

Aus dem Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin
der Universitätsmedizin Rostock

Ehemaliger Direktor: Professor Dr. med. Peter Schuff-Werner

**Magnesiumsulfat als alternatives in vitro Antikoagulans
für die morphologische und funktionelle Thrombozytenanalytik**

Inauguraldissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizinwissenschaften

der Universitätsmedizin Rostock

vorgelegt von

Steffen Mannuß

aus

Neustadt a. d. Weinstraße

Rostock 2017

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Peter Schuff-Werner

2. Gutachter: Prof. Dr. med. Volker Kiefel

3. Gutachter: Prof. Dr. med. Gabriele Siegert

Dekan: Prof. Dr. med. univ. Emil C. Reisinger

Jahr der Einreichung: 2017

Jahr der Verteidigung: 2018

Erklärung

Ich versichere hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Thema:

„Magnesiumsulfat als alternatives in vitro Antikoagulans für die morphologische und funktionelle Thrombozytenanalytik“

selbstständig verfasst und keine anderen Hilfsmittel als die angegebenen benutzt habe. Die Stellen, die anderen Werken dem Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, habe ich in jedem einzelnen Fall durch Angabe der Quelle kenntlich gemacht.

Ich erkläre hiermit weiterhin, dass ich meine wissenschaftlichen Arbeiten nach den Prinzipien der guten wissenschaftlichen Praxis gemäß der gültigen „Regeln zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und zur Vermeidung wissenschaftlichen Fehlverhaltens“ an der Universität Rostock angefertigt habe.

1. Einleitung

1.1. Vom „seltsamen kleinen Kügelchen“ zum Thrombozyten.....	S. 1
1.2. Morphologie und Funktion der Thrombozyten.....	S. 2
1.3. Thrombozytenparameter und Thrombozytenfunktionsmessungen	
1.3.1. Mikroskopische Thrombozytenzählung nach Fonio.....	S. 5
1.3.2. Direkte Bestimmung der Thrombozytenzahl nach Brecher.....	S. 5
1.3.3. Automatisierte Thrombozytenzählung	
1.3.3.1. Impedanz-Methode (Coulter-Prinzip).....	S. 6
1.3.3.2. Streulicht-optische Methode.....	S. 6
1.3.3.3. Fluoreszenz-optische Methode.....	S. 6
1.3.3.4. Durchflusszytometrie.....	S. 7
1.3.4. Thrombozytenfunktion und Thrombozytenaktivierung	
1.3.4.1. Aggregation nach Born.....	S. 7
1.3.4.2. Impedanzaggregometrie (Multiplate ^R).....	S. 7
1.3.4.3. Durchflusszytometrische Messung der Thrombozytenaktivierung.....	S. 8
1.4. In vitro Antikoagulanzen	
1.4.1. Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA).....	S. 8
1.4.2. Natrium-Citrat.....	S. 9
1.4.3. Heparin.....	S. 9
1.4.4. Hirudin.....	S. 10
1.4.5. Magnesiumsulfat.....	S. 10
1.5. Antikoagulanzen-induzierte Pseudothrombozytopenie.....	S. 11
2. Fragestellung.....	S. 12

3. Material und Methoden

3.1. Patienten, Probanden.....	S. 13
3.2. Blutentnahme.....	S. 14
3.3. Bestimmung der Parameter des Kleinen und Großen Blutbildes	
3.3.1. Ermittlung der Thrombozytenzahl und des mittleren Thrombozytenvolumens.....	S. 14
3.3.2. Apparative Bestimmung weiterer Parameter des Kleinen Blutbildes und des Differentialblutbildes.....	S. 15
3.3.3. Untersuchungen zur zeitabhängigen färberischen und morphologischen Integrität von Leukozyten.....	S. 16
3.4. Durchflusszytometrische Bestimmung der Expression von Thrombozytenaktivierungsmarkern in unterschiedlich antikoagulierten Vollblutproben.....	S. 18
3.5. Impedanzaggregometrische Messung der Thrombozytenfunktion in unterschiedlich antikoagulierten Vollblutproben.....	S. 20
3.6. Durchflusszytometrische Untersuchungen zur Erfassung von Thrombozyten-Leukozyten-Komplexen in unterschiedlich antikoagulierten Vollblutproben.....	S. 21
3.7. Statistische Auswertungen.....	S. 24

4. Ergebnisse

4.1. Vergleich der an verschiedenen automatischen Hämatologieanalysatoren gemessenen Thrombozytenzahl und des Thrombozytenvolumens in EDTA- und MgSO ₄ -antikoagulierten Vollblutproben	
4.1.1. Vergleich der Thrombozytenzahl.....	S. 25
4.1.2. Vergleich des mittleren Plättchenvolumens (MPV).....	S. 26
4.1.3. Einfluss einer verlängerten Probenlagerung (> 4 Stunden) und unterschiedlicher Analysesysteme auf die Thrombozytenzahl und das Thrombozytenvolumen in EDTA- und MgSO ₄ -antikoagulierten Vollblutproben.....	S. 29

4.2. Einfluss der Antikoagulation auf die Thrombozytenaktivierung	
4.2.1. Spontane und durch Agonisten (ADP, Arachidonsäure) induzierte Thrombozytenaktivierung in Abhängigkeit von der in vitro Antikoagulation.....	S. 34
4.2.2. Vergleich der Thrombozytenfunktion und der Thrombozytenaktivierung bei Verwendung unterschiedlicher Antikoagulanzen.....	S. 39
4.3. Interaktion von Thrombozyten und Leukozyten in unterschiedlich antikoaguliertem Vollblut.....	S. 45
4.4. Einfluss unterschiedlicher Antikoagulanzen auf die Vergleichbarkeit von mit hämatologischen Analyzern erstellten Blutbildern	
4.4.1. Vergleich der Parameter des Kleinen Blutbildes.....	S. 47
4.4.2. Vergleich der Parameter des Großen Blutbildes.....	S. 53
4.5. Zeitabhängige Veränderungen der Parameter des Kleinen und Großen Blutbildes	
4.5.1. Kurzzeitige Veränderungen	
4.5.1.1. Zeitabhängige Veränderungen der Parameter des Kleinen Blutbildes.....	S. 57
4.5.1.2. Vergleich der mittels Impedanz- und der fluoreszenz-optisch gemessenen Thrombozytenzahl.....	S. 61
4.5.1.3. Zeitabhängige Veränderungen der Parameter des maschinellen Differentialblutbildes....	S. 63
4.5.2. Langzeitige Veränderungen	
4.5.2.1. Zeitabhängige Veränderungen der Parameter des Kleinen Blutbildes.....	S. 67
4.5.2.2. Zeitabhängige Veränderungen der Parameter des maschinellen Differentialblutbildes....	S. 70
4.5.3. Einfluss der unterschiedlichen in vitro Antikoagulanzen auf die morphologische Integrität von neutrophilen Granulozyten.....	S. 73
5. Diskussion.....	S. 75
6. Zusammenfassung.....	S. 86
7. Thesen.....	S. 87
8. Literaturverzeichnis.....	S. 89

Abkürzungsverzeichnis

ADP = Adenosin-Diphosphat

AG = Aktiengesellschaft

APC = Allophycocyanin

ASS = Acetylsalicylsäure

AT III = Antithrombin III

ATP = Adenosin-Triphosphat

AUC = Area under the curve

BSA = Bovine Serum Albumin

β-TG = β-Thromboglobulin

ECGF = Endothelial Cell Growth Factor

EDTA = Ethylendiamintetraacetat

EGF = Epidermal Growth Factor

FITC = Fluorescein isothiocyanate

fl = Femtoliter

GATA-1 = GATA-bindender Faktor-1

Hb = Hämoglobin

ICAM-1 = Intracellular Adhesion Molecule-1

ICSH = International Council for
Standardization in Hematology

LAMP-3 = Lysosomal-Associated Membrane
Protein-3

Ltd. = Limited

MCH = Mean Corpuscular Haemoglobin

MCHC = Mean Corpuscular Haemoglobin
Concentration

MCV = Mean Corpuscular Volume

Ca²⁺ = Kalzium

cAMP = zyklisches Adenosin-Monophosphat

CD = Cluster of Differentiation

Co. = Company

CTAP-3 = Connective Tissue-Activating
Protein-3

DG = Diacylglycerol

DNA = Deoxyribonucleic Acid

DTS = Dense Tubular System

GDP = Guanosin-Diphosphat

GmbH = Gesellschaft mit beschränkter
Haftung

GMP-140 = Granule Membrane Protein-140

Gp = Glykoprotein

GTP = Guanosin-Triphosphat

Ig = Immunglobulin

IP3 = Inositol-1,4,5-trisphosphat

K = Kalium

kDa = Kilo-Dalton

Mg²⁺ = Magnesium

MgSO₄ = Magnesiumsulfat

μl = Mikroliter

MIP-1α = Macrophage Inflammatory
Protein-1 alpha

ml = Milliliter

MPV = Mean Platelet Volume

mRNA = messenger Ribonucleid Acid

Na = Natrium

NF-E2 = Nuclear Factor-Erythroid-Derived 2

nm = Nanometer

NRBC = Nucleated Red Blood Cell

n.s. = nicht signifikant

o.g. = oben genannten

pH = potentia Hydrogenii

PIP = Phosphoinositol-4, 5-biphosphonat

P-LCR = Platelet Large Cell Ratio

PSGL = P-Selectin Glycoprotein Ligand

PTCP = Pseudothrombozytopenie

RBC = Red Blood Cell

TRAP = Thrombinrezeptor-aktivierendes
Peptid

TXA₂ = Thromboxan A₂

u.a. = unter anderem

USA = United States of America

vWF = von Willebrand- Faktor

WBC = White Blood Cell

z.B. = zum Beispiel

z.T. = zum Teil

PDGF = Platelet-Derived Growth Factor

PDW = Platelet Distribution Width

PE-Cy7 = Phycoerythrin-Cyanin 7

PerCP = Peridinin Chlorophyll

PF-4 = Plättchenfaktor-4

PGL₂ = Prostazyklin

RNA = Ribonucleic Acid

ROS = Reactive Oxygen Species

SCS = Surface Connected Open Canalicular
System

SEM = Standard Error of the Mean

Tabellenverzeichnis

Tabelle I: Übersicht über die an unterschiedlichen Patienten- und Probandenkollektiven durchgeführten Untersuchungen.....	S. 13
Tabelle II: Eingesetzte Materialien und Geräte für die Messung der Thrombozytenaktivierung.....	S. 19
Tabelle III: Eingesetzte Materialien und Geräte für die Thrombozytenfunktionsmessung.....	S. 20
Tabelle IV: Eingesetzte Materialien und Geräte zur Bestimmung der Leukozyten-Thrombozyten-Interaktion.....	S. 22
Tabelle V: Statistische Bewertung (Wilcoxon signed rank test) der Differenzen der Thrombozytenzahlen, gemessen in unterschiedlich antikoagulierten Vollblutproben an drei verschiedenen Hämatologieautomaten.....	S. 26
Tabelle VI: Statistische Bewertung (Wilcoxon signed rank test) der Differenzen der Thrombozytenvolumina, gemessen in unterschiedlich antikoagulierten Vollblutproben an drei verschiedenen Hämatologieautomaten.....	S. 27
Tabelle VII: Tabellarische Darstellung der Messwerte der zu unterschiedlichen Zeitpunkten an verschiedenen Messgeräten ermittelten Thrombozytenzahlen.....	S. 32
Tabelle VIII: Tabellarische Darstellung der Messwerte der zu unterschiedlichen Zeitpunkten an verschiedenen Messgeräten ermittelten mittleren Plättchenvolumina.....	S. 32
Tabelle IX: Statistische Bewertung (Wilcoxon signed rank test) der Differenzen der in EDTA- und MgSO ₄ -Proben gemessenen Thrombozytenzahl und des MPV zu unterschiedlichen Zeitpunkten.....	S. 33
Tabelle X: Statistische Bewertung (Wilcoxon signed rank test) der Differenz der in EDTA- und in MgSO ₄ -Proben gemessenen Thrombozytenzahl und des MPV zu den Zeitpunkten „0 h“ und „24 h“.....	S. 33
Tabelle XI: Von der Lagerungszeit abhängige spontane und durch Agonisten induzierte CD62p-Expression der Thrombozyten in unterschiedlich antikoagulierten Vollblutproben.....	S. 34
Tabelle XII: Differenz der spontanen und durch ADP induzierten CD62p-Expression der Thrombozyten in unterschiedlich antikoagulierten Vollblutproben.....	S. 36
Tabelle XIII: Differenz der spontanen und durch Arachidonsäure induzierten CD62p-Expression der Thrombozyten in unterschiedlich antikoagulierten Vollblutproben.....	S. 36

Tabelle XIV: Von der Lagerungszeit abhängige spontane und durch Agonisten induzierte CD63-Expression der Thrombozyten in unterschiedlich antikoagulierten Vollblutproben.....	S. 37
Tabelle XV: Spontane und durch ADP induzierte CD63-Expression der Thrombozyten in unterschiedlich antikoagulierten Vollblutproben.....	S. 38
Tabelle XVI: Spontane und durch Arachidonsäure induzierte CD63-Expression der Thrombozyten in unterschiedlich antikoagulierten Vollblutproben.....	S. 38
Tabelle XVII: Statistische Bewertung (Wilcoxon signed rank test) der Thrombozytenaggregation.....	S. 40
Tabelle XVIII: Am Multiplate gemessene AUC-Werte.....	S. 42
Tabelle XIX: Statistische Bewertung der Erythrozytenzahl und des MCV gemessen in unterschiedlich antikoagulierten, zeitgleich abgenommenen Vollblutproben.....	S. 48
Tabelle XX: Statistische Bewertung der Hämatokrit- und der Hämoglobinwerte, gemessen in unterschiedlich antikoagulierten, zeitgleich abgenommenen Vollblutproben.....	S. 49
Tabelle XXI: Statistische Bewertung des MCH und der MCHC, gemessen in unterschiedlich antikoagulierten, zeitgleich abgenommenen Vollblutproben.....	S. 50
Tabelle XXII: Statistische Bewertung der Leukozytenzahl, gemessen in unterschiedlich antikoagulierten, zeitgleich abgenommenen Vollblutproben.....	S. 50
Tabelle XXIII: Statistische Bewertung der in unterschiedlich antikoagulierten, zeitgleich abgenommenen Vollblutproben gemessenen Thrombozytenzahl und mittleren Thrombozytenvolumina.....	S. 52
Tabelle XXIV: Statistische Bewertung der in unterschiedlich antikoagulierten, zeitgleich abgenommenen Vollblutproben gemessenen Neutrophilenzahl.....	S. 53
Tabelle XXV: Statistische Bewertung der in unterschiedlich antikoagulierten, zeitgleich abgenommenen Vollblutproben gemessenen Monozyten- und Lymphozytenzahl.....	S. 54
Tabelle XXVI: Statistische Bewertung der in unterschiedlich antikoagulierten, zeitgleich abgenommenen Vollblutprobengemessenen Eosinophilen- und Basophilenzahl.....	S. 55
Tabelle XXVII: Übersicht der Schädigungsgrade von Neutrophilen in unterschiedlich antikoagulierten Vollblutproben.....	S. 74

Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1a-e:** Graduierung der morphologischen Integrität von neutrophilen Granulozyten.....S. 16-17
- Abb. 2:** Ausdruck der FACSDiva-Auswertungssoftware zur Thrombozyten-Leukozyten-Interaktion.....S. 23
- Abb. 3:** Vergleich der parallel an drei verschiedenen Messgeräten gemessenen Thrombozytenzahl aus zeitgleich entnommenen EDTA- und MgSO₄-antikoagulierten Vollblutproben.....S. 25
- Abb. 4:** Vergleich der parallel an drei verschiedenen gemessenen mittleren Plättchenvolumina aus zeitgleich entnommenen EDTA- und MgSO₄-antikoagulierten Vollblutproben.....S. 26
- Abb. 5:** Von den verschiedenen Geräten gemessenen Thrombozytenzahlen und MPV-Werte aus EDTA-Proben und MgSO₄-Proben in aufsteigender Reihenfolge.....S. 28
- Abb. 6 a-c:** Zeitlicher Verlauf der parallel an drei verschiedenen Messgeräten gemessenen Thrombozytenzahlen aus zeitgleich entnommenen EDTA- und MgSO₄-antikoagulierten Vollblutproben.....S. 29
- Abb. 7 a-c:** Zeitlicher Verlauf der parallel an drei verschiedenen Geräten gemessenen mittleren Plättchenvolumina aus zeitgleich entnommenen EDTA- und MgSO₄-antikoagulierten Vollblutproben.....S. 31
- Abb. 8:** Vergleich der zeitabhängigen Zunahme der spontanen thrombozytären CD62p-Expression in unterschiedlich antikoagulierten Vollblutproben.....S. 34
- Abb. 9 a + b:** Differenzen der prozentualen Anteile an CD62p-positiven Thrombozyten in unstimulierten und durch ADP, bzw. Arachidonsäure stimulierten, verschieden antikoagulierten und unterschiedlich lang gelagerten Vollblutproben.....S. 35
- Abb. 10:** Vergleich der zeitabhängigen Zunahme der spontanen thrombozytären CD63-Expression in unterschiedlich antikoagulierten Vollblutproben.....S. 36
- Abb. 11 a + b:** Differenzen der prozentualen Anteile an CD63-positiven Thrombozyten in unstimulierten und durch ADP, bzw. Arachidonsäure stimulierten, verschieden antikoagulierten und unterschiedlich lang gelagerten Vollblutproben.....S. 37
- Abb. 12:** Agonisten-induzierte Thrombozytenaggregation (Multiplate^R) in MgSO₄-, Citrat- und Hirudin-antikoagulierten Vollblutproben.....S. 39

Abb. 13: Konzentrationsabhängige Hemmung der mittels verschiedener Agonisten induzierten Thrombozytenaggregation durch Magnesiumsulfat. Dargestellt ist die nach MgSO ₄ -Zugabe gemessene AUC in Relation zum Ausgangswert der Hirudin-Probe.....	S. 41
Abb. 14 a + b: Vergleich der durch verschiedene Agonisten induzierten CD62p-Expression und das Ausmaß der Thrombozytenaggregation in Citrat-, bzw. MgSO ₄ -antikoagulierten Vollblutproben.....	S. 43
Abb. 15 a + b: Vergleich der durch verschiedene Agonisten induzierten CD63-Expression und das Ausmaß der Thrombozytenaggregation in Citrat-, bzw. MgSO ₄ -antikoagulierten Vollblutproben.....	S. 44
Abb. 16 a + b: Prozentualer Anteil der CD42b-positiven Leukozyten, bzw. Monozyten in EDTA-, MgSO ₄ - und Citrat-antikoagulierten Vollblutproben. (Darstellung als Boxplots).....	S. 45
Abb. 17 a + b: Prozentualer Anteil der CD42b-positiven Lymphozyten, bzw. Granulozyten in EDTA-, MgSO ₄ - und Citrat-antikoagulierten Vollblutproben. (Darstellung als Boxplots).....	S. 46
Abb. 18 a + b: Erythrozytenzahl und MCV in zeitgleich gemessenen, aber unterschiedlich antikoagulierten Vollblutproben. (Darstellung als Boxplots).....	S. 47
Abb. 19 a + b: Hämatokrit und Hämoglobin in zeitgleich gemessenen, aber unterschiedlich antikoagulierten Vollblutproben. (Darstellung als Boxplots).....	S. 48
Abb. 20 a + b: MCH und MCHC in zeitgleich gemessenen, aber unterschiedlich antikoagulierten Vollblutproben. (Darstellung als Boxplots).....	S. 49
Abb. 21: Leukozytenzahl in zeitgleich gemessenen, aber unterschiedlich antikoagulierten Vollblutproben. (Darstellung als Boxplots).....	S. 50
Abb. 22 a + b: Boxplot-Darstellung der Thrombozytenzahl, gemessen mittels Impedanz- und fluoreszenz-optischer Messung, sowie Boxplot-Darstellung des MPV in unterschiedlich antikoagulierten Vollblutproben.....	S. 51
Abb. 23: Neutrophilenzahl in zeitgleich abgenommenen, unterschiedlich antikoagulierten Vollblutproben. (Darstellung als Boxplots).....	S. 53
Abb. 24 a + b: Monozyten- und Lymphozytenzahl, gemessen in zeitgleich abgenommenen, unterschiedlich antikoagulierten Vollblutproben. (Darstellung als Boxplots).....	S. 54
Abb. 25 a + b: Eosinophilen- und Basophilenzahl, gemessen in zeitgleich abgenommenen unterschiedlich antikoagulierten Vollblutproben. (Darstellung als Boxplots).....	S. 55

Abb. 26: Korrelation der unterschiedlichen Leukozytenpopulationen, gemessen in zeitgleich abgenommenen, unterschiedlich antikoagulierten Vollblutproben.....	S. 56
Abb. 27: Messgrößen des kleinen Blutbildes, gemessen in zeitgleich abgenommenen, unterschiedlich antikoagulierten Vollblutproben gleich nach der Abnahme (0 min) und nach 20, 40, 60, 180 Minuten.....	S. 60
Abb. 28: Vergleich der mittels Impedanz und fluoreszenz-optischer Methode gemessenen Thrombozytenzahlen in unterschiedlich antikoagulierten Vollblutproben.....	S. 62
Abb. 29: Veränderungen der Messgrößen der maschinell differenzierten Leukozytenpopulationen im Verlauf von 180 Minuten, gemessen in zeitgleich abgenommenen, unterschiedlich antikoagulierten Vollblutproben.....	S. 64
Abb. 30: Veränderungen der Messgrößen des kleinen Blutbildes im Verlauf von 24 Stunden, gemessen in zeitgleich abgenommenen, unterschiedlich antikoagulierten Vollblutproben.....	S. 68
Abb. 31: Messgrößen des großen Blutbildes im Verlauf von 24 Stunden, gemessen in zeitgleich abgenommenen, unterschiedlich antikoagulierten Vollblutproben.....	S. 72
Abb. 32: Grad der morphologischen Schädigung von Neutrophilen in unterschiedlich antikoagulierten Vollblutproben.....	S. 74

1. Einleitung

1.1. Vom „seltsamen kleinen Kügelchen“ zum Thrombozyten

Es ist nicht sicher belegt, wem die Erstbeschreibung des Thrombozyten und seiner Funktion tatsächlich zuzuschreiben ist. Im Jahr 1835 beschrieben Friedrich und Hermann Nasse im Rahmen mikroskopischer Blutuntersuchungen neben den „Blutkügelchen (Globuli)“ auch „Blutkörnchen“, die sich „zu unregelmäßigen, länglichen Haufen (Flocken)“ verbinden [1].

In seiner Arbeit *„Ein heizbarer Objecttisch und seine Verwendung bei Untersuchungen des Blutes“* beschrieb Max Schultze im Jahr 1865 „Klumpchen farbloser Kügelchen“ und verwies auf Voruntersuchungen seines Kollegen Schulten aus dem Jahr 1858, der „weisse Körperchen in grosser Anzahl und von sehr verschiedener Grösse, so dass die kleinsten kaum die Hälfte der grösseren Blutscheiben, die grössten wohl das Doppelte und Dreifache derselben betragen mussten“ beschrieben hatte [2, 3].

Im Gegensatz zu Schulten, der seine Beobachtung dem „Puerperalfieber“ seiner untersuchten Patientin zuschrieb, ging Schultze von einem „normalen Formbestandtheil“ des menschlichen Blutes aus.

Im Jahr 1882 befasste sich Julius Bizzozero in seiner Arbeit *„Ueber einen neuen Formbestandtheil des Blutes und dessen Rolle bei der Thrombose und der Blutgerinnung.“* mit den Beobachtungen seiner Kollegen und deren unterschiedlichen Methoden der mikroskopischen Blutuntersuchung. Er erkannte erstmals die Rolle des Thrombozyten als funktionellen Bestandteil der Blutgerinnung und beschäftigte sich mit den unterschiedlichen Substanzen, die experimentell von ihm und seinen Kollegen zur Verhinderung der Gerinnung eingesetzt wurden. Ein Teil seiner ärztlichen Kollegen, wie z.B. Riess, lehnte die Vorstellung, dass Thrombozyten an der Gerinnung beteiligt sind ab, da man sie ja schließlich auch vor selbiger schon beobachten könne. Vielmehr handele es sich um Zerfallsprodukte der weißen Blutkörperchen [4]. Erst im Jahr 1897 befasste sich James Homer Wright im Rahmen von Färbungsversuchen und mikroskopischen Beobachtungen näher mit der Herkunft der Blutplättchen und kam dabei zu der Erkenntnis, dass Thrombozyten durch Abschnürungsvorgänge aus den Megakaryozyten des Knochenmarks hervorgehen. Die Ergebnisse seiner Untersuchungen veröffentlichte er 1910 in seiner Arbeit *„Die Histogenese der Blutplättchen“*, in der er sich kritisch mit den Theorien zur Thrombozytenentwicklung seiner Kollegen auseinandersetzt. [5, 6].

Im gleichen Jahr erkannte William Duke bei Untersuchungen eines jungen Mannes, der unter einer Thrombozytopenie litt, einen Zusammenhang von gemessener Thrombozytenzahl und Blutungsdauer. Er beobachtete, dass die nach einer Transfusion erhöhte Thrombozytenzahl zu einer

Verkürzung der Blutungsdauer führte und somit die Blutplättchen offenbar für die Hämostase notwendig sind. Er schlussfolgerte aus seinen Beobachtungen, dass eine Thrombozytopenie die Ursache einer Purpura ist [7].

1.2. Morphologie und Funktion der Thrombozyten

Thrombozyten entstehen unter dem Einfluss der Transkriptionsfaktoren GATA1 und NF-E2 und dem Hormon Thrombopoetin durch Abschnürungsvorgänge aus dem Zytosol polyploider Megakaryozyten des Knochenmarks [8, 9]. Ein einzelner Megakaryozyt kann zwischen 5000 und 10 000 Thrombozyten freisetzen, wobei ein gesunder Erwachsener täglich 10^{11} Blutplättchen produziert [10].

Nach ihrer Freisetzung stellen die Blutplättchen den kleinsten zellulären Bestandteil des menschlichen Blutes dar. Unter physiologischen Umständen beträgt ihre Zahl etwa 150 000 bis 450 000 pro μl Blut. Das mittlere Thrombozytenvolumen beträgt zwischen 5 fl und 13 fl, abhängig von der angewandten Messmethode und dem verwendeten in-vitro Antikoagulans [6, 11–13]. Die mittlere Lebensdauer der Thrombozyten liegt bei etwa 5 bis 9 Tagen, bei einer täglichen Erneuerungsrate von ca. 20 % der Gesamt-Thrombozytenzahl. Der Abbau von überalterten Blutplättchen erfolgt durch Phagozytose in den Kupffer-Zellen der Leber und in der Milz. Ungefähr ein Drittel aller vitalen Thrombozyten befindet sich in der Milz, wo sie im Austausch mit den im peripheren Blut zirkulierenden Blutplättchen stehen [10, 14]. Da Thrombozyten durch Abschnürungsvorgänge aus Megakaryozyten hervorgehen, besitzen sie statt eines Zellkerns nur kleine Mengen mRNA. Obwohl die Thrombozyten nur bedingt zur Proteinsynthese, z.B. von Faktor XIII befähigt sind, schätzt man das thrombozytäre Proteom auf über 5000 Proteine [15–17]. Das Zytosol von Thrombozyten enthält u.a. Enzyme der Glykolyse und des Pentosephosphatweges. In den Mitochondrien von Thrombozyten laufen die enzymatischen Schritte des Zitratzyklus und der Elektronentransportphosphorylierung ab. Die Glykolyse durch die Blutplättchen erfolgt durch die Aufnahme von Glukose aus dem Plasma, aber auch durch den Abbau zellulärer Glykogenvorräte [18].

Im nicht aktivierten Zustand liegen Thrombozyten in einer diskoiden Ruheform vor. Erfolgt eine Aktivierung der Blutplättchen durch Agonisten wie z.B. ADP oder Thrombin, bilden die Blutplättchen Pseudopodien aus und verlieren ihre diskoiden Form, was auch als „shape change“ bezeichnet wird. In der aktivierten Form kann man Thrombozyten mikroskopisch als Echinosphärozyten beobachten [14, 19].

Ultrastrukturell kann man beim Thrombozyten eine *periphere Zone*, die der Plasmamembran und der in ihr verankerten Glykoproteine entspricht, erkennen. Sie enthält u.a. auch die Phospholipide Phosphatidylcholin, Phosphatidylinositol und Sphingomyelin und darüber hinaus Rezeptoren für lösliche Aktivatoren (z.B. ADP und Thrombin) und den von-Willebrand-Faktor (vWF), sowie für Fibrinogen.

Die *strukturelle Zone* besteht aus Strukturproteinen, wie z.B. Mikrotubuli, Aktin und Myosin. Sie sind für die Aufrechterhaltung der diskoiden Ruheform, aber auch für den Ablauf des „shape changes“ und die Reorganisation der Zellorganellen während der Thrombozyten-Aktivierung verantwortlich.

Zu den *Zellorganellen* im Zytoplasma zählen neben den Mitochondrien und Glykogenspeichern verschiedene Speichergranula. Bei den elektronendichten Granula handelt es sich um ca. 200 nm große Organellen, die u.a. Ca^{2+} -Ionen und aggregationsfördernde Substanzen wie ATP, ADP, Serotonin, GTP und GDP enthalten [14, 20]. Ein Thrombozyt enthält zudem etwa 35 α -Granula, die ungefähr 15 % des Thrombozytenvolumens ausmachen und den Speicher für Adhäsionsproteine wie Vitronektin, Fibronektin und Thrombospondin, aber auch Wachstums- (EGF, ECGF und PDGF) und Gerinnungsfaktoren (Plasminogen, Faktor V und Faktor XI), sowie Chemokine (PF-4 und β -TG) und Immunglobuline (IgA, IgG, IgM und IgE) darstellen [8, 20]. Die lysosomalen Granula enthalten hydrolytische Enzyme wie Kollagenase, Elastase und Heparinase [20].

Das intrazelluläre Membransystem entspricht ebenfalls einer strukturellen Zone. Man unterscheidet ein „*surface connected open canalicular system (SCS)*“ von einem „*dense tubular system (DTS)*“. Das SCS durchzieht in verzweigten Kanälen den Thrombozyten und vermittelt durch die Verbindung der Plasmamembran mit dem Zellinneren die Freisetzung granulärer Inhalte. Ähnlich der Plasmamembran sind auf der Membranoberfläche des SCS Moleküle wie Gp Ib und Gp IIb/IIIa lokalisiert, die bei der Aktivierung an die Thrombozytenoberfläche exprimiert werden [10, 20]. Das DTS geht aus dem glatten endoplasmatischen Retikulum des Megakaryozyten hervor und stellt den wichtigsten Speicherort für Ca^{2+} -Ionen innerhalb des Thrombozyten dar. Im ruhenden Thrombozyten liegt das DTS als dünnes, längliches Membransystem vor; nach Stimulation (z.B. durch Thrombin) rundet es sich zu einer vesikulären Form ab und setzt Ca^{2+} ins Zytoplasma frei [14, 21].

Tritt der Thrombozyt mit beschädigtem Endothel in Kontakt, so führen die dort freigelegten endothelialen Matrixproteine wie Kollagen, Fibronektin und Laminin über die Interaktion mit den thrombozytären Adhäsionsrezeptoren Gp VI, bzw. Gp Ic/IIa und Gp IIa zu einer Adhäsion des Thrombozyten am beschädigten Endothel. Die Wechselwirkung von kollagengebundenem von-Willebrand-Faktor (vWF) auf Seiten der Endothelschädigung und dem thrombozytären Glykoprotein Gp Ib-V-IX-Komplex führt zu einer Stabilisierung der Thrombozyten-Endothel-Bindung auch bei

hohen Scherkräften. Eine weitere Stabilisierung erfolgt dann durch die thrombozytären Laminin-, Kollagen- und Fibronectin-Rezeptoren. Die Aktivierung des Kollagenrezeptors führt beim Thrombozyten zur Aktivierung und zum damit einhergehenden „shape change“. Der Thrombozyt bildet mittels des Enzyms Cyclooxygenase-1 aus freigesetzter Arachidonsäure Thromboxan A₂, welches einerseits am Endothel vasokonstriktorisch wirkt und andererseits durch die Induktion der thrombozytären ADP-Sekretion das Fortschreiten des Aktivierungsvorgangs bewirkt. Mittels des aktivierten Fibrinogenrezeptors Gp IIb/IIIa rekrutiert der adhärenthafte Thrombozyt weitere Thrombozyten aus dem zirkulierenden Plasma, um dadurch eine vollständige Abdeckung des Endotheldefekts zu erreichen. Dieser Ca²⁺-abhängige Vorgang ist für die Bildung von Thrombozytenaggregaten verantwortlich, wobei ein einzelner Thrombozyt zwischen 60 000 und 100 000 Gp IIb/IIIa-Rezeptoren aufweist [14, 22, 23].

Die aggregierten Thrombozyten erfahren eine weitergehende Aktivierung durch exprimierte Agonisten. Durch die Bindung von Thrombin wird das Enzym Phospholipase C aktiviert, das nachfolgend zu einer Freisetzung der im „dichten tubulären System“ befindlichen Ca²⁺-Ionen und zur Spaltung von Phosphoinositol-4, 5-bisphosphonat (PIP₂) in Inositol-1, 4, 5-triphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DG) führt. Das durch DG aktivierte Enzym Proteinkinase C aktiviert indirekt den Fibrinogenrezeptor innerhalb des Gp IIb/IIIa-Komplexes und interagiert schlussendlich mit den umgebenden Thrombozyten [14, 18, 24].

Neben seinen Funktionen im Rahmen der Blutgerinnung ist der Thrombozyt an antiinflammatorischen und antiinfektiven Prozessen beteiligt. Er ist in der Lage Pathogene zu internalisieren und Leukozyten zu rekrutieren. So kann der Kontakt mit Bakterienspezies wie *Streptococcus pyogenes* und *Escherichia coli* eine Degranulierung und Aggregation des Thrombozyten auslösen [25], was durch den Glykoproteinrezeptor IIb/IIIa vermittelt wird, der u.a. als Bindungsstelle von *Borrelia burgdorferi* identifiziert wurde [26]. Aktivierte Blutplättchen internalisieren Bakterien und Viren über ihr SCS und führen sie den α -Granula zu, wo sie durch Kontakt mit „Thrombozidinen“ inaktiviert werden [8, 27–29]. Auch die Freisetzung bakterizider und fungizider Proteine wie PF-4 und CTAP-3 sind Teil der thrombozytären Immunkompetenz [30]. Von Thrombozyten sezerniertes Serotonin wirkt im Rahmen von Entzündungen als Radikalfänger und kann umliegendes Gewebe vor den von Granulozyten freigesetzten reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) schützen [31].

Durch Zell-Zell-Kontakte mit Leukozyten und Endothelzellen unterstützt der Thrombozyt die leukozytäre Migration aus dem Endothel hin zum Ort der Entzündung. Die Bindung der Leukozyten an Thrombozyten wird durch thrombozytäres P-Selectin und leukozytäres PSGL vermittelt [32]. Die thrombozytäre Sezernierung von PF-4, MIP-1 α und β -TG führt zur Rekrutierung und Aktivierung

von Leukozyten. So wird z.B. durch PF-4 die Ausschüttung von Histamin aus basophilen Granulozyten und die Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen gefördert. MIP-1 α wirkt chemotaktisch auf CD8⁺ T-Lymphozyten und setzt ebenfalls Histamin aus basophilen Granulozyten frei [8, 33, 34].

1.3. Thrombozytenparameter und Thrombozytenfunktionsmessungen

Zu der Zeit als Thrombozyten von Bizzozero als eigenständiger Blutbestandteil beschrieben wurden [4], war die physiologische Thrombozytenzahl nicht genau bekannt. Bizzozeros Kollege Hayem, der Thrombozyten für Vorstufen von Erythrozyten hielt und sie deshalb als „Hämatoblasten“ bezeichnete, hatte jedoch damals schon mikroskopische Zählungen an Blutproben von Neugeborenen, Kindern und Erwachsenen vorgenommen und war, je nach Altersgruppe, von einer physiologischen „Hämatoblastenzahl“ von 200 000 bis 346 000 pro ml ausgegangen [35]. Die Mikroskopie, bzw. die Kammerzählung war bis zur Entwicklung des Impedanz-Messverfahrens durch Wallace Coulter im Jahr 1953 [36] die einzige Möglichkeit der Thrombozytenzählung. Da die Widerstandsänderung abhängig von der Größe des erfassten Partikels ist, war durch dieses Verfahren erstmals auch die automatische Bestimmung des Zellvolumens möglich. Die automatische Messung von Zellzahlen und Zellvolumina ist heutzutage Teil der labormedizinischen Routine. Für spezielle Fragestellungen, wie die Messung von Funktionsparametern und des Aktivierungsgrades, kommen unterschiedliche Messverfahren zum Einsatz, die im folgenden Abschnitt beschrieben werden.

1.3.1. Mikroskopische Thrombozytenzählung nach Fonio

Für die Durchführung der Zählmethode nach Fonio wird kapilläres Blut in einem Tropfen einer 14-prozentigen Magnesiumsulfatlösung aufgenommen und daraus ein Trockenpräparat hergestellt, welches anschließend nach Jenner oder nach Giemsa gefärbt wird. Im nächsten Schritt wird untersucht wie viele Thrombozyten bei der mikroskopischen Zählung von 1000 Erythrozyten erkannt werden. Das so ermittelte Verhältnis von Erythrozytenzahl zu Thrombozytenzahl erlaubt die Bestimmung der Thrombozytenzahl anhand der Gesamt- Erythrozytenzahl [37].

1.3.2. Direkte Bestimmung der Thrombozytenzahl nach Brecher

Ein Fortschritt in der mikroskopischen Thrombozytenzählung (Zählkammermethode) wurde im Jahr 1953 durch die Einführung der Phasen-Kontrast-Mikroskopie erzielt, da sich mit diesem Verfahren Thrombozyten deutlicher von Zelltrümmern unterscheiden lassen [38, 39]. Die direkte

mikroskopische Zählung nach Brecher gilt seit 1988 als Referenzmethode für die manuelle Bestimmung der Thrombozytenzahl [40]. Hierbei wird das Blut mit einer hypotonen Ammoniumoxalat-Lösung versetzt, was zu einer Lyse der störenden Erythrozyten führt und die mikroskopische Thrombozytenzählung in einer Neubauer-Zählkammer ermöglicht.

Seit dem Jahr 2001 gilt die RBC/Platelet Ratio-Methode als Referenzmethode für die Thrombozytenzählung. Dabei wird die durchflusszytometrisch gemessene Zahl spezifisch mit anti-CD41/CD61 gelabelter Thrombozyten in Relation zu der mittels Impedanz-Messverfahren gemessenen Erythrozytenzahl in EDTA-antikoagulierten Vollblutproben gesetzt [41].

1.3.3. Automatisierte Thrombozytenzählung

1.3.3.1. Impedanz-Methode (Coulter-Prinzip)

Das Impedanz-Messverfahren, das 1953 von Wallace Coulter entwickelt wurde [36], basiert darauf, dass Blutzellen eine messbare Zunahme des elektrischen Widerstands auslösen wenn sie eine Messkammer passieren, an die eine elektrische Spannung angelegt ist. Das Ausmaß der Widerstandszunahme ist dabei proportional zum Volumen des durchtretenden Partikels. Dadurch ermöglicht dieses Messprinzip neben der Bestimmung der Zellzahl auch die Gewinnung von Volumeninformation der detektierten Zellen und damit eine Unterscheidung von Thrombozyten und Erythrozyten [39].

1.3.3.2. Streulicht-optische Methode

Zur Identifizierung und Zählung von Zellen kann auch die Streulicht-optische Methode verwendet werden. Dabei erzeugt eine Laserdiode einen monochromatischen Lichtstrahl, der auf die Durchflusszelle gerichtet ist. Die Mie-Theorie über Streulichteigenschaften besagt, dass die an einem bestimmten Winkel gemessene Intensität von monochromatischem Streulicht vom Volumen einer Zelle und der Differenz der Refraktionsindizes von Zelle und Medium abhängig ist [42, 43].

1.3.3.3. Fluoreszenz-optische Methode

Die fluoreszenz-optische Methode basiert auf der Färbung der zellulären Nukleinsäuren mit einem Fluoreszenzfarbstoff nach vorheriger partieller Lyse der Zellmembran. In der Durchflusszelle können die verschiedenen Zellpopulationen anhand ihres Vorwärtsstreulichts und der Fluoreszenzintensität, die abhängig vom Nukleinsäuregehalt ist, voneinander unterschieden werden [44]. Dieses Verfahren erlaubt jedoch keine Bestimmung des Thrombozytenvolumens.

1.3.3.4. Durchflusszytometrie

Das Prinzip der Durchflusszytometrie ermöglicht eine schnelle, automatisierte Identifizierung, Zählung und Sortierung verschiedener Zellpopulationen. Die Zellen passieren, suspendiert in einem hydrodynamisch fokussierten Flüssigkeitsstrom, eine Messkammer und werden dabei von einem monochromatischen Lichtstrahl (Laser) erfasst. Entsprechend ihrer Größe und Zellstruktur wird das Laserlicht in bestimmten Winkeln gestreut und von unterschiedlich angeordneten Fotozellen erfasst. Unterschiedliche Zellen werden über eine Änderung des Streuwinkels der erfassten Vorwärts-, bzw. Seitwärtsstreulichts identifiziert. Diese Veränderungen ermöglichen die Identifizierung der passierenden Zellen. Durch weitere Modifikationen dieses Prinzips, z.B. den Einsatz von Fluoreszenz-Farbstoffen oder fluorochrom-markierten Antikörpern, lassen sich zusätzliche Informationen, wie z.B. der RNA/DNA-Gehalt der Zelle oder die Expression von Oberflächenmarkern gewinnen [45, 46].

1.3.4. Thrombozytenfunktion und Thrombozytenaktivierung

Neben der Bestimmung von Thrombozytenzahl und Thrombozytenvolumen kann auch der Erhalt der Thrombozytenfunktion, z.B. im Rahmen einer Clopidogrel- oder ASS-Therapie, Gegenstand labormedizinischer Untersuchungen sein. Die thrombozytäre Expression spezifischer Marker und die Formierung von Thrombozyten-Leukozyten-Komplexen hängen u.a. vom Ausmaß der Thrombozytenaktivierung ab und können mittels Durchflusszytometrie bestimmt werden.

1.3.4.1. Aggregation nach Born

Die turbidimetrische Aggregationsmessung nach Born wurde im Jahre 1962 entwickelt. Dabei wird die Zunahme der Lichttransmission durch plättchenreiches Citrat-Plasma gemessen, die nach der Stimulation der Thrombozyten mittels ADP, Ristocetin, Arachidonsäure, Epinephrin oder Kollagen aufgrund der Bildung von Thrombozytenaggregaten auftritt [47, 48].

1.3.4.2. Impedanzaggregometrie (Multiplate^R)

Das Messprinzip eines Impedanzaggregometers basiert ebenfalls auf der Tatsache, dass Thrombozyten nach einer Stimulation durch physiologische Agonisten wie ADP, Arachidonsäure, Ristocetin, Thrombin oder Kollagen aktiviert werden und eine Aggregation ausgelöst wird.

Nach erfolgter *in vitro* Aktivierung durch einen dieser Agonisten exprimieren Thrombozyten den Glykoprotein-Rezeptor GpIIb/IIIa, der die Anlagerung der Thrombozyten an die Sensor-Elektroden in der Messzelle ermöglicht. Die Aggregation der Thrombozyten an der Oberfläche der beiden Sensor-Elektroden verursacht eine Zunahme des elektrischen Widerstands (Impedanz) zwischen diesen. Diese Widerstandszunahme wird im zeitlichen Verlauf von 6 Minuten gemessen und in der dimensionslosen Einheit AUC (area under the curve) angegeben [49, 50].

