

ICS 11.100.30

Fachbericht – Thrombozytendiagnostik

Technical Report –
Thrombocyte diagnostics

Rapport Technique –
Diagnostic de thrombocyte

Zur Erstellung einer DIN SPEC können verschiedene Verfahrensweisen herangezogen werden:
Das vorliegende Dokument wurde nach den Verfahrensregeln eines Fachberichts erstellt.

Gesamtumfang 27 Seiten

Normenausschuss Medizin (NAMed) im DIN

Inhalt

	Seite
Vorwort	3
1 Anwendungsbereich	4
2 Symbole und Abkürzungen	4
3 Präanalytik in der Thrombozytenfunktionsdiagnostik.....	5
3.1 Vorbereitung des Patienten für die Thrombozytenfunktionsdiagnostik.....	5
3.2 Blutabnahme	5
3.2.1 Lichttransmissionaggregometrie nach Born (LTA)	5
3.2.2 Mehrfach-Elektroden-Aggregometrie (MEA) und Impedanzaggregometrie	6
3.2.3 Platelet Function Analyzer (PFA-Systeme)	6
3.3 Bestimmung der Thrombozytenanzahl und des Hämatokrits	6
3.4 Probentransport.....	6
3.5 Probenvorbereitung.....	6
3.5.1 Lichttransmissionaggregometrie nach Born (LTA)	6
3.5.2 Impedanzaggregometrie	7
3.5.3 PFA-Systeme.....	7
3.6 Referenzbereich	7
4 Aktivierungswege für die Thrombozytenfunktionsdiagnostik.....	8
5 Aggregationsverfahren	9
5.1 Lichttransmissionaggregometrie nach Born (LTA)	9
5.1.1 Allgemeines	9
5.1.2 Messprinzip	9
5.1.3 Benötigte Geräte, Materialien und Reagenzien	9
5.1.4 Probenvorbereitung.....	9
5.1.5 Durchführung	9
5.1.6 Interpretation	10
5.1.7 Qualitätskontrolle	15
5.2 Aggregationsverfahren — Impedanzaggregation nach Cardinal und Mehrfach Elektroden Aggregometrie (MEA)	15
5.2.1 Allgemeines	15
5.2.2 Messprinzip	15
6 Das PFA-System	19
6.1 Allgemeines	19
6.2 Durchführung	19
6.3 Interpretation der Ergebnisse.....	20
6.3.1 Erwartete Ergebnisse	20
6.3.2 Referenzbereiche und Entscheidungsgrenzen	21
6.4 Klinische Anwendungen der PFA-Messzellen	22
6.5 Qualitätskontrolle	22
7 Interferenzen	22
7.1 Allgemeines	22
7.2 Methodenspezifische Störgrößen	23
7.2.1 LTA	23
7.2.2 Impedanzaggregometrie	23
7.2.3 PFA-Systeme	23
Literaturhinweise	24

Vorwort

Dieses Dokument (DIN SPEC 58961) wurde vom Arbeitsausschuss NA 063-03-05 AA „Hämostaseologie“ im Normenausschuss Medizin (NAMed) im DIN Deutsches Institut für Normung e. V. im Fachberichtverfahren erarbeitet.

Es wird auf die Möglichkeit hingewiesen, dass einige Elemente dieses Dokuments Patentrechte berühren können. Das DIN ist nicht dafür verantwortlich, einige oder alle diesbezüglichen Patentrechte zu identifizieren.

Die Anzahl und Funktion der Thrombozyten sind mit entscheidend für die Hämostase, d. h. das Verschließen von Gefäßverletzungen. Zudem besitzen die Thrombozyten eine wichtige Rolle in der Pathogenese arterieller Gefäßverschlüsse. Thrombozytenfunktionshemmer gehören wegen der epidemiologischen Bedeutung dieser Gefäßverschlüsse zu den am häufigsten eingesetzten Medikationen.

