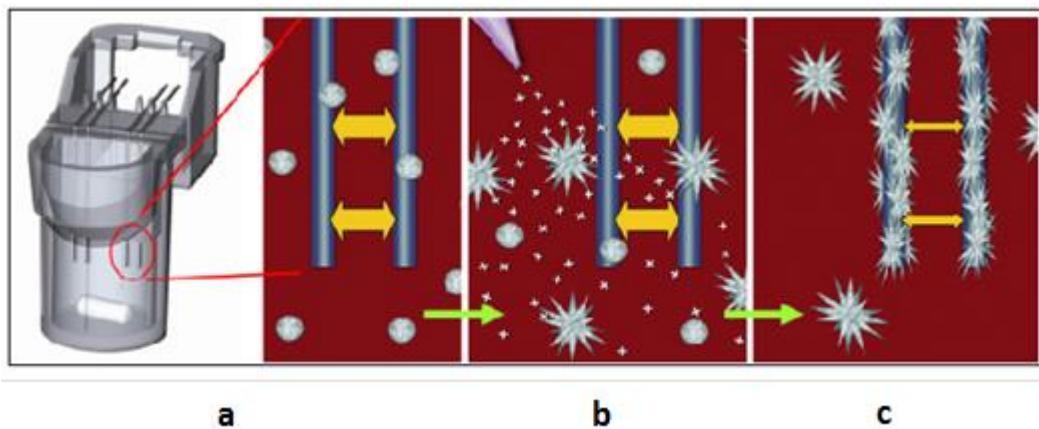


Abbildung 9: Prinzip der Impedanz an den Sensordrähten: a) Unaktivierter Zustand der Thrombozyten – b) Aktivierung der Thrombozyten – c) Anlagerung der aktivierten Thrombozyten an die Sensordrähte und Erhöhung des elektrischen Widerstands.

Dargestellt wird dies über Aggregationskurven, wobei die Zunahme des elektrischen Widerstandes an den Sensoren hierbei vom System in frei gewählte Aggregation Units (AU) umgerechnet und pro Zeit aufgezeichnet wird (Abb. 10). Insgesamt werden drei verschiedene Parameter gemessen und berechnet. „Area Under The Curve“ (AUC), welche von Aggregationsmaximum und der Aggregationsgeschwindigkeit beeinflusst, in der Einheit AU*Min oder U*Min (10 AU=1 U) angegeben wird und laut CALATZIS et al. (2006) am besten für die Thrombozytenfunktions-Bewertung geeignet ist. Velocity, der die maximale Steigung der Aggregationskurve aufzeigt und die Aggregation, der die maximale Höhe der Aggregationskurve beschreibt. Letztere werden mit dem Zusatz „Research Use Only“ (RUO) (Für Forschungszwecke) angegeben.

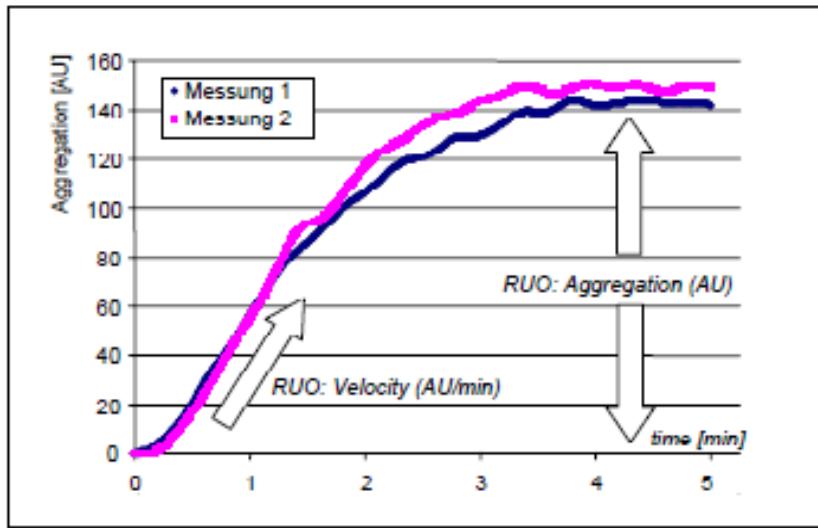


Abbildung 10: Graphische Darstellung der Aggregation (AU) und Velocity (RUO) zweier Sensoren einer Messzelle im Multiplate® im zeitlichen Verlauf.

Am Ende jeder Messung wird durch das System überprüft, ob der während des Messverlaufes errechnete Korrelationskoeffizient zwischen den an den beiden Sensoren aufgezeichneten Werten den Betrag 0,98 unterschreitet oder sich die zwei AUCs der einzelnen Messzelle um mehr als 20 % unterscheiden. Sollte dies der Fall sein kommt es automatisch zu einer Meldung und einer Empfehlung zur Wiederholung der Messung um etwaige fehlerhafte Probenverläufe zu identifizieren.

3.4 Thrombozytenaktivatoren

Um die Blutplättchen in die aktive Form zu überführen und ein Anhaften an die Sensoroberfläche zu ermöglichen, sind Thrombozytenaktivatoren erforderlich. Es stehen mehrere Testreagenzien zu Verfügung, welche unterschiedliche Aktivierungswege haben. Dabei gibt es jedoch speziesbedingte Unterschiede. Folgende Ausführungen gelten für die Humanmedizin.

ADP: Nach Zugabe dieses Agonisten stimuliert ADP die ADP-Rezeptoren, wobei P_2Y_{12} der wichtigste ist (CALATZIS et al., 2006).

ADP-HS: Der endogene Inhibitor Prostaglandin E1 (PGE1) führt kombiniert mit der Aktivierung durch ADP zu einer hohen Sensitivität gegenüber ADP-Rezeptor-Antagonisten. Dieser wird zum Teil auch als „ADP+PG“ bezeichnet.

ASPI: Beinhaltet Arachidonsäure, welche selbst zwar kein direkter Thrombozytenaktivator ist, aber durch Cyclooxygenase (COX) und Thromboxansynthase zu dem potenten Plättchenaktivator Thromboxan A₂ überführt wird.

COL: Das Kollagen im Test bewirkt eine Stimulation des Kollagenrezeptors, worauf es zur Freisetzung von Arachidonsäure kommt, die wiederum in Thromboxan A₂ synthetisiert wird.

TRAP: Das „Thrombin Rezeptor Activating Protein“ (TRAP-6) in diesem Test bindet an Thrombinrezeptoren der Thrombozyten, was zu einer starken Aktivierung führt, welche von Aspirin und Clopidogrel unabhängig ist.

Abbildung 11 zeigt die unterschiedlichen Aktivierungswege der einzelnen Aktivatoren an einem Thrombozyten.

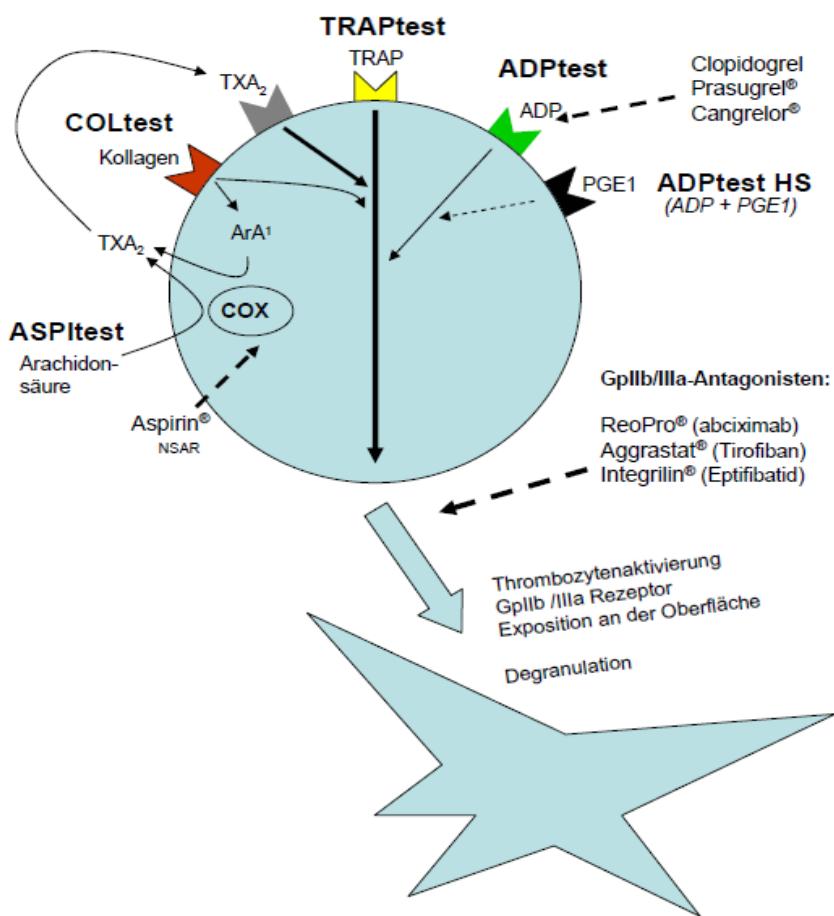


Abbildung 11: Schema zur Thrombozytenaktivierung durch die verschiedenen Agonisten (CALATZIS et al., 2006).

4 Multiplate® in der Veterinärmedizin

Da in der Tiermedizin erste Studien über das Multiplate-Gerät erst im Jahr 2009 durchgeführt wurden, sind die Erfahrungen hier begrenzt, steigen jedoch stetig aufgrund dessen gradueller Etablierung in der Veterinärmedizin. Die Veröffentlichungen beschreiben hauptsächlich die Thrombozytenaggregation mittels Multiplate bei Hund und Schaf, woraus die optimale Messdauer, Agonisten und deren Konzentration sowie Referenzwerte für diese Spezies ermittelt wurden. Diese Informationen bestehen für andere Tierarten noch nicht.

4.1 Multiplate® beim Hund

KALBANTER et al. (2010) führten im Jahr 2009 erstmals eine Studie über Untersuchungen von Blutproben von Hunden am Multiplate-Gerät durch. Ziel dieser Arbeit war es, zu ermitteln, welche Thrombozytenagonisten in welcher Konzentration beim Hund zu verwenden sind, um zuverlässige Werte zu erhalten, und darüber hinaus Referenzwerte festzulegen. Ebenfalls beschäftigte man sich mit der Antikoagulation der Blutproben. Beprobt wurden dafür 50 klinisch gesunde Hunde verschiedenen Geschlechts, Rasse und Alters, wobei zur Antikoagulation sowohl Hirudin als auch Citrat verwendet wurde. Jede Blutprobe wurde in mehreren Ansätzen mit Konzentrationen von ADP (1, 1.5, 2, 2.5, 3, 4, 5, 10- und 20 μ mol/l), Col (0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 4, 5, 10- und 20 mg/ml), Ristocetin (0.2 und 1 mg/ml), ASPI (0.25, 0.5, 1, und 2 mmol/l), TRAP (32 und 160 mmol/l) bei einer Messdauer von 12 Min gemessen. Daraufhin wurden die Ergebnisse danach bewertet, welche maximalen Aggregationswerte und geringsten Varianzen bei möglichst niedrigen Agonistenkonzentrationen erreicht wurden. Daraus resultierten bei ADP eine Konzentration von 10 μ mol/l, Col bei einer Konzentration 5 mg/ml und 1 mmol/l ASPI als beste Thrombozytenaktivierungskonzentrationen. Weiterhin zeigte Hirudin-Vollblut signifikant höhere AUC-Werte als mit Citrat antikoaguliertes Blut.

Dies wurde 2012 von MARSCHNER et al. (2012) erweitert, indem zusätzlich Heparin zur Antikoagulation gebraucht wurde und repräsentativ 6.5 μ mol/l ADP, 3.2 μ g/ml Col, und 0.5 mmol/l ASPI bei einer Messdauer von jeweils 6, 12, 18 und 24 Min verwendet wurden. Diese Studie umfasste 20 gesunde und drei kranke Hunde aus wiederum unterschiedlichen Altersstufen, verschiedener Rasse und Geschlechts. Diese Untersuchung ergab, dass Hirudin und Heparin am besten die Aggregation darstellen und beide Varianten sehr sensitiv für die Aktivatoren ADP, Col und ASPI sind. Bei Verwendung von Hirudin dagegen neigte antikoaguliertes Blut sehr zu Autokoagulation. Hier ist aber zu beachten, dass mit Heparin behandeltes Blut andere Messergebnisse erzielt und diese nicht mit Referenzwerten aus

Hirudinblut verglichen werden können. Bei der Verwendung von Hirudin ist ein sorgfältiger Umgang mit dem Probenmaterial Voraussetzung. Die Messdauer sollte nicht länger als 12 Min betragen, da es bei 6 und 12 Min geringe Varianzen gibt, diese aber über 12 Min ansteigt. In Tabelle 2 sind die Referenzwerte beim Hund aufgeführt.

*Tabelle 2: Referenzwerte mit Median und 2,5-97,5 Quantil von AU*Min und AU beim Hund nach KALBANTNER et al. (2010).*

Agonistenkonzentration	Area under the curve (AU*Min)		Maximale Aggregation (AU)	
	Median	2,5-97,5% Quantil	Median	2,5-97,5% Quantil
ADP (5 µmol/l)	2070	700-3327	144	56,3-219
ADP (7,5 µmol/l)	2164	1185-3186	149	81,4-213
ADP (10 µmol/l)	2341	1481-3448	157	105-134
ADP (20 µmol/l)	2218	1229-3361	149	87-219
Col (3 µg/ml)	2614	1479-3500	197	122-255
Col (5 µg/ml)	2736	2017-3460	205	15-246
Col (10 µg/ml)	2590	1780-3501	190	138-249
ASPI (0,5 mmol/l)	2161	631-2954	152	51,6-223
ASPI (1 mmol/l)	2279	1011-3457	150	73,9-228

AU= Aggregation Unit

Bei weiteren Publikationen wurde der Multiplate-Analyzer nur als diagnostisches Mittel zur Erfassung der Aggregation eingesetzt und war nicht Mittelpunkt der Studien. So erforschte BAUER et al. (2011) den Einfluss auf die Hämostase bei der Benutzung von Venenverweilkathetern im Vergleich zu anderen Blutabnahmetechniken bei Hunden. Ebenfalls gebrauchte BAUER et al. (2012) das neue Impedanzaggregometrie-Verfahren bei einer Untersuchung über den Einfluss einer submaximalen Sauerstoffsättigung auf die Plättchenfunktion bei Hunden. Desgleichen setzten KALBANTNER et al. (2011) das Messgerät bei der Untersuchung der Plättchenfunktion bei Hunden, die an einem Portosystemischen Shunt leiden, ein.

4.2 Multiplate® beim Schaf

Im Jahr 2009 wurde von BAUMGARTEN et al. (2010) eine Studie über die Verwendung des Multiplate-Thrombozytenmessgeräts bei Schafen veröffentlicht. Bestandteil der Studie war, analog zu der Veröffentlichung von KALBANTNER (2010) für die Spezies Hund, die Evaluation der besten Antikoagulation, die Ermittlung der optimalen Agonistenkonzentrationen und die Berechnung von Referenzwerten bei Schafen. Untersucht wurde das Blut von 40 klinisch gesunden Schafen, verschiedenen Geschlechts und aus allen

Altersgruppen. Zur Antikoagulation wurde bei allen Probanden Hirudin verwendet und bei ausgewählten Schafen zusätzlich eine Probe mit Citrat mit und ohne Calcium-Chlorid behandelt. Das antikoagulierte Blut wurde mit unterschiedlichen Konzentrationen ADP (1, 1.5, 2, 2.5, 3, 4, 5, 10- und 20 $\mu\text{mol/l}$), Col (0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 4, 5, 10- und 20 mg/ml), Ristocetin (0.2 und 1 mg/ml), ASPI (0.25, 0.5, 1, und 2 mmol/l), TRAP (32 und 160 mmol/l) bei einer Messdauer von 12 Min gemessen. Bezuglich maximaler Aggregationswerte ergab die Analyse keinen signifikanten Unterschied zwischen 3-10 $\mu\text{mol/l}$ ADP und 3-5 $\mu\text{g/ml}$ Col. Die geringste Varianz wurde bei 4 und 5 $\mu\text{mol/l}$ ADP sowie 4 und 5 $\mu\text{g/ml}$ Col erreicht. Die Agonisten ASPI, Ristocetin und TRAP induzierten keine Thrombozytenaggregation. Mit Hirudin behandeltes Blut erreichte höhere Aggregationswerte als mit Citrat und Calcium-Chlorid angereichertes Blut. Citrat ohne Calcium-Chlorid erschien als nicht geeignet. In Tabelle 3 sind die Referenzwerte beim Schaf dargestellt.

*Tabelle 3: Referenzwerte mit Median und 2,5-97,5% Quantil von AU*Min und AU beim Schaf nach BAUMGARTEN (2010).*

Agonistenkonzentration	Area under the curve (AU*Min)		Maximale Aggregation (AU)	
	Median	2,5-97,5% Quantil	Median	2,5-97,5% Quantil
ADP (3 $\mu\text{mol/l}$)	2337	1159-3782	154	77-241
ADP (4 $\mu\text{mol/l}$)	2395	1395-3706	160	92-245
ADP (5 $\mu\text{mol/l}$)	2515	1358-3896	168	100-269
ADP (10 $\mu\text{mol/l}$)	2325	985-3746	155	76-245
Col (3 $\mu\text{g/ml}$)	1186	254-2254	102	28-184
Col (4 $\mu\text{g/ml}$)	1312	518-1989	110	45-168
Col (5 $\mu\text{g/ml}$)	1434	591-2226	116	59-194

AU= Aggregation Unit

Auch beim Schaf gibt es Veröffentlichungen bei denen das Multiplate-Gerät zur Diagnostik verwendet wurde. BAUMGARTEN et al. (2011) analysierten damit die Thrombozytenfunktion bei mit CPDA-1 stabilisiertem Schafblut. SILLER MATULA et al. (2012) nützten es bei einer Studie in der sie die Blutungsneigung nach kontinuierlicher Thrombinapplikation betrachteten.

4.3 Multiplate® bei anderen Tierarten

Bei anderen Tierarten gibt es noch keine Veröffentlichungen bezüglich Messungen im Multiplate®. Es wurde jedoch vereinzelt gebraucht, ohne dass bei anderen Spezies außer Hund und Schaf ein standardisiertes Verfahren zum Probenablauf entwickelt oder

Referenzwerte ermittelt wurden. So nützten es FRÖBERT et al. (2010) um die Thrombozytenaggregation von Braunbären mit der des Menschen zu vergleichen. HAAS et al. (2008) erforschten die Hämostase bei Schweinen die nach einem hämorrhagischen Schock mit hypertoner Hydroxyethylenstärke im Vergleich zu 4 % Gelatine oder 6 % Hydroxyethylenstärke behandelt wurden. CZURA et al. (2010) untersuchten damit den Einfluss einer Vagusnerv-Stimulation auf die Hämostase beim Schwein.

III MATERIAL UND METHODEN

1 Tiere

Es wurden Blutproben von 64 Kälbern der Rasse Deutsches Fleckvieh im Alter von 8 - 28 Tagen verwendet, die im Rahmen von Bestandsuntersuchungen im Zeitraum vom 12.01.2012 bis 28.03.2012 zur Überprüfung des Selengehaltes entnommen wurden. Die Kälber stammten aus 15 Betrieben, die von der Tierarztpraxis Gars am Inn betreut werden. Es handelte sich um 32 männlich und 32 weibliche Tiere. Die Haltungsform der Kälber war Iglu- oder Boxenhaltung und die Fütterung bestand aus Vollmilch und Heu. Je nach Betrieb wurde zusätzlich noch Kraftfutter in Form von Kälberkorn angeboten. Es wurden nur Blutproben von Kälbern in die Studie aufgenommen, die bis zum Beprobungszeitpunkt unbehandelt und gesund waren. Der Gesundheitsstatus wurde mittels klinischer Untersuchung beurteilt. Anschließend wurden die benötigten Blutproben entnommen und diese unmittelbar im Multiplate®-Aggregometer gemessen. In Tabelle 4 ist die Alters-, und Geschlechtsverteilung der Kälber angegeben.

Tabelle 4: Tabelle über Alters und Geschlechtsverteilung der 64 Kälber aus der Studie.

Altersklasse Lebenswoche	n	Geschlecht	n
LW 2	23	männlich	10
		weiblich	13
LW 3	27	männlich	13
		weiblich	14
LW 4	14	männlich	9
		weiblich	5

2 Verwendete Materialien

Bei der klinischen Untersuchung der Kälber wurde die Auskultation und die Ermittlung der Körperinnentemperatur mit einem Stethoskop nach Prof. Götze (Hauptner & Herberholz GmbH, Solingen, Deutschland) und einem elektrischen Fieberthermometer „Microlife Vet-Temp“ (Lifeware Rheintal AG, Widnau, Schweiz) durchgeführt. Zur Blutentnahme wurden 18 Gauge Kanülen (1,2x40 mm) (ISO 7864 Henry Schein U.K Holdings Ltd., Gillingham, England) und 17 Gauge-Kanülen (1,5x50 mm) (Neoject®, Dispomed Witt oHG, Gelnhausen, Deutschland) verwendet. Als Blutröhrchen dienten für die Beprobung im Multiplate®-Gerät Hirudin-„Aufziehröhrchen“ (4,5 ml) (Dynabyte, München, Deutschland) und Hirudin-Vacutainer (4 ml) (Dynabyte, München, Deutschland). Für weitere Analysen wurden Probenröhrchen für hämatologische Untersuchungen (Röhre 5 ml, 75x13 mm; 1,6 mg EDTA/ml Blut) (Sarstedt AG&Co, Nümbrecht, Deutschland), Röhrchen zur Serumgewinnung (Röhre 9 ml, 92x16 mm; Präparierungsträger/Gerinnungsaktivator) (Sarstedt AG&Co, Nümbrecht, Deutschland) und Röhrchen für Blutgas-Untersuchungen (Röhre 2,6 ml, 65x13 mm; 16 I.E Lithium-Heparin/ ml Blut) (Sarstedt AG&Co, Nümbrecht, Deutschland) verwendet.

Im Probenverlauf wurden Pipettenspitzen, 0,9 %ige NaCl-Lösung, und die Thrombozytenagonisten ADP-Test (0,6 mmol/l mit 1000 µl Aqua dest. aufgefüllt) (Dynabyte, München, Deutschland) und Col-Test (100 µg/ml Col mit 1000 µl Aqua dest. aufgefüllt) (Dynabyte, München, Deutschland) gebraucht.

Zur Bestimmung der Blut-, und Serumwerte wurde das Gerät CellDyn 3500 der Firma Abbott genutzt.

Die Thrombozytenfunktionsmessungen wurden mit dem Multiplate®-Impedanzaggregometer (Dynabyte, München, Deutschland) durchgeführt.

3 Probengewinnung

Den Kälbern wurde für diese Studie eine EDTA- (2-3 ml), eine Serumprobe (2-4 ml) und die je nach Probenreihe benötigten Hirudinproben-Mengen (4,5-13,5 ml) an der Vena Jugularis entnommen. Wurden mehrere Hirudinröhrchen benötigt, wurde das Blut für die einzelnen Probenansätze in ein großes Reagenzglas überführt und durch Schwenken vorsichtig

vermischt. Zur Methodenabstimmung wurden Kanülenstärke, Entnahmerichtung und Entnahmeröhrchen je nach Probenreihe variiert. Zur Entnahme des Hirudinblutes wurde eine aus zwei Kanülen und einem Stück Infusionsschlauch selbst zusammengesetzte Vorrichtung verwendet, da die 4,5 ml – Röhrchen nur mit einer Durchstichkappe aus Gummi verfügbar waren und das Blut keinen Luftkontakt haben sollte. Hierbei wurde ein 1,5 cm langer Infusionsschlauch mit einem Außendurchmesser von 4 mm mit zwei Kanülen gewünschter Stärke verbunden (Abb. 12, Abb. 13)

Bei der Blutentnahme wurde eine Kanüle dieser Konstruktion in die Vena Jugularis eingeführt, worauf mit der anderen Kanüle die Gummimembran der Hirudinröhren durchgestochen wurde. Nach Entnahme der gewünschten Hirudinblutmenge wurde eine Kanüle und das Schlauchstück entfernt, sodass anschließend aus der in der Vene verbleibenden Nadel Serum-, Blutgas- und EDTA-Proben über einen Lueransatz entnommen werden konnten. EDTA-Blut wurde hierbei zuerst mit einer 5 ml-Spritze aspiriert und darauf unverzüglich in ein EDTA-Röhrchen überführt. Unmittelbar nach der Blutabnahme wurde jedes Röhrchen drei Mal vorsichtig geschwenkt. Um eine spontane Thrombozytenaktivierung zu verhindern erfolgte der Transport der Blutproben unter Vermeidung von Erschütterungen. Die Lagerung der Proben bis zur Messung erfolgte unter Raumtemperatur.

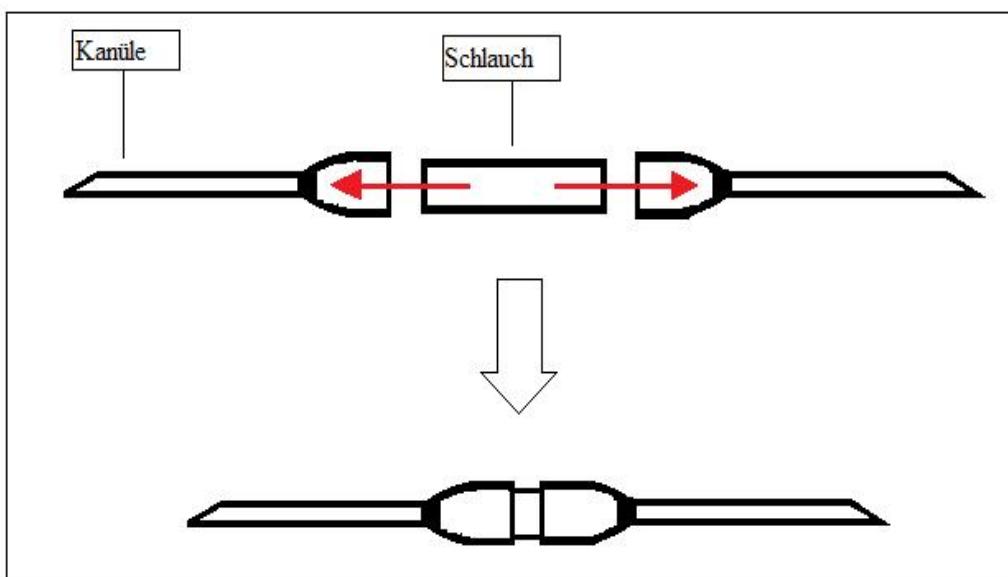


Abbildung 12: Schema zur Erstellung des Entnahmesystems aus zwei Kanülen und einem Stück Infusionsschlauch.