1.3.4.3. Durchflusszytometrische Messung der Thrombozytenaktivierung

Aktivierte Thrombozyten zeigen eine erhöhte Expression von P-Selectin (CD62p) und Granulophysin (CD63), die *in vivo* u.a. die Interaktion mit Endothelzellen und Leukozyten vermitteln [51, 52]. Neben der durchflusszytometrischen Messung der CD62p- und CD63-Expression wird auch die tatsächliche Formierung von Thrombozyten-Leukozyten-Komplexen gemessen, indem man durchflusszytometrisch die Leukozyten erfasst, die neben ihren spezifischen Markern auch einen für Thrombozyten spezifischen Marker aufweisen [53].

1.4. In vitro Antikoagulanzen

Für die Durchführung von Thrombozytenuntersuchungen ist die Hemmung der Blutgerinnung im Probengefäß eine notwendige Voraussetzung. Die Anforderungen an das Antikoagulans umfassen neben der korrekten Abbildung der *in vivo* vorliegenden Situation auch deren zeitliche Stabilität, da zwischen der Blutentnahme und der Messung undefinierte, bzw. nicht immer zu kontrollierende Zeiträume liegen. Abhängig von der Fragestellung ist das jeweils geeignete Antikoagulans zu wählen, da die gerinnungshemmende Wirkung der verschiedenen Antikoagulanzen an unterschiedlichen Stellen des Gerinnungsvorgangs ansetzen und in unterschiedlicher Weise auch die Funktion der Thrombozyten beeinflussen.

1.4.1. Ethylendiamintetraacetat (EDTA)

EDTA wurde bereits in den 1940ziger Jahren auf seine gerinnungshemmenden Eigenschaften untersucht [54] und hat sich seit seiner Einführung im Jahr 1951 [55] als *in vitro* Antikoagulans in der hämatologischen Diagnostik bewährt. Es gilt seit Anfang der 1990ziger Jahre als das Standard-Antikoagulans für die Zählung und Größenbestimmung von Blutzellen [56].

Ethylendiamintetraacetat ist eine mehrprotonige Säure mit der Eigenschaft, Metallionen 1:1 in Metall-EDTA-Komplexen zu binden. Die freien Ca^{2+} -Ionen im Blut gehen eine irreversible Bindung

mit den Carboxylgruppen des EDTA ein und stehen für den Ablauf des Gerinnungsvorgangs nicht mehr zur Verfügung [57]. EDTA wird in den Formulierungen Na₂EDTA, K₂EDTA und K₃EDTA als Antikoagulans verwendet [57, 58]. Obwohl der International Council for Standardization in Hematology (ICSH) die Verwendung von K₂EDTA befürwortet [56], kommt in Teilen der USA und Großbritannien immer noch die K₃EDTA-Formulierung zum Einsatz [57, 58]. Ein bekanntes Phänomen ist der Verlust der diskoiden Form und eine zeitabhängige Zellschwellung von Thrombozyten in EDTA-antikoagulierten Blutproben [57, 59, 60].

1.4.2. Natrium-Citrat

Für Untersuchungen der plasmatischen Gerinnung werden vornehmlich mit Natrium-Citrat antikoagulierte Blutentnahmesysteme verwendet [61]. Bereits im Jahr 1891 wurde von Pekelharing beschrieben, dass die Wirkung von Ca²⁺ auf den Ablauf der Blutgerinnung durch die Zugabe von Natrium-Citrat neutralisiert werden kann [62]. Bei Citrat handelt es sich um das Salz der Citronensäure, das eine Bindung mit freien Ca²⁺-Ionen eingeht und diese damit der Gerinnungskaskade entzieht. Die antikoagulatorische Wirkung von Citrat ist durch die Zugabe von Ca²⁺ zum Probenmaterial reversibel [63]. Wird die Bestimmung von absoluten Zellzahlen aus Citrat-antikoagulierten Blutentnahmesystemen vorgenommen, muss der Verdünnungseffekt durch die Zugabe von flüssigem Citrat beachtet und die Ergebnisse mit einem Faktor von 1,1 korrigiert werden [64]. Aufgrund osmotischer Effekte ist ein im Gegensatz zu EDTA erniedrigtes Thrombozyten- und Erythrozytenvolumen in Citrat-antikoagulierten Blutproben zu beobachten [65]. Neben der labormedizinischen Routine kommt die Citrat-Antikoagulation auch in vivo im Rahmen der renalen Ersatztherapie zum Einsatz [66].

1.4.3. Heparin

Die erstmalige Beschreibung von Heparin geht auf das Jahr 1918 zurück als William Henry Howell und Emmett Holt sich der näheren Identifizierung und Charakterisierung von Gerinnungsfaktoren widmeten. Bereits zwei Jahre zuvor hatte Howells Kollege Jay McLean Extrakte aus Tierlebern gewonnen, die in vitro antikoagulatorische Wirkung zeigten [67]. Howell und Holt griffen McLeans Voruntersuchungen wieder auf und es gelang ihnen, ein Phosphatid zu extrahieren, das aufgrund seines mengenmäßig hohen Anteils in der Leber fortan als Heparin bezeichnet wurde [68]. In der Labormedizin wird Heparin in den Formulierungen Lithium-Heparinat oder Natrium-Heparinat für die Untersuchung von klinisch-chemischen Parametern und Elektrolyten im Blutplasma genutzt [69]. Es kommt im menschlichen Organismus in hoher Konzentration in den Gewebe-Mastzellen der

Leber, der Lunge und der Dünndarm-Mukosa vor. Das industriell hergestellte und in der Medizin angewandte Heparin wird u.a. aus der Darmmukosa von Schweinen und aus Rinderlungen gewonnen. Heparin wirkt dadurch gerinnungshemmend, dass es die Aktivierung von Antithrombin III (AT III) um ein vielfaches verstärkt [70, 71]. Antithrombin ist ein 58 kDa großes Glykoprotein, das unter physiologischen Bedingungen in einer Konzentration von ca. 125 µg/ml im menschlichen Blut vorkommt. Es wirkt als Serin-Proteaseinhibitor und führt daher zur Inaktivierung der Gerinnungsfaktoren IXa, Xa, XIa, XIIa und Thrombin [72]. Unter physiologischen Bedingungen verläuft dieser Prozess langsam, da AT III nur eine geringe Reaktivität aufweist. Die Bindung von Heparin an AT III führt zu dessen Konformitätsänderung und einer damit einhergehenden erhöhten Reaktivität gegenüber den Faktoren Xa, IXa und Thrombin [69, 73].

1.4.4. Hirudin

Bereits im Jahr 1884 beschrieb John Haycraft in seiner Arbeit: „*Ueber die Einwirkung eines Secretes des officinellen Blutegels auf die Gerinnbarkeit des Blutes*“ Experimente, die sich mit den antikoagulativen Eigenschaften des Speichels von Blutegeln befassten [74]. Hirudin leitet sich namentlich vom Blutegel *Hirudo medicinalis* ab und wirkt durch die Hemmung von Thrombin antikoagulatorisch. Es bindet mit hoher Affinität und verhindert dadurch die Thrombin-induzierte Umwandlung von Fibrinogen zu Fibrin [75]. Da die Zusammensetzung und Konzentration der Elektrolyte im Probenmaterial nicht beeinflusst wird, sind Hirudin-antikoagulierte Blutentnahmesysteme für die Untersuchung der Thrombozytenfunktion geeignet und kommen am Multiplate-Analyser zum Einsatz [49].

1.4.5. Magnesiumsulfat

Julius Bizzozero beschrieb Magnesiumsulfat im Jahr 1882 als „das beste gerinnungswidrige Salz“, das vorher schon von Hayem (1878) und Hoffman (1881) experimentell eingesetzt wurde, um Blutproben auf gläsernen Objektträgern mikroskopisch untersuchen zu können [4]. Im Jahr 1909 antikoagulierte Anton Fonio mit einer 14-prozentigen Magnesiumsulfatlösung kapilläres Blut für die mikroskopische Thrombozytenzählung [37].

1986 verwendete die japanische Arbeitsgruppe um Nakamoto Magnesiumsulfat erfolgreich als in vitro Antikoagulans, um die tatsächliche Thrombozytenzahl bei Fällen von EDTA-induzierter Pseudothrombozytopenie zu bestimmen [76]. Da die Ergebnisse dieser Studie nur in einem japanischen Journal publiziert wurden, blieben sie einer breiten öffentlichen Kenntnisnahme vorenthalten. Auch eine 2002 publizierte Arbeit über hämatologische Untersuchungen an MgSO₄-

antikoaguliertem Blut von Kondo und Kollegen führte nicht zu einer breiten Anwendung von Magnesiumsulfat als Antikoagulans im hämatologischen Routinebetrieb [77]. Eine im Jahr 2013 von der eigenen Arbeitsgruppe veröffentlichte Arbeit zur Korrektur der Thrombozytenzahl bei Fällen von EDTA-induzierter Pseudothrombozytopenie mittels MgSO_4 -antikoagulierter Blutentnahmesysteme [78] hatte die kommerzielle Einführung von Magnesiumsulfat als in vitro Antikoagulans in die labormedizinische Routine zur Folge.

Die vielfältige Wirkung von Magnesiumsalzen auf die Gerinnung, sowohl auf zellulärer als auch auf plasmatischer Ebene wurde in verschiedenen Untersuchungen beschrieben [79–81]. So konnte u.a. eine dosisabhängige Hemmung der thrombozytären Thromboxan A₂-Synthese [79] und die Hemmung der mittels ADP und Arachidonsäure induzierbaren Thrombozytenaggregation [78] durch Mg^{2+} nachgewiesen werden.

1.5. Antikoagulanzen-induzierte Pseudothrombozytopenie

Die erstmalige Beschreibung einer Agglutination von Thrombozyten durch einen Serum-Faktor in EDTA-antikoaguliertem Blut geht auf das Jahr 1969 zurück [82]. Die Prävalenz dieses in vitro Phänomens wird in der Literatur mit 0,1 % bis 0,21 % angegeben [58, 83]. Umgekehrt sind allerdings 1,25 % bis 15,3 % aller thrombopenischen Patienten pseudothrombozytopenische Fälle (PTCP) [57]. Grundlage einer EDTA-induzierten PTCP sind Auto-Antikörper, die sich gegen den thrombozytären Fibrinogen-Rezeptor GpIIb/IIIa richten, der durch EDTA demaskiert wird. Da ein solches Phänomen auch für andere in vitro Antikoagulanzen beschrieben ist und teilweise kombinierte Unverträglichkeiten auftreten, spricht man auch von Antikoagulanzen-induzierter PTCP [84–86].

2. Fragestellung

In vorangegangenen Untersuchungen hat sich Magnesiumsulfat als in vitro Antikoagulans für die Korrektur der Thrombozytenzahl bei Fällen von Antikoagulanzen-induzierter Pseudothrombozytopenie bewährt [78, 86]. Allerdings setzt das eine erneute Blutentnahme voraus.

Wird eine vorliegende Pseudothrombozytopenie nicht als solche erkannt, so besteht die Gefahr, dass aufgrund der niedrigen Thrombozytenzahlen therapeutische Fehlentscheidungen getroffen werden [87]. Hinzu kommt, dass eine Pseudothrombozytopenie in einigen Fällen, aufgrund der fehlerhaften Messung von Aggregaten als Leukozyten, mit einer Pseudoleukozytose einhergeht [88].

Nachdem die $MgSO_4$ -antikoagulierte Monovette zum Ausschluss einer PTCP zunehmend Akzeptanz in den Routinelaboratorien fand, ergab sich die Frage, ob diese nicht auch als Standard für die Messung des gesamten Blutbildes und/oder thrombozytärer Marker und Funktionen alternativ zur EDTA- und Citrat-Antikoagulation zur Anwendung kommen kann. Hierdurch würde sich die parallele Blutentnahme eines EDTA-Probenröhrchens erübrigen. Zur Beantwortung dieser Frage sind Untersuchungen zur zeitlichen Stabilität und zur Reproduzierbarkeit der gemessenen Parameter, sowie zur Abhängigkeit von der verwendeten Gerätetechnologie notwendig. Eine weitere Frage ist, inwieweit die verschiedenen Antikoagulanzen die Thrombozytenparameter beeinflussen, da antikoagulanzenbedingte Veränderungen von Blutbild- oder Funktionsparametern mit in die Bewertung von Magnesiumsulfat als alternatives in vitro Antikoagulans einzubeziehen sind.

3. Material und Methoden

3.1. Patienten, Probanden

Die Untersuchungen im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden an unterschiedlichen Patienten-, bzw. Probandenkollektiven durchgeführt. Die Einwilligung der Patienten, der Blutspender und der freiwilligen Probanden (Studierende und Labormitarbeiter), ihre Blutproben für die wissenschaftlichen Untersuchungen zur Verfügung zu stellen, wurde schriftlich dokumentiert, nachdem die Patienten, bzw. Blutspender und Probanden über die Ziele der vergleichenden Untersuchungen und die den Untersucher verpflichtende Datenanonymisierung informiert worden waren.

Für die Untersuchungen war zuvor ein zustimmendes Votum der Ethikkommission eingeholt worden (Registrierungsnummer: A 2011/44).

Ein Teil der Untersuchungen wurde in kooperierenden externen Laboratorien durchgeführt:

Universitätsklinikum Carl Gustav Carus Dresden; Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin, Direktorin Frau Prof. Dr. G. Siegert.

SLK Kliniken Heilbronn GmbH; Institut für Laboratoriumsmedizin, Chefarzt Priv.-Doz. Dr. Dr. A. Pickert.

Tabelle I: Übersicht über die an unterschiedlichen Patienten- und Probandenkollektiven durchgeführten Untersuchungen.

Untersuchung	Kollektiv	Personenzahl (n)
Vergleich der Blutbildparameter	Rostocker Patienten	100
Gerätevergleich	Rostocker Patienten	61
Blutbildvergleich, Zeitkinetik	Rostocker Probanden	20
Thrombozytenaktivierung, Thrombozytenfunktion	Rostocker Probanden	6 / 14
Blutbildvergleich, Zeitkinetik	Heilbronner Probanden	9
Thrombozyten-Leukozyten-Interaktion	Dresdner Probanden	24

3.2. Blutentnahme

Alle Untersuchungen wurden in venösem Blut, das schonend bei geöffnetem Stauschlauch aus der Kubitalvene entnommen wurde, durchgeführt. Das Blut wurde in unterschiedlich antikoagulierte Entnahmeröhrchen aufgenommen (EDTA: *S-Monovette^R EDTA K 2,6 ml*, MgSO₄: *S-Monovette^R ThromboExact 2,7 ml*, Citrat: *S-Monovette^R Coagulation 2,9 ml* und Hirudin: *S-Monovette^R Hirudin 2,7 ml*; Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland). Die entnommenen Blutproben wurden vorsichtig aber gründlich durch mehrmaliges Schwenken durchmischt, um eine optimale Antikoagulation und Zellverteilung zu erreichen.

Die Patientenproben wurden in den Poliklinischen Ambulanzen abgenommen, sodass ein zeitnahes Eintreffen im Labor gewährleistet war und die Messungen spätestens 30 bis 60 Minuten nach der Blutentnahme durchgeführt werden konnten.

Die Blutentnahmen für die zeitkinetischen und durchflusszytometrischen Untersuchungen erfolgten direkt im Labor, um spätestens 10 Minuten nach der Blutentnahme mit der Messung beginnen zu können.

Die unterschiedlich antikoagulierten Blutproben wurden zwischen den einzelnen Messpunkten bei Raumtemperatur gelagert. Bei Messungen im Citrat-Blut wurde der durch den Citratzusatz bedingte Verdünnungseffekt mit dem Faktor 1,1 korrigiert.

3.3. Bestimmung der Parameter des Kleinen und Großen Blutbildes

3.3.1. Ermittlung der Thrombozytenzahl und des mittleren Thrombozytenvolumens

Um den Einfluss der unterschiedlichen Antikoagulanzen und der unterschiedlichen apparativen Messmethoden auf die Thrombozytenzahl und das mittlere Thrombozytenvolumen zu untersuchen, kamen 3 verschiedene apparative Gerätetechnologien zum Einsatz:

1. XE 5000 (Sysmex, Norderstedt, Deutschland)
2. UniceL DxH 800 Coulter (Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland)
3. Advia 120 (Siemens Healthcare Diagnostics, Eschborn, Deutschland)

Sowohl mit dem XE 5000, als auch mit dem DxH 800 erfolgt die Bestimmung der Thrombozytenparameter mit Hilfe der Impedanzmessung, d.h. der Änderung des elektrischen Widerstands, die wiederum abhängig vom Volumen der die Messkammer durchtretenden Zelle ist. Die Thrombozytenzahl entspricht der Anzahl an Impulsen, die durch Zellen mit einem Volumen zwischen 2 fl und 30 fl ausgelöst werden [39]. Das mittlere Thrombozytenvolumen wird durch

Division des Thrombokrits (Summe der gemessenen Plättchenvolumina) durch die Zahl der gemessenen Thrombozyten errechnet und als MPV angegeben [89]. Darüber hinaus verfügt der XE 5000 mit der Fluoreszenzmessung von Nukleinsäuren im Retikulozytenkanal über eine weitere Möglichkeit zur Bestimmung der Thrombozytenzahl [90].

Der Advia 120 arbeitet ausschließlich auf optischer Grundlage, der sogenannten Streulichtmethode. Dabei werden die Zellen mittels des iso-osmotischen *RBC/plt*-Reagenz in eine sphärische Form gebracht. Sie passieren anschließend einen Kleinwinkel-Scatter (2° bis 3°), der Informationen über die Zellvolumina liefert (MCV, bzw. MPV), und einen Großwinkel-Scatter (5° bis 15°), der Aufschluss zur Komplexität des Zellinneren (Refraktionsindex) gibt. Der Refraktionsindex dient zur Unterscheidung der Thrombozyten von Zelltrümmern, insbesondere Erythrozyten-Fragmenten und lässt Rückschlüsse auf die tatsächliche Zahl und laut Literatur möglicherweise auch auf den Aktivierungsgrad der Thrombozyten zu [42, 91, 92].

Die unterschiedlich antikoagulierten Vollblutproben wurden weitgehend zeitgleich gemessen, sowohl für die einmaligen Messungen (Patientenkollektiv), als auch für die Erfassung von Veränderungen in zeitlich definierten Abständen nach 0, 20, 40, 60 und 180 Minuten, bzw. nach 0, 4 und 24 Stunden; in dem Blutspenderkollektiv Heilbronn nach 0, 4, 6, 8, 12 und 24 Stunden. Zwischen den Messungen wurden die Vollblutproben bei Raumtemperatur gelagert.

3.3.2. Apparative Bestimmung weiterer Parameter des Kleinen Blutbildes und des Differentialblutbildes

Bei dem Rostocker Patientenkollektiv wurden aus den unterschiedlich antikoagulierten Vollblutproben neben den Thrombozytenparametern, die Erythrozyten- und Leukozytenzahlen, das Hämoglobin, der Hämatokrit sowie die Winthrobe-Indices am XE 5000 bestimmt und verglichen.

In einem anderen Probandenkollektiv (Heilbronn) wurden die Veränderungen der Differentialblutbilder über die Zeit (0, 4, 6, 8, 12 und 24 Stunden) und in Abhängigkeit vom verwendeten Antikoagulans (EDTA, Citrat und Magnesiumsulfat) untersucht und miteinander verglichen.

3.3.3. Untersuchungen zur zeitabhängigen färberischen und morphologischen Integrität von Leukozyten

Um die Zeitabhängigkeit des Einflusses der zu untersuchenden Antikoagulanzen nicht nur auf die maschinell ermittelten Leukozytenzahlen, sondern auch auf deren Anfärbbarkeit und die morphologische Integrität hin zu untersuchen, wurden die in den entsprechenden Zeitintervallen angefertigten Blutausstriche von 3 Probanden aus dem Heilbronner Probandenkollektiv verblindet mit Hilfe der digitalen Mikroskopie (Cellavision™ DM96, Siemens Healthcare Diagnostics, Eschborn, Deutschland) auf morphologische Änderungen der Neutrophilen hin untersucht.

In Vorversuchen habe ich solche Veränderungs- oder Schädigungszeichen zu definieren und nach Schädigungsgrad wie folgt zu klassifizieren versucht:

Morphologisch unauffällig (Veränderungen Grad 0)

Regelrechte runde Zellkonfiguration mit gleichmäßiger Granulierung des Zytoplasmas, sowie gut abgrenzbare, segmentierte Zellkerne mit unauffälligem Kernchromatin.

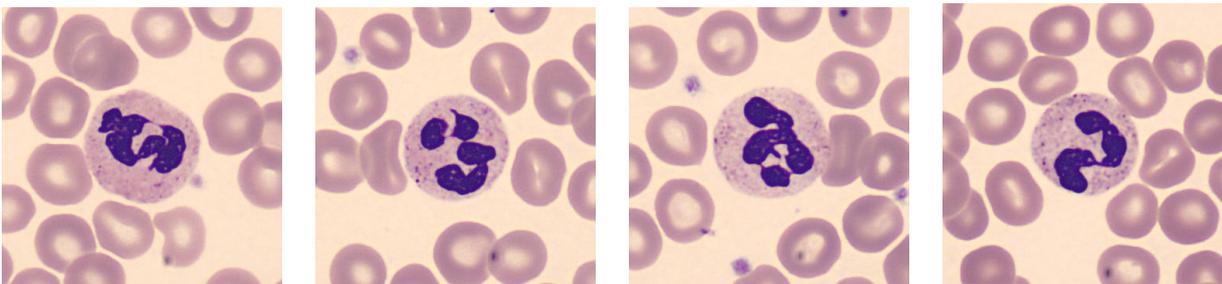


Abb. 1 a: Aufnahmen von Neutrophilen, deren morphologische Integrität dem Grad 0 entspricht.

Morphologische Veränderungen: Grad I

Beginnende Rarifizierung der zytoplasmatischen Granulierung. Membrannahe Aufhellungen mit kontrastarmer Membrankontur bei erhaltener runder Zellkonfiguration. Form und Chromatin-Beschaffenheit des Kerns unauffällig.

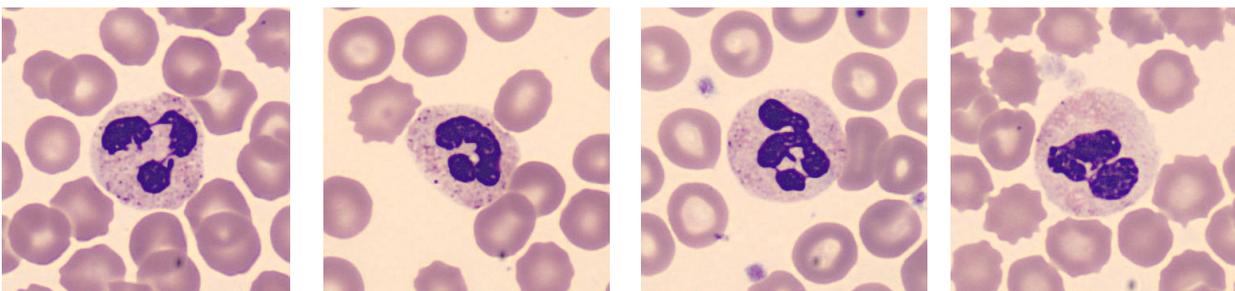


Abb. 1 b: Aufnahmen von Neutrophilen, deren morphologische Integrität dem Grad I entspricht.

Morphologische Veränderungen: Grad II

Weitergehende Rarifizierung der Zytoplasmagranulierung mit homogen aufgehellten Arealen und zunehmender Vakuolisierung des Zytoplasmas bei noch weitgehend erhaltener Zellform. Beginnende Verdichtung des Kernchromatins.

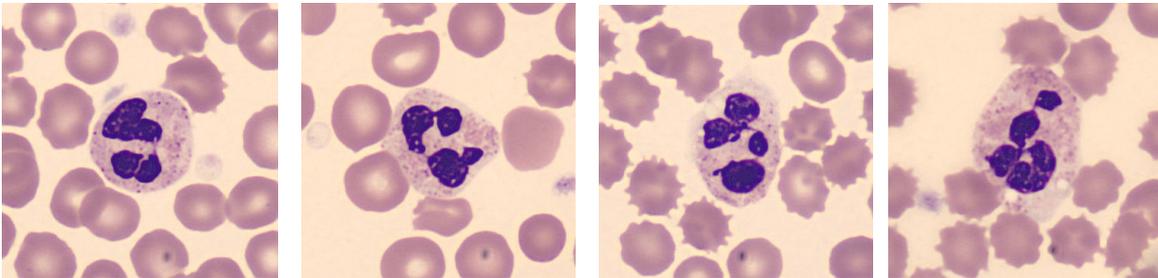


Abb. 1 c: Aufnahmen von Neutrophilen, deren morphologische Integrität dem Grad II entspricht.

Morphologische Veränderungen: Grad III

Weiterer Verlust der Zytoplasmagranulation mit Bildung größerer, z.T. konfluierender Vakuolen. Stellenweise Auflösung der Zellmembran und Entrundung der Zellform. Verdichtung des Zellchromatins und Aufhebung der ursprünglichen Kernkonfiguration.

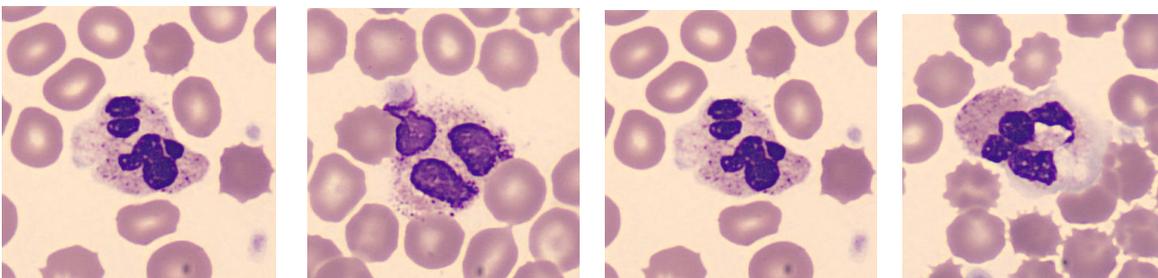


Abb. 1 d: Aufnahmen von Neutrophilen, deren morphologische Integrität dem Grad III entspricht.

Morphologische Veränderungen: Apoptose

Klassische Vorstufe des programmierten Zelltodes mit typischer Chromatinverdichtung und Abschnürung von Kernsegmenten, die in der Regel eine kugelige Form annehmen und ausgestoßen werden.

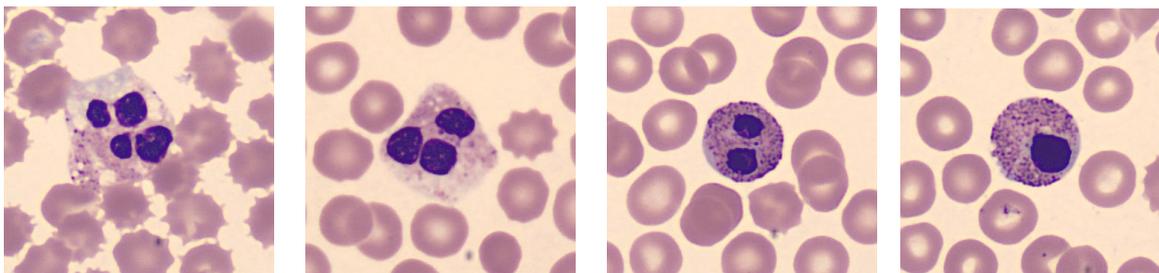


Abb. 1 e: Aufnahmen von Neutrophilen, die Zeichen von Apoptose zeigen.

3.4. Durchflusszytometrische Bestimmung der Expression von Thrombozytenaktivierungs-Markern in unterschiedlich antikoagulierten Vollblutproben

Die spontane und durch Agonisten induzierte Expression von Thrombozytenaktivierungs-Markern in unterschiedlich antikoagulierten Vollblutproben (EDTA, Citrat und MgSO₄) wurde am Mehrfarben-Durchflusszytometer (Navios™, Beckman Coulter; Krefeld, Deutschland) untersucht. Dazu wurden Fluorochrom-markierte Antikörper, welche gegen die Aktivierungsmarker CD62p (P-Selectin) und CD63 (Granulophysin) gerichtet sind, verwendet. Zur Identifizierung der Thrombozyten wurde ein gegen CD41 gerichteter Antikörper eingesetzt.

Die Blutentnahme bei den 6 Probanden erfolgte im Labor, sodass ein möglichst zeitnaher Beginn der Messungen sichergestellt wurde.

Entsprechend eines vorgegebenen Protokolls wurde dann wie folgt vorgegangen:

1. Herstellung einer 10 % BSA-Pufferlösung (Bovine Serum Albumin).
2. Blutabnahme und Bestimmung der Thrombozytenzahl am XE 5000 (Sysmex, Norderstedt, Deutschland)
3. Ansatz einer Blut-Puffer-Suspension (eingestellt auf 10 000 Plättchen / ml)
4. Inkubation von 40 µl der Suspension mit 2,5 µl Anti-CD62p, 2,5 µl Anti-CD63 und 2,5 µl Anti-CD41 bei 37°C für 5 min.
- 4a. Parallele Inkubation von 36 µl der Suspension mit 4 µl ADP, bzw. Arachidonsäure bei 37°C für 10 min.
- 4b. Anschließende Inkubation von 40 µl der stimulierten Suspension mit 2,5 µl Anti-CD62p, 2,5 µl Anti-CD63 und 2,5 µl Anti-CD41 bei 37°C für 5 min.
5. Zugabe von 2 ml der BSA-Pufferlösung.
6. Messung am Durchflusszytometer (Navios, Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland).

Tabelle II: Eingesetzte Materialien und Geräte für die Messung der Thrombozytenaktivierung.

Blutentnahmesystem/ Antikoagulans	Hersteller	Niederlassung
S-Monovette ^R EDTA K 2,6 ml EDTA	Sarstedt AG & Co.	Nümbrecht, Deutschland
S-Monovette ^R ThromboExact 2,7 ml MgSO ₄		
S-Monovette ^R Coagulation 2,9 ml Citrat		
Gerät	Hersteller	Niederlassung
Navios	Beckman Coulter GmbH	Krefeld, Deutschland
Antikörper / Fluorochrom	Hersteller	Niederlassung
Anti-CD41 / PE-Cy7	BioLegend Inc.	San Diego, USA
Anti-CD62 / FITC		
Anti-CD63 / APC		
Zubehör	Hersteller	Niederlassung
Albumin, Bovine 500g	Sigma Chemical Co.	St.Louis, USA
IsoFlow Sheath Fluid	Beckman Coulter GmbH	Krefeld, Deutschland
ADP (2×10^{-4} M)	möLab GmbH	Langenfeld, Deutschland
Arachidonsäure (5 mg/ml)	möLab GmbH	Langenfeld, Deutschland
Centrifuge Tube 50 ml	Greiner Bio-One GmbH	Frickenhausen, Deutschland

3.5. Impedanzaggregometrische Messung der Thrombozytenfunktion in unterschiedlich antikoagulierten Vollblutproben

Um den Einfluss der unterschiedlichen in vitro Antikoagulation auf die mittels Impedanzaggregometrie messbare Thrombozytenfunktion zu untersuchen, wurden Messungen mit Citrat-, MgSO₄- und Hirudin-antikoagulierten Vollblutproben am Gerät Multiplate^R durchgeführt. Die Stimulation der Thrombozyten erfolgte durch ADP, TRAP, Kollagen, Ristocetin und Arachidonsäure.

Tabelle III: Eingesetzte Materialien und Geräte für die Thrombozytenfunktionsmessung.

Blutentnahmesystem/ Antikoagulans	Hersteller	Niederlassung
S-Monovette Hirudin 2,7 ml Hirudin	Sarstedt AG & Co.	Nümbrecht, Deutschland
S-Monovette ThromboExact 2,7 ml MgSO ₄		
S-Monovette Coagulation 2,9 ml Citrat		
Gerät	Hersteller	Niederlassung
Multiplate analyzer	Roche Diagnostics Ltd.	Mannheim, Deutschland
Reagenzien	Hersteller	Niederlassung
ADPtest 3 x 1 ml (0,2 mM)	Roche Diagnostics Ltd.	Mannheim, Deutschland
COLtest 3 x 1 ml (100 µg/ml)		
RISTOtest 3 x 1 ml (10 mg/ml)		
ASPItest 3 x 1 ml (15 mM)		
TRAPtest 3x 1 ml (1 mM)		
Zubehör	Hersteller	Niederlassung
Aqua B.Braun Ecotainer 1000 ml	B.Braun Melsungen AG	Melsungen, Deutschland
Test cell	Roche Diagnostics Ltd.	Mannheim, Deutschland
Eppendorf Safe-Lock Tubes 0,5 ml	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland

3.6. Durchflusszytometrische Untersuchungen zur Erfassung von Thrombozyten-Leukozyten-Komplexen in unterschiedlich antikoagulierten Vollblutproben

Um die Interaktionen zwischen Thrombozyten und Leukozyten, insbesondere den Monozyten, Granulozyten und Lymphozyten zu untersuchen, wurden am FACS Canto II der Firma BD Bioscience eine semiquantitative durchflusszytometrische Bestimmung des Anteils an CD42b-positiven Zellen an unterschiedlichen Leukozytenpopulationen durchgeführt.

Zur Identifizierung der Leukozyten wurde ein fluorochrom-markierter Antikörper gegen CD45 eingesetzt. Um innerhalb der gesamten Leukozyten die Population der Monozyten zu identifizieren, wurde zusätzlich ein fluorochrom-markierter Antikörper gegen CD14 verwendet.

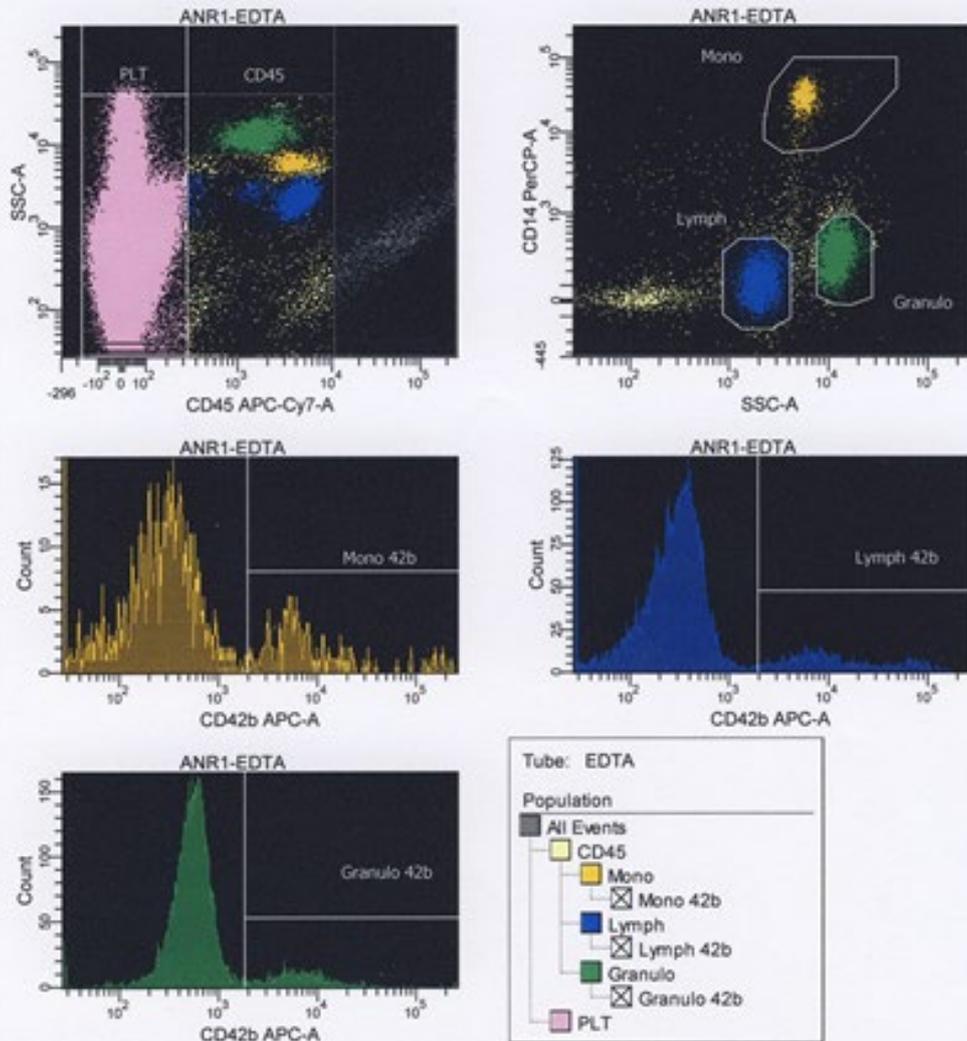
Die Vorbereitung und Durchführung der Messungen sind im Folgenden dargestellt:

1. Blutabnahme in EDTA, Citrat und MgSO₄ und anschließende Messung des Differential-Blutbildes am XE 5000.
2. Senkrechte Lagerung der Monovette für 2 Stunden. Durch die Sedimentation der Erythrozyten entsteht ein plättchenreiches Plasma im Überstand.
3. Abpipettieren des Überstandes.
4. 200 µl Überstand werden mit 400 µl Puffer (CellWASH) gemischt
5. In ein leeres Tube werden 2,5 µl Anti-CD14, 2,5 µl Anti-CD45 und 10 µl Anti-CD42b vorgelegt.
6. Zugabe von 100 µl der Verdünnung (von Punkt 4).
7. Inkubation für 15 min in Dunkelheit bei Raumtemperatur.
8. Zugabe von 500 µl Puffer (CellWASH)
9. Messung am Durchflusszytometer (FACS Canto II).

Tabelle IV: Eingesetzte Materialien und Geräte zur Bestimmung der Leukozyten-Thrombozyten-Interaktion.

Blutentnahmesystem / Antikoagulans	Hersteller	Niederlassung
S-Monovette ^R EDTA K 2,6 ml EDTA	Sarstedt AG & Co.	Nümbrecht, Deutschland
S-Monovette ^R ThromboExact 2,7 ml MgSO ₄		
S-Monovette ^R Coagulation 2,9 ml Citrat		
Gerät / Software	Hersteller	Niederlassung
BD FACS Canto II / BD FACS Diva	BD Bioscience	Heidelberg, Deutschland
Antikörper / Fluorochrom	Hersteller	Niederlassung
Anti-CD42b / APC Anti-CD45 / APC-H7 Anti-CD14 / PerCP-Cy 5.5	BD Pharmingen	Heidelberg, Deutschland
Zubehör	Hersteller	Niederlassung
CellWASH (Puffer) Cytometer Setup & Tracking Beads (Qualitätskontrolle) Falcon Tubes	BD Biosciences	Heidelberg, Deutschland

FACSDiva Version 6.1.3



Experiment Name: PLT_WBC [] -edta
 Specimen Name: ANR1
 Tube Name: EDTA
 Record Date: Oct 6, 2015 4:31:53 PM
 S_{OP}: Tiebel
 GUID: 9b8e240e-b82b-4c82-8521-c4dc3a35c15d

Population	#Events	%Parent	CD42b APC-A Mean	CD42b APC-A Median
All Events	1,424,920	###	6,225	5,098
CD45	12,710	0.9	4,721	451
Mono	1,011	8.0	3,427	239
⊗ Mono 42b	157	15.5	21,045	6,122
Lymph	5,516	43.4	3,493	310
⊗ Lymph 42b	733	13.3	24,431	9,168
Granulo	4,605	36.2	2,270	581
⊗ Granulo 42b	554	12.0	14,723	6,812
PLT	1,410,557	99.0	6,221	5,124

Abb. 2: Ausdruck der FACSDiva-Auswertungssoftware zur Thrombozyten-Leukozyten-Interaktion.

3.7. Statistische Auswertungen

Die statistische Auswertung der Messwerte (Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben und Spearman-Rangkorrelation), sowie die Erstellung der Graphiken wurden mit der Software SigmaPlot 11.0, bzw. Excel 2013 durchgeführt. Der Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben (Wilcoxon signed rank test) ist ein Rangsummentest, der die Differenzen der entsprechenden Wertepaare in aufsteigender Reihenfolge ordnet und ihnen Ränge zuweist. Anhand der Rangzahlen wird die Testgröße „z“ errechnet. Ist sie größer als 1,96, liegt bei einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ ein statistisch signifikanter Unterschied vor. [93, 94]. Die Spearman-Rangkorrelation errechnet das Maß für die Stärke des Zusammenhangs zweier ordinalskalierten Merkmale. Der Korrelationskoeffizient nach Spearman kann Werte von -1 (starke negative Korrelation) bis +1 (starke positive Korrelation) annehmen [94]. Um die Verteilung der Messwerte innerhalb der jeweiligen Gruppe zu zeigen, wurde die Boxplot-Darstellung gewählt. Eine Box umfasst die Messwerte innerhalb der 25ten und der 75ten Perzentile und enthält somit 50 % der Messwerte. Der Median wird durch eine Linie innerhalb der Box dargestellt. Die beiden Antennen repräsentieren die 10te, bzw. die 90te Perzentile, die Punkte unterhalb, bzw. oberhalb der Antennen stehen für die 5te, bzw. die 95te Perzentile. Die Boxplot-Darstellung erlaubt somit den graphischen Vergleich der Lage und Verteilung von Messwerten innerhalb einer Gruppe von Proben [95].

4. Ergebnisse

4.1. Vergleich der an verschiedenen automatischen Hämatologieanalysatoren gemessenen Thrombozytenzahl und des Thrombozytenvolumens in EDTA- und MgSO₄-antikoagulierten Vollblutproben

Die Thrombozytenzahlen und die mittleren Plättchenvolumina wurden in zeitgleich entnommenen EDTA- und MgSO₄-antikoagulierten Vollblutproben von 61 Patienten an den automatischen Hämatologieanalysatoren XE 5000, DxH 800 und Advia 120 gemessen. Die Messungen wurden 4 Stunden, bzw. 24 Stunden nach Probenentnahme wiederholt.

4.1.1. Vergleich der Thrombozytenzahl

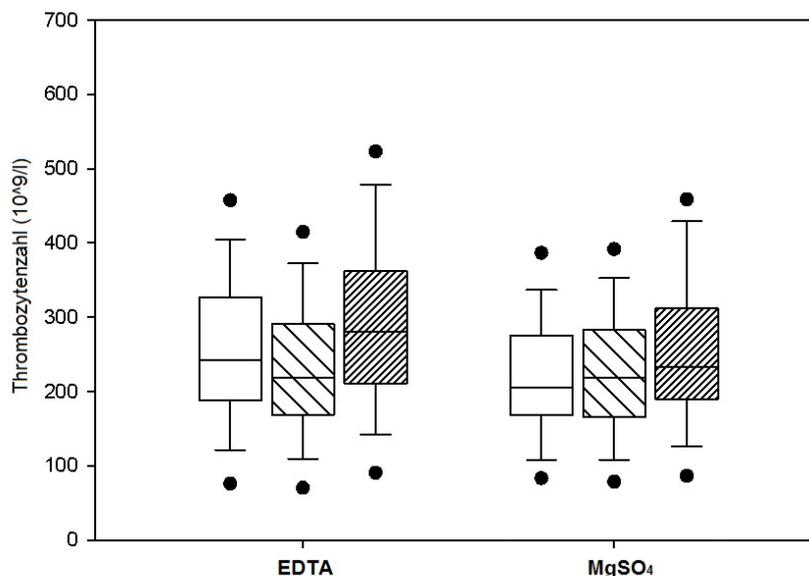


Abb. 3: Vergleich der parallel an drei verschiedenen Messgeräten gemessenen Thrombozytenzahl aus zeitgleich entnommenen EDTA- und MgSO₄-antikoagulierten Vollblutproben von 61 Patienten [XE 5000 (nicht schraffiert); DxH 800 (grob liniert); Advia 120 (fein liniert)].

Abbildung 3 zeigt die an verschiedenen Hämatologiegeräten gemessene Thrombozytenzahl. In den EDTA-antikoagulierten Vollblutproben beträgt sie für den XE 5000 im Mittel 258,9 +/- 104,0*10⁹/l (Median: 242*10⁹/l) und für den DxH 800 im Mittel 234,1 +/- 95,3*10⁹/l (Median: 219*10⁹/l), bzw. 292,9 +/- 121,0*10⁹/l (Median: 280*10⁹/l) bei Messung am Advia 120.

