



Thrombozyten der Equiden -  
ein unterschätzter Biomarker ?





## **Bibliografische Informationen der Deutschen Bibliothek**

Die Deutsche Bibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie;  
detaillierte bibliografische Daten sind im Internet abrufbar über <http://dnb.ddb.de>

© 2019 by Verlag:

**Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft Service GmbH, Gießen**

Printed in Germany

**ISBN 978-3-86345-503-3**

1. Auflage 2019

### **Verlag:**

DVG Service GmbH

Friedrichstraße 17

35392 Gießen

Tel.: 0641/24466

[info@dvg.de](mailto:info@dvg.de)

[www.dvg.de](http://www.dvg.de)

**Justus-Liebig-Universität Gießen**

**Fachbereich Veterinärmedizin**

Klinik für Pferde, Innere Medizin

und

Klinische Pathophysiologie und Klinische Laboratoriumsdiagnostik

# **Thrombozyten der Equiden - ein unterschätzter Biomarker ?**

Habilitationsschrift

zur Erlangung der Lehrbefähigung für das Fach

Innere Medizin und Klinische Labordiagnostik

im Fachbereich Veterinärmedizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

**Dr. med. vet. Katja Roscher**

Gießen 2018



**Für Papa**



## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>LITERATURÜBERSICHT.....</b>	<b>3</b>
<b>2.1</b>	<b>Thrombozytenbiologie .....</b>	<b>3</b>
2.1.1	Morphologie der Thrombozyten.....	3
2.1.2	Zelluläre Gerinnung.....	6
2.1.3	Die Rolle von Thrombozyten bei immunologischen und entzündlichen Prozessen....	9
<b>2.2</b>	<b>Klinische Testverfahren zur Thrombozytenbiologie .....</b>	<b>14</b>
2.2.1	Thrombozytenzählung .....	14
2.2.1.1	Methodik.....	14
2.2.1.2	Antikoagulantien.....	18
2.2.1.3	Thrombozytopenie.....	18
2.2.1.4	Thrombozytose .....	19
2.2.2	Thrombozytenfunktion .....	21
2.2.2.1	Größe und Granularität der Thrombozyten.....	21
2.2.2.2	Thrombozytenaggregation .....	22
2.2.2.3	Membranproteine und RNA .....	25
2.2.2.3.1	Ausgangsmaterial .....	25
2.2.2.3.2	Thrombozytenmarkierung .....	26
2.2.2.3.3	Thrombozytenaktivierung.....	26
2.2.2.3.4	Thrombozyten-Leukozyten-Aggregate (TLA) .....	28
2.2.2.3.5	Retikulierte, juvenile, RNA-reiche Thrombozyten .....	29
2.2.2.4	Oberflächenproteine im Serum und Plasma .....	30
<b>2.3</b>	<b>SIRS.....</b>	<b>31</b>
<b>2.4</b>	<b>Medikamentöse Hemmung der Thrombozytenfunktion .....</b>	<b>33</b>
2.4.1	Acetylsalicylsäure (ASS).....	33
2.4.2	Clopidogrel .....	34
<b>3</b>	<b>EIGENE UNTERSUCHUNGEN - MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>35</b>
<b>3.1</b>	<b>Labordiagnostische Untersuchungen zur Thrombozytenbiologie von Equiden .....</b>	<b>35</b>
3.1.1	Laser-Durchflusszytometrie (ADVIA® 2120) .....	36
3.1.1.1	Gerät und Messprinzip.....	36
3.1.1.2	Probanden und Blutentnahme .....	39

## Inhaltsverzeichnis

---

3.1.1.3	Einfluss von Antikoagulantien und Rasse auf Thrombozytenvariablen .....	40
3.1.1.4	Statistik.....	40
3.1.2	Impedanzaggregometrie (Multiplate® Analyzer).....	42
3.1.2.1	Gerät und Messprinzip.....	42
3.1.2.2	Methodenetablierung.....	45
3.1.2.3	Einfluss der Rasse auf die Impedanzaggregation .....	46
3.1.2.4	Einfluss des magnetischen Rührstabes auf die Impedanzaggregation.....	46
3.1.2.5	Statistik.....	47
3.1.3	Fluoreszenz-Durchflusszytometrie (Accuri® C6).....	48
3.1.3.1	Gerät und Messprinzip.....	48
3.1.3.2	Methodenetablierung.....	49
3.1.3.2.1	Präanalytik.....	49
3.1.3.2.2	Antikörper .....	51
3.1.3.2.3	Messablauf .....	51
3.1.3.2.4	Auswertung der Messungen .....	52
3.1.3.2.5	Statistik.....	54
3.1.3.3	Thiazol Orange .....	55
3.1.4	ELISA sCD40L und sP-Selectin .....	56
3.1.4.1	Testvalidierung.....	56
3.1.4.2	Testdurchführung .....	58
3.1.4.2.1	sCD40L.....	59
3.1.4.2.2	sP-Selectin .....	60
3.1.4.3	Auswertung.....	60
<b>3.2</b>	<b>Thrombozytopenie und Thrombozytose bei Klinikpatienten (2008 - 2015) .....</b>	<b>62</b>
3.2.1	Probanden und Einschlusskriterien .....	62
3.2.2	Statistik.....	63
<b>3.3</b>	<b>Thrombozytenfunktion bei Equiden mit systemischer Entzündung (SIRS) .....</b>	<b>64</b>
3.3.1	Probanden und Blutentnahmen .....	64
3.3.2	Labordiagnostik.....	65
3.3.3	Statistik.....	66
<b>3.4</b>	<b>Hemmung der Thrombozytenfunktion bei Pferden .....</b>	<b>67</b>
3.4.1	Probanden.....	67

## Inhaltsverzeichnis

---

3.4.2	Medikation .....	67
3.4.3	Blutentnahmen .....	68
3.4.4	Labordiagnostik.....	69
3.4.4.1	Impedanzaggregometrie (Multiplate® Analyzer) .....	69
3.4.4.2	Hämatologie, klinische Chemie und plasmatische Gerinnung .....	69
3.4.4.3	Serumkonzentration Salicylsäure .....	70
3.4.5	Statistik.....	71
<b>4</b>	<b>EIGENE UNTERSUCHUNGEN - ERGEBNISSE.....</b>	<b>72</b>
<b>4.1</b>	<b>Labordiagnostische Untersuchungen zur Thrombozytenbiologie von Equiden .....</b>	<b>72</b>
4.1.1	Laser-Durchflusszytometrie (ADVIA® 2120) .....	73
4.1.1.1	Einfluss von Antikoagulantien auf Thrombozytenvariablen.....	73
4.1.1.1.1	Kleinpferd .....	73
4.1.1.1.2	Warmblut .....	75
4.1.1.2	Einfluss der Rasse auf Thrombozytenvariablen .....	75
4.1.1.3	Auffälligkeiten der Variable PDW .....	77
4.1.2	Impedanzaggregometrie (Multiplate® Analyzer).....	80
4.1.2.1	Einfluss der Rasse auf die Impedanzaggregation .....	80
4.1.2.2	Einfluss des magnetischen Rührstabes auf die Impedanzaggregation.....	81
4.1.3	Fluoreszenz-Durchflusszytometrie (Accuri® C6) .....	82
4.1.3.1	In vitro Aktivierung mit Kollagen .....	82
4.1.3.2	Thiazol Orange .....	83
4.1.4	ELISA sCD40L und sP-Selectin .....	84
4.1.4.1	sCD40L.....	84
4.1.4.2	sP-Selectin .....	86
<b>4.2</b>	<b>Thrombozytopenie und Thrombozytose bei Klinikpatienten (2008 - 2015) .....</b>	<b>88</b>
<b>4.3</b>	<b>Thrombozytenfunktion bei Equiden mit systemischer Entzündung (SIRS) .....</b>	<b>94</b>
4.3.1	Probanden.....	94
4.3.2	Laser-Durchflusszytometrie (ADVIA® 2120) .....	95
4.3.3	Impedanzaggregometrie (Multiplate® Analyzer).....	98
4.3.4	Fluoreszenz-Durchflusszytometrie (Accuri® C6) .....	100
4.3.5	Korrelationsanalysen.....	104
4.3.5.1	ADVIA® 2120 und Multiplate® Analyzer .....	104

## Inhaltsverzeichnis

---

4.3.5.2	ADVIA® 2120 und Accuri® C6.....	104
4.3.5.3	Accuri®C6 und Multiplate® Analyzer .....	105
<b>4.4</b>	<b>Hemmung der Thrombozytenfunktion bei Pferden .....</b>	<b>106</b>
4.4.1	Acetylsalicylsäure .....	106
4.4.2	Clopidogrel .....	108
<b>5</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>109</b>
<b>5.1</b>	<b>Labordiagnostische Untersuchungen zur Thrombozytenbiologie von Equiden .....</b>	<b>109</b>
5.1.1	Laser-Durchflusszytometrie (ADVIA® 2120) .....	110
5.1.1.1	Einfluss von Antikoagulantien auf Thrombozytenvariablen.....	110
5.1.1.2	Einfluss der Rasse auf Thrombozytenvariablen .....	125
5.1.2	Impedanzaggregation (Multiplate® Analyzer) .....	129
5.1.2.1	Einfluss der Rasse auf die Impedanzaggregation .....	129
5.1.2.2	Einfluss des magnetischen Rührstabs auf die Impedanzaggregation.....	133
5.1.3	Fluoreszenz-Durchflusszytometrie (Accuri® C6) .....	135
5.1.3.1	Präanalytik .....	135
5.1.3.2	Aktivierte Thrombozyten und Thrombozyten-Leukozyten-Aggregate.....	136
5.1.3.3	Thiazol Orange .....	138
5.1.4	ELISA sCD40L und sP-Selectin .....	140
5.1.4.1	sCD40L.....	140
5.1.4.2	sP-Selectin .....	142
<b>5.2</b>	<b>Thrombozytopenie und Thrombozytose bei Klinikpatienten (2008 - 2015) .....</b>	<b>144</b>
5.2.1	Thrombozytopenie.....	144
5.2.2	Thrombozytose .....	150
<b>5.3</b>	<b>Thrombozytenfunktion bei Equiden mit systemischer Entzündung (SIRS) .....</b>	<b>154</b>
5.3.1	Probanden.....	154
5.3.2	Labordiagnostik.....	157
5.3.2.1	Laser-Durchflusszytometrie (ADVIA® 2120) .....	157
5.3.2.2	Impedanzaggregometrie (Multiplate® Analyzer) .....	163
5.3.2.3	Fluoreszenz-Durchflusszytometrie (Accuri C6).....	167
5.3.3	Prognostische Aussagekraft der SIRS-Kriterien und der Thrombozytenvariablen ..	169
5.3.3.1	SIRS-Kriterien .....	169
5.3.3.2	Laser-Durchflusszytometrie (ADVIA® 2120) .....	170

## Inhaltsverzeichnis

---

5.3.3.3	Impedanzaggregometrie (Multiplate® Analyzer) .....	173
5.3.3.4	Fluoreszenz-Durchflusszytometrie (Accuri C6).....	174
<b>5.4</b>	<b>Hemmung der Thrombozytenfunktion bei Pferden .....</b>	<b>177</b>
5.4.1	Acetylsalicylsäure .....	177
5.4.2	Clopidogrel .....	182
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>187</b>
<b>7</b>	<b>SUMMARY .....</b>	<b>190</b>
<b>8</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>193</b>
<b>9</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>230</b>
<b>10</b>	<b>VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN UND TABELLEN .....</b>	<b>233</b>
10.1	Abbildungen.....	233
10.2	Tabellen.....	238
<b>11</b>	<b>VERÖFFENTLICHUNGEN .....</b>	<b>11-1</b>
<b>12</b>	<b>ANHANG.....</b>	<b>12-2</b>
<b>13</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>13-1</b>



### 1 EINLEITUNG

Bis zum Ende des 19. Jahrhunderts war neben Erythrozyten und Leukozyten die Existenz weiterer Zellen im Blut nicht bekannt. Der deutsche Anatom und Physiologe Max Schultze beschrieb bereits 1865 erstmals ausführlich mikroskopisch sichtbare "*Klümpchen farbloser Kügelchen*" im Blut des Menschen und empfahl "*angelegentlichst*" deren weitere Untersuchung [1]. Knapp 20 Jahre später widmete sich der italienische Pathologe Giulio Bizzozero den beschriebenen Klümpchen und zeigte in einer umfangreichen Reihe von revolutionären in vivo und in vitro Experimenten, dass diese von ihm erstmals als Blutplättchen bezeichneten Bestandteile im zirkulierenden Blut durch ihre Aggregation und somit Thrombusbildung maßgeblich für die Blutgerinnung verantwortlich sind [2].

Erst mit Beginn dieses Jahrhunderts wurde deutlich, dass Thrombozyten neben ihrer essentiellen Bedeutung für die Blutgerinnung eine substantielle Rolle im Rahmen von Entzündungen spielen.

Eine Vielzahl der Erkrankungen, mit denen in der Pferdemedizin tätige Tierärzte täglich konfrontiert werden, beruht auf entzündlichen Prozessen. So erscheint es wahrscheinlich, dass durch die Thrombozytenbiologie Erkrankungen auch beim Pferd substantiell beeinflusst werden. In der internationalen Literatur findet sich bislang eine sehr übersichtliche Anzahl wissenschaftlicher Publikationen, welche sich mit der Rolle der Thrombozytenbiologie beim Pferd in Zusammenhang mit entzündlichen Erkrankungen befassen.

Aufgrund der möglichen Bedeutsamkeit der Thrombozyten insbesondere im Zusammenhang mit entzündlichen Erkrankungen war es so naheliegend, umfangreiche Untersuchungen zur Thrombozytenbiologie bei gesunden und kranken Equiden durchzuführen. Zuerst wurden bei klinisch unauffälligen erwachsenen Equiden 4 labordiagnostische Methoden zur Thrombozytenbiologie untersucht: Die Laser-Durchflusszytometrie, die Impedanzaggregometrie aus Vollblut, die Fluoreszenz-Durchflusszytometrie sowie die Messung von aus der Zellmembran der Thrombozyten gelösten Proteine im Serum und Plasma mittels ELISA.

In einer prospektiven Untersuchung wurden diese Methoden bezüglich ihrer Eignung in der Diagnostik und Prognostik bei Equiden mit systemischen Entzündungen (SIRS) überprüft.

Da bei humanen Patienten positive Einflüsse einer Hemmung der Thrombozytenfunktion auf eine reduzierte Thromboseneigung und auf den Erkrankungsverlauf von SIRS-Patienten ermittelt werden konnten, sollte schlussendlich die Möglichkeit der

## 1 Einleitung

---

medikamentösen Hemmung der Thrombozytenfunktion durch die orale Applikation von Clopidogrel und Acetylsalicylsäure beim Pferd überprüft werden.

## 2 LITERATURÜBERSICHT

### 2.1 Thrombozytenbiologie

#### 2.1.1 Morphologie der Thrombozyten

Die Thrombozyten des Pferdes zeigen sich elektronenmikroskopisch analog zu den humanen Thrombozyten in einer diskoiden Form mit einer Dicke von etwa 0,5  $\mu\text{m}$ , sind jedoch im Durchmesser etwa ein Drittel kleiner als die 3-5  $\mu\text{m}$  großen humanen Thrombozyten [3–5]. Die im Zytoplasma gelegenen  $\alpha$ -Granula sind etwas größer als die humaner Zellen und zeigen eine feine, unterteilte Substruktur [3,4]. Die  $\alpha$ -Granula des Menschen enthalten eine Vielzahl von Faktoren, welche insbesondere für die Adhäsion von Bedeutung sind. Hierzu gehören unter anderem Proteoglykane (u.a. platelet factor 4), Glykoproteine (u.a. von Willebrand Faktor), Faktoren der plasmatischen Gerinnung (u.a. Fibrinogen), Mitogene (u.a. Interleukin- $\beta$ ), Proteaseinhibitoren (u.a.  $\alpha$ 2-Macroglobulin) und weitere Proteine (u.a. Immunglobuline und Albumin) [6]. Untersuchungen zum Inhalt der  $\alpha$ -Granula des Pferdes liegen nach Kenntnis der Autorin nicht vor.

Die zahlenmäßig geringeren  $\delta$ -Granula (Synonym: dense bodies) besitzen beim Pferd wie beim Menschen einen Durchmesser von etwa 0,15  $\mu\text{m}$  [3–5]. Die humanen  $\delta$ -Granula enthalten pro-aggregierende Faktoren: Zu 65 % in Form von Adeninen (Adenosin-di/triphosphat: ADP/ATP), sowie Aminen (Serotonin, Histamin) und bivalenten Kationen (Kalzium, Magnesium) [6,7]. Vergleichende Untersuchungen von Meyers et al. [7] zum Inhalt der  $\delta$ -Granula bei verschiedenen Spezies zeigten, dass equine Granula im Vergleich zu denen des Menschen geringere Konzentrationen an ADP, ATP, ionisiertem Kalzium und Magnesium beinhalten, die Konzentration an Serotonin jedoch etwa gleich hoch gemessen werden konnte (Tabelle 1). Große Unterschiede konnten bezüglich der Veränderungen der Konzentrationen nach Aktivierung der Thrombozyten nachgewiesen werden: Während humane Thrombozyten nach Aktivierung mit Thrombin mehr als 75 % ihres Gehaltes an ADP und ionisiertem Kalzium freisetzen, lag dieser Anteil bei den equinen Zellen mit ca. 40 % bzw. 20 % deutlich niedriger. Bezüglich des Kalziums konnten auch bei keiner der anderen untersuchten Spezies (Katze, Rind, Hund, Schwein, Kaninchen, Nerz) annähernd hohe prozentuale Werte der Freisetzung ermittelt werden wie beim Menschen. Beim ionisierten Magnesium ergab sich ein

## 2 Literaturübersicht

umgekehrtes Bild: Hier sezernierten die equinen Zellen mit ca. 23 % etwa dreifach höhere Anteile als die humanen.

Tabelle 1: Konzentrationen von Adeninen (ATP, ADP), Aminin (Serotonin) und bivalenten Kationen in den  $\delta$ -Granula von Thrombozyten bei Mensch und Pferd sowie Konzentrationsänderungen nach Aktivierung mit Thrombin; modifiziert nach Meyers et al. [7]

		Konzentration ( $\mu\text{mol}/10^{11}$ Thrombozyten)		Ausschüttung nach Aktivierung (%)	
		Pferd	Mensch	Pferd	Mensch
<b>Ca<sup>++</sup></b>	Gesamt	11,3 $\pm$ 3,7	15,1 $\pm$ 1,4		
	Ausschüttung	2,5 $\pm$ 1,1	10,1 $\pm$ 1,9	22 $\pm$ 7	69 $\pm$ 11
<b>Mg<sup>++</sup></b>	Gesamt	5,2 $\pm$ 0,9	6,4 $\pm$ 1,0		
	Ausschüttung	1,2 $\pm$ 0,4	0,4 $\pm$ 0,3	23 $\pm$ 6	7 $\pm$ 6
<b>Serotonin</b>	Gesamt	0,6	0,3		
	Ausschüttung	0,5	0,2	83 $\pm$ 8	81 $\pm$ 4
<b>ATP</b>	Gesamt	2,4 $\pm$ 0,8	5,5 $\pm$ 1,0		
	Ausschüttung	0,4 $\pm$ 0,1	1,9 $\pm$ 0,8	18 $\pm$ 4	33 $\pm$ 9
<b>ADP</b>	Gesamt	1,2 $\pm$ 0,5	3,0 $\pm$ 0,6		
	Ausschüttung	0,4 $\pm$ 0,2	2,6 $\pm$ 0,9	42 $\pm$ 22	84 $\pm$ 14

Als dritte sekretorische Organelle finden sich in humanen Thrombozyten wenige Lysosome, welche säureaktive Enzyme (Proteasen und Hydrolasen) enthalten. Die Funktion der Lysosome im Rahmen der Hämostase ist unklar und wird als unbedeutend angesehen [5,6]. In den beiden Untersuchungen zur Ultrastruktur equiner Thrombozyten finden Lysosome keine Erwähnung [3,4].

Im Unterschied zu den Thrombozyten von Menschen besitzen die der Pferde keine als offenes Kanalsystem (open canalicular system, OCS) bezeichneten Einstülpungen der Zellmembran in das Zellinnere [3,4]. Über das OCS erfolgt beim Menschen die Degranulation der Granula nach Aktivierung des Thrombozyten [5]. Nach Aktivierung equiner Thrombozyten mit Thrombin sammeln sich die  $\alpha$ -Granula im Zentrum der Zelle, verlieren ihre runde Form, fusionieren zunächst miteinander und entlassen ihren Inhalt letztendlich durch Fusion mit der Oberflächenmembran in die Umgebung [3,4]. Über Degranulationsprozesse der  $\delta$ -Granula equiner Thrombozyten liegen nach Kenntnis der Autorin keine Untersuchungen vor. Beim Menschen werden durch die Fusion der Membran der  $\alpha$ -Granula mit der Oberfläche der Thrombozyten zudem eine Vielzahl von in der Membran der Granula enthaltenen

## 2 Literaturübersicht

---

Glykoproteine (u. a. GPIIb/IIIa, GPIb-V-IX, P-Selectin, CD40L) in die Zelloberfläche integriert [6]. Einige dieser Glykoproteine konnten auch bei equinen Thrombozyten nach Aktivierung und Verschmelzen der Membran der  $\alpha$ -Granula mit der Zellmembran auf der Zelloberfläche nachgewiesen werden [3], so dass anzunehmen ist, dass die Glykoproteine auch beim Pferd in die Membran der  $\alpha$ -Granula integriert sind.

Die Benennung der Glykoproteine ist in der Literatur nicht einheitlich: So werden neben der Abkürzung GP insbesondere Bezeichnungen gemäß immunophänotypischer Eingruppierung nach dem Cluster of Differentiation (CD) sowie weitere Synonyme verwendet. Die Tabelle 2 vermittelt einen Überblick über bedeutende Glykoproteine, ihre Veränderungen im Rahmen der Thrombozytenaktivierung sowie das Vorhandensein in der Membran equiner Thrombozyten.

Tabelle 2: Ausgewählte Glykoproteine der Thrombozyten

Glyko-protein	CD	Synonym	Funktion	Präsenz ruhend	Präsenz aktiviert	Pferd (Quelle)
GPIb-V-IX	CD42a-d	GPIb-IX-V	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Adhäsion an subendotheliale Matrix, Endothelzellen, Leukozyten</li> <li>• Signalvermittlung</li> </ul>	++	+	[3]
GPIIb/IIIa	CD41/61	-	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Adhäsion an subendotheliale Matrix, Endothelzellen, Leukozyten</li> <li>• Signalvermittlung</li> </ul>	+	+++	[3]
GPVI	-	-	Adhäsion an Kollagen	+	+	-
-	CD62P	P-Selectin PADGEM GMP-140	Interaktion mit Endothelzellen und Leukozyten	-	+++	[3]
-	CD40L	CD154	Interaktion mit Endothelzellen und Leukozyten	-	+	-

### 2.1.2 Zelluläre Gerinnung

Der deutsche Anatom und Physiologe Max Schultze (1825-1874) hat bereits im Jahre 1865 erstmals ausführlich mikroskopisch sichtbare "*Klümpchen farbloser Kügelchen*" im Blut des Menschen beschrieben und zeichnerisch dargestellt, sowie am Ende seiner Ausführungen geschlossen: "*Die Körnchenbildungen im Blute des Menschen seien also hiermit allen denen, welche sich eingehender mit dem Blute beschäftigen, angelegentlichst empfohlen. Das Material, welches mir vorlag, hat noch keine Inhaltspunkte zur Beurtheilung ihrer etwaigen Bedeutung für pathologische Prozesse gegeben.*" [1]. Knapp 20 Jahre später widmete sich der italienische Pathologe Giulio Bizzozero (1846-1901) den von Schultze beschriebenen Klümpchen und zeigte in einer umfangreichen Reihe von revolutionären in vivo und in vitro Experimenten, dass diese von Bizzozero erstmals als Blutplättchen bezeichneten Bestandteile im zirkulierenden Blut durch ihre Aggregation und somit Thrombusbildung maßgeblich für die Blutgerinnung verantwortlich sind [2].

In den 1960iger Jahren konnte dann dank der Entwicklung der Elektronenmikroskopie gezeigt werden, dass die Aggregation mit strukturellen Veränderungen der Blutplättchen wie z. B. einem Verlust der intrazellulären Granula sowie der Bildung von Pseudopodien einhergeht [8] und dass dies unter anderem durch Adenosin 5'-diphosphat (ADP) [9], Kollagen [10], Epinephrin [11] und Prostaglandine [12] vermittelt wird. In den folgenden Jahren gelang der Nachweis zahlreicher spezifischer Rezeptoren in der Membran der Thrombozyten und der entsprechenden intrazellulären Kaskaden (insbesondere Konzentrationsänderungen von Kalziumionen), welche die Aktivierung der Thrombozyten, daraus resultierende Aggregation und schlussendlich die Thrombusbildung herbeiführen.

So interagiert beim Menschen ADP mit den purinergen Rezeptoren P2Y<sub>12</sub> und P2Y<sub>1</sub> [13]. Das Vorhandensein von P2Y<sub>12</sub> und P2Y<sub>1</sub> auf equinen Thrombozyten und ihre Beteiligung an der ADP-induzierten Aggregation konnte bereits gezeigt werden [14]. Früher ging man zudem davon aus, dass die Aktivierung mittels ADP auch über den Rezeptor P2X<sub>1</sub> vermittelt wird. Untersuchungen zu Beginn des 21. Jahrhunderts haben jedoch gezeigt, dass der Rezeptor P2X<sub>1</sub> beim Menschen ausschließlich mit ATP interagiert und hierdurch eine Aktivierung induziert wird [15].

Die Aktivierung der Thrombozyten durch Kollagen wird beim Menschen durch eine Modulation des Integrins Glykoprotein VI (GPVI) vermittelt [16]. Die Mechanismen der

## 2 Literaturübersicht

---

Thrombozytenaktivierung durch Kollagen beim Pferd sind nach Kenntnis der Autorin nicht untersucht.

Neben den direkten Agonisten wie Kollagen oder ADP werden Thrombozyten auch durch indirekte Agonisten wie die Arachidonsäure (AS) aktiviert. Die AS wird von den Thrombozyten enzymatisch durch die Cyclooxygenase-1 (COX-1) zu Thromboxan A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) umgewandelt, welches durch Interaktion mit Thromboxan-Rezeptoren (TBXA<sub>2</sub>R) zu einer Aktivierung der Thrombozyten führt [17]. In humanen Thrombozyten wird die folgende Aggregation zum Großteil durch die Degranulation der ADP-enhaltenden  $\delta$ -Granula und daraus folgender Aktivierung und Aggregation über den P2Y<sub>12</sub>-Rezeptor vermittelt [18]. Wie beim Kollagen liegen Untersuchungen zu den Mechanismen der AS-induzierten Aktivierung bei equinen Thrombozyten nach Kenntnis der Autorin nicht vor.

Die im Folgenden kurz zusammengefassten Erkenntnisse zum Ablauf der zellulären Gerinnung stammen aus in vivo Untersuchungen mit Labortieren sowie in vitro-Untersuchungen mit humanen Thrombozyten. Entsprechende Untersuchungen mit equinen Thrombozyten liegen nach Kenntnis der Autorin nicht vor.

Die Scherkräfte im Blutfluss sorgen dafür, dass die Thrombozyten bedingt durch ihre geringe Größe immer nahe an der Gefäßwand treiben [19]. Bei Schädigungen des Endothels kommt das Subendothel mit dem Blut in Kontakt, wodurch frei zirkulierender von-Willebrand-Faktor (vWF) an die subendotheliale Matrix gebunden wird. Die Verbindung dieses gebundenen vWF mit dem Oberflächenintegrinkomplex GPIb-V-IX zirkulierender Thrombozyten verursacht eine zunächst noch instabile Bindung ("touch and go" [20]) im Bereich des Defekts (Abbildung 1A) [21]. Die stabile Thrombozytenadhäsion erfolgt insbesondere durch Bindung des Oberflächenintegrins GPVI an das subendotheliale Kollagen mit daraus resultierender Aktivierung und folgender Abflachung der letztlich immobilisierten Thrombozyten (Abbildung 1B) [22]. Die Aktivierung der Thrombozyten über GPIb-V-IX und GPVI sowie zusätzlich durch lösliche Agonisten wie ADP, Thrombin und AS induziert die Aktivierung verschiedener Oberflächenintegrine wie dem GPIIb-IIIa (Abbildung 1B) [22]. Die weitere Aggregation von Thrombozyten ist ein dynamischer Prozess, im Rahmen dessen zirkulierende Blutplättchen zumeist lediglich kurzfristig an diesen immobilisierten Thrombozyten anhaften, nur zu einem geringen Anteil endgültig gebunden werden und zur Thrombusbildung beitragen. Hierbei ist erneut die Bindung von GPIb-V-IX der zirkulierenden

## 2 Literaturübersicht

Zellen an den in diesem Fall in der Oberfläche der immobilisierten aktivierten Thrombozyten exprimierten vWF für die instabile Bindung verantwortlich (Abbildung 1C) [23]. Die stabile Bindung zirkulierender Thrombozyten wird schlussendlich maßgeblich durch die Vernetzung von aktiviertem GPIIb-IIIa durch Fibrinogen erreicht (Abbildung 1D) [23].

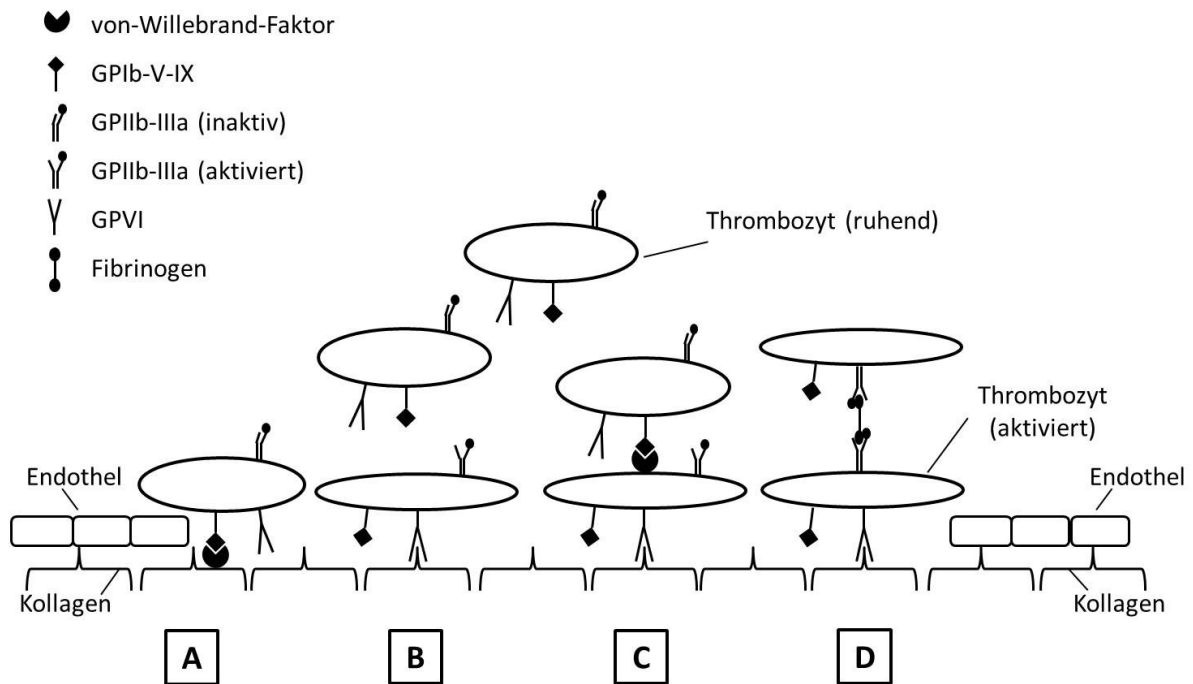


Abbildung 1: Stark vereinfachtes Schema der Thrombozytenaggregation an einem Endotheldefekt: vorübergehende Adhäsion zirkulierender Thrombozyten (A), stabile Bindung an Kollagen und Thrombozytenaktivierung (B), vorübergehende Adhäsion zirkulierender Thrombozyten (C), stabile Bindung zirkulierender Thrombozyten (D)

### 2.1.3 Die Rolle von Thrombozyten bei immunologischen und entzündlichen Prozessen

Erst mit Beginn des 21. Jahrhunderts wurde deutlich, dass Thrombozyten neben ihrer essentiellen Beteiligung an der Gerinnung eine substantielle Rolle im Rahmen von Entzündungen spielen, indem sie überwiegend die angeborene aber auch die erworbene Immunität beeinflussen. Die im Folgenden zusammengefassten Erkenntnisse stammen aus in vitro und in vivo Untersuchungen mit Thrombozyten von Menschen und Labortieren. Vergleichbare Untersuchungen mit equinen Thrombozyten liegen nach Kenntnis der Autorin nicht vor.

Kürzlich konnte gezeigt werden, dass Thrombozyten bei Mäusen insbesondere in Lebersinusoiden als wichtiger Unterstützer der unspezifischen Abwehr gegen eindringende Erreger über den Magen-Darm-Trakt dienen. Die Thrombozyten "scannen" hierbei permanent die Oberfläche von Kupfferzellen durch kurzzeitige Adhäsion für weniger als eine Sekunde mittels GPIIb-V-IX und dem von den Kupfferzellen präsentierten vWF. Präsentieren die Kupfferzellen zusätzlich ein Antigen, werden die Thrombozyten aktiviert, binden mittels GPIIb-IIIa fest an die Kupfferzellen und initiieren hierdurch eine Aggregation (s. 2.1.2). Die infizierte Kupfferzelle wird hierdurch umhüllt, eine Ausbreitung der Erreger verhindert sowie die Abtötung durch Immunzellen ermöglicht [20].

Neben den im Rahmen der Gerinnung beschriebenen Aktivierungsmechanismen werden die Thrombozyten auch durch direkten Kontakt mit Erregern (Bakterien, Viren und Parasiten) [24–28], Lipopolysacchariden (LPS) [29] sowie durch das Komplementsystem [30] aktiviert. Durch diese Aktivierung unterstützen die Thrombozyten das Immunsystem unter anderem in der Erregerbekämpfung:

- Humane und murine Thrombozyten initiieren nach Kontakt mit einem infektiösen Agens (z. B. *Listeria monocytogenes* [27], Adenoviren [28]) durch Bindung an CD8<sup>+</sup>-dendritische Zellen eine spezifische Immunabwehr. Diese Interaktion ist maßgeblich durch die Verbindung von CD40L der Thrombozyten und CD40 der Immunzellen vermittelt und induziert bei eher geringen Antigenkonzentrationen unter anderem eine vermehrte Immunglobulin G-Synthese.
- Antimikrobielle Peptide (Defensine) vorwiegend aus den  $\alpha$ -Granula humaner Thrombozyten besitzen eine bakterizide Wirkung [31].

## 2 Literaturübersicht

---

- Humane Thrombozyten binden *in vitro* mit dem Malaria-Erreger *Plasmodium falciparum* infizierte humane Erythrozyten und töten die intrazellulären Erreger. Die Wirkung ist sowohl von ADP-induzierter Thrombozytenaktivierung als auch von COX-vermittelter Aktivierung (s. 2.1.2, S. 6) abhängig: Unter Zusatz einer ADPase werden befallene Erythrozyten nicht gebunden und die Vermehrung von *Plasmodium falciparum* *in vitro* somit nicht verhindert. Thrombozyten humaner Probanden, welche über eine Woche zweimal täglich 4,2 mg/kg Acetylsalicylsäure (ASS) zur Hemmung der Thrombozytenfunktion oral eingenommen haben, binden *in vitro* ebenfalls nicht mehr an infizierte Erythrozyten. Bei mit *Plasmodium chabaudi* infizierten Mäusen resultierte eine Behandlung mit ASS in einer höheren Mortalität im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren [26].
- In Anwesenheit von LPS entstehen Thrombozyten-Leukozyten-Aggregate (TLA). Die TLA induzieren insbesondere in den Lebersinusoiden und Lungenkapillaren die Synthese neutrophiler extrazellulärer Traps (NETs) [29]. Bei diesen NETs handelt es sich um netzartige Gebilde aus Erbsubstanz (DNA) mit proteolytischer Aktivität, welche ein Einfangen und Abtöten zirkulierender Bakterien und Viren im Blut ermöglichen [24,29,32,33]. Die Aggregatbildung wird nach einer Aktivierung von Thrombozyten und Leukozyten und anschließender Vernetzung durch Fibrinogen vermittelt: Ein Fibrinogen-Molekül verbindet das aktivierte GPIIb-IIIa der Thrombozyten mit dem Makrophagen-Antigen 1 (MAC-1, Synonym CD11b/18) in der Membran von aktivierten neutrophilen Granulozyten. Die Aktivierung der Thrombozyten wird hierbei durch den Kontakt von LPS mit dem Toll-like-Rezeptor 4 (TLR4) der Thrombozyten induziert [29]. Die Aktivierung der neutrophilen Granulozyten und daraus resultierende Präsentation von MAC-1 in der Zellmembran erfolgt durch die Verbindung von aus den  $\alpha$ -Granula der Thrombozyten nach Aktivierung in die Zellmembran integriertem P-Selectin und P-Selectin Glykoprotein Ligand-1 (PSGL-1) in der Membran der neutrophilen Granulozyten [34,35].

Insbesondere die auch als Immunothrombosis bezeichnete Interaktion von Thrombozyten und neutrophilen Granulozyten zieht jedoch auch negative Folgen nach sich. So schädigt die Adhäsion von TLA an das Gefäßendothel die Endothelzellen mit der Folge erhöhter Gefäßpermeabilität und letztlich Ödembildung [31]. Ursache ist hier vornehmlich

## 2 Literaturübersicht

---

eine durch die Aggregatbildung vermittelte gesteigerte Synthese von Sauerstoffradikalen durch die neutrophilen Granulozyten [19,36]. Die Adhäsion der TLA an Endothelzellen erfolgt insbesondere nach Aktivierung der Endothelzellen durch CD40L in der Membran aktivierter Thrombozyten aber auch durch die im Plasma gelöste Form des Glykoproteins, des sCD40L [37,38]. Die Sekretion von Chemokinen wie zum Beispiel CXCL4 (C-X-C Motif Ligand 4; Synonym: platelet factor 4), CXCL7 (C-X-C Motif Ligand 7; Synonym: neutrophil-activating peptide-2) und CCL5 (C-C Motif Ligand 5; Synonym: RANTES) aus den  $\alpha$ -Granula der Thrombozyten verstärkt darüber hinaus die Chemotaxis für Neutrophile sowie Aktivierung und Adhäsion der Granulozyten an das Endothel [39]. Der Einfluss der Thrombozyten an der Gefäßentzündung ist nicht unerheblich: Im Mausmodell konnten nach induzierter Entzündung mittels Angiotensin II histologisch nachweisbare Veränderungen wie eine Infiltration mit Makrophagen und eine Degradation der Lamina elastica sowie die Expression inflammatorischer Zytokine und Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) gezeigt werden. Wurden die Mäuse mit dem Thienopyridin Clopidogrel behandelt, welches über eine Blockade des P2Y<sub>12</sub>-Rezeptors zu einer Funktionshemmung der Thrombozyten führt, konnten signifikant geringere Entzündungsanzeichen im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe nachgewiesen werden [40].

Neben den schädigenden Effekten auf die Endothelzellen können die TLA insbesondere in der Mikrozirkulation einen vollständigen Gefäßverschluss mit nachfolgender Ischämie verursachen [33]. Auch die antimikrobiellen Peptide aus den  $\alpha$ -Granula haben nicht nur bakterizide Wirkung: So induziert Granzyme B bei Mäusen nach experimentell induzierter polymikrobieller Peritonitis durch Ligierung und Punktion des Caecums eine Apoptose von Zellen in Milz, Niere und Lunge. Eine Hemmung der Thrombozytenfunktion mittels Blockade des GPIIb-IIIa durch Eptifibatid führt zu einer signifikanten Reduktion der Apoptose von ca. 66 % mit einer signifikant verlängerten Überlebenszeit behandelter Mäuse im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe [41].

Vor wenigen Jahren konnte gezeigt werden, dass Thrombozyten von Menschen mit Sepsis gespleißte prä-mRNA des Gewebefaktors exprimieren, wodurch bei den betroffenen Patienten die Gewebefaktor-induzierte prokoagulatorische Aktivität erhöht wurde. Bei gesunden Individuen konnte die gespleißte prä-mRNA nicht nachgewiesen werden. In vitro wiederum konnte die Expressierung durch Bakterien,  $\alpha$ -Toxin von Streptokokken sowie LPS an Thrombozyten gesunder Probanden ebenfalls induziert werden [42].

## 2 Literaturübersicht

---

Diese kurz zusammengefassten Mechanismen haben beim Menschen besonders im Rahmen einer Sepsis Anteil am Auftreten teilweise lebensbedrohender Komplikationen mit Schäden vor allem an Niere und Lunge bis zum multiplen Organversagen. Die Verabreichung von Medikamenten zur Thrombozytenfunktionshemmung wie dem Clopidogrel kann den Krankheitsverlauf sowie die Mortalität beeinflussen: So ergab eine Meta-Analyse zu Verlauf und Mortalität bei ambulant erworbenen Pneumonien (community-acquired pneumonia, CAP), dass Lungenschäden, Notwendigkeit und Dauer einer mechanischen Beatmung sowie die Mortalität bei Patienten unter Therapie mit Clopidogrel im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe signifikant geringer waren [43]. Die retrospektive Analyse von 615 in die Intensivstation einer tertiären Klinik überwiesenen Patienten zeigte, dass unabhängig vom Grund der Einweisung eine bestehende Medikation mit Medikamenten zur Thrombozytenfunktionshemmung (ASS, Clopidogrel) die Odds Ratio der Mortalität um Faktor 5 reduziert war. Dieser Effekt zeigte sich insbesondere bei schwerer erkrankten Patienten mit höheren APACHE II-Scores (Acute Physiology and Chronic Health Evaluation) [44].

Eine Aktivierung der plasmatischen Gerinnung sowie Mikrothrombenbildung und daraus resultierende Organschäden im Rahmen akuter systemischer Entzündungen konnten beim Pferd bereits gezeigt werden. Bei adulten Pferden mit Erkrankungen des Magen-Darmtraktes, welche eine Laparotomie notwendig machten, war die aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT) im Vergleich zu einer Kontrollgruppe bereits präoperativ verlängert. Der operative Eingriff verursachte einen signifikanten Anstieg der Serumkonzentration der Fibrin-Monomere und der D-Dimere sowie einen signifikanten Abfall der Konzentration an Antithrombin III [45]. Gleichartiges ergaben Untersuchungen an neugeborenen Fohlen mit schwerer Sepsis: Auch hier waren aPTT und Prothrombinzeit (PT) bei den septischen Fohlen im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant verlängert, die Konzentration der D-Dimere signifikant erhöht und die von Antithrombin III (ATIII) signifikant erniedrigt. Diese Veränderungen waren darüber hinaus mit einer hohen Mortalität verbunden [46].

Bei Pferden mit schweren gastrointestinalen Erkrankungen (intestinale Ischämie, Enteritis) konnten bei etwa 40 % der Patienten zahlreiche (Grad 2-4/4) Mikrothromben in Niere, Leber und insbesondere Lunge nachgewiesen werden. In einer Kontrollgruppe mit 11 Pferden mit weniger schweren Erkrankungen (Obstipationen, Dickdarmverlagerungen) waren

## 2 Literaturübersicht

---

bei keinem Patienten Mikrothromben vorhanden, in einer Gruppe von 16 mutmaßlich klinisch unauffälligen Schlachtpferden lagen bei einem Pferd moderate (Grad 2/4) Fibrinablagerungen vor [47]. Bei neugeborenen Fohlen mit schwerer Septikämie waren die Mikrothromben bei einer deutlich höheren Zahl der Patienten (28/32) nachweisbar, auch hier war bei 97 % der Fohlen insbesondere die Lunge betroffen [48].

Welche Rolle eine Thrombozytenaktivierung in diesen Situationen beim Pferd spielt, ist bislang weitgehend unklar. So liegt lediglich eine sehr übersichtliche Anzahl von Untersuchungen zur Thrombozytenaktivierung im Rahmen immunologischer und entzündlicher Prozesse vor. In vitro führt die Anwesenheit von LPS beim Pferd zu einer Aktivierung von Thrombozyten [49]. Bei mit Oligofruktose bzw. Stärke induzierter Hufrehe konnten eine Aktivierung von Thrombozyten sowie erhöhte Serumkonzentrationen von LPS ebenfalls nachgewiesen werden, so dass die Autoren mutmaßten, dass aktivierte Thrombozyten eine Rolle in der Entstehung einer fütterungsbedingten Hufrehe spielen könnten [50,51]. Aktivierte Thrombozyten wurden auch in Zusammenhang mit viralen Infektionskrankheiten dokumentiert: In vivo bei Ponys mit experimentell induzierter equiner infektiöser Anämie [52] sowie in vitro in Anwesenheit equiner Herpesviren Typ 1 [53]. Eine Verminderung der mittleren Granularität der Thrombozyten (MPC, mean platelet component concentration) als Zeichen einer Degranulation infolge einer Aktivierung konnte beim Pferd im Rahmen systemischer Entzündungen ebenfalls nachgewiesen werden [54].

Entzündliche Veränderungen von Venen durch Venenkatheter sind beim Pferd eine regelmäßig auftretende Komplikation im Rahmen systemischer Entzündungen [55,56], und es erscheint in Anbetracht der Beteiligung von Thrombozyten an entzündlichen Prozessen bei Mensch und Labortier sehr wahrscheinlich, dass die Aktivierung von Thrombozyten in der Entstehung dieser entzündlichen Veränderungen beteiligt ist.

### 2.2 Klinische Testverfahren zur Thrombozytenbiologie

Das erste klinische Testverfahren zur Thrombozytenfunktion beim Menschen war die 1910 von Duke eingeführte in vivo Blutungszeit. Nach einem Hautschnitt am Unterarm oder an der Ohrmuschel wurde die Zeit gemessen, bis die Blutung zum Stillstand kam [57]. Die Technik wurde von Ivy verfeinert und wurde bis in die 1990iger Jahre als Screeningtest zur Thrombozytenfunktion empfohlen [58,59]. Es wurde jedoch gezeigt, dass die Messergebnisse eine schlechte Wiederholbarkeit aufweisen und zudem Blutungszeit und Blutungsneigung insbesondere in Zusammenhang mit operativen Eingriffen nicht korrelieren [60,61]. Seit einigen Jahren wird aus diesem Grund der Einsatz der in vivo Blutungszeit als Screeningtest zur Thrombozytenfunktion beim Menschen nicht mehr empfohlen [62].

In der Veterinärmedizin wurde die in vivo Blutungszeit ebenfalls etabliert und in Untersuchungen bei Pferden eingesetzt [63,64]. Anfang des 21. Jahrhunderts konnte jedoch von Segura et al. auch für das Pferd eine schlechte Wiederholbarkeit gezeigt werden [65]. In Anlehnung an die Empfehlungen der Humanmedizin erscheint der Autorin die Blutungszeit aus diesem Grund wenig geeignet, die Thrombozytenfunktion des Pferdes valide zu ermitteln.

Seit Beginn der 1950iger Jahre wurden in der Human- und Veterinärmedizin eine Vielzahl von labordiagnostischen Methoden zur Thrombozytenzählung (s. 2.2.1) und Thrombozytenfunktion (s. 2.2.2) etabliert, welche validere Ergebnisse liefern und zudem weniger invasiv für den Patienten sind.

#### 2.2.1 Thrombozytenzählung

##### 2.2.1.1 Methodik

Bis in die späten 1950iger Jahre wurde die Thrombozytenzahl manuell in einer Neubauer- oder Thoma-Zählkammer aus einer verdünnten Blutprobe mit Phasenkontrastmikroskopie ermittelt. Die Firmen Coulter Electronics Inc. und Technicon Instruments etablierten die ersten Messinstrumente, welche auf der Basis von Messungen im kontinuierlichen Durchfluss arbeiteten. Zwei bis heute weitverbreitete Messprinzipien wurden hierbei etabliert: Von Technicon die Messung mittels optischer Lichtbrechung und -streuung (optoelektrisch) sowie von Coulter die Messung mittels Widerstand (Impedanz). Die Messungen beschränkten sich zunächst auf Erythrozyten und deren Indizes (z. B. Volumen,

## 2 Literaturübersicht

---

Hämoglobingehalt). In den 1970iger Jahren konnten dann durch technische Weiterentwicklungen auch Leukozyten und Thrombozyten gezählt werden sowie durch die Einführung zytochemischer Färbeverfahren Zellpopulationen differenziert werden.

Bei den in der modernen Hämatologie verwendeten optoelektrischen Geräten kommen verschiedene Laser (Diodenlaser, Halbleiterlaser) zum Einsatz, welche auf Basis einer Streulichtmessung im kontinuierlichen Durchfluss arbeiten. Die Zellen passieren hierbei einzeln in einer Kapillare einen Laserstrahl. Der Laserstrahl wird an den Zellen gestreut, wobei das auf einer Fozelle auftreffende Streulicht proportional der Zellgröße und die Anzahl der Impulse proportional der Zellzahl ist. Beim ADVIA® 120 (Bayer, jetzt Siemens Healthcare) kommt ein Diodenlaser (670 nm) zum Einsatz, das Gerät wurde mittels tierartspezifischer Softwareadaptation unter anderem für die Tierart Pferd validiert [66,67]. Der in den eigenen Untersuchungen eingesetzte ADVIA® 2120 ist die Weiterentwicklung des ADVIA® 120, wobei ein methodischer Unterschied lediglich darin besteht, dass beim ADVIA® 2120 eine cyanfreie Hämoglobinfärbung etabliert wurde.

In einigen Geräten der Firma Sysmex wird die optische Messung durch fluoreszierende Methoden zur Identifizierung der Thrombozyten ergänzt. Die hierbei verwendeten Farbstoffe Polymethin bzw. Oxazin durchdringen die intakte Zellmembran und färben RNA [68]. Zunächst erfolgten die Messungen in der XE-Serie im Retikulozyten-Kanal, die Geräte der neusten Generation (XN) besitzen einen separaten Messkanal [69,70]. Wenngleich das für hämatologische Untersuchungen in der Veterinärmedizin verfügbare Modell XT-2000iV mit speziesspezifischer Software mit der fluoreszierenden Methodik ausgestattet ist, ist eine Zählung der Thrombozyten mittels Kombination aus optischer und fluoreszierender Methodik nicht möglich. Die kombinierte Messmethodik wird lediglich zum Nachweis retikulierter Thrombozyten eingesetzt (s. 2.2.2.3.5, S. 29).

Bei auf Impedanz beruhenden Methoden kommt die Eigenschaft von Blutzellen als schlechte elektrische Leiter zum Einsatz. In einer elektrisch gut leitenden Suspension werden die Zellen im kontinuierlichen Durchfluss zwischen 2 Elektroden mit Gleichspannung durchgeführt. Die nicht-leitenden Zellen führen zu einer kurzzeitigen Änderung des Widerstandes zwischen den Elektroden, wobei der Widerstand als elektrischer Impuls

## 2 Literaturübersicht

---

gemessen und gezählt wird. Das Ausmaß der Änderung des Widerstandes ist proportional zum Volumen der Zelle, so dass neben einer absoluten Zellzahl auch das zugehörige Volumen gemessen werden kann. Verschiedene Geräte basierend auf der Methodik der Impedanz (Mythic 18, Sysmex F-800, Sysmex poCH-100iV, CA530-VET, Hämat-8) wurden zur Zellzählung in equinen Blutproben validiert [67,71–75]. Die vorgenannten Geräte waren nicht Gegenstand der eigenen Untersuchungen.

Einige Hämatologiesysteme verwenden sowohl Impedanz als auch optoelektrische Messmethoden, wobei für die Thrombozytenzahl in der Regel nur das Ergebnis einer Methodik - zumeist der Impedanz - vom Gerät ausgegeben wird. Auch hier wurden Geräte verschiedener Hersteller (Sysmex XT-2000iV, Abbott Cell-Dyn 3500, Idexx ProCyte DX) für die Tierart Pferd validiert [76–78]. Goldmann et al. und Giordano et al. stellten hierbei fest, dass die Thrombozytenzahlen in equinen Blutproben gemessen mittels Impedanz mit der Idexx ProCyte DX bzw. dem Hämat 8 im Vergleich zu den optoelektrischen Messungen mit dem ADVIA® 120/2120 signifikant höher waren [75,78]. Giordano et al. sprachen dem ADVIA® 120 hierbei eine bessere Messgenauigkeit zu, eine Kontrolle der Thrombozytenzahl fand jedoch ohne Zählkammer, sondern lediglich mittels mikroskopischer Schätzung der Zellzahl statt [75]. Bei Goldmann et al. wurden keine manuellen Zählungen durchgeführt [78]. Lilliehöök und Tvedten stellten bei ihrer vergleichenden Untersuchung zur Thrombozytenzählung mittels optischer Methoden mit dem Sysmex XT-2000iV und der Impedanzmessung mit dem Cell-Dyn 3500 fest, dass aufgrund der geringen Größe equiner Thrombozyten mikrozytäre Erythrozyten bei der Impedanzmessung fälschlich als Thrombozyten gezählt wurden [77]. In den eigenen Untersuchungen wurden die Geräte mit kombinierten Messungen durch optische und Impedanzmethoden nicht eingesetzt.

In der Veterinärmedizin wird in der Hämatologie mit der Quantitativen Buffy Coat Analyse (QBC) eine weitere Methode zur Zellzählung und -differenzierung eingesetzt. Zellpopulationen werden hier aufgrund ihrer Auftrennung anhand der Dichte nach Zentrifugation von Vollblut in einer Kapillare sowie ihrer Fluoreszenz nach Färbung mit Acridinorange differenziert. Der IDEXX VetAutoread™ wurde für die Analyse von equinen Blutproben etabliert [79], war jedoch nicht Gegenstand der eigenen Untersuchungen.

## 2 Literaturübersicht

---

Bis zum Anfang des 21. Jahrhunderts war in der Humanmedizin gemäß der Expertenkommission des *International Council for Standardization in Haematology* die Thrombozytenzählung mittels Phasenkontrastmikroskopie als Goldstandard festgelegt [80]. Mittlerweile wurde als Goldstandard die Zählung mittels immunologischer Fluoreszenz-Durchflusszytometrie definiert. Neben der Zellzählung mittels optoelektrischer Methoden werden die Thrombozyten hierbei zusätzlich durch fluoreszierende Antikörper gegen spezifische Oberflächenproteine der Thrombozyten (CD41/61) markiert und die Zellzahl aus dem Verhältnis fluoreszierender Thrombozyten zur Zahl der Erythrozyten ermittelt [81]. Die Methodik wurde in das CELL-DYN Sapphire der Firma Abbott integriert und steht somit vollautomatisch in der humanen Routinediagnostik zur Verfügung. In einer Untersuchung humaner Patienten mit Leukämie und disseminierter intravasaler Koagulopathie (DIC) konnte gezeigt werden, dass die Messungen des CELL-DYN Sapphire eine sehr gute Korrelation ( $r = 0,971$ ) mit dem Goldstandard aufwiesen. Es lag jedoch ein geringer proportionaler Fehler vor, der sich im Mittel in ca. 20 % niedrigeren Zellzahlen des CELL-DYN Sapphire widerspiegelte [82]. Das Gerät wurde bezüglich seiner Eignung für die Thrombozytenzählung in der Veterinärmedizin nach Kenntnis der Autorin bislang nicht geprüft.

In der Untersuchung von Kim et al. wurden neben dem CELL-DYN Sapphire auch der ADVIA® 2120, der Sysmex XE-2100 und der Coulter LH 750 mit dem Goldstandard verglichen. Hierbei zeigten die Messungen aller Geräte ebenfalls eine exzellente Korrelation mit dem Goldstandard (ADVIA® 2120:  $r = 0,968$ ). Die Messungen am ADVIA® 2120 wiesen jedoch den geringsten proportionalen Messfehler und den geringsten prozentualen Unterschied der Messwerte im Vergleich zum Goldstandard auf [82].

Eine dem Goldstandard nahekommende modifizierte Immunfluoreszenzmessung wurde beim Pferd bislang nicht im Vollblut, sondern lediglich im Thrombozyten-reichen Plasma (platelet-rich-plasma, PRP) durchgeführt. O'Shea et al. berechneten hierbei die Zellzahl der Plättchen nicht aus dem Verhältnis zur Zahl der Erythrozyten, sondern im Vergleich zu einer definierten Zahl an fluoreszierenden Beads, welche der Probe zugesetzt waren. Signifikante Unterschiede der Zellzahlen zwischen der Immunfluoreszenzmessung und der optischen Zählung am ADVIA® 2120 konnten sie im PRP nicht nachweisen [83].

### 2.2.1.2 Antikoagulantien

Als Antikoagulans wird in der Hämatologie routinemäßig Kalium-EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure) verwendet [84]. Bei Verdacht auf eine EDTA-induzierte Pseudothrombozytopenie (s. 2.2.1.3) kommt u.a. Zitrat als Antikoagulans zum Einsatz. Hierbei ist zu berücksichtigen, dass die entsprechenden Entnahmegefäße ein standardisiertes Volumen Natriumzitrat (3,2 %) enthalten, welches bei korrekter Befüllung des Entnahmeröhrchens zu einer Verdünnung der Blutprobe im Verhältnis 1:10 führt. Bei der Verwendung von Zitratblut ist dieser Verdünnungseffekt zu beachten, ermittelte Zellzahlen müssen zum direkten Vergleich mit den Ergebnissen aus EDTA-Proben mit dem Faktor 1,1 multipliziert werden. Da bei einzelnen Individuen sehr selten eine Pseudothrombozytopenie auch im Zitrat auftreten kann, werden seit wenigen Jahren beim Menschen auch wieder Probengefäße mit Magnesiumsulfat (Mg-Sulfat) als Antikoagulans in der Hämatologie verwendet [85].

Die Verwendung von Kalium-EDTA und Zitrat als Antikoagulans ist in der Untersuchung equiner Thrombozyten etabliert [66,67,86]. Untersuchungen zur Verwendung von Mg-Sulfat als Antikoagulans beim Pferd liegen nach Kenntnis der Autorin nicht vor.

### 2.2.1.3 Thrombozytopenie

Thrombozytopenien werden beim Pferd eher selten diagnostiziert. In einer retrospektiven Untersuchung aller Patienten einer US-amerikanischen Universitätsklinik über einen Zeitraum von 5 Jahren wurde eine Prävalenz von 1,49 % ermittelt [87]. Die pathophysiologische Ursache der Thrombozytopenie kann eine verminderte Bildung im Knochenmark z. B. bei der equinen infektiösen Anämie [88], ein erhöhter Verbrauch z. B. im Rahmen einer disseminierten intravasalen Koagulopathie (DIC) [89], eine immunvermittelte Zerstörung der Zellen [90–93] oder eine Kombination aus mehreren Ursachen sein.

Das Phänomen einer Thrombozytenaggregation in Anwesenheit von EDTA wurde 1969 beim Menschen erstmals beschrieben [94] und der Begriff EDTA-Pseudothrombozytopenie (EDTA-PTCP) 1973 eingeführt [95]. Bei Verwendung von Zitrat oder Heparin als Antikoagulans war die Aggregation bei den dort beschriebenen Einzelindividuen nicht vorhanden. In wenigen Einzelfällen wurde hingegen auch eine *in vitro* Aggregation mit Zitrat und Heparin beschrieben [96]. Der genaue pathophysiologische Mechanismus des Phänomens ist nach wie vor nicht

geklärt. Es wird jedoch vermutet, dass EDTA eine Konformationsänderung eines Integrins der Thrombozyten (GPIIb-IIIa) verursacht, hierdurch gegen diesen Rezeptor gerichtete IgG- und IgM-Antikörper im Plasma an den Rezeptor binden, was zu einer Aktivierung des Thrombozyten mit folgender Aggregation und Verklumpung führt [96–98]. Die Beteiligung des GPIIb-IIIa und das Vorhandensein entsprechender Antikörper im Plasma werden durch die Beobachtung bestätigt, dass Thrombozyten von Patienten mit einer Glanzmann-Erkrankung, denen das Integrin GPIIb-IIIa fehlt, nach Zugabe von Plasma von Menschen mit EDTA-induzierter Thrombozytopenie nicht aggregieren [98]. Die Aggregation ist bei 0 - 4 °C am stärksten ausgeprägt und steigt auch bei Raumtemperatur mit zunehmender Lagerungsdauer [99,100]. Beim Menschen werden folgende Kriterien zur Bestätigung einer EDTA-PTCP gefordert: Thrombozytenzahl  $< 100 \times 10^9/l$ ; Aggregation lediglich in Anwesenheit von EDTA bei Raumtemperatur; zeitabhängiger Abfall der Thrombozytenzahl im EDTA-Blut; Nachweis von Thrombozyten-Aggregaten im Blutaussstrich oder automatisch (z. B. mittels Laserzytometrie) sowie Fehlen klinischer Anzeichen einer Thrombozytenfehlfunktion [101]. Neben den Thrombozytenaggregaten (Clumps) können am ADVIA® 2120 die Variablen MPV (Mean Platelet Volume) und PDW (Platelet Volume Distribution Width) hilfreich in der Identifizierung einer EDTA-PTCP beim Menschen sein: Alle 3 Variablen sind signifikant erhöht [102].

Die EDTA-induzierte Pseudothrombozytopenie wurde beim Pferd erstmals 1993 in einem Fallbericht beschrieben [103]. Daten über die Prävalenz in der Pferdepopulation fehlen.

### 2.2.1.4 Thrombozytose

Thrombozytosen werden beim Pferd ebenfalls eher selten diagnostiziert. In einer retrospektiven Untersuchung aller Patienten einer US-amerikanischen Universitätsklinik über einen Zeitraum von 5 Jahren wurde eine Prävalenz von 1 % ermittelt [104].

Thrombozytosen können angeboren oder erworben sein. Angeborene Thrombozytosen sind beim Menschen extrem selten [105] und beim Pferd nach Kenntnis der Autorin nicht beschrieben. Bei den erworbenen Thrombozytosen unterscheidet man beim Menschen zwischen einer primären Thrombozytose, der sogenannten essentiellen Thrombozythämie, einer Sonderform der primären Thrombozytose, sowie der reaktiven bzw. sekundären Thrombozytose [105]. In ca. 88 % der Fälle handelt es sich beim Menschen um sekundäre Thrombozytosen, zumeist in Folge einer umfangreichen Gewebeerstörung nach operativen Eingriffen, in Zusammenhang mit akuten Infektionen (z. B. Pneumonie) sowie bei Neoplasien

## 2 Literaturübersicht

---

und chronischen Entzündungen [106]. Die vermehrte Bildung der Thrombozyten ist bei den sekundären Thrombozytosen Ausdruck der systemischen Akut-Phase-Reaktion mit Erhöhung der Konzentrationen an thrombopoetischen Faktoren, insbesondere dem Interleukin 6, welches in der Leber die Synthese von Thrombopoetin induziert [105]. Eine Unterscheidung zwischen primärer und sekundärer Thrombozytose anhand labordiagnostischer Blutvariablen ist nicht möglich, bei den primären Verlaufsformen treten jedoch signifikant häufiger Thrombozytenzahlen über  $1000 \times 10^9/l$  auf [106].

### 2.2.2 Thrombozytenfunktion

Untersuchungen zur Thrombozytenfunktion werden bei Patienten unter anderem zur Erkennung von prothrombotischen Zuständen sowie Blutungsneigungen eingesetzt und sind beim Menschen zudem in der Überwachung von gerinnungshemmenden Therapien bei Patienten mit Herzinfarkt- und Schlaganfallrisiko etabliert. Thrombozyten zirkulieren im Blut in einer ruhenden, diskoiden Form. Die Aktivierung von Thrombozyten führt zu Änderungen in Form und Oberfläche der Zellen und letztendlich zur Aggregation (s. 2.1.2, S. 6). Zahlreiche labordiagnostische Methoden stehen zur Verfügung, um die Veränderungen im Rahmen der Aktivierung nachzuweisen: Hierzu gehören die Ermittlung von Größe und Granularität der Thrombozyten (s. 2.2.2.1), Verfahren basierend auf dem Prinzip der Aggregation (s. 2.2.2.2), der Nachweis von Glykoproteinen in der Zellmembran und RNA im Innern der Thrombozyten (s. 2.2.2.3) sowie die Messung von aus der Zellmembran gelösten Proteinen im Serum und Plasma (s. 2.2.2.4).

#### 2.2.2.1 Größe und Granularität der Thrombozyten

Neben der Zählung der Thrombozyten ermitteln moderne Hämatologiesysteme auch die Größe der Thrombozyten und berechnen das mittlere Zellvolumen (MPV, Mean Platelet Volume). Der ADVIA® 120/2120 kann darüber hinaus die Granularität der Thrombozyten quantifizieren und berechnet daraus die mittlere Granularität der Zellen (MPC, Mean Platelet Component Concentration). Thrombozytenaktivierung führt beim Menschen *in vitro* zu einer Degranulation insbesondere der  $\alpha$ -Granula und hierdurch zu einer Abnahme des brechungsrelevanten Inhaltes der Zellen mit Folge eines abnehmenden MPC [107–109]. Eine Aktivierung der Thrombozyten wird darüber hinaus auch durch die Lagerung der Blutprobe verursacht. So kommt es bei mit  $K_3$ -EDTA antikoagulierten Proben bereits 60 Minuten nach Blutentnahme zu einer signifikanten Abnahme des MPC bei Mensch [109,110] und Pferd [86].

Neben der Granularität wird auch der MPV im Rahmen einer Aktivierung humaner Thrombozyten beeinflusst. Hierbei ist die Messmethode der Geräte zu berücksichtigen: Messungen mittels optoelektrischer Methoden und mittels Impedanz korrelieren bezüglich des MPV insgesamt sehr mäßig, so dass die Ergebnisse aus Studien mit nicht identischer Messtechnik nicht vergleichbar sind [111,112]. Giordano et al. konnten dies auch bei equinen Blutproben zeigen: Der MPV war mit der am ADVIA® 120 gemessenen optischen Methode im

Mittel signifikant niedriger als an dem mittels Impedanz messenden Hemat 8 (Seac). Zudem konnte ein proportionaler Fehler nachgewiesen werden [75].

Beim optischen Messverfahren des ADVIA® 120 steigt der MPV nach Aktivierung mit Thrombin sowohl in mit Zitrat als auch mit K<sub>3</sub>-EDTA antikoagulierten humanen Proben signifikant an [109]. Entsprechend der Abweichungen im MPC unterliegt jedoch auch der MPV Lagerungseinflüssen: In mit K<sub>3</sub>-EDTA antikoagulierten Proben steigt der MPV signifikant innerhalb von 4 bis 6 Stunden sowohl bei Mensch [110] als auch bei Pferd [86]. Bei der Verwendung von Zitrat als Antikoagulans konnte von Prins et al. bei equinen Thrombozyten jedoch ein gegenteiliger Effekt der Lagerung beobachtet werden: Es kam zu einer geringgradigen Verringerung des MPV [86].

### 2.2.2.2 Thrombozytenaggregation

In den frühen 1960iger Jahren führte O'Brien erste Untersuchungen zur Thrombozytenaggregation durch. Nach Aktivierung mit ADP, Thrombin und Kokain aggregierten die Zellen an der Glasoberfläche des Reaktionsgefäßes, der Grad der Aktivierung wurde durch die Abnahme der Zahl an Thrombozyten im Reaktionsgefäß bestimmt [113]. Das Prinzip kommt auch heute noch mit dem Gerät Ichor Plateletworks (Helena Biosciences) zum Einsatz, wird jedoch in der Humanmedizin wenig verwendet [114]. Untersuchungen zur Verwendung des Gerätes bei Equiden liegen nach Kenntnis der Autorin nicht vor und waren auch nicht Teil der eigenen Untersuchungen.

Zur besseren Quantifizierung der Thrombozytenfunktion wurde ebenfalls in den 1960iger Jahren wiederum durch O'Brien sowie durch Born die Methode der Lichttransmissionsaggregometrie (LTA) etabliert [115,116]. Im Unterschied zur Aggregation an einer Fremdoberfläche wie Glas wird bei dieser Methode optisch die Trübung einer Plättchensuspension (PRP, platelet-rich-plasma) gemessen. Durch Aktivierung und daraus resultierende Aggregation der Thrombozyten miteinander wird die Trübung der Suspension vermindert. Zur Quantifizierung der Trübung wird Thrombozyten-armes-Plasma (PPP, platelet-poor-plasma) verwendet, für welches eine Lichttransmission von 100 % definiert ist. Das Verfahren der LTA wurde bereits in zahlreichen equinen Studien eingesetzt [3,14,93,117–135], war jedoch nicht Teil der eigenen Untersuchungen.

Die Verwendung von PRP ist jedoch zeitaufwändig und in Bezug auf die Quantifizierung der Funktion nicht ganz unproblematisch: Die notwendige Zentrifugation bei der Herstellung

## 2 Literaturübersicht

---

führt bereits zu einer Aktivierung der Thrombozyten und kann darüber hinaus einen möglichen Verlust von Subpopulationen der Thrombozyten nach sich ziehen, zudem fehlen der Suspension Erythrozyten und Leukozyten, welche die Thrombozytenfunktion in vivo beeinflussen [37,136].

So wurden zunehmend Verfahren zur Verwendung von Vollblut in der Diagnostik der Thrombozytenfunktion wie z. B. die Impedanzaggregometrie, der VerifyNow, der PFA-100/200, die Thrombelastographie und der Cone and Platelet Analyzer (IMPACT-R) etabliert.

Die Methodik der Impedanzaggregation von Thrombozyten im Vollblut als Indikator einer Thrombozytenaktivierung wurde Ende der 1970iger Jahre für den Menschen von Cardinal und Flower etabliert [137]. Werden Thrombozyten in vitro durch die Zugabe eines Agonisten wie z. B. Thrombin, ADP oder Kollagen aktiviert, aggregieren sie an Fremdoberflächen, im Falle der Impedanzaggregometrie sind dies stromführende Drähte. Durch die Aggregation der Thrombozyten an den Drähten wird der Stromfluss vermindert, die Impedanz folglich erhöht, was kontinuierlich aufgezeichnet wird. Der Multiplate<sup>®</sup> Analyzer (Roche, ehemals Dynabyte) stellt eine Weiterentwicklung der Methodik mit Einführung der Mehrfach-Elektroden Aggregometrie dar: Jede Blutprobe unterliegt hierbei einer Doppelmessung in einer Einmalküvette und es können zeitgleich Proben mit verschiedenen Agonisten untersucht werden [138]. Das Gerät ist in der Humanmedizin insbesondere im Rahmen der Diagnostik der Thrombozytenfunktionshemmung durch Medikamente (z. B. Acetylsalicylsäure, Clopidogrel) sicher etabliert [139–142]. Der Hersteller des Gerätes empfiehlt die Verwendung von Hirudin als Antikoagulans [143]. Dies wurde in verschiedenen humanen Untersuchungen bestätigt [144–146].

Kürzlich konnte gezeigt werden, dass sich beim Menschen mit dem Multiplate<sup>®</sup> Analyzer eine reduzierte Aggregation im Rahmen einer schweren Sepsis nachweisen lässt. Hierbei korrelierte zudem die reduzierte Aggregation in vitro mit dem Schweregrad der Erkrankung und war assoziiert mit einer höheren Mortalität [147,148].

In der Veterinärmedizin wurde der Multiplate<sup>®</sup> Analyzer bislang in Untersuchungen bei Affen [149,150], Braunbären [151], Hunden [152–160], Katzen [161–164], Ratten [154,165], Schafen [166,167] und Schweinen [168–171] eingesetzt. Auch in veterinärmedizinischen Studien wurde die Verwendung von Hirudin als Antikoagulans überprüft und im Vergleich zu Zitrat als besser geeignet beurteilt [149,152,154,157,166].

## 2 Literaturübersicht

---

Beim Pferd wurde das Prinzip der Vollblutimpedanzaggregometrie bereits vereinzelt eingesetzt [118,172], Untersuchungen mit dem Multiplate® Analyzer wurden nach Kenntnis der Autorin jedoch bislang nicht durchgeführt.

Der VerifyNow (Accumetrics) basiert unter Verwendung von Vollblut grundsätzlich auf dem Prinzip der LTA. Die Aggregation der Thrombozyten erfolgt hierbei an mit Fibrinogen beschichteten Latexpartikeln. Durch Verwendung von Fertigküvetten mit den Agonisten ADP, Arachidonsäure und Thrombin-receptor-activating-peptide (TRAP) findet der VerifyNow insbesondere in der Überwachung gerinnungshemmender Therapien beim Menschen Verwendung [114]. Untersuchungen zur Verwendung des Gerätes bei Equiden liegen nach Kenntnis der Autorin nicht vor und waren auch nicht Teil der eigenen Untersuchungen.

Beim PFA-100/200 (Siemens) wird die Aggregation der Thrombozyten nach Aktivierung der Zellen durch Kombination von Scherkraft und Agonisten überprüft. Die Thrombozyten aggregieren hierbei in einer Einmalmesszelle an einer mit den Agonisten beschichteten Membran (Kollagen/ADP, Kollagen/Epinephrin, ADP/PGE<sub>1</sub>/Kalzium) und verursachen hierdurch den vollständigen Stopp des Blutflusses. Gemessen wird die Zeit bis zum Sistieren des Blutflusses, weshalb die Methodik vom Hersteller auch als "in-vitro-Blutungszeit" bezeichnet wird. Das Gerät wird in der Humanmedizin ebenfalls insbesondere in der Überwachung gerinnungshemmender Therapien eingesetzt [114]. Der PFA-100 wurde bezüglich seiner Verwendung beim Pferd von Segura et al. überprüft. Die Autoren stellten fest, dass die Messzellen mit Kollagen/ADP für den Einsatz beim Pferd geeignet sind, die Messzellen mit Kollagen/Epinephrin aufgrund sehr großer Streuung der individuellen Messzeiten jedoch eher weniger [173]. Die Messzellen mit Kollagen/ADP kamen in weiteren equinen Studien zum Einsatz [174–177]. Das Gerät wurde in den eigenen Untersuchungen nicht verwendet.

Die Thrombelastographie kombiniert die Messung von plasmatischer Gerinnung und Thrombozytenaggregation. In der antikoagulierten Vollblutprobe wird hierbei die Zeit bis zur Formung eines stabilen Blutgerinnsels an einem Messdraht und die sich anschließende Auflösung des Gerinnsels gemessen. Hierbei oszilliert beim TEG 5000 (Haemoscope) die Messküvette, beim ROTEM (TEM Innovations GmbH) der Messdraht. In der Humanmedizin wird die Thrombelastographie insbesondere zur Einschätzung eines generalisierten Blutungsrisikos im Umfeld von Operationen genutzt, für die spezifische Diagnostik der Thrombozytenfunktion ist die Methode lediglich mäßig geeignet [114]. Beim Pferd wurden

einige Studien unter Verwendung der Thrombelastographie durchgeführt [175,176,178–188]. Die Methode wurde in den eigenen Untersuchungen nicht eingesetzt.

Bei der Methodik des Cone and Plate(let) Analyzer (IMPACT, Matis Medical) aggregieren die Thrombozyten nach Aktivierung durch Scherkräfte auf einer rotierenden, mit Fibrinogen und vWF beschichteten Platte. Quantifiziert wird die Aggregation durch Färbung der Thrombozyten und darauf folgender mikroskopischer Visualisierung und Analyse durch eine optische Software. In der Humanmedizin ist das Gerät in der Messung der Thrombozytenfunktion wenig verbreitet [114]. In equinen Studien wurde das Gerät nach Kenntnis der Autorin bislang nicht eingesetzt und war kein Gegenstand der eigenen Untersuchungen.

### 2.2.2.3 Membranproteine und RNA

Der Nachweis von Proteinen in der Zellmembran sowie RNA im Zellinnern erfolgt mittels spezifischer Antikörper und Färbemethoden im Rahmen der Fluoreszenz-Durchflusszytometrie. So lassen sich beim Menschen unter anderem erblich bedingte Funktionsstörungen basierend auf dem Fehlen oder einer verminderten Anzahl von Glykoproteinen wie der Glanzmann-Thrombasthenie (GPIIb-IIIa) oder dem Bernard-Soulier-Syndrom (GPIb-V-IX) nachweisen [114]. Weitere Einsatzgebiete der Fluoreszenz-Durchflusszytometrie sind der Nachweis von Thrombozyten-Aktivierung (s. 2.2.2.3.3), Bildung von Thrombozyten-Leukozyten-Aggregaten (s. 2.2.2.3.4) sowie juveniler, RNA-reicher Thrombozyten (s. 2.2.2.3.5).

#### 2.2.2.3.1 Ausgangsmaterial

Traditionell wurde für den Nachweis von Thrombozyten mittels Fluoreszenz-Durchflusszytometrie meist plättchenreiches Plasma (PRP) verwendet. Als Antikoagulant kommt in der Regel Natriumzitrat in seiner Eigenschaft als schwacher Kalzium-Chelator zum Einsatz. EDTA und Heparin sind ungeeignete Antikoagulantien: EDTA als starker Kalzium-Chelator kann eine Dissoziation des GPIIb-IIIa aus der Zellmembran der Thrombozyten verursachen, Heparin kann an Thrombozyten binden und hierdurch eine Aktivierung initiieren [136]. Bei der Herstellung von PRP kommt es jedoch auch im Zitratplasma durch die präanalytisch notwendigen Zentrifugationen der Blutprobe zu einer Aktivierung von Thrombozyten [37]. Um diese Aktivierung zu vermeiden, wurden Methoden zur Untersuchung

aus Vollblut etabliert. Diese bieten zudem den Vorteil, dass die Untersuchungen in einem Milieu stattfinden, welches eher den physiologischen Bedingungen im Blutgefäß entspricht als Untersuchungen aus PRP oder gewaschenen Thrombozyten: So sind Erythrozyten und Leukozyten vorhanden, welche beide Einflüsse auf die Thrombozytenaktivierung haben können, und der Verlust von Subpopulationen der Thrombozyten wird nahezu verhindert [136]. Insbesondere für den Nachweis von Thrombozyten-Leukozyten-Aggregaten (TLA) ist jedoch eine Lyse der Erythrozyten notwendig, um Interferenzen mit der Streulichtmessung zu vermeiden [189,190].

Der Nachweis aktivierter Thrombozyten beim Pferd erfolgte zumeist aus PRP, wobei die angewandten Protokolle unterschiedliche Geschwindigkeiten (100 oder 150 x g) und unterschiedliche Dauer (10-20 Minuten) für die Zentrifugationen aufwiesen [3,191–195]. Für den Nachweis von TLA beim Pferd wurde zumeist Plättchen-Leukozytenreiches-Plasma (PLRP) verwendet, welches durch Sedimentation über 30 Minuten gewonnen wurde. Jedoch wurde der durch Abpipettieren gewonnene Überstand in der Regel anschließend für 2 bzw. 5 Minuten bei 1200 bzw. 2700 x g zentrifugiert [191,192,196].

### 2.2.2.3.2 *Thrombozytenmarkierung*

Auf ruhenden Thrombozyten werden das Glykoprotein GPIV (Synonym CD36) sowie die Glykoproteinkomplexe GPIb-V-IX (Synonym CD42a-d) und GPIIb-IIIa (Synonym CD41/61) konstitutiv exprimiert [136] (s. Tabelle 2, S. 5). Durch die hohe Anzahl des Glykoproteinkomplexes GPIIb-IIIa von 80.000 pro Zelle eignet sich dieser beim Menschen besonders gut als Ziel für einen Thrombozyten-spezifischen Antikörper im Rahmen der Untersuchung mittels Fluoreszenz-Durchflusszytometrie [197]. Beim Pferd wird GPIIb-IIIa analog zu humanen Thrombozyten spezifisch in der Membran der Thrombozyten exprimiert [198] und entsprechende Antikörper in verschiedenen Untersuchungen wurden bereits erfolgreich als spezifische Thrombozytenmarker eingesetzt [3,191–193,196,199].

### 2.2.2.3.3 *Thrombozytenaktivierung*

Unabhängig vom verwendeten Ausgangsmaterial kann die Aktivierung von Thrombozyten in vitro mittels ADP, Kollagen, Thrombin, Epinephrin oder TRAP erfolgen. Dies verursacht umfangreiche Änderungen in der Oberflächenmembran der Thrombozyten, welche sich mit spezifischen Antikörpern nachweisen lassen. Hierzu gehören

## 2 Literaturübersicht

---

Konformationsänderungen des GPIIb-IIIa (Antikörper PAC-1), Expressierung von Rezeptoren für Faktoren der plasmatischen Gerinnung (Faktor VIII, Va, Xa) und insbesondere Expressierung von Proteinen aus den Granula. Zu diesen Proteinen gehören unter anderem P-Selectin (CD62P), CD40L (Synonym CD154), LAMP-1/-2 und Lectin-like oxidized LDL receptor-1 (LOX-1) [136]. Beim Menschen wird die Aktivierung meist durch den Nachweis von P-Selectin [37,200], PAC-1 [200,201] und CD40L [37,200,202] belegt.

Nach Aktivierung *in vitro* werden CD62P und CD40L für 1 bis 4 Stunden exprimiert [37,203]. Das Ausmaß der Expressierung von P-Selectin auf den Thrombozyten korreliert jedoch nicht mit der Funktionsfähigkeit der Zellen. Im Tierexperiment konnte gezeigt werden, dass *in vitro* aktivierte Thrombozyten ohne Expressierung von CD62P für mindestens 24 Stunden aktiv an der Thrombusbildung teilnehmen und für mindestens 48 Stunden im Blut zirkulieren [203].

Beim Menschen konnten erhöhte Anteile P-Selectin-positiver Thrombozyten bei Arteriosklerose [190], nach Herzkatheter-Untersuchungen [204] und beim septischen Schock [205] gemessen werden. Darüber hinaus korrelierte der Anteil der CD62P-positiven Zellen positiv signifikant mit dem Schweregrad beim multiplen Organversagen (MODS), bei der Sepsis zeigte sich ein Trend zur positiven Korrelation mit dem Schweregrad [206]. Nach der intravenösen Verabreichung von LPS an gesunde Individuen konnten erhöhte Anteile CD40L-positiver Thrombozyten gemessen werden [200].

Durch eine Kombinationstherapie mit Aspirin und Clopidogrel war bei Menschen mit Arteriosklerose zum einen der Anteil CD62P-positiver Thrombozyten vermindert, zum anderen ließen sich die Zellen behandelter Patienten *in vitro* weniger aktivieren als bei unbehandelten Kontrollindividuen [190].

Beim Pferd erfolgte die Aktivierung der Thrombozyten *in vitro* überwiegend mit Thrombin, vereinzelt kamen auch TRAP, Plättchenaktivierender Faktor (PAF), Kollagen, ADP und CXCL8 zum Einsatz [3,52,191–194,196]. In den älteren Studien zum Nachweis aktivierter Thrombozyten beim Pferd um die Jahrtausendwende wurde die Fibrinogen-Bindungs-Kapazität als Indikator verwandt [52,194,207]. So konnte das Vorliegen von aktivierten Thrombozyten im akuten Stadium einer Infektion mit dem Virus der Infektiösen Anämie gezeigt werden [52]. In neueren Studien kamen Antikörper gegen P-Selectin zum Einsatz [3,191–193,196]. Bei equinen Patienten mit RAO war im Vergleich zu gesunden Kontrolltieren eine vermehrte Zahl aktivierter Thrombozyten mittels Nachweis CD62P-positiver Zellen nicht

zu belegen [193,196]. Untersuchungen zur Verwendung des Antikörpers PAC-1 und Antikörpern gegen CD40L beim Pferd liegen nach Kenntnis der Autorin nicht vor.

### 2.2.2.3.4 *Thrombozyten-Leukozyten-Aggregate (TLA)*

Die Exprimierung von P-Selectin in der Thrombozytenmembran galt lange Zeit als Goldstandard für den Nachweis der Thrombozytenaktivierung. Im Tierexperiment konnte mittels radioaktiv markierter Thrombozyten durchflusszytometrisch jedoch gezeigt werden, dass Thrombozyten nach Aktivierung mittels Thrombin nach Reinfusion innerhalb von wenigen Minuten *in vivo* das P-Selectin verlieren [203]. Die Funktionsfähigkeit der Thrombozyten blieb hiervon jedoch weitgehend unbeeinflusst und es entstanden innerhalb von einer Minute Aggregate mit Monozyten und in geringerem Maße auch mit neutrophilen Granulozyten [204]. Zum eindeutigen Nachweis der TLA wird in der Humanmedizin eine Doppelmarkierung mit einem Leukozyten-spezifischen Antikörper (z. B. gegen CD14) und einem Thrombozyten-spezifischen Antikörper (z. B. gegen CD41/61) empfohlen [197]. *In vitro* konnten Thrombozyten beim Menschen durch LPS aktiviert und eine darauf folgende signifikant vermehrte Bildung von TLA nachgewiesen werden. *In vivo* ließ sich dies bei gesunden Probanden nur teilweise reproduzieren, es konnte nur der Trend einer Zunahme der TLA gezeigt werden [200]. Bei Patienten wurde eine erhöhte Anzahl von TLA im Rahmen von Herzinfarkten [204] sowie bei Sepsis und multiplen Organversagen (MODS) [205,208] ermittelt.

Beim Pferd konnte erstmals Ende der 1990iger Jahre mittels Fluoreszenz-Durchflusszytometrie gezeigt werden, dass bei der Zugabe eines Leukozytenkonzentrates zum PRP und darauf folgender Aktivierung mittels Thrombin, ADP, TRAP oder PAF ebenfalls TLA entstehen [194]. Der Nachweis der TLA erfolgte hierbei nicht mittels Doppelmarkierung, sondern lediglich durch das Vorhandensein von mit Antikörpern gegen CD41/61 markierten Zellen in einem vorher etablierten Fluoreszenzbereich der neutrophilen Granulozyten. Eine genaue Beschreibung des Leukozyten-spezifischen Antikörpers ist der Publikation nicht zu entnehmen [194]. In späteren Untersuchungen wurden als Leukozyten-spezifischer Marker Antikörper gegen CD11a/18 [191], CD13 [196] oder CD18 [192] verwendet, eine Doppelmarkierung erfolgte ebenfalls nicht.

Das Vorhandensein von TLA beim Pferd *in vivo* wurde bislang nur wenig untersucht. Bei gesunden Pferden konnte gezeigt werden, dass sich die Zahl der TLA durch submaximale

Belastung auf dem Laufband um das 4- bis 5fache erhöht [199]. Nach Kenntnis der Autorin liegen bei kranken Pferden lediglich 2 Untersuchungen zum Vorliegen von TLA vor. Zwar war die Anzahl bei Kohlenhydrat-induzierter Hufrehe vermehrt, nachgewiesen allerdings lediglich mikroskopisch und nicht mittels Fluoreszenz-Durchflusszytometrie [50]. Bei Pferden mit RAO hingegen waren die TLA im Vergleich zu gesunden Kontrolltieren durchflusszytometrisch nicht vermehrt [196].

### 2.2.2.3.5 Retikulierte, juvenile, RNA-reiche Thrombozyten

Nachdem der fluoreszierende Farbstoff Thiazol-Orange zunächst für den Nachweis von RNA-reichen juvenilen Erythrozyten (Retikulozyten) etabliert wurde [209], konnte diese Eignung wenige Jahre später ebenfalls für RNA-reiche juvenile Thrombozyten des Menschen gezeigt werden [210]. Bei gesunden Individuen lag der Anteil retikulierter Thrombozyten bei  $8,6 \pm 2,8 \%$  (Spannweite 2,8-15,8 %). Der prozentuale Anteil RNA-reicher Thrombozyten kennzeichnet beim Menschen eine erhöhte Aktivität der Megakaryozyten im Knochenmark und bietet somit eine im Vergleich zur Punktion des Knochenmarks wenig invasive Methode, eine gesteigerte Thrombopoese nachzuweisen [210].

Bei Menschen mit Neutrophilie war der prozentuale Anteil RNA-reicher Thrombozyten signifikant erhöht, zudem waren die Werte bei Patienten mit positiver Blutkultur als Nachweis einer Sepsis signifikant höher als bei Patienten mit negativer Blutkultur [211]. Darüber hinaus war der Anteil RNA-reicher Thrombozyten bereits bis zu 3 Tage vor der klinischen Manifestation einer Sepsis erhöht [212]. In den beiden vorgenannten Untersuchungen erfolgte der Nachweis jedoch mit dem Sysmex XE2100 und nicht mittels Thiazol-Orange-Färbung in der Durchflusszytometrie (s. 2.2.1.1, S. 14). Mit dem Sysmex XT2000iV gelang der Nachweis retikulierter Thrombozyten auch beim Hund [213,214]. Durch Verwendung der kostenfreien Software WinMDI 2.9 zur Analyse von Durchflusszytometrie-Daten konnten retikulierte Thrombozyten beim Hund zudem mit dem ADVIA<sup>®</sup>120/2120 gemessen werden [215].

Beim Pferd wurden retikulierte Thrombozyten bislang lediglich im Rahmen einer experimentellen Studie nach Infektion mit dem Virus der infektiösen Anämie mittels Durchflusszytometrie und Thiazol-Färbung nachgewiesen. Gleichzeitig misslang in der Untersuchung der Versuch, retikulierte Thrombozyten mittels Licht-, Fluoreszenz- oder Transmissionselektronenmikroskop zu dokumentieren [195]. Untersuchungen zum

Vorhandensein juveniler Thrombozyten bei klinisch kranken Pferden liegen nach Kenntnis der Autorin nicht vor.

### 2.2.2.4 Oberflächenproteine im Serum und Plasma

Eine Expression von P-Selectin oder CD40L auf der Oberfläche der Thrombozyten ist nach Aktivierung lediglich für wenige Stunden nachweisbar [37,203]. Jedoch lassen sich beide Glykoproteine innerhalb von Minuten mit spezifischen ELISAs (enzyme-linked immunosorbent assay) im Plasma gelöst nachweisen [203,216,217]. Nahezu alles im Plasma nachzuweisende sCD40L stammt hierbei von Thrombozyten und trägt in nicht unerheblichem Maße zur Funktionsfähigkeit der zellulären Gerinnung bei [218]. So konnte im Tierexperiment gezeigt werden, dass Mäuse mit einem genetisch determinierten CD40L-Defekt erhebliche Störungen in der Thrombusbildung aufwiesen, welche sich durch Infusion mit sCD40L aufheben ließen [38]. Darüber hinaus fördert sCD40L die Degranulation von  $\alpha$ - und  $\delta$ -Granula und erhöht somit die Exprimierung von P-Selectin [219].

Eine Erhöhung der Konzentration an sP-Selectin im Plasma wurde bei humanen Patienten mit Akutem Atemnotsyndrom (ARDS, auch: acute lung injury, ALI) nachgewiesen, wobei die nichtüberlebenden Patienten signifikant höhere Konzentrationen an sP-Selectin aufwiesen als die Überlebenden [220]. Auch bei humanen Patienten mit Sepsis, SIRS und Endotoxämie ließen sich erhöhte Plasmakonzentrationen des sCD62P messen [217,220,221]. Gleiches galt für sCD40L bei Sepsis, wobei Nichtüberlebende zudem höhere Konzentrationen aufwiesen als Überlebende [222]. Bei Menschen mit fortgeschrittener maligner Tumorerkrankung erwies sich die Konzentration an sP-Selectin ebenfalls als negativer prognostischer Faktor für die Überlebensdauer [223].

Neben der Bedeutung als Marker für eine in vivo vorliegende Thrombozytenaktivierung bei humanen Patienten ist sCD40L vermutlich mitverantwortlich für das Auftreten von unerwünschten Wirkungen im Zusammenhang mit Transfusionen von Thrombozytenkonzentraten. So konnte gezeigt werden, dass die Konzentration von sCD40L mit der Lagerungsdauer der Konzentrate zunimmt und das Auftreten von Nebenwirkungen mit zunehmender Konzentration steigt [224].

Untersuchungen zum Nachweis von sCD40L oder sP-Selectin beim Pferd liegen nach Kenntnis der Autorin nicht vor.

### 2.3 SIRS

Für den Menschen wurde 1991 im Rahmen der Konsensuskonferenz des American College of Chest Physicians (ACCP) und der Society of Critical Care Medicine (SCCM) der Begriff "systemic inflammatory response syndrome", kurz SIRS, für das Auftreten einer generalisierten hyperinflammatorischen Reaktion eingeführt [225]. Hierbei wurden unter anderem Kriterienkataloge und Definitionen der Begriffe SIRS, Sepsis, schwere Sepsis, septischer Schock und multiples Organversagen (multiple organ dysfunction syndrome, MODS) formuliert. Diese wurden im Rahmen der S2k Leitlinie "Prävention, Diagnose, Therapie und Nachsorge der Sepsis" der Deutschen Sepsis-Gesellschaft e.V. (DSG) und der Deutschen Interdisziplinären Vereinigung für Intensiv- und Notfallmedizin (DIVI) modifiziert [226]. So müssen gemäß dieser Leitlinie für das Vorliegen eines SIRS infektiöser Genese mit Organkomplikation(en) sowie eines SIRS nicht-infektiöser Genese ohne oder mit Organkomplikation(en) mindestens 2 der folgenden 4 Kriterien erfüllt sein:

- Fieber ( $\geq 38,0\text{ °C}$ ) oder Hypothermie ( $\leq 36,0\text{ °C}$ ) bestätigt durch eine rektale, intravasale oder intravesikale Messung,
- Tachykardie mit Herzfrequenz  $\geq 90/\text{min}$ ,
- Tachypnoe ( $\geq 20/\text{min}$ ) oder Hyperventilation ( $p_a\text{CO}_2 \leq 4,3\text{ kPa}$  bzw.  $33\text{ mmHg}$ ),
- Leukozytose ( $\geq 12.000/\text{mm}^3$ ) oder Leukopenie ( $\leq 4.000/\text{mm}^3$ ) oder  $\geq 10\%$  unreife Neutrophile im Differentialblutbild.

Als Nachweis einer Infektion ist die Untersuchung von 2 Blutkulturen (aerob und anaerob) erforderlich. Ein SIRS infektiöser Genese liegt darüber hinaus bei negativer Blutkultur und Erfüllung aller 4 Kriterien vor.

Bei der Definition "Organkomplikation" gilt, dass durch Funktionsausfälle einer oder mehrerer Organsysteme eine lebensbedrohliche Situation für den Patienten besteht: Akute Enzephalopathie; arterielle Hypotension und Schock; relative oder absolute Thrombozytopenie; arterielle Hypoxämie; renale Dysfunktion sowie metabolische Azidose.

Eine Überarbeitung dieser Leitlinie mit dem Titel "Sepsis - Prävention, Diagnose, Therapie und Nachsorge" ist derzeit bei der AWMF (Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V.) unter der Registernummer 079 - 001 als S3-Leitlinie angemeldet und soll im Verlauf des Jahres 2018 fertiggestellt werden.

In der Veterinärmedizin findet der Begriff SIRS bei klinischen Patienten ebenfalls Anwendung, so beispielsweise bei Hund [227,228] und Katze [229,230]. Ein einheitlicher

## 2 Literaturübersicht

Kriterienkatalog existiert hierbei jedoch nicht. Gleiches gilt für die Verwendung des Begriffes SIRS in der Pferdemedizin. Zumeist sind Körperinnentemperatur, Puls- und Atemfrequenz sowie Gesamtzahl der Leukozyten Grundlage des Kriterienkatalogs, wobei mindestens 2 Kriterien erfüllt sein müssen, die entsprechenden Referenzlimits jedoch nicht immer einheitlich gesetzt sind (Tabelle 3) [178,231–238]. Bei den von Corley et al. untersuchten bis zu 7 Tagen alten Fohlen musste zusätzlich zu den klinischen Parametern noch eine Sepsis, zerebrale Ischämie oder Hypoxie oder ein Trauma vorliegen [231]. Bei einem für Fohlen und Jungpferde bis zu einem Alter von einem Jahr vorgeschlagenen Kriterienkatalog wird dieser noch um die Konzentrationen von Laktat und Glukose im venösen Blut erweitert. Zudem müssen hierbei 3 von 6 Kriterien erfüllt werden und mindestens 1 der abweichenden Kriterien muss die Körperinnentemperatur oder die Leukozytenzahl sein [234].

Tabelle 3: Kriterien und deren Grenzwerte zur Erfüllung des Vorliegens eines SIRS bei Equiden

Körperinnen- temperatur [°C]	Herz- frequenz Schläge/min	Atem- frequenz Züge/min	Leukozyten [x10 <sup>9</sup> /l]	Laktat (venös) [mmol/l]	Glukose (venös) [mg/dl]	Alter	Quelle
< 37,2 oder > 39,2	> 115	> 56	< 6,9 oder > 14,4	> 5,0	< 50	≤ 3 d	[234]
< 37,2 oder > 39,2	> 120	> 56	< 4,0 oder > 12,5	> 2,5	< 50	4-14 d	[234]
< 37,2 oder > 39,2	> 96	> 44	< 4,0 oder > 12,5	> 2,5	< 50	14 d – 0,5 a	[234]
< 37,2 oder > 39,2	> 60	> 20	< 4,0 oder > 12,5	> 2,5	< 50	0,5 – 1 a	[234]
< 37,2 oder > 39,2	> 120	> 30	< 4,0 oder > 12,5 oder > 10% Stäbe	-	-	< 7 d	[231]
≥ 38,6	≥ 60	≥ 30	≤ 4,5 oder ≥ 12,5 oder > 10% Stäbe	-	-	≥ 1 a	[178]
< 37,0 oder > 38,5	> 50	> 20	< 5,0 oder > 12,5	-	-	≥ 1 a	[233]
< 37,2 oder > 38,3	> 44	> 15	< 5,4 oder > 14,3 oder > 10% Stäbe	-	-	≥ 1 a	[235]
< 37,0 oder > 38,5	> 52	> 20	< 5,0 oder > 12,5	-	-	≥ 1 a	[232]
< 37,2 oder > 38,6	> 50	> 30	< 5,0 oder > 10,0	-	-	≥ 1 a	[238]
> 38,5	> 60	> 30	< 5,0 oder > 10,0	-	-	≥ 1 a	[236,237]

Stäbe= stabkernige neutrophile Granulozyten

### 2.4 Medikamentöse Hemmung der Thrombozytenfunktion

#### 2.4.1 Acetylsalicylsäure (ASS)

Bereits seit den späten 1950er Jahren wurde bei Menschen nach der Einnahme von Acetylsalicylsäure (ASS, Aspirin) das Auftreten von Gerinnungsstörungen in Form von Blutungen beschrieben [239]. Mitte der 1970er Jahre wurde der molekulare Mechanismus der irreversiblen Hemmung der Cyclooxygenase (COX) mit der Folge einer Funktionsstörung der Thrombozytenaktivierung identifiziert [240]. Die Einnahme von ASS, häufig in Kombination mit einem Thienopyridin (z. B. Clopidogrel), wird beim Menschen heute zur Prävention kardiovaskulärer Erkrankungen (z. B. Myokardinfarkt) routinemäßig verschrieben [241–243].

Bereits 4 mg/kg ASS führen beim Menschen nach oraler Einnahme zu einer vollständigen und irreversiblen Hemmung der COX-vermittelten Thrombozytenfunktion (TZF) [244], wobei die maximale Hemmung bereits 2 Stunden nach der Einnahme erreicht wird und Erhaltungsdosen von 1-1,5 mg/kg einmal täglich die Hemmung aufrechterhalten [245]. Für Pferde finden sich in Lehrbüchern Dosierungsvorschläge zur Thromboseprophylaxe zwischen 10 und 100 mg/kg KGW peroral (p.o.) alle 12 bis 48 Stunden [246,247]. In experimentellen Untersuchungen wurden p.o. Dosierungen zwischen 5 und 20 mg/kg einmalig oder täglich für bis zu 5 Tage eingesetzt [64,122,173,248,249], wobei bereits die einmalige Gabe von 5 mg/kg zu einer Verminderung der Serumkonzentration von Thromboxan B<sub>2</sub> (TXB<sub>2</sub>) von 71-87 % für die Dauer von bis zu 72 Stunden führte [249]. Unklar ist jedoch, ob die Hemmung auch beim Pferd durch niedrigere Erhaltungsdosen aufrechterhalten werden kann.

In älteren Studien wurde der hemmende Effekt von ASS auf die TZF beim Pferd mittels Messung der Blutungszeit ermittelt [63,64]. Dieser Messparameter weist beim Pferd jedoch eine schlechte Wiederholbarkeit auf [65] und ist somit zum Nachweis einer verminderten TZF ungeeignet. Durch die Messung der Serumkonzentration von TXB<sub>2</sub> [122,248,249] und Plättchenfunktionstests in Vollblut [173] oder Plättchenreichem Plasma (PRP) [122] konnte der hemmende Effekt von ASS beim Pferd nach peroraler Gabe bereits gezeigt werden. COX-1 spezifische wie z. B. die Arachidonsäure-induzierten Plättchenfunktionstests im Vollblut nach oraler Gabe von ASS wurden beim Pferd nach Kenntnis der Autorin bisher nicht durchgeführt.

### 2.4.2 Clopidogrel

Thienopyridine wie das Clopidogrel gehören beim Menschen neben dem ASS oder als Dualtherapie mit letzterem zu den am häufigsten eingesetzten Wirkstoffen zur Hemmung der Thrombozytenfunktion [243,250]. Die Thienopyridine hemmen die Aktivierung über eine Bindung an einen der ADP-Rezeptoren (P2Y<sub>12</sub>) an der Zelloberfläche der Thrombozyten. Clopidogrel gehört zu den sogenannten pro-drugs, d.h. die Wirkung wird erst nach Resorption des Wirkstoffes aus dem Magen-Darm-Trakt durch die Bildung eines aktiven Metaboliten in der Leber (mittels Cytochrom P450) erreicht. Beim Menschen werden ca. 90 % des Wirkstoffes durch Carboxylasen zu dem inaktiven Metaboliten SR26334 umgewandelt, und lediglich 10 % in einer zweistufigen Konversion in den extrem instabilen aktiven Metaboliten R-130964 überführt [251]. Die hemmende Wirkung des Clopidogrels bzw. des aktiven Metaboliten auf die ADP-induzierte Funktion der Thrombozyten ist beim Menschen irreversibel [252].

In einer in-vitro-Studie konnte bereits 2002 von Mateos-Trigos et al. auch beim Pferd nachgewiesen werden, dass die TZF durch einen P2Y<sub>12</sub>-Antagonisten (AR-C67085) gehemmt wird. Vergleichend wurde hierbei auch die Wirkung auf die Funktion humaner Thrombozyten untersucht, wobei die equinen Thrombozyten bei gleicher Wirkstoffkonzentration eine deutlichere Aggregationshemmung zeigten [128].

Beim Menschen beginnt die Therapie mit Clopidogrel in der Regel mit 4-8 mg/kg und wird mit täglichen Erhaltungsdosen von 1-2 mg/kg fortgesetzt [253]. Mit der Anfangsdosis wird bereits nach 4 Stunden die maximale Hemmung der TZF erreicht [254]. Bei Pferden führt die perorale Gabe von 2 mg/kg zu einer Hemmung der TZF im PRP an Tag 3 der Therapie, wobei die erfolgreiche Resorption des Wirkstoffes durch den Nachweis von SR26334 gezeigt werden konnte [122]. Auch bei Anwendung einer Anfangsdosis von 4 mg/kg und Erhaltungsdosen von 2 mg/kg konnte eine Hemmung der TZF an Tag 3 der Therapie erreicht werden [176]. Unklar ist jedoch, ob mit einer hohen Anfangsdosis eine Hemmung der TZF auch beim Pferd nach wenigen Stunden erreicht werden kann und die Hemmung durch niedrigere Erhaltungsdosen aufrechterhalten wird.

