

**Tierärztliche Hochschule Hannover**

---

**Thrombozytenfunktionsmessung im Schafblut:  
Optimierung der Aggregationsmessung im Multiplate Analyser und Einfluss der  
Probenlagerung**

INAUGURAL – DISSERTATION  
zur Erlangung des Grades  
einer Doktorin der Veterinärmedizin  
- DOCTOR MEDICINAE VETERINARIAE -  
( Dr. med. vet. )

Vorgelegt von

**Andrea Baumgarten**

aus Hannover

Hannover 2011

Wissenschaftliche Betreuung: Univ.-Prof. Dr. R. Mischke  
Klinik für Kleintiere

1. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. R. Mischke

2. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. S. Rautenschlein

Tag der mündlichen Prüfung: 11.10.2011

## **Meiner Großmutter in Memorandum**

**Nur die Sache ist verloren,  
die man aufgibt.**

Ernst Freiherr von Feuchtersleben

Teile dieser Arbeit sind bei folgender Zeitschrift zur Veröffentlichung angenommen  
oder bereits veröffentlicht:

Baumgarten A., Wilhelmi M., Kalbantner K., Ganter M., Mischke R. **Measurement of platelet aggregation in ovine blood using a new impedance aggregometer.** *Veterinary Clinical Pathology* 39 (2010) 149–156.

Baumgarten A., Wilhelmi M., Ganter M., Rohn K., Mischke R. **Changes of platelet function and blood coagulation during short-term storage of CPDA-1 stabilized ovine blood.** *Research in Veterinary Science* 91 (2011) 150–158.



## Inhaltsverzeichnis

Seite

<b>I</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>II</b>	<b>Publikation 1: “Measurement of platelet aggregation in ovine blood using a new impedance aggregometer”</b> .....	<b>3</b>
	Abstract.....	4
<b>III</b>	<b>Publikation 2: “Changes of platelet function and blood coagulation During short term storage of ovine blood”</b> .....	<b>5</b>
	Abstract.....	6
<b>IV</b>	<b>Übergreifende Diskussion</b> .....	<b>7</b>
	Reaktion auf Ristocetin, Arachidonsäure und TRAP-6.....	7
	Evaluierung der optimalen Konzentrationen von ADP und Kollagen.....	8
	Ermittlung des bevorzugten Probenmaterials.....	10
	Untersuchung lagerungsbedingter Veränderungen.....	11
	Thrombozytenzahlveränderungen während der Vollblutlagerung... 11	
	Veränderungen der Aggregationsfähigkeit während der Lagerung... 12	
	Untersuchung der plasmatischen Gerinnung, RTG.....	16
	Vergleich zwischen CPDA1- und Citrat-antikoaguliertem Blut.....	17
	Zusammenfassung.....	18
<b>V</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>19</b>
<b>VI</b>	<b>Summary</b> .....	<b>23</b>
<b>VII</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>27</b>
<b>VIII</b>	<b>Anhang</b> .....	<b>34</b>
<b>IX</b>	<b>Publikationsliste</b> .....	<b>38</b>
<b>X</b>	<b>Danksagung</b> .....	<b>39</b>

## Abkürzungen

ADP	Adenosindiphosphat, adenosine diphosphate
aPTT	aktivierte partielle Thromboplastinzeit, activated partial thromboplastin time
ASPI	Arachidonsäure, arachidonic acid
AU	Aggregationseinheiten, aggregation units
AUC	Fläche unter der Kurve, area under the curve
CPDA-1	Citrat-Phosphat-Dextrose-Adenin-Puffer nach Formel 1, citrate phosphate dextrose adenine stabilizer
DFG	Deutsche Forschungsgemeinschaft
EDTA	Ethylendiamintetraacetat, ethylen-diamintetraacetat
et al.	et alii (lat. „und andere“, “and others”)
Fig.	Abbildung, figure
g	Gramm, gram
h	Stunde(n), hour(s)
L, l	Liter, litre
Max.	Maximum, maximum
mg	Milligramm, milligram
ml	Milliliter, millilitre
mmol	Millimol, millimol
min	Minute(n), minute(s)
Min.	Minimum, minimum
NaCl	Natrium-Chlorid, natrium-chloride
n	Anzahl, number
nm	Nanometer, nanometer
<i>P</i>	<i>P</i> -Wert (Irrtumswahrscheinlichkeit), <i>P</i> -value



PFP	Plättchenfreies Plasma, platelet free plasma
PRP	Plättchenreiches Plasma, platelet rich plasma
PT	Prothrombinzeit, prothrombin time
PT <sub>[MT]</sub>	Prothrombinzeit <sub>[Modifizierter Test]</sub> , prothrombin time <sub>[modified test]</sub>
PT <sub>[ST]</sub>	Prothrombinzeit <sub>[Standardtest]</sub> , prothrombin time <sub>[standard test]</sub>
rpm	Umdrehungen pro Minute, rounds per minute
RTG	Resonanzthrombogramm, resonance thrombogram
RTG-f	Resonanzthrombogramm-Fibrinbildungszeit, resonance thrombogram-fibrin formation time
RTG-F	Resonanzthrombogramm-Fibrinamplitude, resonance thrombogram-fibrin amplitude
RTG-p	Resonanzthrombogramm-Zeit des Abfalls des Fibrinschenkels, resonance thrombogram-decending time of platelet leg
RTG-r	Resonanzthrombogramm-Reaktionszeit, resonance thrombogram-reaction time
Tab.	Tabelle, table
TRAP	Thrombinrezeptor-aktivierendes Peptid, thrombinreceptor-activating peptide
µg	Mikrogramm, microgram
µl	Mikroliter, microlitre
µmol	Mikromol, micromol



# **I Einleitung**

---

## **I Einleitung**

Die Untersuchung der Hämostase von Schafen ist vornehmlich vor dem Hintergrund ihrer Rolle als Studienmodelltier, z.B. für allgemeine (Turner et al., 2002), kardiovaskuläre (Manco-Johnson et al., 2002; McEvoy et al., 2002; Wilhelmi et al., 2003) und traumatische (Hildebrand et al., 2005; White et al., 2006; Krebs et al., 2007) Chirurgiestudien sowie Sepsis- (Wang et al., 2007) und Schock-Modelle (Schiffer et al., 2002), von großer Wichtigkeit. Eine untergeordnete Rolle spielt die Diagnostik der Hämostase beim Schaf hingegen bislang für die klinische Veterinärmedizin.

Ein wichtiger Teilaspekt der Hämostase ist die Funktion der Blutplättchen (Wohner, 2008). Die Thrombozytenaggregometrie ist trotz der Tatsache, dass wichtige Aspekte der Thrombozytenreaktionen wie die Plättchenadhäsion oder die Qualität der gebildeten Aggregate nicht beurteilt werden, eine der wichtigsten In vitro-Standard-Untersuchungen für die Überprüfung der Thrombozytenfunktion. Es gibt zwei Hauptprinzipien der Thrombozytenaggregationsmessung. Bei der von Born beschriebenen Methode (Born, 1962) wird die Zunahme der Lichttransmission in plättchenreichem Plasma während der durch einen Agonisten induzierten Thrombozytenaggregation aufgezeichnet (Dyszkiewicz-Korpanty et al., 2005). Die Impedanzaggregometrie basiert auf dem Anstieg des elektrischen Widerstandes zwischen zwei Edelmetalldrähten aufgrund der Thrombozytenaggregation als Reaktion auf einen Agonisten (Dyszkiewicz-Korpanty et al., 2005; Tóth et al., 2006). Hierzu steht seit einigen Jahren mit dem Multiplate Analyser ein modernes, bedienungsfreundliches Analysengerät zur Verfügung (Calatzis et al., 2006), wofür allerdings bislang zum Schaf in der zugänglichen Literatur keine Daten vorliegen.

# I Einleitung

---

Ein wichtiger Aspekt für die Zuverlässigkeit der Diagnostik der Hämostase, z.B. nach Transport bzw. Versand diagnostischer oder experimenteller Proben, ist die Lagerungsstabilität der Proben. Der Erhalt der Plättchenfunktion in gelagerten Blutproben ist darüber hinaus von Interesse für die Blutlagerung zu therapeutischen Zwecken (Wain et al., 1985) und insbesondere im Hinblick auf die Verwendung von Schafblut in experimentellen Modellen wie z.B. extrakorporalen Kreisläufen (Hong et al., 2009; Ye et al., 2009).

Ziel des ersten Teils dieser Arbeit war es, das neue Vollblut-Impedanzaggregometer mit verschiedenen Agonisten auf seine Anwendbarkeit bei Schafen zu testen, wobei die Konzentration der Agonisten optimiert, die Präzision des Gerätes abgeklärt und Referenzwerte evaluiert werden sollten.

Der zweite Teil dieser Arbeit hatte zum Ziel, den Einfluss von Lagerungsdauer und Lagerungstemperatur auf verschiedene Parameter des primären und sekundären Hämostasesystems im Schafblut herauszufinden, wobei u.a. das im ersten Teil evaluierte Vollblut-Impedanzaggregometer (Multiplate-Analyser) zum Einsatz gelangte.

## **II Measurement of platelet aggregation in ovine blood using a new impedance aggregometer**

---

## **II Measurement of platelet aggregation in ovine blood using a new impedance aggregometer**

### **Short title: Platelet aggregation in ovine blood**

Published in Veterinary Clinical Pathology 39 (2010) 149–156

Andrea Baumgarten<sup>1\*</sup>, Mathias Wilhelmi<sup>2\*</sup>, Kerstin Kalbantner<sup>1</sup>, Martin Ganter<sup>3</sup>,  
Reinhard Mischke<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Small Animal Clinic, Hannover School of Veterinary Medicine, Hannover, Germany,

<sup>2</sup>Clinic for Cardiac, Thoracic, Transplant and Vascular Surgery, Hannover Medical School, Hannover, Germany, and <sup>3</sup>Clinic for Small Ruminants, Hannover School of Veterinary Medicine, Hannover, Germany

\* Both authors contributed equally to this work

### **Correspondence**

Reinhard Mischke, Klinik für Kleintiere, Tierärztliche Hochschule Hannover, Bischofsholer Damm 15, D-30173 Hannover, Germany.