Die Thrombozytenzahl der zeitgleich entnommenen MgSO₄-antikoagulierten Vollblutproben beträgt 219,1 +/- 86,3*10⁹/l (Median: 205*10⁹/l) am XE 5000, 221,9 +/- 88,8*10⁹/l (Median:

218*10⁹/l) am DxH 800 und 252,0 +/- 104,9*10⁹/l (Median: 233*10⁹/l) am Advia 120. Die statistische Bewertung der Differenzen ist in Tabelle V zusammengefasst. Die Resultate aller Messgeräte unterscheiden sich sowohl bei den EDTA-, als auch bei den MgSO₄-antikoagulierten Proben signifikant voneinander. Eine Ausnahme stellt bei den MgSO₄-antikoagulierten Proben der Messwertvergleich vom XE 5000 zum DxH 800 dar. Die Differenzen der in EDTA- und MgSO₄-Proben gemessenen Thrombozytenzahlen sind statistisch signifikant, unabhängig vom verwendeten Messgerät.

Tabelle V: Statistische Bewertung (Wilcoxon signed rank test) der Differenzen der Thrombozytenzahlen, gemessen in unterschiedlich antikoagulierten Vollblutproben an drei verschiedenen Hämatologieautomaten (p < 0,001 = hoch signifikant; n.s. = nicht signifikant).

Gerätevergleich	EDTA	MgSO ₄	Gerät	EDTA vs. MgSO ₄
XE 5000 vs. DxH 800	p < 0,001	n.s.	XE 5000	p < 0,001
XE 5000 vs. Advia 120	p < 0,001	p < 0,001	DxH 800	p < 0,001
DxH 800 vs. Advia 120	p < 0,001	p < 0,001	Advia 120	p < 0,001

4.1.2. Vergleich des mittleren Plättchenvolumens (MPV)

Wie Abbildung 4 zu entnehmen ist, beträgt das MPV in EDTA-antikoagulierten Proben 10,4 +/- 1,0 fl (Median: 10,2 fl), wenn die Messung am XE 5000 durchgeführt wird. Die am DxH 800, bzw. am Advia 120 gemessenen Volumina betragen im Mittel 8,8 +/- 1,1 fl (Median: 8,6 fl), bzw. 8,5 +/- 1,0 fl (Median: 8,3 fl).

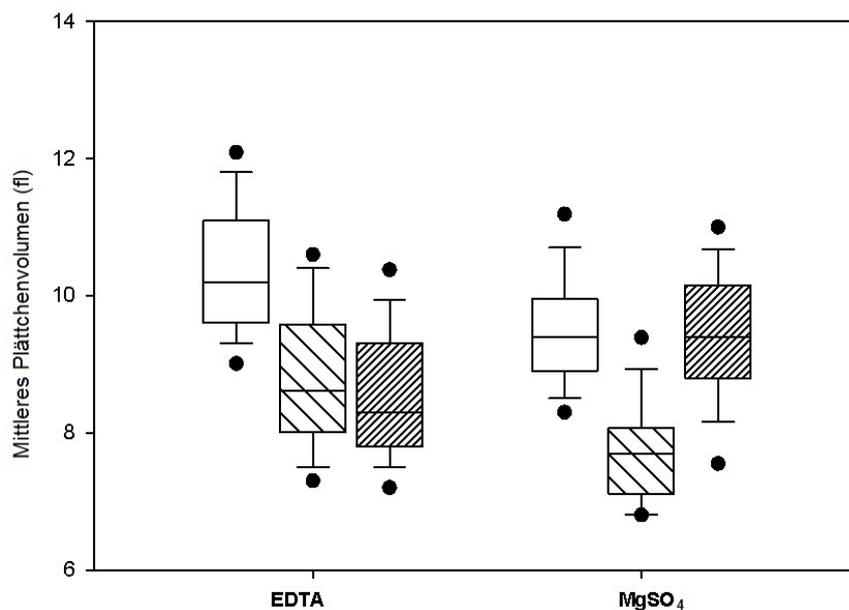


Abb. 4: Vergleich der parallel an drei verschiedenen Messgeräten gemessenen mittleren Plättchenvolumina aus zeitgleich entnommenen EDTA- und MgSO₄- antikoagulierten Vollblutproben von 61 Patienten [XE 5000 (nicht schraffiert); DxH 800 (grob liniert); Advia 120 (fein liniert)].

In MgSO₄-antikoagulierten Proben beträgt das mittlere MPV 9,5 +/- 0,8 fl (Median: 9,4 fl), wenn die Messung am XE 5000 vorgenommen wird, am DxH 800 7,7 +/- 0,8 fl (Median: 7,7 fl) und am Advia 120 werden 9,4 +/- 0,9 fl (Median: 9,4 fl) gemessen. In der Tabelle VI sind die statistischen Signifikanzniveaus der Differenzen der ermittelten MPV-Werte zusammengefasst. Für die EDTA-Proben gilt: Die Messwerte aller Messgeräte unterscheiden sich signifikant voneinander. Das gilt auch für die Werte der MgSO₄-Proben, die sich signifikant voneinander unterscheiden, mit Ausnahme des Vergleichs XE 5000 zum Advia 120. Die Differenzen der in EDTA- und MgSO₄-Proben gemessenen Thrombozytenvolumina sind statistisch hochsignifikant, unabhängig vom verwendeten Messgerät.

Tabelle VI: Statistische Bewertung (Wilcoxon signed rank test) der Differenzen der Thrombozytenvolumina, gemessen in unterschiedlich antikoagulierten Vollblutproben an drei verschiedenen Hämatologieautomaten (p < 0,001 = hoch signifikant; n.s. = nicht signifikant).

Gerätevergleich	EDTA	MgSO ₄	Geräte	EDTA vs. MgSO ₄
XE 5000 vs. DxH 800	p < 0,001	p < 0,001	XE 5000	p < 0,001
XE 5000 vs. Advia 120	p < 0,001	n.s.	DxH 800	p < 0,001
DxH 800 vs. Advia 120	p < 0,001	p < 0,001	Advia 120	p < 0,001

Abbildung 5 zeigt die in EDTA-antikoagulierten Vollblutproben ermittelten Thrombozytenzahlen und mittleren Plättchenvolumina der 61 Patienten in aufsteigender Reihenfolge und die Werte der jeweils zugehörigen MgSO₄-antikoagulierten Vollblutproben. Hierbei wird deutlich, dass sich die Thrombozytenzahlen in den verschiedenen antikoagulierten Vollblutproben nicht nur im Mittel voneinander unterscheiden, sondern fast ausnahmslos eine höhere Thrombozytenzahl in EDTA-antikoagulierten Proben gemessen wird als in den entsprechenden MgSO₄-antikoagulierten Proben. Das gilt auch für die mittels Impedanz-Messverfahren gemessenen MPV-Werte. Bei der streulicht-optischen Methode des Advia 120 ergibt sich eine deutlich andere Wertelage. Hier werden in den EDTA-antikoagulierten Proben fast ausschließlich niedrigere mittlere Plättchenvolumina gemessen als in den korrespondierenden MgSO₄-antikoagulierten Proben.

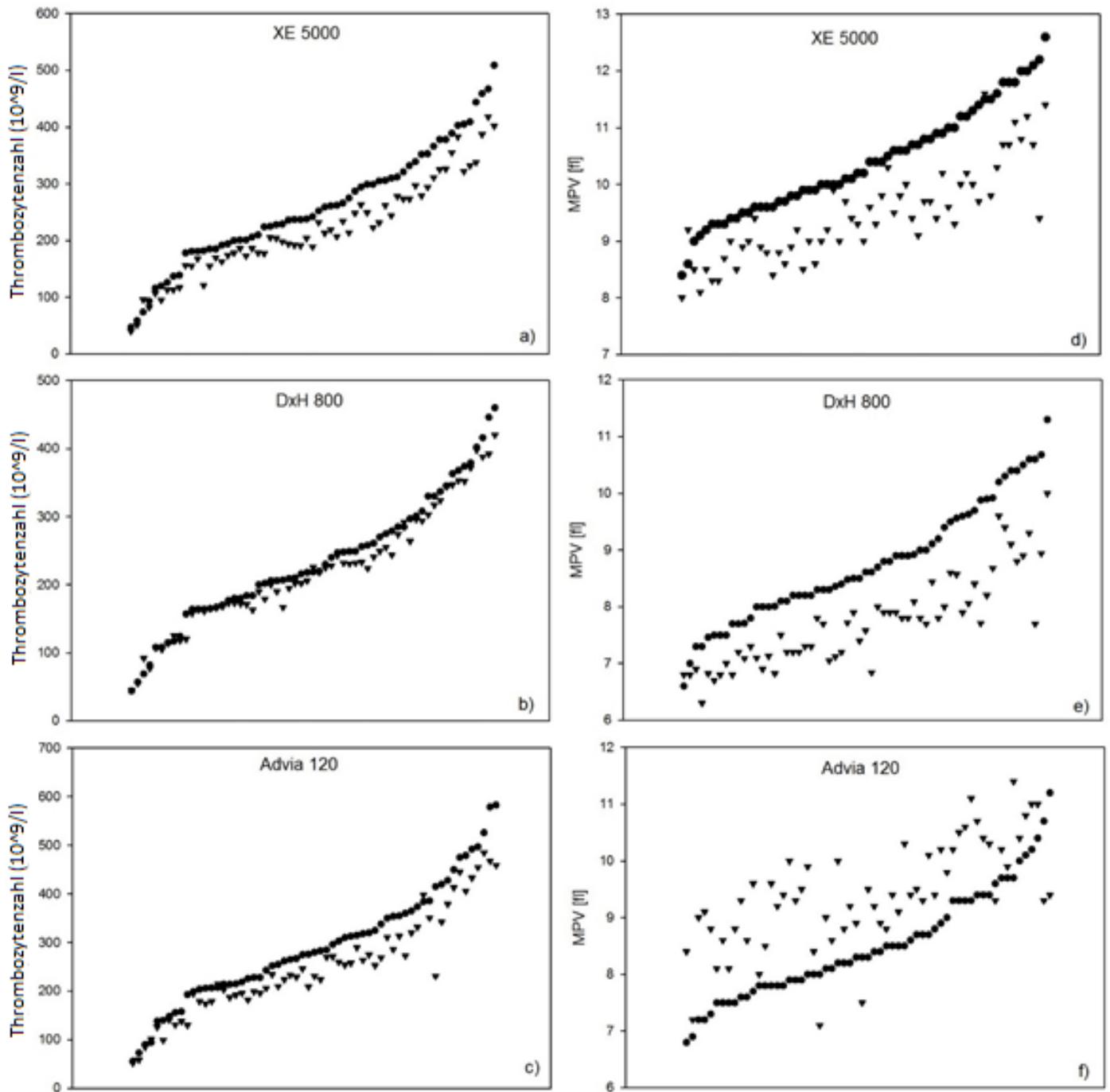


Abb. 5: Auf den Einzelabbildungen a-c sind die von den verschiedenen Geräten gemessenen Thrombozytenzahlen der EDTA-Proben (●) in aufsteigender Reihenfolge und die Werte der entsprechenden MgSO₄-Proben dargestellt (▼). Analog sind auf den Einzelabbildungen d-f die MPV-Werte dargestellt.

4.1.3. Einfluss einer verlängerten Probenlagerung (> 4 Stunden) und unterschiedlicher Analysensysteme auf die Thrombozytenzahl und das Thrombozytenvolumen in EDTA- und MgSO₄-antikoagulierten Vollblutproben

Um zur Stabilität der Parameter Thrombozytenzahl und Thrombozytenvolumen in EDTA- und MgSO₄-antikoagulierten Vollblutproben eine Aussage machen zu können, wurden die Proben auch nach 4 Stunden und nach 24 Stunden untersucht. Die Resultate der Thrombozytenzahl- und MPV-Messungen von 61 Patienten sind in Tabelle VII und VIII, sowie in den Abb. 6 a-c und Abb. 7 a-c dargestellt. Die statistische Bewertung der Werte ist den Tabellen IX und X zu entnehmen.

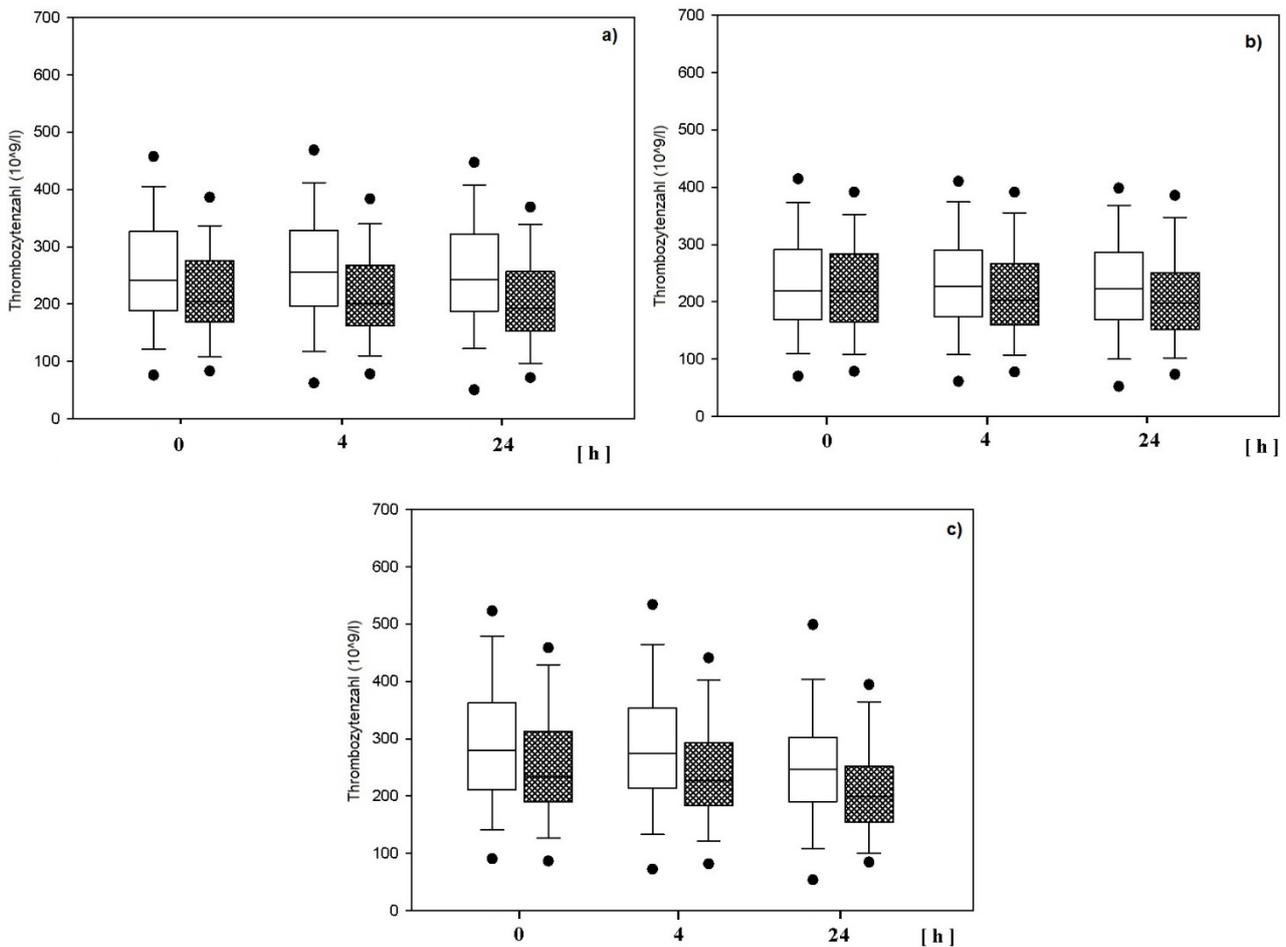


Abb. 6 a-c: Zeitlicher Verlauf der parallel an drei verschiedenen Messgeräten gemessenen Thrombozytenzahlen aus zeitgleich entnommenen EDTA- (weiß) und MgSO₄-antikoagulierten Vollblutproben von 61 Patienten [XE 5000 (a); DxH 800 (b); Advia 120 (c)].

Die zeitnah nach Probenentnahme am XE 5000 gemessene mittlere Thrombozytenzahl beträgt in EDTA-antikoagulierten Proben 258,9 +/- 104,0*10⁹/l (Median: 242*10⁹/l), nach 4 Stunden beträgt sie 262,7 +/- 106,9*10⁹/l (Median: 256*10⁹/l) und nach 24-stündiger Lagerung 253,2 +/- 106,9*10⁹/l (Median: 243*10⁹/l). Werden die Messungen am DxH 800 durchgeführt, erhält man für die 3 Messzeitpunkte Werte, die etwa 10 % niedriger ausfallen: 234,1 +/- 95,3*10⁹/l (Median:

$219 \cdot 10^9/l$); $232,3 \pm 96,3 \cdot 10^9/l$ (Median: $227 \cdot 10^9/l$) und $227,6 \pm 94,3 \cdot 10^9/l$ (Median: $223 \cdot 10^9/l$). Die Zählergebnisse, die mittels streulichtbasiertem optischem Messverfahren (Advia 120) nach 4 Stunden ermittelt werden, sind deutlich höher als die der Impedanz-Messverfahren (XE 5000 und DxH 800). Sie betragen $292,9 \pm 121,0 \cdot 10^9/l$ (Median: $280 \cdot 10^9/l$), bzw. $289,3 \pm 121,8 \cdot 10^9/l$ (Median: $275 \cdot 10^9/l$). Nach 24-stündiger Lagerung wird ein Rückgang auf $255,8 \pm 111,2 \cdot 10^9/l$ (Median: $247 \cdot 10^9/l$) sichtbar.

Die entsprechenden Werte der Magnesiumsulfat-antikoagulierten Vollblutproben sind generell niedriger. Die am XE 5000 gemessene Thrombozytenzahl beträgt $219,1 \pm 86,3 \cdot 10^9/l$ (Median: $205 \cdot 10^9/l$), bzw. $215,7 \pm 84,4 \cdot 10^9/l$ (Median: $201 \cdot 10^9/l$) nach 4 Stunden und $205,3 \pm 82,5 \cdot 10^9/l$ (Median: $193 \cdot 10^9/l$) nach 24 Stunden Lagerungszeit. Am Gerät DxH 800 sind die Werte nur marginal um 1,10 % bis 2,40 % höher als am XE 5000. Sie betragen $221,9 \pm 88,8 \cdot 10^9/l$ (Median: $218 \cdot 10^9/l$), bzw. $218,0 \pm 88,3 \cdot 10^9/l$ (Median: $203 \cdot 10^9/l$) nach 4 Stunden und $210,3 \pm 87,1 \cdot 10^9/l$ (Median: $198 \cdot 10^9/l$) nach 24 Stunden. Die mittels Streulichtmessung (Advia 120) ermittelten Werte sind mit $252,0 \pm 104,9 \cdot 10^9/l$ (Median: $233 \cdot 10^9/l$), bzw. $243,0 \pm 100,2 \cdot 10^9/l$ (Median: $227 \cdot 10^9/l$) nach 4 Stunden und mit $213,7 \pm 91,2 \cdot 10^9/l$ (Median: $199 \cdot 10^9/l$) nach 24 Stunden Lagerungszeit höher als die Werte der Impedanzmessungen.

Unabhängig von der Messmethode und der Lagerungszeit fallen die in $MgSO_4$ -antikoagulierten Proben gemessenen Thrombozytenzahlen niedriger aus als die in EDTA-antikoagulierten Proben ermittelten Werte. Die prozentualen Unterschiede zu den EDTA-Proben betragen am XE 5000 zwischen 15,4 % und 18,9 %, bzw. zwischen 5,2 % und 7,6 % für die Messungen am DxH 800 und zwischen 12,9 % und 16,5 % am Advia 120.

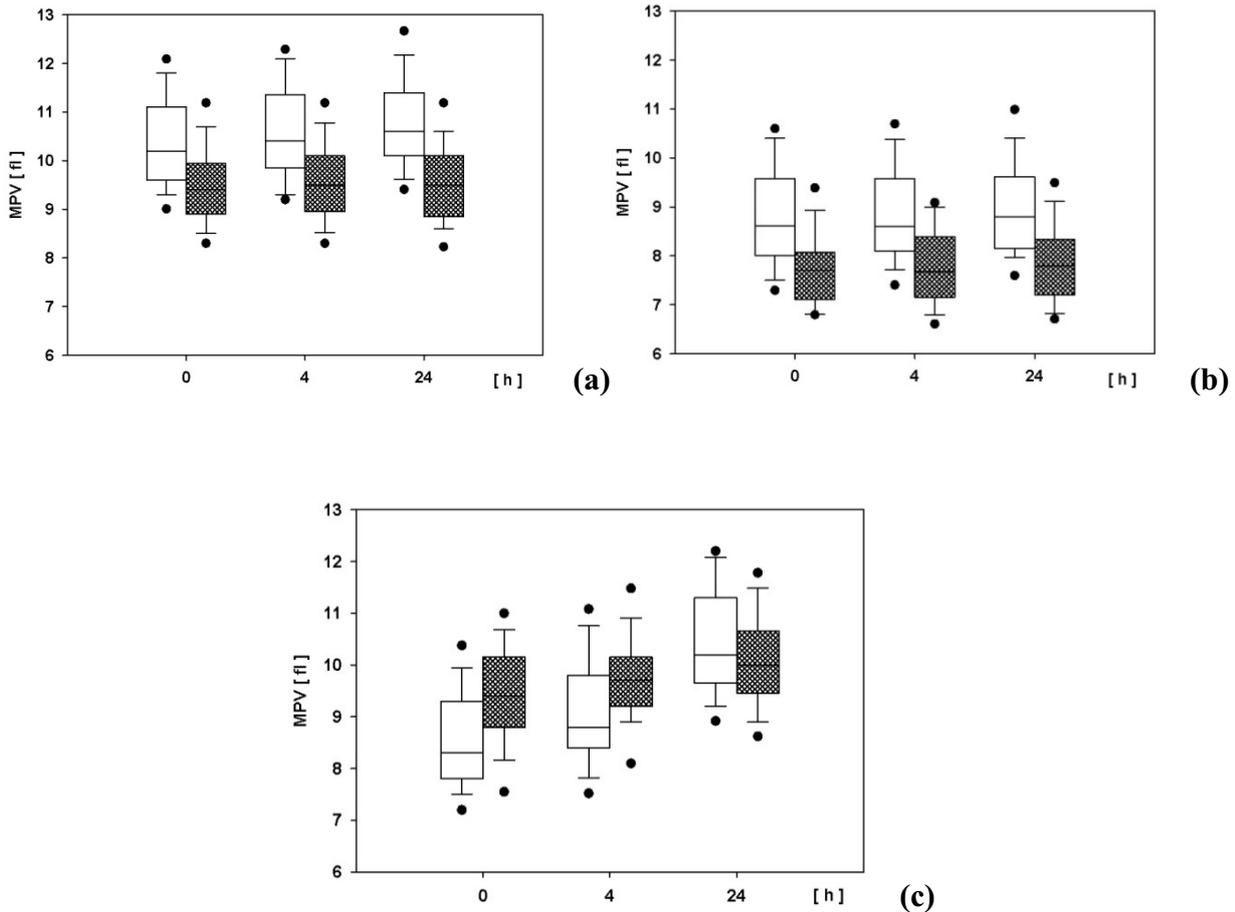


Abb. 7 a-c: Zeitlicher Verlauf der parallel an drei verschiedenen Messgeräten gemessenen mittleren Plättchenvolumina aus zeitgleich entnommenen EDTA- (weiß) und MgSO₄-antikoagulierten Vollblutproben (schraffiert) von 61 Patienten [XE 5000 (a); DxH 800 (b); Advia 120 (c)].

Das am Gerät XE 5000 in EDTA-Proben gemessene MPV beträgt $10,4 \pm 1,0$ fl (Median: 10,2 fl); nach 4 Stunden $10,6 \pm 1,0$ fl (Median: 10,4 fl) und nach 24 Stunden $10,8 \pm 1,0$ fl (Median: 10,6 fl). Erfolgt die Messung am DxH 800, so beträgt das zeitnah nach der Blutentnahme gemessene MPV $8,8 \pm 1,1$ fl (Median: 8,6 fl), bzw. $8,9 \pm 1,0$ fl (Median: 8,6 fl) nach vierstündiger Lagerung und $9,0 \pm 1,0$ fl (Median: 8,8 fl) nach 24 Stunden. Die entsprechenden Werte am Advia 120 fallen wie folgt aus: $8,5 \pm 1,0$ fl (Median: 8,3 fl), $9,0 \pm 1,0$ fl (Median: 8,8 fl) und $10,4 \pm 1,0$ fl (Median: 10,2 fl).

Das initiale MPV in den MgSO₄-antikoagulierten Proben wird am XE 5000 mit 9,5 +/- 0,8 fl (Median: 9,4 fl), nach 4 Stunden Lagerung mit 9,6 +/- 0,9 fl (Median: 9,5 fl) und nach 24 Stunden mit 9,6 +/- 0,8 fl (Median: 9,5 fl) gemessen. Am DxH 800 beträgt das unmittelbar gemessene MPV 7,7 +/- 0,8 fl (Median: 7,7 fl), nach 4 Stunden 7,8 +/- 0,8 fl (Median: 7,7 fl) und nach 24 Stunden 7,9 +/- 0,8 fl (Median: 7,8 fl). Die entsprechenden Messungen MPV am Advia 120 ergeben Werte von 9,4 +/- 0,9 fl (Median: 9,4 fl), 9,7 +/- 0,9 fl (Median: 9,7 fl) und 10,1 +/- 0,9 fl (Median: 10,0 fl).

Tabelle VII: Tabellarische Darstellung der Messwerte der zu unterschiedlichen Zeitpunkten an verschiedenen Messgeräten ermittelten Thrombozytenzahlen (n= 61 Patienten).

	Plt count [$10^9/l$] EDTA / MgSO ₄								
	XE 5000			DxH 800			Advia 120		
	0h	4h	24h	0h	4h	24h	0h	4h	24h
Min	47/40	39/41	26/39	44/45	35/45	19/42	56/52	30/53	22/49
10%	126/113	126/114	124/101	115/114	110/112	106/109	148/130	139/125	121/101
Median	242/205	256/201	243/193	219/218	227/203	223/198	280/233	275/227	247/199
90%	403/332	394/331	406/327	368/352	359/349	363/343	475/413	464/388	401/363
Max	509/418	519/403	500/397	460/420	460/415	431/410	583/485	566/479	524/438
Mean	259/219	263/216	253/205	234/222	232/218	228/219	293/252	289/243	256/214

Tabelle VIII: Tabellarische Darstellung der Messwerte der zu unterschiedlichen Zeitpunkten an verschiedenen Messgeräten ermittelten mittleren Plättchenvolumina (n = 61 Patienten).

	MPV [fl] EDTA / MgSO ₄								
	XE 5000			DxH 800			Advia 120		
	0h	4h	24h	0h	4h	24h	0h	4h	24h
Min	8,4/8,0	8,5/8,1	8,8/8,2	6,6/6,3	6,8/6,1	6,9/6,3	6,8/7,1	7,5/7,8	8,5/8,4
10%	9,3/8,5	9,3/8,6	9,7/8,6	7,5/6,8	7,8/6,8	8,0/6,9	7,5/8,4	7,9/8,9	9,2/8,9
Median	10,2/9,4	10,4/9,5	10,6/9,5	8,6/7,7	8,6/7,7	8,8/7,8	8,3/9,4	8,8/9,7	10,2/10,0
90%	11,8/10,7	12,1/10,7	12,1/10,6	10,4/8,9	10,3/9,0	10,4/9,1	9,7/10,6	10,6/10,9	12,0/11,4
Max	12,6/11,6	12,9/12,2	13,4/12,0	11,3/10,0	11,4/10,2	11,5/10,4	11,2/11,4	11,1/11,6	12,7/12,1
MW	10,4/9,5	10,6/9,6	10,8/9,6	8,8/7,7	8,9/7,8	9,0/7,9	8,5/9,4	9,0/9,7	10,4/10,1

Tabelle IX: Statistische Bewertung (Wilcoxon signed rank test) der Differenzen der in EDTA- und MgSO₄-Proben gemessenen Thrombozytenzahl, bzw. des MPV zu unterschiedlichen Zeitpunkten.

XE 5000	Thrombozytenzahl			MPV		
	0 h	4 h	24 h	0 h	4 h	24 h
EDTA vs MgSO ₄	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001
DxH 800	Thrombozytenzahl			MPV		
	0 h	4 h	24 h	0 h	4 h	24 h
EDTA vs MgSO ₄	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001
Advia 120	Thrombozytenzahl			MPV		
	0 h	4 h	24 h	0 h	4 h	24 h
EDTA vs MgSO ₄	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001

Tabelle X: Statistische Bewertung (Wilcoxon signed rank test) der Differenz der in EDTA-, bzw. in MgSO₄-Proben gemessenen Thrombozytenzahl, bzw. des MPV der Zeitpunkte „0 h“ und „24 h“.

		XE 5000		DxH 800		Advia 120	
		EDTA	MgSO ₄	EDTA	MgSO ₄	EDTA	MgSO ₄
Veränderung von 0 h zu 24 h	Thrombozytenzahl	p < 0,05	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001
	MPV	p < 0,001	n.s.	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001

4.2. Einfluss der Antikoagulation auf die Thrombozytenaktivierung

4.2.1. Spontane und durch Agonisten (ADP, Arachidonsäure) induzierte

Thrombozytenaktivierung in Abhängigkeit von der in vitro Antikoagulation

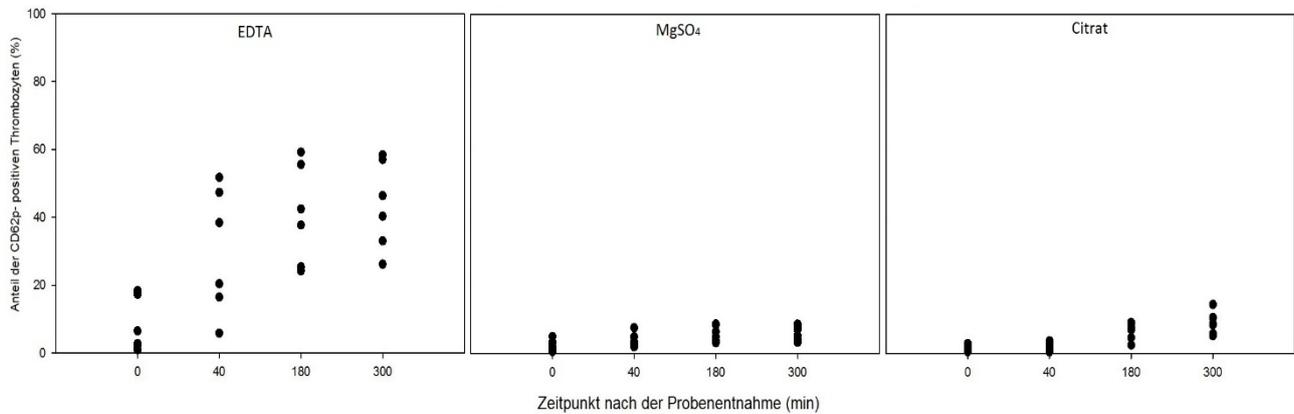


Abb. 8: Vergleich der zeitabhängigen Zunahme der spontanen thrombozytären CD62p-Expression in unterschiedlich antikoagulierten Vollblutproben.

Wie der Abbildung 8 zu entnehmen ist, führt die Lagerung von EDTA-antikoagulierten Vollblutproben zu einer spontanen thrombozytären Expression des Aktivierungsmarkers CD62p, die nach etwa 3 bis 5 Stunden ihr Maximum erreicht. Der Anteil der spontan aktivierten Thrombozyten ist von 7,99 +/- 7,86 % zum Zeitpunkt „0 Minuten“ nach 5 Stunden auf 43,57 +/- 12,92 % (Median: 43,35 %) angestiegen. In MgSO₄- und Citrat-antikoagulierten Vollblutproben ist eine solche Spontanaktivierung von Thrombozyten über einen Zeitraum von 5 Stunden nicht nachweisbar.

Tabelle XI: Von der Lagerungszeit abhängige spontane und durch Agonisten induzierte CD62p-Expression der Thrombozyten in unterschiedlich antikoagulierten Vollblutproben.

		0 min	40 min	180 min	300 min
EDTA	spontan	7,99 +/- 7,86 %	30,05 +/- 18,46 %	40,77 +/- 14,71 %	43,57 +/- 12,92 %
	ADP	47,93 +/- 13,07 %	54,99 +/- 18,84 %	55,89 +/- 21,73 %	60,99 +/- 19,13 %
	Arachidonsäure	20,62 +/- 6,71 %	43,16 +/- 16,92 %	50,35 +/- 16,22 %	60,62 +/- 13,46 %
MgSO ₄	spontan	2,24 +/- 1,66 %	3,90 +/- 2,11 %	5,96 +/- 2,33 %	6,07 +/- 2,14 %
	ADP	49,34 +/- 9,64 %	57,07 +/- 13,58 %	55,36 +/- 16,35 %	63,34 +/- 19,54 %
	Arachidonsäure	24,93 +/- 16,30 %	33,98 +/- 24,30 %	40,89 +/- 17,73 %	45,42 +/- 22,34 %
Citrat	spontan	1,44 +/- 0,89 %	2,31 +/- 1,18 %	6,70 +/- 2,60 %	8,93 +/- 3,36 %
	ADP	41,34 +/- 12,40 %	50,08 +/- 16,70 %	52,49 +/- 14,72 %	60,73 +/- 14,83 %
	Arachidonsäure	22,29 +/- 18,60 %	25,86 +/- 21,44 %	35,13 +/- 16,39 %	42,81 +/- 18,36 %

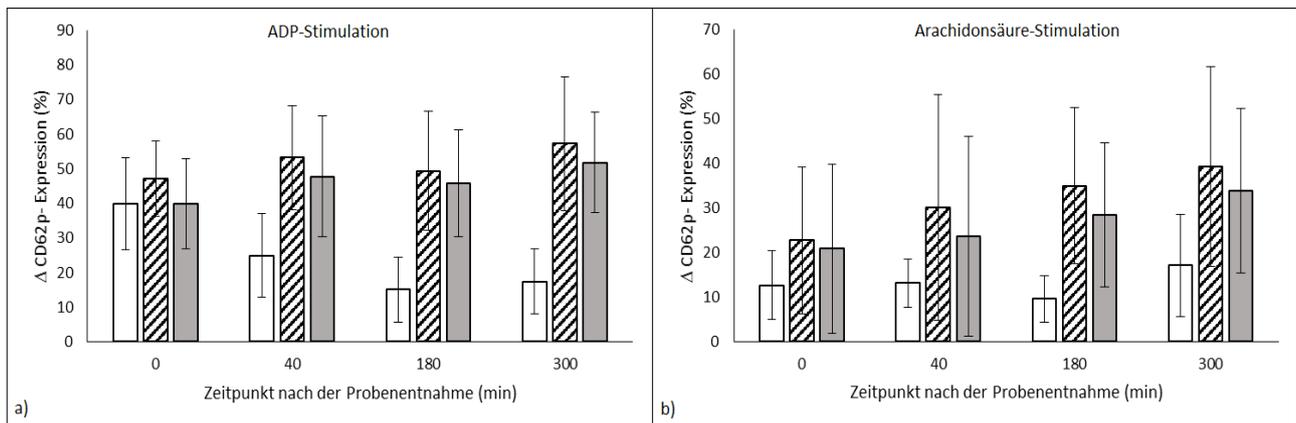


Abb. 9 a + b: Differenzen der prozentualen Anteile an CD62p-positiven Thrombozyten in unstimulierten und durch ADP (a), bzw. Arachidonsäure (b) stimulierten, verschieden antikoagulierten und unterschiedlich lang gelagerten Vollblutproben von 6 Probanden (weiß = EDTA; schraffiert = MgSO₄; hellgrau = Citrat).

Abbildung 9 a zeigt die Differenzen der prozentualen Anteile an CD62p-positiven Thrombozyten in unstimulierten und durch ADP stimulierten, verschieden antikoagulierten und unterschiedlich lang gelagerten Vollblutproben. In EDTA-antikoagulierten Vollblutproben beträgt diese Differenz unmittelbar nach der Blutentnahme 39,94 +/- 13,29 %. Da im Verlauf von 5 Stunden der Anteil der spontan CD62p-exprimierenden Thrombozyten zunimmt, verringert sich die Differenz zu dem Anteil der zusätzlich durch ADP aktivierten Thrombozyten auf 17,41 +/- 11,18 %. In MgSO₄-antikoagulierten Vollblutproben liegt die Differenz zu Beginn der Messung bei 47,10 +/- 10,80 %. Nach 5 Stunden steigt diese Differenz auf 57,27 +/- 19,30 %. In Citrat-antikoagulierten Vollblutproben beträgt die Differenz zwischen spontaner und durch ADP-Stimulation ausgelöster CD62p-Expression zum Zeitpunkt „0“ 39,89 +/- 12,97 %. Sie erhöht sich im Verlauf von 5 Stunden auf 51,80 +/- 14,50 %.

In Abbildung 9 b sind die Differenzen der prozentualen Anteile von spontaner und durch Arachidonsäure-Stimulation ausgelöster CD62p-Expression von Thrombozyten in unterschiedlich antikoagulierten Vollblutproben dargestellt. In EDTA-antikoagulierten Proben beträgt sie, unmittelbar nach Probenentnahme, 12,63 +/- 7,82 %. Im Verlauf von 5 Stunden erhöht sich diese auf 17,05 +/- 11,55 %. Bei den MgSO₄-antikoagulierten Proben ist eine Zunahme der Differenz von 22,69 +/- 16,49 % zum Zeitpunkt „0“ auf 39,36 +/- 22,47 % nach 5 Stunden zu beobachten.

In Citrat-antikoagulierten Vollblutproben liegt der Unterschied zwischen spontaner und induzierter CD62p-Expression nach Probenentnahme bei 20,85 +/- 18,97 %, nach fünfstündiger Lagerung ist eine Zunahme auf 33,88 +/- 18,45 % zu verzeichnen.

Tabelle XII: Differenz der spontanen und der durch ADP induzierten CD62p-Expression der Thrombozyten in unterschiedlich antikoagulierten Vollblutproben im Verlauf von 300 Minuten.

	0 min	40 min	180 min	300 min
EDTA	39,94 +/- 13,29 %	24,95 +/- 12,17 %	15,12 +/- 9,38 %	17,41 +/- 11,18 %
MgSO ₄	47,10 +/- 10,80 %	53,17 +/- 15,05 %	49,40 +/- 17,11 %	57,27 +/- 19,30 %
Citrat	39,89 +/- 12,97 %	47,77 +/- 17,55 %	45,79 +/- 15,41 %	51,80 +/- 14,50 %

Tabelle XIII: Differenz der spontanen und der durch Arachidonsäure induzierten CD62p-Expression der Thrombozyten in unterschiedlich antikoagulierten Vollblutproben im Verlauf von 300 Minuten.

	0 min	40 min	180 min	300 min
EDTA	12,63 +/- 7,82 %	13,11 +/- 5,39 %	9,58 +/- 5,24 %	17,05 +/- 11,55 %
MgSO ₄	22,69 +/- 16,49 %	30,08 +/- 25,32 %	34,94 +/- 17,52 %	39,36 +/- 22,47 %
Citrat	20,85 +/- 18,97 %	23,55 +/- 22,50 %	28,43 +/- 16,23 %	33,88 +/- 18,45 %

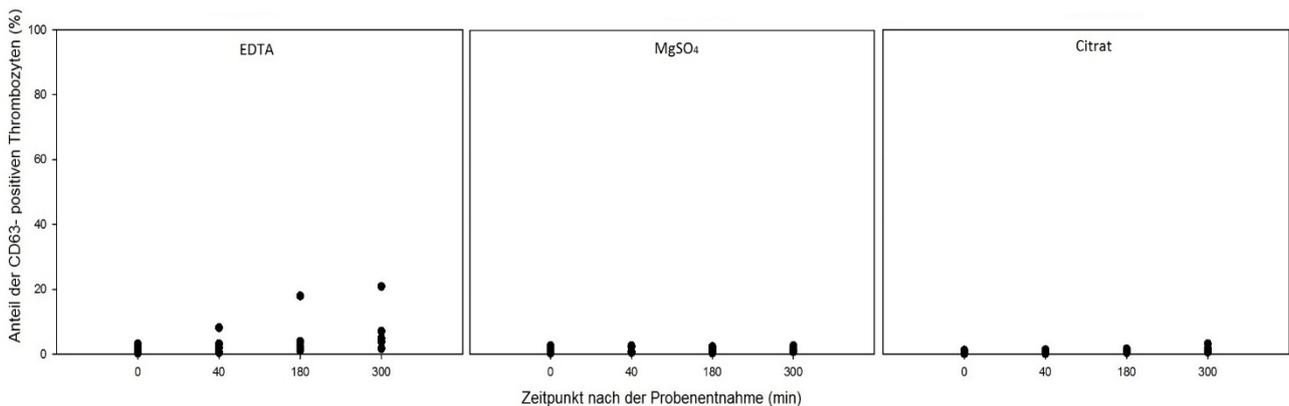


Abb. 10: Vergleich der zeitabhängigen Zunahme der spontanen thrombozytären CD63-Expression in unterschiedlich antikoagulierten Vollblutproben.

In Abbildung 10 ist der Anteil der spontan CD63-positiven Thrombozyten in EDTA-, MgSO₄- und Citrat-antikoagulierten Vollblutproben dargestellt. In EDTA-antikoagulierten Proben ist eine Zunahme des Anteils der CD63-positiven Thrombozyten von im Mittel 1,34 +/- 1,08 % zum Zeitpunkt „0 Minuten“ auf einen mittleren Wert von 6,70 +/- 7,23 % zum Zeitpunkt „300 Minuten“ zu erkennen. In MgSO₄- und Citrat-antikoagulierten Proben kommt es zu keiner zeitabhängigen Zunahme des Anteils an CD63-positiven Thrombozyten.

Tabelle XIV: Von der Lagerungszeit abhängige spontane und durch Agonisten induzierte CD63-Expression der Thrombozyten in unterschiedlich antikoagulierten Vollblutproben.