## 3 EIGENE UNTERSUCHUNGEN - MATERIAL UND METHODEN

Im Rahmen dieser Arbeit wurden umfangreiche Untersuchungen zur Thrombozytenbiologie klinisch unauffälliger und erkrankter Equiden durchgeführt:

- 3.1 Labordiagnostische Untersuchungen zur Thrombozytenbiologie bei klinisch unauffälligen Equiden
- 3.2 Thrombozytopenie und Thrombozytose bei Klinikpatienten (2008-2015)
- 3.3 Thrombozytenfunktion bei Equiden mit systemischer Entzündung (SIRS)
- 3.4 Hemmung der Thrombozytenfunktion bei Pferden

Alle 4 Teile wurden von der Autorin geplant. Die praktische Durchführung der Untersuchungen erfolgte im Rahmen von Dissertationsprojekten durch Lisa Held, Julia Engel und Kim Theuerkauf (Teil 1 und 3), durch das medizinisch-technische Personal des Zentrallabors des Fachbereichs Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität (Teil 1 bis 4) sowie durch die Autorin (Teil 4). Die retrospektive Datenerhebung in Teil 2 wurde von Emma Hübers und der Autorin durchgeführt. Die statistischen Berechnungen erfolgten durch die Autorin sowie in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Klaus Failing und dessen Mitarbeitern der AG Biomathematik und Datenverarbeitung des Fachbereichs Veterinärmedizin (Teil 1 und 4) und in Zusammenarbeit mit PD Dr. Natali Bauer (Teil 2).

### 3.1 Labordiagnostische Untersuchungen zur Thrombozytenbiologie von Equiden

Bei klinisch unauffälligen erwachsenen Equiden wurden 4 labordiagnostische Methoden zur Thrombozytenbiologie untersucht: Thrombozytenzahl und Thrombozytenvariablen mittels Laser-Durchflusszytometrie mit dem ADVIA® 2120 (s. 3.1.1), Thrombozytenfunktion mittels Impedanzaggregometrie aus Vollblut mit dem Multiplate® Analyzer (s. 3.1.2), Thrombozytenfunktion mittels Fluoreszenz-Durchflusszytometrie mit dem Accuri® C6 (s. 3.1.3) sowie die Messung von aus der Zellmembran der Thrombozyten gelösten Proteine im Serum und Plasma mittels kommerzieller humaner ELISAs (s. 3.1.4).

#### 3.1.1 Laser-Durchflusszytometrie (ADVIA® 2120)

##### 3.1.1.1 Gerät und Messprinzip

Der ADVIA® 2120 (Version 5.9.0-MS, Siemens Healthcare, Abbildung 2) ist die Weiterentwicklung des vollautomatischen Hämatologie-Systems ADVIA® 120, wobei ein methodischer Unterschied lediglich darin besteht, dass beim ADVIA® 2120 eine cyanfreie Hämoglobinfärbung etabliert wurde. Die ursprüngliche Bezeichnung 120 ist von der pro Stunde messbaren Anzahl an Blutproben (Hämatologie ohne Retikulozyten) abgeleitet. Das benötigte Probenvolumen beträgt 175 µl Vollblut.



Abbildung 2: ADVIA® 2120

Alle Messungen der Thrombozytenvariablen basieren auf einer Doppelwinkel-Laser-Streulicht-Messung an fixierten Thrombozyten. Im gemeinsamen Erythrozyten- und Thrombozytenkanal werden die Merkmale jeder Einzelzelle (ca. 50.000 Erythrozyten und ca. 3.000 Thrombozyten) unter Kleinwinkel- ( $2^{\circ}$ - $3^{\circ}$ ) und Großwinkelstreulicht ( $5^{\circ}$ - $15^{\circ}$ ) gemessen, wobei zur Analyse der Thrombozyten die Kleinwinkelsignale 30-fach, die Großwinkelsignale 12-fach verstärkt werden. Die ADVIA® 120/2120-spezifische zweidimensionale Thrombozytenanalyse (2D-THROMBO-Methode) kombiniert die beiden verstärkten Streulichtsignale und ermöglicht eine Differenzierung von Thrombozyten, großen Thrombozyten ( $>30$  fl), Erythrozyten, Erythrozyten-Fragmenten (Teile von Erythrozyten mit Hämoglobin) und Erythrozyten-Ghosts (leere Erythrozytenmembranen ohne Hämoglobin).

### 3 Eigene Untersuchungen - Material und Methoden

---

Gemäß der Mie-Theorie (Lichtstreuung für homogene Kugeln) wird das Kleinwinkel-Streulicht in das Zellvolumen der Thrombozyten und das Großwinkel-Streulicht in den Brechungsindex umgerechnet. Der Brechungsindex verhält sich linear zur Dichte der Thrombozyten und wird in die Thrombozyten-Komponenten-Konzentration (TK-Konzentration, platelet component concentration) wie folgt umgerechnet:

$$\text{TK-Konzentration (g/dl)} = \frac{\text{Brechungsindex} - 1,333}{0,0018 \text{ g/dl}}$$

Hierbei entspricht 1,333 dem Brechungsindex von Wasser und 0,0018 der mittleren Zunahme des Brechungsindex verursacht durch die Hauptkomponenten der Trockenmasse der Thrombozyten: 57 % Protein, 19 % Fette und 8,5 % Kohlenhydrate mit entsprechenden Brechungsindizes von 0,00187 g/dl, 0,0017 g/dl und 0,00143 g/dl [107].

Die Mittelwerte von Zellvolumen und TK-Konzentration aller gezählten Thrombozyten werden vom Gerät als MPV (Mean Platelet Volume) bzw. MPC (Mean Platelet Component Concentration) ausgegeben.

Mithilfe von berechnetem Volumen und TK-Konzentration berechnet der ADVIA® 120/2120 zusätzlich die Thrombozyten-Trockenmasse (platelet dry mass):

$$\text{Thrombozyten-Trockenmasse (pg)} = \frac{\text{TK-Konzentration (g/dl)} \times \text{Volumen (fl)}}{100}$$

Auch hierfür wird ein mit MPM (Mean Platelet Dry Mass) bezeichneter Mittelwert berechnet. Da es sich beim MPM lediglich um einen berechneten Wert aus 2 ebenfalls berechneten Werten handelt, erscheint der Autorin der diagnostische Mehrwert der Variable fraglich. Zudem konnte für Volumen und Granularität der Thrombozyten ein negativ korrelierender Einfluss der Lagerungsdauer gezeigt werden (s. 2.2.2.1, S. 21), bei Betrachtung des MPM wäre dieser Lagerungseinfluss nicht erkennbar. Aus diesen Gründen wurde der MPM in den Auswertungen nicht berücksichtigt.

Die Tabelle 4 beinhaltet eine Übersicht der bereits genannten sowie weiterer gemessener und berechneter Thrombozytenvariablen des ADVIA® 2120: PCDW (Platelet Component Distribution Width = Thrombozytenkomponenten-Verteilungsbreite),

### 3 Eigene Untersuchungen - Material und Methoden

PCT (Platelet Crit = Thrombokrit), PDW (Platelet Volume Distribution Width = Thrombozytenvolumen-Verteilungsbreite) und PLT (platelet = Thrombozytenzahl).

Tabelle 4: ADVIA® 2120 : Methoden und Berechnungen der ausgegebenen Thrombozytenvariablen

Variable	Methode/Berechnung
MPC	Mittelwert Thrombozyten-Komponenten-Konzentration
MPM	Mittelwert Thrombozyten-Trockenmasse
MPV	Mittelwert Thrombozytenvolumen
PCDW	Standardabweichung Brechungsindex
PCT	$\frac{\text{Thrombozytenzahl} \times \text{MPV}}{10.000}$
PDW	$100 \times \frac{\text{Standardabweichung Thrombozyten-Volumen}}{\text{MPV}}$
PLT	Thrombozytenzahl
PMDW	Standardabweichung Thrombozyten-Trockenmasse

Quasi als Nebenprodukt der Peroxidase-Färbung zur Differenzierung der Leukozyten werden am ADVIA® 2120 im Peroxidase-Zytogramm Thrombozytenaggregate (Clumps) dargestellt und gezählt (Abbildung 3). Für die Spezies Pferd wird bei mehr als 300 Clumps vom System eine Warnung (Morphology Flag) ausgegeben.

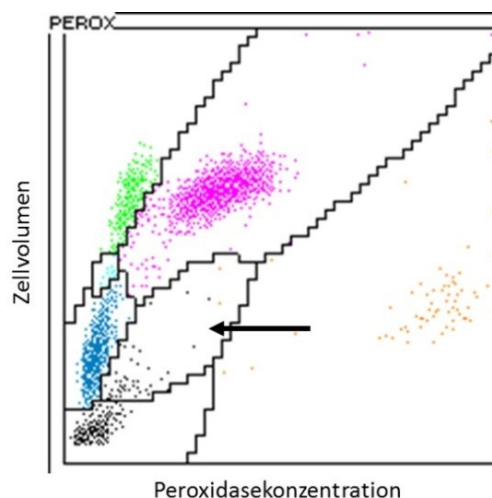


Abbildung 3: ADVIA® 2120: Zytogramm des Peroxidasekanals mit automatisch generiertem Cluster der Thrombozytenaggregate (Pfeil)

#### 3.1.1.2 Probanden und Blutentnahme

Für die Untersuchungen wurden Blutproben von 60 klinisch unauffälligen erwachsenen (> 3 Jahre) Warmblütern und 60 erwachsenen klinisch unauffälligen Kleinpferden verwendet, denen im Rahmen einer allgemeinen Gesundheitskontrolle Blut entnommen wurde. In die Gruppe der Kleinpferde wurden Tiere mit einem Stockmaß  $\leq 148$  cm eingeschlossen, ausgeschlossen wurden Miniaturrassen (z. B. Mini-Shetlandpony). In beiden Gruppen ausgeschlossen waren Equiden mit einem body condition score (BCS) nach Carroll und Huntington  $< 2/5$  [255] sowie Tiere, bei denen in den letzten 6 Monaten eine Gefäßerkrankung (z. B. Phlebitis) bestand oder die klinische Untersuchung eine adspektorische und/oder palpatorische Anomalie einer oder beider Venae jugulares aufwies. Ebenfalls ausgeschlossen waren Pferde und Kleinpferde, die in den vorhergegangenen 14 Tagen Medikamente erhalten hatten und bei denen in der Blutuntersuchung eine Abweichung vom Referenzintervall (RI) von 2 oder mehr Entzündungsvariablen (Leukozyten [ $4,4-9,0 \times 10^9/l$ ; ADVIA® 2120, Siemens], Globuline [ $23-42$  g/l; Pentra 400, Axon Lab], Fibrinogen [ $1,25-3,29$  g/l; STA Compact, Diagnostica Stago ]) ermittelt wurde.

Bei den Warmblütern wurden Blutproben von 30 Wallachen und 30 Stuten untersucht, der Altersmedian lag bei 11 Jahren (Spannweite 4-21 Jahre). Eine Übersicht der Stammdaten zeigt die Tabelle 12-1 im Anhang (S. 12-5).

Die Gruppe der Kleinpferde umfasste 33 Wallache und 27 Stuten, der Altersmedian lag bei 12,5 Jahren (Spannweite 4-26 Jahre). Bei den Rassen handelte es sich um 16 Isländer, 9 Kleinpferde ohne Rassebezeichnung, 8 Haflinger, 8 Shetlandponys, 4 Norweger, 4 Liebenthaler, 4 Kleinpferd-Kreuzungen, 3 Deutsche Reitponys, 2 Dülmener sowie je 1 Tinker und 1 Connemara. Eine Übersicht der Stammdaten zeigt die Tabelle 12-1 im Anhang (S. 12-6).

Die Blutentnahmen erfolgten mit einem sterilen 17 G ( $\emptyset$  1,4 mm) Teflonkatheter (Vasuflo®T, Dispomed) nach Adspektion und Palpation sowie Keimreduzierung (Isopropanol, 70 %) der Entnahmestelle kopfwärts aus der Vena jugularis externa mittels eines sterilen Vakuumsystems (S-Monovette®, Sarstedt). Hierbei wurden die Probengefäße in folgender Reihenfolge befüllt:  $K_3$ -EDTA (1,6 mg/ml Blut), Lithium-Heparin (16 IE/ml Blut), Tri-Natrium-Zitrat (0,106 mol/l, Mischverhältnis 1:10), Hirudin (20  $\mu$ g/ml Blut) und Magnesiumsulfat (33,8  $\mu$ mol/ml Blut).

#### 3.1.1.3 Einfluss von Antikoagulantien und Rasse auf Thrombozytenvariablen

Routinemäßig wird für hämatologische Untersuchungen K<sub>3</sub>-EDTA als Antikoagulans verwendet. EDTA kann jedoch in vitro eine Aggregation der Thrombozyten, resultierend in einer EDTA-induzierte Pseudothrombozytopenie, verursachen (s. 2.2.1.2, S. 18). In diesem Fall können Zitrat oder Mg-Sulfat als Antikoagulans verwendet werden. Vergleichende Untersuchungen mit dem ADVIA® 2120 liegen insbesondere für das Mg-Sulfat nach Kenntnis der Autorin für Equiden nicht vor. Aus diesem Grund wurden von den Kleinpferden Blutproben mit 3 verschiedenen Antikoagulantien gemessen: K<sub>3</sub>-EDTA, Zitrat und Magnesiumsulfat. Bei den Warmblütern erfolgten Messungen aus Blutproben mit den Antikoagulantien K<sub>3</sub>-EDTA und Zitrat.

Folgende Thrombozytenvariablen wurden bezüglich des Einflusses des Antikoagulans und der Rasse ausgewertet und verglichen: PLT, LargePLT, Clumps, PCT, MPV, MPC, PDW und PCDW.

Alle Messungen erfolgten innerhalb von 30 Minuten bis 4 Stunden nach der Blutentnahme.

#### 3.1.1.4 Statistik

Die Daten wurden mit Microsoft Excel 2010 tabellarisch erfasst. Die Anzahl der Thrombozyten (PLT), der großen Thrombozyten (LargePLT) sowie der Thrombozytenaggregate (Clumps) wurde hierbei für das Antikoagulans Zitrat nach Multiplikation mit dem Faktor 1,1 (s. 2.2.1.1, S. 14) in die statistischen Auswertungen eingeschlossen. Die statistischen Berechnungen für die Messungen der Kleinpferde erfolgten in Zusammenarbeit mit Dr. Klaus Failing und dessen Mitarbeitern der AG Biomathematik und Datenverarbeitung des Fachbereichs Veterinärmedizin der JLU Gießen mit dem statistischen Programmpaket BMDP [256]. Nach Prüfung auf Normalverteilung erfolgte der Vergleich der Mittelwerte (ggf. nach logarithmischer Transformation) durch eine einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) mit Messwiederholungen bezüglich der Methode. Bei Berechnung signifikanter Unterschiede wurde ein post-hoc Student-Newman-Keuls-Test durchgeführt. Der paarweise Vergleich zwischen den Antikoagulantien erfolgte mittels Pearson Korrelationsanalyse.

Die statistische Auswertung für die Warmblüter erfolgte durch die Autorin mit dem Programm GraphPad Prism (GraphPad Software Version 6). Alle Variablen wurden zunächst

### 3 Eigene Untersuchungen - Material und Methoden

---

mittels Shapiro Wilk Test bezüglich Normalverteilung geprüft und gegebenenfalls logarithmisch transformiert. Der Einfluss von Antikoagulantien und Rasse wurde durch die Autorin mittels zweifaktorieller ANOVA mit Messwiederholung bezüglich der Methode (K<sub>3</sub>-EDTA und Zitrat) und einem post-hoc paarweisen Mehrfachvergleich nach Bonferroni mit adjustierten  $p$ -Werten überprüft.

Das Signifikanzniveau wurde jeweils auf 0,05 festgelegt.

#### 3.1.2 Impedanzaggregometrie (Multiplate® Analyzer)

##### 3.1.2.1 Gerät und Messprinzip

Der Multiplate® Analyzer (Roche, ehemals Dynabyte) ist ein computergestütztes System zur Ermittlung der Thrombozytenfunktion im Vollblut mittels Impedanzaggregometrie (Abbildung 4). Die Messung basiert auf der Aggregation von aktivierten Thrombozyten an Oberflächen. Im Falle des Multiplate® Analyzer sind dies 4 in einer Einmalküvette parallel angeordnete silberbeschichtete Kupferdrähte, wobei jeweils 2 Drähte eine Messeinheit bilden (Abbildung 5). Die Anordnung in den 2 Messeinheiten ermöglicht eine Doppelmessung jeder Probe.

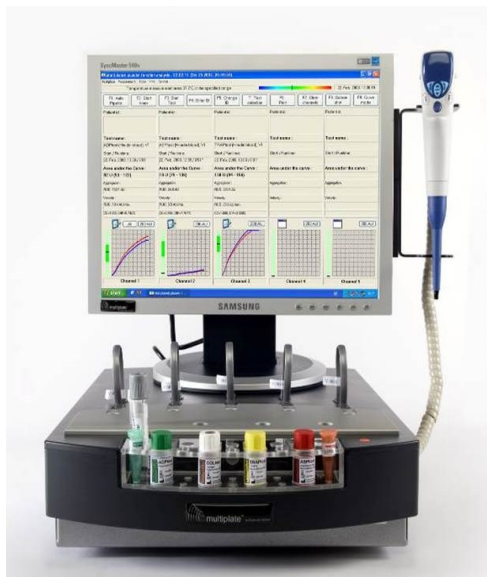


Abbildung 4: Multiplate® Analyzer



Abbildung 5: Multiplate® Analyzer: Einmalküvette mit paarigen Messeinheiten (1) und Rührstab (2)

Zwischen den beiden Drähten einer Messeinheit fließt ein kontinuierlicher elektrischer Wechselstrom. Die Aktivierung und folgende Aggregation der Thrombozyten an den Drähten führt hierbei zu einer Erhöhung des elektrischen Widerstandes (Impedanz), welcher kontinuierlich gemessen und vom Gerät in die frei gewählte Einheit Aggregation Units (AU) umgerechnet wird (Abbildung 6).

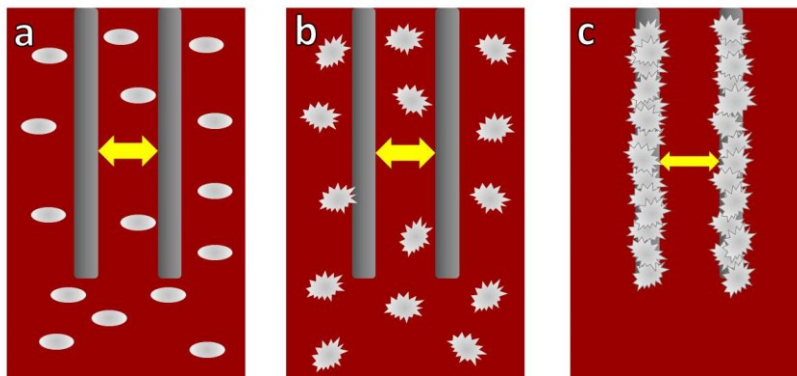


Abbildung 6: Multiplate® Analyzer - Messprinzip: kontinuierlicher Wechselstrom (gelbe Pfeile) zwischen den Messdrähten, inaktivierte Thrombozyten (weiße Ovale) (a); Aktivierung der Thrombozyten (Sterne) nach Zugabe eines Agonisten (b); Reduktion des Stromflusses nach Anhaften der Thrombozyten an den Messdrähten (c)

Die kontinuierlich gemessene Impedanz wird gegen die Zeit aufgetragen und das Maß der Aggregation durch die Fläche unter der Aggregationskurve quantifiziert. Die Fläche wird vom Gerät in die frei gewählte Einheit Units (U) umgerechnet. Durch die Doppelmessung innerhalb der Küvette werden 2 getrennte und farblich markierte Kurven aufgezeichnet. Zusätzlich werden vom Gerät die maximale Steigung der Aggregationskurve (Velocity) und die maximale Impedanz (Aggregation) ausgegeben. Alle angegebenen Werte repräsentieren hierbei die Mittelwerte beider Messungen (Abbildung 7).



Abbildung 7: Multiplate® Analyzer - Messprinzip: Grafische Darstellung der Messergebnisse

Ist der Korrelationskoeffizient beider Kurven kleiner 0,98 oder ist die Abweichung beider Kurven vom Mittelwert größer als 20 %, wird vom Gerät eine Warnung (QC-Flag, Abbildung 8) ausgegeben und vom Hersteller eine einmalige Wiederholung der Messung empfohlen.

### 3 Eigene Untersuchungen - Material und Methoden



Abbildung 8: Multiplate® Analyzer - Messprinzip: Markierung einer Messung mit QC Flag aufgrund prozentualer Abweichung beider Messungen vom Mittelwerte um mehr als 20 %

Die Durchführung der Messung erfolgte gemäß Angaben des Herstellers [143]. Für die Messung wurde mit Hirudin (20 µg/ml) versetztes Vollblut verwendet. Nach der Blutentnahme wurde das Entnahmeröhrchen für mindestens 30 Minuten bei Raumtemperatur stehend gelagert und unmittelbar vor Messbeginn sechsmal über Kopf geschwenkt. In die Küvetten wurden zunächst 300 µl auf 37 °C vorgewärmte 0,9 %ige sterile Kochsalzlösung vorgelegt und anschließend 300 µl Vollblut hinzugefügt. Das Pipettieren erfolgte hierbei mit einer mit dem Gerät verbundenen elektrischen Pipette. Die Verwendung dieser Pipette gewährleistet zum einen das Pipettieren exakter Volumina und kontrolliert zum anderen den zeitlichen Ablauf der einzelnen Messschritte. So wurde nach Zufügen des Blutes vom Gerät automatisch eine Inkubationszeit von 180 Sekunden gestartet. Während der Inkubationszeit sowie der gesamten Messdauer wurde die Probe durch das magnetische Rührstäbchen (Abbildung 5) mit einer Geschwindigkeit von 900 Umdrehungen pro Minute verrührt. Nach der Inkubationszeit wurden die Thrombozyten durch Zugabe verschiedener Agonisten aktiviert: ADP (ADPtest), ADP mit Prostaglandin E1 (ADPtestHS), Arachidonsäure (ASPItest) und Kollagen (COLtest). Die Testreagenzien wurden hierbei unter Verwendung der elektronischen Pipette tief in das verdünnte Blut in die Küvette pipettiert. Mit der Pipettierung der Agonistenlösung wurde vom Gerät automatisch die Messung der Impedanz gestartet. Die Testreagenzien wurden im Vorfeld gemäß Angaben des Herstellers (Roche, ehemals Dynabyte) mit 1000 µl Wasser für Injektionszwecke (bzw. 2000 µl beim COLtest) angemischt. Nicht benötigte Reagenzien wurden innerhalb von einer Stunde nach Herstellung in Aliquote à 50 µl aufgeteilt und für maximal 4 Wochen bei -20°C bis zur nächsten Messung aufbewahrt.

Mindestens einmal täglich wurden die vom Hersteller empfohlenen elektronischen Kontrollen am Gerät durchgeführt.

#### 3.1.2.2 Methodenetablierung

Die Methodenetablierung des Multiplate® Analyzers für die Spezies Pferd erfolgte im Rahmen des Dissertationsprojektes von Lisa Held. Es wurden 20 der unter 3.1.1.2 (S. 39) aufgeführten klinisch unauffälligen erwachsenen Warmblüter (10 Wallache, 10 Stuten) mit einem Altersmedian von 12 Jahren (Spannweite 5-19 Jahre) eingeschlossen.

Die Messungen am Multiplate® Analyzer wurden innerhalb von 30-60 Minuten nach Blutentnahme gestartet. Jeder Test wurde hierbei mit Ausnahme des COLtest in der vom Hersteller vorgeschlagenen Agonisten-Konzentration zur Untersuchung humaner Proben sowie 2 weiteren Konzentrationen durchgeführt, um die für die Spezies Pferd optimale Konzentration zu ermitteln (Tabelle 5). Beim COLtest wurden niedrigere Konzentrationen eingesetzt, da in Vorversuchen mit der vom Hersteller angegebenen Konzentration von 3,2 µg/ml Kollagen bei Pferden extrem hohe Aggregationswerte ermittelt wurden.

Tabelle 5: Multiplate® Analyzer - Methodenetablierung: Testkonzentrationen der eingesetzten Agonisten

	<b>ADPtest</b>	<b>ADPtestHS</b>		<b>ASPitest</b>	<b>COLtest</b>
Agonist	ADP	ADP	PGE1	Arachidonsäure	Kollagen
<b>Konzentration 1</b>	6,5 µM	6,5 µM	9,4 nM	0,5 mM	0,8 µg/ml
<b>Konzentration 2</b>	9,75 µM	9,75 µM	14,1 nM	0,75 mM	1,2 µg/ml
<b>Konzentration 3</b>	13 µM	13 µM	18,8 nM	1 mM	1,6 µg/ml

Zusätzlich hatte sich in den Vorversuchen gezeigt, dass der Verlauf der Aggregationskurve bei den Agonisten ADP und Arachidonsäure beim Pferd im Vergleich zum Menschen zunächst eher konkav verläuft (Abbildung 7), so dass die Messdauer auf 12 Minuten (statt 6 Minuten beim Menschen) festgelegt wurde, um nach Möglichkeit ein Plateau der Kurve zu erreichen. Bei Messungen, die mit QC-Flag markiert waren, wurde die jeweilige Messung einmalig wiederholt. War die Wiederholungsmessung erneut mit einem QC-Flag markiert, wurde die Messung von der Auswertung ausgeschlossen.

Die statistischen Berechnungen erfolgten in Zusammenarbeit mit Dr. Klaus Failing und dessen Mitarbeitern der AG Biomathematik und Datenverarbeitung des Fachbereichs Veterinärmedizin der JLU Gießen mit dem statistischen Programmpaket BMDP [256]. Die

interindividuellen Varianzen wurden durch eine einfaktorielle Varianzanalyse errechnet und mittels Levene-Test verglichen. Aufgrund der erfolgten Doppelmessung in der Einmalküvette konnten die intraindividuellen Varianzen mittels zweifaktorieller hierarchischer Varianzanalyse mit zufälligen Effekten und anschließendem F-Test berechnet werden. Das Signifikanzniveau wurde auf 0,05 festgelegt.

Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den eingesetzten Konzentrationen konnten sowohl inter- als auch intraindividuell nicht nachgewiesen werden. Entscheidungskriterien für die Auswahl der Konzentrationen waren höhere Mittelwerte der Aggregation (U) und niedrige interindividuelle Variationskoeffizienten (Anhang Tabelle 12-3, S. 12-7).

So ergaben sich für die weiteren Untersuchungen mit dem Multiplate® Analyser folgende finale Testkonzentrationen der Agonisten:

- ADPtest: 6,5 µM ADP ( $\cong$  20 µl Testreagenz)
- ADPtestHS: 6,5 µM ADP + 9,4 nM PGE1 ( $\cong$  je 20 µl Testreagenz)
- ASPItest: 0,75 mM Arachidonsäure ( $\cong$  30 µl Testreagenz)
- COLtest: 1,6 µg/ml Kollagen ( $\cong$  20 µl Testreagenz)

Als Kontrolle wurde bei jedem Pferd die Spontanaggregation gemessen. Statt eines Agonisten wurden der Probe hierbei nach der Inkubation 20 µl 0,9 %ige Kochsalzlösung zugegeben.

#### 3.1.2.3 Einfluss der Rasse auf die Impedanzaggregation

Um einen bislang nicht untersuchten Einfluss der Rasse auf die Impedanzaggregometrie zu überprüfen, wurden Blutproben von den unter 3.1.1.2 (S. 39) aufgeführten klinisch unauffälligen erwachsenen Kleinpferden und Warmblütern mit dem Multiplate® Analyser unter Verwendung des ADPtest, ADPtestHS, ASPItest und COLtest in den vorgenannten Konzentrationen sowie die Spontanaggregation entsprechend den Ausführungen unter 3.1.2.1 (S. 42) untersucht.

#### 3.1.2.4 Einfluss des magnetischen Rührstabes auf die Impedanzaggregation

In Untersuchungen von humanen Blutproben konnte gezeigt werden, dass das alleinige Verrühren der Probe mit dem magnetischen Rührstab während der Messung eine Aktivierung

und Aggregation der Thrombozyten verursachen kann [257]. Gleichwohl gelten erhöhte Aggregationswerte der Spontanaggregation bei Messungen im Vollblut beim Menschen als Indikator einer Hyperkoaguabilität und wurden als Risikoindikator für arterielle Gefäßverschlüsse identifiziert [258–260].

Um den Einfluss des Rührstabes beim Equiden zu ermitteln, wurden bei 10 Warmblütern und 32 Kleinpferden zeitgleich zu den unter 3.1.2.3 genannten weitere Messungen durchgeführt. Hierbei wurde der Messablauf (s. 3.1.2.1) entsprechend der Untersuchungen von Bampalis et al. [257] dahingehend abgeändert, dass der magnetische Rührstab erst nach Ende der Inkubationszeit vor der Zugabe des jeweiligen Agonisten mit einer Pinzette in die Küvette eingelegt wurde. Bei Messungen, die mit QC-Flag markiert waren, wurde die jeweilige Messung einmalig wiederholt. War die Wiederholungsmessung erneut mit einem QC-Flag markiert, wurde die Messung von der Auswertung ausgeschlossen.

#### 3.1.2.5 Statistik

Die Daten der Ergebnisse der Untersuchungen aus 3.1.2.3 und 3.1.2.4 wurden mit Microsoft Excel 2010 tabellarisch erfasst, die statistische Auswertung erfolgte durch die Autorin mit dem Programm GraphPad Prism (GraphPad Software Version 6).

Alle Variablen wurden zunächst mittels Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung überprüft und gegebenenfalls logarithmisch transformiert. Der Einfluss von Rasse und magnetischem Rührstab wurde mittels zweifaktorieller ANOVA mit Messwiederholung bezüglich der Methode (mit und ohne Rührstab) und einem post-hoc paarweisen Mehrfachvergleich nach Bonferroni mit adjustierten  $p$ -Werten geprüft. Das Signifikanzniveau wurde auf 0,05 festgelegt.

#### 3.1.3 Fluoreszenz-Durchflusszytometrie (Accuri® C6)

##### 3.1.3.1 Gerät und Messprinzip

Der Accuri® C6 (Becton Dickinson) ist ein laser- und fluoreszenzbasiertes Durchflusszytometer zur Differenzierung von Zellpopulationen (Abbildung 9).



Abbildung 9: Accuri® C6

Das Messprinzip ähnelt hierbei zunächst dem des ADVIA® 2120, so werden mittels Streulicht Informationen über Zellgröße (Vorwärtsstreulicht, Forward Scatter, FSC) und Granularität des Zellinhaltes (Seitwärtsstreulicht, Side Scatter, SSC) generiert. Mithilfe von Emissions-Detektoren kann bei der Durchflusszytometrie zusätzlich eine Fluoreszenz von Zellen nachgewiesen werden. Zur Darstellung nicht eigenständig fluoreszierender Zellen kommen hierbei mit fluoreszierenden Farbstoffen (Fluorochrome) markierte Antikörper gegen spezifische Oberflächenproteine der nachzuweisenden Zellen zum Einsatz. Diese Fluorochrome werden durch das Laserlicht angeregt und emittieren dann Licht spezifischer Wellenlängenspektren. Durch die Verwendung verschiedener Laser, Detektoren und Filter können in einer Probe verschiedene Fluorochrome eingesetzt und so unterschiedliche Zelltypen gleichzeitig identifiziert werden. Der hier verwendete Accuri® C6 ist mit einem roten (Wellenlänge 640 nm) und einem blauen (Wellenlänge 488 nm) Laser sowie 4 Fluoreszenzkanälen (FL) mit spezifischen Detektoren und Filtern ausgestattet (Tabelle 6).

### 3 Eigene Untersuchungen - Material und Methoden

---

Tabelle 6: Accuri® C6: Spezifikationen der Fluoreszenzkanäle (Filter: Mittelwert/Bandbreite der durchgelassenen Wellenlänge; LP=long pass=Tiefpassfilter)

Fluoreszenzkanal	Laserwellenlänge (nm)	Filter (nm)	Fluorochrom (Beispiele)
FL-1	488	530/30	Fluoresceinisothiocyanat (FITC)
FL-2	488	670 LP	Peridinin-Chlorophyll (PerCP)
FL-3	488	585/40	Phycoerythrin (PE)
FL-4	640	675/25	Allophycocyanin (APC)

Durch die Programmierung eines elektronischen Schwellenwertes (threshold) für einen frei wählbaren Messparameter kann die Zahl der vom Durchflusszytometer detektierten Ereignisse begrenzt werden. In den eigenen Untersuchungen wurde der Schwellenwert des FSC-H als Indikator der Zellgröße auf Kanal 20.000 gesetzt.

#### 3.1.3.2 Methodenetablierung

Die Methodenetablierung erfolgte im Rahmen des Dissertationsprojektes von Kim Theuerkauf. Ziel war eine Adaptation der in der Humanmedizin verwandten Protokolle zur Messung der Thrombozytenaktivierung [136] und der Thrombozyten-Leukozyten-Aggregate [197] im Vollblut von Pferden. Durch die Verwendung von mit einem Fluorochrom markierten Thrombozyten-spezifischen Antikörpern kann im Rahmen dieser Protokolle auf Waschschriffe und folglich Zentrifugation verzichtet werden. Eine durch die Zentrifugation bedingte Aktivierung der Thrombozyten in vitro wird hierdurch vermindert.

##### 3.1.3.2.1 Präanalytik

Das Protokoll zum Nachweis von TLA empfiehlt vor der Durchführung der durchflusszytometrischen Untersuchung eine Lyse der Erythrozyten [197]. Im Rahmen von Voruntersuchungen zeigte sich jedoch, dass die nach Herstellerangaben durchgeführte erfolgreiche Lysierung der Erythrozyten mit VersaLyse® (Beckman Coulter) im mit Zitrat antikoagulierten Pferdeblut (0,106 mol/l Tri-Natrium-Zitrat, Mischverhältnis 1:10; S-Monovette; Sarstedt) auch zu einer signifikanten Abnahme der am ADVIA® 2120 gemessenen Zellzahlen von Thrombozyten und Leukozyten führte (Tabelle 7). Aufgrund der deutlich reduzierten Zahl an Thrombozyten und Leukozyten erschien die Verwendung des lysierten Plasmas ungeeignet.

### 3 Eigene Untersuchungen - Material und Methoden

---

In einem zweiten Schritt wurde aus dem mit Zitrat antikoagulierten Blut (0,106 mol/l Tri-Natrium-Zitrat, Mischverhältnis 1:10; S-Monovette; Sarstedt) nach Sedimentation der Erythrozyten für 30 Minuten bei Raumtemperatur durch Abpipettierung des Überstandes Plättchen-Leukozytenreiches-Plasma (PLRP) gewonnen. Die Messung der Zellzahlen mit dem ADVIA® 2120 ergaben hierbei eine signifikante Erhöhung der Thrombozyten und Leukozyten (Tabelle 7).

Tabelle 7: Accuri® C6 - Methodenetablierung: Zellzahlen gemessen am ADVIA® 2120 vor und nach Erythrozytenlyse sowie Sedimentation (Mittelwerte und Standardabweichungen, Statistik GraphPad Prism 6)

	Anzahl	Thrombozyten [ $\times 10^9/l$ ]	Leukozyten [ $\times 10^9/l$ ]
<b>Erythrozytenlyse</b>			
vorher	10	103,2 $\pm$ 14,4	5,3 $\pm$ 0,6
nachher	10	28,9 $\pm$ 16,7	0,7 $\pm$ 0,7
<i>p</i> -Wert		0,002	0,002
Statistik		Wilcoxon-Test	t-Test
<b>Sedimentation</b>			
vorher	10	103,2 $\pm$ 14,4	5,3 $\pm$ 0,6
nachher	10	176,1 $\pm$ 42,4	8,7 $\pm$ 0,9
<i>p</i> -Wert		0,0002	<0,0001
Statistik		t-Test	t-Test

Durch die signifikante Erhöhung beider Zellpopulationen im PLRP wurde dieses als Ausgangsmaterial für die weitere Methodenetablierung der Durchflusszytometrie verwendet.

### 3 Eigene Untersuchungen - Material und Methoden

#### 3.1.3.2.2 Antikörper

Als spezifischer Marker für Thrombozyten wurde ein Antikörper gegen CD41/61 verwendet. Als Aktivierungsmarker kamen Antikörper gegen CD62P und gegen CD154 (Synonym CD40L) zum Einsatz. Der Nachweis von Thrombozyten-Leukozyten-Aggregaten wurde mittels Antikörper gegen CD11a/18 geführt (Tabelle 8).

Tabelle 8: Accuri® C6 - Methodenetablierung: Monoklonale Antikörper und Isotypenkontrollen (Fluorochrome s. Tabelle 6, S. 49)

	<b>CD41/61</b>	<b>CD62P</b>	<b>CD154</b>	<b>CD11a/18</b>
<b>Antikörper</b>				
Artikel	MCA1095GA	MCA2419	MCA1521F	MCA1081F
Hersteller	AbD Serotec (jetzt Bio Rad)	AbD Serotec (jetzt Bio Rad)	AbD Serotec (jetzt Bio Rad)	AbD Serotec (jetzt Bio Rad)
Wirtspezies	Maus	Maus	Hamster	Maus
Zielspezies	Schaf	Mensch	Maus	Pferd
Klon	CO.35E4	Psel.KO.2.7	-	CVS9
Fluorochrom	kein	kein	FITC	FITC
Verdünnung	1:50	1:50	1:100	1:200
<b>Isotypenkontrolle</b>				
Artikel	550826	sc-2012	sc-3870	550589
Hersteller	Becton Dickinson	Santa Cruz	Santa Cruz	Becton Dickinson
Wirtspezies	Maus	Maus	Hamster	Maus
Fluorochrom	APC	FITC	FITC	FITC

Die beiden unmarkierten Antikörper wurden mittels des LYNX Rapid Antibody Conjugation Kit® (AbD Serotec, jetzt Bio Rad) nach Herstellerangabe konjugiert: Der Antikörper gegen CD41/61 mit APC und der Antikörper gegen CD62P mit FITC.

#### 3.1.3.2.3 Messablauf

Für die Methodenetablierung wurden Blutproben von klinisch unauffälligen Equiden verwendet, denen im Rahmen einer allgemeinen Gesundheitskontrolle Blut entnommen wurde. Ausgeschlossen waren Pferde und Kleinpferde, die in den vorhergegangenen 14 Tagen Medikamente erhalten hatten und bei denen in der Blutuntersuchung eine Abweichung vom Referenzintervall (RI) von 2 oder mehr Entzündungsvariablen (Leukozyten [4,4-9,0 x10<sup>9</sup>/l; ADVIA® 2120, Siemens], Globuline [23-42 g/l; Pentra 400, Axon Lab], Fibrinogen [1,25-3,29 g/l; STA Compact, Diagnostica Stago ]) ermittelt wurde.

Es handelte sich um jeweils 5 Stuten und Wallache (5 Warmblüter und 5 Kleinpferde) mit einem Altersmedian von 12,5 Jahren (Spannweite 5-28 Jahre) und einem medianen Körpergewicht von 500 kg (Spannweite 420-620 kg). Die Blutentnahme erfolgte wie unter 3.1.1.2 (S. 39) beschrieben in ein Natriumzitrat enthaltendes, 10 ml fassendes Blutröhrchen (0,106 mol/l Tri-Natrium-Zitrat, Mischverhältnis 1:10; S-Monovette; Sarstedt).

Aus 10 ml mit Zitrat antikoaguliertem Blut (0,106 mol/l Tri-Natrium-Zitrat, Mischverhältnis 1:10; S-Monovette; Sarstedt) wurde nach Sedimentation der Erythrozyten für 30 Minuten bei Raumtemperatur durch Abpipettierung des Überstandes Plättchen-Leukozytenreiches-Plasma (PLRP) gewonnen. Die Messungen erfolgten unmittelbar nach der Herstellung des PLRP. Zum Nachweis der Thrombozytenaktivierung wurde das PLRP 1:10 mit modifiziertem HEPES/Tyrod's Puffer verdünnt [136]. Der Nachweis von Thrombozyten-Leukozyten-Aggregaten erfolgte aus unverdünntem PLRP [197].

Es wurden in 2 Probengefäße jeweils 20 µl verdünntes bzw. unverdünntes PLRP, 20 µl Antikörperlösung gegen CD41/61 sowie 20 µl Antikörperlösung gegen CD62P oder CD154 oder CD11a/18 pipettiert. Einer Probe wurde 20 µl modifizierter HEPES/Tyrod's Puffer, der anderen Probe zur Aktivierung der Thrombozyten 20 µl Kollagenlösung (50 µg/ml, COLtest, Roche) zugefügt. Alle Proben wurden gevortext und im Dunkeln inkubiert. Die Inkubationszeit betrug für den Nachweis der Thrombozytenaktivierung 20 Minuten [136] für den Nachweis der Thrombozyten-Leukozyten-Aggregate 15 Minuten [197]. Die Proben zum Nachweis der Thrombozyten-Leukozyten-Aggregate aus unverdünntem PLRP wurden nach der Inkubation mit 100 µl modifiziertem HEPES/Tyrod's Puffer verdünnt [197].

Anschließend erfolgte die Messung der Proben mit dem Accuri® C6. Alle Messungen wurden innerhalb von 75 Minuten nach Blutentnahme abgeschlossen.

#### 3.1.3.2.4 Auswertung der Messungen

Die Auswertung der Messungen erfolgten mit dem Programm BD Accuri™ C6 Analysis Software (Version 1.0.264.21; Becton Dickinson).

Zunächst wurde für die Thrombozyten mittels Kombination von Streulicht (Forward Scatter, FSC und Side Scatter, SSC) und Fluoreszenz das Gate P1 definiert. Verwendet wurde der mit APC-markierte Antikörper gegen CD41/61, und dem Fluorochrom entsprechend erfolgten die Messungen im FL-4 (Abbildung 10).

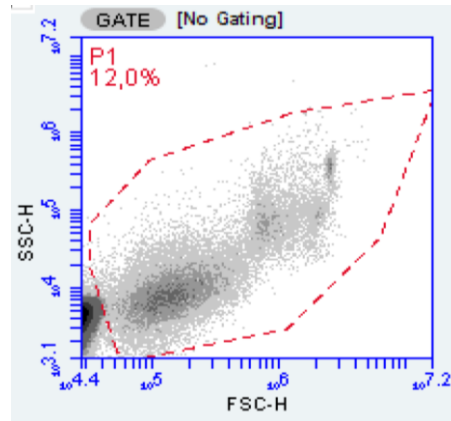


Abbildung 10: Accuri® C6 - Methodenetablierung: Definition des Gates P1 zur Einschränkung der Messungen auf Thrombozyten (CD41/61-positive Zellen)

Um den Bereich der Ereignisse auf den Zielparameter, in diesem Fall CD41/61-positive Zellen, zu spezifizieren, wurden Kontrollmessungen mit einem Isotypen der verwendeten Antikörper (Tabelle 8, S. 51) durchgeführt. Mittels Darstellung als Histogramm, bei dem die Fluoreszenz auf der X-Achse gegen die Zahl der Ereignisse auf der Y-Achse dargestellt wird, wurden Marker gesetzt, um den tatsächlichen Anteil positiver Zellen zu ermitteln (Abbildung 11). Diese Isotypen-Kontrollen wurden für die im FL-1 gemessenen Ereignisse mit FITC-markierten Antikörpern gegen CD62P, CD154 und CD11a/18 entsprechend durchgeführt.

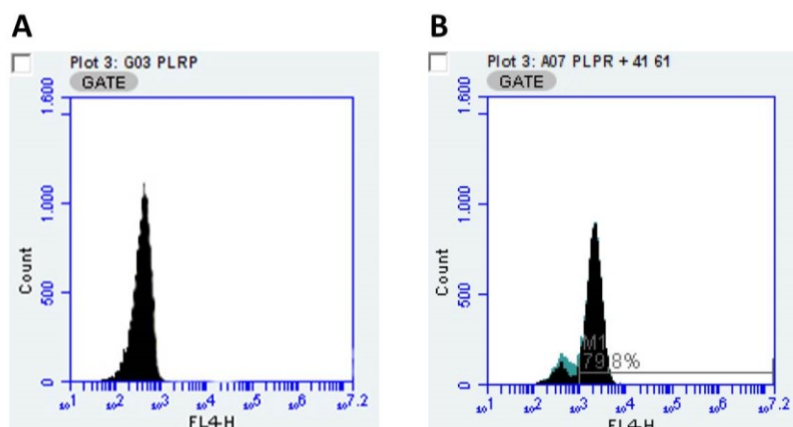


Abbildung 11: Accuri® C6 - Methodenetablierung: Histogramme der Messungen der Isotypenkontrolle (A) und der mit Antikörper gegen CD41/61 markierten Zellen (B) im Gate P1 im FL-4

Mittels Punktwolkendiagramm können Daten aus Messungen aus 2 unterschiedlichen Fluoreszenzkanälen dargestellt werden (Abbildung 12). Jeder Punkt im Diagramm stellt hierbei ein Messereignis dar. Der untere linke Quadrant (Q1-LL, lower left) stellt Ereignisse dar,

welche für beide gewählten Parameter negativ sind und wird durch die Isotypenkontrolle definiert.

Bei den eigenen Untersuchungen wurden jeweils 20.000 CD41/61 positive Ereignisse im Gate P1 gemessen. In der Abbildung 12 liegen einfach positive Zellen für CD41/61 im Q1-UL (upper left). Einfach positive Zellen für den im FL-1 detektierten Antikörper (hier CD11a/18) liegen im Q1-LR (lower right), Doppelt positive Events im Q1-UR (upper right). Im dargestellten Beispiel waren somit 3,5% der Zellen mit beiden Antikörpern markiert und definierten hierdurch den prozentualen Anteil der Thrombozyten-Leukozyten-Aggregate.

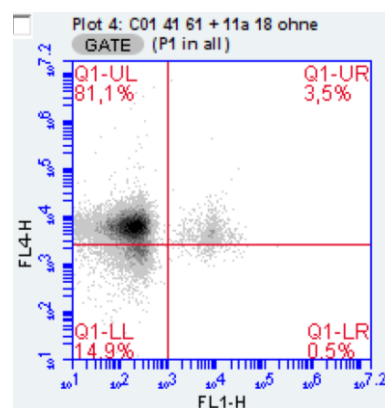


Abbildung 12: Accuri® C6 - Methodenetablierung: Punktwolkendiagramm mit Quadrantenmarkern für Messungen mit 2 Parametern im FL-1 und FL-4

#### 3.1.3.2.5 Statistik

Die Daten wurden mit Microsoft Excel 2010 tabellarisch erfasst, die statistische Auswertung erfolgte durch die Autorin mit dem Programm GraphPad Prism (GraphPad Software Version 6, San Diego). Alle Variablen wurden zunächst mittels Shapiro Wilk Test bezüglich Normalverteilung geprüft. Der Vergleich zwischen den nativen und den Kollagen-aktivierten Proben erfolgte mittels gepaartem t-Test bzw. Wilcoxon-Test.

#### 3.1.3.3 Thiazol Orange

Zum Nachweis retikulierter, juveniler, RNA-reicher Thrombozyten wurde eine Färbung mit Thiazol Orange wie für das Pferd beschrieben [195] durchgeführt. Verwendet wurde hierbei das PLRP der 10 unter 3.1.3.2.3 (S. 51) aufgeführten Equiden.

Es wurden 5 µl PLRP, 5 µl Antikörperlösung gegen CD41/61 sowie 1 ml Thiazol Orange (Retic-Count®, Becton Dickinson) in ein Probengefäß pipettiert, gevortext und für 90 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Die Messungen erfolgten im Anschluss erneut mit dem Accuri® C6.

Für die Auswertungen wurde auch hier das Programm BD Accuri™ C6 Analysis Software (Version 1.0.264.21; Becton Dickinson) verwendet. Entsprechend den Ausführungen im vorhergehenden Kapitel wurde für die Thrombozyten mittels Kombination von Streulicht und Fluoreszenz ein Gate definiert und durch Isotypenkontrolle spezifiziert. Thiazol-positive Events wurden dem Emissionsspektrum des Thiazols von 488 nm entsprechend im FL-1 gemessen. Es wurden 10.000 CD41/61 positive Ereignisse gemessen. Doppelt positive Ereignisse sind ebenfalls im Bereich Q1-UR wiedergegeben, im gewählten Beispiel entsprechend 3,7 % (Abbildung 13).

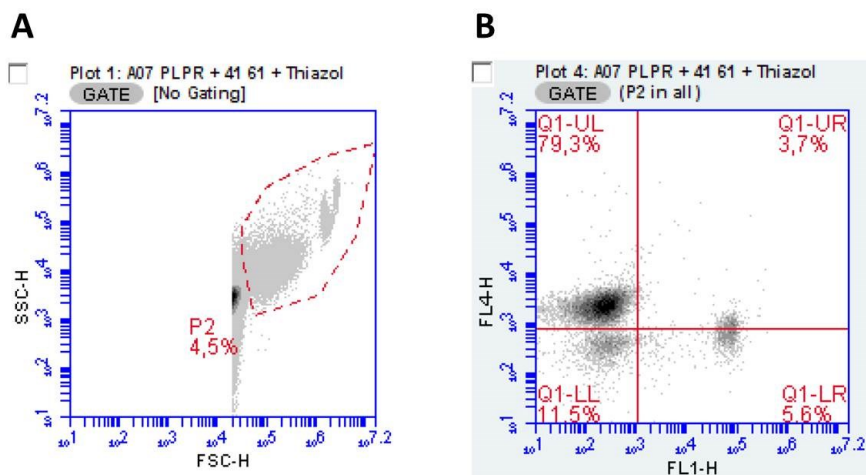


Abbildung 13: Accuri® C6 - Methodenetablierung: Definition des Gates P2 zur Einschränkung der Messungen Thiazol-positiver Thrombozyten (A) und Punktwolkendiagramm mit Quadrantenmarkern für CD41/61- sowie Thiazol-positive Zellen (B)

#### 3.1.4 ELISA sCD40L und sP-Selectin

Es wurden 2 ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) gemäß Herstellerangaben auf ihre Eignung zur Messung von löslichem CD40L bzw. CD62P aus Pferdeserum bzw. -plasma überprüft: der Quantikine® ELISA Human CD40 Ligand/TNFSF5 Immunoassay (DCDL40; R&D Systems Inc.) sowie der Human sP-Selectin/CD62P Immunoassay (BBE6; R&D Systems Inc.). Bei beiden Testsystemen handelt es sich um quantitative Sandwich ELISA zur Konzentrationsbestimmung von humanem, löslichem (s=soluble) sCD40L bzw. sP-Selectin (sCD62P). Hierbei sind die Mikroplatten mit einem spezifischen primären Antikörper gegen humanes CD40L bzw. humanes P-Selectin beschichtet. Beim CD40L handelt es sich um einen polyklonalen, beim P-Selectin um einen monoklonalen Antikörper. Standards, Kontrollen und Proben werden in die Vertiefungen der Mikroplatte pipettiert und jegliches vorhandene sCD40L bzw. sP-Selectin an den auf der Mikroplatte fixierten primären Antikörper gebunden. Nachdem alle ungebundenen Substanzen gewaschen sind, wird ein enzymatisch markierter polyklonaler sekundärer Antikörper gegen sCD40L bzw. sP-Selectin zugegeben. Durch erneutes Waschen werden alle ungebundenen sekundären Antikörper entfernt. Nach Zugabe einer Substrat-Lösung kommt es proportional zur gebundenen Menge an sCD40L bzw. sP-Selectin durch das am sekundären Antikörper gebundene Enzym zu einem Farbumschlag des Substrates. Die enzymatische Reaktion wird nach 15 bzw. 30 Minuten gestoppt. Anschließend kann die Farbintensität photometrisch gemessen und in Konzentrationen des Zielproteins umgerechnet werden.

##### 3.1.4.1 Testvalidierung

Beide ELISA wurden nach einem Validierungs-Protokoll der Herstellerfirma R&D getestet. Hierbei sollte zunächst überprüft werden, ob Interferenzen zwischen dem eingesetzten Probenmaterial (Serum bzw. Heparinplasma von Pferden) und den Testreagenzien bestehen, wodurch das Testergebnis verfälscht werden könnte. Im Rahmen dieser Prüfung auf "Spike/Recovery" (Wiederfindung) wurde zunächst eine definierte Menge des rekombinanten Zielproteins in die Probe gegeben ("spiked") und der ELISA gemäß Herstellerangabe durchgeführt. Die gemessene Konzentration (Recovery) sollte hierbei der erwarteten zugegebenen Menge (Spike) entsprechen. Ergeben sich erhebliche Abweichungen der gemessenen von der erwarteten Konzentration, kann dies ein Zeichen dafür sein, dass

einer oder mehrere Bestandteile in der untersuchten Probe mit einer oder mehreren Testsubstanzen interferiert und falsch zu hohe oder falsch zu niedrige Werte verursacht. Im Rahmen der Prüfung auf Linearität wurden native und "spiked" Proben in einer Verdünnungsreihe untersucht. Abweichende Messungen der Verdünnungsreihe von den erwarteten Messwerten können erneut ein Hinweis auf Interferenzen der Probe und der Testbestandteile sein. Hierbei treten fehlerhafte Messungen unter Umständen nur bei zu gering verdünnten Ausgangsproben auf, bei höheren Verdünnungsstufen sind die Interferenzen möglicherweise nicht mehr vorhanden. So könnte die Testsensitivität durch Verdünnungen der Ausgangsprobe erhöht werden.

Für die Validierung wurden zunächst Serum- und Heparinplasma-Proben von 3 Pferden gepoolt. Die Proben stammten von Pferden, denen im Rahmen einer Gesundheitskontrolle Blut entnommen wurde. Die Entnahme erfolgte wie unter 3.1.1.2 (S. 39) beschrieben. Die Proben wurden innerhalb von 60 Minuten zentrifugiert (1500 g, 10 Minuten; Rotina 35, Hettich), Serum und Plasma abpipettiert, gepoolt und bei -80 °C gelagert. Die Pool-Proben wurden unmittelbar vor der Durchführung des ELISA aufgetaut und gevortext.

Gemäß Vorgaben des Herstellers wurden diese Pool-Proben zunächst verdünnt:

- sCD40L: Serum 1:5 mit RD5P (Calibrator Diluent)
- sP-Selectin: Serum und Plasma 1:20 mit Sample Diluent.

Die zum "Spiking" verwendete Lösung (Spiking Stock Solution) sollte dem 10-fachen der höchsten eingesetzten Konzentration der Standard-Reihe entsprechen. Für das sP-Selectin wurde hierbei der höchste Standard durch Zugabe von 100 µl statt 1000 µl Aqua destillata in Lösung gebracht und so eine Konzentration von 460 ng/ml erreicht. Im Falle des sCD40L entsprach die geforderte Konzentration mit 40.000 pg/ml der unverdünnten Standardlösung.

Durch Zugabe von 20 µl der Spiking Stock Solution zu 980 µl Serum- bzw. Plasmaprobe wurde das "spiked" Ausgangsmaterial (S) hergestellt, die Zugabe der gleichen Menge zu 980 µl des entsprechenden Verdünners des Test (Diluent) ergab die Kontrollprobe (RC).

Die Herstellung der Verdünnungsreihe zur Überprüfung der Linearität erfolgte in den Verdünnungsschritten 1:2, 1:4 und 1:8 (Tabelle 9).

### 3 Eigene Untersuchungen - Material und Methoden

Tabelle 9: ELISA sCD40L und sP-Selectin - Validierung: Probenherstellung für die Prüfung auf Wiederfindung und Linearität

	N nativ		S spiked		RC control
	Serum	Plasma	Serum	Plasma	
"unverdünnt"	<b>SN0</b>	<b>PN0</b>	<b>SS0</b>	<b>PS0</b>	<b>RC0</b>
<b>1:2</b>	<b>SN2</b>	<b>PN2</b>	<b>SS2</b>	<b>PS2</b>	<b>RC2</b>
Herstellung	500 µl SN0 + 500 µl Diluent	500 µl PN0 + 500 µl Diluent	500 µl SS0 + 500 µl Diluent	500 µl PS0 + 500 µl Diluent	500 µl RC0 + 500 µl Diluent
<b>1:4</b>	<b>SN4</b>	<b>PN4</b>	<b>SS4</b>	<b>PS4</b>	<b>RC4</b>
Herstellung	500 µl SN2 + 500 µl Diluent	500 µl PN2 + 500 µl Diluent	500 µl SS2 + 500 µl Diluent	500 µl PS2 + 500 µl Diluent	500 µl RC2 + 500 µl Diluent
<b>1:8</b>	<b>SN8</b>	<b>PN8</b>	<b>SS8</b>	<b>PS8</b>	<b>RC8</b>
Herstellung	500 µl SN4 + 500 µl Diluent	500 µl PN4 + 500 µl Diluent	500 µl SS4 + 500 µl Diluent	500 µl PS4 + 500 µl Diluent	500 µl RC4 + 500 µl Diluent

#### 3.1.4.2 Testdurchführung

Neben den vorgenannten Poolplasma- und Poolserumproben wurde Serum und Heparinplasma von 3 weiteren Pferden verwendet, denen im Rahmen einer Gesundheitskontrolle Blut entnommen wurde. Die Entnahme erfolgte wie unter 3.1.1.2 (S. 39) beschrieben. Hierbei wurden in jeweils eine Serum- bzw. Heparin-S-Monovette (4500 µl) je 150 µl einer equinen Kollagenlösung (50 µg/ml; COLtest, Roche) vorgelegt, um eine Thrombozytenaktivierung zu induzieren. Die Proben wurden innerhalb von 60 Minuten zentrifugiert (1500 g, 10 Minuten; Rotina 35, Hettich), Serum und Plasma abpipettiert und bei -80 °C gelagert. Die Proben wurden unmittelbar vor der Durchführung des ELISA aufgetaut und gevortext.

Für den Quantikine® ELISA Human CD40 Ligand/TNFSF5 Immunoassay wurden unverdünnte sowie 1:5 verdünnte Serum- und Heparinplasmaproben von 2 Pferden verwendet. Bei dem Human sP-Selectin/CD62P Immunoassay wurden unverdünnte Serum- und Heparinplasmaproben sowie Verdünnungen 1:10, 1:20 und 1:40 von 3 Pferden verwendet. Dies galt in beiden Fällen für die nativen sowie die mit equinem Kollagen aktivierten Proben.

#### 3.1.4.2.1 sCD40L

Der Quantikine® ELISA Human CD40 Ligand/TNFSF5 Immunoassay (DCDL40; R&D Systems Inc.) wurde gemäß Herstellerangabe durchgeführt.

Zunächst wurden die benötigten Reagenzien vorbereitet:

- Calibrator Diluent RD5P 1:2 mit Aqua destillata verdünnt
- Waschpuffer 1:24 mit Aqua destillata verdünnt
- Standards: Zugabe von 100 µl Standard in 900 µl Calibrator Diluent RD5P, davon 500 µl in 500 µl RD5P, diesen Schritt fünfmal wiederholen.

Im weiteren Testablauf wurde jede Probe doppelt gemessen, d.h. jeweils in 2 Vertiefungen aufgetragen:

- 100 µl Assay Diluent RD1-65 in jede Vertiefung
- jeweils 100 µl in jede Vertiefung: 7 Standards, Kontrollen (low, medium, high), Proben Validierung (Tabelle 9), Proben Testpferde (n = 2); Abdecken der Platte mit Klebefolie, Übersicht der Plattenbelegung s. Anhang Tabelle 12-4, S. 12-8.
- Inkubation: 2 Stunden bei Raumtemperatur, horizontal kreisender Rüttler (500 rpm)
- Aspiration der Flüssigkeiten, viermaliges Waschen mit Waschpuffer, nach letztem Waschvorgang Mikroplatte auf sauberen Papiertüchern ausklopfen
- 200 µl CD40L Conjugate in jede Vertiefung, Abdecken der Platte mit Klebefolie
- Inkubation: 2 Stunden bei Raumtemperatur, horizontal kreisender Rüttler (500 rpm)
- Substrat-Lösung A und B vermischen, vor Licht schützen
- erneutes Aspirieren und Waschen wie oben
- 200 µl Substrat-Lösung in jede Vertiefung, Inkubation für 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln
- 50 µl Stop Solution (Schwefelsäure, 2 N) in jede Vertiefung, Kontrolle Farbumschlag von blau zu gelb
- Messung der optischen Dichte innerhalb von 30 Minuten bei 450 nm sowie 540 nm

#### 3.1.4.2.2 sP-Selectin

Der Human sP-Selectin/CD62P Immunoassay (BBE6; R&D Systems Inc.) wurde gemäß Herstellerangabe durchgeführt.

Zunächst wurden die benötigten Reagenzien vorbereitet:

- Waschpuffer 1:24 mit Aqua destillata verdünnt
- Standards mit jeweils 1 ml Aqua destillata in Lösung gebracht
- sP-Selectin Control mit 500 µl Aqua destillata aufgelöst, nach 10 Minuten 1:20 mit Sample Diluent verdünnt
- 250 µl sP-Selectin Conjugate Concentrate in Ampulle mit Conjugate Diluent

Im weiteren Testablauf wurde jede Probe doppelt gemessen, d.h. jeweils in 2 Vertiefungen aufgetragen:

- jeweils 100 µl in jede Vertiefung: 6 Standards, 1 Kontrolle, Proben Validierung (Tabelle 9), Proben Testpferde (n = 3), Übersicht der Plattenbelegung s. Anhang Tabelle 12-4, S. 12-8.
- 100 µl sP-Selectin Conjugate in jede Vertiefung, Abdecken der Platte mit Klebefolie
- Inkubation für 1 Stunde bei Raumtemperatur
- Aspiration der Flüssigkeiten, dreimaliges Waschen mit Waschpuffer, nach letztem Waschvorgang Mikroplatte auf sauberen Papiertüchern ausklopfen
- 100 µl Substrat in jede Vertiefung, Abdecken der Platte mit Klebefolie, Inkubation für 15 Minuten bei Raumtemperatur
- 100 µl Stop Solution (Salzsäure, 1 N) in jede Vertiefung
- Messung der optischen Dichte innerhalb von 30 Minuten bei 450 nm sowie 620 nm

#### 3.1.4.3 Auswertung

Die Auswertung der Mikroplatten erfolgte mit dem EPOCH2 microplate reader (BioTek). Hierbei erfolgte die Messung der Optischen Dichte (OD) gemäß Herstellerangaben beim ELISA des sCD40L bei 450 nm sowie 540 nm und beim ELISA des sCD62P bei 450 nm und 620 nm. Aus diesen beiden Messungen errechnet das Programm des Readers die delta-OD-Werte. Mittels der eingegebenen Konzentrationen und der gemessenen OD-Werte der Standards und

### 3 Eigene Untersuchungen - Material und Methoden

---

Kontrollen wurde durch das Gerät mittels "four parameter logistic (4-PL) curve" eine Standardkurve berechnet. Aus der so erstellten Standardkurve überprüfte das Programm des EPOCH2, ob die eingesetzten Kontrollen mit den eingegebenen, erwarteten Konzentrationen ( $\pm 15\%$  Abweichungstoleranz) übereinstimmen. Lagen die Messungen der Standards und Kontrollen innerhalb der erwarteten Werte, wurden durch das Programm die Konzentrationen für die zu untersuchenden Proben berechnet.

Die Berechnung der Wiederfindung "Spike/Recovery" (3.1.4.1, S. 56) erfolgte mittels der Formel:

$$\% \text{ Recovery} = \frac{\text{Messwert Probe spiked} - \text{Messwert Probe nativ}}{\text{zu erwartender Wert Probe spiked}} \times 100$$

Die Überprüfung der Linearität (3.1.4.1, S. 56) erfolgte am Beispiel der Verdünnungsstufe 1:2 mittels der Formel:

$$\% \text{ Recovery (1:2)} = \frac{\text{Messwert Probe (1:2)}}{\text{zu erwartender Wert dividiert durch 2}} \times 100$$

## 3.2 Thrombozytopenie und Thrombozytose bei Klinikpatienten (2008 - 2015)

### 3.2.1 Probanden und Einschlusskriterien

Zur Ermittlung von Prävalenz, Ätiologie und prognostischer Aussagekraft einer Thrombozytopenie und Thrombozytose wurden retrospektiv die hämatologischen Daten von Pferden ausgewertet, die zwischen Juli 2008 und Juni 2015 in der Klinik für Pferde, Innere Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen vorgestellt wurden. Hierbei wurde jedes Pferd für die verminderte und die erhöhte Anzahl an Thrombozyten jeweils nur einmalig in der Datenerhebung berücksichtigt.

Gemäß des geltenden Referenzintervalls des Zentrallabors für die mit dem ADVIA® 120/2120 (Siemens) ermittelten Thrombozytenzahlen für erwachsene Warmblüter bestand eine Thrombozytopenie bei einer Thrombozytenzahl von  $< 90 \times 10^9/l$  im  $K_3$ -EDTA-Blut (S-Monovette; Sarstedt) bzw. von  $< 84 \times 10^9/l$  im Zitrat-Blut (0,106 mol/l Tri-Natrium-Zitrat, Mischverhältnis 1:10; S-Monovette; Sarstedt). Als Thrombozytosen wurden Werte  $> 270 \times 10^9/l$  im  $K_3$ -EDTA-Blut bzw. von  $> 245 \times 10^9/l$  im Zitrat-Blut gewertet.

Die ermittelten Thrombozytopenien wurden weiter unterteilt: Eine echte Thrombozytopenie lag vor, wenn im Zitrat-Blut ebenfalls eine Thrombozytopenie ermittelt wurde oder im Blutausstrich Thrombozytenaggregate fehlten bzw. nur ganz vereinzelt zu finden waren und hierbei zugleich die Gesamtzahl der Thrombozyten unter  $50 \times 10^9/l$  lag. Bei Vorliegen einer EDTA-PTCP war die reduzierte Anzahl an Thrombozyten lediglich im  $K_3$ -EDTA-Blut und nicht im Zitrat-Blut vorhanden. Als fraglich eingestuft wurden Untersuchungsergebnisse, bei denen im Blutausstrich vermehrt Thrombozytenaggregate vorlagen bzw. weder die Befundung eines Blutausstriches noch eine Thrombozytenzählung im Zitrat-Blut vorhanden waren.

Bei den Pferden mit echter Thrombozytopenie, bei denen sowohl aus  $K_3$ -EDTA- als auch aus Zitratblut die Thrombozytenzahl bestimmt wurde, sowie den Pferden mit EDTA-PTCP wurden am ADVIA® 2120 zusätzlich die Thrombozytenvariablen MPV, PDW, PCT, LargePLT und Clumps erfasst.

Pferde mit einer echten Thrombozytopenie sowie einer Thrombozytose wurden nach den Ergebnissen der klinischen Untersuchung, weiterführender Untersuchungen (Labor, Bildgebung) und pathologischer und histopathologischer Befunde in 4 Gruppen eingeteilt: Entzündung (lokal/systemisch), Neoplasie, nicht-entzündliche Darmerkrankung und Sonstige.

Unter Sonstige wurden auch Patienten eingeordnet, bei denen lediglich eine Verdachtsdiagnose gestellt werden konnte. Eine Zuordnung in die Gruppe systemische Entzündung erfolgte bei Vorliegen entsprechender pathologischer Befunde oder bei Erfüllung von mindestens 2 der folgenden Kriterien: Körpertemperatur  $\leq 36,0$  °C bzw.  $\geq 39,0$  °C; Pulsfrequenz  $> 52$ /min; Atemfrequenz  $> 24$ /min; Laktat  $> 5,0$  mmol/l; Bikarbonat  $< 17,0$  mmol/l; Leukozyten  $< 3,0 \times 10^9$ /l bzw.  $> 15,0 \times 10^9$ /l.

Die 4 Gruppen wurden bezüglich der Verteilung mit der gesamten Patientenpopulation der Klinik für Pferde, Innere Medizin verglichen. Darüber hinaus wurde die Mortalität bei Vorhandensein einer verminderten bzw. erhöhten Thrombozytenzahl im Vergleich zur Gesamtpopulation berechnet.

#### 3.2.2 Statistik

Die Daten wurden mit Microsoft Excel 2010 tabellarisch erfasst, die statistischen Auswertungen erfolgten durch die Autorin und Frau PD Dr. Natali Bauer mit dem Programm GraphPad Prism (GraphPad Software Version 6, San Diego) sowie MedCalc (version 16.8, MedCalc Software bvba). Das Signifikanzniveau wurde auf 0,05 festgelegt.

Alle Variablen wurden zunächst mittels Shapiro Wilk Test bezüglich Normalverteilung geprüft. Der Vergleich der Thrombozytenvariablen zwischen den Antikoagulantien erfolgte mittels gepaartem t-Test bzw. Wilcoxon-Test und zwischen den Patienten mit echter Thrombozytopenie und EDTA-PTCP mittels ungepaartem t-Test bzw. Wilcoxon-Mann-Whitney-U-Test. Der Vergleich der Thrombozytenzahl zwischen den Patienten mit klinisch sichtbaren Blutungen und ohne Blutungen erfolgte mit dem Wilcoxon-Mann-Whitney-U-Test. Der Vergleich der Diagnosegruppen sowie der Einflüsse von Rasse, Alter und Geschlecht erfolgte durch eine einfaktorische Varianzanalyse mit einem post-hoc paarweisen Mehrfachvergleich nach Tukey für normalverteilte Daten und Kruskal Wallis Test mit post-hoc paarweisen Mehrfachvergleich mittels Dunn's Test für nicht normalverteilte Daten. Der Vergleich der proportionalen Häufigkeiten der Diagnosegruppen erfolgte mittels  $\chi^2$ -Test. Für eine Beurteilung des Chancenverhältnisses der Mortalität der Pferde mit Thrombozytopenie bzw. Thrombozytose im Vergleich zu der Gesamtpopulation wurde die Odds ratio berechnet. Zur Ermittlung eines Zusammenhangs von Thrombozytenzahl und Symptomen einer Blutungsneigung wurde mittels Receiver Operating Characteristic Curve (ROC)-Analyse die positive Likelihood ratio ( $LR+ = \text{Sensitivität} / 1 - \text{Spezifität}$ ) berechnet.

#### 3.3 Thrombozytenfunktion bei Equiden mit systemischer Entzündung (SIRS)

Im Rahmen der Dissertationsprojekte von Kim Theuerkauf und Julia Engel wurde mittels einer prospektiven, kontrollierten Studie der Einfluss systemischer Entzündungsreaktionen (SIRS) auf folgende Thrombozytenvariablen überprüft:

- Thrombozytenzahl und Thrombozytenvariablen (ADVIA® 2120),
- in vivo Aktivierung der Thrombozyten (Accuri® C6),
- Entstehung von Thrombozyten-Leukozyten-Aggregaten (Accuri® C6),
- Vorliegen retikulierter, RNA-reicher Thrombozyten (Accuri® C6) und
- Thrombozytenfunktion (Multiplate® Analyzer).

##### 3.3.1 Probanden und Blutentnahmen

In die Gruppe der SIRS-Patienten wurden Warmblüter und Kleinpferde (Stockmaß  $\leq 148$  cm) älter als 3 Jahre eingeschlossen, welche in der Klinik für Pferde, Innere Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen vorgestellt wurden und im Rahmen der klinischen und labordiagnostischen Untersuchungen mindestens 2 der folgenden Kriterien erfüllten:

- Pulsfrequenz > 52 Schläge/min
- Atemfrequenz > 24 Züge/min
- Körpertemperatur  $\geq 39,0$  °C oder  $\leq 36,0$  °C
- Thrombozytenzahl (ADVIA® 2120)
  - im K<sub>3</sub>-EDTA-Blut <  $90 \times 10^9/l$
  - im Zitratblut <  $82 \times 10^9/l$
- Leukozytenzahl (ADVIA® 2120) <  $3,0 \times 10^9/l$  oder >  $15,0 \times 10^9/l$
- Plasma-Bikarbonat (cobas b 221, Roche)  $\leq 20,0$  mmol/l
- Plasma-Laktat (cobas b 221, Roche)  $\geq 5,0$  mmol/l

Ausgeschlossen wurden Equiden, die mit Acetylsalicylsäure oder Clopidogrel vorbehandelt waren, sowie tragende Stuten und Miniaturrassen.

Bei allen Probanden wurde der Body condition score (BCS) nach Carroll und Huntington [255] ermittelt.

### 3 Eigene Untersuchungen - Material und Methoden

---

Die Blutentnahmen erfolgten nach Adspektion und Palpation sowie Keimreduzierung (Isopropanol, 70 %) der Entnahmestelle kopfwärts aus der Vena jugularis externa mittels einer sterilen Einmalkanüle (18 G; B. Braun) bzw. aus einem lege artis herzwärts in die V. jugularis externa eingelegten Teflonkatheter (80 mm, 14 G; Walter). Die Blutproben wurden mittels eines sterilen Vakuumsystems in folgende Probengefäße (S-Monovette®, Sarstedt) entnommen: K<sub>3</sub>-EDTA (1,6 mg/ml), Tri-Natrium-Zitrat (0,106 mol/l, Mischverhältnis 1:10), Hirudin (20 µg/ml) sowie ohne Antikoagulans zur Serumgewinnung. Bei der Entnahme aus einem Katheter wurden die ersten 2 ml Blut verworfen.

Als Kontrollgruppen wurden für die Messungen mittels Laser-Durchflusszytometrie mit dem ADVIA® 2120 und mittels Impedanzaggregometrie mit dem Multiplate® Analyzer die unter 3.1.1.2 (S. 39) aufgeführten jeweils 60 Warmblüter und 60 Kleinpferde verwendet. Die Kontrollgruppe für die Messungen mittels Fluoreszenz-Durchflusszytometrie am Accuri® C6 umfasste die unter 3.1.3.2.1 (S. 49) angegebenen 10 Pferde.

#### 3.3.2 Labordiagnostik

Folgende Thrombozytenvariablen wurden mittels Laser-Durchflusszytometrie mit dem ADVIA® 2120 innerhalb von 60 Minuten nach Blutentnahme jeweils aus mit K<sub>3</sub>-EDTA sowie mit Zitrat antikoagulierten Blutproben gemessen: PLT, LargePLT, Clumps, PCT, MPV, PDW, MPC und PCDW.

Die Messungen der Blutproben mittels Fluoreszenz-Durchflusszytometrie mit dem Accuri® C6 erfolgten innerhalb von 75 Minuten nach Blutentnahme wie unter 3.1.3.2.3 (S. 51) und 3.1.3.3 (S. 55) beschrieben.

Die Messungen der Blutproben mittels Impedanzaggregometrie mit dem Multiplate® Analyzer erfolgten wie unter 3.1.2.1 (S. 42) und 3.1.2.4 (S. 46) beschrieben innerhalb von 30 bis 60 Minuten nach Blutentnahme. Neben der Messung der Spontanaggregation wurden folgende Tests verwendet: ADPtest (6,5 µM), ADPtestHS (6,5 µM/9,4 nM), ASPtest (0,75 mM) und COLtest (1,6 µg/ml).

#### 3.3.3 Statistik

Die Daten wurden mit Microsoft Excel 2010 tabellarisch erfasst, die statistische Auswertung erfolgte durch die Autorin mit dem Programm GraphPad Prism (GraphPad Software Version 6, San Diego). Das Signifikanzniveau wurde auf 0,05 festgelegt.

Alle Variablen wurden zunächst mittels Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung überprüft und gegebenenfalls logarithmisch transformiert. Bei den mit dem ADVIA® 2120 gemessenen Variablen erfolgte der Vergleich der SIRS-Gruppe mit der klinisch unauffälligen Kontrollgruppe mittels zweifaktorieller ANOVA mit Messwiederholung bezüglich der Methode (K<sub>3</sub>-EDTA vs. Zitrat) und einem post-hoc paarweisen Mehrfachvergleich nach Bonferroni mit adjustierten  $p$ -Werten. Bei den Variablen des Multiplate® Analyzer erfolgte der Vergleich der SIRS-Gruppe mit der klinisch unauffälligen Kontrollgruppe mittels zweifaktorieller ANOVA mit Messwiederholung bezüglich der Methode (mit und ohne Rührstab) und einem post-hoc paarweisen Mehrfachvergleich nach Bonferroni mit adjustierten  $p$ -Werten. Mittels zweifaktorieller ANOVA wurde darüber hinaus für den ASPItest der Einfluss der Rasse ermittelt, auch hier mit post-hoc paarweisem Mehrfachvergleich nach Bonferroni mit adjustierten  $p$ -Werten.

Bei den mit dem Accuri® C6 gemessenen Variablen erfolgte der Vergleich der SIRS-Gruppe mit der klinisch unauffälligen Kontrollgruppe mittels zweifaktorieller ANOVA mit Messwiederholung bezüglich der Methode (nativ vs. Kollagen) und einem post-hoc paarweisen Mehrfachvergleich nach Bonferroni mit adjustierten  $p$ -Werten. Der Vergleich Thiazol-positiver Thrombozyten zwischen Kontroll- und SIRS-Gruppe erfolgte mittels ungepaartem t-Test bzw. Wilcoxon-Mann-Whitney-U-Test.

Innerhalb der SIRS-Gruppe erfolgte ein Vergleich der Messergebnisse der überlebenden Patienten mit denen der nichtüberlebenden Patienten mittels zweifaktorieller ANOVA mit Messwiederholung bezüglich der Methode und einem post-hoc paarweisen Mehrfachvergleich nach Bonferroni mit adjustierten  $p$ -Werten.

Innerhalb der Gruppen der klinisch unauffälligen Probanden und der SIRS-Probanden wurden nach Prüfung auf Normalverteilung und ggf. logarithmischer Transformation Korrelationsanalysen zwischen ausgewählten Variablen folgender Geräte berechnet: ADVIA® 2120 und Multiplate® Analyzer; ADVIA® 2120 und Accuri® C6; Multiplate® Analyzer und Accuri® C6.

#### 3.4 Hemmung der Thrombozytenfunktion bei Pferden

Im Rahmen einer prospektiven Untersuchung wurde überprüft, ob und in welchem Maße sich die Thrombozytenfunktion von Pferden durch die orale Gabe von Acetylsalicylsäure (ASS) und Clopidogrel unter Verwendung einer einmaligen hohen Anfangsdosis gefolgt von niedrigeren Erhaltungsdosen hemmen lässt.

##### 3.4.1 Probanden

Für die Untersuchung standen 10 klinisch unauffällige Warmblüter (6 Wallache, 4 Stuten) älter als 3 Jahre (Median 15,2 Jahre, Spannweite: 3-23 Jahre) zur Verfügung. Der Gesundheitsstatus wurde zu Beginn der Studie anhand einer klinischen Untersuchung inklusive Ultraschalluntersuchung beider Jugularvenen überprüft. Ausschlusskriterien waren jegliche Medikation in den vorausgegangenen 14 Tagen sowie Auffälligkeiten einer oder beider Jugularvenen. Das Körpergewicht wurde mit einer elektronischen Pferdewaage (Burghley, Horse Weigh®) ermittelt, der Gewichtsmedian lag bei 572,1 kg (Spannweite 440-626 kg). Die Pferde waren in Einzelboxen aufgestellt und erhielten täglich leichte Bewegung auf einem Auslauf und/oder Paddock. Gefüttert wurden die Pferde viermal täglich mit Heu ( $\geq 1,7$  kg/100 kg/d) sowie individuellen Mengen an Krippenfutter. Die Untersuchung erfolgte nach Anzeige und Genehmigung der zuständigen Behörde (GI 18/17-Nr. 102/2010).

##### 3.4.2 Medikation

Die Pferde wurden paarweise zufällig der Reihenfolge der Behandlung zugeordnet. Zwischen den Medikationen mit Acetylsalicylsäure (Aspirin® 500 mg/100 mg, Bayer) bzw. Clopidogrel-Besylat (Clopidogrel AL 75 mg, Aliud) unterlagen die Probanden einer 14tägigen Auswaschphase.

Die Medikamente wurden morgens um 9 Uhr als intakte Tabletten vermischt mit einer kleinen Menge Kraftfutter oder gemörsert und vermischt mit Zuckerrübensirup mit einer Spritze verabreicht. Die Pferde waren nicht nüchtern, die letzte Fütterung von Heu war ca. 3 Stunden vor der Medikation.

Um den klinischen Alltag besser zu simulieren, erfolgte die Dosierung der Medikamente nicht nach dem individuellen Gewicht, sondern in Gewichtsklassen zu 50 kg. Die Pferde

### 3 Eigene Untersuchungen - Material und Methoden

erhielten am ersten Tag eine Anfangsdosis und in den folgenden 4 Tagen tägliche Erhaltungsdosen (Tabelle 10).

Tabelle 10: Hemmung der Thrombozytenfunktion - Methodik: Dosierungsschema für Clopidogrel und ASS in Gewichtskategorien (\*Anzahl Tabletten Clopidogrel: 75 mg; ASS: 500 mg/100 mg)

Gewicht (kg)		Clopidogrel		Acetylsalicylsäure	
		Anfangs-dosis	Erhaltungs-dosis	Anfangs-dosis	Erhaltungs-dosis
450-499	mg	3000	600	2300	500
	Tabletten*	40	8	4/3	1/0
500-549	mg	3300	675	2500	600
	Tabletten*	44	9	5/0	1/1
550-599	mg	3600	750	2800	600
	Tabletten*	48	10	5/3	1/1
600-649	mg	3900	825	3000	700
	Tabletten*	52	11	6/0	1/2
650-700	mg	4200	900	3300	700
	Tabletten*	56	12	6/3	1/2

Bezogen auf das individuelle Gewicht betrug die Anfangsdosis Clopidogrel 6,0-6,5 mg/kg, die Erhaltungsdosis lag bei 1,2-1,4 mg/kg. Bei ASS waren es 4,7-5,0 mg/kg und 1,0-1,3 mg/kg.

Während des gesamten Versuchszeitraums (Medikationen und Auswaschphase) wurden die Pferde alle 12 Stunden von der Autorin klinisch untersucht, hierbei wurde insbesondere auf Blutungen (z. B. Epistaxis, Petechien), Reaktionen an den Blutentnahmestellen (z. B. Hämatom, Phlebitis) und unerwünschte Arzneimittelwirkungen auf den Magen-Darm-Trakt (z. B. Inappetenz, Diarrhoe) geachtet.

#### 3.4.3 Blutentnahmen

Die Blutentnahmen erfolgten mit einer sterilen 18 G ( $\emptyset$  1,2 mm) Einmalkanüle nach Adspektion und Palpation sowie Keimreduzierung (Isopropanol, 70 %) der Entnahmestelle kopfwärts aus der Vena jugularis mittels eines sterilen Vakuumsystems (S-Monovette®, Sarstedt). Die Entnahmestellen wurden zu jedem Entnahmezeitpunkt gewechselt: beginnend mit der am weitesten cranial gelegenen Position (1, Abbildung 14) an der linken V. jugularis

externa, anschließend die äquivalenten Positionen an der rechten Jugularvene und zurückkehrend an die linke Vene.



Abbildung 14: Hemmung der Thrombozytenfunktion - Methodik: Schematische Darstellung der Entnahmestellen an der Vena jugularis externa

Die Entnahmen der Blutproben zur Überprüfung der Thrombozytenfunktion (TZF) erfolgten unmittelbar vor der Verabreichung der Anfangsdosis (T0) sowie zu den Zeitpunkten (T) 6, 12, 24, 48, 72, 96, 144, 192 und 240 Stunden nach Verabreichung der Anfangsdosis. Die Blutproben wurden jeweils vor der oralen Medikamentengabe entnommen. Während der Medikation mit ASS wurden zu allen Zeitpunkten mit Ausnahme von T192 und T240 Serumproben für den Nachweis von Salicylsäure entnommen und bis zur Untersuchung bei -20 °C gelagert. Zu den Zeitpunkten T0, T24, T144 und T240 wurden des Weiteren Variablen der Hämatologie, klinischen Chemie und Gerinnung untersucht.

#### 3.4.4 Labordiagnostik

##### 3.4.4.1 Impedanzaggregometrie (Multiplate® Analyzer)

Die Untersuchungen erfolgten wie unter 3.1.2.1 (S. 42) aufgeführt.

Unter der Medikation wurden folgende Tests verwendet:

- ASS: ADPtest (6,5 µM), ASPItest (0,75 mM,) und COLtest (1,6 µg/mL)
- Clopidogrel: ADPtest (6,5 µM), ADPtestHS (6,5 µM/9,4 nM) ASPItest (0,5 mM) und COLtest (1,6 µg/mL)

Alle Messungen erfolgten innerhalb von 30 bis 60 Minuten nach der Blutentnahme. Die Messdauer betrug 12 Minuten.

##### 3.4.4.2 Hämatologie, klinische Chemie und plasmatische Gerinnung

Alle Messungen erfolgten innerhalb von 60 Minuten nach der Blutentnahme.

Folgende Variablen wurden untersucht:

### 3 Eigene Untersuchungen - Material und Methoden

---

- Hämatologie (ADVIA® 2120) aus K<sub>3</sub>-EDTA: Leukozyten (Anzahl, Differentialzellbild), Erythrozyten (Anzahl, Hämoglobin, Hämatokrit, Retikulozyten, MCV, MCH, MCHC, CHCM), Thrombozyten (Anzahl, MPC, MPV)
- Klinische Chemie: Harnstoff, Kreatinin, ionisierte Elektrolyte (Natrium, Kalium, Chlorid, Phosphor), Gesamtprotein, Albumin, Gesamt-Bilirubin, direktes Bilirubin, Enzyme (AP, GLDH,  $\gamma$ -GT, AST, CK, LDH), Gallensäuren (Pentra 400, Axon Lab) sowie ionisiertes Magnesium und Kalzium (Nova 8 Analyzer, Nova)
- Plasmatische Gerinnung (STA Compact, Diagnostica Stago): aPTT, PT, INR und Fibrinogen.

#### 3.4.4.3 Serumkonzentration Salicylsäure

Die Messungen der Serumkonzentrationen der Salicylsäure erfolgten im Institut für Biochemie der Deutschen Sporthochschule Köln.

Bis zur Analyse wurden die Proben bei -20 °C gelagert. Für die Analyse wurden 500  $\mu$ l Serum mit 500  $\mu$ l Milli-Q-Wasser sowie dem internen Standard d<sub>4</sub>-Salicylsäure verdünnt. Die Abtrennung der Proteine erfolgte über Fällung durch Zugabe von 1,5 ml Acetonitril. Nach Zentrifugation wurde ASS mithilfe von KOH zu Salicylsäure hydrolysiert.

Der Nachweis der Salicylsäure erfolgte mittels einer Kombination eines Hochleistungsflüssigkeitschromatographen (LC, Series 1200, Agilent) mit einem Massenspektrometer (MS, API 3200 triple quadrupol mass spectrometer, AB Sciex). Die Ionisation erfolgte mit einem Electrospray-Ionisations-Interface (ESI). Als analytische Säule wurde eine Nucleodur®C18 Pyramid (5  $\mu$ m Teilchengröße, Macherey und Nagel) gekoppelt an eine Gemini C6-Vorsäule (Phenomenex) verwendet. Als mobile Phasen wurde A: Ammonium Acetate Puffer (5 mM Ammoniumacetat, 0,1 % Essigsäure, pH 3,5) und B: Acetonitril eingesetzt. Die Flussrate betrug 0,8 ml/min bei linearem Gradient von 15 %  $\rightarrow$  100 % B in 7 Minuten und einem Injektionsvolumen von 10  $\mu$ l. Die Proben wurden im negativen Ionisationsmodus bei einer Interface Temperatur von 450 °C mit Ionenspray-Spannung von -4500 V gemessen. Diagnostische Ionen wurden durch kollisionsinduzierte Dissoziation mit Stickstoff ( $2,9 \times 10^{-3}$  Pa) generiert und im MRM-Modus (multiple reaction monitoring) aufgezeichnet. Für die Quantifizierung wurden die Ionenübergänge  $m/z$  137/65 und  $m/z$  141/69 für Salicylsäure bzw. den internen Standard d<sub>4</sub>-Salicylsäure verwendet.

Die Datenerhebung und -analyse erfolgte durch die Analyst® Software (Version 1.4.2, AB Sciex).

Die Nachweisgrenze für Salicylsäure betrug im Serum 0,1 µg/ml, die Quantifizierungsgrenze lag bei 0,2 µg/ml.

#### 3.4.5 Statistik

Die Planung der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. Klaus Failing, Leiter der Arbeitsgruppe Biomathematik und Datenverarbeitung des Fachbereichs Veterinärmedizin der JLU Gießen. Die Berechnung der Fallzahl beruhte auf der Schätzung der angestrebten Abnahme der Aggregation durch den Einfluss der Medikamente 24 Stunden nach deren Applikation. Die Genauigkeit der Schätzung in Form des 95 %-Konfidenzintervalls wurde auf  $\pm 10$  % festgelegt. Für die Berechnung wurden die Ergebnisse der Untersuchung von Baxter & Moore [249] verwendet. Aus den Ergebnissen der vorgenannten Untersuchung lässt sich eine geschätzte Standardabweichung von 13,6 % für die relative Abnahme errechnen. Es wurde angenommen, dass die Verhältnisse der Abnahme der Aggregation mit der in der eigenen Untersuchung gewählten Methodik übereinstimmen. Auf eine Kontrollgruppe wurde verzichtet, da nicht davon auszugehen war, dass die Abnahme der Thrombozytenaggregation beim klinisch unauffälligen Pferd ohne Einfluss eines Medikamentes auftritt. Die Fallzahlberechnung erfolgte mit dem Programm BiAS. für Windows (Version 9.08) und ergab eine Zahl von 10 Pferden, um eine Reduktion der mittleren Arachidonsäure-induzierten Aggregation um 70 % 24 Stunden nach Applikation des Medikamentes nachzuweisen. Für die Anwendung des Clopidogrels existierten zum Zeitpunkt der Studienplanung 2010 keine dem ASS vergleichbaren Daten für das Pferd. Im Vergleich mit der Anwendung beim Menschen wurde angenommen, dass die Änderung der Thrombozytenaggregation beim Pferd der des ASS entspricht.

Die Datenauswertung erfolgte mit dem Programmpaket BMDP [256]. Nach Prüfung auf Normalverteilung erfolgte der Vergleich der Mittelwerte (ggf. nach logarithmischer Transformation) durch eine einfaktorielle ANOVA mit Messwiederholungen. Bei Berechnung signifikanter Unterschiede wurde zum Vergleich jedes einzelnen Messzeitpunktes mit dem Messzeitpunkt T0 ein post-hoc Dunnett-Test durchgeführt. Der Vergleich zwischen der Aggregometrie und den Serumkonzentrationen der Salicylsäure erfolgte mittels Pearson Korrelationsanalyse. Das Signifikanzniveau wurde auf 0,05 festgelegt.

### 4 EIGENE UNTERSUCHUNGEN - ERGEBNISSE

Die Darstellung der Ergebnisse gliedert sich in die Abschnitte:

- 4.1 Labordiagnostische Untersuchungen zur Thrombozytenbiologie bei klinisch unauffälligen Equiden
- 4.2 Thrombozytopenie und Thrombozytose bei Klinikpatienten (2008-2015)
- 4.3 Thrombozytenfunktion bei Equiden mit systemischer Entzündung (SIRS)
- 4.4 Hemmung der Thrombozytenfunktion bei Pferden

Ein Teil der Ergebnisse der retrospektiven Untersuchung zur Thrombozytopenie und Thrombozytose wurde bereits publiziert:

- Hübers E, Bauer N, Fey K, Moritz A, Roscher K (2018): Thrombopenie beim Pferd. Tierarztl Prax Ausg G; 46(02): 73-79

Alle Ergebnisse der Studie zur Hemmung der Thrombozytenfunktion bei Pferden wurden bereits publiziert:

- Roscher KA, Failing K, Schenk I, Moritz A (2017): Suspected aspirin resistance in individual healthy adult warmblood horses. J vet Pharmacol Therap.;40(6):e16-e22
- Roscher KA, Failing K, Moritz A (2015): Inhibition of platelet function with clopidogrel, as measured with a novel whole blood impedance aggregometer in horses. Vet J; 203(3):332-6

#### 4.1 Labordiagnostische Untersuchungen zur Thrombozytenbiologie von Equiden

Die Darstellung der Ergebnisse der labordiagnostischen Untersuchungen bei klinisch unauffälligen erwachsenen Equiden gliedert sich in die Abschnitte:

- 4.1.1 Thrombozytenzahl und Thrombozytenvariablen mittels Laser-Durchflusszytometrie mit dem ADVIA® 2120
- 4.1.2 Thrombozytenfunktion mittels Impedanzaggregometrie aus Vollblut mit dem Multiplate® Analyzer
- 4.1.3 Thrombozytenfunktion mittels Fluoreszenz-Durchflusszytometrie mit dem Accuri® C6
- 4.1.4 Messung von aus der Zellmembran der Thrombozyten gelösten Proteine im Serum und Plasma mittels kommerzieller humaner ELISA

## 4 Eigene Untersuchungen - Ergebnisse

### 4.1.1 Laser-Durchflusszytometrie (ADVIA® 2120)

#### 4.1.1.1 Einfluss von Antikoagulantien auf Thrombozytenvariablen

##### 4.1.1.1.1 *Kleinpferd*

Mit Ausnahme der Variable Clumps konnte bei den Kleinpferden mittels einfaktorieller ANOVA für alle Variablen ein signifikanter Unterschied bezüglich des Antikoagulans berechnet werden (Tabelle 11). Eine Übersicht aller Einzelmessungen zeigt die Tabelle 12-5 im Anhang (S. 12-9).

Tabelle 11: ADVIA® 2120: Thrombozytenvariablen beim Kleinpferd in Abhängigkeit vom Antikoagulans [arithmetischer MW  $\pm$  SD bzw. \* geometrischer MW(SF)]; #= Zitratwerte korrigiert um Verdünnungsfaktor 1,1

Variable	Einheit	n	K <sub>3</sub> -EDTA	Zitrat	Mg-Sulfat	p-Wert
PLT	10 <sup>9</sup> /l	60	171,7 $\pm$ 37,9	161,0 $\pm$ 35,1#	157,4 $\pm$ 46,7	<b>0,005</b>
MPV	fL	60	7,5 $\pm$ 1,3	8,4 $\pm$ 1,0	9,0 $\pm$ 1,4	<b>&lt; 0,0001</b>
MPC	g/dl	60	24,6 $\pm$ 2,6	22,3 $\pm$ 2,1	21,2 $\pm$ 2,1	<b>&lt; 0,0001</b>
PCDW	g/dl	60	8,5 $\pm$ 0,7	8,8 $\pm$ 0,4	9,2 $\pm$ 0,4	<b>&lt; 0,0001</b>
LargePLT*	10 <sup>9</sup> /l	60	2,4 (2,9)	3,1 (2,4)#	6,6 (2,6)	<b>&lt; 0,0001</b>
Clumps*	n	54	115,9 (1,6)	128,1 (1,9)#	124,5 (1,8)	0,522
PCT	%	56	0,13 $\pm$ 0,03	0,12 $\pm$ 0,03	0,14 $\pm$ 0,05	<b>0,005</b>

Bei dem sich an die ANOVA anschließenden paarweisen Vergleich (Tabelle 12) zeigte sich, dass in den mit K<sub>3</sub>-EDTA antikoagulierten Blutproben die Thrombozytenzahl (PLT) signifikant größer war als mit den Antikoagulantien Zitrat und Mg-Sulfat. Zwischen Zitrat und Mg-Sulfat konnte kein signifikanter Unterschied berechnet werden. Gegenteiliges zeigte sich für den MPV: Mit dem Antikoagulans K<sub>3</sub>-EDTA wurden hier signifikant niedrigere Werte ermittelt als mit den Antikoagulantien Zitrat und Mg-Sulfat. Bei der Berechnung des Thrombokrits (PCT) als Produkt der Zellzahl und des Volumens durch den ADVIA® 2120 (s. Tabelle 4, S. 38) konnte beim Vergleich von K<sub>3</sub>-EDTA und Zitrat sowie K<sub>3</sub>-EDTA und Mg-Sulfat aufgrund der gegenteiligen Unterschiede in Zellzahl und Volumen bei den entsprechenden Antikoagulantien kein signifikanter Unterschied berechnet werden.

#### 4 Eigene Untersuchungen - Ergebnisse

Tabelle 12: ADVIA® 2120: Vergleich der Mittelwerte der Thrombozytenvariablen beim Kleinpferd; der Effekt gibt wieder, bei welchem Antikoagulans der höhere Mittelwert berechnet wurde (E= K<sub>3</sub>-EDTA, Z=Zitrat, M=Mg-Sulfat)

Variable	Einheit	K <sub>3</sub> -EDTA vs. Zitrat		K <sub>3</sub> -EDTA vs. Mg-Sulfat		Zitrat vs. Mg-Sulfat	
		Effekt	p-Wert	Effekt	p-Wert	Effekt	p-Wert
PLT	10 <sup>9</sup> /l	E>Z	< 0,05	E>M	< 0,01	Z>M	> 0,05
MPV	fL	Z>E	< 0,01	M>E	< 0,01	M>Z	< 0,01
MPC	g/dl	E>Z	< 0,01	E>M	< 0,01	Z>M	< 0,01
PCDW	g/dl	Z>E	< 0,01	M>E	< 0,01	M>Z	< 0,01
LargePLT	10 <sup>9</sup> /l	Z>E	> 0,05	M>E	< 0,01	M>Z	< 0,01
Clumps	n	ANOVA nicht signifikant (p=0,522)					
PCT	%	E>Z	> 0,05	M>E	> 0,05	M>Z	< 0,01

Bei der Prüfung auf Zusammenhänge der Messergebnisse bezüglich der Antikoagulantien konnten mit Ausnahme der Variablen PCDW und Clumps (Ausnahme: Clumps Zitrat versus Mg-Sulfat  $p = 0,028$ ) beim Kleinpferd für alle Variablen signifikante jedoch insgesamt schwach positive Korrelationskoeffizienten berechnet werden (Tabelle 13).

Tabelle 13: ADVIA® 2120: Korrelationskoeffizienten (r) des paarweisen Vergleichs der Antikoagulantien beim Kleinpferd (n = 60)

Variable	Einheit	K <sub>3</sub> -EDTA vs. Zitrat		K <sub>3</sub> -EDTA vs. Mg-Sulfat		Zitrat vs. Mg-Sulfat	
		r	p-Wert	r	p-Wert	r	p-Wert
PLT	10 <sup>9</sup> /l	0,589	< 0,001	0,587	< 0,001	0,746	< 0,001
MPV	fL	0,470	< 0,001	0,369	0,004	0,431	< 0,001
MPC	g/dl	0,624	< 0,001	0,454	< 0,001	0,528	< 0,001
PCDW	g/dl	0,117	0,372	-0,084	0,524	0,180	0,168
LargePLT	10 <sup>9</sup> /l	0,519	< 0,001	0,332	0,010	0,452	< 0,001
Clumps	n	-0,097	0,485	0,012	0,929	0,293	0,028
PCT	%	0,293	0,028	0,278	0,038	0,604	< 0,001

## 4 Eigene Untersuchungen - Ergebnisse

### 4.1.1.1.2 Warmblut

Bei den 60 Warmblütern konnten für die Variablen MPV, MPC und LargePLT im Mittel signifikante Unterschiede zwischen den Messungen aus K<sub>3</sub>-EDTA und Zitrat berechnet werden (Tabelle 14). Eine Übersicht aller Einzelmessungen zeigt die Tabelle 12-6 im Anhang (S. 12-13).

Tabelle 14: ADVIA® 2120: Thrombozytenvariablen in Abhängigkeit vom Antikoagulans beim Warmblut (n = 60); #= Zitratwerte korrigiert um Verdünnungsfaktor 1,1

	PLT# [x10 <sup>9</sup> /l]	MPV [fl]	MPC [g/dl]	PCDW [g/dl]	LargePLT# [x10 <sup>9</sup> /l]	Clumps# [n]	PCT [%]
<b>K<sub>3</sub>-EDTA</b>							
Minimum	18	5,8	15,9	6,2	0	52	0,02
25 % Perzentil	117,5	7,3	22,8	8,0	2	82,5	0,10
Median	136,5	8,0	24,3	8,6	3	112	0,12
75 % Perzentil	161,5	8,9	26,3	9	7	155	0,13
Maximum	217	10,8	30,1	9,5	25	2774	0,20
<b>Zitrat</b>							
Minimum	79	6,1	16,9	7,8	0	37	0,04
25 % Perzentil	117,5	8,9	19,5	8,5	5	73	0,10
Median	131,5	9,6	20,7	8,8	9	95	0,12
75 % Perzentil	152,8	10,5	21,9	9,1	12	125,8	0,14
Maximum	202	12,3	27,7	10,1	20	1018	0,19
<b>p-Wert</b>	0,836	<b>&lt;0,0001</b>	<b>&lt;0,0001</b>	0,487	<b>&lt;0,0001</b>	0,135	0,342

### 4.1.1.2 Einfluss der Rasse auf Thrombozytenvariablen

Beim Rassenvergleich zwischen Kleinpferden und Warmblütern zeigte sich, dass Kleinpferde sowohl in den K<sub>3</sub>-EDTA-Blutproben (Tabelle 15) als auch in den Zitrat-Blutproben (Tabelle 16) im Mittel signifikant mehr (PLT), dafür aber kleinere Thrombozyten (MPV) aufwiesen als Warmblüter. In den K<sub>3</sub>-EDTA-Blutproben spiegelte sich dies auch im signifikanten Unterschied beim PCT wieder. Bei allen weiteren Variablen konnte in den K<sub>3</sub>-EDTA-Blutproben kein signifikanter Unterschied berechnet werden (Tabelle 15). In den Zitratblutproben wurde für alle Variablen außer PCDW, Clumps und PCT ein signifikanter Unterschied berechnet (Tabelle 16).

#### 4 Eigene Untersuchungen - Ergebnisse

Tabelle 15: ADVIA® 2120: Thrombozytenvariablen aus K<sub>3</sub>-EDTA-Blutproben in Abhängigkeit von der Rasse (n = 60, Clumps und PCT Kleinpferd n = 56)

	<b>PLT</b> [x10 <sup>9</sup> /l]	<b>MPV</b> [fl]	<b>MPC</b> [g/dl]	<b>PCDW</b> [g/dl]	<b>LargePLT</b> [x10 <sup>9</sup> /l]	<b>Clumps</b> [n]	<b>PCT</b> [%]
<b>Kleinpferd</b>							
Minimum	38	5,1	20,2	6,4	0	0	0,06
25 % Perzentil	148,3	6,6	22,8	8,3	1	82,5	0,1
Median	171	7,3	24,8	8,6	3	99	0,13
75 % Perzentil	197,8	8,4	26,2	9	6,5	145,5	0,16
Maximum	253	10,9	30	9,6	15	502	0,21
<b>Warmblut</b>							
Minimum	18	5,8	15,9	6,2	0	52	0,02
25 % Perzentil	117,5	7,3	22,8	8,0	2	82,5	0,10
Median	136,5	8,0	24,3	8,6	3	112	0,12
75 % Perzentil	161,5	8,9	26,3	9	7	155	0,13
Maximum	217	10,8	30,1	9,5	25	2774	0,20
<b>p-Wert</b>	<b>&lt;0,0001</b>	<b>0,004</b>	<b>&gt;0,9</b>	0,451	0,218	0,192	<b>0,001</b>

Tabelle 16: ADVIA® 2120: Thrombozytenvariablen aus Zitrat-Blutproben in Abhängigkeit von der Rasse (n = 60); #= korrigiert um Verdünnungsfaktor 1,1

	<b>PLT#</b> [x10 <sup>9</sup> /l]	<b>MPV</b> [fl]	<b>MPC</b> [g/dl]	<b>PCDW</b> [g/dl]	<b>LargePLT#</b> [x10 <sup>9</sup> /l]	<b>Clumps#</b> [n]	<b>PCT</b> [%]
<b>Kleinpferd</b>							
Minimum	64	6,3	17,8	7,8	0	41	0,04
25 % Perzentil	135	7,5	20,7	8,5	2	83,0	0,10
Median	162	8,5	21,8	8,9	4	104	0,12
75 % Perzentil	182,3	8,9	25,1	9,1	6	180	0,14
Maximum	246	11,4	26,6	9,6	13	1010	0,19
<b>Warmblut</b>							
Minimum	79	6,1	16,9	7,8	0	37	0,04
25 % Perzentil	117,5	8,9	19,5	8,5	5	73	0,10
Median	131,5	9,6	20,7	8,8	9	95	0,12
75 % Perzentil	152,8	10,5	21,9	9,1	12	125,8	0,14
Maximum	202	12,3	27,7	10,1	20	1018	0,19
<b>p-Wert</b>	<b>&lt;0,0001</b>	<b>&lt;0,0001</b>	<b>0,002</b>	0,562	<b>&lt;0,0001</b>	0,100	<b>&gt;0,9</b>

## 4 Eigene Untersuchungen - Ergebnisse

### 4.1.1.3 Auffälligkeiten der Variable PDW

Im Vergleich der Antikoagulantien  $K_3$ -EDTA und Zitrat war bei der Auswertung der Korrelationsanalysen der PDW bei den klinisch unauffälligen Warmblütern und Kleinpferden bei der grafischen Darstellung eine auffallende und biologisch nicht erklärbare Häufung der Werte in 4 Einzelgruppen vorhanden (Abbildung 15).