Abbildung 13: Foto eines fertigen Entnahmesystems aus 2 18 Gauge-Kanülen und einem Stück Infusionsschlauch.

4 **Messverlauf**

4.1 **Vorbereitungen**

Genauere Informationen hierzu befinden sich in der Betriebsanleitung. Bevor eine Messung gestartet wurde, wurde mit Hirudin antikoaguliertes Vollblut, 0,9 %ige NaCl-Lösung und die Agonisten ADP und Col bereitgestellt. Die in getrockneter Form gelieferten Agonisten mussten hierbei mit jeweils 1000 µl Aqua dest. pro Einheit in eine durchsichtige Lösung überführt werden. Nach Erreichen der Messtemperatur von 37,4 °C wurde eine elektronische Kontrolle durchgeführt, um fehlerhafte Kanäle zu identifizieren. Anschließend wurde im Computersystem die Messdauer festgelegt, die einzelnen Messkanäle beschriftet und die Thrombozytenaktivatoren in gewünschter Konzentration ausgewählt. Danach wurde jeder benötigte Messkanal mit einer Messzelle bestückt (Abb. 14).

4.2 **Probenablauf**

Im Probenverlauf wurde den automatischen Pipettieranweisungen des Computersystems Folge geleistet. Zuerst wurde jeweils 300 µl 0,9 % NaCl und Hirudinblut in die Messzellen pipettiert (Abb. 15). Nachdem diese Probenbestandteile in eine Messzelle überführt wurden,

startete eine Inkubationszeit von drei Minuten. Nach Ablauf dieser Zeit wurde das gewünschte Volumen der Agonisten zugegeben. Um fehlerhafte oder verfälschte Messergebnisse zu vermeiden, wurden zu jedem Pipettievorgang die Pipettenspitzen gewechselt. Die Ergebnisse konnten in Form der Aggregationskurve am Bildschirm beobachtet und danach ausgedruckt werden.

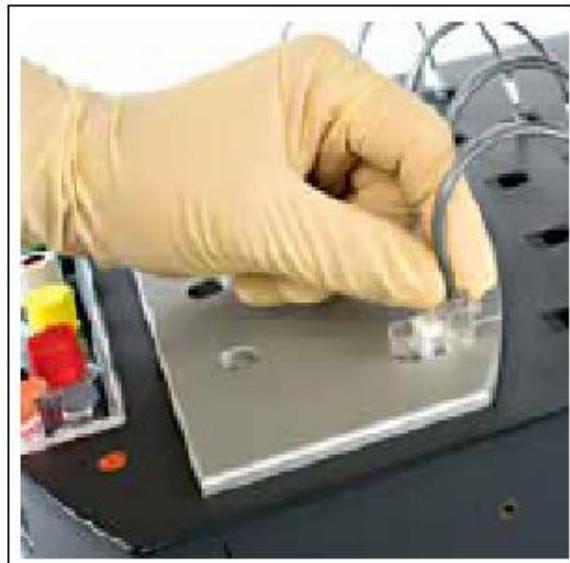


Abbildung 14: Anschluss der Messzellen an das Messkabel im Multiplate® (Productfolder Multiplate).



Abbildung 15: Pipettieren von Hirudinblut in eine Messzelle (Productfolder Multiplate).

5 Etablierung eines standardisierten Verfahrens beim Kalb zur Blutentnahme und Probenuntersuchung bei Rindern am Multiplate®

Es wurden verschiedene Variationen der Blutabnahme sowie Zeitdauer und Agonistenzugabe für die Messungen am Multiplate® durchgeführt und deren Ergebnisse statistisch ausgewertet, um ein standardisiertes Verfahren für die Thrombozytenfunktionsmessung bei Rindern zu entwickeln. Hierzu mussten zuerst die optimale Messdauer und die optimalen Thrombozytenaktivatoren in der aussagekräftigsten Konzentration bezüglich Rinderblut identifiziert werden. Ebenfalls waren Untersuchungen nötig, ob Veränderungen bei der Probenentnahme in Bezug auf Probenröhrchen, Kanülenstärke und Entnahmerichtung einen Einfluss auf die Messergebnisse haben. Dies sollte in vier Probenreihen zu je 10 Kälbern untersucht werden. Die fünfte Versuchsreihe diente der Referenzwertberechnung. Da bei der ersten Probenreihe die Ergebnissen von vier Kälbern deutlich von denen der restlichen Probanden abwichen, und es aufgrund des Fehlens von Vergleichswerten nicht auszuschließen war, dass es sich bei den auffälligen Kälbern um Träger eines Thrombozytendefektes handelte, wurde diese Versuchsreihe um vier Kälber auf 14 Probanden erweitert. Tabelle 5 bietet eine Übersicht über die 5 Probengruppen.

Tabelle 5: Übersicht über Kälberanzahl, Identifikation (ID) und Funktion der 5 Probengruppen.

Probenreihe	Kälberzahl (n)	Funktion
1 (ID 1-14)	14	Vergleich Agonistenkonzentration und Messdauer
2 (ID 15-24)	10	Vergleich Kanülenstärken
3 (ID 25-34)	10	Vergleich Aufziehverfahren
4 (ID 35-44)	10	Vergleich Entnahmerichtung
5 (ID 45-64)	20	Referenzwerte

Die Ergebnisse der statistischen Auswertung einer Versuchsreihe wurden jeweils in die darauffolgenden Versuchsreihen einbezogen und die Methode mit der geringsten Streuung angewandt.

Ist nichts anderes erwähnt, erfolgte die Blutprobennahme mit einer 18 Gauge-, herzwärts punktierenden Kanüle und einem Hirudin-Aufziehröhrchen aus der linken Jugularvene. Im Anschluss an das letzte Hirudinblutröhrchen wurden jedem Kalb je eine Probe EDTA-, Serum und Blutgas-Blut entnommen.

5.1 Probenreihe 1: Konzentration von ADP und Col – Messdauer

Da es bei ersten Untersuchungen im Vorfeld der Arbeit mit den Thrombozytenagonisten TRAP und ASPI zu keinen aussagekräftigen Ergebnissen kam, verwendete man nur noch ADP und Kollagen in vorliegender Arbeit. Bei der ersten Probenreihe wurde das Blut der Probanden jeweils im Doppelansatz mit je 10 µl, 20 µl, 30 µl und 50 µl 0,6 mmol/l ADP bzw. 100 µg/ml Col bei 6 und 8 Min Messdauer gemessen. Dies entspricht Agonistenkonzentrationen von 6, 12, 18 und 30 µmol/l ADP und 1, 2, 3 und 5 µg/ml Col. Somit wurden bei dieser Probenreihe 32 Messungen pro Kalb durchgeführt.

5.2 Probenreihe 2: Kanülenstärken

In der zweiten Versuchsreihe wurden 10 Kälber beprobt, um zwei oft im Praxisgebrauch befindliche Kanülenstärken zu vergleichen. Jedem Kalb wurden zuerst zwei Hirudinaufziehröhrchen mit einer 18 Gauge-Kanüle entnommen. Anschließend wurden zwei Hirudinaufziehröhrchen mit einer 17 Gauge- Kanüle befüllt. Aufgrund der Ergebnisse aus der ersten Probenreihe wurde das Blut in dieser Messreihe mit je 30 µl und 50 µl einer 100 µg/ml Col-Lösung (3 und 5 µg/ml Col) bzw. einer 0,6 mmol/l ADP-Lösung (18 und 30 µmol/l ADP) bei einer Messdauer von 6 Min gemessen. Da die Messungen wiederum im Doppelansatz durchgeführt wurden, benötigte man hierfür 16 Probenansätze pro Kalb.

5.3 Probenreihe 3: Aufziehverfahren

In der dritten Versuchsreihe wurden Vacutainer und Aufziehröhrchen einander gegenübergestellt. Bei jedem der 10 Kälber dieser Reihe wurden Hirudinblutproben mittels eines Vacutainerröhrchens und eines Hirudinaufziehröhrchen entnommen. Angesichts der bis dahin erzielten Ergebnisse wurde jede Probe mit 30 µl 0,6 mmol/l ADP-Lösung (18 µmol/l ADP) sowie 30 µl und 50 µl einer 100 µg/ml Col-Lösung (3 und 5 µg/ml Col) im Doppelansatz gemessen und bei einer Messdauer von 6 Min beprobt. Somit kam es hier zu 12 Einzelmessungen pro Kalb.

5.4 Probenreihe 4: Entnahmerichtung

In der vierten Probenreihe wurden 10 Kälber beprobt, wobei zuerst durch eine kopfwärts

gestochene Kanüle und anschließend über eine herzwärts punktierte Kanüle Hirudinblut gewonnen wurde. Somit wurde jede Hirudinblutprobe im Doppelansatz mit den Agonistenkonzentrationen von 30 µl einer 0,6 mmol/l ADP-Lösung (18 µmol/l ADP) und 50 µl einer 100 µg/ml Col-Lösung (5 µg/ml Col) und einer Messdauer von 6 Min beprobt, wodurch pro Kalb acht Einzelprobenansätze durchgeführt wurden.

6 Bestimmung von Referenzwerten

Zur Bestimmung der Referenzwerte wurden mit der endgültig ausgewählten Methode weitere 20 Kälber beprobt. Ihnen wurde herzwärts, mit einer 18 Gauge-Kanüle mittels einem Hirudinaufziehröhrchen Blut entnommen und dies mit 30 µl einer 0,6 mmol/l ADP-Lösung (18 µmol/l ADP) und 50 µl einer 100 µg/ml Col-Lösung (5 µg/ml Col) 6 Min im Multiplate®-Gerät gemessen. Jedem Probanden wurde zusätzlich ebenfalls je eine Probe EDTA-, Serum und Blutgas-Blut entnommen. Zusätzlich wurden die 44 Kälber, die im Rahmen der Methodenabstimmung mit diesen Entnahmeparametern untersucht wurden, in die Berechnung der Referenzwerte miteinbezogen.

7 Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung und dem Erstellen von graphischen Darstellungen wurden das Tabellenprogramm Excel (Microsoft, Excel 2007), das Statistikprogramm SPSS (IBM, SPSS Statistics 19) und das Statistikprogramm PAST (Palaeontologia Electronica, Paleontological statistics software package for education and data analysis 2001) genutzt.

7.1 Statistische Auswertung der einzelnen Methodenschritte

Die Daten der Messungen wurden in das Tabellenprogramm Excel übertragen. In dieser Anwendung wurde für jeden Probenansatz das arithmetische Mittel \bar{x} , die Standardabweichung SD und der Variationskoeffizient VC ermittelt (BORTZ & SCHUSTER, 2010). Es wurde jeweils der VC aus allen Werten eines Probenansatzes gebildet. Für die Beurteilung der Messgenauigkeit des Geräts wurde pro Doppelansatz ein VC aus den zwei Einzelwerten berechnet und diese je Probenansatz in einen durchschnittlichen VC aus den Doppelansatzeinzelwerten zusammengefasst.

7.2 Graphische Darstellung

Zur graphischen Darstellung der Verteilung der erhaltenen Werte wurden mithilfe des Statistikprogramms SPSS Boxplots gebildet. Die Box stellt den Bereich dar, in dem 50 % der

Ergebnisse liegen (Interquartilbereich). Die horizontale Linie in der Box, der Median, teilt die Box in ein unteres und ein oberes Quartil ein. Die Verteilung der restlichen 50 % der Werte sind durch die obere und untere T-Linie („Whisker“) abgebildet (VOLKER, 1998). Ausreißer (1,5 bzw. 3 x Interquartilbereich) werden als * bzw. ° visualisiert (FALK et al., 2002). Um Korrelationen zu verbildlichen wurden ebenfalls mit dem Statistikprogramm SPSS Punktdiagramme angefertigt. Hierbei wird in einem x-y-Graphen für jeden Probanden ein Punkt abgebildet und eine Verlaufslinie dargestellt, die den Trend aller Punkte verdeutlicht.

7.3 Statistische Auswertung der Referenzwerte

Die Ergebnisse der in der Methodenabstimmung ermittelten Agonistenkonzentrationen der 61 Probanden, bei denen eine Thrombozytenfunktionsstörung als unwahrscheinlich galt, wurden mithilfe des Statistikprogramms SPSS unter Verwendung des Kolmogorov-Smirnov Tests auf Normalverteilung überprüft. Mittels Henry&Reed-Test (REED et al., 1971) wurde auf Ausreißer untersucht. Zur Berechnung der Referenzwerte wurde das parametrische Verfahren ($\bar{x} \pm 2 \cdot SD$) angewandt.

7.4 Signifikanz und Korrelation

Unterschiede in den Ergebnissen von männlichen und weiblichen Kälbern, den verschiedenen Entnahmeverfahren und den Lebenswochen 2, 3 und 4 wurden mit dem Statistikprogramm PAST ausgewertet. Dabei kam bei der Überprüfung eines statistischen Unterschieds zwischen den Geschlechtern und den Probengewinnungsverfahren der Mann-Whitney-U-Test, und bei der Überprüfung eines statistischen Unterschieds zwischen den drei Lebenswochen der Kruskal-Wallis-Test zum Einsatz. Ein Zusammenhang zwischen der Thrombozytenzahl sowie Lebenstage und der AUC wurde mit dem Statistikprogramm SPSS mittels Korrelation nach Pearson berechnet.

IV ERGEBNISSE

Im folgenden Abschnitt werden die Messergebnisse und deren Verteilung mittels Boxplots dargestellt

1 Konzentration von ADP und Col – Messdauer

Die Aggregationswerte der ersten 14 Probanden werden in den Abbildungen 16 bis 19 veranschaulicht. Es werden jeweils die Ergebnisse von 6, 12, 18 und 30 $\mu\text{mol/l}$ ADP und 1, 2, 3 und 5 $\mu\text{g/ml}$ Col bei Messzeiten von 6 und 8 Min dargestellt. In den Tabellen 6 bis 9 sind die Variationskoeffizienten (VC) der einzelnen Probenansätze aufgelistet. In Tabelle 10 befinden sich die Werte der Verteilungen der Doppelansatzeinzelwerte.

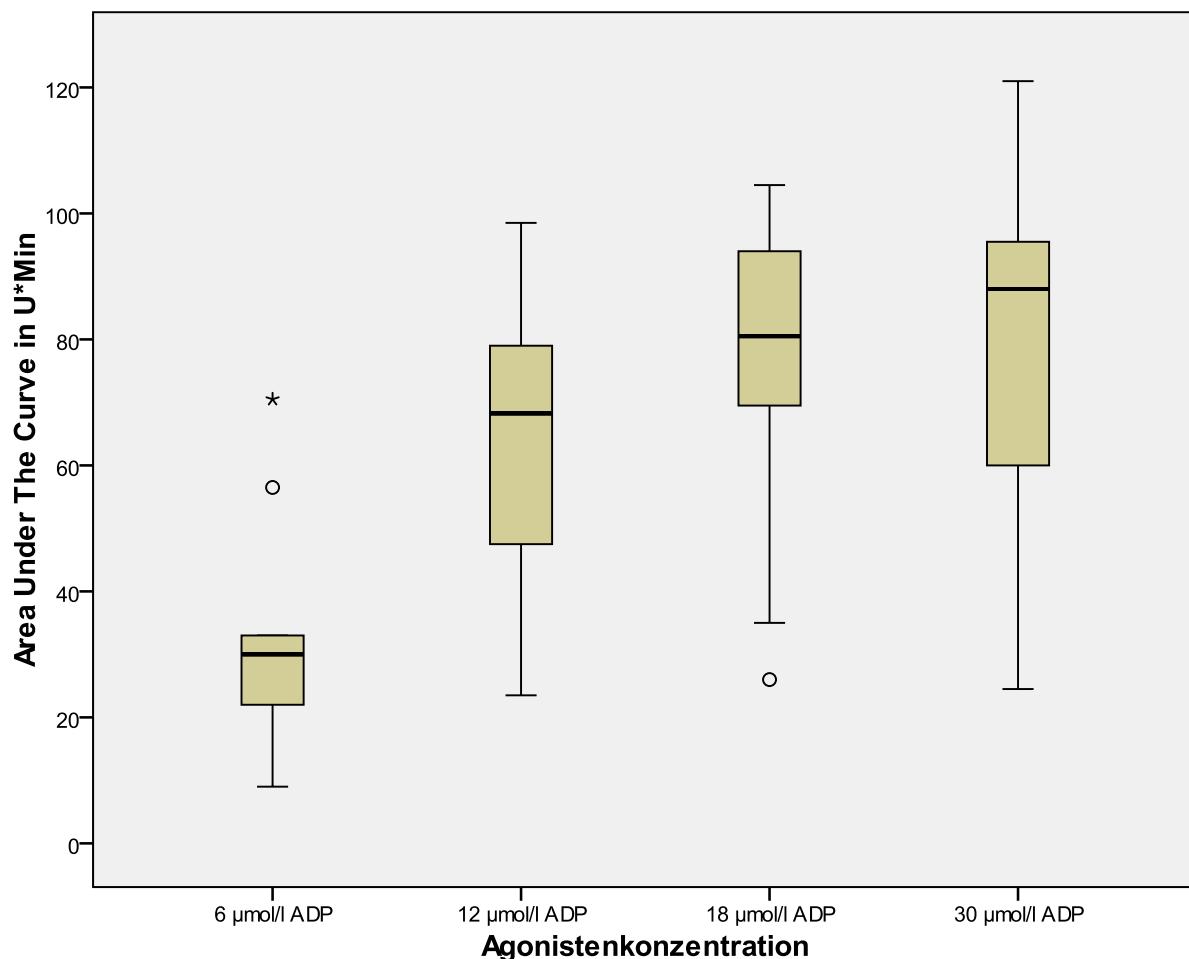


Abbildung 16: Verteilung der AUC-Werte in U^*Min von 14 Kälbern, inkubiert mit 6, 12, 18 und 30 $\mu\text{mol/l}$ ADP bei einer Messdauer von 6 Min. In der Box (Interquartilbereich) sind Mediane dargestellt.

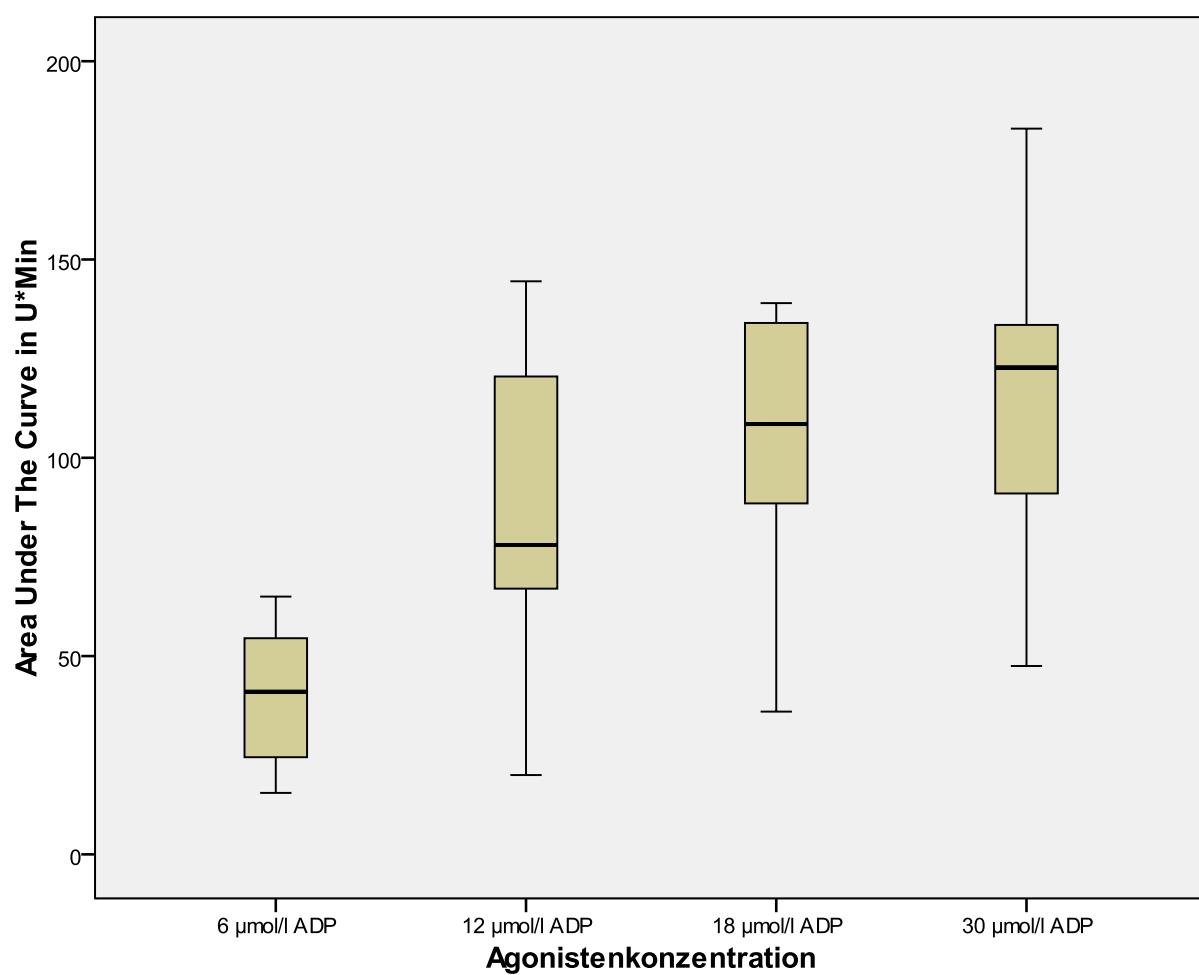


Abbildung 17: Verteilung der AUC-Werte in U*Min von 14 Kälbern, inkubiert mit 6, 12, 18 und 30 $\mu\text{mol/l}$ ADP bei einer Messdauer von 8 Min. In der Box (Interquartilbereich) sind Mediane dargestellt.

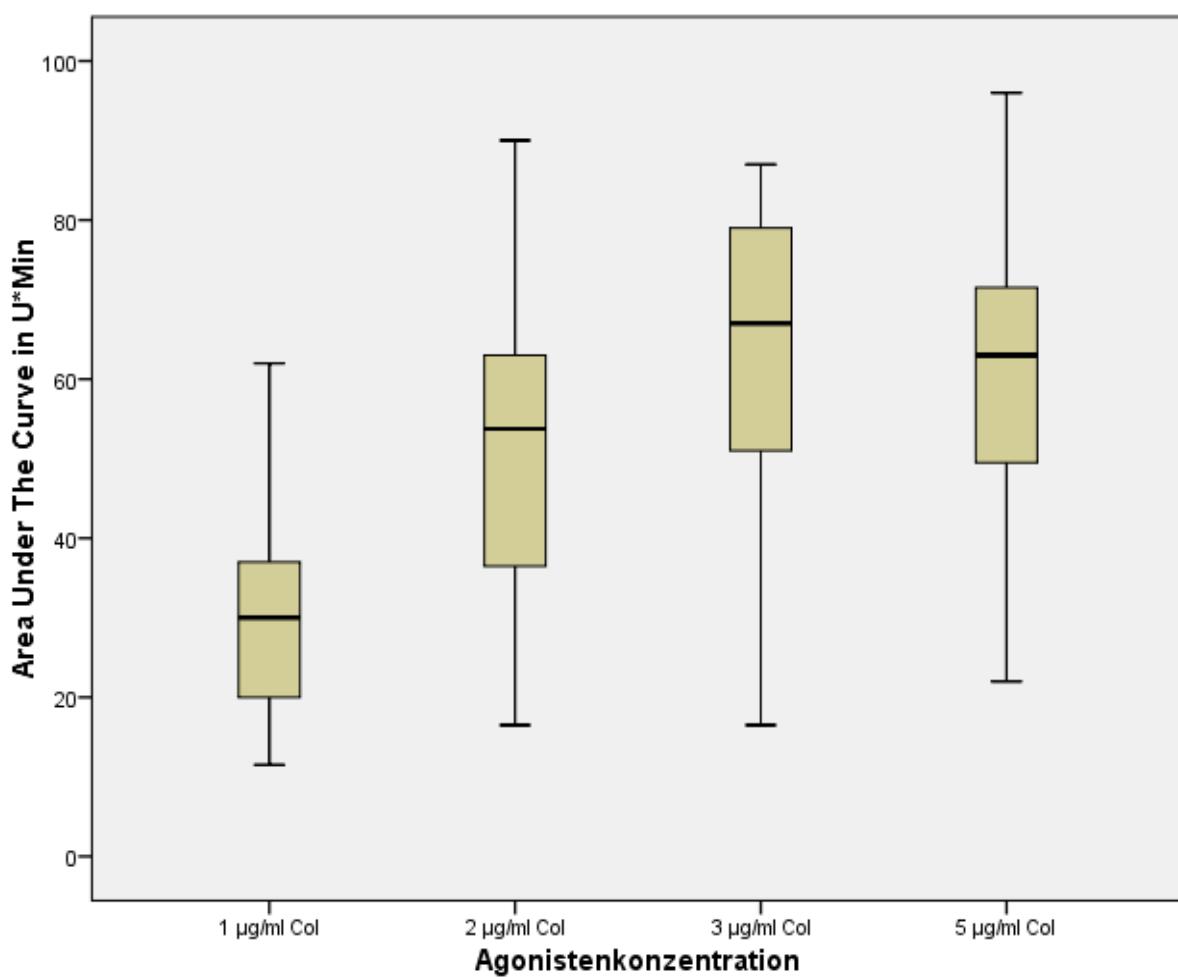


Abbildung 18: Verteilung der AUC-Werte in U*Min von 14 Kälbern, inkubiert mit 1, 2, 3 und 5 µg/ml Col bei einer Messdauer von 6 Min. In der Box (Interquartilbereich) sind Mediane dargestellt.