		0 min	40 min	180 min	300 min
EDTA	spontan	1,34 +/- 1,08 %	2,71 +/- 2,85 %	5,14 +/- 6,36 %	6,70 +/- 7,23 %
	ADP	7,94 +/- 3,45 %	11,81 +/- 8,03 %	14,90 +/- 11,17 %	21,27 +/- 8,10 %
	Arachidonsäure	1,68 +/- 0,91 %	5,85 +/- 5,66 %	8,99 +/- 8,83 %	13,10 +/- 8,41 %
MgSO ₄	spontan	1,07 +/- 0,90 %	1,31 +/- 0,92 %	1,41 +/- 0,67 %	1,44 +/- 0,70 %
	ADP	10,37 +/- 4,65 %	13,91 +/- 6,22 %	13,60 +/- 6,61 %	18,68 +/- 10,01 %
	Arachidonsäure	3,14 +/- 2,48 %	5,95 +/- 7,96 %	5,07 +/- 2,94 %	7,55 +/- 4,84 %
Citrat	spontan	0,55 +/- 0,39 %	0,75 +/- 0,44 %	1,04 +/- 0,51 %	1,50 +/- 0,91 %
	ADP	8,36 +/- 5,33 %	10,80 +/- 5,82 %	14,88 +/- 6,60 %	21,24 +/- 10,70 %
	Arachidonsäure	4,23 +/- 6,96 %	4,56 +/- 6,27 %	5,80 +/- 3,44 %	9,41 +/- 7,23 %

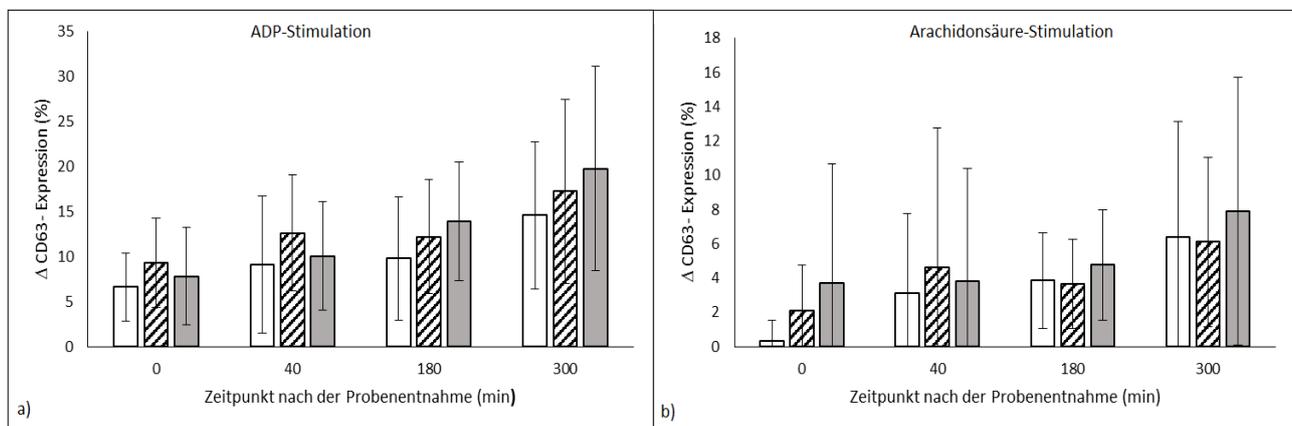


Abb. 11 a + b: Differenzen der prozentualen Anteile an CD63-positiven Thrombozyten in unstimulierten und durch ADP (a), bzw. Arachidonsäure (b) stimulierten, verschieden antikoagulierten und unterschiedlich lang gelagerten Vollblutproben von 6 Probanden (weiß = EDTA; schraffiert = MgSO₄; hellgrau = Citrat).

Abbildung 11 a zeigt die Differenzen der spontanen und der durch ADP induzierten Anteile an CD63 exprimierenden Thrombozyten in Abhängigkeit von der Aufbewahrungszeit der unterschiedlich antikoagulierten Vollblutproben. In EDTA-antikoagulierten Vollblutproben beträgt der Unterschied gleich nach der Probenentnahme 6,61 +/- 3,78 %, im Verlauf von 300 Minuten erhöht sich die Differenz auf 14,57 +/- 8,18 %. Die Differenz der CD63-Expression der MgSO₄-antikoagulierten Vollblutproben beträgt initial 9,30 +/- 4,94 % und nimmt innerhalb von 300 Minuten auf 17,25 +/- 10,22 % zu. In Citrat-antikoagulierten Vollblutproben liegt die Differenz der CD63-Expression nach Stimulation, bezogen auf die Spontanexpression, zu diesem Zeitpunkt bei 7,81 +/- 5,38 %, sie steigt innerhalb von 300 Minuten auf 19,74 +/- 11,34 %.

In Abbildung 11 b sind die Differenzen der spontanen und der durch Arachidonsäure-Stimulation ausgelösten thrombozytären CD63-Expression in unterschiedlich antikoagulierten Vollblutproben in Abhängigkeit von der Lagerungszeit der Proben dargestellt.

In EDTA-antikoagulierten Proben beträgt sie nach Probenentnahme 0,35 +/- 1,21 %. Innerhalb von 300 Minuten erhöht sich dieser Wert auf 6,40 +/- 6,74 %. In MgSO₄-antikoagulierten Vollblutproben beträgt die Differenz direkt nach der Probengewinnung 2,08 +/- 2,70 %. Sie steigt innerhalb von fünf Stunden Lagerungszeit auf 6,11 +/- 4,95 % an. In Citrat-Proben beträgt diese Differenz anfangs 3,69 +/- 6,96 %, nach 300 Minuten liegt sie bei 7,91 +/- 7,83 %.

Tabelle XV: Differenz der spontanen und der durch ADP induzierten CD63-Expression der Thrombozyten in unterschiedlich antikoagulierten Vollblutproben im Verlauf von 5 Stunden.

	0 min	40 min	180 min	300 min
EDTA	6,61 +/- 3,78 %	9,11 +/- 7,62 %	9,77 +/- 6,83 %	14,57 +/- 8,18 %
MgSO ₄	9,30 +/- 4,94 %	12,60 +/- 6,41 %	12,19 +/- 6,32 %	17,25 +/- 10,22 %
Citrat	7,81 +/- 5,38 %	10,06 +/- 6,03 %	13,85 +/- 6,59 %	19,74 +/- 11,34 %

Tabelle XVI: Differenz der spontanen und der durch Arachidonsäure induzierten CD63-Expression der Thrombozyten in unterschiedlich antikoagulierten Vollblutproben im Verlauf von 5 Stunden.

	0 min	40 min	180 min	300 min
EDTA	0,35 +/- 1,21 %	3,14 +/- 4,61 %	3,85 +/- 2,80 %	6,40 +/- 6,74 %
MgSO ₄	2,08 +/- 2,70 %	4,64 +/- 8,11 %	3,66 +/- 2,59 %	6,11 +/- 4,95 %
Citrat	3,69 +/- 6,96 %	3,82 +/- 6,57 %	4,77 +/- 3,22 %	7,91 +/- 7,83 %

4.2.2. Vergleich der Thrombozytenfunktion und der Thrombozytenaktivierung bei Verwendung unterschiedlicher Antikoagulanzen

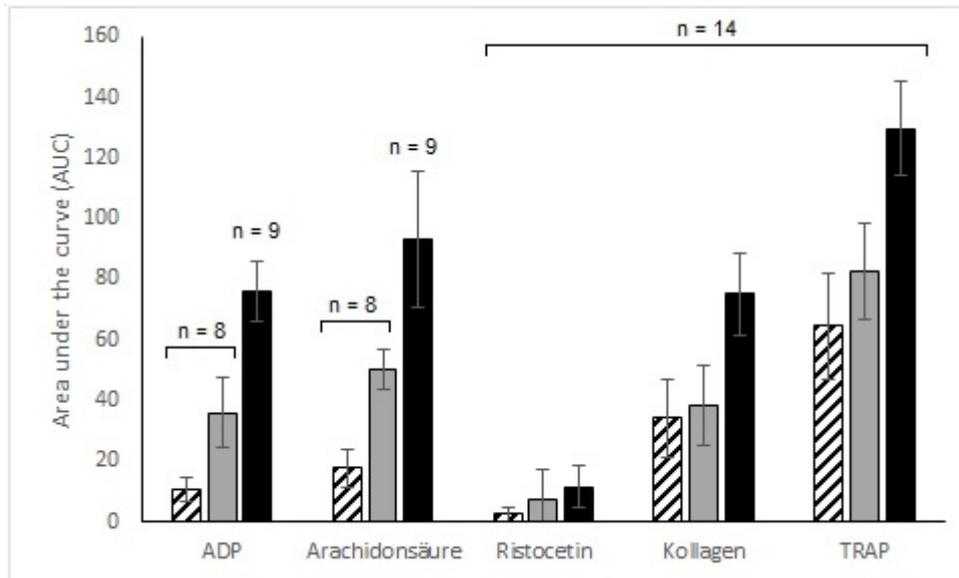


Abb. 12: Agonisten-induzierte Thrombozytenaggregation (Multiplate^R) in MgSO₄- (schraffiert), Citrat- (grau) und Hirudin-antikoagulierten Vollblutproben (schwarz).

In Abbildung 12 ist die durch ADP, Arachidonsäure, Ristocetin, Kollagen und TRAP ausgelöste Thrombozytenaggregation in MgSO₄-, Citrat- und Hirudin-antikoagulierten Vollblutproben dargestellt. Das Ausmaß der Aggregation wird in der dimensionslosen Einheit „Area under the curve“ (AUC) angegeben.

Nach ADP-Stimulation der Thrombozyten wird eine AUC von 10,63 +/- 4,07 in MgSO₄-antikoagulierten Vollblutproben und von 36,00 +/- 11,77 in Citrat-antikoagulierten Vollblutproben, sowie von 75,89 +/- 9,79 in Hirudin-antikoagulierten Vollblutproben gemessen.

Durch Stimulation mit Arachidonsäure wird in MgSO₄-antikoagulierten Proben eine AUC von 17,75 +/- 6,18, in Citrat-Proben eine AUC von 50,13 +/- 6,53 und in Hirudin-Proben eine AUC von 93,33 +/- 22,54 gemessen.

Die Stimulation mit Ristocetin führt zu einer AUC von 2,57 +/- 2,31 in MgSO₄-antikoagulierten Proben, bzw. von 7,50 +/- 10,02 in Citrat-antikoagulierten Vollblutproben und in Hirudin-antikoaguliertem Blut zu einer AUC von 11,29 +/- 6,92.

Nach Kollagen-Stimulation beträgt die AUC 34,29 +/- 12,88 in MgSO₄-Proben, bzw. 38,36 +/- 12,97 in Citrat-Proben und 75,14 +/- 13,65 in Hirudin-Proben.

Am deutlichsten fällt die Agonisten-induzierte Thrombozytenaggregation bei Stimulation durch TRAP aus: Sie erreicht einen AUC-Wert von 64,64 +/- 17,43 in MgSO₄-antikoaguliertem Vollblut und von 82,50 +/- 16,09 in Citrat-antikoaguliertem Vollblut. Die Thrombozyten aggregieren in Hirudin-antikoaguliertem Blut stärker, es wird eine AUC von 129,64 +/- 15,31 gemessen.

Die AUC-Werte der verschiedenen Antikoagulanzen unterscheiden sich statistisch signifikant voneinander, unabhängig vom verwendeten Agonisten. Eine Ausnahme stellt die Kollagen-induzierte Thrombozytenaggregation bei MgSO₄- und Citrat-antikoagulierten Proben dar.

Tabelle XVII: Statistische Bewertung (Wilcoxon signed rank test) der Thrombozytenaggregation.

	MgSO ₄	Citrat	
ADP	p < 0,05		Citrat
Arachidonsäure	p < 0,05		Citrat
Ristocetin	p < 0,05		Citrat
	p < 0,001	p < 0,05	Hirudin
Kollagen	n.s.		Citrat
	p < 0,001	p < 0,001	Hirudin
TRAP	p < 0,05		Citrat
	p < 0,001	p < 0,001	Hirudin

Um den Einfluss von Magnesiumsulfat auf die agonisten-induzierte Thrombozytenaggregation zu untersuchen, wurde der für die Methode empfohlenen Hirudin-Monovette Magnesiumsulfat in unterschiedlichen Mengen zugesetzt.

In Abbildung 13 und Tabelle XVIII ist die konzentrationsabhängige Hemmung der Thrombozytenaggregation durch Magnesiumsulfat in Hirudin-antikoagulierten Probengefäßen von 3 Probanden dargestellt. Aus den Messwerten geht hervor, dass die Thrombozytenaggregation konzentrationsabhängig gehemmt wird und dass eine zweistündige Lagerung der Proben den anti-aggregatorischen Effekt des Magnesiumsulfats nicht beeinflusst.

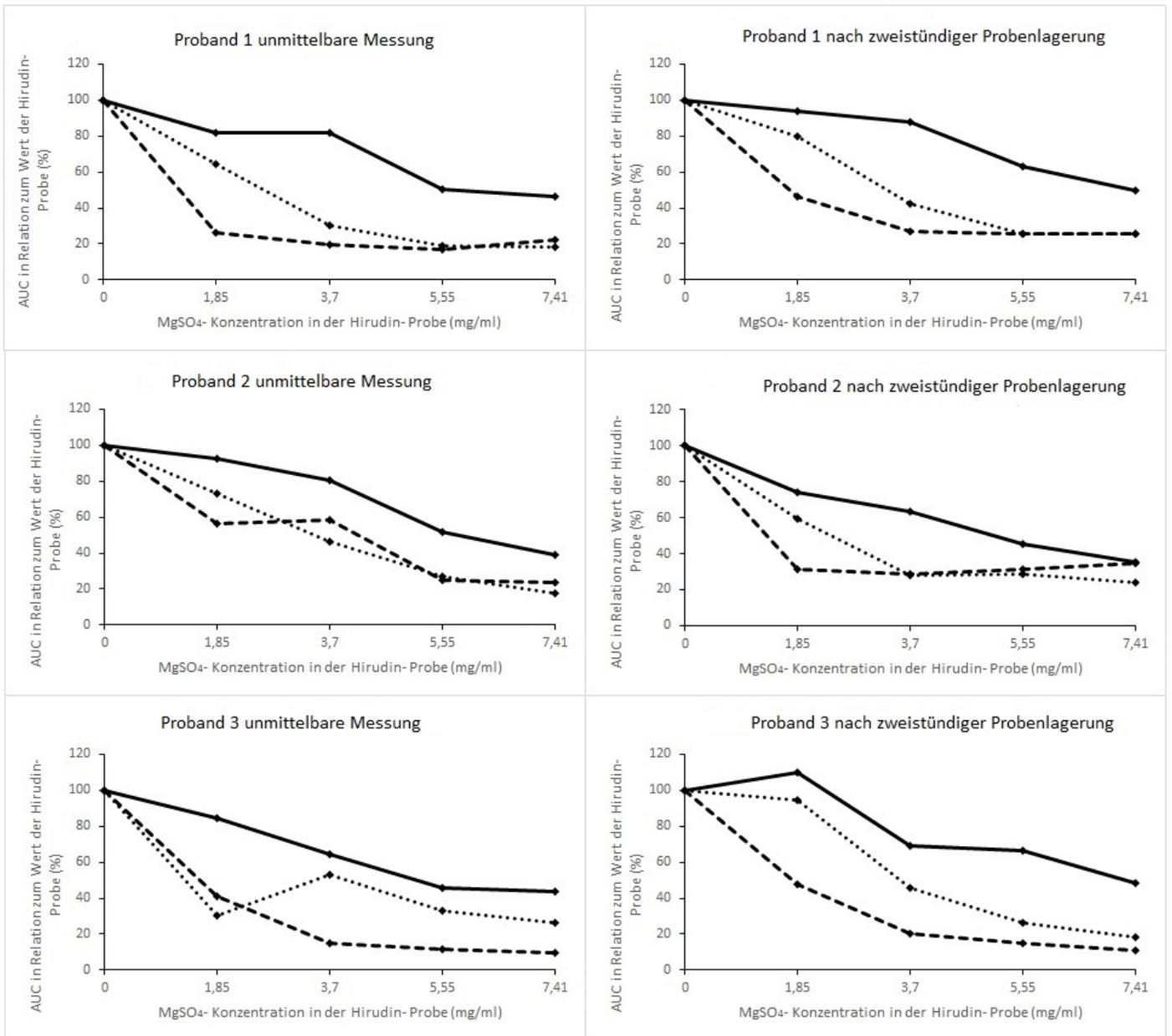


Abb. 13: Konzentrationsabhängige Hemmung der mittels verschiedener Agonisten (Linie = TRAP, fein gepunktet = Arachidonsäure, grob gepunktet = ADP) induzierten Thrombozytenaggregation durch Magnesiumsulfat. Dargestellt ist die nach MgSO₄-Zugabe gemessene AUC in Relation zum Ausgangswert der Hirudin-Probe.

Tabelle XVIII: Übersicht der am Multiplate gemessenen AUC-Werte der 3 Probanden (Nr.1 = weiß, Nr.2 = hellgrau, Nr.3 = dunkelgrau).

MgSO ₄ mg/ml	ADP				Arachidonsäure				TRAP			
	sofort	(%) 0 mg	2 h	(%) 0 mg	sofort	(%) 0 mg	2 h	(%) 0 mg	sofort	(%) 0 mg	2 h	(%) 0 mg
0	76	100	75	100	109	100	90	100	148	100	117	100
1,85	20	26,3	35	46,7	70	64,2	72	80	121	81,8	110	94
3,7	15	19,7	20	26,7	33	30,3	38	42,2	121	81,8	103	88
5,55	13	17,1	19	25,3	21	19,3	23	25,6	75	50,7	74	63,2
7,41	17	22,4	19	25,3	20	18,3	23	25,6	69	46,6	58	49,6
MgSO ₄ mg/ml	ADP				Arachidonsäure				TRAP			
	sofort	(%) 0 mg	2 h	(%) 0 mg	sofort	(%) 0 mg	2 h	(%) 0 mg	sofort	(%) 0 mg	2 h	(%) 0 mg
0	60	100	67	100	86	100	76	100	107	100	101	100
1,85	34	56,7	21	31,3	63	73,3	45	59,2	99	92,5	75	74,3
3,7	35	58,3	19	28,4	40	46,5	21	27,6	86	80,4	64	63,4
5,55	15	25	21	31,3	23	26,7	22	28,9	55	51,4	46	45,5
7,41	14	23,3	23	34,3	15	17,4	18	23,7	42	39,3	36	35,6
MgSO ₄ mg/ml	ADP				Arachidonsäure				TRAP			
	sofort	(%) 0 mg	2 h	(%) 0 mg	sofort	(%) 0 mg	2 h	(%) 0 mg	sofort	(%) 0 mg	2 h	(%) 0 mg
0	61	100	73	100	79	100	87	100	131	100	101	100
1,85	25	41	35	47,9	24	30,4	82	94,3	111	84,7	111	109,9
3,7	9	14,8	15	20,5	42	53,2	40	46	84	64,1	70	69,3
5,55	7	11,5	11	15,1	26	32,9	23	26,4	60	45,8	67	66,3
7,41	6	9,8	8	11	21	26,6	16	18,4	57	43,5	49	48,5

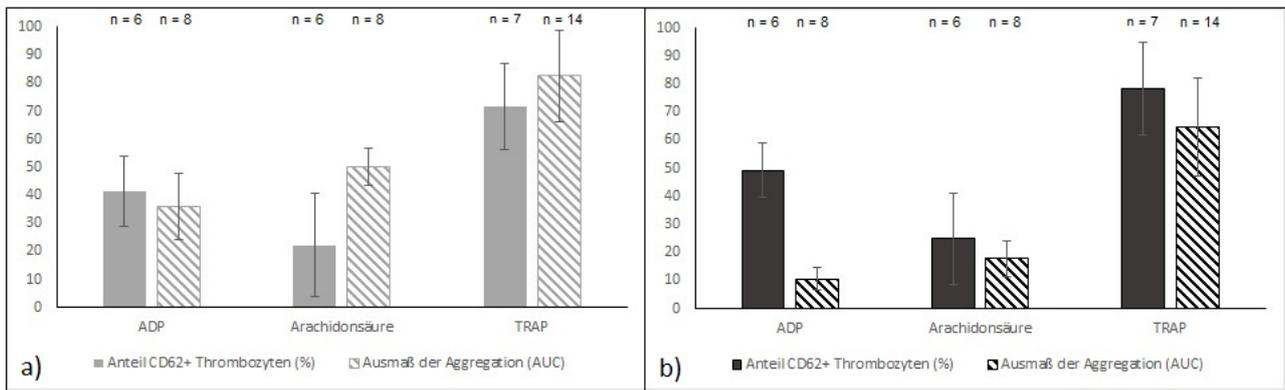


Abb. 14 a + b: Vergleich der durch verschiedene Agonisten induzierten CD62p-Expression in Prozent und das Ausmaß der Thrombozytenaggregation in Citrat- (a), bzw. MgSO₄-antikoagulierten Vollblutproben (b) als AUC.

Abb. 14 a zeigt die durch ADP, Arachidonsäure und TRAP induzierte CD62p-Expression und das Ausmaß der durch diese Agonisten induzierten Thrombozytenaggregation in Citrat-antikoaguliertem Vollblut. Die Stimulation mit ADP resultiert in einer AUC von 36,00 +/- 11,77, bzw. einem Anteil CD62p-positiver Thrombozyten von 41,34 +/- 12,4 %. Eine Stimulation mit Arachidonsäure ergibt eine AUC von 50,13 +/- 6,53 und einen Anteil an CD62p-positiven Thrombozyten von 22,90 +/- 18,60 %. Nach einer Stimulation mit TRAP beträgt die AUC 82,50 +/- 16,09, der Anteil an CD62p-positiven Thrombozyten liegt bei 71,56 +/- 15,31 %.

In Abbildung 14 b ist die durch ADP, Arachidonsäure und TRAP induzierte CD62p-Expression und Thrombozytenaggregation in MgSO₄-antikoagulierten Vollblutproben dargestellt. Die Stimulation mit ADP führt zu einer AUC von 10,63 +/- 4,07 und einem Anteil an CD62p-positiven Thrombozyten von 49,34 +/- 9,64 %. Bei Stimulation mit Arachidonsäure beträgt die AUC 17,75 +/- 6,18, der Anteil CD62p-positiver Plättchen liegt bei 24,93 +/- 16,30 %. Die TRAP-Stimulation resultiert in einer AUC von 64,64 +/- 17,43, beziehungsweise einem Anteil CD62p-positiver Thrombozyten von 78,36 +/- 16,37 %.

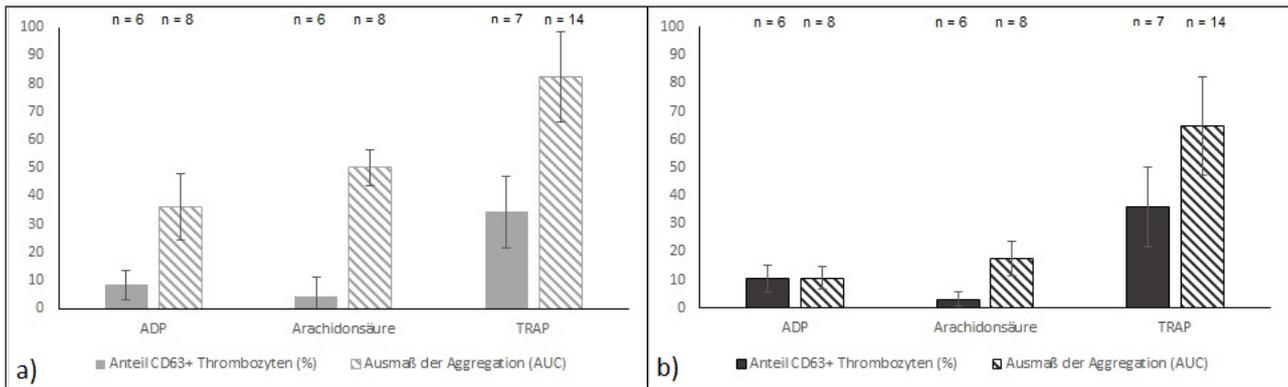


Abb. 15 a + b: Vergleich der durch verschiedene Agonisten induzierten CD63-Expression in Prozent und das Ausmaß der Thrombozytenaggregation in Citrat- (a), bzw. MgSO₄-antikoagulierten Vollblutproben (b) als AUC.

In Abb. 15 a wird die durch ADP, Arachidonsäure und TRAP induzierte CD63-Expression und das Ausmaß der Agonisten-induzierten Thrombozytenaggregation im Citrat-antikoaguliertem Vollblut nebeneinander abgebildet. Die Stimulation der Thrombozyten mittels ADP resultiert in einer AUC von 36,00 +/- 11,77 und einem CD63-positiven Thrombozytenanteil von 8,36 +/- 5,33 %. Werden die Thrombozytenaggregation und die CD63-Expression durch Arachidonsäure stimuliert, so führt das zu einer AUC von 50,13 +/- 6,53, beziehungsweise einem Anteil an CD63-positiven Thrombozyten von 4,23 +/- 6,96 %. Nach TRAP-Stimulation beträgt die AUC 82,50 +/- 16,09, der Anteil an CD63-positiven Thrombozyten liegt bei 34,27 +/- 12,95 %.

In Abb. 15 b sind die durch ADP, Arachidonsäure und TRAP induzierte CD63-Expression und die durch diese Agonisten induzierte Thrombozytenaggregation in MgSO₄-antikoagulierten Vollblutproben dargestellt. Die ADP-Stimulation führt zu einer AUC von 10,63 +/- 4,07 und zu einem Anteil an CD63-positiven Thrombozyten von 10,37 +/- 4,65 %. Nach Arachidonsäure-Stimulation, beziehungsweise TRAP-Stimulation betragen die entsprechenden AUCs 17,75 +/- 6,18, bzw. 64,64 +/- 17,43. Der Anteil CD63-positiver Thrombozyten beläuft sich auf 3,14 +/- 2,48 %, bzw. 36,02 +/- 14,31 %.

4.3. Interaktion von Thrombozyten und Leukozyten in unterschiedlich antikoagulierte Vollblut

Neben der Messung von Aktivierungsmarkern kann die Formierung von Thrombozyten-Leukozyten-Komplexen als Gradmesser der Thrombozytenaktivierung untersucht werden. Dies geschieht in der Regel mit Citrat-antikoagulierten Vollblutproben. Um zu untersuchen, inwieweit die Magnesiumsulfat-Antikoagulation hierfür ebenfalls geeignet ist, wurde in zeitgleich gewonnenen aber unterschiedlich antikoagulierten Vollblutproben der Anteil CD42b-positiver Leukozyten ($n = 21$) und der Anteil CD42b-positiver Monozyten, Granulozyten und Lymphozyten ($n = 24$) am Durchflusszytometer (*FACS Canto II*) hin untersucht. Hierbei dient der Thrombozytenmarker CD42b zur Identifizierung von an Leukozyten gebundenen Blutplättchen.

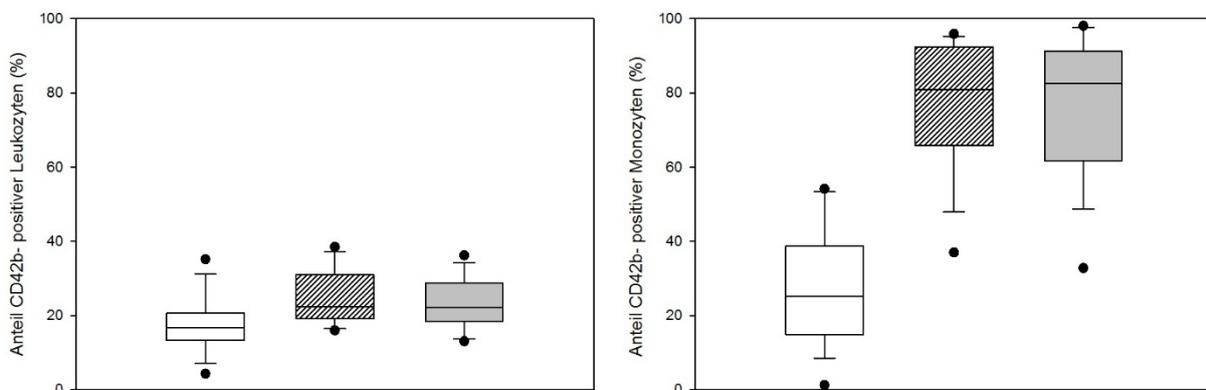


Abb. 16 a + b: Prozentualer Anteil der CD42b-positiven Leukozyten ($n = 21$), bzw. Monozyten ($n = 24$) in EDTA- (weiss), MgSO₄- (schraffiert) und Citrat-antikoagulierten Vollblutproben (grau). Die Darstellung erfolgt in Form von Boxplots.

In EDTA-antikoagulierten Vollblutproben sind im Mittel $17,4 \pm 7,51$ % der erfassten Leukozyten CD42b-positiv. Die MgSO₄-antikoagulierten Vollblutproben weisen einen prozentualen Anteil an CD42b-positiven Leukozyten von $24,82 \pm 7,22$ % auf. Dieser ist signifikant ($p < 0,001$) höher als der Anteil in EDTA-Proben. In Citrat-antikoagulierten Proben beträgt der Anteil CD42b-positiver Leukozyten $23,6 \pm 6,84$ % und ist damit signifikant höher ($p < 0,05$) als der Anteil in EDTA-Proben. Zu den Werten der MgSO₄-Proben besteht kein signifikanter Unterschied.

In EDTA-antikoagulierten Proben sind $26,82 \pm 15,82$ % der erfassten Monozyten CD42b-positiv. In MgSO₄-antikoaguliertem Vollblut beträgt der Anteil an Monozyten, die CD42b-positiv sind, $77,77 \pm 16,74$ %. Er unterscheidet sich signifikant ($p < 0,001$) vom Wert der EDTA-Proben. Gegenüber den Werten der Citrat-Proben besteht jedoch kein signifikanter Unterschied. In Citrat-antikoagulierten Proben beträgt der Anteil der CD42b-positiven Monozyten $71,31 \pm 18,61$ % und unterscheidet sich daher signifikant ($p < 0,001$) von den EDTA-antikoagulierten Vollblutproben.

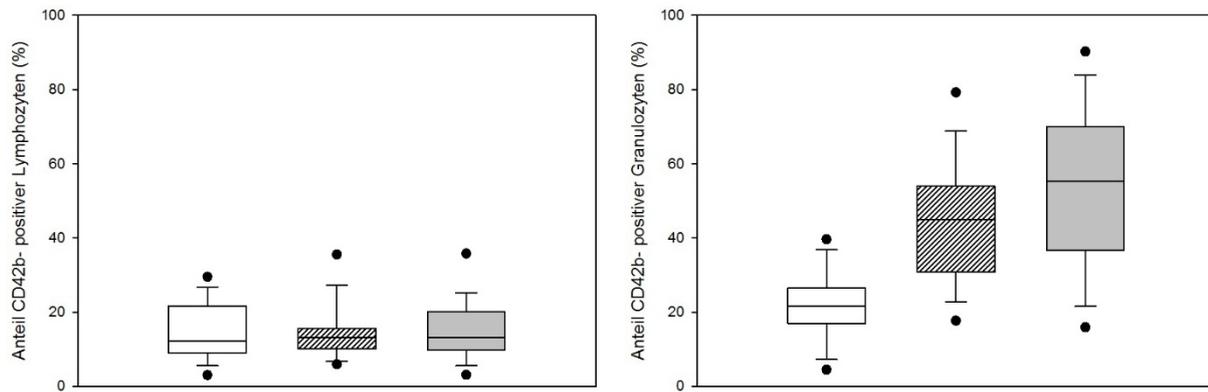


Abb. 17 a + b: Prozentualer Anteil der CD42b-positiven Lymphozyten (n = 24), bzw. Granulozyten (n = 24) in EDTA- (weiss), MgSO₄- (schraffiert) und Citrat-antikoagulierten Vollblutproben (grau). Die Darstellung erfolgt in Form von Boxplots.

In EDTA-antikoagulierten Vollblutproben beträgt der Anteil CD42b-positiver Lymphozyten 14,53 +/- 7,62 %, in MgSO₄-antikoagulierten Proben 14,53 +/- 7,30 % und in Citrat-antikoagulierten Proben 14,97 +/- 8,09 %. Die Werte der unterschiedlich antikoagulierten Vollblutproben unterscheiden sich statistisch nicht signifikant.

Der Anteil der CD42b-positiven Granulozyten an der Gesamtpopulation beträgt in EDTA-antikoaguliertem Vollblut 21,63 +/- 9,11 %, in MgSO₄-Proben 44,92 +/- 16,12 % und in Citrat-antikoaguliertem Blut 54,09 +/- 20,89 %.

Die in MgSO₄- und in Citrat-Proben gemessenen Werte unterscheiden sich nicht signifikant voneinander, jedoch ist ihr Unterschied zu den positiven Anteilen im EDTA-Blut statistisch signifikant (p < 0,001).

4.4. Einfluss unterschiedlicher Antikoagulanzen auf die Vergleichbarkeit von mit hämatologischen Analyzern erstellten Blutbildern

4.4.1. Vergleich der Parameter des Kleinen Blutbildes

Erythrozytenzahl und mittleres Erythrozytenvolumen

Die Erythrozytenzahlen in den unterschiedlich antikoagulierten Vollblutproben ($n = 100$) unterscheiden sich nur geringfügig. In EDTA-Proben beträgt die Anzahl der Erythrozyten im Mittel $4,49 \pm 0,68 \cdot 10^{12}/l$ (Median: $4,59 \cdot 10^{12}/l$), in $MgSO_4$ -Proben $4,47 \pm 0,68 \cdot 10^{12}/l$ (Median: $4,57 \cdot 10^{12}/l$) und in Citrat-Proben $4,48 \pm 0,68 \cdot 10^{12}/l$ (Median: $4,53 \cdot 10^{12}/l$). Die Erythrozytenzahlen der EDTA-Proben weichen nicht signifikant von den in Citrat-Proben gemessenen Werten ab, allerdings besteht zwischen den Werten der EDTA- und der $MgSO_4$ -antikoagulierten Proben ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$), wenn man den Wilcoxon-Rangsummentest anwendet. Die Erythrozytenzahlen der Citrat- und der $MgSO_4$ -Proben sind dagegen nicht signifikant unterschiedlich. Zwischen den Werten der unterschiedlich antikoagulierten Proben besteht eine sehr gute Korrelation, was durch den Spearman-Korrelationskoeffizienten (siehe Tabelle XIX) zum Ausdruck kommt.

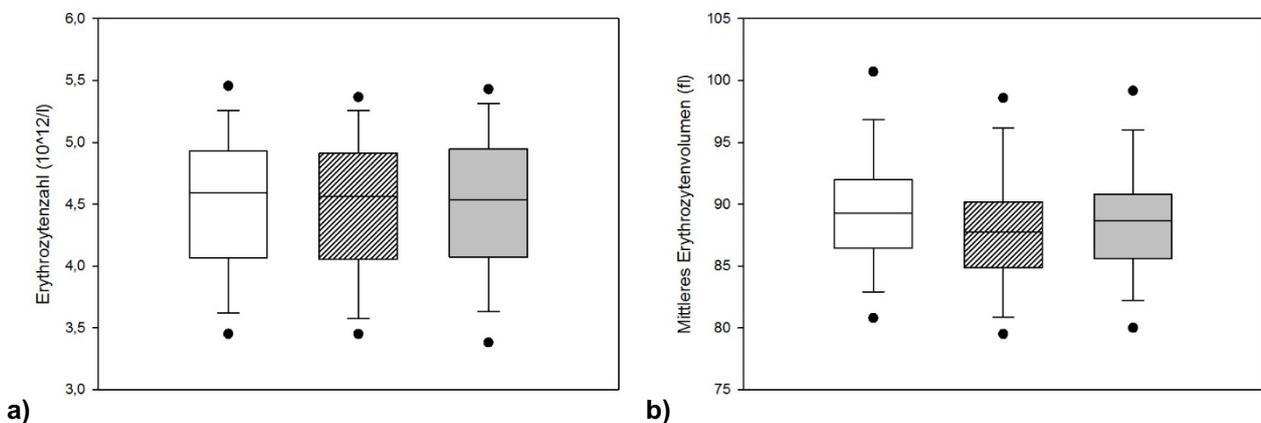


Abb. 18 a + b: Erythrozytenzahl (a) und MCV (b) in zeitgleich gemessenen, aber unterschiedlich antikoagulierten Vollblutproben von 100 Patienten (weiß = EDTA; schraffiert = $MgSO_4$; grau = Citrat). Die Darstellung der Ergebnisse erfolgt als Boxplots.

Das mittlere korpuskuläre Volumen der Erythrozyten (MCV) in EDTA-Proben beträgt im Mittel $89,34 \pm 6,10$ fl (Median: 89,30 fl), während es in $MgSO_4$ -antikoagulierten Vollblutproben mit $87,9 \pm 6,06$ fl (Median: 87,75 fl) und in Citrat-Proben mit $89,3 \pm 6,10$ fl (Median: 89,3 fl) gemessen wird. Die mittleren Volumina in Citrat- und $MgSO_4$ -antikoagulierten Proben sind statistisch signifikant niedriger ($p < 0,001$) als in EDTA-antikoagulierten Proben. Auch die in den Citrat- und $MgSO_4$ -Proben gemessenen Werte weichen statistisch signifikant voneinander ab ($p < 0,001$).

Tabelle XIX: Statistische Bewertung der Erythrozytenzahl (n = 100) und des MCV (n = 100), gemessen in unterschiedlich antikoagulierten, zeitgleich abgenommenen Vollblutproben.

	Spearman-Korrelationskoeffizient (r)		Wilcoxon-Rangsummentest	
	Erythrozytenzahl	MCV	Erythrozytenzahl	MCV
EDTA vs. MgSO ₄	0,995	0,987	p < 0,05	p < 0,001
EDTA vs. Citrat	0,994	0,995	n.s.	p < 0,001
Citrat vs. MgSO ₄	0,993	0,988	n.s.	p < 0,001

Hämatokrit und Hämoglobin

Der Hämatokrit in EDTA-antikoagulierten Vollblutproben beträgt im Mittel 0,398 +/- 0,053 l/l (Median: 0,405 l/l), in MgSO₄-Proben 0,391 +/- 0,052 l/l (Median: 0,397 l/l) und in Citrat-Proben 0,395 +/- 0,054 l/l (Median: 0,398 l/l). Obwohl diese Werte nahe beieinander liegen, unterscheiden sie sich nach dem Wilcoxon-Rangsummentest statistisch hochsignifikant voneinander (p < 0,001).

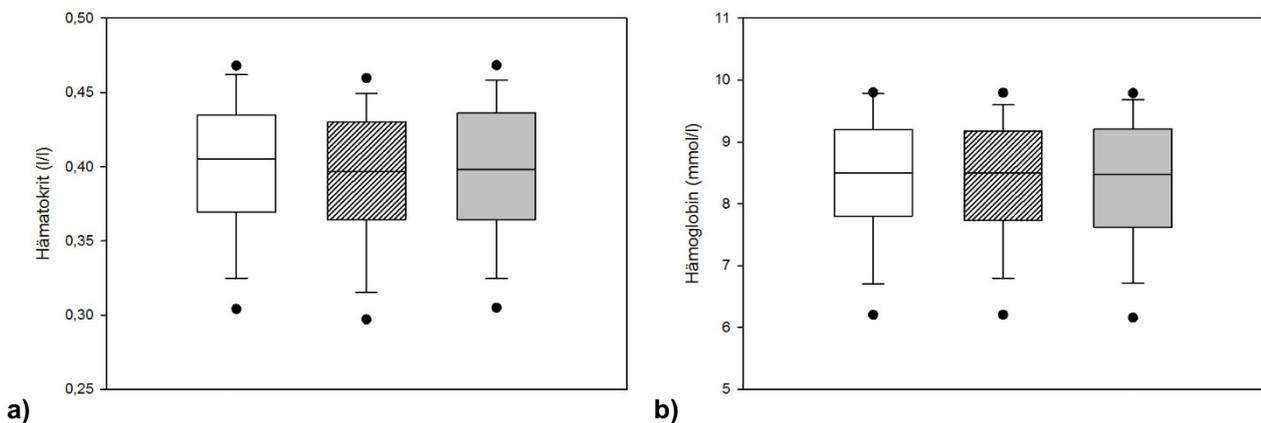


Abb. 19 a + b: Hämatokrit (a) und Hämoglobin (b) in zeitgleich gemessenen, aber unterschiedlich antikoagulierten Vollblutproben von 100 Patienten (weiß = EDTA; schraffiert = MgSO₄; grau = Citrat). Die Darstellung der Ergebnisse erfolgt als Boxplots.

Der Hämoglobingehalt im EDTA-Blut beträgt im Mittel 8,31 +/- 1,19 mmol/l (Median: 8,50 mmol/l), bzw. 8,30 +/- 1,17 mmol/l (Median: 8,50 mmol/l) in MgSO₄-Proben und 8,30 +/- 1,19 mmol/l (Median: 8,47 mmol/l) in Citrat-Proben. Die Hb-Messwerte in EDTA-Proben unterscheiden sich statistisch nicht signifikant von denen in MgSO₄-Proben, im Gegensatz zu den Hb-Werten in den Citrat-Proben (p < 0,05). Zwischen den Werten der Citrat- und der MgSO₄-Proben besteht kein signifikanter Unterschied. Die Werte der Hämatokrit- und Hämoglobinmessung der unterschiedlich antikoagulierten Proben zeigen eine sehr gute Korrelation.

Tabelle XX: Statistische Bewertung der Hämatokrit- (n = 100) und der Hämoglobinwerte (n = 100), gemessen in unterschiedlich antikoagulierten, zeitgleich abgenommenen Vollblutproben.

	Spearman-Korrelationskoeffizient (r)		Wilcoxon-Rangsummentest	
	Hämatokrit	Hämoglobin	Hämatokrit	Hämoglobin
EDTA vs. MgSO ₄	0,991	0,996	p < 0,001	n.s.
EDTA vs. Citrat	0,989	0,993	p < 0,001	p < 0,05
Citrat vs. MgSO ₄	0,988	0,993	p < 0,001	n.s.

MCH und MCHC

Das MCH beträgt in allen Proben, unabhängig vom verwendeten Antikoagulans, im Mittel 1,86 +/- 0,14 fmol und es zeigt sich eine sehr gute Korrelation der Werte. Durch die unterschiedliche Wertelage innerhalb der Stichproben kommt es jedoch zu statistisch signifikanten Unterschieden der Citrat-Proben zu den EDTA-Proben (p < 0,05), bzw. zu den MgSO₄-Proben (p < 0,001).

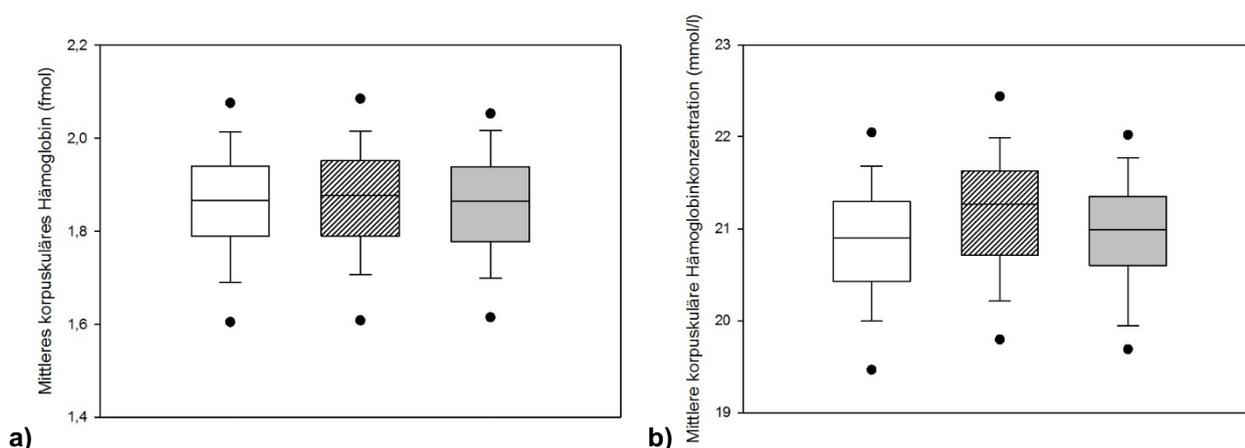


Abb. 20 a + b: MCH (a) und MCHC (b) in zeitgleich gemessenen, aber unterschiedlich antikoagulierten Vollblutproben von 100 Patienten (weiß = EDTA; schraffiert = MgSO₄; grau = Citrat). Die Darstellung der Ergebnisse erfolgt als Boxplots.

Die mittleren korpuskulären Hämoglobinkonzentrationen (MCHC) in den unterschiedlichen antikoagulierten Vollblutproben unterscheiden sich statistisch signifikant voneinander (p < 0,001). In den untersuchten EDTA-Proben beträgt die MCHC im Mittel 20,83 +/- 0,73 mmol/l (Median: 20,90 mmol/l), bzw. 21,20 +/- 0,73 mmol/l (Median: 21,26 mmol/l) in MgSO₄-antikoagulierten Proben und 20,94 +/- 0,70 mmol/l (Median: 20,99 mmol/l) in Citrat-Proben.

Tabelle XXI: Statistische Bewertung des MCH (n = 100) und der MCHC (n = 100), gemessen in unterschiedlich antikoagulierten, zeitgleich abgenommenen Vollblutproben.