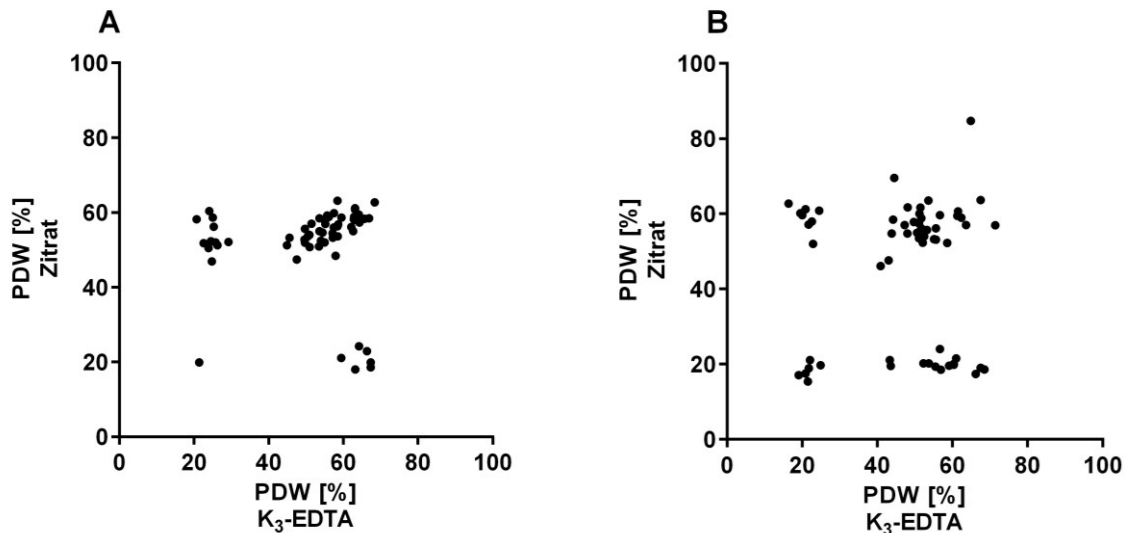


Abbildung 15: ADVIA® 2120: Vergleich der Messergebnisse der PDW aus  $K_3$ -EDTA- und Zitrat-Blutproben bei jeweils 60 klinisch unauffälligen Kleinpferden (A) und Warmblütern (B)

Bei den Kleinpferden waren diese Effekte auch beim Vergleich von Mg-Sulfat mit  $K_3$ -EDTA bzw. Zitrat zu beobachten (Abbildung 16).

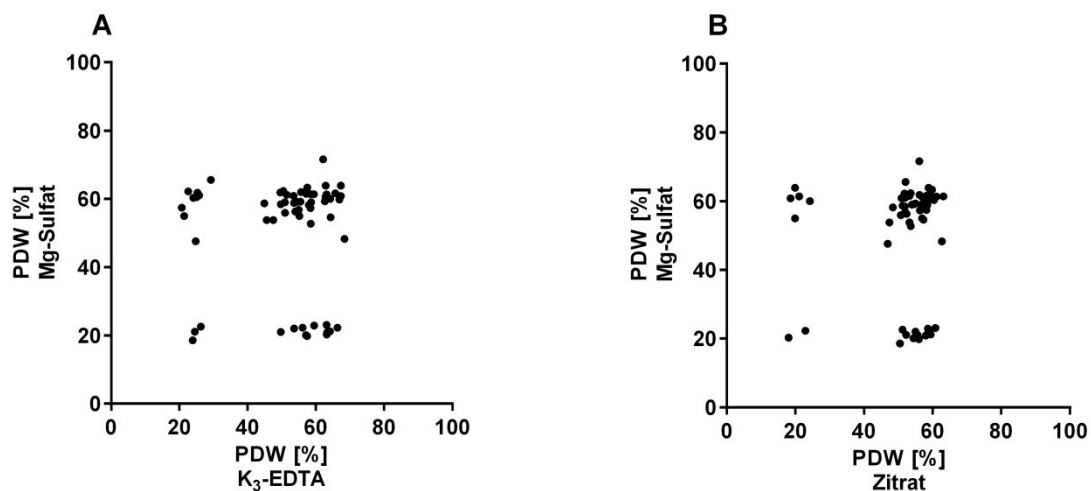


Abbildung 16: ADVIA® 2120: Vergleich der Messergebnisse der PDW aus  $K_3$ -EDTA- und Mg-Sulfat-Blutproben (A) sowie Zitrat- und Mg-Sulfat-Blutproben (B) bei 60 klinisch unauffälligen Kleinpferden

## 4 Eigene Untersuchungen - Ergebnisse

Auffallend war, dass bei Betrachtung der Einzelwerte für die PDW bei allen Antikoagulantien niemals Werte zwischen 30 und 40 % ausgegeben wurden. Berechnet man mithilfe der entsprechenden Formel (Tabelle 4, S. 38) manuell die Standardabweichung, zeigt sich auch hier ein mathematisch nicht erklärbares Fehlen von Werten zwischen 1,9 und 2,4. Eine Übersicht aller individuellen Messergebnisse sowie der von der Autorin manuell berechneten Standardabweichungen zeigt die Tabelle 12-7 im Anhang (S. 12-16).

Die Berechnung der PDW erfolgt durch die Software des ADVIA® 2120 unter Zuhilfenahme des Volumen-Histogramms, welches den Messwert des Volumens jeder einzelnen Zelle (Brechungsindex des Großwinkel-Streulichts) darstellt. Hierbei ist die PDW der Quotient aus Standardabweichung und Mittelwert des Histogramms und spiegelt den Grad der Streuung der Werte wieder. Abbildung 17 zeigt beispielhaft die vom Gerät ausgegebenen Thrombozyten-Volumen-Histogramme eines Kleinpferdes. Hierbei ist offensichtlich, dass das Histogramm der Messung aus dem mit Mg-Sulfat antikoagulierten Blut die größte Streuung der Messwerte aufweist. Gleichwohl ist nicht nur die vom Gerät berechnete PDW mit 20,1 % erheblich kleiner als die PDW aus den beiden anderen Messungen (49,7 % bzw. 55,6 %). Auch die Standardabweichung, welche aus den vom Gerät ausgegebenen Variablen MPV und PDW manuell durch die Autorin berechnet wurde, ist mit 1,77 deutlich geringer als bei den beiden anderen Messungen (3,63 bzw. 4,39).

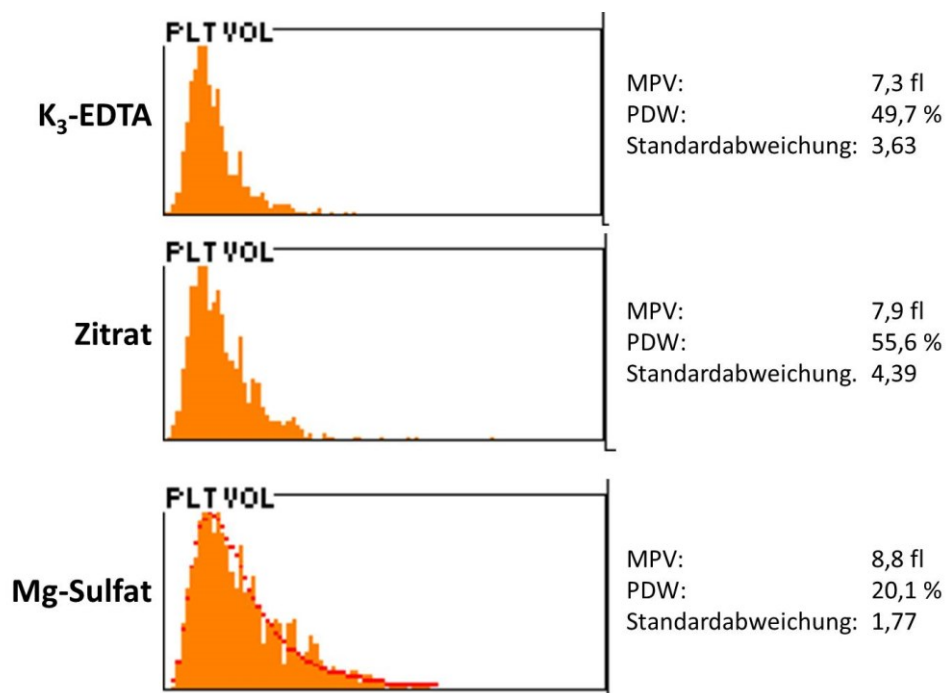


Abbildung 17: ADVIA® 2120: Thrombozyten-Volumen-Histogramme eines Kleinpferdes mit ausgegebenen Variablen MPV und PDW sowie manuell berechneter Standardabweichung

#### 4 Eigene Untersuchungen - Ergebnisse

---

Offensichtlich besteht innerhalb der Software (Version 5.9.0-MS) des ADVIA® 2120 ein Fehler bei der Berechnung der PDW. Da die Einzelmessungen des Zellvolumens in den Rohdaten des Gerätes nicht zur Verfügung stehen, ist eine nachträgliche manuelle Korrektur des Berechnungsfehlers nicht möglich.

Die Variable PDW wurde aufgrund der mutmaßlich fehlerhaften Berechnung bei allen Auswertungen nicht weiter berücksichtigt.

## 4 Eigene Untersuchungen - Ergebnisse

---

### 4.1.2 Impedanzaggregometrie (Multiplate® Analyser)

#### 4.1.2.1 Einfluss der Rasse auf die Impedanzaggregation

Beim Rassenvergleich zwischen Kleinpferden und Warmblütern zeigte sich, dass Kleinpferde grundsätzlich bei allen Agonisten signifikant niedrigere Aggregationswerte aufwiesen. Hierbei waren die Unterschiede insbesondere beim ASPItest zu erkennen. Die Spontanaggregation war bei den Kleinpferden im Mittel ebenfalls geringer als bei den Warmblütern, dieser Unterschied war jedoch statistisch nicht signifikant (Tabelle 17). Eine Übersicht aller Einzelmessungen findet sich im Anhang (Tabelle 12-8, S. 12-18).

Tabelle 17: Multiplate® Analyser: Aggregation [U] in Abhängigkeit von der Rasse

	<b>COLtest</b> [U]	<b>ADPtest</b> [U]	<b>ADPtestHS</b> [U]	<b>ASPItest</b> [U]	<b>Spontanaggregation</b> [U]
<b>Kleinpferd</b>					
Anzahl	60	60	59	58	58
Minimum	44	16	13	2	0
25% Perzentil	216	90	63	12	0,75
Median	264,5	125	92	39,5	9,5
75% Perzentil	313,5	268,8	198	165,8	77,5
Maximum	401	367	355	321	376
<b>Warmblut</b>					
Anzahl	59	60	60	60	60
Minimum	131,9	48,9	26,4	25	0
25% Perzentil	234	136,8	99,85	133,1	6,05
Median	300	193,5	142,6	181,8	23,5
75% Perzentil	344	251,6	232,7	233,3	85,2
Maximum	440	422	388,4	361	229,5
<b>p-Wert</b>	<b>0,0341</b>	<b>0,0127</b>	<b>0,0455</b>	<b>&lt;0,0001</b>	0,1536

## 4 Eigene Untersuchungen - Ergebnisse

### 4.1.2.2 Einfluss des magnetischen Rührstabes auf die Impedanzaggregation

Beim Vergleich der Messungen mit und ohne magnetischen Rührstab während der dreiminütigen Inkubation vor Zugabe des jeweiligen Agonisten zeigten sich grundsätzlich niedrigere Aggregationswerte bei den Messungen ohne magnetischen Rührstab. Bei den Kleinpferden waren diese Unterschiede bei allen Tests signifikant, bei den Warmblütern konnten signifikante Unterschiede für den COLtest und ADPtest berechnet werden (Tabelle 18). Eine Übersicht aller Einzelmessungen findet sich im Anhang (Tabelle 12-9, S. 12-20).

Tabelle 18: Multiplate® Analyzer: Aggregation [U] in Abhängigkeit von der Messmethodik während der Inkubation bei klinisch unauffälligen Kleinpferden (KP) und Warmblütern (WB)

	COLtest [U]		ADPtest [U]		ADPtestHS [U]		ASPItest [U]		Spontanaggregation [U]	
	KP	WB	KP	WB	KP	WB	KP	WB	KP	WB
<b>mit magnetischem Rührstab</b>										
Anzahl	32	10	31	10	32	10	31	10	31	10
Minimum	44,0	193,0	16,0	77,0	13,0	56,0	2,0	104,0	0,0	0,0
25 % Perzentil	187,5	216,0	61,8	108,0	45,5	77,8	9,0	148,3	0,0	5,5
Median	238,5	245,0	92,5	179,0	73,0	169,0	16,0	210,0	7,0	8,0
75 % Perzentil	298,8	316,5	154,0	225,3	109,8	196,5	95,0	274,8	19,0	30,5
Maximum	345,0	339,0	280,0	319,0	240,0	331,0	249,0	325,0	157,0	92,0
<b>ohne magnetischen Rührstab</b>										
Anzahl	32	10	31	10	32	10	31	10	31	10
Minimum	16,0	113,0	9,0	45,0	5,0	39,0	0,0	47,0	0,0	0,0
25 % Perzentil	87,3	134,5	45,0	62,5	33,5	63,5	7,0	92,0	0,0	0,0
Median	123,0	154,5	64,0	104,0	58,5	109,5	15,5	167,5	0,0	6,0
75 % Perzentil	145,5	183,8	92,0	162,8	78,0	170,0	42,0	195,5	3,8	8,8
Maximum	259,0	246,0	200,0	244,0	154,0	263,0	159,0	239,0	24,0	17,0
<b>p-Wert</b>	<b>&lt;0,0001</b>	<b>&lt;0,0001</b>	<b>&lt;0,0001</b>	<b>0,041</b>	<b>0,002</b>	0,284	<b>0,002</b>	0,865	<b>0,0001</b>	0,109

## 4 Eigene Untersuchungen - Ergebnisse

### 4.1.3 Fluoreszenz-Durchflusszytometrie (Accuri® C6)

#### 4.1.3.1 In vitro Aktivierung mit Kollagen

In den nativen Proben ließen sich maximal 4,65 % CD62P-positive Thrombozyten bzw. 0,89 % CD154-positive Thrombozyten messen. Nach in vitro Aktivierung der Thrombozyten mit Kollagen wurden im Mittel signifikante Zunahmen des prozentualen Anteils CD62P- sowie CD154-positiver Thrombozyten gemessen (Abbildung 18). Eine prozentuale Zunahme konnte hierbei in allen 10 Proben ermittelt werden, darüber hinaus lagen keine Überschneidungen der Messwerte der aktivierten und nativen Proben vor (Tabelle 19).

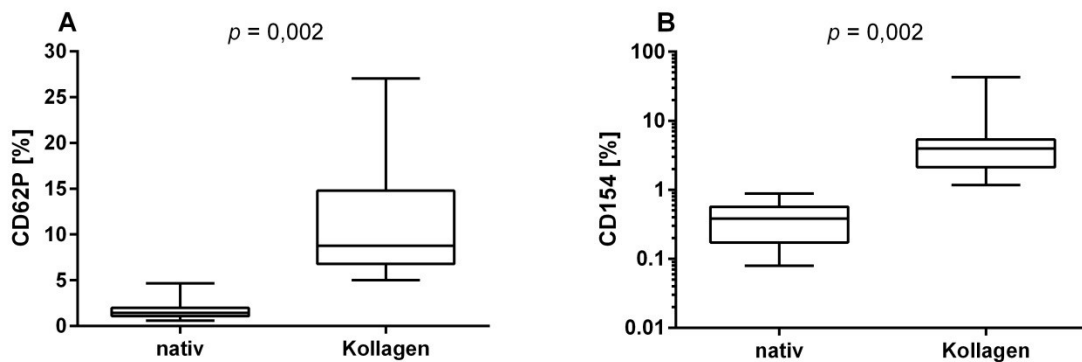


Abbildung 18: Accuri® C6 - Methodenetablierung: Prozentualer Anteil CD62P- (A) bzw. CD154- (B)-positiver Thrombozyten bei 10 Equiden vor und nach Aktivierung mit Kollagen (Median, 25/75%, min-max)

Tabelle 19: Accuri® C6 – Methodenetablierung: Prozentualer Anteil doppelmarkierter Thrombozyten (CD41/61-positiv) vor und nach Aktivierung mit Kollagen bei 10 klinisch unauffälligen Equiden

Tier Nr.	CD62P [%]		CD154 [%]		CD11a/18 [%]	
	nativ	Kollagen	nativ	Kollagen	nativ	Kollagen
1	1,66	27,06	0,18	1,18	1,68	2,46
2	0,59	5,01	0,08	2,24	3,65	1,3
3	1,14	8,11	0,15	1,77	0,7	1,67
4	4,65	11,16	0,52	4,35	1,91	2,6
5	2,18	7,99	0,53	5,08	3,2	3,99
6	1,93	14,62	0,29	42,91	1,24	1,77
7	1,85	15,25	0,89	6,1	3,26	4,38
8	1,23	7,14	0,2	2,36	3,13	1,23
9	1,09	5,75	0,48	4,52	2,99	1,66
10	1,04	9,45	0,68	3,58	2,86	1,86

## 4 Eigene Untersuchungen - Ergebnisse

In den nativen Proben konnten als Maß für das Vorhandensein von Thrombozyten-Leukozyten-Aggregaten im Mittel 2,9 % CD11a/18-positive Thrombozyten gemessen werden. Durch eine Aktivierung der Thrombozyten mit Kollagen konnte der prozentuale Anteil im Mittel nicht erhöht werden (Abbildung 19, Tabelle 19).

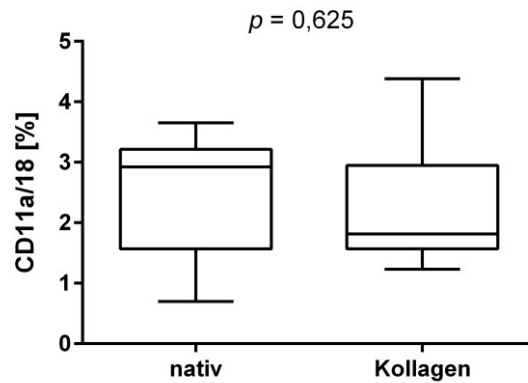


Abbildung 19: Accuri® C6 - Methodenetablierung: Prozentualer Anteil CD11a/18-Antikörper-positiver Thrombozyten bei 10 Equiden vor und nach Aktivierung mit Kollagen (Median, 25/75%, min-max)

### 4.1.3.2 Thiazol Orange

In den Proben der Kontrollpferde ließen sich im Median 2,35 % Thiazol-positive, RNA-reiche Thrombozyten messen. Bei 3 Equiden wurden jedoch sehr hohe prozentuale Anteile gemessen (Tabelle 20). Hierdurch ergeben sich mit 0,58 % bzw. 26,25 % sehr weite 25/75 %-Perzentile.

Tabelle 20: Accuri® C6 – Methodenetablierung: Prozentualer Anteil Thiazol-positiver Thrombozyten bei 10 klinisch unauffälligen Equiden

Tier Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Thiazol-positiv [%]	2,12	0,46	0,27	0,84	2,58	36,37	4,36	22,88	0,62	51,82

### 4.1.4 ELISA sCD40L und sP-Selectin

#### 4.1.4.1 sCD40L

Bei der optischen Kontrolle der Mikroplatte (Abbildung 20) zeigten sich Farbumschläge zu Gelb in den Bereichen der Standards (1), der Kontrollen (2), der Recovery (3) sowie des "spiked" Poolserums (5) und "spiked" Poolplasmas (7). In den Vertiefungen mit dem nativen Poolserum (4) und Poolplasma (6) sowie den Serum- und Plasmaproben der Einzelindividuen (8 und 9) war optisch keine Gelbfärbung erkennbar.

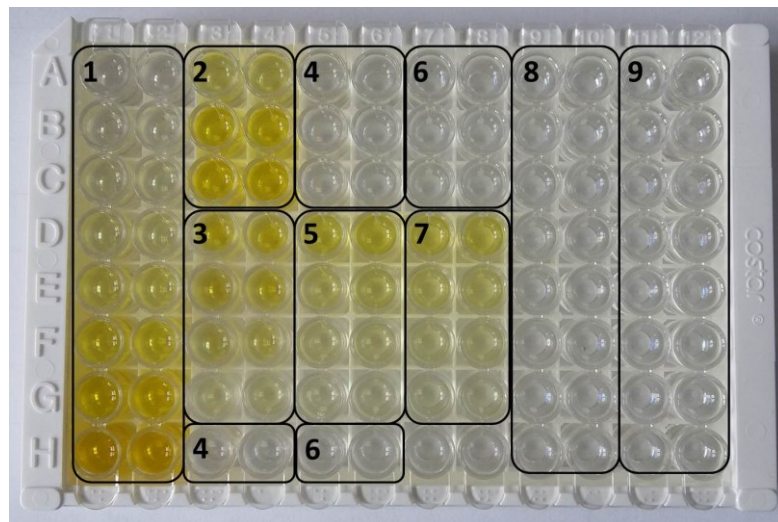


Abbildung 20: ELISA sCD40L: Mikroplatte nach der Testdurchführung: Standards (1), Kontrollen (2), Recovery (3), Poolserum nativ (4), Poolserum spiked (5), Poolplasma nativ (6), Poolplasma spiked (7), Pferd 1 (8), Pferd 2 (9)

Die optischen Eindrücke bestätigten sich durch die Messungen der optischen Dichte und der daraus berechneten Konzentrationen, die erwarteten Zielwerte der Standards und der Kontrollen wurden erreicht (Tabelle 21). Bei der Wiederfindung wurden bei der "spiked" Kontrolle (RC) im Mittel 96,65 % erreicht, bei dem "spiked" Poolserum (SS) im Mittel 93,33 % und bei dem "spiked" Poolplasma (PS) 81,83 % (Tabelle 22). Bei den Proben des nativen Poolserums und -plasmas sowie den nativen und Kollagen-aktivierten Proben der beiden Einzelindividuen bestätigte sich ebenfalls der optische Eindruck: Es konnten keine erhöhten optischen Dichten gemessen werden, die berechneten Konzentrationen waren somit 0 pg/ml.

#### 4 Eigene Untersuchungen - Ergebnisse

Tabelle 21: ELISA sCD40L: Einzelmesswerte und Mittelwert der Doppelmessungen der Standards (S) und Kontrollen (C) sowie zu erwartende Konzentrationen [pg/ml]

	Messung 1 [pg/ml]	Messung 2 [pg/ml]	Mittelwert [pg/ml]	erwarteter Wert [pg/ml]
<b>Standard</b>				
S0	0,0	0,0		0
S1	58,3	63,9	61,1	62,5
S2	125,4	125,5	125,5	125
S3	249,1	251,2	250,2	250
S4	510,3	497,3	503,8	500
S5	972,0	1017,4	994,7	1000
S6	1939,5	2066,9	2003,2	2000
S7	3906,6	4093,5	4000,0	4000
<b>Kontrollen</b>				
CL	423,9	433,4	428,7	336-584
CM	1343,1	1319,2	1331,2	1037-1656
CH	1627,8	1781,8	1704,8	1712-3374

Tabelle 22: ELISA sCD40L: Einzelmesswerte und Mittelwert der Doppelmessungen der "spiked" Kontrollen (RC), des "spiked" Poolserums (SS) und des "spiked" Poolplasmas (PS) sowie der zu erwartenden Konzentrationen [pg/ml] und der prozentualen Rate der Wiederfindung (Recovery)

	Verdünnung	Messung 1 [pg/ml]	Messung 2 [pg/ml]	Mittelwert [pg/ml]	erwarteter Wert [pg/ml]	Recovery %
<b>Kontrolle Recovery</b>						
RC0	keine	785,8	793,4	789,6	800	98,7
RC2	1:2	389,5	387,6	388,6	400	97,2
RC4	1:4	195,6	189,9	192,8	200	96,4
RC8	1:8	97,3	91,2	94,3	100	94,3
<b>Pool-Serum spiked</b>						
SS0	keine	716,9	679,8	698,3	800	87,3
SS2	1:2	355,1	363,1	359,1	400	89,8
SS4	1:4	187,5	208,0	197,7	200	98,9
SS8	1:8	99,1	98,1	98,6	100	98,6
<b>Pool-Plasma spiked</b>						
PS0	keine	558,1	550,5	554,3	800	69,3
PS2	1:2	321,2	309,7	315,4	400	78,9
PS4	1:4	181,0	176,0	178,5	200	89,3
PS8	1:8	89,5	90,1	89,8	100	89,8

## 4 Eigene Untersuchungen - Ergebnisse

### 4.1.4.2 sP-Selectin

Bei der optischen Kontrolle der Mikroplatte 1 zeigten sich gleichartige Farbumschläge wie beim sCD40L. Die optischen Eindrücke bestätigten sich durch die Messungen der optischen Dichte und der daraus berechneten Konzentrationen, die erwarteten Zielwerte der Standards und der Kontrolle wurden erreicht (Tabelle 23).

Tabelle 23: ELISA sP-Selectin: Einzelmesswerte und Mittelwert der Standards (S) und der Kontrolle (C) sowie zu erwartende Konzentrationen [ng/ml] der Mikroplatte 1

	Messung 1 [ng/ml]	Messung 2 [ng/ml]	Mittelwert [ng/ml]	erwarteter Wert [ng/ml]
<b>Standard</b>				
S0	0,15	0,09	0,12	0,00
S1	0,85	0,90	0,88	0,82
S2	8,34	7,65	7,99	7,28
S3	20,44	20,04	20,24	18,83
S4	32,50	35,05	33,78	30,76
S5	>52,77	45,19	48,98	45,94
<b>Kontrolle</b>				
C	35,58	29,60	32,59	28,53-35,71

Bei der Wiederfindung wurden bei der "spiked" Kontrolle (RC) im Mittel 59,9 % erreicht, bei dem "spiked" Poolserum (SS) im Mittel 52,8 % und bei dem "spiked" Poolplasma (PS) 56,7 % (Tabelle 24). Bei den Proben des nativen Poolserums (SN) und Poolplasmas (PN) wurden niedrige optische Dichten mit entsprechend geringen Konzentrationen sP-Selectin gemessen (Tabelle 24). Diese Dichtewerte bzw. Konzentrationen lagen jedoch nahezu ausnahmslos unterhalb der im Null-Standard (S0) gemessenen Werte. Zudem wurden auch in den unbenutzten Vials (Reihen 11 und 12, Vials D bis H, Anhang Tabelle 12-4, S. 12-8) Konzentrationen zwischen 0,01-0,09 ng/ml berechnet. Beim Einzelindividuum 1 wurden ebenfalls niedrige optische Dichten bzw. Konzentrationen im Bereich der Messwerte von S0 bzw. der unbenutzten Vials gemessen (Anhang Tabelle 12-10, S. 12-21)

#### 4 Eigene Untersuchungen - Ergebnisse

Tabelle 24: ELISA sP-Selectin: Einzelmesswerte und Mittelwert der "spiked" Kontrollen (RC), des "spiked" Poolserums (SS) und des "spiked" Poolplasmas (PS) sowie der zu erwartenden Konzentrationen [ng/ml] und der prozentualen Rate der der Wiederfindung (Recovery) der Mikroplatte 1

	Verdünnung	Messung 1 [ng/ml]	Messung 2 [ng/ml]	Mittelwert [ng/ml]	erwarteter Wert [ng/ml]	Recovery %
<b>Kontrolle Recovery</b>						
RC0	keine	6,23	6,09	6,16	9,2	67
RC2	1:2	2,78	2,76	2,77	4,6	60,2
RC4	1:4	1,40	1,19	1,29	2,3	56,1
RC8	1:8	0,62	0,68	0,65	1,15	56,5
<b>Serum gespiked</b>						
SS0	keine	4,84	4,61	4,73	9,2	51,4
SS2	1:2	2,71	2,51	2,61	4,6	56,7
SS4	1:4	1,22	1,08	1,15	2,3	50
SS8	1:8	0,66	0,57	0,61	1,15	53
<b>Serum nativ</b>						
SN0	keine	0,08	0,03	0,06	-	-
SN2	1:2	0,08	0,08	0,08	-	-
SN4	1:4	0,07	0,08	0,08	-	-
SN8	1:8	0,12	0,09	0,10	-	-
<b>Plasma gespiked</b>						
PS0	keine	5,84	4,94	5,39	9,2	58,6
PS2	1:2	2,53	2,89	2,71	4,6	59
PS4	1:4	1,11	1,34	1,23	2,3	53,5
PS8	1:8	0,63	0,65	0,64	1,15	55,7
<b>Plasma nativ</b>						
PN0	keine	0,15	0,09	0,12	-	-
PN2	1:2	0,06	0,08	0,07	-	-
PN4	1:4	0,11	0,09	0,10	-	-
PN8	1:8	0,10	0,22	0,16	-	-

Bei der Auswertung der Mikroplatte 2 ergaben sich bezüglich der Standards und der Kontrolle mit den Ergebnissen von Mikroplatte 1 vergleichbare Messwerte. Allerdings wurden bei S0 sowie den unbenutzten Vials (Reihen 11 und 12, Vials A bis H) deutlich höhere Konzentrationen von ca. 0,4 ng/ml gemessen. In diesem Bereich lagen auch die Messergebnisse der Proben der Einzelindividuen 2 und 3 (Anhang Tabelle 12-11, S. 12-22).

#### 4.2 Thrombozytopenie und Thrombozytose bei Klinikpatienten (2008 - 2015)

Zwischen Juli 2008 und Juni 2015 wurden in der Klinik für Pferde, Innere Medizin 4.397 unterschiedliche Equiden vorgestellt. Bei 3.592 dieser Tiere erfolgten hämatologische Untersuchungen mit dem ADVIA® 120/2120.

Bei 123 Pferden (3,4 %) lag eine Thrombozytopenie vor, die bei 60 Pferden echt war, bei 6 EDTA-induziert und bei 57 Patienten fraglich. Somit ergibt sich eine Prävalenz von 1,7 % (60/3.592) echter Thrombozytopenien und 0,17 % (6/3.592) EDTA-induzierter Pseudothrombozytopenien. Eine Thrombozytose wurde bei 111 Pferden (3,1 %) ermittelt.

Bei den Thrombozytopenien ergab sich eine der Gesamtpopulation (n = 4.397) entsprechende Verteilung bezüglich Geschlechter und Rassen (Tabelle 25). Bei den Thrombozytosen war der Anteil von Stuten und Hengsten signifikant ( $p = 0,012$ ) höher als in der Gesamtpopulation. Ponys, Kaltblüter und die sonstigen Rassen waren bei der Thrombozytose signifikant ( $p = 0,0001$ ) häufiger anzutreffen als in der Gesamtpopulation.

Tabelle 25: Thrombozytopenie und Thrombozytose bei Klinikpatienten (2008 - 2015): Rasse- und Geschlechtsverteilung der Patienten mit Thrombozytenabweichungen im Vergleich zur Gesamtpopulation (n = 4.397)

		Geschlecht			Rasse				
		Wallach	Stute	Hengst	Warmblut	Kleinpferd	Kaltblut	Vollblut	Sonstige
<b>Gesamtpopulation</b>	(%)	49	44	7	54	28	5	4	9
<b>Thrombozytopenie</b>									
echt	%	53	43	4	55	27	3	5	10
	n	32	26	2	33	16	2	3	6
EDTA-PTCP	%	57	43	0	57	28	15	0	0
	n	4	2	0	4	1	1	0	0
fraglich	%	42	58	0	61	23	5	2	9
	n	24	33	0	35	13	3	1	5
<b>Thrombozytose</b>									
	%	32	50	18	22	45	14	7	12
	n	35	55	21	24	50	15	8	14

Das mediane Alter entsprach bei der Thrombozytopenie etwa dem der Gesamtpopulation (12 Jahre), Patienten mit einer Thrombozytose waren hingegen im Median signifikant ( $p < 0,0001$ ) jünger. Hierbei waren 29 % der Pferde jünger als ein Jahr, in der Gesamtpopulation lag dieser Anteil bei 5 % (Tabelle 26).

#### 4 Eigene Untersuchungen - Ergebnisse

Tabelle 26: Thrombozytopenie und Thrombozytose bei Klinikpatienten (2008 - 2015): Patientenzahl, Altersverteilung und Thrombozytenzahl

	<b>Alter</b> Median (Spannweite)	<b>Thrombozyten [x10<sup>9</sup>/l]</b> Median (Spannweite)
<b>Thrombozytopenie</b>		
echt (n = 60)	13,5 Jahre (4 Monate -27 Jahre)	56 (9-89)
EDTA-PTCP (n = 6)	11,5 Jahre (3 - 20 Jahre)	38 (24-83)
fraglich (n = 57)	13 Jahre (4 Monate -23 Jahre)	64 (7-89)
<b>Thrombozytose</b>		
(n = 111)	5 Jahre (19 Tage -35 Jahre)	307 (272-575)

Sowohl bei der Thrombozytopenie als auch bei der Thrombozytose wurde die Mehrzahl der Patienten der Gruppe Entzündung zugeordnet (Tabelle 27), wobei systemische Entzündungen jeweils den größten Anteil der Patienten betrafen: 56 % (14/25) bei der Thrombozytopenie, 73 % (37/51) bei der Thrombozytose. Die nicht-entzündlichen Darmerkrankungen betrafen nahezu ausnahmslos den Dickdarm. Bei den Neoplasien war das maligne Lymphom (5/11 bei Thrombozytopenie bzw. 3/11 bei Thrombozytose) die häufigste Diagnose. Die Tabelle 12-12 im Anhang (S. 12-23) gibt einen Überblick über Stammdaten, Messergebnisse der Thrombozytenvariablen, Gruppeneinteilung sowie individuelle Diagnosen aller Patienten.

Tabelle 27: Thrombozytopenie und Thrombozytose bei Klinikpatienten (2008 - 2015): Verteilung in die Diagnosegruppen (absolut und prozentualer Anteil) sowie Anzahl der Nichtüberlebenden (†) und Mortalität (%) bei Patienten mit Thrombozytopenie und Thrombozytose

	<b>Entzündung</b>		<b>Neoplasie</b>		<b>nicht-entzündliche Darmerkrankung</b>		<b>Sonstige</b>	
	<b>gesamt</b> (%)	<b>†</b> (%)	<b>gesamt</b> (%)	<b>†</b> (%)	<b>gesamt</b> (%)	<b>†</b> (%)	<b>gesamt</b> (%)	<b>†</b> (%)
<b>Thrombozytopenie</b> (n = 60)	25 (42)	8 (32)	11 (18)	10 (91)	10 (17)	2 (20)	14 (23)	3 (21)
<b>Thrombozytose</b> (n = 111)	51 (46)	21 (24)	11 (10)	9 (82)	17 (15)	3 (18)	32 (29)	4 (13)

#### 4 Eigene Untersuchungen - Ergebnisse

In der gesamten Patientenpopulation (4.397 Pferde) der Klinik für Pferde, Innere Medizin wurden im gleichen Zeitraum zu 10 % entzündliche Geschehen, zu 1 % Neoplasien und in 39 % der Fälle eine nicht-entzündliche Darmerkrankung diagnostiziert. Die Häufigkeit der Diagnosegruppen bei der Thrombozytopenie und Thrombozytose unterscheidet sich signifikant ( $p < 0.0001$ ) von der Gesamtpatientenpopulation und es zeigt sich, dass Entzündungen und Neoplasien sowohl in der Gruppe der Pferde mit einer Thrombozytopenie als auch der Gruppe mit Thrombozytose deutlich überrepräsentiert waren (Abbildung 21).

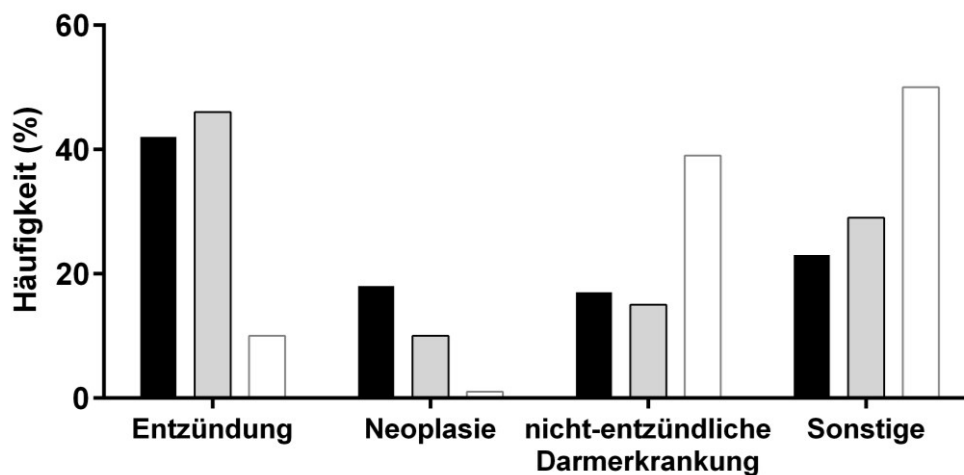


Abbildung 21: Thrombozytopenie und Thrombozytose bei Klinikpatienten (2008 - 2015): Prozentuale Verteilung in die Diagnosegruppen bei Patienten mit echter Thrombozytopenie (schwarzer Balken) und Thrombozytose (grauer Balken) im Vergleich zur Gesamtpopulation der Klinik (weißer Balken)

Die mediane Thrombozytenzahl betrug bei den echten Thrombozytopenien bzw. den Thrombozytosen  $56 \times 10^9/l$  bzw.  $307 \times 10^9/l$  mit einer Spannweite von  $9-89 \times 10^9/l$  bzw.  $272-575 \times 10^9/l$  (Tabelle 26). Pferde mit einer Neoplasie wiesen bei den Thrombozytopenien die niedrigste mediane Thrombozytenzahl auf, ein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Diagnosegruppen konnte jedoch nicht berechnet werden. Bei den Thrombozytosen waren ebenfalls keine Gruppenunterschiede nachweisbar (Abbildung 22; Anhang Tabelle 12-13, S. 12-28).

#### 4 Eigene Untersuchungen - Ergebnisse

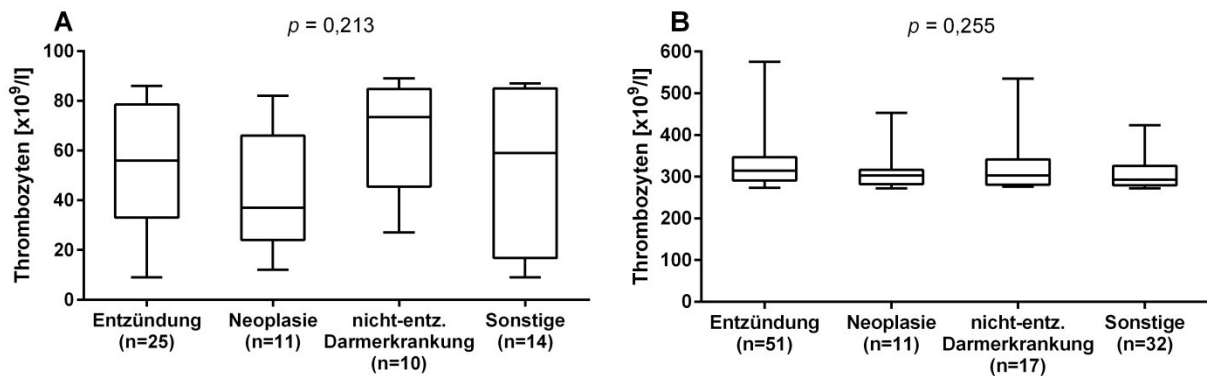


Abbildung 22: Thrombozytopenie und Thrombozytose bei Klinikpatienten (2008 - 2015): Thrombozytenzahlen in den Diagnosegruppen bei Thrombozytopenie (A) und Thrombozytose (B); (Median, 25/75%, min-max)

Lediglich 8 Pferde mit echter Thrombozytopenie zeigten klinisch Blutungsanzeichen (z. B. Petechien, Epistaxis). Die Thrombozytenzahl im K<sub>3</sub>-EDTA-Blut lag bei diesen Pferden zwischen 9-43 x10<sup>9</sup>/l (Median 16,5 x10<sup>9</sup>/l) und war signifikant ( $p < 0,0001$ ) niedriger als bei den Pferden mit echter Thrombozytopenie ohne klinische Symptome einer Blutungsneigung (Median 62,5 x10<sup>9</sup>/l; Abbildung 23). Bei den 52 Pferden ohne klinische Anzeichen einer Blutung lag jedoch bei 14 Pferden die Thrombozytenzahl im K<sub>3</sub>-EDTA-Blut ebenfalls unter 44 x10<sup>9</sup>/l.

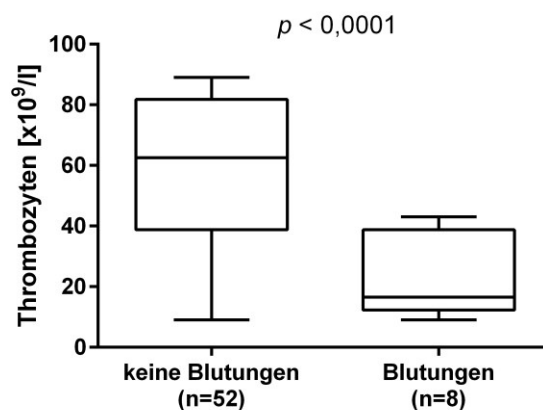


Abbildung 23: Thrombozytopenie und Thrombozytose bei Klinikpatienten (2008 - 2015): Thrombozytenzahlen bei Pferden mit echter Thrombozytopenie in Abhängigkeit von klinischen Symptomen einer Blutungsneigung (Median, 25/75%, min-max)

#### 4 Eigene Untersuchungen - Ergebnisse

Eine klinisch relevante positive Likelihood ratio von 13 für das Aufweisen von Blutungsanzeichen (z. B. Petechien, Epistaxis) mit einer Sensitivität von 50 % und einer Spezifität von 96 % konnte für eine Thrombozytenzahl von  $< 16 \times 10^9/l$  berechnet werden.

Bei den mit dem ADVIA® 2120 ermittelten Thrombozytenvariablen wurde die Gruppe der EDTA-PTCP mit den 5 Pferden und Ponys ergänzt, bei denen im Rahmen des Vergleichs der Antikoagulantien eine EDTA-PTCP festgestellt wurde (s. 4.1.1.1, S. 75). Beim Vergleich der Messungen aus K<sub>3</sub>-EDTA- und Zitratblut konnte lediglich bei den Patienten mit echter Thrombozytopenie für die Thrombozytenzahl sowie bei den Patienten mit EDTA-PTCP für die Thrombozytenzahl, die großen Thrombozyten (LargePLT) und den Thrombokrit (PCT) ein signifikanter Unterschied bezüglich des Antikoagulans berechnet werden (Tabelle 28). Beim Vergleich der aus K<sub>3</sub>-EDTA-Blut gemessenen Variablen konnten zwischen den echten Thrombozytopenien und den EDTA-PTCP keine signifikanten Unterschiede berechnet werden (PLT:  $p = 0,669$ ; Clumps:  $p = 0,151$ ; LargePLT:  $p = 0,545$ ; MPV:  $p = 0,347$ ; PCT:  $p = 0,521$ ).

Tabelle 28: Thrombozytopenie und Thrombozytose bei Klinikpatienten (2008 - 2015): Thrombozytenvariablen am ADVIA® 2120 in Abhängigkeit des Antikoagulans bei echter Thrombozytopenie (n = 22) und EDTA-PTCP (n = 11)

	PLT [ $\times 10^9/l$ ]		MPV [fl]		LargePLT [n]		Clumps [n]		PCT [%]	
	echt	PTCP	echt	PTCP	echt	PTCP	echt	PTCP	echt	PTCP
<b>K<sub>3</sub>-EDTA</b>										
Minimum	12,00	18,00	6,90	6,50	0,0	0,0	57,00	75,00	0,01	0,02
25 % Perzentil	33,00	28,00	7,82	6,90	1,00	0,0	91,00	118,0	0,03	0,03
Median	50,00	49,00	8,75	8,00	2,00	2,00	138,5	293,0	0,04	0,05
75 % Perzentil	69,00	83,00	9,85	10,00	4,00	3,00	187,0	595,0	0,05	0,07
Maximum	86,00	98,00	13,30	11,10	14,00	7,00	1892	1604	0,08	0,18
<b>Zitrat</b>										
Minimum	8,000	96,00	6,50	7,90	0,0	1,000	0,0	47,00	0,01	0,05
25 % Perzentil	34,75	99,00	8,40	8,40	1,00	5,000	60,00	81,00	0,03	0,10
Median	44,50	118,0	9,75	9,30	3,00	10,00	111,0	113,0	0,04	0,12
75 % Perzentil	59,50	155,0	11,00	11,10	6,25	16,00	231,3	287,0	0,06	0,13
Maximum	76,00	181,0	15,60	12,50	10,00	21,00	886,0	400,0	0,08	0,19
<b>p-Wert</b>	<b>0,026</b>	<b>&lt;0,0001</b>	0,124	0,133	0,366	<b>0,0007</b>	0,086	0,123	>0,9	<b>0,005</b>

Die Mortalität (Tabelle 26, S. 89) lag bei den Pferden mit einer echten Thrombozytopenie bei 37 %, bei den Pferden mit Thrombozytose waren es 25 %. In den Gruppen Entzündung und Neoplasie war die Mortalität jeweils am höchsten. Die Mortalität der gesamten Patientenpopulation war im gleichen Zeitraum mit 13 % signifikant ( $p < 0.0001$ ).

#### 4 Eigene Untersuchungen - Ergebnisse

niedriger. Die Chance zu versterben (Odds Ratio) ist bei Vorliegen einer Thrombozytopenie 3,7-fach, bei Vorliegen einer Thrombozytose 2,3-fach erhöht.

Weder bei den Thrombozytopenien noch bei den Thrombozytosen konnte zwischen der Gruppe der Nichtüberlebenden und der der Überlebenden bezüglich der Zahl der Thrombozyten ein signifikanter Unterschied berechnet werden (Abbildung 24; Anhang Tabelle 12-14, S. 12-28).

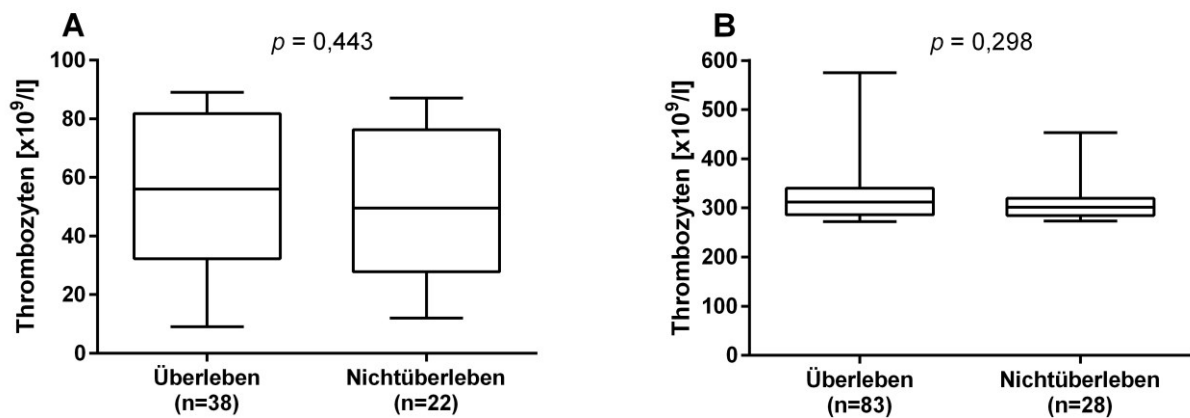


Abbildung 24: Thrombozytopenie und Thrombozytose bei Klinikpatienten (2008 - 2015): Thrombozytenzahlen bei Überlebenden und Nichtüberlebenden bei Equiden mit Thrombozytopenie (A) bzw. Thrombozytose (B); (Median, 25/75%, min-max)

### 4.3 Thrombozytenfunktion bei Equiden mit systemischer Entzündung (SIRS)

#### 4.3.1 Probanden

In die Studie eingeschlossen wurden 20 Patienten, welche zwischen September 2014 und März 2016 in der Klinik vorgestellt wurden und die SIRS-Einschlusskriterien erfüllten (Tabelle 29). Es handelte sich um 11 Warmblüter und 9 Kleinpferde im Alter zwischen 4 und 25 Jahren (Median 17 Jahre), darunter 12 Wallache und 8 Stuten. Von den Patienten wurden 6 geheilt entlassen, 14 wurden euthanasiert. Von letzteren Pferden wurde von den Tier-eigentümern bei 4 Individuen (Patient 3, 15, 18 und 20) bei mäßig bis schlechter Prognose ein Therapieversuch aus wirtschaftlichen Gründen abgelehnt. Zwei Pferde (Patient 7 und 9) wurden im Rahmen einer Laparotomie aufgrund eines inoperablen Befundes euthanasiert. Einen Überblick über die Stammdaten und individuellen Diagnosen aller Patienten zeigt die Tabelle 12-15 im Anhang (S. 12-29).

Tabelle 29: Thrombozytenfunktion bei Equiden mit systemischer Entzündung (SIRS): SIRS-Kriterien der 20 Individuen, n.d. = nicht durchgeführt

Pat-ID	Herzfrequenz (Schläge/min)	Atemfrequenz (Züge/min)	Temperatur (°C)	Laktat [mmol/l]	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> [mmol/l]	PLT [x10 <sup>9</sup> /l]		WBC [x10 <sup>9</sup> /l]
						K <sub>3</sub> -EDTA	Zitrat	
Einschluss wenn	> 52	> 20	≤ 36,0/≥ 39,0	≥ 5,0	≤ 20,0	< 90	< 82	< 3,0/> 15,0
1	48	<b>32</b>	<b>39,1</b>	1,9	23,3	128	113	10,12
2	<b>108</b>	<b>36</b>	<b>39,7</b>	<b>5,9</b>	26,1	116	139	<b>1,24</b>
3	<b>60</b>	18	38,8	n.d.	<b>19,8</b>	116	131	<b>15,23</b>
4	44	12	<b>39,3</b>	0,9	24,7	125	119	<b>2,96</b>
5	<b>64</b>	16	<b>40,3</b>	0,9	21,3	<b>44</b>	<b>49</b>	3,94
6	<b>80</b>	<b>76</b>	37,4	<b>7,3</b>	24,1	133	124	<b>1,68</b>
7	<b>96</b>	<b>26</b>	37,5	<b>12,3</b>	<b>19,8</b>	<b>69</b>	<b>73</b>	<b>1,95</b>
8	48	18	<b>39,1</b>	1,2	24,9	121	148	<b>16,87</b>
9	<b>62</b>	<b>30</b>	37,8	1,7	25,5	156	160	10,57
10	48	18	<b>39,6</b>	1,0	23,3	<b>24</b>	<b>38</b>	6,76
11	<b>60</b>	<b>52</b>	38,2	n.d.	n.d.	<b>26</b>	<b>33</b>	8,73
12	<b>56</b>	<b>28</b>	<b>39,2</b>	0,5	29,1	119	104	8,95
13	<b>88</b>	<b>28</b>	37,7	<b>10,1</b>	<b>19,3</b>	<b>19</b>	<b>69</b>	<b>2,23</b>
14	<b>60</b>	<b>80</b>	37,5	<b>12,8</b>	23,8	147	132	<b>16,11</b>
15	<b>64</b>	<b>24</b>	37,8	<b>12,8</b>	24,0	139	124	<b>15,07</b>
16	<b>62</b>	<b>60</b>	38,1	n.d.	n.d.	98	92	<b>17,89</b>
17	40	20	37,4	<b>9,1</b>	<b>18,8</b>	<b>37</b>	156	9,44
18	<b>80</b>	<b>36</b>	n.d.	4,6	29,8	188	172	5,86
19	52	<b>36</b>	38,1	n.d.	n.d.	183	229	<b>16,41</b>
20	<b>64</b>	20	<b>35,8</b>	3,0	27,6	114	104	7,11

## 4 Eigene Untersuchungen - Ergebnisse

### 4.3.2 Laser-Durchflusszytometrie (ADVIA® 2120)

Die SIRS-Patienten wiesen niedrigere Thrombozytenzahlen auf als die Kontrollgruppe, wobei der Unterschied lediglich in den K<sub>3</sub>-EDTA-Blutproben signifikant war. Bei den SIRS-Patienten wurden im Zitratblut im Mittel signifikant mehr Thrombozyten gemessen als aus den mit K<sub>3</sub>-EDTA antikoagulierten Proben. In der Kontrollgruppe war das Gegenteil der Fall (Abbildung 25).

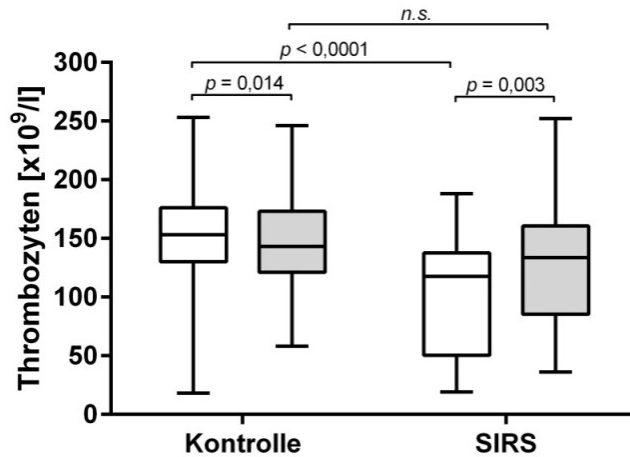


Abbildung 25: Thrombozytenfunktion bei Equiden mit systemischer Entzündung (SIRS): Thrombozytenzahlen am ADVIA® 2120 im K<sub>3</sub>-EDTA-Blut (weiße Box) und Zitratblut (graue Box, korrigiert um Verdünnungsfaktor 1,1) der Kontroll-(n = 120) und der SIRS-Gruppe (n = 20); (Median, 25/75%, min-max)

Bei der Betrachtung aller Einzelmesswerte der Thrombozytenzahl wurde deutlich, dass bei den SIRS-Patienten die Zahl im Zitratblut im Vergleich zum K<sub>3</sub>-EDTA-Blut nicht nur im Mittel, sondern bei allen 20 Individuen nahezu gleich oder höher war (Abbildung 26).

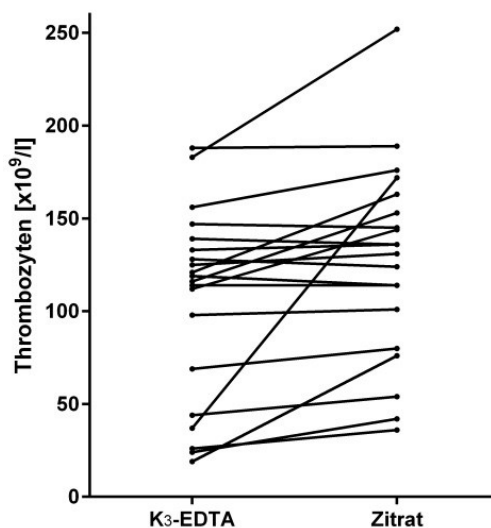


Abbildung 26: Thrombozytenfunktion bei Equiden mit systemischer Entzündung (SIRS): Thrombozytenzahlen [x10<sup>9</sup>/l] am ADVIA® 2120 im K<sub>3</sub>-EDTA- und Zitratblut bei 20 Individuen

#### 4 Eigene Untersuchungen - Ergebnisse

Für die weiteren Variablen konnten mit Ausnahme des Thrombokrit (PCT) aus Zitratblut keine signifikanten Unterschiede zwischen den SIRS-Patienten und der Kontrollgruppe berechnet werden (Tabelle 30). Eine Übersicht aller Einzelmessungen der Patienten zeigt die Tabelle 12-16 im Anhang (S. 12-30).

Tabelle 30: Thrombozytenfunktion bei Equiden mit systemischer Entzündung (SIRS): Thrombozytenvariablen am ADVIA® 2120 in Abhängigkeit von der Gruppe in Messungen aus K<sub>3</sub>-EDTA- bzw. Zitratblut (#= korrigiert um Verdünnungsfaktor 1,1)

	PLT [x10 <sup>9</sup> /l]		MPV [fl]		MPC [g/dl]		LargePLT [x10 <sup>9</sup> /l]		Clumps [n]		PCT [%]	
	K <sub>3</sub> - EDTA	Zitrat#	K <sub>3</sub> - EDTA	Zitrat	K <sub>3</sub> - EDTA	Zitrat	K <sub>3</sub> - EDTA	Zitrat#	K <sub>3</sub> - EDTA	Zitrat#	K <sub>3</sub> - EDTA	Zitrat
<b>Kontrolle</b>												
Anzahl	120	119	120	120	120	120	120	120	116	120	116	120
Minimum	18,0	58,0	5,1	6,3	15,9	17,7	0,0	0,0	0,0	41,0	0,02	0,04
25% Perzentil	130,0	121,0	6,9	8,1	22,9	20,3	1,0	2,0	90,0	80,2	0,10	0,10
Median	153,0	143,0	7,7	8,8	24,7	21,4	3,0	5,0	112,0	102,0	0,12	0,12
75% Perzentil	176,0	173,0	8,5	9,7	26,3	23,0	7,0	9,0	158,5	169,3	0,14	0,14
Maximum	253,0	246,0	10,9	12,3	30,2	26,6	25,0	20,0	2774	1578	0,21	0,19
<b>SIRS</b>												
Anzahl	20	20	20	20	19	20	20	20	20	20	20	19
Minimum	19,0	36,0	6,0	6,0	21,0	17,6	0,0	0,0	26,0	41,0	0,03	0,03
25% Perzentil	50,2	85,2	6,6	8,4	23,5	19,9	2,2	3,2	61,0	69,5	0,07	0,12
Median	117,5	133,5	7,5	8,9	25,8	21,1	5,5	7,5	74,5	99,0	0,10	0,17
75% Perzentil	137,5	160,5	7,9	10,3	27,3	22,7	8,0	12,7	108,5	150,5	0,13	0,21
Maximum	188,0	252,0	11,1	11,2	30,0	30,5	18,0	26,0	1299	736,0	0,19	0,25
<b>p-Wert</b>	<b>&lt;0,0001</b>	0,102	0,777	0,826	0,131	>0,9	0,057	>0,9	0,181	0,833	0,107	<b>&lt;0,0001</b>

Innerhalb der SIRS-Gruppe waren die Unterschiede bezüglich der Antikoagulantien für die Variablen PLT ( $p = 0,003$ ), MPV ( $p = 0,0001$ ), MPC ( $p < 0,0001$ ) und PCT ( $p < 0,0001$ ) signifikant. Für die Variablen LargePLT ( $p > 0,9$ ) und Clumps ( $p > 0,9$ ) konnten keine signifikanten Unterschiede berechnet werden.

Zwischen den 14 Nichtüberlebenden und den 6 Überlebenden der SIRS-Gruppe konnten für die Thrombozytenvariablen aus K<sub>3</sub>-EDTA- bzw. Zitratblut keine signifikanten Unterschiede berechnet werden (Tabelle 31). Allerdings lag die Anzahl der Thrombozyten bei fast der Hälfte der Nichtüberlebenden unter 100 x10<sup>9</sup>/l, wohingegen keines der überlebenden Tiere diesen Wert unterschritt (Abbildung 27).

#### 4 Eigene Untersuchungen - Ergebnisse

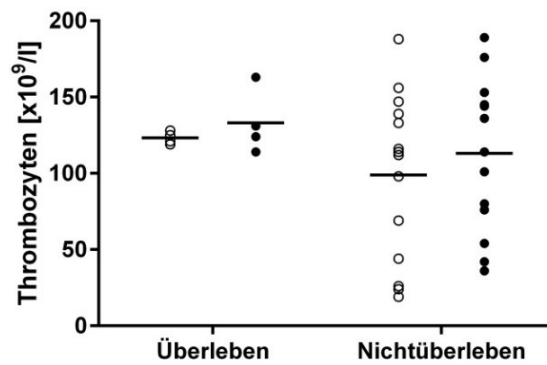


Abbildung 27: Thrombozytenfunktion bei Equiden mit systemischer Entzündung (SIRS): Thrombozytenzahlen [ $\times 10^9/l$ ] der 20 SIRS-Patienten im  $K_3$ -EDTA-Blut (ungefüllte Kreise) und Zitratblut (gefüllte Kreise) am ADVIA® 2120 in Abhängigkeit von Überleben ( $n = 6$ ) und Nichtüberleben ( $n = 14$ ); (Balken=Mittelwert)

Tabelle 31: Thrombozytenfunktion bei Equiden mit systemischer Entzündung (SIRS): Thrombozytenvariablen am ADVIA® 2120 in Abhängigkeit von Überleben und Nichtüberleben der SIRS-Probanden aus  $K_3$ -EDTA-Blut bzw. Zitratblut (#=korrigiert um Verdünnungsfaktor 1,1)

	PLT [ $\times 10^9/l$ ]		MPV [fl]		MPC [g/dl]		LargePLT [ $\times 10^9/l$ ]		Clumps [n]		PCT [%]	
	$K_3$ -EDTA	Zitrat#	$K_3$ -EDTA	Zitrat	$K_3$ -EDTA	Zitrat	$K_3$ -EDTA	Zitrat#	$K_3$ -EDTA	Zitrat#	$K_3$ -EDTA	Zitrat
<b>Nichtüberleben</b>												
Anzahl	14	14	14	14	13	14	14	14	14	14	14	13
Minimum	19,0	36,0	6,0	6,8	21,0	17,6	1,0	0,0	26,0	41,0	0,03	0,03
25% Perzentil	39,5	70,5	6,8	8,6	23,4	19,6	2,0	2,8	63,0	59,3	0,07	0,05
Median	113,0	125,0	7,7	10,0	25,3	20,3	6,0	6,0	74,5	107,0	0,11	0,16
75% Perzentil	141,0	147,0	8,3	10,5	26,8	22,3	8,3	13,3	107,5	158,3	0,13	0,21
Maximum	188,0	189,0	11,1	11,2	29,3	24,6	18,0	26,0	1299,0	736,0	0,19	0,25
<b>Überleben</b>												
Anzahl	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
Minimum	37,0	114,0	6,6	6,0	23,4	20,9	0,0	0,0	41,0	68,0	0,09	0,12
25% Perzentil	98,5	121,5	6,6	7,5	26,0	21,0	2,3	3,8	55,3	72,5	0,09	0,14
Median	123,0	147,0	6,7	8,7	27,1	21,6	4,0	10,5	84,5	99,0	0,10	0,18
75% Perzentil	141,8	192,0	7,1	8,8	28,3	26,4	8,0	12,3	383,8	117,8	0,14	0,24
Maximum	183,0	252,0	7,5	9,0	30,0	30,5	11,0	13,0	749,0	153,0	0,18	0,25
<b>p-Wert</b>	0,739	0,919	0,349	0,108	0,349	0,108	0,946	>0,9	>0,9	>0,9	>0,9	>0,9

## 4 Eigene Untersuchungen - Ergebnisse

### 4.3.3 Impedanzaggregometrie (Multiplate® Analyzer)

Beim Vergleich der SIRS-Gruppe mit der Kontrollgruppe wurde ein signifikanter Unterschied mit niedrigeren Aggregationswerten in der SIRS-Gruppe lediglich für die Messungen des ASPitest mit magnetischem Rührstab ermittelt (Tabelle 32). Der offensichtliche Methodeneinfluss in der Kontrollgruppe mit signifikant niedrigeren Aggregationswerten bei den Messungen ohne magnetischen Rührstab während der Inkubation (s. 4.1.2.2, S. 81) war innerhalb der SIRS-Gruppe lediglich beim COLtest ( $p = 0,022$ ) nachweisbar. Für den ADPtest ( $p = 0,647$ ), ADPtestHS ( $p > 0,9$ ) und die Spontanaggregation ( $p = 0,067$ ) konnten keine methodenabhängigen signifikanten Unterschiede berechnet werden. Der ASPitest ergab im Mittel signifikant ( $p = 0,001$ ) höhere Messwerte bei den Messungen ohne magnetischen Rührstab. Eine Übersicht aller Einzelmessungen der Patienten zeigt die Tabelle 12-17 im Anhang (S. 12-31).

Tabelle 32: Thrombozytenfunktion bei Equiden mit systemischer Entzündung (SIRS): Aggregationswerte am Multiplate® Analyzer der Kontroll- und SIRS-Gruppe bei Messungen mit bzw. ohne magnetischen Rührstab während der Inkubation

	COLtest [U]		ADPtest [U]		ADPtestHS [U]		ASPitest [U]		Spontanaggregation [U]	
	mit Magnet	ohne Magnet	mit Magnet	ohne Magnet	mit Magnet	ohne Magnet	mit Magnet	ohne Magnet	mit Magnet	ohne Magnet
<b>Kontrolle</b>										
Anzahl	42	42	42	41	42	42	41	42	41	42
Minimum	44,0	16,0	16,0	9,0	13,0	5,0	2,0	0,0	0,0	0,0
25% Perzentil	209,3	96,3	74,5	48,0	54,5	38,8	12,0	9,8	0,0	0,0
Median	238,5	135,5	113,0	72,0	77,0	64,5	78,0	31,5	7,0	0,0
75% Perzentil	303,0	156,3	179,0	101,5	168,0	98,3	173,5	100,0	18,5	7,0
Maximum	345,0	259,0	319,0	244,0	331,0	263,0	325,0	239,0	157,0	24,0
<b>SIRS</b>										
Anzahl	20	20	20	19	20	20	20	20	19	18
Minimum	10,0	39,0	10,0	16,0	9,0	24,0	0,0	0,0	0,0	0,0
25% Perzentil	120,0	97,0	35,5	59,0	30,5	45,0	7,5	13,5	0,0	0,0
Median	338,5	169,5	120,5	85,0	123,5	90,0	21,5	66,0	4,0	1,0
75% Perzentil	404,3	258,8	279,8	203,0	255,5	239,3	56,8	182,0	54,0	18,3
Maximum	526,0	323,0	414,0	340,0	376,0	360,0	171,0	282,0	214,0	126,0
<b>p-Wert</b>	>0,9	0,103	>0,9	0,597	0,9	0,061	<b>0,031</b>	0,305	>0,9	0,539

Innerhalb der SIRS-Gruppe konnten keine signifikanten Unterschiede der Aggregationswerte in Abhängigkeit von Überleben und Nichtüberleben berechnet werden. Mit Ausnahme des ASPitest zeigten die 14 Nichtüberlebenden jedoch einen Trend zu geringeren Aggregationswerten (Tabelle 33). Der insgesamt geringere Methodeneffekt in der SIRS-Gruppe wurde insbesondere durch die Messungen bei den Nichtüberlebenden

#### 4 Eigene Untersuchungen - Ergebnisse

beeinflusst. Die Aggregationswerte waren bei den Nichtüberlebenden in den Messungen ohne magnetischen Rührstab während der Inkubation lediglich im COLtest ( $p = 0,044$ ) signifikant niedriger (ADPtest  $p > 0,9$ , ADPtestHS  $p > 0,9$ , Spontanaggregation  $p = 0,196$ ). Innerhalb der Gruppe der Überlebenden ergaben sich signifikante Unterschiede für den COLtest ( $p = 0,0001$ ), den ADPtest ( $p = 0,049$ ) und den ADPtestHS ( $p = 0,050$ ).

Tabelle 33: Thrombozytenfunktion bei Equiden mit systemischer Entzündung (SIRS): Aggregationswerte am Multiplate® Analyzer in Abhängigkeit von Überleben und Nichtüberleben der SIRS-Probanden bei Messungen mit bzw. ohne magnetischen Rührstab während der Inkubation

	COLtest [U]		ADPtest [U]		ADPtestHS [U]		ASPItest [U]		Spontanaggregation [U]	
	mit Magnet	ohne Magnet	mit Magnet	ohne Magnet	mit Magnet	ohne Magnet	mit Magnet	ohne Magnet	mit Magnet	ohne Magnet
<b>Nichtüberleben</b>										
Anzahl	14	14	14	14	14	14	14	14	13	12
Minimum	10,0	39,0	10,0	19,0	9,0	28,0	0,1	0,1	0,1	0,1
25% Perzentil	81,8	91,5	27,8	54,5	24,3	47,3	5,3	9,8	0,1	0,1
Median	270,0	169,5	104,0	74,0	123,0	116,5	28,5	66,0	3,0	1,0
75% Perzentil	387,0	244,3	261,3	231,5	246,5	264,0	56,3	236,8	26,5	14,5
Maximum	482,0	323,0	386,0	340,0	376,0	360,0	171,0	282,0	214,0	57,0
<b>Überleben</b>										
Anzahl	6	6	6	5	6	6	6	6	6	6
Minimum	200,0	88,0	80,0	16,0	49,0	24,0	6,0	13,0	0,1	0,0
25% Perzentil	314,0	116,5	95,8	37,5	87,3	36,0	10,5	41,5	2,3	0,1
Median	398,5	168,0	132,5	107,0	123,5	57,5	17,5	67,5	70,0	6,0
75% Perzentil	502,8	282,0	348,0	171,5	312,8	201,8	79,5	109,3	125,8	45,0
Maximum	526,0	294,0	414,0	203,0	333,0	249,0	90,0	140,0	140,0	126,0
<b>p-Wert</b>	0,026	>0,9	0,99	>0,9	>0,9	0,826	0,809	>0,9	0,365	0,788

Eine Signifikanz für die niedrigeren Messwerte des ASPItest der Kleinpferde im Vergleich zu den Warmblütern konnte innerhalb der SIRS-Gruppe ( $p = 0,626$ ) im Unterschied zur Kontrollgruppe ( $p < 0,0001$ , s. 4.1.2.1, S. 80) nicht berechnet werden (Tabelle 34).

Tabelle 34: Thrombozytenfunktion bei Equiden mit systemischer Entzündung (SIRS): ASPItest am Multiplate® Analyzer [U] bei SIRS-Probanden in Abhängigkeit von der Rasse

	Kleinpferd	Warmblut
Anzahl	9	11
Minimum	0,0	0,0
25% Perzentil	3,0	12,0
Median	9,0	36,0
75% Perzentil	51,5	76,0
Maximum	90,0	171,0

### 4.3.4 Fluoreszenz-Durchflusszytometrie (Accuri® C6)

Bei einem Probanden (Pferd Nr. 2) konnten keine Messungen durchgeführt werden, da sich mittels Sedimentation kein PLRP gewinnen ließ. Das Pferd wurde mit einer Magenruptur im hochgradigen Schock vorgestellt und befand sich mutmaßlich in der hypokoagulablen Phase einer disseminierten intravasalen Koagulopathie. Dieser Verdacht konnte im Nachhinein durch die Messung der Plasmakonzentration des Fibrinogens bekräftigt werden: Die Konzentration lag mit 0,8 g/l erheblich unter dem laboreigenen unteren Referenzlimit von 1,4 g/l (STA-Fibrinogen, STA Compact® Analyzer, Stago).

In den nativen Proben konnten bei den SIRS-Patienten signifikant mehr CD62P-positive und somit aktivierte Thrombozyten gemessen werden, bei den CD154-positiven Zellen war dies im Trend ebenfalls erkennbar (Abbildung 28, Tabelle 35). Innerhalb der SIRS-Gruppe war die Anzahl positiver Zellen nach der Aktivierung mit Kollagen wie innerhalb der Kontrollgruppe signifikant erhöht (jeweils  $p < 0,0001$ ). Eine Übersicht aller Einzelmessungen der Patienten zeigt die Tabelle 12-18 im Anhang (S. 12-32).

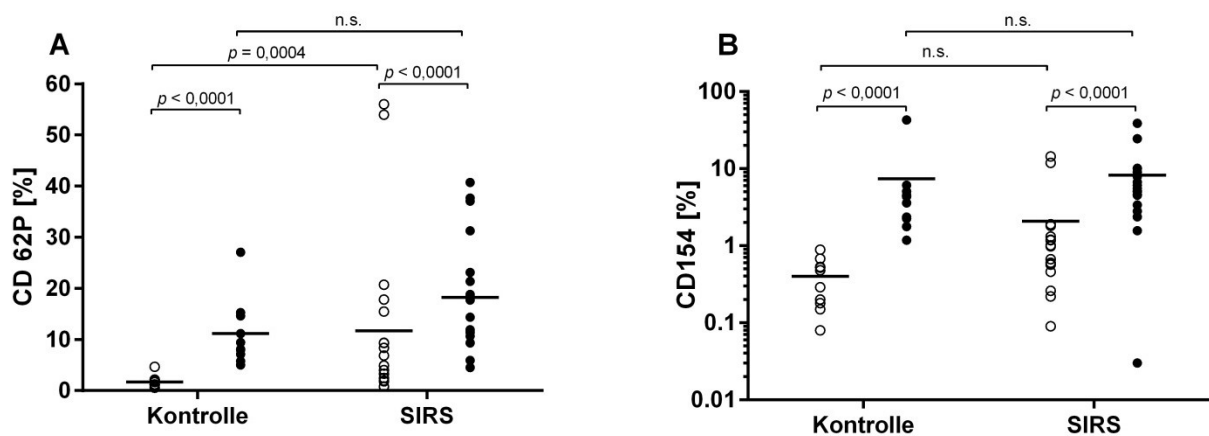


Abbildung 28: Thrombozytenfunktion bei Equiden mit systemischer Entzündung (SIRS): Prozentualer Anteil CD62P- (A) bzw. CD154- (B) positiver Thrombozyten der Individuen in der Kontroll- (n = 10) und der SIRS-Gruppe (n = 19) am Accuri® C6 vor (ungefüllte Kreise) und nach (gefüllte Kreise) Aktivierung mit Kollagen; (Balken=Mittelwert)

In der SIRS-Gruppe konnten sowohl in der nativen Probe ( $p = 0,031$ ) als auch nach Aktivierung mit Kollagen ( $p = 0,031$ ) signifikant mehr Thrombozyten-Leukozyten-Aggregate in Form von CD11a/18-positiven Thrombozyten nachgewiesen werden. Im Unterschied zur Kontrollgruppe, in der die Zahl der TLA durch Aktivierung mit Kollagen nicht erhöht werden

#### 4 Eigene Untersuchungen - Ergebnisse

konnte ( $p > 0,9$ ), waren in der SIRS-Gruppe die TLA nach der Aktivierung signifikant ( $p = 0,013$ ) erhöht (Abbildung 29, Tabelle 35).

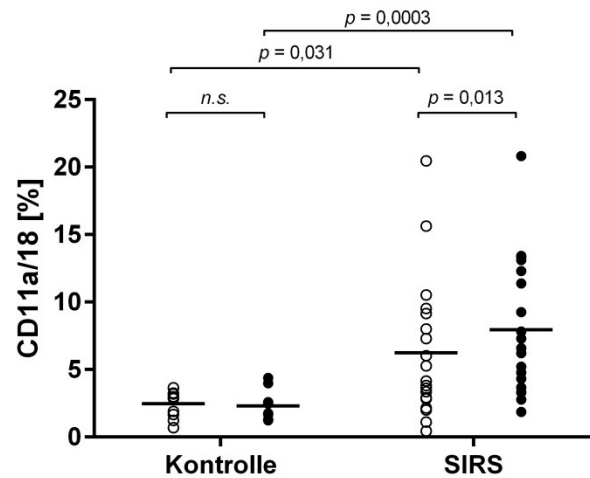


Abbildung 29: Thrombozytenfunktion bei Equiden mit systemischer Entzündung (SIRS): Prozentualer Anteil CD11a/18-positiver Thrombozyten der Individuen in der Kontroll- (n = 10) und der SIRS-Gruppe (n = 19) am Accuri® C6 vor (ungefüllte Kreise) und nach (gefüllte Kreise) Aktivierung mit Kollagen; (Balken=Mittelwert)

Beim Vergleich der Anzahl Thiazol-positiver Thrombozyten zwischen Kontroll- und SIRS-Gruppe konnte kein signifikanter Unterschied berechnet werden (Tabelle 35).

Tabelle 35: Thrombozytenfunktion bei Equiden mit systemischer Entzündung (SIRS): Antikörper- und Thiazol-positive Thrombozyten am Accuri® C6 der SIRS- und Kontrollgruppe vor und nach Aktivierung mit Kollagen

	CD62P [%]		CD154 [%]		CD11a/18 [%]		Thiazol [%]
	nativ	Kollagen	nativ	Kollagen	nativ	Kollagen	nativ
<b>Kontrolle</b>							
Anzahl	10	10	10	10	10	10	10
Minimum	0,59	5,01	0,08	1,18	0,70	1,23	0,27
25% Perzentil	1,08	6,79	0,17	2,12	1,57	1,57	0,58
Median	1,45	8,78	0,38	3,96	2,93	1,82	2,35
75% Perzentil	1,99	14,78	0,57	5,33	3,22	2,95	26,25
Maximum	4,65	27,06	0,89	42,91	3,650	4,38	51,82
<b>SIRS</b>							
Anzahl	19	19	19	19	19	19	19
Minimum	0,75	4,54	0,09	0,03	0,45	1,87	0,42
25% Perzentil	2,45	10,67	0,46	3,38	2,84	3,67	1,78
Median	4,92	14,40	0,67	5,53	4,16	6,60	4,27
75% Perzentil	15,46	23,13	1,31	9,03	9,15	12,31	8,43
Maximum	56,05	40,72	14,35	38,76	20,46	20,83	29,85
<b>p-Wert</b>	<b>0,0004</b>	0,374	0,119	>0,9	<b>0,031</b>	<b>0,0003</b>	0,668

## 4 Eigene Untersuchungen - Ergebnisse

Innerhalb der SIRS-Gruppe konnten keine signifikanten Unterschiede im prozentualen Anteil aktivierter Thrombozyten und TLA in Abhängigkeit von Überleben und Nichtüberleben berechnet werden. Es bestand jedoch bei den Nichtüberlebenden ein Trend zu einer höheren Anzahl aktivierter Thrombozyten sowie TLA (Abbildung 30, Tabelle 36).

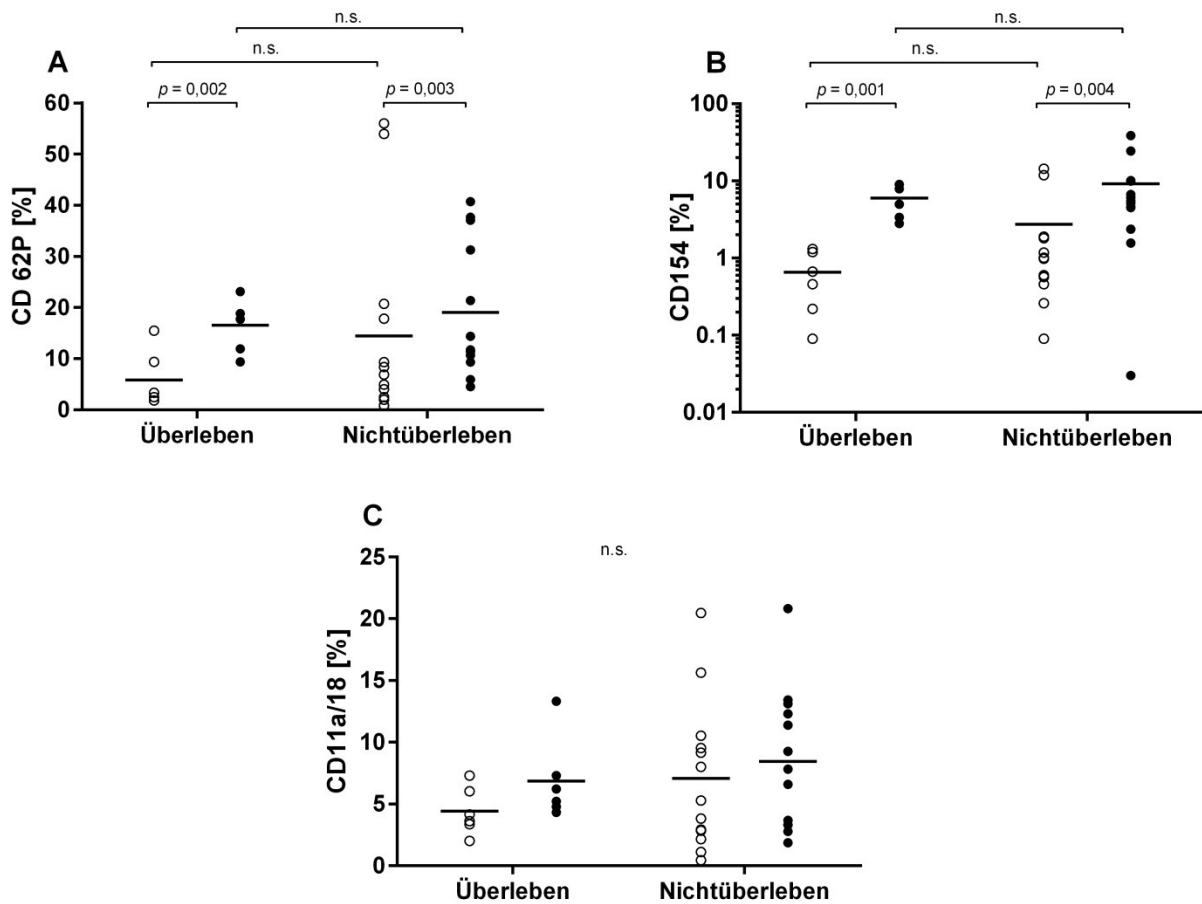


Abbildung 30: Thrombozytenfunktion bei Equiden mit systemischer Entzündung (SIRS): Prozentualer Anteil CD62P- (A), CD154- (B) und CD11a/18-(C) positiver Thrombozyten der Individuen in der SIRS-Gruppe am Accuri® C6 vor (ungefüllte Kreise) und nach (gefüllte Kreise) Aktivierung mit Kollagen in Abhängigkeit von Überleben (n = 6) und Nichtüberleben (n = 13); (Balken=Mittelwert)

#### 4 Eigene Untersuchungen - Ergebnisse

Tabelle 36: Thrombozytenfunktion bei Equiden mit systemischer Entzündung (SIRS): CD62P-, CD154-, CD11a/18- und Thiazol-positive Thrombozyten am Accuri® C6 in Abhängigkeit von Überleben und Nichtüberleben der SIRS-Probanden bei Messungen vor und nach Aktivierung mit Kollagen

	CD62P [%]		CD154 [%]		CD11a/18 [%]		Thiazol [%]
	nativ	Kollagen	nativ	Kollagen	nativ	Kollagen	
<b>Nichtüberleben (n = 13)</b>							
Minimum	0,75	4,54	0,09	0,03	0,45	1,87	0,42
25% Perzentil	2,21	9,99	0,52	3,45	2,50	3,2	1,53
Median	6,89	11,71	0,98	5,53	5,29	7,83	4,59
75% Perzentil	19,27	34,18	1,86	10,07	10,04	12,72	13,99
Maximum	56,05	40,72	14,35	38,76	20,46	20,83	96,28
<b>Überleben (n = 6)</b>							
Minimum	1,81	9,38	0,09	2,8	2,02	4,33	0,52
25% Perzentil	2,29	11,28	0,19	3,24	3,03	4,68	1,88
Median	2,89	18,17	0,57	6,44	3,89	5,71	3,57
75% Perzentil	10,89	19,89	1,23	8,18	6,36	8,81	5,48
Maximum	15,46	23,13	1,31	9,03	7,31	13,33	8,97
<b>p-Wert</b>	0,784	>0,9	0,495	>0,9	0,597	>0,9	0,638

### 4.3.5 Korrelationsanalysen

#### 4.3.5.1 ADVIA® 2120 und Multiplate® Analyzer

In der klinisch unauffälligen Kontrollgruppe konnten sowohl für die Untersuchungen aus K<sub>3</sub>-EDTA-Blut als auch aus Zitratblut vereinzelt signifikante Korrelationen mit niedrigen Korrelationskoeffizienten von maximal  $\pm 0,5$  berechnet werden (Anhang Tabelle 12-19, S. 12-33).

Innerhalb der SIRS-Gruppe konnten ausschließlich aus K<sub>3</sub>-EDTA-Blut bei der Thrombozytenzahl, den LargePLT und den Clumps und einzelnen Aggregationsvariablen signifikante Korrelationskoeffizienten zwischen  $r = 0,211$  und  $r = 0,520$  berechnet werden (Anhang Tabelle 12-20, S. 12-34). In den entsprechenden Untersuchungen aus Zitratblut waren die Zusammenhänge am Beispiel des in Abbildung 31 dargestellten ADPtests und der Thrombozytenzahl nicht zu berechnen.

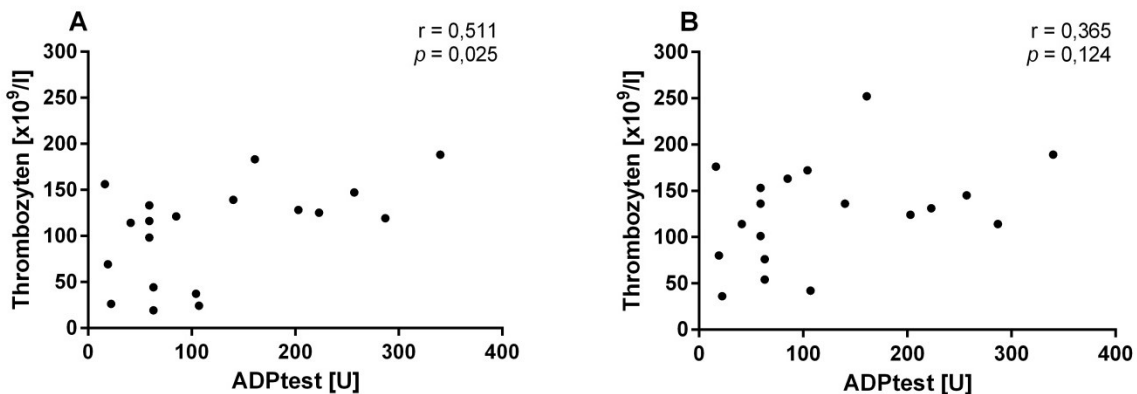


Abbildung 31: Thrombozytenfunktion bei Equiden mit systemischer Entzündung (SIRS): Korrelationsanalysen zwischen Thrombozytenzahl aus K<sub>3</sub>-EDTA-Blut (A) und Zitratblut (B) am ADVIA® 2120 und ADPtest am Multiplate® Analyzer bei 20 SIRS-Patienten

#### 4.3.5.2 ADVIA® 2120 und Accuri® C6

In der Kontrollgruppe konnten keine signifikanten Korrelationen berechnet werden. Die Korrelationsanalysen in der SIRS-Gruppe ergaben wenige signifikante negative Korrelationen von Aktivierungsmarkern und Thrombozytenvariablen gemessen mit dem ADVIA® 2120 (Anhang Tabelle 12-21, S. 12-35). Der stärkste negative Zusammenhang ergab sich für die

## 4 Eigene Untersuchungen - Ergebnisse

Thrombozytenzahl und den Thrombokrit aus Zitratblut bei nativen CD154-positiven Zellen (Abbildung 32).

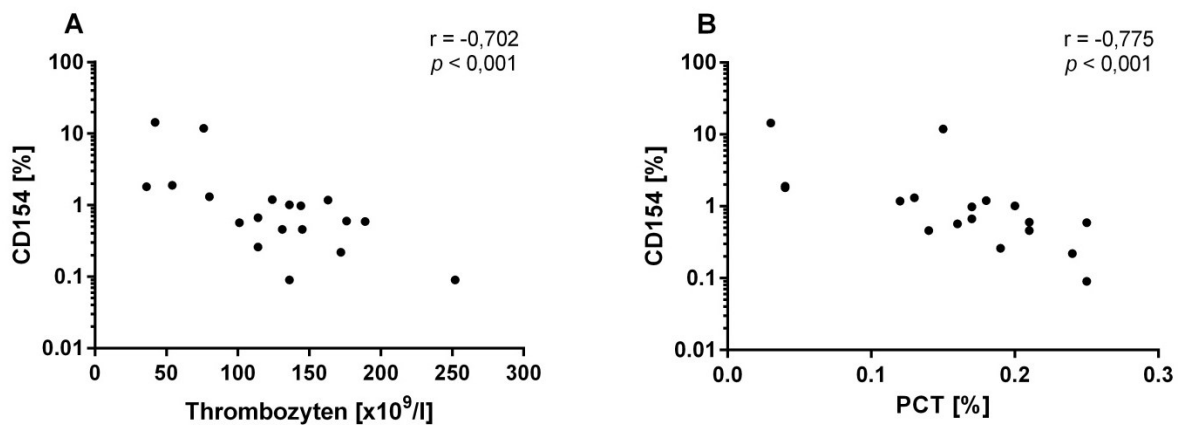


Abbildung 32: Thrombozytenfunktion bei Equiden mit systemischer Entzündung (SIRS): Korrelationsanalyse zwischen Thrombozytenzahl (A) und Thrombokrit (PCT, B) aus Zitratblut am ADVIA® 2120 und prozentualen Anteil CD154-positiver Thrombozyten nativer Proben am Accuri® C6 bei 19 SIRS-Patienten

### 4.3.5.3 Accuri®C6 und Multiplate® Analyzer

In der SIRS-Gruppe konnten lediglich beim Vergleich des COLtest und der CD11a/18-positiven Zellen signifikante Korrelationskoeffizienten berechnet werden (Abbildung 33, Anhang Tabelle 12-22, S. 12-36). In der Kontrollgruppe des Accuri® C6 wurden keine Messungen mit dem Multiplate® Analyzer durchgeführt und folglich keine Korrelationsanalysen berechnet.

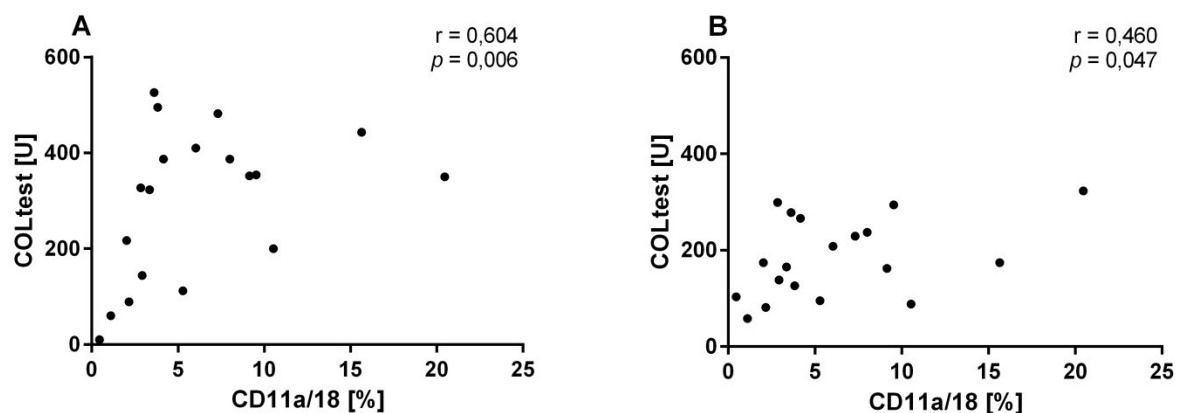


Abbildung 33: Thrombozytenfunktion bei Equiden mit systemischer Entzündung (SIRS): Korrelationsanalyse zwischen COLtest mit (A) und ohne (B) magnetischen Rührstab während der Inkubation am Multiplate® Analyzer und prozentualen Anteil CD11a/18-positiver Thrombozyten nativer Proben am Accuri® bei 19 SIRS-Patienten

#### 4.4 Hemmung der Thrombozytenfunktion bei Pferden

##### 4.4.1 Acetylsalicylsäure

Keines der 10 Pferde zeigte während der Medikation unerwünschte Arzneimittelwirkungen. Vereinzelt konnten statistisch signifikante, jedoch klinisch nicht relevante Abweichungen in den hämatologischen und klinisch chemischen Laborvariablen sowie denen der plasmatischen Gerinnung berechnet werden (Anhang Tabelle 12-23, S. 12-37).

Mittels ANOVA konnte für die Serumkonzentration der Salicylsäure ein signifikanter Einfluss der Zeit berechnet werden ( $p < 0,0001$ ). Der post-hoc Dunnett-Test ergab signifikante ( $p < 0,01$ ) Erhöhungen der Konzentration zum Zeitpunkt T6 ( $5,56 \pm 1,46 \mu\text{g/ml}$ ) und T12 ( $3,67 \pm 1,26 \mu\text{g/ml}$ ) im Vergleich zu den Messwerten vor Beginn der Medikation ( $0,34 \pm 0,12 \mu\text{g/ml}$ ) (Abbildung 34). Die Tabelle 12-24 im Anhang zeigt eine Übersicht der Einzelmessungen (S. 12-39).

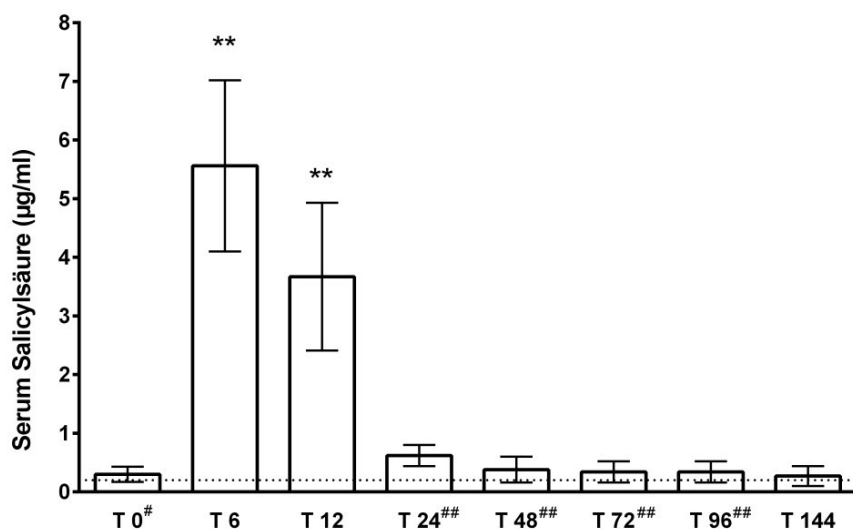


Abbildung 34: Hemmung der Thrombozytenfunktion bei Pferden: Serumkonzentration der Salicylsäure (HPLC-MS) bei Medikation mit Acetylsalicylsäure (<sup>#</sup>4,7-5,0 mg/kg, <sup>##</sup>1,0-1,3 mg/kg) bei 10 Pferden (MW  $\pm$  SD; \*\*  $p < 0,01$  zu T0); gepunktete Linie = Nachweisgrenze

Signifikante Korrelationen zwischen der Serumkonzentration und den mit dem Multiplate<sup>®</sup> Analyzer ermittelten Variablen konnten hierbei nicht berechnet werden: ADPtest (T6:  $r = -0,480$ ,  $p = 0,160$ ; T12:  $r = 0,395$ ,  $p = 0,258$ ), COLtest (T6:  $r = -0,466$ ,  $p = 0,175$ ; T12:  $r = -0,197$ ,  $p = 0,586$ ) und ASPItest (Abbildung 35).

#### 4 Eigene Untersuchungen - Ergebnisse

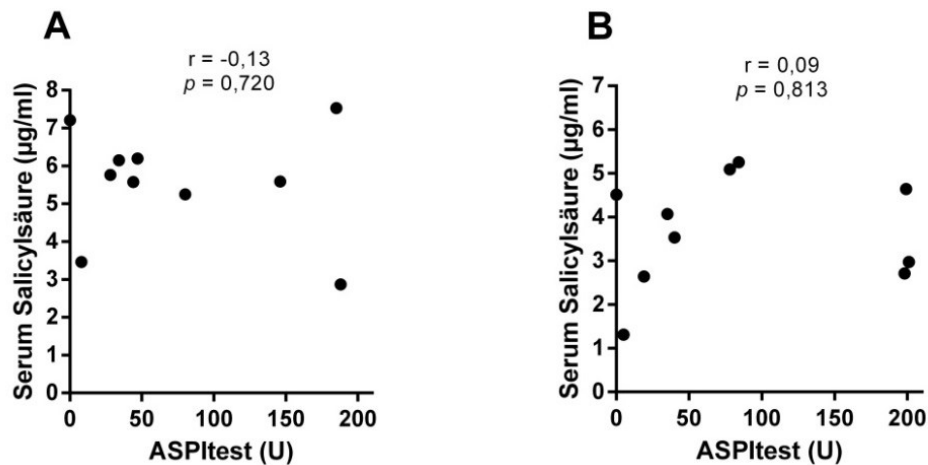


Abbildung 35: Hemmung der Thrombozytenfunktion bei Pferden: Korrelationen der Serumkonzentration der Salicylsäure ( $\mu\text{g/ml}$ ) und der mittels Multiplate<sup>®</sup> Analyzer gemessenen AS-induzierten TZF (ASPItest) bei T6 (A) und T12 (B)

Die ANOVA für den ASPItest ergab einen signifikanten Einfluss der Zeit auf die Messwerte ( $p < 0,001$ ). Lediglich zu den Zeitpunkten T24 ( $p < 0,05$ ), T48 ( $p < 0,05$ ) und T96 ( $p < 0,01$ ) konnte hierbei eine signifikante Hemmung der Thrombozytenfunktion berechnet werden. Für die mittels ADPtest und COLtest gemessene Thrombozytenfunktion konnte keine Abhängigkeit von der Zeit berechnet werden (Tabelle 37). Die Tabelle 12-25 im Anhang zeigt eine Übersicht der Einzelmessungen der 10 Probanden (S. 12-40).

Tabelle 37: Hemmung der Thrombozytenfunktion bei Pferden: Aggregationswerte am Multiplate<sup>®</sup> Analyzer zu verschiedenen Messzeitpunkten (T, in Stunden) nach Medikation mit Acetylsalicylsäure (<sup>#</sup>4,7-5,0 mg/kg, <sup>##</sup>1,0-1,3 mg/kg) bei 10 Pferden; absolute Messwerte (MW  $\pm$  SD in Units=U), prozentuale Abweichung vom Ausgangswert (T0); \*\*  $p < 0,01$ ; \*  $p < 0,05$

Test	Einheit	T0 <sup>#</sup>	T6	T12	T24 <sup>##</sup>	T48 <sup>##</sup>	T72 <sup>##</sup>	T96 <sup>##</sup>	T144	T192	T240
ASPItest	U	107 $\pm$ 45	76 $\pm$ 71	86 $\pm$ 83	<b>66*</b> $\pm$ 62	<b>68*</b> $\pm$ 58	78 $\pm$ 56	<b>56**</b> $\pm$ 48	109 $\pm$ 58	101 $\pm$ 59	90 $\pm$ 44
	%	100	59 $\pm$ 40	69 $\pm$ 55	<b>54*</b> $\pm$ 35	<b>57*</b> $\pm$ 29	73 $\pm$ 35	<b>51**</b> $\pm$ 30	107 $\pm$ 45	97 $\pm$ 65	84 $\pm$ 12
COLtest	U	344 $\pm$ 74	302 $\pm$ 70	322 $\pm$ 71	310 $\pm$ 67	316 $\pm$ 70	310 $\pm$ 76	317 $\pm$ 64	348 $\pm$ 66	318 $\pm$ 47	329 $\pm$ 47
	%	100	89 $\pm$ 10	93 $\pm$ 15	96 $\pm$ 23	91 $\pm$ 16	95 $\pm$ 23	94 $\pm$ 21	102 $\pm$ 28	98 $\pm$ 24	96 $\pm$ 13
ADPtest	U	193 $\pm$ 64	186 $\pm$ 72	195 $\pm$ 71	169 $\pm$ 53	186 $\pm$ 64	167 $\pm$ 48	165 $\pm$ 50	174 $\pm$ 39	164 $\pm$ 49	149 $\pm$ 34
	%	100	99 $\pm$ 31	102 $\pm$ 23	90 $\pm$ 23	97 $\pm$ 15	88 $\pm$ 13	88 $\pm$ 16	94 $\pm$ 17	95 $\pm$ 29	84 $\pm$ 14

## 4 Eigene Untersuchungen - Ergebnisse

### 4.4.2 Clopidogrel

Keines der 10 Pferde zeigte während der Medikation unerwünschte Arzneimittelwirkungen. Vereinzelt konnten statistisch signifikante, jedoch klinisch nicht relevante Abweichungen in den hämatologischen und klinisch chemischen Laborvariablen sowie denen der plasmatischen Gerinnung berechnet werden (Anhang Tabelle 12-26, S. 12-41).

Die ANOVA für den ADPtest, ADPtestHS und ASPItest ergab einen signifikanten ( $p < 0,0001$ ) Einfluss der Zeit auf die Messwerte. Die TZF war 6 Stunden nach Beginn der Medikation und während der Gabe der Erhaltungsdosis über weitere 4 Tage signifikant gehemmt. Nach Absetzen der Medikation blieb die TZF, gemessen mit dem ADPtest und dem ADPtestHS für weitere 4 Tage bis T192 signifikant vermindert. Sechs Tage nach der letzten Medikation (T240) waren die Ausgangswerte wieder erreicht. Gemessen mit dem ASPItest blieb die TZF bis einschließlich der letzten Messung signifikant vermindert. Für den COLtest konnten keine signifikanten Messwertänderungen in Abhängigkeit von der Zeit berechnet werden (Tabelle 38). Die Tabelle 12-27 im Anhang zeigt eine Übersicht der Einzelmessungen der 10 Probanden (S. 12-43).