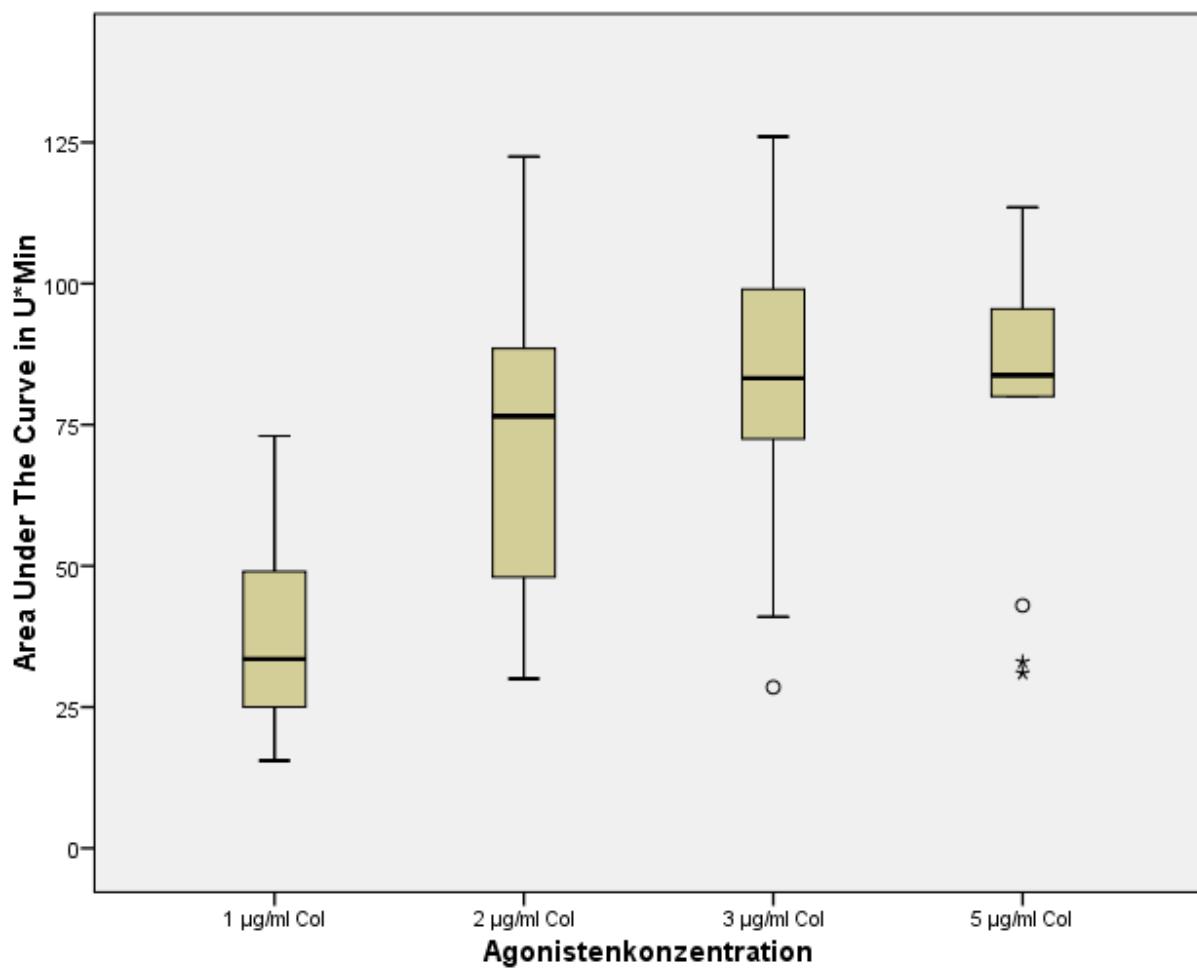


Abbildung 19: Verteilung der AUC-Werte in U^*Min von 14 Kälbern, inkubiert mit 1, 2, 3 und 5 $\mu g/ml$ Col bei einer Messdauer von 8 Min. In der Box (Interquartilbereich) sind Mediane dargestellt.

Tabelle 6: Variationskoeffizienten (VC) der ermittelten AUC-Mittelwerte (\bar{X}) der Doppelansatzwerte und Variationskoeffizienten (VC) der AUCs aller einzelnen Doppelansatzeinzelwerte von den Kälbern 1-14 bei einer Messdauer von 6 und 8 Minuten, inkubiert mit 6, 12, 18 und 30 $\mu mol/l$ ADP.

Agonistenkonzentration		6 $\mu mol/l$ ADP	12 $\mu mol/l$ ADP	18 $\mu mol/l$ ADP	30 $\mu mol/l$ ADP
VCs aus \bar{X} der Doppelansatzwerte in %	6 Min	49,8	39,1	35,3	39,0
	8 Min	38,3	42,8	35,0	35,8
VCs aus den Einzelwerten in %	6 Min	50,8	39,4	35,3	39,0
	8 Min	39,3	42,6	34,9	35,6

Tabelle 7: Variationskoeffizienten (VC) der ermittelten AUC-Mittelwerte (\bar{X}) der Doppelansatzwerte und Variationskoeffizienten (VC) der AUCs aller einzelnen Doppelansatzeinzelwerte von 10 Kälbern (ID 1-14) bei einer Messdauer von 6 und 8 Minuten, inkubiert mit 1, 2, 3 und 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Kollagen.

Agonistenkonzentration		1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Col	2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Col	3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Col	5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Col
VCs aus \bar{X} der Doppelansatzwerte in %	6 Min	47,5	41,4	36,5	34,4
	8 Min	47,1	37,6	34,2	33,2
VCs aus den Einzelwerten in %	6 Min	49,4	41,3	36,9	35,2
	8 Min	49,2	37,6	34,3	33,5

Tabelle 8: Variationskoeffizienten (VC) der ermittelten AUC-Mittelwerte (\bar{X}) der Doppelansatzwerte und Variationskoeffizienten (VC) der AUCs aller einzelnen Doppelansatzeinzelwerte von 10 Kälbern (ohne 4 Kälber mit fraglichen AUC-Werten bei einer Messdauer von 6 und 8 Minuten, inkubiert mit 6, 12, 18 und 30 $\mu\text{mol}/\text{l}$ ADP).

Agonistenkonzentration		6 $\mu\text{mol}/\text{l}$ ADP	12 $\mu\text{mol}/\text{l}$ ADP	18 $\mu\text{mol}/\text{l}$ ADP	30 $\mu\text{mol}/\text{l}$ ADP
VCs aus \bar{X} der Doppelansatzwerte in %	6 Min	45,6	22,3	14,8	17,0
	8 Min	38,9	30,8	17,6	18,8
VCs aus den Einzelwerten in %	6 Min	45,7	25,5	16,4	20,9
	8 Min	37,0	31,0	18,9	21,0

Tabelle 9: Variationskoeffizienten (VC) der ermittelten AUC-Mittelwerte (\bar{X}) der Doppelansatzwerte und Variationskoeffizienten (VC) der AUCs aller einzelnen Doppelansatzeinzelwerte von 10 Kälbern (ohne 4 Kälber mit fraglichen AUC-Werten bei einer Messdauer von 6 und 8 Minuten, inkubiert mit 1, 2, 3 und 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Kollagen).

Agonistenkonzentration		1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Col	2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Col	3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Col	5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Col
VCs aus \bar{X} der Doppelansatzwerte in %	6 Min	34,8	20,1	13,2	18,8
	8 Min	40,1	18,9	18,4	13,3
VCs aus den Einzelwerten in %	6 Min	41,8	29,2	24,6	26,6
	8 Min	44,1	28,2	29,6	25,3

Tabelle 10: Durchschnittliche Variationskoeffizienten (VC) der AUC-Doppelansatzeinzelwerte von Kalb 1-14. bei einer Messdauer von 6 und 8 Minuten, inkubiert mit 6, 12, 18 und 30 µmol/l ADP sowie 1, 2, 3 und 5 µg/ml Kollagen.

Agonistenkonzentration	6 µmol/l ADP	12 µmol/l ADP	18 µmol/l ADP	30 µmol/l ADP
VC in % 6 Min	13,5	7,0	5,7	5,8
VC in % 8 Min	8,7	7,3	5,6	4,1
Agonistenkonzentration	1 µg/ml Col	2 µg/ml Col	3 µg/ml Col	5 µg/ml Col
VC in % 6 Min	12,5	6,2	7,9	8,0
VC in % 8 Min	11,2	7,3	5,7	5,5

2 Vergleich verschiedener Kanülenstärken bei der Blutprobenentnahme

In der zweiten Probenreihe wurden 10 Kälber mit einer 18 Gauge-Kanüle und einer 17 Gauge-Kanüle beprobt und dieses Blut je mit 18 und 30 $\mu\text{mol/l}$ ADP, und 3 und 5 $\mu\text{g/ml}$ Col bei einer Messdauer von 6 Min gemessen. Die Ergebnisse beider Kanülenstärken bei 18 und 30 $\mu\text{mol/l}$ ADP sind in Abbildung 20 dargestellt. In Abbildung 21 werden die Ergebnisse beider Kanülenstärken bei 3 und 5 $\mu\text{g/ml}$ Col visualisiert. Laut Mann Whitney-U-Test bestehen bei 18 $\mu\text{mol/l}$ ADP ($p=0,790$), 30 $\mu\text{mol/l}$ ADP ($p=0,970$), 3 $\mu\text{g/ml}$ Col ($p=0,677$) und 5 $\mu\text{g/ml}$ Col ($p=0,450$) keine statistische Signifikanz zwischen 18 Gauge- und 17 Gauge-Kanülen. Abbildung 22 führt die Verteilung aller Ergebnisse von Probenreihe 1 und 2 auf. Tabelle 11 beinhaltet die Variationskoeffizienten (VC) der AUC-Werte und Tabelle 12 die Verteilung der Doppelansatzeinzelwerte aller Probenansätze dieser Versuchsreihe. In Tabelle 13 sind die Variationskoeffizienten (VC) der Pobenreihe und der Kälber 1-24 aufgeführt. Tabelle 14 zeigt dies ohne 4 Kälber mit fraglichen Ergebnissen. Tabelle 15 veranschaulicht die Verteilung der einzelnen Doppelansatzeinzelwerte.

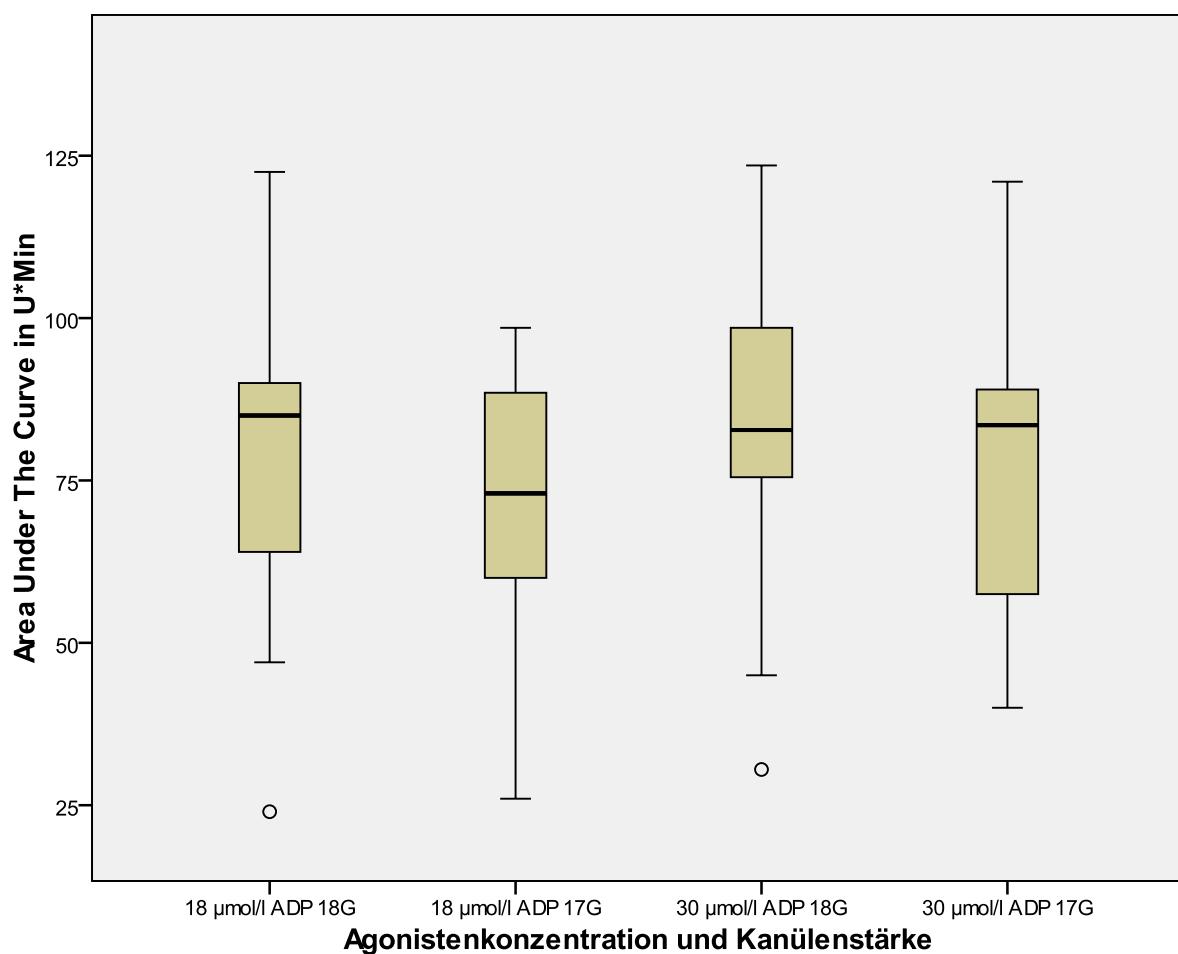


Abbildung 20: Verteilung der AUC-Werte in U*Min von 10 Kälbern, inkubiert mit 18 und 30 $\mu\text{mol/l}$ ADP von über 18 Gauge- und 17 Gauge-Kanülen gewonnenem Blut. In der Box (Interquartilbereich) sind Mediane dargestellt.

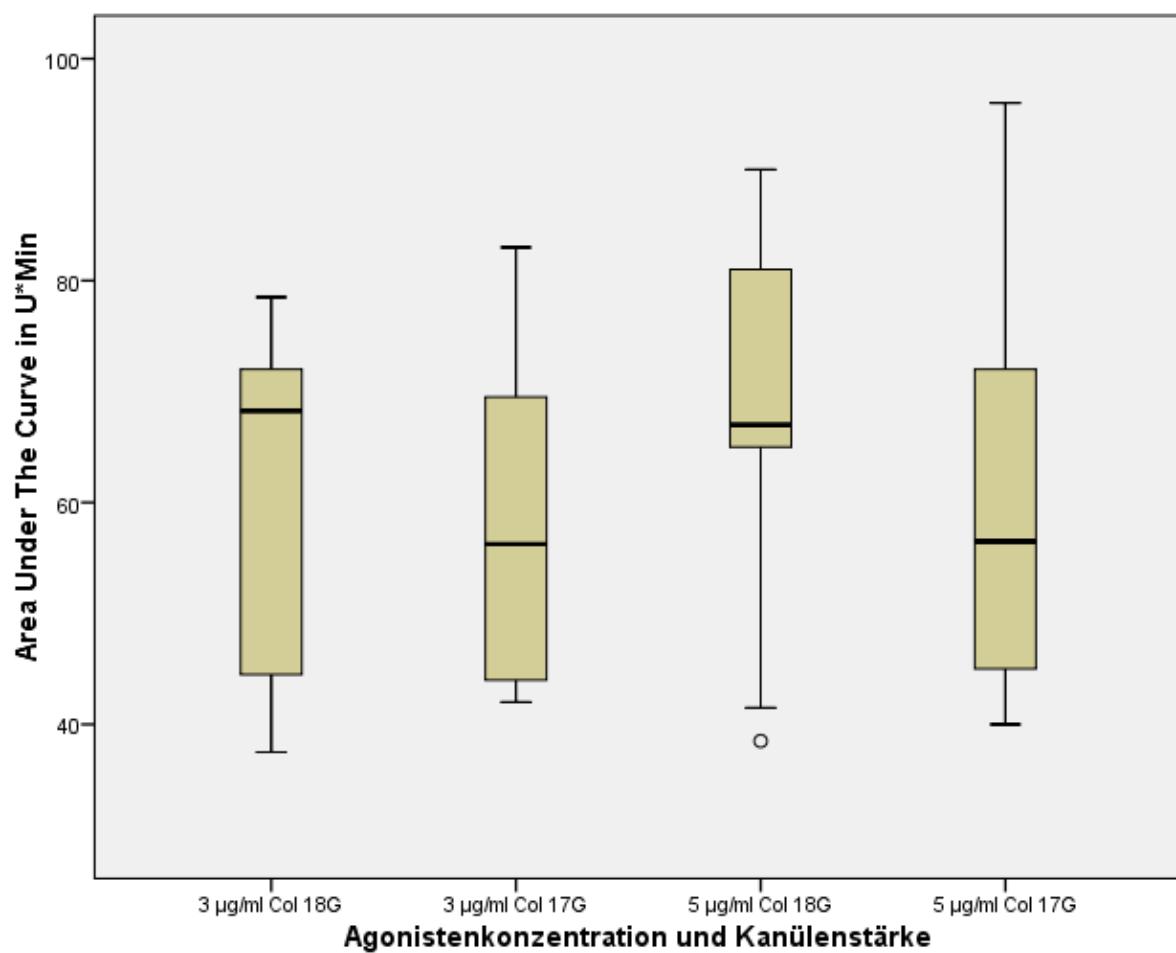


Abbildung 21: Verteilung der AUC-Werte in U*Min von 10 Kälbern von über 18 Gauge- und 17 Gauge-Kanülen gewonnenem Blut, inkubiert mit 3 und 5 µg/ml Col. In der Box (Interquartilsbereich) sind Mediane dargestellt.

Tabelle 11: Variationskoeffizienten (VC) der ermittelten AUC-Mittelwerte (\bar{X}) der Doppelansatzwerte und Variationskoeffizienten (VC) der AUCs aller einzelnen Doppelansatzeinzelwerte von den Kälbern 15-24 von mit 17 Gauge- und 18 Gauge entnommenem und mit 6, 12, 18 und 30 µmol/l ADP und 1, 2, 3 und 5 µg/ml Col inkubiertem Blut.

Agonistenkonzentration		18 µmol/l ADP	30 µmol/l ADP	3 µg/ml Col	5 µg/ml Col
VCs aus \bar{X} der Doppelansatzwerte in %	18 Gauge	35,9	34,5	25,0	24,9
	17 Gauge	30,8	30,2	25,2	28,9
VCs aus den Einzelwerten in %	18 Gauge	35,5	33,7	25,3	24,9
	17 Gauge	30,5	30,4	25,8	27,2

Tabelle 12: Durchschnittliche Variationskoeffizienten (VC) der AUC-Doppelansatzeinzelwerte von mit 18 Gauge- und 17 Gauge- Kaniülen entnommenem Blut.

Agonistenkonzentration	18 $\mu\text{mol/l}$ ADP	30 $\mu\text{mol/l}$ ADP	3 $\mu\text{g/ml}$ Col	5 $\mu\text{g/ml}$ Col
VC in % 18 Gauge	4,2	2,8	6,1	4,4
VC in % 17Gauge	5,4	6,1	7,4	5,8

Tabelle 13: Variationskoeffizienten (VC) der ermittelten AUC-Mittelwerte (\bar{X}) der Doppelansatzwerte und Variationskoeffizienten (VC) der AUCs aller einzelnen Doppelansatzeinzelwerte der Kälber 1-24, inkubiert mit 18 und 30 $\mu\text{mol/l}$ ADP und 3 und 5 $\mu\text{g/ml}$ Col.

Agonistenkonzentration	18 $\mu\text{mol/l}$ ADP	30 $\mu\text{mol/l}$ ADP	3 $\mu\text{g/ml}$ Col	5 $\mu\text{g/ml}$ Col
VCs aus \bar{X} der Doppelansatzwerte in %	33,0	34,2	32,4	30,8
VCs aus den Einzelwerten in %	35,3	39,0	36,9	35,2

Tabelle 14: Variationskoeffizienten (VC) der ermittelten AUC-Mittelwerte (\bar{X}) der Doppelansatzwerte und Variationskoeffizienten (VC) der AUCs aller einzelnen Doppelansatzeinzelwerte von 20 Kälbern der ersten beiden Probenreihen (ohne 4 Kälber mit fraglichen Werten), inkubiert mit 18 und 30 $\mu\text{mol/l}$ ADP und 3 und 5 $\mu\text{g/ml}$ Col.

Agonistenkonzentration	18 $\mu\text{mol/l}$ ADP	30 $\mu\text{mol/l}$ ADP	3 $\mu\text{g/ml}$ Col	5 $\mu\text{g/ml}$ Col
VCs aus \bar{X} der Doppelansatzwerte in %	24,4	23,6	22,4	22,7
VCs aus den Einzelwerten in %	15,8	18,0	14,9	20,8

Tabelle 15; Variationskoeffizienten (VC) aller durchschnittlichen AUC-Doppelansatzeinzelwerte von Kalb 1-24 sowie derselben ohne die vier Kälber mit fraglichen Ergebnissen.

Agonistenkonzentration	18 $\mu\text{mol/l}$	30 $\mu\text{mol/l}$	3 $\mu\text{g/ml}$	5 $\mu\text{g/ml}$
VC in %	5,6	5,9	8,2	6,6
VC in % (ohne 4 fragliche Ergebnisse)	5,7	8,3	6,8	6,7

3 Vergleich unterschiedlicher Entnahmesysteme bei der Blutprobenentnahme

Abbildung 22 bringt die Ergebnisse der 10 Kälber aus der dritten Probenreihe zum Ausdruck. Die Werte zeigen mit Aufziehröhrchen und Vacutainern gewonnenes Blut, das jeweils mit 18 $\mu\text{mol/l}$ ADP und 3 und 5 $\mu\text{g/ml}$ Col inkubiert wurde. Laut Mann-Whitney-U-Test besteht kein statistischer Unterschied bei 18 $\mu\text{mol/l}$ ADP ($p=0,821$), 3 $\mu\text{g/ml}$ Col ($p=0,970$), und 5 $\mu\text{g/ml}$ Col ($p=0,7913$) zwischen Aufziehröhrchen und Vacutainer. In Abbildung 23 ist die Verteilung der Ergebnisse der 34 Probanden der ersten drei Probenreihen bei 18 $\mu\text{mol/l}$ ADP, und 3 und 5 $\mu\text{g/ml}$ Col aufgeführt. In Tabelle 16 sind die Variationskoeffizienten (VC) aller Probenansätze dieser Reihe und in Tabelle 17 sind die VCs der Kälber 1-35 gelistet. Tabelle 18 zeigt die Variationskoeffizienten (VC) der Doppelansatzeinzelwerte dieser Versuchsreihe.

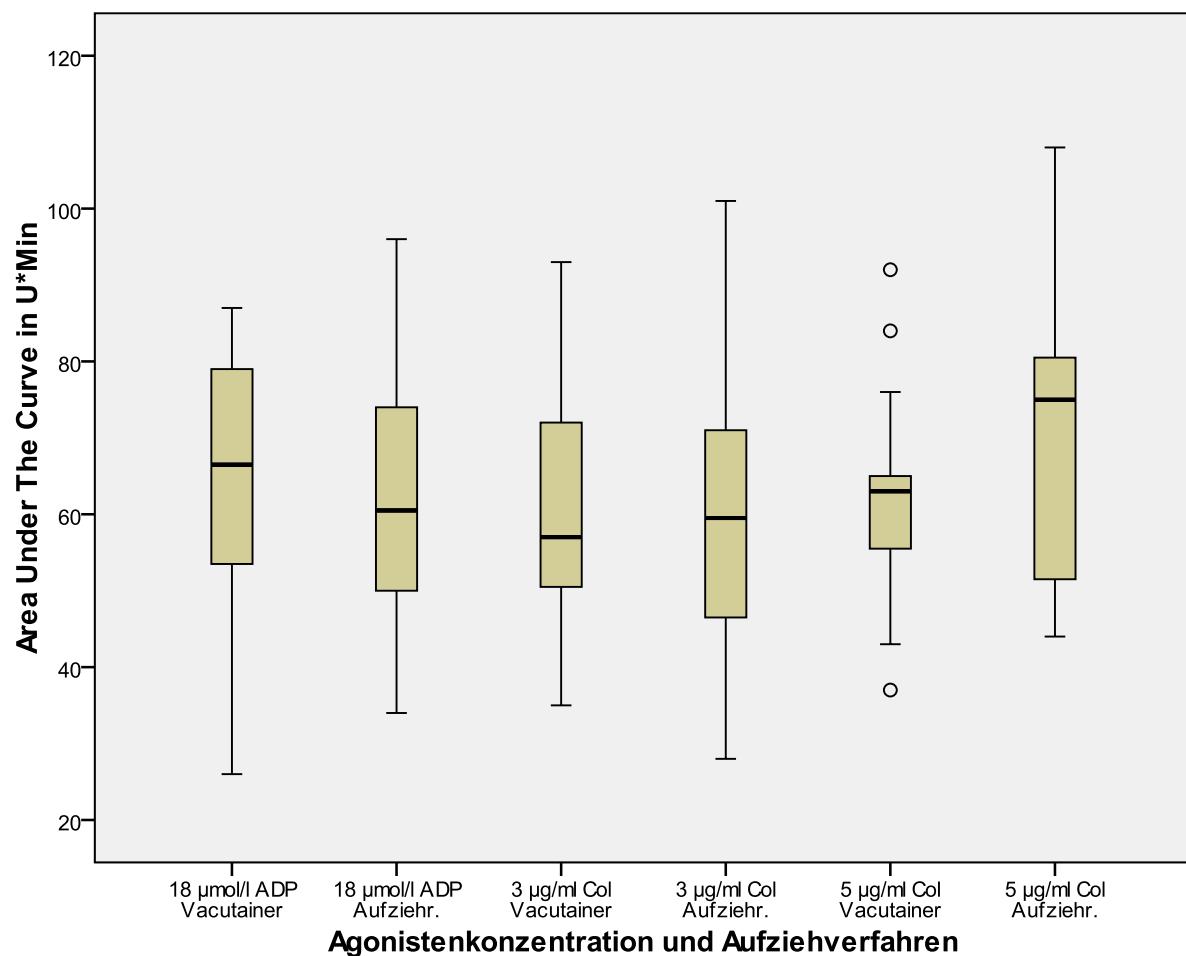


Abbildung 22: Verteilung der AUC-Werte in U^*Min von 10 Kälbern, mit Vacutainer und Aufziehröhrchen beprobt, inkubiert mit 18 $\mu\text{mol/l}$ ADP, und 3 und 5 $\mu\text{g/ml}$ Col. In der Box (Interquartilbereich) sind Mediane dargestellt.