	Spearman-Korrelationskoeffizient (r)		Wilcoxon-Rangsummentest	
	MCH	MCHC	MCH	MCHC
EDTA vs. MgSO ₄	0,982	0,892	n.s.	p < 0,001
EDTA vs. Citrat	0,969	0,864	p < 0,05	p < 0,001
Citrat vs. MgSO ₄	0,968	0,836	p < 0,05	p < 0,001

Leukozytenzahl

Die Leukozytenzahl (WBC) beträgt $7,91 \pm 3,41 \cdot 10^9/l$ (Median: $7,29 \cdot 10^9/l$) in EDTA-antikoagulierten Proben, $7,66 \pm 3,29 \cdot 10^9/l$ (Median: $7,10 \cdot 10^9/l$) in MgSO₄-antikoagulierten Proben und $7,81 \pm 3,37 \cdot 10^9/l$ (Median: $7,45 \cdot 10^9/l$) in Citrat-antikoagulierten Proben. Bei Anwendung des Wilcoxon-Tests für verbundene Stichproben errechnet sich ein statistisch signifikanter Unterschied ($p < 0,001$) zwischen der Leukozytenzahl der MgSO₄-Proben und der EDTA-, bzw. der Citrat-Proben. Die Leukozytenzahlen der EDTA- und der Citrat-Proben unterscheidet sich ebenfalls signifikant ($p < 0,05$) voneinander. Die in den unterschiedlich antikoagulierten Proben gemessenen Leukozytenzahlen zeigen eine sehr gute Korrelation.

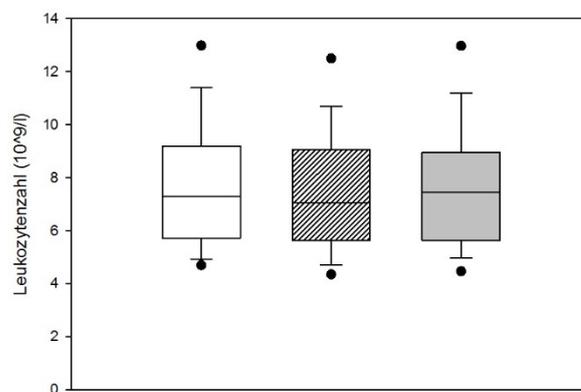


Abb. 21: Leukozytenzahl in zeitgleich gemessenen, aber unterschiedlich antikoagulierten Vollblutproben von 100 Patienten (weiß = EDTA; schraffiert = MgSO₄; grau = Citrat). Die Darstellung der Ergebnisse erfolgt als Boxplots.

Tabelle XXII: Statistische Bewertung der Leukozytenzahl (n = 100), gemessen in unterschiedlich antikoagulierten, zeitgleich abgenommenen Vollblutproben.

	Spearman-Korrelationskoeffizient (r)	Wilcoxon-Rangsummentest
	Leukozytenzahl	Leukozytenzahl
EDTA vs. MgSO ₄	0,991	p < 0,001
EDTA vs. Citrat	0,990	p < 0,05
Citrat vs. MgSO ₄	0,994	p < 0,001

Thrombozytenzahl und Thrombozytenvolumen (MPV)

Die mittels Impedanzmessverfahren in EDTA-antikoagulierten Vollblutproben (n = 100) parallel gemessene Thrombozytenzahl beträgt im Mittel 241,79 +/- 93,56*10⁹/l (Median: 231,00*10⁹/l), während sie in MgSO₄-antikoagulierten Vollblutproben 204,32 +/- 78,56*10⁹/l (Median: 198,50*10⁹/l) und in Citrat-Proben 176,26 +/- 72,19*10⁹/l (Median: 166,1*10⁹/l) beträgt. Diese Messwerte unterscheiden sich statistisch hochsignifikant (p < 0,001) voneinander. Die mittels fluoreszenz-optischer Methode gemessene mittlere Thrombozytenzahl in EDTA-antikoagulierten Proben beträgt 235,40 +/- 89,00 *10⁹/l (Median: 221,50*10⁹/l), in MgSO₄-antikoagulierten Proben beträgt sie 227,56 +/- 86,62 *10⁹/l (Median: 217,00*10⁹/l) und 197,04 +/- 79,91 *10⁹/l (Median: 184,25*10⁹/l) in Citrat-Proben. Die Differenzen der Messwerte der unterschiedlich antikoagulierten Vollblutproben sind statistisch hochsignifikant (p < 0,001).

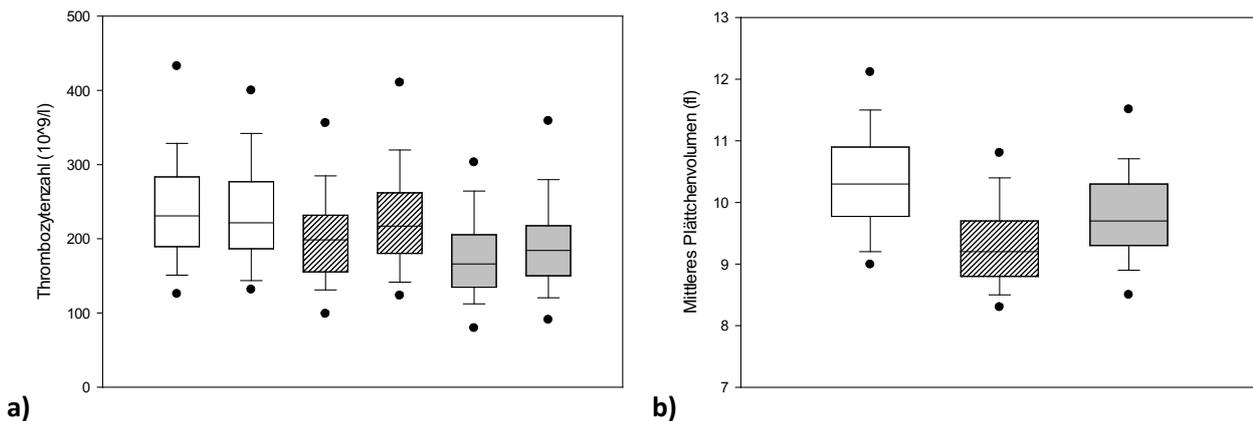


Abb. 22 a + b: (a) Boxplot-Darstellung der Thrombozytenzahl von 100 Patienten, gemessen mittels Impedanz- (linke Box) und fluoreszenz-optischer Messung (rechte Box). (b) Boxplot-Darstellung des MPV von 98 Patienten in unterschiedlich antikoagulierten Vollblutproben (weiß = EDTA; schraffiert = MgSO₄; grau = Citrat).

Das mittlere MPV beträgt 10,4 +/- 0,90 fl (Median: 10,3 fl) in EDTA-Proben, bzw. 9,3 +/- 0,75 fl (Median: 9,2 fl) in MgSO₄-Proben und 9,8 +/- 0,8 fl (Median: 9,7 fl) in Citrat-antikoagulierten Vollblutproben. Die MPV-Werte der unterschiedlich antikoagulierten Vollblutproben unterscheiden sich hochsignifikant voneinander (p < 0,001).

Tabelle XXIII: Statistische Bewertung der Thrombozytenzahl (n = 100) und des MPV (n = 98), gemessen in unterschiedlich antikoagulierten, zeitgleich abgenommenen Vollblutproben.

	Spearman-Korrelationskoeffizient (r)		Wilcoxon-Rangsummentest			
	Thrombozytenzahl		MPV	Thrombozytenzahl		MPV
	Impedanz	fl-opt.		Impedanz	fl-opt.	
EDTA vs. MgSO ₄	0,949	0,987	0,868	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001
EDTA vs. Citrat	0,876	0,934	0,837	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001
Citrat vs. MgSO ₄	0,891	0,945	0,833	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001

4.4.2. Vergleich der Parameter des Großen Blutbildes

Die Boxplot- und Korrelationsgraphiken der maschinellen Differenzierung von Neutrophilen, Lymphozyten, Monozyten, Eosinophilen und Basophilen in zeitgleich entnommenen aber unterschiedlich antikoagulierten Vollblutproben von 99 Probanden sind im folgenden Abschnitt dargestellt.

Neutrophile Granulozyten

Die mittlere Neutrophilenzahl beträgt $5,05 \pm 2,20 \cdot 10^9/l$ (Median: $4,52 \cdot 10^9/l$) in EDTA-antikoagulierten Vollblutproben, $4,92 \pm 2,08 \cdot 10^9/l$ (Median: $4,46 \cdot 10^9/l$) in $MgSO_4$ -Proben und $5,03 \pm 2,16 \cdot 10^9/l$ (Median: $4,62 \cdot 10^9/l$) in Citrat-antikoagulierten Proben. Die Neutrophilenzahlen der EDTA- und der Citrat-Proben unterscheiden sich nach dem Wilcoxon-Rangsummentest statistisch signifikant ($p < 0,001$) von denen der $MgSO_4$ -Proben. Die Werte der EDTA- und der Citrat-Proben sind statistisch nicht signifikant unterschiedlich. Die Korrelationen der Wertelagen sind andererseits mit Spearman-Korrelationskoeffizienten (r) zwischen 0,992 und 0,994 sehr gut.

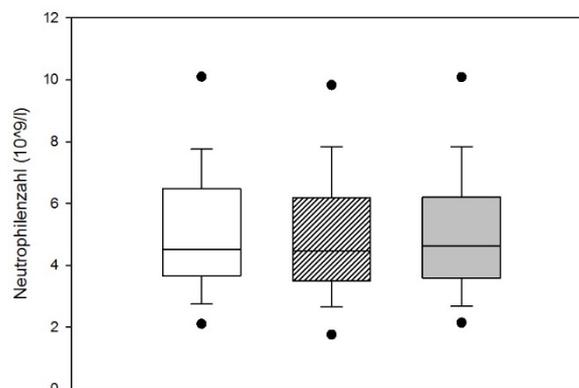


Abb. 23: Neutrophilenzahl von 99 Patienten, gemessen in zeitgleich abgenommenen, unterschiedlich antikoagulierten Vollblutproben (weiß = EDTA; schraffiert = $MgSO_4$; grau = Citrat). Die Darstellung der Ergebnisse erfolgt als Boxplots.

Tabelle XXIV: Statistische Bewertung der Neutrophilenzahl ($n = 99$), gemessen in unterschiedlich antikoagulierten, zeitgleich abgenommenen Vollblutproben.

	Spearman-Korrelationskoeffizient (r)	Wilcoxon-Rangsummentest
	Neutrophilenzahl	Neutrophilenzahl
EDTA vs. $MgSO_4$	0,993	$p < 0,001$
EDTA vs. Citrat	0,992	n.s.
Citrat vs. $MgSO_4$	0,994	$p < 0,001$

Monozyten und Lymphozyten

Die mittlere Monozytenzahl beträgt $0,70 \pm 0,42 \cdot 10^9/l$ (Median: $0,64 \cdot 10^9/l$) in EDTA-Proben, $0,66 \pm 0,38 \cdot 10^9/l$ (Median: $0,59 \cdot 10^9/l$) in $MgSO_4$ -Proben und $0,69 \pm 0,41 \cdot 10^9/l$ (Median: $0,63 \cdot 10^9/l$) in Citrat-Proben. Die Monozytenzahlen der EDTA-Proben unterscheiden sich statistisch signifikant von denen der $MgSO_4$ -Proben ($p < 0,001$), jedoch nicht von denen der Citrat-Proben. Die Werte der $MgSO_4$ - und der Citrat-Proben unterscheiden sich statistisch signifikant ($p < 0,05$).

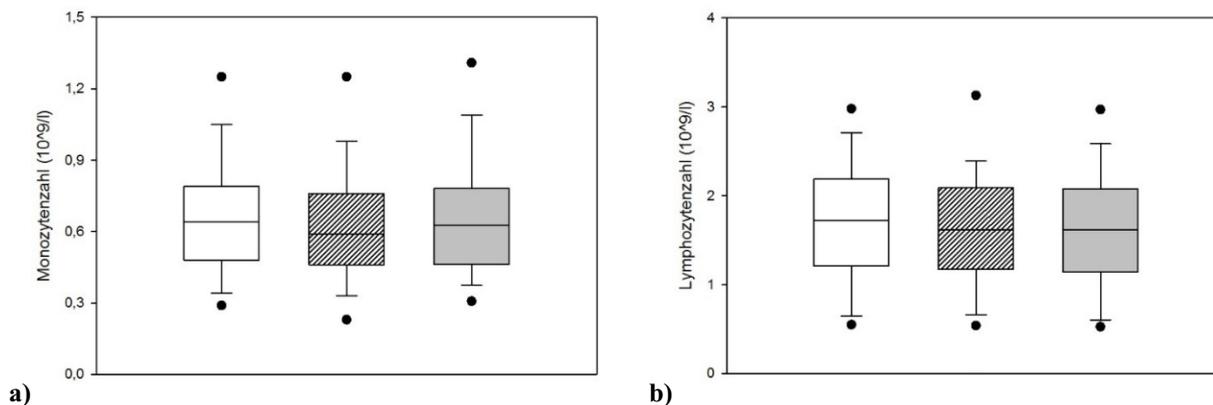


Abb. 24 a + b: Monozyten- (a) und Lymphozytenzahl (b) von 99 Patienten, gemessen in zeitgleich abgenommenen, unterschiedlich antikoagulierten Vollblutproben (weiß = EDTA; schraffiert = $MgSO_4$; grau = Citrat). Die Darstellung der Ergebnisse erfolgt als Boxplots.

Die mittlere Lymphozytenzahl in den EDTA-antikoagulierten Proben beträgt $1,75 \pm 0,81 \cdot 10^9/l$ (Median: $1,72 \cdot 10^9/l$), $1,65 \pm 0,77 \cdot 10^9/l$ (Median: $1,62 \cdot 10^9/l$) in $MgSO_4$ -antikoagulierten Proben und $1,66 \pm 0,79 \cdot 10^9/l$ (Median: $1,62 \cdot 10^9/l$) in Citrat-antikoagulierten Proben. Es besteht ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Lymphozytenzahlen der EDTA-Proben und denen der $MgSO_4$ -, bzw. der Citrat-Proben ($p < 0,001$). Die Lymphozytenzahlen der $MgSO_4$ - und der Citrat-Proben unterscheiden sich statistisch allerdings nicht signifikant voneinander. Insgesamt stimmen die Wertelagen der Monozyten-, bzw. der Lymphozytenzahlen gut überein, wie man den Spearman-Korrelationskoeffizienten (r) zwischen 0,921 und 0,982 entnehmen kann.

Tabelle XXV: Statistische Bewertung der Monozyten- ($n = 99$) und der Lymphozytenzahl ($n = 99$), gemessen in unterschiedlich antikoagulierten, zeitgleich abgenommenen Vollblutproben.

	Spearman-Korrelationskoeffizient (r)		Wilcoxon-Rangsummentest	
	Monozytenzahl	Lymphozytenzahl	Monozytenzahl	Lymphozytenzahl
EDTA vs. $MgSO_4$	0,929	0,962	$p < 0,001$	$p < 0,001$
EDTA vs. Citrat	0,921	0,982	n.s.	$p < 0,001$
Citrat vs. $MgSO_4$	0,929	0,963	$p < 0,05$	n.s.

Eosinophile und Basophile

Die mittlere Eosinophilenzahl in den EDTA-antikoagulierten Proben beträgt $0,15 \pm 0,13 \cdot 10^9/l$ (Median: $0,13 \cdot 10^9/l$), $0,14 \pm 0,13 \cdot 10^9/l$ (Median: $0,12 \cdot 10^9/l$) in den $MgSO_4$ -antikoagulierten Proben und $0,15 \pm 0,12 \cdot 10^9/l$ (Median: $0,13 \cdot 10^9/l$) in den Citrat-antikoagulierten Proben. Die Eosinophilenzahlen der unterschiedlich antikoagulierten Vollblutproben unterscheiden sich statistisch nicht signifikant voneinander, die Korrelationskoeffizienten liegen zwischen 0,939 und 0,975.

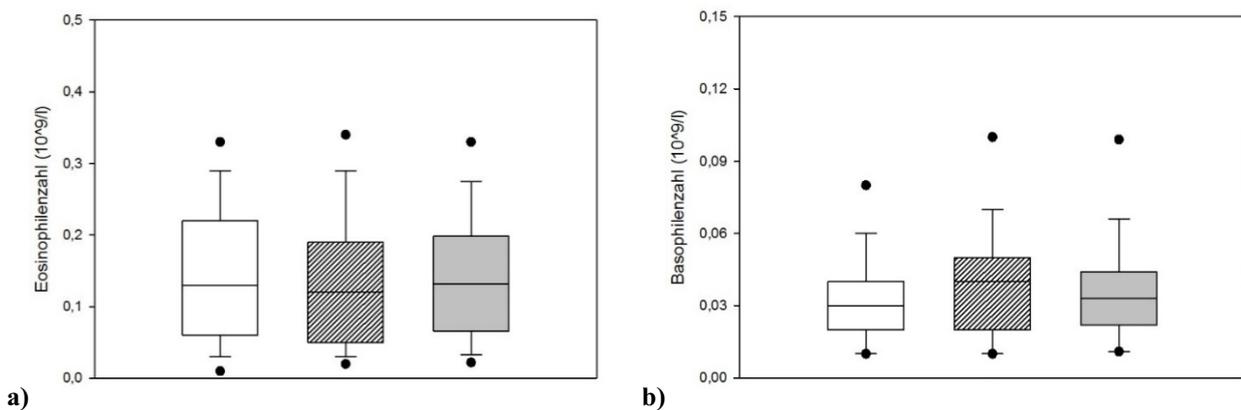


Abb. 25 a + b: Eosinophilen- (a) und Basophilenzahl (b) von 99 Patienten, gemessen in zeitgleich abgenommenen unterschiedlich antikoagulierten Vollblutproben (weiß = EDTA; schraffiert = $MgSO_4$; grau = Citrat). Die Darstellung der Ergebnisse erfolgt als Boxplots.

Die mittlere in EDTA-antikoagulierten Blutproben maschinell bestimmte Basophilenzahl beträgt $0,04 \pm 0,04 \cdot 10^9/l$ (Median: $0,03 \cdot 10^9/l$), in $MgSO_4$ -Proben $0,04 \pm 0,04 \cdot 10^9/l$ (Median: $0,04 \cdot 10^9/l$) und in Citrat-Proben $0,04 \pm 0,04 \cdot 10^9/l$ (Median: $0,03 \cdot 10^9/l$). Die Werte der EDTA- und der Citrat-Proben unterscheiden sich statistisch signifikant von denen der $MgSO_4$ -Proben ($p < 0,05$), nicht jedoch untereinander. Die Korrelationskoeffizienten der Basophilenzahl fallen, verglichen mit den anderen Populationen, niedriger aus, was aber vor allem an den per se geringen Zellzahlen liegt.

Tabelle XXVI: Statistische Bewertung der Eosinophilen- ($n = 99$) und Basophilenzahl ($n = 99$), gemessen in unterschiedlich antikoagulierten, zeitgleich abgenommenen Vollblutproben.

	Spearman- Korrelationskoeffizient (r)		Wilcoxon-Rangsummentest	
	Eosinophilenzahl	Basophilenzahl	Eosinophilenzahl	Basophilenzahl
EDTA vs. $MgSO_4$	0,939	0,877	n.s.	$p < 0,05$
EDTA vs. Citrat	0,975	0,760	n.s.	n.s.
Citrat vs. $MgSO_4$	0,946	0,731	n.s.	$p < 0,05$

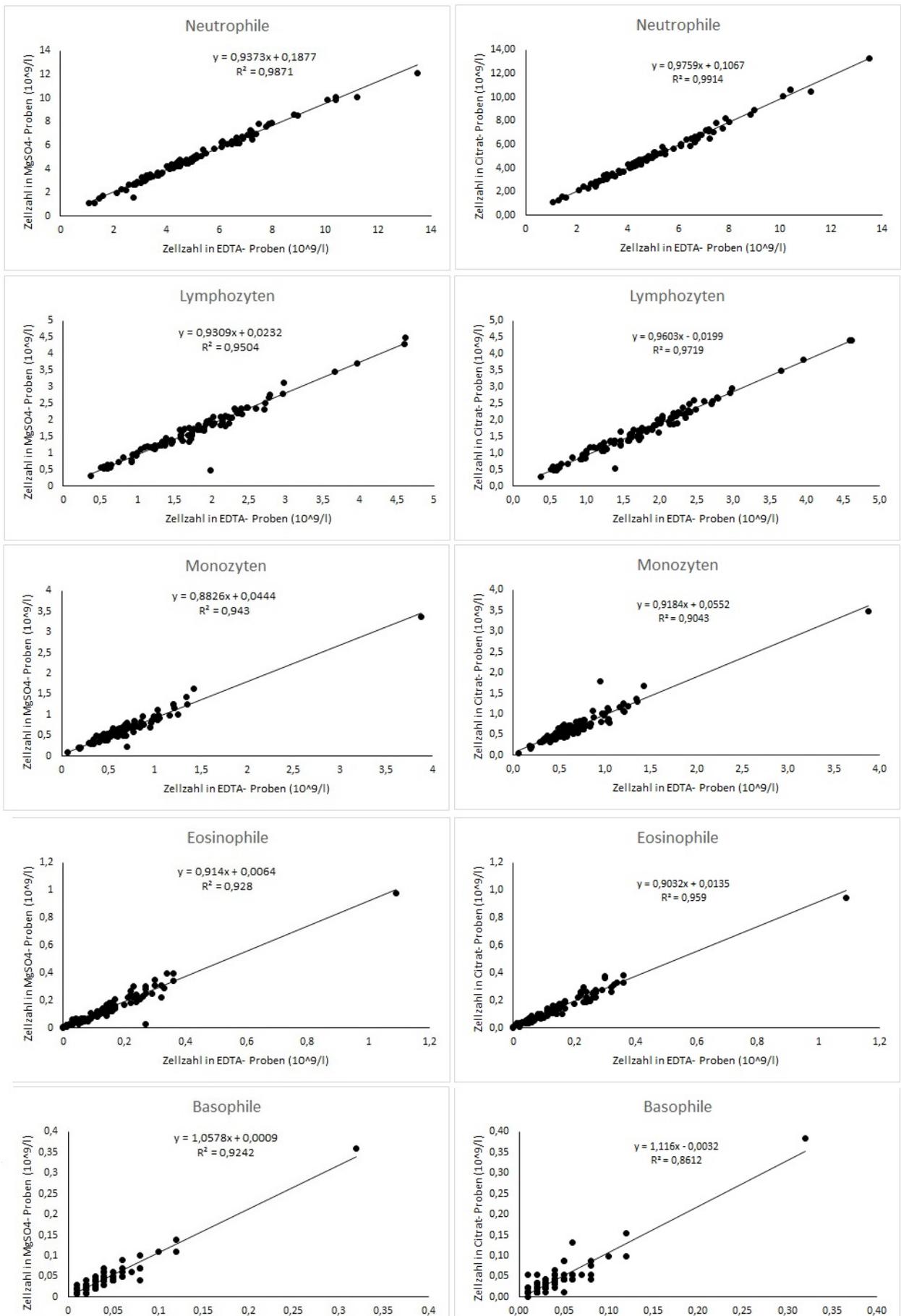


Abb. 26: Korrelation der unterschiedlichen Leukozytenpopulationen, gemessen in zeitgleich abgenommenen, unterschiedlich antikoagulierten Vollblutproben von 99 Patienten.

4.5. Zeitabhängige Veränderungen der Parameter des Kleinen und des Großen Blutbildes

Um die Zeitabhängigkeit des Einflusses der in dieser Arbeit vergleichend untersuchten Antikoagulanzen auf das sogenannte Kleine und das Große Blutbild zu evaluieren, wurden zwei unterschiedliche Ansätze gewählt: Einmal sollte der akute Einfluss der Lagerungszeit von bis zu 3 Stunden auf Zellzahl, Zellvolumen und maschineller Identifizierung der verschiedenen Leukozytenpopulationen untersucht werden. In einem anderen Ansatz sollte dann auch der Einfluss einer im Bereich der niedergelassenen Ärzte durchaus üblichen, längeren Lagerung bis zu 24 Stunden geprüft werden.

4.5.1. Kurzzeitige Veränderungen

Der Einfluss der EDTA-, MgSO₄- und Citrat-Antikoagulation auf die Stabilität unterschiedlicher Blutbildparameter im Verlauf von 3 Stunden Lagerung bis zur Messung der Blutbilder wurde an Vollblutproben von 20 Probanden vergleichend untersucht. Die Messungen erfolgten am XE 5000 zu den Zeitpunkten 0, 20, 40, 60 und 180 Minuten nach der Probenentnahme.

4.5.1.1. Zeitabhängige Veränderungen der Parameter des Kleinen Blutbildes

Die mittlere Erythrozytenzahl beträgt unmittelbar nach der Probenentnahme $4,89 \pm 0,48 \cdot 10^{12}/l$ in EDTA-Proben, $4,86 \pm 0,47 \cdot 10^{12}/l$ in MgSO₄-Proben und $4,86 \pm 0,47 \cdot 10^{12}/l$ in Citrat-Proben. Diese Werte unterscheiden sich statistisch nicht signifikant voneinander und bleiben im Verlauf von 180 Minuten stabil.

Das mittlere Erythrozytenvolumen (MCV) in EDTA-antikoagulierten Proben beträgt unmittelbar nach der Probenentnahme im Mittel $87,41 \pm 3,80$ fl (Median: 87,2 fl), nach 180 Minuten bleibt das MCV mit einem Wert von $87,12 \pm 4,07$ fl (Median: 86,90 fl) nahezu konstant.

Das unmittelbar gemessene MCV in MgSO₄-antikoagulierten Vollblutproben beträgt im Mittel $87,05 \pm 3,79$ fl (Median: 86,90 fl), im Verlauf von 3 Stunden ist eine statistisch signifikante ($p < 0,001$) Abnahme des mittleren MCV um 2,78 % auf einen Wert von $84,63 \pm 4,01$ fl (Median: 84,25 fl) zu verzeichnen.

In Citrat-antikoagulierten Vollblutproben beträgt das initial gemessene mittlere MCV $86,94 \pm 3,76$ fl (Median: 86,90 fl). Es verringert sich im Verlauf von 180 Minuten geringfügig, aber doch statistisch signifikant ($p < 0,001$), um 0,96 % auf einen Wert von $86,11 \pm 4,08$ fl (Median: 86,00 fl).

Während sich das mittlere MCV der EDTA-Proben direkt nach der Probenentnahme signifikant ($p <$

0,001), wenn auch marginal, von den entsprechenden Werten der MgSO₄- und der Citrat-Proben unterscheidet, liegt zwischen den MCV-Werten der beiden Kollektive kein statistisch signifikanter Unterschied vor. Nach 180-minütiger Probenlagerung besteht zwischen den mittleren MCV-Werten aller Kollektive allerdings ein statistisch signifikanter Unterschied ($p < 0,001$).

Unmittelbar nach der Probenentnahme beträgt die mittlere Hämoglobin-Konzentration 8,98 +/- 0,88 mmol/l (Median: 8,90 mmol/l) in EDTA-Proben, 8,96 +/- 0,88 mmol/l (Median: 8,95 mmol/l) in MgSO₄-Proben und 8,91 +/- 0,83 mmol/l (Median: 8,745 mmol/l) in Citrat-Proben. Die Werte bleiben im Verlauf von 180 Minuten stabil und unterscheiden sich sowohl zum Zeitpunkt „0 Minuten“, als auch nach 180-minütiger Probenlagerung statistisch nicht signifikant voneinander. Eine Ausnahme stellen die Messwerte der EDTA- und der MgSO₄-Proben nach „180 min“ dar, da sie sich zu diesem Zeitpunkt statistisch signifikant ($p < 0,05$) unterscheiden.

Der unmittelbar nach der Probenentnahme in EDTA-antikoagulierten Vollblutproben gemessene mittlere Hämatokrit beträgt 0,43 +/- 0,04 l/l (Median: 0,424 l/l). Im Verlauf von 180 Minuten bleibt der Wert nahezu konstant bei 0,43 +/- 0,04 l/l (Median: 0,426 l/l).

Der unmittelbar in MgSO₄-antikoagulierten Proben gemessene Wert liegt im Mittel bei 0,42 +/- 0,04 l/l (Median: 0,415 l/l). Im Verlauf von 3 Stunden ist ein statistisch signifikanter Rückgang ($p < 0,001$) um 2,83 % auf 0,41 +/- 0,04 l/l (Median: 0,407 l/l) erkennbar.

Der initial gemessene Hämatokrit in Citrat-antikoagulierten Vollblutproben beträgt 0,42 +/- 0,04 l/l (Median: 0,421 l/l), im Verlauf von 180 Minuten ist ein geringer (0,99 %) aber statistisch signifikanter ($p < 0,001$) Rückgang auf einen Wert von 0,42 +/- 0,04 l/l (Median: 0,415 l/l) zu beobachten.

Der mittlere Hämatokrit der EDTA-Proben unterscheidet sich bereits unmittelbar nach der Probenentnahme signifikant von dem der MgSO₄- ($p < 0,05$), bzw. dem der Citrat-Proben ($p < 0,05$). Zwischen den Werten der MgSO₄- und der Citrat-Proben besteht jedoch kein signifikanter Unterschied. Nach dreistündiger Probenlagerung unterscheidet sich der mittlere Hämatokrit der EDTA- und der MgSO₄-Proben statistisch signifikant voneinander ($p < 0,001$), gleiches gilt für die Messwerte der EDTA- und der Citrat-Proben ($p < 0,05$) und für die Messwerte der MgSO₄- verglichen mit denen der Citrat-Proben ($p < 0,05$).

Die unmittelbar nach der Probenentnahme in EDTA-antikoagulierten Vollblutproben gemessene Thrombozytenzahl beträgt im Mittel 223,65 +/- 51,41*10⁹/l (Median: 220*10⁹/l). Im Verlauf von 180 Minuten wird dann eine um 5,52 % höhere mittlere Thrombozytenzahl von 236,00 +/- 61,47*10⁹/l (Median: 236,50*10⁹/l) gemessen. Diese Zunahme ist statistisch hochsignifikant ($p = 0,001$).

In den MgSO₄-antikoagulierten Vollblutproben wird initial eine geringere Thrombozytenzahl von 197,25 +/- 42,77*10^{9/l} (Median: 193*10^{9/l}) und nach 180 Minuten eine, statistisch nicht signifikant, um 2,36 % höhere Thrombozytenzahl von 201,90 +/- 46,26*10^{9/l} (Median: 194,00*10^{9/l}) bestimmt.

In den Citrat-antikoagulierten Vollblutproben beträgt die um den Verdünnungsfaktor korrigierte initiale Thrombozytenzahl im Mittel 192,94 +/- 39,34*10^{9/l} (Median: 189,75*10^{9/l}), sie nimmt im Verlauf von 180 Minuten statistisch nicht signifikant um 2,94 % auf einen Wert von 187,28 +/- 42,98*10^{9/l} ab.

Sowohl unmittelbar nach der Probenentnahme, als auch nach 180-minütiger Lagerungszeit unterscheidet sich die mittlere Thrombozytenzahl in EDTA-Proben statistisch signifikant ($p < 0,001$) von jener der Citrat-, bzw. der MgSO₄-Proben. Zwischen den mittleren Thrombozytenzahlen der Citrat- und der MgSO₄-antikoagulierten Proben besteht zum Zeitpunkt „0 Minuten“ kein statistisch signifikanter Unterschied. Nach 180-minütiger Probenlagerung unterscheiden sich die Thrombozytenzahlen der beiden Kollektive allerdings statistisch signifikant.

Das unmittelbar nach der Probenentnahme gemessene MPV in EDTA-antikoagulierten Vollblutproben beträgt im Mittel 10,37 +/- 1,11 fl (Median: 10,45 fl). Im Verlauf von 180 Minuten nimmt der gemittelte Wert statistisch signifikant ($p < 0,001$) um 6,71 % auf einen Wert von 11,06 +/- 1,24 fl (Median: 10,95 fl) zu.

Das in MgSO₄-antikoagulierten Vollblutproben initial gemessene MPV von im Mittel 9,28 +/- 0,92 fl (Median: 9,4 fl) nimmt im Verlauf von 180 Minuten statistisch signifikant ($p < 0,001$) um 3,56 % auf einen Wert von 9,61 +/- 1,02 fl (Median: 9,60 fl) zu.

In den Citrat-antikoagulierten Vollblutproben wird gleich nach der Probenentnahme ein MPV von 9,49 +/- 1,07 fl (Median: 9,45 fl) gemessen, das im Verlauf von 3 Stunden statistisch signifikant ($p < 0,05$) um 2,79 % auf einen Wert von 9,75 +/- 0,92 fl (Median: 9,90 fl) ansteigt.

Das mittlere Plättchenvolumen in EDTA-antikoagulierten Proben unterscheidet sich sowohl unmittelbar nach der Probenentnahme, als auch nach 180-minütiger Lagerungszeit statistisch signifikant ($p < 0,001$) von den in Citrat- und in MgSO₄-antikoagulierten Proben gemessenen Werten. Das MPV in Citrat- und in MgSO₄-Proben unterscheidet sich sowohl zum Zeitpunkt „0 Minuten“, als auch zum Zeitpunkt „180 Minuten“ statistisch signifikant ($p < 0,05$).

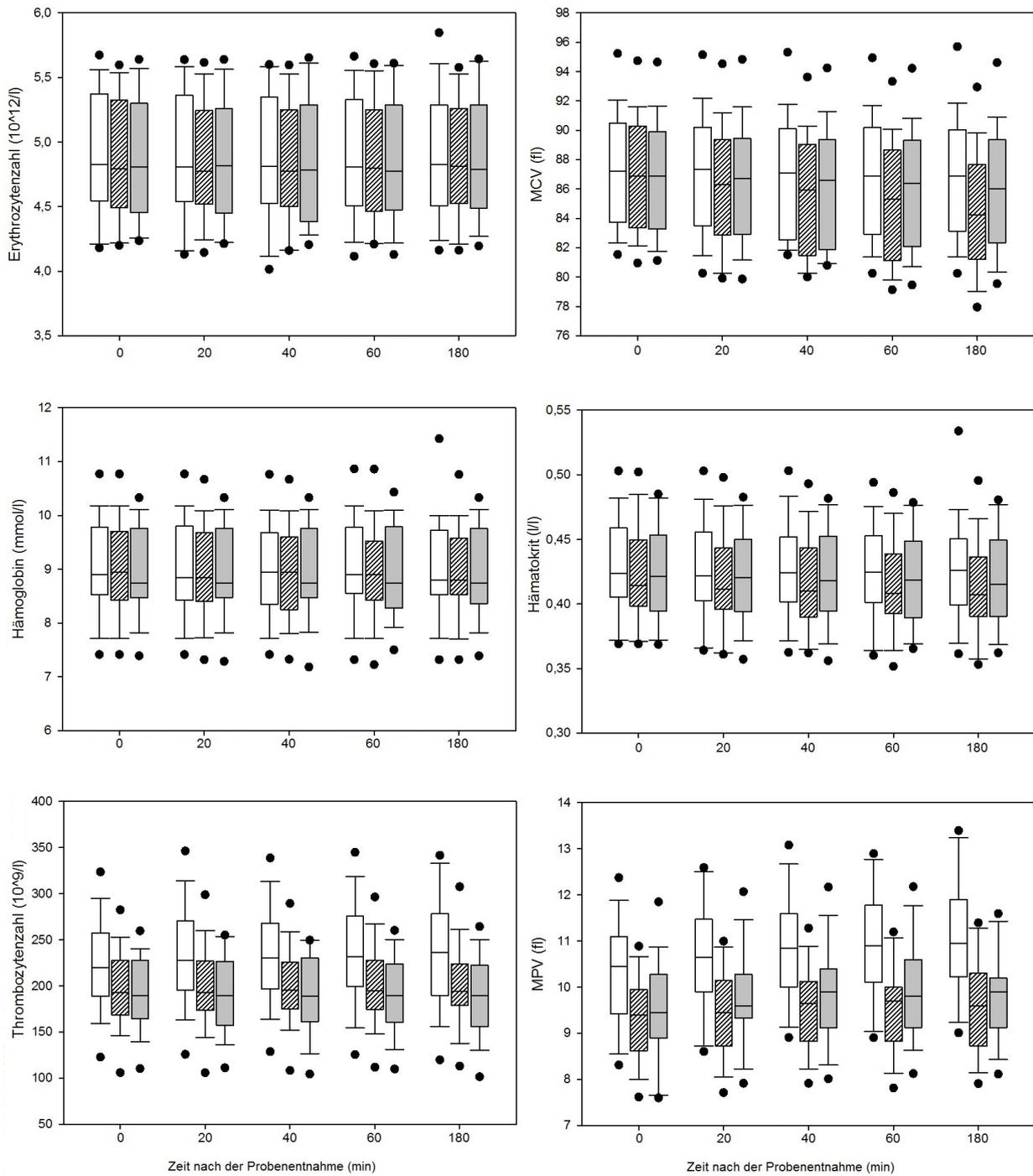


Abb. 27: Messgrößen des Kleinen Blutbildes von 20 Probanden, gemessen in zeitgleich abgenommenen, unterschiedlich antikoagulierten Vollblutproben (weiß = EDTA; schraffiert = MgSO₄; grau = Citrat) gleich nach der Abnahme (0 min) und nach 20, 40, 60, 180 Minuten.

4.5.1.2. Vergleich der mittels Impedanz- und der fluoreszenz-optisch gemessenen Thrombozytenzahl

Wie man der Abbildung 28 entnehmen kann, ist die mittels Impedanz gemessene mittlere Thrombozytenzahl in MgSO_4 -antikoagulierten Proben unmittelbar nach der Probenentnahme mit $189,9 \pm 41,9 \cdot 10^9/l$ vergleichbar mit der in Citrat-antikoagulierten Proben gemessenen mittleren Thrombozytenzahl ($184,3 \pm 37,7 \cdot 10^9/l$). Ein statistisch signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) der Thrombozytenzahlen besteht gegenüber den deutlich höheren, in den EDTA-Proben (MW: $216,9 \pm 49,2 \cdot 10^9/l$) gemessenen Werten. Auch die Thrombozytenzahlen in EDTA- und Citrat-antikoagulierten Proben unterscheiden sich statistisch signifikant voneinander ($p < 0,05$).

Die mit der fluoreszenz-optischen Messmethode gemessenen Thrombozytenzahlen in MgSO_4 -antikoagulierten Vollblutproben (MW: $222,8 \pm 53 \cdot 10^9/l$) unterscheiden sich nur geringfügig von den in EDTA-Proben gemessenen Thrombozytenzahlen (MW: $228,3 \pm 53,8 \cdot 10^9/l$). Dieser geringe Unterschied ist jedoch noch statistisch signifikant ($p < 0,05$). Auch zu den Thrombozytenzahlen der Citrat-antikoagulierten Vollblutproben ($204 \pm 47,6 \cdot 10^9/l$) besteht eine statistisch signifikante Differenz ($p < 0,05$). Zwischen den Thrombozytenzahlen der EDTA- und der Citrat-Proben besteht ebenfalls eine statistisch signifikante Differenz ($p < 0,05$).

Im Verlauf von 180 Minuten ist in den MgSO_4 -Proben eine statistisch signifikante Zunahme ($p < 0,05$) der mittels Impedanz bestimmten Thrombozytenzahl um 4,27 % auf $198,0 \pm 44,4 \cdot 10^9/l$ zu erkennen. Die Erhöhung der Plättchenzahl in den EDTA-Proben um 3,89 % auf $225,3 \pm 58 \cdot 10^9/l$ ist statistisch nicht signifikant. In den Citrat-Proben nimmt die mittlere Plättchenzahl um 1,87 % auf $180,9 \pm 38,7 \cdot 10^9/l$ ab.

Die fluoreszenz-optisch gemessene Thrombozytenzahl in den MgSO_4 -antikoagulierten Proben bleibt im Verlauf von 3 Stunden mit $221,3 \pm 55,2 \cdot 10^9/l$ nahezu konstant. Die Differenz zum Ausgangswert beträgt nur 0,65 %. Die in den EDTA-antikoagulierten Proben gemessene mittlere Thrombozytenzahl nimmt in diesem Zeitraum um 2,34 % auf $223 \pm 54,3 \cdot 10^9/l$ ab. In Citrat-antikoagulierten Vollblutproben beträgt der Abfall 4,25 % und resultiert in einem Wert von $195,3 \pm 44,2 \cdot 10^9/l$.

Die zeitabhängigen Änderungen der Thrombozytenzahlen, die fluoreszenz-optisch gemessen wurden, sind mit Ausnahme der Werte der Citrat-antikoagulierten Proben ($p < 0,05$), statistisch nicht signifikant.

Der Vergleich der Werte der Impedanz-Messung zum Zeitpunkt "180 min" zeigt, dass sich die Thrombozytenzahlen der EDTA- und der MgSO_4 -Proben, bzw. der EDTA- und der Citrat-Proben signifikant voneinander unterscheiden ($p < 0,05$). Zwischen den MgSO_4 -antikoagulierten Vollblutproben und den Citrat-antikoagulierten Vollblutproben besteht dagegen kein solcher

signifikanter Unterschied.

Beim fluoreszenz-optischen Messverfahren unterscheiden sich die Werte der Citrat-Proben zwar jeweils statistisch signifikant ($p < 0,05$) von denen der EDTA- und der Magnesiumsulfat-Proben, zwischen den Werten dieser beiden derart antikoagulierten Proben besteht jedoch keine signifikante Differenz.

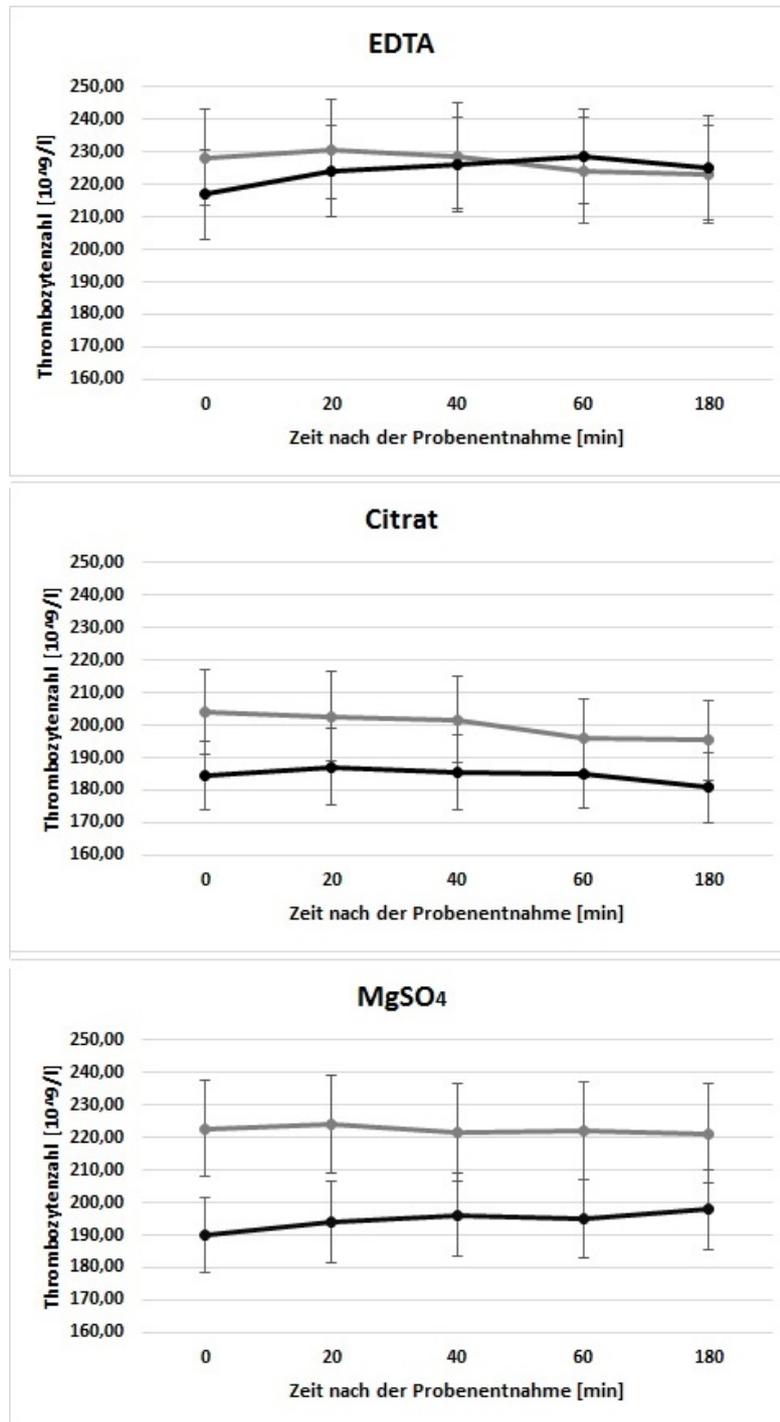


Abb. 28: Vergleich der mittels Impedanz (schwarz) und fluoreszenz-optischer Methode (grau) gemessenen Thrombozytenzahlen in unterschiedlich antikoagulierten Vollblutproben von 9 Probanden. Die Whisker repräsentieren die Standardabweichung des Mittelwerts (SEM).