Tabelle 38: Hemmung der Thrombozytenfunktion bei Pferden: Aggregationswerte am Multiplate® Analyzer zu verschiedenen Messzeitpunkten (T, in Stunden) nach Medikation mit Clopidogrel (<sup>#</sup>6,0-6,5 mg/kg, <sup>##</sup>1,2-1,4 mg/kg) bei 10 Pferden; absolute Messwerte (MW ± SD in Units=U) sowie prozentuale Abweichung vom Ausgangswert (T0); \*\*  $p < 0,01$ , \*  $p < 0,05$

Test	Einheit	T0 <sup>#</sup>	T6	T12	T24 <sup>##</sup>	T48 <sup>##</sup>	T72 <sup>##</sup>	T96 <sup>##</sup>	T144	T192	T240
ADPtest	U	181 ± 39	<b>118**</b> ± 48	<b>131**</b> ± 51	<b>117**</b> ± 41	<b>102**</b> ± 49	<b>97**</b> ± 44	<b>103**</b> ± 57	<b>115**</b> ± 56	<b>128**</b> ± 62	166 ± 81
	%	100	<b>65**</b> ± 20	<b>72**</b> ± 23	<b>72**</b> ± 23	<b>54**</b> ± 21	<b>51**</b> ± 16	<b>55**</b> ± 24	<b>61**</b> ± 24	<b>69**</b> ± 29	91 ± 40
ADPtestHS	U	133 ± 40	<b>88**</b> ± 43	<b>93**</b> ± 45	<b>74**</b> ± 27	<b>71**</b> ± 41	<b>70**</b> ± 40	<b>74**</b> ± 49	<b>87**</b> ± 55	<b>99**</b> ± 54	132 ± 54
	%	100	<b>64**</b> ± 20	<b>68**</b> ± 24	<b>68**</b> ± 24	<b>50**</b> ± 19	<b>50**</b> ± 21	<b>51**</b> ± 21	<b>61**</b> ± 26	<b>71**</b> ± 27	99 ± 36
ASPItest	U	129 ± 39	<b>58**</b> ± 33	<b>47**</b> ± 29	<b>39**</b> ± 20	<b>48**</b> ± 26	<b>48**</b> ± 24	<b>43**</b> ± 21	<b>66**</b> ± 42	<b>88*</b> ± 47	<b>93*</b> ± 66
	%	100	<b>45**</b> ± 25	<b>40**</b> ± 27	<b>40**</b> ± 27	<b>39**</b> ± 20	<b>37**</b> ± 13	<b>37**</b> ± 27	<b>58**</b> ± 42	<b>75*</b> ± 53	<b>77*</b> ± 54
COLtest	U	311 ± 66	297 ± 77	324 ± 61	309 ± 67	335 ± 41	346 ± 44	326 ± 56	306 ± 75	305 ± 54	340 ± 57
	%	100	96 ± 18	110 ± 38	110 ± 38	112 ± 28	117 ± 34	109 ± 32	101 ± 26	100 ± 19	112 ± 22

### 5 DISKUSSION

Die Diskussion der Ergebnisse gliedert sich in die Abschnitte:

- 5.1 Labordiagnostische Untersuchungen zur Thrombozytenbiologie bei klinisch unauffälligen Equiden
- 5.2 Thrombozytopenie und Thrombozytose bei Klinikpatienten (2008-2015)
- 5.3 Thrombozytenfunktion bei Equiden mit systemischer Entzündung (SIRS)
- 5.4 Hemmung der Thrombozytenfunktion bei Pferden

#### 5.1 Labordiagnostische Untersuchungen zur Thrombozytenbiologie von Equiden

Die Diskussion der Ergebnisse der labordiagnostischen Untersuchungen bei klinisch unauffälligen erwachsenen Equiden gliedert sich in die Abschnitte:

- 5.1.1 Thrombozytenzahl und Thrombozytenvariablen mittels Laser-Durchflusszytometrie mit dem ADVIA® 2120
- 5.1.2 Thrombozytenfunktion mittels Impedanzaggregometrie aus Vollblut mit dem Multiplate® Analyzer
- 5.1.3 Thrombozytenfunktion mittels Fluoreszenz-Durchflusszytometrie mit dem Accuri® C6
- 5.1.4 Messung von aus der Zellmembran der Thrombozyten gelösten Proteinen im Serum und Plasma mittels kommerzieller humaner ELISA

### 5.1.1 Laser-Durchflusszytometrie (ADVIA® 2120)

#### 5.1.1.1 Einfluss von Antikoagulantien auf Thrombozytenvariablen

Routinemäßig wird für hämatologische Untersuchungen K<sub>3</sub>-EDTA als Antikoagulans verwendet. EDTA kann jedoch in vitro eine Aggregation der Thrombozyten, resultierend in einer EDTA-induzierte Pseudothrombozytopenie, verursachen (s. 2.2.1.3, S. 18). In diesem Fall können Zitrat oder Mg-Sulfat als Antikoagulans verwendet werden. Vergleichende Untersuchungen mit dem ADVIA® 2120 liegen insbesondere für das Mg-Sulfat nach Kenntnis der Autorin für Equiden nicht vor und waren somit Gegenstand der eigenen Untersuchung.

Die ADVIA® 120/2120 spezifische Methodik der zweidimensionalen Thrombozytenanalyse (2D-THROMBO-Methode) identifiziert die Thrombozyten im verstärkten Streulicht (THROMBO-Streulicht-Zytogramm, Abbildung 36) zum einen anhand ihrer Größe (1-30 fl), zum anderen anhand ihres Brechungsindex (1,35-1,40). Mikrozyten und Erythrozytenfragmente sowie Erythrozyten-Ghosts (leere Erythrozytenmembranen ohne Hämoglobin) mit vergleichbarer Größe haben einen höheren bzw. niedrigeren Brechungsindex und können dadurch von den Thrombozyten unterschieden werden.

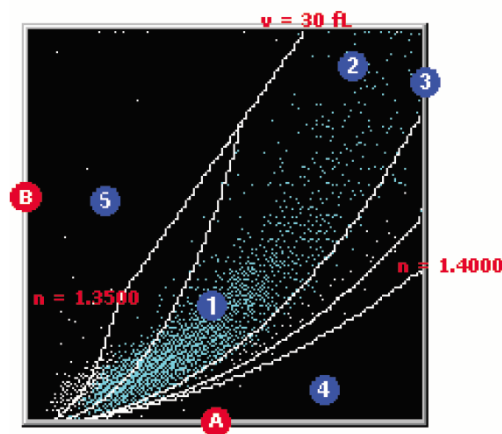


Abbildung 36: ADVIA® 2120 - Diskussion: THROMBO-Streulicht-Zytogramm: Brechungsindex (1,35-1,40, A), Volumen (1-30 fl, B), Thrombozyten (1), große Thrombozyten (2), Erythrozyten (3), Ery-Fragmente (4), Ery-Ghosts (5); Quelle: Operator's Guide ADVIA® 2120/2120i, Siemens Healthcare

Große Thrombozyten (30-60 fl) werden im unverstärkten Streulicht (ERY-Streulicht-Zytogramm, Abbildung 37) anhand ihres niedrigeren Brechungsindex von Erythrozyten differenziert. Die ausgegebene Thrombozytenzahl entspricht der Summe der im verstärkten und unverstärkten Streulicht ermittelten Thrombozyten [261].

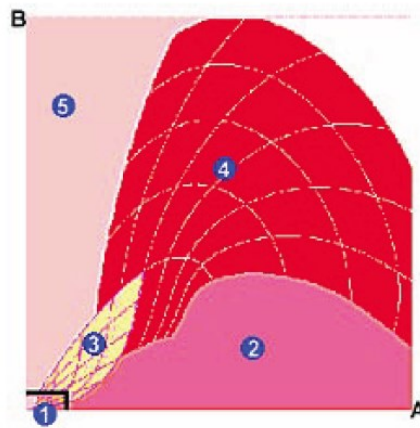


Abbildung 37: ADVIA® 2120 - Diskussion: ERY-Streulicht-Zytogramm: A = Brechungsindex, B = Volumen, 1 = Thrombozyten, 2 = Ery-Fragmente, 3 = große Thrombozyten, 4 = Erythrozyten, 5 = Ery-Ghosts (Quelle: Operator's Guide ADVIA® 2120/2120i, Siemens Healthcare)

Diese Berechnungen auf Grundlage der Mie-Theorie zur Streuung sind jedoch nur für kugelige Strukturen zuverlässig [107]. Das ERY/THROMBO-Reagenz des ADVIA® 120/2120, bestehend aus Natriumdodecylsulfat und Glutaraldehyd, verursacht eine isovolumetrische Aufkugelung der Erythrozyten [262], wohingegen die Form der humanen Thrombozyten nahezu unbeeinflusst bleibt [107]. Bereits in den 1980iger Jahren wurde jedoch elektronenmikroskopisch gezeigt, dass EDTA an humanen Thrombozyten innerhalb von 20 bis 30 Minuten eine Veränderung der Form von diskoid zu sphärisch verursacht [263]. Dieser Effekt wird im ADVIA® 120/2120 zur Differenzierung der Thrombozyten und der Ermittlung der Thrombozytenindizes genutzt. Antikoagulantien wie ACD (acid/citrate/dextrose) [107] oder Zitrat [264,265] hingegen verursachen keine Aufkugelung der humanen Zellen. Durch das Aufkugeln durch EDTA nehmen nahezu alle Thrombozyten eine ähnliche Form und Größe ein. Dieser Unterschied zeigt sich im Zytogramm des in der Patentschrift als "PLT1" benannten ADVIA® 120/2120 bei humanen Blutproben in einer etwas diffuseren Verteilung der Thrombozyten im mit ACD antikoagulierten Blut (rote Markierung Abbildung 38/A) im Vergleich zu Proben mit dem Antikoagulans K<sub>3</sub>-EDTA (rote Markierung Abbildung 38/B), wobei das fehlende Sphäring die Genauigkeit der Messungen nicht beeinflussen soll: "*These results demonstrate, that the red blood cell diluent does not sphere platelets; indeed, platelet sphering is not required for the accuracy of results of the intervention.*" [107].

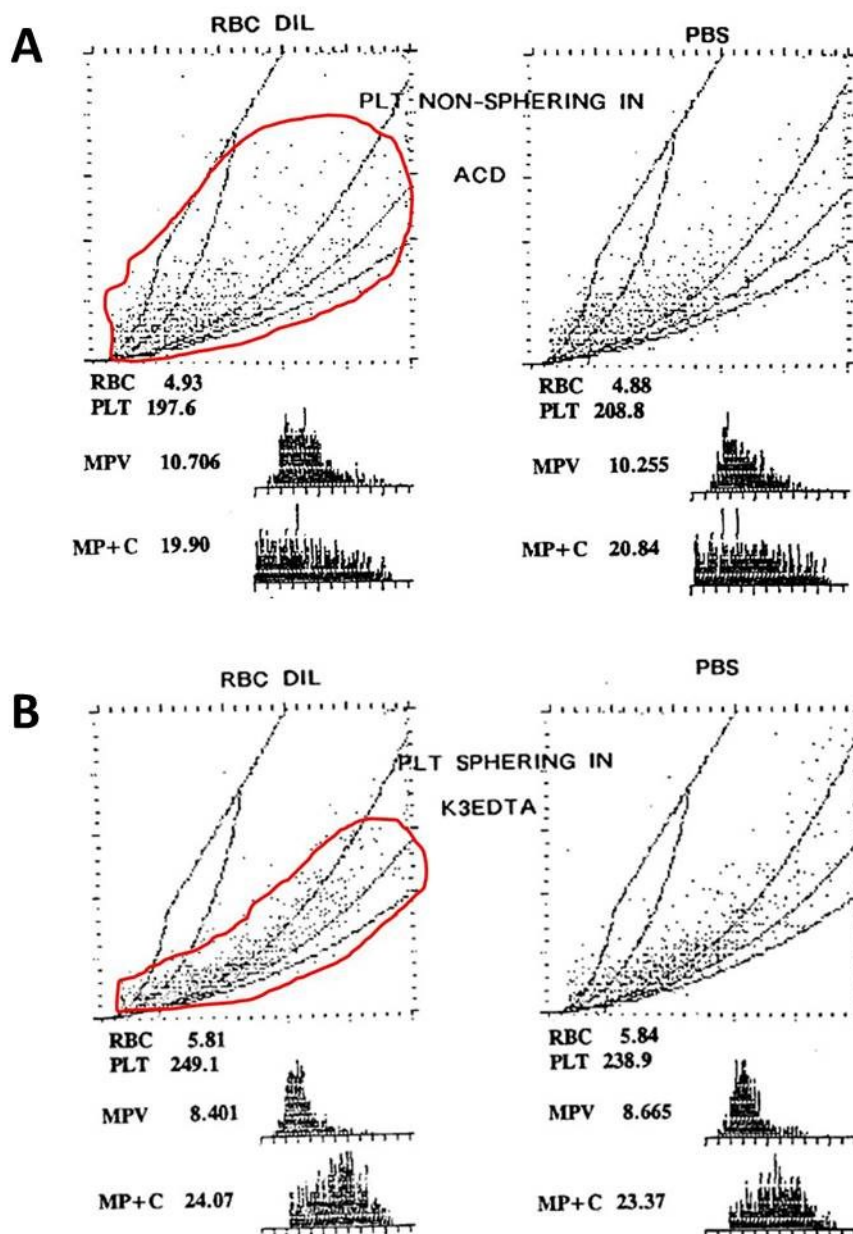


Abbildung 38: ADVIA® 2120 - Diskussion: diffuses Zytogramm (rote Markierung) durch fehlende Aufkugelung der Thrombozyten durch das Antikoagulans ACD (A); dicht beieinander liegende Verteilung der durch K<sub>3</sub>-EDTA aufgekugelten Thrombozyten (rote Markierung, B); Quelle: [107]

Der EDTA-induzierte aufkugelnde Effekt auf die Thrombozyten wird für das Pferd ebenfalls postuliert, ein Nachweis ist jedoch in der internationalen Literatur nicht beschrieben. Wird Zitrat [3] oder ACD [14] als Antikoagulans verwendet, bleiben die equinen Thrombozyten, elektronenmikroskopisch nachgewiesen, in ihrer scheibenartigen Form.

Betrachtet man die in der eigenen Untersuchung erzeugten Thrombozyten-Zytogramme des ADVIA® 2120, so scheint der aufkugelnde Effekt des K<sub>3</sub>-EDTA im Equidenblut nahezu vollständig zu fehlen (Abbildung 39). Bei den Messungen aus K<sub>3</sub>-EDTA (Abbildung 39/A) zeigt

## 5 Diskussion

sich eine gleichartig diffuse Verteilung der Thrombozyten im Zytogramm wie bei den Messungen aus Zitrat (Abbildung 39/B). Hierbei ist kein Unterschied feststellbar, ob aus K<sub>3</sub>-EDTA eine höhere Thrombozytenzahl (Proband 1), eine gleichhohe Thrombozytenzahl (Proband 2) oder eine niedrigere Thrombozytenzahl (Proband 3) im Vergleich zum Zitratblut (korrigiert um Verdünnungsfaktor 1,1) gemessen wurde.

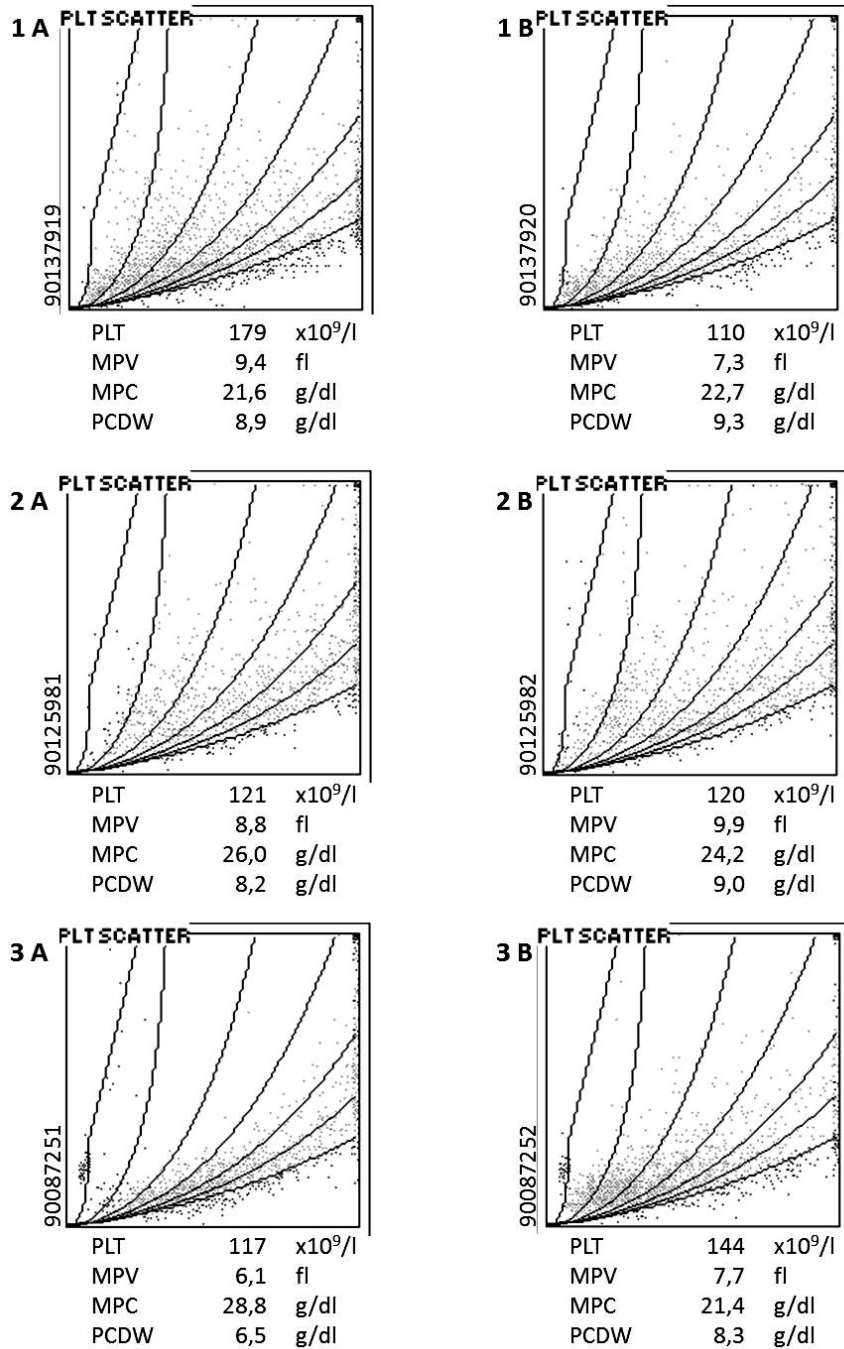


Abbildung 39: ADVIA® 2120 - Diskussion: Thrombozytogramme von 3 Equiden mit dazugehörigen Thrombozytenvariablen jeweils gemessen aus K<sub>3</sub>-EDTA- (A) und Zitrat- Blutproben (B, korrigiert um Verdünnungsfaktor 1,1)

## 5 Diskussion

---

Das vermutlich mangelhafte Aufkugeln der equinen Thrombozyten durch  $K_3$ -EDTA spiegelt sich zudem in der Variable PCDW, der Standardabweichung des Brechungsindex aller gemessenen Zellen, wider. Passiert eine scheibenförmige Zelle den Laserstrahl, wird die Lichtbrechung erheblich durch die Ausrichtung der Scheibe im Strahl beeinflusst, wodurch die Streuung der Messwerte steigt und folglich die Standardabweichung einen hohen Wert ergibt. Dieser Effekt verschwindet, wenn ausschließlich kugelige Elemente mit nahezu identischem Brechungsindex den Laserstrahl passieren (Abbildung 40).

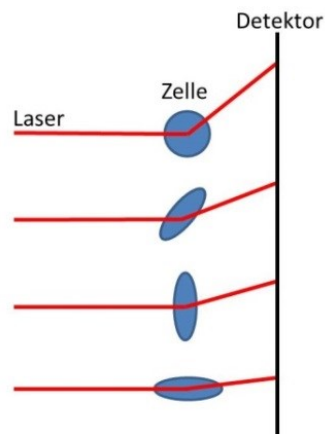


Abbildung 40: ADVIA® 2120 - Diskussion: Schematische Darstellung des Einflusses der Zellform und -positionierung im Raum auf die Brechung des Laserstrahls

So konnte in humanen Blutproben konsistent eine höhere PCDW im Zitrat ermittelt werden [108,109]. Ein adäquates Sphäring ist gekennzeichnet durch eine  $PCDW \leq 5,5 \text{ g/dl}$  [266]. In der eigenen Untersuchung ergaben sich im  $K_3$ -EDTA Mittelwerte von  $8,5 \pm 0,7 \text{ g/dl}$  bei den Kleinpferden und  $8,4 \pm 0,8 \text{ g/dl}$  bei den Warmblütern. Im Zitratblut ist die mittlere PCDW mit  $8,8 \pm 0,4 \text{ g/dl}$  bei den Kleinpferden und  $8,7 \pm 0,5 \text{ g/dl}$  bei den Warmblütern, wengleich statistisch signifikant, nur unwesentlich größer. Für den Hund ist ebenfalls ein reduziertes Aufkugeln der Thrombozyten durch  $K_3$ -EDTA beschrieben, hierbei wurde eine mediane PCDW von  $6,1 \text{ g/dl}$  (Spannweite  $3,6\text{-}8,2 \text{ g/dl}$ ) im  $K_3$ -EDTA und  $8,0 \text{ g/dl}$  (Spannweite  $6,8\text{-}8,7 \text{ g/dl}$ ) im Zitrat ermittelt [267]. Gleichwohl konnten deutliche individuelle Unterschiede festgestellt werden: Bei 19 der 50 untersuchten Hunde lag die PCDW unter  $5,5 \text{ g/dl}$ , die dazugehörigen Zytogramme wiesen eine deutliche Bündelung, vergleichbar mit der Darstellung in Abbildung 38 (S. 112), als Kennzeichen eines Sphäring auf. In der eigenen Untersuchung wurde bei keinem Probanden eine  $PCDW \leq 5,5 \text{ g/dl}$  gemessen, das Minimum lag bei den Kleinpferden bei  $6,4 \text{ g/dl}$ , bei den Warmblütern bei  $6,2 \text{ g/dl}$ . Eine Kontrolle der

Präzision der Messungen der PCDW erfolgte im Rahmen dieser Arbeit nicht. Es konnte jedoch in vorangegangenen Untersuchungen im gleichen Labor eine gute Präzision der PCDW mit einem niedrigen Variationskoeffizienten von 2,7 % bei der Messung equiner Blutproben mit dem ADVIA® 120 gezeigt werden [66,67].

In der eigenen Untersuchung sowie in weiteren Studien bei Pferd [86], Mensch [108] und Hund [267] lag die mittlere Thrombozytenzahl in mit Zitrat antikoagulierten Blutproben gemessen mit dem ADVIA® 120/2120 jeweils 5-8 % unter der aus K<sub>3</sub>-EDTA-Blutproben.

In den Untersuchungen der Hundebloodproben wurde von Stokol und Erb eine vermehrte Aggregation in Folge einer Aktivierung der Thrombozyten im Zitrat als Ursache diskutiert: Bei 70 % der Zitrat-Proben waren in einer mikroskopischen Untersuchung von Blutaussstrichen Aggregate vorhanden, in den K<sub>3</sub>-EDTA-Proben lag diese Zahl signifikant niedriger bei 28 %. Allerdings handelte es sich bei den Probanden nicht um klinisch unauffällige Hunde, sondern um Tiere mit verschiedenen neoplastischen Erkrankungen [267]. Eine vermehrte Aggregation im Zitrat-Blut als Ursache der niedrigeren Zellzahl beim Pferd wurde von Prins et al. ebenfalls vermutet, Untersuchungen von Blutaussstrichen erfolgten jedoch nicht [86]. In der Studie humaner Proben von Macey et al. [108] finden sich keine Erklärungsansätze zur niedrigeren Thrombozytenzahl im Zitratblut. Bereits in der Patentschrift [107] zur Thrombozytendiagnostik mit dem ADVIA® 120 lag mit  $249,1 \times 10^9/l$  und  $197,6 \times 10^9/l$  ein nicht weiter diskutierter sehr deutlicher Unterschied in der Zellzahl zwischen K<sub>3</sub>-EDTA- und ACD-antikoagulierten humanen Blutproben vor (Abbildung 38, S. 112).

Das Vorliegen von Aggregaten wurde in der eigenen Untersuchung mikroskopisch nicht überprüft, somit kann dies als Ursache der niedrigeren mittleren Thrombozytenzahl im Zitrat-Blut nicht ausgeschlossen werden. Bei der automatischen Zählung von Thrombozytenaggregaten (Clumps) mit dem ADVIA® 2120 konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Antikoagulantien berechnet werden. Die Validität dieser Daten erscheint jedoch fraglich: In der Untersuchung der Hundeproben zeigte sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied der automatischen Zählung der Clumps, wenngleich bei der mikroskopischen Beurteilung der Blutaussstriche in den Zitrat-Proben signifikant mehr Aggregate gezählt werden konnten [267].

## 5 Diskussion

Aufgrund des fehlenden bis mangelhaften Sphärings sowohl im Zitrat- als auch im K<sub>3</sub>-EDTA-Blut der eigenen equinen Proben ist es jedoch denkbar, dass bedingt durch die stärker streuenden Messungen des Volumens und des Brechungsindex nicht alle Thrombozyten in die durch den ADVIA® 2120 vorgegebenen Raster (Abbildung 36/1, S. 110 und Abbildung 37/1, S. 111) fallen und somit nicht korrekt erfasst wurden. Jedoch wurden die Thrombozyten im Zitrat-Blut nicht fälschlich als Erythrozyten-Fragmente oder -Ghosts gezählt, beide Variablen zeigten im Mittel insgesamt sehr kleine, im K<sub>3</sub>-EDTA-Blut jedoch signifikant höhere Anzahlen (Abbildung 41).

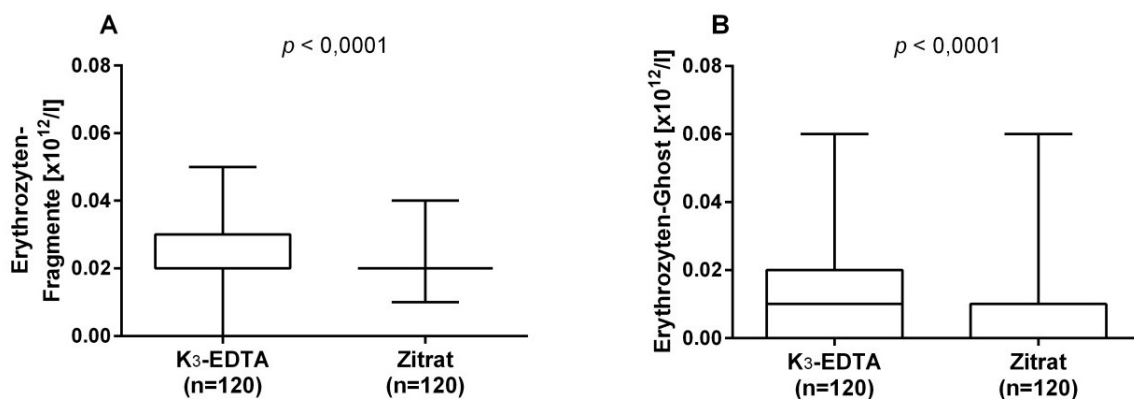


Abbildung 41: ADVIA® 2120 - Diskussion: Anzahl der Erythrozytenfragmente (A) und Erythrozyten-Ghosts (B) im K<sub>3</sub>-EDTA- bzw. Zitrat-Blut, Zitratwerte korrigiert um Verdünnungsfaktor 1,1 (U-Test, GraphPad Prism 6); (Median, 25/75%, min-max)

Darüber hinaus könnte die Zeitspanne zwischen Blutentnahme und Messung in der eigenen Untersuchung einen addierenden Einfluss haben: Beim Pferd erhöht sich die mittlere Thrombozytenzahl im K<sub>3</sub>-EDTA innerhalb der ersten 4 Stunden nicht signifikant um ca. 8 %, im Zitrat verringert sich die Zahl nicht signifikant um ca. 10 % [86]. Ähnliche Tendenzen wurden auch für humane Proben beschrieben [108,109]. Bei noch längeren Lagerungszeiten verringern sich die Zellzahlen im Zitratblut erheblich: Nach 24 Stunden ist die Zahl bei equinen Proben signifikant um ca. 25 % verringert [86]. So erscheint eine Thrombozytenzählung aus Zitrat-Blut nur innerhalb weniger Stunden nach der Blutentnahme zuverlässig zu sein, zudem müssten vermutlich eigene Referenzintervalle erstellt werden [86,267].

Bei der Verwendung von Mg-Sulfat als Antikoagulans lag die mittlere Thrombozytenzahl in der eigenen Studie ebenfalls unter der aus K<sub>3</sub>-EDTA-Blut. Gleiches wird auch beim Menschen beschrieben [85]. Die Autoren erklärten die Beobachtung dadurch, dass das vom

verwendeten Impedanz-Gerät (Coulter LH 750 system, Beckman Coulter) gemessene mittlere Thrombozytenvolumen (MPV) im EDTA-Blut größer ist als im Mg-Sulfat-Blut und hierdurch die kleineren Thrombozyten nicht als solche erkannt und gezählt würden. Diese Theorie lässt sich auf die eigenen Daten nicht übertragen, hier war der MPV im Mg-Sulfat-Blut im Mittel größer als im K<sub>3</sub>-EDTA-Blut. Die Unterschiede im Zellvolumen sind höchstwahrscheinlich auf die grundlegend unterschiedliche Messtechnik (Impedanz versus Optisch) zurückzuführen. Der MPV zeigt bei Mensch und Pferd, gemessen mit Geräten mit unterschiedlicher Messtechnik, insgesamt eine sehr mäßige Korrelation, so dass die Ergebnisse aus Studien mit nicht identischer Messtechnik nicht vergleichbar sind [75,111,112]. Ein Einfluss von Mg-Sulfat auf die Form der Thrombozyten ist in der Literatur nicht beschrieben. Betrachtet man jedoch die Ergebnisse der PCDW in den eigenen Untersuchungen, lassen die Werte mit  $9,2 \pm 0,4$  g/dl im Mittel und 6,4 g/dl als kleinstem gemessenen Einzelwert den Schluss zu, dass Mg-Sulfat keinen aufkugelnden Effekt auf die Thrombozyten des Pferdes hat. So könnten bei Verwendung von Mg-Sulfat, wie oben für K<sub>3</sub>-EDTA und Zitrat diskutiert, Thrombozyten ebenfalls teilweise nicht korrekt erfasst werden. Eine vermehrte Aggregation der Thrombozyten durch Mg-Sulfat ist in der Literatur nicht beschrieben, jedoch grundsätzlich nicht auszuschließen und wurde in den eigenen Untersuchungen nicht überprüft. Ebenfalls unklar sind mögliche Lagerungseinflüsse auf die Thrombozytenzahl.

Bis zum Anfang des 21. Jahrhunderts war in der Humanmedizin gemäß der Expertenkommission des *International Council for Standardization in Haematology* die Thrombozytenzählung mittels Phasenkontrastmikroskopie als Goldstandard festgelegt [80]. Mittlerweile wurde als Goldstandard die Zählung mittels immunologischer Fluoreszenz-Durchflusszytometrie definiert. Neben der Zellzählung mittels optoelektrischer Methoden werden die Thrombozyten hierbei zusätzlich durch fluoreszierende Antikörper gegen spezifische Oberflächenproteine der Thrombozyten (CD41/61) markiert und die Zellzahl aus dem Verhältnis fluoreszierender Thrombozyten zur Zahl der Erythrozyten ermittelt [81]. Die Methodik wurde in das CELL-DYN Sapphire der Firma Abbott integriert und steht somit vollautomatisch in der humanen Routinediagnostik zur Verfügung. Das Gerät wurde bezüglich seiner Eignung für die Thrombozytenzählung in der Veterinärmedizin nach Kenntnis der Autorin bislang nicht geprüft, sowie in den in diesem Kapitel zitierten Publikationen nicht angewandt.

## 5 Diskussion

Wenngleich die Thrombozytenzahlen abhängig von den verschiedenen Antikoagulantien im Mittel signifikante Unterschiede aufwiesen, stellt sich die Frage nach der klinischen Bedeutung dieses Ergebnisses. Betrachtet man den Messbereich der einzelnen Antikoagulantien, so wird deutlich, dass eine sehr breite Überschneidung vorliegt (Abbildung 42). Jedoch wird ebenso deutlich, dass die Messwerte beim K<sub>3</sub>-EDTA insbesondere bei den Warmblütern deutlich breiter streuen als in den Zitrat-Proben (Abbildung 42/B).

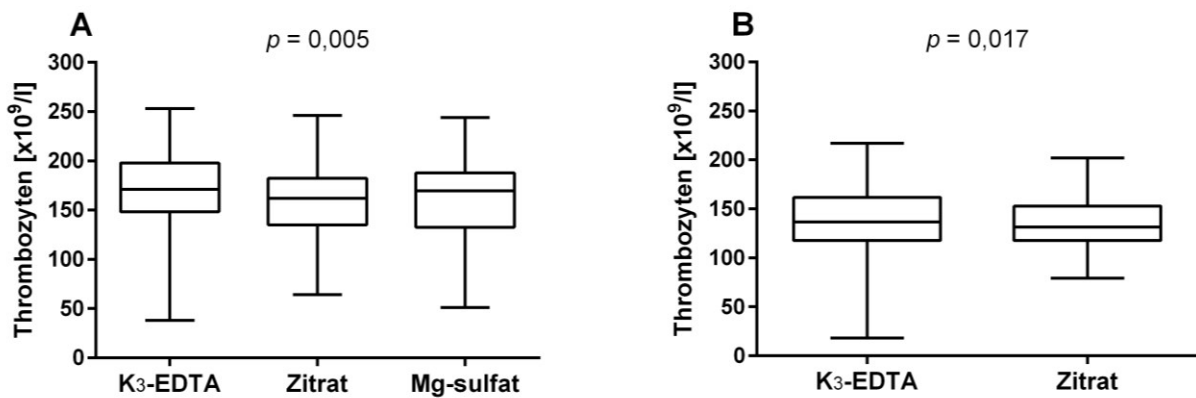


Abbildung 42: ADVIA® 2120 - Diskussion: Messergebnisse der Thrombozytenzahl beim Kleinpferd (A, n = 60) und Warmblut (B, n = 60); Zitratwerte korrigiert um Verdünnungsfaktor 1,1; (Median, 25/75%, min-max)

Sowohl bei den Kleinpferden als auch bei den Warmblütern zeigte sich, dass die Individuen, die im K<sub>3</sub>-EDTA sehr niedrige Werte, die zugleich unter dem im eigenen Labor aktuell gültigen unteren Referenzlimit von 90 x10<sup>9</sup>/l lagen, im Zitrat alle deutlich höhere Zellzahlen aufwiesen (Abbildung 43). Ursache ist hier höchstwahrscheinlich eine EDTA-induzierte Pseudothrombozytopenie (s. 2.2.1.3, S. 18).

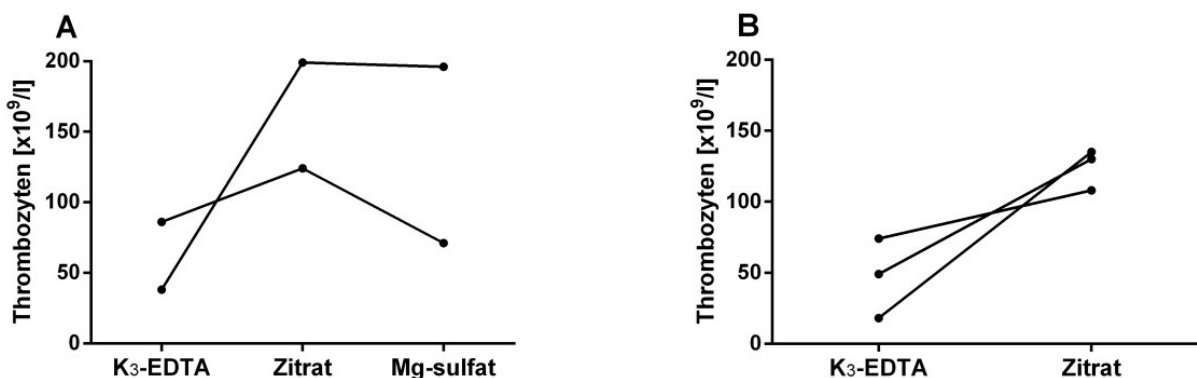


Abbildung 43: ADVIA® 2120 - Diskussion: Thrombozytenzahlen von Einzelindividuen beim Kleinpferd (A) und Warmblut (B); Zitratwerte korrigiert um Verdünnungsfaktor 1,1

## 5 Diskussion

---

In der Humanmedizin wird die Verwendung von Mg-Sulfat als Antikoagulans bei vermuteter EDTA-PTCP empfohlen, da vereinzelt auch mit Zitrat eine Pseudothrombozytopenie beobachtet werden kann [85]. In der eigenen Untersuchung wurde lediglich bei 2 Kleinpferden mit mutmaßlicher EDTA-PTCP eine Thrombozytenzählung im mit Mg-Sulfat antikoagulierten Blut durchgeführt. Bei einem Individuum war die Thrombozytenzahl beim Mg-Sulfat vergleichbar mit der im Zitrat-Blut ( $196$  bzw.  $199 \times 10^9/l$ ), bei dem zweiten Probanden war die Zahl mit  $71 \times 10^9/l$  niedriger als im Zitrat- ( $124 \times 10^9/l$ ) und auch als im  $K_3$ -EDTA-Blut ( $86 \times 10^9/l$ ) (Abbildung 43). Basierend auf den eigenen Daten ergibt sich somit beim Pferd zum Nachweis einer EDTA-PTCP kein Vorteil für die Verwendung von Mg-Sulfat gegenüber der Verwendung von Zitrat.

Unklar ist, ob Probanden mit vermuteter EDTA-PTCP bei der Erstellung von laboreigenen Referenzintervallen berücksichtigt oder ausgeschlossen werden sollten. In der Literatur finden sich hierzu weder für den Menschen noch für Tiere Vorgaben. Da es sich bei der EDTA-PTCP um einen methodischen Fehler in der Analytik handelt, müssten die betroffenen Proben prinzipiell aus der Referenzpopulation ausgeschlossen werden. Voraussetzung ist hierbei, dass eine eindeutige Definition für das Vorliegen einer EDTA-PTCP vorliegt. Beim Menschen werden folgende Kriterien zur Bestätigung einer EDTA-PTCP gefordert: Thrombozytenzahl  $< 100 \times 10^9/l$ ; Aggregation lediglich in Anwesenheit von EDTA bei Raumtemperatur; zeitabhängiger Abfall der Thrombozytenzahl im EDTA-Blut; Nachweis von Thrombozyten-Aggregaten im Blutaussstrich oder automatisch (z. B. mittels Laserzytometrie) sowie Fehlen klinischer Anzeichen einer Thrombozytenfehlfunktion [101]. Die Formulierung einer Aggregation "lediglich in Anwesenheit von EDTA" bedeutet jedoch auch, dass bei jedem Probanden ein weiteres Antikoagulans untersucht werden müsste. Nur bei der Erfüllung aller Kriterien wäre für den Menschen die EDTA-PTCP bestätigt und das entsprechende Individuum könnte aus der Referenzpopulation ausgeschlossen werden. Entsprechende Kriterien für das Vorliegen einer EDTA-PTCP wurden in der Veterinärmedizin bislang nicht formuliert, so dass betroffene Individuen lediglich aufgrund einer Vermutung nicht ohne weiteres aus einer Referenzpopulation ausgeschlossen werden dürfen.

Grundsätzlich lassen sich erheblich abweichende Messergebnisse einzelner Probanden auch mittels statistischer Verfahren ermitteln und so gegebenenfalls aus einer Referenzpopulation ausschließen. Die Leitlinie EP28-A3C zur Erstellung von Referenz-

intervallen in der Labordiagnostik des CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) empfiehlt hierbei die Anwendung zweier Methoden [268]. Die von Dixon 1953 [269] und von Reed et al. 1971 [270] modifizierte Methode nach Dixon identifiziert eine erheblich von allen anderen abweichende Beobachtung, unabhängig, ob sie erheblich größer oder kleiner ist. Der Ausreißer wird mittels des Quotienten  $D/R$  berechnet, wobei  $D$  die absolute Differenz zwischen der extremen Beobachtung und der nächst größeren bzw. kleineren Beobachtung ist und  $R$  die Spannweite aller Beobachtungen umfasst. Reed et al. [270] empfehlen den Ausschluss einer extremen Beobachtung, wenn der Quotient  $1/3$  beträgt, d. h.  $D$  größer oder gleich einem Drittel der Spannweite ist. Die Leitlinie EP28-A3C empfiehlt das Verfahren insbesondere für Populationen von mindestens 120 Probanden und einer nichtparametrischen Berechnung des Referenzintervalls. Liegen mehrere extreme Ausreißer auf der gleichen Seite der Verteilung, wie es im Falle der EDTA-PTCP zu erwarten wäre, ist die Methode nach Dixon und die Quantifizierung nach Reed et al. zur Identifikation von Ausreißern nicht mehr geeignet, da die Differenz der kleinsten bzw. größten Beobachtung zur nächstkleinsten bzw. nächstgrößten Beobachtung nur sehr klein ausfallen wird. In diesen Fällen empfiehlt die Leitlinie EP28-A3C zur Identifikation von Ausreißern die Methode nach Tukey [271], bei der lediglich die mittleren 50 % der Beobachtungen durch Berechnung der 25/75 % Perzentile zum Vergleich herangezogen werden. Die Methode ist jedoch ausschließlich bei einer Gaußschen Verteilung anwendbar oder bei nicht normalverteilten Daten nach Transformation nach Box und Cox [272]. Gleichwohl sollten gemäß der Leitlinie EP28-A3C Ausreißer grundsätzlich lieber eingeschlossen werden und nur nach strenger Prüfung der möglichen Abweichungsgründe wie z. B. präanalytische oder analytische Fehler von der Analyse ausgeschlossen werden.

In der Veterinärmedizin ist die Verwendung der Programmergänzung *Reference Value Advisor* für Microsoft Excel zur Ermittlung von Referenzintervallen etabliert [273]. Hierbei werden die Daten zunächst mittels Anderson-Darling-Test und manuell mittels Histogramm auf Normalverteilung überprüft. Ausreißer werden mittels der oben genannten statistischen Verfahren nach Dixon-Reed (ein Ausreißer) sowie Tukey (mehrere Ausreißer) ermittelt. Der *Reference Value Advisor* differenziert beim Tukey-Test noch zwischen geringgradigen ("Suspect data Tukey") und extremen Ausreißern ("Outliners Tukey"). Die Graduierung berechnet sich hierbei anhand der Quartile der Daten sowie des Interquartilranges (IQ): Q1,

## 5 Diskussion

---

Q2 und Q3 repräsentieren die ersten 3 Quartile der Verteilung, IQ ist die Differenz zwischen Q3 und Q1. Für "Outliers Tukey" gilt: Messwert ist kleiner als  $Q1 - 3 \times IQ$  oder Messwert ist größer als  $Q3 + 3 \times IQ$ . Für "Suspect data Tukey" gilt: Messwert liegt innerhalb des Intervalls  $[Q1 - 3 \times IQ; Q1 - 1,5 \times IQ]$  oder innerhalb  $[Q3 + 1,5 \times IQ; Q3 + 3 \times IQ]$ . Gemäß Richtlinie der American Society for Veterinary Clinical Pathology (ASVCP) zur Erstellung von Referenzbereichen sollten Referenzbereiche bei Probandenzahlen zwischen 40 und 120 parametrisch robust, bei nicht normalverteilten Daten zusätzlich transformiert (z. B. Box-Cox), berechnet werden [274].

Bei der Berechnung von Referenzintervallen für  $K_3$ -EDTA anhand der eigenen Daten mit dem *Reference Value Advisor* zeigte sich, dass bei Berücksichtigung aller 60 Individuen sowohl bei den Kleinpferden als auch den Warmblütern keine Normalverteilung der Daten vorliegt und nur mittels Box-Cox-Transformation eine weitgehende Normalverteilung erreicht werden kann (Anhang Abbildung 12-1, S. 12-49 und Abbildung 12-2, S. 12-50). Von dem Programm wurden hierbei mittels Dixon-Reed keine Ausreißer erkannt. Jedoch wurden mittels Tukey-Test bei den Kleinpferden ein, bei den Warmblütern 2 Individuen als "Suspect data Tukey" folglich als geringgradige Ausreißer identifiziert. Durch Elimination dieser statistisch ermittelten Ausreißer steigt die Thrombozytenzahl des unteren Referenzlimits sowohl bei den Kleinpferden als auch bei den Warmblütern deutlich. Auf Grundlage der Messungen aus Zitrat-Blutproben kann man jedoch bei insgesamt 5 Individuen (Abbildung 43, S. 118) vom Vorliegen einer EDTA-PTCP ausgehen. Schließt man die zusätzlichen beiden, also insgesamt 5 Individuen von der Berechnung aus, erhöht sich das untere Referenzlimit erneut (Tabelle 39).

Tabelle 39: ADVIA® 2120 - Diskussion: Referenzintervalle für die Thrombozytenzahlen aus  $K_3$ -EDTA- und Zitrat-Blutproben; #nach Ausschluss von Ausreißern (Tukey-Test), ##nach Ausschluss von Individuen mit EDTA-PTCP; Berechnung parametrisch, robust, Box-Cox-transformiert (Reference Value Advisor, V 2.1)

Rasse	Antikoagulans	Anzahl	Thrombozyten [ $\times 10^9/l$ ]	
			unteres Referenzlimit	oberes Referenzlimit
Kleinpferd	$K_3$ -EDTA	60	86	240
	$K_3$ -EDTA <sup>#</sup>	59	106	244
	$K_3$ -EDTA <sup>##</sup>	58	117	246
	Zitrat	60	73	222
Warmblut	$K_3$ -EDTA	60	62	198
	$K_3$ -EDTA <sup>#</sup>	58	88	202
	$K_3$ -EDTA <sup>##</sup>	57	96	204
	Zitrat	60	87	193

## 5 Diskussion

---

Bei Berechnungen von Referenzintervallen mittels in der Veterinärmedizin üblichen kleinen Probandenzahlen ist der Einfluss des Individuums auf das berechnete Referenzintervall, wie die Ergebnisse der eigenen Untersuchung zeigen konnten, von großer mathematischer Bedeutung. Im Falle der Thrombozyten könnte dies zur Folge haben, dass bedingt durch ein sehr niedriges unteres Referenzlimit möglicherweise klinisch relevante pathologische Thrombozytopenien unerkannt blieben. Dies zeigt sich in der Studie mit 114 klinisch unauffälligen Pferden von Giordano et al., in welcher das mit dem ADVIA® 2120 ermittelte untere Referenzlimit für Thrombozyten mit  $46 \times 10^9/l$  angegeben wurde [75]. Zur Methodik der Referenzintervallerstellung finden sich keine Angaben, so dass sich nur spekulieren lässt, dass mutmaßlich ein oder mehrere Ausreißer mit sehr niedriger Zellzahl aufgrund einer EDTA-PTCP in die Population eingeschlossen wurden.

Die Erstellung von Referenzintervallen stellt jedoch auch in der Humanmedizin eine erhebliche Herausforderung dar. So wird die Erstellung eigener Referenzintervalle für jedes individuelle Labor international durch die Leitlinie EP28-A3C des CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) [268] sowie national durch die DIN EN ISO 15189 gefordert. Wenngleich die CLSI Leitlinie lediglich 120 Probanden zur prospektiven Erstellung laboreigener Referenzintervalle fordert, ist dies in der Praxis aus finanziellen und logistischen Gründen nahezu nicht umsetzbar. So werden seit einigen Jahren zunehmend indirekte Verfahren angewendet, bei denen retrospektiv aus den täglich erhobenen Laborergebnissen Referenzintervalle geschätzt werden können. Die angewandten statistischen Verfahren beruhen auf den Theorien des amerikanischen Biostatistikers Robert G. Hoffmann, der bereits 1963 erstmals die indirekte Schätzung von Referenzintervallen aus Messdaten von Patienten anstelle von Referenzpersonen etablierte [275]. Die "Arbeitsgruppe Richtwerte" der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin e.V. (DGKL) hat hierzu ein Verfahren etabliert [276], welches in weiteren Studien sowohl bei normalverteilten [277] als auch nicht normalverteilten [278] Variablen sowie in 2 multizentrischen Studien [279,280] überprüft wurde. So konnten auch altersabhängige hämatologische Referenzintervalle für Kinder etabliert werden, bei denen aus ethischen Gründen eine prospektive Etablierung in der Regel nahezu unmöglich ist [281]. Eine Limitierung der Methode liegt darin, dass für die zuverlässige Schätzung mindestens 2000, besser 4000 Falldaten benötigt werden [276]. Gleichwohl könnte diese Methode auch für veterinärmedizinische Labore mit einem hohen

Probenumsatz geeignet sein. In der Routinediagnostik ist eine Zählung der Thrombozyten sowohl aus  $K_3$ -EDTA- als auch Zitrat-Blutproben zum Ausschluss einer EDTA-PTCP bei jedem Individuum organisatorisch nur schlecht realisierbar. Im Rahmen einer retrospektiven Schätzung könnten betroffene Individuen aufgrund der hohen Probandenzahl jedoch durch statistische Methoden eher als Ausreißer erkannt und folglich aus der Auswertung eliminiert werden.

Neben einer geringeren Thrombozytenzahl ergab sich bei den eigenen Messungen aus mit Zitrat im Vergleich zu mit  $K_3$ -EDTA antikoagulierten Blut im Mittel ein kleinerer MPC. Gleiches zeigte sich in einer weiteren Studie beim Pferd [86] sowie auch bei Hund [267] und Mensch [107,108]. Erklärungsansätze finden sich in den humanen Untersuchungen sowie der equinen Studie von Prins et al. nicht. Beim Hund diskutierten Stokol und Erb eine Aktivierung der Thrombozyten durch Zitrat als Ursache. In Blutausstrichen erschienen die Thrombozyten im Zitrat-Blut hierbei größer und blasser, was auf eine Aufnahme von Flüssigkeit und Degranulation im Rahmen der Aktivierung zurückgeführt wurde [267]. Thrombozytenaktivierung führt zu einer Degranulation insbesondere der  $\alpha$ -Granula humaner Thrombozyten und hierdurch zu einer Abnahme des brechungsrelevanten Inhaltes der Zellen mit Folge eines abnehmenden MPC [107–109]. Überprüft man jedoch die Aktivierung der Thrombozyten durch Nachweis des CD62P, eines durch Aktivierung vermehrt auf der Oberfläche der Thrombozyten präsentierten Proteins aus den  $\alpha$ -Granula, zeigte sich in humanen Proben unmittelbar nach der Blutentnahme kein Unterschied zwischen den beiden Antikoagulantien [107,108]. Dies änderte sich jedoch mit einer Lagerung von mehr als 60 Minuten: Mit  $K_3$ -EDTA antikoagulierte Proben wiesen hier eine signifikante Erhöhung der CD62P-positiven Zellen auf [108,109]. Dies spiegelte sich auch in einer signifikanten Abnahme des MPC bei  $K_3$ -EDTA-Proben von Mensch [109,110] und Pferd [86] wider. Bei Verwendung von Zitrat als Antikoagulans wurde beim Menschen eine Aktivierung, gekennzeichnet durch eine vermehrte Präsentation von CD62P, für mindestens 8 Stunden nahezu verhindert [109]. Vergleichende Untersuchungen von Antikoagulantien bezüglich des MPC bei Verwendung von Mg-Sulfat liegen nach Kenntnis der Autorin nicht vor.

Für den MPV ergaben Untersuchungen equiner [86], humaner [109] und caniner [267] Blutproben im Einklang mit den Ergebnissen der eigenen Untersuchung im Mittel größere Messwerte aus Zitrat- im Vergleich zu  $K_3$ -EDTA-Blutproben. Beim Hund wurde von Stokol und

Erb eine Aktivierung mit daraus folgendem Einstrom von Flüssigkeit und Zellvergrößerung diskutiert [267]. Wie oben beim MPC beschrieben, konnte in anderen Untersuchungen eine Aktivierung durch Zitrat innerhalb der ersten Stunden nach Blutentnahme jedoch nicht gezeigt werden. Die Autoren der equinen [86] und der humanen [109] Studie diskutierten das Ergebnis des höheren MPV im Zitratblut nicht.

Die einzige vergleichende Untersuchung von Antikoagulantien bezüglich des MPV bei Verwendung von Mg-Sulfat sowie K<sub>3</sub>-EDTA wurde mit einer grundlegend unterschiedlichen Messtechnik (Impedanz) aus humanen Proben durchgeführt [85]. Da vergleichende Untersuchungen von Hämatologie-Geräten mit grundlegend unterschiedlicher Messtechnik (Impedanz versus Optisch) eine mangelnde Korrelation des MPV in humanen Blutproben ergaben [111,112], sind die Ergebnisse der humanen Studie zum Mg-Sulfat [85] mit den eigenen Messergebnissen nicht vergleichbar.

Proben mit dem Antikoagulans K<sub>3</sub>-EDTA unterliegen bezüglich des MPV ebenfalls nicht unerheblichen Lagerungseinflüssen: So steigt beim Menschen der MPV innerhalb von 6 Stunden nach der Blutentnahme kontinuierlich signifikant an [110]. Prins et al. konnten dies auch für equine Blutproben zeigen. Im Zitratblut hingegen bestand eine Tendenz zur Abnahme der Mittelwerte, wobei die Werte insgesamt stabiler blieben als in den mit K<sub>3</sub>-EDTA antikoagulierten Proben [86].

***Die Ergebnisse der eigenen Untersuchungen zeigen erstmals, dass mutmaßlich keines der untersuchten Antikoagulantien K<sub>3</sub>-EDTA, Zitrat und Mg-Sulfat ein vollständiges Sphäring der Thrombozyten der Equiden verursacht. Dies könnte mittels Raster- und/oder Transmissions-Elektronenmikroskopie bestätigt werden. Da die optischen Messungen auf Grundlage der Mie-Theorie durch Streuung an kugelförmigen Körpern bestehen, ist es wahrscheinlich, dass die Messergebnisse des ADVIA® 120/2120 durch das mangelhafte Aufkugeln der Thrombozyten beeinflusst werden. Im klinischen Alltag ist der Einfluss auf die Zellzahl mutmaßlich von eher geringer Bedeutung. Die methodenbedingte größere Streuung der Messwerte bei der Ermittlung von Volumen und Granularität könnte jedoch deren mittlere Werte MPV und MPC in der Eignung als Funktionsmarker einer Thrombozytenaktivierung beeinflussen.***

***Wird zur Ermittlung der Thrombozytenzahl K<sub>3</sub>-EDTA als Antikoagulans verwendet, können mit dem ADIVA® 2120 gemessene Zellzahlen von < 120 x10<sup>9</sup>/l bei erwachsenen***

***Kleinpferden und  $< 90 \times 10^9/l$  bei erwachsenen Warmblütern auf eine EDTA-induzierte Pseudothrombozytopenie zurückzuführen sein. Basierend auf den eigenen Ergebnissen kann die Verwendung des Antikoagulans Mg-Sulfat zur Bestätigung der EDTA-PTCP im Gegensatz zur Verwendung von Zitrat nicht empfohlen werden. Bei Messungen aus Zitrat-Blutproben ist grundsätzlich unabhängig vom methodischen Verdünnungsfaktor mit einer um ca. 5 % niedrigeren Zellzahl im Vergleich zu Messungen aus  $K_3$ -EDTA-Blutproben zu rechnen.***

### 5.1.1.2 Einfluss der Rasse auf Thrombozytenvariablen

Vergleichende Untersuchungen der Thrombozytenvariablen am ADVIA® 2120 zwischen unterschiedlichen Pferderassen wurden nach Kenntnis der Autorin bislang nicht durchgeführt. In der eigenen Untersuchung wurde für die Kleinpferde eine im Mittel signifikant höhere Thrombozytenzahl im Vergleich zu den Warmblütern ermittelt. Dies deckt sich mit der Untersuchung bei 135 Isländern von Leidinger et al., im Rahmen derer Referenzintervalle durch den *Reference Value Advisor* nach der Richtlinie der American Society for Veterinary Clinical Pathology (ASVCP) [274] erstellt wurden. Das RI für die Isländer wurde mit  $146\text{--}263 \times 10^9/l$  berechnet und liegt für das untere Referenzlimit über dem im dortigen Labor gültigen RI für Pferde von  $100\text{--}300 \times 10^9/l$ . Angaben zur Erstellung des letzteren RIs sind der Publikation nicht zu entnehmen [282]. Im Vergleich zu den Ergebnissen der eigenen Untersuchung kann man jedoch annehmen, dass das RI auf der Untersuchung von Warmblütern beruhen könnte. Im Vergleich zu den Isländern wurde in der eigenen Untersuchung ein niedrigeres unteres Referenzlimit von  $117 \times 10^9/l$  für die Kleinpferde berechnet. In die Gruppe eingeschlossen waren jedoch lediglich 16 Isländer, die Spannweite der aus  $K_3$ -EDTA-Blut gemessenen Thrombozytenzahlen betrug für diese 16 Individuen  $140\text{--}225 \times 10^9/l$  und liegt somit nahezu im identischen für Isländer von Leidinger et al. [282] ermittelten Referenzintervall. Dies deutet darauf hin, dass die Rasse der Isländer im Vergleich mit anderen Kleinpferden eher höhere Thrombozytenzahlen aufweist.

In der grafischen Darstellung erscheinen die Unterschiede der Messwerte in der eigenen Untersuchung aufgrund der Überschneidungen optisch zunächst wenig relevant (Abbildung 44/A).

## 5 Diskussion

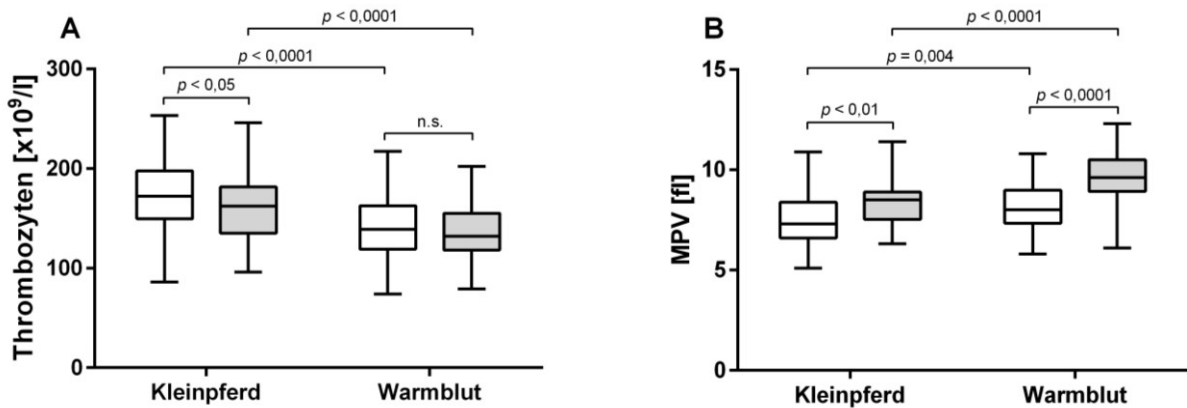


Abbildung 44: ADVIA® 2120 - Diskussion: Thrombozytenzahlen (A) und MPV (B) im K<sub>3</sub>-EDTA-Blut (weiße Boxen) und Zitratblut (graue Boxen) bei jeweils 60 gesunden Kleinpferden und Warmblütern; (Median, 25/75%, min-max)

Bei Berechnung von rassespezifischen Referenzintervallen mit dem *Reference Value Advisor* wird jedoch deutlich, dass sich insbesondere die klinisch relevanteren unteren Referenzlimits der Thrombozytenzahl der Kleinpferde erheblich von denen der Warmblüter unterscheiden. Hierbei spielt es keine Rolle, ob das Referenzintervall alle Probanden enthält oder statistisch ermittelte Ausreißer oder Probanden mit einer EDTA-PTCP (Nachweis durch Kontrollmessung aus Zitratblut) eliminiert wurden (Abbildung 45).

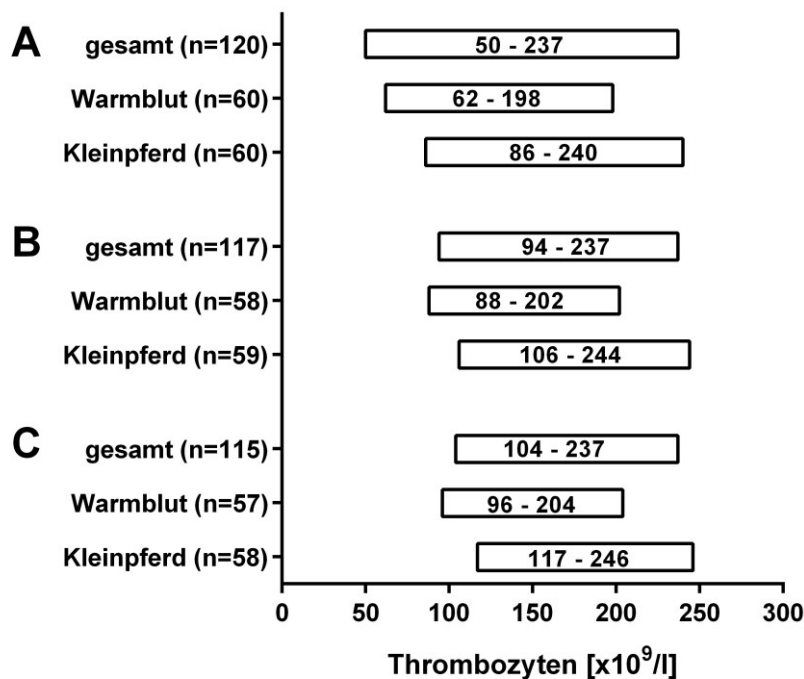


Abbildung 45: ADVIA® 2120 - Diskussion: Referenzintervalle der Thrombozytenzahl im K<sub>3</sub>-EDTA-Blut berechnet mit dem Reference Value Advisor ohne Ausschluss von Ausreißern (A), nach Ausschluss von Ausreißern mittels Tukey-Test (B) sowie Ausschluss von Equiden mit EDTA-PTCP (C)

Da jedoch die Gruppe der Kleinpferde eine sehr heterogene Gruppe bezüglich der eingeschlossenen Rassen darstellte, lässt sich vermuten, dass innerhalb dieser Gruppe weitere rassespezifische Unterschiede vorhanden sein könnten. Diese Vermutung wird durch die Ergebnisse der Untersuchung der Isländer von Leidinger et al. mit einem höheren unteren Referenzlimit im Vergleich zur eigenen Gruppe der Kleinpferde bestätigt [282].

Dies würde bedeuten, dass in Bezug auf die Thrombozytenzahl möglicherweise für jede Pferderasse eigene Referenzpopulationen untersucht und Referenzintervalle erstellt werden müssten. Dies ist jedoch nicht nur im Rahmen der Erstellung, sondern auch in der Verwendung der Intervalle in der täglichen Laborroutine nicht praktikabel. Offen bliebe hierbei auch die Frage, wie Individuen aus einer Kreuzung verschiedener Rassen einzuordnen wären.

So erscheint aufgrund der eigenen Daten bezüglich der Thrombozytenzahl die Erstellung eines rasseübergreifenden Referenzintervalls bei einer heterogenen Patientenpopulation sinnvoll. Mit den dann verfügbaren 115 Individuen wäre zudem die Forderung von 120 Probanden als Referenzpopulation der Leitlinie EP28-A3C des CLSI nahezu erfüllt [268]. In der Bewertung von Thrombozytenzahlen würde dies bedeuten, dass bei Warmblütern bei Betrachtung des unteren Referenzlimits um ca. 5 % niedrigere Werte als wahrscheinlich physiologisch einzuordnen wären. Bei Kleinpferden hingegen ist mit ca. 10 % höheren Werten zu rechnen, so dass bei einem Individuum mit einer Zellzahl im unteren rasseübergreifenden Referenzintervall bereits eine geringgradige Thrombozytopenie vorliegen würde.

Thrombozytenzahl und Größe weisen beide eine große individuelle Variation aus. Dass ein enger Zusammenhang zwischen diesen beiden Variablen besteht, wurde erstmals 1974 von O'Brien postuliert [283]. Beim Menschen konnte eine Erbllichkeit der Thrombozytenzahl und des MPV gezeigt werden [284]. In einer Meta-Analyse genomweiter Assoziationsstudien mit 66.867 europäischen Individuen konnten insgesamt 68 Genloci identifiziert werden, die mit der Anzahl und Größe der Thrombozyten assoziiert sind. Bei Überprüfung dieser Genloci bei knapp 8.000 asiatischen bzw. 15.000 japanischen Individuen konnten 13 bzw. 15 der 68 Genloci ebenfalls mit Anzahl und Größe der Zellen assoziiert werden [285].

Für das Pferd könnte nach den Ergebnissen der eigenen Untersuchung ebenfalls eine erbliche Komponente vermutet werden, da ein signifikanter Unterschied beider Variablen zwischen Kleinpferden und Warmblütern berechnet werden konnte (Abbildung 44, Tabelle 15 und Tabelle 16, S. 76).

Für den Menschen wurden zwischen Zahl und Größe der Thrombozyten mittels Impedanzmessung signifikante negative Korrelationen von  $r = -0,72$  [286] und  $r = -0,33$  [287] nachgewiesen. Vasse et al. [288] beschrieben für den ADVIA® 2120 ebenfalls eine signifikante negative Korrelation bei humanen Blutproben, ein Korrelationskoeffizient wurde jedoch nicht angegeben. Bessman et al. ermittelten für den Menschen ebenso einen negativen Zusammenhang, allerdings nichtlinear [289]. In der eigenen Untersuchung fiel beim Vergleich der Warmblüter und der Kleinpferde auf, dass letztere im Mittel einen signifikant niedrigeren MPV, dafür jedoch signifikant höhere mittlere Thrombozytenzahlen aufwiesen. Mittels Korrelationsanalyse konnte beim Equiden ebenfalls eine sehr schwach negative signifikante Korrelation berechnet werden (Abbildung 46).

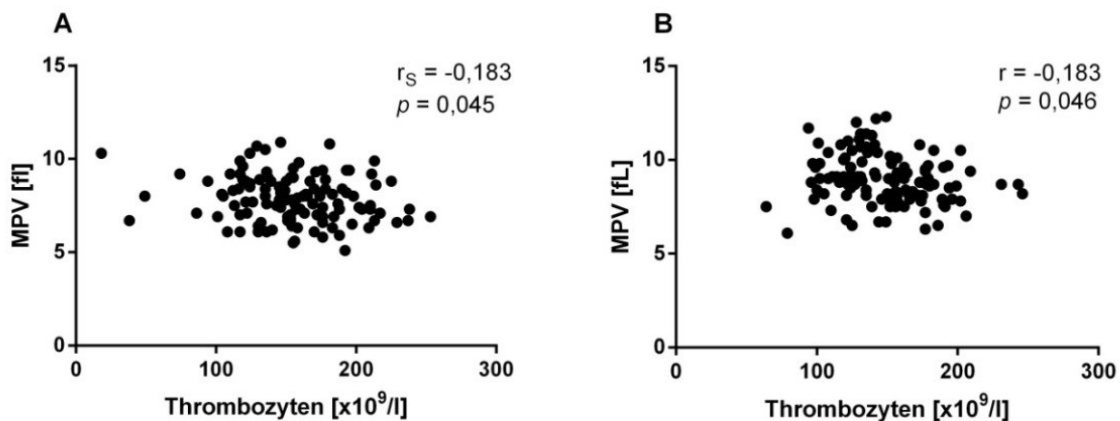


Abbildung 46: ADVIA® 2120 - Diskussion: Korrelation der Variablen Thrombozytenzahl und MPV aus K<sub>3</sub>-EDTA-Blut (A) und Zitratblut (B) bei 120 klinisch unauffälligen Warmblütern und Kleinpferden (Statistik: GraphPad Prism 6)

***In der eigenen Untersuchung konnten Unterschiede bei den Thrombozytenvariablen am ADVIA® 2120 zwischen Kleinpferden und Warmblütern gezeigt werden. Da die Erstellung und Anwendung von rassespezifischen Referenzintervallen in der Laborroutine nicht praktikabel sind, sollte die Referenzpopulation der Rassenverteilung des zu untersuchenden Patientengutes entsprechen. Die Thrombozytenzahl bei den Kleinpferden war im Mittel höher als die der Warmblüter. So können sowohl bei einem rasseübergreifenden als auch einem anhand von Warmblütern erstellten Referenzintervall Messwerte am unteren Referenzlimit bei einem Kleinpferd bereits auf eine bestehende Thrombozytopenie hinweisen.***

### 5.1.2 Impedanzaggregation (Multiplate® Analyzer)

Um eine die Messergebnisse beeinflussende präanalytische Aktivierung der Thrombozyten im Rahmen der Blutentnahme zu minimieren, werden in der Leitlinie H58-A "Platelet function testing by aggregometry" des CLSI zur Blutentnahme die Verwendung großlumiger Kanülen (19-21 G) zur Minimierung des Scherstresses, ein Vakuum-Blutentnahme-System sowie ein möglichst geringer Stau der Vene empfohlen [290]. In der eigenen Untersuchung wurden die Blutproben durch Punktion der Vena jugularis externa gewonnen, welche bedingt durch ihren Durchmesser im Rahmen der Blutentnahme beim Pferd nur wenig gestaut werden muss. Die verwendeten Katheter besaßen einen Durchmesser von 17 G und wiesen somit einen noch größeren Durchmesser auf, als von der Leitlinie vorgeschlagen. Das verwendete Blutentnahme-System der Firma Sarstedt arbeitet mittels Vakuum, so dass die geforderten Bedingungen eingehalten wurden und eine entnahmebedingte Aktivierung der Thrombozyten weitgehend ausgeschlossen werden konnte. Zudem konnten Untersuchungen bei Hunden [159] und Menschen [291] zeigen, dass Kanülengröße und Unterschiede im Venenstau die Messergebnisse des Multiplate® Analyzers nicht signifikant beeinflussen.

#### 5.1.2.1 Einfluss der Rasse auf die Impedanzaggregation

Vergleichende Untersuchungen der Messvariablen am Multiplate® Analyzer zwischen unterschiedlichen Pferderassen wurden nach Kenntnis der Autorin bislang nicht durchgeführt. Dergleichen liegen auch keine vergleichenden Untersuchungen vor, bei denen die Thrombozytenaggregation bzw. -funktion bei unterschiedlichen Pferderassen mit anderen Methoden überprüft wurde. Untersuchungen der Thrombozytenfunktion bei Pferden mittels Impedanz-Aggregometrie aus Vollblut mit anderen Geräten lassen sich mit den Ergebnissen der eigenen Untersuchung nicht vergleichen, da insbesondere Unterschiede in der Konzentration der zugefügten Agonisten (ADP und Kollagen) und der Messdauer vorlagen [118,172].

In der eigenen Untersuchung zeigte die Gruppe der Kleinpferde bei allen Agonisten niedrigere Aggregationswerte im Vergleich zur Gruppe der Warmblüter. Wenngleich für die Messungen des COLtest, ADPtest und ADPtestHS signifikante Unterschiede berechnet werden konnten, bestehen umfassende Überschneidungen der Messwerte, so dass rasseabhängige

## 5 Diskussion

Referenzintervalle klinisch nicht relevant erscheinen. Anders stellt sich dies beim ASPItest dar. Es lag lediglich eine sehr kleine Überschneidung des 25%/75 %-Interquartils der Kleinpferde und der Warmblüter vor. Rasseabhängige Referenzintervalle erscheinen hier klinisch sinnvoll und notwendig (Abbildung 47).

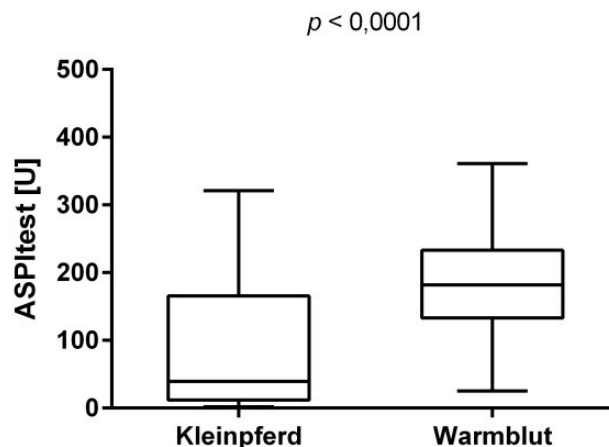


Abbildung 47: Multiplate® Analyzer - Diskussion: ASPItest bei klinisch unauffälligen Kleinpferden (n = 58) und Warmblütern (n = 60); (Median, 25/75%, min-max)

Beim Menschen konnten für den Multiplate® Analyzer keine Unterschiede zwischen Weißen und Afroamerikanern ermittelt werden [292]. In einer weiteren Studie wurden Probanden in 3 Zentren weltweit untersucht. Hierbei wurden in einem Zentrum mit ca. 80 % asiatischen Probanden signifikant niedrigere Aggregationswerte im Vergleich zu den anderen beiden Zentren mit sehr gemischter ethnischer Zugehörigkeit ermittelt [145]. Bei Hunden konnten Rasseunterschiede zwischen Cavalier King Charles Spaniel, Boxer, Cairn Terrier und Labrador nach Aktivierung mit ADP in verschiedenen Konzentrationen mittels Vollblut-Impedanzaggregometrie unter Verwendung des Lumi-Aggregometer (Chrono-log Corporation) nachgewiesen werden. Die Cavalier King Charles Spaniel zeigten hierbei Aggregationswerte, welche auch mit hohen Konzentrationen ADP (20 $\mu$ M) bei keiner der anderen Rassen erreicht wurden [293].

Innerhalb der Gruppe der Kleinpferde war in der eigenen Untersuchung insbesondere beim ADPtest und auch beim ADPtestHS eine Gruppierung der Werte in 2 Bereiche erkennbar (Abbildung 48).

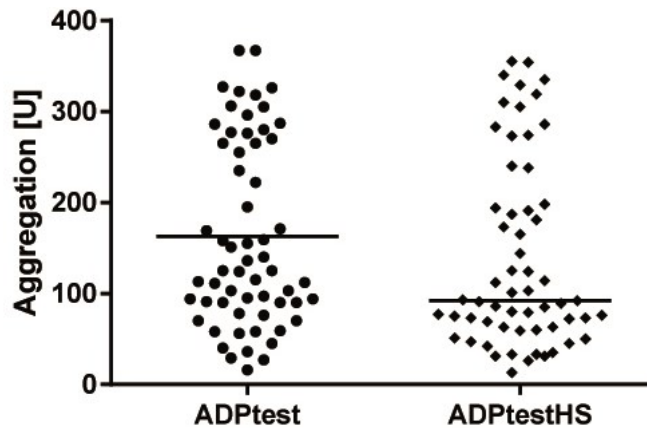


Abbildung 48: Multiplate® Analyzer - Diskussion: ADPtest und ADPtestHS der 60 klinisch unauffälligen Kleinpferde (Balken = Median)

Diese Gruppierung ließ sich jedoch keiner einheitlichen Rasse innerhalb der heterogenen Gruppe der Kleinpferde zuordnen. So verteilten sich die Messwerte der Individuen der zahlenmäßig größten Probandengruppen der Rassen Isländer (n = 16), Haflinger (n = 8) und Shetlandponys (n = 8) gleichmäßig innerhalb der Spannweite der Gesamtpopulation der Kleinpferde (Abbildung 49). Gleiches galt für die übrigen Rassen innerhalb der Gruppe der Kleinpferde.

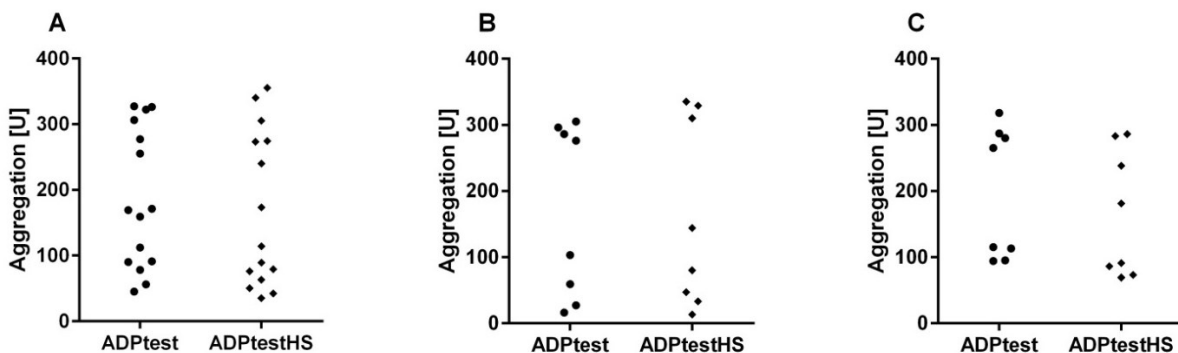


Abbildung 49: Multiplate® Analyzer - Diskussion: ADPtest und ADPtestHS bei Isländern (A, n = 16), Haflingern (B, n = 8) und Shetlandponys (C, n = 8)

Denkbar wäre auch, dass die Gruppierung auf unterschiedliches Körpergewicht zurückzuführen sein könnte. Beim Menschen konnte gezeigt werden, dass die mit dem Multiplate® Analyzer ermittelten Aggregationswerte beim ADPtest bei adipösen Probanden signifikant höher lagen als bei normal- oder geringgradig übergewichtigen Individuen [294]. In der Gruppe der hier untersuchten Kleinpferde waren 33 der 60 Tiere mit einem BCS von 4/5 stark übergewichtig, ein signifikanter Unterschied der Aggregationswerte des ADPtest zu

## 5 Diskussion

denen der Kleinpferde mit Idealgewicht und einem BCS 3/5 (26/60 Probanden) konnte jedoch im Unterschied zum Menschen nicht berechnet werden (Abbildung 50, Tabelle 40).

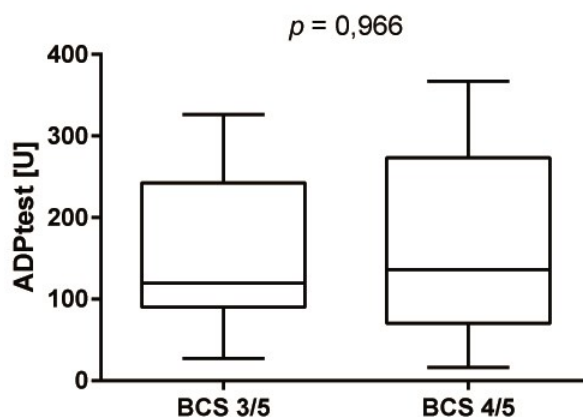


Abbildung 50: Multiplate® Analyzer - Diskussion: ADPtest der klinisch unauffälligen Kleinpferde in Abhängigkeit vom Body Condition Score (BCS); (Median, 25/75%, min-max)

Bei den weiteren verwendeten Tests ADPtestHS, ASPItest, COLtest sowie der Spontanaggregation zeigte sich keine Gruppierung der Messwerte, signifikante Unterschiede in Abhängigkeit des Körpergewichts konnten auch hier nicht berechnet werden (Tabelle 40).

Tabelle 40: Multiplate® Analyzer – Diskussion: Aggregationswerte in Abhängigkeit vom Körpergewicht bei klinisch unauffälligen Kleinpferden, BCS nach Carroll und Huntington [255]; t-Test bzw. U-Test (GraphPad Prism 6)

	COLtest [U]	ADPtest [U]	ADPtestHS [U]	ASPItest [U]	Spontanaggregation [U]
<b>BCS 3/5</b>					
Anzahl	26	26	26	25	25
Minimum	116,0	27,0	31,0	6,0	0,1
25% Perzentil	212,5	90,0	71,3	20,0	1,5
Median	242,0	119,5	92,5	51,0	10,0
75% Perzentil	310,3	242,5	191,8	151,0	79,0
Maximum	366,0	326,0	355,0	321,0	202,0
<b>BCS 4/5</b>					
Anzahl	33	33	32	32	32
Minimum	44,0	16,0	13,0	2,0	0,1
25% Perzentil	225,0	70,0	53,3	9,0	0,1
Median	276,0	136,0	84,5	18,5	8,5
75% Perzentil	319,5	273,0	265	181,3	113,3
Maximum	401,0	367,0	354,0	316,0	376,0
<b>p-Wert</b>	0,314	0,967	0,736	0,222	0,958

***Erstmals konnte in der eigenen Untersuchung für Messungen der Thrombozytenfunktion mit dem Multiplate® Analyzer bei erwachsenen Equiden ein Einfluss der Rasse gezeigt werden. Die Messungen bei den Kleinpferden ergaben hierbei grundsätzlich niedrigere Aggregationswerte im Vergleich zu denen der Warmblüter. Jedoch waren die Messbereiche beim ASPItest so voneinander abweichend, dass zur Verwendung des Tests in der Routinediagnostik die Erstellung eines rassespezifischen Referenzintervalls notwendig erscheint.***

### 5.1.2.2 Einfluss des magnetischen Rührstabs auf die Impedanzaggregation

Erhöhte Aggregationswerte der Spontanaggregation bei Messungen im Vollblut gelten beim Menschen als Indikator einer Hyperkoaguabilität und wurden als Indikator für arterielle Gefäßverschlüsse identifiziert [258–260]. Bampalis et al. konnten in ihren Untersuchungen an Blutproben gesunder Menschen mit dem Multiplate® Analyzer zeigen, dass hohe Spontanaggregationen maßgeblich durch den Rührvorgang während der dreiminütigen Inkubation verursacht wurden. Das Rühren des Vollblutes führte hierbei zu einer Freisetzung von ATP und mutmaßlich auch ADP aus den Erythrozyten, so dass zu Beginn der eigentlichen Messung nach der Inkubation in der Messküvette bereits ein Aktivator der Thrombozyten vorhanden war. Dies resultierte in einer messbaren Aggregation der Thrombozyten auch ohne Zugabe eines Agonisten. Wurde der magnetische Rührstab erst nach der dreiminütigen Inkubationszeit in die Küvette eingelegt, konnte die Spontanaggregation nahezu vollständig eliminiert werden. Die Messwerte der Proben mit den Agonisten ADP, Arachidonsäure und Kollagen waren in den ungerührten Proben im Mittel ebenfalls signifikant kleiner als in den gerührten Proben [257]. Die höheren Messwerte der gerührten Proben sind somit mutmaßlich das Ergebnis der höheren Konzentration des Agonisten ADP durch dessen Freisetzung aus den Erythrozyten.

Diese Ergebnisse konnten in der eigenen Untersuchung bestätigt werden. Insbesondere konnten die, im Vergleich zu Untersuchungen beim Menschen, sehr hohen Werte der Spontanaggregation einiger Pferde deutlich reduziert werden (Abbildung 51).

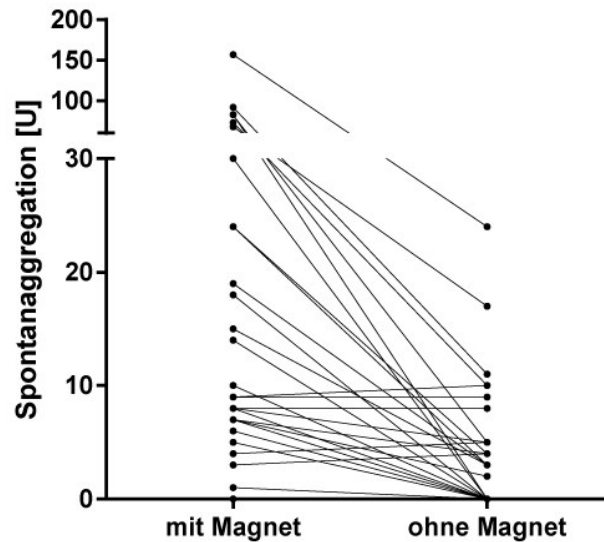


Abbildung 51: Multiplate® Analyzer - Diskussion: Spontanaggregation bei Messungen mit und ohne magnetischen Rührstab während der Inkubation bei klinisch unauffälligen erwachsenen Kleinpferden und Warmblütern (n = 41)

*Erstmalig konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass bei Messungen mit dem Multiplate® Analyzer der Verzicht auf das Rühren der Probe während der Inkubation auch beim Equiden insbesondere bei der Spontanaggregation eine Reduktion der Aggregationswerte bewirkt. Beim Einsatz der Spontanaggregation als Nachweis einer in vivo Aktivierung der Thrombozyten sind so auch beim Equiden Messungen ohne magnetischen Rührstab während der Inkubation ratsam.*

### 5.1.3 Fluoreszenz-Durchflusszytometrie (Accuri® C6)

#### 5.1.3.1 Präanalytik

Auch im Rahmen der Fluoreszenz-Durchflusszytometrie gilt es, eine Aktivierung der Thrombozyten im Rahmen der Blutentnahme zu vermeiden. So sollten beim Menschen verwendete Kanülen mindestens die Größe 21 G aufweisen, die Vene geringstmöglich gestaut, ein gleichmäßiger Blutfluss aufrechterhalten und die ersten 2 ml verworfen werden [136]. All diese Bedingungen waren in der eigenen Untersuchung, wie bereits beim Multiplate® Analyser ausgeführt, gewährleistet (s. 5.1.2, S. 129).

Ziel der Untersuchungen am Accuri® C6 war es, Untersuchungsmethoden mittels Fluoreszenz-Durchflusszytometrie nach Protokollen aus der Humanmedizin zum Nachweis aktivierter Thrombozyten [136] sowie Thrombozyten-Leukozyten-Aggregaten [197] aus Vollblut für Equiden zu etablieren. Da die in beiden Protokollen vorgesehene Lyse der Erythrozyten in den equinen Proben zu einer signifikanten Abnahme der Thrombozyten und der Leukozyten führte, wurde durch Sedimentation gewonnenes Plättchen- und Leukozytenreiches Plasma (PLRP) verwendet. In humanen Blutproben konnten ähnliche Veränderungen durch die Erythrozytenlyse einhergehend mit einer Verringerung der Zahl an Blasten gezeigt werden [295]. Ein weiterer Vorteil der Verwendung des durch Sedimentation gewonnenen PLRP liegt darin, dass das Plasma vor der Untersuchung nicht zentrifugiert werden muss. So ist weitgehend gewährleistet, dass keine Subpopulationen der Thrombozyten verloren gehen [136]. In den equinen Studien zum Nachweis von TLA wurde das PLRP in der Regel zwar durch Sedimentation gewonnen, die Proben in der Folge jedoch zumeist zentrifugiert [191,192,199]. Neben einem Verlust von einzelnen Zellpopulationen verursacht das Zentrifugieren eine unerwünschte Aktivierung der Thrombozyten [37]. Um im gesamten Messablauf der Fluoreszenz-Durchflusszytometrie auf Zentrifugationen verzichten zu können, müssen bereits mit einem Fluorochrom markierte Antikörper verwendet werden [136,197].

Erfolgen die fluoreszenz-durchflusszytometrischen Untersuchungen nicht unmittelbar im Anschluss an die Probenverarbeitung, wird grundsätzlich eine Fixierung der Proben mit 1%igem (Para)formaldehyd empfohlen. Erfolgt die Fixierung der Proben jedoch vor der Antikörpermarkierung und gegebenenfalls Aktivierung der Zellen, so werden einzelne Oberflächenproteine durch die spezifischen Antikörper möglicherweise nicht mehr erkannt

oder die Reaktion auf plättchenaktivierende Agonisten verändert. Erfolgt die Fixierung nach Markierung und gegebenenfalls Aktivierung, wird die Intensität der Fluoreszenz negativ und zum Teil nichtlinear von der Zeitspanne bis zur Messung beeinflusst [136]. Bei Untersuchungen von Pferdeblutproben konnte gezeigt werden, dass eine Fixierung mit Formalin die Aktivierbarkeit der Thrombozyten und die Bindungsfähigkeit von Aktivierungsmarkern in unterschiedlichem Maße beeinflusste [207]. Da in der eigenen Untersuchung Probenverarbeitung und Probenmessung in einem Zeitraum von 75 Minuten nach Blutentnahme erfolgten, wurde auf eine Fixierung der Proben verzichtet.

### 5.1.3.2 Aktivierte Thrombozyten und Thrombozyten-Leukozyten-Aggregate

Wenngleich Thrombozyten in der Fluoreszenz-Durchflusszytometrie relativ zuverlässig durch ihr klassisches Scatter-Profil zu identifizieren sind, sollte für den Nachweis aktivierter Thrombozyten und TLA eine Doppelmarkierung erfolgen. So sollten ein Thrombozyten-spezifischer Antikörper (z. B. gegen CD41 oder CD61) und zudem ein weiterer Antikörper, welcher zum Nachweis der Aktivierung (z. B. gegen CD62P) oder als Marker für Leukozyten zum Nachweis der TLA (z. B. gegen CD11a) dient, verwendet werden [136,197]. Die ausgewählten Fluorochrome sollten hierbei in ihrem Emissionsspektrum möglichst keine Überschneidungen aufweisen. In der eigenen Untersuchung wurden zur Identifikation der Thrombozyten ein mit APC-markierter Antikörper gegen CD41/61 verwendet, die Antikörper gegen die Aktivierungsproteine CD62P und CD154 sowie der Antikörper gegen spezifische Oberflächenproteine der Leukozyten (CD11a/18) waren FITC-markiert. Der Peak des Emissionsspektrums von FITC liegt bei 530 nm, der von APC bei 675 nm, so dass Überschneidungen bei gleichzeitiger Verwendung dieser Fluorochrome nahezu ausgeschlossen sind [296]. In der eigenen Untersuchung erfolgten alle Messungen mittels Doppelmarkierung, wohingegen in einer weiteren equinen Studie eine Doppelmarkierung lediglich in einer einzelnen Untersuchung und dort aufgrund mangelnder Verfügbarkeit nur bei einem Teil der Proben zum Einsatz kam [192]. Die verwendeten Antikörper gegen CD41/61 und CD62P wurden bereits erfolgreich in Untersuchungen aus Pferdeblutproben eingesetzt [193,196]. Bei dem Antikörper gegen CD11a/18 handelte es sich um einen pferdespezifischen monoklonalen Antikörper. Antikörper gegen CD40L (Synonym CD154) wurden beim Pferd nach Kenntnis der Autorin bislang nicht verwendet. Laut Datenbank UniProt ([www.uniprot.org](http://www.uniprot.org)) besteht zwischen murinem und equinem CD40L eine Übereinstimmung in

der Aminosäuresequenz von 77,011 %, so dass die Wahrscheinlichkeit einer Kreuzreaktivität des hier verwendeten murinen Antikörpers gegen equines CD40L gegeben erscheint.

Die Aktivierung der Thrombozyten *in vitro* erfolgte in der eigenen Untersuchung durch equines Kollagen mit einer finalen Testkonzentration von 12,5 µg/ml. In einer Untersuchung an equinen, gewaschenen Zellen wurde ebenfalls Kollagen in einer Konzentration von 2,5 µg/ml verwendet, allerdings ist der Publikation nicht zu entnehmen, ob es sich hierbei um die finale Testkonzentration oder die der zugegebenen Kollagenlösung handelte [3]. Gleichwohl führte die Aktivierung in vorgenannter Studie mit einer, im Vergleich zu der in der eigenen Untersuchung eingesetzten, erheblich geringeren Kollagenkonzentration zu einer Zunahme der CD62P-positiven Thrombozyten von 2,12 % auf 21,86 % im PRP. Unklar ist hierbei, ob es sich um den Mittelwert der Untersuchungen der beiden verwendeten Pferde handelt oder um die maximal erreichte Erhöhung bei einem der beiden Probanden. In der eigenen Untersuchung konnte der prozentuale Anteil CD62P-positiver Zellen durch Kollagen von 1,44 % auf 8,78 % doppelmarkierter Zellen erhöht werden, wobei die minimale Erhöhung 5,01 %, die maximale Erhöhung 27,06 % betrug. Beim Menschen konnte gezeigt werden, dass nach Aktivierung mit Kollagen (in nicht benannter Konzentration) Thrombozyten innerhalb von Minuten für 1 bis 8 Stunden vermehrt CD40L auf der Zelloberfläche exprimieren. Die vermehrte Exprimierung wurde hierbei durch eine Erhöhung der mittleren Fluoreszenzintensität von 0,3 auf 11,3 nach 1 Stunde ermittelt [37,203,204]. Die Steigerung der mittleren Fluoreszenzintensität wurde in der eigenen Untersuchung nicht überprüft, so dass die Ergebnisse nicht vergleichbar sind.

In der eigenen Untersuchung konnte nach Zugabe von Kollagen der prozentuale Anteil der TLA nicht signifikant erhöht werden. In Untersuchungen aus equinen [194] und humanen Blutproben [34] konnte gezeigt werden, dass ein Anstieg der TLA erst nach der Zugabe von Kalzium mittels Fluoreszenz-Durchflusszytometrie nachweisbar war. In beiden vorgenannten Studien wurden TLA jedoch nach Zugabe eines Leukozytenkonzentrates zum PRP gemessen, so dass die Ergebnisse auch bedingt durch diesen methodischen Unterschied nicht mit den Ergebnissen der eigenen Untersuchung vergleichbar erscheinen. In der humanen Studie wurde das Leukozytenkonzentrat aus heparinisierten Blutproben gewonnen. In der equinen Studie lässt sich dies nicht erkennen, da sowohl Heparin als auch Zitrat als Antikoagulans zur Gewinnung des PRP und des Leukozytenkonzentrates verwendet wurden. Heparin vermindert die Ansprechbarkeit der Thrombozyten auf Kollagen [136] und könnte somit die Entstehung

von TLA negativ beeinflussen. So bleibt der tatsächliche Einfluss einer Zugabe von Kalzium in der Entstehung von TLA fraglich.

Vergleichbar mit den Ergebnissen der eigenen Untersuchung konnte auch beim Menschen gezeigt werden, dass bei gesunden Individuen eine in vitro Aktivierung mit Thrombin allein keinen Einfluss auf die Bindung von Leukozyten und Thrombozyten hatte. So konnte die Bindungskapazität von Thrombozyten an neutrophile Granulozyten in Proben von gesunden Individuen durch Aktivierung der Blutplättchen mit hohen Konzentrationen Thrombin nicht erhöht werden. Erst nach Zugabe von Plasma septischer Patienten wurde die Bindung der Thrombozyten an die Granulozyten signifikant erhöht [29].

***Erstmals konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass der Nachweis von aktivierten Thrombozyten sowie von Thrombozyten-Leukozyten-Aggregaten unter Verwendung von geringfügig modifizierten humanen Protokollen [136,197] aus PLRP möglich ist. Zudem konnte erstmals gezeigt werden, dass bei Aktivierung der Thrombozyten auch beim Pferd eine Exprimierung von CD154 (CD40L) stattfindet.***

### 5.1.3.3 Thiazol Orange

Zum Nachweis RNA-reicher Thrombozyten beim Pferd finden sich in der Literatur lediglich 2 Publikation der gleichen Arbeitsgruppe mit identischer Methodik [52,195]. Aus diesem Grund wurde für die eigene Untersuchung das dort beschriebene Protokoll verwendet. Da die im verwendeten PLRP in Leukozyten vorhandene RNA ebenfalls durch Thiazol angefärbt wird, wurde analog zu einem Protokoll aus der Humanmedizin zusätzlich ein Antikörper gegen CD41/61 zur Identifikation der Thrombozyten eingesetzt [297]. Bei 16 klinisch unauffälligen Equiden konnten Russell et al. im Mittel 2,07 % (Spannweite 0,9-3,44 %) Thiazol-positive Thrombozyten nachweisen [195]. In der eigenen Untersuchung wurde mit 2,35 % ein vergleichbarer Mittelwert errechnet, die Spannweite war mit 0,27-51,82 % jedoch erheblich größer. Die Daten von Russell et al. beruhen auf Messungen aus mit EDTA-antikoagulierten PRP, allerdings konnten von den Autoren in Voruntersuchungen keine signifikanten Unterschiede beim Vergleich von Messungen aus Zitrat- und EDTA-Proben ermittelt werden. Beim Menschen konnte gezeigt werden, dass mit Thiazol nicht nur RNA, sondern auch unspezifisch  $\delta$ -Granula in Thrombozyten angefärbt werden [298]. Die Autoren

mutmaßten, dass bis zu 50 % der gemessenen Fluoreszenz durch das Anfärben der  $\delta$ -Granula verursacht wurden. Dieser Effekt verstärkte sich mit steigender Konzentration der verwendeten Thiazol-Lösung. In der Untersuchung von Russell et al. und dementsprechend in der eigenen Untersuchung wurde das Thiazol in einer Konzentration von 10  $\mu\text{g/ml}$  verwendet, diese liegt deutlich über der in einem humanen Protokoll angegebenen von 1  $\mu\text{g/ml}$  [297]. Nach Aktivierung der Thrombozyten mit daraus resultierender Degranulation der  $\delta$ -Granula konnte beim Menschen der Anteil Thiazol-positiver Thrombozyten signifikant vermindert werden [298]. Da Russell et al. für ihre Untersuchungen beim Pferd PRP verwendeten, kann spekuliert werden, dass im Rahmen der präanalytischen Zentrifugationen eine Aktivierung und folgende Degranulation erfolgt waren. Dies könnte eine Ursache für den trotz sehr hoher Thiazol-Konzentration niedrigen Anteil Thiazol-positiver Thrombozyten sein. Dass eine Aktivierung in der eigenen Untersuchung durch die Verwendung des PLPR nicht erfolgte, bestätigen die Untersuchungen der Aktivierungsmarker in den nativen Proben. Die hohen Prozentzahlen bei einigen der Probanden könnten so auf eine Färbung von  $\delta$ -Granula zurückzuführen sein. Eine Messung Thiazol-positiver Thrombozyten nach Aktivierung wurde in der eigenen Untersuchung nicht durchgeführt, so dass der Effekt einer Degranulation der  $\delta$ -Granula auf die Zahl der Thiazol-positiven Zellen beim Pferd unklar bleibt. Die 3 betroffenen Probanden zeigten jedoch keine Besonderheiten bezüglich Granularität oder Aktivierbarkeit der Thrombozyten: Der MPC lag mit 26,0, 27,5 und 27,6 g/dl in der Spannweite von 23,3 - 28,6 g/dl aller 10 Messungen. Bei der Aktivierbarkeit mittels Kollagen waren unter Berücksichtigung des Anteils CD62P-, CD154- und CD11a/18-positiver Zellen ebenfalls keine Besonderheiten zu erkennen (Tabelle 19, S. 82). Ein Einfluss von Alter, Rasse oder Geschlecht erscheint ebenfalls unwahrscheinlich: Es handelte sich um 2 Stuten und 1 Wallach, 2 Warmblüter und 1 Kleinpferd im Alter von 6, 13 und 28 Jahren. Zuletzt ist nicht auszuschließen, dass es sich bei den 3 Messungen mit mehr als 10 % Thiazol-positiven Thrombozyten um Messfehler handelt, da eine Wiederholungsmessung nicht durchgeführt wurde.

***Der Nachweis RNA-reicher Thrombozyten war mit der hier eingesetzten Methodik fraglich und sollte mit einer geringeren Konzentration des Thiazols bei weiteren Probanden erneut überprüft werden.***

### 5.1.4 ELISA sCD40L und sP-Selectin

#### 5.1.4.1 sCD40L

Dass equine Thrombozyten nach Aktivierung CD40L exprimieren, konnte im Rahmen der Untersuchungen mittels Fluoreszenz-Durchflusszytometrie gezeigt werden (s. 4.1.3.1, S. 82). Beim Menschen wird das Glykoprotein nach Aktivierung der Thrombozyten in vitro kurzzeitig exprimiert und dann ins Serum abgegeben, wo die Konzentration beginnend nach wenigen Minuten und endend nach einer Stunde um das ca. 30-fache ansteigt [216]. Gleichwohl ließ sich in den Pferdeproben mit dem Quantikine® ELISA Human CD40 Ligand/TNFSF5 Immunoassay kein sCD40L nachweisen. Laut Datenbank UniProt ([www.uniprot.org](http://www.uniprot.org)) besteht zwischen humanem und equinem CD40L eine Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz von 89,27 %, so dass grundsätzlich eine Kreuzreaktivität eines humanen Antikörpers mit dem equinen CD40L vermutet werden kann. Aus den Angaben des Testherstellers geht jedoch nicht hervor und war auch auf Nachfrage beim Hersteller nicht in Erfahrung zu bringen, gegen welche Abschnitte der Aminosäuresequenzen der polyklonale Antikörper gerichtet ist. Equines sCD40L ist nach Kenntnis der Autorin kommerziell nicht erhältlich, so dass der Test nicht mit dem reinen equinen Protein überprüft werden konnte.

Ein grundlegender Fehler in der Messmethodik und Testdurchführung kann ausgeschlossen werden, da bei den Standards und Kontrollen die zu erwartenden Messwerte erreicht wurden. Interferenzen zwischen dem eingesetzten Probenmaterial und den Testreagenzien sind ebenfalls weitgehend auszuschließen, da in den Proben mit Zugabe von humanem sCD40L die Wiederfindung im Mittel 93,33 % im equinen Poolserum und 81,83 % im equinen Poolplasma betrug. Diese Wiederfindungswerte liegen innerhalb des vom Hersteller angegebenen akzeptablen Intervalls von 80-120 %.

Die minimale nachweisbare Konzentration von sCD40L liegt bei dem ELISA nach Angaben des Herstellers im Mittel bei 4,2 pg/ml (Spannweite 2,1-10,1 pg/ml). Bei gesunden Menschen können gemäß Untersuchungen des Herstellers im Serum im Mittel Konzentrationen von 5461 pg/ml (Spannweite 0-11.451 pg/ml) gemessen werden (Quelle: Testanleitung). Auch bei Verwendung eines ELISA eines anderen Herstellers sind bei gesunden Menschen Konzentrationen mit einer Spannweite von 2.100-4.190 pg/ml messbar [222]. So ist davon auszugehen, dass auch bei gesunden Pferden geringe Konzentrationen an sCD40L im Serum nachweisbar sein müssten, was im Rahmen der eigenen Untersuchung nicht gelang.

Auch in den mit Kollagen aktivierten Pferdeproben konnte kein sCD40L gemessen werden. In den *in vitro* Untersuchungen beim Mensch wurde das Kollagen in einer Konzentration von 10 µg/ml eingesetzt. Hierbei ist jedoch aus der Publikation nicht eindeutig zu entnehmen, ob es sich hierbei um die finale Testkonzentration oder die Konzentration der zugefügten Kollagenlösung handelt [216]. In der eigenen Untersuchung betrug die finale Konzentration des Kollagens 1,6 µg/ml. Im Rahmen der Etablierung des Multiplate® Analyser zur Ermittlung der Thrombozytenfunktion beim Pferd hatte sich gezeigt, dass bei Pferden deutlich geringere Konzentrationen an Kollagen im Vergleich zum Menschen notwendig waren, um eine Thrombozytenaggregation zu erreichen (s. 3.1.2.2, S. 45). Zudem konnte in einer weiteren Untersuchung an equinen Thrombozyten gezeigt werden, dass eine Konzentration von 1 µg/ml Kollagen eine annähernd 100 %ige Aggregation der Thrombozyten im PRP verursacht [120]. Weiterhin gilt es zu berücksichtigen, dass beim Menschen die Art und der Ursprung des verwendeten Kollagens einen erheblichen Einfluss auf das Maß der Aggregation haben [299]. Bei dem in der eigenen Untersuchung verwendeten Kollagen handelt es sich um Kollagen Typ I aus equinen Sehnen, wodurch ein maximaler Effekt auf die Aggregation erwartet werden kann. So kann man davon ausgehen, dass auch mit der im Vergleich zum Menschen niedrigen Konzentration von Kollagen ein Anstieg der Serumkonzentration sCD40L hätte erfolgen müssen, was nicht der Fall war.