E-mail: [reinhard.mischke@tiho-hannover.de](mailto:reinhard.mischke@tiho-hannover.de)

This work was supported by a grant of the German Research Foundation / Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG).

## II Measurement of platelet aggregation in ovine blood using a new impedance aggregometer

---

### Abstract

**Background:** Whole blood (impedance) platelet aggregometry is an important method to investigate platelet function disorders. Examination of haemostatic function in sheep is important with respect to their role as an animal model of human disease.

**Objective:** The aim of this study was to evaluate and optimize selected methodological aspects (anticoagulant, agonist concentration) of impedance aggregometry in ovine blood using the new Multiplate 5.0 analyzer.

**Methods:** Blood samples were collected in hirudin anticoagulant from 40 clinically healthy sheep. Samples from selected sheep were collected in citrate, with or without the addition of calcium chloride. The agonists adenosine diphosphate (ADP), collagen, ristocetin, arachidonic acid, and thrombin receptor-activating peptide (TRAP) were added in several concentrations to induce aggregation.

**Results:** Based on maximum aggregation values and internal precision, no significant difference was found between ADP concentrations of 3–10  $\mu\text{mol/L}$  and collagen concentrations of 3–5  $\mu\text{g/mL}$  ( $P > .05$ ). The lowest interindividual variation of approximately 3–4-fold was seen with 4 and 5  $\mu\text{mol/L}$  ADP and 4 and 5  $\mu\text{g/mL}$  collagen. Ristocetin, arachidonic acid, and TRAP did not induce significant aggregation at any concentration. Aggregation results were significantly lower when measured in citrate- vs hirudin-anticoagulated blood, regardless of the presence of calcium chloride.

### **III Changes of platelet function and blood coagulation during short term storage of CPDA-1 stabilized ovine blood**

---

### **III Changes of platelet function and blood coagulation during short term storage of CPDA-1 stabilized ovine blood**

#### **Running title: Haemostatic function in stored ovine blood**

Published in Research in Veterinary Science 91 (2011) 150–158

A. Baumgarten<sup>a§</sup>, M. Wilhelmi<sup>b§</sup>, M. Ganter<sup>c</sup>, K. Rohn<sup>d</sup>, and R. Mischke<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Small Animal Clinic, University of Veterinary Medicine Hannover, Hannover, Germany

<sup>b</sup>Clinic for Cardiac, Thoracic, Transplant and Vascular Surgery, Hannover Medical School, Hannover, Germany

<sup>c</sup>Clinic for Small Ruminants, University of Veterinary Medicine Hannover, Hannover, Germany

<sup>d</sup>Institute for Biometry and Epidemiology and Data Processing, University of Veterinary Medicine Hannover, Hannover, Germany

<sup>§</sup> Both authors contributed equally to this work

Correspondence and requests for reprints to Reinhard Mischke, Small Animal Clinic, University of Veterinary Medicine Hannover, Bünteweg 9, D-30559 Hannover, Germany

Tel: +49 511 9536200; fax: +49 511 6204;

e-mail: [reinhard.mischke@tiho-hannover.de](mailto:reinhard.mischke@tiho-hannover.de)

This work was supported by a grant of the German Research Foundation / Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG).

### **III Changes of platelet function and blood coagulation during short term storage of CPDA-1 stabilized ovine blood**

---

#### **Abstract**

The objective of this study was to detect the influence of short term storage on the haemostatic function in whole citrated ovine blood at different storage temperatures. Ovine blood was collected in commercial transfer bag system containing CPDA-1 and stored on a wobbler at room (20–25 °C; n=5) or refrigerator temperature (4 °C; n=5). The following analyses were performed initially and after 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 12, 24, 48 and 72 hours of storage: platelet count and (spontaneous) aggregates, agonist-induced platelet aggregation with two methods (impedance aggregometry, turbidimetric method), prothrombin time, activated partial thromboplastin time, thrombin time, fibrinogen concentration, and resonance thrombography.

Platelet count remained stable at room temperature, whereas a significant decrease was detected after 48 hour storage at 4 °C. The latter was associated with the formation of a high percentage of platelet aggregates (50–60 %) after 5 h storage. Decrease in platelet aggregation was significantly more pronounced when blood was stored at 4 °C. The plasmatic coagulation tests were stable within the observation period.

Results indicate that platelet count and aggregability of CPDA-1 stabilized ovine blood is better preserved at room temperature and provides adequate haemostatic function for ex vivo experiments for one working day. Functional loss and high percentage of platelets within aggregates which were observed in ovine blood stored at refrigerator temperature have to be considered in blood transfusion in sheep.



## IV Übergreifende Diskussion

---

### IV Übergreifende Diskussion

#### Reaktion auf die Agonisten Ristocetin, Arachidonsäure und TRAP-6

Das Multiplate-Vollblutimpedanzaggregometer, das mittlerweile neben dem Menschen auch bei Labortieren (Dobaczewski et al., 2008; Kirkeby et al., 2008) und dem Hund (Kalbantner et al., 2009) zur Anwendung kam, wurde in dem ersten Teil der Arbeit für die Messung von Schafblut evaluiert. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigen, dass Ristocetin, Arachidonsäure und humanes Thrombinrezeptor-aktivierendes Peptid (TRAP)-6, welche beim Menschen Thrombozytenaggregationen hervorrufen (Calatzis et al., 2007), für Thrombozyten des Schafs ungeeignete Agonisten zur Induktion einer Vollblut-Impedanz-Aggregation sind. Mit den untersuchten Konzentrationen von Ristocetin und Arachidonsäure lagen die Messsignale im Median  $< 5\%$  der mit Adenosindiphosphat (ADP) oder Kollagen herbeigeführten Signale. Dies steht teilweise im Kontrast zu zuvor veröffentlichten Studien mit Schafblut (Gentry et al., 1987; Spanos, 1993; Pelagalli et al., 2002), die auf der turbidimetrischen Methode nach Born beruhten. In der vorliegenden Arbeit kamen Agonistenkonzentrationen entsprechend den für menschliches Blut angegebenen Konzentrationen (Ristocetin: 0,2 mg/ml; Arachidonsäure: 0,5 mmol/l; TRAP: 32  $\mu$ mol/l) sowie mehrfach höher konzentrierte Agonisten bis 1 mg/ml Ristocetin und 2 mmol/l Arachidonsäure zum Einsatz. Dies entspricht etwa den in den genannten Studien eingesetzten Agonistenkonzentrationen. Der Grund für die Diskrepanz zwischen unseren Ergebnissen und denen der zitierten Studien bleibt unklar, könnte aber eine Folge unterschiedlicher Agonistenqualitäten verschiedener Hersteller sein.

## IV Übergreifende Diskussion

---

Die mangelhafte Reaktion auf humanen TRAP-6, die sich auch in einer aktuellen Publikation beim Hund zeigte (Kalbantner et al., 2009), spiegelt wahrscheinlich die speziesspezifischen Unterschiede von Thrombinrezeptoren wider. Die Variabilität der zellulären Ansprechbarkeit auf TRAP ist bereits für einige Spezies wie Kaninchen, Hund, Schwein, Ratte und Hamster beschrieben (Connolly et al., 1994).

### Evaluierung der optimalen Konzentrationen von ADP und Kollagen

Zur Ermittlung der optimalen Agonistenkonzentrationen von ADP und Kollagen kamen zu Beginn die Konzentrationen um die zur Untersuchung von humanem Blut angegebenen Konzentrationen (ADP: 6,4  $\mu\text{mol/l}$ ; Kollagen: 3,2  $\mu\text{g/ml}$ ) zum Einsatz. Dass man davon ausgehen kann, dass die Messempfindlichkeit, um Thrombozytenfunktionsstörungen aufzudecken, bei der Schwellenkonzentration am höchsten ist, d.h. der niedrigsten Agonistenkonzentration, die bei allen gesunden Tieren hohe Aggregationsmaxima induziert, wurde bereits in einer anderen Studie gezeigt (Mischke und Schulze, 2004). Daher wurden nur jene Agonistenkonzentrationen, die bei allen zehn untersuchten gesunden Schafen zu einer signifikanten Aggregation führten, für die folgenden Untersuchungen weiter eingesetzt und hohe Konzentrationen (wie z.B. ADP: 20  $\text{mmol/l}$ ; Kollagen: 20  $\mu\text{g/ml}$ ) wurden von weiteren Versuchen ausgeschlossen, da überraschenderweis diese Konzentrationen wieder niedrigere Area under the Curve (AUC)-Werte hervorbrachten. Eine mögliche Ursache für diese Tatsache könnte eine schon vor Erreichen der Elektroden stattfindende Aggregatbildung der Thrombozyten sein.

Basierend auf den Kriterien maximales Messsignal, minimale interindividuelle Varianz, höchste Präzision und Sicherheit der Messungen (d.h. niedrige Anzahl nötiger Wiederholungen) scheinen 4–5  $\mu\text{mol/l}$  ADP und 4–5  $\mu\text{g/ml}$  Kollagen die optimalen

## IV Übergreifende Diskussion

---

Konzentrationen zur Untersuchung der Thrombozytenaggregation von Schafblut mit dieser neuen Methode der Vollblut-Impedanz-Aggregometrie zu sein. Damit liegt die optimale Konzentration von ADP leicht unter der für menschliches Blut angegebenen Konzentration, die von Kollagen leicht darüber (Calatzis et al., 2007). Die Tatsache, dass gerade niedrige Konzentrationen eine hohe Streuung an Messergebnissen hervorbrachten, scheint darauf hinzuweisen, dass die Technik generell nicht zur Messung von individuell erhöhter Plättchenreaktivität geeignet ist.