4.5.1.3. Zeitabhängige Veränderungen der Parameter des maschinellen Differentialblutbildes

Die gleich nach der Probenentnahme gemessene mittlere Leukozytenzahl in den EDTA-antikoagulierten Vollblutproben beträgt $6,74 \pm 1,66 \cdot 10^9/l$ (Median: $6,325 \cdot 10^9/l$), im Verlauf von 180 Minuten nehmen die Werte statistisch signifikant ($p < 0,05$) ab. Der Mittelwert nimmt um 2,50 % auf einen Wert von $6,57 \pm 1,63 \cdot 10^9/l$ (Median: $6,295 \cdot 10^9/l$) ab.

In $MgSO_4$ -antikoagulierten Vollblutproben wird unmittelbar nach der Probenentnahme eine mittlere Leukozytenzahl von $6,66 \pm 1,61 \cdot 10^9/l$ (Median: $6,525 \cdot 10^9/l$) gemessen, sie verringert sich im Verlauf von 180 Minuten um 1,30 % auf $6,57 \pm 1,53 \cdot 10^9/l$ (Median: $6,34 \cdot 10^9/l$). Die Wertelagen unterscheiden sich allerdings nicht signifikant.

Die unmittelbar nach der Probengewinnung gemessene Leukozytenzahl in Citrat-antikoagulierten Vollblutproben beträgt im Mittel $6,76 \pm 1,49 \cdot 10^9/l$ (Median: $6,749 \cdot 10^9/l$), im Verlauf von 180 Minuten ist eine statistisch signifikante Abnahme ($p < 0,05$) der Leukozytenzahlen um 3,11 % auf einen Mittelwert von $6,55 \pm 1,56 \cdot 10^9/l$ (Median: $6,287 \cdot 10^9/l$) zu beobachten.

Die Leukozytenzahlen der unterschiedlich antikoagulierten Vollblutproben unterscheiden sich sowohl direkt nach der Probengewinnung, als auch nach dreistündiger Probenlagerung statistisch nicht signifikant voneinander.

Die unmittelbar nach der Probenentnahme gemessene mittlere Neutrophilenzahl in EDTA-Proben beträgt $3,87 \pm 1,34 \cdot 10^9/l$ (Median: $3,64 \cdot 10^9/l$). Im Verlauf von 180 Minuten kommt es zu einer Abnahme der mittleren Neutrophilenzahl um 3,68 % auf $3,73 \pm 1,33 \cdot 10^9/l$ (Median: $3,66 \cdot 10^9/l$). Die Abnahme der Neutrophilenzahl ist statistisch hochsignifikant ($p < 0,001$).

In $MgSO_4$ -antikoagulierten Vollblutproben wird unmittelbar nach der Probenentnahme eine mittlere Neutrophilenzahl von $3,82 \pm 1,30 \cdot 10^9/l$ (Median: $3,555 \cdot 10^9/l$) gemessen, sie verringert sich im Verlauf von 180 Minuten um 1,10 % auf $3,78 \pm 1,29 \cdot 10^9/l$ (Median: $3,56 \cdot 10^9/l$). Die Wertelagen unterscheiden sich aber nicht signifikant.

Die direkt nach der Probengewinnung in Citrat-antikoagulierten Vollblutproben gemessene Neutrophilenzahl beträgt $3,91 \pm 1,31 \cdot 10^9/l$ (Median: $3,652 \cdot 10^9/l$), im Verlauf von 3 Stunden ist eine statistisch signifikante Abnahme ($p < 0,05$) der Neutrophilenzahlen um 4,87 % auf einen Mittelwert von $3,72 \pm 1,31 \cdot 10^9/l$ (Median: $3,377 \cdot 10^9/l$) zu beobachten.

Die Neutrophilenzahlen in den unterschiedlich antikoagulierten Vollblutproben unterscheiden sich weder direkt nach der Probengewinnung, noch nach dreistündiger Probenlagerung statistisch signifikant voneinander.

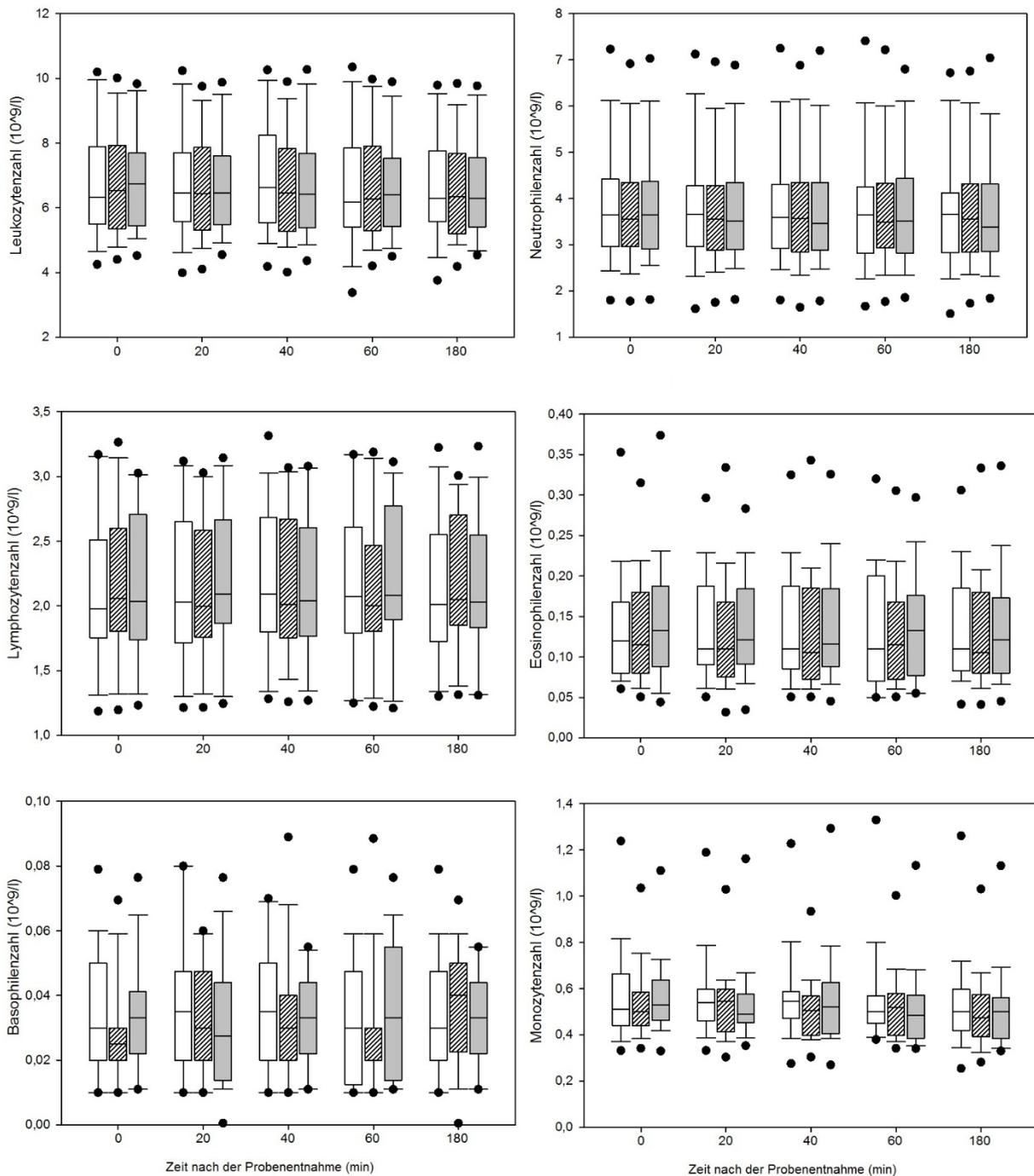


Abb. 29: Veränderungen der Messgrößen der maschinell differenzierten Leukozytenpopulationen von 20 Probanden im Verlauf von 180 Minuten, gemessen in zeitgleich abgenommenen, unterschiedlich antikoagulierten Vollblutproben (weiß = EDTA; schraffiert = MgSO₄; grau = Citrat).

In EDTA-antikoagulierten Vollblutproben wird unmittelbar nach der Probenentnahme eine mittlere Lymphozytenzahl von $2,13 \pm 0,61 \cdot 10^9/l$ (Median: $1,98 \cdot 10^9/l$) gemessen. Im Verlauf von 3 Stunden bleibt die Zahl nahezu konstant bei $2,13 \pm 0,58 \cdot 10^9/l$ (Median: $2,01 \cdot 10^9/l$).

Die unmittelbar nach der Probenentnahme in MgSO₄-antikoagulierten Vollblutproben gemessene Lymphozytenzahl beträgt im Mittel $2,15 \pm 0,60 \cdot 10^9/l$ (Median: $2,06 \cdot 10^9/l$). Im Verlauf von 180 Minuten ist eine Abnahme der mittleren Zellzahl um 1,09 % auf $2,12 \pm 0,55 \cdot 10^9/l$ (Median:

$2,05 \cdot 10^9/l$) zu verzeichnen. Die Veränderung der Wertelagen ist statistisch nicht signifikant.

Die direkt nach der Probengewinnung in Citrat-antikoagulierten Vollblutproben gemessene mittlere Lymphozytenzahl beträgt $2,12 \pm 0,56 \cdot 10^9/l$ (Median: $2,035 \cdot 10^9/l$), sie nimmt im Verlauf von 3 Stunden um 1,23 % zu auf $2,14 \pm 0,58 \cdot 10^9/l$ (Median: $2,030 \cdot 10^9/l$).

Die Lymphozytenzahlen der unterschiedlich antikoagulierten Vollblutproben unterscheiden sich weder direkt nach der Probengewinnung, noch in den nach 180 Minuten gelagerten Proben statistisch signifikant voneinander.

Unmittelbar nach der Probenentnahme beträgt die mittlere Eosinophilenzahl in EDTA-Proben $0,14 \pm 0,07 \cdot 10^9/l$ (Median: $0,12 \cdot 10^9/l$), sie bleibt im Verlauf von 3 Stunden nahezu konstant bei $0,14 \pm 0,07 \cdot 10^9/l$ (Median: $0,11 \cdot 10^9/l$).

In $MgSO_4$ -antikoagulierten Vollblutproben wird unmittelbar nach der Probengewinnung eine mittlere Eosinophilenzahl von $0,14 \pm 0,07 \cdot 10^9/l$ (Median: $0,115 \cdot 10^9/l$) gemessen. Im Verlauf von 180 Minuten ist eine Abnahme der mittleren Eosinophilenzahl um 3,33 % auf $0,13 \pm 0,07 \cdot 10^9/l$ (Median: $0,105 \cdot 10^9/l$) zu verzeichnen. Die Veränderungen der Eosinophilenzahlen sind statistisch nicht signifikant.

Die unmittelbar nach der Probengewinnung in Citrat-antikoagulierten Vollblutproben gemessene Eosinophilenzahl beträgt im Mittel $0,14 \pm 0,08 \cdot 10^9/l$ (Median: $0,132 \cdot 10^9/l$). Im Verlauf von 3 Stunden lässt sich eine Abnahme der mittleren Eosinophilenzahl um 5,39 % auf $0,13 \pm 0,07 \cdot 10^9/l$ (Median: $0,121 \cdot 10^9/l$) erkennen.

Die in unterschiedlich antikoagulierten Vollblutproben bestimmten Eosinophilenzahlen unterscheiden sich weder direkt nach der Probengewinnung, noch in den nach 180 Minuten gelagerten Proben statistisch signifikant voneinander.

Die unmittelbar nach der Probengewinnung in EDTA-antikoagulierten Vollblutproben gemessene Basophilenzahl beträgt im Mittel $0,03 \pm 0,02 \cdot 10^9/l$ (Median: $0,03 \cdot 10^9/l$), sie bleibt im Verlauf von 180 Minuten nahezu konstant bei $0,03 \pm 0,02 \cdot 10^9/l$ (Median: $0,03 \cdot 10^9/l$).

In $MgSO_4$ -antikoagulierten Vollblutproben wird unmittelbar nach der Probengewinnung eine mittlere Basophilenzahl von $0,03 \pm 0,02 \cdot 10^9/l$ (Median: $0,025 \cdot 10^9/l$) gemessen. Im Verlauf von 180 Minuten ist eine Zunahme der Basophilenzahl um 26,32 % auf $0,04 \pm 0,02 \cdot 10^9/l$ (Median: $0,04 \cdot 10^9/l$) zu erkennen. Diese Veränderung ist statistisch signifikant ($p < 0,05$).

Die unmittelbar nach der Probengewinnung in Citrat-antikoagulierten Vollblutproben gemessene Basophilenzahl beträgt $0,03 \pm 0,02 \cdot 10^9/l$ (Median: $0,033 \cdot 10^9/l$), sie bleibt im Verlauf von 180 Minuten nahezu konstant bei $0,03 \pm 0,02 \cdot 10^9/l$ (Median: $0,033 \cdot 10^9/l$).

Die Basophilenzahlen der unterschiedlich antikoagulierten Vollblutproben unterscheiden sich weder

direkt nach der Probengewinnung, noch in den nach 180 Minuten gelagerten Proben statistisch signifikant voneinander.

Die unmittelbar nach der Probenentnahme in EDTA-antikoagulierten Vollblutproben gemessene Monozytenzahl beträgt im Mittel $0,56 \pm 0,21 \cdot 10^9/l$ (Median: $0,51 \cdot 10^9/l$). Im Verlauf von 180 Minuten ist eine statistisch nicht signifikante Abnahme der Monozytenzahlen zu erkennen. Der Mittelwert nimmt um 4,27 % auf $0,54 \pm 0,21 \cdot 10^9/l$ (Median: $0,50 \cdot 10^9/l$) ab.

In $MgSO_4$ -antikoagulierten Vollblutproben wird unmittelbar nach der Probenentnahme eine mittlere Monozytenzahl von $0,53 \pm 0,16 \cdot 10^9/l$ (Median: $0,50 \cdot 10^9/l$) gemessen, sie verringert sich im Verlauf von 180 Minuten um 4,54 % auf $0,50 \pm 0,17 \cdot 10^9/l$ (Median: $0,475 \cdot 10^9/l$). Diese Änderung ist statistisch nicht signifikant.

Die unmittelbar nach der Probengewinnung in Citrat-antikoagulierten Vollblutproben gemessene Monozytenzahl beträgt im Mittel $0,56 \pm 0,17 \cdot 10^9/l$ (Median: $0,528 \cdot 10^9/l$). Im Verlauf von 180 Minuten ist eine Abnahme der Monozytenzahl um 8,44 % auf $0,51 \pm 0,19 \cdot 10^9/l$ (Median: $0,501 \cdot 10^9/l$) zu beobachten, eine Änderung der Wertelage, die statistisch signifikant ($p < 0,05$) ist. Zwischen den Monozytenzahlen der unterschiedlich antikoagulierten Vollblutproben liegt weder direkt nach der Probengewinnung, noch in den nach 180 Minuten gelagerten Proben eine statistisch signifikante Differenz vor.

4.5.2. Langzeitige Veränderungen

Die Messgrößen des Kleinen und des Großen Blutbildes wurden im Verlauf von 24 Stunden an 9 Probanden in jeweils 3 unterschiedlich antikoagulierten Vollblutproben am Gerät XE 5000 gemessen.

4.5.2.1. Zeitabhängige Veränderungen der Parameter des Kleinen Blutbildes

Unmittelbar nach der Probennahme wird in EDTA-Proben eine mittlere Erythrozytenzahl von $4,73 \pm 0,31 \cdot 10^{12}/l$ gemessen. Nach 24 Stunden verringert sich die Zahl auf $4,59 \pm 0,30 \cdot 10^{12}/l$. Dieser Rückgang um 3,14 % ist statistisch signifikant ($p < 0,05$).

Die zeitnah nach Probengewinnung gemessene Erythrozytenzahl in $MgSO_4$ -antikoagulierten Proben beträgt im Mittel $4,60 \pm 0,36 \cdot 10^{12}/l$. Im Verlauf von 24 Stunden kann eine leichte, statistisch nicht signifikante Abnahme der Zahl um 0,17 % auf $4,59 \pm 0,30 \cdot 10^{12}/l$ beobachtet werden.

In Citrat-antikoagulierten Vollblutproben beträgt die mittlere Erythrozytenzahl initial $4,67 \pm 0,26 \cdot 10^{12}/l$. Im Verlauf von 24 Stunden ist eine Abnahme der Erythrozytenzahlen um 2,83 % zu verzeichnen, die statistisch signifikant ($p < 0,05$) ist.

Die Erythrozytenzahlen der unterschiedlich antikoagulierten Vollblutproben unterscheiden sich, sowohl bei unmittelbar erfolgter Messung, als auch zum Zeitpunkt „24 Stunden“, statistisch nicht signifikant voneinander.

Das zeitnah nach der Probenentnahme gemessene MCV in EDTA-antikoagulierten Proben beträgt im Mittel $88,09 \pm 2,72$ fl, es nimmt im Verlauf von 24 Stunden um 10,00 % auf $96,90 \pm 4,23$ fl zu. Diese Veränderung ist statistisch signifikant ($p < 0,05$).

In $MgSO_4$ -antikoagulierten Vollblutproben wird zum Zeitpunkt „0 Minuten“ ein MCV von $87,13 \pm 2,72$ fl gemessen, es erhöht sich im Verlauf von 24 Stunden statistisch signifikant ($p < 0,05$) um 2,13 % auf $88,99 \pm 2,96$ fl.

Unmittelbar nach der Probenentnahme wird in Citrat-antikoagulierten Vollblutproben ein MCV von $87,46 \pm 2,69$ fl gemessen. Im Verlauf von 24 Stunden ist eine statistisch signifikante ($p < 0,05$) Zunahme des MCV um 5,55 % auf einen Wert von $92,31 \pm 3,23$ fl zu verzeichnen.

Die MCV-Werte der unterschiedlich antikoagulierten Vollblutproben unterscheiden sich, sowohl bei unmittelbar erfolgter Messung, als auch nach 24-stündiger Probenlagerung, statistisch signifikant voneinander ($p < 0,05$).

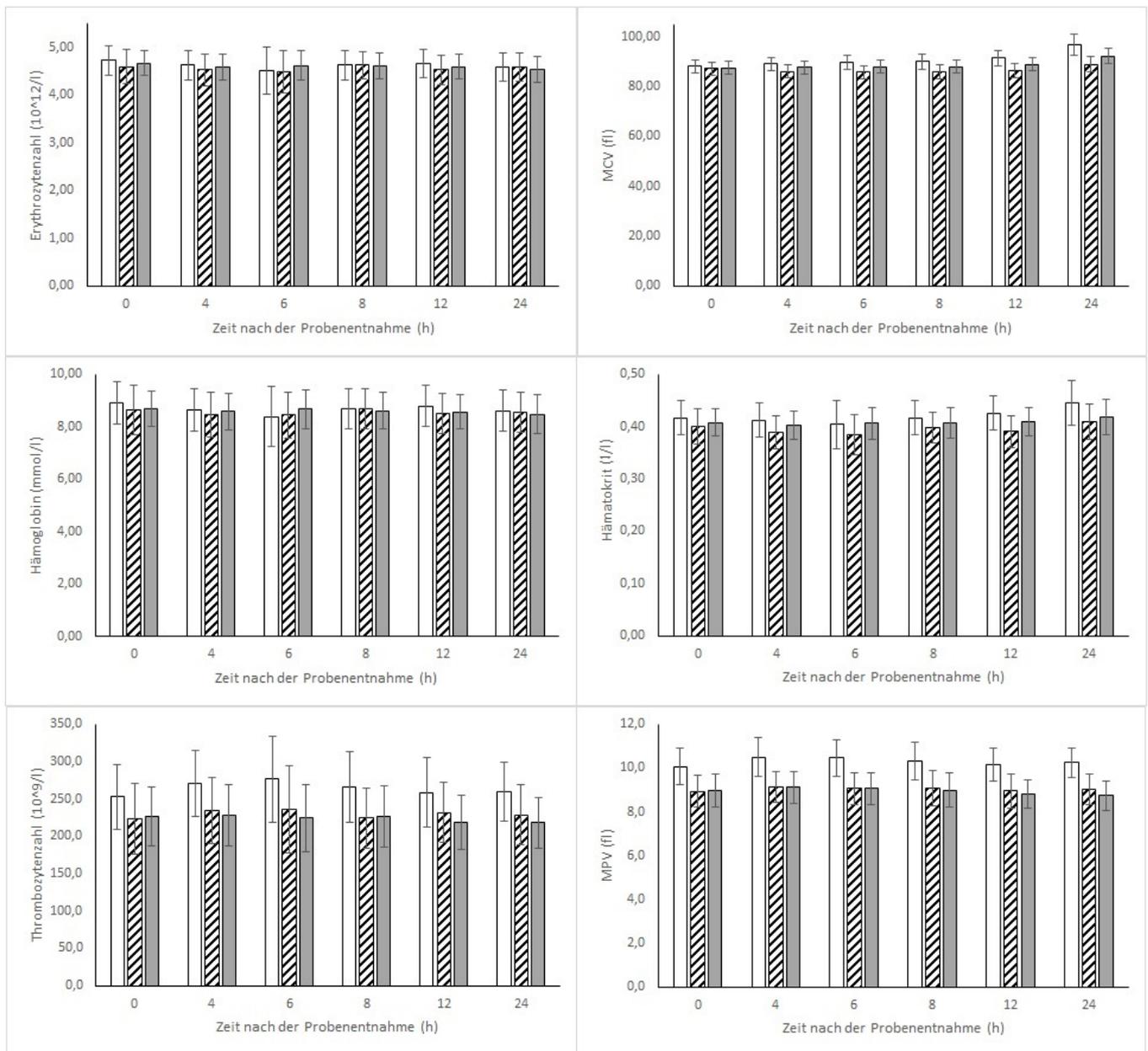


Abb. 30: Veränderungen der Messgrößen des kleinen Blutbildes von 9 Probanden im Verlauf von 24 Stunden, gemessen in zeitgleich abgenommenen, unterschiedlich antikoagulierten Vollblutproben (weiß = EDTA; schraffiert = MgSO₄; grau = Citrat).

Direkt nach der Probengewinnung beträgt die Hämoglobin-Konzentration in EDTA-Proben im Mittel 8,92 +/- 0,81 mmol/l, die Werte verringern sich im Verlauf von 24 Stunden um 3,56 % auf 8,60 +/- 0,79 mmol/l. Dieser Rückgang ist statistisch signifikant ($p < 0,05$).

In MgSO₄-Proben beträgt die unmittelbar nach der Probenentnahme gemessene Hämoglobin-Konzentration 8,64 +/- 0,94 mmol/l, im Verlauf von 24 Stunden verringert sich diese geringfügig und statistisch nicht signifikant um 0,72 % auf 8,58 +/- 0,77 mmol/l.

In Citrat-Proben wird unmittelbar nach Probengewinnung eine Hämoglobin-Konzentration von im Mittel 8,68 +/- 0,68 mmol/l gemessen, die Werte verringern sich im Verlauf von 24 Stunden statistisch nicht signifikant um 2,19 % auf einen Mittelwert von 8,49 +/- 0,75 mmol/l.

Zum Zeitpunkt „0 Minuten“ liegt ein statistisch signifikanter Unterschied nur zwischen den Hämoglobin-Konzentrationen der EDTA- und der Citrat-Proben vor ($p < 0,05$). Nach 24-stündiger Probenlagerung besteht zwischen den Werten der unterschiedlich antikoagulierten Proben kein statistisch signifikanter Unterschied.

In EDTA-antikoagulierten Vollblutproben beträgt der Hämatokrit unmittelbar nach der Probenentnahme im Mittel $0,42 \pm 0,03$ l/l, die Werte erhöhen sich im Verlauf von 24 Stunden um 6,66 % auf einen Mittelwert von $0,45 \pm 0,04$ l/l. Die Zunahme ist statistisch signifikant ($p < 0,05$). In $MgSO_4$ -antikoagulierten Proben wird zeitnah nach der Probengewinnung ein mittlerer Hämatokrit von $0,40 \pm 0,03$ l/l gemessen, innerhalb von 24 Stunden ist eine Erhöhung der Werte um 2,02 % auf einen Mittelwert von $0,41 \pm 0,03$ l/l zu verzeichnen. Diese Zunahme ist statistisch nicht signifikant. Zum Zeitpunkt „0 Minuten“ wird in Citrat-antikoagulierten Vollblutproben ein mittlerer Hämatokrit von $0,41 \pm 0,03$ l/l gemessen, die Werte erhöhen sich im Zeitverlauf von 24 Stunden um 2,63 % auf einen Mittelwert von $0,42 \pm 0,03$ l/l. Die Zunahme ist statistisch nicht signifikant.

Sowohl unmittelbar nach der Probenentnahme, als auch nach 24-stündiger Lagerungszeit unterscheiden sich die Hämatokrit-Werte der EDTA-Proben statistisch signifikant ($p < 0,05$) von denen der Citrat- und der $MgSO_4$ -Proben, während zwischen deren Hämatokrit-Werte zu beiden Zeitpunkten kein statistisch signifikanter Unterschied besteht.

Direkt nach der Probengewinnung wird in EDTA-antikoagulierten Vollblutproben eine mittlere Thrombozytenzahl von $253,0 \pm 43,5 \cdot 10^9/l$ gemessen, die Thrombozytenzahlen erhöhen sich im Zeitverlauf von 24 Stunden um 2,72 % auf einen Mittelwert von $259,9 \pm 40,1 \cdot 10^9/l$. Die Zunahme der Plättchenzahl ist statistisch jedoch nicht signifikant.

In $MgSO_4$ -antikoagulierten Vollblutproben beträgt die zum Zeitpunkt „0 Minuten“ gemessene Thrombozytenzahl im Mittel $223,9 \pm 47,3 \cdot 10^9/l$, die Werte erhöhen sich im Zeitverlauf von 24 Stunden statistisch nicht signifikant um 2,23 % auf $228,9 \pm 40,3 \cdot 10^9/l$.

Die unmittelbar nach Probenentnahme in Citrat-Proben gemessene mittlere Thrombozytenzahl beträgt $226,8 \pm 39,0 \cdot 10^9/l$, im Verlauf von 24 Stunden ist eine statistisch signifikante ($p < 0,05$) Abnahme der Thrombozytenzahlen um 3,88 % auf $218,0 \pm 34,4 \cdot 10^9/l$ zu verzeichnen.

Sowohl unmittelbar nach der Probenentnahme, als auch nach 24-stündiger Lagerungszeit unterscheiden sich die Thrombozytenzahlen in EDTA-Proben statistisch signifikant ($p < 0,05$) von jenen in Citrat- und in $MgSO_4$ -Proben. Zwischen den Thrombozytenzahlen der Citrat- und der $MgSO_4$ -Proben besteht zum Zeitpunkt „0 Minuten“ kein statistisch signifikanter Unterschied, nach einer 24-stündigen Probenlagerung ist jedoch ein statistisch signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zwischen den Thrombozytenzahlen zu verzeichnen.

Das direkt nach der Probenentnahme in EDTA-Proben gemessene MPV beträgt im Mittel 10,1 +/- 0,8 fl, im Verlauf von 24 Stunden erhöhen sich die Werte um 1,66 % auf 10,2 +/- 0,7 fl. Die Zunahme der Werte ist statistisch nicht signifikant.

In MgSO₄-antikoagulierten Proben beträgt das MPV zum Zeitpunkt „0 Minuten“ im Mittel 8,9 +/- 0,7 fl, im Zeitverlauf von 24 Stunden ist eine statistisch nicht signifikante Zunahme der MPV-Werte um 1,12 % auf einen Mittelwert von 9,0 +/- 0,7 fl zu verzeichnen.

In Citrat-Proben wird unmittelbar nach der Probengewinnung ein mittleres MPV von 9,0 +/- 0,7 fl gemessen, die Werte erniedrigen sich im Verlauf von 24 Stunden statistisch signifikant ($p < 0,05$) um 2,72 % auf einen Mittelwert von 8,7 +/- 0,7 fl.

Sowohl direkt nach der Probenentnahme, als auch nach 24-stündiger Probenlagerung unterscheiden sich die mittleren Plättchenvolumina der EDTA-Proben statistisch signifikant ($p < 0,05$) von den entsprechenden Werten der Citrat- und der MgSO₄-Proben. Zwischen den MPV-Werten der Citrat- und der MgSO₄-Proben besteht zum Zeitpunkt „0 Minuten“ kein statistisch signifikanter Unterschied, nach einer 24-stündigen Probenlagerung ist jedoch ein statistisch signifikanter ($p < 0,05$) Unterschied der MPV-Werte zu erkennen.

4.5.2.2. Zeitabhängige Veränderungen der Parameter des maschinellen Differentialblutbildes

Nach 24-stündiger Probenlagerung sind teilweise deutliche Änderungen der Zellzahlen bei verschiedenen Zellpopulationen des großen Blutbildes erkennbar.

Die mittlere Leukozytenzahl der EDTA-antikoagulierten Vollblutproben beträgt unmittelbar nach der Probenentnahme $5,62 \pm 1,11 \cdot 10^9/l$, im Verlauf von 24 Stunden nehmen die Leukozytenzahlen statistisch signifikant ($p < 0,05$) um 4,13 % auf einen Mittelwert von $5,86 \pm 1,24 \cdot 10^9/l$ zu.

In MgSO₄-antikoagulierten Vollblutproben beträgt die unmittelbar nach der Probengewinnung gemessene Leukozytenzahl im Mittel $5,73 \pm 1,28 \cdot 10^9/l$, die Zahlen fallen im Verlauf von 24 Stunden um 9,45 % auf einen Mittelwert von $5,19 \pm 1,26 \cdot 10^9/l$ ab. Die Abnahme der Leukozytenzahl ist statistisch signifikant ($p < 0,05$).

Die unmittelbar nach Probenentnahme in Citrat-antikoagulierten Vollblutproben gemessene Leukozytenzahl liegt im Mittel bei $5,82 \pm 1,22 \cdot 10^9/l$. Im Verlauf von 24 Stunden ist ein statistisch nicht signifikanter Rückgang der Werte um 2,62 % auf einen Mittelwert von $5,67 \pm 1,30 \cdot 10^9/l$ zu verzeichnen. Die zeitnah nach der Probenentnahme in den unterschiedlich antikoagulierten Vollblutproben gemessenen Leukozytenzahlen unterscheiden sich statistisch nicht signifikant voneinander, nach 24-stündiger Probenlagerung ist eine statistisch signifikante Differenz zwischen den Leukozytenzahlen der EDTA-, bzw. der Citrat-Proben und denen der MgSO₄-Proben zu erkennen

($p < 0,05$), während zwischen den Werten der EDTA- und der Citrat-Proben kein signifikanter Unterschied besteht.

Unmittelbar nach der Probenentnahme beträgt die Neutrophilenzahl der EDTA-Proben im Mittel $2,83 \pm 0,73 \cdot 10^9/l$, im Verlauf von 24 Stunden nehmen die Werte um 7,49 % auf einen Mittelwert von $3,04 \pm 0,82 \cdot 10^9/l$ zu. Dieser Anstieg ist statistisch signifikant ($p < 0,05$).

Die mittlere Neutrophilenzahl in $MgSO_4$ -antikoagulierten Vollblutproben beträgt direkt nach Probengewinnung $2,88 \pm 0,77 \cdot 10^9/l$. Die Werte fallen im Verlauf von 24 Stunden um 14,68 % auf im Mittel $2,45 \pm 0,80 \cdot 10^9/l$. Diese Veränderung ist statistisch signifikant ($p < 0,05$).

In Citrat-antikoagulierten Vollblutproben liegt die für den Verdünnungsfaktor korrigierte Neutrophilenzahl zu Beginn im Mittel bei $2,94 \pm 0,80 \cdot 10^9/l$, die Zahlen sinken im Verlauf von 24 Stunden um 2,73 % auf einen mittleren Wert von $2,87 \pm 0,86 \cdot 10^9/l$. Dieser Rückgang ist statistisch jedoch nicht signifikant. Betrachtet man die Werte der ersten Messung, so sind die Unterschiede der Neutrophilenzahlen in den verschiedenen Antikoagulanzen statistisch nicht signifikant, jedoch unterscheiden sich die Neutrophilenzahlen aller Antikoagulanzen 24 Stunden nach der Probenentnahme statistisch signifikant voneinander (EDTA und Citrat: $p < 0,05$; $MgSO_4$ und Citrat: $p < 0,05$; EDTA und $MgSO_4$: $p < 0,05$).

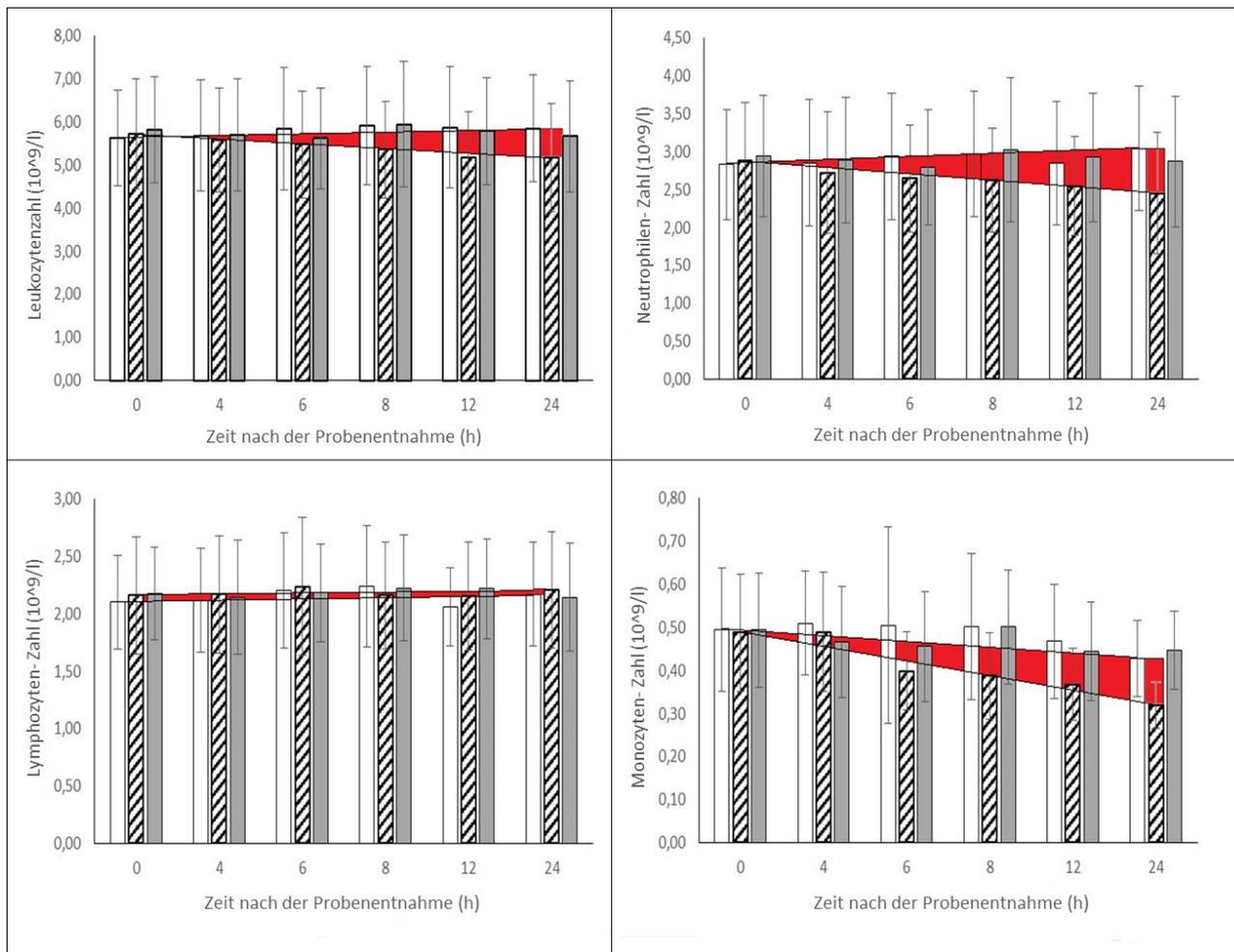


Abb. 31: Messgrößen des großen Blutbildes von 9 Probanden im Verlauf von 24 Stunden, gemessen in zeitgleich abgenommenen, unterschiedlich antikoagulierten Vollblutproben (weiß = EDTA; schraffiert = MgSO₄; grau = Citrat). Die Differenz der Werte der EDTA-Proben zu denen der MgSO₄-Proben im zeitlichen Verlauf ist rot hinterlegt.

Die mittlere Lymphozytenzahl der EDTA-Proben beträgt zu Beginn $2,10 \pm 0,41 \cdot 10^9/l$, die Zahlen steigen im Verlauf von 24 Stunden um 3,12 % auf im Mittel $2,17 \pm 0,45 \cdot 10^9/l$. Dieser Anstieg ist statistisch jedoch nicht signifikant.

Die initial in MgSO₄-antikoagulierten Vollblutproben gemessene Lymphozytenzahl beträgt im Mittel $2,16 \pm 0,51 \cdot 10^9/l$. Die Werte erhöhen sich innerhalb von 24 Stunden um 2,11 % auf einen Mittelwert von $2,21 \pm 0,51 \cdot 10^9/l$. Die Zunahme ist statistisch nicht signifikant.

In Citrat-antikoagulierten Proben beträgt die unmittelbar nach der Probenentnahme gemessene Lymphozytenzahl im Mittel $2,18 \pm 0,40 \cdot 10^9/l$, innerhalb von 24 Stunden gehen die Werte um 1,57 % zurück auf im Mittel $2,15 \pm 0,47 \cdot 10^9/l$. Dieser Rückgang ist statistisch nicht signifikant. Die Messwerte der unterschiedlich antikoagulierten Vollblutproben unterscheiden sich, sowohl bei unmittelbar erfolgter Messung, als auch nach 24 Stunden, statistisch nicht signifikant voneinander.

Die mittlere Monozytenzahl in EDTA-antikoagulierten Vollblutproben beträgt direkt nach der Probennahme $0,49 \pm 0,14 \cdot 10^9/l$. Die Zellzahlen gehen innerhalb von 24 Stunden um 13,48 % auf im Mittel $0,43 \pm 0,09 \cdot 10^9/l$ zurück. Dieser Rückgang ist nach dem Wilcoxon-Rangsummentest statistisch nicht signifikant.

In $MgSO_4$ -antikoagulierten Vollblutproben wird unmittelbar nach der Probengewinnung eine mittlere Monozyten-Zahl von $0,49 \pm 0,14 \cdot 10^9/l$ gemessen. Nach 24 Stunden beträgt die Monozytenzahl im Mittel $0,32 \pm 0,05 \cdot 10^9/l$. Der Rückgang der Monozyten um 34,17 % ist statistisch signifikant ($p < 0,05$).

In den Citrat-Proben wird bei der ersten Messung eine mittlere Monozytenzahl von $0,49 \pm 0,13 \cdot 10^9/l$ gemessen. Im Verlauf von 24 Stunden gehen die Werte um 9,41 % auf einen mittleren Wert von $0,45 \pm 0,09 \cdot 10^9/l$ zurück. Der Rückgang ist jedoch statistisch nicht signifikant.

Die Monozytenzahlen der verschiedenen Kollektive unterscheiden sich zu Beginn nicht signifikant voneinander, nach 24 Stunden kann jedoch ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Monozytenzahlen der $MgSO_4$ -Proben und der Citrat-Proben ($p < 0,05$) beobachtet werden. Die Differenz der Monozytenzahlen der $MgSO_4$ -Proben und der EDTA-Proben ist ebenfalls statistisch signifikant ($p < 0,05$).

4.5.3. Einfluss der unterschiedlichen in vitro Antikoagulanzen auf die morphologische Integrität von neutrophilen Granulozyten

Parallel zu den vergleichenden maschinellen Analysen des Differentialblutbildes habe ich an einer kleineren Gruppe von Probanden den Einfluss der unterschiedlichen Antikoagulanzen auf die Anfärbbarkeit und die morphologische Integrität der neutrophilen Granulozyten untersucht. Wie unter Material und Methoden beschrieben, habe ich die digitalisierten Fotos des Cellavision™ einzeln verblindet analysiert und gemäß einer in Vorversuchen erstellten Graduierung die morphologische Schädigung bewertet (siehe Material und Methoden).

In Abbildung 32 sind die prozentualen Anteile der vom Schädigungsgrad unterschiedlich morphologisch eingestuften Neutrophilen aus verschiedenen antikoagulierten Blutproben als Kreisdiagramme dargestellt. Dabei wurden die Neutrophilen in den nach ca. 30 Minuten (Zeitpunkt „0“) und in den nach 24 Stunden ausgestrichenen und gefärbten Proben klassifiziert.

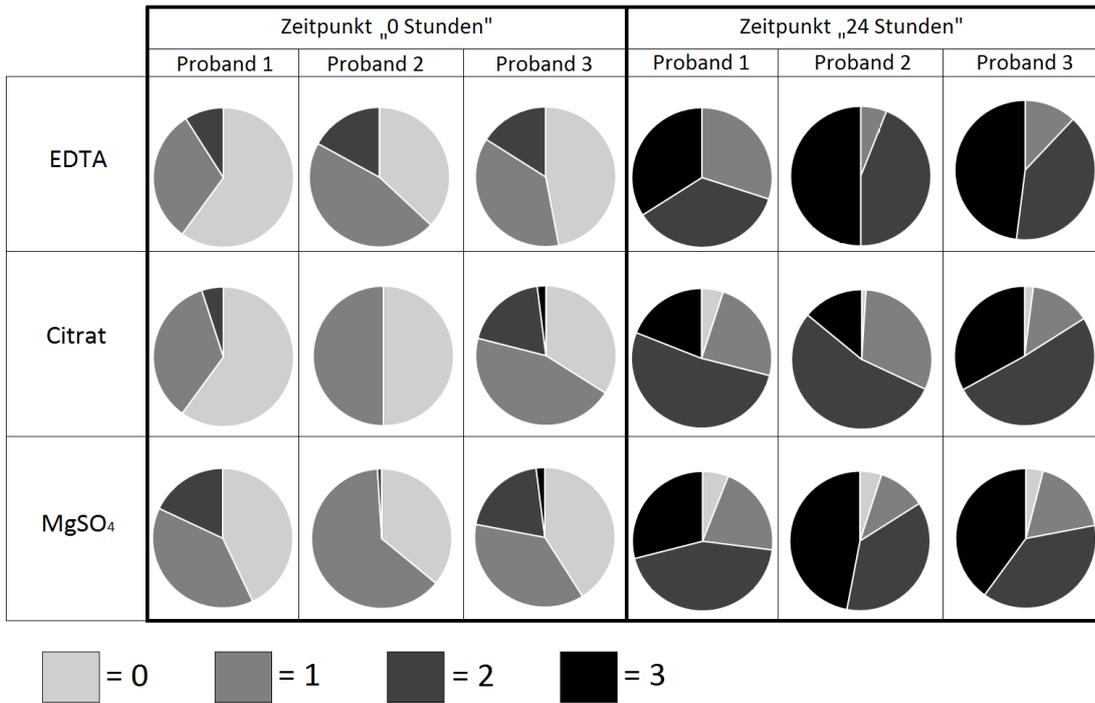


Abb. 32: Grad der morphologischen Schädigung von Neutrophilen in unterschiedlich antikoagulierten Vollblutproben. (Erläuterung der graduellen Unterschiede siehe Material und Methoden)

Der Abbildung 32 ist zu entnehmen, dass der Anteil der höhergradig morphologisch geschädigten Neutrophilen unabhängig von der Antikoagulation im Zeitverlauf von 24 Stunden zunimmt. Darüber hinaus wird deutlich, dass sich die Verteilungsmuster der Schädigungsgrade der MgSO₄- und der EDTA-antikoagulierten Proben ähneln. Die Citrat-antikoagulierten Proben zeigen den geringsten Schädigungsgrad, sowohl zum Zeitpunkt „0 Stunden“, als auch nach 24-stündiger Probenlagerung.