Zielsetzung der Thrombozytenfunktionsdiagnostik ist die Messung einer verminderten, normalen oder gesteigerten Thrombozytenfunktion. Hier stehen im Vordergrund:

- Nachweis oder Ausschluss von Störungen der Thrombozytenfunktion im Sinne einer Blutungsneigung oder einer gesteigerten Aggregation;
- Nachweis oder Ausschluss einer Krankheits- oder Medikamenten-induzierten Thrombozytenfunktionsstörung, vor allem bei Erkrankungen der Organsysteme Leber, Niere sowie Knochenmark. Substanzen und Arzneimittel mit thrombozytenhemmenden Nebenwirkungen sind zum Beispiel nicht-steroidale Antirheumatika, bestimmte Psychopharmaka, Antihypertensiva und Antibiotika sowie verschiedene Nahrungsergänzungsmittel;
- Kontrolle der korrekten Wirkung thrombozytenfunktionshemmender Medikationen;
- funktionelle Beurteilung des VWF als wesentlicher Komponente der primären Hämostase.

In diesem Dokument werden die folgenden Verfahren zur Thrombozytenfunktionsdiagnostik beschrieben:

- Lichttransmissionaggregometrie nach Born (LTA);
- Impedanzaggregometrie nach Cardinal;
- Mehrfachelektrodenaggregometrie (MEA);
- PFA-Systeme (PFA-100, PFA-200).

Die verschiedenen Methoden der Thrombozytenfunktionsdiagnostik sind untereinander nicht standardisiert. Verwendete Ergebnisse, Referenzbereiche bzw. therapeutische Bereiche sollten im Vorfeld mit weitgehend übereinstimmenden präanalytischen und analytischen Verfahren bestimmt worden sein. Insbesondere können Erkenntnisse (Studiendaten, klinische Erfahrung, Arbeitsgruppenempfehlungen, Leitlinien), die mit einem Messprinzip gesammelt wurden, nicht ohne Prüfung zwischen verschiedenen Gerätesystemen übertragen werden. Für die Analyse sollten etablierte Reagenz-Gerätesystem-Kombinationen verwendet werden.

1 Anwendungsbereich

Die Zielsetzung dieses Fachberichts ist die Beschreibung von Methoden zur Thrombozytenfunktionsanalyse in klinischen Laboratorien. Hier wird die Gesamtheit, sofern möglich und bekannt, der Aspekte der Analyse der Präanalytik, Probenbehandlung, Reagenzienvorbereitung, Testdurchführung und klinischen Anwendung beschrieben.

Methoden, die vornehmlich zu Forschungszwecken eingesetzt werden, sowie Methoden, die in klinischen Laboratorien nicht oder selten eingesetzt werden, werden hier nicht behandelt.

2 Symbole und Abkürzungen

Tabelle 1 — Symbole und Abkürzungen

ADP	Adenosin-5'-diphosphat
ArA	Arachidonsäure
ASS	Acetylsalicylsäure
AUC	Fläche unter der Aggregationskurve (en: „area under the curve“)
BAPA	Benzylsulfonyl-D-Arg-Pro-4-Amidinobenzylamid
cAMP	Zyklisches Adenosin-5'-Monophosphat
DDAVP	1-Desamino-8-D-Arginin Vasopressin
EIA	Elektrische Impedanzaggregometrie
EPI	Epinephrin
GpIb-Rezeptor	Thrombozytärer Glycoprotein Ib-Rezeptor
GP-IIb/IIIa-Rezeptor	Thrombozytärer Glycoprotein IIb/IIIa-Rezeptor
KOL	Kollagen
LTA	Lichttransmissionsaggregometrie nach Born
MEA	Mehrfach-Elektroden-Aggregometrie
NSAR	Nichtsteroidale Antirheumatika
P2Y12-Rezeptor	Thrombozytärer ADP-Rezeptor
P2Y1-Rezeptor	Thrombozytärer ADP-Rezeptor
PAR-1 Rezeptor	Thrombozytärer Rezeptor
PFA	Platelet Function Analyzer
PGE1	Prostaglandin E1
PPP	Plättchenarmes Plasma
PRP	Plättchenreiches Plasma
TRAP-6	Thrombinrezeptoraktivator für Peptid 6 (en: Thrombin Receptor Activator for Peptide 6)
VK	Variationskoeffizient
VWF	von Willebrand Faktor
VWS	von Willebrand Syndrom
VZ	Verschlusszeit