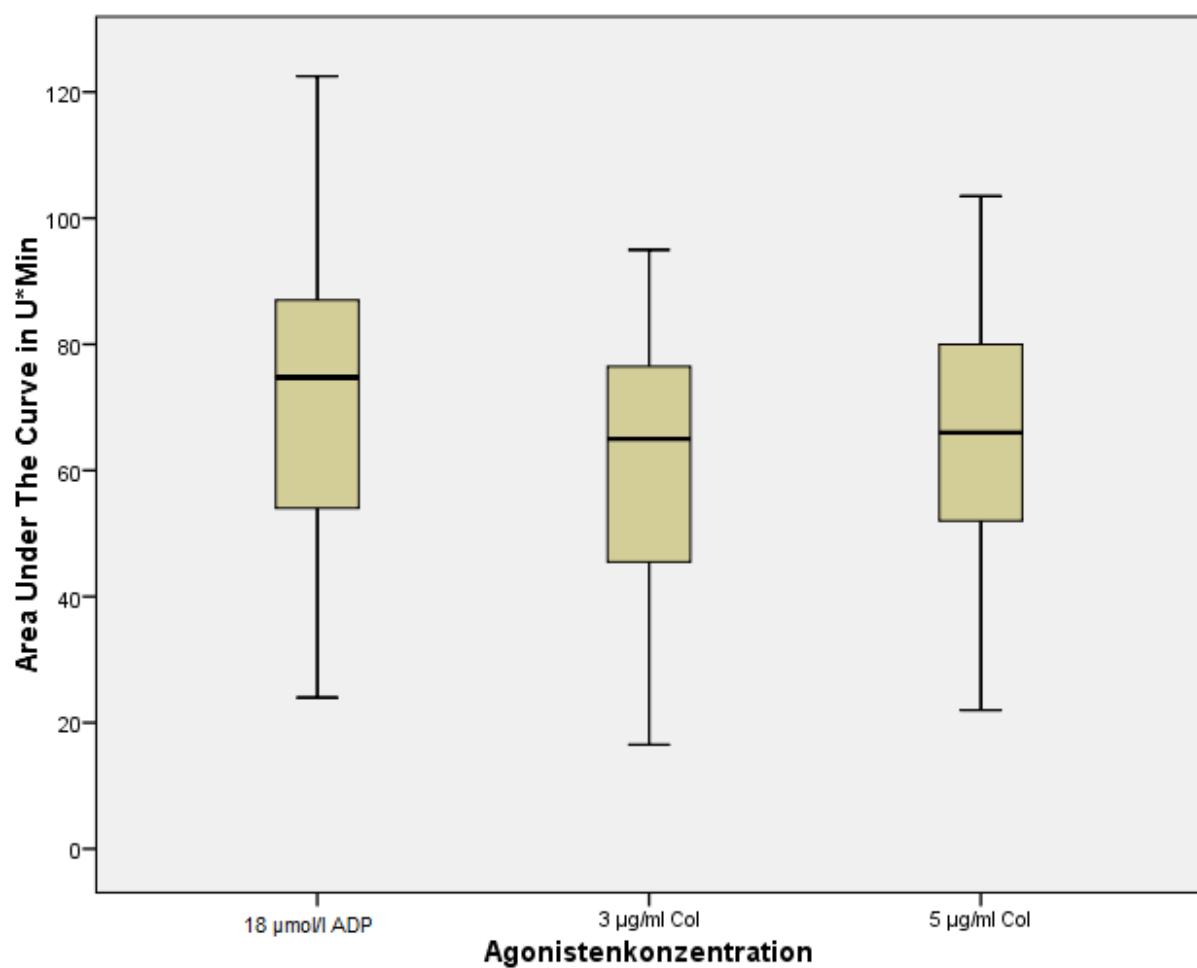


Abbildung 23: Verteilung der AUC-Werte in U*Min von Kalb 1-34, inkubiert mit 18 $\mu\text{mol/l}$ ADP, und 3 und 5 $\mu\text{g/ml}$ Col. In der Box (Interquartilbereich) sind Mediane dargestellt.

Tabelle 16: Variationskoeffizienten (VC) der AUC-Werte von mit Aufziehröhrchen und Vacutainern entnommenem Blut der Kälber 25-34, inkubiert mit 18 µmol/l ADP sowie 3 und 5 µg/ml Col.

Agonistenkonzentration	18 µmol/l ADP	3 µg/ml Col	5 µg/ml Col
VCs in % Vacutainer	27,6	26,4	20,6
VCs in % Aufziehröhrchen	27,2	30,0	25,0

Tabelle 17: Variationskoeffizienten (VC) der AUC-Werte der Kälber 1-34, inkubiert mit 18 µmol/l ADP sowie 3 und 5 µg/ml Col.

Agonistenkonzentration	18 µmol/l ADP	3 µg/ml Col	5 µg/ml Col
VCs in %	33,4	30,4	28,4

Tabelle 18: Durchschnittliche Variationskoeffizienten (VC) der AUC-Doppelansatzeinzelwerte von Kalb 25-34, beprobt mit Vacutainern und Aufziehröhrchen, inkubiert mit 18 µmol/l ADP sowie 3 und 5 µg/ml Col.

Agonistenkonzentration	18 µmol/l ADP	3 µg/ml Col	5 µg/ml Col
VC in % Vacutainer	5,8	8,9	5,9
VC in % Aufziehröhrchen	5,2	5,4	5,0

4 Vergleich unterschiedlicher Entnahmerichtungen bei der Blutprobenentnahme

Abbildung 24 zeigt die Ergebnisse der 10 Kälbern aus der Probenreihe Nummer 4, kopfwärts und herzwärts punktiert, jeweils mit $18 \mu\text{mol/l}$ ADP und $5 \mu\text{g/ml}$ Col inkubiert. Laut Mann Whitney-U-Test besteht bei $18 \mu\text{mol/l}$ ADP ($p=0,940$) und $5 \mu\text{g/ml}$ Col ($p=1,000$) kein statistischer Unterschied zwischen kopfwärts und herzwärts gewählter Punktionsrichtung. Tabelle 19 zeigt die Variationskoeffizienten (VC) aller Probenansätze der Versuchsreihe. In Tabelle 20 sind die durchschnittlichen Variationskoeffizienten (VC) der Doppelansatzeinzelwerte von Kalb 35-44 ersichtlich.

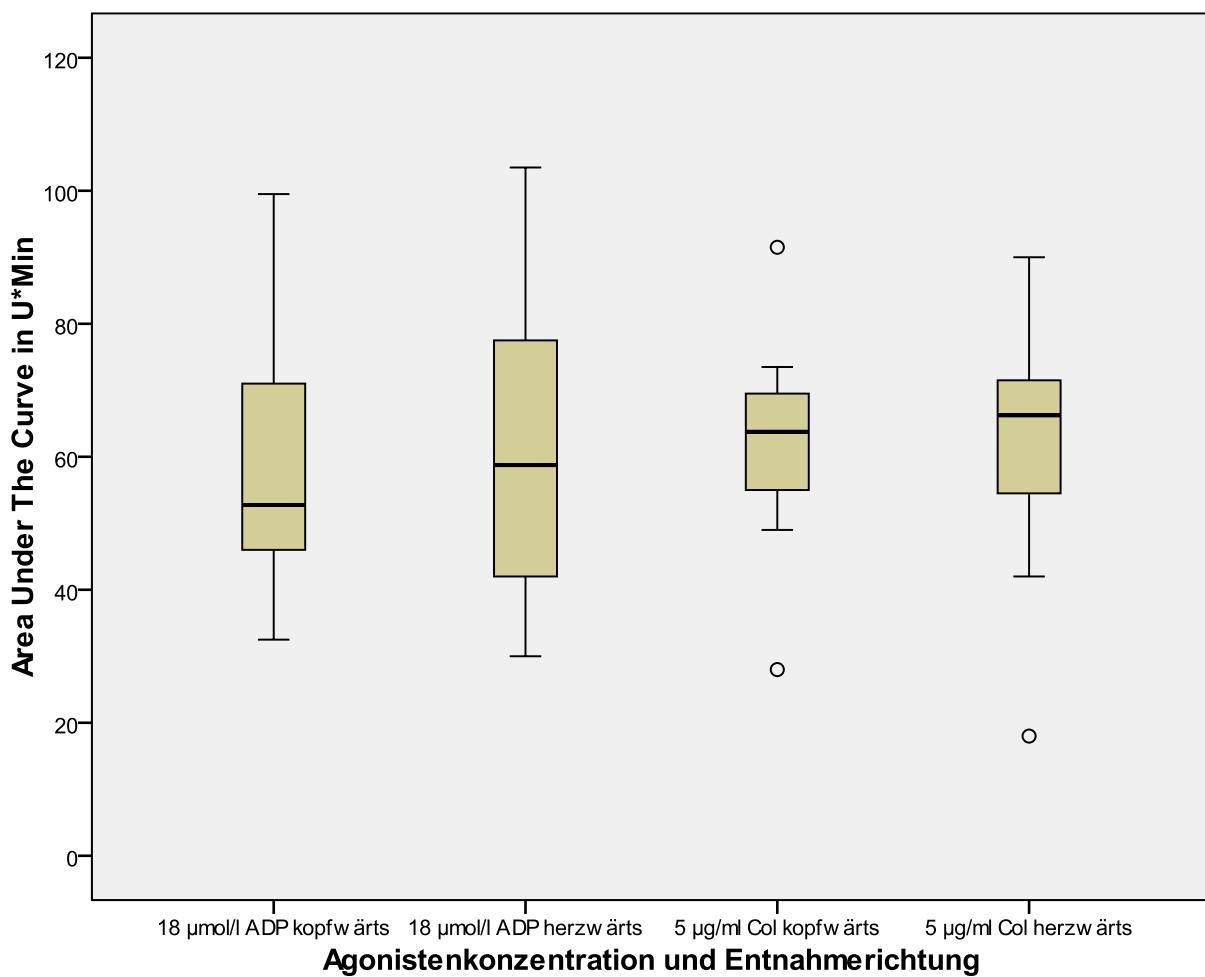


Abbildung 24: Verteilung der AUC-Werte in $U^*\text{Min}$ von Kalb 35-44, kopfwärts und herzwärts beprobt, inkubiert mit $18 \mu\text{mol/l}$ ADP und $5 \mu\text{g/ml}$ Col. In der Box (Interquartilbereich) sind Mediane dargestellt.

Tabelle 19: Variationskoeffizienten (VC) der AUC-Werte der Kälber 35-44, kopfwärts und herzwärts beprobt, inkubiert mit 18 µmol/l ADP und 5 µg/ml Col.

Agonistenkonzentration	18 µmol/l ADP	5 µg/ml Col
VCs in % kopfwärts	37,3	26,9
VCs in % herzwärts	38,7	33,1

Tabelle 20: Durchschnittliche Variationskoeffizienten (VC) der AUC-Doppelansatzeinzelwerte von herzwärts und kopfwärts punktiertem Blut der Kälber 35-44, inkubiert mit 18 µmol/l ADP sowie 5 µg/ml Col.

Agonistenkonzentration	18 µmol/l ADP	5 µg/ml Col
VC`s in % kopfwärts	6,0	6,8
VC`s in % herzwärts	4,3	3,8

5 Referenzwerte

Aus den Messergebnissen bei 18 µmol/l ADP und 5 µg/ml Col bei 43 Kälbern aus der Methodenabstimmung sowie weiterer 18 Kälber wurden die Referenzwerte berechnet. Dabei wurden nicht alle 64 Kälber miteinbezogen, da nur Messergebnisse von Kälbern verwendet wurden, deren Thrombozytenzahl im Blutbild über 200000/µl lag (n=61). Nicht miteinbezogen wurden Kälber mit einer Thrombozytenzahl unter 200000/µl (n=2) oder unauswertbarer EDTA-Blutprobe (n=1). Abbildung 25 stellt die Verteilung der Werte von 61 Kälbern, bei 18 µmol/l ADP und 5 µg/ml Col dar. Der Kolmogorov-Smirnov Test ergab eine Normalverteilung für 18 µmol/l ADP ($p=0,450$) und 5 µg/ml Col ($p=0,376$). Mittels Ausreißertest nach Henry und Reed (REED et al., 1971) wurden keine Ausreißer identifiziert (ADP: Min: 0,0000476; Max: 0,00038 / Col: Min: 0,045; Max: 0,000765). Die berechneten Referenzwerte sind in Tabelle 21 ersichtlich.

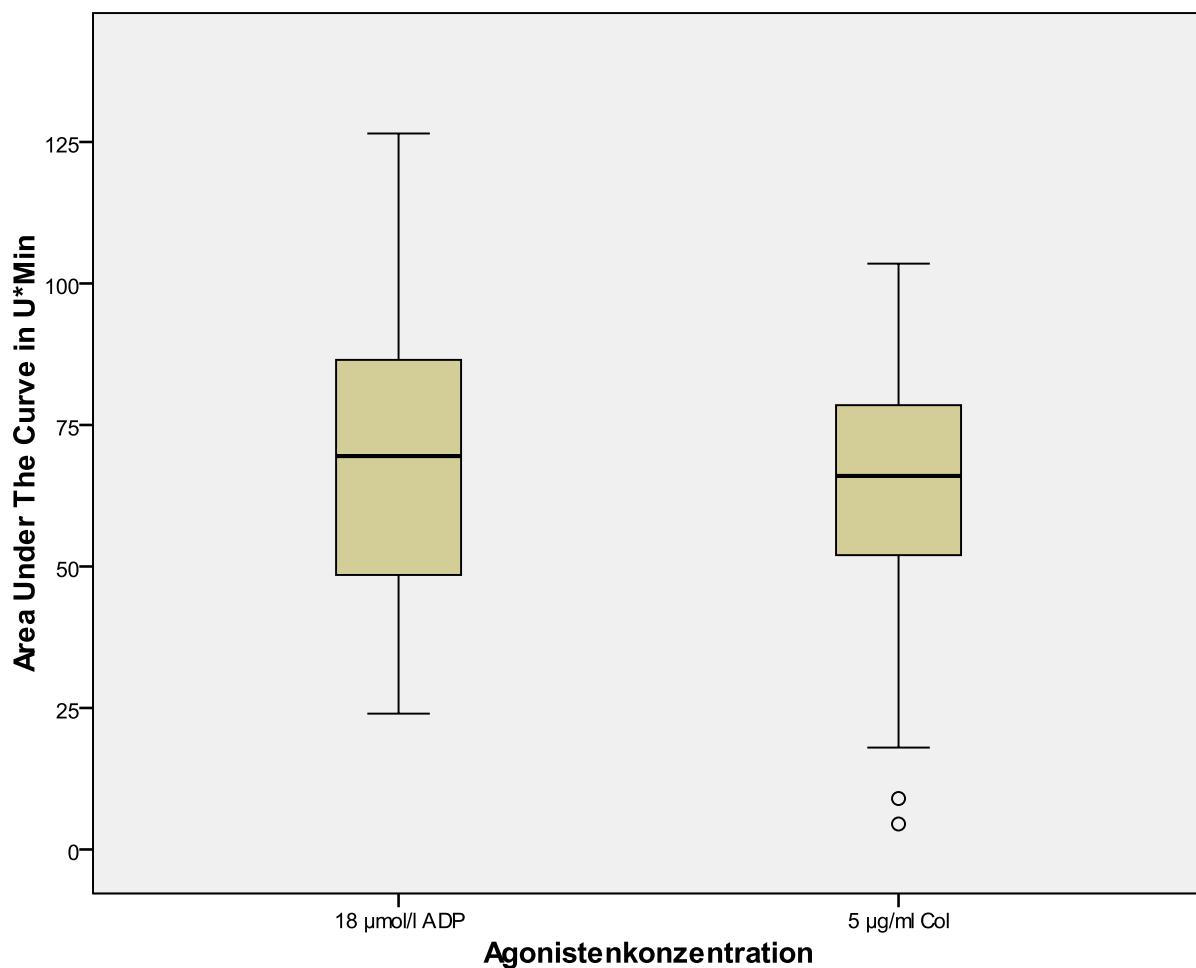


Abbildung 25: Verteilung der AUC-Werte in U^*Min von 61 Kälbern mit einer Thrombozytenzahl $>200000/\mu l$, inkubiert mit $18 \mu mol/l$ ADP und $5 \mu g/ml$ Col. In der Box (Interquartilbereich) sind Mediane dargestellt.

Tabelle 21: Referenzbereich, Mittelwert (\bar{X}) und Standardabweichung (SD) für die Thrombozyten-Aggregation im Multiplate®, von mit $18 \mu mol/l$ ADP und $5 \mu g/ml$ Col inkubiertem Hirudinblut bei 8-28 Tagen alten Kälbern. Aus den Ergebnissen von 61 Kälbern mit einer Thrombozytenzahl $> 200000/\mu l$ berechnet.

	\bar{X} AUC in AU^*Min	
	$18 \mu mol/l$ ADP	$5 \mu g/ml$ Col
\bar{X}	685,25	621,89
SD	253,43	213,81
Referenzbereich		
Untere Grenze ($\bar{X}-2*SD$)	178,39	194,25
Obere Grenze ($\bar{X}+2*SD$)	1192,09	1049,51

6 Gruppenvergleiche

6.1 Vergleich der Funktionsweise zwischen männlichen und weiblichen Tieren

Laut Mann-Whitney-U-Test besteht bei 18 $\mu\text{mol/l}$ ADP kein statistischer Unterschied zwischen den 29 männlichen und 32 weiblichen Kälbern (jeweils mit Thrombozytenzahl $>200000/\mu\text{l}$) ($p=0,251$). In Abbildung 26 ist die Verteilung dieser 29 männlichen und 32 weiblichen Kälbern im Geschlechtervergleich bei 18 $\mu\text{mol/l}$ ADP dargestellt.

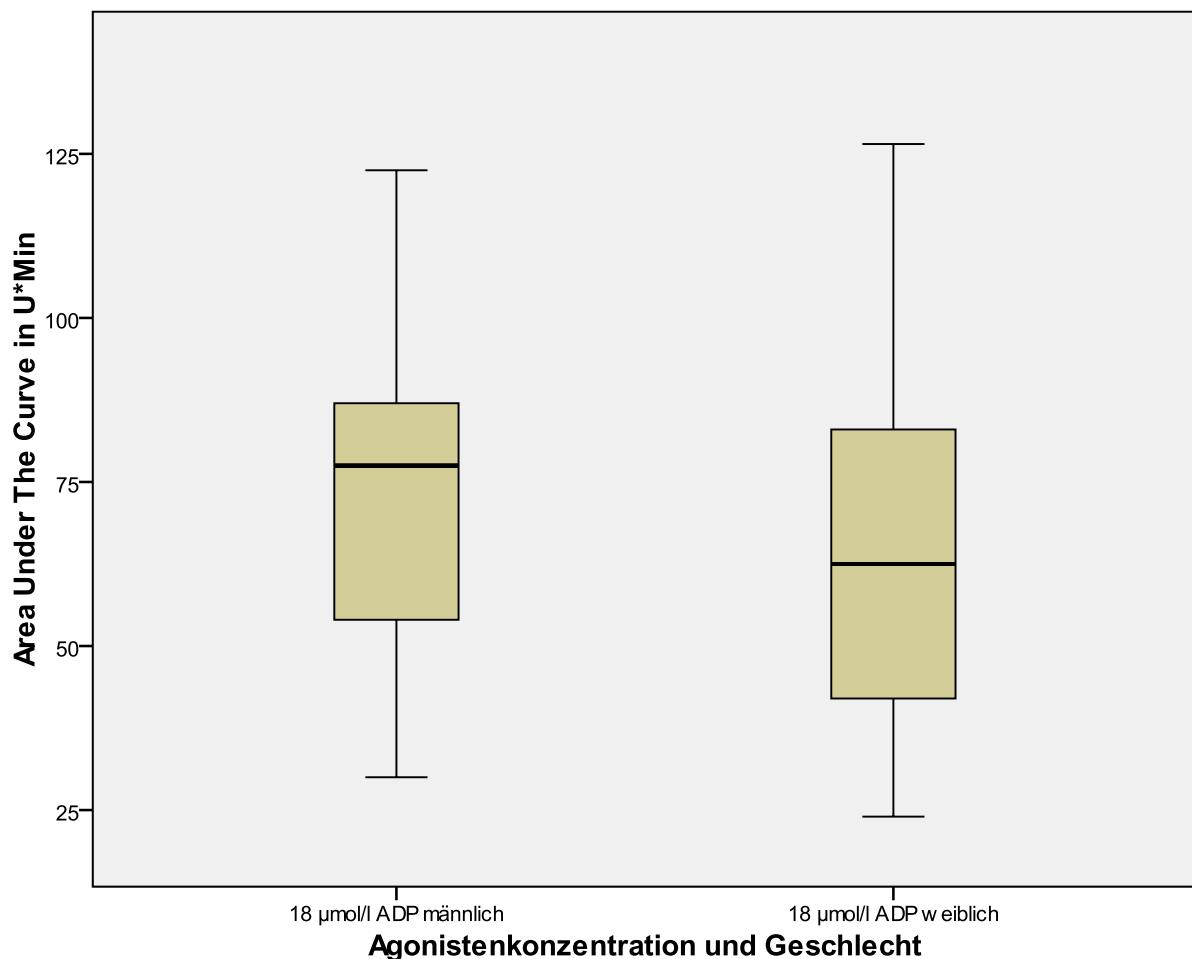


Abbildung 26: Verteilung der AUC-Werte in U^*Min von 29 männlichen und 32 weiblichen Kälbern (Thrombozytenzahl $>200000/\mu\text{l}$), inkubiert mit 18 $\mu\text{mol/l}$ ADP. In der Box (Interquartilbereich) sind Mediane dargestellt.

Ebenfalls besteht laut Mann-Whitney-U-Test bei 5 µg/ml Col kein statistischer Unterschied zwischen den 29 männlichen und 32 weiblichen Kälbern ($p=0,697$). In Abbildung 27 ist die Verteilung von 61 Kälbern (Thrombozytenzahl $> 200000/\mu\text{l}$) bei 5 µg/ml Col im Geschlechtervergleich dargestellt.

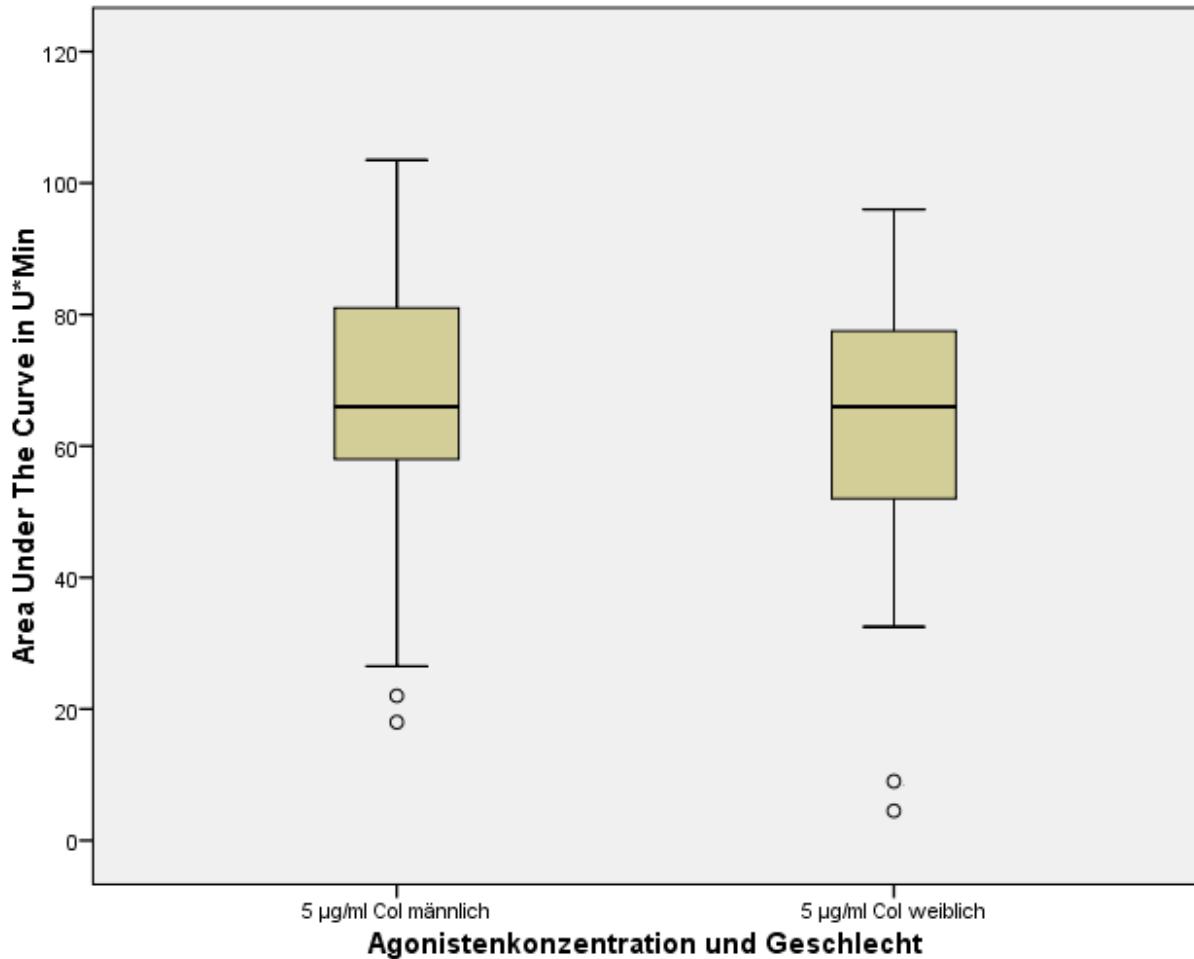


Abbildung 27: Verteilung der AUC-Werte in U^*Min von 29 männlichen und 32 weiblichen Kälbern (Thrombozytenzahl $> 200000/\mu\text{l}$), inkubiert mit 5 µg/ml Col. In der Box (Interquartilbereich) sind Mediane dargestellt.

6.2 Vergleich der erhaltenen Referenzwerte der Thrombozytenfunktion nach Altersgruppen

Laut Kruskal-Wallis-Test besteht kein statistischer Unterschied zwischen den 3 Altersgruppen (zweite, dritte und vierte Lebenswoche) bei $18 \mu\text{mol/l}$ ADP ($p=0.585$) und $5 \mu\text{g/ml}$ Col ($p=0,504$). Abbildung 28 zeigt die Verteilung der AUC-Werte der drei Altersgruppen aller Probanden bei $18 \mu\text{mol/l}$ ADP und Abbildung 29 bei $5 \mu\text{g/ml}$ Col.