In der Literatur ist lediglich eine andere Studie zu finden, die sich mit Vollblutaggregation beim Schaf befasst (Sato et al., 2002). Hier kam ein anderes Gerät zum Einsatz, es wurde spezies-unabhängig nur mit einer Agonistenkonzentration gemessen (ADP: 10  $\mu\text{mol/l}$ ; Kollagen: 1  $\mu\text{g/ml}$ ), die Messergebnisse wurden mit denen von humanem, caninem und bovinem Blut verglichen. Es zeigten sich hier Ergebnisse ähnlicher Höhe für ADP ( $23 \pm 10$  Ohm; Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung) und Kollagen ( $20 \pm 7,7$  Ohm). Auch eine andere vergleichende Studie mit Blut von Menschen, Hunden und Kälbern kam zu dem Ergebnis, dass ADP und Kollagen die Agonisten sind, die die zuverlässigsten Aggregationswerte liefern (Soloviev et al., 1999). Bei Aggregationsstudien mit Schafblut mit der Methode der Lichttransmission kamen eine Vielfalt von ADP- und Kollagenkonzentrationen zum Einsatz (Gentry et al., 1987; Spanos, 1993; Pelagalli et al., 2002). Die ähnliche Reaktivität humaner und oviner Thrombozyten auf ADP und Kollagen deutet an, dass das Schaf ein adäquates Modell zur Untersuchung der primären Hämostase des Menschen darstellt.

Die signifikante interindividuelle Streuung um annähernd den Faktor drei bis vier bei Schafen stimmt teilweise mit einer Studie überein, bei welcher die Untersuchung des Blutes verschiedener gesunder Menschen mit 5  $\mu\text{mol/l}$  ADP zu einer interindividuellen Streuung nahezu um den Faktor vier führte, bei Einsatz von 2,5  $\mu\text{g/ml}$  Kollagen jedoch lag die Streuung unter dem Zweifachen (Tóth et al., 2006). Diesbezüglich muss bedacht werden, dass

## IV Übergreifende Diskussion

---

bei der vorliegenden Arbeit verschiedene Schafrassen sowie unterschiedliche Altersklassen zum Einsatz kamen. Bereits eine frühere Studie hatte signifikante Unterschiede bei ADP-induzierten Thrombozytenaggregationswerten bei unterschiedlichen Hunderassen beschrieben (Nielsen et al., 2007). Die teilweise weite interindividuelle Streuung könnte also durch rassespezifische Unterschiede mitverursacht worden sein. Untersuchungen an Menschen und Labortieren deuten zudem einen signifikanten Einfluss von Alter und Geschlecht auf die Ergebnisse der Thrombozytenaggregation an (Gleerup and Winther, 1988; Okazaki et al., 1998). Dahingegen zeigte sich in einer Studie, in welcher das Blut von Braunbären mit Impedanzaggregometer untersucht wurde, kein Unterschied in der Aggregationsfähigkeit der Thrombozyten von Tieren verschiedenen Alters (1–16 Jahre alt) oder Geschlechts (Fröbert et al.; 2010). Es ist jedoch fraglich, ob die Erstellung spezieller Rasse- und altersabhängiger Referenzwerte in der Tiermedizin im Allgemeinen und insbesondere bei der Untersuchung von Schafblut mit vergleichsweise geringer klinischer Relevanz realistisch ist. Um das Ausmaß des Einflusses dieser Faktoren zu definieren, bedarf es weiterer Untersuchungen mit höheren Tierzahlen.

### Ermittlung des bevorzugten Probenmaterials

Die vorliegende Studie zeigt, dass mit Hirudin antikoaguliertes Schafblut zu höheren Messwerten führt als mit Citrat versetztes Blut, was mit den Resultaten einer Studie mit humanem Blut (Tóth et al., 2006) und ebenfalls einer Arbeit beim Hund (Kalbantner et al., 2009) übereinstimmt. Dass der Zusatz von Kalzium nur bedingten Einfluss auf diese Diskrepanzen zeigte, und dann auch nur, wenn Kollagen als Agonist eingesetzt wurde, deutet darauf hin, dass auch andere Faktoren als die Kalziumbindung an Zitrat hierbei eine Rolle spielen.

## IV Übergreifende Diskussion

---

### Untersuchung lagerungsbedingter Veränderungen

Ein erheblicher Faktor für die präanalytische Qualitätssicherung im Hämostaselabor ist die Kenntnis von der Lagerungsstabilität von Proben (Hess, 2010; Gulliksson und van der Meer, 2009; Ahmed et al., 2010), die darüber hinaus auch für experimentelle Anwendungen von Schafblut von erheblichem Interesse ist und im zweiten Teil dieser Arbeit untersucht wurde. Hierbei konnte gezeigt werden, dass insbesondere Veränderungen bezüglich der Thrombozytenzahl und deren Funktion während einer dreitägigen Lagerung von ovinem Blut in Citrat-Phosphat-Dextrose-Adenin (CPDA)-1-enthaltenden Blutbeuteln auftreten, und dies vorzugsweise bei Lagerung bei Kühlschranktemperatur (4 °C).

### Thrombozytenzahlveränderungen während der Vollblutlagerung

Der deutliche Abfall der automatisch gemessenen Thrombozytenzahl nach Lagerung bei Kühlschranktemperatur über mehrere Tage wurde bereits für canines (Nolte und Mischke, 1995) und humanes Blut (Lestin und Sander, 1975) nachgewiesen. Dies ist unter Umständen eine Folge der Bildung von Thrombozytenaggregaten, welche sowohl in caninem (Nolte und Mischke, 1995) als auch in der vorliegenden Untersuchung in ovinem Blut beobachtet wurden. Thrombozytenaggregate führen zu artifiziell niedrigen Thrombozytenzahlen (Stokol und Erb, 2007). Der von uns festgestellte prozentuale Anteil von in Aggregaten gebundenen Thrombozyten ab einer Lagerungszeit von fünf Stunden bei 4 °C (ca. 50–60 %) lag nur leicht über den Resultaten der Untersuchung von Hundeblood, bei welcher die Anzahl und die Größe der Aggregate bis zu einer Lagerungszeit von vier Stunden anstieg und sich dann relativ

## IV Übergreifende Diskussion

---

konstant auf einem Level von 40–50 % der Thrombozyten einpendelte (Nolte und Mischke, 1995). Auch die Tatsache, dass bereits zu Beginn der Lagerung ein kleiner Teil der Thrombozyten in Aggregaten vorlag (ca. 10 %), stimmte in beiden Studien überein.

Auch in einer anderen Studie wurde ein stärkerer Abfall der Thrombozytenzahl in Humanblut während der Lagerung bei 4 °C als während der Lagerung bei ca. 20 °C beobachtet (Freise et al., 2009). Hier wurde auf die Bildung von Aggregaten nicht eingegangen, es wurden aber unterschiedliche Antikoagulantien verglichen und gezeigt, dass die Thrombozytenzahl in EDTA-antikoaguliertem Blut deutlich weniger abnimmt als in mit Heparin versetztem Blut.

### Veränderungen der Aggregationsfähigkeit während der Lagerung

Die Abnahme der Thrombozytenfunktion, gemessen mit Hilfe der Thrombozytenaggregation, scheint nach den ersten acht bis 12 Stunden in der vorliegenden Untersuchung ausgeprägter zu sein als in anderen Studien (Nolte und Mischke, 1995; Choi und Pai, 2003; Tsuchiya et al., 2003), obwohl ein Taumelschüttler zum Einsatz kam, welcher die besten Voraussetzungen zum Erhalt der Thrombozytenfunktion schafft (Holme et al., 1978). Nach drei Tagen Lagerung bei Kühlschranktemperatur war bereits das nahezu vollständige Ausbleiben einer Aggregationsreaktion mit der Methode nach Born zu beobachten. Bei caninem Blut wurden mit der turbidimetrischen Methode Aggregationsmaxima in Höhe von im Mittel ca. 50 % des Ausgangswertes (abhängig vom Agonisten) erreicht; diese blieben zwischen dem ersten und dem 25. Lagerungstag relativ konstant (Nolte und Mischke, 1995). Abgesehen von speziesspezifischen Unterschieden könnte der weniger deutliche Abfall der turbidimetrischen Aggregation in der zitierten Hundestudie auch eine Folge der Tatsache sein, dass hier frisches Plasma zur Resuspension der Thrombozyten genutzt wurde (Brackett et al., 1976), was den Einfluss von Stoffwechselprodukten auf die Aggregation reduziert und zu einem für die

## IV Übergreifende Diskussion

---

Plättchenfunktion optimalen pH-Wert in der Suspension führt. Der korrigierende Effekt der Resuspension in Frischplasma wurde u.a. in einer Studie zur Lagerfähigkeit caniner Thrombozytenkonzentrate deutlich (Klein et al., 1999). Außerdem wurde in der Studie von Brackett et al. (1976) eine Einstellung einer Thrombozytenzahl von ca. 300.000/ $\mu$ l vorgenommen und damit die lagerungsbedingte Abnahme der Plättchenzahl ausgeglichen. Die Thrombozytenzahl beeinflusst die turbidimetrische Aggregationsanalyse, sowohl sehr niedrige als auch sehr hohe Thrombozytenkonzentrationen führen zu einer Abnahme der Aggregationskurve (Wilner et al., 1968).

In einer anderen Studie, in der CPDA-1-stabilisiertes Hundeblut 24 Stunden bei Raumtemperatur gelagert wurde, blieb die Kollagen-induzierte Vollblutaggregation nahezu konstant, während die ADP-induzierte Aggregation bereits nach acht Stunden signifikant nachließ (Tsuchiya et al., 2003). Der substantielle Verlust der Thrombozytenfunktion während der Lagerung bei Raumtemperatur scheint nach der Transfusion jedoch größtenteils reversibel zu sein. Dies wurde bereits in einer Studie beim Menschen beobachtet, in welcher Thrombozytenkonzentrate über 5 Tage bei 20–24°C auf einem Flachbettschüttler gelagert und danach transfundiert wurden (Rinder et al., 2003).