3 Präanalytik in der Thrombozytenfunktionsdiagnostik

3.1 Vorbereitung des Patienten für die Thrombozytenfunktionsdiagnostik

Die Thrombozytenfunktionsdiagnostik kann durch eine Vielzahl von endogenen (patienteneigenen) und exogenen Faktoren (Blutabnahme, Transport, Lagerung, Aufbereitung der Probe) beeinflusst werden.

Vor der Blutabnahme für die Thrombozytenfunktionsdiagnostik sind je nach Fragestellung folgende Punkte zu erfragen:

- Hämorrhagische Diathese in der Eigen- und Familienanamnese;
- Erkrankungen, insbesondere Diabetes mellitus, cerebrovaskuläre Erkrankungen, Niereninsuffizienz, myeloproliferative Erkrankungen;
- Medikamenteneinnahme, insbesondere Thrombozytenaggregationshemmer, Antikoagulantien, NSAR, Phosphodiesterasehemmer, Desmopressin, Antibiotika, Chemotherapeutika, Plasma-expander, darüber hinaus sollte die Einnahme von Naturheilprodukten und die Gabe von Röntgenkontrastmitteln erfasst werden;
- Alkohol-, Nikotinkonsum;
- bei der Beurteilung des Effekts von Thrombozytenaggregationshemmern müssen Medikamente erfasst werden, die durch Wechselwirkungen den Effekt von Thrombozytenaggregationshemmern beeinträchtigen können (Beispiel: Protonenpumpenhemmer bei der Einnahme von Clopidogrel).

Der Patient sollte nach Möglichkeit sportliche Betätigung über 24 h vor Blutabnahme vermeiden. Belastungsuntersuchungen (z. B. Fahrradergometrie) dürfen nicht vor der Blutabnahme durchgeführt werden, da es durch sportliche Betätigung zu einer Erhöhung der Thrombozytenaggregation auf Adenosin-5'-diphosphat (ADP) und Epinephrin (EPI) sowie des von Willebrand Faktors (VWK) kommen kann [1]. Der Patient muss auf Alkoholkonsum und stark fetthaltige Mahlzeiten vor der Blutabnahme verzichten. Falls nicht der thrombozyteninhibierende Effekt von Medikamenten untersucht wird, muss der Patient, wenn aus klinischer Sicht vertretbar, 14 Tage auf die Einnahme von Medikamenten, die die Thrombozytenfunktion beeinträchtigen (z. B. NSAR) verzichten [2].

3.2 Blutabnahme

Die Blutabnahme erfolgt venös in sitzender oder liegender Position des Patienten. Der Staudruck sollte zwischen systolischem und diastolischem Druck liegen und wird nach erfolgreicher Punktion der Vene gelöst. Die Größe der Punktionsnadel muss 19 Gauge bis 21 Gauge betragen [2]. Dabei können sowohl Butterfly-Systeme als auch Nadeln verwendet werden [3]. Ein starker Sog sollte vermieden werden, damit keine Thrombozytenaktivierung bzw. Hämolyse erfolgt. Es müssen für die Thrombozytendiagnostik geeignete Abnahmesysteme verwendet werden. Der Inhalt des ersten Abnahmeröhrchens sollte nach Möglichkeit nicht für die Thrombozytendiagnostik verwendet werden. Unterfüllte, geronnene oder hämolytische Proben sind zu verwerfen. Die Art des verwendeten Antikoagulans im Blutabnahmeröhrchen ist abhängig von der Thrombozytenfunktionsdiagnostik, die zur Anwendung kommt (Lichttransmissionaggregometrie nach Born (LTA), Impedanzaggregometrie, PFA-Systeme).