***Mit dem hier verwendeten ELISA zum Nachweis von humanem sCD40L lässt sich beim Pferd die mutmaßlich im Serum vorliegende lösliche Form des Glykoproteins CD40L nicht nachweisen. Ursache ist sehr wahrscheinlich eine mangelnde Kreuzreaktivität des equinen CD40L und des im Test verwendeten Antikörpers. In weiteren Untersuchungen könnte geprüft werden, ob die in ELISAs anderer Hersteller verwendeten Antikörper eine Kreuzreaktivität aufweisen. Darüber hinaus könnte unter Verwendung des in der eigenen Untersuchung in der Fluoreszenz-Durchflusszytometrie erfolgreich eingesetzten Antikörpers gegen murines CD40L ein pferdespezifischer ELISA etabliert werden.***

### 5.1.4.2 sP-Selectin

Dass equine Thrombozyten nach Aktivierung CD62P exprimieren, konnte im Rahmen der eigenen Untersuchungen mittels Fluoreszenz-Durchflusszytometrie (s. 4.1.3.1, S. 82) sowie in weiteren Studien gezeigt werden [3,191,192,196]. Die Reaktionen nach Aktivierung verlaufen beim Menschen analog zum CD40L, so dass sich die Konzentration des löslichen Glykoproteins nach 10 Minuten etwa verdoppelt [217]. Auch beim sP-Selectin kann angenommen werden, dass der Prozess beim Pferd in vergleichbarer Weise verläuft. Laut Datenbank UniProt ([www.uniprot.org](http://www.uniprot.org)) besteht zwischen humanem und equinem CD62P eine Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz von 79,88 %, so dass auch hier die Möglichkeit einer Kreuzreaktivität eines humanen Antikörpers mit dem equinen CD62P besteht. Dies bestätigte sich im Rahmen der eigenen Untersuchungen mittels Fluoreszenz-Durchflusszytometrie, wo ein monoklonaler Antikörper gegen humanes CD62P aus dem Kaninchen zum Einsatz kam und bereits vom Hersteller eine Kreuzreaktivität mit equinem CD62P angegeben war. Gleichwohl ließ sich in den Pferdeproben mit dem Human sP-Selectin/CD62P Immunoassay (BBE6; R&D Systems Inc.) auch kein sP-Selectin nachweisen. Detaillierte Informationen zu dem im Test verwendeten Antikörper gegen CD62P sind nicht erhältlich, so dass ein direkter Vergleich mit den Ergebnissen der Fluoreszenz-Durchflusszytometrie nicht möglich ist. Equines CD62P ist nach Kenntnis der Autorin kommerziell nicht erhältlich, so dass der Test nicht mit dem reinen equinen Protein überprüft werden konnte.

Ein grundlegender Fehler in der Messmethodik und Testdurchführung kann ausgeschlossen werden, da bei den Standards und der Kontrolle die zu erwartenden Messwerte erreicht wurden. Die Wiederfindung des zugesetzten humanen sP-Selectin ergab nicht zufriedenstellende Mittelwerte von 59,9 % bei der Kontrolle, sowie 52,8 % und 56,7 % beim equinen Poolserum und -plasma. Die zum "Spiking" verwendete Lösung (Spiking Stock Solution) sollte dem 10-fachen der höchsten eingesetzten Konzentration der Standard-Reihe entsprechen. Für das sP-Selectin wurde hierbei der höchste Standard durch Zugabe von 100 µl statt 1000 µl Aqua destillata in Lösung gebracht, um eine Konzentration von 460 ng/ml zu erreichen. Mutmaßlich wurde durch das geringe Lösungsvolumen das in der Ampulle enthaltene lyophilisierte sP-Selectin nicht ausreichend in Lösung gebracht, so dass die gewünschte Konzentration der Spiking Stock Solution nicht erreicht wurde. Da die Rate der Wiederfindung im Poolserum und -plasma annähernd derer in der Kontrolle entsprach,

können Interferenzen zwischen dem eingesetzten Probenmaterial und den Testreagenzien hier weitgehend ausgeschlossen werden.

Die minimale nachweisbare Konzentration von sP-Selectin liegt bei dem ELISA nach Angaben des Herstellers unter 0,5 ng/ml. Bei gesunden Menschen können gemäß Untersuchungen des Herstellers im Serum im Mittel Konzentrationen von 82 ng/ml gemessen werden. Die Spannweite der Messwerte liegt hierbei zwischen 51-113 ng/ml (Quelle: Testanleitung). Gleiches zeigte sich auch bei Verwendung eines ähnlichen ELISA des gleichen Herstellers mit Konzentrationen von  $97,7 \pm 35,9$  ng/ml [221]. So ist davon auszugehen, dass auch bei gesunden Pferden geringe Konzentrationen im Serum nachweisbar sein müssten, was im Rahmen der eigenen Untersuchung nicht gelang.

Auch in den mit 1,6 µg/ml Kollagen aktivierten Pferdeproben konnte kein sP-Selectin nachgewiesen werden. In einer Untersuchung humaner Proben war jedoch bereits eine Konzentration von 0,25 µg/ml Kollagen ausreichend, um eine Erhöhung der Konzentration sP-Selectin um 50 % zu erreichen [217].

***Mit dem hier verwendeten ELISA zum Nachweis von humanem sCD62P lässt sich beim Pferd die mutmaßlich im Serum vorliegende lösliche Form des Glykoproteins CD62P nicht nachweisen. Ursache ist sehr wahrscheinlich eine mangelnde Kreuzreaktivität des equinen CD62P und des im Test verwendeten Antikörpers. In weiteren Untersuchungen könnte geprüft werden, ob die in ELISAs anderer Hersteller verwendeten Antikörper gegen humanes CD62P eine Kreuzreaktivität aufweisen. Darüber hinaus könnte unter Verwendung des in der eigenen Untersuchung in der Fluoreszenz-Durchflusszytometrie erfolgreich eingesetzten Antikörpers gegen humanes CD62P ein pferdespezifischer ELISA etabliert werden.***

### 5.2 Thrombozytopenie und Thrombozytose bei Klinikpatienten (2008 - 2015)

#### 5.2.1 Thrombozytopenie

In der vorliegenden Untersuchung wurde erstmalig gezeigt, dass die Prävalenz einer Thrombozytopenie beim Pferd in einer internistisch orientierten Patientenpopulation einer Überweisungsklinik in Deutschland bei 3,4% (123/3.592) liegt. Vergleichbare Daten lagen bislang lediglich aus einer ca. 20 Jahre alten US-amerikanischen Studie von Sellon et al. vor [87]. Mit 3,4% sind Thrombozytopenien beim Pferd deutlich seltener zu beobachten als bei anderen Spezies wie z. B. dem Hund: So wurden bei 9,6 % der internistischen Patienten der Klinik für Kleintiere der JLU Gießen mit dem ADVIA® 2120 Thrombozytenzahlen von unter  $150 \times 10^9/l$  gemessen (110/1149, Jahr 2014, unveröffentlichte Daten).

Bei knapp der Hälfte der thrombozytopenischen Pferde (49 %, 60/123) konnte die im EDTA-Blut gemessene Thrombozytopenie durch eine Zählung im Zitratblut oder durch eine manuelle Blutausrichbeurteilung bestätigt werden. So ergab sich für 1,7 % (60/3.592) der hämatologischen Untersuchungen eine echte Thrombozytopenie. Dieser Anteil stimmt in etwa mit der Prävalenz der US-amerikanischen Studie von Sellon et al. überein, in der bei 1,49 % der Klinikpatienten (35/2.346) eine echte Thrombozytopenie ermittelt wurde [87]. Die geringe Differenz ist neben einem unterschiedlichen Patientengut in den Kliniken vermutlich auch dadurch zu erklären, dass Sellon et al. ein niedrigeres unteres Referenzlimit von  $75 \times 10^9/l$  wählten und alle Messungen mit Hinweis auf Thrombozytenaggregate im Blutausrich ausgeschlossen wurden. Für die eigene Untersuchung ergibt sich bei einem entsprechenden unteren Referenzlimit von  $75 \times 10^9/l$  eine nahezu identische Prävalenz von 1,53 % (55/3.592). Gastrointestinale Erkrankungen und Entzündungen/Infektionen machten in der amerikanischen Studie mit 42 % und 11 % den größten Anteil der Diagnosen aus, wobei sich nur ein Pferd mit einer Neoplasie fand. Auf den ersten Blick scheinen sich diese Zahlen sehr deutlich von den Ergebnissen der eigenen Untersuchung zu unterscheiden, jedoch erfolgte die Einteilung der Patienten in die Gruppen nach anderen Kriterien. So wurden z. B. Enteritiden in die Gruppe der gastrointestinalen Erkrankungen eingruppiert, wohingegen diese in der eigenen Untersuchung den Entzündungen zugeordnet wurden.

Von Sellon et al. wurde mit 57 % (20/35) im Vergleich zu 37 % (22/60) in der eigenen Untersuchung eine deutlich höhere Mortalität ermittelt. Dies gilt jedoch nicht nur für die Pferde mit Thrombozytopenie: In der Vergleichspopulation waren es 21 % im Vergleich zu

13 % in der eigenen Untersuchung [87]. Schließt man zudem die Neonaten, von denen keiner mit neonataler Septikämie überlebte aus der Berechnung aus, sinkt die Mortalität bereits um 5 %-Punkte auf 52 %. Der bleibende Unterschied könnte in einer seit 1996 erheblich verbesserten medizinischen Versorgung von Pferdepatienten begründet sein. Darüber hinaus werden Pferde in den letzten Jahrzehnten von ihren Besitzern zunehmend als Familienmitglied eingeordnet, wodurch möglicherweise die Bereitschaft, höhere Diagnostik- und Therapiekosten zu tragen, gestiegen ist.

In der eigenen Untersuchung traten echte Thrombozytopenien insbesondere bei systemischen entzündlichen Erkrankungen und bei Neoplasien, mutmaßlich aufgrund einer sekundären immunvermittelten Zerstörung, auf. Beide Gruppen wiesen im Median niedrigere, statistisch jedoch nicht signifikante Thrombozytenzahlen auf als die anderen Diagnosegruppen (Abbildung 22, S. 91). Zudem wurden bei den Entzündungen und den Neoplasien mit 32 % bzw. 91 % die höchsten Mortalitätsraten ermittelt, so dass das Auftreten einer Thrombozytopenie bei schwerkranken Patienten negativ prognostisch zu werten ist. Dies spiegelt sich auch in einer OR von 3,7 für die Mortalität bei Vorliegen einer Thrombozytopenie wider. Die Ergebnisse der US-amerikanischen Untersuchung bestätigten dies: Das Vorliegen einer Entzündung konnte auch hier als Risikofaktor identifiziert werden [87]. Der Schweregrad der Thrombozytopenie ließ hingegen keinen Rückschluss auf das Überleben zu, ein signifikanter Unterschied in der Thrombozytenzahl in Abhängigkeit des Überlebens konnte nicht berechnet werden. Gleiches zeigte sich in der Studie von Sellon et al. [87] (Abbildung 52).

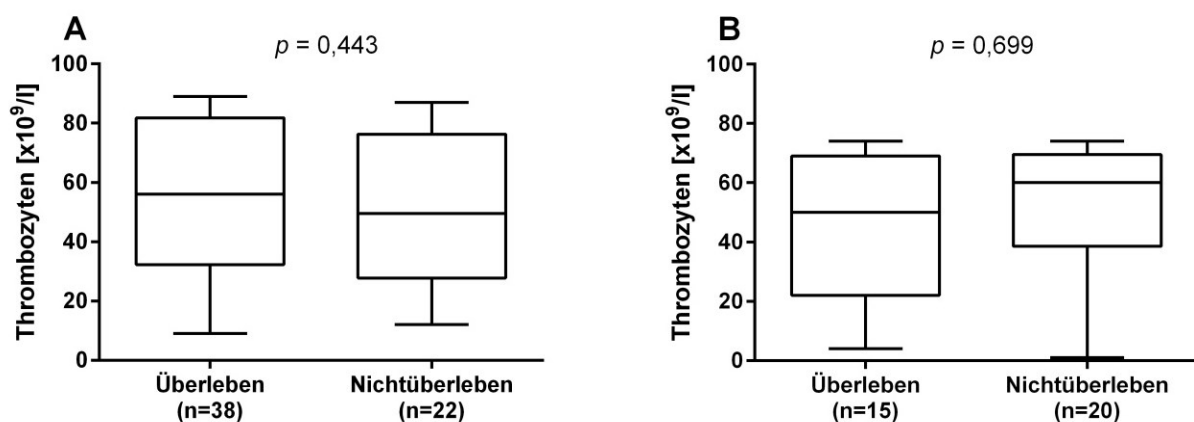


Abbildung 52: Thrombozytopenie und Thrombozytose bei Klinikpatienten (2008 - 2015) - Diskussion: Thrombozytenzahlen bei eigenen Patienten (A) und Patienten von Sellon et al. [87] (B) mit Thrombozytopenie in Abhängigkeit vom Überlebenden; (Median, 25/75%, min-max)

Die Prävalenz einer EDTA-induzierten Thrombozytopenie wurde in der eigenen Untersuchung für das Pferd erstmals evaluiert und liegt in der gesamten Studienpopulation bei 0,17 % (6/3.592). Dies entspricht weitestgehend den Prävalenzen beim Menschen von 0,09 % [300] bis 0,27 % [301]. Bei den klinisch unauffälligen erwachsenen 60 Pferden und 60 Kleinpferden wurde ein deutlich höheres Vorkommen von 5 % bei den Pferden und 3 % bei den Kleinpferden ermittelt (s. 5.1.1.1, S. 75). Das höhere Vorkommen bei den klinisch unauffälligen Pferden und Ponys ist mutmaßlich darauf zurückzuführen, dass bei diesen Probanden sowohl K<sub>3</sub>-EDTA- als auch Zitratblut untersucht wurden. In der retrospektiven Auswertung wurde lediglich bei 28 der 123 Pferde mit Thrombozytopenie eine Zitratprobe untersucht. Dies erklärt auch den mit 46 % (57/122) großen Anteil an Pferden, die in die Gruppe der fraglichen Thrombozytopenien zugeordnet wurden, da eine EDTA-PTCP hier nicht sicher ausgeschlossen werden konnte. Darüber hinaus war in dieser Gruppe eine eindeutige Zuordnung zur Gruppe der echten Thrombozytopenien aufgrund fehlender oder nicht eindeutiger manueller Quantifizierung anhand eines Blutausriches nicht möglich. Dies stellt grundsätzlich eine Limitierung der retrospektiven Untersuchung dar, da es sich bei der Beurteilung des Blutausriches um eine subjektive, nicht standardisierte, semiquantitative Einschätzung der Anzahl der Thrombozytenaggregate ohne inter- und intraindividuelle Qualitätskontrolle handelte. So lässt sich vermuten, dass die retrospektiv ermittelte Prävalenz der EDTA-PTCP von 0,17 % falsch niedrig ist, und die tatsächliche Prävalenz eher derer bei den jeweils 60 klinisch unauffälligen Kleinpferden und Warmblütern ermittelten 3 bzw. 5 % entspricht. Ein weiterer Hinweis auf eine falsch niedrige Prävalenz in der Gesamtpopulation spiegelt sich auch im eher geringen Anteil der EDTA-PTCP von 5 % (6/123) aller Thrombozytopenien wider. Betrachtet man humane Patienten mit Thrombozytenzahlen  $< 100 \times 10^9/l$ , liegt der Anteil der EDTA-PTCP hier zwischen 15,3 und 17 % [302,303]. Die EDTA-PTCP tritt beim Menschen zu ca. 60 % bei Frauen auf [97,100], für Equiden konnte dies in der eigenen Untersuchung nicht bestätigt werden. Bei den Individuen der retrospektiven Untersuchung handelte es sich um 4 Wallache und 2 Stuten, beim Antikoagulansvergleich waren es 3 Wallache und 2 Stuten.

Der große Anteil fraglicher Thrombozytopenien mit Nachweis zahlreicher Aggregate im Ausstrich kann auch lagerungsbedingt sein. Die Bildung von Aggregaten nimmt bei der EDTA-PTCP innerhalb von 2 Stunden nach Blutentnahme deutlich zu, so dass die Thrombozytenzahl beim Menschen im Mittel um 49,3 % reduziert ist [300]. Aufgrund dessen wird ein

fortschreitender Abfall der Thrombozytenzahl bei wiederholten Messungen aus EDTA-Blut nach Lagerung der Probe bei Raumtemperatur unter anderem zum Nachweis der EDTA-PTCP beim Menschen verwendet [101]. Die Zeitspanne zwischen Blutentnahme und Messung der Thrombozytenzahl wurde bei den eigenen Patienten nicht dokumentiert. Es ist jedoch anzunehmen, dass die Mehrzahl der Messungen sowie die Anfertigung eines Blutausstriches in einem Zeitrahmen von 1 bis 3 Stunden nach Blutentnahme erfolgten. Da im Routinebetrieb eines Labors eine Messung der Thrombozytenzahl innerhalb von 10 Minuten nach Blutentnahme nicht realisierbar ist, stellt die Messung der Zellzahl im Zitratblut sehr wahrscheinlich eine erheblich verlässlichere Methode dar. Hierbei ist jedoch zu berücksichtigen, dass diese Untersuchung möglichst innerhalb von 4 Stunden durchgeführt werden sollte. Bei längerer Lagerung reduziert sich die Zahl der Thrombozyten beim Pferd um 20 % innerhalb von 6 Stunden und 25 % innerhalb von 24 Stunden [86].

Das Erkennen einer EDTA-PTCP ist insbesondere von Bedeutung, wenn hierdurch eine aufwändige Diagnostik im Sinne einer Knochenmarkbiopsie sowie eine mit möglicherweise erheblichen Nebenwirkungen einhergehende immunsuppressive Therapie, wie im Fallbericht eines Pferdes [304] beschrieben, vermieden werden kann. In dem vorgenannten Fallbericht wurde von den Autoren diskutiert, ob die Pathogenese der EDTA-PTCP beim Pferd von der des Menschen (s. 2.2.1.3, S. 18) abweichen könnte. Diese Annahme beruht auf der Beobachtung, dass das EDTA-Plasma des betroffenen Pferdes im plättchenreichen Plasma eines Kontrollpferdes keine Thrombozytenaggregation verursachte. Allerdings wurde das Plasma des Patienten mit EDTA-PTCP 5 Tage nach der letzten Gabe von 0,08 mg/kg Dexamethason gewonnen, was möglicherweise immunologische Vorgänge beeinflusst haben könnte. Da es sich bei der eigenen Untersuchung um eine retrospektive Auswertung handelte, wurde der Mechanismus der EDTA-PTCP nicht untersucht.

Beim Menschen konnte gezeigt werden, dass der ADVIA® 2120 in der Diagnostik der EDTA-PTCP hilfreich sein kann: Clumps, MPV und PDW sind im K<sub>3</sub>-EDTA-Blut signifikant höher als bei echten Thrombozytopenien [102]. In der eigenen Untersuchung konnte dies für die Clumps und den MPV beim Pferd nicht bestätigt werden. Aufgrund der Problematik bei der Berechnung der PDW (s. 4.1.1.3, S. 77) wurde diese nicht ausgewertet. Der MPV lag, wenngleich statistisch nicht signifikant, bei der EDTA-PTCP im Median sogar etwas niedriger als bei den echten Thrombozytopenien, die Anzahl der Clumps hingegen war im Median bei der EDTA-PTCP deutlich höher, jedoch konnte auch hier kein signifikanter Unterschied

## 5 Diskussion

berechnet werden (Abbildung 53). Dies könnte auf die geringere Anzahl an Probanden im Vergleich zu der Untersuchung beim Menschen - 11 versus 25 - zurückzuführen sein.

Bei der Betrachtung der Einzeldaten der Pferde zeigte sich, dass die Anzahl an Clumps bei den echten Thrombozytopenien lediglich bei 3 von 22 Pferden über 220 lag, bei der EDTA-PTCP lagen 6 von 11 Pferden über diesem Wert. Jedoch lässt sich für eine Anzahl von 250 Clumps lediglich eine Sensitivität von 54,6 %, eine Spezifität von 86,7 % und eine sehr schwache positive Likelihood ratio von 4 berechnen. Gleichwohl könnte eine gemessene Anzahl von 250 Clumps und mehr hinweisend für das Vorliegen einer EDTA-PTCP sein, so dass eine Messung der Thrombozytenzahl im Zitratblut insbesondere bei diesen Individuen anzuraten ist.

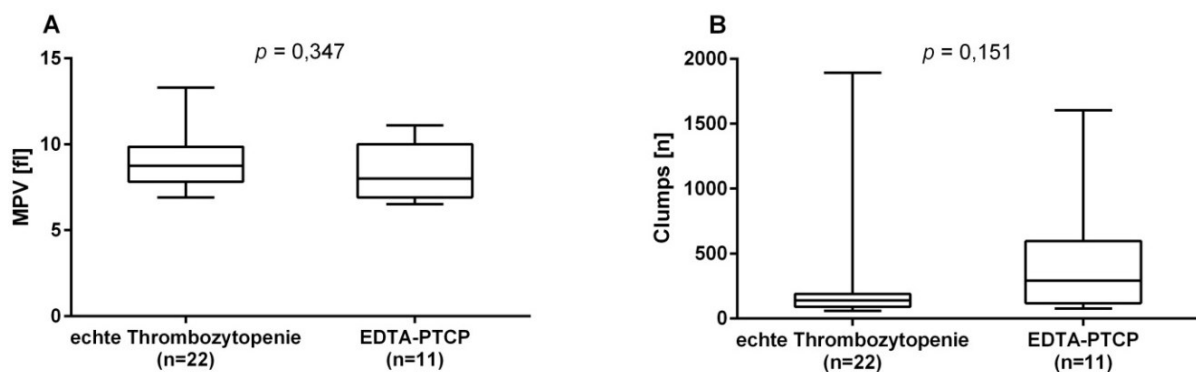


Abbildung 53: Thrombozytopenie und Thrombozytose bei Klinikpatienten (2008 - 2015)- Diskussion: MPV (A) und Clumps (B) im K<sub>3</sub>-EDTA-Blut am ADVIA® 2120 bei Pferden mit echter Thrombozytopenie und Pferden mit EDTA-PTCP; (Median, 25/75%, min-max)

Lediglich 2 der 60 Pferde mit echter Thrombozytopenie wurden aufgrund von klinischen Symptomen einer Blutungsneigung, in beiden Fällen Epistaxis, in der Klinik vorgestellt. Auch bei der klinischen Untersuchung bei Aufnahme konnten lediglich bei weiteren 6 Pferden Petechien bzw. in einem Fall Schleimhautblutungen im Pharynx gefunden werden. Die insgesamt 8 Pferde zeigten Thrombozytenzahlen zwischen  $9 \times 10^9/l$  und  $43 \times 10^9/l$ . Eine klinisch relevante positive Likelihood ratio von 13 für das Aufweisen von Symptomen einer Thrombozytopenie mit einer Sensitivität von 50% und einer Spezifität von 96% konnte für eine Thrombozytenzahl von  $< 16 \times 10^9/l$  berechnet werden. Dies entspricht Angaben in der veterinärmedizinischen Literatur, dass ab einer Thrombozytenzahl unter  $50 \times 10^9/l$  mit Blutungen zu rechnen ist und ein hochgradiges Blutungsrisiko für Thrombozytenzahlen kleiner als  $10 \times 10^9/l$  besteht [305]. Das Fehlen von klinisch sichtbaren Blutungen insbesondere im Bereich der Schleimhäute am Kopf auch bei sehr niedrigen Thrombozytenzahlen könnte mit

dem Fehlen einer lokalen entzündlichen Reaktion in diesem Bereich erklärt werden. So konnte experimentell bei Mäusen gezeigt werden, dass auch bei hochgradigen Thrombozytopenien lediglich in den Bereichen einer lokalen Vaskulitis Hämorrhagien auftraten [306]. So treten auch beim Pferd petechiale Blutungen insbesondere bei Erkrankungen einhergehend mit einer Vaskulitis wie z. B. beim Morbus maculosus [307] oder der Sepsis [308] auf.

In der eigenen Untersuchung lagen jedoch auch bei 14 Patienten ohne klinische Anzeichen einer Blutungsneigung die Thrombozytenzahlen unter  $44 \times 10^9/l$ . Die niedrigsten Thrombozytenzahlen waren hier 9, 10, 16 und  $17 \times 10^9/l$ , wobei im Blutausstrich jeweils keine bzw. in einem Fall sehr wenige Aggregate vorlagen. In keinem der 4 Fälle wurde Zitratblut untersucht. Bei 2 dieser Pferde (PLT 9 bzw.  $17 \times 10^9/l$ ) wurde eine akute Enteritis diagnostiziert, welche mit einer immunvermittelten Thrombozytopenie einhergehen könnte. Bei den anderen beiden Pferden wurde eine chronische Bronchitis bzw. eine Chondritis der Aryknorpel diagnostiziert, wobei für beide ein ätiologischer Zusammenhang mit einer Thrombozytopenie unwahrscheinlich erscheint. Möglicherweise lag bei diesen Pferden eine EDTA-PTCP vor, die mangels Untersuchung in Zitratblut nicht erkannt wurde. Zugleich lässt das dokumentierte Fehlen von Aggregaten bzw. eine lediglich sehr geringe Anzahl an Aggregaten im Blutausstrich in diesen beiden Fällen an der Validität der Beurteilung eines Blutausstriches in der Diagnostik der EDTA-PTCP zweifeln.

***Erstmals konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass Thrombozytopenien beim Pferd im Patientengut einer internistischen Klinik in Deutschland mit einer Prävalenz von 3,4 % im Vergleich mit anderen Spezies deutlich seltener auftreten. Da es sich um ein bereits vorselektiertes Patientenmaterial handelt, ist anzunehmen, dass die Prävalenz in der gesamten Pferdepopulation deutlich geringer ist. In Verbindung mit systemischen Entzündungen sowie Neoplasien ist eine Thrombozytopenie negativ prognostisch. Der Schweregrad der Thrombozytopenie lässt jedoch keine Rückschlüsse auf das Überleben zu. Erstmals wurde zudem mit bis zu 5 % die Prävalenz einer EDTA-PTCP bei Equiden ermittelt. Diese sollte insbesondere bei einer Thrombozytenzahl  $< 16 \times 10^9/l$  ohne klinische Anzeichen einer Blutungsneigung in Betracht gezogen werden. Gleiches gilt für das Auftreten von  $> 250$  Clumps (Thrombozytenaggregate) in Messungen mit dem ADVIA® 2120. Verifizieren lässt sich die EDTA-PTCP durch eine Messung aus mit Zitrat antikoaguliertem Blut innerhalb von 4 bis 6 Stunden nach Blutentnahme.***

### 5.2.2 Thrombozytose

In der vorliegenden Untersuchung wurde erstmals gezeigt, dass die Prävalenz einer Thrombozytose beim Pferd in einer internistisch orientierten Patientenpopulation einer Überweisungsklinik in Deutschland bei 3,1% (111/3.592) liegt. Sie liegt damit deutlich über den 1 % der bislang einzigen Untersuchung zur Prävalenz bei Equiden durch die US-amerikanische Autorengruppe um D.C. Sellon [104]. Allerdings wurden in der vorgenannten Studie Patienten mit Thrombozytenzahlen über  $400 \times 10^9/l$  als Thrombozytose gewertet. Das Referenzintervall wurde hierbei mit  $75 - 300 \times 10^9/l$  angegeben, eine Erklärung für die Wahl von  $400 \times 10^9/l$  Thrombozyten als Einschlusskriterium ist in der Publikation nicht formuliert. In der eigenen Untersuchung erfüllen lediglich 10 Pferde letzteres Kriterium, was eine Prävalenz von 0,3 % ergeben würde.

Analog zur Thrombozytopenie traten erhöhte Thrombozytenzahlen insbesondere bei entzündlichen Erkrankungen (46 %) und bei Neoplasien (10 %) auf. Dies entspricht den Ergebnissen der US-amerikanischen Studie, bei der insbesondere das Vorliegen einer Entzündung mit einer Odds ratio von 9,9 als Risikofaktor identifiziert werden konnte [104]. Vergleichbare Zahlen wurden auch für den Menschen publiziert, hier wurde in 30 % eine Infektion bzw. Entzündung und in 11 % eine Neoplasie diagnostiziert [106]. Beim Menschen konnte gezeigt werden, dass die vermehrte Bildung der Thrombozyten im Rahmen der systemischen Akut-Phase-Reaktion durch eine Erhöhung der Konzentrationen thrombopoetischer Faktoren, insbesondere dem Interleukin 6 (IL-6), induziert wird [105]. Eine erhöhte Konzentration von IL-6 nach intravenöser Gabe von LPS als standardisiertes Entzündungsmodell konnte beim Pferd gezeigt werden [309]. Eine hierdurch induzierte Thrombopoese wurde beim Pferd nicht untersucht, kann jedoch als wahrscheinliche Ursache für die Mehrzahl der Thrombozytosen im Sinne einer sekundären, reaktiven Thrombozytose vermutet werden. Sellon et al. ermittelten einen engen Zusammenhang von Thrombozytose und erhöhter Plasmakonzentration an Fibrinogen als Zeichen der Akut-Phase-Reaktion [104]. In der eigenen Untersuchung konnte dies nicht nachgewiesen werden. Betrachtet man die 10 Pferde, welche den Einschlusskriterien der US-amerikanischen Studie entsprechen, zeigte sich im Gegenteil ein Trend einer negativen Korrelation zwischen Thrombozytenzahl und Fibrinogen (Abbildung 54). Dies könnte auf die mäßige Sensitivität der Fibrinogenkonzentration in der Diagnostik entzündlicher Erkrankungen beim Pferd

zurückzuführen sein [310]. Eine Messung der Serumkonzentration des erheblich sensitiveren SAA wurde lediglich bei einem der 10 Pferde durchgeführt.

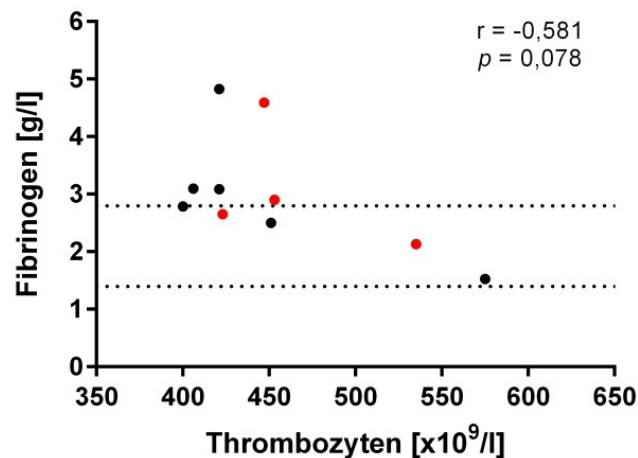


Abbildung 54: Thrombozytopenie und Thrombozytose bei Klinikpatienten (2008 - 2015) - Diskussion: Korrelation von Thrombozytenzahl und Plasmakonzentration von Fibrinogen (gepunktete Linien: unteres/oberes Referenzlimit) bei Patienten mit Thrombozytose, rote Punkte: Nichtüberlebende (Statistik: GraphPad Prism 6)

Bei Messungen der Thrombozyten mit dem ADVIA® 120 wurden beim Pferd in der Vergangenheit lagerungsbedingte Pseudothrombozytosen beschrieben [311]. Verursacht wurde dies durch eine Erhöhung an Erythrozyten-Ghosts, welche als Thrombozyten gezählt wurden. Erkennbar war dies sowohl im THROMBO-Streulicht-Zytogramm (vgl. Abbildung 36, S. 110) als auch im Thrombozyten-Volumen-Histogramm (vgl. Abbildung 17, S. 78). Nach einer Softwarekorrektur war diese Fehleinordnung behoben. In der eigenen Untersuchung wurden alle 111 Zytogramme kontrolliert, vergleichbare Abweichungen konnten nicht festgestellt werden, so dass ein Messfehler als Ursache der Thrombozytose auszuschließen ist.

Beim Menschen konnte gezeigt werden, dass in der Milz ein Thrombozytenpool vorhanden ist, welcher mittels Infusion von Epinephrin freigesetzt wird und zu einer Erhöhung der Thrombozytenzahl um ca. 40 % führt [312]. Beim Pferd konnten gleiche Reaktionen der Erythrozyten nachgewiesen werden [313]. In Lehrbüchern wird eine mit den Erythrozyten vergleichbare Speicherung von Thrombozyten postuliert und mit einer Thrombozytose bedingt durch Aufregung in Verbindung gebracht [246,314], entsprechende Untersuchungen liegen nach Kenntnis der Autorin jedoch nicht vor. Möglicherweise ist diese Annahme Grundlage der 30 % über dem oberen Referenzlimit liegenden Thrombozytenzahl als Einschlusskriterium der Untersuchung von Sellon et al. [104].

## 5 Diskussion

In der eigenen Untersuchung und der von Sellon et al. [104] war in der Gruppe der Thrombozytosen zum einen der Anteil von Hengsten signifikant höher als in der Vergleichspopulation, zum anderen waren die Pferde in der eigenen Untersuchung signifikant jünger, bzw. das Alter von unter einem Jahr wurde von Sellon et al. als Risikofaktor identifiziert. Beide Beobachtungen stehen mutmaßlich in direktem Zusammenhang: Untersuchungen bei Fohlen konnten zeigen, dass die Thrombozytenzahl bis zum Alter von 30 Tagen signifikant höher ist als bei erwachsenen Pferden ( $245 \pm 59$  vs.  $153 \pm 49 \times 10^9/l$ ) [315]. Bis zu welchem Alter dieser Unterschied bestehen bleibt, ist nicht bekannt. In der eigenen Untersuchung waren unter den Pferden mit Thrombozytose 4 Fohlen im Alter zwischen 25 und 30 Tagen, welche möglicherweise lediglich aufgrund ihres Alters das Einschlusskriterium erfüllten. Die Abhängigkeit der Thrombozytenzahl vom Alter erklärt auch den höheren Anteil an Hengsten in der Gruppe der Thrombozytosen: Bis zu einem Alter von ca. 2 Jahren gibt es bei Pferden in der Regel lediglich Hengste und keine Wallache.

Die Mortalität lag in der eigenen Untersuchung bei den Thrombozytosen bei 25 %. Vergleichbare Ergebnisse erbrachte auch die US-amerikanische Studie von Sellon et al. mit einer Mortalität von 33 %. Isoliert man aus der eigenen Untersuchung die Patienten mit einer Thrombozytenzahl von über  $400 \times 10^9/l$  wie bei Sellon et al., steigt die Mortalität auf 40 %. Der Schweregrad der Zellzahlabweichung in der eigenen Untersuchung und der von Sellon et al. ließ jedoch keine Rückschlüsse auf das Überleben zu (Abbildung 55).

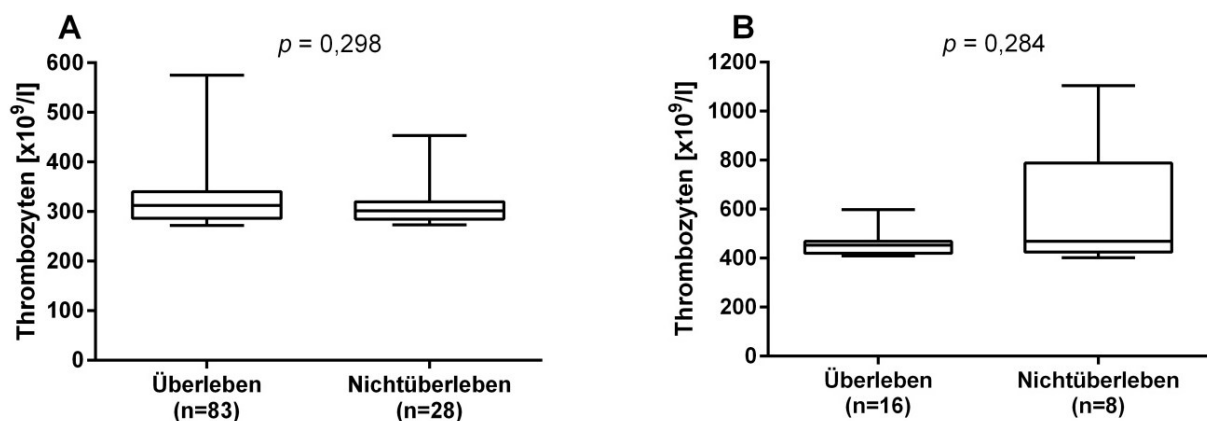


Abbildung 55: Thrombozytopenie und Thrombozytose bei Klinikpatienten (2008 - 2015) - Diskussion: Thrombozytenzahlen bei eigenen Patienten (A) und Patienten von Sellon et al. [104] (B) mit Thrombozytose in Abhängigkeit vom Überlebenden; (Median, 25/75%, min-max)

*Erstmals konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass Thrombozytosen beim Pferd im Patientengut einer internistischen Klinik in Deutschland mit einer Prävalenz von 3,1 % auftreten. Aufgrund der Vorselektion ist anzunehmen, dass die Prävalenz in der gesamten Pferdepopulation geringer ist. In Verbindung mit systemischen Entzündungen sowie Neoplasien ist eine Thrombozytose negativ prognostisch. Der Schweregrad der Thrombozytose hingegen lässt keine Rückschlüsse auf das Überleben zu.*

### 5.3 Thrombozytenfunktion bei Equiden mit systemischer Entzündung (SIRS)

#### 5.3.1 Probanden

Die für die eigene Untersuchung gewählten SIRS-Kriterien wurden an die Parameter in der humanen S2k-Leitlinie [226] entsprechend der physiologischen Unterschiede bei Pferden angepasst und mit weiteren Variablen ergänzt. Die ergänzten Variablen Thrombozytenzahl, Laktat und Bikarbonat wurden basierend auf den in der Leitlinie formulierten Kriterien der "Organkomplikation" als Einschlusskriterien gewählt: Akute Enzephalopathie; arterielle Hypotension und Schock; relative oder absolute Thrombozytopenie; arterielle Hypoxämie; renale Dysfunktion sowie metabolische Azidose.

Bei Einschränkung der Kriterien auf die in der Leitlinie aufgeführten (Pulsfrequenz, Atemfrequenz, Temperatur und Leukozytenzahl) hätten gleichwohl 18 der 20 Probanden die Einschlusskriterien erfüllt. Diese Individuen wären auch bei der Verwendung der von anderen Autoren bei erwachsenen Equiden gewählten SIRS-Kriterien [178,232,233] eingeschlossen worden (Tabelle 41). Die in der eigenen Untersuchung gewählten erweiterten SIRS-Einschlusskriterien Thrombozytenzahl, Laktat und Bikarbonat verursachen somit sehr wahrscheinlich keinen Bias im Vergleich mit anderen humanen oder veterinärmedizinischen Studien.

Die Grenzwerte der SIRS-Kriterien in der eigenen Untersuchung wurden im Vergleich mit denen anderer equiner Studien überwiegend mit einer größeren Abweichung von den physiologischen Parametern festgelegt (Tabelle 41). So lässt sich mutmaßen, dass in die eigene Untersuchung eher schwerer erkrankte Equiden eingeschlossen wurden.

Tabelle 41: Thrombozytenfunktion bei Equiden mit systemischer Entzündung (SIRS): Kriterien und deren Grenzwerte zur Erfüllung des Vorliegens eines SIRS bei erwachsenen Equiden

Körperinnen- temperatur [°C]	Herzfrequenz Schläge/min	Atemfrequenz Züge/min	Leukozyten [x10 <sup>9</sup> /l]	Quelle
≥ 38,6	≥ 60	≥ 30	≤ 4,5 oder ≥ 12,5	[178]
< 37,0 > 38,5	> 50	> 20	< 5,0 oder > 12,5	[233]
< 37,0 > 38,5	> 52	> 20	< 5,0 oder > 12,5	[232]
< 36,0 > 39,0	> 52	> 24	< 3,0 oder > 15	eigene

Der Begriff SIRS mit den entsprechenden Definitionskriterien wurde 1991 in der Humanmedizin als Überbegriff für Erkrankungen einhergehend mit organischer Dysfunktion aufgrund bestätigter oder vermuteter Infektion eingeführt und sollte insbesondere die Diagnostik der Sepsis verbessern [225]. Es zeigte sich jedoch, dass durch die übermäßig sensitiven und unspezifischen Kriterien Schweregrad und prognostische Aussagen einer Infektion bzw. Sepsis nicht graduert werden konnten und dass SIRS weniger eine Sepsis denn eine unspezifische Aktivierung des Immunsystems beschreibt, welche nicht mit einer Infektion einhergehen muss [316]. Aus diesem Grund wurden seit Anfang dieses Jahrhunderts für den Menschen mit PIRO (predisposition, insult, response, organ dysfunction) und SOFA (sequential organ failure assessment) Kriterienkataloge etabliert, die es ermöglichen sollten, den Schweregrad einer Sepsis zu ermitteln, Prämorbiditäten zu erkennen und bessere prognostische Aussagen treffen zu können [316,317]. Da anders als bei SIRS bei PIRO/SOFA keine ja/nein-Entscheidung, sondern eine Graduierung der Erkrankung erfolgen sollte, müssen Erhebungen aller Einschlusskriterien vorliegen. Bei SOFA sind dies: Oxygenierungsindex nach Horowitz (Quotient aus  $p_aO_2$  und  $FiO_2$ ), arterieller Blutdruck, Thrombozytenzahl, Bilirubinkonzentration im Plasma/Serum, Glasgow Koma Score sowie Kreatininkonzentration im Plasma/Serum oder Urinvolumen [317]. Ein dem an den SOFA angenäherter Score wurde für das Pferd von McConachie et al. zur Erkennung eines Multiorganversagens in Folge einer chirurgischen gastrointestinalen Therapie erstellt [318].

Für den Hund wurden mit dem SPI (survival prediction index) und dem APPLE (Acute Patient Physiologic and Laboratory Evaluation) Scores entwickelt, welche unabhängig vom Vorliegen einer Sepsis den Schweregrad der Erkrankung beim caninen Patienten evaluieren können und prognostische Aussagen ermöglichen [319–321]. Darüber hinaus wurden für den Hund spezifische Scores zur Graduierung von akuten Nierenerkrankungen und Hitzschlag publiziert [322,323].

Für Equiden wurde von Brewer et al. in den 1980iger Jahren ein Score zur Diagnostik und Graduierung der Sepsis beim Fohlen vorgestellt. Dieser beinhaltete neben klinischen Vitalparametern eine Vielzahl hämatologischer und klinisch-chemischer Laborvariablen [324,325]. Insbesondere aufgrund der Vielzahl benötigter Laborvariablen hat sich der Score in der Praxis nicht durchgesetzt. Zudem zeigte sich im Rahmen von Reevaluationen, dass der Score auch aufgrund mäßiger Sensitivität und Spezifität für die Diagnostik und insbesondere Prognose einer Sepsis beim Fohlen mäßig geeignet war [326–328]. Weber et al. kamen zu der

Schlussfolgerung: *"Thus, clinicians may decide to use SIRS-based criteria in addition to a suspected infectious focus as a sepsis definition for future trials."* [326].

So ergab sich auch im Rahmen einer aktuellen umfangreichen Multicenter-Studie aus 2018 mit 273 Fohlen kein diagnostischer oder prognostischer Vorteil aus einem modifizierten Sepsis-Score im Vergleich zu den für Fohlen von Wong et al. [234] vorgeschlagenen SIRS-Kriterien: *"The updated sepsis scores did not provide improved ability in predicting sepsis. Fulfilling the original SIRS criteria provided similar sensitivity and specificity in predicting sepsis as the modified sepsis score and might serve as a diagnostic aid in identifying foals at risk for sepsis."* [329].

Somit kamen auch Studien, welche nach der Planung der eigenen Studie publiziert wurden, zu der Schlussfolgerung, dass - zumindest beim Fohlen - etablierte SIRS-Kriterien als Einschlusskriterien zukünftiger Studien geeignet sind.

Wenngleich die SIRS-Kriterien insgesamt nur eine geringe Spezifität aufweisen und zur Diagnostik spezifischer Erkrankungen ungeeignet sind, wurden sie in der Humanmedizin für eine Vielzahl prospektiver, kontrollierter klinischer Untersuchungen als Einschlusskriterien verwendet und ermöglichten auf diese Art eine gute Vergleichbarkeit der Daten. Zudem lassen sich im Rahmen solcher Untersuchungen Biomarker auf ihre Eignung in der Diagnostik der SIRS oder Sepsis überprüfen und gegebenenfalls in diagnostische Algorithmen integrieren [330].

***Es kann angenommen werden, dass die Aufnahme der Probanden anhand der gewählten SIRS-Kriterien in der eigenen Untersuchung geeignet war, die Bedeutung der Thrombozytenvariablen als Biomarker systemischer Entzündungen zu überprüfen.***

### 5.3.2 Labordiagnostik

#### 5.3.2.1 Laser-Durchflusszytometrie (ADVIA® 2120)

Bei den SIRS-Patienten kann man aufgrund der eigenen Messungen ebenso wie bei den klinisch unauffälligen Individuen (s. 5.1.1.1, S. 110) davon ausgehen, dass sich equine Thrombozyten weder durch K<sub>3</sub>-EDTA- noch durch Zitrat ausreichend aufkugeln lassen. Ein adäquates Sphäring der Thrombozyten ist gekennzeichnet durch eine PCDW  $\leq 5,5$  g/dl [266]. Weder bei den klinisch unauffälligen Equiden noch bei den SIRS-Patienten wurde dieser Wert erreicht oder unterschritten. So ist davon auszugehen, dass ein methodischer Fehler durch das mangelnde Aufkugeln in beiden Gruppen gleichermaßen zum Tragen käme. So konnten keine signifikanten Unterschiede der PCDW zwischen der Kontrollgruppe und den SIRS-Patienten ermittelt werden (Abbildung 56).

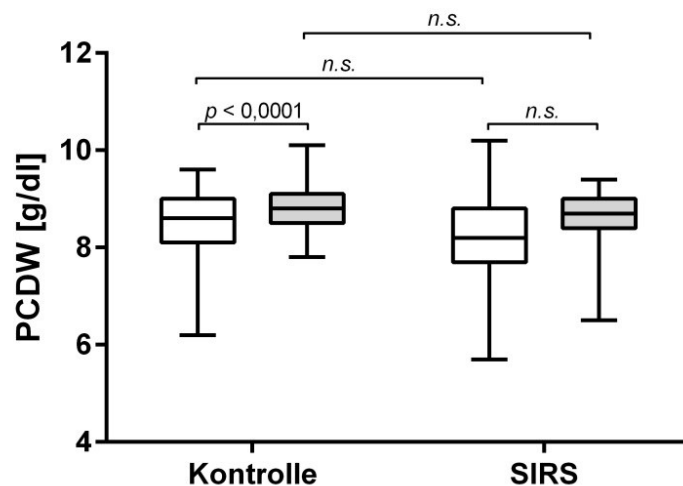


Abbildung 56: Thrombozytenfunktion bei Equiden mit systemischer Entzündung (SIRS): PCDW [g/dl] am ADVIA® 2120 im K<sub>3</sub>-EDTA-Blut (weiße Box) und Zitratblut (graue Box) der Kontroll- (n = 120) und der SIRS-Gruppe (n = 19); (Median, 25/75%, min-max)

Bei den SIRS-Probanden konnte mit 5,7 g/dl bei Patient 19 der niedrigste Wert der PCDW aller untersuchten Probanden gemessen werden. Betrachtet man das zugehörige Thrombozyten-Zytogramm (Abbildung 57), zeigt sich bei diesem Individuum eine im Vergleich zu der Messung aus Zitratblut deutlichere Bündelung der Thrombozyten vergleichbar mit Messungen beim Menschen (Abbildung 38, S. 112). Die Zytogramme der weiteren 19 Probanden mit diffuser Verteilung der Zellen sowohl im K<sub>3</sub>-EDTA- als auch im Zitratblut sind im Anhang abgebildet (Tabelle 12-28, S. 12-44).

## 5 Diskussion

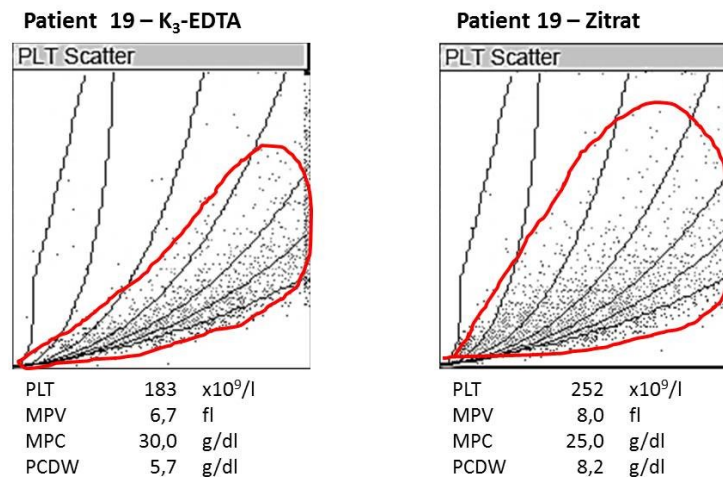


Abbildung 57: Thrombozytenfunktion bei Equiden mit systemischer Entzündung (SIRS): Thrombozyten-Zytogramme und -Variablen am ADVIA® 2120 mit dichterere Verteilung der Zellen im K<sub>3</sub>-EDTA im Vergleich zum Zitratblut (rote Markierungen) bei Patient 19

Bei den equinen SIRS-Patienten wurden im K<sub>3</sub>-EDTA-Blut im Vergleich zur Kontrollgruppe im Mittel signifikant weniger Thrombozyten gemessen. Dies bestätigt die Ergebnisse der retrospektiven Untersuchung zur Thrombozytopenie und Thrombozytose, im Rahmen derer eine Thrombozytopenie insbesondere bei Patienten mit systemisch entzündlichen Erkrankungen beobachtet werden konnte (s. 5.2, S. 144). Die angewandten SIRS-Kriterien in der retro- und der prospektiven Untersuchung waren hierbei identisch.

Ein SIRS-Proband (Patient 10) wurde aufgrund einer Thrombozytopenie in die Studie aufgenommen. Schließt man diesen aus der statistischen Auswertung aus, sind die Thrombozytenzahlen im K<sub>3</sub>-EDTA-Blut dennoch signifikant ( $p < 0,0001$ ) niedriger als bei den Kontrolltieren. Bei einem weiteren SIRS-Probanden (Patient 17) wurden die Einschlusskriterien durch abweichende Konzentrationen von Laktat und Bikarbonat im Plasma und zudem aufgrund einer Thrombozytopenie erfüllt. Wird auch dieser Patient aus der statistischen Auswertung ausgeschlossen, bleibt der Unterschied zwischen den SIRS-Probanden und den Kontrolltieren statistisch signifikant ( $p = 0,0001$ ).

Entgegen der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit konnte in der retrospektiven Untersuchung equiner Patienten von Segura et al. im K<sub>3</sub>-EDTA-Blut am ADVIA® 120 zwischen SIRS-Patienten und der gesunden Kontrollgruppe kein signifikanter Unterschied der Thrombozytenzahl ermittelt werden. Die Beschreibung der Einschlusskriterien der SIRS-Gruppe ist jedoch wenig eindeutig formuliert: " *The criteria for selection of horses with inflammatory disease included the clinical diagnosis and a neutrophil count greater than the*

*upper limit (8,500/mL) or lower than the lower limit (2,500/mL) of the reference range for the laboratory, fibrinogen values over 400 mg/dL, band cells, or toxic white blood cell (WBC) morphology.*" [54]. Es bleibt unklar, ob alle gelisteten Kriterien oder nur eine Mindestzahl erfüllt sein mussten. Aus diesem Grund sind die SIRS-Gruppen der eigenen prospektiven Untersuchung und der retrospektiven von Segura et al. nicht vergleichbar und ein direkter Vergleich der Ergebnisse ist nicht möglich.

In einer Untersuchung bei Hunden zeigte sich ebenfalls kein Unterschied der Thrombozytenzahl im K<sub>3</sub>-EDTA-Blut zwischen der gesunden Kontrollgruppe und Hunden mit entzündlichen Erkrankungen. Jedoch wurden auch hier keine SIRS-Kriterien angewandt. Einschlusskriterien für die erkrankten Hunde waren Fieber, Neutrophilie sowie stabkernige neutrophile Granulozyten > 1000/μl [331].

Bezüglich der Thrombozytenzahl liegen nach Kenntnis der Autorin mit der eigenen Untersuchung vergleichbare Daten von Menschen nicht vor. In einer Untersuchung von Patienten einer Intensivstation zeigte sich jedoch, dass Patienten mit SIRS im K<sub>3</sub>-EDTA-Blut im Median eher niedrige Thrombozytenzahlen im unteren Referenzintervall aufwiesen [205].

Im Gegensatz zur Kontrollgruppe war bei den eigenen SIRS-Patienten die Thrombozytenzahl im K<sub>3</sub>-EDTA-Blut im Mittel signifikant niedriger als im Zitratblut. Bei 2 Individuen lag eine EDTA-PTCP vor, was mit 10 % eine Verdopplung der Prävalenz im Vergleich zur Kontrollgruppe bedeutet. Auch beim Menschen ist die Prävalenz der EDTA-PTCP bei schwerkranken Patienten höher und entwickelt sich darüber hinaus zum Teil auch erst im Verlauf einer Erkrankung. So konnte bei Patienten einer Intensivstation gezeigt werden, dass die Thrombozytenzahl bei Einlieferung in die Klinik bei 11 von 18 Patienten (61 %) über  $100 \times 10^9/l$  lag und sich im Mittel erst nach 6 Tagen (Spannweite 10-60 Tagen) eine EDTA-PTCP entwickelte. Diese war zum Zeitpunkt der Entlassung bei allen Patienten persistierend. Bei 5 Patienten waren wiederholte Untersuchungen nach 1 bzw. 5 Jahren möglich, die EDTA-PTCP war weiter vorhanden [100]. Die beiden Pferde mit EDTA-PTCP zeigten diese bereits beim Einschluss in die Studie, beide waren bereits seit einigen Tagen erkrankt, so dass sich die EDTA-PTCP erst im Krankheitsverlauf bis zur Vorstellung in der Klinik entwickelt haben könnte. Bei den übrigen equinen Patienten trat im Krankheitsverlauf keine weitere EDTA-PTCP auf. Allerdings wurden lediglich bei 4 Patienten wiederholte Messungen der Thrombozytenzahl durchgeführt. Bei 3 Pferden bestand bereits beim Einschluss in die Studie eine

## 5 Diskussion

Thrombozytopenie, bei einem weiteren Pferd blieb die Thrombozytenzahl weitgehend konstant. Die geschlechtsabhängige Häufung der EDTA-PTCP bei Frauen [100] wurde bei den Pferden nicht festgestellt: Betroffen waren jeweils eine Stute und ein Wallach.

Vergleichbare Untersuchungen bezüglich des Einflusses der Antikoagulantien auf die Zellzahl bei SIRS bei anderen Tieren oder beim Mensch liegen nach Kenntnis der Autorin nicht vor. Aufgrund der erhöhten Prävalenz der EDTA-PTCP bei schwererkrankten Menschen lässt sich jedoch mutmaßen, dass die niedrigere Zellzahl im K<sub>3</sub>-EDTA-Blut in der eigenen Untersuchung auf eine erhöhte Aggregatbildung *in vitro* zurückzuführen ist. Mikroskopische Untersuchungen der Blutausstriche zur Absicherung der Mutmaßung wurden jedoch nicht durchgeführt.

Entzündliche Prozesse gehen mit einer Aktivierung von Thrombozyten einher (s. 2.1.3, S. 9). Die Aktivierung führt beim Menschen *in vitro* zu einer Degranulation insbesondere der  $\alpha$ -Granula und hierdurch zu einer Abnahme des brechungsrelevanten Inhaltes der Zellen mit Folge eines abnehmenden MPC [107–109]. Die Degranulation der  $\alpha$ -Granula konnte auch bei Pferden *in vitro* nach Aktivierung mit Thrombin gezeigt werden [3,4]. Gleichwohl konnten in der eigenen Untersuchung im Mittel keine signifikanten Unterschiede beim MPC zwischen der Kontrollgruppe und der SIRS-Gruppe berechnet werden (Abbildung 58).

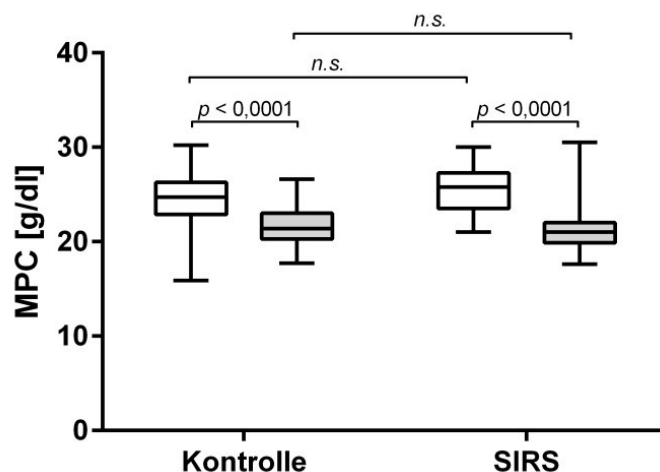


Abbildung 58: Thrombozytenfunktion bei Equiden mit systemischer Entzündung (SIRS): MPC am ADVIA® 2120 im K<sub>3</sub>-EDTA-Blut (weiße Box) und Zitratblut (graue Box) der Kontroll- (n = 120) und der SIRS-Gruppe (n = 20) ; (Median, 25/75%, min-max)

Dies steht im Widerspruch zu den Ergebnissen einer weiteren equinen Studie von Segura et al., in der SIRS-Patienten im K<sub>3</sub>-EDTA-Blut mit  $23,5 \pm 4,7$  g/dl einen signifikant niedrigeren

MPC als die  $26,2 \pm 3,5$  g/dl der Kontrollpferde aufwiesen [54]. Allerdings handelte es sich bei Untersuchung, wie bereits weiter oben erwähnt, um eine retrospektive Untersuchung mit anderen Einschlusskriterien, so dass ein Vergleich der Ergebnisse schlecht möglich ist. Zudem erfolgten die Messungen in der SIRS-Gruppe bis zu 24 Stunden nach Blutentnahme. Erst in einer späteren Untersuchung von Prins et al. konnte gezeigt werden, dass der MPC auch bei Pferden lagerungsbedingt innerhalb von 24 Stunden um 15 % abnimmt [86]. Der von Segura et al. nachgewiesene Unterschied könnte so der Lagerung geschuldet sein.

Ein Lagerungseffekt könnte auch die fehlenden Unterschiede in der eigenen Untersuchung erklären. Die Messungen der SIRS-Probanden erfolgten innerhalb von 60 Minuten nach Blutentnahme. Bei den Kontrollpferden wurde die Mehrzahl der Messungen nach ca. 2 Stunden durchgeführt, als maximales Zeitintervall waren hierbei jedoch 4 Stunden einzuhalten. Der so für die Kontrollgruppe ermittelte MPC liegt mit  $24,7 \pm 2,6$  g/dl niedriger als die von Segura et al. ( $26,2 \pm 3,5$  g/dl) und von Prins et al. ( $27,5$  g/dl nach 2 Stunden) ermittelten Mittelwerte, jedoch höher als der im Rahmen der Etablierung des ADVIA® 2120 berechnete Mittelwert von  $20,2$  g/dl [67].

Auch bei Hunden lag der MPC bei nichtseptischen Entzündungen mit  $18,3$  g/dl im Median signifikant unter dem der Kontrollgruppe mit  $21,9$  g/dl. So wie in der equinen Studie von Segura et al. waren die Hunde jedoch ebenfalls wie bereits weiter oben erwähnt nicht anhand von SIRS-Kriterien eingeschlossen worden [331]. Darüber hinaus ist es denkbar, dass die Messungen des MPC beim Pferd im Gegensatz zum Hund durch das bei Pferden gezeigte mangelnde Sphäring der Thrombozyten beeinflusst seien könnten.

Neben der Granularität wird auch die Zellgröße der Thrombozyten durch die Aktivierung beeinflusst. In vitro erhöht sich das mittlere Zellvolumen humaner Thrombozyten nach Aktivierung mit Thrombin, Kollagen oder ADP sowohl in mit Ziträt als auch mit  $K_3$ -EDTA antikoagulierten Blutproben signifikant [109,332,333]. Die Quantifizierung des Zellvolumens mittels Messung des MPV ist in hämatologischen Laborgeräten etabliert und steht somit in der Routinediagnostik zur Verfügung. In der Humanmedizin wurde eine Vielzahl an Studien publiziert, im Rahmen derer ein Zusammenhang zwischen thrombotischen Erkrankungen und erhöhter Zellgröße postuliert wurde. Unklar ist hierbei jedoch, ob die Zellvergrößerung Ursache oder Folge der Thrombophilie ist. Zudem sind die Unterschiede in der Zellgröße zwischen Patienten und einer Kontrollpopulation zumeist sehr klein, so dass statistische

Unterschiede lediglich aufgrund sehr hoher Fallzahlen erreicht werden und die Beurteilung einer veränderten Zellgröße bei einem Individuum anhand des MPV nicht möglich ist [334]. Genomweite Assoziationsstudien konnten zudem zeigen, dass Zahl und Größe der Thrombozyten erheblichen genetischen Einflüssen unterliegen [285]. Schlussendlich wird die Messung des MPV erheblich durch die Methodik beeinflusst, so dass Untersuchungen mit optischen Messmethoden und Messungen mittels Impedanz nicht vergleichbar sind [75,111,112].

So ist es wenig verwunderlich, dass im Rahmen der eigenen Untersuchung keine statistischen Unterschiede des MPV zwischen den kleinen Populationen der SIRS-Probanden und der Kontrollgruppe nachgewiesen werden konnten. Zu dem gleichen Ergebnis kamen Segura et al. bei ihrer retrospektiven Untersuchung von Pferden mit systemischen Entzündungen [54].

Neben der Aktivierung und den genetischen Varianzen beeinflusst zuletzt auch noch das Ausmaß der Thrombopoese im Knochenmark die Zellgröße. So resultieren niedrige Thrombozytenzahlen beim Menschen in einer gesteigerten Thrombopoese, in deren Folge die Produktion großer Thrombozyten im Knochenmark und deren Sequestrierung ins periphere Blut erhöht sind [335,336]. So konnte bei einer Thrombozytopenie sowohl bei Menschen [337] als auch bei Pferden [52,54] ein signifikant erhöhter MPV ermittelt werden. Vergleicht man die Ergebnisse der Patienten mit Thrombozytopenie der eigenen retrospektiven Untersuchung (s. 4.2, S. 88) mit den 120 Probanden der Kontrollgruppe (s. 4.1.1.1, S. 73) ergibt sich für die Gruppe der Thrombozytopenie ebenfalls ein signifikant höherer MPV (9,1 fl vs. 7,8 fl,  $p < 0,0001$ ; Anhang Abbildung 12-3, S. 12-51).

***Erstmals konnte gezeigt werden, dass equine SIRS-Patienten im  $K_3$ -EDTA-Blut signifikant niedrigere Thrombozytenzahlen im Vergleich zur Kontrollgruppe aufweisen. Da im Unterschied zur Kontrollgruppe die Zahl im mit Zitrat antikoagulierten Blut höher als im  $K_3$ -EDTA-Blut war, kann vermutet werden, dass die niedrige Zellzahl der SIRS-Probanden im  $K_3$ -EDTA-Blut auf eine gesteigerte in vitro-Aggregation zurückzuführen ist. Basierend auf den eigenen Daten haben die Thrombozytenvariablen MPC und MPV keine diagnostische Aussagekraft bei Equiden mit SIRS.***

### 5.3.2.2 Impedanzaggregometrie (Multiplate® Analyzer)

Die Technik der Blutentnahme war innerhalb der SIRS-Gruppe sowie zwischen SIRS- und Kontrollgruppe nicht einheitlich. Gleichwohl erfolgten die Entnahmen immer aus der Vena jugularis externa unter Verwendung großlumiger Kanülen von 14-18 G, einem somit größeren Durchmesser als die von der Leitlinie des CLSI empfohlenen 19-21 G [290]. Zudem konnten Untersuchungen bei Hund [159] und Mensch [291] zeigen, dass die Messergebnisse am Multiplate® Analyzer nicht vom Kanüledurchmesser beeinflusst werden.

Bei den SIRS-Patienten konnten lediglich für den ASPItest signifikant niedrigere Aggregationswerte berechnet werden. Wenngleich statistisch nicht signifikant, erreichten die Aggregationswerte des ADPtest, ADPtestHS und COLtest im Mittel hingegen höhere Messwerte im Vergleich zur Kontrollgruppe. Untersuchungen bei humanen SIRS-Patienten ergaben ähnliche Ergebnisse: Die Aggregationswerte des ADPtest, ASPItest und COLtest waren im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht, diese Abweichung jedoch lediglich beim COLtest signifikant [147]. Bei Vorliegen einer Sepsis oder eines septischen Schocks hingegen waren die Aggregationswerte des ADPtest, ASPItest und COLtest signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe [147,148]. Eine intensivmedizinische Behandlung spiegelte sich bei den Patienten in den Aggregationswerten wider: Bei den SIRS-Patienten mit erhöhten Aggregationswerten sanken diese innerhalb von 24 Stunden nach Beginn einer Behandlung signifikant, während die erniedrigten Messwerte bei den Patienten mit schwerer Sepsis und septischen Schock unverändert und auch niedriger als die der SIRS-Patienten blieben [147].

In vitro Untersuchungen konnten zeigen, dass die Zugabe von LPS eine Erhöhung der durch ADP, Kollagen und Arachidonsäure-induzierten Aggregation im humanen Vollblut verursachte. Die alleinige Gabe von LPS hingegen führte zu keinem Anstieg der Aggregation. Die Autoren erklärten diese Beobachtungen mit einem "priming-Effekt" des LPS auf die humanen Thrombozyten. [338,339]. Diese Effekte auf die ADP- und AS-induzierte Aggregation konnten bereits bei sehr niedrigen Konzentrationen LPS von 0,1-10 ng/ml beobachtet werden. Bei höheren Konzentrationen von 100 ng/ml war eine Erhöhung der Aggregationswerte nicht mehr vorhanden [338]. Für die Kollagen-induzierte Aggregation hingegen waren die Effekte auch bei höheren LPS-Konzentrationen von 200-300 ng/ml nachweisbar [339]. Diese Konzentrationen werden auch bei humanen Patienten mit klinischen Schocksymptomen [340] sowie Pferden mit akuten gastrointestinalen Erkrankungen [341] erreicht.

Die bei Sepsis und septischen Schock erniedrigten Aggregationswerte von Menschen erklärten die Autoren mit einer bei diesen Erkrankungen bestehenden Aktivierung des plasmatischen und zellulären Gerinnungssystems. Die Aktivierung der Thrombozyten in vivo bedeutet, dass in der zu untersuchenden Probe mutmaßlich überwiegend hyporesponsive Thrombozyten vorhanden sind, welche sich in vitro durch die Zugabe eines Agonisten nicht weiter aktivieren lassen und keine oder lediglich eine erheblich reduzierte Aggregation vermittelt werden kann [147,148,342].

In der eigenen Untersuchung wurden die Probanden nicht nach SIRS, Sepsis und septischem Schock differenziert, so dass sowohl erhöhte wie auch reduzierte Aggregationen im Vergleich zur Kontrollgruppe zu erwarten waren. Diese Vermutung wird durch die Beobachtung bestätigt, dass bei allen Aggregationstests sowohl die minimal als auch die maximal erreichte Aggregation unter bzw. über den bei der Kontrollgruppe ermittelten Werten lagen (s. Tabelle 32, S. 98).

In der Kontrollgruppe wurden die Agonisten-induzierten Aggregationswerte durch die verzögerte Zugabe des magnetischen Rührstabes nach der Inkubation signifikant gesenkt. Das Rühren erhöht beim Menschen [257] die Konzentration an ADP in der Messzelle mit daraus resultierenden höheren Aggregationswerten in vitro. Werden die Proben während der Inkubation nicht gerührt, reduzieren sich die Aggregationswerte bei Mensch [257] und wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt auch bei klinisch unauffälligen Pferden (Abbildung 59). Innerhalb der SIRS-Gruppe bestand der Methodeneffekt ebenfalls, die Unterschiede waren jedoch überwiegend statistisch nicht signifikant. Bei der Betrachtung der individuellen Messwerte fiel auf, dass der reduzierende Einfluss des Rührens während der Inkubation bei allen Tests fast ausschließlich bei Probanden mit hohen Aggregationswerten zu beobachten war, während bei niedrigeren Werten im Unterschied zu Kontrollgruppe dieser Effekt nahezu vollständig fehlte (Abbildung 59).

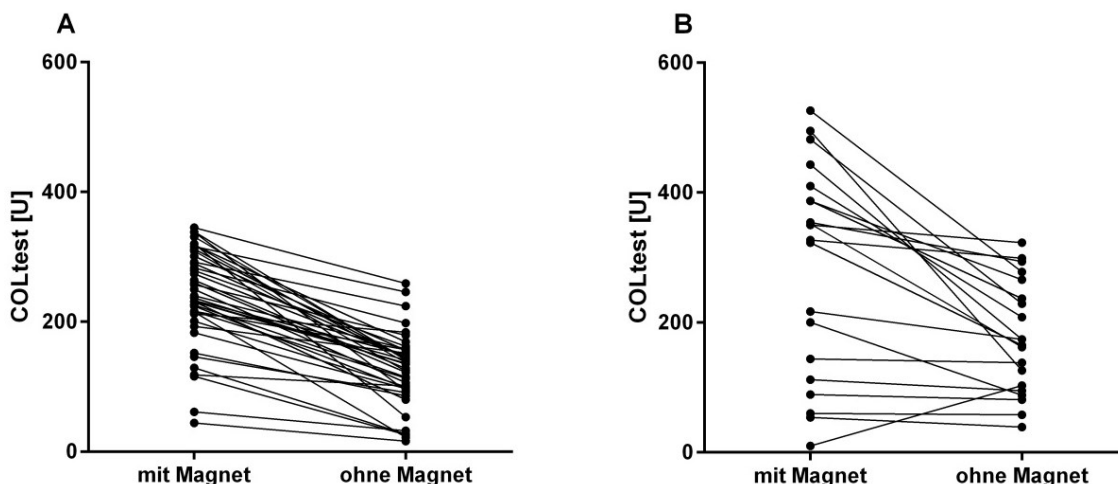


Abbildung 59: Thrombozytenfunktion bei Equiden mit systemischer Entzündung (SIRS): COLtest am Multiplate® Analyzer der Kontrollgruppe (A, n = 42) und der SIRS-Probanden (B, n = 20) bei Messungen mit und ohne magnetischen Rührstab während der Inkubation

Die im Vergleich zur Kontrollgruppe höheren Aggregationswerte der während der Inkubation gerührten Proben am Beispiel des COLtest über 350 U können durch ein in vivo priming der Thrombozyten und den additiven Effekt der durch das Rühren erhöhten Konzentration an ADP in der Messzelle erklärt werden. Wird der magnetische Rührstab bei diesen Individuen erst nach der Inkubation zugegeben, werden die Aggregationswerte sichtbar reduziert.

Offensichtlich verliert sich der durch das Rühren bedingte additive Effekt des ADP jedoch bei dem Großteil der equinen SIRS-Patienten mit geringeren Aggregationswerten (z. B. bis 300 U beim COLtest). In vitro Untersuchungen mit humanen Thrombozyten konnten zeigen, dass eine einstündige Inkubation mit einem ADP-Analogon eine selektive Desensibilisierung der unterschiedlichen ADP-Rezeptoren verursachte. Während der P2Y<sub>1</sub>-Rezeptor durch eine anschließende Zugabe von ADP nicht mehr aktivierbar war, war die Funktionsfähigkeit des P2Y<sub>12</sub>-Rezeptors unbeeinträchtigt [343]. So könnte der fehlende additive Effekt der durch das Rühren erhöhten Konzentration an ADP auf eine in vivo Aktivierung der Thrombozyten bei schwerer erkrankten Patienten zurückzuführen sein. Die in vivo Aktivierung könnte eine Desensibilisierung der P2Y<sub>1</sub>-Rezeptoren verursacht haben, wodurch die ADP-induzierte Aggregation lediglich über die P2Y<sub>12</sub>-Rezeptoren vermittelt werden könnte und hierdurch in der Summe eine reduzierte Aggregation verursacht würde.

Die in der eigenen Untersuchung ermittelten niedrigeren Aggregationswerte beim ASPItest in der SIRS-Gruppe könnten zudem auf eine Vorbehandlung der Pferde mit nichtsteroidalen Antiphlogistika zurückzuführen sein. In den Ausschlusskriterien war lediglich eine medikamentöse Vorbehandlung mit ASS und Clopidogrel definiert worden. Die Verabreichung der beiden nichtselektiven COX-Hemmer Flunixin Meglumin und Phenylbutazon verursachte bei Pferden eine signifikanten Abnahme der Serumkonzentration an Thromboxan B<sub>2</sub>, mutmaßlich aufgrund der Hemmung der COX in den Thrombozyten [123]. Diese Hemmung würde vergleichbar mit den Auswirkungen von Acetylsalicylsäure in niedrigen Aggregationswerten im ASPItest resultieren. Bestätigt wird diese Vermutung durch die Messwerte des COLtest, welche bei den SIRS-Probanden nicht erniedrigt waren: In der Untersuchung von Burkett et al. hatte die Medikation mit Flunixin Meglumin und Phenylbutazon ebenfalls keinen Einfluss auf die Kollagen-induzierte Aggregation im PRP [123].

Bei humanen Patienten mit SIRS konnten signifikante positive Korrelationen zwischen Thrombozytenzahl und Aggregationswerten von COLtest, ADPtest und ASPItest von  $r = 0,589-0,635$  ( $p < 0,001$ ) berechnet werden [147]. Die Messung der Thrombozytenzahl erfolgte hierbei aus K<sub>2</sub>-EDTA-Blutproben. In der eigenen Untersuchung konnte für den ADPtest ebenfalls eine vergleichbare signifikante positive Korrelation mit der Thrombozytenzahl aus K<sub>3</sub>-EDTA-Blut berechnet werden ( $r = 0,511$ ,  $p = 0,025$ ), während dies bei Bestimmung aus Zitratblut nicht gelang ( $r = 0,365$ ,  $p = 0,124$ ). Da bei equinen SIRS-Patienten aufgrund der Ergebnisse der eigenen Untersuchungen vermutet werden kann, dass eine vermehrte in vitro Aggregatbildung im K<sub>3</sub>-EDTA-Blut vorliegt, wären die Zellzahlen falsch zu niedrig und eine berechnete Korrelation somit fragwürdig.

***Die mittels Impedanzaggregometrie am Multiplate® Analyser gemessene Thrombozytenfunktion ergab keine signifikanten Unterschiede der SIRS-Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe. Dies ist mutmaßlich darauf zurückzuführen, dass die Impedanzaggregometrie im Vollblut erheblich vom Schweregrad der Erkrankung beeinflusst ist. Während bei leichter erkrankten Patienten eine Erhöhung der Aggregationswerte erwartet werden kann, gilt für schwer erkrankte Patienten das Gegenteil. Da in die eigene Untersuchung mutmaßlich alle Schweregrade einer SIRS eingeschlossen waren, würden sich die folglich entgegengesetzt auftretenden Aggregationen in der Summe aufheben.***

### 5.3.2.3 Fluoreszenz-Durchflusszytometrie (Accuri C6)

Bei den SIRS-Patienten war der prozentuale Anteil aktivierter Thrombozyten sowie derer von Thrombozyten-Leukozyten-Aggregaten im Vergleich zu der Kontrollgruppe signifikant erhöht.

Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit Untersuchungen beim Menschen, in denen beim septischen Schock sowie nach Infusion von LPS eine Erhöhung des prozentualen Anteils aktivierter Thrombozyten gezeigt werden konnte [200,205]. Auch bei Hunden war eine Zunahme P-Selectin-positiver Thrombozyten bei septischen und nichtseptischen entzündlichen Erkrankungen messbar [331].

Eine Zunahme der TLA konnte beim Menschen mit Sepsis und multiplen Organversagen (MODS) gezeigt werden [205,208].

Beim Pferd konnte eine Erhöhung aktivierter Thrombozyten bei erkrankten Tieren *in vivo* bislang lediglich bei experimenteller Infektion mit dem Virus der infektiösen Anämie [52] sowie bei Kohlenhydrat-induzierter Hufrehe [50,51] gezeigt werden. Bei equinen Patienten mit RAO war im Vergleich zu gesunden Kontrolltieren eine vermehrte Zahl aktivierter Thrombozyten jedoch nicht zu belegen [193,196].

Eine Zunahme von TLA konnte ebenfalls im Modell der Kohlenhydrat-induzierten Hufrehe gezeigt werden, allerdings lediglich mikroskopisch und nicht mittels Fluoreszenz-Durchflusszytometrie [50]. Auch eine vermehrte Zahl an TLA war bei equinen Patienten mit RAO im Vergleich zu gesunden Kontrolltieren nicht nachweisbar [196].

Wenngleich die *in vitro* Aktivierung mit Kollagen bei den SIRS-Patienten zu einer signifikanten Erhöhung des prozentualen Anteils der CD62P- und CD154-positiven Thrombozyten führte, war das Ausmaß der Erhöhung insbesondere beim CD62P deutlich geringer als in der Kontrollgruppe. In dieser bewirkte die Aktivierung mit Kollagen einen mehr als 10-fachen Anstieg der aktivierten Thrombozyten, während in der SIRS-Gruppe beim CD62P lediglich eine Verdopplung der prozentualen Anteile und beim CD154 eine 7-fache Erhöhung messbar war. Vergleichbare Ergebnisse konnten auch für den Hund gezeigt werden: Die Thrombozyten entzündlich erkrankter Tiere ließen sich *in vitro* im Mittel schlechter und bei einigen Individuen gar nicht aktivieren [331].

Im Unterschied zur Kontrollgruppe, in der die Anzahl der TLA durch die Zugabe von Kollagen nicht erhöht werden konnte, war bei den SIRS-Probanden eine signifikante Zunahme um etwa 50 % nachweisbar. Mutmaßlich lag bei den gesunden Kontrolltieren die Ursache in einer fehlenden Aktivierung der Leukozyten durch Kollagen. So konnten in vitro Untersuchungen humaner Thrombozyten ebenfalls zeigen, dass bei gesunden Individuen eine in vitro Aktivierung mit Thrombin allein keinen Einfluss auf die Bindung von Leukozyten und Thrombozyten hatte. So konnte die Bindungskapazität von Thrombozyten an neutrophile Granulozyten in Proben von gesunden Individuen durch Aktivierung der Blutplättchen mit hohen Konzentrationen Thrombin nicht erhöht werden. Dies wurde erst nach Zugabe von Plasma septischer Patienten erreicht [29].

Die Ergebnisse der Fluoreszenz-Durchflusszytometrie bestätigen die Vermutungen aus dem vorangegangenen Kapitel zur Impedanzaggregation, dass bei SIRS auch bei Equiden eine in vivo Aktivierung stattfindet. Dass in einer zu untersuchenden Probe somit mutmaßlich überwiegend hyporesponsive Thrombozyten vorhanden sind, welche sich in vitro durch die Zugabe eines Agonisten nicht oder weniger deutlich aktivieren lassen [147,148,342], wird durch die Beobachtung der reduzierten in vitro-Aktivierbarkeit mit Kollagen ebenfalls bestätigt.

***Erstmals konnten die eigenen Untersuchungen mittels Fluoreszenz-Durchflusszytometrie unter Verwendung von geringfügig modifizierten humanen Protokollen [136,197] zeigen, dass der prozentuale Anteil aktivierter Thrombozyten und Thrombozyten-Leukozyten-Aggregate im Rahmen einer SIRS auch bei equinen Patienten erhöht ist.***

5.3.3 Prognostische Aussagekraft der SIRS-Kriterien und der Thrombozytenvariablen

5.3.3.1 SIRS-Kriterien

Anhand der Anzahl der erfüllten SIRS-Kriterien erstellten Roy et al. für Pferde einen Score zur Graduierung einer SIRS und dem Einfluss auf das Überleben. Waren mindestens 3 der 4 SIRS-Kriterien von dem Patienten erfüllt, konnten sie eine Odds ratio von 4,45 ( $p = 0,002$ ) für einen letalen Ausgang im Vergleich zu den Patienten mit 2 erfüllten Kriterien berechnen [232]. Bei den eigenen Patienten konnten für die 18 gemäß Roy et al. einzuschließenden Probanden zwar ähnliche Odds ratios berechnet werden, diese erreichten jedoch mutmaßlich aufgrund der niedrigen Fallzahl kein signifikantes Niveau (Tabelle 42).

Tabelle 42: Thrombozytenfunktion bei Equiden mit systemischer Entzündung (SIRS): Odds ratios für einen letalen Ausgang in Abhängigkeit vom SIRS-Score nach Roy et al. [232], # = Ausschluss der Patienten mit Euthanasie aus wirtschaftlichen Gründen (MedCalc Statistical Software version 18.9, MedCalc Software bvba)

SIRS-Kriterien	n	Überleben		Nichtüberleben		Odds ratio
		Score 2	Score 3+4	Score 2	Score 3+4	
eigene Grenzwerte	18	4	1	7	6	3,4 $p = 0,323$
	14 <sup>#</sup>	4	1	3	6	8,0 $p = 0,116$
Grenzwerte Roy et al. [232]	18	4	1	4	9	9,0 $p = 0,116$
	14 <sup>#</sup>	4	1	2	7	14,0 $p = 0,055$

Die stärkste prognostische Aussagekraft konnten Roy et al. mittels multivariabler logistischer Regressionsanalysen und Receiver Operating Characteristic Curve (ROC)-Analyse für das diagnostische Modell aus SIRS-Score, Plasmakonzentration von Laktat sowie den von der physiologischen Norm abweichenden Qualitäten der Schleimhäute am Kopf berechnen [232]. Bei Anwendung des ermittelten cut-off-Wertes der Plasmakonzentration des Laktats von 2,06 mmol/l lässt sich für die eigenen Patienten eine Odds ratio von 30,6 ( $p = 0,039$ ) für einen letalen Ausgang berechnen. Bei Ausschluss der 4 aus wirtschaftlichen Gründen euthanasierten Probanden sinkt die Odds ratio auf 19,8 ( $p = 0,075$ ). Ein Score für die Qualitäten der Schleimhautabweichungen wurde in der eigenen Untersuchung nicht verwendet.

**Die Summe der erfüllten SIRS-Kriterien Herz-, Atemfrequenz, Körperinnentemperatur und Leukozytenzahl im Blut kann beim Pferd als prognostischer Indikator nützlich sein.**

### 5.3.3.2 Laser-Durchflusszytometrie (ADVIA® 2120)

Wenngleich nicht signifikant lag die Thrombozytenzahl bei den nichtüberlebenden Pferden niedriger als bei den Überlebenden. Zudem überlebte keines der Pferde mit einer Thrombozytopenie (Abbildung 60). Der überlebende Proband mit  $37 \times 10^9/l$  Thrombozyten im  $K_3$ -EDTA-Blut hatte im Zitratblut eine Zellzahl von  $156 \times 10^9/l$  und somit eine EDTA-PTCP. Bei 4 der Nichtüberlebenden war eine Therapie bei vorsichtiger Prognose aus wirtschaftlichen Gründen von den Eigentümern nicht gewünscht. Diese Individuen lagen alle in der oberen Spannweite der gemessenen Zellzahlen (Abbildung 60, rote Markierungen). Schließt man diese Probanden aus der statistischen Auswertung aus, ergibt sich für die Zellzahl aus Zitratblut ein signifikanter Unterschied in Abhängigkeit vom Überleben ( $p = 0,038$ ). Im  $K_3$ -EDTA-Blut bleibt der Unterschied jedoch - auch nach Ausschluss des Probanden mit EDTA-PTCP - knapp nicht signifikant ( $p = 0,062$ ).

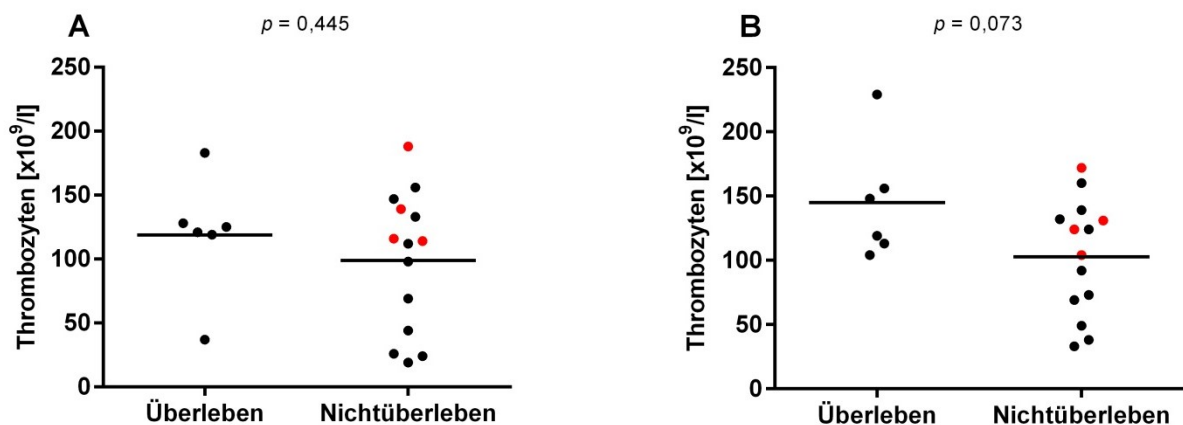


Abbildung 60: Thrombozytenfunktion bei Equiden mit systemischer Entzündung (SIRS): Thrombozytenzahl am ADVIA® 2120 im  $K_3$ -EDTA-Blut (A) und Zitratblut (B) in Abhängigkeit von Überleben (n = 6) und Nichtüberleben (n = 14), rote Markierung = Euthanasie aus wirtschaftlichen Gründen; (Balken= Mittelwert)

Hierbei können mittels Receiver Operating Characteristic Curve (ROC)-Analyse (GraphPad Prism 6) für die Thrombozytenzahl für alle Probanden bzw. nach Ausschluss der aus wirtschaftlichen Gründen nicht therapierten Probanden folgende maximale positive

Likelihood ratios berechnet werden: im K<sub>3</sub>-EDTA-Blut 3,9 bzw. 4,2 für einen cut-off von 117 x10<sup>9</sup>/l und im Zitratblut 1,8 bzw. 2,0 für einen cut-off von 119 x10<sup>9</sup>/l. Die Daten entsprechen den Ergebnissen der retrospektiven Untersuchung, im Rahmen derer eine Thrombozytopenie mit einer Odds ratio (OR) von 3,7 negativ prognostisch für das Überleben war (s. 5.2, S. 144). Gleichmaßen wurde die Thrombozytenzahl in einen an den SOFA adaptierten Score zur Identifizierung eines Multiorganversagens nach operativer gastrointestinaler Therapie beim Pferd eingeschlossen, wobei der cut-off mit 103 x10<sup>9</sup>/l dem eigenen cut-off sehr nahe lag [318].

Auch beim Menschen stellen niedrige Thrombozytenzahlen einen negativen prognostischen Faktor für das Überleben dar [147,205,344–347]. In einer internationalen Multicenter-Studie mit knapp 1.500 Patienten in Intensivstationen kam es innerhalb der ersten 4 Tage zu einem signifikanten Abfall der Thrombozytenzahl, der bei 54 % der Patienten eine Thrombozytopenie verursachte. Bei diesen Patienten lag die Mortalität bei 33 %. Bei 20 % der Patienten persistierte die Thrombozytopenie bis zu Tag 14, bei diesen erhöhte sich die Mortalität auf 66 % [347].

Eine weitere prospektive europäische Multicenterstudie mit knapp 1.000 Patienten konnte zeigen, dass innerhalb der ersten 7 Tage auf der Intensivstation von über 30 analysierten Vital- und Laborparametern lediglich steigende SOFA-Scores, das Auftreten eines Nierenversagens und einer Thrombozytopenie mit einer erhöhten Mortalität bis zu einem Beobachtungszeitraum von 6 Monaten assoziiert waren [345].

Basierend auf den Daten großer Patientenpopulationen wurde die Thrombozytenzahl neben klinischen Parametern und Laborvariablen wie einer erhöhten Serumkonzentration des C-reaktiven Proteins, einer Lymphopenie sowie erhöhten Plasmakonzentrationen von Interleukin-6 und Procalcitonin in diagnostischen Modellen zur Differenzierung einer Sepsis von einer nicht-infektiösen SIRS bei Kindern und Erwachsenen etabliert [348,349].

Das Akut-Phase-Protein Serum Amyloid A (SAA) wurde beim Pferd bereits Ende der 1980iger Jahre von Pepys et al. als sensitiver Entzündungsmarker vergleichbar dem C-reaktiven Protein beim Menschen identifiziert und diese Eigenschaft in zahlreichen weiteren equinen Untersuchungen bestätigt [237,238,350–355]. Bei den eigenen SIRS-Patienten waren die Serumkonzentrationen des SAA (Eiken SAA, Eiken Chemical Co. Ltd. am ABX Pentra 400, Axon Lab) bei einem gültigen oberen Referenzlimit für gesunde Equiden von 2,7 µg/ml mit

## 5 Diskussion

einem Median von 848,7  $\mu\text{g/ml}$  (Spannweite 0,1-13.097  $\mu\text{g/ml}$ ) ebenfalls deutlich erhöht. Eine prognostische Aussagekraft ergab sich hieraus jedoch nicht, die Serumkonzentrationen der überlebenden Equiden lagen im Mittel sogar über denen der nichtüberlebenden (Abbildung 61). Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen Hooijberg et al.: Die Serumkonzentration des SAA erwies sich bei Pferden erneut als sensitiver Entzündungsmarker, die Erstellung eines diagnostischen Algorithmus zur Differenzierung systemischer und lokaler Entzündungen war hierdurch jedoch nicht möglich [237].

Bei den Lymphozyten (ADVIA® 2120) wiesen die Zellzahlen der eigenen SIRS-Probanden zwar einen dem Menschen vergleichbaren Trend mit im Mittel niedrigeren Werten auf, die ROC-Analyse (GraphPad Prism 6) ergab für alle Probanden bzw. nach Ausschluss der aus wirtschaftlichen Gründen nicht therapierten Probanden maximale positive Likelihood ratios von 2,8 für einen cut-off von  $1,35 \times 10^9/\text{l}$  bzw. 2,7 für einen cut-off von  $1,34 \times 10^9/\text{l}$  Lymphozyten (Abbildung 61).

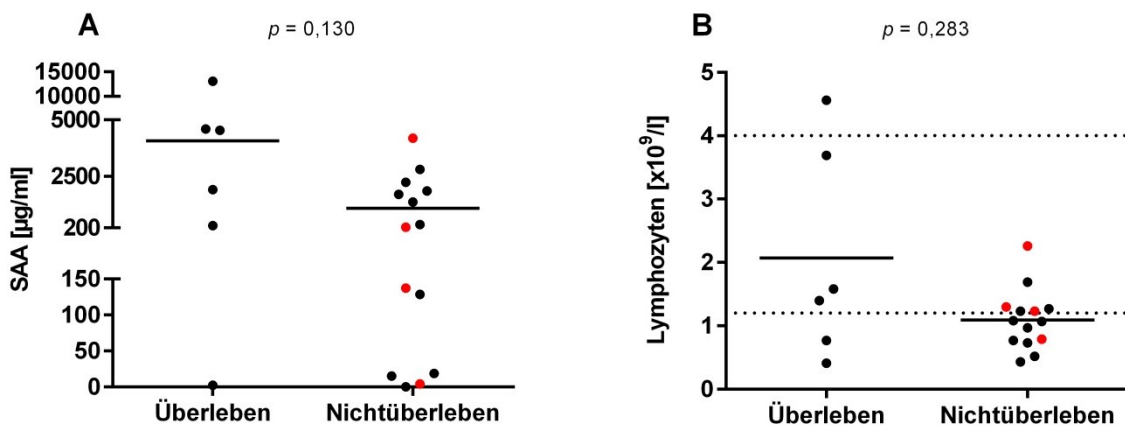


Abbildung 61: Thrombozytenfunktion bei Equiden mit systemischer Entzündung (SIRS): Serumkonzentration von Serum Amyloid A (A) und Lymphozytenzahl (B, gestrichelte Linien = oberes/unteres Referenzlimit) in Abhängigkeit von Überleben (n = 6) und Nichtüberleben (n = 14), rot markierte Patienten = Euthanasie aus wirtschaftlichen Gründen; (Balken=Mittelwert)

Beim Pferd konnten erste Untersuchungen zum Procalcitonin zeigen, dass die Plasmakonzentration bei gesunden Pferden durch eine 30-minütige Infusion von LPS (30 ng/kg) über eine Dauer von 24 Stunden signifikant erhöht ist [356]. Bei SIRS-Patienten konnten ebenfalls signifikant erhöhte Plasmakonzentrationen im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe gemessen werden [235].

Plasmakonzentrationen von Interleukin-6 wurden ebenfalls vereinzelt als Entzündungsmarker beim Pferd identifiziert [352,357].

Die Messungen der Plasmakonzentrationen von Procalcitonin und Interleukin-6 sind jedoch derzeit beim Pferd lediglich mittels ELISA möglich und hierdurch in eine zeitnahe Diagnostik bezüglich einer Prognose equiner SIRS-Patienten nicht integrierbar.

***Erstmals konnte gezeigt werden, dass niedrige Thrombozytenzahlen bei equinen SIRS-Patienten mit einer erhöhten Mortalität assoziiert sind. Die Zellzahl könnte auch beim Pferd eine aussagekräftige Variable in diagnostischen Algorithmen zur Prognose bei SIRS-Patienten darstellen.***

### 5.3.3.3 Impedanzaggregometrie (Multiplate® Analyzer)

Der COLtest ergab bei den Nichtüberlebenden signifikant niedrigere Messwerte im Vergleich zu den Überlebenden. Bei der Betrachtung der individuellen Messwerte fiel zudem auf, dass der reduzierende Einfluss des Rührens während der Inkubation fast ausschließlich bei den überlebenden Probanden auftrat, während er bei den nichtüberlebenden nahezu vollständig fehlte (Abbildung 62). Dies bestätigt die oben formulierte Vermutung, dass der fehlende additive Effekt der durch das Rühren erhöhten Konzentration an ADP auf eine in vivo Aktivierung der Thrombozyten bei schwerer erkrankten Patienten zurückzuführen ist.

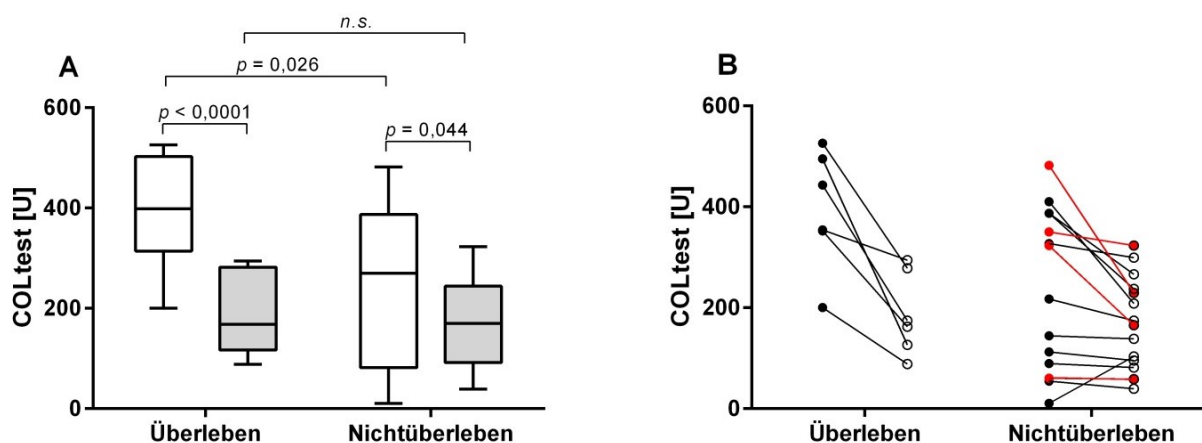


Abbildung 62: Thrombozytenfunktion bei Equiden mit systemischer Entzündung (SIRS): COLtest am Multiplate® Analyzer bei 20 SIRS-Patienten in Abhängigkeit vom Überleben bei Messungen mit (A, weiße Boxen; B, gefüllte Kreise) und ohne (A, graue Boxen; B, offene Kreise) magnetischen Rührstab während der Inkubation; rote Markierung = Probanden mit Euthanasie aus wirtschaftlichen Gründen; (Median, 25/75%, min-max)

Beim ADPtest, ADPtestHS und der Spontanaggregation waren vergleichbare Trends ebenfalls zu erkennen.

Bei 4 der Nichtüberlebenden war eine Therapie bei vorsichtiger Prognose aus wirtschaftlichen Gründen von den Eigentümern nicht gewünscht. Werden diese Individuen aus der Berechnung ausgeschlossen, bleiben die Unterschiede weiterhin lediglich für den COLtest signifikant ( $p = 0,011$ ).

Beim Menschen waren erniedrigte Aggregationswerte bei Patienten mit SIRS, Sepsis, septischem Schock und schwerer Sepsis ebenfalls mit einer erhöhten Mortalität assoziiert [147,148].

***Erstmals konnte gezeigt werden, dass niedrige Aggregationswerte des COLtest, ADPtest und ADPtestHS am Multiplate® Analyser bei equinen SIRS-Patienten mit einer erhöhten Mortalität assoziiert sein könnten. Dies könnte in Folgeuntersuchungen mit einer größeren Probandenzahl bestätigt werden und die Aggregometrie auch beim Pferd eine aussagekräftige Variable in diagnostischen Algorithmen zur Prognose bei SIRS-Patienten darstellen.***

### 5.3.3.4 Fluoreszenz-Durchflusszytometrie (Accuri C6)

Wenngleich nicht signifikant war der prozentuale Anteil der aktivierten Thrombozyten bei den nichtüberlebenden Pferden höher als bei den überlebenden. Bei 4 der Nichtüberlebenden war eine Therapie bei vorsichtiger Prognose aus wirtschaftlichen Gründen von den Eigentümern nicht gewünscht. Diese Individuen lagen alle in der unteren Spannweite der prozentualen Anteile der CD62P- sowie der CD154-positiven Zellen (Abbildung 63). Schließt man diese Individuen aus der Berechnung aus, bleiben die Unterschiede jedoch weiter nicht signifikant.

Darüber hinaus erschienen die Thrombozyten bei den Nichtüberlebenden schlechter durch Kollagen aktivierbar als bei den Überlebenden. Wenngleich zwischen den Kollagen-aktivierten Proben kein signifikanter Unterschied berechnet werden konnte, waren die aktivierten Thrombozyten bei den Überlebenden in den Kollagen-aktivierten Proben im Mittel ca. 6-fach beim CD62P und ca. 10-fach beim CD154 erhöht. Bei den Nichtüberlebenden hingegen konnte der prozentuale Anteil im Mittel lediglich um das ca. 1,5-fache bzw. 6-fache

## 5 Diskussion

gesteigert werden. Bei dieser Beobachtung war kein Einfluss der vier aus wirtschaftlichen Gründen euthanasierten Patienten zu erkennen.

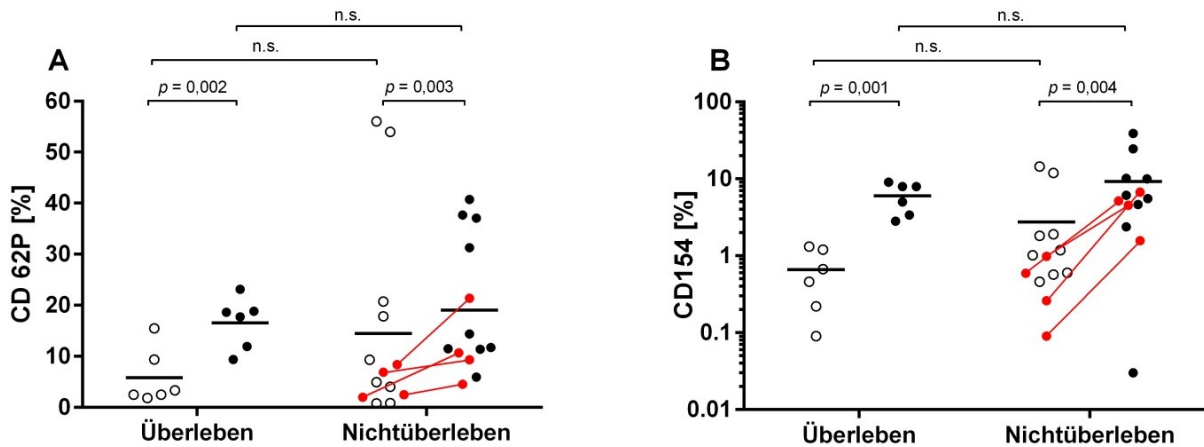


Abbildung 63: Thrombozytenfunktion bei Equiden mit systemischer Entzündung (SIRS): Prozentuale Anteile CD62P- (A) sowie CD154-positiver Thrombozyten (B) am Accuri® C6 vor (ungefüllte Kreise) und nach Aktivierung mit Kollagen (gefüllte Kreise) bei 19 SIRS-Patienten in Abhängigkeit vom Überleben; rote Markierung = Probanden mit Euthanasie aus wirtschaftlichen Gründen; (Balken=Mittelwert)

Bei den Thrombozyten-Leukozyten-Aggregaten war der prozentuale Anteil bei den nichtüberlebenden Pferden ebenfalls im Trend höher als bei den überlebenden. Hierbei beeinflussten die 4 aus wirtschaftlichen Gründen euthanasierten Probanden dies praktisch nicht (Abbildung 64).

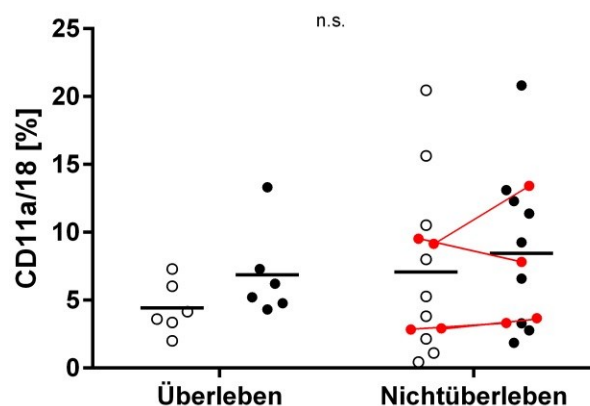


Abbildung 64: Thrombozytenfunktion bei Equiden mit systemischer Entzündung (SIRS): Prozentuale Anteile CD11a/18-positiver Thrombozyten am Accuri® C6 vor (ungefüllte Kreise) und nach Aktivierung mit Kollagen (gefüllte Kreise) bei 19 SIRS-Patienten in Abhängigkeit vom Überleben; rote Markierung = Probanden mit Euthanasie aus wirtschaftlichen Gründen; (Balken=Mittelwert)

Unabhängig vom Ausgang für den Patienten war der prozentuale Anteil TLA nach Aktivierung mit Kollagen um ca. 50 % erhöht.

Die eigenen Ergebnisse passen zu denen humaner Patienten mit Multiorganversagen. Hierbei korrelierte der Anteil der CD62P-positiver Zellen positiv signifikant mit dem Schweregrad des MODS, bei der Sepsis zeigte sich ein Trend zur positiven Korrelation mit dem Schweregrad [206]. In der eigenen Untersuchung wurde der Schweregrad der Erkrankung nicht evaluiert, jedoch war ein Trend erkennbar, dass aktivierte Thrombozyten und TLA bei den Nichtüberlebenden vermehrt waren.

***Zum ersten Mal konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass eine Erhöhung der prozentualen Anteile aktivierter Thrombozyten sowie Thrombozyten-Leukozyten-Aggregate bei equinen SIRS-Patienten mit einer erhöhten Mortalität assoziiert sein könnten. Dies könnte in Folgeuntersuchungen mit einer größeren Probandenzahl bestätigt werden und aktivierte Thrombozyten sowie Thrombozyten-Leukozyten-Aggregate auch beim Pferd aussagekräftige Variablen in diagnostischen Algorithmen zur Prognose bei SIRS-Patienten darstellen.***

## 5.4 Hemmung der Thrombozytenfunktion bei Pferden

### 5.4.1 Acetylsalicylsäure

Gemessen mit Arachidonsäure-induzierter Aggregometrie (ASPItest) konnte mit der Anfangsdosis von 4,7-5 mg/kg ASS im Mittel keine Hemmung der Aggregation bei den 10 Pferden erreicht werden.