Tab. XXVII: Übersicht der Schädigungsgrade von Neutrophilen in unterschiedlich antikoagulierten Vollblutproben.

	„0 Stunden“						„24 Stunden“					
	Proband 1		Proband 2		Proband 3		Proband 1		Proband 2		Proband 3	
	Grad	%	Grad	%	Grad	%	Grad	%	Grad	%	Grad	%
EDTA	0	60	0	37	0	47	0	0	0	0	0	0
	1	31	1	46	1	37	1	30	1	6	1	12
	2	9	2	17	2	16	2	36	2	44	2	40
	3	0	3	0	3	0	3	34	3	50	3	48
Citrat	0	60	0	50	0	34	0	5	0	1	0	2
	1	35	1	50	1	45	1	24	1	31	1	14
	2	5	2	0	2	19	2	52	2	54	2	51
	3	0	3	0	3	2	3	19	3	14	3	33
MgSO ₄	0	43	0	36	0	41	0	6	0	5	0	4
	1	39	1	63	1	37	1	21	1	11	1	18
	2	18	2	1	2	20	2	44	2	37	2	38
	3	0	3	0	3	2	3	29	3	47	3	40

5. Diskussion

Schon vor etwa 100 Jahren wurden Magnesiumsalze in der hämatologischen Diagnostik als *in vitro* Antikoagulans verwendet [37]. Seit Einführung der maschinellen Blutbildanalytik wurde allerdings EDTA als Referenzantikoagulans eingesetzt [56]. Magnesiumsulfat wurde 2013 als *in vitro* Antikoagulans für die Korrektur der Thrombozytenzahlen bei Fällen von Antikoagulanzen-bedingter Pseudothrombozytopenie wiederentdeckt [78]. Nach Einführung der auf Anregung unserer Arbeitsgruppe mit $MgSO_4$ versetzten *ThromboExact*-Monovette der Firma Sarstedt zur Messung korrekter Thrombozytenzahlen bei Pseudothrombozytopenie, wurde seitens der Anwender wiederholt die Frage aufgeworfen, inwieweit aus dem derart antikoagulierten Blut nicht auch weitere Parameter, insbesondere die übrigen Blutbildparameter, aber auch Funktionsparameter gemessen werden können. Diesen Fragen bin ich in meiner nun vorliegenden Dissertationsschrift nachgegangen.

Da schon aus der oben genannten Publikation zur Pseudothrombozytopenie [78] hervorgegangen war, dass in Magnesiumsulfat-antikoaguliertem Blut etwa um 10% geringere Thrombozytenzahlen und ein geringeres mittleres Plättchenvolumen (MPV) gemessen werden als in EDTA-antikoaguliertem Blut, galt mein besonderes Augenmerk auch der Frage des Einflusses verschiedener Antikoagulanzen und unterschiedlicher Messprinzipien der gebräuchlichen hämatologischen Analysegeräte auf die gemessenen Thrombozytenparameter.

Einfluss der Gerätetechnologie auf die Thrombozytenzahl und das MPV

Die Ergebnisse meiner vorgelegten Untersuchungen zeigen, dass in EDTA-antikoagulierten Proben am XE 5000 ein signifikant höheres MPV gemessen wird als am DxH 800 und am Advia 120. Dieses Phänomen wurde bereits für das Vorgängermodell XE 2100D von Sysmex und auch für den LH 750 der Firma Beckman Coulter beschrieben [96]. In $MgSO_4$ -antikoagulierten Proben wird ein niedrigeres MPV gemessen als in EDTA-antikoagulierten Proben, sofern die Messung an Impedanz-Messgeräten erfolgt. Wird die Messung jedoch mittels der Streulicht-Methode durchgeführt (Advia 120), so wird in $MgSO_4$ -Proben ein MPV gemessen, das fast 1 fl höher ist als das in EDTA-Proben. Dieser Umstand ist am ehesten dem Messprinzip des Advia 120 zuzuschreiben. Im Gegensatz zu den Impedanz-Messgeräten, die das Thrombozytenvolumen anhand der Widerstandsänderung bei Durchtritt durch eine Messzelle, an die eine elektrische Spannung angelegt ist, messen, bezieht das Streulicht-Messverfahren neben der Größe auch den Refraktionsindex der zu messenden Zelle mit in

die Analyse ein. Dabei werden die Zellen mittels eines isoosmotischen Reagenzes, das einen als „surfactant“ bezeichneten Zusatz enthält [96], in eine sphärische Form gebracht und von einem monochromatischen Lichtstrahl, der auf die Durchflusszelle gerichtet ist, erfasst [42]. Das an der Zelle entstehende Streulicht wird von Photodioden, die in zwei verschiedenen Winkeln positioniert sind, gemessen. Das Signal des Kleinwinkel-Streulichts (low angle light scatter) bei 2° - 3° wird dabei 30-fach verstärkt und liefert Informationen über das Volumen der Zelle (MCV, bzw. MPV). Das Signal des Großwinkel-Streulichts (high angle light scatter) bei 5° bis 15° wird 12-fach verstärkt und dient der Messung des Refraktionsindex einer Zelle, der eine Aussage zu deren Dichte ermöglicht [91]. So lassen sich aufgrund der Refraktion z.B. Zellfragmente von Thrombozyten unterscheiden [39]. Anhand dieser beiden Parameter erstellt die Geräte-Software ein Scattergramm, in welchem die Thrombozyten anhand ihres Volumens (1 - 30 fl) und ihres Refraktionsindex (1,35 - 1,40) identifiziert werden [91, 92]. Die Informationen werden anhand der Mie-Theory in Zellvolumen und Dichte umgerechnet [43].

Die Möglichkeit, auch Thrombozyten kleiner Größe messen zu können, die sonst bei der Impedanz-Methode durch die unteren Diskriminatoren ausgegrenzt werden, ist ein Vorteil der Streulicht-Methode. Andererseits können große Thrombozyten, die bei der Impedanzmethode entsprechend der oberen Diskrimination als Erythrozyten identifiziert werden, anhand ihres niedrigeren Refraktionsindex korrekt der Thrombozytenfraktion zugerechnet werden [39]. Inwieweit das zur Antikoagulation verwendete Magnesiumsulfat mit den Gerätereagenzien interferiert und den Refraktionsindex verändert, ist nicht geklärt. Es ist durchaus vorstellbar, dass die $MgSO_4$ -Antikoagulation die Thrombozyten in ihrer Struktur und der Reaktion mit dem Reagenz, welches die Zellen in eine sphärische Form bringt, dahingehend beeinflusst, dass ein anderes Thrombozytenvolumen und ein anderer Refraktionsindex gemessen werden als in EDTA-antikoagulierte Blut. Untersuchungen, die diese Hypothese unterstützen, z.B. die Verwendung von unterschiedlichen Gerätereagenzien und eine anschließende rasterelektronenmikroskopische Untersuchung zur Erfassung von Konformationsänderungen stehen noch aus.

Da Erythrozytenfragmente anhand ihres Refraktionsindex von Thrombozyten gleicher Größe unterschieden werden, ist es durchaus denkbar, dass die $MgSO_4$ -Antikoagulation den Refraktionsindex der Erythrozytenfragmente ändert, sodass sie nicht mehr korrekt als solche identifiziert werden, sondern den großen Thrombozyten zugeordnet werden und somit zu einer Erhöhung des MPV beitragen. Diese Hypothese, dass Magnesiumsulfat einen Einfluss auf das Zellvolumen und den Refraktionsindex hat, wird auch durch die Beobachtung von Francois und Kollegen [97] gestützt, die bei der Messung in $MgSO_4$ -antikoagulierte Blut sehr kleine, ungranulierte Partikel im Thrombozyten-Diffraktionsdiagramm außerhalb des Thrombozytengates

beobachtet haben. Im Gegensatz zu Francois und Mitarbeitern, die hinter diesen Partikeln aktivierte, fragmentierte Thrombozyten vermuten [97], gehe ich eher davon aus, dass es sich um Thrombozyten handelt, die nur aufgrund ihres geringeren Volumens und ihres unterschiedlichen Refraktionsindexes außerhalb der unteren Thrombozytengrenzen liegen. Eine spontane Aktivierung der Thrombozyten ist in MgSO₄-antikoaguliertem Blut nicht nachweisbar, wie meine eigenen durchflusszytometrischen Untersuchungen mit den Aktivierungsmarkern CD 62p und CD 63 zeigen. Das wäre auch eine Erklärung dafür, warum am Advia 120 die Thrombozytenzahl in MgSO₄-Blut im Mittel um ca. $40 \cdot 10^9/l$ niedriger und das MPV im Mittel um 0,9 fl höher gemessen werden als in EDTA-Blut.

Wie bereits erwähnt, wird mit dem XE 5000 in EDTA-antikoagulierten Proben ein höheres MPV gemessen als in den entsprechenden MgSO₄-antikoagulierten Proben. Die Gerätesoftware erstellt anhand der Ergebnisse der Impedanz-Messung ein Histogramm, welches durch zwei Diskriminatoren, die sich flexibel der Lage des Histogramms anpassen, begrenzt ist. Der untere Diskriminator erfasst flexibel Partikel, die zwischen 2 fl und 6 fl liegen, der obere Diskriminator solche im Bereich von 12 fl bis 30 fl. Durch die Anpassung der Diskriminatoren an die Lage der Thrombozytenverteilungskurve können Erythrozytenfragmente am oberen Ende, bzw. Zelltrümmer am unteren Ende des Histogramms ausgeschlossen werden [39]. Der Umstand, dass aufgrund des erniedrigten MPV in MgSO₄-antikoagulierten Proben eine niedrigere Thrombozytenzahl als in EDTA-Proben gemessen wird, spricht dafür, dass es im Vergleich zu EDTA-antikoaguliertem Blut zu einer Linksverschiebung der Thrombozyten-Verteilungskurve kommt, weshalb Thrombozyten jenseits des unteren Diskriminators nicht erfasst werden (das lässt sich auch den in dieser Arbeit nicht dargestellten P-LCR-Werten entnehmen). Die Beobachtung, dass der Advia 120 in EDTA-Proben im Vergleich zum XE 5000 und zum DxH 800 eine höhere Thrombozytenzahl misst, steht im Einklang mit den Beobachtungen von Briggs und Kollegen [98].

Die Annahme, dass Thrombozyten in MgSO₄-antikoagulierten Proben durch das Impedanz-Messverfahren des XE 5000 nicht erfasst werden aber offensichtlich doch vorhanden sind, wird dadurch gestützt, dass mit der fluoreszenz-optischen Messmethode des XE 5000 auch in Magnesiumsulfat-antikoagulierten, zeitgleich abgenommenen und gemessenen Proben deutlich höhere Thrombozytenzahlen gemessen werden, die sich nur noch unwesentlich von den Werten der EDTA-antikoagulierten Proben unterscheiden. Anders verhält es sich bei vergleichenden Messungen von Thrombozyten in Citrat-antikoaguliertem Blut. Zwar können bei Verwendung der fluoreszenz-optischen Methode ebenfalls höhere Werte gemessen werden als mit der Impedanz-Methode. Die Differenz zu den fluoreszenz-optisch gemessenen Werten der EDTA- und der MgSO₄-Proben ist aber immer noch deutlich. Mögliche Gründe hierfür sind entweder der Verdünnungseffekt, der durch den Korrekturfaktor 1,1 nicht vollständig korrigiert wird oder eine schlechtere Anfärbbarkeit der

Thrombozyten in Citrat-antikoaguliertem Blut durch das fluoreszierende RET-SEARCH Reagenz. Es kann allerdings auch nicht ausgeschlossen werden, dass Thrombozyten im Citratblut zeitabhängig verloren gehen oder kleinere Aggregate bilden. So wurde von einer japanischen Arbeitsgruppe bei Untersuchungen zur Detektion thrombozytärer Hyperaggregabilität mit Hilfe eines hämatologischen Analyzers eine Aggregatbildung in Citrat-antikoagulierten Proben entdeckt, die bei EDTA-antikoagulierten Proben nicht nachgewiesen werden konnte [99]. Es ist vorstellbar, dass bei der Probenlagerung das reversibel durch Citrat gebundene Kalzium freigesetzt wird und so die Aggregatbildung begünstigt wird. Eine vergleichbare, aber in der vorliegenden Arbeit nicht kommunizierte Beobachtung habe ich bei seriellen Messungen in Citratproben mit zwischenzeitlicher wiederholter manueller Durchmischung der Probe gemacht.

Der hämatologische Analyzer Unicell DxH 800 weist die geringste Differenz der Thrombozyten-Zahlen, die in EDTA- und $MgSO_4$ -Proben gemessen wurden auf, obwohl die Differenz der MPV-Werte am größten ist. Der DxH 800 identifiziert Partikel zwischen 2 fl und 20 fl als Thrombozyten. Die Impulse werden von 3 Messzellen aus generiert, aus denen jeweils 64-Kanal Histogramme erstellt werden. Die Gerätesoftware identifiziert die zwei tiefsten Punkte sowie den höchsten Punkt innerhalb der Verteilungskurven und legt eine logarithmische Normalverteilungskurve über diese Punkte. Aus der so erstellten Kurve, die den Bereich von 0 fl bis 70 fl umfasst, wird die Thrombozytenzahl abgeleitet, indem alle Zellen mit einem Volumen von 2-20 fl zu den Thrombozyten gezählt werden [39, 96, 100]. Dass der DxH 800 sowohl in EDTA- als auch in $MgSO_4$ -antikoaguliertem Blut deutlich niedrigere MPV-Werte misst als der ebenfalls auf dem Impedanz-Messverfahren basierende XE 5000, dürfte u.a. auf dem Umstand beruhen, dass der DxH 800 durch seine logarithmische Normalverteilungskurve auch Plättchen, die kleiner als 2 fl sind, erfassen kann. Das erklärt möglicherweise, warum sich die Thrombozytenzahlen der EDTA- und der $MgSO_4$ -Proben geringer als an den anderen beiden Geräten unterscheiden.

Während die Thrombozytenzahlen an den Geräten XE 5000 und DxH 800 im Zeitverlauf von 24 Stunden sowohl in EDTA-, als auch in $MgSO_4$ -antikoagulierten Proben stabil bleiben, ist bei Messung am Gerät Advia 120 ein deutlicher Abfall der mittleren Thrombozytenzahlen des untersuchten Kollektivs (ca. $40 \cdot 10^9/l$) für beide Antikoagulanzen zu beobachten. Es ist durchaus denkbar, dass die zeitabhängige Formänderung von Thrombozyten bei Kontakt mit EDTA [59] zu Änderungen der Streulichteigenschaften und zu einer falschen Zuordnung der Zellen durch die Advia-Gerätesoftware führt. Auch für die $MgSO_4$ -Antikoagulation sind solche zeitabhängigen Veränderungen der Thrombozyten, z.B. durch osmotische Effekte, nicht auszuschließen. Die Arbeitsgruppe um Ahnadi und Kollegen nutzte zur Untersuchung von Citrat-antikoagulierten Proben

am Advia 120 eine speziell angepasste Software, um die veränderten Refraktionsindizes zu korrigieren [101]. Da die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit an Geräten des Routinebetriebs erfolgten und daher auch keine speziell angepasste Software verwendet werden konnte, ist davon auszugehen, dass ein Teil der Thrombozyten in MgSO₄-antikoaguliertem Blut zeitabhängig den Grenzwert des Refraktionsindex im Diffraktionsdiagramm unterschreitet und es, ähnlich wie bei den Vergleichsmessungen von Francois und Kollegen [97], zu einer Unterschätzung der Thrombozytenzahl durch den Advia 120 kommt.

Die am Advia 120 gemessenen MPV-Werte der EDTA-Proben nehmen innerhalb von 24 Stunden um 1,9 fl, bzw. um 0,7 fl in MgSO₄-antikoagulierten Proben zu, während an den Impedanz-Geräten XE 5000 und DxH 800 nur geringe Volumenzunahmen im Bereich von 0,2 fl bis 0,4 fl bei den EDTA-Proben, bzw. 0,1 fl bis 0,2 fl bei den MgSO₄-Proben gemessen werden. Unter diesem Gesichtspunkt erscheint die Streulicht-Technologie nicht für Untersuchungen der Thrombozytenzahl und des MPV bei längeren Intervallen zwischen Blutentnahme und Messung geeignet zu sein.

Thrombozytenaktivierung und Thrombozytenfunktion

Eine Aktivierung von Thrombozyten geht mit einer erhöhten Expression von CD62p (P-Selectin, GMP-140) und CD63 (Granulophysin, LAMP-3) einher. Erste Versuche von Stenberg und Kollegen [102] zeigten, dass GMP-140 (CD62p) im unstimulierten Thrombozyten in der Membran der α -Granula vorliegt und nach einer Thrombin-Stimulation während der Degranulierung in das *surface connected open canalicular system* (SCS) exprimiert wird. In vivo vermittelt GMP-140 (CD62p) über seine Ca²⁺-abhängige Lektin-Domäne die Bindung von aktivierten Thrombozyten an Leukozyten und das vaskuläre Endothel [51] und unterstützt damit die Rekrutierung von Leukozyten an den Endotheldefekt [103], sowie die Ausbildung von stabilen Thrombozytenaggregaten [104].

Granulophysin (CD63) ist ein Protein aus der Gruppe der Tetraspanine und liegt u.a. in den dichten Granula und den α -Granula von Thrombozyten [105, 106], sowie den azurophilen Granula von Neutrophilen [107] und den Weibel-Palade-Körpern von Endothelzellen [108] vor. Die Interaktion des CD63 mit Neutrophilen führt zu deren Aktivierung und Expression von CD11/18 [52]. In vivo führt die Bindung des CD11/18 mit endotheliale ICAM-1 zur Adhäsion des neutrophilen Granulozyten am Endotheldefekt [109].

Die spontane Thrombozytenaktivierung in EDTA-antikoaguliertem Blut ist bekannt [85]. Ursächlich dafür sind neben den Ca²⁺-bindenden Eigenschaften des EDTA, auch dessen Einfluss auf die Membranfluidität und die Glykoproteinstruktur, insbesondere von Gp IIb/IIIa [110, 111]. Die durch

EDTA verursachten Änderungen der Thrombozyten gleichen denen nach der Bindung von Fibrinogen an den Gp IIb/IIIa-Rezeptor, wie durch Versuche mit Thrombozyten von Thrombasthenie-Patienten im Citrat-Plasma gezeigt werden konnte [111, 112]. Daher sollten durchflusszytometrische Untersuchungen von Ca^{2+} -abhängigen Markern, wie z.B. zur Fibrinogen-Bindung, zur Konformitätsänderung des Gp IIb/IIIa und zur Thrombozyten-Leukozyten-Interaktionen nicht mit EDTA-antikoaguliertem Blut durchgeführt werden [113]. Für durchflusszytometrische Untersuchungen der Thrombozytenaktivierung wird vornehmlich Citrat-antikoaguliertes Probenmaterial verwendet, da diese eine deutlich geringere Spontanaktivierung des Thrombozyten auslöst [42, 114].

Aus den vorliegenden Untersuchungen zur Eignung von Magnesiumsulfat als Antikoagulans lässt sich ableiten, dass auch mit Magnesiumsulfat antikoaguliertes Blut für durchflusszytometrische Untersuchungen der Thrombozytenaktivierung geeignet ist.

Während in den EDTA-Proben eine zeitabhängige Zunahme des Anteils an spontan aktivierten Thrombozyten zu beobachten ist, lässt sich in Citrat- und MgSO_4 -Proben auch nach 5 Stunden allenfalls eine marginale spontane Thrombozytenaktivierung nachweisen. Dennoch bleibt die Aktivierbarkeit der Thrombozyten durch Agonisten wie ADP und Arachidonsäure auch in Anwesenheit von MgSO_4 erhalten. Die Ergebnisse meiner Untersuchungen zeigen, dass es in MgSO_4 -antikoaguliertem Blut nach ADP- und Arachidonsäure-Stimulation zwar zu einem ähnlich hohen Grad der Thrombozytenaktivierung (Anteil an CD62p- und CD63-positiven Thrombozyten) wie in Citrat-antikoaguliertem Blut kommt, das Ausmaß der Aggregation durch diese Agonisten in MgSO_4 -Proben jedoch geringer ausfällt. Diese Beobachtung spricht dafür, dass die MgSO_4 -Antikoagulation weitreichendere Effekte auf den Thrombozyten hat als die Citrat-Antikoagulation, die vornehmlich über den Ca^{2+} -Entzug wirkt. Die Beobachtung von Hwang und Ravn, dass es zu einer dosisabhängigen Hemmung der Thrombozytenaggregation durch Mg^{2+} kommt [79, 115], konnte durch meine Untersuchungen zu den Auswirkungen einer aufsteigenden MgSO_4 -Zugabe zu Hirudin-antikoaguliertem Blut am Multiplate bestätigt werden.

Die Aggregationshemmung der Thrombozyten in MgSO_4 -antikoaguliertem Blut ist unter anderem auch dadurch bedingt, dass Mg^{2+} die Synthese von Prostazyklin (PGL_2), einem Inhibitor der Thrombozytenaggregation, steigert und gleichzeitig die Synthese und Freisetzung des proaggregatorischen TXA_2 hemmt [79, 116, 117]. PGL_2 führt durch die Stimulation der Adenylatzyklase zu einer erhöhten cAMP-Konzentration, wodurch die intrazelluläre Ca^{2+} -Mobilisation des Thrombozyten gehemmt wird [118, 119]. Somit hemmt Mg^{2+} indirekt die Erhöhung des zytoplasmatischen Ca^{2+} -Spiegels und damit den Ablauf der sekundären Aggregation.

Für die Ausbildung eines stabilen Thrombozytenaggregates spielt der aktivierte Fibrinogenrezeptor Gp IIb/IIIa eine wichtige Rolle, indem er über die Fibrinogenbindung weitere Thrombozyten rekrutiert und für die Ausbildung eines stabilen Aggregates sorgt. Gawaz und Kollegen konnten zeigen, dass Mg^{2+} die Fibrinogen-vermittelte Thrombozytenaggregation hemmt, unabhängig davon welcher Agonist sie ausgelöst hat, und die Adhäsion von Thrombozyten an immobilisiertem Fibrinogen vermindert [120]. Auch in meinen Untersuchungen war das Ausmaß der Aggregation bei allen verwendeten Agonisten (ADP, Arachidonsäure, Ristocetin, Kollagen und TRAP) in $MgSO_4$ -antikoaguliertem Blut jeweils geringer als in den Citrat- oder Hirudin-antikoagulierten Proben.

Alternativ zur Messung von Aktivierungsmarkern lässt sich die Aktivierung von Thrombozyten über die Messung von Thrombozyten-Leukozyten-Komplexen als Gradmesser der Thrombozyten-Aktivierung bestimmen [53, 121]. Aus diesem Grund habe ich in dieser Arbeit auch den Einfluss von EDTA, Citrat und $MgSO_4$ auf die Bildung von Leukozyten-Thrombozyten-Komplexen untersucht.

Die Fähigkeit zur Bildung von Thrombozyten-Leukozyten-Komplexen ist innerhalb der verschiedenen Leukozytenpopulationen unterschiedlich stark ausgeprägt. Die Lymphozyten bilden solche Aggregate unabhängig vom verwendeten Antikoagulans (jeweils ca. 15 % CD42b-positive Lymphozyten). Im Gegensatz dazu ist der Effekt bei der Monozyten- und der Granulozyten-Population vermehrt antikoagulanzenabhängig, wobei hier aus meiner Sicht die Ca^{2+} -Abhängigkeit dieser Bindung erkennbar wird. Wie in der Literatur beschrieben [113], konnte auch ich zeigen, dass EDTA-antikoagulierte Proben aufgrund der Ca^{2+} -Chelation nicht geeignet sind, um eine Thrombozyten-Leukozyten-Interaktion zu messen. Versuche mit Hirudin-antikoaguliertem Blut zeigten, dass es durch die nachträgliche Zugabe von EDTA sogar zu einem Dissoziieren der Thrombozyten-Leukozyten-Komplexe kommt [122], was damit zusammenhängt, dass die Interaktion zwischen dem thrombozytären P-Selectin und dem leukozytären PSGL-1 streng Ca^{2+} -abhängig ist [123].

Eine solche P-Selectin-abhängige Interaktion kann allerdings nur nach erfolgter Thrombozyten-Aktivierung und daraus folgender granulärer Expression von P-Selectin stattfinden [124, 125]. Der Anteil an spontan CD62p-exprimierenden Thrombozyten ist in $MgSO_4$ - und Citrat-Blut zwar sehr gering, bezogen auf die physiologische Leukozytenzahl jedoch ausreichend um Leukozyten, die Thrombozyten gebunden haben, nachzuweisen.

Hierbei muss auch bedacht werden, inwieweit die höhere Zahl an spontan CD62p-exprimierenden Thrombozyten in EDTA-antikoaguliertem Blut auch der schlechten Bindung an Leukozyten geschuldet ist, sodass mehr Thrombozyten im entsprechenden Gate detektiert werden und nicht durch ihre Adhäsion an Leukozyten verloren gehen. Der Effekt dürfte aber aufgrund der Tatsache, dass unter

physiologischen Umständen die Thrombozytenzahl etwa um den Faktor 15 bis 100 höher als die Leukozytenzahl ist nur gering sein. Die Bindung von Thrombozyten an Leukozyten kann über unterschiedliche Rezeptoren vermittelt werden, wie Gawaz in einer Übersichtsarbeit beschrieben hat [32]. In der Hauptsache wird der Mechanismus jedoch Ca^{2+} -abhängig über P-Selectin und PSGL-1 vermittelt [126, 127].

Die Citrat-Antikoagulation führt allerdings nur zu einem teilweisen Ca^{2+} -Entzug und im Gegensatz zu EDTA werden andere divalente Kationen wie z.B. Mg^{2+} nicht komplexiert [126]. Die Magnesiumsulfat-Antikoagulation führt zu keiner Kationen-Komplexierung, wobei der Ca^{2+} -Effekt auf die durch P-Selectin vermittelte Bindung von Thrombozyten an Leukozyten [128] unterstützt wird. Aus diesen Gründen ist für durchflusszytometrische Untersuchungen zur Thrombozyten-Leukozyten-Interaktion die MgSO_4 -Antikoagulation als Alternative zum gebräuchlichen Einsatz von Citrat durchaus denkbar.

Einfluss der Antikoagulation auf Parameter des apparativen Blutbildes

Entsprechend der ICSH-Richtlinie gilt die EDTA-Antikoagulation als Standard für die Erstellung von Blutbildern [56]. Die Verwendung von Citrat-antikoagulierten Proben als Alternative zur EDTA-Antikoagulation für die apparative Erstellung des Blutbilds wurde zwar untersucht und positiv bewertet [64], konnte sich aber, wahrscheinlich wegen des durch das Antikoagulans auftretenden Verdünnungseffekts, nicht durchsetzen. Hinzu kommt, dass inzwischen alle verfügbaren Hämatologie-Automaten auf die Messung von EDTA-antikoagulierten Proben kalibriert und validiert sind.

Die Arbeitsgruppe um Kondo hat die aus EDTA- und MgSO_4 -antikoagulierten Blutproben erstellten Großen Blutbilder miteinander verglichen und war dabei zu dem Ergebnis gekommen, dass diese nur wenig voneinander abweichen [77]. Die von Schuff-Werner et al. im Zusammenhang mit Untersuchungen zur Pseudothrombozytopenie gemessenen Blutbilder bestätigten diese Aussage [78].

Der in der vorliegenden Untersuchung durchgeführte Vergleich der Blutbilder von 100, bzw. 99 Patienten zeigt, dass sich sowohl die Citrat-Antikoagulation (nach Korrektur des Verdünnungsfaktors), als auch die Magnesiumsulfat-Antikoagulation als Alternative zur etablierten EDTA-Antikoagulation für die Erstellung von Blutbildern eignen. Obwohl sich die Werte der einzelnen Blutbildparameter in den unterschiedlich antikoagulierten Blutproben bei Anwendung des Wilcoxon-Rangsummentests für verbundene Stichproben zum Teil statistisch signifikant voneinander unterscheiden, ist eine generelle Vergleichbarkeit bei fast allen Parametern mit Ausnahme der

Thrombozytenparameter gegeben, was auch durch die Korrelationsanalysen der gemessenen Werte bestätigt wird. Das wird am Beispiel der Erythrozytenzahl deutlich, die in den MgSO₄-antikoagulierten Proben im Mittel um lediglich $0,02 \cdot 10^{12/l}$ niedriger ausfällt als in den EDTA-antikoagulierten Proben. Diese Differenz ist statistisch nach dem o.g. Test zwar signifikant, für die klinische Bewertung des Laborergebnisses jedoch kaum relevant. Ähnliches gilt für das MCV und daraus folgend für das MCHC in den MgSO₄-Proben. Die im Vergleich zu den EDTA-Proben niedrigeren Werte können durch das bekannte Phänomen der zeitabhängigen MCV-Zunahme in EDTA-antikoaguliertem Blut bedingt sein [129], denn auch in meiner Untersuchung konnte im EDTA-Blut eine Zunahme des MCV um 10 % innerhalb von 24 Stunden beobachtet werden. Andererseits ist ein osmotisch bedingter Volumenverlust der Erythrozyten und Thrombozyten in MgSO₄-Blut nicht auszuschließen.

Die zeitabhängige MCV-Zunahme ist ein Phänomen, welches sowohl für die K2- [130] als auch für die K3-Formulierung [129] von EDTA beschrieben wird. Der Einfluss von EDTA auf das Volumen der Erythrozyten wird vor allem osmotischen Effekten und Änderungen des pH-Wertes zugeschrieben [131], was jedoch erst nach 4 bis 6 Stunden zur messbaren MCV-Zunahme führt [132, 133]. Diese Beobachtungen kann ich insofern bestätigen, als dass nach 3-stündiger Probenlagerung keine messbare Änderung des Erythrozytenvolumens erkennbar ist. Die Beobachtungen, dass die Anwendung von K3-EDTA einen stärkeren Einfluss auf das Erythrozytenvolumen haben soll [56, 134] und daher die K2-Formulierung zu präferieren sei, wurden zu einer Zeit gemacht als die K3-Formulierung nur in flüssiger Form verfügbar war. Da das K3-EDTA mittlerweile als Trockenspray-Formulierung eingesetzt und auch in dieser Arbeit so verwendet wurde, ist die Empfehlung aus dem Jahr 1993 [56] aus meiner Sicht nicht mehr relevant. Das MCV in MgSO₄-antikoagulierten Proben nimmt innerhalb von 180 Minuten um 2,18 % ab, binnen 24 Stunden ist jedoch eine MCV-Zunahme um 2,13 % gegenüber dem Ausgangswert zu verzeichnen, sie ist damit noch geringer als die in Citrat-antikoagulierten Proben gemessene Zunahme des MCV (+ 5,55 %). Der Grund dafür könnte sein, dass sich im zeitlichen Verlauf ein osmotisches Gleichgewicht einstellt.

Da die Proben bei Klinikpatienten abgenommen wurden und auf kurzem Wege ins Labor gelangten, ist anzunehmen, dass Messungen in dieses frühe Zeitfenster fallen und die Unterschiede erklären. Bei den Zellzahlen ist mit Ausnahme der mittels Impedanz-Messung ermittelten Thrombozytenzahl eine generelle Vergleichbarkeit der hämatologischen Parameter der EDTA- und der MgSO₄-Proben gegeben.

Zur Vergleichbarkeit von Thrombozytenzahlen und mittleren Volumina, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten in unterschiedlich antikoagulierten Vollblutproben gemessen wurden, gibt es etliche Studien [135–139]. Aus diesen Untersuchungen ist bekannt, dass in Citrat-antikoaguliertem Blut ein

im Vergleich zu EDTA niedrigeres Thrombozytenvolumen gemessen wird, welches auch im zeitlichen Verlauf deutlich geringer zunimmt [140]. Der niedrigere MPV-Wert ist wohl in erster Linie osmotischen Effekten zuzuschreiben [65].

Da die MPV-Messung Einflussgrößen wie Art der Antikoagulation [13], präanalytische Zeitspanne [135] und Messmethode [141] unterliegt, aber dessen ungeachtet in einer wachsenden Zahl von Studien sogar als prognostischer Biomarker eingesetzt wird [142–149], muss ein standardisiertes Vorgehen für die Vergleichbarkeit von MPV-Messungen dringend gefordert werden. Eine solche Standardisierung umfasst neben der Verwendung des gleichen *in vitro* Antikoagulans und der gleichen Messmethode auch die einheitliche präanalytische Behandlung der Probe, insbesondere eine frühe, vom Zeitpunkt nach der Blutentnahme her vergleichbare Messung. In Metaanalysen solcher MPV-Studien konnten Lance [60] und Beyan [139] zeigen, dass solche standardisierte Bedingungen in der Regel nicht eingehalten werden.

Mehrere Studien zur zeitlichen Stabilität der Blutbildparameter in EDTA-antikoagulierten Blutproben an unterschiedlichen Hämatologie-Analysatoren wurden bisher publiziert [132, 133, 150, 151]. Für Citrat-antikoaguliertes Blut liegen dagegen nur wenige und für Magnesiumsulfat keine vergleichbaren Untersuchungen vor. Obwohl die mit Magnesiumsulfat antikoagulierte *ThromboExact*-Monovette laut Herstellerinformation nur für die Korrektur von Thrombozytenwerten bei Vorliegen einer Pseudothrombozytopenie empfohlen wird, häufen sich zunehmend die Nachfragen von Nutzern, inwieweit das derart antikoagulierte Blut nicht auch für die Bestimmung anderer Blutbildparameter genutzt werden kann. Da zwischen Probenentnahme und Probenmessung oftmals unterschiedliche Zeiträume liegen und Magnesiumsulfat nur dann als Alternative zur EDTA- und Citrat-Antikoagulation in Betracht gezogen werden kann, wenn auch nach mehrstündiger Probenlagerung noch verlässliche Messergebnisse erzielt werden können, habe ich vergleichende Blutbildanalysen bis zu 3 Stunden nach Probenentnahme durchgeführt, um die Zeitspanne zwischen Blutentnahme und Messung im stationären Arbeitsablauf abzudecken. Der in einer anderen Untersuchungsserie durchgeführte langfristige Vergleich bis zu 24 Stunden nach Probenentnahme sollte das Zeitintervall des Probenversands in externe Laboratorien berücksichtigen.

Die Ergebnisse der Zeitverlaufsmessungen zeigen, dass die $MgSO_4$ -Antikoagulation nur bedingt für die zeitlich verzögerte Messung von Blutbildparametern geeignet ist. Insbesondere ist eine Abnahme der Leukozytenzahl um 9,45 % innerhalb von 24 Stunden zu beachten, die im Wesentlichen auf den Abfall der Neutrophilen und der Monozyten zurückzuführen ist. Nach 24 Stunden beträgt der Abfall 14,68 %, bzw. 34,17 % und fällt damit deutlicher als in EDTA- und Citrat-antikoagulierten Proben aus. Drei Stunden nach Probenentnahme hat die Gesamtleukozytenzahl dagegen nur um 1,30 % abgenommen. Die Verwendung von $MgSO_4$ als Antikoagulans kann daher für mindestens 3 Stunden

nach Probengewinnung für die Erstellung von Blutbildern akzeptiert werden. Eine Zunahme der Neutrophilen- und ein Abfall der Monozytenzahl im Verlauf von 24 Stunden, wie sie auch für EDTA-antikoagulierte Proben beschrieben wurde [151], kann durch meine eigenen Untersuchungen bestätigt werden. In EDTA-Proben nehmen die Leukozyten um 4,13 % zu, wobei die Neutrophilenzahl um 7,49 % zunimmt, die Monozytenzahl aber um 13,48 % abnimmt. Die prozentuale Abnahme der Monozytenzahl binnen 24 Stunden deckt sich mit den Ergebnissen von Imeri und Kollegen [132] und de Baca und Kollegen [151], die für ihre Untersuchung die gleiche Gerätetechnologie verwendet haben. Allerdings fällt die Zunahme der Neutrophilenzahl in den Untersuchungen beider Gruppen geringer aus. Ein Grund für die zeitabhängige Zunahme der Neutrophilen-Zahl könnte die falsche Zuordnung von morphologisch veränderten, bzw. degenerierten Monozyten sein [151]. Da die zeitabhängige Zunahme der Neutrophilen- und die Abnahme der Monozyten-Zahl in EDTA-antikoagulierte Blut bereits in einer früheren Untersuchung am Gen. S von Beckman Coulter beobachtet wurde [152], gehe ich davon aus, dass es sich nicht um ein gerätespezifisches Phänomen des XE 5000 handelt. Von Joshi und Kollegen, die ebenfalls den XE 5000 für ihre Untersuchung genutzt hatten, wird ebenfalls eine zeitabhängige Zunahme der Neutrophilenzahl und eine Abnahme der Monozytenzahl beobachtet, die sich in einer Beobachtungszeit von über 72 Stunden nach Probenentnahme fortsetzt [153]. De Baca et al berichten solche Verläufe sogar bis zu 4 Tage nach Probenentnahme [151]. Der von mir gemessene moderate Rückgang der Lymphozytenzahl innerhalb von 24 Stunden wird durch die Untersuchungen von Imeri et al, de Baca et al und Joshi et al bestätigt [132, 151, 153]. Auch hier muss diskutiert werden, dass zeitlich bedingte morphologische Veränderungen der Lymphozyten zu einer fehlerhaften Zuordnung der Zellen führen.

Meine vergleichenden Untersuchungen zu morphologischen Veränderungen der neutrophilen Granulozyten in Abhängigkeit vom Antikoagulans und der Lagerungszeit bestätigen die Ergebnisse einer 2014 veröffentlichten internationalen Studie [154]. Die in Kollaboration mit der „European Organization for External Quality Assurance Providers in Laboratory Medicine (EQALM) an EDTA-antikoagulierte Blut durchgeführten Untersuchungen ergaben, dass bereits 30 Minuten nach Blutentnahme ausgestrichene Zellen erste Veränderungen aufweisen.

Diese Beobachtung kann ich sowohl an den EDTA-antikoagulierten Proben als auch an Ausstrichen aus den mit Magnesiumsulfat, bzw. Citrat antikoagulierten Blutproben bestätigen, obwohl Letztere von der Tendenz her die etwas besseren Ergebnisse hinsichtlich der morphologischen Integrität aufwiesen. Allerdings erlaubt keines der hier untersuchten Antikoagulanzen eine morphologisch unkritische Differenzierung. Ich schließe mich daher der Empfehlung an, dass die Untersuchung von Blutausstrichen, unabhängig von der Antikoagulation, allenfalls bis zu 4 Stunden nach der Probenentnahme durchgeführt werden soll. Dieses Zeitfenster ermöglicht allerdings bei PTCP-

Patienten, denen zur korrekten Bestimmung der Thrombozytenzahl eine MgSO₄-Monovette abgenommen wurde, eine Bestimmung des kompletten mikroskopischen Differentialblutbildes ohne dass eine zusätzliche EDTA-Monovette abgenommen werden muss.

6. Zusammenfassung

Magnesiumsulfat wurde schon vor gut 100 Jahren als Antikoagulans für die Bestimmung der Thrombozytenzahl eingesetzt, wurde aber mit der Entwicklung automatischer Analysegeräte in der Hämatologie durch EDTA verdrängt.

Seit kurzem hat sich die Verwendung von Magnesiumsulfat zur Bestimmung der Thrombozytenzahl bei EDTA-induzierter Pseudothrombozytopenie bewährt, daher stellte sich die Frage, ob sich aus den MgSO₄-antikoagulierten Proben nicht auch gleich andere Kenngrößen des Blutbildes bestimmen lassen. Die hier vorgelegten Ergebnisse meiner Untersuchungen zeigen, dass die in MgSO₄-antikoagulierten Proben gemessenen Parameter des Kleinen und Großen Blutbildes bis zu 4 Stunden nach Probenentnahme mit den entsprechenden Werten der EDTA-antikoagulierten Proben übereinstimmen, obwohl die mittlere Thrombozytenzahl etwa 10% niedriger und das mittlere Thrombozytenvolumen etwa 1 fl geringer bei Messung mit der Impedanzmethode ausfällt.

Bei Anwendung der fluoreszenz-optischen Methode lassen sich allerdings vergleichbare Thrombozytenzahlen messen, woraus geschlossen werden kann, dass es zu keinem substanziellen Verlust an Thrombozyten durch die Magnesiumsulfat-Antikoagulation kommt. Als Erklärung hierfür bietet sich an, dass ein Teil der Thrombozyten aufgrund ihres niedrigeren Plättchenvolumens bei MgSO₄-Antikoagulation mit dem Impedanzverfahren des hämatologischen Analysegerätes XE 5000 nicht korrekt erfasst wird. In Citrat-antikoagulierten Proben ist die mittlere Thrombozytenzahl ebenfalls signifikant niedriger als in den entsprechenden EDTA-Proben, allerdings unabhängig von der verwendeten Messmethode. Das deutet darauf hin, dass es zu einem substanziellen „Verlust“ an Thrombozyten in Citrat-antikoaguliertem Blut kommt, was möglicherweise durch die Bildung kleiner Plättchenaggregate (Clumps) in vitro bedingt ist, was wiederum mit der Freisetzung von Kalzium aus der reversiblen Bindung mit Citrat zusammenhängen kann.

Während es in EDTA-antikoagulierten Proben zu einer zeitabhängigen Volumenzunahme von Thrombozyten kommt, tritt in MgSO₄-antikoagulierten Proben innerhalb von 24 Stunden nur eine geringe Änderung der Thrombozytenzahl und des MPV auf, besonders dann, wenn die Messung an Geräten erfolgt, die die Impedanz-Methode verwenden. Bei Messung mittels Streulichtmethode ist, sowohl in EDTA- als auch in MgSO₄-antikoagulierten Proben, eine deutliche Zunahme des mittleren

Thrombozytenvolumens zu erkennen. Daher sollte für die Standardisierung der MPV-Messung, z.B. im Rahmen von epidemiologischen Studien zur prognostischen Bedeutung erhöhter MPV-Werte, die Impedanz-Methode der streulicht-optischen Methode vorgezogen und Magnesiumsulfat als in vitro Antikoagulans der Wahl verwendet werden.

Im Gegensatz zur EDTA-Antikoagulation zeigen Thrombozyten in Citrat- und $MgSO_4$ -antikoagulierten Proben keine zeitabhängige Zunahme der Spontanaktivierung, obwohl die Stimulation durch Agonisten zu einer vergleichbaren Aktivierung führt. Beim Vergleich der mit der Impedanzaggregometrie gemessenen Thrombozytenfunktion und durch Agonisten induzierten Thrombozytenaktivierung hat sich die Citrat-Antikoagulation vorteilhaft gegenüber der $MgSO_4$ -Antikoagulation gezeigt. Die $MgSO_4$ -Antikoagulation ist zwar auch für die Messung der Thrombozytenaktivierung geeignet, allerdings haben sich die Hirudin- und Citrat-Antikoagulation als vorteilhafter für die Messung der Thrombozytenfunktion erwiesen.

Für durchflusszytometrische Untersuchungen der Thrombozyten-Leukozyten-Interaktion ist die $MgSO_4$ -Antikoagulation der EDTA-Antikoagulation überlegen und stellt daher eine Alternative zur Citrat-Antikoagulation dar.