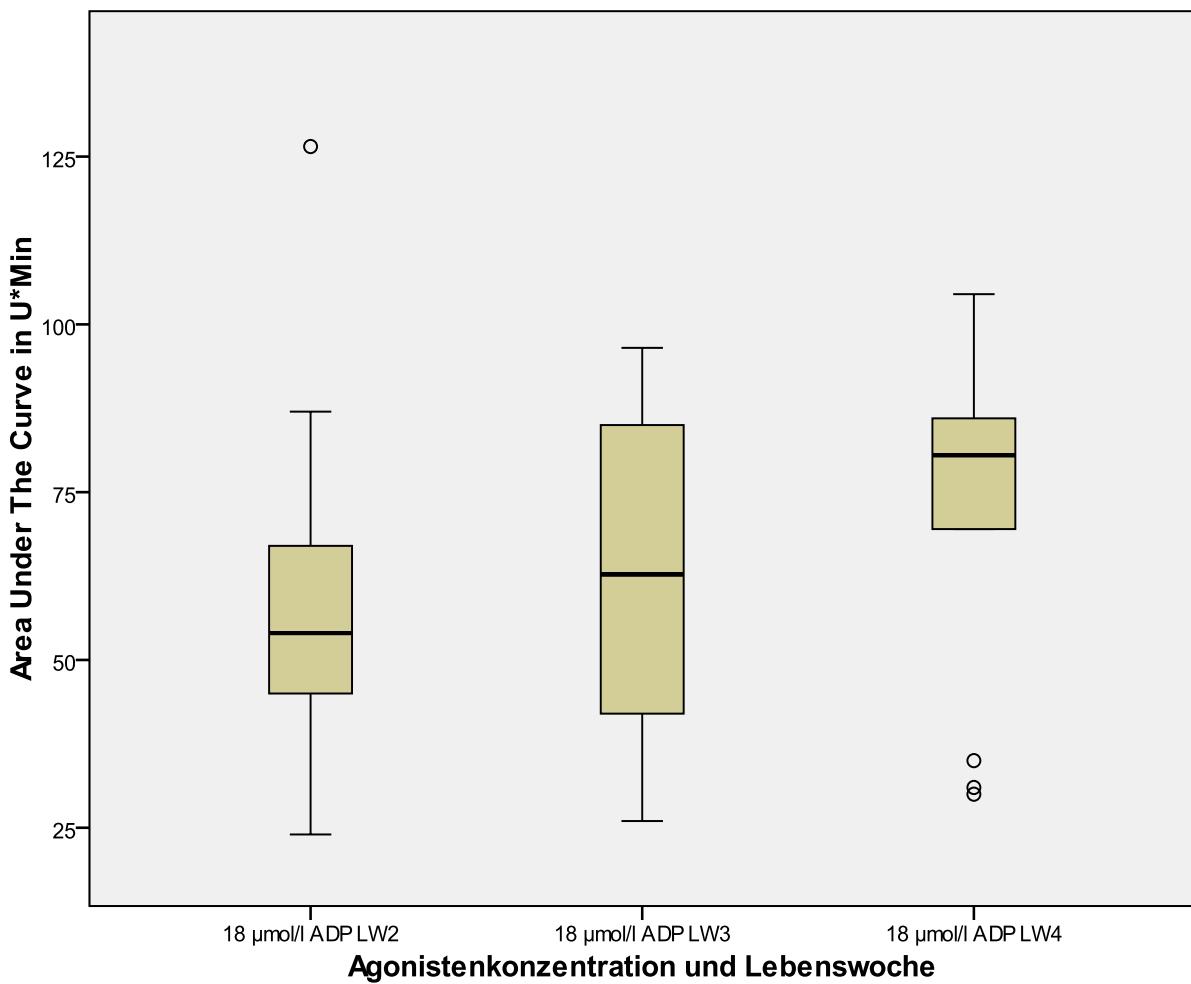


Abbildung 28: Verteilung der AUC-Werte in $U^*\text{Min}$ von 23 Kälbern in der zweiten Lebenswoche, 24 Kälbern in der dritten Lebenswoche und 14 Kälber in der vierten Lebenswoche, inkubiert mit $18 \mu\text{mol/l}$ ADP. In der Box (Interquartilbereich) sind Mediane dargestellt.

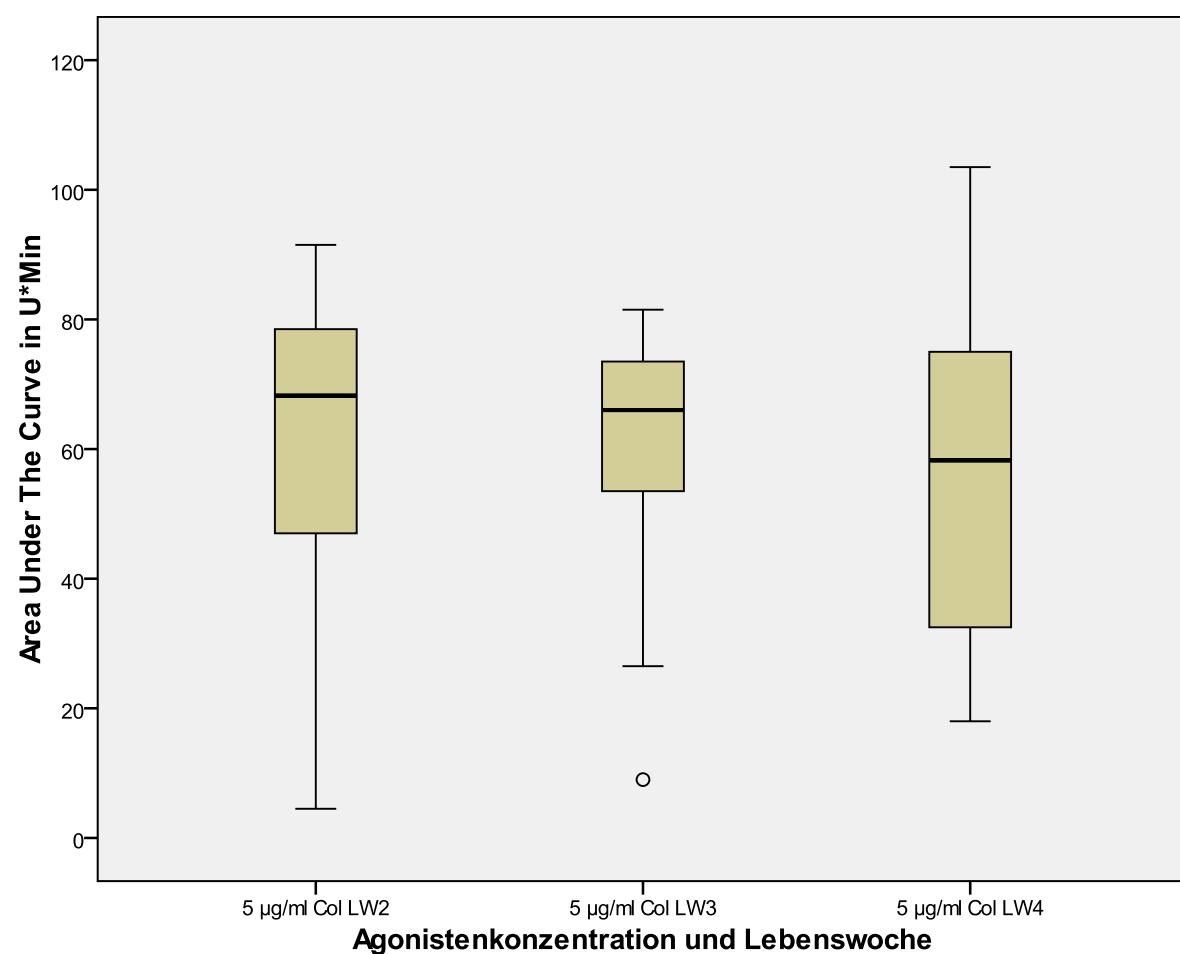


Abbildung 29: Verteilung der AUC-Werte in U*Min von 23 Kälbern in der zweiten Lebenswoche, 24 Kälbern in der dritten Lebenswoche und 14 Kälber in der vierten Lebenswoche, inkubiert mit 5 µg/ml Col. In der Box (Interquartilbereich) sind Mediane dargestellt.

6.3 Korrelation zwischen der Thrombozytenzahl und den erhaltenen AUC-Werten der Thrombozytenfunktion

Es wurde ein schwacher bis mäßiger Zusammenhang zwischen Thrombozytenzahlen und Aggregationswerten bei 18 $\mu\text{mol/l}$ ADP ($r=0,387$; $p=0,001$) und 5 $\mu\text{g/ml}$ Col ($r=0,332$; $p=0,001$) nachgewiesen. Dies ist für 18 $\mu\text{mol/l}$ ADP in Abbildung 30 und für 5 $\mu\text{g/ml}$ Col in Abbildung 31 graphisch verdeutlicht. Da der Thrombozytenwert eines Kalbes nicht ermittelt werden konnte, wurde dieses nicht in die Korrelationsberechnung einbezogen.

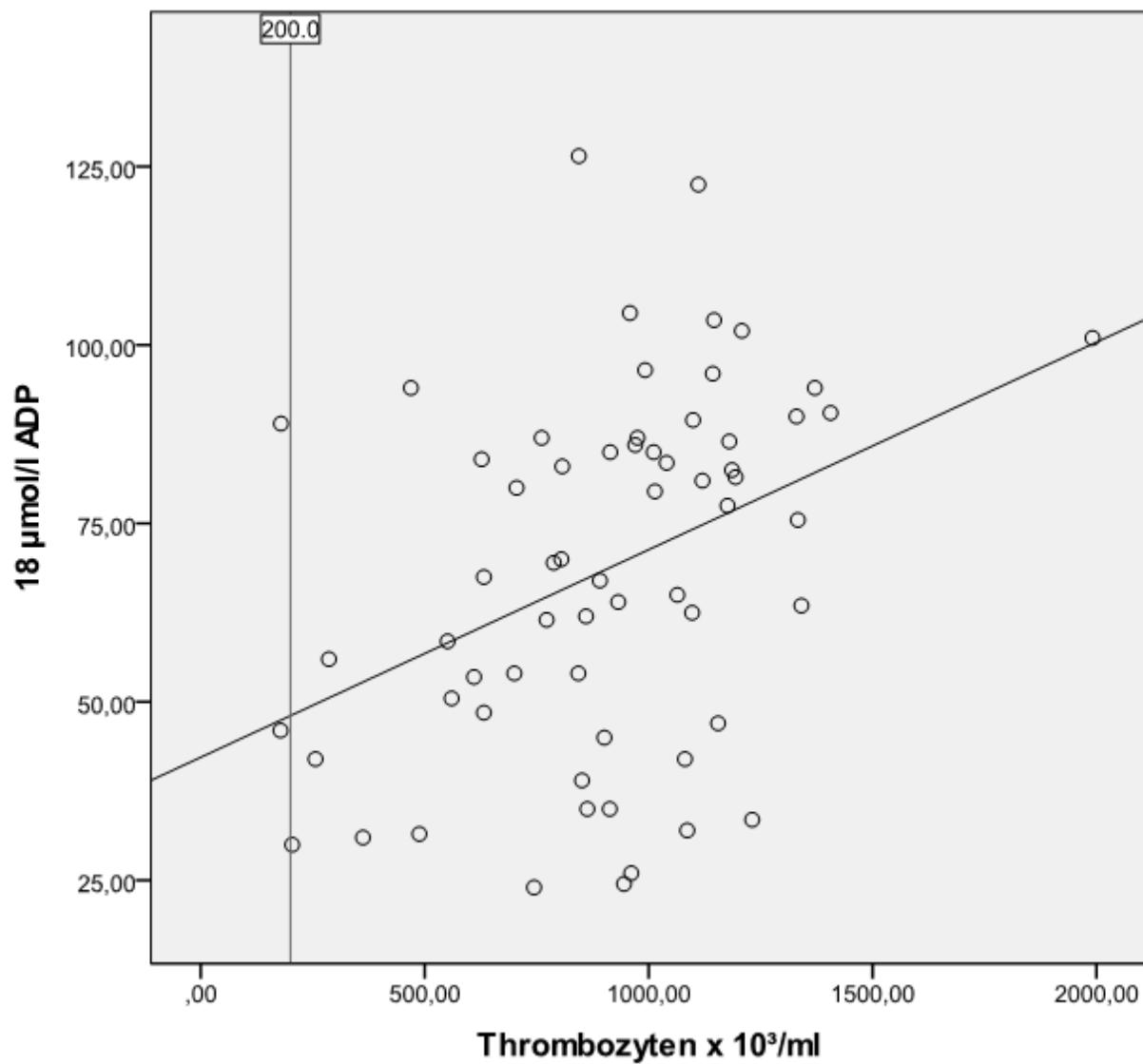


Abbildung 30: Punktdiagramm mit Trendlinie für die AUC-Werte in U*Min in Abhängigkeit von Thrombozytenzahl bei 63 Kälbern, inkubiert mit 18 $\mu\text{mol/l}$ ADP. Die vertikale Linie stellt den unteren Referenzbereich der Thrombozytenzahl von 200000/ml dar.

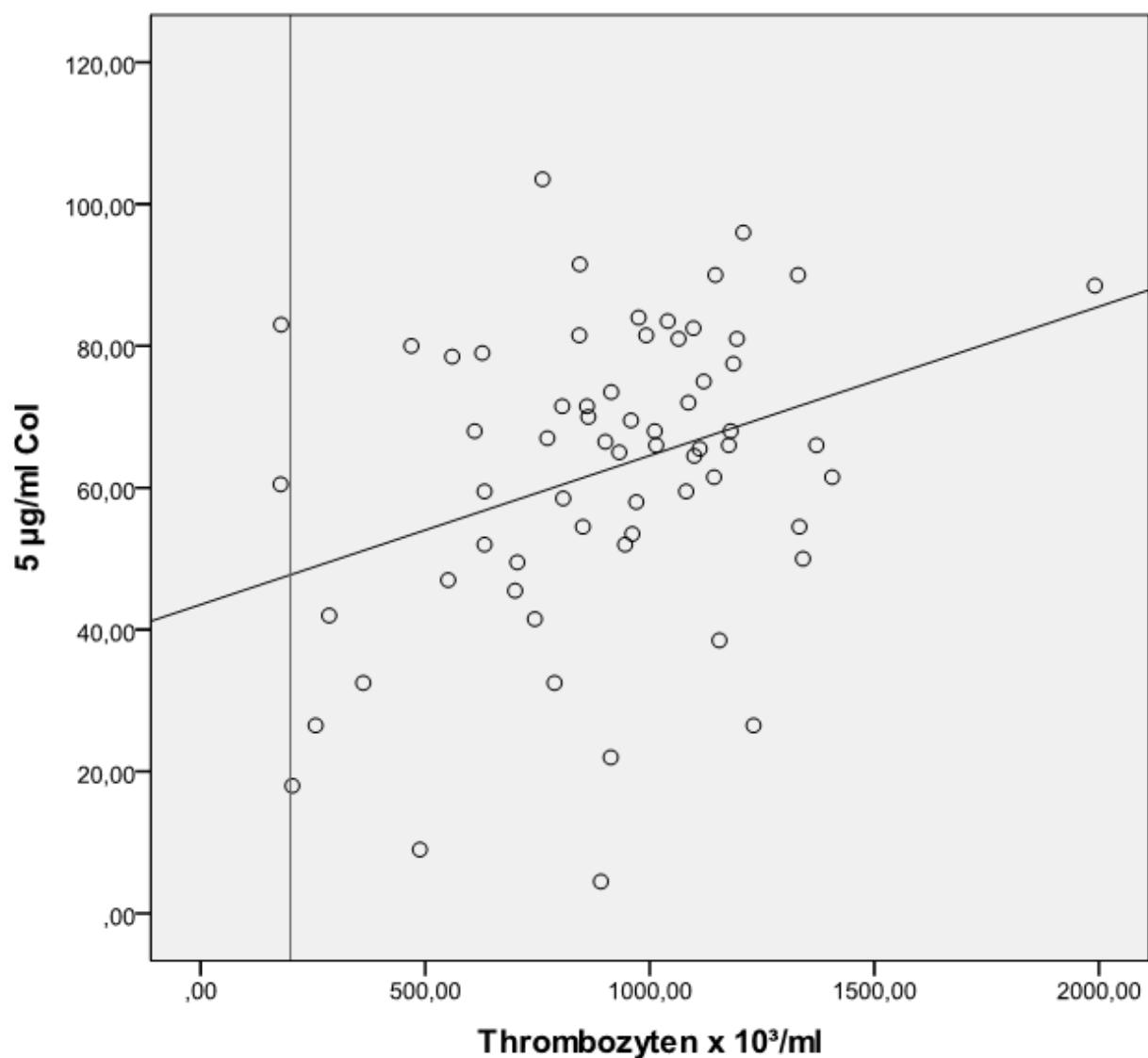


Abbildung 31: Punktdiagramm mit Trendlinie für die AUC-Werte in U*Min in Abhängigkeit von Thrombozytenzahl bei 61 Kälbern, inkubiert mit 5 µg/ml Col. Die vertikale Linie stellt den unteren Referenzbereich der Thrombozytenzahl von 200000/ml dar.

6.4 Korrelation zwischen der Anzahl an Lebenstagen der Tiere und den gemessenen Aggregationswerten (AUC-Werte)

Bei $18 \mu\text{mol/l}$ ADP ($r=0,201$; $p=0,057$) ergaben die Berechnungen einen schwachen linearen Zusammenhang zwischen Aggregationswerten und Anzahl an Lebenstagen wohingegen bei $5 \mu\text{g/ml}$ Col keine Korrelation nachzuweisen war ($r=-0,056$; $p=0,332$). Abbildung 32 veranschaulicht in einem Punktediagramm die Abhängigkeit bei $18 \mu\text{mol/l}$ ADP und Abbildung 33 die Abhängigkeit bei $5 \mu\text{g/ml}$ Col.

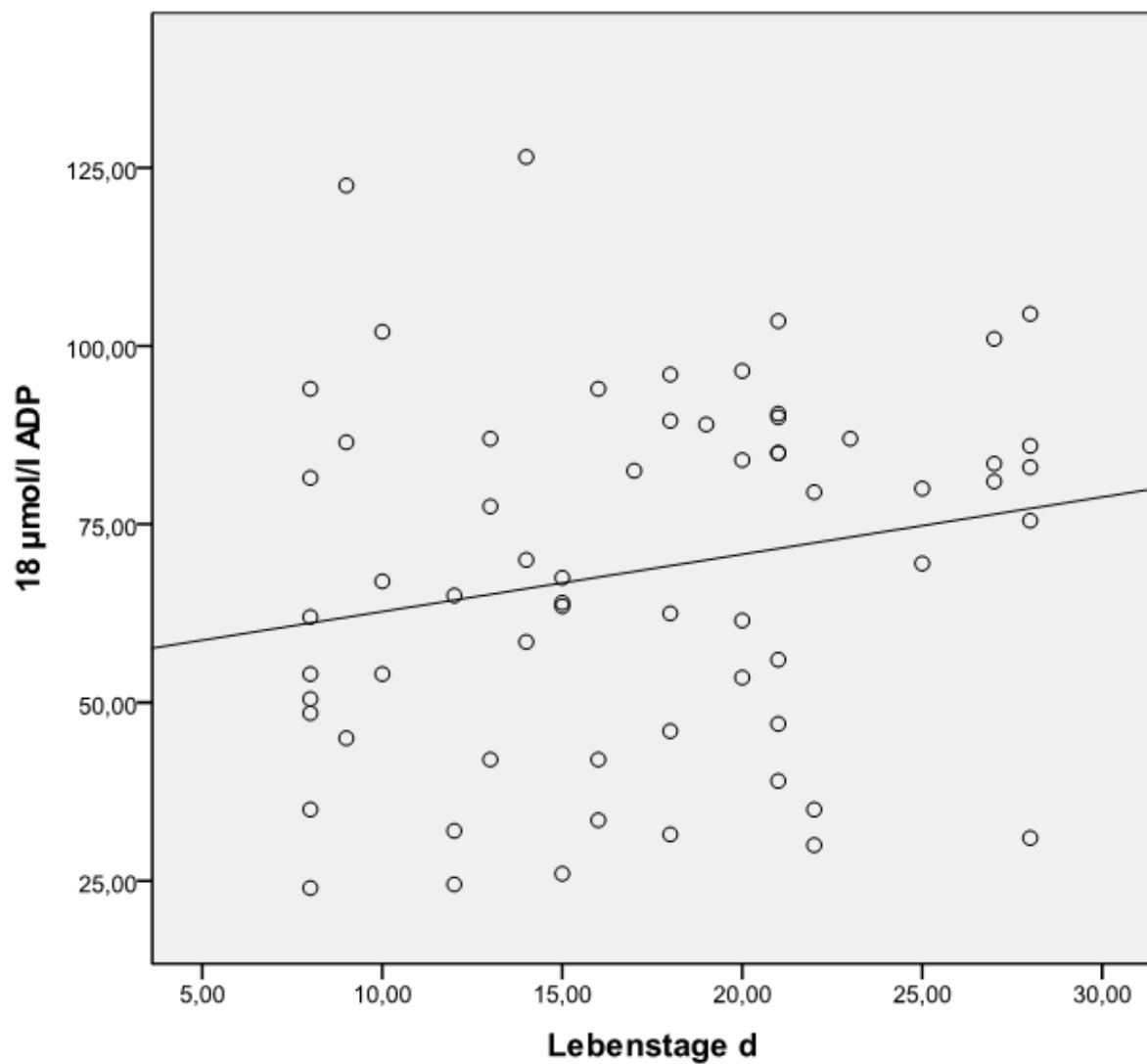


Abbildung 32: Punktdiagramm mit Trendlinie für AUC-Werte in U^*Min in Abhängigkeit zu Lebenstagen bei 61 Kälbern, inkubiert mit $18 \mu\text{mol/l}$ ADP.

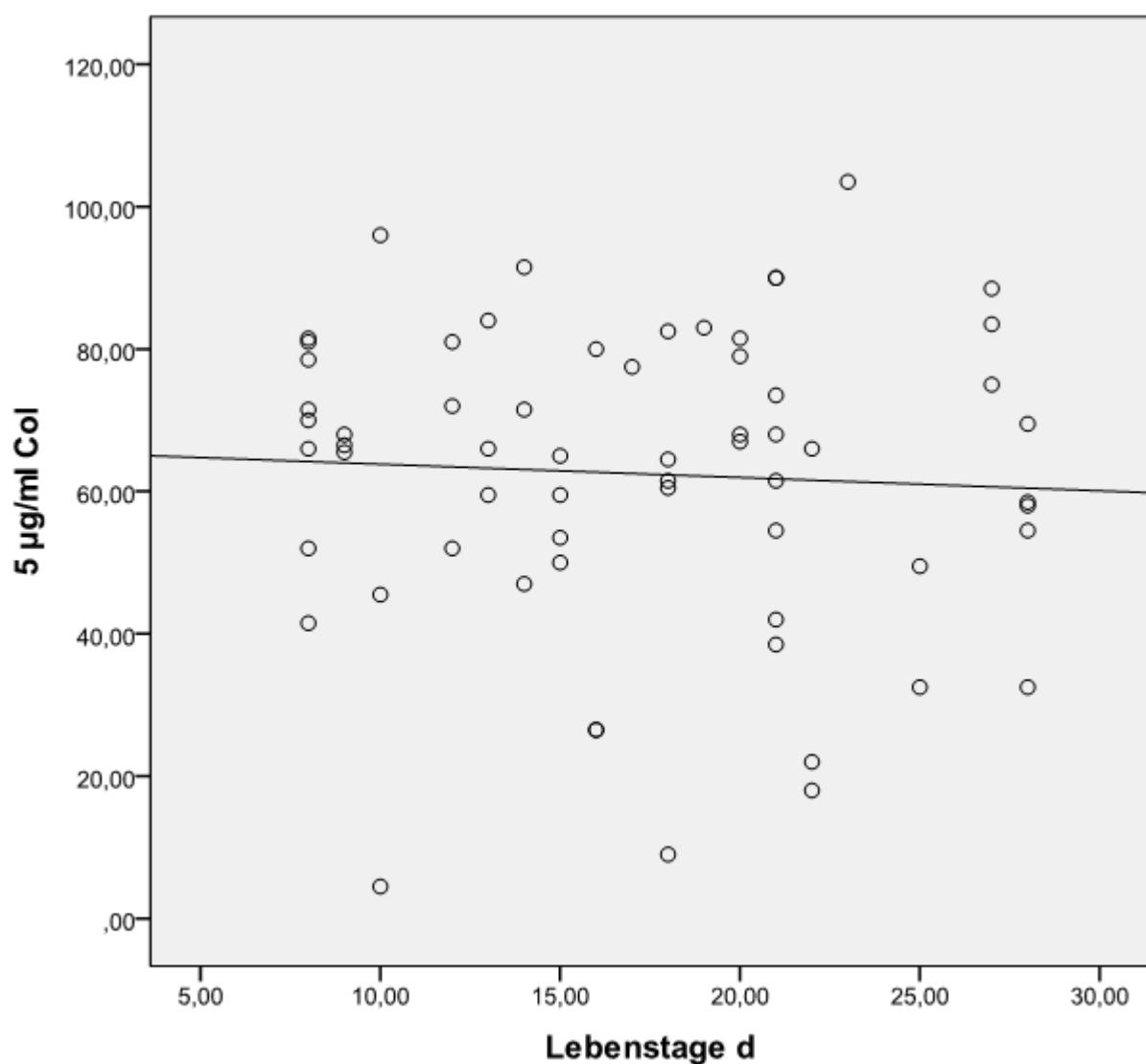


Abbildung 33: Punktdiagramm mit Trendlinie für AUC-Werte in U^*Min in Abhängigkeit zu Lebenstagen bei 61 Kälbern, inkubiert mit 5 µg/ml Col.

V DISKUSSION

1 Auswahl der Kälber

Die Auswahl der Probanden erfolgte willkürlich im Rahmen von Bestandsuntersuchungen hinsichtlich Selenversorgung von der Tierarztpraxis Gars am Inn betreuter landwirtschaftlicher Betriebe. Das Alter der beprobten Kälber wurde auf 8-28 Tage beschränkt, da zum einen in der Literatur beschrieben ist, dass die Thrombozytenfunktion bei unter einer Woche alten Individuen eingeschränkt sein kann und zum anderen es möglich ist, dass sich Referenzwerte von Juvenilen und Adulten unterscheiden. Deshalb sollten im ersten Schritt nur Referenzwerte für eine Altersgruppe bestimmt werden. Weiterhin wurden nur bis zum Beprobungszeitpunkt unbehandelte Kälber in die Studie aufgenommen, da in der Literatur Einflüsse von Medikamenten auf die Thrombozytenfunktion beschrieben sind: Von Penicillinen ist zum Beispiel bekannt, dass sie den durch Agonisten induzierten Calciumeinstrom hemmen und somit zu erniedrigten Messergebnissen bei Thrombozytenfunktionstests führen (SCHULZ et al., 2010). Um mögliche Einflüsse durch Haltungsform oder Ernährung einzuschränken, wurden nur Kälber in Iglu- oder Boxenhaltung beprobpt, die mit Vollmilch, Heu und allenfalls Kälberkorn ernährt wurden. Statistische Vergleiche zwischen den einzelnen Haltungseinrichtungen, den Standorten und Kraftfuttereinsatz wurden nicht berechnet, erscheinen jedoch auch sehr unwahrscheinlich. Eine Verwandtschaft der Kälber wurde zwar nicht überprüft, jedoch wurden keine Probanden in die Studie einbezogen, die in genetischen Zusammenhang zu einem Tier mit Verdacht auf eine Gerinnungsstörung standen.