Bei der Betrachtung der individuellen Messwerte wurde deutlich, dass bei 7 eine Verminderung der TZF von 37-100 % 6 und 12 Stunden nach erster Medikation erreicht werden konnte. Die verbleibenden 3 Pferde (Pferd 5, 8 und 10) zeigten trotz deutlich erhöhter Serumkonzentration der Salizylsäure keinen hemmenden Effekt der ASS in Form einer Verringerung der AS-induzierten Thrombozytenfunktion (ASPItest). Während der Medikation mit der Erhaltungsdosis (T24 bis T96) war die TZF bei diesen Pferden um maximal 22 % ausgehend vom Ausgangswert (Pferd 8) reduziert. Bei den verbleibenden 7 Pferden konnten Verminderungen der Thrombozytenfunktion von 40-100 % bei T6, 37-100 % bei T12 und 0-98 % zwischen T24 und T96 gemessen werden (Tabelle 43).

Tabelle 43: Hemmung der Thrombozytenfunktion bei Pferden: ASPItest (prozentuale Abweichungen vom Ausgangswert T0) am Multiplate® Analyser sowie Serumkonzentration der Salicylsäure (SS) zu verschiedenen Messzeitpunkten (T, in Stunden) nach Medikation mit ASS (# 4,7-5 mg/kg, ##1-1,3 mg/kg) bei 10 Pferden

Pferd	Test	T0 <sup>#</sup>	T6	T12	T24 <sup>##</sup>	T48 <sup>##</sup>	T72 <sup>##</sup>	T96 <sup>##</sup>	T144	T192	T240
1	ASPItest (%)	100	52	47	69	38	91	48	192	225	81
	SS (µg/ml)	0,35	5,58	3,53	0,58	-	-	<0,2	0,24	-	-
2	ASPItest (%)	100	60	63	26	31	23	16	28	41	68
	SS (µg/ml)	0,29	5,25	5,25	0,65	-	-	<0,2	0,21	-	-
3	ASPItest (%)	100	41	113	58	64	62	44	113	99	101
	SS (µg/ml)	0,25	5,76	5,09	0,81	-	-	0,54	<0,2	-	-
4	ASPItest (%)	100	58	0	21	21	16	2	60	89	85
	SS (µg/ml)	0,34	6,20	4,51	0,79	-	-	0,34	<0,2	-	-
5	ASPItest (%)	100	125	169	106	79	100	81	128	174	96
	SS (µg/ml)	<0,2	5,59	2,71	0,48	-	-	0,26	<0,2	-	-
6	ASPItest (%)	100	42	43	37	78	77	54	120	116	68
	SS (µg/ml)	0,31	6,15	4,07	0,64	-	-	0,33	0,26	-	-
7	ASPItest (%)	100	0	26	31	61	60	35	128	57	69
	SS (µg/ml)	0,37	7,21	2,64	0,51	-	-	0,38	0,26	-	-
8	ASPItest (%)	100	102	110	104	88	78	89	112	106	85
	SS (µg/ml)	<0,2	7,53	2,97	0,45	-	-	0,41	0,34	-	-
9	ASPItest (%)	100	12	7	9	16	113	42	68	63	85
	SS (µg/ml)	0,22	3,46	1,31	0,36	-	-	<0,2	0,20	-	-
10	ASPItest (%)	100	104	110	81	99	108	94	125	99	97
	SS (µg/ml)	0,61	2,87	4,64	0,95	-	-	0,70	0,73	-	-

Da beim Menschen bereits innerhalb von 12 Stunden der maximale hemmende Effekt von ASS nachweisbar ist [245], kann bei den 3 Pferden aufgrund der fehlenden Hemmung eine Aspirin-Resistenz vermutet werden. Darüber hinaus konnte bei diesen 3 Pferden während der viertägigen Gabe der Erhaltungsdosis der ASS eine maximale Hemmung der AS-induzierten TZF um 22 % gemessen werden. Für das Pferd liegen keine Daten zur intra-individuellen Varianz sowie Präzision des ASPItest vor, jedoch konnte beim Menschen eine intra-individuelle Varianz zwischen 4,9 und 22,9 % sowie eine Test-Varianz zwischen 7,0 und 19,6 % gemessen werden [358]. Für den Hund wurde eine vergleichbare Varianz des ASPItest zwischen 6,0 und 17,6 % ermittelt [157]. So lässt sich vermuten, dass die geringgradige Hemmung der TZF um maximal 22 % auf eine intra-individuelle Varianz oder Test-Varianz zurückzuführen ist und nicht durch die Gabe der ASS verursacht wurde.

Der Begriff der Aspirin-"Resistenz" ist in der humanmedizinischen Literatur häufig anzutreffen, er sollte jedoch nur verwendet werden, wenn trotz gesicherter Einnahme von Aspirin die COX-1-abhängige Synthese von Thromboxan A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) in den Thrombozyten nicht gehemmt ist [359]. Über eine zuverlässige und spezifische Methodik in der Diagnostik dieser Resistenz besteht in der Wissenschaft derzeit kein allgemeiner Konsens. Unspezifische Methoden, im Rahmen derer eine Aktivierung der Thrombozyten durch Thrombin, ADP, Kollagen oder Epinephrin erfolgt, sind jedoch für die Ermittlung einer Aspirin-Resistenz ungeeignet [360]. Als COX-1-spezifische Methoden gelten die Messung der Serumkonzentration von TXB<sub>2</sub>, einem Metaboliten von TXA<sub>2</sub>, die Bestimmung der TXB<sub>2</sub>-Konzentration im plättchenreichen Plasma nach Thrombozytenaktivierung sowie die Aggregometrie mit Stimulation der Thrombozyten durch Arachidonsäure [360]. Der Anteil resistenter Patienten beträgt in humanen Studien zwischen 5 und 45 %, wobei diese große Spannweite zum Großteil auf das Fehlen einer standardisierten Definition des Begriffes sowie auf das Fehlen einer einheitlichen und validierten Labormethodik zurückzuführen ist [361]. Eine Überprüfung der tatsächlichen Einnahme des Medikamentes, beispielsweise durch Messung der Serum- oder Urinkonzentration von Salicylsäure, erfolgt beim überwiegenden Teil der humanen Studien nicht, wodurch ein erheblicher intrinsischer Bias auf die Ermittlung des Anteils resistenter Patienten entsteht [362].

In der Mehrzahl der humanen Studien wurden mindestens 2 unterschiedliche labordiagnostische Methoden als Nachweis einer Aspirin-Resistenz verwendet [361,363]. Die bei den eigenen Pferden vermutete Resistenz wurde nicht mit einer zweiten Methode

verifiziert, was eine Limitation der eigenen Untersuchung darstellt. Gleichwohl wurde in weiteren equinen Studien mit der Messung der Serumkonzentration von TXB<sub>2</sub> ebenfalls lediglich eine COX-1-spezifische Methode zum Nachweis des Aggregations-hemmenden Effekts von ASS eingesetzt, wobei Resistenzen nicht beschrieben wurden [122,248,249].

In der eigenen Untersuchung wurde als spezifische Nachweismethodik zur Effizienz der Hemmung der TZF durch ASS die AS-induzierte Aggregometrie (ASPItest) verwendet und eine Resistenz bei den Probanden vermutet, bei denen innerhalb der ersten 12 Stunden nach Medikation keine Hemmung der TZF gemessen werden konnte. Um eine mangelnde Resorption der ASS als Ursache auszuschließen, wurden Serumkonzentrationen der Salicylsäure gemessen. Hierbei zeigten die 3 Pferde mit mutmaßlicher Resistenz keine Unterschiede in der Konzentration im Vergleich zu den restlichen 7 Pferden. Darüber hinaus konnte bei einem der mutmaßlich resistenten Pferde (Pferd 8) die höchste Serumkonzentration der Salicylsäure aller Messungen (7,53 µg/ml bei T6) gemessen werden, wobei die AS-induzierte Aggregation keinerlei Abweichung vom Ausgangswert aufwies (Tabelle 43). Vergleichbare Ergebnisse konnten bei Menschen gezeigt werden: Mittels ELISA gemessen konnten bei allen Probanden mit Aspirin-Resistenz erhöhte Serumkonzentrationen der Salicylsäure ermittelt werden [361]. Bei den Pferden konnten keine signifikanten Korrelationen zwischen der Serumkonzentration der Salicylsäure und der AS-induzierten Aggregometrie berechnet werden. Dies deutet auf eine hohe individuelle Variabilität des Aggregations-hemmenden Effektes der ASS beim Pferd hin. Vergleichbare Berechnungen wurden bei humanen Probanden nicht durchgeführt [361].

Mittels Erhaltungsdosis von 1-1,3 mg/kg ASS war es nicht möglich, im Mittel die Hemmung der TZF über 4 Tage aufrechtzuerhalten, am vierten Behandlungstag (T72) konnte eine signifikante mittlere Reduktion der TZF nicht berechnet werden. Von den 7 Pferden, welche eine deutliche Hemmung der TZF nach der ersten Medikation zeigten, konnte lediglich bei 3 von ihnen (Pferd 2, 3 und 4) die Hemmung im Verlauf der weiteren viertägigen Medikation aufrechterhalten werden. So scheint die gewählte Erhaltungsdosis für das Pferd zu niedrig zu sein. Beim Menschen induziert bereits die Verabreichung von 100 mg ASS (entsprechend 1-1,5 mg/kg) an 7 aufeinanderfolgenden Tagen eine Verminderung der TZF gemessen mit dem ASPItest um 91-100 % [140,142], während in der eigenen Untersuchung in nahezu keiner Messung dieser Grad der Hemmung erreicht werden konnte (Tabelle 43).

## 5 Diskussion

---

Unterschiede in der Bioverfügbarkeit der oral aufgenommenen ASS zwischen Mensch und Pferd könnten ursächlich für diese unterschiedlich hemmenden Effekte eine Rolle spielen. In der eigenen Untersuchung konnten jedoch mit  $5,56 \pm 1,46 \mu\text{g/ml}$  6 Stunden nach der ersten Medikation mit 4,7-5 mg/kg ASS vergleichbare Serumkonzentrationen des Metaboliten Salizylsäure nachgewiesen werden, wie beim Menschen mit ca.  $6 \mu\text{g/ml}$  6 Stunden nach der Einnahme von 325 mg (entsprechend ca. 5 mg/kg) ASS [364]. So kann vermutet werden, dass die Thrombozyten von Pferden weniger empfänglich für die hemmenden Effekte auf die TZF sind. Diese Überlegung wird durch die Ergebnisse anderer Studien zur Wirkung von ASS beim Pferd gestützt: Hierbei wurde die Serumkonzentration von  $\text{TXB}_2$  nach der Gabe von ASS entweder einmalig in 3 verschiedenen Dosierungen (5, 10 und 20 mg/kg; [249]) oder an 5 aufeinanderfolgenden Tagen (10 mg/kg, [122]) gemessen. Im Gegensatz zu Menschen, bei denen ASS bereits in einer Dosierung von 1 mg/kg eine Verringerung der Serumkonzentration von 99 % verursachte [140], konnte bei den Pferden mit deutlich höheren Dosierungen eine maximale Verringerung um 90 % ermittelt werden.

Die Verabreichung von ASS hatte keinen Einfluss auf die ADP-induzierte Aggregometrie, wie bereits in Studien bei Mensch [142] und Pferd [122,173] gezeigt werden konnte.

Bei den eigenen Pferden konnte mittels ASS keine Hemmung der Kollagen-induzierten Aggregation erreicht werden. Beim Menschen führen bereits niedrige Dosen von 100 mg ASS (entsprechend ca. 1-1,5 mg/kg) zu einer Abnahme der mit dem Multiplate® Analyser gemessenen Kollagen-induzierten TZF (COLtest) um 30-50 % [139,365].

Im Unterschied zu den humanen Studien, bei denen der COLtest mit einer Konzentration von  $3,2 \mu\text{g/ml}$  durchgeführt wurde, wurde in der eigenen Untersuchung eine niedrigere Konzentration von  $1,6 \mu\text{g/ml}$  verwendet. Diese niedrigere Konzentration liegt innerhalb der in der CLSI Guideline zur Thrombozytenfunktion empfohlenen Spannweite [290]. Zudem zeigte sich in einer Pilotstudie zur Methodenetablierung des Multiplate® Analyser, dass bei Pferden mit der empfohlenen Konzentration von  $3,2 \mu\text{g/ml}$  extrem hohe Aggregationen erreicht wurden. Ausgehend von der Überlegung, dass die Sensitivität für die Erkennung von Störungen der TZF am größten ist, wenn eine möglichst niedrige Konzentration des Agonisten zur Erreichung der maximalen Aggregation gewählt wird [366], wurde eine niedrigere Konzentration des Kollagens für die eigenen Untersuchungen gewählt und im Rahmen der Methodenetablierung (s. 3.1.2.2, S. 45) validiert. Zudem konnte in einer weiteren

Untersuchung an equinen Thrombozyten gezeigt werden, dass eine Konzentration von 1 µg/ml Kollagen annähernd eine 100 %ige Aggregation der Thrombozyten im PRP verursacht [120]. So ist davon auszugehen, dass die Messergebnisse des COLtest bei den mit ASS behandelten Pferden nicht durch die geringere Konzentration des Kollagens beeinflusst werden.

Auch eine höhere Dosierung von ASS (10 mg/kg, einmal täglich über 5 Tage) hatte beim Pferd keinen Einfluss auf die Kollagen-induzierte Aggregometrie gemessen im PRP [122]. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass der COLtest des Multiplate® Analyser und andere Kollagen-induzierte Plättchenfunktionstests beim Pferd zum Nachweis einer Thrombozytenfunktionshemmung durch ASS nicht geeignet sind. So könnte die mangelnde Hemmung der Thrombozytenfunktion durch ASS nach Kontakt mit Kollagen ein weiteres Indiz für Unterschiede in der Plättchenaktivierung von Mensch und Pferd sein. Dies müsste in nachfolgenden Studien eingehender untersucht werden.

***Die in der eigenen Untersuchung verwendete Anfangsdosis von ASS verursachte eine schnelle, jedoch nur mäßige Hemmung der Thrombozytenfunktion. Hierbei war die gewählte Erhaltungsdosis nicht ausreichend, um die Hemmung über die folgenden 4 Tage zu erhalten. Bei 3 der 10 Pferde konnte eine Aspirin-Resistenz vermutet werden. Der Multiplate® Analyser war geeignet, die hemmenden Effekte von ASS nachzuweisen, jedoch lediglich mit dem Agonisten Arachidonsäure und im Unterschied zum Menschen nicht mit Kollagen. Im Rahmen einer Therapie sollte die Hemmung der TZF 6 bis 12 Stunden nach der ersten Medikamentengabe überprüft werden, um eine Aspirin-Resistenz ausschließen zu können. Wie in einer weiteren Untersuchung bei Pferden gezeigt werden konnte, konnte durch eine höhere Dosis der hemmende Effekt nicht gesteigert werden [249]. So erscheint aufgrund des mutmaßlich geringen hemmenden Effektes von ASS der Nutzen für einen Einsatz in der Thromboseprophylaxe und -therapie beim Pferd fraglich.***

### 5.4.2 Clopidogrel

Gemessen mit ADP-induzierter Aggregometrie (ADPtest) konnte mit der Anfangsdosis von 6-6,5 mg/kg Clopidogrel eine Hemmung der Aggregation innerhalb von 6 Stunden erreicht werden. Der hemmende Effekt blieb innerhalb der ersten 24 Stunden nahezu unverändert und konnte mittels Erhaltungsdosis von 1,2-1,4 mg/kg über die folgenden 4 Tage aufrechterhalten werden.

Im Unterschied zu 2 weiteren equinen Studien von Brooks et al. sowie Brainard et al., bei denen die Wirkung von Clopidogrel auf die TZF mittels Lichttransmissions-Aggregometrie (LTA) im PRP untersucht wurde [122,176], kam in der eigenen Untersuchung die Vollblutimpedanzaggregometrie mittels Multiplate® Analyzer zum Einsatz. Der Multiplate® Analyzer wurde der eigenen Untersuchung zum Nachweis des hemmenden Effekts von Clopidogrel beim Pferd erstmals eingesetzt. Beim Menschen konnte jedoch gezeigt werden, dass sich mittels Multiplate® Analyzer die hemmende Wirkung von Clopidogrel auf die TZF gleichartig oder besser als in der LTA nachweisen lässt [245,367–369].

Im Unterschied zu den beiden anderen equinen Studien, in denen Clopidogrel-Hydrogensulfat zum Einsatz kam [122,176], wurde in der eigenen Untersuchung Clopidogrel-Besylat verwendet. Beim Menschen konnte in einer vergleichenden Studie jedoch kein Unterschied in der Funktionshemmung ermittelt werden [370].

In der Untersuchung von Brooks et al. zur Wirkung von Clopidogrel bei Pferden zeigten 2 von 5 Warmblütern unabhängig von der eingesetzten Konzentration an ADP nahezu keinerlei Hemmung der mittels optischer Aggregometrie im PRP gemessenen TZF an Tag 3 der Behandlung [176]. Dies konnte in der eigenen Untersuchung nicht beobachtet werden, bei allen Pferden wurde eine signifikante Hemmung der ADP-induzierten TZF an Tag 3 der Behandlung (T72) im Vergleich zu den initialen Messwerten (T0) erreicht (Abbildung 65).

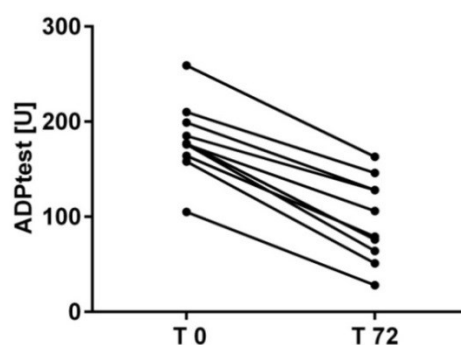


Abbildung 65: Hemmung der Thrombozytenfunktion bei Pferden: ADPtest am Multiplate® Analyzer während der Verabreichung von Clopidogrel (T0: 6-6,5 mg/kg, T24,T48: 1,2-1,4 mg/kg) bei 10 Pferden

Möglicherweise lässt sich dies auf die in der eigenen Untersuchung höhere Anfangsdosis von 6-6,5 mg/kg Clopidogrel im Unterschied zu 4 mg/kg in der Studie von Brooks et al. [176] zurückführen. Dieser überlegene Effekt der höheren Anfangsdosis von 600 mg Clopidogrel (ca. 8 mg/kg) im Vergleich zu 300 mg (ca. 4 mg/kg) konnte beim Menschen bereits nachgewiesen werden [371]. Die Anfangsdosis in der eigenen Studie wurde mit ca. 6 mg/kg etwas niedriger als beim Menschen gewählt, da Untersuchungen gezeigt hatten, dass equine Thrombozyten empfindlicher auf die hemmende Wirkung von P2Y<sub>12</sub>-Antagonisten reagieren als humane Thrombozyten [128].

Im Vergleich zur Untersuchung von Brainard et al., bei der die Pferde 2 mg/kg Clopidogrel erhielten [122], war die in der eigenen Untersuchung verabreichte Erhaltungsdosis von 1,2-1,4 mg/kg ausreichend, die hemmende Wirkung über den Verlauf der fünf-tägigen Medikation aufrechtzuerhalten. Darüber hinaus war die TZF bei Brainard et al. noch mindestens weitere 6 Tage nach Absetzen der Medikation mit 2 mg/kg gehemmt [122]. In der eigenen Untersuchung mit niedrigerer Erhaltungsdosis war ein hemmender Effekt zu diesem Zeitpunkt nicht mehr nachweisbar.

Beim Menschen wird die ADP-induzierte Aggregation durch Interaktion von ADP und den in der Thrombozytenmembran liegenden Rezeptoren P2Y<sub>12</sub> und P2Y<sub>1</sub> vermittelt [13]. Bis vor einigen Jahren ging man zudem davon aus, dass der Rezeptor P2X<sub>1</sub> ebenfalls mit ADP interagiert, wobei hierbei nur sehr geringe aggregierende Reaktionen gezeigt werden konnten [15]. Neuere Untersuchungen haben gezeigt, dass der Rezeptor P2X<sub>1</sub> ausschließlich mit ATP interagiert und hierdurch eine Aggregation induziert wird [15]. Das Vorhandensein von P2Y<sub>12</sub> und P2Y<sub>1</sub> auf equinen Thrombozyten und ihre Beteiligung an der ADP-induzierten Aggregation konnte bereits gezeigt werden [14]. Clopidogrel hemmt den Rezeptor P2Y<sub>12</sub> ohne Einfluss auf den Rezeptor P2Y<sub>1</sub>. Um die Beteiligung des P2Y<sub>1</sub> auf die ADP-induzierte Aggregation zu vermindern, kann in vitro PGE<sub>1</sub> in Testsystemen eingesetzt werden.

PGE<sub>1</sub> aktiviert die intrazelluläre Adenylylcyclase mit der Folge eines intrazellulären Anstiegs von AMP in den Thrombozyten, welcher wiederum die ADP-induzierte Aktivierung über den P2Y<sub>1</sub>-Rezeptor hemmt [372]. Durch die Hemmung des P2Y<sub>1</sub>-Rezeptors wird die ADP-induzierte Aggregation alleinig durch die Interaktion mit dem P2Y<sub>12</sub>-Rezeptor vermittelt, und hemmende Effekte dieses Rezeptors durch Thienopyridine wie das Clopidogrel werden beim Menschen sensitiver erfasst [144,373]. Der Effekt von PGE<sub>1</sub> auf die mit dem Multiplate® Analyser gemessene ADP-induzierte Aggregation zeigte sich beim Menschen

## 5 Diskussion

---

durch signifikant niedrigere mediane Aggregationswerte beim ADPtestHS (ADP in Kombination mit PGE<sub>1</sub>) im Vergleich zum ADPtest (ADP allein) [144,373]. In der eigenen Untersuchung beim Pferd konnte dies bestätigt werden. Im Mittel wurde für den ADPtestHS eine Aggregation von 133 ± 40 U ermittelt, beim ADPtest ergaben sich 181 ± 39 U. Jedoch konnte beim Pferd keine höhere Sensitivität des ADPtestHS in der Erkennung der hemmenden Wirkung von Clopidogrel auf die ADP-induzierte Aggregation detektiert werden. Sechs Stunden nach der Gabe der Anfangsdosis Clopidogrel war die Aggregation beim ADPtest um 35 ± 20 % und beim ADPtestHS um 36 ± 20 % im Vergleich zur Messung vor der Medikamentengabe reduziert. Gleichwohl konnte mittels ADPtestHS die Wiederherstellung der ADP-induzierten Aggregation sensibler erkannt werden: Sechs Tage nach der letzten Medikation (T 240) war gemessen mit dem ADPtest bei 7 der 10 Pferde der Ausgangswert der Aggregation wieder erreicht, wohingegen dies für den ADPtestHS bei 9 der 10 Pferde ermittelt werden konnte (Tabelle 44). Beim Menschen konnte bei Messungen der TZF mit dem Multiplate® Analyser eine intraindividuelle Varianz sowie eine Test-Varianz von ca. 15 % gezeigt werden [358]. Da entsprechende Daten für Pferde nicht vorlagen, wurde in der eigenen Untersuchung die Wiederherstellung der TZF ebenfalls mit einer Spannweite von ± 15 % definiert.

Tabelle 44: Hemmung der Thrombozytenfunktion bei Equiden: Wiederherstellung der Thrombozytenfunktion zum Zeitpunkt T240 im Vergleich zu T0 am Multiplate® Analyser nach Medikation mit Clopidogrel bei 10 Pferden (+: Ausgangswert ± 15 % erreicht; -: Ausgangswert ± 15 % nicht erreicht)

	<b>Pferd</b>									
	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>
<b>ADPtest</b>	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
<b>ADPtestHS</b>	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
<b>ASPItest</b>	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-

Im Einklang mit den beiden equinen [122,176] sowie humanen Studien [367] kam es zu keiner Hemmung der Kollagen-induzierten Aggregation durch Clopidogrel. Dies erklärt sich dadurch, dass die Aggregation durch Kollagen durch eine Modulation des Oberflächenrezeptors Glykoprotein VI (GPVI) und daraus resultierender Freisetzung intrazellulärer Kalziumionen in Unabhängigkeit vom P2Y<sub>12</sub>-Rezeptor vermittelt wird [16].

Im Unterschied zu den direkten Agonisten wie Kollagen oder ADP, welche durch direkte Interaktion mit Oberflächenrezeptoren der Thrombozyten eine Aktivierung und folgende Aggregation vermitteln, handelt es sich bei der Arachidonsäure (AS) um einen indirekten Agonisten. Die AS wird von den Thrombozyten enzymatisch durch die Cyclooxygenase-1 (COX-1) zu Thromboxan A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) umgewandelt, welches durch Interaktion mit Thromboxan-Rezeptoren zu einer Aktivierung der Thrombozyten führt. In humanen Thrombozyten wird die folgende Aggregation zum Großteil durch die Degranulation der ADP-enthaltenden dichten Granula und daraus folgender Aktivierung und Aggregation über den P2Y<sub>12</sub>-Rezeptor vermittelt [18]. In diesem Zusammenhang ist es nicht verwunderlich, dass beim Menschen die Gabe von Clopidogrel und die daraus resultierende Blockade des P2Y<sub>12</sub>-Rezeptors eine Hemmung der AS-induzierten Aggregation nach sich zieht [374]. Dieser Effekt konnte in der eigenen Untersuchung beim Pferd ebenfalls beobachtet werden: Die Gabe von Clopidogrel führte innerhalb von Stunden zu einer schnellen und signifikanten Hemmung der mittels ASPItest gemessenen AS-induzierten Aggregation. Erstaunlicherweise war diese Hemmung bis zum letzten Messzeitpunkt 6 Tage nach der letzten Gabe des Clopidogrels im Mittel signifikant nachweisbar. Bei der Betrachtung der Individuen zeigte sich, dass lediglich 3 Pferde (Pferd 2, 7, 8) die initialen Aggregationswerte zu diesem Zeitpunkt (T240) wieder erreicht hatten, 7 Pferde zeigten nach wie vor eine Hemmung der AS-induzierten Aggregation. Bei 6 dieser Pferde wiederum waren bei der ADP-induzierten Aggregation (ADPtest und ADPtestHS) als Hinweis auf eine vollständige Wiederherstellung der Funktion des P2Y<sub>12</sub>-Rezeptors, die initialen Werte wieder erreicht (Tabelle 44).

Beim Menschen wurde von Armstrong et al. nach der Einnahme von Clopidogrel ein weiterer P2Y<sub>12</sub> unabhängiger Effekt beschrieben [375]. In dieser Untersuchung wurde ein Metabolit des TXA<sub>2</sub> im Urin gemessen, wobei 7 Tage nach der Einnahme von Clopidogrel bei gesunden Probanden eine signifikante Abnahme des Metaboliten ermittelt wurde. Darüber hinaus war die Synthese von TXA<sub>2</sub> mittels Nachweis von TXB<sub>2</sub> nach Zugabe von Kollagen und Epinephrin im PRP ebenfalls signifikant gehemmt. In der eigenen Untersuchung wurden keine Metaboliten von TXA<sub>2</sub> in Urin oder Serum gemessen. In einer anderen equinen Studie war jedoch eine Abnahme der Serumkonzentration von TXB<sub>2</sub> nach der Verabreichung von Clopidogrel nicht nachweisbar [122]. So bleibt der Effekt des Clopidogrels auf die AS-induzierte Aggregation beim Pferd nicht endgültig geklärt.

Als unerwünschte Arzneimittelwirkungen des Clopidogrels sind beim Menschen insbesondere gastrointestinale Störungen (Erbrechen, Diarrhoe) und Blutungen beschrieben [376,377]. Derartige Symptome traten bei keinem Pferd in der eigenen Studie auf. Als sehr seltene unerwünschte Wirkung ist beim Menschen ein Lebersversagen infolge einer hepatozellulären und cholestatischen Schädigung beschrieben [377]. Die Leberfunktion wurde bei den Pferden mittels leberspezifischer Funktionsvariablen im Blut (Gesamtbilirubin, direktes Bilirubin, Gallensäuren) kontrolliert, hierbei ergab sich zu keinem Zeitpunkt und bei keinem Pferd ein Hinweis auf eine eingeschränkte Leberfunktion.

Beim Menschen konnte die Verabreichung von Medikamenten zur Thrombozytenfunktionshemmung wie dem Clopidogrel die Inzidenz von schwerwiegenden Komplikationen während der Behandlung auf der Intensivstation vermindern und zudem die Aufenthaltsdauer in Intensivstationen verkürzen [43,44]. Wie die eigenen Untersuchungen gezeigt haben, lässt sich auch beim Pferd die Thrombozytenfunktion durch die orale Verabreichung von Clopidogrel hemmen. Dies könnte somit auch bei Equiden einen positiven prognostischen Effekt bei SIRS-Patienten haben.

***Erstmals konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Thrombozytenfunktion bei klinisch unauffälligen erwachsenen Pferden mit Clopidogrel in einer einmaligen Anfangsdosis von 6-6,5 mg/kg sowie einer täglichen Erhaltungsdosis von 1,2-1,4 mg/kg über einen Zeitraum von 4 Tagen gehemmt wird. Es bleibt zu überprüfen, ob die orale Gabe von Clopidogrel nach diesem Dosierungsschema zur Verhinderung oder Verminderung von Auswirkungen einer gesteigerten Thrombozytenaggregation z. B. im Rahmen einer SIRS bei kranken Pferden geeignet ist.***

### 6 ZUSAMMENFASSUNG

Erst mit Beginn dieses Jahrhunderts wurde deutlich, dass Thrombozyten neben ihrer essentiellen Bedeutung für die Blutgerinnung eine substantielle Rolle im Rahmen von Entzündungen spielen. So war es naheliegend, Untersuchungen zu Thrombozytenzahlen und -variablen sowie der Thrombozytenfunktion bei gesunden und kranken equinen Individuen durchzuführen. Da bei humanen Patienten positive Einflüsse einer Hemmung der Thrombozytenfunktion auf eine reduzierte Thromboseneigung und den Erkrankungsverlauf von SIRS-Patienten ermittelt werden konnten, sollte zudem die Möglichkeit der oralen medikamentösen Hemmung der Thrombozytenfunktion beim Pferd überprüft werden.

Das Hämatologiegerät ADVIA® 2120 ist eine Standardmethode in der Messung von Thrombozytenzahlen sowie deren Variablen. Die eigenen Untersuchungen konnten jedoch zeigen, dass equine Thrombozyten durch die etablierten Antikoagulantien K<sub>3</sub>-EDTA und Zitrat nicht ausreichend aufgekugelt werden und die Messergebnisse insbesondere der Variablen MPV und MPC hierdurch beeinflusst sein können. In künftigen Studien könnte überprüft werden, ob durch Verwendung anderer Antikoagulantien wie dem CTAD (Citrato, Theophylline, Adenosine and Dipyridamole) validere Messergebnisse erreicht werden könnten.

Die Etablierung von Referenzintervallen auf Basis einer klinisch unauffälligen Referenzpopulation ist in der Labordiagnostik oftmals ein logistisches und finanzielles Problem. Dies wird noch verstärkt, wenn wie in der vorliegenden Untersuchung für den ADVIA® 2120 und den Multiplate® Analyser innerhalb einer Spezies zum Teil klinisch relevante rasseabhängige Unterschiede ermittelt werden können. Hier könnten statistische Verfahren aus der Humanmedizin, im Rahmen derer Referenzintervalle anhand aller in einem Labor vorhandenen Daten geschätzt werden, auch für die Veterinärmedizin ein sinnvolles Werkzeug darstellen.

Thrombozytopenien und Thrombozytosen treten beim Pferd mit einer Prävalenz von 3,4 % bzw. 3,1 % im Vergleich mit anderen Spezies deutlich seltener auf. Da es sich in der vorliegenden Untersuchung um ein bereits vorselektiertes Patientenmaterial handelt, ist anzunehmen, dass die Prävalenz in der gesamten Pferdepopulation deutlich geringer ist. In Verbindung mit systemischen Entzündungen sowie Neoplasien sind die Abweichungen in der Thrombozytenzahl negativ prognostisch, wobei der Schweregrad keine Rückschlüsse auf das Überleben zulässt.

Erstmals konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Prävalenz einer EDTA-induzierten Pseudothrombozytopenie beim Equiden bis zu 5 % beträgt. Sie sollte insbesondere bei einer Thrombozytopenie ohne klinische Anzeichen einer Blutungsneigung als Ursache in Betracht gezogen werden. Gleiches gilt für das Auftreten von > 250 Clumps (Thrombozytenaggregate) in Messungen mit dem ADVIA® 2120. Verifizieren lässt sich die EDTA-PTCP durch eine Messung aus mit Zitrat antikoagulierten Blut innerhalb von 4 bis 6 Stunden nach Blutentnahme.

Im Rahmen dieser Arbeit gelang es zum ersten Mal, beim Equiden aus Thrombozyten-Leukozyten-reichem Plasma aktivierte Thrombozyten sowie Thrombozyten-Leukozyten-Aggregaten mittels Fluoreszenz-Durchflusszytometrie unter Verwendung zweier geringfügig modifizierter humaner Protokolle nachzuweisen. Zudem konnte erstmals gezeigt werden, dass bei Aktivierung der Thrombozyten auch beim Pferd eine Expressierung von CD154 (CD40L) stattfindet. Der Nachweis RNA-reicher Thrombozyten gelang auf diesem Wege jedoch nicht. Desgleichen konnten bei Pferden mit 2 humanen ELISAs lösliche Formen der Glykoproteine CD40L und CD62P im Serum nicht nachgewiesen werden.

Eine Zunahme von Thrombozytenaktivierung und der Thrombozyten-Leukozyten-Aggregate konnte darüber hinaus erstmalig bei equinen Patienten mit SIRS gezeigt werden. Mittels Impedanzaggregometrie am Multiplate® Analyzer konnten jedoch bei diesen Patienten keine signifikanten Unterschiede der Thrombozytenfunktion ermittelt werden. Dies ist mutmaßlich darauf zurückzuführen, dass die Impedanzaggregometrie im Vollblut erheblich vom Schweregrad der Erkrankung beeinflusst ist. Während bei leichter erkrankten Patienten eine Erhöhung der Aggregationswerte erwartet werden kann, gilt für schwer erkrankte Patienten das Gegenteil. Da in der eigenen Untersuchung sehr wahrscheinlich alle Schweregrade einer SIRS vertreten waren, hoben sich die folglich entgegengesetzt auftretenden Aggregationen in der Summe mutmaßlich auf.

Im Rahmen der Untersuchungen konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass niedrige Thrombozytenzahlen bei equinen SIRS-Patienten mit einer erhöhten Mortalität assoziiert sind. Darüber hinaus ergaben sich Hinweise, dass niedrige Aggregationswerte des COLtest, ADPtest und ADPtestHS am Multiplate® Analyzer sowie eine Erhöhung der prozentualen Anteile aktivierter Thrombozyten sowie Thrombozyten-Leukozyten-Aggregate ebenfalls mit einer erhöhten Mortalität assoziiert sein könnten.

Thrombozytenzahl, Thrombozytenaggregation, Thrombozytenaktivierung sowie Thrombozyten-Leukozyten-Aggregate könnten somit auch beim Pferd aussagekräftige Variablen in diagnostischen Algorithmen zur Prognose bei SIRS-Patienten darstellen.

Bei klinisch unauffälligen Warmblütern konnte durch die orale Gabe von Clopidogrel in einer einmaligen Anfangsdosis von 6-6,5 mg/kg sowie einer täglichen Erhaltungsdosis von 1,2-1,4 mg/kg sowohl die ADP-induzierte als auch die Arachidonsäure-induzierte Aggregation gehemmt werden. Die orale Verabreichung von Acetylsalicylsäure verursachte in der gleichen Pferdegruppe lediglich eine mäßige Hemmung der Arachidonsäure-induzierten Aggregation. Zudem konnte eine dauerhafte Hemmung nicht erreicht werden. Bei 3 der 10 Pferde konnte darüber hinaus eine Aspirin-Resistenz vermutet werden. So erscheint im Gegensatz zu Clopidogrel der Nutzen der ASS für einen Einsatz in der Thromboseprophylaxe und -therapie beim Pferd aufgrund des mutmaßlich eher geringen hemmenden Effektes fraglich.

Es bleibt in weiteren Untersuchungen zu überprüfen, ob sich durch die orale Gabe von Clopidogrel die im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesenen Reaktionen insbesondere der Thrombozytenaktivierung und der Thrombozyten-Leukozyten-Aggregate bei equinen SIRS-Patienten beeinflussen lassen und ob hierdurch der Krankheitsverlauf positiv beeinflusst werden kann.

### 7 SUMMARY

#### **Platelets in equids – an underrated biomarker?**

It was not until the early 21<sup>st</sup> century that it became clear that, in addition to their primary role in hemostasis, platelets are multifunctional and act as key players in inflammatory processes. It therefore seemed apposite to investigate platelet biology in healthy and diseased horses. Since it had been demonstrated that inhibition of platelet function reduces the mortality of severe disease in human ICU patients, a further purpose of the studies was to determine the efficacy of oral antiplatelet drugs in horses.

The ADVIA® 2120 automated hematology system is a standard method of measuring platelet numbers and variables in veterinary laboratory diagnostics. However, the results of the own study demonstrated that adequate sphering due to the established anti-coagulants K<sub>3</sub>-EDTA and citrate was not achieved in equine platelets and that this phenomenon may influence measurement results, in particular the variables MPC and MPV. Further studies are required to investigate whether the use of other anticoagulants as CTAD (citrate, theophylline, adenosine and dipyridamole) could provide more valid results for the measurement of the platelet variables.

The establishment of reference intervals based on a healthy clinical reference population often represents a logistical and financial challenge in laboratory diagnostics. This situation is further complicated by the fact that in the present study clinically relevant breed-related differences were determined for the ADVIA® 2120 and the Multiplate® Analyzer measurements. Statistical methods used in human medicine in which reference intervals are estimated on the basis of all the data available in a laboratory can probably pose an option as valuable tool in veterinary medicine too.

The prevalence of thrombocytopenia and thrombocytosis determined in a German referral equine internal medicine center was, at levels of 3.4 % and 3.1 % respectively, lower than in other species. Given that a referral clinic population is subject to preselection, it seems extremely probable that the prevalence in the whole population is even lower. Although both thrombocytopenia and thrombocytosis are correlated with a negative outcome in horses with systemic inflammatory conditions and neoplastic disorders, survival is not impacted by the extent of the variation.

For the first time, the present study demonstrated a prevalence of up to 5 % for the EDTA-induced pseudothrombocytopenia in equids. This in vitro phenomenon should be

## 7 Summary

---

considered especially in patients with no clinical signs of an increased bleeding tendency and a thrombocytopenia or more than 250 clumps (platelet aggregates) measured with the ADVIA® 2120. The EDTA-PTCP may be verified by platelet counting in citrated blood samples within 4-6 hours after sampling.

This is the first study to measure equine activated platelets and platelet-leukocyte-aggregates in platelet-rich-plasma with flow-cytometry using modified human protocols. It is also the first study to demonstrate that CD40L is expressed in equine platelets during activation. Measurement of juvenile, immature, RNA-rich platelets using this method nevertheless failed. Similarly, a soluble form of glycoproteins CD40L and CD62P could not be quantified in equine plasma samples using commercial human ELISAs.

Moreover, for the first time the study identified increased numbers of activated platelets and platelet-leukocyte-aggregates in clinical cases of equine SIRS. Measurement of whole blood impedance aggregometry with the Multiplate® Analyzer failed to verify differences in these patients compared to healthy controls. This could be explained by the fact that whole blood impedance aggregometry is mainly influenced by the severity of disease. In less severe cases platelet aggregation is usually increased, whereas in severe cases the opposite reaction occurs. As the equids included in the SIRS group probably exhibited all the degrees of disease severity, it is probable that the higher and lower aggregations were offset on balance in the final count.

As far as the survival of equids with SIRS is concerned, the study for the first time reveals a correlation between low platelet counts and increased mortality. Furthermore, there were indications of increased mortality in patients with decreased aggregations of the COLtest, ADPtest and ADPtestHS on the Multiplate® Analyzer and increased numbers of activated platelets and platelet-leukocyte-aggregates.

Platelet count, platelet aggregation, platelet activation and platelet-leukocyte-aggregates may therefore represent valuable variables in diagnostic and prognostic algorithms in equine SIRS.

Oral clopidogrel with a loading dose of 6-6.5 mg/kg and daily maintenance doses of 1.2-1.4 mg/kg induced an inhibition of ADP- and arachidonic acid-induced platelet function in healthy horses. Oral administration of acetylsalicylic acid (aspirin) in the same group of horses only led to a moderate inhibition of the arachidonic acid-induced platelet function. An aspirin resistance was suspected in three horses. In view of its presumably low inhibitory effects in

## 7 Summary

---

contrast to clopidogrel, the efficacy of aspirin in preventing and treating thrombotic diseases in horses appears doubtful.

Further studies are accordingly required to evaluate the efficacy of clopidogrel as a platelet inhibitor in equine SIRS and to evaluate the potentially positive impact of platelet inhibition on survival.

### 8 LITERATURVERZEICHNIS

- [1] Schultze, M. (1865) Ein heizbarer Objecttisch und seine Verwendung bei Untersuchungen des Blutes. *Archiv für Mikroskopische Anatomie* **1**, 1–42.
- [2] Bizzozero, J. (1882) Über einen neuen Formbestandtheil des Blutes und dessen Rolle bei der Thrombose und der Blutgerinnung. *Archiv für pathologische Anatomie und Physiologie und für klinische Medicin* **90**, 261–332.
- [3] Segura, D., Monreal, L., Perez-Pujol, S., Pino, M., Ordinas, A., Brugues, R., White, J.G. and Escolar, G. (2006) Assessment of platelet function in horses: ultrastructure, flow cytometry, and perfusion techniques. *J Vet Intern Med* **20**, 581–588.
- [4] Gader, A.G.M.A., Ghumlas, A.K.A., Hussain, M.F., Haidari, A.A. and White, J.G. (2008) The ultrastructure of camel blood platelets: a comparative study with human, bovine, and equine cells. *Platelets* **19**, 51–58.
- [5] White, J.G. (2013) 7. Platelet Structure. In: *Platelets*, 3rd edn., Ed: A.D. Michelson, Elsevier, Amsterdam, pp 117–144.
- [6] Rendu, F. and Brohard-Bohn, B. (2009) The platelet release reaction: Granules' constituents, secretion and functions. *Platelets* **12**, 261–273.
- [7] Meyers, K.M., Holmsen, H. and Seachord, C.L. (1982) Comparative study of platelet dense granule constituents. *Am J Physiol* **243**, 61.
- [8] Hellem, A. and Owren, P.A. (1964) The Mechanism of the hemostatic Function of Blood Platelets. *Acta Haematol* **31**, 230–238.
- [9] Gaarder, A., Jonsen, J., Laland, S., Hellem, A. and Owren, P.A. (1961) Adenosine Diphosphate in Red Cells as a Factor in the Adhesiveness of Human Blood Platelets. *Nature* **192**, 531–532.
- [10] Hovig, T. (1963) Aggregation of Rabbit Blood Platelets produced in vitro by saline "Extrakt" of Tendons. *Thromb Diath Haemorrh* **143**, 248–263.
- [11] Ardlie, N.G., Glew, G. and Schwartz, C.J. (1966) Influence of catecholamines on nucleotide-induced platelet aggregation. *Nature* **212**, 415–417.
- [12] Kloeze, J. (1969) Relationship between chemical structure and platelet-aggregation activity of prostaglandins. *Biochim Biophys Acta* **187**, 285–292.
- [13] Kunapuli, S.P. (1998) Functional characterization of platelet ADP receptors. *Platelets* **9**, 343–351.

- [14] Mateos-Trigos, G., Evans, R.J. and Heath, M.F. (2002) Effects of P2Y(1) and P2Y(12) receptor antagonists on ADP-induced shape change of equine platelets: comparison with human platelets. *Platelets* **13**, 285–292.
- [15] Mahaut-Smith, M.P., Ennion, S.J., Rolf, M.G. and Evans, R.J. (2000) ADP is not an agonist at P2X 1 receptors: evidence for separate receptors stimulated by ATP and ADP on human platelets. *Br J Pharmacol* **131**, 108–114.
- [16] Gibbins, J.M., Okuma, M., Farndale, R.W., Barnes, M. and Watson, S.P. (1997) Glycoprotein VI is the collagen receptor in platelets which underlies tyrosine phosphorylation of the Fc receptor  $\gamma$ -chain. *FEBS Lett* **413**, 255–259.
- [17] Offermanns, S., Laugwitz, K.L., Spicher, K. and Schultz, G. (1994) G proteins of the G12 family are activated via thromboxane A2 and thrombin receptors in human platelets. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**, 504–508.
- [18] Paul, B.Z., Jin, J. and Kunapuli, S.P. (1999) Molecular mechanism of thromboxane A(2)-induced platelet aggregation. Essential role for p2t(ac) and alpha(2a) receptors. *J.Biol.Chem* **274**, 29108–29114.
- [19] Rossaint, J. and Zarbock, A. (2015) Platelets in leucocyte recruitment and function. *Cardiovasc Res* **107**, 386–395.
- [20] Wong, C.H.Y., Jenne, C.N., Petri, B., Chrobok, N.L. and Kubes, P. (2013) Nucleation of platelets with blood-borne pathogens on Kupffer cells precedes other innate immunity and contributes to bacterial clearance. *Nat Immunol* **14**, 785–792.
- [21] Alevriadou, B.R., Moake, J.L., Turner, N.A., Ruggeri, Z.M., Folie, B.J., Phillips, M.D., Schreiber, A.B., Hrinda, M.E. and McIntire, L.V. (1993) Real-time analysis of shear-dependent thrombus formation and its blockade by inhibitors of von Willebrand factor binding to platelets. *Blood* **81**, 1263–1276.
- [22] Jackson, S.P., Nesbitt, W.S. and Kulkarni, S. (2003) Signaling events underlying thrombus formation. *J. Thromb. Haemost.* **1**, 1602–1612.
- [23] Kulkarni, S., Dopheide, S.M., Yap, C.L., Ravanat, C., Freund, M., Mangin, P., Heel, K.A., Street, A., Harper, I.S., Lanza, F. and Jackson, S.P. (2000) A revised model of platelet aggregation. *J. Clin. Invest.* **105**, 783–791.
- [24] Jenne, C.N., Wong, C.H.Y., Zemp, F.J., McDonald, B., Rahman, M.M., Forsyth, P.A., McFadden, G. and Kubes, P. (2013) Neutrophils recruited to sites of infection protect

- from virus challenge by releasing neutrophil extracellular traps. *Cell Host Microbe* **13**, 169–180.
- [25] Arman, M., Krauel, K., Tilley, D.O., Weber, C., Cox, D., Greinacher, A., Kerrigan, S.W. and Watson, S.P. (2014) Amplification of bacteria-induced platelet activation is triggered by FcγRIIA, integrin αIIbβ3, and platelet factor 4. *Blood* **123**, 3166–3174.
- [26] McMorran, B.J., Marshall, V.M., Graaf, C. de, Drysdale, K.E., Shabbar, M., Smyth, G.K., Corbin, J.E., Alexander, W.S. and Foote, S.J. (2009) Platelets kill intraerythrocytic malarial parasites and mediate survival to infection. *Science* **323**, 797–800.
- [27] Verschoor, A., Neuenhahn, M., Navarini, A.A., Graef, P., Plaumann, A., Seidlmeier, A., Nieswandt, B., Massberg, S., Zinkernagel, R.M., Hengartner, H. and Busch, D.H. (2011) A platelet-mediated system for shuttling blood-borne bacteria to CD8α+ dendritic cells depends on glycoprotein GPIb and complement C3. *Nat Immunol* **12**, 1194–1201.
- [28] Elzey, B.D., Grant, J.F., Sinn, H.W., Nieswandt, B., Waldschmidt, T.J. and Ratliff, T.L. (2005) Cooperation between platelet-derived CD154 and CD4+ T cells for enhanced germinal center formation. *J Leukoc Biol* **78**, 80–84.
- [29] Clark, S.R., Ma, A.C., Tavener, S.A., McDonald, B., Goodarzi, Z., Kelly, M.M., Patel, K.D., Chakrabarti, S., McAvoy, E., Sinclair, G.D., Keys, E.M., Allen-Vercoe, E., Devinney, R., Doig, C.J., Green, F.H.Y. and Kubes, P. (2007) Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nat Med* **13**, 463–469.
- [30] Peerschke, E.I., Reid, K.B. and Ghebrehiwet, B. (1993) Platelet activation by C1q results in the induction of alpha IIb/beta 3 integrins (GPIIb-IIIa) and the expression of P-selectin and procoagulant activity. *J Exp Med* **178**, 579–587.
- [31] Stoppelaar, S.F. de, van 't Veer, C. and van der Poll, T. (2014) The role of platelets in sepsis. *Thromb Haemost* **112**, 666–677.
- [32] Brinkmann, V., Reichard, U., Goosmann, C., Fauler, B., Uhlemann, Y., Weiss, D.S., Weinrauch, Y. and Zychlinsky, A. (2004) Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. *Science* **303**, 1532–1535.
- [33] McDonald, B., Urrutia, R., Yipp, B.G., Jenne, C.N. and Kubes, P. (2012) Intravascular neutrophil extracellular traps capture bacteria from the bloodstream during sepsis. *Cell Host Microbe* **12**, 324–333.
- [34] Hamburger, S.A. and McEver, R.P. (1990) GMP-140 mediates adhesion of stimulated platelets to neutrophils. *Blood* **75**, 550–554.

- [35] Evangelista, V., Manarini, S., Sideri, R., Rotondo, S., Martelli, N., Piccoli, A., Totani, L., Piccardoni, P., Vestweber, D., Gaetano, G.d. and Cerletti, C. (1999) Platelet/Polymorphonuclear Leukocyte Interaction: P-Selectin Triggers Protein-Tyrosine Phosphorylation–Dependent CD11b/CD18 Adhesion: Role of PSGL-1 as a Signaling Molecule. *Blood* **93**, 876–885.
- [36] Peters, M.J., Dixon, G., Kotowicz, K.T., Hatch, D.J., Heyderman, R.S. and Klein, N.J. (1999) Circulating platelet-neutrophil complexes represent a subpopulation of activated neutrophils primed for adhesion, phagocytosis and intracellular killing. *Br J Haematol* **106**, 391–399.
- [37] Henn, V., Slupsky, J.R., Grafe, M., Anagnostopoulos, I., Forster, R., Muller-Berghaus, G. and Kroczeck, R.A. (1998) CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature* **391**, 591–594.
- [38] Andre, P., Nannizzi-Alaimo, L., Prasad, S.K. and Phillips, D.R. (2002) Platelet-Derived CD40L: The Switch-Hitting Player of Cardiovascular Disease. *Circulation* **106**, 896–899.
- [39] Zarbock, A., Polanowska-Grabowska, R.K. and Ley, K. (2007) Platelet-neutrophil interactions: Linking hemostasis and inflammation. *Blood Rev* **21**, 99–111.
- [40] Liu, O., Jia, L., Liu, X., Wang, Y., Wang, X., Qin, Y., Du, J. and Zhang, H. (2012) Clopidogrel, a platelet P2Y<sub>12</sub> receptor inhibitor, reduces vascular inflammation and angiotensin II induced-abdominal aortic aneurysm progression. *PLOS ONE* **7**, e51707.
- [41] Sharron, M., Hoptay, C.E., Wiles, A.A., Garvin, L.M., Geha, M., Benton, A.S., Nagaraju, K. and Freishtat, R.J. (2012) Platelets induce apoptosis during sepsis in a contact-dependent manner that is inhibited by GPIIb/IIIa blockade. *PLoS ONE* **7**, e41549.
- [42] Rondina, M.T., Schwertz, H., Harris, E.S., Kraemer, B.F., Campbell, R.A., Mackman, N., Grissom, C.K., Weyrich, A.S. and Zimmerman, G.A. (2011) The septic milieu triggers expression of spliced tissue factor mRNA in human platelets. *J. Thromb. Haemost.* **9**, 748–758.
- [43] Gross, A.K., Dunn, S.P., Feola, D.J., Martin, C.A., Charnigo, R., Li, Z., Abdel-Latif, A. and Smyth, S.S. (2013) Clopidogrel treatment and the incidence and severity of community acquired pneumonia in a cohort study and meta-analysis of antiplatelet therapy in pneumonia and critical illness. *J. Thromb. Thrombolysis* **35**, 147–154.

- [44] Winning, J., Neumann, J., Kohl, M., Claus, R.A., Reinhart, K., Bauer, M. and Lösche, W. (2010) Antiplatelet drugs and outcome in mixed admissions to an intensive care unit. *Crit Care Med* **38**, 32–37.
- [45] Feige, K., Kastner, S.B., Dempfle, C.E. and Balestra, E. (2003) Changes in coagulation and markers of fibrinolysis in horses undergoing colic surgery. *J.Vet.Med.A Physiol Pathol.Clin.Med* **50**, 30–36.
- [46] Armengou, L., Monreal, L., Tarancon, I., Navarro, M., Ríos, J. and Segura, D. (2008) Plasma D-dimer concentration in sick newborn foals. *J Vet Intern Med* **22**, 411–417.
- [47] Cotovio, M., Monreal, L., Navarro, M., Segura, D., Prada, J. and Alves, A. (2007) Detection of fibrin deposits in tissues from horses with severe gastrointestinal disorders. *J Vet Intern Med* **21**, 308–313.
- [48] Cotovio, M., Monreal, L., Armengou, L., Prada, J., Almeida, J.M. and Segura, D. (2008) Fibrin deposits and organ failure in newborn foals with severe septicemia. *J Vet Intern Med* **22**, 1403–1410.
- [49] Brooks, A.C., Menzies-Gow, N.J., Wheeler-Jones, C.P., Bailey, S.R., Cunningham, F.M. and Elliott, J. (2007) Endotoxin-induced activation of equine platelets: evidence for direct activation of p38 MAPK pathways and vasoactive mediator production. *Inflamm Res* **56**, 154–161.
- [50] Weiss, D.J., Evanson, O.A., McClenahan, D., Fagliari, J.J. and Jenkins, K. (1997) Evaluation of platelet activation and platelet-neutrophil aggregates in ponies with alimentary laminitis. *Am J Vet Res* **58**, 1376–1380.
- [51] Bailey, S.R., Adair, H.S., Reinemeyer, C.R., Morgan, S.J., Brooks, A.C., Longhofer, S.L. and Elliott, J. (2009) Plasma concentrations of endotoxin and platelet activation in the developmental stage of oligofructose-induced laminitis. *Vet Immunol Immunopathol* **129**, 167–173.
- [52] Russell, K.E., Perkins, P.C., Hoffman, M.R., Miller, R.T., Walker, K.M., Fuller, F.J. and Sellon, D.C. (1999) Platelets from Thrombocytopenic Ponies Acutely Infected with Equine Infectious Anemia Virus Are Activated in Vivo and Hypofunctional. *Virology* **259**, 7–19.
- [53] Stokol, T., Yeo, W.M., Burnett, D., DeAngelis, N., Huang, T., Osterrieder, N., Catalfamo, J. and Stewart, J.P. (2015) Equid Herpesvirus Type 1 Activates Platelets. *PLOS ONE* **10**, e0122640.

- [54] Segura, D., Monreal, L., Armengou, L., Tarancon, I., Brugues, R. and Escolar, G. (2007) Mean platelet component as an indicator of platelet activation in foals and adult horses. *J Vet Intern Med* **21**, 1076–1082.
- [55] Traub-Dargatz, J.L. and Dargatz, D.A. (1994) A retrospective study of vein thrombosis in horses treated with intravenous fluids in a veterinary teaching hospital. *J Vet Intern Med* **8**, 264–266.
- [56] Dolente, B.A., Beech, J., Lindborg, S. and Smith, G. (2005) Evaluation of risk factors for development of catheter-associated jugular thrombophlebitis in horses: 50 cases (1993–1998) *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **227**, 1134–1141.
- [57] Duke, W.W. (1910) 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. *JAMA* **55**, 1185.
- [58] Nilsson, I.M., Magnusson, S. and Borchgrevink, C. (1963) The Duke and Ivy methods for determination of the bleeding time. *Thromb Diath Haemorrh* **10**, 223–234.
- [59] The British Society for Haematology BCSH Haemostasis and Thrombosis Task Force (1988) Guidelines on platelet function testing. *J Clin Pathol* **41**, 1322–1330.
- [60] Rodgers, R.P. and Levin, J. (1990) A critical reappraisal of the bleeding time. *Semin Thromb Hemost* **16**, 1–20.
- [61] Lind, S.E. (1991) The bleeding time does not predict surgical bleeding. *Blood* **77**, 2547–2552.
- [62] Harrison, P., Mackie, I., Mumford, A., Briggs, C., Liesner, R., Winter, M. and Machin, S. (2011) Guidelines for the laboratory investigation of heritable disorders of platelet function. *Br J Haematol* **155**, 30–44.
- [63] Hagedorn, H.W., Bock, M. and Schulz, R. (1992) Acetylsalicylic acid and blood coagulation in the horse. *Dtsch.Tierarztl.Wochenschr* **99**, 410–412.
- [64] Judson, D.G. and Barton, M.H. (1981) Effect of aspirin on haemostasis in the horse. *Res. Vet. Sci.* **30**, 241–242.
- [65] Segura, D. and Monreal, L. (2008) Poor Reproducibility of Template Bleeding Time in Horses. *J Vet Intern Med* **22**, 238–241.
- [66] Dura, A. (2006) *Blutzellzählung und -differenzierung bei Pferd und Schwein mit dem Hämatologiesystem ADVIA 120: Gerätevalidierung und Softwareadaptation*, 1st edn., VVB Laufersweiler, Wettenberg.

- [67] Moritz, A. Habilitation. Justus-Liebig-Universität (2000)
- [68] Harrison, P. and Goodall, A.H. (2008) "Message in the Platelet" – more than just vestigial mRNA! *Platelets* **19**, 395–404.
- [69] Briggs, C., Harrison, P., Grant, D., Staves, J. and MacHin, S.J. (2000) New quantitative parameters on a recently introduced automated blood cell counter--the XE 2100. *Clin Lab Haematol* **22**, 345–350.
- [70] Park, S.H., Park, C.-J., Kim, M.-J., Han, M.-Y., Lee, B.-R., Cho, Y.-U. and Jang, S. (2014) The Sysmex XN-2000 Hematology Autoanalyzer Provides a Highly Accurate Platelet Count than the Former Sysmex XE-2100 System Based on Comparison with the CD41/CD61 Immunoplatelet Reference Method of Flow Cytometry. *Ann Lab Med* **34**, 471.
- [71] Wassmuth, A.K., Riond, B., Hofmann-Lehmann, R. and Lutz, H. (2011) Evaluation of the Mythic 18 hematology analyzer for use with canine, feline, and equine samples. *J Vet Diagn Invest* **23**, 436–453.
- [72] Riond, B., Weissenbacher, S., Hofmann-Lehmann, R. and Lutz, H. (2011) Performance evaluation of the Sysmex poch-100iV Diff hematology analyzer for analysis of canine, feline, equine, and bovine blood. *Vet Clin Pathol* **40**, 484–495.
- [73] Pastor, J., Cuenca, R., Velarde, R., Marco, I., Viñas, L. and Lavín, S. (1998) Evaluation of a haematological analyser (Sysmex F-800) with equine blood. *Zentralbl Veterinarmed A* **45**, 119–126.
- [74] Roleff, S., Arndt, G., Bottema, B., Junker, L., Grabner, A. and Kohn, B. (2007) Clinical evaluation of the CA530-VET hematology analyzer for use in veterinary practice. *Vet Clin Pathol* **36**, 155–166.
- [75] Giordano, A., Rossi, G., Pieralisi, C. and Paltrinieri, S. (2008) Evaluation of equine hemograms using the ADVIA 120 as compared with an impedance counter and manual differential count. *Vet Clin Pathol* **37**, 21–30.
- [76] Bauer, N.B., Nakagawa, J., Dunker, C., Failing, K. and Moritz, A. (2011) Evaluation of the automated hematology analyzer Sysmex XT-2000iV compared to the ADVIA(R) 2120 for its use in dogs, cats, and horses: Part I--precision, linearity, and accuracy of complete blood cell count. *J.Vet Diagn.Invest* **23**, 1168–1180.
- [77] Lilliehöök, I. and Tvedten, H. (2009) Validation of the Sysmex XT-2000iV hematology system for dogs, cats, and horses. I. Erythrocytes, platelets, and total leukocyte counts. *Vet Clin Pathol* **38**, 163–174.

- [78] Goldmann, F., Bauer, N. and Moritz, A. (2013) Comparison of the ProCyte Dx analyzer with the ADVIA 2120 and the manual differential for validation of equine and bovine hemograms. *Comp Clin Pathol* **22**, 855–868.
- [79] Papasouliotis, K., Graham, S.C., Mary, Sparkes, A.H. and Gruffydd-Jones, T. (1999) Analysis of Feline, Canine and Equine Hemograms Using the QBC VetAutoread. *Vet Clin Pathol* **28**, 109–115.
- [80] International Council for Standardization in Haematology Expert Panel on Cytometry (2000) Recommended methods for the visual determination of white blood cell count and platelet count, Geneva : World Health Organization. Available at [http://www.who.int/iris/bitstream/10665/66241/1/WHO\\_DIL\\_00.3.pdf](http://www.who.int/iris/bitstream/10665/66241/1/WHO_DIL_00.3.pdf).
- [81] International Council for Standardization in Haematology Expert Panel on Cytometry and International Society of Laboratory Hematology Task Force on Platelet Counting. (2001) Platelet counting by the RBC/platelet ratio method. A reference method. *Am J Clin Pathol* **115**, 460–464.
- [82] Kim, S.Y., Kim, J.-E., Kim, H.K., Han, K.-S. and Toh, C.H. (2010) Accuracy of platelet counting by automated hematologic analyzers in acute leukemia and disseminated intravascular coagulation: potential effects of platelet activation. *Am J Clin Pathol* **134**, 634–647.
- [83] O'Shea, C.M., Werre, S.R. and Dahlgren, L.A. (2015) Comparison of platelet counting technologies in equine platelet concentrates. *Vet Surg* **44**, 304–313.
- [84] England, J.M., Rowan, R.M., van Assendelft, O.W., Bull, B.S., Coulter, W., Fujimoto, K., Groner, W., Richardson-Jones, A., Klee, G., Koepke, J.A., Lewis, S.M., McLaren, C.E., Shinton, N.K., Tatsumi, N. and Verwilghen, R.L. (1993) Recommendations of the International Council for Standardization in Haematology for Ethylenediaminetetraacetic Acid Anticoagulation of Blood for Blood Cell Counting and Sizing: International Council for Standardization in Haematology: Expert Panel on Cytometry. *Am J Clin Pathol* **100**, 371–372.
- [85] Schuff-Werner, P., Steiner, M., Fenger, S., Gross, H.-J., Bierlich, A., Dreissiger, K., Mannuss, S., Siegert, G., Bachem, M. and Kohlschein, P. (2013) Effective estimation of correct platelet counts in pseudothrombocytopenia using an alternative anticoagulant based on magnesium salt. *Br J Haematol* **162**, 684–692.

- [86] Prins, M., van Leeuwen, M.W. and Teske, E. (2009) Stability and reproducibility of ADVIA 120-measured red blood cell and platelet parameters in dogs, cats, and horses, and the use of reticulocyte haemoglobin content (CH(R)) in the diagnosis of iron deficiency. *Tijdschr Diergeneeskd* **134**, 272–278.
- [87] Sellon, D.C., Levine, J.F., Millikin, E., Palmer, K., Grindem, C.B. and Covington, P. (1996) Thrombocytopenia in horses: 35 cases (1989-1994) *J Vet Intern Med* **10**, 127–132.
- [88] Crawford, T.B., Wardrop, K.J., Tornquist, S.J., Reilich, E., Meyers, K.M. and McGuire, T.C. (1996) A primary production deficit in the thrombocytopenia of equine infectious anemia. *J. Virol.* **70**, 7842–7850.
- [89] Monreal, L., Angles, A.M., Espada, Y., Monasterio, J. and Monreal, M. (2000) Hypercoagulation and hypofibrinolysis in horses with colic and DIC. *Equine Vet J Suppl*, 19–25.
- [90] Buechner-Maxwell, V., Scott, M.A., Godber, L. and Kristensen, A.T. (1997) Neonatal Alloimmune Thrombocytopenia in a Quarter Horse Foal. *J Vet Intern Med* **11**, 304–308.
- [91] Fey, K. and Sasse, H.H.L. (1998) Relapsing immune-mediated thrombocytopenia of unknown origin in a stallion. *Equine Vet Educ* **10**, 127–132.
- [92] Perkins, G.A., Miller, W.H., Divers, T.J., Clark, C.K., Belgrave, R.L. and Sellon, D.C. (2005) Ulcerative dermatitis, thrombocytopenia, and neutropenia in neonatal foals. *J Vet Intern Med* **19**, 211–216.
- [93] Ramirez, S., Gaunt, S.D., McClure, J.J. and Oliver, J. (1999) Detection and effects on platelet function of anti-platelet antibody in mule foals with experimentally induced neonatal alloimmune thrombocytopenia. *J Vet Intern Med* **13**, 534–539.
- [94] Gowland, E., Kay, H.E.M., Spillman, J.C. and Williamson, J.R. (1969) Agglutination of platelets by a serum factor in the presence of EDTA. *J Clin Pathol* **22**, 460–464.
- [95] Shreiner, D.P. and Bell, W.R. (1973) Pseudothrombocytopenia: Manifestation of a New Type of Platelet Agglutinin. *Blood* **42**, 541–549.
- [96] Schrezenmeier, H., Muller, H., Gunsilius, E., Heimpel, H. and Seifried, E. (1995) Anticoagulant-induced pseudothrombocytopenia and pseudoleucocytosis. *Thromb Haemost* **73**, 506–513.
- [97] Onder, O., Weinstein, A. and Hoyer, L.W. (1980) Pseudothrombocytopenia caused by platelet agglutinins that are reactive in blood anticoagulated with chelating agents. *Blood* **56**, 177–182.

- [98] Pegels, J.G., Bruyneyes, E.C., Engelfriet, C.P. and Borne, A.E. von dem (1982) Pseudothrombocytopenia: an immunologic study on platelet antibodies dependent on ethylene diamine tetra-acetate. *Blood* **59**, 157–161.
- [99] Lin, J., Luo, Y., Yao, S., Yan, M., Li, J., Ouyang, W. and Kuang, M. (2015) Discovery and Correction of Spurious Low Platelet Counts due to EDTA-Dependent Pseudothrombocytopenia. *J Clin Lab Anal* **29**, 419–426.
- [100] Berkman, N., Michaeli, Y., Or, R. and Eldor, A. (1991) Edta-dependent pseudothrombocytopenia: A clinical study of 18 patients and a review of the literature. *Am. J. Hematol.* **36**, 195–201.
- [101] Lippi, G. and Plebani, M. (2012) EDTA-dependent pseudothrombocytopenia: further insights and recommendations for prevention of a clinically threatening artifact. *Clin Chem Lab Med* **50**, 1281–1285.
- [102] Wu, W., Guo, Y., Zhang, L., Cui, W., Li, W. and Zhang, S. (2011) Clinical utility of automated platelet clump count in the screening for ethylene diamine tetraacetic acid-dependent pseudothrombocytopenia. *Chin Med J (Engl)* **124**, 3353–3357.
- [103] Hinchcliff, K.W., Kociba, G.J. and Mitten, L.A. (1993) Diagnosis of EDTA-dependent pseudothrombocytopenia in a horse. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **203**, 1715–1716.
- [104] Sellon, D.C., Levine, J.F., Palmer, K., Millikin, E., Grindem, C.B. and Covington, P. (1997) Thrombocytosis in 24 horses (1989-1994) *J Vet Intern Med* **11**, 24–29.
- [105] Tefferi, A. (2013) 49. Thrombocytosis and essential Thrombocythemia. In: *Platelets*, 3rd edn., Ed: A.D. Michelson, Elsevier, Amsterdam, pp 999–1017.
- [106] Griesshammer, M., Bangerter, M., Sauer, T., Wennauer, R., Bergmann, L. and Heimpel, H. (1999) Aetiology and clinical significance of thrombocytosis: Analysis of 732 patients with an elevated platelet count. *J Intern Med* **245**, 295–300.
- [107] Zelmanovic, D., Collela, G.M., Hetherington, E., Chapman, E.S. and Pasettiner, L. (1996) Automated method and device for identifying and quantifying platelets and for determining platelet activation state using whole blood samples.
- [108] Macey, M.G., Carty, E., Webb, L., Chapman, E.S., Zelmanovic, D., Okrongly, D., Rampton, D.S. and Newland, A.C. (1999) Use of mean platelet component to measure platelet activation on the ADVIA 120 haematology system. *Cytometry* **38**, 250–255.
- [109] Ahnadi, C.E., Chapman, E.S., Lepine, M., Okrongly, D., Pujol-Moix, N., Hernandez, A., Boughrassa, F. and Grant, A.M. (2003) Assessment of platelet activation in several

- different anticoagulants by the Advia 120 Hematology System, fluorescence flow cytometry, and electron microscopy. *Thromb Haemost* **90**, 940–948.
- [110] Diaz-Ricart, M., Brunso, L., Pino, M., Navalon, F., Jou, J.M., Heras, M., White, J.G. and Escolar, G. (2010) Preanalytical treatment of EDTA-anticoagulated blood to ensure stabilization of the mean platelet volume and component measured with the ADVIA counters. *Thromb Res* **126**, e30-e35.
- [111] Lippi, G., Pavesi, F. and Pipitone, S. (2015) Evaluation of mean platelet volume with four hematological analyzers: harmonization is still an unresolved issue. *Blood Coagul Fibrinolysis* **26**, 235–237.
- [112] Diquattro, M., Gagliano, F., Calabrò, G.M., Tommasi, M., Scott, C.S., Mancuso, G., Palma, B. and Menozzi, I. (2009) Relationships between platelet counts, platelet volumes and reticulated platelets in patients with ITP: evidence for significant platelet count inaccuracies with conventional instrument methods. *Int J Lab Hematol* **31**, 199–206.
- [113] O'Brien, J.R. (1962) Platelet aggregation: Part I Some effects of the adenosine phosphates, thrombin, and cocaine upon platelet adhesiveness. *J Clin Pathol* **15**, 446–452.
- [114] Harrison, P. and Mumford, A. (2009) Screening Tests of Platelet Function: Update on Their Appropriate Uses for Diagnostic Testing. *Semin Thromb Hemost* **35**, 150.
- [115] O'Brien, J.R. (1962) Platelet aggregation: Part II Some results from a new method of study. *J Clin Pathol* **15**, 452–455.
- [116] Born, G.V. (1962) Aggregation of Blood Platelets by Adenosine Diphosphate and its Reversal. *Nature* **194**, 927 EP -.
- [117] Kelly, A.B., Steffey, E.P., McNeal, D. and Willits, N. (1985) Immediate and long-term effects of halothane anesthesia on equine platelet function. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* **8**, 284–289.
- [118] Jarvis, G.E. and Evans, R.J. (1994) Endotoxin-induced platelet aggregation in heparinised equine whole blood in vitro. *Res. Vet. Sci.* **57**, 317–324.
- [119] Boudreaux, M.K., Wagner-Mann, C.C., Purohit, R., Hankes, G., Spano, J., Pablo, L., Lee, S. and Conti, J. (1988) Platelet function testing in the pony. *Lab Anim Sci* **38**, 448–451.
- [120] Pelagalli, A., Lombardi, P., d'Angelo, D., Della, M.R., Avallone, L. and Staiano, N. (2002) Species variability in platelet aggregation response to different agonists. *J Comp Pathol* **127**, 126–132.

- [121] Bailey, S.R., Andrews, M.J., Elliott, J. and Cunningham, F.M. (2000) Actions and interactions of ADP, 5-HT, histamine and PAF on equine platelets. *Res. Vet. Sci.* **68**, 175–180.
- [122] Brainard, B.M., Epstein, K.L., LoBato, D.N., Kwon, S., Papich, M.G. and Moore, J.N. (2011) Effects of Clopidogrel and Aspirin on Platelet Aggregation, Thromboxane Production, and Serotonin Secretion in Horses. *J Vet Intern Med* **25(1)**, 116–122.
- [123] Burkett, B.N., Thomason, J.M., Hurdle, H.M., Wills, R.W. and Fontenot, R.L. (2016) Effects of Firocoxib, Flunixin Meglumine, and Phenylbutazone on Platelet Function and Thromboxane Synthesis in Healthy Horses. *Vet Surg.*
- [124] Cambridge, H., Lees, P., Hooke, R.E. and Russell, C.S. (1991) Antithrombotic actions of aspirin in the horse. *Equine Vet J* **23**, 123–127.
- [125] Heath, M.F., Evans, R.J., Poole, A.W., Hayes, L.J., McEvoy, R.J. and Littler, R.M. (1994) The effects of aspirin and paracetamol on the aggregation of equine blood platelets. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* **17**, 374–378.
- [126] Kingston, J.K., Bayly, W.M., Sellon, D.C., Meyers, K.M. and Wardrop, K.J. (2001) Effects of sodium citrate, low molecular weight heparin, and prostaglandin E1 on aggregation, fibrinogen binding, and enumeration of equine platelets. *Am J Vet Res* **62**, 547–554.
- [127] Kingston, J.K., Sampson, S.N., Beard, L.A., Meyers, K.M., Sellon, D.C. and Bayly, W.M. (1999) The effect of supramaximal exercise on equine platelet function. *Equine Vet J Suppl* **30**, 181–183.
- [128] Mateos-Trigos, G., Evans, R.J. and Heath, M.F. (2002) Effects of a P2Y<sub>12</sub> receptor antagonist on the response of equine platelets to ADP. Comparison with human platelets. *Res. Vet. Sci.* **73**, 171–175.
- [129] Meyers, K.M., Katz, J.B., Clemmons, R.M., Smith, J.B. and Holmsen, H. (1980) An evaluation of the arachidonate pathway of platelets from companion and food-producing animals, mink, and man. *Thromb Res* **20**, 13–24.
- [130] Meyers, K.M., Lindner, C. and Grant, B. (1979) Characterization of the equine platelet aggregation response. *Am J Vet Res* **40**, 260–264.
- [131] Poole, A.W., Heath, M.F. and Evans, R.J. (1993) ADP induces desensitisation of equine platelet aggregation responses: studies using ADP beta S, a stable analogue of ADP. *Res. Vet. Sci.* **54**, 235–243.

- [132] Rickards, K.J., Andrews, M.J., Waterworth, T.H., Alexander, G.B. and Cunningham, F.M. (2003) Differential effects of phosphodiesterase inhibitors on platelet activating factor (PAF)- and adenosine diphosphate (ADP)-induced equine platelet aggregation. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* **26**, 277–282.
- [133] Weiss, D.J. and Evanson, O.A. (2004) Comparison of three arginine-glycine-aspartate-containing peptides as inhibitors of equine platelet aggregation. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* **27**, 377–379.
- [134] Weiss, D.J., Evanson, O.A., McClenahan, D., Fagliari, J.J., Dunnwiddie, C.T. and Wells, R.E. (1998) Effect of a competitive inhibitor of platelet aggregation on experimentally induced laminitis in ponies. *Am J Vet Res* **59**, 814–817.
- [135] Weiss, D.J., Evanson, O.A. and Wells, R.E. (1997) Evaluation of arginine-glycine-aspartate-containing peptides as inhibitors of equine platelet function. *Am J Vet Res* **58**, 457–460.
- [136] Krueger, L.A., Barnard, M.R., Frelinger, A.L., III, Furman, M.I. and Michelson, A.D. (2002) 6.10.1 Immunophenotypic Analysis of Platelets. *Curr Protoc Cytom*, 6.10.1-6.10.17.
- [137] Cardinal, D.C. and Flower, R.J. (1980) The electronic aggregometer: a novel device for assessing platelet behavior in blood. *J Pharmacol Methods* **3**, 135–158.
- [138] Calatzis, A., Wittwer, M. and Krueger, B. (2004) A new approach to platelet function analysis in whole blood-the Multiplate® Analyzer. *Platelets* **15**, 485–486.
- [139] Velik-Salchner, C., Maier, S., Innerhofer, P., Streif, W., Klingler, A., Kolbitsch, C. and Fries, D. (2008) Point-of-care whole blood impedance aggregometry versus classical light transmission aggregometry for detecting aspirin and clopidogrel: the results of a pilot study. *Anesth Analg* **107**, 1798–1806.
- [140] Pedersen, S.B., Grove, E.L., Nielsen, H.L., Mortensen, J., Kristensen, S.D. and Hvas, A.M. (2009) Evaluation of aspirin response by Multiplate whole blood aggregometry and light transmission aggregometry. *Platelets* **20**, 415–420.
- [141] Chen, F., Maridakis, V., O'Neill, E.A., Beals, C., Radziszewski, W., Lepeleire, I. de, Van, D., Depre, M., Bolognese, J.A., Hoon, J. de and Jacquemin, M. (2011) A randomized clinical trial comparing point-of-care platelet function assays and bleeding time in healthy subjects treated with aspirin or clopidogrel. *Platelets*, 249–258.

- [142] Penz, S.M., Bernlochner, I., Toth, O., Lorenz, R., Calatzis, A. and Siess, W. (2010) Selective and rapid monitoring of dual platelet inhibition by aspirin and P2Y12 antagonists by using multiple electrode aggregometry. *Thromb J* **8**, 9.
- [143] *User Manual Multiplate 5.0 Analyzer* (2010), München.
- [144] Johnson, A., Dovlatova, N. and Heptinstall, S. (2008) Multiple electrode aggregometry and P2Y12 antagonists. *Thromb Haemost*, 985–1136.
- [145] Peerschke, E.I.B., Castellone, D.D., Stroobants, A.K. and Francis, J. (2014) Reference range determination for whole-blood platelet aggregation using the Multiplate analyzer. *Am J Clin Pathol* **142**, 647–656.
- [146] Johnston, L.R., Larsen, P.D., La Flamme, A.C. and Harding, S.A. (2013) Methodological considerations for the assessment of ADP induced platelet aggregation using the Multiplate® analyser. *Platelets* **24**, 303–307.
- [147] Davies, G.R., Mills, G.M., Lawrence, M., Battle, C., Morris, K., Hawkins, K., Williams, P.R., Davidson, S., Thomas, D. and Evans, P.A. (2014) The role of whole blood impedance aggregometry and its utilisation in the diagnosis and prognosis of patients with systemic inflammatory response syndrome and sepsis in acute critical illness. *PLOS ONE* **9**, e108589.
- [148] Adamzik, M., Gorlinger, K., Peters, J. and Hartmann, M. (2012) Whole blood impedance aggregometry as a biomarker for the diagnosis and prognosis of severe sepsis. *Crit Care* **16**, R204.
- [149] Dugan, G., O'Donnell, L., Hanbury, D.B., Cline, J.M. and Caudell, D.L. (2015) Assessment of Multiplate platelet aggregometry using citrate, heparin or hirudin in Rhesus macaques. *Platelets* **26**, 730–735.
- [150] Ponschab, M., van Griensven, M., Heitmeier, S., Laux, V., Schlimp, C.J., Calatzis, A., Bahrami, S., Redl, H. and Schöch, H. (2016) Platelet function in baboons and humans - A comparative study of whole blood using impedance platelet aggregometry (Multiplate®) *Thromb Res* **147**, 115–121.
- [151] Fröbert, O., Christensen, K., Fahlman, A., Brunberg, S., Josefsson, J., Särndahl, E., Swenson, J.E. and Arnemo, J.M. (2010) Platelet function in brown bear (*Ursus arctos*) compared to man. *Thromb J* **8**, 11.
- [152] Marschner, C.B., Kristensen, A.T., Spodsberg, E.H. and Wiinberg, B. (2012) Evaluation of platelet aggregometry in dogs using the Multiplate platelet analyzer: impact of

- anticoagulant choice and assay duration. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)* **22**, 107–115.
- [153] Shipley, E.A., Hogan, D.F., Fiakpui, N.N., Magee, A.N., Green, H.W. and Sederquist, K.A. (2013) In vitro effect of pimobendan on platelet aggregation in dogs. *Am J Vet Res* **74**, 403–407.
- [154] Defontis, M., Côté, S., Stirn, M. and Ledieu, D. (2013) Optimization of Multiplate(®) whole blood platelet aggregometry in the Beagle dog and Wistar rat for ex vivo drug toxicity testing. *Exp Toxicol Pathol* **65**, 637–644.
- [155] Saati, S., Abrams-Ogg, A.C.G., Blois, S.L. and Wood, R.D. (2018) Comparison of Multiplate, Platelet Function Analyzer-200, and Plateletworks in Healthy Dogs Treated with Aspirin and Clopidogrel. *J Vet Intern Med* **32**, 111–118.
- [156] Haines, J.M., Lee, P.M., Hegedus, R.M., Hwang, J.K. and Court, M.H. (2017) Establishment of reference ranges and evaluation of in vitro concentration-dependent platelet inhibition by acetylsalicylic acid for multiple electrode impedance aggregometry in healthy dogs. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* **40**, 618–628.
- [157] Kalbantner, K., Baumgarten, A. and Mischke, R. (2010) Measurement of platelet function in dogs using a novel impedance aggregometer. *Vet J* **185**, 144–151.
- [158] Marschner, C.B., Wiinberg, B., Tarnow, I., Markussen, B., Kühnel, L., Bochsén, L. and Kristensen, A.T. (2018) The influence of inflammation and hematocrit on clot strength in canine thromboelastographic hypercoagulability. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)* **28**, 20–30.
- [159] Bauer, N.B., Er, E. and Moritz, A. (2011) Influence of blood collection technique on platelet function and coagulation variables in dogs. *Am J Vet Res* **72**, 64–72.
- [160] Bauer, N.B., Er, E. and Moritz, A. (2012) Effect of submaximal aerobic exercise on platelet function, platelet activation, and secondary and tertiary hemostasis in dogs. *Am J Vet Res* **73**, 125–133.
- [161] Magee, A.N., Hogan, D.F., Sederquist, K.A. and Durham, J.A. (2014) In vitro effects of the glycoprotein IIb/IIIa receptor antagonists abciximab and eptifibatid on platelet aggregation in healthy cats. *Am J Vet Res* **75**, 309–312.
- [162] Ho, K.K., Abrams-Ogg, A.C.G., Wood, R.D., O'Sullivan, M.L., Kirby, G.M. and Blois, S.L. (2015) Assessment of platelet function in healthy sedated cats using three whole blood platelet function tests. *J Vet Diagn Invest* **27**, 352–360.

- [163] Teuber, M. and Mischke, R. (2016) Influence of a low dosage of clopidogrel on platelet function in cats as measured by the platelet function analyser PFA-100 and the multiplate analyser. *Res Vet Sci* **109**, 149–156.
- [164] Ho, K.K., Abrams-Ogg, A.C., Wood, R.D., O'Sullivan, M.L., Kirby, G.M. and Blois, S.L. (2017) Assessment of platelet function in healthy cats in response to commonly prescribed antiplatelet drugs using three point-of-care platelet function tests. *J Feline Med Surg* **19**, 638–647.
- [165] Kim, C.-W., Yun, J.-W., Bae, I.-H., Park, Y.-H., Jeong, Y.S., Park, J.W., Chung, J.-H., Park, Y.-H. and Lim, K.-M. (2011) Evaluation of anti-platelet and anti-thrombotic effects of cilostazol with PFA-100® and Multiplate® whole blood aggregometer in vitro, ex vivo and FeCl<sub>3</sub>-induced thrombosis models in vivo. *Thromb Res* **127**, 565–570.
- [166] Baumgarten, A., Wilhelmi, M., Kalbantner, K., Ganter, M. and Mischke, R. (2010) Measurement of platelet aggregation in ovine blood using a new impedance aggregometer. *Vet Clin Pathol* **39**, 149–156.
- [167] Hayes, R.A., Foley, S., Shekar, K., Diab, S., Dunster, K.R., McDonald, C. and Fraser, J.F. (2015) Ovine platelet function is unaffected by extracorporeal membrane oxygenation within the first 24 h. *Blood Coagul Fibrinolysis* **26**, 816–822.
- [168] Czura, C.J., Schultz, A., Kaipel, M., Khadem, A., Huston, J.M., Pavlov, V.A., Redl, H. and Tracey, K.J. (2010) Vagus nerve stimulation regulates hemostasis in swine. *Shock* **33**, 608–613.
- [169] Haas, T., Fries, D., Holz, C., Innerhofer, P., Streif, W., Klingler, A., Hanke, A. and Velik-Salchner, C. (2008) Less impairment of hemostasis and reduced blood loss in pigs after resuscitation from hemorrhagic shock using the small-volume concept with hypertonic saline/hydroxyethyl starch as compared to administration of 4% gelatin or 6% hydroxyethyl starch solution. *Anesth Analg* **106**, 1078-86, table of contents.
- [170] Mohr, J., Ruchholtz, S., Hildebrand, F., Flohé, S., Frink, M., Witte, I., Weuster, M., Fröhlich, M., van Griensven, M., Keibl, C. and Mommsen, P. (2013) Induced hypothermia does not impair coagulation system in a swine multiple trauma model. *J Trauma Acute Care Surg* **74**, 1014–1020.
- [171] Witt, L., Osthaus, W.A., Jahn, W., Rahe-Meyer, N., Hanke, A., Schmidt, F., Boehne, M. and Sümpelmann, R. (2012) Isovolaemic hemodilution with gelatin and

- hydroxyethylstarch 130/0.42: effects on hemostasis in piglets. *Paediatr Anaesth* **22**, 379–385.
- [172] Kornreich, B., Enyeart, M., Jesty, S.A., Nydam, D.V. and Divers, T.J. (2010) The Effects of Pentoxifylline on Equine Platelet Aggregation. *J Vet Intern Med*, 1196–1202.
- [173] Segura, D., Monreal, L., Espada, Y., Pastor, J., Mayos, I. and Homedes, J. (2005) Assessment of a platelet function analyser in horses: reference range and influence of a platelet aggregation inhibitor. *Vet J* **170**, 108–112.
- [174] Watts, A.E., Ness, S.L., Divers, T.J., Fubini, S.L., Frye, A.H., Stokol, T., Cummings, K.J. and Brooks, M.B. (2014) Effects of clopidogrel on horses with experimentally induced endotoxemia. *Am J Vet Res* **75**, 760–769.
- [175] Ness, S.L., Frye, A.H., Divers, T.J., Rishniw, M., Erb, H.N. and Brooks, M.B. (2017) Randomized placebo-controlled study of the effects of Yunnan Baiyao on hemostasis in horses. *Am J Vet Res* **78**, 969–976.
- [176] Brooks, M.B., Divers, T.J., Watts, A.E., Ness, S.L., Frye, A.H., Stokol, T. and Fubini, S.L. (2013) Effects of clopidogrel on the platelet activation response in horses. *Am J Vet Res* **74**, 1212–1222.
- [177] Iwaszko-Simonik, A. and Graczyk, S. (2016) Evaluation of platelet function in horses undergoing colic surgery using the PFA-100 platelet function analyser. *Veterinarni Medicina* **60**, 476–482.
- [178] Epstein, K.L., Brainard, B.M., Gomez-Ibanez, S.E., Lopes, M.A.F., Barton, M.H. and Moore, J.N. (2011) Thrombelastography in Horses with Acute Gastrointestinal Disease. *J Vet Intern Med* **25**, 307–314.
- [179] Junge, H.K., Ringer, S.K., Mayer, N. and Schwarzwald, C.C. (2016) Assessment of method reliability and determination of reference intervals for rotational thromboelastometry in horses. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)* **26**, 691–703.
- [180] Thane, K., Bedenice, D. and Pacheco, A. (2017) Operator-based variability of equine thromboelastography. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)* **27**, 419–424.
- [181] Scruggs, J.L., Flatland, B., McCormick, K.A. and Reed, A. (2016) Biological variation of thromboelastography variables in 10 clinically healthy horses. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)* **26**, 80–84.
- [182] Leclere, M., Bédard, C., Cortes-Dubly, M.-L. and Lavoie, J.-P. (2015) Blood hypercoagulability and systemic inflammation in horses with heaves. *Vet J* **206**, 105–107.

- [183] Rossi, T.M., Smith, S.A., McMichael, M.A. and Wilkins, P.A. (2015) Evaluation of contact activation of citrated equine whole blood during storage and effects of contact activation on results of recalcification-initiated thromboelastometry. *Am J Vet Res* **76**, 122–128.
- [184] Hyldahl Laursen, S., Andersen, P.H., Kjelgaard-Hansen, M. and Wiinberg, B. (2013) Comparison of components of biological variation between 3 equine thromboelastography assays. *Vet Clin Pathol* **42**, 443–450.
- [185] McGovern, K.F., Lascola, K.M., Smith, S.A., Clark-Price, S.C., Wilkins, P.A., Schaeffer, D.J. and Foreman, J.H. (2013) The Effects of Hyperglycemia and Endotoxemia on Coagulation Parameters in Healthy Adult Horses. *J Vet Intern Med* **27**, 347–353.
- [186] Mendez-Angulo, J.L., Mudge, M., Zaldivar-Lopez, S., Vilar-Saavedra, P. and Couto, G. (2011) Thromboelastography in healthy, sick non-septic and septic neonatal foals. *Aust Vet J* **89**, 500–505.
- [187] Mendez-Angulo, J.L., Mudge, M.C., Vilar-Saavedra, P., Stingle, N. and Couto, C.G. (2010) Thromboelastography in healthy horses and horses with inflammatory gastrointestinal disorders and suspected coagulopathies. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)* **20**, 488–493.
- [188] Epstein, K.L., Brainard, B.M., Lopes, M.A.F., Barton, M.H. and Moore, J.N. (2009) Thrombelastography in 26 healthy horses with and without activation by recombinant human tissue factor. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)* **19**, 96–101.
- [189] Tarnow, I., Kristensen, A.T., Krogh, A.K.R., Frelinger, A.L., III, Barnard, M.R. and Michelson, A.D. (2008) Effects of physiologic agonists on canine whole blood flow cytometry assays of leukocyte–platelet aggregation and platelet activation. *Vet Immunol Immunopathol* **123**, 345–352.
- [190] Klinkhardt, U., Bauersachs, R., Adams, J., Graff, J., Lindhoff-Last, E. and Harder, S. (2003) Clopidogrel but not aspirin reduces P-selectin expression and formation of platelet-leukocyte aggregates in patients with atherosclerotic vascular disease. *Clin Pharmacol Ther* **73**, 232–241.
- [191] Lalko, C.C., Deppe, E., Ulatowski, D., Lutgen, A., Hart, A.P., Patton, E.A., Lunn, D.P., Suresh, M. and Darien, B.J. (2003) Equine platelet CD62P (P-selectin) expression: a phenotypic and morphologic study. *Vet Immunol Immunopathol* **91**, 119–134.

- [192] Brainard, B.M., Epstein, K.L., LoBato, D.N., Kwon, S., Darien, B.J., Hurley, D.J. and Moore, J.N. (2012) Treatment with aspirin or clopidogrel does not affect equine platelet expression of P selectin or platelet-neutrophil aggregates. *Vet Immunol Immunopathol* **149**, 119–125.
- [193] Iwaszko-Simonik, A., Niedzwiedz, A., Graczyk, S., Slowikowska, M. and Pliszczyk-Krol, A. (2015) Expression of surface platelet receptors (CD62P and CD41/61) in horses with recurrent airway obstruction (RAO) *Vet Immunol Immunopathol* **164**, 87–92.
- [194] Weiss, D.J. and Evanson, O.A. (1997) Detection of activated platelets and platelet-leukocyte aggregates in horses. *Am J Vet Res* **58**, 823–827.
- [195] Russell, K.E., Perkins, P.C., Grindem, C.B., Walker, K.M. and Sellon, D.C. (1997) Flow cytometric method for detecting thiazole orange-positive (reticulated) platelets in thrombocytopenic horses. *Am J Vet Res* **58**, 1092–1096.
- [196] Dunkel, B., Rickards, K.J., Werling, D., Page, C.P. and Cunningham, F.M. (2009) Neutrophil and platelet activation in equine recurrent airway obstruction is associated with increased neutrophil CD13 expression, but not platelet CD41/61 and CD62P or neutrophil-platelet aggregate formation. *Vet Immunol Immunopathol* **131**, 25–32.
- [197] Barnard, M.R., Krueger, L.A., Frelinger, A.L., III, Furman, M.I. and Michelson, A.D. (2003) 6.15.1 Whole Blood Analysis of Leukocyte-Platelet Aggregates. *Curr Protoc Cytom*, 6.15.1-6.15.8.
- [198] Pintado, C.O., Friend, M. and Llanes, D. (1995) Characterisation of a membrane receptor on ruminants and equine platelets and peripheral blood leukocytes similar to the human integrin receptor glycoprotein IIb/IIIa (CD41/61) *Vet Immunol Immunopathol* **44**, 359–368.
- [199] Weiss, D.J., Evanson, O.A., Fagliari, J.J. and Valberg, S. (1998) Evaluation of platelet activation and platelet-neutrophil aggregates in Thoroughbreds undergoing near-maximal treadmill exercise. *Am J Vet Res* **59**, 393–396.
- [200] Schrottmaier, W.C., Kral, J.B., Zeitlinger, M., Salzmann, M., Jilma, B. and Assinger, A. (2016) Platelet activation at the onset of human endotoxemia is undetectable in vivo. *Platelets*, 1–5.
- [201] Shattil, S.J., Hoxie, J.A., Cunningham, M. and Brass, L.F. (1985) Changes in the platelet membrane glycoprotein IIb.IIIa complex during platelet activation. *J.Biol.Chem* **260**, 11107–11114.

- [202] Lapchak, P.H., Ioannou, A., Kannan, L., Rani, P., Dalle Lucca, J.J., Tsokos, G.C. and Ryffel, B. (2012) Platelet-Associated CD40/CD154 Mediates Remote Tissue Damage after Mesenteric Ischemia/Reperfusion Injury. *PLOS ONE* **7**, e32260.
- [203] Michelson, A.D., Barnard, M.R., Hechtman H. B., MacGregor H., Connolly R. J., Loscalzo, J. and Valeri, C.R. (1996) In vivo tracking of platelets: circulating degranulated platelets rapidly lose surface P-selectin but continue to circulate and function. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 11877–11882.
- [204] Michelson, A.D., Barnard, M.R., Krueger, L.A., Valeri, C.R. and Furman, M.I. (2001) Circulating monocyte-platelet aggregates are a more sensitive marker of in vivo platelet activation than platelet surface P-selectin: studies in baboons, human coronary intervention, and human acute myocardial infarction. *Circulation* **104**, 1533–1537.
- [205] Russwurm, S., Vickers, J., Meier-Hellmann, A., Spangenberg, P., Bredle, D., Reinhart, K. and Lösche, W. (2002) Platelet and leukocyte activation correlate with the severity of septic organ dysfunction. *Shock* **17**, 263–268.
- [206] Gawaz, M., Fateh-Moghadam, S., Pilz, G., Gurland, H.J. and Werdan, K. (1995) Severity of multiple organ failure (MOF) but not of sepsis correlates with irreversible platelet degranulation. *Infection* **23**, 16–23.
- [207] Kingston, J.K., Bayly, W.M., Sellon, D.C., Meyers, K.M. and Wardrop, K.J. (2002) Effects of formaldehyde fixation on equine platelets using flow cytometric methods to evaluate markers of platelet activation. *Am J Vet Res* **63**, 840–844.
- [208] Gawaz, M., Fateh-Moghadam, S., Pilz, G., Gurland, H.J. and Werdan, K. (1995) Platelet activation and interaction with leucocytes in patients with sepsis or multiple organ failure. *Eur J Clin Invest* **25**, 843–851.
- [209] Lee, L.G., Chen, C.-H. and Chiu, L.A. (1986) Thiazole orange: A new dye for reticulocyte analysis. *Cytometry* **7**, 508–517.
- [210] Kienast, J. and Schmitz, G. (1990) Flow cytometric analysis of thiazole orange uptake by platelets: a diagnostic aid in the evaluation of thrombocytopenic disorders. *Blood* **75**, 116–121.
- [211] Di Mario, A., Garzia, M., Leone, F., Arcangeli, A., Pagano, L. and Zini, G. (2009) Immature platelet fraction (IPF) in hospitalized patients with neutrophilia and suspected bacterial infection. *J Infect* **59**, 201–206.

- [212] Blasi, R.A. de, Cardelli, P., Costante, A., Sandri, M., Mercieri, M. and Arcioni, R. (2013) Immature platelet fraction in predicting sepsis in critically ill patients. *Intensive Care Med* **39**, 636–643.
- [213] Pankraz, A., Bauer, N.B. and Moritz, A. (2009) Comparison of flow cytometry with the Sysmex XT2000iV automated analyzer for the detection of reticulated platelets in dogs. *Vet Clin Pathol* **38**, 30–38.
- [214] Oellers, D.E., Bauer, N., Ginder, M., Johannes, S., Pernecker, I. and Moritz, A. (2016) Optimized gating and reference ranges of reticulated platelets in dogs for the Sysmex XT-2000iV. *BMC Vet Res* **12**, 148.
- [215] Oellers, D. Dissertation. Justus-Liebig-Universität (2015)
- [216] Henn, V., Steinbach, S., Buchner, K., Presek, P. and Kroczeck, R.A. (2001) The inflammatory action of CD40 ligand (CD154) expressed on activated human platelets is temporally limited by coexpressed CD40. *Blood* **98**, 1047–1054.
- [217] Cangemi, R., Pignatelli, P., Carnevale, R., Bartimoccia, S., Nocella, C., Falcone, M., Taliani, G. and Violi, F. (2016) Low-grade endotoxemia, gut permeability and platelet activation in community-acquired pneumonia. *J Infect.*
- [218] Freedman, J.E. (2003) CD40-CD40L and platelet function: beyond hemostasis. *Circ Res* **92**, 944–946.
- [219] Inwald, D.P., McDowall, A., Peters, M.J., Callard, R.E. and Klein, N.J. (2003) CD40 is constitutively expressed on platelets and provides a novel mechanism for platelet activation. *Circ Res* **92**, 1041–1048.
- [220] Sakamaki, F., Ishizaka, A., Handa, M., Fujishima, S., Urano, T., Sayama, K., Nakamura, H., Kanazawa, M., Kawashiro, T. and Katayama, M. (1995) Soluble form of P-selectin in plasma is elevated in acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* **151**, 1821–1826.
- [221] Ding, H., Cao, X.-y., Ma, X.-g. and Zhou, W.-j. (2013) Endothelial cell injury with inflammatory cytokine and coagulation in patients with sepsis. *World J Emerg Med* **4**, 285–289.
- [222] Lorente, L., Martin, M.M., Varo, N., Borreguero-Leon, J.M., Sole-Violan, J., Blanquer, J., Labarta, L., Diaz, C., Jimenez, A., Pastor, E., Belmonte, F., Orbe, J., Rodriguez, J.A., Gomez-Melini, E., Ferrer-Aguero, J.M., Ferreres, J., Lliminana, M.C. and Paramo, J.A. (2011) Association between serum soluble CD40 ligand levels and mortality in patients with severe sepsis. *Crit Care* **15**, R97.

- [223] Di Nisio, M., Niers, T.M., Reitsma, P.H. and Buller, H.R. (2005) Plasma cytokine and P-selectin levels in advanced malignancy: prognostic value and impact of low-molecular weight heparin administration. *Cancer* **104**, 2275–2281.
- [224] Phipps, R.P., Kaufmann, J. and Blumberg, N. (2001) Platelet derived CD154 (CD40 ligand) and febrile responses to transfusion. *Lancet* **357**, 2023–2024.
- [225] Bone, R.C., Balk, R.A., Cerra, F.B., Dellinger, R.P., Fein, A.M., Knaus, W.A., Schein, R.M. and Sibbald, W.J. (1992) Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest* **101**, 1644–1655.
- [226] Reinhart, K., Brunkhorst, F.M., Bone, H.-G., Bardutzky, J., Dempfle, C.E., Forst, H., Gastmeier, P., Gerlach, H., Gründling, M., John, S., Kern, W., Kreymann, G., Krüger, W., Kujath, P., Marggraf, G., Martin, J., Mayer, K., Meier-Hellmann, A., Oppert, M., Putensen, C., Quintel, M., Ragaller, M., Rossaint, R., Seifert, H., Spies, C., Stüber, F., Weiler, N., Weimann, A., Werdan, K. and Welte, T. (2010) Prävention, Diagnose, Therapie und Nachsorge der Sepsis. Erste Revision der S2k-Leitlinien der Deutschen Sepsis-Gesellschaft e.V. (DSG) und der Deutschen Interdisziplinären Vereinigung für Intensiv- und Notfallmedizin (DIVI) *Anaesthesist* **59**, 347–370.
- [227] Hauptman, J.G., Walshaw, R. and Olivier, N.B. (1997) Evaluation of the sensitivity and specificity of diagnostic criteria for sepsis in dogs. *Vet Surg* **26**, 393–397.
- [228] Okano, S., Yoshida, M., Fukushima, U., Higuchi, S., Takase, K. and Hagio, M. (2002) Usefulness of systemic inflammatory response syndrome criteria as an index for prognosis judgement. *Vet. Rec.* **150**, 245–246.
- [229] Babyak, J.M. and Sharp, C.R. (2016) Epidemiology of systemic inflammatory response syndrome and sepsis in cats hospitalized in a veterinary teaching hospital. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **249**, 65–71.
- [230] Brady, C.A., Otto, C.M., van Winkle, T.J. and King, L.G. (2000) Severe sepsis in cats: 29 cases (1986-1998) *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **217**, 531–535.
- [231] Corley, K.T.T., Donaldson, L.L. and Furr, M.O. (2005) Arterial lactate concentration, hospital survival, sepsis and SIRS in critically ill neonatal foals. *Equine Vet J* **37**, 53–59.

- [232] Roy, M.-F., Kwong, G.P.S., Lambert, J.L., Massie, S. and Lockhart, S. (2017) Prognostic Value and Development of a Scoring System in Horses With Systemic Inflammatory Response Syndrome. *J Vet Intern Med* **31**, 582–592.
- [233] Lambert, J.L., Fernandez, N.J. and Roy, M.-F. (2016) Association of Presence of Band Cells and Toxic Neutrophils with Systemic Inflammatory Response Syndrome and Outcome in Horses with Acute Disease. *J Vet Intern Med* **30**, 1284–1292.
- [234] Wong, D.M. and Wilkins, P.A. (2015) Defining the Systemic Inflammatory Response Syndrome in Equine Neonates. *Vet.Clin.North Am.Equine Pract.* **31**, 463–481.
- [235] Bonelli, F., Meucci, V., Divers, T.J., Jose-Cunilleras, E., Corazza, M., Tognetti, R., Guidi, G., Intorre, L. and Sgorbini, M. (2015) Plasma Procalcitonin Concentration in Healthy Horses and Horses Affected by Systemic Inflammatory Response Syndrome. *J Vet Intern Med* **29**, 1689–1691.
- [236] Schwarz, B.C., van den Hoven, R. and Schwendenwein, I. (2012) Diagnostic value of the neutrophil myeloperoxidase index in horses with systemic inflammation. *Vet J* **191**, 72–78.
- [237] Hooijberg, E.H., van den Hoven, R., Tichy, A. and Schwendenwein, I. (2014) Diagnostic and predictive capability of routine laboratory tests for the diagnosis and staging of equine inflammatory disease. *J Vet Intern Med* **28**, 1587–1593.
- [238] Daniel, A.J., Leise, B.S., Burgess, B.A., Morley, P.S., Cloninger, M. and Hassel, D.M. (2016) Concentrations of serum amyloid A and plasma fibrinogen in horses undergoing emergency abdominal surgery. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)* **26**, 344–351.
- [239] Gast, L.F. (1964) Influence of Aspirin on haemostatic parameters. *Ann. Rheum. Dis.* **23**, 500–504.
- [240] Roth, G.J. and Majerus, P.W. (1975) The mechanism of the effect of aspirin on human platelets. I. Acetylation of a particulate fraction protein. *J. Clin. Invest.* **56**, 624–632.
- [241] Valgimigli, M., Bueno, H., Byrne, R.A., Collet, J.-P., Costa, F., Jeppsson, A., Jüni, P., Kastrati, A., Kolh, P., Mauri, L., Montalescot, G., Neumann, F.-J., Petricevic, M., Roffi, M., Steg, P.G., Windecker, S., Zamorano, J.L. and Levine, G.N. (2018) 2017 ESC focused update on dual antiplatelet therapy in coronary artery disease developed in collaboration with EACTS: The Task Force for dual antiplatelet therapy in coronary artery disease of the European Society of Cardiology (ESC) and of the European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS) *Eur Heart J* **39**, 213–260.