Sowohl die apparative als auch die mikroskopische Untersuchung des Einflusses der verschiedenen Antikoagulanzen und der Zeit auf die morphologische Integrität der Zellen am Beispiel der Neutrophilen zeigen, dass mit zunehmender Probenlagerungszeit unabhängig vom Antikoagulans mit Zellverlusten und -schädigungen zu rechnen ist. Daher gilt auch für $MgSO_4$ als alternatives Antikoagulans, dass für die Bestimmung von Blutbildparametern ein Zeitintervall von 4 Stunden nach Blutentnahme nicht überschritten werden sollte.

7. Thesen

1. Magnesiumsulfat eignet sich als in vitro Antikoagulans zur Messung hämatologischer Kenngrößen.
2. Die Bestimmung der Thrombozytenzahl ist abhängig von der verwendeten Messmethode und der Antikoagulation.
3. Das mittlere Thrombozytenvolumen (MPV) ist abhängig vom verwendeten Antikoagulans und von dem Zeitpunkt der Bestimmung nach Abnahme der zu messenden Probe.
4. Die zeitabhängige Zunahme des MPV ist in EDTA-antikoaguliertem Blut größer als in Blut, das mit Citrat oder Magnesiumsulfat antikoaguliert wurde.
5. In $MgSO_4$ - und Citrat-antikoaguliertem Blut ist, im Gegensatz zu EDTA-antikoaguliertem Blut, keine spontane Thrombozytenaktivierung nachweisbar. Die ADP- und Arachidonsäure-induzierte Aktivierbarkeit der Thrombozyten bleibt aber unabhängig vom Antikoagulans erhalten.
6. Im Gegensatz zu EDTA kommt es bei der Antikoagulation mit Magnesiumsulfat nicht zur Kationen-Komplexierung, wodurch die P-Selectin vermittelte Bindung von Thrombozyten an Leukozyten begünstigt wird.
7. Die Bestimmung der Blutbildparameter ist bis zu 4 Stunden nach Blutentnahme aus der $MgSO_4$ -antikoagulierten Monovette möglich, wenn man berücksichtigt, dass bis zu 10 % niedrigere Thrombozytenzahlen gemessen werden und das mittlere Thrombozytenvolumen um ca. 1 fl niedriger bestimmt wird.
8. Die Erstellung eines Blutbildes ist auch mit Citrat-antikoaguliertem Vollblut möglich, wenn man den Verdünnungsfaktor durch das Antikoagulans und die, wie bei Magnesiumsulfat, etwas erniedrigten Thrombozytenwerte berücksichtigt.
9. Mit der fluoreszenz-optischen Thrombozytenzählung unterscheiden sich die Thrombozytenzahlen der $MgSO_4$ -antikoagulierten Vollblutproben nicht von den in EDTA gemessenen Plättchenzahlen.
10. Wenn über 24 Stunden bei Raumtemperatur gelagerte, unterschiedlich antikoagulierte Vollblutproben ausgestrichen, gefärbt und mikroskopisch differenziert werden, so zeigen alle Ausstriche abgestufte Schädigungen der Leukozyten, die am deutlichsten bei EDTA-Antikoagulation und tendenziell geringer bei den anderen Antikoagulanzen ausfallen.
11. Ausstreichbarkeit und Färbung der verschieden antikoagulierten Proben sind identisch.
12. Die zeitabhängigen, abgestuften Schädigungen der neutrophilen Granulozyten umfassen teilweise Degranulierung, Vakuolisierung und Kernveränderungen.

8. Literaturverzeichnis

- 1 Nasse CF, Nasse H. Untersuchungen zur Physiologie und Pathologie. Bonn: Habicht 1835.
- 2 Schulten. Ergebnisse einiger Blutuntersuchungen in Puerperalrankheiten. Archiv für Pathologische Anatomie und Physiologie und für Klinische Medicin 1858;**14**(5-6):501–509. doi:10.1007/BF01929155.
- 3 Schultze M. Ein heizbarer Objecttisch und seine Verwendung bei Untersuchungen des Blutes. Archiv für Mikroskopische Anatomie 1865;**1**(1):1–42. doi:10.1007/BF02961404.
- 4 Bizzozero J. Ueber einen neuen Formbestandtheil des Blutes und dessen Rolle bei der Thrombose und der Blutgerinnung - Untersuchungen. Archiv für Pathologische Anatomie und Physiologie und für Klinische Medicin 1882;**90**(2):261–332. doi:10.1007/BF01931360.
- 5 Wright J.H. The histogenesis of the blood platelets. Journal of Morphology 1910;**21**(2):263–278.
- 6 Kuter DJ. The physiology of platelet production. Stem cells (Dayton, Ohio) 1996;**14 Suppl 1**:88–101. doi:10.1002/stem.5530140711.
- 7 Duke WW. The relation of blood platelets to hemorrhagic disease - Description of a method for determining the bleeding time and coagulation time and report of three cases of hemorrhagic disease relieved by transfusion. JOURNAL OF THE AMERICAN MEDICAL ASSOCIATION 1910;**55**:1185–1192.
- 8 Klinger MHF and Jelkmann W. Review: Role of Blood Platelets in Infection and Inflammation. Journal of Interferon and Cytokine Research 2002;**22**(9):913–922.
- 9 Schulze H, Shivdasani RA. Mechanisms of thrombopoiesis. Journal of thrombosis and haemostasis JTH 2005;**3**(8):1717–1724. doi:10.1111/j.1538-7836.2005.01426.x.
- 10 Ghoshal K, Bhattacharyya M. Overview of platelet physiology: its hemostatic and nonhemostatic role in disease pathogenesis. TheScientificWorldJournal 2014;**2014**. doi:10.1155/2014/781857.
- 11 Bath P, Butterworth RJ. Platelet size Measurement, physiology and vascular disease. Blood coagulation & fibrinolysis an international journal in haemostasis and thrombosis 1996;**7**(2):157–161.
- 12 Hoffmann, Johannes J M L. Reference range of mean platelet volume. Thrombosis research 2012;**129**(4):534–535. doi:10.1016/j.thromres.2011.11.012.
- 13 Mannuß S, Schuff-Werner P, Dreissiger K, et al. Magnesium Sulfate as an Alternative In Vitro Anticoagulant for the Measurement of Platelet Parameters? American Journal of Clinical Pathology 2016;**145**(6):806–814. doi:10.1093/ajcp/aqw066.
- 14 Gawaz MP. Das Blutplättchen: Physiologie, Pathophysiologie, Membranrezeptoren, antithrombozytäre Wirkstoffe und antithrombozytäre Therapie bei koronarer Herzerkrankung 31 Tabellen. Stuttgart, New York: Thieme 1999.
- 15 Geddis AE. Megakaryopoiesis. Seminars in hematology 2010;**47**(3):212–219. doi:10.1053/j.seminhematol.2010.03.001.
- 16 Burkhart JM, Gambaryan S, Watson SP, et al. What can proteomics tell us about platelets? Circulation research 2014;**114**(7):1204–1219. doi:10.1161/CIRCRESAHA.114.301598.
- 17 Mitchell JL, Mutch NJ. Novel aspects of platelet factor XIII function. Thrombosis research an international journal on vascular obstruction, hemorrhage and hemostasis 2016;**141**(Suppl 2):S17-S21. [http://dx.doi.org/10.1016/S0049-3848\(16\)30356-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0049-3848(16)30356-5).
- 18 Löffler G, Petrides PE. Biochemie und Pathobiochemie. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg 1997.
- 19 White JG. Fine structural alterations induced in platelets by adenosine diphosphate. Blood 1968;**31**(5):604–622.
- 20 Pötzsch B, Madlener K. Hämostaseologie, 2nd edn. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag 2010.
- 21 Ebbeling L. Rapid Ultrastructural Changes in the Dense Tubular System Following Platelet Activation. Blood 1992;**80**(3):718–723.
- 22 Andrews RK, López JA, Berndt MC. Molecular mechanisms of platelet adhesion and activation. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 1997;**29**(1):91–105.

- 23 Nieswandt B, Pleines I, Bender M. Platelet adhesion and activation mechanisms in arterial thrombosis and ischaemic stroke. *Journal of thrombosis and haemostasis JTH* 2011;**9**(Suppl 1):92–104. doi:10.1111/j.1538-7836.2011.04361.x.
- 24 Blockmans D, Deckmyn H, Vermeylen J. Platelet activation. *Blood Reviews* 1995;**9**(3):143–156.
- 25 Clawson CC, White JG. Platelet interaction with bacteria. I. Reaction phases and effects of inhibitors. *The American journal of pathology* 1971;**65**(2):367–380.
- 26 COBURN J, LEONG JM, ERBAN JK. Integrin alpha IIb beta 3 mediates binding of the Lyme disease agent *Borrelia burgdorferi* to human platelets. *PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA* 1993;**90**(15):7059–7063.
- 27 Youssefian T, Drouin A, Masse J-M, et al. Host defense role of platelets: engulfment of HIV and *Staphylococcus aureus* occurs in a specific subcellular compartment and is enhanced by platelet activation. *Blood* 2002;**99**(11):4021–4029. doi:10.1182/blood-2001-12-0191.
- 28 Boukour S, Cramer EM. Platelet interaction with bacteria. *Platelets* 2005;**16**(3-4):215–217. doi:10.1080/09537100500136941.
- 29 Yeaman MR. Platelets: at the nexus of antimicrobial defence. *Nature reviews / Microbiology* 2014;**12**(6):426–437.
- 30 Tang YQ, Yeaman, Selsted ME. Antimicrobial peptides from human platelets. *Infection & Immunity* 2002;**70**(12):6524–6533.
- 31 Schuff-Werner P, Splettstößer W, Schmidt F, et al. Serotonin acts as a radical scavenger and is oxidized to a dimer during the respiratory burst of human mononuclear and polymorphonuclear phagocytes. *European journal of clinical investigation* 1995;**25**(7):477–484.
- 32 Gawaz M, Langer H, May AE. Platelets in inflammation and atherogenesis. *The Journal of clinical investigation* 2005;**115**(12):3378–3384. doi:10.1172/JCI27196.
- 33 Brindley LL, Sweet JM, Goetzl EJ. Stimulation of histamine release from human basophils by human platelet factor 4. *Journal of Clinical Investigation* 1983;**72**(4):1218–1223.
- 34 Scheuerer B, Ernst M, Durrbaum-Landmann I, et al. The CXC-chemokine platelet factor 4 promotes monocyte survival and induces monocyte differentiation into macrophages. *Blood* 2000;**95**(4):1158–1166.
- 35 Hayem G. *Recherches sur l'anatomie normale et pathologique du sang*. Paris: G. Masson 1878.
- 36 Graham MD. The Coulter Principle: Foundation of an industry. *JALA - Journal of the Association for Laboratory Automation* 2003;**8**(6):72–81. doi:10.1016/S1535-5535(03)00023-6.
- 37 Fonio A. Über ein neues Verfahren der Blutplättchenzählung. *Deutsche Zeitschrift f. Chirurgie* 1912;**117**(1-2):176–194. doi:10.1007/BF02793644.
- 38 Brecher G, Schneiderman, M. and Cronkite, E.P. The reproducibility and constancy of the platelet count. *American Journal of Clinical Pathology* 1953;**23**(1):15–26.
- 39 Briggs C, Harrison P, Machin SJ. Continuing developments with the automated platelet count. *International journal of laboratory hematology* 2007;**29**(2):77–91. doi:10.1111/j.1751-553X.2007.00909.x.
- 40 World Health Organization. Recommended methods for the visual determination of white cell and platelet counts 1988.
- 41 ICSH. Platelet Counting by the RBC/Platelet Ratio Method: A Reference Method. *American Journal of Clinical Pathology* 2001;**115**(3):460–464.
- 42 Macey MG, Carty E, Webb L, et al. Use of mean platelet component to measure platelet activation on the ADVIA 120 haematology system. *Cytometry* 1999;**38**(5):250–255. doi:10.1002/(SICI)1097-0320(19991015)38:5<250:AID-CYTO8>3.3.CO;2-B.
- 43 Wilson JD, Foster TH. Mie theory interpretations of light scattering from intact cells. *OPTICS LETTERS* 2005;**30**(18):2442–2444. doi:10.1364/OL.30.002442.

- 44 Abe Y, Wada H, Tomatsu H, et al. A simple technique to determine thrombopoiesis level using immature platelet fraction (IPF). *Thrombosis research an international journal on vascular obstruction, hemorrhage and hemostasis* 2006;**118**(4):463–470.
- 45 Michelson AD. Flow cytometry: a clinical test of platelet function. *Blood* 1996;**87**(12):4925–4936.
- 46 Mach WJ, Thimmesch AR, Orr JA, et al. Flow cytometry and laser scanning cytometry, a comparison of techniques. *Journal of clinical monitoring and computing* 2010;**24**(4):251–259. doi:10.1007/s10877-010-9242-4.
- 47 Born GVR. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature* 1962;**194**(4832):927–929.
- 48 Knöfler R, Eberl W, Schulze H, et al. Diagnose angeborener Störungen der Thrombozytenfunktion. Interdisziplinäre S2K-Leitlinie der Ständigen Kommission Pädiatrie der Gesellschaft für Thrombose- und Hämostaseforschung e. V. *Hämostaseologie* 2014;**34**(3):201–212. doi:10.5482/HAMO-13-04-0024.
- 49 Toth O, Calatzis A, Penz S, et al. Multiple electrode aggregometry: A new device to measure platelet aggregation in whole blood. *THROMBOSIS AND HAEMOSTASIS* 2006;**96**(6):781–788. doi:10.1160/TH06-05-0242.
- 50 Mueller T, Dieplinger B, Poelz W, et al. Utility of whole blood impedance aggregometry for the assessment of clopidogrel action using the novel Multiplate (R) analyzer - comparison with two flow cytometric methods. *Thrombosis research* 2007;**121**(2):249–258. doi:10.1016/j.thromres.2007.03.022.
- 51 Bajorath J, Hollenbaugh D, King G, et al. CD62/P-selectin binding sites for myeloid cells and sulfatides are overlapping. *Biochemistry* 1994;**33**(6):1332–1339.
- 52 Skubitz KM, Campbell KD, Skubitz AP. CD63 associates with CD11/CD18 in large detergent-resistant complexes after translocation to the cell surface in human neutrophils. *FEBS Letters* 2000;**469**(1):52–56. doi:10.1016/S0014-5793(00)01240-0.
- 53 Pearson L, Thom J, Adams M, et al. A rapid flow cytometric technique for the detection of platelet-monocyte complexes, activated platelets and platelet-derived microparticles. *International journal of laboratory hematology* 2009;**31**(4):430–439. doi:10.1111/j.1751-553X.2008.01059.x.
- 54 Dyckerhoff H, Marx R, Ludwig B. Über den Wirkungsmechanismus und die Verwendbarkeit einiger blutgerinnungshemmender organischer Substanzen. *Zeitschrift für die gesamte experimentelle Medizin* 1942;**110**(4-5):412–422. doi:10.1007/BF02661175.
- 55 Proescher F. Anti-Coagulant Properties of Ethylene Bis-iminodiacetic Acid. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 1951;**76**(4):619–620. doi:10.3181/00379727-76-18577.
- 56 England JM, Rowan RM, Van Assendelft OW, et al. Recommendations of the international council for standardization in haematology for ethylenediaminetetraacetic acid anticoagulation of blood for blood cell counting and sizing. *American Journal of Clinical Pathology* 1993;**100**(4):371–372.
- 57 Banfi G, Salvagno GL, Lippi G. The role of ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) as in vitro anticoagulant for diagnostic purposes. *Clinical chemistry and laboratory medicine CCLM / FESCC* 2007;**45**(5):565–576. 17484616.
- 58 Lippi G, Plebani M. EDTA-dependent pseudothrombocytopenia: Further insights and recommendations for prevention of a clinically threatening artifact. *CLINICAL CHEMISTRY AND LABORATORY MEDICINE* 2012;**50**(8):1281–1285. doi:10.1515/cclm-2012-0081.
- 59 White JG. Effects of ethylenediamine tetracetic acid (EDTA) on platelet structure. *Scandinavian Journal of Haematology* 1968;**5**(4):241–254.
- 60 Lance MD, Sloep M, Henskens YM, et al. Mean platelet volume as a diagnostic marker for cardiovascular disease: drawbacks of preanalytical conditions and measuring techniques. *Clinical & Applied Thrombosis/Hemostasis* 2012;**18**(6):561–568.
- 61 Adcock DM, Kressin DC, Marlar RA. Effect of 3.2% vs 3.8% sodium citrate concentration on routine coagulation testing. *American Journal of Clinical Pathology* 1997;**107**(1):105–110.

- 62 Mann KG, Whelihan MF, Butenas S, et al. Citrate anticoagulation and the dynamics of thrombin generation. *Journal of thrombosis and haemostasis JTH* 2007;**5**(10):2055–2061. doi:10.1111/j.1538-7836.2007.02710.x.
- 63 QUICK AJ, STEFANINI M. THE CHEMICAL STATE OF THE CALCIUM REACTING IN THE COAGULATION OF BLOOD. *JOURNAL OF GENERAL PHYSIOLOGY* 1948;**32**(2):191–202.
- 64 Perrotta G, Roberts L, Glazier J, Schumacher HR. Use of sodium citrate anticoagulant for routine hematology analysis on the CELL-DYN® 4000: An opportunity to enhance efficiency in the clinical laboratory. *Laboratory hematology official publication of the International Society for Laboratory Hematology* 1998;**4**:156–162.
- 65 THOMPSON CB, DIAZ DD, QUINN PG, et al. The role of anticoagulation in the measurement of platelet volumes. *American Journal of Clinical Pathology* 1983;**80**(3):327–332.
- 66 Shum HP, Yan WW, Chan TM. Risks and benefits of citrate anticoagulation for continuous renal replacement therapy. *Hong Kong Medical Journal* 2015;**21**(2):149–154. doi:10.12809/hkmj144330.
- 67 McLean J. The thromboplastic action of cephalin. *AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY* 1916;**41**(2):250–257. <http://ajplegacy.physiology.org/content/41/2/250>.
- 68 Howell WH, Holt E. TWO NEW FACTORS IN BLOOD COAGULATION - HEPARIN AND PRO-ANTITHROMBIN. *AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY* 1918;**47**(3):328–341.
- 69 Narayanan S. The preanalytic phase. An important component of laboratory medicine. *American Journal of Clinical Pathology* 2000;**113**(3):429–452. doi:10.1309/CONM-Q7R0-LL2E-B3UY.
- 70 Jin L, Abrahams JP, Skinner R, et al. The anticoagulant activation of antithrombin by heparin. *PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA* 1997;**94**(26):14683–14688.
- 71 Lüllmann H, Hein L, Mohr K, et al. *Pharmakologie und Toxikologie: Arzneimittelwirkungen verstehen - Medikamente gezielt einsetzen ; ein Lehrbuch für Studierende der Medizin, der Pharmazie und der Biowissenschaften, eine Informationsquelle für Ärzte, Apotheker und Gesundheitspolitiker ; 129 Tabellen, 16th edn. Stuttgart [u.a.]: Thieme 2006.*
- 72 Pike RN, Buckle AM, Le Bonniec BF, et al. Control of the coagulation system by serpins. Getting by with a little help from glycosaminoglycans. *The FEBS journal* 2005;**272**(19):4842–4851. doi:10.1111/j.1742-4658.2005.04880.x.
- 73 Olson ST, Richard B, Izaguirre G, et al. Molecular mechanisms of antithrombin-heparin regulation of blood clotting proteinases. A paradigm for understanding proteinase regulation by serpin family protein proteinase inhibitors. *Biochimie* 2010;**92**(11):1587–1596. doi:10.1016/j.biochi.2010.05.011.
- 74 Haycraft JB. Ueber die Einwirkung eines Secretes des officinellen Blutegels auf die Gerinnbarkeit des Blutes. *Archiv f. experiment. Pathol. u. Pharmakol* 1884;**18**(3-4):209–217. doi:10.1007/BF01833843.
- 75 Stone SR, Hofsteenge J. Kinetics of the inhibition of thrombin by hirudin. *Biochemistry* 1986;**25**(16):4622–4628. doi:10.1021/bi00364a025.
- 76 Nakamoto K, Sugibayashi S, Takahashi A, et al. Platelet count in EDTA-dependent pseudothrombocytopenia--application of MgSO₄ as an anticoagulant. *Rinsho byori. The Japanese journal of clinical pathology* 1986;**34**(2):167–173.
- 77 Kondo H, Kobayashi E, Itani T, et al. Hematology tests of blood anticoagulated with magnesium sulphate. *The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health off. publ. of the SEAMEO Regional Tropical Medicine and Public Health Project (TROPMED)* 2002;**33**(2):6–9.
- 78 Schuff-Werner P, Steiner M, Fenger S, et al. Effective estimation of correct platelet counts in pseudothrombocytopenia using an alternative anticoagulant based on magnesium salt. *British Journal of Haematology* 2013;**162**(5):684–692. doi:10.1111/bjh.12443.
- 79 Hwang DL, Yen CF, Nadler JL. Effect of extracellular magnesium on platelet activation and intracellular calcium mobilization. *American Journal of Hypertension* 1992;**5**(10):700–706.

- 80 Gawaz M. Antithrombotic effects of magnesium. Possible therapeutic consequences for acute coronary syndromes | Antithrombozytare Wirksamkeit von Magnesium. Mogliche Konsequenzen fur die akut ischamische Herzerkrankung. Fortschritte der Medizin 1996;**114**(26):47–50.
- 81 Jankun J, Skrzypczak-Jankun E, Lipiński B. Complex function of magnesium in blood clot formation and lysis. Central-European Journal of Immunology bimonthly of the Polish Society for Immunology coedited by eleven other central european immunological societies 2013;**38**(2):149–153.
- 82 Gowland E et al. Agglutination of platelets by a serum factor in the presence of EDTA. Journal of Clinical Pathology 1969;**22**(4):460–464.
- 83 Bartels PCM, Schoorl M, Lombarts, A. J. P. F. Screening for EDTA-dependent deviations in platelet counts and abnormalities in platelet distribution histograms in pseudothrombocytopenia. Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation 1997;**57**(7):629–636. doi:10.3109/00365519709055287.
- 84 Rosenkranz B, Wisser H, Bode JC. Pseudothrombopenie--eine Störung der Thrombozytenzahlbestimmung. Deutsche medizinische Wochenschrift 1985;**110**(13):492–495. doi:10.1055/s-2008-1068851.
- 85 SCHREZENMEIER H, MULLER H, GUNSILIUS E, et al. ANTICOAGULANT-INDUCED PSEUDOTHROMBOCYTOPENIA AND PSEUDOLEUCOCYTOSIS. THROMBOSIS AND HAEMOSTASIS 1995;**73**(3):506–513.
- 86 Kovacs F, Varga M, Pataki Z, et al. Pseudothrombocytopenia with multiple anticoagulant sample collection tubes. Interventional Medicine and Applied Science 2016;**8**(4):181–183. doi:10.1556/1646.8.2016.4.4.
- 87 Lau LG, Chng WJ, Liu TC. Unnecessary transfusions due to pseudothrombocytopenia. Transfusion 2004;**44**(6):801. doi:10.1111/j.1537-2995.2004.04009.x.
- 88 Lombarts AJ, De Kieviet W. Recognition and prevention of pseudothrombocytopenia and concomitant pseudoleukocytosis. American Journal of Clinical Pathology 1988;**89**(5):634–639.
- 89 Briggs C, Mellors I, Roderick A, et al. Quality counts: new parameters in blood cell counting. International journal of laboratory hematology 2009;**31**(3):277–297. doi:10.1111/j.1751-553X.2009.01160.x.
- 90 Briggs CJ, Linssen J, Longair I, et al. Improved flagging rates on the sysmex XE-5000 compared with the XE-2100 reduce the number of manual film reviews and increase laboratory productivity. American Journal of Clinical Pathology 2011;**136**(2):309–316. doi:10.1309/AJCPDLR4KGKAFW4W.
- 91 Stanworth SJ, Denton K, Monteath J, et al. Automated counting of platelets on the Bayer ADVIA(TM) 120 analyser. Clinical and Laboratory Haematology 1999;**21**(2):113–117. doi:10.1046/j.1365-2257.1999.00200.x.
- 92 Kunicka JE, Fischer G, Murphy J, et al. Improved platelet counting using two-dimensional laser light scatter. American Journal of Clinical Pathology 2000;**114**(2):283–289. doi:10.1309/0GLP-K5NU-N1GD-PR8T.
- 93 WILCOXON F. Individual comparisons by ranking methods. Biometrics Bulletin 1945;**1**(6):80–83.
- 94 Kundt G, Krentz H. Epidemiologie und medizinische Biometrie: Eine kurzgefasste übersichtliche Einführung ; mit Prüfungsfragen und Übungsaufgaben, 4th edn. Aachen: Shaker 2009.
- 95 Liu Y. Box plots: Use and interpretation. Transfusion 2008;**48**(11):2279–2280. doi:10.1111/j.1537-2995.2008.01925.x.
- 96 Latger-Cannard V, Hoarau M, Salignac S, et al. Mean platelet volume: comparison of three analysers towards standardization of platelet morphological phenotype. International journal of laboratory hematology 2012;**34**(3):300–310. doi:10.1111/j.1751-553X.2011.01396.x.
- 97 François D, Masure A, Atallah N, et al. Underestimation of platelet count on magnesium salt-anticoagulated samples. CLINICAL CHEMISTRY AND LABORATORY MEDICINE 2014;**52**(5):e95-e97. doi:10.1515/cclm-2013-1016.
- 98 Briggs C, Kunka S, Machin SJ. The most accurate platelet count on the Sysmex XE-2100. Optical or impedance? Clin Lab Haematol 2004;**26**(2):157–158. doi:10.1111/j.1365-2257.2004.00596.x.

- 99 Shimizu M, Yamamoto M, Miyachi H, et al. Simple, rapid, and automated method for detection of hyperaggregability of platelets using a hematology analyzer. *American Journal of Hematology* 2003;**72**(4):282–283.
- 100 Harrison P, Briggs C. Platelet Counting. In: *Platelets* 2013:547–557.
- 101 Ahnadi CE, Chapman ES, Lépine M, et al. Assessment of platelet activation in several different anticoagulants by the Advia 120 hematology system, fluorescence flow cytometry, and electron microscopy. *THROMBOSIS AND HAEMOSTASIS* 2003;**90**(5):940–948.
- 102 Stenberg PE, McEver RP, Shuman MA, et al. A platelet alpha-granule membrane protein (GMP-140) is expressed on the plasma membrane after activation. *Journal of Cell Biology* 1985;**101**(3):880–886. doi:10.1083/jcb.101.3.880.
- 103 Smyth SS, McEver RP, Weyrich AS, et al. Platelet functions beyond hemostasis. *Journal of thrombosis and haemostasis the official journal of the International Society on Thrombosis and Haemostasis ; JTH* 2009;**7**(11):1759–1766.
- 104 Merten M, Thiagarajan P. P-Selectin Expression on Platelets Determines Size and Stability of Platelet Aggregates. *Circulation* 2000;**102**(16):1931–1936. doi:10.1161/01.CIR.102.16.1931.
- 105 Nishibori M, Cham B, McNicol A, et al. The protein CD63 is in platelet dense granules, is deficient in a patient with Hermansky-Pudlak syndrome, and appears identical to granulophysin. *Journal of Clinical Investigation* 1993;**91**(4):1775–1782. doi:10.1172/JCI116388.
- 106 Pols MS, Klumperman J. Trafficking and function of the tetraspanin CD63. *Experimental Cell Research* 2009;**315**(9):1584–1592. doi:10.1016/j.yexcr.2008.09.020.
- 107 Cham BP, Gerrard JM, Bainton DF. Granulophysin is located in the membrane of azurophilic granules in human neutrophils and mobilizes to the plasma membrane following cell stimulation. *American Journal of Pathology* 1994;**144**(6):1369–1380.
- 108 Vischer UM, Wagner DD. CD63 is a component of Weibel-Palade bodies of human endothelial cells. *Blood* 1993;**82**(4):1184–1191.
- 109 Downey DG, Bell SC, Elborn JS. Neutrophils in cystic fibrosis. *Thorax* 2009;**64**(1):81–88. doi:10.1136/thx.2007.082388.
- 110 Watala C, Golański J, Boncler MA, et al. Membrane lipid fluidity of blood platelets: A common denominator that underlies the opposing actions of various agents that affect platelet activation in whole blood. *Platelets* 1998;**9**(5):315–327. doi:10.1080/09537109876564.
- 111 Golanski J, Pietrucha T, Baj Z, et al. Molecular insights into the anticoagulant-induced spontaneous activation of platelets in whole blood-various anticoagulants are not equal. *Thrombosis research* 1996;**83**(3):199–216.
- 112 Lages B, Weiss HJ. Evidence for a role of glycoprotein IIb-IIIa, distinct from its ability to support aggregation, in platelet activation by ionophores in the presence of extracellular divalent cations. *Blood* 1994;**83**(9):2549–2559.
- 113 Hagberg IA, Lyberg T. Blood platelet activation evaluated by flow cytometry: Optimised methods for clinical studies. *Platelets* 2000;**11**(3):137–150.
- 114 Mody M, Lazarus AH, Semple JW, et al. Preanalytical requirements for flow cytometric evaluation of platelet activation: Choice of anticoagulant. *Transfusion Medicine* 1999;**9**(2):147–154. doi:10.1046/j.1365-3148.1999.00188.x.
- 115 Ravn HB, Kristensen SD, Vissinger H, et al. Magnesium inhibits human platelets. *BLOOD COAGULATION & FIBRINOLYSIS* 1996;**7**(2):241–244.
- 116 Moncada S, Vane JR. Pharmacology and endogenous roles of prostaglandin endoperoxides, thromboxane A₂, and prostacyclin. *Pharmacological Reviews* 1978;**30**(3):293–331.
- 117 Mcgiff JC, Carroll MA. Eicosanoids in preeclampsia-eclampsia: The effects of magnesium. *Hypertension in Pregnancy* 1994;**13**(3):217–226. doi:10.3109/10641959409072224.
- 118 Marcus AJ, Safier LB. Thromboregulation: multicellular modulation of platelet reactivity in hemostasis and thrombosis. *FASEB Journal* 1993;**7**(6):516–522.

- 119 Sheu, JR, Hsiao G, Shen MY, et al. Mechanisms involved in the antiplatelet activity of magnesium in human platelets. *British Journal of Haematology* 2002;**119**(4):1033–1041.
- 120 Gawaz M, Ott I, Reiningger AJ, et al. Effects of magnesium on platelet aggregation and adhesion. Magnesium modulates surface expression of glycoproteins on platelets in vitro and ex vivo. *Thrombosis and haemostasis international journal for vascular biology and medicine ; official organ of the Working Group on Thrombosis of the European Society of Cardiology (ESC)* 1994;**72**(6):912–918.
- 121 Nagasawa A, Matsuno K, Tamura S, et al. The basis examination of leukocyte-platelet aggregates with CD45 gating as a novel platelet activation marker. *International journal of laboratory hematology* 2013;**35**(5):534–541. doi:10.1111/ijlh.12051.
- 122 Zhao L, Bath PM, May J, et al. P-selectin, tissue factor and CD40 ligand expression on platelet-leucocyte conjugates in the presence of a GPIIb/IIIa antagonist. *Platelets* 2003;**14**(7-8):473–480. doi:10.1080/09537100310001638562.
- 123 Sako D, Comess KM, Barone KM, et al. A sulfated peptide segment at the amino terminus of PSGL-1 is critical for P-selectin binding. *Cell* 1995;**83**(2):323–331. doi:10.1016/0092-8674(95)90173-6.
- 124 Dole VS, Bergmeier W, Mitchell HA, et al. Activated platelets induce Weibel-Palade-body secretion and leukocyte rolling in vivo: Role of P-selectin. *Blood* 2005;**106**(7):2334–2339. doi:10.1182/blood-2005-04-1530.
- 125 McEver RP. Regulation of function and expression of P-selectin. *Agents and Actions Supplements* 1995;**47**:117–119.
- 126 Bournazos S, Rennie J, Hart SP, et al. Choice of anticoagulant critically affects measurement of circulating platelet-leukocyte complexes. *ARTERIOSCLEROSIS THROMBOSIS AND VASCULAR BIOLOGY* 2008;**28**(1):E2-E3. doi:10.1161/ATVBAHA.107.153387.
- 127 NORMAN KE, MOORE KL, McEver RP, et al. Leukocyte rolling in vivo is mediated by P-selectin glycoprotein ligand-1. *Blood* 1995;**86**(12):4417–4421.
- 128 Geng JG, Bevilacqua MP, Moore KL, et al. Rapid neutrophil adhesion to activated endothelium mediated by GMP-140. *Nature* 1990;**343**(6260):757–760.
- 129 Wood BL, Andrews J, Miller S, et al. Refrigerated storage improves the stability of the complete blood cell count and automated differential. *American Journal of Clinical Pathology* 1999;**112**(5):687–695.
- 130 Cornet E, Behier C, Troussard X. Guidance for storing blood samples in laboratories performing complete blood count with differential. *International journal of laboratory hematology* 2012;**34**(6):655–660. doi:10.1111/j.1751-553X.2012.01452.x.
- 131 Zini G. Stability of complete blood count parameters with storage: toward defined specifications for different diagnostic applications. *International journal of laboratory hematology* 2014;**36**(2):111–113. doi:10.1111/ijlh.12181.
- 132 Imeri F, Herklotz R, Risch L, et al. Stability of hematological analytes depends on the hematology analyser used: A stability study with Bayer Advia 120, Beckman Coulter LH 750 and Sysmex XE 2100. *Clinica Chimica Acta* 2008;**397**(1-2):68–71. doi:10.1016/j.cca.2008.07.018.
- 133 Hedberg P, Lehto T. Aging stability of complete blood count and white blood cell differential parameters analyzed by Abbott CELL-DYN Sapphire hematology analyzer. *International journal of laboratory hematology* 2009;**31**(1):87–96. doi:10.1111/j.1751-553X.2007.01009.x.
- 134 Buttarello M. Quality specification in haematology: the automated blood cell count. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 2004;**346**(1):45–54. doi:10.1016/j.cccn.2004.02.038.
- 135 Lancé MD, van Oerle R, Henskens, Yvonne M C, et al. Do we need time adjusted mean platelet volume measurements? *Laboratory hematology official publication of the International Society for Laboratory Hematology* 2010;**16**(3):28–31. doi:10.1532/LH96.10011.
- 136 Dastjerdi MS, Emami T, Najafian A, et al. Mean platelet volume measurement, EDTA or citrate? *Hematology (Amsterdam, Netherlands)* 2006;**11**(5):317–319. doi:10.1080/10245330600954163.

- 137McShine RL, Das PC, Smit Sibinga CT, et al. Differences between the effects of EDTA and citrate anticoagulants on platelet count and mean platelet volume. *Clinical and Laboratory Haematology* 1990;**12**(3):277–285.
- 138Bath PM. The routine measurement of platelet size using sodium citrate alone as the anticoagulant. *THROMBOSIS AND HAEMOSTASIS* 1993;**70**(4):687–690.
- 139Beyan C, Beyan E. Were the measurements standardized sufficiently in published studies about mean platelet volume? *Blood Coagulation and Fibrinolysis* 2017;**28**(3):234–236. doi:10.1097/MBC.0000000000000586.
- 140Jackson SR, Carter JM. Platelet volume: laboratory measurement and clinical application. *Blood Reviews* 1993;**7**(2):104–113.
- 141Mannuß S, Kohlschein P, Dreißeiger K, et al. Measurement of Platelet Counts and Volume Using Magnesium Sulfate as an Anticoagulant: Comparison of Impedance and Light-Scatter Technology. *American Journal of Clinical Pathology* 2016;**146**(5):538–545. doi:10.1093/ajcp/aqw146.
- 142Chu SG, Becker RC, Berger PB, et al. Mean platelet volume as a predictor of cardiovascular risk: a systematic review and meta-analysis. *Journal of thrombosis and haemostasis JTH* 2010;**8**(1):148–156. doi:10.1111/j.1538-7836.2009.03584.x.
- 143Erdem H, Aktimur R, Cetinkunar S, et al. Evaluation of mean platelet volume as a diagnostic biomarker in acute appendicitis. *International journal of clinical and experimental medicine* 2015;**8**(1):1291–1295.
- 144Goncalves SC, Labinaz M, Le May M, et al. Usefulness of mean platelet volume as a biomarker for long-term outcomes after percutaneous coronary intervention. *The American journal of cardiology* 2011;**107**(2):204–209. doi:10.1016/j.amjcard.2010.08.068.
- 145Han L, Han T, Nie C, et al. Elevated mean platelet volume is associated with poor short-term outcomes in hepatitis B virus-related acute-on-chronic liver failure patients. *Clinics and research in hepatology and gastroenterology* 2015;**39**(3):331–339. doi:10.1016/j.clinre.2014.10.006.
- 146Ju HY, Kim JK, Hur SM, et al. Could mean platelet volume be a promising biomarker of progression of chronic kidney disease? *Platelets* 2015;**26**(2):143–147. doi:10.3109/09537104.2014.890179.
- 147Lippi G, Filippozzi L, Salvagno GL, et al. Increased mean platelet volume in patients with acute coronary syndromes. *Archives of pathology & laboratory medicine* 2009;**133**(9):1441–1443. doi:10.1043/1543-2165-133.9.1441.
- 148Qi X, Wan F, Lou Y, et al. The mean platelet volume is a potential biomarker for cirrhosis in chronic hepatitis B virus infected patients. *Hepato-gastroenterology* 2014;**61**(130):456–459.
- 149Sun W, Zhang J, Cao Z, et al. A decreased mean platelet volume is associated with stable and exacerbated asthma. *Respiration* 2014;**88**(1):31–37. doi:10.1159/000360296.
- 150Cohle SD, Saleem A, Makkaoui DE. Effects of storage of blood on stability of hematologic parameters. *American Journal of Clinical Pathology* 1981;**76**(1):67–69.
- 151Baca ME de, Gulati G, Kocher W, et al. Effects of storage of blood at room temperature on hematologic parameters measured on Sysmex XE-2100. *LABMEDICINE* 2006;**37**(1):28–36. doi:10.1309/1EERK1MO2QFJRX6P.
- 152Gulati GL, Hyland LJ, Kocher W, et al. Changes in automated complete blood cell count and differential leukocyte count results induced by storage of blood at room temperature. *Archives of pathology & laboratory medicine* 2002;**126**(3):336–342. doi:10.1043/0003-9985(2002)126<0336:CIACBC>2.0.CO;2.
- 153Joshi A, McVicker W, Segalla R, et al. Determining the stability of complete blood count parameters in stored blood samples using the SYSMEX XE-5000 automated haematology analyser. *International journal of laboratory hematology* 2015;**37**(5):705–714. doi:10.1111/ijlh.12389.
- 154Vives-Corróns J-L, Briggs C, Simon-Lopez R, et al. Effect of EDTA-anticoagulated whole blood storage on cell morphology examination. A need for standardization. *International journal of laboratory hematology* 2014;**36**(2):222–226. doi:10.1111/ijlh.12170.

Danksagung

Herrn Professor Dr. med. Peter Schuff-Werner danke ich für die Überlassung des Themas und die engagierte persönliche Betreuung und Beratung bei der Durchführung und Fertigstellung der vorliegenden Doktorarbeit.

Den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin der Universitätsmedizin Rostock, insbesondere Herrn Dr. Kohlschein und Frau Dr. Burstein, danke ich für die freundliche und zuvorkommende Unterstützung.

Mein besonderer Dank gilt Frau Katrin Dreißiger, die geduldig beratend und jederzeit hilfsbereit bei der Planung und Durchführung der Versuchsreihen ansprechbar war.

Den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin des Universitätsklinikums Carl Gustav Carus Dresden und des Zentrallabors der SLK-Kliniken Heilbronn GmbH danke ich dafür, dass ich die im Rostocker Institut begonnenen Untersuchungen weiterführen und ergänzen durfte.

Meiner Familie und meiner Freundin Sina danke ich für ihre geduldige und verständnisvolle Unterstützung im Studium und während der Promotionszeit.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Steffen Mannuß
Geburtsdatum: 12. März 1986 in Neustadt an der Weinstraße
Familienstand: ledig
Eltern: Christa und Manfred Mannuß

Schulische Bildung

1992 – 1996 Grundschule Gimmeldingen
1996 – 2005 Käthe-Kollwitz-Gymnasium Neustadt
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Berufliche Bildung

4/2005 – 12/2005 Zivildienst als Rettungssanitäter beim DRK Bad Dürkheim
4/2006 – 11/2007 Ausbildung zum Rettungsassistenten beim ASB Grünstadt
12/2007 – 9/2009 Beschäftigung als Rettungsassistent beim DRK Bad Dürkheim

Studium

10/2009 – 9/2012 Studium „Medizinische Biotechnologie“ an der Universität Rostock
Abschluss: Bachelor of Science
10/2012 – 9/2014 Studium „Medizinische Biotechnologie“ an der Universität Rostock
Abschluss: Master of Science
Seither Promotionsstudium an der Universität Rostock

Aktuelle Tätigkeit

Weiterbildung zum Klinischen Chemiker bei
MDI Laboratorien GmbH (MVZ), Berlin

Publikationen

2013

Schuff-Werner, Peter; Steiner, Michael; Fenger, Sebastian; Groß, Hans Jürgen; Bierlich, Alexa; Dreissiger, Katrin; Mannuß, Steffen; Siegert, Gabriele; Bachem, Max Georg; Kohlschein, Peter
Effective estimation of correct platelet counts in pseudothrombocytopenia using an alternative anticoagulant based on magnesium salt.

British Journal of Haematology 2013; **162** (5) 684–692

2016

Mannuß, Steffen; Schuff-Werner, Peter; Dreissiger, Katrin; Kohlschein, Peter
Magnesium Sulfate as an Alternative In Vitro Anticoagulant for the Measurement of Platelet Parameters?

American Journal of Clinical Pathology 2016; **145** (6) 806-814

Mannuß, Steffen; Kohlschein, Peter; Dreißiger, Katrin; Schuff-Werner, Peter
Measurement of Platelet Counts and Volume Using Magnesium Sulfate as an Anticoagulant: Comparison of Impedance and Light-Scatter Technology.

American Journal of Clinical Pathology 2016; **146** (5) 538-545

Eigene Vorträge

Weitere Konfusion oder Harmonisierung?

Standardisierung der Bestimmung von Thrombozytenparametern

Untersuchungen zur Vergleichbarkeit der automatisierten Bestimmung von Thrombozytenparametern unter besonderer Berücksichtigung der Antikoagulation und der Gerätetechnik.

Gerinnungsdinner 02.07.2015

Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin der TU Dresden

Magnesiumsulphat (ThromboExact) als alternatives in-vitro Antikoagulans für die Bestimmung der Thrombozytenzahl bei EDTA-induzierter Pseudothrombozytopenie

Mitteldeutsche Laborkonferenz 26.05.-28.05.2016

Dorint Hotel Dresden

Postervorträge

Mannuß, Steffen; Dreißiger, Katrin; Kohlschein, Peter; Schuff-Werner, Peter

Determination of platelet parameters: Is magnesium sulphate an alternative anticoagulant?

Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin
14.10.-17.10.2015 im Congress Center Leipzig

Mannuß, Steffen; Kohlschein, Peter; Dreißiger, Katrin; Schuff-Werner, Peter

Magnesium Sulfate as Alternative Anti-Coagulant Compared to EDTA and Citrate:

Spontaneous and Agonist-induced Platelet Activation and Aggregation

Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin
28.09.-30.09.2016 im Congress Center Rosengarten Mannheim

Mannuß, Steffen; Kohlschein, Peter; Dreißiger, Katrin; Schuff-Werner, Peter

Magnesium Sulfate Suitable as In Vitro Anti-Coagulant in the Hematological Routine Laboratory?

XXXth International Symposium on Technical Innovations in Laboratory Hematology

04.05.-06.05.2017 im Hawaii Convention Center Honolulu, Hawaii

Mannuß, Steffen; Kohlschein, Peter; Dreißiger, Katrin; Schuff-Werner, Peter

Magnesium Sulfate Suitable as In Vitro Anti-Coagulant in the Hematological Routine Laboratory?

Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin
11.10.-14.10.2017 in den Weser-Ems-Hallen Oldenburg