3.2.1 Lichttransmissionaggregometrie nach Born (LTA)

Bei der Lichttransmissionaggregometrie nach Born (LTA) liegen die meisten Erfahrungen mit citratantikoagulierte Blut vor. Die Blutentnahme erfolgt hierfür unter Verwendung von Blutentnahmeröhrchen unter Vorlage von einem Volumenanteil steriler Trinatriumcitratlösung ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) = 0,109 M (3,2 %) auf neun Volumenanteile Venenblut. Blut und Antikoagulans sind unmittelbar nach der Entnahme ohne Schaumbildung durch 3- bis 6-maliges Kippen gut zu mischen. Allerdings ist die Verwendung von Citrat als Antikoagulans nicht optimal, da die Thrombozytenaggregation durch die unphysiologisch niedrige Calcium-Konzentration beeinträchtigt wird; beispielsweise wird die Thrombozytenreaktion auf ADP verstärkt [4], [5]. Da die Thrombinbildung nach Blutabnahme durch Citrat nicht vollständig inhibiert wird und die Thrombozytenlebensfähigkeit in Citrat-antikoagulierte Blut vermindert ist, muss die Thrombozytenfunktionsmessung in Citrat-antikoagulierte Blut innerhalb von 4 h erfolgen, um Falschmessungen zu vermeiden. Die Limitationen von Citrat als Antikoagulans haben zur Untersuchung weiterer Antikoagulantien in der Thrombozytenfunktionsdiagnostik geführt. Dabei zeigen vor allem Hirudin und Benzylsulfonyl-D-Arg-Pro-4-Amidinobenzylamide (BAPA) Vorteile gegenüber der Antikoagulation mit Citrat [6], [7].

Rekombinantes Hirudin beeinträchtigt die Calcium-Konzentration der Blutprobe nicht. Allerdings wird die Thrombinbildung nach Blutabnahme durch Hirudin, auch in hohen Konzentrationen, nicht vollständig gehemmt, so dass mit einer Thrombin-induzierten Thrombozytenaktivierung bei Lagerung der Probe zu rechnen ist [6].

3.2.2 Mehrfach-Elektroden-Aggregometrie (MEA) und Impedanzaggregometrie

Für die MEA mit dem Multiplate-System, Dynabyte, München¹⁾ erfolgt die Blutabnahme unter Verwendung von Blutentnahmeröhrchen unter Vorlage von einem Volumenanteil Hirudin (15 µg/ml bis 35 µg/ml) auf neun Volumenanteile Venenblut [2]. Für die Impedanzaggregometrie wird die Verwendung von 0,109 M Citrat-antikoagulierte Blut (3,2 %, siehe 4.2.1) empfohlen [2].

3.2.3 Platelet Function Analyzer (PFA-Systeme)

Das Blut sollte direkt in ein Kunststoff- oder silikonisiertes Vakuumglasröhrchen oder eine Spritze mit 3,8 % (0,129 M) oder 3,2 % (0,109 M) gepuffertem Natriumcitrat abgenommen werden (1 Teil Antikoagulans auf 9 Teile Blut), wobei die Verwendung von 3,8 % gepuffertem Natriumcitrat favorisiert wird. Der Gebrauch von ungepuffertem Natriumcitrat als Antikoagulans wird nicht empfohlen.

3.3 Bestimmung der Thrombozytenanzahl und des Hämatokrits

Zur Beurteilung der Thrombozytenfunktion sollte die aktuelle Thrombozytenanzahl und der Hämatokrit bekannt sein. Die Thrombozytenanzahl muss für die Lichttransmissionaggregometrie nach Born (LTA) und Impedanzaggregometrie mindestens 100 /nl betragen.

In der klinischen Diagnostik ist auch eine niedrigere Thrombozytenanzahl akzeptabel, dabei ist nur eine qualitative Aussage möglich.

Die Verschlusszeiten im PFA-System verlängern sich nach Packungsbeilage bei einer Thrombozytenanzahl < 100 /nl und sind in der Regel bei einer Thrombozytenanzahl < 50 /nl pathologisch verlängert. Bei einem Hämatokrit < 30 % und > 50 % ist ebenfalls mit abnormalen Verschlusszeiten im PFA-System zu rechnen [2], [8].