- [242] Baigent, C., Blackwell, L., Collins, R., Emberson, J., Godwin, J., Peto, R., Buring, J.E., Hennekens, C.H., Kearney, P., Meade, T., Patrono, C., Roncaglioni, M.C. and Zanchetti, A. (2009) Aspirin in the primary and secondary prevention of vascular disease: collaborative meta-analysis of individual participant data from randomised trials. *Lancet* **373**, 1849–1860.
- [243] Egidi, G. and Wille, H. (2015) Neue Thrombozyten-Aggregationshemmer Einsatz in der Hausarztpraxis, S2e-Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Allgemeinmedizin und Familienmedizin e.V.
- [244] Patrignani, P., Filabozzi, P. and Patrono, C. (1982) Selective cumulative inhibition of platelet thromboxane production by low-dose aspirin in healthy subjects. *J. Clin. Invest.* **69**, 1366–1372.
- [245] Siller-Matula, J.M., Gouya, G., Wolzt, M. and Jilma, B. (2009) Cross validation of the Multiple Electrode Aggregometry. A prospective trial in healthy volunteers. *Thromb Haemost* **102**, 397–403.
- [246] Reed, S.M., Bayly, W.M. and Sellon, D.C., eds (2010) *Equine internal medicine*.
- [247] Robinson, N.E. and Sprayberry, K.A. (2009) *Current therapy in equine medicine*, 6th edn., Saunders Elsevier, St. Louis, Mo.
- [248] Kopp, K.J., Moore, J.N., Byars, T.D. and Brooks, P. (1985) Template bleeding time and thromboxane generation in the horse: effects of three non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Equine Vet J* **17**, 322–324.
- [249] Baxter, G.M. and Moore, J.N. (1987) Effect of aspirin on ex vivo generation of thromboxane in healthy horses. *Am J Vet Res* **48**, 13–16.
- [250] Bonzel, T., Erbel, R., Hamm, C.W., Levenson, B., Neumann, F.J., Rupprecht, H.J. and Zahn, R.Z.R. (2008) Perkutane Koronarinterventionen (PCI) *Clin Res Cardiol* **97**, 513–547.
- [251] Bonello, L., Tantry, U.S., Marcucci, R., Blindt, R., Angiolillo, D.J., Becker, R., Bhatt, D.L., Cattaneo, M., Collet, J.P., Cuisset, T., Gachet, C., Montalescot, G., Jennings, L.K., Kereiakes, D., Sibbing, D., Trenk, D., van Werkum, J.W., Paganelli, F., Price, M.J., Waksman, R. and Gurbel, P.A. (2010) Consensus and Future Directions on the Definition of High On-Treatment Platelet Reactivity to Adenosine Diphosphate. *J Am Coll Cardiol* **56**, 919–933.

- [252] Sibbing, D., Beckerath, N. von, Morath, T., Stegherr, J., Mehilli, J., Sarafoff, N., Braun, S., Schulz, S., Schömig, A. and Kastrati, A. (2010) Oral anticoagulation with coumarin derivatives and antiplatelet effects of clopidogrel. *Eur Heart J* **31**, 1205–1211.
- [253] Siller-Matula, J.M., Huber, K., Christ, G., Schrör, K., Kubica, J., Herkner, H. and Jilma, B. (2010) Impact of clopidogrel loading dose on clinical outcome in patients undergoing percutaneous coronary intervention: a systematic review and meta-analysis. *Heart* **97**, 98–105.
- [254] Müller, I., Besta, F., Schulz, C., Massberg, S., Schonig, A. and Gawaz, M. (2003) Prevalence of clopidogrel non-responders among patients with stable angina pectoris scheduled for elective coronary stent placement. *Thromb Haemost* **89**, 783–787.
- [255] Carroll, C.L. and Huntington, P.J. (1988) Body condition scoring and weight estimation of horses. *Equine Vet J* **20**, 41–45.
- [256] Dixon, W.J. (1993) *BMDP statistical software manual: To accompany BMDP release 7*, University of California Press; California/Princeton Fulfillment Services [distributor], Berkeley, Princeton, N.J.
- [257] Bampalis, V.G., Brantl, S.A. and Siess, W. (2012) Why and how to eliminate spontaneous platelet aggregation in blood measured by multiple electrode aggregometry. *J. Thromb. Haemost.*, no.
- [258] Suehiro, A., Uedaa, M., Suehiroh, M., Ohe, Y. and Kakishitaa, E. (1995) Evaluation of platelet hyperfunction in aged subjects using spontaneous platelet aggregation in whole blood. *Arch Gerontol Geriatr* **21**, 277–283.
- [259] Breddin, H.K. (1999) Spontaneous platelet aggregation as a predictive risk factor for vascular occlusions in healthy volunteers? Results of the HAPARG Study. *Atherosclerosis* **144**, 211–219.
- [260] Hendra, T.J. and Yudkin, J.S. (1992) 'Spontaneous' platelet aggregation in whole blood in diabetic patients with and without microvascular disease. *Diabet Med* **9**, 247–251.
- [261] Kunicka, J.E., Fischer, G., Murphy, J. and Zelmanovic, D. (2000) Improved platelet counting using two-dimensional laser light scatter. *Am J Clin Pathol* **114**, 283–289.
- [262] Kim, Y.R. and Ornstein, L. (1983) Isovolumetric sphering of erythrocytes for more accurate and precise cell volume measurement by flow cytometry. *Cytometry* **3**, 419–427.

- [263] Trowbridge, E.A., Reardon, D.M., Hutchinson, D. and Pickering, C. (1985) The routine measurement of platelet volume: a comparison of light-scattering and aperture-impedance technologies. *Clin Phys Physiol Meas* **6**, 221–238.
- [264] Born, G.V., Dearnley, R., Foulks, J.G. and Sharp, D.E. (1978) Quantification of the morphological reaction of platelets to aggregating agents and of its reversal by aggregation inhibitors. *J Physiol* **280**, 193.
- [265] Zucker, M.B. and Borrelli, J. (1954) Reversible alterations in platelet morphology produced by anticoagulants and by cold. *Blood* **9**, 602–608.
- [266] Zelmanovic, D. (2006) Interpretation of changes in PDW and MPC in stored canine blood. *Vet Clin Pathol* **35**, 140; author reply 140.
- [267] Stokol, T. and Erb, H.N. (2007) A comparison of platelet parameters in EDTA- and citrate-anticoagulated blood in dogs. *Vet Clin Pathol* **36**, 148–154.
- [268] Horowitz, G.L., Altaie, S., Boyd, J.C., Ceriotti, F., Garg, U., Horn, P.S., Pesce, A.J., Sine, H.E. and Zakowski, J. (2008) *Defining, establishing, and verifying reference intervals in the clinical laboratory: Approved guideline*, 3rd edn., Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa.
- [269] Dixon, W.J. (1953) Processing Data for Outliers. *Biometrics* **9**, 74.
- [270] Reed, A.H., Henry, R.J. and Mason, W.B. (1971) Influence of statistical method used on the resulting estimate of normal range. *Clin Chem* **17**, 275–284.
- [271] Tukey, J.W. (1977) *Exploratory data analysis*, Addison-Wesley, Reading, Mass.
- [272] Box, G.E.P. and Cox, D.R. (1964) An Analysis of Transformations. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)* **26**, 211–252.
- [273] Geffré, A., Concordet, D., Braun, J.-P. and Trumel, C. (2011) Reference Value Advisor: A new freeware set of macroinstructions to calculate reference intervals with Microsoft Excel. *Vet Clin Pathol* **40**, 107–112.
- [274] Friedrichs, K.R., Harr, K.E., Freeman, K.P., Szladovits, B., Walton, R.M., Barnhart, K.F. and Blanco-Chavez, J. (2012) ASVCP reference interval guidelines: determination of de novo reference intervals in veterinary species and other related topics. *Vet Clin Pathol* **41**, 441–453.
- [275] Hoffmann, R.G. (1963) Statistics in the Practice of Medicine. *JAMA* **185**, 864.
- [276] Arzideh, F., Wosniok, W., Gurr, E., Hinsch, W., Schumann, G., Weinstock, N. and Haeckel, R. (2007) A plea for intra-laboratory reference limits. Part 2. A bimodal

- retrospective concept for determining reference limits from intra-laboratory databases demonstrated by catalytic activity concentrations of enzymes. *Clin Chem Lab Med* **45**, 1043–1057.
- [277] Arzideh, F., Brandhorst, G., Gurr, E., Hinsch, W., Hoff, T., Roggenbuck, L., Rothe, G., Schumann, G., Wolters, B., Wosniok, W. and Haeckel, R. (2009) An improved indirect approach for determining reference limits from intra-laboratory data bases exemplified by concentrations of electrolytes / Ein verbesserter indirekter Ansatz zur Bestimmung von Referenzgrenzen mittels intra-laboratorieller Datensätze am Beispiel von Elektrolyt-Konzentrationen. *J.Lab.Med.* **33**, 52–66.
- [278] Zierk, J., Arzideh, F., Haeckel, R., Cario, H., Fruhwald, M.C., Gross, H.-J., Gscheidmeier, T., Hoffmann, R., Krebs, A., Lichtinghagen, R., Neumann, M., Ruf, H.-G., Steigerwald, U., Streichert, T., Rascher, W., Metzler, M. and Rauh, M. (2017) Pediatric reference intervals for alkaline phosphatase. *Clin Chem Lab Med* **55**, 102–110.
- [279] Arzideh, F., Wosniok, W. and Haeckel, R. (2010) Reference limits of plasma and serum creatinine concentrations from intra-laboratory data bases of several German and Italian medical centres: Comparison between direct and indirect procedures. *Clin Chim Acta* **411**, 215–221.
- [280] Arzideh, F., Wosniok, W. and Haeckel, R. (2011) Indirect reference intervals of plasma and serum thyrotropin (TSH) concentrations from intra-laboratory data bases from several German and Italian medical centres. *Clin Chem Lab Med* **49**, 659–664.
- [281] Zierk, J., Arzideh, F., Haeckel, R., Rascher, W., Rauh, M. and Metzler, M. (2013) Indirect determination of pediatric blood count reference intervals. *Clin Chem Lab Med* **51**, 863–872.
- [282] Leidinger, E.F., Leidinger, J., Figl, J., Rumpler, B. and Schwendenwein, I. (2015) Application of the ASVCP guidelines for the establishment of haematologic and biochemical reference intervals in Icelandic horses in Austria. *Acta Vet Scand* **57**, 30.
- [283] O'Brien, J.R. (1974) Letter: A relationship between platelet volume and platelet number. *Thromb Diath Haemorrh* **31**, 363–365.
- [284] Soranzo, N., Rendon, A., Gieger, C., Jones, C.I., Watkins, N.A., Menzel, S., Doring, A., Stephens, J., Prokisch, H., Erber, W., Potter, S.C., Bray, S.L., Burns, P., Jolley, J., Falchi, M., Kuhnel, B., Erdmann, J., Schunkert, H., Samani, N.J., Illig, T., Garner, S.F., Rankin, A., Meisinger, C., Bradley, J.R., Thein, S.L., Goodall, A.H., Spector, T.D., Deloukas, P. and

- Ouwehand, W.H. (2009) A novel variant on chromosome 7q22.3 associated with mean platelet volume, counts, and function. *Blood* **113**, 3831–3837.
- [285] Gieger, C., Radhakrishnan, A., Cvejic, A., Tang, W., Porcu, E., Pistis, G., Serbanovic-Canic, J., Elling, U., Goodall, A.H., Labrune, Y., Lopez, L.M., Mägi, R., Meacham, S., Okada, Y., Pirastu, N., Sorice, R., Teumer, A., Voss, K., Zhang, W., Ramirez-Solis, R., Bis, J.C., Ellinghaus, D., Gögele, M., Hottenga, J.-J., Langenberg, C., Kovacs, P., O'Reilly, P.F., Shin, S.-Y., Esko, T., Hartiala, J., Kanoni, S., Murgia, F., Parsa, A., Stephens, J., van der Harst, P., van der Ellen Schoot, C., Allayee, H., Attwood, A., Balkau, B., Bastardot, F., Basu, S., Baumeister, S.E., Biino, G., Bomba, L., Bonnefond, A., Cambien, F., Chambers, J.C., Cucca, F., D'Adamo, P., Davies, G., Boer, R.A. de, Geus, E.J.C. de, Döring, A., Elliott, P., Erdmann, J., Evans, D.M., Falchi, M., Feng, W., Folsom, A.R., Frazer, I.H., Gibson, Q.D., Glazer, N.L., Hammond, C., Hartikainen, A.-L., Heckbert, S.R., Hengstenberg, C., Hersch, M., Illig, T., Loos, R.J.F., Jolley, J., Khaw, K.T., Kühnel, B., Kyrtsolis, M.-C., Lagou, V., Lloyd-Jones, H., Lumley, T., Mangino, M., Maschio, A., Mateo Leach, I., McKnight, B., Memari, Y., Mitchell, B.D., Montgomery, G.W., Nakamura, Y., Nauck, M., Navis, G., Nöthlings, U., Nolte, I.M., Porteous, D.J., Pouta, A., Pramstaller, P.P., Pullat, J., Ring, S.M., Rotter, J.I., Ruggiero, D., Ruukonen, A., Sala, C., Samani, N.J., Sambrook, J., Schlessinger, D., Schreiber, S., Schunkert, H., Scott, J., Smith, N.L., Snieder, H., Starr, J.M., Stumvoll, M., Takahashi, A., Tang, W.H.W., Taylor, K., Tenesa, A., Lay Thein, S., Tönjes, A., Uda, M., Ulivi, S., van Veldhuisen, D.J., Visscher, P.M., Völker, U., Wichmann, H.-E., Wiggins, K.L., Willemsen, G., Yang, T.-P., Hua Zhao, J., Zitting, P., Bradley, J.R., Dedoussis, G.V., Gasparini, P., Hazen, S.L., Metspalu, A., Pirastu, M., Shuldiner, A.R., van Joost Pelt, L., Zwaginga, J.-J., Boomsma, D.I., Deary, I.J., Franke, A., Froguel, P., Ganesh, S.K., Jarvelin, M.-R., Martin, N.G., Meisinger, C., Psaty, B.M., Spector, T.D., Wareham, N.J., Akkerman, J.-W.N., Ciullo, M., Deloukas, P., Greinacher, A., Jupe, S., Kamatani, N., Khadake, J., Kooner, J.S., Penninger, J., Prokopenko, I., Stemple, D., Toniolo, D., Wernisch, L., Sanna, S., Hicks, A.A., Rendon, A., Ferreira, M.A., Ouwehand, W.H. and Soranzo, N. (2011) New gene functions in megakaryopoiesis and platelet formation. *Nature* **480**, 201–208.
- [286] Thompson, C.B., Diaz, D.D., Quinn, P.G., Lapins, M., Kurtz, S.R. and Valeri, C.R. (1983) The role of anticoagulation in the measurement of platelet volumes. *Am J Clin Pathol* **80**, 327–332.

- [287] Demirin, H., Ozhan, H., Ucgun, T., Celer, A., Bulur, S., Cil, H., Gunes, C. and Yildirim, H.A. (2011) Normal range of mean platelet volume in healthy subjects: Insight from a large epidemiologic study. *Thromb Res* **128**, 358–360.
- [288] Vasse, M., Masure, A. and Lenormand, B. (2012) Mean platelet volume is highly correlated to platelet count. *Thromb Res* **130**, 559–560.
- [289] Bessman, D.J., Williams, L.J. and Gilmer, P.R. (1981) Mean Platelet Volume. The Inverse Relation of Platelet Size and Count in Normal Subjects, and an Artifact of Other Particles. *Am J Clin Pathol* **76**, 289–293.
- [290] Christie, D.J., Avari, T., Carrington, L.R., Cohen, E., DeBiase, B.A., Harrison, P., Kickler, T.S., Kottke-Marchant, K., Ledford-Kraemer, M., Rand, M.L., Schmaier, A.H. and McCabe White, M. (2008) *Platelet function testing by aggregometry: Approved guideline*, CLSI, Wayne, PA.
- [291] Behr, T., Behr, W. and Scheidt, W. von (2010) Überwachung der Clopidogrel-Therapie mit Hilfe der Mehrfach-Elektroden Plättchen-Aggregometrie. *J.Lab.Med.* **34**, 99–107.
- [292] Miller, C.H., Rice, A.S., Garrett, K. and Stein, S.F. (2014) Gender, race and diet affect platelet function tests in normal subjects, contributing to a high rate of abnormal results. *Br J Haematol* **165**, 842–853.
- [293] Nielsen, L.A., Zois, N.E., Pedersen, H.D., Olsen, L.H. and Tarnow, I. (2007) Platelet function in dogs: Breed differences and effect of acetylsalicylic acid administration. *Vet Clin Pathol* **36**, 267–273.
- [294] Campello, E., Spiezia, L., Zabeo, E., Maggiolo, S., Vettor, R. and Simioni, P. (2015) Hypercoagulability detected by whole blood thromboelastometry (ROTEM®) and impedance aggregometry (MULTIPLATE®) in obese patients. *Thromb Res* **135**, 548–553.
- [295] Einwallner, E., Subasic, A., Strasser, A., Augustin, D., Thalhammer, R., Steiner, I. and Schwarzingler, I. (2013) Lysis matters: Red cell lysis with FACS Lyse affects the flow cytometric enumeration of circulating leukemic blasts. *J Immunol Methods* **390**, 127–132.
- [296] BD Biosciences, C.S., ed (2014) *Einführung in die Durchflusszytometrie: Trainingsvorbereitung*.
- [297] Matic, G.B., Rothe, G. and Schmitz, G. (2001) Flow cytometric analysis of reticulated platelets. *Curr Protoc Cytom* **Chapter 7**, Unit 7.10.
- [298] Robinson, M.S., Mackie, I.J., Khair, K., Liesner, R., Goodall, A.H., Savidge, G.F., MacHIn, S.J. and Harrison, P. (1998) Flow cytometric analysis of reticulated platelets:

- Evidence for a large proportion of non-specific labelling of dense granules by fluorescent dyes. *Br J Haematol* **100**, 351–357.
- [299] Jarvis, G.E., Atkinson, B.T., Snell, D.C. and Watson, S.P. (2002) Distinct roles of GPVI and integrin  $\alpha 2\beta 1$  in platelet shape change and aggregation induced by different collagens. *Br J Pharmacol* **137**, 107–117.
- [300] Lin, J., Luo, Y., Yao, S., Yan, M., Li, J., Ouyang, W. and Kuang, M. (2015) Discovery and Correction of Spurious Low Platelet Counts due to EDTA-Dependent Pseudothrombocytopenia. *J Clin Lab Anal* **29**, 419–426.
- [301] Froom, P. and Barak, M. (2011) Prevalence and course of pseudothrombocytopenia in outpatients. *Clin Chem Lab Med* **49**, 111–114.
- [302] Cohen, A.M., Cycowitz, Z., Mittelman, M., Lewinski, U.H. and Gardyn, J. (2000) The incidence of pseudothrombocytopenia in automatic blood analyzers. *Haematologia (Budap)* **30**, 117–121.
- [303] Silvestri, F., Virgolini, L., Savignano, C., Zaja, F., Velisig, M. and Baccarani, M. (1995) Incidence and diagnosis of EDTA-dependent pseudothrombocytopenia in a consecutive outpatient population referred for isolated thrombocytopenia. *Vox Sang* **68**, 35–39.
- [304] Hinchcliff, K.W., Kociba, G.J. and Mitten, L.A. (1993) Diagnosis of EDTA-dependent pseudothrombocytopenia in a horse. *J Am Vet Med Assoc* **203**, 1715–1716.
- [305] Russell, K.E. (2010) Chapter 77: Platelet Kinetics and Laboratory Evaluation of Thrombocytopenia. In: *Schalm's veterinary hematology*, 6th edn., Eds: D.J. Weiss, K.J. Wardrop and O.W. Schalm, Wiley-Blackwell, Ames, Iowa, pp 576–585.
- [306] Goerge, T., Ho-Tin-Noe, B., Carbo, C., Benarafa, C., Remold-O'Donnell, E., Zhao, B.-Q., Cifuni, S.M. and Wagner, D.D. (2008) Inflammation induces hemorrhage in thrombocytopenia. *Blood* **111**, 4958–4964.
- [307] Pusterla, N., Watson, J.L., Affolter, V.K., Magdesian, K.G., Wilson, W.D. and Carlson, G.P. (2003) Purpura haemorrhagica in 53 horses. *Vet. Rec.* **153**, 118–121.
- [308] Fielding, C.L. and Magdesian, K.G. (2015) Sepsis and Septic Shock in the Equine Neonate. *Vet.Clin.North Am.Equine Pract.* **31**, 483–496.
- [309] MacKay, R.J. and Lester, G.D. (1992) Induction of the acute-phase cytokine, hepatocyte-stimulating factor/interleukin 6, in the circulation of horses treated with endotoxin. *Am J Vet Res* **53**, 1285–1289.
- [310] Roscher, K.A. Justus-Liebig-Universität (2000)

- [311] Clark, P., Mogg, T.D., Tvedten, H.W. and Korcal, D. (2002) Artifactual changes in equine blood following storage, detected using the Advia 120 hematology analyzer. *Vet Clin Pathol* **31**, 90–94.
- [312] Aster, R.H. (1966) Pooling of platelets in the spleen: Role in the pathogenesis of "hypersplenic" thrombocytopenia. *J. Clin. Invest.* **45**, 645–657.
- [313] Persson, S.G., Ekman, L., Lydin, G. and Tufvesson, G. (1973) Circulatory effects of splenectomy in the horse. I. Effect on red-cell distribution and variability of haematocrit in the peripheral blood. *Zentralbl Veterinarmed A* **20**, 441–455.
- [314] Stokol, T. (2010) Chapter 80: Essential Thrombocytopenia and Reactive Thrombocytosis. In: *Schalm's veterinary hematology*, 6th edn., Eds: D.J. Weiss, K.J. Wardrop and O.W. Schalm, Wiley-Blackwell, Ames, Iowa, pp 605–611.
- [315] Barton, M.H., Morris, D.D., Crowe, N., Collatos, C. and Prasse, K.W. (1995) Hemostatic indices in healthy foals from birth to one month of age. *J. Vet Diagn. Invest* **7**, 380–385.
- [316] Levy, M.M., Fink, M.P., Marshall, J.C., Abraham, E., Angus, D., Cook, D., Cohen, J., Opal, S.M., Vincent, J.-L. and Ramsay, G. (2003) 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Intensive Care Med* **29**, 530–538.
- [317] Vincent, J.L., Moreno, R.P., Takala, J., Willatts, S., Mendonça, A. de, Bruining, H., Reinhart, C.K., Suter, P.M. and Thijs, L.G. (1996) The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure: Intensive Care Medicine. *Intensive Care Med* **22**, 707–710.
- [318] McConachie, E., Giguère, S. and Barton, M.H. (2016) Scoring System for Multiple Organ Dysfunction in Adult Horses with Acute Surgical Gastrointestinal Disease. *J Vet Intern Med* **30**, 1276–1283.
- [319] Hayes, G., Mathews, K., Doig, G., Kruth, S., Boston, S., Nykamp, S., Poljak, Z. and Dewey, C. (2010) The acute patient physiologic and laboratory evaluation (APPLE) score: a severity of illness stratification system for hospitalized dogs. *J Vet Intern Med* **24**, 1034–1047.
- [320] King, L.G., Stevens, M.T., Ostro, E.N.S., Diserens, D. and Ravi Shankar, J. (1994) A Model For Prediction Of Survival In Critically Ill Dogs. *J Veter Emer Crit* **4**, 85–99.
- [321] King, L.G., Wohl, J.S., Manning, A.M., Hackner, S.G., Raffe, M.R. and Maislin, G. (2001) Evaluation of the survival prediction index as a model of risk stratification for clinical

- research in dogs admitted to intensive care units at four locations. *Am J Vet Res* **62**, 948–954.
- [322] Thoen, M.E. and Kerl, M.E. (2011) Characterization of acute kidney injury in hospitalized dogs and evaluation of a veterinary acute kidney injury staging system. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)* **21**, 648–657.
- [323] Segev, G., Aroch, I., Savoray, M., Kass, P.H. and Bruchim, Y. (2015) A novel severity scoring system for dogs with heatstroke. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)* **25**, 240–247.
- [324] Brewer, B.D. and Koterba, A.M. (1988) Development of a scoring system for the early diagnosis of equine neonatal sepsis. *Equine Vet J* **20**, 18–22.
- [325] Brewer, B.D., Koterba, A.M., Carter, R.L. and Rowe, E.D. (1988) Comparison of empirically developed sepsis score with a computer generated and weighted scoring system for the identification of sepsis in the equine neonate. *Equine Veterinary Journal* **20**, 23–24.
- [326] Weber, E.J., Sanchez, L.C. and Giguère, S. (2015) Re-evaluation of the sepsis score in equine neonates. *Equine Vet J* **47**, 275–278.
- [327] Hurcombe, S.D.A., Toribio, R.E., Slovis, N., Kohn, C.W., Refsal, K., Saville, W. and Mudge, M.C. (2008) Blood arginine vasopressin, adrenocorticotropin hormone, and cortisol concentrations at admission in septic and critically ill foals and their association with survival. *J Vet Intern Med* **22**, 639–647.
- [328] Giguère, S., Weber, E.J. and Sanchez, L.C. (2017) Factors associated with outcome and gradual improvement in survival over time in 1065 equine neonates admitted to an intensive care unit. *Equine Vet J* **49**, 45–50.
- [329] Wong, D.M., Ruby, R.E., Dembek, K.A., Barr, B.S., Reuss, S.M., Magdesian, K.G., Olsen, E., Burns, T., Slovis, N.M. and Wilkins, P.A. (2018) Evaluation of updated sepsis scoring systems and systemic inflammatory response syndrome criteria and their association with sepsis in equine neonates. *J Vet Intern Med* **32**, 1185–1193.
- [330] Balk, R.A. (2014) Systemic inflammatory response syndrome (SIRS): where did it come from and is it still relevant today? *Virulence* **5**, 20–26.
- [331] Moritz, A., Walcheck, B.K. and Weiss, D.J. (2005) Evaluation of flow cytometric and automated methods for detection of activated platelets in dogs with inflammatory disease. *Am J Vet Res* **66**, 325–329.

- [332] Park, Y., Schoene, N. and Harris, W. (2002) Mean platelet volume as an indicator of platelet activation: methodological issues. *Platelets* **13**, 301–306.
- [333] Laufer, N., Grover, N.B., Ben-Sasson, S. and Freund, H. (1979) Effects of adenosine diphosphate, colchicine and temperature on size of human platelets. *Thromb Haemost* **41**, 491–497.
- [334] Noris, P., Melazzini, F. and Balduini, C.L. (2016) New roles for mean platelet volume measurement in the clinical practice? *Platelets* **27**, 607–612.
- [335] Machlus, K.R. and Italiano, J.E. (2013) The incredible journey: From megakaryocyte development to platelet formation. *J Cell Biol* **201**, 785–796.
- [336] Levin, J. and Bessman, J.D. (1983) The inverse relation between platelet volume and platelet number. Abnormalities in hematologic disease and evidence that platelet size does not correlate with platelet age. *J Lab Clin Med* **101**, 295–307.
- [337] Giacomini, A., Legovini, P., Gessoni, G., Antico, F., Valverde, S., Salvadego, M.M. and Manoni, F. (2001) Platelet count and parameters determined by the Bayer ADVIA 120 in reference subjects and patients. *Clin Lab Haematol* **23**, 181–186.
- [338] Montrucchio, G., Bosco, O., Del Sorbo, L., Fascio Pecetto, P., Lupia, E., Goffi, A., Omedè, P., Emanuelli, G. and Camussi, G. (2003) Mechanisms of the priming effect of low doses of lipopoly-saccharides on leukocyte-dependent platelet aggregation in whole blood. *Thromb Haemost* **90**, 872–881.
- [339] Whitworth, N.H., Barradas, M.A., Mikhailidis, D.P. and Dandona, P. (1989) An investigation into the effects of bacterial lipopolysaccharide on human platelets. *Eur J Haematol* **43**, 112–119.
- [340] van Deventer, S.J., Buller, H.R., Cate, J.W. ten, Sturk, A. and Pauw, W. (1988) Endotoxaemia: an early predictor of septicaemia in febrile patients. *Lancet* **1**, 605–609.
- [341] Steverink, P.J.G.M., Salden, H.J.M., Sturk, A., Klein, W.R., van der Velden, M.A. and Németh, F. (1994) Laboratory and clinical evaluation of a chromogenic endotoxin assay for horses with acute intestinal disorders. *Vet Q* **16**, 117–121.
- [342] Levi, M. (2004) Platelets at a crossroad of pathogenic pathways in sepsis. *J. Thromb. Haemost.* **2**, 2094–2095.
- [343] Baurand, A., Eckly, A., Bari, N., Leon, C., Hechler, B., Cazenave, J.P. and Gachet, C. (2000) Desensitization of the platelet aggregation response to ADP: Differential down-regulation of the P2Y1 and P2cyc receptors. *Thromb Haemost* **84**, 484–491.

- [344] Kim, H.K., Kim, J.-E., Ham, C.K., Lee, D.S., Park, S. and Cho, H.-I. (2008) Prognostic value of platelet indices as determined by ADVIA 120 in patients suspected of having disseminated intravascular coagulation. *Int J Lab Hematol* **30**, 117–123.
- [345] Tridente, A., Clarke, G.M., Walden, A., Gordon, A.C., Hutton, P., Chiche, J.-D., Holloway, P.A.H., Mills, G.H., Bion, J., Stüber, F., Garrard, C. and Hinds, C. (2015) Association between trends in clinical variables and outcome in intensive care patients with faecal peritonitis: analysis of the GenOSept cohort. *Crit Care* **19**, 210.
- [346] Moreau, D., Timsit, J.-F., Vesin, A., Garrouste-Orgeas, M., Lassence, A. de, Zahar, J.-R., Adrie, C., Vincent, F., Cohen, Y., Schlemmer, B. and Azoulay, E. (2007) Platelet count decline: an early prognostic marker in critically ill patients with prolonged ICU stays. *Chest* **131**, 1735–1741.
- [347] Akca, S., Haji-Michael, P., Mendonça, A. de, Suter, P., Levi, M. and Vincent, J.L. (2002) Time course of platelet counts in critically ill patients. *Crit Care Med* **30**, 753–756.
- [348] Gucyetmez, B. and Atalan, H.K. (2016) C-Reactive Protein and Hemogram Parameters for the Non-Sepsis Systemic Inflammatory Response Syndrome and Sepsis: What Do They Mean? *PLoS ONE* **11**, e0148699.
- [349] Lamping, F., Jack, T., Rübsamen, N., Sasse, M., Beerbaum, P., Mikolajczyk, R.T., Boehne, M. and Karch, A. (2018) Development and validation of a diagnostic model for early differentiation of sepsis and non-infectious SIRS in critically ill children - a data-driven approach using machine-learning algorithms. *BMC Pediatr* **18**, 112.
- [350] Belgrave, R.L., Dickey, M.M., Arheart, K.L. and Cray, C. (2013) Assessment of serum amyloid A testing of horses and its clinical application in a specialized equine practice. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **243**, 113–119.
- [351] Pepys, M.B., Baltz, M.L., Tennent, G.A., Kent, J., Ousey, J. and Rosedale, P.D. (1989) Serum amyloid A protein (SAA) in horses: objective measurement of the acute phase response. *Equine Vet J* **21**, 106–109.
- [352] El-Deeb, W., Iacob, O., Fayez, M., Elgiouhy, M., Shawaf, T. and Ibrahim, A. (2018) Acute phase proteins, interleukin-6, tumor necrosis factor, nitric oxide and oxidative stress markers in horses with cutaneous habronemosis under field condition. *Vet Parasitol* **255**, 20–25.

- [353] Nunokawa, Y., Fujinaga, T., Taira, T., Okumura, M., Yamashita, K., Tsunoda, N. and Hagio, M. (1993) Evaluation of serum amyloid A protein as an acute-phase reactive protein in horses. *J Vet Med Sci* **55**, 1011–1016.
- [354] Hultén, C., Sandgren, B., Skiöldebrand, E., Klingeborn, B., Marhaug, G. and Forsberg, M. (1999) The acute phase protein serum amyloid A (SAA) as an inflammatory marker in equine influenza virus infection. *Acta Vet Scand* **40**, 323–333.
- [355] Jacobsen, S., Jensen, J.C., Frei, S., Jensen, A.L. and Thoenfer, M.B. (2005) Use of serum amyloid A and other acute phase reactants to monitor the inflammatory response after castration in horses: a field study. *Equine Vet J* **37**, 552–556.
- [356] Bonelli, F., Meucci, V., Divers, T.J., Wagner, B., Intorre, L. and Sgorbini, M. (2017) Kinetics of plasma procalcitonin, soluble CD14, CCL2 and IL-10 after a sublethal infusion of lipopolysaccharide in horses. *Vet Immunol Immunopathol* **184**, 29–35.
- [357] Bertuglia, A., Pagliara, E., Grego, E., Ricci, A. and Brkljaca-Bottegaro, N. (2016) Pro-inflammatory cytokines and structural biomarkers are effective to categorize osteoarthritis phenotype and progression in Standardbred racehorses over five years of racing career. *BMC Vet Res* **12**, 246.
- [358] Seyfert, U.T., Haubelt, H., Vogt, A. and Hellstern, P. (2007) Variables influencing Multiplate(TM) whole blood impedance platelet aggregometry and turbidimetric platelet aggregation in healthy individuals. *Platelets* **18**, 199–206.
- [359] Cattaneo, M. (2007) Resistance to antiplatelet drugs: molecular mechanisms and laboratory detection. *J. Thromb. Haemost.* **5 Suppl 1**, 230–237.
- [360] Gurbel, P.A. and Tantry, U.S. (2013) 30. Monitoring of antiplatelet therapy: III. Aspirin. In: *Platelets*, 3rd edn., Ed: A.D. Michelson, Elsevier, Amsterdam, pp 603–633.
- [361] Floyd, C.N., Goodman, T., Becker, S., Chen, N., Mustafa, A., Schofield, E., Campbell, J., Ward, M., Sharma, P. and Ferro, A. (2014) Increased platelet expression of glycoprotein IIIa following aspirin treatment in aspirin-resistant but not aspirin-sensitive subjects. *Br J Clin Pharmacol* **78**, 320–328.
- [362] Patrono, C. (2013) 53. Aspirin. In: *Platelets*, 3rd edn., Ed: A.D. Michelson, Elsevier, Amsterdam, pp 1099–1115.
- [363] Schwartz, K.A., Schwartz, D.E., Ghosheh, K., Reeves, M.J., Barber, K. and Defranco, A. (2005) Compliance as a critical consideration in patients who appear to be resistant to aspirin after healing of myocardial infarction. *Am J Cardiol* **95**, 973–975.

- [364] Patrick, J., Dillaha, L., Armas, D. and Sessa, W.C. (2015) A randomized trial to assess the pharmacodynamics and pharmacokinetics of a single dose of an extended-release aspirin formulation. *Postgrad Med* **127**, 573–580.
- [365] Can, M.M., Tanboga, I.H., Turkyilmaz, E., Karabay, C.Y., Akgun, T., Koca, F., Tokgoz, H.C., Keles, N., Ozkan, A., Bezgin, T., Ozveren, O., Sonmez, K., Saglam, M., Ozdemir, N. and Kaymaz, C. (2010) The risk of false results in the assessment of platelet function in the absence of antiplatelet medication: comparison of the PFA-100, multiplate electrical impedance aggregometry and verify now assays. *Thromb Res* **125**, e132-e137.
- [366] Mischke, R. and Schulze, U. (2004) Studies on platelet aggregation using the Born method in normal and uraemic dogs. *Vet J* **168**, 270–275.
- [367] Dyszkiewicz-Korpanty, A.M., Olteanu, H., Frenkel, E.P. and Sarode, R. (2007) Clopidogrel anti-platelet effect: an evaluation by optical aggregometry, impedance aggregometry, and the platelet function analyzer (PFA-100) *Platelets* **18**, 491–496.
- [368] Sibbing, D., Braun, S., Jawansky, S., Vogt, W., Mehilli, J., Schömig, A., Kastrati, A. and Beckerath, N. von (2008) Assessment of ADP-induced platelet aggregation with light transmission aggregometry and multiple electrode platelet aggregometry before and after clopidogrel treatment. *Thromb Haemost* **99**, 121–126.
- [369] Paniccia, R., Antonucci, E., Maggini, N., Romano, E., Gori, A.M., Marcucci, R., Prisco, D. and Abbate, R. (2009) Assessment of Platelet Function on Whole Blood by Multiple Electrode Aggregometry in High-Risk Patients With Coronary Artery Disease Receiving Antiplatelet Therapy. *Am J Clin Pathol* **131**, 834–842.
- [370] Neubauer, H., Krüger, J.C., Lask, S., Endres, H.G., Pepinghege, F., Engelhardt, A., Bulut, D. and Mügge, A. (2009) Comparing the antiplatelet effect of clopidogrel hydrogensulfate and clopidogrel besylate: a crossover study. *Clin Res Cardiol* **98**, 533–540.
- [371] Price, M.J., Coleman, J.L., Steinhubl, S.R., Wong, G.B., Cannon, C.P. and Teirstein, P.S. (2006) Onset and Offset of Platelet Inhibition After High-Dose Clopidogrel Loading and Standard Daily Therapy Measured by a Point-of-Care Assay in Healthy Volunteers. *Am J Cardiol* **98**, 681–684.
- [372] Yang, D., Chen, H., Koupenova, M., Carroll, S.H., Eliades, A., Freedman, J.E., Toselli, P. and Ravid, K. (2010) A new role for the A2b adenosine receptor in regulating platelet function. *J. Thromb. Haemost.* **8**, 817–827.

- [373] Mueller, T., Dieplinger, B., Poelz, W., Calatzis, A. and Haltmayer, M. (2007) Utility of whole blood impedance aggregometry for the assessment of clopidogrel action using the novel Multiplate analyzer--comparison with two flow cytometric methods. *Thromb Res* **121**, 249–258.
- [374] Hobson, A.R., Qureshi, Z., Banks, P. and Curzen, N.P. (2009) Effects of clopidogrel on “aspirin specific” pathways of platelet inhibition. *Platelets* **20**, 386–390.
- [375] Armstrong, P.C.J., Dhanji, A.-R.A., Tucker, A.T., Mitchell, J.A. and Warner, T.D. (2010) Reduction of platelet thromboxane A2 production ex vivo and in vivo by clopidogrel therapy. *J. Thromb. Haemost.* **8**, 613–615.
- [376] Quinn, M.J. and Fitzgerald, D.J. (1999) Ticlopidine and Clopidogrel. *Circulation* **100**, 1667–1672.
- [377] Zahno, A., Bouitbir, J., Maseneni, S., Lindinger, P.W., Brecht, K. and Krähenbühl, S. (2013) Hepatocellular toxicity of clopidogrel: Mechanisms and risk factors. *Free Radic Biol Med* **65**, 208–216.

9 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ACD	acid-citrate-dextrose; Antikoagulans aus Zitronensäure, Natriumzitat und Dextrose
ADP	Adenosin 5'-diphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
ANOVA	Analysis of Variance = Varianzanalyse
AP	Alkalische Phosphatase
APACHE	Acute Physiology and Chronic Health Evaluation
APC	Allophycocyanin
aPTT	activated partial Thromboplastin time (aktivierte partielle Thromboplastinzeit)
ARDS	Acute Respiratory Distress Syndrome, = Akutes Atemnotsyndrom
AS	Arachidonsäure
ASS	Acetylsalicylsäure (Aspirin)
AST	Aspartat-Aminotransferase
ATIII	Antithrombin III
ATP	Adenosintriphosphat
AU	Aggregation Unit (Multiplate® Analyzer)
BCS	body condition score
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CCL	C-C Motif Ligand
CD	Cluster of Differentiation
CD40L	Synonym CD154
CD41/61	Synonym GPIIb-IIIa
CD62P	P-Selectin
CHCM	Corpuscular Hemoglobin Concentration Mean (ADVIA® 2120, gemessen) = mittlere korpuskuläre Hämoglobinkonzentration
CK	Creatin-Kinase
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
Clumps	Thrombozytenaggregate (ADVIA® 2120)
COX	Cyclooxygenase
CXCL	C-X-C Motif Ligand
DIC	disseminated intravascular coagulation, =disseminierte intravasale Koagulopathie
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EDTA-PTCP	EDTA-induzierte Pseudothrombozytopenie
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
et al.	et alia (= und andere)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	forward scatter, Vorwärtsstreulicht
G	gauge
γ-GT	γ -Glutamyltransferase
GLDH	Glutamatdehydrogenase
GP	Glykoprotein
IL	Interleukin
INR	International Normalized Ratio (Prothrombin time)

## 9 Abkürzungsverzeichnis

KGW	Körpergewicht
LargePLT	large Platelets = große Thrombozyten (ADVIA® 2120)
LDH	Laktat-Dehydrogenase
LPS	Lipopolysaccharid, Endotoxin
LTA	Lichttransmissionsaggregometrie
MAC-1	Makrophagen-Antigen 1
MCH	Mean Corpuscular Hemoglobin (ADVIA® 2120) = mittleres korpuskuläres Hämoglobin
MCHC	Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration (ADVIA® 2120, berechnet) = mittlere korpuskuläre Hämoglobinkonzentration
MCV	Mean Corpuscular Volume (ADVIA® 2120) = mittleres Erythrozytenvolumen
MEA	Mehrfach-Elektroden Aggregometrie
Mg-Sulfat	Magnesiumsulfat
MMP	Matrix-Metalloproteinase
MODS	multiple organ dysfunction syndrome, multiples Organversagen
MPC	Mean Platelet Component Concentration (ADVIA® 2120) = mittlere Thrombozytenkomponenten-Konzentration
MPM	Mean Platelet Dry Mass (ADVIA® 2120) = mittlere Thrombozyten-Trockenmasse
MPV	Mean Platelet Volume (ADVIA® 2120) = mittleres Thrombozytenvolumen
mRNA	messenger RNA
MW	Mittelwert
n	Anzahl
NETs	neutrophile extrazelluläre Traps
OCS	open canalicular system = offenes Kanalsystem
P2Y <sub>1</sub> /P2Y <sub>12</sub> /P2X <sub>1</sub>	Purinerge Rezeptoren Y1, Y12 und X1
PAF	Plättchenaktivierender Faktor
PCDW	Platelet Component Distribution Width (ADVIA® 2120) = Thrombozytenkomponenten-Verteilungsbreite
PCT	Platelet Crit = Thrombokrit (ADVIA® 2120)
PDW	Platelet Volume Distribution Width (ADVIA® 2120) = Thrombozytenvolumen-Verteilungsbreite
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll
PGE <sub>1</sub>	Prostaglandin E <sub>1</sub>
PLRP	Plättchen-Leukozytenreiches Plasma
PLT	Thrombozytenzahl (ADVIA® 2120)
PMDW	Platelet Dry Mass Distribution Width (ADVIA® 2120) = Thrombozytentrockenmasse-Verteilungsbreite
p.o.	peroral
PRP	Plättchenreiches Plasma
PSGL-1	P-Selectin Glykoprotein Ligand-1

## 9 Abkürzungsverzeichnis

---

PT	prothrombin time (Thromboplastinzeit) = Quick-Wert
PTFE	Polytetrafluoroethylen
r	Korrelationskoeffizient nach Pearson
RAO	recurrent airway obstruction
RBC	red blood cells = Erythrozyten
RDW	Red Cell Volume Distribution Width (ADVIA® 2120) = Verteilungsbreite des Erythrozytenvolumens
RI	Referenzintervall
r <sub>s</sub>	Korrelationskoeffizient nach Spearman
SD	Standardabweichung
SIRS	systemic inflammatory response syndrome, systemisches inflammatorisches Responsesyndrom
sCD40L	soluble CD40 Ligand, = löslicher CD40-Ligand
sCD62P	soluble P-Selectin, = lösliches P-Selectin
sP-Selectin	soluble P-Selectin, = lösliches P-Selectin
SSC	side scatter, Seitwärtsstreulicht
TBXA2R	Thromboxan-Rezeptor
TLA	Thrombozyten-Leukozyten-Aggregate
TLR	Toll-like-Rezeptor
TRAP	Thrombin receptor-activating peptide
TXA <sub>2</sub>	Thromboxan A <sub>2</sub>
TXB <sub>2</sub>	Thromboxan B <sub>2</sub>
TZF	Thrombozytenfunktion
vWF	von-Willebrand-Faktor
WBC	white blood cells, = Leukozyten

### 10 VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN UND TABELLEN

#### 10.1 Abbildungen

Abbildung 1: Stark vereinfachtes Schema der Thrombozytenaggregation an einem Endotheldefekt: vorübergehende Adhäsion zirkulierender Thrombozyten (A), stabile Bindung an Kollagen und Thrombozytenaktivierung (B), vorübergehende Adhäsion zirkulierender Thrombozyten (C), stabile Bindung zirkulierender Thrombozyten (D).....	8
Abbildung 2: ADVIA® 2120 .....	36
Abbildung 3: ADVIA® 2120: Zytogramm des Peroxidasekanals mit automatisch generiertem Cluster der Thrombozytenaggregate (Pfeil).....	38
Abbildung 4: Multiplate® Analyzer.....	42
Abbildung 5: Multiplate® Analyzer: Einmalküvette mit paarigen Messeinheiten (1) und Rührstab (2).....	42
Abbildung 6: Multiplate® Analyzer - Messprinzip: kontinuierlicher Wechselstrom (gelbe Pfeile) zwischen den Messdrähten, inaktivierte Thrombozyten (weiße Ovale) (a); Aktivierung der Thrombozyten (Sterne) nach Zugabe eines Agonisten (b); Reduktion des Stromflusses nach Anhaften der Thrombozyten an den Messdrähten (c) .....	43
Abbildung 7: Multiplate® Analyzer - Messprinzip: Grafische Darstellung der Messergebnisse .....	43
Abbildung 8: Multiplate® Analyzer - Messprinzip: Markierung einer Messung mit QC Flag aufgrund prozentualer Abweichung beider Messungen vom Mittelwerte um mehr als 20 % .....	44
Abbildung 9: Accuri® C6 .....	48
Abbildung 10: Accuri® C6 - Methodenetablierung: Definition des Gates P1 zur Einschränkung der Messungen auf Thrombozyten (CD41/61-positive Zellen) .....	53
Abbildung 11: Accuri® C6 - Methodenetablierung: Histogramme der Messungen der Isotypenkontrolle (A) und der mit Antikörper gegen CD41/61 markierten Zellen (B) im Gate P1 im FL-4 .....	53
Abbildung 12: Accuri® C6 - Methodenetablierung: Punktwolkendiagramm mit Quadrantenmarkern für Messungen mit 2 Parametern im FL-1 und FL-4 .....	54
Abbildung 13: Accuri® C6 - Methodenetablierung: Definition des Gates P2 zur Einschränkung der Messungen Thiazol-positiver Thrombozyten (A) und Punktwolkendiagramm mit Quadrantenmarkern für CD41/61- sowie Thiazol-positive Zellen (B) .....	55
Abbildung 14: Hemmung der Thrombozytenfunktion - Methodik: Schematische Darstellung der Entnahmestellen an der Vena jugularis externa .....	69
Abbildung 15: ADVIA® 2120: Vergleich der Messergebnisse der PDW aus K <sub>3</sub> -EDTA- und Zitrat-Blutproben bei jeweils 60 klinisch unauffälligen Kleinpferden (A) und Warmblütern (B).....	77

## 10 Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

---

Abbildung 16: ADVIA® 2120: Vergleich der Messergebnisse der PDW aus K <sub>3</sub> -EDTA- und Mg-Sulfat-Blutproben (A) sowie Zitrat- und Mg-Sulfat-Blutproben (B) bei 60 klinisch unauffälligen Kleinpferden .....	77
Abbildung 17: ADVIA® 2120: Thrombozyten-Volumen-Histogramme eines Kleinpferdes mit ausgegebenen Variablen MPV und PDW sowie manuell berechneter Standardabweichung.....	78
Abbildung 18: Accuri® C6 - Methodenetablierung: Prozentualer Anteil CD62P- (A) bzw. CD154- (B)-positiver Thrombozyten bei 10 Equiden vor und nach Aktivierung mit Kollagen (Median, 25/75%, min-max).....	82
Abbildung 19: Accuri® C6 - Methodenetablierung: Prozentualer Anteil CD11a/18-Antikörper-positiver Thrombozyten bei 10 Equiden vor und nach Aktivierung mit Kollagen (Median, 25/75%, min-max) .	83
Abbildung 20: ELISA sCD40L: Mikroplatte nach der Testdurchführung: Standards (1), Kontrollen (2), Recovery (3), Poolserum nativ (4), Poolserum spiked (5), Poolplasma nativ (6), Poolplasma spiked (7), Pferd 1 (8), Pferd 2 (9).....	84
Abbildung 21: Thrombozytopenie und Thrombozytose bei Klinikpatienten (2008 - 2015): Prozentuale Verteilung in die Diagnosegruppen bei Patienten mit echter Thrombozytopenie (schwarzer Balken) und Thrombozytose (grauer Balken) im Vergleich zur Gesamtpopulation der Klinik (weißer Balken).....	90
Abbildung 22: Thrombozytopenie und Thrombozytose bei Klinikpatienten (2008 - 2015): Thrombozytenzahlen in den Diagnosegruppen bei Thrombozytopenie (A) und Thrombozytose (B); (Median, 25/75%, min-max).....	91
Abbildung 23: Thrombozytopenie und Thrombozytose bei Klinikpatienten (2008 - 2015): Thrombozytenzahlen bei Pferden mit echter Thrombozytopenie in Abhängigkeit von klinischen Symptomen einer Blutungsneigung (Median, 25/75%, min-max).....	91
Abbildung 24: Thrombozytopenie und Thrombozytose bei Klinikpatienten (2008 - 2015): Thrombozytenzahlen bei Überlebenden und Nichtüberlebenden bei Equiden mit Thrombozytopenie (A) bzw. Thrombozytose (B); (Median, 25/75%, min-max).....	93
Abbildung 25: Thrombozytenfunktion bei Equiden mit systemischer Entzündung (SIRS): Thrombozytenzahlen am ADVIA® 2120 im K <sub>3</sub> -EDTA-Blut (weiße Box) und Zitratblut (graue Box, korrigiert um Verdünnungsfaktor 1,1) der Kontroll-(n = 120) und der SIRS-Gruppe (n = 20); (Median, 25/75%, min-max).....	95
Abbildung 26: Thrombozytenfunktion bei Equiden mit systemischer Entzündung (SIRS): Thrombozytenzahlen [ $\times 10^9/l$ ] am ADVIA® 2120 im K <sub>3</sub> -EDTA- und Zitratblut bei 20 Individuen .....	95
Abbildung 27: Thrombozytenfunktion bei Equiden mit systemischer Entzündung (SIRS): Thrombozytenzahlen [ $\times 10^9/l$ ] der 20 SIRS-Patienten im K <sub>3</sub> -EDTA-Blut (ungefüllte Kreise) und Zitratblut (gefüllte Kreise) am ADVIA® 2120 in Abhängigkeit von Überleben (n = 6) und Nichtüberleben (n = 14); (Balken=Mittelwert) .....	97
Abbildung 28: Thrombozytenfunktion bei Equiden mit systemischer Entzündung (SIRS): Prozentualer Anteil CD62P- (A) bzw. CD154- (B) positiver Thrombozyten der Individuen in der Kontroll- (n = 10) und der SIRS-Gruppe (n = 19) am Accuri® C6 vor (ungefüllte Kreise) und nach (gefüllte Kreise) Aktivierung mit Kollagen; (Balken=Mittelwert) .....	100

## 10 Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

---

- Abbildung 29: Thrombozytenfunktion bei Equiden mit systemischer Entzündung (SIRS): Prozentualer Anteil CD11a/18-positiver Thrombozyten der Individuen in der Kontroll- (n = 10) und der SIRS-Gruppe (n = 19) am Accuri® C6 vor (ungefüllte Kreise) und nach (gefüllte Kreise) Aktivierung mit Kollagen; (Balken=Mittelwert) ..... 101
- Abbildung 30: Thrombozytenfunktion bei Equiden mit systemischer Entzündung (SIRS): Prozentualer Anteil CD62P- (A), CD154- (B) und CD11a/18-(C) positiver Thrombozyten der Individuen in der SIRS-Gruppe am Accuri® C6 vor (ungefüllte Kreise) und nach (gefüllte Kreise) Aktivierung mit Kollagen in Abhängigkeit von Überleben (n = 6) und Nichtüberleben (n = 13); (Balken=Mittelwert) ..... 102
- Abbildung 31: Thrombozytenfunktion bei Equiden mit systemischer Entzündung (SIRS): Korrelationsanalysen zwischen Thrombozytenzahl aus K<sub>3</sub>-EDTA-Blut (A) und Zitratblut (B) am ADVIA® 2120 und ADPtest am Multiplate® Analyzer bei 20 SIRS-Patienten ..... 104
- Abbildung 32: Thrombozytenfunktion bei Equiden mit systemischer Entzündung (SIRS): Korrelationsanalyse zwischen Thrombozytenzahl (A) und Thrombokrit (PCT, B) aus Zitratblut am ADVIA® 2120 und prozentualem Anteil CD154-positiver Thrombozyten nativer Proben am Accuri® C6 bei 19 SIRS-Patienten ..... 105
- Abbildung 33: Thrombozytenfunktion bei Equiden mit systemischer Entzündung (SIRS): Korrelationsanalyse zwischen COLtest mit (A) und ohne (B) magnetischen Rührstab während der Inkubation am Multiplate® Analyzer und prozentualem Anteil CD11a/18-positiver Thrombozyten nativer Proben am Accuri® bei 19 SIRS-Patienten ..... 105
- Abbildung 34: Hemmung der Thrombozytenfunktion bei Pferden: Serumkonzentration der Salicylsäure (HPLC-MS) bei Medikation mit Acetylsalicylsäure (#4,7-5,0 mg/kg, ##1,0-1,3 mg/kg) bei 10 Pferden (MW ± SD;\*\* p < 0,01 zu T0); gepunktete Linie = Nachweisgrenze ..... 106
- Abbildung 35: Hemmung der Thrombozytenfunktion bei Pferden: Korrelationen der Serumkonzentration der Salicylsäure (µg/ml) und der mittels Multiplate® Analyzer gemessenen AS-induzierten TZF (ASPItest) bei T6 (A) und T12 (B) ..... 107
- Abbildung 36: ADVIA® 2120 - Diskussion: THROMBO-Streulicht-Zytogramm: Brechungsindex (1,35-1,40, A), Volumen (1-30 fl, B), Thrombozyten (1), große Thrombozyten (2), Erythrozyten (3), Ery-Fragmente (4), Ery-Ghosts (5); Quelle: Operator's Guide ADVIA® 2120/2120i, Siemens Healthcare 110
- Abbildung 37: ADVIA® 2120 - Diskussion: ERY-Streulicht-Zytogramm: A = Brechungsindex, B = Volumen, 1 = Thrombozyten, 2 = Ery-Fragmente, 3 = große Thrombozyten, 4 = Erythrozyten, 5 = Ery-Ghosts (Quelle: Operator's Guide ADVIA® 2120/2120i, Siemens Healthcare) ..... 111
- Abbildung 38: ADVIA® 2120 - Diskussion: diffuses Zytogramm (rote Markierung) durch fehlende Aufkugelung der Thrombozyten durch das Antikoagulans ACD (A); dicht beieinander liegende Verteilung der durch K<sub>3</sub>-EDTA aufgekugelten Thrombozyten (rote Markierung, B); Quelle: [107].... 112
- Abbildung 39: ADVIA® 2120 - Diskussion: Thrombozytogramme von 3 Equiden mit dazugehörigen Thrombozytenvariablen jeweils gemessen aus K<sub>3</sub>-EDTA- (A) und Zitrat- Blutproben (B, korrigiert um Verdünnungsfaktor 1,1) ..... 113
- Abbildung 40: ADVIA® 2120 - Diskussion: Schematische Darstellung des Einflusses der Zellform und -positionierung im Raum auf die Brechung des Laserstrahls ..... 114

## 10 Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

---

Abbildung 41: ADVIA® 2120 - Diskussion: Anzahl der Erythrozytenfragmente (A) und Erythrozyten-Ghosts (B) im K <sub>3</sub> -EDTA- bzw. Zitrat-Blut, Zitratwerte korrigiert um Verdünnungsfaktor 1,1 (U-Test, GraphPad Prism 6); (Median, 25/75%, min-max) .....	116
Abbildung 42: ADVIA® 2120 - Diskussion: Messergebnisse der Thrombozytenzahl beim Kleinpferd (A, n = 60) und Warmblut (B, n = 60); Zitratwerte korrigiert um Verdünnungsfaktor 1,1; (Median, 25/75%, min-max) .....	118
Abbildung 43: ADVIA® 2120 - Diskussion: Thrombozytenzahlen von Einzelindividuen beim Kleinpferd (A) und Warmblut (B); Zitratwerte korrigiert um Verdünnungsfaktor 1,1 .....	118
Abbildung 44: ADVIA® 2120 - Diskussion: Thrombozytenzahlen (A) und MPV (B) im K <sub>3</sub> -EDTA-Blut (weiße Boxen) und Zitratblut (graue Boxen) bei jeweils 60 gesunden Kleinpferden und Warmblütern; (Median, 25/75%, min-max) .....	126
Abbildung 45: ADVIA® 2120 - Diskussion: Referenzintervalle der Thrombozytenzahl im K <sub>3</sub> -EDTA-Blut berechnet mit dem Reference Value Advisor ohne Ausschluss von Ausreißern (A), nach Ausschluss von Ausreißern mittels Tukey-Test (B) sowie Ausschluss von Equiden mit EDTA-PTCP (C) .....	126
Abbildung 46: ADVIA® 2120 - Diskussion: Korrelation der Variablen Thrombozytenzahl und MPV aus K <sub>3</sub> -EDTA-Blut (A) und Zitratblut (B) bei 120 klinisch unauffälligen Warmblütern und Kleinpferden (Statistik: GraphPad Prism 6).....	128
Abbildung 47: Multiplate® Analyzer - Diskussion: ASPItest bei klinisch unauffälligen Kleinpferden (n = 58) und Warmblütern (n = 60); (Median, 25/75%, min-max) .....	130
Abbildung 48: Multiplate® Analyzer - Diskussion: ADPtest und ADPtestHS der 60 klinisch unauffälligen Kleinpferde (Balken = Median).....	131
Abbildung 49: Multiplate® Analyzer - Diskussion: ADPtest und ADPtestHS bei Isländern (A, n = 16), Haflingern (B, n = 8) und Shetlandponys (C, n = 8) .....	131
Abbildung 50: Multiplate® Analyzer - Diskussion: ADPtest der klinisch unauffälligen Kleinpferde in Abhängigkeit vom Body Condition Score (BCS); (Median, 25/75%, min-max) .....	132
Abbildung 51: Multiplate® Analyzer - Diskussion: Spontanaggregation bei Messungen mit und ohne magnetischen Rührstab während der Inkubation bei klinisch unauffälligen erwachsenen Kleinpferden und Warmblütern (n = 41) .....	134
Abbildung 52: Thrombozytopenie und Thrombozytose bei Klinikpatienten (2008 - 2015) - Diskussion: Thrombozytenzahlen bei eigenen Patienten (A) und Patienten von Sellon et al. [87] (B) mit Thrombozytopenie in Abhängigkeit vom Überlebenden; (Median, 25/75%, min-max).....	145
Abbildung 53: Thrombozytopenie und Thrombozytose bei Klinikpatienten (2008 - 2015)- Diskussion: MPV (A) und Clumps (B) im K <sub>3</sub> -EDTA-Blut am ADVIA® 2120 bei Pferden mit echter Thrombozytopenie und Pferden mit EDTA-PTCP; (Median, 25/75%, min-max) .....	148
Abbildung 54: Thrombozytopenie und Thrombozytose bei Klinikpatienten (2008 - 2015) - Diskussion: Korrelation von Thrombozytenzahl und Plasmakonzentration von Fibrinogen (gepunktete Linien: unteres/oberes Referenzlimit) bei Patienten mit Thrombozytose, rote Punkte: Nichtüberlebende (Statistik: GraphPad Prism 6).....	151

## 10 Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

---

Abbildung 55: Thrombozytopenie und Thrombozytose bei Klinikpatienten (2008 - 2015) - Diskussion: Thrombozytenzahlen bei eigenen Patienten (A) und Patienten von Sellon et al. [104] (B) mit Thrombozytose in Abhängigkeit vom Überlebenden; (Median, 25/75%, min-max) .....	152
Abbildung 56: Thrombozytenfunktion bei Equiden mit systemischer Entzündung (SIRS): PCDW [g/dl] am ADVIA® 2120 im K <sub>3</sub> -EDTA-Blut (weiße Box) und Zitratblut (graue Box) der Kontroll- (n = 120) und der SIRS-Gruppe (n = 19); (Median, 25/75%, min-max).....	157
Abbildung 57: Thrombozytenfunktion bei Equiden mit systemischer Entzündung (SIRS): Thrombozyten-Zytogramme und -Variablen am ADVIA® 2120 mit dichterem Verteilung der Zellen im K <sub>3</sub> -EDTA im Vergleich zum Zitratblut (rote Markierungen) bei Patient 19.....	158
Abbildung 58: Thrombozytenfunktion bei Equiden mit systemischer Entzündung (SIRS): MPC am ADVIA® 2120 im K <sub>3</sub> -EDTA-Blut (weiße Box) und Zitratblut (graue Box) der Kontroll- (n = 120) und der SIRS-Gruppe (n = 20) ; (Median, 25/75%, min-max) .....	160
Abbildung 59: Thrombozytenfunktion bei Equiden mit systemischer Entzündung (SIRS): COLtest am Multiplate® Analyzer der Kontrollgruppe (A, n = 42) und der SIRS-Probanden (B, n = 20) bei Messungen mit und ohne magnetischen Rührstab während der Inkubation.....	165
Abbildung 60: Thrombozytenfunktion bei Equiden mit systemischer Entzündung (SIRS): Thrombozytenzahl am ADVIA® 2120 im K <sub>3</sub> -EDTA-Blut (A) und Zitratblut (B) in Abhängigkeit von Überleben (n = 6) und Nichtüberleben (n = 14), rote Markierung = Euthanasie aus wirtschaftlichen Gründen; (Balken= Mittelwert).....	170
Abbildung 61: Thrombozytenfunktion bei Equiden mit systemischer Entzündung (SIRS): Serumkonzentration von Serum Amyloid A (A) und Lymphozytenzahl (B, gestrichelte Linien = oberes/unteres Referenzlimit) in Abhängigkeit von Überleben (n = 6) und Nichtüberleben (n = 14), rot markierte Patienten = Euthanasie aus wirtschaftlichen Gründen; (Balken=Mittelwert).....	172
Abbildung 62: Thrombozytenfunktion bei Equiden mit systemischer Entzündung (SIRS): COLtest am Multiplate® Analyzer bei 20 SIRS-Patienten in Abhängigkeit vom Überleben bei Messungen mit (A, weiße Boxen; B, gefüllte Kreise) und ohne (A, graue Boxen; B, offene Kreise) magnetischen Rührstab während der Inkubation; rote Markierung = Probanden mit Euthanasie aus wirtschaftlichen Gründen; (Median, 25/75%, min-max).....	173
Abbildung 63: Thrombozytenfunktion bei Equiden mit systemischer Entzündung (SIRS): Prozentuale Anteile CD62P- (A) sowie CD154-positiver Thrombozyten (B) am Accuri® C6 vor (ungefüllte Kreise) und nach Aktivierung mit Kollagen (gefüllte Kreise) bei 19 SIRS-Patienten in Abhängigkeit vom Überleben; rote Markierung = Probanden mit Euthanasie aus wirtschaftlichen Gründen; (Balken=Mittelwert) 175	175
Abbildung 64: Thrombozytenfunktion bei Equiden mit systemischer Entzündung (SIRS): Prozentuale Anteile CD11a/18-positiver Thrombozyten am Accuri® C6 vor (ungefüllte Kreise) und nach Aktivierung mit Kollagen (gefüllte Kreise) bei 19 SIRS-Patienten in Abhängigkeit vom Überleben; rote Markierung = Probanden mit Euthanasie aus wirtschaftlichen Gründen; (Balken=Mittelwert).....	175
Abbildung 65: Hemmung der Thrombozytenfunktion bei Pferden: ADPtest am Multiplate® Analyzer während der Verabreichung von Clopidogrel (T0: 6-6,5 mg/kg, T24,T48: 1,2-1,4 mg/kg) bei 10 Pferden .....	182

### 10.2 Tabellen

Tabelle 1: Konzentrationen von Adeninen (ATP, ADP), Amininen (Serotonin) und bivalenten Kationen in den $\delta$ -Granula von Thrombozyten bei Mensch und Pferd sowie Konzentrationsänderungen nach Aktivierung mit Thrombin; modifiziert nach Meyers et al. [7].....	4
Tabelle 2: Ausgewählte Glykoproteine der Thrombozyten .....	5
Tabelle 3: Kriterien und deren Grenzwerte zur Erfüllung des Vorliegens eines SIRS bei Equiden .....	32
Tabelle 4: ADVIA® 2120 : Methoden und Berechnungen der ausgegebenen Thrombozytenvariablen	38
Tabelle 5: Multiplate® Analyzer - Methodenetablierung: Testkonzentrationen der eingesetzten Agonisten.....	45
Tabelle 6: Accuri® C6: Spezifikationen der Fluoreszenzkanäle (Filter: Mittelwert/Bandbreite der durchgelassenen Wellenlänge; LP=long pass=Tiefpassfilter).....	49
Tabelle 7: Accuri® C6 - Methodenetablierung: Zellzahlen gemessen am ADVIA® 2120 vor und nach Erythrozytenlyse sowie Sedimentation (Mittelwerte und Standardabweichungen, Statistik GraphPad Prism 6).....	50
Tabelle 8: Accuri® C6 - Methodenetablierung: Monoklonale Antikörper und Isotypenkontrollen (Fluorochrome s. Tabelle 6, S. 49).....	51
Tabelle 9: ELISA sCD40L und sP-Selectin - Validierung: Probenherstellung für die Prüfung auf Wiederfindung und Linearität .....	58
Tabelle 10: Hemmung der Thrombozytenfunktion - Methodik: Dosierungsschema für Clopidogrel und ASS in Gewichtskategorien (*Anzahl Tabletten Clopidogrel: 75 mg; ASS: 500 mg/100 mg) .....	68
Tabelle 11: ADVIA® 2120: Thrombozytenvariablen beim Kleinpferd in Abhängigkeit vom Antikoagulans [arithmetischer MW $\pm$ SD bzw. * geometrischer MW(SF)]; #= Zitratwerte korrigiert um Verdünnungsfaktor 1,1 .....	73
Tabelle 12: ADVIA® 2120: Vergleich der Mittelwerte der Thrombozytenvariablen beim Kleinpferd; der Effekt gibt wieder, bei welchem Antikoagulans der höhere Mittelwert berechnet wurde (E= K <sub>3</sub> -EDTA, Z=Zitrat, M=Mg-Sulfat).....	74
Tabelle 13: ADVIA® 2120: Korrelationskoeffizienten (r) des paarweisen Vergleichs der Antikoagulantien beim Kleinpferd (n = 60).....	74
Tabelle 14: ADVIA® 2120: Thrombozytenvariablen in Abhängigkeit vom Antikoagulans beim Warmblut (n = 60); #= Zitratwerte korrigiert um Verdünnungsfaktor 1,1 .....	75
Tabelle 15: ADVIA® 2120: Thrombozytenvariablen aus K <sub>3</sub> -EDTA-Blutproben in Abhängigkeit von der Rasse (n = 60, Clumps und PCT Kleinpferd n = 56).....	76
Tabelle 16: ADVIA® 2120: Thrombozytenvariablen aus Zitrat-Blutproben in Abhängigkeit von der Rasse (n = 60); #= korrigiert um Verdünnungsfaktor 1,1 .....	76
Tabelle 17: Multiplate® Analyzer: Aggregation [U] in Abhängigkeit von der Rasse .....	80

## 10 Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

---

Tabelle 18: Multiplate® Analyzer: Aggregation [U] in Abhängigkeit von der Messmethodik während der Inkubation bei klinisch unauffälligen Kleinpferden (KP) und Warmblütern (WB) .....	81
Tabelle 19: Accuri® C6 – Methodenetablierung: Prozentualer Anteil doppelmarkierter Thrombozyten (CD41/61-positiv) vor und nach Aktivierung mit Kollagen bei 10 klinisch unauffälligen Equiden.....	82
Tabelle 20: Accuri® C6 – Methodenetablierung: Prozentualer Anteil Thiazol-positiver Thrombozyten bei 10 klinisch unauffälligen Equiden.....	83
Tabelle 21: ELISA sCD40L: Einzelmesswerte und Mittelwert der Doppelmessungen der Standards (S) und Kontrollen (C) sowie zu erwartende Konzentrationen [pg/ml] .....	85
Tabelle 22: ELISA sCD40L: Einzelmesswerte und Mittelwert der Doppelmessungen der "spiked" Kontrollen (RC), des "spiked" Poolserums (SS) und des "spiked" Poolplasmas (PS) sowie der zu erwartenden Konzentrationen [pg/ml] und der prozentualen Rate der Wiederfindung (Recovery)...	85
Tabelle 23: ELISA sP-Selectin: Einzelmesswerte und Mittelwert der Standards (S) und der Kontrolle (C) sowie zu erwartende Konzentrationen [ng/ml] der Mikroplatte 1.....	86
Tabelle 24: ELISA sP-Selectin: Einzelmesswerte und Mittelwert der "spiked" Kontrollen (RC), des "spiked" Poolserums (SS) und des "spiked" Poolplasmas (PS) sowie der zu erwartenden Konzentrationen [ng/ml] und der prozentualen Rate der der Wiederfindung (Recovery) der Mikroplatte 1.....	87
Tabelle 25: Thrombozytopenie und Thrombozytose bei Klinikpatienten (2008 - 2015): Rasse- und Geschlechtsverteilung der Patienten mit Thrombozytenabweichungen im Vergleich zur Gesamtpopulation (n = 4.397) .....	88
Tabelle 26: Thrombozytopenie und Thrombozytose bei Klinikpatienten (2008 - 2015): Patientenzahl, Altersverteilung und Thrombozytenzahl.....	89
Tabelle 27: Thrombozytopenie und Thrombozytose bei Klinikpatienten (2008 - 2015): Verteilung in die Diagnosegruppen (absolut und prozentualer Anteil) sowie Anzahl der Nichtüberlebenden (†) und Mortalität (%) bei Patienten mit Thrombozytopenie und Thrombozytose .....	89
Tabelle 28: Thrombozytopenie und Thrombozytose bei Klinikpatienten (2008 - 2015): Thrombozytenvariablen am ADVIA® 2120 in Abhängigkeit des Antikoagulans bei echter Thrombozytopenie (n = 22) und EDTA-PTCP (n = 11) .....	92
Tabelle 29: Thrombozytenfunktion bei Equiden mit systemischer Entzündung (SIRS): SIRS-Kriterien der 20 Individuen, n.d. = nicht durchgeführt.....	94
Tabelle 30: Thrombozytenfunktion bei Equiden mit systemischer Entzündung (SIRS): Thrombozytenvariablen am ADVIA® 2120 in Abhängigkeit von der Gruppe in Messungen aus K <sub>3</sub> -EDTA- bzw. Zitratblut (#= korrigiert um Verdünnungsfaktor 1,1).....	96
Tabelle 31: Thrombozytenfunktion bei Equiden mit systemischer Entzündung (SIRS): Thrombozytenvariablen am ADVIA® 2120 in Abhängigkeit von Überleben und Nichtüberleben der SIRS- Probanden aus K <sub>3</sub> -EDTA-Blut bzw. Zitratblut (#=korrigiert um Verdünnungsfaktor 1,1) .....	97
Tabelle 32: Thrombozytenfunktion bei Equiden mit systemischer Entzündung (SIRS): Aggregationswerte am Multiplate® Analyzer der Kontroll- und SIRS-Gruppe bei Messungen mit bzw. ohne magnetischen Rührstab während der Inkubation .....	98

## 10 Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

---

Tabelle 33: Thrombozytenfunktion bei Equiden mit systemischer Entzündung (SIRS): Aggregationswerte am Multiplate® Analyzer in Abhängigkeit von Überleben und Nichtüberleben der SIRS-Probanden bei Messungen mit bzw. ohne magnetischen Rührstab während der Inkubation ....	99
Tabelle 34: Thrombozytenfunktion bei Equiden mit systemischer Entzündung (SIRS): ASPItest am Multiplate® Analyzer [U] bei SIRS-Probanden in Abhängigkeit von der Rasse .....	99
Tabelle 35: Thrombozytenfunktion bei Equiden mit systemischer Entzündung (SIRS): Antikörper- und Thiazol-positive Thrombozyten am Accuri® C6 der SIRS- und Kontrollgruppe vor und nach Aktivierung mit Kollagen.....	101
Tabelle 36: Thrombozytenfunktion bei Equiden mit systemischer Entzündung (SIRS): CD62P-, CD154-, CD11a/18- und Thiazol-positive Thrombozyten am Accuri® C6 in Abhängigkeit von Überleben und Nichtüberleben der SIRS-Probanden bei Messungen vor und nach Aktivierung mit Kollagen .....	103
Tabelle 37: Hemmung der Thrombozytenfunktion bei Pferden: Aggregationswerte am Multiplate® Analyzer zu verschiedenen Messzeitpunkten (T, in Stunden) nach Medikation mit Acetylsalicylsäure (#4,7-5,0 mg/kg, ##1,0-1,3 mg/kg) bei 10 Pferden; absolute Messwerte (MW ± SD in Units=U), prozentuale Abweichung vom Ausgangswert (T0); ** $p < 0,01$ ; * $p < 0,05$ .....	107
Tabelle 38: Hemmung der Thrombozytenfunktion bei Pferden: Aggregationswerte am Multiplate® Analyzer zu verschiedenen Messzeitpunkten (T, in Stunden) nach Medikation mit Clopidogrel (#6,0-6,5 mg/kg, ##1,2-1,4 mg/kg) bei 10 Pferden; absolute Messwerte (MW ± SD in Units=U) sowie prozentuale Abweichung vom Ausgangswert (T0); ** $p < 0,01$ , * $p < 0,05$ .....	108
Tabelle 39: ADVIA® 2120 - Diskussion: Referenzintervalle für die Thrombozytenzahlen aus K <sub>3</sub> -EDTA- und Zitrat-Blutproben; #nach Ausschluss von Ausreißern (Tukey-Test), ##nach Ausschluss von Individuen mit EDTA-PTCP; Berechnung parametrisch, robust, Box-Cox-transformiert (Reference Value Advisor, V 2.1) .....	121
Tabelle 40: Multiplate® Analyzer – Diskussion: Aggregationswerte in Abhängigkeit vom Körpergewicht bei klinisch unauffälligen Kleinpferden, BCS nach Carroll und Huntington [255]; t-Test bzw. U-Test (GraphPad Prism 6) .....	132
Tabelle 41: Thrombozytenfunktion bei Equiden mit systemischer Entzündung (SIRS): Kriterien und deren Grenzwerte zur Erfüllung des Vorliegens eines SIRS bei erwachsenen Equiden.....	154
Tabelle 42: Thrombozytenfunktion bei Equiden mit systemischer Entzündung (SIRS): Odds ratios für einen letalen Ausgang in Abhängigkeit vom SIRS-Score nach Roy et al. [232], # = Ausschluss der Patienten mit Euthanasie aus wirtschaftlichen Gründen (MedCalc Statistical Software version 18.9, MedCalc Software bvba) .....	169
Tabelle 43: Hemmung der Thrombozytenfunktion bei Pferden: ASPItest (prozentuale Abweichungen vom Ausgangswert T0) am Multiplate® Analyzer sowie Serumkonzentration der Salicylsäure (SS) zu verschiedenen Messzeitpunkten (T, in Stunden) nach Medikation mit ASS (# 4,7-5 mg/kg, ##1-1,3 mg/kg) bei 10 Pferden.....	177
Tabelle 44: Hemmung der Thrombozytenfunktion bei Equiden: Wiederherstellung der Thrombozytenfunktion zum Zeitpunkt T240 im Vergleich zu T0 am Multiplate® Analyzer nach Medikation mit Clopidogrel bei 10 Pferden (+: Ausgangswert ± 15 % erreicht; -: Ausgangswert ± 15 % nicht erreicht).....	184

### 11 VERÖFFENTLICHUNGEN

Teile dieser Arbeit wurden bereits publiziert:

#### Zeitschriften (peer reviewed)

- Hübers E, Bauer N, Fey K, Moritz A, Roscher K (2018): Thrombopenie beim Pferd. Tierarztl Prax Ausg G; 46(02): 73-79
- Roscher KA, Failing K, Schenk I, Moritz A (2017): Suspected aspirin resistance in individual healthy adult warmblood horses. J vet Pharmacol Therap.;40(6):e16-e22
- Roscher KA, Failing K, Moritz A (2015): Inhibition of platelet function with clopidogrel, as measured with a novel whole blood impedance aggregometer in horses. Vet J; 203(3):332-6

#### Dissertation

- Held L (2018): Ermittlung von Referenzintervallen der Thrombozytenfunktion mittels Multiplate® Analyser beim klinisch unauffälligen Warmblutpferd

#### Vorträge

- Theuerkauf K, Obach-Schröck C, Staszyc C, Moritz A, Roscher KA (2018): Activated platelets and platelet-leukocyte-aggregates in equine systemic inflammatory response syndrome. BEVA Congress 2018; 13.-15.09.18; Birmingham/GB
- Theuerkauf K, Obach-Schröck C, Staszyc C, Moritz A, Roscher KA (2018): Activated platelets and platelet-leukocyte-aggregates in equine systemic inflammatory response syndrome. ACVIM Forum 2018; 14.-16.06.18; Seattle/USA
- Engel J, Moritz A, Held L, Fey K, Roscher K (2017): Impedanzaggregometrisch bestimmte Thrombozytenfunktion bei klinisch unauffälligen Ponys. 25. Jahrestagung der FG "Innere Medizin und klinische Labordiagnostik" der DVG (InnLab); 03./04.02.17; Göttingen
- Theuerkauf K, Moritz A, Fey K, Roscher K (2017): Etablierung einer durchflusszytometrischen Methode zur Messung aktivierter Thrombozyten und von Thrombozyten-Leukozyten-Aggregaten beim Pferd. 25. Jahrestagung der FG "Innere Medizin und klinische Labordiagnostik" der DVG (InnLab); 03./04.02.17; Göttingen
- Hübers E, Roscher K, Fey K, Moritz A (2016): Thrombozytopenie beim Pferd. 24. Jahrestagung der FG "Innere Medizin und klinische Labordiagnostik" der DVG (InnLab), 29./30.01.16; Berlin
- Held L und Roscher K (2013): Measurement of platelet function with whole blood impedance aggregometry in healthy adult warmblood horses. 16. International Symposium of the World Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians (WAVLD); 06.-08.06.13; Berlin
- Held L, Roscher K (2012): Messung der Thrombozytenfunktion beim klinisch unauffälligen Warmblutpferd. 20. Jahrestagung der der FG "Innere Medizin und klinische Labordiagnostik" der DVG (InnLab); 03./04.02.12; Göttingen

### 12 ANHANG

#### Tabellen und Abbildungen im Anhang:

Tabelle 12-1: ADVIA® 2120: Stammdaten der klinisch unauffälligen Warmblüter.....	12-5
Tabelle 12-2: ADVIA® 2120: Stammdaten der klinisch unauffälligen Kleinpferde.....	12-6
Tabelle 12-3: Multiplate® Analyzer - Methodenetablierung: Mittelwerte (MW), Standardabweichungen (s) sowie Variationskoeffizienten (CV) der Messungen bei klinisch unauffälligen Warmblutpferden (n = 20) mit verschiedenen Agonisten-Konzentrationen.....	12-7
Tabelle 12-4: ELISA sCD40L und sCD62P: Plattenbelegung.....	12-8
Tabelle 12-5: ADVIA® 2120 – Vergleich von Antikoagulantien: Einzelmesswerte der klinisch unauffälligen Kleinpferde (PLT2= PLT korrigiert um Verdünnungsfaktor 1,1 bei Zitrat) .....	12-9
Tabelle 12-6: ADVIA®2120 – Vergleich von Antikoagulantien: Einzelmesswerte der klinisch unauffälligen Warmblüter (PLT2= PLT korrigiert um Verdünnungsfaktor 1,1 bei Zitrat) .....	12-13
Tabelle 12-7: ADVIA® 2120: Einzelwerte der vom Gerät ausgegebene Variablen PDW und MPV der klinisch unauffälligen Kleinpferde (2) und Warmblüter (1): sowie manuell berechnete Standardabweichung (SD) für die Antikoagulantien K <sub>3</sub> -EDTA, Zitrat und Mg-Sulfat (ID: Patient; R: Rasse) .....	12-16
Tabelle 12-8: Multiplate® Analyzer – Rassenvergleich: Einzelmesswerte der klinisch unauffälligen Kleinpferde und Warmblüter (s. 3.1.1.2, S. 39).....	12-18
Tabelle 12-9: : Multiplate® Analyzer – Methodenvergleich: Einzelmesswerte der Messungen mit und ohne magnetischem Rührstab (s. 3.1.2.4, S. 46).....	12-20
Tabelle 12-10: ELISA sP-Selectin – Ergebnisse: Einzelmesswerte und Mittelwert des nativen Serums (SN), des Kollagen-aktivierten Serums (SA), des nativen Plasmas (PN) und des Kollagen-aktivierten Plasmas (PA) von Pferd 1 (Platte 1).....	12-21
Tabelle 12-11: ELISA sP-Selectin – Ergebnisse: Einzelmesswerte und Mittelwert des nativen Serums (SN), des Kollagen-aktivierten Serums (SA), des nativen Plasmas (PN) und des Kollagen-aktivierten Plasmas (PA) von Pferd 2 und 3 (Mikroplatte 2) .....	12-22
Tabelle 12-12: Thrombozytopenie und Thrombozytose bei Klinikpatienten (2008 - 2015): Übersicht aller Patienten mit Thrombozytopenie und Thrombozytose.....	12-23
Tabelle 12-13: Thrombozytopenie und Thrombozytose bei Klinikpatienten (2008 - 2015): Thrombozytenzahlen [x10 <sup>9</sup> /l] in den Diagnosegruppen bei Pferden mit Thrombozytopenie und Thrombozytose.....	12-28
Tabelle 12-14: Thrombozytopenie und Thrombozytose bei Klinikpatienten (2008 - 2015): Thrombozytenzahlen [x10 <sup>9</sup> /l] bei Pferden mit Thrombozytopenie und Thrombozytose in Abhängigkeit vom Überleben.....	12-28
Tabelle 12-15: Thrombozytenfunktion bei Equiden mit systemischer Entzündung (SIRS): Stammdaten der Patienten (BCS nach Carroll und Huntington [255]) .....	12-29

- Tabelle 12-16: Thrombozytenfunktion bei Equiden mit systemischer Entzündung (SIRS): Thrombozytenvariablen am ADVIA® 2120 sowie Minimal- und Maximalwert, 25%-75%-Perzentil und Median bei 20 Equiden; #= PLT im Zitrat korrigiert um Verdünnungsfaktor 1,1 ..... 12-30
- Tabelle 12-17: Thrombozytenfunktion bei Equiden mit systemischer Entzündung (SIRS): Aggregationswerte am Multiplate® Analyzer mit und ohne magnetischen Rührstab sowie Minimal- und Maximalwert, 25%-75%-Perzentil und Median bei 20 Equiden ..... 12-31
- Tabelle 12-18: Thrombozytenfunktion bei Equiden mit systemischer Entzündung (SIRS): Prozentualer Anteil doppelmarkierter Thrombozyten (CD41/61-positiv) vor und nach Aktivierung mit Kollagen am Accuri® C6 sowie Minimal- und Maximalwert, 25%-75%-Perzentil und Median bei 19 Equiden, n.d.=nicht durchgeführt ..... 12-32
- Tabelle 12-19: Thrombozytenfunktion bei Equiden mit systemischer Entzündung (SIRS): Korrelationskoeffizienten der Messungen aus K<sub>3</sub>-EDTA-Blut und Zitratblut am ADVIA® 2120 und dem Multiplate® Analyzer bei klinisch unauffälligen Kleinpferden und Warmblütern (Spontanaggregation Korrelation nach Spearman, alle anderen nach Pearson) ..... 12-33
- Tabelle 12-20: Thrombozytenfunktion bei Equiden mit systemischer Entzündung (SIRS): Korrelationskoeffizienten der Messungen aus K<sub>3</sub>-EDTA-Blut und Zitratblut am ADVIA® 2120 und dem Multiplate® Analyzer bei 20 Equiden mit SIRS (Spontanaggregation Korrelation nach Spearman, alle anderen nach Pearson) ..... 12-34
- Tabelle 12-21: Thrombozytenfunktion bei Equiden mit systemischer Entzündung (SIRS): Korrelationskoeffizienten nach Pearson der Messungen aus Zitratblut am ADVIA® 2120 und dem Accuri® C6 in der Kontroll- und der SIRS-Gruppe ..... 12-35
- Tabelle 12-22: Thrombozytenfunktion bei Equiden mit systemischer Entzündung (SIRS): Korrelationskoeffizienten der Messungen am Multiplate® Analyzer und dem Accuri® C6 der 19 SIRS-Patienten (Spontanaggregation Korrelation nach Spearman, alle anderen nach Pearson) ..... 12-36
- Tabelle 12-23: Hemmung der Thrombozytenfunktion bei Equiden: Hämatologie, klinische Chemie und plasmatische Gerinnung nach Medikation mit Acetylsalicylsäure zu verschiedenen Messzeitpunkten (T, in Stunden) bei 10 Pferden; Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SD); \*\*  $p < 0,01$ , \*  $p < 0,05$  ..... 12-37
- Tabelle 12-24: Hemmung der Thrombozytenfunktion bei Pferden: Serumkonzentration der Salicylsäure ( $\mu\text{g/ml}$ ) zu verschiedenen Messzeitpunkten (T, in Stunden) nach Medikation mit ASS (# 4,7-5 mg/kg, ##1-1,3 mg/kg) bei 10 Pferden ..... 12-39
- Tabelle 12-25: Hemmung der Thrombozytenfunktion bei Pferden: Thrombozytenfunktion am Multiplate® Analyzer zu verschiedenen Messzeitpunkten (T, in Stunden) nach Medikation mit Acetylsalicylsäure (#4,7-5,0 mg/kg, ##1,0-1,3 mg/kg) bei 10 Pferden ..... 12-40
- Tabelle 12-26: Hemmung der Thrombozytenfunktion bei Equiden: Hämatologie, klinische Chemie und plasmatische Gerinnung nach Medikation mit Clopidogrel zu verschiedenen Messzeitpunkten (T, in Stunden) bei 10 Pferden; Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SD); \*\*  $p < 0,01$ , \*  $p < 0,05$  12-41
- Tabelle 12-27: Hemmung der Thrombozytenfunktion bei Pferden: Thrombozytenfunktion am Multiplate® Analyzer zu verschiedenen Messzeitpunkten (T, in Stunden) nach Medikation mit Clopidogrel (#6,0-6,5 mg/kg, ##1,2-1,4 mg/kg) bei 10 Pferden ..... 12-43

## 12 Anhang

---

Tabelle 12-28: Thrombozytenfunktion bei Equiden mit systemischer Entzündung (SIRS): Thrombozyten-Zytogramme und PCDW der 20 Individuen am ADVIA® 2120 ..... 12-44

Abbildung 12-1: ADVIA® 2120 - Diskussion: Histogramme der Thrombozytenzählung der klinisch unauffälligen Kleinpferde (Reference Value Advisor, V2.1)..... 12-49

Abbildung 12-2: ADVIA® 2120 - Diskussion: Histogramme der Thrombozytenzählung der klinisch unauffälligen Warmblüter (Reference Value Advisor, V2.1)..... 12-50

Abbildung 12-3: MPV [fl] bei klinisch unauffälligen Equiden (n = 120) und Equiden mit Thrombozytopenie (n = 22) im K<sub>3</sub>-EDTA-Blut (weiße Box) und Zitratblut (graue Box); ; (Median, 25/75%, min-max) ..... 12-51

## 12 Anhang

---

Tabelle 12-1: ADVIA® 2120: Stammdaten der klinisch unauffälligen Warmblüter

Pat-ID	Geschlecht	Alter (Jahre)
1	Wallach	17
2	Stute	16
3	Stute	15
4	Wallach	9
5	Stute	15
6	Stute	5
7	Wallach	16
8	Stute	11
9	Wallach	11
10	Wallach	16
11	Stute	17
12	Stute	15
13	Wallach	7
14	Wallach	11
15	Wallach	13
16	Stute	19
17	Wallach	6
18	Stute	6
19	Stute	9
20	Wallach	8
21	Wallach	17
22	Wallach	8
23	Wallach	20
24	Wallach	7
25	Stute	7
26	Stute	6
27	Wallach	4
28	Stute	14
29	Stute	10
30	Stute	4

Pat-ID	Geschlecht	Alter (Jahre)
31	Stute	14
32	Stute	6
33	Stute	8
34	Wallach	17
35	Wallach	7
36	Wallach	21
37	Wallach	7
38	Wallach	12
39	Stute	11
40	Wallach	4
41	Stute	15
42	Stute	11
43	Stute	16
44	Stute	4
45	Wallach	4
46	Stute	6
47	Stute	5
48	Stute	6
49	Wallach	10
50	Wallach	15
51	Wallach	5
52	Wallach	15
53	Wallach	6
54	Wallach	11
55	Stute	21
56	Wallach	15
57	Stute	24
58	Stute	16
59	Stute	4
60	Wallach	15

## 12 Anhang

Tabelle 12-2: ADVIA® 2120: Stammdaten der klinisch unauffälligen Kleinpferde

Pat-ID	Rasse	Geschlecht	Alter (Jahre)
1	Shetlandpony	Wallach	17
2	Isländer	Stute	19
3	Haflinger	Stute	7
4	Haflinger	Stute	17
5	Isländer	Wallach	21
6	Connemara	Wallach	26
7	Shetlandpony	Wallach	7
8	Haflinger	Wallach	16
9	Liebenthaler	Wallach	7
10	Dülmener	Stute	19
11	Isländer	Wallach	5
12	Isländer	Stute	8
13	Pony Mix	Wallach	16
15	Tinker	Wallach	12
16	Shetlandpony	Wallach	21
17	Dt. Reitpony	Wallach	6
18	Norweger	Wallach	20
19	Isländer	Stute	6
20	Tinker Mix	Wallach	9
21	Dt. Reitpony	Stute	22
22	Shetlandpony-Mix	Wallach	21
23	Liebenthaler	Wallach	7
24	Liebenthaler	Stute	7
25	Kleinpferd	Wallach	4
26	Kleinpferd	Stute	20
27	Isländer	Wallach	10
28	Isländer	Wallach	23
29	Dülmener	Stute	11
30	Liebenthaler	Stute	7

Pat-ID	Rasse	Geschlecht	Alter (Jahre)
31	Isländer	Wallach	10
32	Isländer	Stute	14
33	Connemara Mix	Wallach	7
34	Shetlandpony	Wallach	21
35	Haflinger	Stute	14
36	Shetlandpony	Stute	8
39	Dülmener	Wallach	25
40	Shetlandpony	Wallach	11
41	Shetlandpony	Stute	12
42	Haflinger-Mix	Wallach	4
43	Kleinpferd	Wallach	20
44	Haflinger	Stute	4
45	Norweger	Stute	20
46	Isländer	Wallach	11
47	Isländer	Wallach	26
48	Haflinger	Stute	23
49	Isländer	Stute	21
50	Isländer	Stute	18
51	Isländer	Stute	7
52	Haflinger	Stute	7
53	Haflinger	Stute	15
54	Norweger	Wallach	13
55	Norweger	Wallach	6
56	Pony	Wallach	16
57	Isländer	Stute	8
58	Isländer	Wallach	17
59	Shetlandpony	Stute	21
60	dt. Reitpony	Wallach	10

## 12 Anhang

Tabelle 12-3: Multiplate® Analyser - Methodenetablierung: Mittelwerte (MW), Standardabweichungen (s) sowie Variationskoeffizienten (CV) der Messungen bei klinisch unauffälligen Warmblutpferden (n = 20) mit verschiedenen Agonisten-Konzentrationen

	Konzentration	intra-individuell			inter-individuell		
		MW (U)	s (U)	CV	MW (U)	s (U)	CV
<b>ADPtest</b> (ADP)	6,5 µM	202	29	0,14	202	75	0,37
	9,75 µM	192	22	0,12	192	76	0,40
	13 µM	206	17	0,08	206	78	0,38
<b>ADPtestHS</b> (ADP / PGE <sub>1</sub> )	6,5 µM / 9.4 nM	125	13	0,16	125	63	0,51
	9,75 µM / 14,1 nM	123	16	0,13	123	62	0,51
	13 µM / 18,8 nM	114	18	0,16	114	71	0,62
<b>ASPItest</b> (Arachidonsäure)	0,5 mM	165	21	0,14	165	70	0,42
	0,75 mM	186	16	0,09	186	65	0,35
	1 mM	166	24	0,14	166	54	0,32
<b>COLtest</b> (Kollagen)	0,8 µg/ml	271	24	0,09	271	59	0,22
	1,2 µg/ml	292	24	0,08	292	54	0,18
	1,6 µg/ml	302	19	0,06	302	65	0,22

## 12 Anhang

Tabelle 12-4: ELISA sCD40L und sCD62P: Plattenbelegung

S0-S7 = Standards; C = control; CL,CM,CH = control low, medium, high; RC = recovery control; SN = Serum nativ; SS = Serum spiked; PN = Plasma nativ; PS = Plasma spiked; Codierung Testpferde: 1SN = Testpferd 1 Serum nativ; 2PA = Testpferd 2 Plasma aktiviert

### sCD40L

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	S0	S0	CL	CL	SN2	SN2	PN2	PN2	1SN0	1SN0	2SN0	2SN0
<b>B</b>	S1	S1	CM	CM	SN4	SN4	PN4	PN4	1SN1	1SN1	2SN1	2SN1
<b>C</b>	S2	S2	CH	CH	SN8	SN8	PN8	PN8	1SA0	1SA0	2SA0	2SA0
<b>D</b>	S3	S3	RC0	RC0	SS0	SS0	PS0	PS0	1SA1	1SA1	2SA1	2SA1
<b>E</b>	S4	S4	RC2	RC2	SS2	SS2	PS2	PS2	1PN0	1PN0	2PN0	2PN0
<b>F</b>	S5	S5	RC4	RC4	SS4	SS4	PS4	PS4	1PN1	1PN1	2PN1	2PN1
<b>G</b>	S6	S6	RC8	RC8	SS8	SS8	PS8	PS8	1PA0	1PA0	2PA0	2PA0
<b>H</b>	S7	S7	SN0	SN0	PN0	PN0			1PA1	1PA1	2PA1	2PA1

### sCD62P Platte 1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	S0	S0	RC2	RC2	SS2	SS2	PS2	PS2	1SA1	1SA1	1PA1	1PA1
<b>B</b>	S1	S1	RC4	RC4	SS4	SS4	PS4	PS4	1SA2	1SA2	1PA2	1PA2
<b>C</b>	S2	S2	RC8	RC8	SS8	SS8	PS8	PS8	1SA3	1SA3	1PA3	1PA3
<b>D</b>	S3	S3	SN0	SN0	PN0	PN1	1SN0	1SN0	1PN0	1PN0		
<b>E</b>	S4	S4	SN2	SN2	PN2	PN2	1SN1	1SN1	1PN1	1PN1		
<b>F</b>	S5	S5	SN4	SN4	PN4	PN4	1SN2	1SN2	1PN2	1PN2		
<b>G</b>	C	C	SN8	SN8	PN8	PN8	1SN3	1SN3	1PN3	1PN3		
<b>H</b>	RC0	RC0	SS0	SS0	PS0	PS0	1SA0	1SA0	1PA0	1PA0		

### sCD62P Platte 2

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	S0	S0	2SN0	2SN0	2PN0	2PN0	3SN0	3SN0	3PN0	3PN0		
<b>B</b>	S1	S1	2SN1	2SN1	2PN1	2PN1	3SN1	3SN1	3PN1	3PN1		
<b>C</b>	S2	S2	2SN2	2SN2	2PN2	2PN2	3SN2	3SN2	3PN2	3PN2		
<b>D</b>	S3	S3	2SN3	2SN3	2PN3	2PN3	3SN3	3SN3	3PN3	3PN3		
<b>E</b>	S4	S4	2SA0	2SA0	2PA0	2PA0	3SA0	3SA0	3PA0	3PA0		
<b>F</b>	S5	S5	2SA1	2SA1	2PA1	2PA1	3SA1	3SA1	3PA1	3PA1		
<b>G</b>	C	C	2SA2	2SA2	2PA2	2PA2	3SA2	3SA2	3PA2	3PA2		
<b>H</b>			2SA3	2SA3	2PA3	2PA3	3SA3	3SA3	3PA3	3PA3		

## 12 Anhang

Tabelle 12-5: ADVIA® 2120 – Vergleich von Antikoagulantien: Einzelmesswerte der klinisch unauffälligen Kleinpferde (PLT2= PLT korrigiert um Verdünnungsfaktor 1,1 bei Zitrat)

Pat-ID	Antikoagulans	PLT [10 <sup>9</sup> /l]	PLT2 [10 <sup>9</sup> /l]	MPV [fL]	PDW [%]	MPC [g/dl]	PCDW [g/dl]	LargePLT [10 <sup>9</sup> /l]	Clumps [n]	PCT [%]
1	K <sub>3</sub> -EDTA	155		5,5	44,9	29,2	7,5	0	80	0,11
2	K <sub>3</sub> -EDTA	176		6,6	53,6	24,9	8,6	1	137	0,13
3	K <sub>3</sub> -EDTA	146		10,9	63,2	20,2	8,6	13	100	0,16
4	K <sub>3</sub> -EDTA	159		9,8	63,1	20,3	9,1	10	70	0,12
5	K <sub>3</sub> -EDTA	213		9,9	67,3	21,9	9,1	15	100	0,21
6	K <sub>3</sub> -EDTA	86		7,1	55,5	24,6	8,6	1	316	0,06
7	K <sub>3</sub> -EDTA	145		8,5	64,2	22,9	9	5	68	0,12
8	K <sub>3</sub> -EDTA	167		8,8	62,9	22,9	9,1	7	84	0,15
9	K <sub>3</sub> -EDTA	153		6,8	50,9	27,3	8,1	1	54	0,11
10	K <sub>3</sub> -EDTA	108		6,1	25,3	27,4	7,6	0	-	0,1
11	K <sub>3</sub> -EDTA	253		6,9	58,6	24,7	9,1	3	117	0,1
12	K <sub>3</sub> -EDTA	124		10,3	67,3	21,7	9	10	101	0,13
13	K <sub>3</sub> -EDTA	214		8,6	66,9	20,6	9,1	10	68	0,18
14	K <sub>3</sub> -EDTA	149		8,3	59,4	24,4	9,1	4	92	0,16
15	K <sub>3</sub> -EDTA	193		8,2	55	22,8	8,7	4	-	-
16	K <sub>3</sub> -EDTA	209		6,3	54,4	25,1	8,7	1	170	0,1
17	K <sub>3</sub> -EDTA	213		6,7	55,7	26,3	8,5	2	137	0,12
18	K <sub>3</sub> -EDTA	210		7,5	62,8	24,8	9,3	3	148	0,16
19	K <sub>3</sub> -EDTA	229		6,6	24,5	23,2	8,6	3	154	0,12
20	K <sub>3</sub> -EDTA	178		8,9	58,4	23,7	8,5	7	-	-
21	K <sub>3</sub> -EDTA	193		9,4	64,1	20,8	8,9	12	80	0,19
22	K <sub>3</sub> -EDTA	153		6,7	24,1	23,8	8,4	1	91	0,1
23	K <sub>3</sub> -EDTA	238		7,3	54	25,1	8,6	2	90	0,12
24	K <sub>3</sub> -EDTA	130		6,4	23,9	28,3	7,7	1	126	0,13
25	K <sub>3</sub> -EDTA	146		8,2	20,7	21,2	8,7	13	-	-
26	K <sub>3</sub> -EDTA	132		6,6	22,6	25,6	8,3	1	188	0,09
27	K <sub>3</sub> -EDTA	136		6,1	25,8	25,9	8,4	0	91	0,11
28	K <sub>3</sub> -EDTA	204		7,3	64,3	25,4	8,7	3	406	0,15
29	K <sub>3</sub> -EDTA	154		6,4	24,8	25,7	8,4	2	184	0,12
30	K <sub>3</sub> -EDTA	135		8,4	65,7	24,1	9,2	5	97	0,11
31	K <sub>3</sub> -EDTA	225		8,8	68,4	21,7	9,3	11	138	0,18
32	K <sub>3</sub> -EDTA	184		6,9	53,5	27,8	8	1	250	0,13
33	K <sub>3</sub> -EDTA	202		7,4	57,9	25,5	9,1	3	106	0,14
34	K <sub>3</sub> -EDTA	195		9,4	63,3	23,1	9,6	9	105	0,16
35	K <sub>3</sub> -EDTA	174		8	62,6	23,5	9	5	97	0,15
36	K <sub>3</sub> -EDTA	158		6,3	45,6	29,6	6,4	0	91	0,09
37	K <sub>3</sub> -EDTA	156		5,6	26,3	30	6,6	0	289	0,09
38	K <sub>3</sub> -EDTA	151		6,9	25	23	9,4	4	95	0,1
39	K <sub>3</sub> -EDTA	197		6,5	49,7	25,8	8,7	1	168	0,1
40	K <sub>3</sub> -EDTA	210		7,3	57,1	22,9	8,6	4	99	0,2
41	K <sub>3</sub> -EDTA	176		6,9	49,7	26,6	8,4	1	-	-
42	K <sub>3</sub> -EDTA	38		6,7	57,5	26	7,6	0	75	0,18
43	K <sub>3</sub> -EDTA	237		6,7	53,6	25,9	8,6	1	204	0,17
44	K <sub>3</sub> -EDTA	169		7,6	57,2	22,3	8,6	2	125	0,07
45	K <sub>3</sub> -EDTA	143		7,5	56,1	26,4	8	2	78	0,1
46	K <sub>3</sub> -EDTA	151		6,7	51,5	26,3	8,3	0	222	0,13
47	K <sub>3</sub> -EDTA	148		8,3	58,4	22,7	9,3	5	59	0,12
48	K <sub>3</sub> -EDTA	190		8,4	63,1	22	8,6	7	97	0,16
49	K <sub>3</sub> -EDTA	198		8	62,1	23	8,9	5	81	0,16