Der Zeitraum der Beprobung erstreckte sich vom 12.01.2012 bis 28.03.2012. Ein eventueller, jahreszeitlich bedingter Einfluss kann nicht ausgeschlossen werden. Hierzu gibt es aber weder in der Humanmedizin, noch in der Tiermedizin Untersuchungen. Ein Einfluss der Tageszeit auf die Ergebnisse wurde nicht untersucht, konnte aber in der Humanmedizin nicht nachgewiesen werden (SEYFERT et al., 2007).

2 Diskussionspunkte bezüglich der Blutentnahme

Die Blutprobenentnahme erfolgte bis auf Probenreihe 3, in der Vacutainer und Aufziehröhrchen verglichen wurden, ausschließlich mit 4,5 ml Hirudinaufziehröhrchen mit Gummikappe. Hirudinaufziehröhrchen mit Lueransatz sind nur mit 2 ml-Volumen verfügbar.

Angesichts des teilweise großen Volumenbedarfs der einzelnen Messungen hätte deren Verwendung aber zu einer hohen Zahl an Probenrörchen pro Patient und damit möglicherweise zu einer erhöhten Gefahr einer Verfälschung der Werte durch eventuelle Aktivierung der Thrombozyten beim Umfüllen geführt. Werden jedoch nicht mehr als 2 ml Probenvolumen benötigt, können die 2 ml- Probenrörchen mit standardisiertem Lueraufsatzt verwendet werden, was den Entnahmekomfort sehr erhöht und die Thrombozyten schonen dürfte. Zum einen muss man das Probenrörchen nicht mehr umständlich anschließen, indem man die Gummikappe mit der zweiten Kanüle der Entnahmeverrichtung durchstechen muss sondern muss nur noch den Lueransatz auf die punktierte Kanüle setzen. Zum anderen ist der Weg des Blutes durch die Kanüle und den Lueransatz kürzer, wobei auch weniger potentielle Hindernisse, an denen Thrombozyten beschädigt werden könnten, wie bei dem oben beschriebenen Entnahmesystem an den Übergängen zwischen Infusionsschlauch und Kanülen, bestehen. Ob eine Verwendung von Aufziehrörchen mit Lueransatz andere Messergebnisse ergibt oder es aufgrund des hier unvermeidbaren Luftkontakts mit Hirudin zu Abweichungen kommt, wurde nicht untersucht und kann nicht ausgeschlossen werden. Sollten hier dennoch Abweichungen bei den Messwerten auftreten, dürften diese sehr wahrscheinlich gering ausfallen, da im Vergleich Aufziehrörchen - Vacutainer ebenfalls keine statistischen Unterschiede zwischen den zwei Aufziehverfahren festgestellt werden konnten.

Der Transport der Proben erfolgte ohne Hilfsmittel und die Lagerung geschah bei Raumtemperatur. SCHARBERT et al. (2006) untersuchten einen Einfluss der Lagerungstemperatur auf die Aggregation und kamen zu dem Schluss, dass eine Temperatur von 22 °C im Vergleich zu 37 °C zu einer verbesserten durch ADP und Kollagen induzierten Aggregation führt (SCHARBERT et al., 2006). BRAUN et al. veröffentlichten 2009 eine Studie, in welcher die AUC-Werte von ADP induzierten Plättchen von „zu Fuß“ und von einem pneumatischen Röhrentransport-System transportierten Proben verglichen wurden (2009). Dabei wurden keine statistischen Unterschiede festgestellt.

Ein Einfluss der Testtemperatur kann ausgeschlossen werden, da stets auf eine Blocktemperatur von 37,4 °C geachtet wurde. Jedoch kann es bei Variationen dieser Temperatur zu Abweichungen der Ergebnisse kommen. SCHABERT et al. (2006) konnten nachweisen dass es bei von Ristocetin, Col und ASPI induziertem Blut keine signifikanten Abweichungen bei 34 °C und 37 °C Blocktemperatur gibt, diese jedoch bei 22 °C auftraten und hier die Aggregation schwächer war. Mit ADP inkubierte Blutproben reagierten schon

etwas sensibler und zeigten bei 22 °C und 34 °C Abweichungen der Ergebnisse in Form einer gesteigerten Aggregation. Eine Hyperthermie führte nur bei der Col induzierten Aggregation zu einer Beeinträchtigung (SCHARBERT et al., 2006).

3 Diskussionspunkte bezüglich der Methodenabstimmung

Ein Ziel der vorliegenden Studie war es, ein standardisiertes Verfahren zur Blutabnahme zum Zweck der Probengewinnung für Multiplate-Messungen beim Rind zu entwickeln. Ebenso sollte ein standardisiertes Verfahren zum Messablauf im Multiplate® für den Einsatz in der Buiatrik bestimmt werden. Für die Spezies Rind sind noch keine entsprechenden Untersuchungen diesbezüglich veröffentlicht. Es wurde untersucht, welche für die Humanmedizin erhältlichen Thrombozytenaktivatoren bovinen Blut zur Aggregation veranlassen, in welcher Konzentration diese zu verwenden sind, und welche Messdauer hier zu wählen ist (CALATZIS et al., 2006). Aufgrund veröffentlichter Studien war bekannt, dass nicht alle Thrombozytenagonisten bei Blutplättchen von Tieren einen Effekt zeigen. Ovine Thrombozyten können zum Beispiel nicht mit den Agonisten ASPI, Ristocetin und TRAP aktiviert werden (BAUMGARTEN et al., 2010) wohingegen Blutplättchen von Hunden nur durch die Verwendung von Ristocetin und TRAP nicht induzierbar sind (KALBANTNER et al., 2010). Als beste Aktivatoren wurden für beide Spezies ADP und Col bestimmt, wobei bei Schafen und Hunden eine Messdauer von 12 Min gewählt wurde. MARSCHNER et al. (2012) untersuchten die Messzeiten 6, 12, 18 und 24 Min beim Hund und kamen zu dem Ergebnis, dass eine Messdauer von über 12 Min zu erheblichen Varianzen führt. In Vorarbeiten zu der vorliegenden Studie löste die Inkubierung mit den Agonisten ASPI, Ristocetin und TRAP keinerlei Thrombozytenaktivierung aus. Weiterhin zeigte eine Messzeitverlängerung auf über 8 Min eine Plateaubildung im Kurvenverlauf, wodurch teils erhebliche Varianzen zwischen zwei Doppelansätzen entstanden. Aufgrund dieser Ergebnisse vorab beschränkte man sich bei vorliegender Studie auf Untersuchungen mit den Agonisten ADP und Col bei zwei Messzeiten 6 Min und 8 Min.

Als Probenröhrchen wurden mit Hirudin beschichtete Röhrchen gewählt, da in den Untersuchungen von KALBANTER und BAUMGARTEN (2010) Citrat als ungeeignetes Antikoagulans genannt wurde und diese Autoren Hirudin-Probenröhrchen empfehlen. Es sind sowohl vorgefertigte Hirudin-Aufziehröhrchen als auch Hirudin-Vacutainer erhältlich (Firma Dynabite, München, Deutschland). Das Ergebnis von MARSCHNER et al. (2012), dass Heparin als antikoagulatorische Substanz bei Hundeblut aufgrund der höheren

Autokoagulationsneigung von Hirudin vorzuziehen ist, war zu Beginn dieser Arbeit noch nicht veröffentlicht und bekannt. Auch BRAUN et al. (2009) konnten keine Autokoagulation von „zu Fuß“ transportierten Proben nachweisen. LORETH et al. (2010) verglichen Röhrchen mit getrocknetem Hirudin und Röhrchen mit flüssiger Hirudinisoform Lepirudin und kamen dabei zu dem Ergebnis, dass aufgrund der besseren Handhabung trockenes Hirudin zu favorisieren ist, sich aber auch Lepirudin hervorragend als Thrombininhibitor für die Thrombozytendiagnostik mit dem Multiplate-System eignet. In der Humanmedizin kann die Autokoagulation von Hirudinblut durch das Verabreichen von Apyrase reduziert werden (TÓTH et al., 2006). Ob in vorliegender Studie trotz sorgfältigem Umgang mit den Hirudin-Blutproben (bei Entnahme, Transport und Probenablauf) eine Autokoagulation stattfand, kann nicht ausgeschlossen werden. Da in den Vorarbeiten zu dieser Studie bei wiederholten Messungen derselben Blutprobe, meist unterschiedliche Werte berechnet wurden, war die Überlegung naheliegend, ob die Entnahmetechnik einen Einfluss auf die Aggregationswerte und deren Verteilung hat. Deshalb wurden hierfür zwei Kanülen, Aufziehröhrchen und Vacutainer, und die Entnahmerichtung gegenübergestellt. Um die Ergebnisse zu vergleichen und zu bewerten, wurde der Variationskoeffizient (VC) aus allen Mittelwerten der Doppelansätze einer Probenreihe sowie den Doppelansatzeinzelwerten jedes Probenansatzes gewählt. Je kleiner der VC-Wert ist, desto geringer ist die Standardabweichung SD zwischen den Messungen. Dies bedeutet dass die einzelnen AUC-Werte enger zusammenliegen, was einen Rückschluss auf die Messgenauigkeit bei den einzelnen Probenansätzen gibt.

Das Blut der ersten 10 Kälber sollte zu Ermittlung der geeigneten Konzentrationen von ADP und Col, und einer adäquaten Messdauer dienen. Die beiden niedrigsten Variationskoeffizienten (VC) wurden mit 18 $\mu\text{mol/l}$ ADP und einer Messdauer von 6 Min bei einem Wert von 34,63 %, und mit 5 $\mu\text{g/ml}$ Col und ebenfalls 6 Min Messdauer bei einem Wert von 32,12 % ermittelt. Da die Kälber mit den ID's 2,6 und 8 niedrigere Werte im Vergleich zu den anderen sieben Probanden erzielten und zu Anfang der Studie noch nicht bekannt war, ob sich diese Werte in einer möglichen Normalverteilung befinden, wurden sicherheitshalber die Berechnung der Variationskoeffizienten (VC) ohne diese Werte wiederholt. Hierbei hatten die Messungen mit 18 $\mu\text{mol/l}$ ADP bei einem VC von 13,25 % und mit 3 $\mu\text{g/ml}$ Col bei einem VC von 10,06 %, beide 6 Min lang beprobt, die niedrigsten Werte. Folglich wurden weitere drei Kälber in die erste Probenreihe mitaufgenommen. Da jedoch für das erste dieser Rinder wieder etwas kleinere Werte ermittelt wurden, wurde die Untersuchungsreihe schlussendlich auf 14 Probanden vergrößert. Die geringste Varianz

erreichten hierbei die Probenansätze bei 8 Min Messdauer und 18 µmol/l ADP (VC: 35,0 %) und 5 µg/ml Col (VC: 33,2 %). Die Variationskoeffizienten (VC) bei 6 Min Messdauer und 18 µmol/l ADP (VC: 35,3 %) und 5 µg/ml Col (VC 34,4 %) sind nur geringfügig höher. Berechnet man dies wiederum ohne die vier Proben mit höherer Abweichung vom Mittelwert, so sind die niedrigsten Varianzen bei 18 µmol/l ADP (VC: 14,8 %) und bei 3 µg/ml Col (VC: 13,3 %) beide bei einer Messdauer von 6 Min erhalten worden. Aufgrund dieser Auswertungen und der Beobachtung, dass die AUC-Kurven nach 6 Minuten das Amplitudenmaximum bereits erreicht hatten, wurde für die folgenden Messungen dieselbe Messdauer gewählt. Laut Probenplan sollte in der folgenden Versuchsreihe pro Agonist mit den zwei Konzentrationen mit der geringsten Varianz gemessen werden. Laut den durchschnittlichen Variationskoeffizienten (VC) der Doppelansatzeinzelwerte bestand die geringste Variation bei 18 µmol/l (6 Min: 5,7 %; 8 Min: 5,6 %) und 30 µmol/l ADP (6 Min: 5,9 %; 8 Min: 4,1 %). Bei Kollagen wurden bei 6 Minuten Messdauer mit 2 µg/ml (VC: 6,2 %) und 3 µg/ml (VC: 7,9 %) und bei 8 Minuten Messdauer mit 3 µg/ml (VC: 5,7 %) und 5 µg/ml (VC: 5,5 %) berechnet. Unter Berücksichtigung aller Parameter wurden die Agonistenkonzentrationen auf 18 und 30 µmol/l ADP, und 3 und 5 µg/ml Col beschränkt. Es konnte bei den AUC-Werten der ersten 14 Kälber 18 µmol/l ADP und 3 µg/ml Col als die Aggregationsaktivatoren mit der geringsten Varianz ermittelt werden. Betrachtet man selbes ohne die AUC-Werte der vier fraglichen Kälber, ist dies undeutlicher. Da man zu diesem Zeitpunkt noch nicht beurteilen konnte, ob es sich bei den Ergebnissen der vier besagten Kälber um abnormale Werte handelte, wurde sicherheitshalber mit 18 und 30 µmol/l ADP sowie 3 und 5 µg/ml Col weitergemessen.

Die nächsten 10 Versuchskälber fungierten als Vergleich zwischen 18 Gauge-Kanüle und 17 Gauge-Kanüle. Die jeweils geringste Varianz der 2 Agonisten wurde bei mit 18 µmol/l ADP inkubierten und mit einer 17 Gauge-Kanüle punktierten (VC: 30,2 %) sowie mit 5 µg/ml Col inkubierten und mit einer 18 Gauge-Kanüle abgenommenen Probe (VC: 24,9 %) ermittelt. Da man als Kriterium für die Auswahl der geeigneten Kanüle diejenige identifizieren wollte, die zu einer möglichst geringen Streuung der Werte und möglichst kleiner Beeinflussung der Einzelwerte führt, wählte man als Parameter die durchschnittlichen Variationskoeffizienten (VC) der Doppelansatzeinzelwerte. Diese kleinsten prozentualen Unterschiede erreichte man bei mit einer 18 Gauge-Kanüle abgenommenen Blutprobe bei einer Messung mit 30 µmol/l ADP (VC: 2,8 %) und bei 5 µg/ml Col-Test (VC: 4,4 %). Aufgrund dieser Ergebnisse und unter Berücksichtigung der Tatsache, dass die Kälber bei der

Manipulation mit einer 17 Gauge-Kanüle erheblich mehr Abwehrbewegungen zeigten und offensichtlich mehr Stress empfanden als bei der dünneren 18 Gauge-Kanüle, wurde die Kleinere als Standardkanüle bestimmt. Es konnte jedoch keine statistische Signifikanz zwischen den zwei Kanülenstärken nachgewiesen werden (18 $\mu\text{mol/l}$ ADP: $p=0,790$; 30 $\mu\text{mol/l}$: $p=0,970$; 3 $\mu\text{g/ml}$ Col: $p=0,677$; 5 $\mu\text{g/ml}$ Col: $p=0,450$). Ebenso wurden die Testergebnisse dieser Studienreihe in die Berechnung für die beste Agonistenkonzentrationen miteinbezogen. Nach Berechnung der Variationskoeffizienten der Testwerte aller bis dahin beprobten Testkälber erreichten 18 $\mu\text{mol/l}$ ADP (VC: 33,0 %) und 5 $\mu\text{g/ml}$ Col (VC: 30,8 %) die geringsten Varianzen. Ohne die Kälber 2, 6, 8 und 11 ergab die Berechnung bei 30 $\mu\text{mol/l}$ ADP (VC: 23,6 %) und 3 $\mu\text{g/ml}$ Col (VC: 22,4 %) geringere Werte. Betrachtet man die durchschnittliche Verteilung der Doppelansatzeinzelwerte, ist diese bei 18 $\mu\text{mol/l}$ ADP (VC: 5,6 %) und 5 $\mu\text{g/ml}$ Col (VC: 6,6 %) gleichmäßiger. Die Konzentration von ADP wurde auf 18 $\mu\text{mol/l}$ beschränkt. Bei Col unterschieden sich die Variationskoeffizienten (VC) bei 3 $\mu\text{g/ml}$ und 5 $\mu\text{g/ml}$ nur geringfügig, weshalb in der nächsten Untersuchungsreihe nochmals mit beiden Konzentrationen gemessen wurde.

Die dritte Untersuchungsreihe mit weiteren 10 Testkälbern hatte zum Zweck, die Probenabnahmeverfahren mittels Aufziehröhrchen und Vacutainer zu vergleichen. Den geringeren Variationskoeffizienten (VC) bei mit 18 $\mu\text{mol/l}$ ADP aktiviertem Blut hatten mit Aufziehröhrchen gewonnene Proben (VC: 27,2 %). Bei mit 3 und 5 $\mu\text{g/ml}$ Col inkubierten Proben hatte mit Vacutainer entnommenes Blut die niedrigeren Variationskoeffizienten (VC) (26,4 %; 20,6 %). Die geringsten durchschnittlichen Variationskoeffizienten (VC) der Doppelansatzeinzelwerte ergaben sich jedoch aus allen Ansätzen mit Aufziehröhrchenblut (18 $\mu\text{mol/l}$ ADP, VC: 5,2 %; 3 $\mu\text{g/ml}$ Col, VC: 5,4 %; 5 $\mu\text{g/ml}$ Col, VC: 5,0 %). Da die Probenansätze von mit Aufziehröhrchen gewonnenem Blut zu genaueren Ergebnissen führten, wurde dieses Entnahmesystem als Standardsystem gewählt. Es wurden keine statistischen Unterschiede zwischen den verschiedenen Aufziehverfahren festgestellt (18 $\mu\text{mol/l}$ ADP: $p=0,820$; 3 $\mu\text{g/ml}$ ADP: $p=0,970$; und 5 $\mu\text{g/ml}$ Col: $p=0,791$). Anhand der minimalsten interindividuellen Variation aller bisher gemessenen Werte konnten 5 $\mu\text{g/ml}$ Col (VC: 28,9 %) und 18 $\mu\text{mol/l}$ ADP (VC: 33,9 %) im weiteren Verlauf der Untersuchung als Standardkonzentrationen festgelegt werden.

In der vierten Versuchsreihe wurde überprüft, ob ein signifikanter Unterschied der Ergebnisse zwischen den Entnahmerichtungen „herzwärts“ und „kopfwärts“ besteht und welche Richtung hierbei die bessere ist. Gemäß ROSENBERGER et al. (1970) ist die Lehrmeinung zwar eine

kopfwärts gerichtete Punktionsrichtung, die Proben der ersten drei Versuchsreihen wurden jedoch aus Gründen der besseren Praktikabilität mit einer herzwärts eingeführten Kanüle gewonnen. Die geringste Varianz zwischen den einzelnen Ansätzen bestand bei mit 18 µmol/l ADP (VC: 37,3 %) sowie mit 5 µg/ml Col (VC: 26,9 %) aktivierten und kopfwärts entnommenen Proben. Die Abweichung der einzelnen Ergebnisse der Doppelansätze war dennoch bei herzwärts entnommenen Blutproben geringer (18 µmol/l ADP, VC: 4,3 %; 5 µg/ml Col, VC: 3,8 %) was wiederum aufgrund der besseren Messgenauigkeit als Standardverfahren gewählt wurde. Es wurden jedoch keine statistischen Unterschiede zwischen den Entnahmerichtungen bestätigt (18 µmol/l ADP: $p=0,820$; 3 µg/ml Col: $p=0,970$; 5 µg/ml Col: $p=0,791$).

Bei Hunden ermittelten KALBANTER et al. (2009) diejenigen Konzentrationen, welche möglichst hohe Werte bei kleinst möglicher Varianz erreichten. Dies waren 10 µmol/l ADP, 5 µg/ml Col und 1 mmol/l Arachidonsäure. Interessant bei der Untersuchung von KALBANTER ist, dass bei höheren Konzentrationen von Col und Arachidonsäure (20 µg/ml und 2 mmol/l) niedrigere AUC-Werte gemessen wurden. Dies konnte bei der vorliegenden Evaluation ebenfalls vereinzelt zwischen 18 und 30 µmol/l ADP sowie zwischen 3 und 5 µg/ml Col beobachtet werden. KALBANTER (2006) erklärt dieses Phänomen damit, dass eine Plättchenaggregation schon während der Inkubationsphase und somit vor der Messung an den Elektroden stattfinden könnte. BAUMGARTEN et al. (2009) erforschten Selbiges bei Schafen. Hierbei wurden 4 und 5 µmol/ml ADP und 4 und 5 mg/ml Col als die Agonistenkonzentrationen mit geringster Varianz erhoben. Vergleicht man diese Ergebnisse mit denen der eigenen Untersuchung, kamen beide Autoren ebenfalls zu einer Kollagenkonzentration von 5 µg/ml. Jedoch gibt es bei ADP deutliche Unterschiede, wobei für Kälber höhere Konzentrationen nötig sind.

4 Ermittelte Referenzwerte

Anhand der Variationskoeffizienten (VC) der Ansätze 18 µmol/l ADP und 5 µg/ml Col wurden diese Agonisten mit dieser Konzentration als Standard festgelegt. Für die Ermittlung der Referenzwerte wurden nur diejenigen Kälber verwendet, bei denen eine erniedrigte AUC aufgrund einer eventuellen Thrombozytopenie auszuschließen war. Dies gestaltete sich schwierig, da es für den Alterszeitraum von 8 - 28 Tagen für Kälber keine Referenzwerte bezüglich der Plättchenanzahl gibt. 2012 wurden Referenzbereiche für neugeborene Kälber ermittelt, wobei für die Thrombozytenkonzentration am Lebenstag 5 ein Referenzintervall

von 317‘700/ μ l bis 1‘193‘900/ μ l errechnet wurde. Da sich dieser Referenzbereich laut Verfasser im Lebensverlauf noch erheblich ändern dürfte (HEINDL, 2012) erschien dieser nicht als geeigneter Vergleichsbereich für die vorliegende Studie. Als Thrombozytenwerte bei adulten Rindern werden unterschiedliche Referenzregionen wie 100‘000/ μ l bis 800‘000/ μ l (KRAMER, 2000) und 200‘000/ μ l bis 800‘000/ μ l (STÖBER & GRÜNDER, 1990) definiert. KRAFT (2005) beschrieb eine Referenzspanne von 300‘000/ μ l bis 800‘000/ μ l für adulte Rinder. Diese sei jedoch bei Kälbern höher nachdem die Thrombozytenzahl in den ersten 3 Lebenstagen eines Rindes ansteigt (KRAFT, 2005). Dass die Plättchenanzahlen bei Kälbern höher sind, erwähnen auch weitere Autoren (KNOWLES et al., 2000; BRUN-HANSEN et al., 2006; MOHRI et al., 2007). KNOWLES et. al. (2000) sind der Meinung, dass der Anstieg der Thrombozytenkonzentration nach einer Woche abgeschlossen ist, wohingegen MOHRI et al. (2007) dies erst nach zwei Wochen annehmen. Aufgrund der vielen Unklarheiten wurde als untere Grenze der in der Klinik für Wiederkäuer der LMU München angewandte untere Referenzwert von 200‘000/ μ l nach STÖBER und GRÜNDER (1990) festgelegt. Um dies genauer einzugrenzen müsste man Referenzwerte für Kälber in besagter Altersklasse evaluieren. Da für den Ausschluss einer Funktionsstörung nur der untere Bereich eine Rolle spielt, wurde eine obere Grenze nicht berücksichtigt. Die Berechnung der Werte ergab die Referenzbereiche von 178,39 AU*Min bis 1192,09 AU*Min für 18 μ mol/l ADP und 194,25 AU*Min bis 1049,51 AU*Min für 5 μ g/ml Col. KALBANTER et. al. (2006) ermittelten bei Hunden erheblich höhere Referenzwerte von 1481–3448 AU*min bei 10 μ mol/l ADP und 2017–3460 AU*Min bei 5 μ g/ml Col, jedoch wurde hierbei die doppelte Messdauer (12 Min) gewählt. MARSCHNER et al. (2012) beprobten 19 Hunde bei einer Messdauer von 6 Min mit 6,5 μ mol/l ADP bei Ergebnissen von 406–966 AU*Min und 20 Hunde mit 3,2 μ g/ml Col bei Werten von 534–1092 AU*Min. BAUMGARTEN et al. (2009) berechneten Referenzbereiche für Schafe bei 1395–3706 AU*Min bei 4 μ mol/ml ADP, 1358–3896 AU*Min für 5 μ mol/l ADP, 518–1989 AU*Min für 4 μ g/ml Col und 591–2226 AU*Min bei 5 μ g/ml Col. Hierbei sind ebenfalls höhere Werte wie bei Kälbern zu beobachten, was sich aber wiederum durch die längere Messzeit von 12 Min erklären lässt. Außergewöhnlich erscheint dabei, dass Col bei Schafen niedrigere Werte ergibt als ADP, was bei Hunden unter KALBANTER (2010) und MARSCHNER (2012) sowie bei den Kälbern der eigenen Untersuchung entgegengesetzt zu verzeichnen ist. CALATZIS et al. (2006) bestimmten Referenzwerte für die Humanmedizin bei einer Testzeit von 5 Min. Diese erreichten Werte von 259-707 AU*Min für 5 μ mol/l ADP und 564-784 AU*Min für 2,5 μ g/ml Col. Da bei jeder Studie unterschiedliche Messzeiten und

Agonistenkonzentrationen verwendet wurden, ist ein exakter Vergleich der Referenzwerte zwischen den verschiedenen Spezies nicht möglich.

5 Signifikanz und Korrelation

Da 2007 bereits darauf hingewiesen wurde, dass ein Einfluss von Hunderassen auf die ADP-induzierte Aggregation besteht (NIELSEN et al., 2007), und auch KALBANTER (2006) auf eine Abhängigkeit von Geschlecht und Alter auf die Aggregometrie bei Menschen und Labortieren verwies, wurde in dieser Arbeit auf signifikante Unterschiede zwischen den Geschlechtern und den verschiedenen Altersgruppen überprüft. Rassespezifische Unterschiede sollten in Folgearbeiten überprüft, und gegebenenfalls spezifische Referenzwerte gebildet werden. Im Geschlechtervergleich wurde keine statistische Signifikanz der Aggregationswerte zwischen männlichen und weiblichen Kälbern nachgewiesen (18 $\mu\text{mol/l}$ ADP: $p=0,251$; 5 $\mu\text{g/ml}$ Col: $p=0,697$). Auch im Altersvergleich konnten keine statistischen Unterschiede zwischen LW 2, LW 3 und LW 4 nachgewiesen werden (18 $\mu\text{mol/l}$ ADP: $p=0,585$; 5 $\mu\text{g/ml}$ Col: $p=0,504$). Dies ist analog zu Ergebnissen aus der Humanmedizin (SEYFERT et al., 2007).