Die Tatsache, dass der Verlust an Aggregationsfähigkeit in gelagertem CPDA-1-stabilisiertem Vollblut bei Lagerung bei 4 °C erheblicher ist, kann mit der deutlicheren Zunahme der Anzahl von Thrombozytenaggregaten in Zusammenhang gebracht werden, welche das Messsignal bei Aggregationstests reduzieren. Aus Aggregaten freigewordene Thrombozyten haben ihre Aggregationsfähigkeit verloren (Bowry und Müller-Berghaus, 1986) und sind somit wertlos für Transfusionen. Die Plättchenzahl beeinflusst auch die Aggregationsantwort mit dem Multiplate Analyser. Es zeigte sich beim Menschen eine im Vergleich zu normalen Thrombozytenzahlen um 18,4 % geringere Aggregationsantwort bei einer Thrombozytenzahl von weniger als 100.000/ $\mu$ l und bei weniger als 50.000/ $\mu$ l Thrombozyten sogar eine

## IV Übergreifende Diskussion

---

Reduktion um 37,2 %. Allerdings wurde in dieser Studie auch eine hohe interindividuelle Diskrepanz deutlich, es gab auch der Norm entsprechende Aggregationsantworten bei Thrombozytenzahlen von weniger als 50.000/ $\mu$ l (Hanke et al., 2010).

Des Weiteren kommt es bei 4 °C zu ausgeprägteren Strukturveränderungen der Thrombozyten. Die Thrombozyten verlieren mit zunehmender Lagerungsdauer und abnehmender Lagerungstemperatur (unter 20 °C) allmählich ihre discoide Form (Holme et al., 1997). Außerdem wurden zunehmende Membranvesikulation und der Verlust von Glykoprotein Ib bei 4 °C beobachtet (Bode und Knupp, 1994). Zudem wurde beobachtet, dass die Lipiddoppelschicht der Thrombozyten unter 18 °C eine Umwandlung erfährt, die eine Aggregation von Oberflächenglykoproteinen ermöglicht (Rumjantseva und Hoffmeister, 2010). Die morphologischen Veränderungen sind unter Umständen auch dafür verantwortlich, dass menschliche Thrombozyten, die bei niedrigen Temperaturen gelagert wurden, eine geringere posttransfusionale Verfügbarkeit aufweisen (Becker et al., 1973; Moroff und Holme, 1991).

Biochemische und morphologische Veränderungen in gelagerten Schafthrombozyten sind detailliert beschrieben worden, einschließlich der Lipid-Peroxidation der Membran, der Abschnürung von Mikropartikeln und Veränderungen des Tyrosin-Phosphorylierungs-Gleichgewichts (Martin-Valmaseda et al., 1998, 1999; Hernández-Hernández et al., 2001). Martin-Valmaseda et al. (1998) zeigten in ihrer Studie u.a. den linearen Anstieg der Mikropartikelbildung innerhalb der ersten 2 Lagerungstage unabhängig vom Lagerungsmedium, wobei die in Seto-Lösung entstandenen Mikropartikel ein höheres Lipid-Protein-Verhältnis hatten als die in Plasma entstandenen. Hernández-Hernández et al. (2001) beobachteten in ihrer Studie bereits ab dem ersten Lagerungstag unabhängig vom Lagerungsmedium eine fortschreitende Abnahme der Phosphotyrosin-Phosphatase-Aktivität der Thrombozyten, begleitet von einer vermehrten Phosphorylierung der



## IV Übergreifende Diskussion

---

Thrombozytenmembranproteine Vor allem Letzteres scheint laut der Autoren einer der Gründe für den Funktionsverlust gelagerter Thrombozyten zu sein. Alle diese Studien wurden nur bei einer Lagerungstemperatur von 4 °C durchgeführt, um Lagerungsmedien mit der Lagerung von Plasma zu vergleichen.

Interessanterweise zeigte eine Untersuchung von gelagertem Menschenblut gegensätzliche Ergebnisse zu denen dieser Studie. Hierbei wurden humane Thrombozyten aus Blut, das 48 Stunden bei Raumtemperatur oder 4 °C gelagert worden war, auf ihre Aggregationsantwort untersucht. Nach Lagerung bei Raumtemperatur zeigten sich niedrigere maximale Aggregationswerte auf Epinephrin, ADP, Kollagen und Ristocetin als nach Lagerung bei Kühlschranktemperatur (Choi und Pai, 2003). Die Autoren erklären die Diskrepanz von anderen Studien mit Humanthrombozyten mit Unterschieden bei den Lagerungsbedingungen, denn sie stellten das Plättchen reiche Plasma (PRP) aus dem gelagerten Vollblut direkt vor der Durchführung der Aggregationstests her. Dieser Aspekt kann jedoch die Abweichung zu den Ergebnissen der vorliegenden Studie nicht erklären, denn auch hier wurden die PRP-Proben direkt vor der Testdurchführungen aus dem gelagerten Vollblut hergestellt. Eine mögliche Erklärung für die Diskrepanz könnte allerdings die Tatsache sein, dass Choi und Pai (2003) ihre Studie mit (ungepuffertem) Citrat-antikoagulierte Blut durchführten, während in der vorliegenden Studie CPDA-1-sabilidiertes Blut zum Einsatz kam, in welchem der Zusatz von Phosphat eine signifikante Pufferkapazität gewährleistet. Eine Folge des höheren Erythrozytenstoffwechsels während einer Lagerung bei Raumtemperatur ist, dass es in ungepuffertem Citratblut nach 48 Stunden zu einem signifikant stärkeren Abfall des pH-Wertes (auf 6,81) kommt als während einer Lagerung bei 4 °C (auf 7,04). Niedrige pH-Werte werden assoziiert mit einer deutlich gestörten Thrombozyten-Aggregation (Green et al., 1978; Marumo et al., 2001). Der pH-Wert wurde in der vorliegenden Studie nicht gemessen, doch der Einsatz eines Stabilisators mit Puffersubstanzen macht weniger deutliche pH-Wert-

## IV Übergreifende Diskussion

---

Veränderungen wahrscheinlich. Der Einfluss des pH-Wertes und eventuell auch die Ansammlung von Stoffwechselprodukten erklären auch, warum die Aggregationsfähigkeit caniner Thrombozytenkonzentrate in Polyvinylchlorid-Lagerungsbeuteln mit hoher Gasdiffusionskapazität und somit möglichem aeroben Katabolismus bei Lagerung bei 4 °C besser erhalten bleibt als bei Lagerung bei 22 °C (Klein et al., 1999). Außerdem könnten speziesspezifische Unterschiede eine Rolle spielen. Choi und Pai (2003) beobachteten in ihren Humanproben, dass v.a. die zweite Welle der ADP-induzierten Aggregation, ausgelöst durch eine endogene ADP-Freisetzung, während 24-stündiger Lagerung bei Raumtemperatur verloren geht. Im Gegensatz zu humanen Thrombozyten, die typischerweise einer biphasischen Aggregation unterliegen, zeigen Schaf- und Hunde-Thrombozyten normalerweise eine monophasische primäre Antwort auf ADP (Spanos, 1993).

### Untersuchung der plasmatischen Gerinnung während der Lagerung, RTG

Im Hinblick auf die plasmatische Gerinnung konnten während der Lagerungsdauer von 72 Stunden nur geringfügige Veränderungen beobachtet werden. Einzelne Gerinnungsfaktoren wurden in der vorliegenden Studie nicht gemessen, aber Studien mit in Blutbeuteln gelagerten humanen und caninen Blutproben zeigten, dass Faktor V und VIII:C des Menschen und des Hundes eine geringe Lagerungsstabilität aufweisen (Hondow et al., 1982; Nolte et al., 1988). Basierend auf den Ergebnissen der vorliegenden Studie scheint die Blutgerinnung von Schafblut im Gegensatz zu humanem oder caninem Blut vergleichsweise stabil zu sein. In CPDA-1-stabilisiertem Blut von Hunden stiegen die Mittelwerte der Prothrombinzeit (PT) innerhalb der ersten 24 Stunden Lagerung bei Kühlschranktemperatur um ca. 10 % und die der aktivierten partiellen Thromboplastinzeit (aPTT) um ca. 15 % an (Nolte et al., 1988); danach traten nur noch geringfügige Veränderungen auf. Zudem wurden signifikante

## IV Übergreifende Diskussion

---

Veränderungen der Routinegerinnungstests (v.a. aPTT) innerhalb der ersten 24 Lagerungsstunden in Studien beschrieben, die die Stabilität von Citrat-antikoaguliertem Blut des Menschen ungeachtet der Lagerungstemperatur untersuchten (Adcock et al., 1998; Salvagno et al., 2009). Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen, dass ovines Blut für diagnostische Zwecke der Blutgerinnung, z.B. Routinegerinnungstests, bei Raumtemperatur aufbewahrt werden kann.

Die Tatsache, dass in erster Linie die Thrombozyten bei der Kurzzeitlagerung von Schafblut beeinträchtigt wurden, zeigte sich auch in den Ergebnissen des Resonanzthrombogramms (RTG), wo sich vor allem der Parameter RTG-p (Zeit des Abfalls des Fibrinschenkels) veränderte, welcher vorwiegend Thrombozyten-assoziiert ist. Unterstützt wird diese Beobachtung von der Tatsache, dass auch die RTG-r im Laufe des Lagerungszeitraums abnahm.

### Vergleich zwischen CPDA1- und Citrat-antikoaguliertem Blut

Des Weiteren zeigten die Ergebnisse dieser Studie, dass die Thrombozytenfunktion von CPDA-1-stabilisiertem Blut vergleichbar ist mit der von Citrat-antikoaguliertem Blut. Die leicht niedrigeren Thrombozytenaggregations-Maxima in CPDA1-stabilisiertem Blut können eine Folge der Aktivierung während der verlängerten und potentiell mehr Stress verursachenden Blutentnahme bis zur Füllung des kompletten Blutbeutels sein. Letzteres könnte auch die verkürzte aPTT erklären. Im Gegensatz dazu wurde die geringfügig höhere Verdünnung durch das Antikoagulanzen CPDA-1 nicht durch eine signifikant geringere Thrombozytenzahl widerspiegelt.