3.4 Probentransport

Der Transport sollte bei Raumtemperatur erfolgen, wobei die tolerierbaren Zeiten je nach Methode variieren. Die Probe sollte dabei möglichst wenig Agitation ausgesetzt werden. Der Transport per Boten ist wünschenswert. Rohrpostanlagen dürfen verwendet werden, wenn im Einzelfall durch Vergleichsmessungen nachgewiesen wird, dass die Thrombozytenfunktion durch den Transport in der Rohrpostanlage nicht beeinträchtigt wird. Der Transport darf nicht unter Kühlung erfolgen, da es bei Kälte zur Veränderung der Thrombozytenfunktion kommen kann.

3.5 Probenvorbereitung

3.5.1 Lichttransmissionaggregometrie nach Born (LTA)

Nach der Blutabnahme muss die Blutprobe (30 min bis 60 min) bei Raumtemperatur (Vorzugsweise zwischen 20 °C bis 25 °C) ruhen. Danach erfolgt zur Herstellung von plättchenreichem Plasma (PRP) die Zentrifugation bei Raumtemperatur ohne Bremse mit 170 g für 15 min. Alternative Zentrifugationsprotokolle sind möglich (100 g bis 200 g für 5 min bis 15 min) [2]. Mit Hilfe von Kunststoffpipetten wird das PRP in Kunststoff-Reagenzröhrchen transferiert, die Thrombozytenanzahl wird im Zellzähler gemessen und dokumentiert. Eine Verdünnung auf eine bestimmte Thrombozytenanzahl im PRP ist bei Konzentrationen von > 800 /nl eher ungünstig und wird nicht mehr empfohlen. Zur Herstellung von PPP wird die nach Entnahme des PRP verbleibende Blutprobe bei 1 500 g bis 2 000 g für 10 min bis 15 min bei Raumtemperatur zentrifugiert.

1) Das Multiplate-System der Dynabyte-Informationssysteme GmbH, München ist ein Beispiel für ein geeignetes handelsübliches Produkt. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieses Fachberichtes und bedeutet keine Anerkennung dieses genannten Produktes durch das DIN.

Alternative Zentrifugationsprotokolle sind möglich über eine PDQ^{TM2}) mikroprozessor-gesteuerte Hochgeschwindigkeits-Tischzentrifuge zur schnellen Trennung von Blut (Rotor mit 30° Winkel und 4 440 g für 120 s) Die Thrombozytenanzahl im PPP muss < 10/nl betragen, was durch Messung im Zellzähler bestätigt und dokumentiert werden muss. Zur Vermeidung von pH-Veränderungen sollten PRP und PPP bis zur Messung im verschlossenen Röhrchen bei Raumtemperatur aufbewahrt werden [2]. Bei unverschlossenen Röhrchen kann der pH-Wert durch CO₂-Diffusion vom Plasma in die Umgebung ansteigen. Verschiebungen des pH-Werts beeinträchtigen die Thrombozytenfunktion [2]. Bei einer Thrombozytenanzahl < 100 /nl im PRP oder bei stark lipämischen oder stark ikterischen Plasmen kann die Lichttransmissionaggregometrie nicht oder bei einigen Geräten nur unter Anwendung spezieller Korrekturmaßnahmen durchgeführt werden (elektronische Korrektur der Eigentrübung der Probe). Die Messungen müssen innerhalb von 4 h nach Blutabnahme abgeschlossen sein.

3.5.2 Impedanzaggregometrie

Bei der Impedanzaggregometrie wird als Probenmaterial Blut verwendet. Zur Vermeidung von pH Wert-Veränderungen müssen die Blutabnahmeröhrchen bis unmittelbar vor der Messung verschlossen bei Raumtemperatur gelagert werden. Vor der Messung wird die Blutprobe durch mehrmaliges Schwenken des Röhrchens noch einmal gemischt. Die Messungen müssen innerhalb von 3 h abgeschlossen sein [9], [10].