Es konnte nur eine mäßige Korrelation zwischen steigender Plättchenzahl und den Aggregationswerten bei ADP und Col nachgewiesen werden (18 $\mu\text{mol/l}$ ADP: $r=0,387$, $p=0,001$; 5 $\mu\text{g/ml}$ Col: $r=0,332$, $p=0,001$). Zu einer Abhängigkeit zwischen Thrombozytenzahl und AUC gibt es bereits mehrere Meinungen aus der Humanmedizin. TOTH et al. (2006) schildern, dass eine Plättchenaggregation, welche mit ADP oder Col induziert wurde, unabhängig von der Plättchenkonzentration ist. SEYFERT et al. (2007) konnten dagegen eine statistische Korrelation von der Aggregation mit ADP und Col induziertem Blut bezüglich der Plättchenzahl nachweisen. WÜRTZ et al. (2012) fanden eine signifikante Korrelation zwischen Blutplättchenzahl und Col sowie ASPI induzierten Aggregationswerten. Eine weitere Untersuchung testete 2010 unter Verwendung der Agonisten ADP, Col, TRAP und ASPI ebenfalls den Einfluss von Thrombozytenzahl auf Aggregationswerte (HANKE et al., 2010). Die Autoren berichteten, dass bei einer Thrombozytenzahl unter normalem Niveau, welches bei 100000/ μl lag, großteils auch erniedrigte AUC's gemessen wurden, dies aber nicht zwingend der Fall war. Beurteilt man die AUCs der Kälber aus der eigenen Studie, deren Thrombozytenzahlen sich unter der gewählten Grenze von 200000/ μl befanden ($n=2$), ist zu beobachten, dass sich deren Aggregationskurven mit 460 AU*Min und 605 AU*Min für ADP, und 890 AU*Min und

830 AU*Min für Col, jeweils im mittleren Referenzbereich befanden. Um jedoch eine Aussage zu treffen, dass AUC-Werte nicht von der Plättchenzahl abhängig sind, bedarf es mehrerer Werte von Probanden mit erniedrigter Thrombozytenkonzentration. Dies beweist jedoch, dass eine zu niedrige Plättchenquantität keine Multiplate®-Ergebnisse im Normalbereich ausschließt.

Eine Korrelation zwischen dem Lebensalter und der AUC bei Kälbern konnte nicht bestätigt werden (ADP: $r=0,201$, $p=0,057$; Col: $r=-0,056$, $p=0,332$). Zwar ergab die Berechnung bei den Werten von ADP einen schwachen linearen Zusammenhang, jedoch war dieser nicht signifikant. Darüber hinaus erscheinen drei Lebenswochen für diese Korrelationsberechnung ein zu enger Zeitraum. In der Humanmedizin wurde ein Zusammenhang der Thrombozytenfunktion von Säuglingen, Kindern und Jugendlichen (0,1 bis 18 Jahre) untersucht. Für die induzierte Aggregation mit ADP und Col wurde keine signifikante Korrelation zwischen Babys (1-12 Monate) und Jugendlichen (<18 Jahre) bescheinigt. Jedoch erreichten ältere Kinder bei TRAP und ASPI höhere AUC-Werte gegenüber Babys (HALIMEH et al., 2010).

Die Ergebnisse dieser Studie reichen dazu aus, die Thrombozytenfunktion von Kälbern zu erfassen und eine klare Aussage darüber zu treffen, ob es sich dabei um physiologische oder pathologische Aggregationswerte handelt. Die Referenzwerte für das Multiplate®-Aggregometer sollten jedoch in Folgearbeiten bezüglich anderer Altersgruppen, verschiedener Rinderrassen und unphysiologisch erniedrigter oder erhöhter Thrombozytenzahlen ergänzt werden. Aufgrund des einfachen Proben- und Messablaufes kann jeder Veterinär und besonders Klinikeinrichtungen ohne größere Laboranschaffungen oder einer komplizierten Aufbereitung des Probenmaterials eine qualitativ hochwertig und sensitive Thrombozytendiagnostik nun auch in der Buiatrik durchführen und die Wissenschaft auf diesem hochaktuellen Forschungsgebiet vorantreiben.

VI ZUSAMMENFASSUNG

„Multiplate®-Impedanzaggregometrie in der Buiatrik - Methodenabstimmung und Ermittlung von Referenzwerten für Kälber der Rasse Deutsches Fleckvieh“

Das Ziel dieser Arbeit war es, das Multiplate®-Thrombozytenfunktionsmessgerät in der Buiatrik zu etablieren. Dazu sollte ein standardisiertes Verfahren bezüglich Probengewinnung und Messablauf entwickelt und Referenzwerte gebildet werden. Hierfür wurde insgesamt 64 Kälbern der Rasse Fleckvieh in der Altersklasse von 8-28 Tagen in verschiedenen Ansätzen Blut entnommen. 44 Kälber dienten der Methodenabstimmung. Hierbei wurden die Plättchenagonisten ADP bei Konzentrationen von 6, 12, 18 und 30 $\mu\text{mol/l}$ und Col bei Konzentrationen von 1, 2, 3 und 5 $\mu\text{g/ml}$, wie auch der Einfluss verschiedener Messzeiten von 6 Min und 8 Min evaluiert. Ebenso wurde ein Unterschied zwischen verschiedenen Blutentnahmetechniken, wie 18 – und 17 Gauge-Kanüle, Aufziehröhrchen und Vacutainer, und einer herzwärts- und kopfwärts-Punktion der Jugularvene, überprüft. Die Ergebnisse dieser Probanden wurden zusätzlich zur Referenzwertermittlung genutzt. 20 Kälber dienten der Berechnung der Referenzintervalle. Das Probenmaterial wurde im Sinne der Methodenabstimmung in verschiedenen Ansätzen im Multiplate®-Aggregometer gemessen. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte über die Berechnung von \bar{x} , SD, VC, Unterschiedsbestimmungen und Korrelationen. Letztlich wurde 18 $\mu\text{mol/l}$ für ADP und 5 $\mu\text{g/ml}$ für Col als beste Agonistenkonzentrationen, und 6 Min als bessere Messdauer ermittelt. Als Standardverfahren der Blutabnahme wurde die Verwendung einer herzwärts punktierenden 18-Gauge-Kanüle und eines Hirudin-Aufziehröhrchens bestimmt. Es wurden jedoch keine statistischen Signifikanzen zwischen den verschiedenen Entnahmetechniken nachgewiesen. Für die Abhängigkeit der AUCs von der Thrombozytenzahl konnte nur eine geringe Korrelation festgestellt werden. Für die Berechnung der Referenzwerte wurde nach Überprüfung auf Normalverteilung und Ausreißertest, das parametrische Verfahren ($\bar{x} \pm 2 \text{ SD}$) angewandt. Dies ergab für 18 $\mu\text{mol/l}$ ADP induziertes Blut 178,39-1192,09 AU*Min ($\bar{x}=685,25$; SD=253,43) und für 5 $\mu\text{g/ml}$ Col induziertes Blut 194,25-1049,51 AU*Min ($\bar{x}=621,25$; SD=213,81). Die graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgte mittels Boxplots und Punktdiagrammen.

VII SUMMARY

„Multiplate®-impedance aggregometry in buiatrics – Establishment of a standardized procedure and determination of reference values of Simmenthal calves“

The intention of this survey was the establishment of platelet function analytics as a method in buiatrics using the Multiplate®-Analyzer. Standardized procedures of obtaining sample-material had to be developed in order to obtain data of reference. Basis of the trial were blood-samples of 64 Simmenthal-calves, aged 8-28 days divided in groups. The blood of 44 calves was used to establish the standardized procedure. The platelet agonists ADP at concentrations of 6, 12, 18 and 30 $\mu\text{mol/l}$ and Col at concentrations of 1, 2, 3 and 5 $\mu\text{g/ml}$ as well as the influence of different times of measurement of 6 and 8 min. were evaluated. The difference of various techniques of blood-sampling were examined: 17 and 18 gauge drain tubes; Draw tubes and Vacutainer; Puncturing the jugular vein in direction heart or head. The results were used in addition to the establishment of reference values. The samples of 20 calves was used to establish the standard data of reference. The sample-material was used to establish the procedure analyzed in the Multiplate®-Analyzer. The evaluation of the results took place with the calculation of \bar{X} , SD, VCs, evaluation of differences and correlations. 18 $\mu\text{mol/l}$ for ADP and 5 $\mu\text{g/ml}$ for Col were determined as best concentration of agonists and 6 min. as best time for measurement were determined. The use of 18 gauge drain tubes puncturing in direction of the heart and Hirudin-draw tubes was found to be the best blood-sampling-technique, without any statistical significance. The dependence of the AUCs from the amount of platelets could only be slightly correlated. To define the reference values after the examination of normal distribution and the Grubbs test for outliers the parametric procedure ($\bar{X} \pm 2 \text{ SD}$) was used. The result was for 18 $\mu\text{mol/l}$ ADP induced blood 178,39 - 1192,09 AU*Min ($\bar{X}=685$; $SD=253,43$) and for 5 $\mu\text{g/ml}$ Col induced blood 194,25 - 1049,51 AU*Min ($\bar{X}=621,25$; $SD=213,81$). The graphic presentation of the results was done by boxplots and scatterdiagrams.

VIII LITERATURVERZEICHNIS

- Bade S. In-vitro-Blutungstest (IVBT) mit virtueller Kapillare. Ein neues Verfahren zur Messung der primären Hämostase. Veröffentlichte Dissertation. Universitätsbibliothek Marburg 2007.
- Bauer NB, Er E, Moritz A. Influence of blood collection technique on platelet function and coagulation variables in dogs. American Journal of Veterinary Research 2011; 72: 64-72.
- Bauer NB, Er E, Moritz A. Effect of submaximal aerobic exercise on platelet function, platelet activation, and secondary and tertiary hemostasis in dogs. American Journal of Veterinary Research 2012; 73: 125-33.
- Baumgarten A, Wilhelm M, Kalbantner K, Ganter M, Mischke R. Measurement of platelet aggregation in ovine blood using a new impedance aggregometer. Veterinary Clinical Pathology 2010; 39: 149-56.
- Baumgartner W. Klinische Propädeutik der inneren Krankheiten und Hautkrankheiten der Haus-und Heimtiere. 6. Auflage Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2005; 218
- Bortz J. & Schuster C. Statistik für Human- und Sozialwissenschaftler, 7. Auflage. Springer Verlag, Berlin 2010.
- Boudreaux M, Schmutz S, French P. Calcium diacylglycerol guanine nucleotide exchange factor I (CalDAG-GEFI) gene mutations in a thrombopathic Simmental calf. Veterinary Pathology Online 2007; 44: 932-5.
- Braun S, von Beckerath S, Ellert J, Kastrati A, Schömig A, Vogt W, Sibbing D. Assessment of Platelet Function in Whole Blood by Multiple Electrode Aggregometry: Transport of Samples Using a Pneumatic Tube System. American Journal of Clinical Pathology 2009; 132: 802-803.
- Braunwald E, Angiolillo D, Bates E, Berger PB, Bhatt D, Cannon CP, Furman MI, Gurbel P, Michelson AD, Peterson E. Assessing the current role of platelet function testing. Clinical cardiology 2008; 31: I10-I6.
- Brun-Hansen HC, Kampen AH, Lund A. Hematologic values in calves during the first 6 months of life. Veterinary Clinical Pathology 2006; 35: 182-7.
- Budde U. Diagnose von Funktionsstörungen der Thrombozyten mit Hilfe der Aggregometrie. J Lab Med 2002; 26: 564-71.

- Calatzis A, Loreth R, Spannagl M. Multiplate platelet function analysis—application and interpretation. Dynabite GmbH, Munich 2006.
- Calatzis A. Vollblutverfahren zur Erfassung der primären Hämostase. LaboratoriumsMedizin 2007; 31: 239–247.
- Carcao M, Blanchette V, Dean J, He L, Kern M, Stain A, Sparling C, Stephens D, Ryan G, Freedman J. The Platelet Function Analyzer (PFA-100): a novel in-vitro system for evaluation of primary haemostasis in children. British Journal of Haematology 1998; 101: 70-3.
- Carlin A. Epidemiologische Untersuchung zur Bovinen Neonatalen Panzytopenie (BNP). Veröffentlichte Dissertation. Universitätsbibliothek München 2011.
- Cattaneo M, Hayward C, Moffat K, Pugliano M, Liu Y, Michelson A. Results of a worldwide survey on the assessment of platelet function by light transmission aggregometry: a report from the platelet physiology subcommittee of the SSC of the ISTH. Journal of Thrombosis and Haemostasis 2009; 7: 1029.
- Czura CJ, Schultz A, Kaipel M, Khadem A, Huston JM, Pavlov VA, Redl H, Tracey KJ. Vagus nerve stimulation regulates hemostasis in swine. Shock (Augusta, Ga.) 2010; 33: 608.
- Daraktchiev AT. Evaluation eines neuen Thrombelastographie-Verfahrens-ROTEM (Rotationsthrombelastographie). Veröffentlichte Dissertation. Universitätsbibliothek Marburg 2009.
- Davì G, Patrono C. Platelet activation and atherothrombosis. New England Journal of Medicine 2007; 357: 2482-94.
- Dynabite, München. Benutzerhandbuch Multiplate®-Gerät.
- Dynabite München. Internetauftritt. Adresse: www.multiplate.net. Letzter Zugriff: 08.10.2012
- Falk M, Marohn F, Tewes B. Foundations of statistical analyses and applications with SAS. Birkhäuser, Basel 2002.
- Forsythe LAT, Willis SE. Evaluating oral mucosa bleeding times in healthy dogs using a spring-loaded device. The Canadian Veterinary Journal 1989; 30: 344.
- Friedrich A, Büttner M, Rademacher G, Klee W, Weber B, Müller M, Carlin A, Assad A, Hafner-Marx A, Sauter-Louis C. Ingestion of colostrum from specific cows induces Bovine Neonatal Panzytopenia (BNP) in some calves. BMC Veterinary Research

2011; 7: 10.

Fröbert O, Christensen K, Fahlman Å, Brunberg S, Josefsson J, Särndahl E, Swenson JE, Arnemo JM. Original basic research Platelet function in brown bear (*Ursus arctos*) compared to man. *Thrombosis Journal* 2010; 8:11

George JN. Platelets. *The Lancet* 2000; 355: 1531-1539

Haas T, Fries D, Holz C, Innerhofer P, Streif W, Klingler A, Hanke A, Velik-Salchner C. Less impairment of hemostasis and reduced blood loss in pigs after resuscitation from hemorrhagic shock using the small-volume concept with hypertonic saline/hydroxyethyl starch as compared to administration of 4% gelatin or 6% hydroxyethyl starch solution. *Anesthesia & Analgesia* 2008; 106: 1078-86.

Hänecke P, Klouche M. Thrombelastography today: Practicability and analytical power. *Transfusion Medicine and Hemotherapy* 2007; 34: 421-8.

Halimeh S, de Angelis G, Sander A, Edelbusch C, Rott H, Thedieck S, Mesters R, Schlegel N, Multiplate ® Whole Blood Impedance Point of Care Aggregometry: Preliminary Reference Values in Healthy Infants, Children and Adolescents. *Klinische Pädiatrie* 2010; 222: 158– 163

Hanke A, Roberg K, Monaca E, Sellmann T, Weber C, Rahe-Meyer N, Görlinger K. Impact of platelet count on results obtained from multiple electrode platelet aggregometry (Multiplate™). *European journal of medical research* 2010; 15: 214.

Harrison P, Robinson M, Liesner R, Khair K, Cohen H, Mackie I, Machin S. The PFA-100®: a potential rapid screening tool for the assessment of platelet dysfunction. *Clinical & Laboratory Haematology* 2002; 24: 225-32.

Harrison P, Platelet function analysis. *Blood reviews* 2005; 19(2): 111-123.

Hartert H. Blutgerinnungsstudien mit der Thrombelastographie, einem neuen Untersuchungsverfahren. *Journal of Molecular Medicine* 1948; 26: 577-83.

Hayward C, Pai M, Liu Y, Moffat K, Seecharan J, Webert K, Cook R, Heddle N. Diagnostic utility of light transmission platelet aggregometry: results from a prospective study of individuals referred for bleeding disorder assessments. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2009; 7: 676-84.

Heemskerk JWM, Bevers EM, Lindhout T. Platelet activation and blood coagulation. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2002; 88: 186-94.

- Heindl F. Referenzwerte für das rote Blutbild und das Differentialblutbild neugeborener Kälber. Veröffentlichte Dissertation. Universitätsbibliothek München 2012.
- Herkommer M, Geisler T, Gawaz M. Verfahren zur Messung der Thrombozytenfunktion: pro und kontra. Kardiologie Up2date 2010; 6
- Ingerman-Wojenski C, Silver M. A quick method for screening platelet dysfunctions using the whole blood lumi-aggregometer. Journal of Thrombosis and Haemostasis 1984; 51: 154.
- Jackson SP. The growing complexity of platelet aggregation. Blood 2007; 109: 5087-5095.
- Jergens A, Turrentine M, Kraus K, Johnson G. Buccal mucosa bleeding times of healthy dogs and of dogs in various pathologic states, including thrombocytopenia, uremia, and von Willebrand's disease. American journal of veterinary research 1987; 48: 1337.
- Jurk K, Kehrel BE. Platelets: physiology and biochemistry. Seminars in Thrombosis and Hemostasis 2005; 31(4): 381-392.
- Kalbantner K, Baumgarten A, Mischke R. Measurement of platelet function in dogs using a novel impedance aggregometer. The Veterinary Journal 2010; 185: 144-51.
- Kehrel B. Blutplättchen: Biochemie und Physiologie. Hämostaseologie 2003; 23: 149-58.
- Keidel A, Mischke R. Clinical evaluation of platelet function analyzer PFA-100 in dogs. Berliner und Münchener tierärztliche Wochenschrift 1998; 111: 452.
- Klouche M. Diagnostic methods for platelet function analysis. Transfusion Medicine and Hemotherapy 2007; 34: 20-32.
- Knowles T, Edwards J, Bazeley K, Brown S, Butterworth A, Warriss P. Changes in the blood biochemical and haematological profile of neonatal calves with age. Veterinary Record 2000; 147: 593-8.
- Kol A, Borjesson DL. Application of thrombelastography/thromboelastometry to veterinary medicine. Veterinary Clinical Pathology 2010; 39: 405-16.
- Kraft W. Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin. 6. Auflage Schattauer Verlag, Stuttgart 2005.
- Kramer J. Normal hematology of cattle, sheep and goats. Schalm's veterinary hematology 2000; 5: 1075-84.
- Kulkarni S, Dopheide SM, Yap CL, Ravanat C, Freund M, Mangin P, Heel KA, Street A,

- Harper IS, Lanza F. A revised model of platelet aggregation. *Journal of Clinical Investigation* 2000; 105: 783-92.
- Kundu SK, Heilmann E, Sio R, Garcia C, Davidson R, Ostgaard R. Description of an in vitro platelet function analyzer--PFA-100. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* 1995; 2: 106-112.
- Linnemann B, Schwonberg J, Mani H, Prochnow S, Lindhoff-Laste. Standardization of light transmittance aggregometry for monitoring antiplatelet therapy: an adjustment for platelet count is not necessary. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2008; 6: 677-83.
- Loreth RM, Klose G, Loreth R, Klose G. Comparison of Two Different Blood Sample Tubes for Platelet Function Analysis with the Multiplate® System. *Transfusion Medicine and Hemotherapy* 2010; 37: 289.
- Mapletoft RJ, Schmutz SM, Searcy GP. A study of the inheritance of a bleeding disorder in Simmental cattle. *The Canadian Veterinary Journal* 2000; 41: 791.
- Marschner CB, Kristensen AT, Spodsberg EH, Wiinberg B. Evaluation of platelet aggregometry in dogs using the Multiplate platelet analyzer: impact of anticoagulant choice and assay duration. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care* 2012; 22: 107-15.
- Mohri M, Sharifi K, Eidi S. Hematology and serum biochemistry of Holstein dairy calves: Age related changes and comparison with blood composition in adults. *Research in Veterinary Science* 2007; 83: 30-9.
- Nielsen LA, Zois NE, Pedersen HD, Olsen LH, Tarnow I. Platelet function in dogs: breed differences and effect of acetylsalicylic acid administration. *Veterinary Clinical Pathology* 2007; 36: 267-73.
- Nolte I et al. A Method for Measuring Capillary Bleeding Time in Non-Anaesthetized Dogs: Prolongation of the Bleeding Time by Acetylsalicylic Acid. *Journal of Veterinary Medicine Series A* 1997; 44: 625-8.
- Offermanns S. Activation of platelet function through G protein-coupled receptors. *Circulation research* 2006; 99: 1293-304.
- Raczynski J. Retrospektive Analyse von Fällen von hämorrhagischer Diathese im Patientengut der Klinik für Wiederkäuer. Veröffentlichte Dissertation.

Universitätsbibliothek München 2011.

Reed AH, Henry RJ, Mason WB. Influence of statistical method used on the resulting estimate of normal range. *Clinical Chemistry* 1971; 17: 275-84.

Rosenberger G. Innere Medizin und Chirurgie des Rindes. 4. Auflage Paul Parey Verlag, Berlin 1970.

Scharbert G, Kalb M, Marschalek C, Kozek-Langenecker SA. The effects of test temperature and storage temperature on platelet aggregation: a whole blood in vitro study. *Anesthesia & Analgesia* 2006; 102: 1280-4.

Schulz C, Von Beckerath O, Okrojek R, Von Beckerath N, Massberg S. Platelet dysfunction and inhibition of multiple electrode platelet aggregometry caused by penicillin. *Thrombosis Journal* 2010; 8: 13.

Seyfert U, Haubelt H, Vogt A, Hellstern P. Variables influencing Multiplate (TM) whole blood impedance platelet aggregometry and turbidimetric platelet aggregation in healthy individuals. *Platelets* 2007; 18: 199-206.

Siller-Matula, , Miller I, Jolanta M., Gemeiner M, Plasenzottic R, Bayer G, Mesteri I, Fabry A, Petroczi K, Nöbauer K, Razzazi-Fazeli E, Planchon S, Renaut J, Quehenberger P, Selzer E, Jilm B, Continuous thrombin infusion leads to a bleeding phenotype in sheep. *Thrombosis Research* 2012; 130: 226–236

Simon C. Vollblutaggregation beim Hund: Vergleich der Methode nach Born mit einer errechneten Aggregation nach Thrombozytenzählung mittels konventioneller Hämatologiesysteme. Veröffentlichte Dissertation. Universitätsbibliothek Giessen 2009.

Steficek BA, Thomas JS, Baker JC, Bell TG. Hemorrhagic diathesis associated with a hereditary platelet disorder in Simmental cattle. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 1993; 5: 202.

Stöber M, Gründer H. Kreislauf. IN. Rosenberger G. Die klinische Untersuchung des Rindes. 3. Auflage Paul Parey Verlag, Berlin 1990; 3: 171-241.

Tablin F, Castro M, Leven R. Blood platelet formation in vitro. The role of the cytoskeleton in megakaryocyte fragmentation. *Journal of cell science* 1990; 97: 59-70.

Tóth O, Calatzis A, Penz S, Losonczy H, Siess W. Multiple electrode aggregometry: a new device to measure platelet aggregation in whole blood. *Journal of Thrombosis and*

Haemostasis 2006; 96: 781.

Universitätsklinikum Köln. Internetauftritt. Aufbau und Funktionsweise des PFA100®.

Adresse:

http://www.medizin.unikoeln.de/institute/kchemie/Diagnostik/Parameter/Daten/PFA/PF_Aufbau.html. Letzter Zugriff: 11. Okt. 2012.

Velik-Salchner C, Maier S, Innerhofer P, Streif W, Klingler A, Kolbitsch C, Fries D. Point-of-care whole blood impedance aggregometry versus classical light transmission aggregometry for detecting aspirin and clopidogrel: the results of a pilot study. *Anesthesia & Analgesia* 2008; 107: 1798-806.

Volker H. Biomathematik, Statistik und Dokumentation. 7. Auflage Harms Verlag Kiel 1998; 65-68.

Wagner CL, Mascelli M, Neblock D, Weisman H, Coller B, Jordan R. Analysis of GPIIb/IIIa receptor number by quantification of 7E3 binding to human platelets. *Blood* 1996; 88: 907-14.

White JG. Platelet Structure. In: Michelson AD. Platelets. 2. Auflage Elvesier Inc. 2002; 45-74.

Wiinberg B, Kristensen AT. Thromboelastography in Veterinary Medicine. Seminar of Thrombosis and Hemostasis 2010; 36(7): 747-756

Wiinberg B, Jessen LR, Tarnow I, Kristensen AT. Diagnosis and treatment of platelet hyperactivity in relation to thrombosis in dogs and cats. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care* 2012; 22: 42-58.

Würtz M, Hvas AM, Kristensen SD, Grove EL. Platelet aggregation is dependent on platelet count in patients with coronary artery disease. *Thrombosis Research* 2012; 129: 56-61.

Wuillemin WA, Gasser KM, Zeerleider SS, Lammle B. Evaluation of a Platelet Function Analyser (PFA-100®) in patients with a bleeding tendency. *Swiss medical weekly* 2002; 132: 443-8.