## IV Übergreifende Diskussion

---

### Zusammenfassung

Zusammenfassend erwies sich das untersuchte Vollblut-Impedanz-Aggregometer unter Einsatz der optimierten Agonistenkonzentrationen (ADP: 4–5 mmol/l; Kollagen: 4–5 mg/ml) zur Untersuchung von Schafblut geeignet. Hirudin-antikoaguliertes Vollblut ist das zu bevorzugende Untersuchungsmaterial. Allerdings sind weitere Studien unter Einbeziehung von Patienten mit definierten Thrombopathien nötig, um die Sensivität der Methode zur Aufdeckung reduzierter Thrombozytenfunktion zu überprüfen. Gegebenenfalls sind basierend auf größeren Tierzahlen rasse-, geschlechts- oder altersspezifische Referenzwerte zur Erhöhung der Sensivität zu definieren.

Im zweiten Teil dieser Studie zeigten sich als wichtigste Veränderungen im gelagerten Schafblut der Funktionsverlust und der hohe Anteil zu Aggregaten zusammengelagerter Thrombozyten bei Kühlschranklagerung. Dies muss bei der Bluttransfusion bei Schafen beachtet werden, da Blutkonserven mit Rücksicht auf den Erhalt der Funktionalität von Erythrozyten bei Kühlschranktemperatur gelagert werden. Ist jedoch die kurzzeitige Erhaltung der Hämostase und der Thrombozytenfunktion das primäre Ziel bei der Lagerung, z.B. für ex vivo-Experimente und für den Probenversand zu diagnostischen Zwecken, sollte Raumtemperatur die bevorzugte Lagerungstemperatur sein, wo sich nicht nur die plasmatische Gerinnungsdiagnostik erstaunlich stabil zeigte, sondern u.a. auch die Vollblutplättcheaggregation zumindest mit der Impedanzmethode für mindestens einen Arbeitstag recht stabile Ergebnisse produzierte.

## V Zusammenfassung

---

## V Zusammenfassung

Andrea Baumgarten (2011)

### **Thrombozytenfunktionsmessung im Schafblut: Optimierung der Aggregationsmessung im Multiplate Analyser und Einfluss der Probenlagerung**

Die Untersuchung der Hämostase von Schafen ist vornehmlich vor dem Hintergrund ihrer Rolle als Studienmodelltier, z.B. für allgemeine, cardiovaskuläre und traumatische Chirurgiestudien sowie Sepsis- und Schock-Modelle, von großer Wichtigkeit. Thrombozyten-Aggregometrie ist eine der wichtigsten in vitro-Standard-Techniken zur Untersuchung der Thrombozytenfunktion.

Das Ziel des ersten Teils der vorliegenden Studie war es, herauszufinden, ob das neue Vollblut-Impedanz-Aggregometer (Multiplate™ 5.0 Analyzer, Dynabite) eine geeignete Methode zur Untersuchung der Thrombozytenaggregation von Schafblut darstellt, optimale Agonistenkonzentrationen zu ermitteln und entsprechende Referenzwerte für Blut von Schafen zu evaluieren.

Im ersten Schritt der Untersuchungen wurden unterschiedliche Agonisten (Adenoindiphosphat [ADP], Kollagen, Thrombinrezeptor-aktivierendes Peptid [TRAP-6], Ristocetin und Arachidonsäure) in verschiedenen Konzentrationen bei Hirudin-antikoaguliertem Blut von sechs (TRAP, Ristocetin und Arachidonsäure) bzw. zehn (ADP und Kollagen) gesunden Schafen eingesetzt, um die optimalen Agonistenkonzentrationen zu evaluieren. Es kamen die folgenden Konzentrationen zum Einsatz:

- ADP: 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 4, 5, 10 und 20 µmol/l;

## V Zusammenfassung

---

- Kollagen: 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 4, 5, 10 und 20 µg/ml;
- TRAP-6: 32 und 160 µmol/l;
- Ristocetin: 0,2 und 1 mg/ml und
- Arachidonsäure: 0,25, 0,5, 1 und 2 mmol/l.

Dabei stellten sich TRAP-6, Ristocetin und Arachidonsäure als ungeeignete Agonisten für die Vollblut-Impedanz-Aggregometrie von Schafblut heraus (Messsignale im Median <5 % der nach Induktion mit ADP oder Kollagen erreichten Medianwerte).

Basierend auf den Ergebnissen der mit ADP und Kollagen durchgeführten Messungen wurde das Blut weiterer 30 Schafe mit ausgewählten Konzentrationen dieser beiden Agonisten fortgesetzt (ADP: 3, 4, 5 und 10 µmol/l; Kollagen: 3, 4 und 5 µg/ml). Selektionskriterien für Agonistenkonzentrationen waren maximales Messsignal bei möglichst geringer Agonistenkonzentration, minimale interindividuelle Varianz und höchste Präzision beruhend auf der internen Doppelmessung. Allerdings mussten 20 % der Messungen, bei denen ADP als Agonist eingesetzt wurde, wiederholt werden. Referenzbereiche basierend auf insgesamt 40 gesunden Schafen zeigten eine deutliche Streuung der Messwerte.

Bei zehn Schafen (n=10) wurde neben Hirudin-antikoaguliertem Blut zum Vergleich auch Blut mit Citrat als Antikoagulans (mit und ohne Rekalzifizierung) unter Einsatz verschiedener Konzentrationen von ADP und Kollagen untersucht. Hierbei zeigten sich deutlich höhere Messsignale im Hirudin-antikoagulierten Blut.

Kenntnisse zu Veränderungen der Hämostase in gelagertem Schafblut sind sowohl vor dem Hintergrund der Nutzung zu diagnostischen und therapeutischen Zwecken als auch zum Einsatz in ex vivo-Modellen, z.B. Thrombogenizitätsuntersuchungen, von Bedeutung.

Daher wurde im zweiten Teil der Studie untersucht, welchen Einfluss eine dreitägige Lagerung von Schafvollblut auf die Thrombozytenfunktion hat und ob die Lagerungstemperatur dabei von Bedeutung ist.

## V Zusammenfassung

---

Vollblut von zehn gesunden Schafen wurde in Citrat-Phosphat-Dextrose-Adenosin (CPDA)-1-stabilisierten Transfusionsbeuteln auf einem Taumelschüttler gelagert, fünf Konserven bei Raumtemperatur (20–25 °C) und fünf bei Kühlschranktemperatur (4 °C). Jeweils unmittelbar nach Blutnahme und nach einer Lagerungsdauer von 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 12, 24, 48 und 72 Stunden wurde die Thrombozytenzahl automatisch und visuell ermittelt sowie die Anzahl und Größe von Thrombozytenaggregaten visuell erfasst. Außerdem wurde die Thrombozytenfunktion untersucht mittels Vollblut-Impedanz-Aggregometrie (mit Hilfe von 5 und 10 µmol/l ADP sowie 5 µg/ml Kollagen) sowie mittels der turbidimetrischen Methode nach Born (unter Einsatz von 10 und 20 µmol/l ADP sowie 5 und 10 µg/ml Kollagen). Des Weiteren wurde ein Resonanzthrombogramm (RTG) geschrieben und die plasmatische Gerinnung durch Messung von Prothrombinzeit, aktivierter partieller Thromboplastinzeit, Thrombinzeit und Fibrinogenkonzentration mit der Methode nach Jacobssen überprüft. Jeweils am Tag vor der Blutentnahme in den Transferbeutel wurde von jedem Tier eine Citrat-antikoagulierte Blutprobe gewonnen und hiermit alle genannten Untersuchungen zur Erlangung von Vergleichswerten durchgeführt.

Die Thrombozytenzahl fiel nach 24 Stunden Lagerung bei 4 °C signifikant ab, wohingegen die Thrombozytenzahl während der Lagerung bei Raumtemperatur im Untersuchungszeitraum stabil blieb. Bereits direkt nach der Blutentnahme ließ sich in den Blutbeuteln ein niedriger Prozentsatz von in Aggregaten vorliegenden Thrombozyten finden. Schon nach fünf Stunden Lagerung bei Kühlschranktemperatur war dieser Anteil auf ca. 50–60 % angestiegen, wohingegen während der gesamten Lagerungsdauer von 72 Stunden bei Raumtemperatur höchstens 20–30 % der Thrombozyten Aggregate bildeten. Des Weiteren bestanden die Aggregate im bei 4 °C gelagerten Blut aus einer höheren Anzahl Thrombozyten.

## V Zusammenfassung

---

Eine Abnahme der mittels Impedanzaggregometrie gemessenen Aggregationsfähigkeit konnte lediglich in bei 4 °C gelagertem Blut (nach 4 Stunden mit Kollagen, nach 24 Stunden mit ADP) festgestellt werden. Auch bei den Messungen mit der turbidimetrischen Methode verminderten sich die maximalen Aggregationswerte in bei 4 °C gelagerten Proben agonistenabhängig nach 5–24 Stunden signifikant. Wurde das Blut hingegen bei Raumtemperatur gelagert, nahmen die maximalen Aggregationswerte frühestens nach 24 Lagerungsstunden ab.

Bei keiner Lagerungstemperatur war bei den Parametern der plasmatischen Gerinnung eine signifikante Veränderung im Vergleich zu den Initialwerten festzustellen. Abgesehen von einer signifikanten RTG-r-Verkürzung zu einzelnen Zeitpunkten während der Lagerung bei Raumtemperatur und einer RTG-p-Verlängerung zum Ende der Lagerungsdauer bei 4 °C zeigte das RTG keine lagerungsbedingten Veränderungen.