3.5.3 PFA-Systeme

Die PFA-Messung erfolgt im Blut. Das Citrat-antikoagulierte Blut muss 10 min vor der Messung ruhen und wird unmittelbar vor der Messung durch mehrmaliges Schwenken noch einmal vorsichtig gemischt. Die Messung muss innerhalb von 4 h nach der Blutabnahme abgeschlossen sein.

3.6 Referenzbereich

Für alle Agonisten und Agonistenkonzentrationen, die bei der Thrombozytenfunktionstestung eingesetzt werden, müssen Referenzbereiche ermittelt werden, die auf einem Kollektiv von mindestens 120 Personen basieren. Für die Reagenzien werden in der Regel Referenzbereiche der Hersteller angegeben. Jedes Labor ist jedoch gehalten, den Referenzbereich für das eigene Labor zu überprüfen. Hierfür sollte eine Mindestanzahl von 40 gesunden Personen mit jedem verwendeten Agonisten und mit jeder Agonistenkonzentration untersucht werden [2], [11], [12].

Das Kollektiv für die Referenzbereichserstellung muss aus Männern und Frauen bestehen und folgende Eigenschaften erfüllen:

- keine Einnahme von Medikamenten, die die Thrombozytenfunktion beeinträchtigen, über einen Zeitraum von mindestens 10 bis 14 Tagen;
- keine hämorrhagische Diathese in der Eigen- oder Familienanamnese;
- keine Thrombophilie in der Eigen- oder Familienanamnese;
- keine Erkrankung, die die Thrombozytenanzahl oder Thrombozytenfunktion beeinflussen könnte, insbesondere keine hämatologische Erkrankung, kein Diabetes mellitus, keine Niereninsuffizienz, keine Erkrankung, die mit einer Akut-Phase-Reaktion einhergeht;
- keine Schwangerschaft.

Bisherige Erfahrungen zeigen, dass ab einem Lebensalter von 1 Jahr das Alter keinen signifikanten Einfluss auf die Referenzbereiche von Thrombozytenfunktionstests hat. Zu beachten ist, dass Frühgeborene in der LTA ein Reaktionsmuster wie bei einer Glanzmann-Thrombasthenie zeigen.

Bei Änderung von Testbedingungen, z. B. Reagenz- oder Gerätewechsel, ist der laborspezifische Referenzbereich zu überprüfen.

Für die Ermittlung eines klinischen Grenzwertes sind entsprechende Endpunktstudien notwendig.

2) PDQTM ist ein Beispiel für ein geeignetes handelsübliches Produkt. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieses Fachberichtes und bedeutet keine Anerkennung dieses genannten Produktes durch das DIN.

4 Aktivierungswege für die Thrombozytenfunktionsdiagnostik

Verbreitete Induktoren für die Thrombozytenfunktionsdiagnostik sind die Aktivatoren ADP, ArA, KOL, EPI, Ristocetin und TRAP-6 sowie der Inhibitor PGE1.

ADP aktiviert die Thrombozyten über zwei Rezeptoren (P2Y₁₂ und P2Y₁), wobei der P2Y₁₂-Rezeptor der physiologisch wichtigere zu sein scheint, und ebenfalls das pharmakologische Ziel der klinisch eingesetzten ADP-Rezeptor-Antagonisten wie z. B. Clopidogrel, Prasugrel und Ticagrelor darstellt. ADP wird für die Lichttransmissionaggregometrie nach Born (LTA) in Konzentrationen von 1 µM bis 20 µM eingesetzt. Für die Impedanzaggregometrie und MEA wird ADP in der Regel in Konzentrationen von 5 µM bis 10 µM eingesetzt (MEA 6,4 µM). In der KOL/ADP Messzelle für die PFA-Systeme werden 50 µg ADP und in der PFA P2Y Messzelle 20 µg ADP eingesetzt. Die ADP-induzierte Aggregometrie wird für das Monitoring von ADP-Rezeptor-Antagonisten genutzt, aber auch in der Evaluation von Thrombozytenfunktionsstörungen. Bei Verwendung von Citratblut ist dieser Aktivierungsweg auch sensitiv für die Wirkung von Zykllooxygenase-Hemmern, welches auf einer artifiziellen Steigerung der Sekretion durch den Kalzium-Entzug resultiert. Für das Monitoring von Acetylsalicylsäure (ASS) wird jedoch in der Regel die spezifischere ArA-induzierte Aggregation empfohlen.