IX ANHANG

1 Einzelwerte

Kalb	Ohrmarken-Nr.	Alter(Tage)	Alter LW	Geschlecht	Brustumfang	ADP	Col	Thrombozahl
1	946465281	28	4	m	105,5	104,5	69,5	958
2	946465282	22	4	m	103	35	22	913
3	946465285	18	3	m	101,5	96	61,5	1143
4	946465288	8	2	m	92,5	81,5	81	1194
5	946465284	18	3	m	94,5	89,5	64,5	1099
6	946465287	15	3	w	96	26	53,5	961
7	946937250	14	2	m	93,5	70	71,5	805
8	946454834	25	4	w	96	69,5	32,5	788
9	946465286	16	3	w	89	94	80	469
10	946465283	22	4	w	93	79,5	66	1014
11	946454835	28	4	m	100,5	31	32,5	362
12	947057206	25	4	w	95	80	49,5	705
13	947057207	15	3	m	94	67,5	59,5	632
14	947057208	10	2	w	88,5	102	96	1208
15	946465382	21	3	w	93	85	73,5	914
16	946465383	21	3	w	93,5	47	38,5	1155
17	946465384	15	3	w	92,5	64	65	932
18	946465385	8	2	w	86	24	41,5	744
19	946465380	21	3	w	97	90	90	1330
20	946465381	21	3	w	95	85	68	1011
21	946465386	9	2	m	89	122,5	65,5	1111
22	946454892	12	2	m	93	65	81	1064

Daten von Kalb 1-22: Ohrmarkennummern, Alter in d, Altersgruppe in LW, Geschlecht w=wieblich / m=männlich, Brustumfang in cm, Aggregationswerte in U*Min und Thrombozytenzahl in x10³/µl

Kalb	Ohrmarken-Nr.	Alter(Tage)	Alter LW	Geschlecht	Brustumfang	ADP	Col	Thrombozahl
23	946454750	13	2	m	98	87	84	975
24	947454751	8	2	w	84	94	66	1371
25	946465041	8	2	w	88,5	48,5	52	632
26	946465039	18	3	w	94	62,5	82,5	1097
27	946465040	17	3	w	92,5	82,5	77,5	1186
28	946465037	28	4	w	100	83	58,5	807
29	947465038	23	4	m	99,5	87	103,5	761
30	946454125	8	2	w	86	35	70	863
31	946454121	8	2	w	92	50,5	78,5	560
32	946454124	8	2	m	93	54	81,5	843
33	946465289	15	3	m	94	63,5	50	1341
34	946465290	14	2	w	90	58,5	47	551
35	946454128	22	4	m	98	30	18	204
36	946454129	21	3	m	99	56	42	286
37	946689602	13	2	m	94,5	42	59,5	1081
38	946689601	13	2	m	93	77,5	66	1176
39	946689600	19	3	m	98	89	83	179
40	946689604	8	2	w	89	62	71,5	860
41	946689603	20	3	m	102	61,5	67	772
42	946689599	21	3	m	100,5	103,5	90	1146
43	946408258	9	2	w	89,5	45	66,5	901
44	946408257	21	3	w	88,5	39	54,5	851

Daten von Kalb 23-44: Ohrmarkennummern, Alter in d, Altersgruppe in LW, Geschlecht w=weiblich / m=männlich,
Brustumfang in cm, Aggregationswerte in U*Min und Thrombozytenzahl in x10³/µl

Kalb	Ohrmarken-Nr.	Alter(Tage)	Alter LW	Geschlecht	Brustumfang	ADP	Col	Thrombozahl
45	987111522	10	2	w	92,5	67	4,5	891
46	987111519	27	4	m	101,5	101	88,5	1991
47	946687175	12	2	w	91	24,5	52	945
48	946687174	20	3	m	102	53,5	68	610
49	946687173	27	4	m	101,5	83,5	83,5	1040
50	946687172	28	4	w	97	75,5	54,5	1333
51	946687171	28	4	m	99,5	86	58	970
52	946746819	16	3	m	93,5	33,5	26,5	1231
53	946746820	14	2	w	95	126,5	91,5	844
54	946746818	20	3	w	95,5	96,5	81,5	992
55	946746817	21	3	m	97	90,5	61,5	1406
56	946465301	18	3	w	95	31,5	9	488
57	946465302	10	2	m	90	54	45,5	700
58	946465300	27	4	m	104	81	75	1120
59	946465522	20	3	m	97,5	49,5	48,5	nicht auswertbar
60	946465523	20	3	w	94	84	79	627
61	946465524	12	2	w	88,5	32	72	1086
62	946465403	9	2	m	90	86,5	68	1180
63	946465402	16	3	w	97	42	26,5	256
64	946465401	18	3	m	96,5	46	60,5	178

Daten von Kalb 45-64: Ohrmarkennummern, Alter in d, Altersgruppe in LW, Geschlecht w=weiblich / m=männlich,
 Brustumfang in cm, Aggregationswerte in U*Min und Thrombozytenzahl in x10³/µl

	6 Min Messdauer				8 Min Messdauer			
	ADP				ADP			
	6 μ Mol/L	12 μ Mol/L	18 μ Mol/L	30 μ Mol/L	6 μ Mol/L	12 μ Mol/L	18 μ Mol/L	30 μ Mol/L
Kalb 1	25	70	100	112	34	81	136	176
	36	88	109	130	48	93	142	190
Kalb 2	22	28	33	31	28	47	60	61
	22	33	37	35	48	50	62	68
Kalb 3	29	72	87	86	19	83	120	122
	34	74	105	91	22	83	124	135
Kalb 4	7	63	78	82	22	72	94	111
	11	64	85	93	27	74	96	115
Kalb 5	28	92	88	99	46	119	117	156
	38	101	91	117	63	122	149	177
Kalb 6	8	22	23	24	14	14	35	47
	15	25	29	25	17	26	37	48
Kalb 7	28	53	69	74	40	62	87	109
	31	57	71	85	42	76	94	128
Kalb 8	25	45	66	56	45	61	85	84
	31	50	73	64	46	73	92	98
Kalb 9	54	69	91	92	53	111	133	114
	59	85	97	95	63	137	135	140
Kalb 10	64	89	74	83	64	144	131	132
	77	108	85	108	66	145	142	135
Kalb 11	25	28	30	31	37	38	34	44
	20	31	32	36	42	51	42	45
Kalb 12	35	54	76	67	54	96	98	98
	41	65	84	74	52	93	104	109
Kalb 13	27	64	61	76	29	66	91	116
	41	44	74	87	28	68	101	116
Kalb 14	23	88	93	112	22	53	87	123
	39	93	111	114	28	67	108	125

Einzelwerte von Kalb 1-14 in U*Min bei 6, 12, 18 und 30 μ mol/l ADP bei 6 und 8 Min Messdauer.

	18 μ Mol/L ADP		30 μ Mol/L ADP		3 μ g/ml Col		5 μ g/ml Col	
Kanüldurchmesser	18 Gauge	17 Gauge	18 Gauge	17 Gauge	18 Gauge	17 Gauge	18 Gauge	17 Gauge
Kalb 15	84	70	73	79	74	65	71	68
	86	79	82	85	79	74	76	85
Kalb 16	45	48	45	51	43	38	38	40
	49	52	45	57	46	50	39	45
Kalb 17	62	56	71	54	63	43	64	45
	66	64	80	61	66	54	66	65
Kalb 18	24	22	27	37	35	44	35	43
	24	30	34	43	40	44	48	49
Kalb 19	84	96	98	82	77	73	83	96
	96	101	99	88	80	81	97	96
Kalb 20	81	70	95	78	71	50	66	59
	89	75	95	80	73	55	70	65
Kalb 21	116	72	123	110	34	37	65	53
	129	75	124	132	47	47	66	53
Kalb 22	61	67	80	75	69	52	76	54
	69	71	83	95	75	68	86	56
Kalb 23	79	95	114	103	67	81	84	80
	95	96	115	106	77	85	84	86
Kalb 24	93	79	83	79	53	64	63	72
	95	98	85	99	71	71	69	73

Einzelwerte von Kalb 15-24 in U*Min bei 18 und 20 μ mol/l ADP, und 3 und 5 μ g/ml Col jeweils mit 18 Gauge- und 17 Gauge-Kanüle punktiert.

	18 µMol/L ADP		3 µg/ml Col		5 µg/ml Col	
	Vacutainer	Aufziehröhr.	Vacutainer	Aufziehröhr.	Vacutainer	Aufziehröhr.
Kalb 25	46	47	55	57	60	49
	55	50	59	60	65	55
Kalb 26	64	61	71	67	65	79
	67	64	73	74	65	86
Kalb 27	78	82	78	83	74	76
	86	83	92	90	92	79
Kalb 28	86	70	41	58	37	53
	87	96	53	59	49	64
Kalb 29	80	78	71	89	76	99
	82	96	93	101	84	108
Kalb 30	26	34	67	60	61	65
	28	36	77	67	65	75
Kalb 31	62	50	35	44	55	75
	66	51	48	45	56	82
Kalb 32	43	49	54	55	65	76
	57	59	70	68	65	87
Kalb 33	52	61	53	43	49	50
	72	66	55	48	57	50
Kalb 34	67	57	37	28	43	44
	72	60	47	36	56	50

Einzelwerte von Kalb 25-34 in U*Min bei 18 µmol/l ADP, und 3 und 5 µg/ml Col jeweils mit Vacutainern und Aufziehröhrchen entnommen.

	18 µMol/L ADP		3 µg/50µl Col	
	kopfwärts	herzwärts	kopfwärts	herzwärts
Kalb 35	31	28	23	16
	33	32	33	20
Kalb 36	63	55	48	41
	63	57	50	43
Kalb 37	42	42	61	59
	53	42	78	60
Kalb 38	69	77	54	66
	73	78	79	66
Kalb 39	87	82	91	81
	105	96	92	85
Kalb 40	44	62	64	69
	48	62	75	74
Kalb 41	53	54	61	66
	58	69	61	68
Kalb 42	89	101	69	86
	110	106	78	94
Kalb 43	49	41	57	59
	51	49	60	74
Kalb 44	37	38	55	54
	47	40	55	55

Einzelwerte von Kalb 35-44 in U*Min bei 18µmol/l ADP und 5 µg/ml Col jeweils kopfwärts und herzwärts punktiert.

	18 µMol/L ADP	5 µg/ml Col
Kalb 45	67	3
	67	6
Kalb 46	98	91
	104	86
Kalb 47	25	52
	24	52
Kalb 48	53	63
	54	73
Kalb 49	77	80
	90	87
Kalb 50	72	46
	79	63
Kalb 51	73	51
	99	65
Kalb 52	29	24
	38	29
Kalb 53	125	90
	128	93
Kalb 54	91	74
	102	89
Kalb 55	84	61
	97	62
Kalb 56	30	8
	33	10
Kalb 57	53	41
	55	50
Kalb 58	86	74
	76	76
Kalb 59	44	43
	55	54
Kalb 60	82	72
	86	86
Kalb 61	33	66
	31	78
Kalb 62	85	57
	88	79
Kalb 63	36	24
	48	29
Kalb 64	47	60
	45	61

Einzelwerte von Kalb 45-64 in U*Min bei 18 µmol/l ADP und 5 µg/ml Col.

2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Agonisten und deren Rezeptoren beim Menschen (JURK & KEHREL, 2005). S.8

Tabelle 2: Referenzwerte mit Median und 2,5-97,5 Quantil von AU*Min und AU beim Hund nach KALBANTNER et al. (2010). S.23

Tabelle 3: Referenzwerte mit Median und 2,5-97,5% Quantil von AU*Min und AU beim Schaf nach BAUMGARTEN (2010). S.24

Tabelle 4: Tabelle über Alters und Geschlechtsverteilung der 64 Kälber aus der Studie. S.26

Tabelle 5: Übersicht über Kälberanzahl, Identifikation (ID) und Funktion der 5 Probengruppen. S.31

Tabelle 6: Variationskoeffizienten (VC) der ermittelten AUC- Mittelwerte der Doppelansatzwerte und Variationskoeffizienten (VC) der AUCs aller einzelnen Doppelansatzeinzelwerte von den Kälbern 1-14 bei einer Messdauer von 6 und 8 Minuten, inkubiert mit 6, 12, 18 und 30 μ mol/l ADP. S.38

Tabelle 7: Variationskoeffizienten (VC) der ermittelten AUC-Mittelwerte (\bar{X}) der Doppelansatzwerte und Variationskoeffizienten (VC) der AUCs aller einzelnen Doppelansatzeinzelwerte von 10 Kälbern (ID 1-14) bei einer Messdauer von 6 und 8 Minuten, inkubiert mit 1, 2, 3 und 5 μ g/ml Kollagen. S.39

Tabelle 8: Variationskoeffizienten (VC) der ermittelten AUC-Mittelwerte (\bar{X}) der Doppelansatzwerte und Variationskoeffizienten (VC) der AUCs aller einzelnen Doppelansatzeinzelwerte von 10 Kälbern (ohne 4 Kälber mit fraglichen AUC-Werten bei einer Messdauer von 6 und 8 Minuten, inkubiert mit 6, 12, 18 und 30 μ mol/l ADP. S.39

Tabelle 9: Variationskoeffizienten (VC) der ermittelten AUC-Mittelwerte (\bar{X}) der Doppelansatzwerte und Variationskoeffizienten (VC) der AUCs aller einzelnen Doppelansatzeinzelwerte von 10 Kälbern (ohne 4 Kälber mit fraglichen AUC-Werten bei einer Messdauer von 6 und 8 Minuten, inkubiert mit 1, 2, 3 und 5 μ g/ml Kollagen. S. 39

Tabelle 10: Durchschnittliche Variationskoeffizienten (VC) der AUC-Doppelansatzeinzelwerte von Kalb 1-14. bei einer Messdauer von 6 und 8 Minuten, inkubiert mit 6, 12, 18 und 30 μ mol/l ADP sowie 1, 2, 3 und 5 μ g/ml Kollagen. S.40

Tabelle 11: Variationskoeffizienten (VC) der ermittelten AUC- Mittelwerte (\bar{X}) der Doppelansatzwerte und Variationskoeffizienten (VC) der AUCs aller einzelnen

Doppelansatzeinzelwerte von den Kälbern 15-24 von mit 17 Gauge- und 18 Gauge entnommenem und mit 6, 12, 18 und 30 $\mu\text{mol/l}$ ADP und 1, 2, 3 und 5 $\mu\text{g/ml}$ Col inkubiertem Blut. S.43

Tabelle 12: Durchschnittliche Variationskoeffizienten (VC) der AUC-Doppelansatzeinzelwerte von mit 18 Gauge- und 17 Gauge- Kanülen entnommenem Blut. S.44

Tabelle 13: Variationskoeffizienten (VC) der ermittelten AUC-Mittelwerte (\bar{X}) der Doppelansatzwerte und Variationskoeffizienten (VC) der AUCs aller einzelnen Doppelansatzeinzelwerte der Kälber 1-24, inkubiert mit 18 und 30 $\mu\text{mol/l}$ ADP und 3 und 5 $\mu\text{g/ml}$ Col. S.44

Tabelle 14: Variationskoeffizienten (VC) der ermittelten AUC-Mittelwerte (\bar{X}) der Doppelansatzwerte und Variationskoeffizienten (VC) der AUCs aller einzelnen Doppelansatzeinzelwerte von 20 Kälbern der ersten beiden Probenreihen (ohne 4 Kälber mit fraglichen Werten), inkubiert mit 18 und 30 $\mu\text{mol/l}$ ADP und 3 und 5 $\mu\text{g/ml}$ Col. S.44

Tabelle 15; Variationskoeffizienten (VC) aller durchschnittlichen AUC-Doppelansatzeinzelwerte von Kalb 1-24 sowie derselben ohne die vier Kälber mit fraglichen Ergebnissen. S.44

Tabelle 16: Variationskoeffizienten (VC) der AUC-Werte von mit Aufziehröhrchen und Vacutainern entnommenem Blut der Kälber 25-34, inkubiert mit 18 $\mu\text{mol/l}$ ADP sowie 3 und 5 $\mu\text{g/ml}$ Col. S.47

Tabelle 17: VCs der AUC-Werte der Kälber 1-34, , inkubiert mit 18 $\mu\text{mol/l}$ ADP sowie 3 und 5 $\mu\text{g/ml}$ Col.S.47

Tabelle 18: Durchschnittliche Variationskoeffizienten (VC) der AUC-Doppelansatzeinzelwerte von Kalb 25-34, beprobt mit Vacutainern und Aufziehröhrchen, inkubiert mit 18 $\mu\text{mol/l}$ ADP sowie 3 und 5 $\mu\text{g/ml}$ Col. S.47

Tabelle 19: Variationskoeffizienten (VC) der AUC-Werte der Kälber 35-44, kopfwärts und herzwärts beprobt, inkubiert mit 18 $\mu\text{mol/l}$ ADP und 5 $\mu\text{g/ml}$ Col. S.49

Tabelle 20: Durchschnittliche Variationskoeffizienten (VC) der AUC-Doppelansatzeinzelwerte von herzwärts und kopfwärts punktierter Blut der Kälber 35-44, inkubiert mit 18 $\mu\text{mol/l}$ ADP sowie 5 $\mu\text{g/ml}$ Col. S.49

Tabelle 21: Referenzbereich, Mittelwert (\bar{X}) und Standardabweichung (SD) für die Thrombozyten-Aggregation im Multiplate®, von mit 18 $\mu\text{mol/l}$ ADP und 5 $\mu\text{g/ml}$ Coll inkubiertem Hirudinblut bei 8-28 Tagen alten Kälbern. Aus den Ergebnissen von 61 Kälbern mit einer Thrombozytenzahl > 200000/ μl berechnet. S.50

3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Morphologie eines ruhenden Thrombozyten (KEHREL, 2003). S.4

Abbildung 2: Schema zur Thrombozyten-Adhäsion über Glycoproteine am Gefäßendothel mittels Kollagen und vWF (KEHREL, 2003). S.5

Abbildung 3: Beispiel einer Aggregationskurve nach Born. Ersichtlich ist die Aggregationsrate im zeitlichen Verlauf von Zugabe von 10 $\mu\text{g/ml}$ Kollagen bis Endpunkt der Aggregation (SIMON, 2009). S.11

Abbildung 4: Messprinzip eines PFA 100®. Thrombozyten adhäsieren an einer ADP/Kollagen- oder Epinephrin-Kollagen-Membran über vWF und verschließen die 150 μm große Öffnung. (<http://www.medizin.uni-koeln.de>). S.12

Abbildung 5: ROTEM-Aufbau: Stempel rotiert zu 4,75° in beide Richtungen. Aggregation wird in einem Computer berechnet und über ein Thrombelastogramm aufgezeichnet (HÄNECKE & KLOUCHE, 2007). S.14

Abbildung 6: Parameter ROTEM® und Messkurve im Thrombozytenfunktionsverlauf (DARAKTCHIEV, 2009). S.15

Abbildung 7: Multiplate®-Messgerät mit Monitor, elektronischer Pipette, verschiedenen Reagenzien und eingelegten Einwegmesszellen. (www.multiplate.net). S.17

Abbildung 8: Messzelle in Front- und Seitenansicht mit 4 Messdrähten und Rührstab (www.multiplate.net). S.18

Abbildung 9: Prinzip der Impedanz an den Sensordrähten: a) Unaktivierter Zustand der Thrombozyten – b) Aktivierung der Thrombozyten – c) Anlagerung der aktivierte Thrombozyten an die Sensordrähte und Erhöhung des elektrischen Widerstands. S.19

Abbildung 10: Graphische Darstellung der Aggregation (AU) und Velocity (RUO) zweier Sensoren einer Messzelle im Multiplate® im zeitlichen Verlauf. S.20

Abbildung 11: Schema zur Thrombzytenaktivierung durch die verschiedenen Agonisten (CALATZIS et al., 2006). S.21

Abbildung 12: Schema zur Erstellung des Entnahmesystems aus zwei Kanülen und einem Stück Infusionsschlauch. S.28

Abbildung 13: Foto eines fertigen Entnahmesystems aus 2 18 Gauge-Kanülen und einem Stück Infusionsschlauch. S.29

Abbildung 14: Anschluss der Messzellen an das Messkabel im Multiplate® (Productfolder Multiplate). S.30

Abbildung 15: Pipettieren von Hirudinblut in eine Messzelle. S.30

Abbildung 16: Verteilung der AUC-Werte in U*Min von 14 Kälbern, inkubiert mit 6, 12, 18 und 30 $\mu\text{mol/l}$ ADP bei einer Messdauer von 6 Min. In der Box (Interquartilbereich) sind Mediane dargestellt. S. 35

Abbildung 17: Verteilung der AUC-Werte in U*Min von 14 Kälbern, inkubiert mit 6, 12, 18 und 30 $\mu\text{mol/l}$ ADP bei einer Messdauer von 8 Min. In der Box (Interquartilbereich) sind Mediane dargestellt. S.36

Abbildung 18: Verteilung der AUC-Werte in U*Min von 14 Kälbern, inkubiert mit 1, 2, 3 und 5 $\mu\text{g/ml}$ Col bei einer Messdauer von 6 Min. In der Box (Interquartilbereich) sind Mediane dargestellt. S.37

Abbildung 19: Verteilung der AUC-Werte in U*Min von 14 Kälbern, inkubiert mit 1, 2, 3 und 5 $\mu\text{g/ml}$ Col bei einer Messdauer von 8 Min. In der Box (Interquartilbereich) sind Mediane dargestellt. S.38

Abbildung 20: Verteilung der AUC-Werte in U*Min von 10 Kälbern, inkubiert mit 18 und 30 $\mu\text{mol/l}$ ADP von über 18 Gauge- und 17 Gauge-Kanülen gewonnenem Blut. In der Box (Interquartilbereich) sind Mediane dargestellt. S.42

Abbildung 21: Verteilung der AUC-Werte in U*Min von 10 Kälbern von über 18 Gauge- und 17 Gauge-Kanülen gewonnenem Blut, inkubiert mit 3 und 5 $\mu\text{g/ml}$ Col. In der Box (Interquartilbereich) sind Mediane dargestellt. S.43

Abbildung 22: Verteilung der AUC-Werte in U*Min von 10 Kälbern, mit Vacutainer und Aufziehröhrchen beprobt, inkubiert mit 18 $\mu\text{mol/l}$ ADP, und 3 und 5 $\mu\text{g/ml}$ Col. In der Box (Interquartilbereich) sind Mediane dargestellt. S.45

Abbildung 23: Verteilung der AUC-Werte in U*Min von Kalb 1-34, inkubiert mit 18 $\mu\text{mol/l}$ ADP, und 3 und 5 $\mu\text{g/ml}$ Col. In der Box (Interquartilbereich) sind Mediane dargestellt. S.46

Abbildung 24: Verteilung der AUC-Werte in U*Min von Kalb 35-44, kopfwärts und herzwärts beprobt, inkubiert mit 18 $\mu\text{mol/l}$ ADP und 5 $\mu\text{g/ml}$ Col. In der Box (Interquartilbereich) sind Mediane dargestellt. S.48

Abbildung 25: Verteilung der AUC-Werte in U*Min von 61 Kälbern mit einer Thrombozytenzahl $>200000/\mu\text{l}$, inkubiert mit 18 $\mu\text{mol/l}$ ADP und 5 $\mu\text{g/ml}$ Col. In der Box (Interquartilbereich) sind Mediane dargestellt. S.50

Abbildung 26: Verteilung der AUC-Werte in U*Min von 29 männlichen und 32 weiblichen Kälbern (Thrombozytenzahl $>200000/\mu\text{l}$), inkubiert mit 18 $\mu\text{mol/l}$ ADP. In der Box (Interquartilbereich) sind Mediane dargestellt. S.51

Abbildung 27: Verteilung der AUC-Werte in U*Min von 29 männlichen und 32 weiblichen Kälbern (Thrombozytenzahl $>200000/\mu\text{l}$), inkubiert mit 5 $\mu\text{g/ml}$ Col. In der Box (Interquartilbereich) sind Mediane dargestellt. S.52

Abbildung 28: Verteilung der AUC-Werte in U*Min von 23 Kälbern in der zweiten Lebenswoche, 24 Kälbern in der dritten Lebenswoche und 14 Kälber in der vierten Lebenswoche, inkubiert mit 18 $\mu\text{mol/l}$ ADP. In der Box (Interquartilbereich) sind Mediane dargestellt. S.53

Abbildung 29: Verteilung der AUC-Werte in U*Min von 23 Kälbern in der zweiten Lebenswoche, 24 Kälbern in der dritten Lebenswoche und 14 Kälber in der vierten Lebenswoche, inkubiert mit 5 $\mu\text{g/ml}$ Col. In der Box (Interquartilbereich) sind Mediane dargestellt. S.54

Abbildung 30: Punktdiagramm mit Trendlinie für die AUC-Werte in U*Min in Abhängigkeit von Thrombozytenzahl bei 63 Kälbern, inkubiert mit 18 $\mu\text{mol/l}$ ADP. Die vertikale Linie stellt den unteren Referenzbereich der Thrombozytenzahl von 200000/ml dar. S.55

Abbildung 31: Punktdiagramm mit Trendlinie für die AUC-Werte in U*Min in Abhängigkeit von Thrombozytenzahl bei 61 Kälbern, inkubiert mit 5 $\mu\text{g/ml}$ Col. Die vertikale Linie stellt den unteren Referenzbereich der Thrombozytenzahl von 200000/ml dar. S.56

Abbildung 32: Punktdiagramm mit Trendlinie für AUC-Werte in U*Min in Abhängigkeit zu Lebenstagen bei 61 Kälbern, inkubiert mit 18 $\mu\text{mol/l}$ ADP. S.57

Abbildung 33: Punktdiagramm mit Trendlinie für AUC-Werte in U*Min in Abhängigkeit zu Lebenstagen bei 61 Kälbern, inkubiert mit 5 µg/ml Col. S.58

X DANKSAGUNG

Frau Prof. Dr. Gabriela Knubben Schweizer danke ich für die Überlassung des Themas, der Flexibilität bei der Gestaltung und Durchführung, und das mir entgegengebrachte Vertrauen.

Frau Dr. Annette Pfitzner und *Frau Dr. Carola Sauter Louis* danke ich für die nette Betreuung. Besonders möchte ich hervorheben, dass sie immer ein offenes Ohr für meine Wünsche und Anregungen hatten. Ebenso danke ich für die zügigen Korrekturarbeiten aller Arbeitsschritte, weshalb in dieser Dissertation nie das Gefühl der Zeitnot aufkam.

Den Mitarbeitern des Kliniklabors danke ich für die Erstellung der Blutparameter und der Nachsicht bei manch schlecht verpackten Sendungen.

Frederike Reichmann danke ich für die Einarbeitung am Multiplate®-Gerät.

Frau Eisgruber sei für die Kurierdienste zwischen Oberschleißheim und Gars a. Inn gedankt.

Besonders zu Dank verpflichtet bin ich allen Landwirten, die ihre Tiere zur Verfügung gestellt haben.

Meinen Arbeitgebern *Dr. Johann Höcketstaller* und *Dr. Ulrich Schneider* gilt mein Dank für die flexible Dienstplangestaltung und der Möglichkeit, im Praxisalltag meine Messungen vorzunehmen, wodurch die zügige Durchführung ermöglicht wurde.

Bei meiner Frau *Vanessa Huber* und meinen Eltern *Johann* und *Sabine Huber* möchte ich mich für die Rücksichtnahme in der Durchführung, die tätige Unterstützung und die Diskussionsbereitschaft bedanken. Meinen Brüdern danke ich für die Hilfe bei der Blutabnahme der Kälber.