Zusammenfassend lässt sich basierend auf den Untersuchungsergebnissen des ersten Teils sagen, dass die untersuchte Methode der Vollblut-Impedanz-Aggregometrie mit den Agonisten ADP und Kollagen in den optimalen Konzentrationen (ADP: 4–5 µmol/l; Kollagen: 4–5 µg/ml) geeignet ist, um Schafthrombozyten im Hirudin-antikoagulierten Blut zu untersuchen. Im zweiten Teil zeigte sich als wichtigste lagerungsbedingte Veränderung der Funktionsverlust und der hohe Anteil an zu Aggregaten zusammengelagerter Thrombozyten in bei 4 °C gelagertem Schafblut. Dies muss bei der Bluttransfusion bei Schafen beachtet werden, da Blutkonserven mit Rücksicht auf den Erhalt der Funktionalität von Erythrozyten bei Kühlschranktemperatur gelagert werden. Ist jedoch die kurzzeitige Erhaltung der Hämostase und der Thrombozytenfunktion das primäre Ziel bei der Lagerung, z.B. für ex vivo-Experimente, sollte Raumtemperatur die bevorzugte Lagerungstemperatur sein, um ein relativ stabiles Arbeitsmaterial für einen Arbeitstag zu haben.



## VI Summary

---

### VI Summary

Andrea Baumgarten (2011)

#### **Measurement of platelet functions in ovine blood: Optimisation of aggregation measurements with the Multiplate Analyser and influence of sample storage**

The examination of haemostasis in sheep is primarily important considering their role in various experimental models including general surgical, trauma surgical, cardiovascular surgical and sepsis or other shock studies. Platelet aggregometry is one of the main in vitro standard techniques for the evaluation of platelet functions.

The intention of the first part of the present study was to examine whether the new whole blood impedance aggregometer (Multiplate™ 5.0 Analyzer, Dynabyte) is a valuable tool to examine platelet aggregation in sheep, to optimise agonist concentrations and to determine reference values for ovine blood.

In the first experiment, different concentrations of several agonists (adenosine diphosphate [ADP], collagen, thrombinrezeptor-activating peptid [TRAP-6], ristocetin and arachidonic acid) were added to hirudin-anticoagulated blood of six (TRAP, ristocetin, arachidonic acid) or ten (ADP and collagen) healthy sheep to optimize the agonist concentrations. The following concentrations have been used:

- ADP: 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 4, 5, 10 and 20  $\mu\text{mol/l}$ ;
- collagen: 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 4, 5, 10 and 20  $\mu\text{g/ml}$ ;
- TRAP-6: 32 and 160  $\mu\text{mol/l}$ ;
- ristocetin: 0.2 and 1  $\text{mg/ml}$ ;
- arachidonic acid: 0.25, 0.5, 1 and 2  $\text{mmol/l}$ .

## VI Summary

---

TRAP-6, ristocetin, and arachidonic acid are unsuitable agonists for induction of whole blood impedance aggregation in ovine platelets (median measurement signals < 5 % of the median measurement signals achieved with ADP or collagen).

Based on the results of the examinations using ADP and collagen as agonists, further measurements were performed on 30 sheep with selected agonist concentrations (ADP: 3, 4, 5 and 10  $\mu\text{mol/l}$ ; collagen: 3, 4 and 5  $\mu\text{g/ml}$ ). The lowest agonist concentration leading to the maximum aggregation measurement signal, minimal inter-individual variation and the highest precision based on the internal measurements in duplicate were used as selection criteria. However, 20 % of the measurements with ADP had to be repeated. Reference values based on the total number of 40 healthy sheep revealed a wide variation of measurement values.

In ten healthy sheep (n=10), hirudin-anticoagulated blood and in comparison citrate-anticoagulated blood (with and without the addition of calcium chloride) were measured using different concentrations of ADP and collagen. Hirudin-anticoagulated blood generated significantly higher measurement signals.

Knowledge of changes of the haemostatic function in stored ovine blood are important with respect to diagnostic and therapeutic aspects as well the use of ovine blood in ex vivo models, e.g. for tests of thrombogenicity.

The aim of the second part of this study was to investigate how storage of whole ovine blood for three days influences platelet function and whether the storage temperature affects the results.

Whole blood of ten healthy sheep was stored in citrate-phosphate-dextrose-adenosine (CPDA)-1-stabilized transfer bag system on a wobbler, five blood bags at room temperature (20-25°C) and five blood bags at refrigerator temperature (4°C). Immediately after blood withdrawal and after 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 12, 24, 48 and 72 hours of storage the platelets were counted automatically as well as visually. The number and size of platelet aggregates were

## VI Summary

---

counted visually. Additionally, the platelet function was examined by impedance aggregometry (using 5 and 10  $\mu\text{mol/l}$  ADP as well as 5  $\mu\text{g/ml}$  collagen) as well as by turbidimetric aggregometry (using 10 and 20  $\mu\text{mol/l}$  ADP as well as 5 and 10  $\mu\text{g/ml}$  collagen). Furthermore, a resonance thrombogram (RTG) was prepared and different parameters of the plasmatic coagulation were measured: the prothrombin time, activated partial thromboplastin time, thrombin time, and the fibrinogen concentration using the Jacobssen method. On each day before taking the blood for the storage experiments citrate-anticoagulated blood was taken from the equal sheep and the same measurements were carried out to get comparison values.

After storage for 24 hours at 4°C the platelet count decreased significantly, whereas it remained stable at room temperature. A low percentage of platelet aggregates was present immediately after the withdrawal of the blood sample into the transfer bag. After five hours of storage at 4°C approx. 50–60 % of the platelets were within aggregates, whereas only approx. 20–30 % of the platelets formed aggregates in blood which was stored at 20–25°C for up to 72 hours. In addition, platelet aggregates were larger, i.e. consisted of more platelets, when storage was performed at 4 °C.

A decrease of aggregability measured with impedance aggregometry was only seen in blood stored at 4 °C (after 4 hours with collagen, after 24 hours with ADP). Maximum turbidimetric aggregation values of the blood stored at 4°C decreased significantly after 5 to 24 hours, dependent on agonist and agonist concentration. In contrast, maximum turbidimetric aggregation did not decrease before a storage time of 24 hours, if blood bags were stored at room temperature.

There was no significant change of any of the investigated parameters of the plasmatic coagulation when compared to initial values. A significant shortening of RTG-r at individual times in blood which was stored at room temperature and a prolongation of RTG-p at the end

## VI Summary

---

of the observation period in blood stored at 4°C were the only obvious storage-induced changes of the RTG.

In conclusion, based on the results of the first part of this study the investigated method of whole blood impedance aggregometry is well appropriate for the examination of ovine platelets in hirudin-anticoagulated blood using the agonists ADP and collagen in the optimal concentrations (ADP: 4–5  $\mu\text{mol/l}$ ; collagen : 4–5  $\mu\text{g/ml}$ ). In the second part of the study, the most relevant storage-induced change was the functional loss and high percentage of platelets within aggregates in ovine blood stored at refrigerator temperature. This fact has to be taken into account when blood transfusion in sheep is performed, because blood bags are stored at refrigerator temperature to maintain quality of red blood cells. However, when the short-term preservation of haemostasis and platelet function is the primary aim, e.g. for *ex vivo* experiments, room temperature is the preferred storage temperature providing a relatively stable material for one working day.

## VII Literaturverzeichnis

---

### VII Literaturverzeichnis

**Adcock, D., Kressin, D., Marlar, R.A.** The effect of time and temperature variables on routine coagulation tests. *Blood Coag. Fibrinol.* 1998; 9, 463-470.

**Ahmed, A.S., Leheta, O., Younes, S.** In vitro assessment of platelet storage lesion in leucoreduced random donor platelet concentrates. *Blood Transfus.* 2010; 8, 28-35.

**Baumgarten, A., Wilhelmi, M., Kalbantner, K., Ganter, M., Mischke, R.** Measurements of platelet aggregation in ovine blood using a new impedance aggregometer. *Vet. Clin. Pathol.* 2010; 39, 149-156.

**Becker, G.A., Tuccelli, M., Kunicki, T., Chalos, M.K., Aster, R.H.** Studies on platelet concentrates stored at 22 °C and 4 °C. *Transfus.* 1973; 13, 61-68.

**Bode, A.P., Knupp, C.L.** Effect of cold storage on platelet glycoprotein Ib and vesiculation. *Transfus.* 1994; 34, 690-696.

**Born, G.V.R.** Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature.* 1962; 194, 927-929.

**Bowry, S.K., Müller-Berghaus, G.** Aggregation of washed platelets from non-anticoagulated human blood is not reversible. *Thromb. Haemost.* 1986; 56, 172-177.

**Brackett, D.J., Schaefer, C.F., Gunn, C.G.** Influence of time, temperature and platelet concentration on dog platelet aggregation. *Thromb. Res.* 1976; 8, 441-451.

**Calatzis, A., Loreth, R., Spannagl, M.** Multiplate<sup>®</sup> platelet function analysis – Application and interpretation. 2007. (instruction manual provided by the manufacturer).

**Choi, J.W., Pai, S.H.** Influence of storage temperature on the responsiveness of human platelets to agonists. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 2003; 33, 79-85.

## VII Literaturverzeichnis

---

**Connolly, T.M., Condra, C., Feng, D.M., Cook, J.J., Stranieri, M.T., Reilly, C.F., Nutt, R.F., Gould, R.J.** Species variability in platelet and other cellular responsiveness to thrombin receptor-derived peptides. *Thromb. Haemost.* 1994; 72, 627-633.

**Dobaczewski, M., Golański, J., Kowalski, T., Nocuń, M., Różalski, M., Kostka, B., Ulicna, O., Mussur, M., Markuszewski, L., Watała, C.** Can we use adenosine diphosphate (ADP) to study "aspirin resistance"? The Janus faces of ADP-triggered platelet aggregation. *Pharmacol Rep.* 2008; 60, 361-368.

**Dyszkiewicz-Korpanty, A.M., Frenkel, E.P., Sarode, R.** Approach to the assessment of platelet function: Comparison between optical-based platelet-rich plasma and impedance-based whole blood platelet aggregation methods. *Clin. Appl. Thromb. Hemost.* 2005; 11, 25-35.

**Freise, K.J., Schmidt, R.L., Gingerich, E.L., Veng-Pedersen, P., Widness, J.A.** The effect of anticoagulant, storage temperature and dilution on cord blood hematology parameters over time. *Int. J. Lab. Hematol.* 2009; 31, 496-504.

**Fröbert, O., Christensen, K., Fahlman, A., Brunberg, S., Josefsson, J., Särndahl, E., Swenson, J.E., Arnemo, J.M.** Platelet function in brown bear (*Ursus arctos*) compared to man. *Thromb. J.* 2010; 8, 11.