Arachidonsäure ist das Substrat der Zykllooxygenase und wird von diesem Enzym zu Thromboxan A₂, einem potenten Thrombozytenaktivator, umgewandelt. ArA hat selber keine thrombozytenaktivierende Eigenschaften. ArA wird in der Lichttransmissionaggregometrie nach Born (LTA), Impedanzaggregometrie und MEA in Konzentrationen von 0,5 mM oder 1 mM eingesetzt. Durch die hohe Sensitivität und vergleichbar hohe Spezifität für die Wirkung von ASS und anderen Zykllooxygenase-Hemmern wird die Zykllooxygenase-induzierte Aggregometrie von vielen Autoren als Methode der Wahl zum Monitoring der ASS-Wirkung angesehen.

Kollagen aktiviert die Thrombozyten über die KOLrezeptoren. Gerade bei niedrigeren Konzentrationen von KOL, ist zu einer vollständigen Aktivierung der Thrombozyten eine Verstärkung der Reaktion durch endogen freigesetztes Thromboxan A₂ erforderlich. Durch diesen Mechanismus ist die KOL-induzierte Aggregation in der Regel durch ASS hemmbar. Unterschiedliche kommerziell verfügbare KOL-Präparationen unterscheiden sich in ihrer Herkunft (z. B. Pferdesehne, Rinderhaut), der Verarbeitung der Präparationen und in ihrer Potenz. Konzentrationsangaben von KOL sind insofern nicht von einer Präparation zur anderen übertragbar. Typisch eingesetzte Konzentrationen für die LTA, Impedanzaggregometrie betragen 1 µg/ml bis 5 µg/ml (in Einzelfällen bis zu 190 µg/ml). Für die MEA werden in der Regel 3,2 µg/ml verwendet. Die PFA-Messzellen KOL/EPI und KOL/ADP enthalten jeweils 2 µg KOL Typ I.

Epinephrin stimuliert die Thrombozyten über EPI-Rezeptoren. Diese Aktivierung ist vergleichsweise schwach und wird zum Teil in Kombination mit anderen Aktivatoren wie ADP oder KOL (PFA-Systeme) verwendet. Die Aktivierung durch EPI ist mittels ASS hemmbar. In der Impedanzaggregometrie sowie MEA findet dieser Aktivator kaum Anwendung, weil die Stimulation eben sehr schwach ist.

Ristocetin bildet Komplexe mit dem VWF aus der Probe, welche – anders als der native VWF - an den thrombozytären GPIb-Rezeptor binden können. Es kommt hierdurch zu einer GPIb-VWF-vermittelten Aggregation der Thrombozyten, sowie auch zu einer weitergehenden Aktivierung der Thrombozyten inklusive Exposition von GPIIb/IIIa-Rezeptoren an der Thrombozytenoberfläche. Ristocetin wird eingesetzt zur Untersuchung von Störungen des VWF. Um einen Mangel oder eine verminderte Funktion des VWF zu erfassen, werden in der Regel Konzentrationen von 0,7 mg/ml bis 1 mg/ml verwendet (MEA: 0,77 mg/ml). Für eine Detektion eines VWS Typ 2b werden geringe Konzentrationen von Ristocetin eingesetzt (0,2 mg/ml). Bei diesem Syndrom liegt eine erhöhte Adhäsivität des VWF vor. Bei diesen geringen Konzentrationen von Ristocetin findet sich beim Gesunden oder bei Patienten mit anderen Formen des VWS keine bzw. nur eine schwache Aggregation, wobei Proben von Patienten mit VWS Typ 2b eine ausgeprägte Aggregation zeigen.