**Gentry, P.A., Socha, A.S., Ross, M.L.** Ovine platelet function and its inhibition by T-2 toxin. *Vet. Res. Commun.* 1987; 11, 457-466.

**Gleerup, G., Winther, K.** The effect of ageing on human platelet sensitivity to serotonin. *Europ. J. Clin. Invest.* 1988; 18, 504-506.

**Green, F.W., Jr., Kaplan, M.M., Curtis, L.E., Levine, P.H.** Effect of acid and pepsin on blood coagulation and platelet aggregation. A possible contributor to prolonged gastroduodenal mucosal hemorrhage. *Gastroenterol.* 1978; 74, 38-43.

## VII Literaturverzeichnis

---

- Gulliksson, H., van der Meer, P.F.** Storage of whole blood overnight in different blood bags preceding preparation of blood components: in vitro effects on red blood cells. *Blood Transfus.* 2009; 7, 210-215.
- Hanke, A.A., Roberg, K., Monaca, E., Sellmann, T., Weber, C.F., Rahe-Meyer, N., Görlinger, K.** Impact of platelet count on results obtained from multiple electrode platelet aggregometry (Multiplate). *Eur. J. Med. Res.* 2010; 15, 214-219.
- Hernández- Hernández, A., Sánchez-Bernal, C., Rodríguez, M.C., Gómez, F.P., Llanillo, M., Sánchez-Yagüe, J.** Loss of phosphotyrosine phosphatase activity and changes in the tyrosine phosphorylation state of proteins after storage of sheep platelets in plasma or Seto solution at 4 °C. *Vox. Sang.* 2001; 81, 241-247.
- Hess, J.R.** Conventional blood banking and blood component storage regulation: opportunities for improvement. *Blood Transfus.* 2010; 8, 9-15.
- Hildebrand, F., Giannoudis, P., van Griensven, M.** Secondary effects of femoral instrumentation on pulmonary physiology in a standardised sheep model: what is the effect of lung contusion and reaming? *Injury.* 2005; 36, 544-545.
- Holme, S., Sawyer, S., Heaton, A., Sweeney, J.D.** Studies on platelets exposed to or stored at temperatures below 20 degrees C or above 24 degrees C. *Transfus.* 1997; 37, 5-11.
- Hondow, J.A., Russell, W.J., Duncan, B.M., Lloyd, J.V.** The stability of coagulation factors in stored blood. *Aust. N. Z. J. Surg.* 1982; 52, 265-269.
- Hong, Yi, Ye, S.-H., Nieponice, A., Soletti, L., Vorp, D.A., Wagner, W.R.** A small diameter, fibrous vascular conduit generated from a poly(ester urethane)urea and phospholipid polymer blend. *Biomater.* 2009; 30, 2457-2467.
- Kalbantner, K., Baumgarten, A., Mischke, R.** Measurement of platelet function in dogs using a new impedance aggregometer – Optimisation of agonist concentration and reference values. *Vet. J.* 2010; 185, 144-151.

## VII Literaturverzeichnis

---

**Kirkeby, A., Torup, L., Bochsén, L., Kjalke, M., Abel, K., Theilgaard-Monch, K., Johansson, P.I., Bjørn, S.E., Gerwien, J., Leist, M.** High-dose erythropoietin alters platelet reactivity and bleeding time in rodents in contrast to the neuroprotective variant carbamyl-erythropoietin (CEPO). *Thromb. Haemost.* 2008; 99, 720-728.

**Klein, A., Adamik, A., Mischke, R.** Changes in platelet concentrates from dogs due to storage. I. Platelet count and in vitro function. *Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr.* 1999; 112, 243-253 (in German).

**Krebs, J., Aebli, N., Goss, B.G.** Cardiovascular changes after pulmonary embolism from injecting calcium phosphate cement. *J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater.* 2007; 82, 526-532.

**Lestin, H.G., Sander, W.** The effect of stabilizer composition on thrombocytes and thrombocyte function in stored whole blood. I. The thrombocyte count, thrombocyte aggregation and retraction during storage. *Folia. Haematol.* 1975; 102, 700-716 (in German).

**Manco-Johnson, M.J., Jacobson, L.J., Hacker, M.R., Townsend, S.F., Murphy, J., Hay, W. Jr.** Development of coagulation regulatory proteins in the fetal and neonatal lamb. *Pediatr. Res.* 2002; 52, 580-588.

**Martin-Valmaseda, E.M., Sánchez-Yagüe, J., Hernández- Hernández, A., Llanillo, M.** Vesiculation and changes in fluidity and lipid composition of platelet membranes after storage of sheep platelets in plasma or Seto solution. *Thromb. Haemost.* 1998; 80, 668-676.

**Martin-Valmaseda, E.M., Sánchez-Yagüe, J., Rodríguez, M.C., Gómez, F.P., Llanillo, M.** Comparison between in vitro liquid peroxidation in fresh sheep platelets and peroxidative processes during sheep platelet ageing under storage at 4°C. *Biochem. Biophys Acta.* 1999; 1419, 1218-1230.



## VII Literaturverzeichnis

---

- Marumo, M., Suehiro, A., Kakishita, E., Groschner, K., Wakabayashi, I.** Extracellular pH affects platelet aggregation associated with modulation of store-operated Ca<sup>2+</sup> entry. *Thromb. Res.* 2001; 104, 353-360.
- McEvoy, F.J., Webbon, P.M., Gaffney, P.J.** An experimental clot model in sheep; generation of a heterologous clot and its detection in vivo using venography and (125)I labelled fibrinogen. *Res. Vet. Sci.* 2002; 72, 217-221.
- Mischke, R., Schulze, U.** Studies on platelet aggregation using the Born method in normal and uraemic dogs. *Vet. J.* 2004; 168, 270-275.
- Moroff, G., Holme, S.** Concepts about current conditions for the preparation and storage of platelets. *Transfus. Med. Rev.* 1991; 5, 48-59.
- Nielsen, L.A., Zois, N.E., Pedersen, H.D., Olsen, L.H., Tarnow, I.** Platelet function in dogs: breed differences and effect of acetylsalicylic acid administration. *Vet. Clin. Pathol.* 2007; 36, 267-273.
- Nolte, I., Mischke, R.** Investigations of platelet aggregation and platelet counts from stored canine whole blood. *Res. Vet. Sci.* 1995; 58, 190-192.
- Nolte, I., Niemann, C., Müller-Berghaus, G.** The conservation of whole blood of dogs for transfusion purposes in CPDA-I stabilizer-coated PVC bags – effect of storage on the preservation of plasmatic coagulation factors. *Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr.* 1988; 101, 73–76 (in German).
- Okazaki, M., Morio, Y., Iwai, S., Miyamoto, K., Sakamoto, H., Imai, K., Oguchi, K.** Age-related changes in blood coagulation and fibrinolysis in mice fed on a high-cholesterol diet. *Experim. animals.* 1998; 47, 237-246.
- Pelagalli, A., Lombardi, P., d'Angelo, D., Della Morte, R., Avallone, L., Staiano, N.** Species variability in platelet aggregation response to different agonists. *J. Comp. Pathol.* 2002; 127, 126-132.

## VII Literaturverzeichnis

---

**Rinder, H.M., Snyder, E.L., Tracey, J.B., Dinecco, D., Wang, C., Barli, L., Rinder, C.S., Smith, R.** Reversibility of severe metabolic stress in stored platelets after in vitro plasma rescue or in vivo transfusion: restoration of secretory function and maintenance of platelet survival. *Transfus.* 2003; 43,1230-1237.

**Rumjantseva, V., Hoffmeister, K.M.** Novel and unexpected clearance mechanisms for cold platelets. *Transfus. Apher. Sci.* 2010; 42, 63-70.

**Salvagno, G.L., Lippi, G., Montagnana, M., Franchini, M., Poli, G., Guidi, G.C.** Influence of temperature and time before centrifugation of specimens for routine coagulation testing. *Int. J. Lab. Hematol.* 2009; 31, 462-467.

**Sato, M., Harasaki, H.** Evaluation of platelet and coagulation function in different animal species using the Xylom Clot Signature Analyzer. *ASAIO. J.* 2002; 48, 360-364.

**Schiffer, E.R., Reber, G., De Moerloose, P., Morel, D.R.** Evaluation of unfractionated heparin and recombinant hirudin on survival in a sustained ovine endotoxin shock model. *Crit. Care Med.* 2002; 30, 2689-2699.

**Soloviev, M.V., Okazaki, Y., Harasaki, H.** Whole blood platelet aggregation in humans and animals. *J. Surg. Res.* 1999; 82, 180-187.

**Spanos, H.G.** Aspirin fails to inhibit platelet aggregation in sheep. *Thromb. Res.* 1993; 72, 175-182.

**Stokol, T., Erb, H.N.** A comparison of platelet parameters in EDTA- and citrate-anticoagulated blood in dogs. *Vet. Clin. Pathol.* 2007; 36, 148-154.

**Tóth, O., Calatzis, A., Penz, S., Losonczy, H., Siess, W.** Multiple electrode aggregometry: A new device to measure platelet aggregation in whole blood. *Thromb. Haemost.* 2006; 96, 781-788.

**Tsuchiya, R., Yagura, H., Hachiya, Y., Mochizuki, T., Fruichi, M., Hisasue, M., Kobayashi, K., Yamada, T.** Aggregability and post-transfusion survival of canine platelets

## VII Literaturverzeichnis

---

in stored whole blood. *J. Vet. Med. Sci.* 2003; 65, 825-829.

**Turner, A.S., Parker, D., Egbert, B., Maroney, M., Armstrong, R., Powers, N.** Evaluation of a novel hemostatic device in an ovine parenchymal organ bleeding model of normal and impaired hemostasis. *J. Biomed. Mater. Res.* 2002; 63, 37-47.