TRAP-6 ist ein Hexapeptid, welches den thrombozytären PAR-1 Rezeptor (Protease-aktivierter-Rezeptor) stimuliert. TRAP-6 hat eine Sequenzhomologie mit einem Peptid, welches von Thrombin vom PAR-1-Rezeptor abgespalten wird und diesen anschließend stimuliert. Die Thrombozytenaktivierung durch TRAP-6 wird in der Regel durch ASS kaum und durch Clopidogrel nur geringgradig gehemmt, und wird von verschiedenen Arbeitsgruppen bei Patienten mit dualer Thrombozytenhemmung als Kontrolle für das allgemeine Potential zur Thrombozytenaktivierung eingesetzt. TRAP-6 kommt bislang vor allem bei der MEA zum Einsatz (Konzentration 32 µM).

Prostaglandin E1 ist ein endogener Thrombozyteninhibitor, welcher antagonistisch zum ADP zu einem intrazellulären Anstieg von cAMP führt. Die Zugabe zu ADP als Reagenz bei der Thrombozytenfunktionsuntersuchung kann die Sensitivität von Verfahren für die Detektion einer ADP-Rezeptor-Blockade steigern, weswegen PGE1 unter anderem bei der PFA P2Y-Messzelle sowie bei der MEA im ADPtest HS eingesetzt wird.

5 Aggregationsverfahren

5.1 Lichttransmissionaggregometrie nach Born (LTA)

5.1.1 Allgemeines

Die Methode nach Born wird seit 1960 angewendet und gilt als „Goldstandard“ in der Thrombozytenaggregation. Sie beruht auf der turbidimetrischen Bestimmung der Aggregation von Zellsuspensionen.

Weltweit sind unterschiedliche Aggregometer im Handel erhältlich. Diese unterscheiden sich im Aufbau der photometrischen Baugruppe, Anzahl der Messkanäle und der Auswertung des Messergebnisses [13]. Je nach Hersteller werden die Ergebnisse in % Transmission oder nach Umwandlung in Extinktion in % Aggregation dargestellt. Referenzwerte, Zielwerte und andere Ergebnisse sind insofern nicht ohne Validierung (seitens des Herstellers oder Labors) zwischen verschiedenen Aggregometern übertragbar.

5.1.2 Messprinzip

Plättchenreiches Plasma (**PRP**) hat eine geringe Durchlässigkeit für Licht, plättchenarmes Plasma (**PPP**) lässt dieses Licht fast ungehindert durch, so dass die prozentuale Lichtdurchlässigkeit des PRP nach Aggregation als Maß für die Aggregation verwendet werden kann. Durch die Zugabe eines **Induktors** und durch das kontinuierliche Durchmischen in einem Reaktionsgefäß wird die Aggregation der Thrombozyten ausgelöst. Die Änderung der Lichtdurchlässigkeit wird als Reaktionskurve aufgezeichnet, und diese wird visuell oder mit speziellen Software-Programmen ausgewertet.

5.1.3 Benötigte Geräte, Materialien und Reagenzien

- a) Zentrifuge;
- b) Aggregometer;
- c) Disposysteme und/oder Test Tubes und Magnetprüher;
- d) Pipetten;
- e) Einweg-Pipettenspitzen;
- f) Plättchenreiches Plasma;
- g) Plättchenarmes Plasma;
- h) Induktorlösungen.

5.1.4 Probenvorbereitung

Siehe 3.5.1.

5.1.5 Durchführung

Das Aggregometer wird eingeschaltet und bis zur Betriebstemperatur aufgewärmt. Dies dauert geräteabhängig etwa 15 min. Das Probenmaterial sollte in den entsprechenden Küvetten (Kunststoff oder Glas) inklusive Rührstab inkubiert werden.

Einige Arbeitsgruppen stellen die Thrombozytenanzahl des PRP auf 200 /nl bis 300 /nl ein, andere vertreten die Ansicht, dass dieses sich eher nachteilig auf das Messergebnis auswirkt [13], [14], [15]. Es wird empfohlen hier auf die Empfehlung des Aggregometer-Herstellers zu achten und das Vorgehen hausintern zu standardisieren.