**Wain, E.B., Redpath, J.A.** Blood transfusion as a treatment of anaemia in lambs. *Vet. Rec.* 1985; 116, 527.

**Wang Z, Su F, Rogiers P, Vincent JL.** Beneficial effects of recombinant human activated protein C in a ewe model of septic shock. *Crit. Care Med.* 2007; 35, 2594-2600.

**White, T.O., Clutton, R.E., Salter, D., Swann, D., Christie, J., Robinson, C.M.** The early response to major trauma and intramedullary nailing. *J. Bone Joint. Surg. Br.* 2006; 88, 823-827.

**Wilhelmi, M.H., Gratz, K.F., Mischke, R., von Depka, M., Noske, D., Francis, T., Haverich, A., Mertsching, H.** The ex-vivo-shunt-model: novel approach for assessing the thrombogenicity of vascular implants. *Int. J. Artif. Organs.* 2003; 26, 1095-1103.

**Wilner, G. D., Nossel, H. L., LeRoy, E. C.** Aggregation of Platelets by Collagen. *J. Clin. Invest.* 1968; 47, 2616-2621.

**Wohner, M.** Role of Cellular Elements in Thrombus Formation and Dissolution. *Cardiovasc. Hematol. Agents. Med. Chem.* 2008; 6, 224—28.

**Ye, S.-H., Johnson, C.A., Woolley, J.R., Snyder, T.A., Gamble, L.J., Wagner, W.R.** Covalent surface modification of a titanium alloy with a phosphorylcholine-containing copolymer for reduced thrombogenicity in cardiovascular devices. *J. Biomed. Mater. Res. A.* 2009; 91, 18–28.

## VIII Anhang

---

### VIII Anhang

#### Geräte und Bezugsquellen:

Bayer HealthCare, Fernwald

ADVIA<sup>®</sup> 120, hämatologisches Analysengerät

Beckman Coulter GmbH, Krefeld

Allegra<sup>™</sup> 6KR Centrifuge, Kühlzentrifuge

Dynabyte GmbH, München

Multiplate<sup>®</sup>, Impedanz-Aggregometer

Eppendorf AG, Hamburg

- Reference<sup>®</sup> variabel, 10 – 100 µl Kolbenhubpipette

- Reference<sup>®</sup> variabel, 200 – 1000 µl Kolbenhubpipette

Fresenius Apparatebau, Bad Homburg

Resonanzthrombograph RTG 801

Hitachi Ltd., Tokyo, Japan

U-2000 Spectrophotometer

Rolf Greiner BioChemica, Flacht

## VIII Anhang

---

APACT 4™ Plättchenaggregationsmessgerät mit zugehörigen Meßzellen

Laborzentrifugen GmbH, Osterrode am Harz

Sigma 113 Centrifuge

Leitz, Wetzlar

Laborlux 12, Mikroskop

Trinity biotech, Lemgo

AMAX Destiny Plus, Amelung

### **Reagenzien und Bezugsquellen:**

Baxter GmbH, Unterschleißheim

Isotonische Kochsalzlösung NaCl 0,9, 1000 ml

Dynabyte GmbH, München

- ADPtest, 1 ml lyophilisiert, Adenosindiphosphat 0,2 mM
- COLtet, 1 ml lyophilisiert, Kollagen 100 µg/ml
- ASPitest, 1 ml lyophilisiert, Arachidonsäure 15 mM
- RISTOtest, 1 ml lyophilisiert, Ristocetin 10 mg/ml
- TRAPtest, 1 ml lyophilisiert, TRAP 1 mM

MediPac GmbH, Rheinbreitbach

## VIII Anhang

---

PPS Natrium Citricum 3.13 %, 100 ml, 2,79 g Natriumcitrat, Gerinnungshemmer

### **Verbrauchsmaterialien und Bezugsquellen:**

BD, Heidelberg

Adsyte Pro™ i.v. Katheter 18 GA - 1,3 x 45mm - 97 ml/min

BIOHIT OYJ, Helsinki/Finnland

BIOHIT® Tip, Pipettenspitzen (Zubehör zu Miltiplate)

Brand GmbH & Co.KG, Wertheim

Plastikbrand® 20-100 µl- und 250-100 µl-Pipettenspitzen

Eppendorf AG, Wesseling-Berzdorf

1,3 ml Original Eppendorf Reaktionsgefäße 3810

Dynabyte GmbH, München

- Multiplate®, Messzellen
- Thrombin Inhibitor 4,5 ml suited for Sarstedt® system
- ADPtest Aliquotgefäße, Kunststoffreaktionsgefäße
- COLtest Aliquotgefäße, Kunststoffreaktionsgefäße
- ASPItest Aliquotgefäße, Kunststoffreaktionsgefäße
- RISTOtest Aliquotgefäße, Kunststoffreaktionsgefäße
- TRAPtest Aliquotgefäße, Kunststoffreaktionsgefäße

## VIII Anhang

---

### Fresenius Kabi AG, Bad Homburg

- Compoflex<sup>®</sup> 500 ml-Bluttransfusionsbeutel mit CPDA-1-Puffer
- Compoflex<sup>®</sup> 4 150 ml- Satellitenbeutel, per Schlauchsystem verbunden

### Sarstedt Aktiengesellschaft & Co, Nümbrecht

- Mikro-Probengefäß, 1,3 ml Lithium-Heparin, Probengefäß mit 35 I.E. Heparin/ml Blut
- Mikro-Probengefäß, 1,3 ml EDTA, Probengefäß mit 1,6 mg EDTA/ml Blut
- 10ml-Probengefäße incl. Stopfen

## IX Publikationsliste

---

### IX Publikationsliste

#### Journalartikel

1. **Baumgarten A.**, Wilhelmi M., Kalbantner K., Ganter M., Mischke R. (2010):  
Measurement of platelet aggregation in ovine blood using a new impedance aggregometer  
Veterinary Clinical Pathology 39 (2010) 149–156.
2. **Baumgarten A.**, Wilhelmi M., Ganter M., Rohn K., Mischke R. (2011):  
Changes of platelet function and blood coagulation during short term storage of ovine blood  
Research in Veterinary Science 91 (2011) 150–158.
3. Kalbantner K., **Baumgarten A.**, Mischke R. (2009):  
Measurement of platelet function in dogs using a new impedance aggregometer – Optimisation of agonist concentration and reference values  
The Veterinary Journal 185 (2010) 144-151.

#### Abstract (eines Posters auf Kongressen):

1. Mischke R., Kalbantner K., **Baumgarten A.** (2008):  
Measurement of platelet function in dogs using a new impedance aggregometer  
13<sup>th</sup> ISACP, 10<sup>th</sup> ESVCP, 8<sup>th</sup> AECCP, 7<sup>th</sup> APP Congress: conference program & activities, Barcelona

#### Meine Beteiligung an den Publikationen:

- 1./2. Die Idee und die Versuchsplanung waren durch das Forschungsprojekt sowie durch die Beteiligten, v.a. Prof. Dr. R. Mischke, größtenteils vorgegeben. Die Versuchsdurchführung, z.B. Blutentnahme, Probenbearbeitung und Messungsdurchführung sowie alle anderen praktischen Arbeiten für die vorliegende Dissertation, wurden von mir persönlich durchgeführt. Hier standen mir lediglich Hilfspersonen, z.B. zum Fixieren der Schafe während der Blutentnahme, zur Seite. Auch die Auswertung der Ergebnisse sowie die Erstellung des Manuskripts wurden von mir persönlich durchgeführt unter Rücksprache mit und Korrektur durch Prof. Dr. Mischke und Karl Rohn.
3. Die Idee und die Versuchsplanung waren durch die Beteiligten, v.a. Prof. Dr. R. Mischke, größtenteils vorgegeben. Ich habe die Untersuchungen der ersten Proben einschließlich Probenbearbeitung durchgeführt. Die erstellten Daten habe ich zur Beendigung der Untersuchung an Dr. K. Kalbantner übergeben.



## **X Danksagung**

---

### **X Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Reinhard Mischke, dem wissenschaftlichen Betreuer meiner Arbeit, sowohl für die Möglichkeit, an diesem sehr interessanten Thema arbeiten zu dürfen, als auch für die immerwährende wertvolle Unterstützung und wissenschaftliche Anleitung während meiner Dissertation. Auch Herrn Dr. Mathias Wilhelmi, Mitinitiator dieser Studie, danke ich für die hilfreiche Zusammenarbeit, den freundlichen Kontakt und den Humor zu jeder Zeit.

Mein spezieller Dank geht auch an Herrn Prof. Dr. Ingo Nolte für die Möglichkeit, in der Klinik für Kleintiere arbeiten und alle Geräte und Materialien, die ich benötigte, nutzen zu können.

Sehr dankbar bin ich auch Herrn Prof. Dr. Martin Ganter, der mir die Blutentnahmen bei jeglicher Art von Schafen, die ich für meine Untersuchungen benötigte, ermöglichte. Des Weiteren danke ich Herrn Karl Rohn für die geduldige Hilfe bezüglich der statistischen Auswertungen meiner Ergebnisse.

Spezieller Dank geht auch an Herrn Dirk Menzel für die geduldige Einweisung in den Umgang mit allen benötigten Geräten, seine Hilfsbereitschaft und den freundschaftlichen Umgang mit ihm.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Tierärzten, wissenschaftlichen Angestellten und Tierpflegern bedanken für die Assistenz bei meinen Untersuchungen und der Hilfe bei den Blutentnahmen, besonders Herrn Klaus Schlotter, Herrn Thorsten Waßmann, Herrn Kalle Napierski und Herrn Paul Zerbe.

Mein allerbesten Dank geht an meine Familie, in besonderem Maße an meine Mutter dafür, dass sie mir immer in jeglicher Hinsicht für meine Arbeit den Rücken freigehalten hat und natürlich an meinen Sohn Lucas, der so oft ohne zu klagen auf mich verzichten musste. Des Weiteren auch an meine Schwägerin für ihr wiederholtes Korrekturlesen. Zu guter Letzt möchte ich inständig Frau Dr. Kerstin Kalbantner dafür danken, dass sie mit mir durch leichte und durch schwere Zeiten gegangen ist.

**Danke!**