## 12 Anhang

Pat-ID	Antikoagulans	PLT [10 <sup>9</sup> /l]	PLT2 [10 <sup>9</sup> /l]	MPV [fl]	PDW [%]	MPC [g/dl]	PCDW [g/dl]	LargePLT [10 <sup>9</sup> /l]	Clumps [n]	PCT [%]
50	K <sub>3</sub> -EDTA	211		9,2	59,5	20,8	8,7	10	126	0,15
51	K <sub>3</sub> -EDTA	188		5,9	51	27,7	8	1	502	0,16
52	K <sub>3</sub> -EDTA	192		5,1	29,2	29,1	7,6	0	82	0,13
53	K <sub>3</sub> -EDTA	140		6,2	47,5	29,2	6,9	0	89	0,08
54	K <sub>3</sub> -EDTA	146		7,4	55,2	24,1	9,1	2	209	0,17
55	K <sub>3</sub> -EDTA	164		8,1	57,4	24,9	8,5	3	76	0,16
56	K <sub>3</sub> -EDTA	172		7	50,5	25,6	8,5	1	58	0,09
57	K <sub>3</sub> -EDTA	187		7,6	58,5	25,2	8,8	3	112	0,14
58	K <sub>3</sub> -EDTA	170		6,1	49,6	28,6	7,7	1	95	0,15
59	K <sub>3</sub> -EDTA	176		9,4	66,3	21,6	8,9	10	116	0,16
60	K <sub>3</sub> -EDTA	150		7,8	21,4	21,3	8,8	8	90	0,14
1	Zitrat	161	177	7,2	51,2	24,4	9	1	87	0,12
2	Zitrat	156	172	8,1	55	20,8	8,3	2	117	0,13
3	Zitrat	90	99	9,6	18	17,8	7,8	9	119	0,09
4	Zitrat	136	150	8,2	60,8	23	9,6	4	320	0,11
5	Zitrat	176	194	8,5	19,9	20,1	8,3	9	93	0,15
6	Zitrat	113	124	9,2	58,4	19,7	9	5	367	0,1
7	Zitrat	110	121	6,8	24,2	23,9	9,1	1	180	0,07
8	Zitrat	123	135	11,4	58,8	18,4	8,7	13	546	0,14
9	Zitrat	126	139	7,5	54	24,8	9,3	1	86	0,09
10	Zitrat	111	122	8,7	56,2	21,9	8,9	4	135	0,1
11	Zitrat	221	243	8,7	56,8	20,7	9,1	6	131	0,19
12	Zitrat	110	121	9	18,6	18,7	8	12	80	0,1
13	Zitrat	159	175	8,1	58,4	21,3	9,2	4	96	0,13
14	Zitrat	142	156	8,3	21,1	20,5	8,9	8	167	0,12
15	Zitrat	164	180	8,6	52	21,9	8,7	4	73	0,14
16	Zitrat	187	206	7	54,6	22,8	9,1	1	44	0,13
17	Zitrat	162	178	8,8	59,2	21,4	9,2	6	75	0,14
18	Zitrat	190	209	9,4	58,2	20,7	9,2	7	120	0,18
19	Zitrat	184	202	7,8	52,3	21,4	8,5	2	89	0,14
20	Zitrat	147	162	9,2	56,3	21,7	9,3	5	71	0,14
21	Zitrat	159	175	8,8	59,4	21,3	8,9	6	281	0,14
22	Zitrat	162	178	8,7	60,4	20,5	8,6	5	41	0,14
23	Zitrat	224	246	8,2	52,4	22,5	8,8	3	360	0,18
24	Zitrat	117	129	9,1	50,5	22,8	8,6	4	283	0,11
25	Zitrat	130	143	10,4	58,2	21,1	9,2	10	67	0,14
26	Zitrat	115	127	8,7	51,8	22,3	8,5	3	93	0,1
27	Zitrat	123	135	8,1	52	21,2	8,1	1	137	0,1
28	Zitrat	157	173	8,8	57,3	21,6	9,1	7	120	0,14
29	Zitrat	131	144	6,7	46,9	26,3	8	0	87	0,09
30	Zitrat	58	64	7,5	58,3	25,7	8,9	1	90	0,04
31	Zitrat	166	183	8,7	62,7	21,3	9,4	6	97	0,14
32	Zitrat	158	174	7,8	50,9	25,4	8,3	2	70	0,12
33	Zitrat	114	125	6,5	48,4	26,6	8,4	0	639	0,07
34	Zitrat	157	173	10,8	58	20,1	9,3	13	111	0,17
35	Zitrat	143	157	9,3	55	20,7	8,4	5	107	0,13
36	Zitrat	151	166	7,9	53,2	25	8,8	3	104	0,12
37	Zitrat	147	162	7,5	51,2	25,4	8,6	1	45	0,11
38	Zitrat	161	177	9,5	58,6	19,6	9,1	8	97	0,15
39	Zitrat	173	190	7,6	51,9	23,7	9	2	230	0,13
40	Zitrat	172	189	7,9	54,4	21,4	9	3	77	0,14
41	Zitrat	133	146	7,9	55,6	24,1	9,2	1	289	0,11
42	Zitrat	181	199	8,6	59,8	21,6	9,6	5	231	0,16

## 12 Anhang

Pat-ID	Antikoagulans	PLT [10 <sup>9</sup> /l]	PLT2 [10 <sup>9</sup> /l]	MPV [fl]	PDW [%]	MPC [g/dl]	PCDW [g/dl]	LargePLT [10 <sup>9</sup> /l]	Clumps [n]	PCT [%]
43	Zitrat	210	231	8,7	58,4	21,1	9	7	243	0,18
44	Zitrat	138	152	7,5	53,2	22,7	8,8	2	67	0,1
45	Zitrat	114	125	9,1	58,8	22	8,7	4	161	0,1
46	Zitrat	140	154	8,9	57	21,4	8,8	5	214	0,12
47	Zitrat	117	129	8,9	63,1	21,7	9,1	5	118	0,1
48	Zitrat	87	96	8,8	61,1	22,1	9,3	2	83	0,08
49	Zitrat	178	196	7,9	56,1	23,1	9,1	3	1010	0,14
50	Zitrat	175	193	9,7	58,6	20,3	9	10	78	0,17
51	Zitrat	161	177	6,3	50,7	25,9	8,7	1	162	0,1
52	Zitrat	169	186	6,5	52,1	25,4	9,1	1	64	0,11
53	Zitrat	135	149	6,7	47,4	26,6	8,3	0	72	0,09
54	Zitrat	141	155	8,8	56,9	20,3	8,4	5	-	0,12
55	Zitrat	149	164	9,3	56	21,9	8,6	6	555	0,14
56	Zitrat	174	191	7,5	53,6	24,3	8,8	2	100	0,13
57	Zitrat	139	153	7,7	53,6	24,5	8,5	2	87	0,11
58	Zitrat	142	156	7,5	52,7	24,8	9,3	1	101	0,11
59	Zitrat	100	110	7,3	22,9	22,7	9,3	2	121	0,07
60	Zitrat	113	124	8,5	19,9	20,7	8,3	5	97	0,1
1	Mg-Sulfat	163		7,2	58,7	24,7	9,3	2	204	0,12
2	Mg-Sulfat	148		7,6	22	19,8	8,5	4	227	0,11
3	Mg-Sulfat	126		9,3	20,3	18,8	9	17	98	0,12
4	Mg-Sulfat	153		8,1	23,1	19,6	9,3	14	77	0,12
5	Mg-Sulfat	196		10	63,9	21,2	9,7	16	112	0,2
6	Mg-Sulfat	71		9	59,2	20,4	9,1	3	108	0,06
7	Mg-Sulfat	132		9,5	60	21,6	9,6	8	116	0,12
8	Mg-Sulfat	138		11	59	18,8	9,2	14	121	0,15
9	Mg-Sulfat	148		9,5	63,9	21,5	9,3	8	135	0,14
10	Mg-Sulfat	99		10,3	61,8	20,5	9,5	8	121	0,1
11	Mg-Sulfat	242		9,3	59	19,7	9,3	12	187	0,23
12	Mg-Sulfat	85		11,2	60,8	19,6	9,2	8	264	0,09
13	Mg-Sulfat	191		8,5	59,8	20,5	9,2	7	62	0,16
14	Mg-Sulfat	148		11,4	61,4	19,1	9,2	16	54	0,17
15	Mg-Sulfat	187		10,3	56,8	19,4	8,6	12	80	0,19
16	Mg-Sulfat	200		8	59,1	21,2	9,2	5	104	0,16
17	Mg-Sulfat	203		9,6	62	20,7	9,3	12	101	0,19
18	Mg-Sulfat	190		8,8	60,6	22,5	9,8	10	77	0,17
19	Mg-Sulfat	211		7,9	21,1	19,1	7,9	6	96	0,17
20	Mg-Sulfat	180		10,7	57,3	19,6	9	14	79	0,19
21	Mg-Sulfat	176		8,2	21,2	20,7	9,5	10	67	0,14
22	Mg-Sulfat	178		9,5	60,3	19,3	8,8	12	74	0,17
23	Mg-Sulfat	244		9,3	56,3	21	9,3	10	105	0,23
24	Mg-Sulfat	137		8,8	18,6	21,8	9,2	7	177	0,12
25	Mg-Sulfat	134		11,6	57,4	19,2	8,8	15	77	0,16
26	Mg-Sulfat	123		7,6	21	21,5	8,8	8	73	0,09
27	Mg-Sulfat	125		7,7	62,2	23,6	9,5	2	244	0,1
28	Mg-Sulfat	174		9,6	61	20,8	9,4	10	105	0,17
29	Mg-Sulfat	172		8	54,6	23,6	9,4	3	90	0,14
30	Mg-Sulfat	56		6,6	47,6	27,7	8,1	0	262	0,04
31	Mg-Sulfat	216		11	61,6	18,2	9,1	22	68	0,24
32	Mg-Sulfat	147		7,2	48,3	26	8,8	1	193	0,11
33	Mg-Sulfat	186		12,2	60,9	16,8	8,2	26	86	0,23
34	Mg-Sulfat	182		12,3	58,2	18,2	8,8	27	112	0,22
35	Mg-Sulfat	173		8	20,9	19,8	8,5	11	108	0,14

## 12 Anhang

Pat-ID	Antikoagulans	PLT [10 <sup>9</sup> /l]	PLT2 [10 <sup>9</sup> /l]	MPV [fL]	PDW [%]	MPC [g/dl]	PCDW [g/dl]	LargePLT [10 <sup>9</sup> /l]	Clumps [n]	PCT [%]
36	Mg-Sulfat	173		8,6	59,3	23,7	9,2	6	165	0,15
37	Mg-Sulfat	187		9,1	53,8	22,3	9	5	75	0,17
38	Mg-Sulfat	146		8	22,6	20,3	9,2	9	124	0,12
39	Mg-Sulfat	187		8,3	60,5	22,5	9,3	5	105	0,15
40	Mg-Sulfat	186		8,8	58,4	20	8,5	6	138	0,16
41	Mg-Sulfat	154		8,8	20,1	19,2	8,7	14	68	0,14
42	Mg-Sulfat	196		9,6	63,3	20,1	9,6	15	125	0,19
43	Mg-Sulfat	242		9,8	58,8	19	8,7	15	320	0,24
44	Mg-Sulfat	70		7	61,5	24,1	9,4	1	601	0,05
45	Mg-Sulfat	101		7,6	22,3	23,6	9,1	3	188	0,08
46	Mg-Sulfat	146		8,8	61,2	21,7	9,5	7	57	0,13
47	Mg-Sulfat	148		11,3	61,4	18,2	9	18	84	0,17
48	Mg-Sulfat	146		9,5	61,3	20,9	9,3	9	368	0,14
49	Mg-Sulfat	85		8,7	71,6	22	10,2	4	63	0,07
50	Mg-Sulfat	196		8,4	22,9	18,9	9,1	22	87	0,16
51	Mg-Sulfat	178		7,1	55,9	23,5	8,9	1	111	0,13
52	Mg-Sulfat	208		7,9	65,6	22,9	9,7	5	156	0,16
53	Mg-Sulfat	167		7,6	53,8	24,1	9,1	2	110	0,13
54	Mg-Sulfat	59		6,5	55	24,5	9,7	0	255	0,04
55	Mg-Sulfat	188		8,8	19,8	19,7	9	15	83	0,16
56	Mg-Sulfat	212		8,7	62,3	21,7	9,8	9	75	0,19
57	Mg-Sulfat	118		7,5	52,7	24,5	9,1	2	826	0,09
58	Mg-Sulfat	173		9,2	61,9	21,9	9,7	10	121	0,16
59	Mg-Sulfat	92		8	22,3	20,7	9,1	7	302	0,07
60	Mg-Sulfat	51		8,8	55	22,7	9,7	1	252	0,05

## 12 Anhang

Tabelle 12-6: ADVIA®2120 – Vergleich von Antikoagulantien: Einzelmesswerte der klinisch unauffälligen Warmblüter (PLT2= PLT korrigiert um Verdünnungsfaktor 1,1 bei Zitrat)

Pat-ID	Antikoagulans	PLT [10 <sup>9</sup> /l]	PLT2 [10 <sup>9</sup> /l]	MPV [fL]	PDW [%]	MPC [g/dl]	PCDW [g/dl]	LargePLT [10 <sup>9</sup> /l]	Clumps [n]	PCT [%]
1	K <sub>3</sub> -EDTA	121		7,7	51,2	26,7	8,1	1	142	0,09
2	K <sub>3</sub> -EDTA	135		8	53,6	27,1	7,5	3	110	0,11
3	K <sub>3</sub> -EDTA	104		8,1	21,5	25	8,5	7	109	0,08
4	K <sub>3</sub> -EDTA	129		10,7	66,2	23,1	9,5	12	80	0,14
5	K <sub>3</sub> -EDTA	94		8,8	61,3	25,2	8,6	4	93	0,08
6	K <sub>3</sub> -EDTA	181		10,8	59,1	19,4	8,4	16	564	0,2
7	K <sub>3</sub> -EDTA	117		9,2	18,1	21,5	8,1	11	90	0,11
8	K <sub>3</sub> -EDTA	188		7,3	48,1	25,5	8,3	1	112	0,14
9	K <sub>3</sub> -EDTA	157		7,3	52,3	26,3	8,4	1	107	0,11
10	K <sub>3</sub> -EDTA	145		7,8	53,2	25,1	8,6	2	128	0,11
11	K <sub>3</sub> -EDTA	117		6,1	43,3	28,8	6,5	0	631	0,07
12	K <sub>3</sub> -EDTA	150		8,8	62,4	22,6	8,7	5	81	0,13
13	K <sub>3</sub> -EDTA	18		10,3	16,4	15,9	7,9	3	293	0,02
14	K <sub>3</sub> -EDTA	136		7,6	20,9	22,9	8,6	4	142	0,1
15	K <sub>3</sub> -EDTA	183		6,3	24,9	26,8	8,3	3	172	0,12
16	K <sub>3</sub> -EDTA	217		7,1	24,5	21,8	9,4	25	2774	0,15
17	K <sub>3</sub> -EDTA	137		9	71,4	24,2	9,4	7	184	0,12
18	K <sub>3</sub> -EDTA	149		7,9	53,9	23,2	8,4	2	63	0,12
19	K <sub>3</sub> -EDTA	121		8,8	50,7	26	8,2	3	123	0,11
20	K <sub>3</sub> -EDTA	117		7	43,8	29,2	6,4	0	114	0,08
21	K <sub>3</sub> -EDTA	153		7	22,6	25,8	7,9	2	124	0,11
22	K <sub>3</sub> -EDTA	178		8,4	56,9	23,4	9	5	128	0,15
23	K <sub>3</sub> -EDTA	158		7,9	51,1	25,2	8,2	1	100	0,13
24	K <sub>3</sub> -EDTA	175		6,9	43,6	26,5	7,7	0	52	0,12
25	K <sub>3</sub> -EDTA	105		8	53,7	26,3	7,7	2	166	0,08
26	K <sub>3</sub> -EDTA	155		9	61,5	23,4	9,1	8	76	0,14
27	K <sub>3</sub> -EDTA	175		7	69,8	26,5	8,5	3	60	0,12
28	K <sub>3</sub> -EDTA	113		7,5	43	28,7	6,6	1	88	0,08
29	K <sub>3</sub> -EDTA	117		9,9	55,5	23,7	8,7	6	96	0,12
30	K <sub>3</sub> -EDTA	49		8	21,7	22,5	9,4	3	421	0,04
31	K <sub>3</sub> -EDTA	119		8,9	19,1	23,1	8,7	10	168	0,11
32	K <sub>3</sub> -EDTA	122		7,1	21,8	23,7	9,2	13	65	0,09
33	K <sub>3</sub> -EDTA	126		7,7	51,5	24,1	8,5	2	81	0,1
34	K <sub>3</sub> -EDTA	147		7,8	46,4	25,6	7,8	1	105	0,12
35	K <sub>3</sub> -EDTA	119		9,6	68,5	22,8	9	7	70	0,11
36	K <sub>3</sub> -EDTA	153		9	60,4	24	9	7	97	0,14
37	K <sub>3</sub> -EDTA	112		8,3	58,9	24,9	8,5	3	73	0,09
38	K <sub>3</sub> -EDTA	124		8,5	20,9	22	9,3	12	144	0,11
39	K <sub>3</sub> -EDTA	163		7,1	22,1	24,2	8,6	3	157	0,12
40	K <sub>3</sub> -EDTA	136		9,3	61	24,7	9,2	7	195	0,13
41	K <sub>3</sub> -EDTA	176		5,8	24,9	29	6,7	0	98	0,1
42	K <sub>3</sub> -EDTA	124		8,7	52,9	24,8	7,9	2	87	0,11
43	K <sub>3</sub> -EDTA	139		8,8	19,5	22,4	9,1	11	170	0,12
44	K <sub>3</sub> -EDTA	176		7,4	49,7	26,3	8	1	68	0,13
45	K <sub>3</sub> -EDTA	162		8	55,6	25,7	8,8	2	112	0,13
46	K <sub>3</sub> -EDTA	165		8	20	21,5	8,8	13	103	0,13
47	K <sub>3</sub> -EDTA	171		9,3	63,6	23,1	8,8	9	111	0,16
48	K <sub>3</sub> -EDTA	135		10,5	67,5	21,2	9,3	10	80	0,14
49	K <sub>3</sub> -EDTA	154		7,8	56,7	26,1	8,5	3	159	0,12
50	K <sub>3</sub> -EDTA	101		6,9	40,9	28,6	6,2	0	596	0,07

## 12 Anhang

Pat-ID	Antikoagulans	PLT [10 <sup>9</sup> /l]	PLT2 [10 <sup>9</sup> /l]	MPV [fL]	PDW [%]	MPC [g/dl]	PCDW [g/dl]	LargePLT [10 <sup>9</sup> /l]	Clumps [n]	PCT [%]
51	K <sub>3</sub> -EDTA	110		9,2	67,5	22,5	9	5	113	0,1
52	K <sub>3</sub> -EDTA	183		8,1	51,6	27	7,7	3	250	0,15
53	K <sub>3</sub> -EDTA	160		7,3	51,7	26,7	8,1	1	147	0,12
54	K <sub>3</sub> -EDTA	156		7,6	22,9	22,2	9,3	9	73	0,12
55	K <sub>3</sub> -EDTA	74		9,2	20,6	22,5	9	7	118	0,07
56	K <sub>3</sub> -EDTA	131		8,9	60,4	24	8,6	4	81	0,12
57	K <sub>3</sub> -EDTA	155		9,5	60,5	21,2	9,2	8	53	0,15
58	K <sub>3</sub> -EDTA	170		8,4	58,6	24,4	8,8	5	123	0,14
59	K <sub>3</sub> -EDTA	130		6,1	44,2	30,1	6,8	0	149	0,08
60	K <sub>3</sub> -EDTA	116		8,4	51,7	23,3	8,8	2	117	0,1
1	Zitrat	106	117	10,8	60	21,1	8,9	8	71	0,11
2	Zitrat	114	125	10,5	63,5	22,3	10,1	9	225	0,12
3	Zitrat	85	94	11,7	15,4	18,6	8,8	17	272	0,1
4	Zitrat	92	101	10,9	17,4	17,7	8,3	18	47	0,1
5	Zitrat	93	102	9,8	59,4	23	9	6	81	0,09
6	Zitrat	173	190	9,6	19,6	18,6	8,9	20	127	0,17
7	Zitrat	116	128	12	58,5	20,5	8,6	12	140	0,14
8	Zitrat	163	179	9,7	61,7	20,9	9,1	9	116	0,16
9	Zitrat	148	163	8,4	20,2	19,8	8,7	11	133	0,12
10	Zitrat	109	120	10,1	55,7	19,6	8,9	6	159	0,11
11	Zitrat	144	158	7,7	21,1	21,4	8,3	3	78	0,11
12	Zitrat	128	141	10,8	58,9	19,1	8,7	12	99	0,14
13	Zitrat	123	135	10,7	62,7	19,5	9,2	10	81	0,13
14	Zitrat	119	131	11,4	61,2	19,4	8,8	12	184	0,14
15	Zitrat	72	79	6,1	25,4	27,7	8,2	0	1018	0,04
16	Zitrat	184	202	10,5	60,8	20,3	9,3	14	66	0,19
17	Zitrat	119	131	11,4	56,9	19,1	8,7	10	75	0,14
18	Zitrat	128	141	9,3	53,8	20,6	8,4	4	73	0,12
19	Zitrat	120	132	9,9	61	24,2	9	6	101	0,12
20	Zitrat	108	119	9,1	54,7	23,4	8,5	2	64	0,1
21	Zitrat	119	131	10,7	57,9	20,3	8,8	10	100	0,13
22	Zitrat	147	162	9	18,5	18,6	8,1	11	136	0,13
23	Zitrat	138	152	10,2	53,5	21,1	8,8	6	103	0,14
24	Zitrat	153	168	8,3	19,5	21	7,9	5	64	0,13
25	Zitrat	91	100	8,4	20,2	22	9,2	8	74	0,08
26	Zitrat	138	152	10,2	60,6	20,9	9,2	10	97	0,14
27	Zitrat	163	179	9	55,2	20	8,5	5	77	0,15
28	Zitrat	101	111	9,1	47,6	24,9	8,1	2	88	0,09
29	Zitrat	113	124	9,2	19,3	21	9,4	12	103	0,1
30	Zitrat	118	130	11,1	57,1	20,7	8,6	10	51	0,13
31	Zitrat	88	97	9,8	17,1	19,3	8,8	17	160	0,09
32	Zitrat	120	132	8,9	18,9	19,8	8,4	10	58	0,11
33	Zitrat	124	136	10,4	61,6	20,3	9,2	9	114	0,13
34	Zitrat	139	153	9,8	17,7	18,4	7,8	14	37	0,14
35	Zitrat	108	119	10	18,6	18,3	8,5	17	59	0,11
36	Zitrat	105	116	8,8	19,8	20,1	9	11	88	0,09
37	Zitrat	89	98	7,9	20,8	21,8	9,1	5	73	0,07
38	Zitrat	113	124	9,6	17,5	19,6	8,5	16	92	0,11
39	Zitrat	133	146	7,9	21,1	21,9	8,5	5	99	0,1
40	Zitrat	110	121	8,1	21,5	22,3	9,6	10	107	0,09
41	Zitrat	150	165	8,2	19,7	20,6	8,7	9	82	0,12
42	Zitrat	98	108	9	18,1	20,8	8,6	11	102	0,09
43	Zitrat	135	149	12,3	60,1	20,3	9	17	135	0,17

## 12 Anhang

Pat-ID	Antikoagulans	PLT [10 <sup>9</sup> /l]	PLT2 [10 <sup>9</sup> /l]	MPV [fL]	PDW [%]	MPC [g/dl]	PCDW [g/dl]	LargePLT [10 <sup>9</sup> /l]	Clumps [n]	PCT [%]
44	Zitrat	166	183	10,5	57,8	20,3	8,9	12	85	0,17
45	Zitrat	143	157	10,1	56,1	21,4	8,9	8	50	0,14
46	Zitrat	137	151	9	59,6	22,6	9,1	5	122	0,12
47	Zitrat	111	122	11	57	19,2	8,5	9	76	0,12
48	Zitrat	126	139	11,3	63,6	19,7	9,5	13	93	0,14
49	Zitrat	129	142	9,1	59,6	23,2	9,2	6	67	0,12
50	Zitrat	123	135	8,4	46,1	24	7,8	1	65	0,1
51	Zitrat	104	114	9,1	19	19	8,4	8	93	0,09
52	Zitrat	161	177	9,4	18,2	21	8,7	13	121	0,15
53	Zitrat	147	162	9,6	58,8	21,8	9,1	7	175	0,14
54	Zitrat	119	131	9,1	52	22,3	8,7	4	105	0,11
55	Zitrat	98	108	10,4	16,4	17,6	7,9	18	108	0,1
56	Zitrat	95	105	8,2	20,1	22,6	8,8	5	58	0,08
57	Zitrat	129	142	12,2	56,6	16,9	7,8	18	43	0,16
58	Zitrat	143	157	8,1	52,2	24,9	9,1	2	183	0,12
59	Zitrat	111	122	8,8	58,4	22,5	9,2	3	205	0,1
60	Zitrat	93	102	9	56,1	21,5	8,2	2	203	0,08

## 12 Anhang

Tabelle 12-7: ADVIA® 2120: Einzelwerte der vom Gerät ausgegebene Variablen PDW und MPV der klinisch unauffälligen Kleinpferde (2) und Warmblüter (1): sowie manuell berechnete Standardabweichung (SD) für die Antikoagulantien K<sub>3</sub>-EDTA, Zitrat und Mg-Sulfat (ID: Patient; R: Rasse)

ID	R	K <sub>3</sub> -EDTA			Zitrat			Mg-Sulfat		
		PDW	MPV	SD	PDW	MPV	SD	PDW	MPV	SD
1	2	44,9	5,5	2,47	51,2	7,2	3,69	58,7	7,2	4,23
2	2	53,6	6,6	3,54	55	8,1	4,46	22	7,6	1,67
3	2	63,2	10,9	6,89	18	9,6	1,73	20,3	9,3	1,89
4	2	63,1	9,8	6,18	60,8	8,2	4,99	23,1	8,1	1,87
5	2	67,3	9,9	6,66	19,9	8,5	1,69	63,9	10	6,39
6	2	55,5	7,1	3,94	58,4	9,2	5,37	59,2	9	5,33
7	2	64,2	8,5	5,46	24,2	6,8	1,65	60	9,5	5,7
8	2	50,9	8,8	4,48	54	11,4	6,16	63,9	11	7,03
9	2	62,9	6,8	4,28	58,8	7,5	4,41	59	9,5	5,61
10	2	25,3	6,1	1,54	56,2	8,7	4,89	61,8	10,3	6,37
11	2	58,6	6,9	4,04	56,8	8,7	4,94	59	9,3	5,49
12	2	67,3	10,3	6,93	18,6	9	1,67	60,8	11,2	6,81
13	2	66,9	8,6	5,75	58,4	8,1	4,73	59,8	8,5	5,08
14	2	59,4	8,3	4,93	21,1	8,3	1,75	61,4	11,4	7
15	2	55	8,2	4,51	52	8,6	4,47	56,8	10,3	5,85
16	2	54,4	6,3	3,43	54,6	7	3,82	59,1	8	4,73
17	2	55,7	6,7	3,73	59,2	8,8	5,21	62	9,6	5,95
18	2	62,8	7,5	4,71	58,2	9,4	5,47	60,6	8,8	5,33
19	2	24,5	6,6	1,62	52,3	7,8	4,08	21,1	7,9	1,67
20	2	58,4	8,9	5,2	56,3	9,2	5,18	57,3	10,7	6,13
21	2	64,1	9,4	6,03	59,4	8,8	5,23	21,2	8,2	1,74
22	2	24,1	6,7	1,61	60,4	8,7	5,25	60,3	9,5	5,73
23	2	54	7,3	3,94	52,4	8,2	4,3	56,3	9,3	5,24
24	2	23,9	6,4	1,53	50,5	9,1	4,6	18,6	8,8	1,64
25	2	20,7	8,2	1,7	58,2	10,4	6,05	57,4	11,6	6,66
26	2	25,8	6,6	1,7	52	8,7	4,52	62,2	7,6	4,73
27	2	64,3	6,1	3,92	57,3	8,1	4,64	61	7,7	4,7
28	2	24,8	7,3	1,81	46,9	8,8	4,13	54,6	9,6	5,24
29	2	65,7	6,4	4,2	58,3	6,7	3,91	47,6	8	3,81
30	2	68,4	8,4	5,75	62,7	7,5	4,7	61,6	6,6	4,07
31	2	53,5	8,8	4,71	50,9	8,7	4,43	48,3	11	5,31
32	2	57,9	6,9	4	48,4	7,8	3,78	60,9	7,2	4,38
33	2	63,3	7,4	4,68	58	6,5	3,77	58,2	12,2	7,1
34	2	62,6	9,4	5,88	55	10,8	5,94	20,9	12,3	2,57
35	2	45,6	8	3,65	53,2	9,3	4,95	59,3	8	4,74
36	2	26,3	6,3	1,66	51,2	7,9	4,04	53,8	8,6	4,63
37	2	25	5,6	1,4	58,6	7,5	4,4	22,6	9,1	2,06
38	2	49,7	6,9	3,43	51,9	9,5	4,93	60,5	8	4,84
39	2	57,1	6,5	3,71	54,4	7,6	4,13	58,4	8,3	4,85
40	2	49,7	7,3	3,63	55,6	7,9	4,39	20,1	8,8	1,77
41	2	22,6	6,9	1,56	51,8	7,9	4,09	21	8,8	1,85
42	2	57,5	6,7	3,85	59,8	8,6	5,14	63,3	9,6	6,08
1	1	50,6	8,5	4,3	54,9	10,2	5,6			
2	1	22,9	7,6	1,74	52	9,1	4,73			
3	1	43,8	7	3,07	54,7	9,1	4,98			
4	1	24,5	7,1	1,74	60,8	10,5	6,38			
5	1	40,9	6,9	2,82	46,1	8,4	3,87			
6	1	24,9	5,8	1,44	19,7	8,2	1,62			
7	1	43,6	6,9	3,01	19,5	8,3	1,62			
8	1	43,3	6,1	2,64	21,1	7,7	1,62			
9	1	51,7	8,4	4,34	56,1	9	5,05			
10	1	51,2	7,7	3,94	60	10,8	6,48			
11	1	53,7	8	4,3	20,2	8,4	1,7			
12	1	21,8	7,1	1,55	18,9	8,9	1,68			
13	1	64,9	7,7	5	84,7	10,5	8,89			
14	1	21,7	8	1,74	57,1	11,1	6,34			
15	1	61,5	9	5,54	60,6	10,2	6,18			
16	1	67,5	10,5	7,09	63,6	11,3	7,19			
17	1	51,7	7,3	3,77	58,8	9,6	5,64			
18	1	52,3	7,3	3,82	20,2	8,4	1,7			
19	1	55,6	8	4,45	56,1	10,1	5,67			
20	1	67,5	9,2	6,21	19	9,1	1,73			
21	1	22,6	7	1,58	57,9	10,7	6,2			
22	1	53,2	7,8	4,15	55,7	10,1	5,63			
23	1	71,4	9	6,43	56,9	11,4	6,49			
24	1	62,4	8,8	5,49	58,9	10,8	6,36			
25	1	49,7	7,4	3,68	57,8	10,5	6,07			
26	1	48	7,3	3,5	54,7	8,4	4,59			
27	1	56,7	7,8	4,42	59,6	9,1	5,42			
28	1	51,5	7,7	3,97	61,6	10,4	6,41			
29	1	48,1	7,3	3,51	61,7	9,7	5,98			
30	1	53,6	8	4,29	63,5	10,5	6,67			
31	1	47,3	6,4	3,03	57	7,4	4,22			
32	1	51,1	7,9	4,04	53,5	10,2	5,46			
33	1	55,6	8,5	4,73	53,1	9,7	5,15			
34	1	55,1	8,3	4,57	53,2	8,8	4,68			
35	1	56,9	8,4	4,78	18,5	9	1,67			
36	1	55,5	9,9	5,49	19,3	9,2	1,78			
37	1	43	7,5	3,23	47,6	9,1	4,33			
38	1	21,5	8,1	1,74	15,4	11,7	1,8			
39	1	19,5	8,8	1,72	60,1	12,3	7,39			
40	1	20,9	7,6	1,59	61,2	11,4	6,98			
41	1	19,1	8,9	1,7	17,1	9,8	1,68			
42	1	20	8	1,6	59,6	9	5,36			

## 12 Anhang

		K <sub>3</sub> -EDTA			Zitrat			Mg-Sulfat		
43	2	53,6	6,7	3,59	58,4	8,7	5,08	58,8	9,8	5,76
44	2	57,2	7,6	4,35	53,2	7,5	3,99	61,5	7	4,31
45	2	56,1	7,5	4,21	58,8	9,1	5,35	22,3	7,6	1,69
46	2	51,5	6,7	3,45	57	8,9	5,07	61,2	8,8	5,39
47	2	58,4	8,3	4,85	63,1	8,9	5,62	61,4	11,3	6,94
48	2	63,1	8,4	5,3	61,1	8,8	5,38	61,3	9,5	5,82
49	2	62,1	8	4,97	56,1	7,9	4,43	71,6	8,7	6,23
50	2	59,5	9,2	5,47	58,6	9,7	5,68	22,9	8,4	1,92
51	2	51	5,9	3,01	50,7	6,3	3,19	55,9	7,1	3,97
52	2	29,2	5,1	1,49	52,1	6,5	3,39	65,6	7,9	5,18
53	2	47,5	6,2	2,95	47,4	6,7	3,18	53,8	7,6	4,09
54	2	55,2	7,4	4,08	56,9	8,8	5,01	55	6,5	3,58
55	2	57,4	8,1	4,65	56	9,3	5,21	19,8	8,8	1,74
56	2	50,5	7	3,54	53,6	7,5	4,02	62,3	8,7	5,42
57	2	58,5	7,6	4,45	53,6	7,7	4,13	52,7	7,5	3,95
58	2	49,6	6,1	3,03	52,7	7,5	3,95	61,9	9,2	5,69
59	2	66,3	9,4	6,23	22,9	7,3	1,67	22,3	8	1,78
60	2	21,4	7,8	1,67	19,9	8,5	1,69	55	8,8	4,84

		K <sub>3</sub> -EDTA			Zitrat		
43	1	22,1	7,1	1,57	21,1	7,9	1,67
44	1	63,6	9,3	5,91	57	11	6,27
45	1	60,4	9	5,44	19,8	8,8	1,74
46	1	61	9,3	5,67	21,5	8,1	1,74
47	1	16,4	10,3	1,69	62,7	10,7	6,71
48	1	58,6	8,4	4,92	52,2	8,1	4,23
49	1	52,1	7,7	4,01	52,3	8	4,18
50	1	61,3	8,8	5,39	59,4	9,8	5,82
51	1	59,1	10,8	6,38	19,6	9,6	1,88
52	1	20,9	8,5	1,78	17,5	9,6	1,68
53	1	60,4	8,9	5,38	20,1	8,2	1,65
54	1	52,5	7,1	3,73	54	9,2	4,97
55	1	44,2	6,1	2,7	58,4	8,8	5,14
56	1	66,2	10,7	7,08	17,4	10,9	1,9
57	1	56,7	7,5	4,25	24	7,2	1,73
58	1	44,5	6,7	2,98	69,5	8,6	5,98
59	1	51,1	7,7	3,93	57,4	7,5	4,31
60	1	68,5	9,6	6,58	18,6	10	1,86

## 12 Anhang

Tabelle 12-8: Multiplate® Analyser – Rassenvergleich: Einzelmesswerte der klinisch unauffälligen Kleinpferde und Warmblüter (s. 3.1.1.2, S. 39)

Pat-ID	COLtest [U]		ADPtest [U]		ADPtestHS [U]		ASPItest [U]		Spontanaggregation [U]	
	Warm- blut	Klein- pferd	Warm- blut	Klein- pferd	Warm- blut	Klein- pferd	Warm- blut	Klein- pferd	Warm- blut	Klein- pferd
1	281	274	202	280	150	238	119	160	20	157
2	227	116	261	159	256	173	293	95	30	83
3	435	129	176	59	106	33	236	15	48	30
4	204	146	109	27	77	47	174	6	101	15
5	297	312	225	277	114	240	204	41	6	73
6	311	61	288	70	204	33	129	9	10	8
7	355	215	115	115	68	73	269	12	10	24
8	234	44	205	16	143	13	152	14	30	24
9	344	338	155	270	64	165	108		4	10
10	362	320	226	265	121	194	230	109	7	82
11	299	301	188	171	90	89	110	249	91	14
12	351	237	231	90	156	76	192	16	75	7
13	273	231	163	94	117	75	198	7	19	0
14	250	250	135	155	82	124	208	94	0	9
15	316	331	260	136	138	112	245	8	22	0
16	152	290	116	265	38	181	180	87	57	7
17	369	318	199	125	124	63	180	31	30	0
18	322	231	422	90	287	72	133	20	47	0
19	323	118	255	56	110	42	301	9	0	3
20	333	224	115	76	61	59	64	42	0	5
21	299	264	206	36	131	26	115	2	78	0
22	271	345	171	70	89	45	196	12	89	7
23	255	240	114	90	72	73	222	9	0	19
24	240	279	105	140	98	103	25	9	23	0
25	370	231	405	103	388	101	125	78	62	9
26	171	183	272	29	246	31	182	5	230	0
27	310	201	239	112	240	79	181	176	58	0
28	184	292	73	91	46	63	57	13	0	0
29	364	212	105	151	69	77	173	176	3	
30	349	260	142	58	97	60	222	12	2	0
31	188	152	154	45	152	35	91	157	98	0
32	341	309	229	78	175	50	188	204	9	1
33	315	388	75	111	77	51	175	6	4	6
34	287	249	168	113	124	91	211	17	11	2
35	400	294	173	103	156	80	293	7	6	0
36	440	214	167	95	134	69	288	34	24	4
37	358	247	126	124	113	93	177	51	11	14
38	332	222	134	195	109	187	173	145	4	100
39	316	265	217	40	161	31	158		37	4
40	132	321	178	287	197	283	172	259	135	141
41	357	123	213	94	280	86	285	35	107	0
42	279	293	232	97	264	92	216	20	116	0
43	379	208	302	235	288	198	322	168	42	192
44	137	360	113	286	113	329	104	251	2	376
45	171	357	126	367	116	319	125	183	8	155
46	228	255	289	169	261	114	194	3	219	7
47	321	256	299	327	284	340	234	186	112	252
48	220	305	201	296	192	144	134	119	185	31

## 12 Anhang

Pat-ID	COLtest		ADPtest		ADPtestHS		ASPItest		Spontanaggregation	
	[U]	[U]	[U]	[U]	[U]	[U]	[U]	[U]	[U]	[U]
49	280	308	142	255	236	274	218	269	88	278
50	300	219	241	158	145	125	197	22	115	5
51		366	399	306	312	273	279	26	95	20
52	285	314	272	305	285	310	282	276	118	76
53	177	307	146	276	142	335	160	272	0	269
54	229	401	178	367	185	354	131	38	39	13
55	386	184	186	222	165	191	182	113	6	
56	246	276	257	58	185		172	9	7	13
57	304	363	289	326	231	355	314	321	10	112
58	307	366	286	322	254	305	327	165	12	202
59	319	309	233	318	233	286	361	316	76	193
60	169	320	49	125	26	85	65	41	0	10

## 12 Anhang

Tabelle 12-9: : Multiplate® Analyzer – Methodenvergleich: Einzelmesswerte der Messungen mit und ohne magnetischem Rührstab (s. 3.1.2.4, S. 46)

Pat-ID	COLtest [U]		ADPtest [U]		ADPtestHS [U]		ASPItest [U]		Spontanaggregation [U]	
	mit Magnet	ohne Magnet	mit Magnet	ohne Magnet	mit Magnet	ohne Magnet	mit Magnet	ohne Magnet	mit Magnet	ohne Magnet
1	274	146	280	200	238	154	160	36	157	24
2	116	26	159	26	173	16	95	14	83	0
3	129	27	59	17	33	14	15	5	30	0
4	146	91	27	43	47	45	6	19	15	3
5	312	144	277	81	240	99	41	17	73	10
6	61	32	70	48	33	42	9	10	8	0
7	215	22	115	21	73	11	12	0	24	4
8	44	16	16	9	13	5	14	5	24	3
9	338	94	270	49	165	38		13	10	0
10	320	53	265	72	194	58	109	7	82	5
11	301	156	171	77	89	59	249	159	14	0
12	237	135	90	100	76	74	16	18	7	0
13	231	141	94	85	75	62	7	0	0	0
14	250	106	155	92	124	78	94	12	9	10
15	331	143	136	98	112	93	8	10	0	0
16	290	146	265	103	181	137	87	68	7	2
17	318	137	125	57	63	31	31	7	0	0
18	231	136	90	71	72	64	20	10	0	0
19	118	101	56	134	42	105	9	31	3	17
20	224	98	76	55	59	41	42	44	5	0
21	264	128	36	38	26	32	2	0	0	0
22	345	259	70	63	45	78	12	32	7	0
23	240	158	90	90	73	68	9	9	19	3
24	279	162	140	106	103	98	9	50	0	0
25	231	80	103	59	101	54	78	34	9	24
26	183	97	29	45	31	31	5	5	0	0
27	201	100	112	64	79	66	176	100	0	0
28	292	224	91		63	69	13	28	0	0
29	212	184	151	116	77	92	176	91		7
30	260	122	58	72	60	58	12	0	0	0
31	152	86	45	32	35	25	157	100	0	0
32	309	124	78	48	50	38	204	60	1	0
33	216	113	119	61	77	59	204	102	0	0
34	226	115	77	45	56	39	104	62	6	0
35	318	169	214	127	171	131	295	176	18	0
36	216	157	259	174	249	166	216	156	68	17
37	257	179	90	63	78	65	154	193	4	7
38	283	198	193	149	171	182	325	239	8	8
39	339	141	179	81	179	100	171	159	8	5
40	193	152	114	72	88	69	131	47	8	8
41	233	150	179	159	167	119	216	189	7	4
42	316	246	319	244	331	263	268	203	92	11

## 12 Anhang

---

Tabelle 12-10: ELISA sP-Selectin – Ergebnisse: Einzelmesswerte und Mittelwert des nativen Serums (SN), des Kollagen-aktivierten Serums (SA), des nativen Plasmas (PN) und des Kollagen-aktivierten Plasmas (PA) von Pferd 1 (Platte 1)

	Verdünnung	Messung 1 [ng/ml]	Messung 2 [ng/ml]	Mittelwert [ng/ml]
<b>Pferd 1 Serum nativ</b>				
1SN0	keine	0,12	0,08	0,10
1SN1	1:2	0,13	0,14	0,14
1SN2	1:4	0,08	0,05	0,06
1SN3	1:8	0,08	0,09	0,08
<b>Pferd 1 Serum Kollagen-aktiviert</b>				
1SA0	keine	0,09	0,06	0,08
1SA1	1:2	0,05	0,07	0,06
1SA2	1:4	0,05	0,20	0,13
1SA3	1:8	0,11	0,06	0,09
<b>Pferd 1 Plasma nativ</b>				
1PN0	keine	0,10	0,10	0,10
1PN1	1:2	0,09	0,07	0,08
1PN2	1:4	0,07	0,11	0,09
1PN3	1:8	0,07	0,09	0,08
<b>Pferd 1 Plasma Kollagen-aktiviert</b>				
1PA0	keine	0,07	0,07	0,07
1PA1	1:2	0,03	0,10	0,06
1PA2	1:4	0,10	0,08	0,09
1PA3	1:8	0,08	0,07	0,07

## 12 Anhang

Tabelle 12-11: ELISA sP-Selectin – Ergebnisse: Einzelmesswerte und Mittelwert des nativen Serums (SN), des Kollagen-aktivierten Serums (SA), des nativen Plasmas (PN) und des Kollagen-aktivierten Plasmas (PA) von Pferd 2 und 3 (Mikroplatte 2)

	Verdünnung	Messung 1 [ng/ml]	Messung 2 [ng/ml]	Mittelwert [ng/ml]
<b>Pferd 2 Serum nativ</b>				
2SN0	keine	0,39	0,42	0,40
2SN1	1:2	0,38	0,34	0,36
2SN2	1:4	0,38	0,38	0,38
2SN3	1:8	0,38	0,40	0,39
<b>Pferd 2 Serum Kollagen-aktiviert</b>				
2SA0	keine	0,38	0,43	0,40
2SA1	1:2	0,40	0,41	0,40
2SA2	1:4	0,41	0,42	0,41
2SA3	1:8	0,42	0,43	0,42
<b>Pferd 2 Plasma nativ</b>				
2PN0	keine	0,39	0,41	0,40
2PN1	1:2	0,35	0,38	0,36
2PN2	1:4	0,42	0,39	0,41
2PN3	1:8	0,37	0,43	0,40
<b>Pferd 2 Plasma Kollagen-aktiviert</b>				
2PA0	keine	0,39	0,40	0,40
2PA1	1:2	0,41	0,41	0,41
2PA2	1:4	0,42	0,42	0,42
2PA3	1:8	0,43	0,41	0,42
<b>Pferd 3 Serum nativ</b>				
3SN0	keine	0,45	0,44	0,44
3SN1	1:2	0,41	0,39	0,40
3SN2	1:4	0,36	0,42	0,39
3SN3	1:8	0,38	0,40	0,39
<b>Pferd 3 Serum Kollagen-aktiviert</b>				
3SA0	keine	0,39	0,36	0,38
3SA1	1:2	0,41	0,38	0,40
3SA2	1:4	0,41	0,41	0,41
3SA3	1:8	0,42	0,41	0,42
<b>Pferd 3 Plasma nativ</b>				
3PN0	keine	0,48	0,47	0,47
3PN1	1:2	0,40	0,42	0,41
3PN2	1:4	0,40	0,41	0,40
3PN3	1:8	0,42	0,42	0,42
<b>Pferd 3 Plasma Kollagen-aktiviert</b>				
3PA0	keine	0,43	0,44	0,43
3PA1	1:2	0,40	0,40	0,40
3PA2	1:4	0,41	0,40	0,41
3PA3	1:8	0,41	0,41	0,41

## 12 Anhang

Tabelle 12-12: Thrombozytopenie und Thrombozytose bei Klinikpatienten (2008 - 2015): Übersicht aller Patienten mit Thrombozytopenie und Thrombozytose

Rasse: 1=Warmblut, 2=Kleinpferd, 3=Kaltblut, 4=Vollblut, 5=Sonstige

EDTA: Thrombozyten ( $\times 10^9/l$ ) im EDTA-Blut; Zitrat: Thrombozyten im Zitratblut; n.d.=nicht durchgeführt

Kat(egorie) nur Thrombozytopenie: 1=echte Thrombozytopenie, 2=EDTA-induziert, 3=fraglich

Agg(egate): 0=keine, 1=vereinzelt, 2=zahlreich, n.d.=nicht durchgeführt

Gruppe (echte Thrombozytopenie, Thrombozytose): 1.1=Entzündung systemisch, 1.2=Entzündung lokal, 2=Neoplasie, 3=Kolik, 4=Sonstige

Outcome: 1=Entlassung, 2=Euthanasie

Rasse	Geschlecht	Alter	EDTA	Zitrat	Kat.	Agg.	Gruppe	Kurzdiagnose	Outcome
2	Stute	10	7	n.d.	3	n.d.		Ovarialkarzinom	2
4	Wallach	14	9	n.d.	1	0	1.2	Enteritis	1
2	Wallach	27	9	n.d.	1	0	4	V.a. Neoplasie	1
2	Stute	14	10	n.d.	1	0	4	COB	1
1	Stute	19	12	8	1	0	2	Hämangiosarkom	2
2	Stute	19	13	9	1	0	4	unklar	1
1	Stute	12	15	13	1	2	2	V.a. Thymom	2
2	Stute	0	15	n.d.	3	n.d.		Bronchopneumonie	1
1	Stute	10	16	n.d.	1	1	1.2	Chondritis Aryknorpel	1
5	Wallach	2	17	n.d.	1	0	1.2	Enteritis	1
4	Stute	19	18	n.d.	1	1	4	Uteruskarzinom	2
2	Stute	3	24	170	2	2		klinisch unauffällig	1
1	Wallach	25	24	n.d.	1	n.d.	2	metastasierendes Karzinom	2
1	Wallach	12	24	38	1	n.d.	1.1	eitrige Hepatitis	2
1	Wallach	20	25	96	2	n.d.		Gastritis	1
5	Stute	20	25	n.d.	3	2		Colonsarkom	2
2	Stute	14	27	n.d.	1	0	3	Obstipation Colon asc.	1
1	Wallach	16	28	136	2	1		Kolik unklarer Genese	1
1	Wallach	9	29	n.d.	1	1	3	Obstipation Colon asc.	1
1	Wallach	15	29	n.d.	1	0	1.1	V.a. Septikämie	2
5	Stute	24	30	n.d.	1	1	2	Leiomyom Magen	2
1	Stute	16	30	n.d.	3	n.d.		EMPF	2
1	Wallach	5	31	n.d.	3	2		klinisch unauffällig	1
1	Stute	13	31	n.d.	1	0	2	metastasierendes Leiomyosarkom	2
1	Stute	25	33	n.d.	1	1	1.2	Peritonitis	2
2	Wallach	13	33	25	1	n.d.	1.2	Fieber unklarer Genese	1
2	Wallach	20	37	n.d.	1	0	2	malignes Lymphom	2
5	Stute	5	40	n.d.	3	2		Enteritis	1
1	Wallach	22	40	n.d.	3	n.d.		Zustand nach Kolik	1
2	Stute	6	42	n.d.	1	0	1.2	Enteritis	1
1	Wallach	11	42	n.d.	3	n.d.		Anaplasiose	1
3	Stute	13	43	n.d.	1	0	1.1	Anaplasiose	1
2	Stute	1	44	n.d.	3	n.d.		Zustand nach Kolik	1
2	Wallach	23	44	41	1	n.d.	2	malignes Lymphom	2
1	Stute	23	44	n.d.	3	n.d.		klinisch unauffällig	1
1	Stute	0	48	n.d.	1	0	1.1	Polyarthrit	2
2	Wallach	15	48	58	1	1	4	COB	1
2	Wallach	8	49	47	1	n.d.	1.2	Fieber unklarer Genese	1
1	Wallach	6	49	99	2	0		Caecumobstipation	1

## 12 Anhang

Rasse	Geschlecht	Alter	EDT A	Zitrat	Kat.	Agg.	Gruppe	Kurzdiagnose	Outcome
1	Wallach	16	50	n.d.	1	1	4	COB	1
2	Stute	21	51	53	1	n.d.	1.1	Nephritis, Pleuritis, Meningitis	2
2	Stute	23	51	n.d.	1	1	3	Obstipation Colon asc.	1
2	Hengst	13	53	n.d.	1	0	2	malignes Lymphom	1
1	Wallach	17	54	n.d.	3	n.d.		Fieber unklarer Genese	1
1	Wallach	21	56	n.d.	1	0	1.2	Phlegmone Gliedmaße	1
1	Wallach	12	56	58	1	n.d.	4	ZNS-Störung unklarer Genese	1
4	Stute	21	56	n.d.	1	1	1.1	EMPF	1
1	Wallach	17	56	n.d.	1	0	1.1	Colitis	2
1	Stute	10	57	102	2	n.d.		Colitis	2
5	Wallach	5	57	n.d.	3	n.d.		Fieber unklarer Genese	1
2	Wallach	19	59	n.d.	3	n.d.		Obstipation Colon asc.	1
1	Stute	13	62	n.d.	1	0	4	V.a. Trauma	1
1	Stute	18	63	n.d.	3	n.d.		Niereninsuffizienz	1
3	Wallach	7	63	n.d.	1	0	1.1	Enteritis	2
1	Stute	13	63	n.d.	3	n.d.		Obstipation Colon asc.	1
1	Wallach	15	64	n.d.	3	n.d.		Morbus maculosus	1
2	Stute	3	65	n.d.	3	n.d.		Phlegmone	1
1	Wallach	18	66	64	1	0	2	metastas. Colonkarzinom	2
4	Stute	17	67	75	1	n.d.	3	Colonmeteorismus	1
1	Wallach	2	68	n.d.	1	0	1.1	Pleuritis, Pneumonie	2
3	Stute	17	69	n.d.	3	n.d.		klinisch unauffällig	1
1	Stute	11	71	n.d.	1	0	1.1	V.a. akuten Virusinfekt	1
5	Wallach	6	71	n.d.	3	n.d.		Ataxie unklarer Genese	1
1	Stute	13	72	n.d.	3	n.d.		Exzitation unklarer Genese	1
1	Wallach	17	72	n.d.	3	2		Caecummeteorismus	1
1	Wallach	11	73	n.d.	1	0	3	Caecumobstipation	1
1	Wallach	11	74	n.d.	1	0	3	Colonverlagerung	1
1	Stute	12	74	n.d.	3	n.d.		Obstipation Colon asc.	1
1	Stute	17	76	n.d.	1	n.d.	2	Equines Sarkoid	2
1	Stute	8	76	n.d.	1	0	1.2	V.a. akuten Virusinfekt	1
2	Stute	25	77	n.d.	1	0	4	Niereninsuffizienz	2
1	Wallach	6	77	n.d.	1	0	3	Obstipation Colon asc.	1
1	Wallach	18	78	n.d.	1	0	4	Vorhofflimmern	1
2	Stute	9	80	n.d.	3	2		Zustand nach Kolik	1
1	Wallach	11	81	69	1	0	1.1	Fieber unklarer Genese	1
1	Stute	19	81	n.d.	3	2		Zustand nach Kolik	1
1	Wallach	21	82	n.d.	3	n.d.		Obstipation Colon asc.	1
1	Stute	3	82	n.d.	1	0	2	malignes Lymphom	2
3	Wallach	13	83	155	2	n.d.		Vorhofflimmern	1
2	Wallach	16	83	n.d.	3	n.d.		Rhabdomyolyse	1
1	Stute	18	84	n.d.	1	0	1.1	V.a. akuten Virusinfekt	1
3	Stute	19	84	n.d.	3	n.d.		Hämaskos unklarer Genese	1
1	Wallach	14	84	n.d.	1	0	3	Colonverlagerung	2
1	Wallach	10	84	n.d.	1	0	1.2	akuter bakterieller Infekt	1
2	Hengst	7	84	55	1	n.d.	1.1	Phlegmone Backe	1
5	Wallach	8	84	n.d.	1	0	1.1	V.a. akuten Virusinfekt	1
1	Stute	14	84	n.d.	3	n.d.		COB	1
1	Wallach	23	85	n.d.	1	0	4	COB	1
1	Wallach	17	85	n.d.	1	0	4	Niereninsuffizienz	1
1	Stute	4	85	n.d.	3	2		Obstipation Colon asc.	1

## 12 Anhang

Rasse	Geschlecht	Alter	EDT A	Zitrat	Kat.	Agg.	Gruppe	Kurzdiagnose	Outcome
2	Stute	21	86	n.d.	1	0	4	V.a. Neoplasie	2
1	Wallach	13	86	57	1	n.d.	1.1	Morbus Maculosus	1
1	Wallach	14	86	n.d.	3	n.d.		malignes Lymphom	1
1	Stute	19	87	n.d.	3	2		Colonverlagerung	1
5	Stute	11	87	n.d.	1	0	3	Magenruptur	2
1	Wallach	13	87	n.d.	1	0	4	Enteritis	1
2	Stute	13	87	n.d.	3	1		klinisch unauffällig	1
5	Wallach	13	89	n.d.	1	0	3	Colonverlagerung	1
1	Wallach	8	89	n.d.	3	n.d.		Gastritis	1
1	Stute	18	89	n.d.	3	n.d.		Kolik unklarer Genese	1
1	Wallach	5	89	n.d.	3	0		Gastritis	1
4	Hengst	3	272	n.d.		n.d.	4	Herzklappeninsuffizienzen	1
2	Wallach	26	272	n.d.		n.d.	2	PPID	1
3	Wallach	1	273	n.d.		n.d.	1.1	Enteritis	1
2	Wallach	19	273	n.d.		n.d.	2	malignes Lymphom	2
2	Stute	21	274	n.d.		n.d.	4	COB	1
5	Wallach	7	275	n.d.		n.d.	4	Fieber unklarer Genese	1
3	Wallach	6	275	n.d.		n.d.	4	ZNS-Störung unklarer Genese	2
2	Stute	14	276	n.d.		n.d.	3	Colonverlagerung	1
2	Stute	0,1	277	n.d.		n.d.	3	Colonmeteorismus	1
2	Wallach	22	277	n.d.		n.d.	3	Obstipation Colon asc.	1
4	Wallach	10	277	n.d.		n.d.	1.2	Luftsackempyem	1
1	Wallach	12	277	n.d.		n.d.	1.1	eitrige Hepatitis	2
5	Wallach	1	278	n.d.		n.d.	1.2	Gingivitis, Glossitis	1
3	Stute	1	278	n.d.		n.d.	4	Herzklappeninsuffizienzen	1
1	Stute	17	278	n.d.		n.d.	4	Hepatopathie	1
2	Wallach	24	279	n.d.		n.d.	1.1	Enteritis	1
2	Wallach	15	279	n.d.		n.d.	4	Niereninsuffizienz	1
5	Wallach	0,1	279	n.d.		n.d.	4	Fieber unklarer Genese	1
2	Stute	5	280	n.d.		n.d.	3	Colonverlagerung	1
2	Wallach	13	281	n.d.		n.d.	3	Zustand nach Kolik	1
3	Stute	4	281	n.d.		n.d.	1.2	Laryngitis, Pharyngitis	1
4	Stute	14	282	n.d.		n.d.	2	Granularzelltumor Lunge	2
5	Hengst	0,4	282	n.d.		n.d.	3	Volvulus mesenterialis	2
2	Wallach	22	283	n.d.		n.d.	4	klinisch unauffällig	1
4	Hengst	0,1	283	n.d.		n.d.	1.1	Bronchopneumonie	1
4	Hengst	0,1	284	n.d.		n.d.	1.1	Bronchopneumonie	2
1	Stute	24	284	n.d.		n.d.	1.1	Typhlocolitis	2
1	Stute	0,1	286	n.d.		n.d.	4	Missbildung der Wirbelsäule	2
2	Stute	13	286	n.d.		n.d.	3	Obstipation Colon asc.	1
2	Stute	11	287	n.d.		n.d.	4	Hepatopathie	2
2	Stute	5	288	n.d.		n.d.	1.1	Enteritis	1
1	Stute	0,1	288	n.d.		n.d.	1.1	Bronchopneumonie	1
1	Hengst	0,6	289	n.d.		n.d.	1.1	Peritonitis	2
3	Wallach	1	289	n.d.		n.d.	1.1	Enteritis	1
3	Stute	12	291	n.d.		n.d.	1.2	Botryomykose	2
2	Stute	2	291	n.d.		n.d.	4	Pemphigus foliaceus	1
2	Hengst	0,1	292	n.d.		n.d.	4	Fieber unklarer Genese	1
2	Wallach	7	292	n.d.		n.d.	4	ZNS-Störung unklarer Genese	1
3	Stute	3	292	n.d.		n.d.	4	klinisch unauffällig	1

## 12 Anhang

Rasse	Geschlecht	Alter	EDT A	Zitrat	Kat.	Agg.	Gruppe	Kurzdiagnose	Outcome
1	Wallach	6	293	n.d.		n.d.	1.2	Cholangitis	1
2	Wallach	19	293	n.d.		n.d.	4	unklar	1
2	Stute	3	293	n.d.		n.d.	1.1	Myositis	1
2	Wallach	19	297	n.d.		n.d.	1.2	Phlegmone Präputium	1
5	Wallach	15	297	n.d.		n.d.	2	Plattenepithelkarzinom Magens	2
2	Hengst	23	297	n.d.		n.d.	2	Plattenepithelkarzinom Magens	2
1	Stute	0,1	298	n.d.		n.d.	1.1	Enteritis	1
2	Wallach	28	300	n.d.		n.d.	3	Obstipation Colon desc.	2
2	Stute	10	303	n.d.		n.d.	2	Ovariakarzinom	2
1	Stute	0,1	303	n.d.		n.d.	3	Zustand nach Kolik	1
2	Stute	10	304	n.d.		n.d.	4	V.a. akuten Virusinfekt	1
5	Wallach	8	304	n.d.		n.d.	1.1	Fieber unklarer Genese	2
1	Wallach	5	305	n.d.		n.d.	1.1	Nephritis	2
2	Wallach	23	306	n.d.		n.d.	1.1	Fieber unklarer Genese	2
2	Stute	12	307	n.d.		n.d.	4	Luftsackmykose	1
2	Stute	11	307	n.d.		n.d.	2	malignes Lymphom	2
2	Stute	0,8	307	n.d.		n.d.	3	Kolik unklarer Genese	1
2	Stute	4	308	n.d.		n.d.	4	hypokalzämische Tetanie	1
2	Wallach	14	308	n.d.		n.d.	1.1	Colitis	1
5	Stute	0,1	309	n.d.		n.d.	1.2	Dermatitis, Omphalitis	1
2	Stute	1	309	n.d.		n.d.	1.1	Enteritis	1
1	Hengst	0,1	311	n.d.		n.d.	1.2	Meningitis	2
5	Wallach	21	312	n.d.		n.d.	1.1	Colitis	1
2	Stute	29	314	n.d.		n.d.	2	malignes Lymphom	1
5	Stute	1	315	n.d.		n.d.	4	klinisch unauffällig	1
2	Wallach	18	316	n.d.		n.d.	2	malignes Thymom	2
2	Stute	16	316	n.d.		n.d.	1.1	Enteritis	1
3	Stute	4	317	n.d.		n.d.	1.2	Bronchitis	1
1	Stute	3	318	n.d.		n.d.	4	Abmagerung unklarer Genese	1
1	Wallach	35	318	n.d.		n.d.	3	Obstipation Colon asc.	1
1	Hengst	1	321	n.d.		n.d.	4	Abmagerung unklarer Genese	1
2	Stute	9	321	n.d.		n.d.	1.1	Pleuropneumonie	2
2	Stute	0,1	323	n.d.		n.d.	1.1	Enteritis	2
3	Wallach	3	324	n.d.		n.d.	4	Gastritis	1
5	Wallach	3	324	n.d.		n.d.	4	Luftsackmykose	1
2	Wallach	0,2	326	n.d.		n.d.	3	Obstipation Colon desc.	1
4	Stute	0,1	328	n.d.		n.d.	1.1	Enteritis	1
3	Hengst	21	328	n.d.		n.d.	4	Herzinsuffizienz	1
1	Hengst	0,7	332	n.d.		n.d.	1.1	Bronchitis	1
5	Stute	1	333	n.d.		n.d.	4	Abmagerung unklarer Genese	1
2	Stute	5	333	n.d.		n.d.	4	Hepatopathie	1
1	Hengst	0,1	335	n.d.		n.d.	1.1	Enteritis	1
1	Stute	21	336	n.d.		n.d.	2	V.a. Nebennierentumor	2
1	Hengst	0,1	337	n.d.		n.d.	1.1	Bronchopneumonie	1
1	Stute	0,9	338	n.d.		n.d.	1.1	Enteritis	1
2	Stute	19	338	n.d.		n.d.	1.1	IBD	1
2	Stute	1	339	n.d.		n.d.	1.2	intraabdominaler Abszess	1
3	Hengst	1	340	n.d.		n.d.	3	Obstipation Colon desc.	1

## 12 Anhang

Rasse	Geschlecht	Alter	EDT A	Zitrat	Kat.	Agg.	Gruppe	Kurzdiagnose	Outcome
2	Wallach	12	343	n.d.		n.d.	3	Kolik unklarer Genese	1
5	Stute	3	343	n.d.		n.d.	1.1	Bronchopneumonie	1
1	Wallach	9	346	n.d.		n.d.	1.1	Enteritis	1
5	Stute	12	347	n.d.		n.d.	4	klinisch unauffällig	1
4	Hengst	0,6	348	n.d.		n.d.	1.2	Gastritis	1
2	Stute	22	353	n.d.		n.d.	4	COB	1
4	Hengst	0,2	354	n.d.		n.d.	4	Pemphigus foliaceus	1
1	Stute	0,9	356	n.d.		n.d.	1.2	Druse	1
5	Hengst	0,9	357	n.d.		n.d.	4	V.a. akuten Virusinfekt	1
2	Hengst	0,2	361	n.d.		n.d.	1.1	Pleuritis	1
1	Stute	0,5	362	n.d.		n.d.	1.2	Druse	1
3	Stute	14	363	n.d.		n.d.	1.1	Enteritis	1
3	Hengst	2	371	n.d.		n.d.	1.1	larvale Cyathostominose	1
2	Stute	0,1	389	n.d.		n.d.	3	jejunojejunale Invagination	2
3	Wallach	0,8	400	n.d.		n.d.	1.1	Vaskulitis, Enteritis	1
2	Hengst	2	406	n.d.		n.d.	1.1	larvale Cyathostominose	1
2	Stute	23	421	n.d.		n.d.	3	Zustand nach Kolik	1
2	Stute	0,4	421	n.d.		n.d.	1.1	Bronchopneumonie	1
1	Wallach	19	423	n.d.		n.d.	4	Vorhofflimmern	2
2	Stute	0,1	447	n.d.		n.d.	1.1	Aspirationspneumonie	2
3	Stute	13	451	n.d.		n.d.	1.1	Anaplasiose	1
2	Stute	14	453	n.d.		n.d.	2	malignes Lymphom	2
1	Hengst	0,1	535	n.d.		n.d.	1.1	Pneumonie	2
2	Stute	12	575	n.d.		n.d.	1.1	Enteritis	1

## 12 Anhang

Tabelle 12-13: Thrombozytopenie und Thrombozytose bei Klinikpatienten (2008 - 2015): Thrombozytenzahlen [ $\times 10^9/l$ ] in den Diagnosegruppen bei Pferden mit Thrombozytopenie und Thrombozytose

	Entzündung	Neoplasie	nicht-entzündliche Darmerkrankung	Sonstige
<b>Thrombozytopenie (n = 60)</b>				
Anzahl	25	11	10	14
Minimum	9,000	12,00	27,00	9,000
25 % Perzentil	33,00	24,00	45,50	16,75
Median	56,00	37,00	73,50	59,00
75 % Perzentil	78,50	66,00	84,75	85,00
Maximum	86,00	82,00	89,00	87,00
<b>Thrombozytose (n = 111)</b>				
Anzahl	51	11	17	32
Minimum	273,0	272,0	276,0	272,0
25 % Perzentil	290,5	282,0	280,5	279,0
Median	314,0	303,0	303,0	293,0
75 % Perzentil	346,5	316,0	341,5	326,0
Maximum	575,0	453,0	535,0	423,0

Tabelle 12-14: Thrombozytopenie und Thrombozytose bei Klinikpatienten (2008 - 2015): Thrombozytenzahlen [ $\times 10^9/l$ ] bei Pferden mit Thrombozytopenie und Thrombozytose in Abhängigkeit vom Überleben

	Thrombozytopenie (n = 60)		Thrombozytose (n = 111)	
	Überleben	Nichtüberleben	Überleben	Nichtüberleben
Anzahl	38	22	83	28
Minimum	9,000	12,00	272,0	273,0
25 % Perzentil	32,25	27,75	286,0	284,5
Median	56,00	49,50	312,0	301,5
75 % Perzentil	81,75	76,25	340,0	319,8
Maximum	89,00	87,00	575,0	453,0

## 12 Anhang

Tabelle 12-15: Thrombozytenfunktion bei Equiden mit systemischer Entzündung (SIRS): Stammdaten der Patienten (BCS nach Carroll und Huntington [255])

Rasse: 1= Warmblut, 2= Kleinpferd

Outcome: 1=Entlassung, 2=Euthanasie

Pat-ID	Rasse	Alter (Jahre)	Geschlecht	BCS	SAA [ $\mu\text{g/ml}$ ]	Outcome	Diagnose
1	2	7	Wallach	3	298,8	1	V.a. viralen Infekt
2	2	10	Wallach	4	15,2	2	Magenruptur
3	1	7	Wallach	3	227	2	hgr. Akute diphtheroid- nekrotisierende Ileitis
4	2	17	Stute	4	1893,7	1	V.a. Enteritis
5	1	17	Wallach	3	1687,8	2	therapieresistentes Fieber unklarer Genese
6	2	17	Wallach	4	1346,4	2	mgr. akute diffuse katharralische Typhlocolitis
7	2	7	Wallach	4	2797,1	2	hgr. akute diffuse, katarralisch, fokal ulzerativ-nekrotisierende Typhlocolitis
8	1	17	Stute	4	4543	1	Infektion mit <i>Sc. equi s. equi</i> mit bds. Luftsackempyem und hgr. Pharyngitis
9	2	18	Stute	4	0,1	2	strangulierendes Lipoma pendulans mit hämorrhagischer Infarzierung C. desc.
10	1	12	Wallach	2	351	2	hgr. chronisch-aktive eitrige Hepatitis mit Fibrose
11	2	20	Wallach	2	18,9	2	T-Zell Lymphom
12	1	5	Stute	4	4600,1	1	Fieber unklarer Genese
13	1	19	Wallach	4	2222,3	2	Aspirationspneumonie
14	1	20	Wallach	3	1840,5	2	akutes alveoläres Lungenödem unklarer Genese
15	2	29	Wallach	3	137,5	2	strangulierendes Lipoma pendulans mit hämorrhagischer Infarzierung Jejunum
16	1	10	Stute	2	128,5	2	Lungenfibrose
17	2	4	Stute	3	2,5	1	Dysphagie, V.a. Borna
18	1	5	Stute	2	4189	2	mgr. akute diffuse katarrhalische Typhlocolitis
19	1	22	Stute	4	13097	1	V.a. intraabdominalen Abszess
20	1	25	Wallach	4	4,1	2	strangulierendes Lipoma pendulans mit hämorrhagischer Infarzierung Jejunum

## 12 Anhang

Tabelle 12-16: Thrombozytenfunktion bei Equiden mit systemischer Entzündung (SIRS): Thrombozytenvariablen am ADVIA® 2120 sowie Minimal- und Maximalwert, 25%-75%-Perzentil und Median bei 20 Equiden; #= PLT im Zitrat korrigiert um Verdünnungsfaktor 1,1

Pat-ID		PLT# [10 <sup>9</sup> /l]	MPV [fl]	MPC [g/dl]	PCDW [g/dl]	LargePLT [10 <sup>9</sup> /l]	Clumps [n]	PCT [%]
<b>K<sub>3</sub>-EDTA</b>								
1		128	7,5	26,9	7,8	5	41	0,1
2		116	6,2	29,3	6,7	7	26	0,14
3		112	6	*	*	2	106	0,09
4		125	6,6	26,9	8,4	3	69	0,1
5		44	10,1	23,5	9,4	8	86	0,05
6		133	11,1	21	9	5	45	0,12
7		69	6,9	28,1	7,7	1	60	0,07
8		121	6,6	27,7	7,6	0	100	0,09
9		156	6,3	27,3	7,8	4	66	0,13
10		24	7,6	23,2	10,2	2	1299	0,03
11		26	7,9	25,3	8,2	2	109	0,03
12		119	6,7	23,4	10,2	7	749	0,09
13		19	7,6	25,3	7,7	6	64	0,07
14		147	7,6	25,8	8,4	9	72	0,13
15		139	8,2	23,2	8,4	8	143	0,13
16		98	7,7	26,3	7,8	9	107	0,1
17		37	6,9	27,3	7,5	11	60	0,13
18		188	8,4	24,5	8,8	18	73	0,19
19		183	6,7	30	5,7	3	262	0,18
20		114	8	25	8,8	6	76	0,11
	Minimum	19,00	6,000	21,00	5,700	0,0	26,00	0,0300
	25% Perzentil	50,25	6,625	23,50	7,700	2,250	61,00	0,0750
	Median	117,5	7,550	25,80	8,200	5,500	74,50	0,1000
	75% Perzentil	137,5	7,975	27,30	8,800	8,000	108,5	0,1300
	Maximum	188,0	11,10	30,00	10,20	18,00	1299	0,1900
<b>Zitrat</b>								
1		124	8,7	21	8,5	10	105	0,18
2		153	9,8	21,9	9,2	2	233	0,05
3		144	6,8	23,5	8,3	5	80	0,17
4		131	8,7	21,5	8,4	5	93	0,14
5		54	10,5	17,6	8	0	180	0,04
6		136	9,3	23	8,5	7	41	0,2
7		80	8,9	24,6	8,9	5	90	0,13
8		163	6	30,5	6,5	0	106	0,12
9		176	8,3	22	8,7	4	75	0,21
10		42	8,4	20,3	8,7	0	736	0,03
11		36	8,7	19,7	9,4	3	60	0,04
12		114	9	21,6	8,9	12	74	0,17
13		76	10,6	19,2	8,8	8	57	0,15
14		145	10,2	21,2	9,2	13	124	0,21
15		136	10,4	19,3	8,7	21	151	*
16		101	11,2	20,2	8,9	11	149	0,16
17		172	8,6	20,9	9	13	68	0,24
18		189	11,1	20	9	26	142	0,25
19		252	8	25	8,2	11	153	0,25
20		114	10,2	19,9	8,3	14	49	0,19
	Minimum	36,00	6,000	17,60	6,500	0,0	41,00	0,0300
	25% Perzentil	85,25	8,450	19,93	8,325	3,250	69,50	0,1200
	Median	133,5	8,950	21,10	8,700	7,500	99,00	0,1700
	75% Perzentil	160,5	10,35	22,75	8,975	12,75	150,5	0,2100
	Maximum	252,0	11,20	30,50	9,400	26,00	736,0	0,2500

## 12 Anhang

Tabelle 12-17: Thrombozytenfunktion bei Equiden mit systemischer Entzündung (SIRS): Aggregationswerte am Multiplate® Analyser mit und ohne magnetischen Rührstab sowie Minimal- und Maximalwert, 25%-75%-Perzentil und Median bei 20 Equiden

Pat-ID	COLtest		ADPtest		ADPtestHS		ASPtest		Spontanaggregation		
	mit Magnet	ohne Magnet	mit Magnet	ohne Magnet	mit Magnet	ohne Magnet	mit Magnet	ohne Magnet	mit Magnet	ohne Magnet	
1	526	278	414	203	306	249	90	58	121	18	
2	54	39	31	59	26	48	46	70	0	1	
3	352	162	138	*	137	40	13	99	4	6	
4	217	174	252	223	230	276	9	245	3	0	
5	112	95	114	63	140	127	56	127	120	19	
6	60	58	37	59	30	57	0	10	0	1	
7	10	103	18	19	9	28	0	0	0	0	
8	482	229	239	85	242	168	21	54	28	1	
9	495	126	80	16	49	24	22	77	0	0	
10	200	88	127	107	110	70	12	13	3	0	
11	350	323	17	22	9	43	7	4	3	1	
12	387	266	386	287	376	292	171	282	214	57	
13	89	81	10	63	19	74	0	15	0	0	
14	387	237	289	257	260	260	51	234	25	45	
15	354	294	101	140	100	186	6	140	54	126	
16	443	174	326	59	333	45	76	51	86	6	
17	323	165	94	104	106	106	57	62	7	0	
18	327	299	340	340	343	360	36	260	9	*	
19	410	208	216	161	193	210	10	9	*	*	
20	144	138	35	41	32	45	80	196	1	0	
	Minimum	10,00	39,00	10,00	16,00	9,000	24,00	0,0	0,0	0,0	0,0
	25% Perzentil	120,0	97,00	35,50	59,00	30,50	45,00	7,500	13,50	0,0	0,0
	Median	338,5	169,5	120,5	85,00	123,5	90,00	21,50	66,00	4,000	1,000
	75% Perzentil	404,3	258,8	279,8	203,0	255,5	239,3	56,75	182,0	54,00	18,25
	Maximum	526,0	323,0	414,0	340,0	376,0	360,0	171,0	282,0	214,0	126,0

## 12 Anhang

Tabelle 12-18: Thrombozytenfunktion bei Equiden mit systemischer Entzündung (SIRS): Prozentualer Anteil doppelmarkierter Thrombozyten (CD41/61-positiv) vor und nach Aktivierung mit Kollagen am Accuri® C6 sowie Minimal- und Maximalwert, 25%-75%-Perzentil und Median bei 19 Equiden, n.d.=nicht durchgeführt

Pat-ID	CD62P [%]		CD154 [%]		CD11a/18 [%]		Thiazol	
	nativ	Kollagen	nativ	Kollagen	nativ	Kollagen		
1	3,31	18,81	1,2	9,03	3,62	6,21	0,52	
2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
3	8,35	21,36	0,98	4,53	9,15	13,42	1,78	
4	2,47	11,91	0,46	7,89	2,02	4,33	2,33	
5	4,03	14,4	1,9	9,99	5,29	11,38	1,9	
6	0,75	5,91	1,01	6,09	1,11	1,87	1,06	
7	0,82	11,47	1,31	7,89	0,45	2,78	1,27	
8	9,36	18,62	1,18	10,15	7,31	7,3	4,27	
9	4,92	11,71	0,6	5,53	3,82	9,27	0,42	
10	20,7	37,68	14,35	38,76	10,53	12,31	29,85	
11	17,84	31,26	1,81	24,52	20,46	20,83	19,54	
12	15,46	23,13	0,67	3,38	4,16	5,21	2,86	
13	56,05	40,72	11,9	4,61	2,16	3,31	8,43	
14	53,97	37,09	0,46	0,03	8,01	6,6	7,36	
15	2,45	4,54	0,09	1,57	9,54	7,83	4,59	
16	9,31	11,38	0,57	2,37	15,64	13,12	5,09	
17	2,45	17,71	0,22	4,99	3,36	13,33	4,32	
18	6,89	9,32	0,59	5,16	2,84	3,32	3,79	
19	1,81	9,38	0,09	2,8	6,04	4,79	8,97	
20	1,96	10,67	0,26	6,7	2,93	3,67	9,62	
	Minimum	0,7500	4,540	0,0900	0,0300	0,4500	1,870	0,4200
	25% Perzentil	2,450	10,67	0,4600	3,380	2,840	3,670	1,780
	Median	4,920	14,40	0,6700	5,530	4,160	6,600	4,270
	75% Perzentil	15,46	23,13	1,310	9,030	9,150	12,31	8,430
	Maximum	56,05	40,72	14,35	38,76	20,46	20,83	29,85

## 12 Anhang

Tabelle 12-19: Thrombozytenfunktion bei Equiden mit systemischer Entzündung (SIRS): Korrelationskoeffizienten der Messungen aus K<sub>3</sub>-EDTA-Blut und Zitratblut am ADVIA® 2120 und dem Multiplate® Analyzer bei klinisch unauffälligen Kleinpferden und Warmblütern (Spontanaggregation Korrelation nach Spearman, alle anderen nach Pearson)

		COLtest [U]		ADPtest [U]		ADPtestHS [U]		ASPItest [U]		Spontanaggregation [U]	
		mit Magnet	ohne Magnet	mit Magnet	ohne Magnet	mit Magnet	ohne Magnet	mit Magnet	ohne Magnet	mit Magnet	ohne Magnet
<b>K<sub>3</sub>-EDTA</b>											
<b>PLT</b> [x10 <sup>9</sup> /l]	n	119	42	120	41	119	42	<b>118</b>	<b>42</b>	116	<b>40</b>
	r	-0,041	-0,008	0,023	-0,243	0,037	0,260	<b>-0,249</b>	<b>-0,412</b>	-0,012	<b>-0,357</b>
	p-Wert	0,655	0,961	0,799	0,125	0,687	0,097	<b>0,007</b>	<b>0,007</b>	0,901	<b>0,020</b>
<b>MPV</b> [fl]	n	119	<b>42</b>	120	41	<b>119</b>	42	<b>118</b>	42	<b>116</b>	40
	r	-0,090	<b>-0,474</b>	0,210	-0,307	<b>0,190</b>	-0,264	<b>0,192</b>	-0,134	<b>0,329</b>	0,076
	p-Wert	0,329	<b>0,002</b>	0,021	0,051	<b>0,038</b>	0,091	<b>0,037</b>	0,398	<b>&lt;0,001</b>	0,631
<b>MPC</b> [g/dl]	n	119	<b>42</b>	120	<b>41</b>	<b>119</b>	<b>42</b>	118	<b>42</b>	<b>116</b>	40
	r	0,167	<b>0,466</b>	-0,157	<b>0,312</b>	<b>-0,194</b>	<b>0,317</b>	-0,045	<b>0,384</b>	<b>-0,348</b>	-0,110
	p-Wert	0,069	<b>0,002</b>	0,086	<b>0,047</b>	<b>0,035</b>	<b>0,040</b>	0,627	<b>0,012</b>	<b>&lt;0,001</b>	0,488
<b>LargePLT</b> [x10 <sup>9</sup> /l]	n	119	<b>42</b>	<b>120</b>	<b>41</b>	<b>119</b>	<b>42</b>	118	<b>42</b>	<b>116</b>	40
	r	-0,133	<b>-0,501</b>	<b>0,188</b>	<b>-0,425</b>	<b>0,216</b>	<b>-0,414</b>	0,127	<b>0,396</b>	<b>0,390</b>	-0,054
	p-Wert	0,148	<b>&lt;0,001</b>	<b>0,040</b>	<b>0,006</b>	<b>0,018</b>	<b>0,006</b>	0,170	<b>0,009</b>	<b>&lt;0,001</b>	0,733
<b>Clumps</b> [n]	n	114	42	115	41	114	42	113	42	111	40
	r	-0,066	0,277	-0,015	0,261	-0,057	0,183	0,102	0,194	-0,018	0,257
	p-Wert	0,483	0,075	0,873	0,100	0,545	0,247	0,283	0,218	0,857	0,100
<b>PCT</b> [%]	n	115	<b>42</b>	116	<b>41</b>	115	<b>42</b>	114	<b>42</b>	112	<b>40</b>
	r	-0,070	<b>-0,349</b>	0,078	<b>-0,444</b>	0,113	<b>-0,418</b>	-0,113	<b>-0,471</b>	0,134	<b>-0,340</b>
	p-Wert	0,457	<b>0,023</b>	0,407	<b>0,004</b>	0,228	<b>0,006</b>	0,229	<b>0,002</b>	0,154	<b>0,027</b>
<b>Zitrat</b>											
<b>PLT</b> [x10 <sup>9</sup> /l]	n	118	42	119	41	118	42	<b>117</b>	<b>42</b>	115	40
	r	0,084	0,249	-0,008	-0,770	-0,007	-0,132	<b>-0,235</b>	<b>-0,378</b>	-0,104	-0,352
	p-Wert	0,366	0,112	0,930	0,630	0,936	0,405	<b>0,011</b>	<b>0,013</b>	0,264	0,022
<b>MPV</b> [fl]	n	119	42	120	41	119	42	<b>118</b>	42	116	40
	r	-0,008	-0,141	0,092	-0,027	0,020	-0,028	<b>0,230</b>	-0,032	0,113	0,133
	p-Wert	0,929	0,375	0,317	0,865	0,832	0,863	<b>0,012</b>	0,839	0,225	0,401
<b>MPC</b> [g/dl]	n	119	42	120	41	119	42	118	<b>42</b>	116	40
	r	0,095	0,194	-0,061	0,126	-0,013	0,133	-0,029	<b>0,327</b>	-0,118	-0,181
	p-Wert	0,305	0,219	0,505	0,432	0,891	0,399	0,758	<b>0,034</b>	0,205	0,252
<b>LargePLT</b> [x10 <sup>9</sup> /l]	n	119	42	<b>120</b>	41	119	42	<b>118</b>	42	<b>116</b>	40
	r	0,035	-0,119	<b>0,214</b>	-0,055	0,151	-0,050	<b>0,208</b>	-0,164	<b>0,213</b>	0,078
	p-Wert	0,703	0,454	<b>0,019</b>	0,734	0,100	0,753	<b>0,024</b>	0,299	<b>0,020</b>	0,524
<b>Clumps</b> [n]	n	118	42	119	41	118	42	117	<b>42</b>	115	40
	r	0,009	0,084	0,011	0,263	0,129	0,289	-0,004	<b>0,492</b>	0,100	0,158
	p-Wert	0,921	0,599	0,909	0,096	0,164	0,063	0,962	<b>&lt;0,001</b>	0,282	0,318
<b>PCT</b> [%]	n	119	42	120	41	119	42	11	<b>42</b>	116	40
	r	0,070	0,221	0,069	-0,067	0,045	-0,115	-0,074	<b>-0,345</b>	-0,002	-0,264
	p-Wert	0,447	0,160	0,454	0,677	0,626	0,467	0,424	<b>0,025</b>	0,981	0,092

## 12 Anhang

Tabelle 12-20: Thrombozytenfunktion bei Equiden mit systemischer Entzündung (SIRS): Korrelationskoeffizienten der Messungen aus K<sub>3</sub>-EDTA-Blut und Zitratblut am ADVIA® 2120 und dem Multiplate® Analyzer bei 20 Equiden mit SIRS (Spontanaggregation Korrelation nach Spearman, alle anderen nach Pearson)

		COLtest [U]		ADPtest [U]		ADPtestHS [U]		ASPItest [U]		Spontanaggregation [U]	
		mit Magnet	ohne Magnet	mit Magnet	ohne Magnet	mit Magnet	ohne Magnet	mit Magnet	ohne Magnet	mit Magnet	ohne Magnet
<b>K<sub>3</sub>-EDTA</b>											
<b>PLT</b> [x10 <sup>9</sup> /l]	n	20	20	<b>20</b>	<b>19</b>	<b>20</b>	<b>20</b>	20	20	17	16
	r	0,409	0,328	<b>0,479</b>	<b>0,511</b>	<b>0,445</b>	<b>0,520</b>	0,102	0,438	0,154	0,370
	p-Wert	0,074	0,158	<b>0,033</b>	<b>0,025</b>	<b>0,050</b>	<b>0,019</b>	0,669	0,053	0,528	0,131
<b>MPV</b> [fL]	n	20	20	20	19	20	20	20	20	17	16
	r	-0,362	-0,120	-0,154	-0,090	-0,122	-0,014	-0,086	-0,043	0,153	0,217
	p-Wert	0,166	0,615	0,518	0,715	0,610	0,954	0,718	0,858	0,532	0,387
<b>MPC</b> [g/dl]	n	19	19	19	19	19	19	19	19	16	15
	r	0,217	-0,025	0,045	-0,120	0,001	-0,054	-0,102	-0,235	-0,239	-0,331
	p-Wert	0,372	0,920	0,854	0,625	0,999	0,827	0,677	0,334	0,340	0,194
<b>LargePLT</b> [x10 <sup>9</sup> /l]	n	20	20	<b>20</b>	19	20	20	20	<b>20</b>	17	16
	r	-0,017	0,079	<b>0,211</b>	0,396	0,247	0,312	0,417	<b>0,465</b>	0,373	0,397
	p-Wert	0,945	0,740	<b>0,037</b>	0,094	0,294	0,181	0,067	<b>0,039</b>	0,116	0,103
<b>Clumps</b> [n]	n	20	20	20	19	20	20	20	20	<b>17</b>	16
	r	0,208	0,196	0,239	0,240	0,276	0,163	0,215	0,089	<b>0,461</b>	0,329
	p-Wert	0,378	0,406	0,309	0,322	0,239	0,493	0,363	0,709	<b>0,047</b>	0,183
<b>PCT</b> [%]	n	20	20	20	19	20	20	20	20	17	16
	r	0,242	0,180	0,227	0,441	0,278	0,431	0,045	0,317	-0,059	0,104
	p-Wert	0,304	0,448	0,237	0,059	0,236	0,058	0,852	0,173	0,810	0,680
<b>Zitrat</b>											
<b>PLT</b> [x10 <sup>9</sup> /l]	n	20	20	20	19	20	20	20	20	17	16
	r	0,400	0,177	0,288	0,365	0,279	0,378	-0,019	0,178	-0,027	0,021
	p-Wert	0,081	0,456	0,218	0,124	0,234	0,100	0,936	0,452	0,911	0,935
<b>MPV</b> [fL]	n	20	20	20	19	20	20	20	20	17	16
	r	-0,325	-0,049	0,005	0,138	0,052	0,113	0,201	0,302	0,139	0,317
	p-Wert	0,162	0,838	0,984	0,574	0,827	0,636	0,396	0,196	0,569	0,199
<b>MPC</b> [g/dl]	n	20	20	20	19	20	20	20	20	17	16
	r	0,224	0,004	0,099	-0,067	0,089	-0,001	-0,200	-0,248	-0,234	-0,127
	p-Wert	0,342	0,988	0,677	0,784	0,710	0,997	0,398	0,292	0,335	0,615
<b>LargePLT</b> [x10 <sup>9</sup> /l]	n	20	20	20	19	20	20	20	20	17	16
	r	0,200	0,403	0,258	0,432	0,240	0,346	0,231	0,366	0,251	0,248
	p-Wert	0,398	0,078	0,273	0,065	0,309	0,135	0,328	0,113	0,299	0,321
<b>Clumps</b> [n]	n	20	20	20	19	20	20	20	20	17	16
	r	0,014	-0,095	0,194	0,154	0,203	0,119	-0,060	-0,060	0,374	0,349
	p-Wert	0,954	0,689	0,413	0,528	0,392	0,617	0,803	0,800	0,115	0,154
<b>PCT</b> [%]	n	20	20	20	19	20	20	20	20	17	16
	r	0,361	0,398	0,209	0,367	0,203	0,368	0,005	0,283	0,126	0,188
	p-Wert	0,118	0,082	0,376	0,122	0,390	0,111	0,985	0,226	0,607	0,456

## 12 Anhang

Tabelle 12-21: Thrombozytenfunktion bei Equiden mit systemischer Entzündung (SIRS): Korrelationskoeffizienten nach Pearson der Messungen aus Zitratblut am ADVIA® 2120 und dem Accuri® C6 in der Kontroll- und der SIRS-Gruppe

		CD62P [%]		CD154 [%]		CD11a/18 [%]		Thiazol [%]
		nativ	Kollagen	nativ	Kollagen	nativ	Kollagen	
<b>Kontrolle</b>								
<b>PLT</b> [x10 <sup>9</sup> /l]	n	10	10	10	10	10	10	10
	r	-0,245	-0,266	-0,183	-0,188	0,236	-0,413	-0,143
	p-Wert	0,496	0,458	0,613	0,603	0,511	0,235	0,694
<b>MPV</b> [fL]	n	10	10	10	10	10	10	10
	r	0,046	-0,617	0,317	0,507	0,048	-0,116	-0,004
	p-Wert	0,900	0,057	0,372	0,135	0,896	0,749	0,991
<b>MPC</b> [g/dl]	n	10	10	10	10	10	10	10
	r	-0,122	0,610	-0,127	0,032	-0,022	0,244	0,451
	p-Wert	0,738	0,061	0,727	0,929	0,952	0,497	0,191
<b>LargePLT</b> [x10 <sup>9</sup> /l]	n	10	10	10	10	10	10	10
	r	0,077	-0,579	-0,149	0,368	0,053	-0,242	-0,368
	p-Wert	0,833	0,079	0,681	0,295	0,885	0,501	0,295
<b>Clumps</b> [n]	n	10	10	10	10	10	10	10
	r	-0,290	-0,365	-0,585	-0,340	-0,295	-0,499	-0,016
	p-Wert	0,417	0,300	0,076	0,337	0,408	0,065	0,964
<b>PCT</b> [%]	n	10	10	10	10	10	10	10
	r	-0,183	-0,403	-0,062	-0,042	0,250	-0,414	-0,151
	p-Wert	0,613	0,248	0,865	0,909	0,486	0,234	0,677
<b>SIRS</b>								
<b>PLT</b> [x10 <sup>9</sup> /l]	n	19	19	<b>19</b>	19	19	19	19
	r	-0,303	-0,433	<b>-0,702</b>	-0,366	-0,094	-0,253	-0,255
	p-Wert	0,207	0,064	<b>&lt;0,001</b>	0,123	0,702	0,296	0,291
<b>MPV</b> [fL]	n	19	19	19	19	19	19	19
	r	0,097	-0,196	-0,044	-0,316	-0,079	-0,221	0,138
	p-Wert	0,692	0,421	0,857	0,188	0,749	0,363	0,572
<b>MPC</b> [g/dl]	n	19	19	19	19	19	19	19
	r	-0,197	-0,069	-0,123	0,033	-0,147	-0,188	-0,171
	p-Wert	0,420	0,779	0,616	0,894	0,549	0,442	0,483
<b>LargePLT</b> [x10 <sup>9</sup> /l]	n	19	19	<b>19</b>	<b>19</b>	19	19	19
	r	-0,152	-0,346	<b>-0,492</b>	<b>-0,485</b>	-0,190	-0,390	-0,099
	p-Wert	0,534	0,146	<b>0,008</b>	<b>0,028</b>	0,436	0,130	0,687
<b>Clumps</b> [n]	n	19	19	19	19	19	19	19
	r	0,228	0,147	0,223	0,083	0,401	0,342	0,352
	p-Wert	0,349	0,547	0,358	0,737	0,089	0,151	0,139
<b>PCT</b> [%]	n	19	<b>19</b>	<b>19</b>	<b>19</b>	19	19	19
	r	-0,307	<b>-0,522</b>	<b>-0,775</b>	<b>-0,515</b>	-0,112	-0,298	-0,213
	p-Wert	0,201	<b>0,007</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>0,024</b>	0,649	0,216	0,380

## 12 Anhang

Tabelle 12-22: Thrombozytenfunktion bei Equiden mit systemischer Entzündung (SIRS): Korrelationskoeffizienten der Messungen am Multiplate® Analyzer und dem Accuri® C6 der 19 SIRS-Patienten (Spontanaggregation Korrelation nach Spearman, alle anderen nach Pearson)

			CD62P		CD154		CD11a/18		Thiazol
			nativ	Kollagen	nativ	Kollagen	nativ	Kollagen	
<b>COLtest</b> [U]	mit Magnet	n	19	19	19	19	<b>19</b>	<b>19</b>	19
		r	0,263	0,074	-0,364	-0,231	<b>0,604</b>	<b>0,477</b>	-0,113
		p-Wert	0,277	0,763	0,126	0,340	<b>0,006</b>	<b>0,039</b>	0,644
	ohne Magnet	n	19	19	19	19	<b>19</b>	19	19
		r	0,209	-0,006	-0,414	-0,215	<b>0,460</b>	0,247	0,139
		p-Wert	0,391	0,981	0,078	0,377	<b>0,047</b>	0,307	0,571
<b>ADPtest</b> [U]	mit Magnet	n	19	19	19	19	19	19	19
		r	0,211	0,060	-0,204	-0,296	0,223	0,012	-0,160
		p-Wert	0,387	0,806	0,402	0,219	0,360	0,960	0,512
	ohne Magnet	n	18	18	18	18	18	18	18
		r	0,219	0,045	-0,249	-0,400	0,032	-0,220	-0,003
		p-Wert	0,382	0,859	0,319	0,100	0,900	0,380	0,992
<b>ADPtestHS</b> [U]	mit Magnet	n	19	19	19	19	19	19	19
		r	0,242	0,043	-0,214	-0,306	0,253	0,035	-0,090
		p-Wert	0,318	0,860	0,379	0,202	0,296	0,888	0,713
	ohne Magnet	n	19	19	19	19	19	19	19
		r	0,120	-0,056	-0,310	-0,341	-0,008	-0,258	-0,038
		p-Wert	0,626	0,819	0,196	0,153	0,975	0,287	0,876
<b>ASPItest</b> [U]	mit Magnet	n	19	19	19	19	19	19	19
		r	0,151	0,146	-0,163	-0,166	0,111	0,073	-0,115
		p-Wert	0,537	0,550	0,504	0,497	0,651	0,766	0,641
	ohne Magnet	n	19	19	19	19	19	19	19
		r	0,149	-0,076	-0,350	-0,417	-0,013	-0,174	-0,052
		p-Wert	0,542	0,757	0,141	0,076	0,958	0,476	0,832
<b>Spontan- aggregation</b> [U]	mit Magnet	n	16	16	16	16	16	16	16
		r	0,195	0,067	-0,171	-0,202	0,467	0,323	-0,008
		p-Wert	0,439	0,793	0,498	0,421	0,051	0,191	0,974
	ohne Magnet	n	15	15	15	15	15	15	15
		r	0,156	-0,005	-0,156	-0,416	0,478	0,173	-0,096
		p-Wert	0,551	0,985	0,551	0,097	0,052	0,506	0,715

## 12 Anhang

Tabelle 12-23: Hemmung der Thrombozytenfunktion bei Equiden: Hämatologie, klinische Chemie und plasmatische Gerinnung nach Medikation mit Acetylsalicylsäure zu verschiedenen Messzeitpunkten (T, in Stunden) bei 10 Pferden; Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SD); \*\*  $p < 0,01$ , \*  $p < 0,05$

Variable	Einheit		T0	T6	T12	T24	T48	T72	T96	T144	T192	T240
Salicylsäure	µg/ml	MW	0,34	<b>5,56**</b>	<b>3,67**</b>	0,62	0,38	0,35	0,42	0,32		
		SD	0,12	<b>1,46</b>	<b>1,26</b>	0,18	0,22	0,18	0,15	0,19		
WBC	10 <sup>9</sup> /l	MW	7,51	<b>8,23*</b>	8,12	7,65	7,50	7,42	7,20	7,53	7,52	7,31
		SD	1,44	<b>1,39</b>	1,71	1,63	1,65	1,76	1,44	1,45	1,52	1,59
Neutrophile Granulozyten	10 <sup>9</sup> /l	MW	4,15	4,52	4,37	4,08	4,00	3,94	4,00	4,03	4,31	4,05
		SD	0,98	0,80	1,03	0,79	0,78	0,98	0,84	0,69	0,87	1,09
Lymphozyten	10 <sup>9</sup> /l	MW	2,78	<b>3,08*</b>	<b>3,09*</b>	2,94	2,92	2,88	2,64	2,90	2,67	2,75
		SD	1,01	<b>1,19</b>	<b>1,30</b>	1,20	1,24	1,17	0,94	1,10	0,94	0,82
Monozyten	10 <sup>9</sup> /l	MW	0,28	0,32	0,29	0,28	0,26	0,27	0,26	0,29	0,28	0,26
		SD	0,13	0,12	0,13	0,08	0,10	0,11	0,08	0,11	0,11	0,10
Eosinophile Granulozyten	10 <sup>9</sup> /l	MW	0,24	0,24	0,32	0,27	0,25	0,24	0,23	0,24	0,21	0,21
		SD	0,15	0,18	0,18	0,16	0,14	0,15	0,15	0,15	0,16	0,16
Basophile Granulozyten	10 <sup>9</sup> /l	MW	0,03	0,03	0,02	0,03	0,04	0,04	0,03	0,03	0,03	0,03
		SD	0,03	0,03	0,02	0,01	0,02	0,03	0,01	0,01	0,01	0,01
RBC	10 <sup>12</sup> /l	MW	7,55	7,96	7,59	7,55	7,41	7,33	7,50	7,56	7,59	7,44
		SD	0,50	0,35	0,55	0,49	0,60	0,58	0,36	0,51	0,49	0,39
Hämoglobin	mmol/l	MW	7,63	8,03	7,61	7,63	7,45	7,38	7,61	7,57	7,77	7,51
		SD	0,64	0,52	0,71	0,48	0,78	0,55	0,50	0,44	0,58	0,41
Hämatokrit	l/l	MW	0,37	0,39	0,38	0,37	0,37	0,36	0,37	0,37	0,37	0,37
		SD	0,02	0,03	0,03	0,02	0,04	0,02	0,02	0,02	0,02	0,03
Retikulozyten	10 <sup>9</sup> /l	MW	6,56	3,39	<b>2,34*</b>	5,04	5,20	3,90	2,48	4,12	5,39	5,10
		SD	7,12	1,19	<b>1,25</b>	1,85	3,72	2,14	2,14	3,73	3,81	2,51
MCV	fl	MW	49,44	49,25	49,56	49,17	49,14	<b>49,04*</b>	49,56	49,26	49,28	49,45
		SD	2,80	2,82	2,70	2,72	2,68	<b>2,69</b>	2,54	2,72	2,61	2,56
MCH	fmol/l	MW	1,03	1,02	1,02	1,02	1,02	1,03	1,03	1,02	1,04	1,03
		SD	0,06	0,06	0,06	0,06	0,05	0,06	0,04	0,06	0,05	0,05
MCHC	mmol/l	MW	20,72	20,85	20,60	20,84	20,82	20,90	20,85	20,72	21,09	20,77
		SD	0,49	0,58	0,52	0,39	0,47	0,51	0,62	0,35	0,37	0,24
CHCM	mmol/l	MW	21,42	21,49	21,42	21,49	21,52	21,53	21,54	21,46	21,62	21,41
		SD	0,49	0,50	0,52	0,42	0,51	0,51	0,49	0,44	0,43	0,21
PLT	10 <sup>9</sup> /l	MW	125,80	130,40	128,10	128,70	124,40	125,90	139,44	127,50	130,78	130,38
		SD	36,32	32,28	37,76	35,21	37,52	36,59	21,69	33,78	24,98	18,62
MPC	g/dl	MW	24,19	24,14	<b>22,02*</b>	25,03	24,65	25,32	24,41	24,27	23,53	24,36
		SD	2,66	2,43	<b>3,08</b>	2,02	2,29	2,22	2,49	2,67	3,11	2,43
Harnstoff	mmol/l	MW	4,36			4,43				4,36		4,41
		SD	1,01			0,73				1,26		1,02
Kreatinin	µmol/l	MW	116,30			113,00				118,10		122,11
		SD	12,12			13,12				12,47		8,62
Na+	mmol/l	MW	135,80			135,00				136,00		135,67
		SD	1,62			1,41				2,40		1,94
CL-	mmol/l	MW	99,80			100,20				99,40		99,67
		SD	1,87			1,62				2,63		1,12
K+	mmol/l	MW	3,58			3,62				3,37		2,85
		SD	0,60			0,44				0,58		0,52
Ca <sup>++</sup>	mmol/l	MW	1,66			1,65				1,64		1,64
		SD	0,06			0,06				0,03		0,05
P-	mmol/l	MW	0,99			1,04				0,92		0,87
		SD	0,10			0,13				0,10		0,13
Mg <sup>++</sup>	mmol/l	MW	0,52			0,52				0,51		0,52
		SD	0,05			0,04				0,07		0,02
Gesamtprotein	g/l	MW	69,26			67,47				68,21		68,69
		SD	3,81			3,44				5,53		6,34
Albumin	g/l	MW	33,18			32,73				32,66		32,84
		SD	2,05			2,38				2,26		2,05
Globuline	g/l	MW	36,08			34,74				35,55		35,84
		SD										

## 12 Anhang

Variable	Einheit		T0	T6	T12	T24	T48	T72	T96	T144	T192	T240
		SD	3,25			2,47				4,88		5,58
Fibrinogen	g/l	MW	2,02			1,71				1,65		1,68
		SD	0,89			0,13				0,14		0,22
Bilirubin gesamt	μmol/l	MW	33,68			30,67				31,66		34,30
		SD	11,60			12,56				12,09		11,10
Bilirubin direkt	μmol/l	MW	4,47			4,19				4,37		3,91
		SD	1,17			1,05				0,89		0,79
AP	U/l	MW	176,90			174,30				171,90		156,22
		SD	36,89			31,31				38,15		45,44
GLDH	U/l	MW	3,50			4,60				3,70		2,44
		SD	3,10			3,41				3,77		1,59
γ-GT	U/l	MW	19,20			21,10				19,40		21,56
		SD	7,36			8,57				6,38		4,50
Gallensäuren	μmol/l	MW	6,70			6,70				6,10		6,89
		SD	1,49			1,64				1,60		0,60
AST	U/l	MW	303,70			297,10				288,30		280,44
		SD	69,18			60,22				49,17		36,95
CK	U/l	MW	201,90			201,50				200,30		191,67
		SD	63,67			38,47				37,02		35,32
LDH	U/l	MW	374,50			383,10				366,60		322,67
		SD	99,48			93,42				107,96		53,60
aPTT	sec.	MW	42,20			41,90				44,70		42,34
		SD	2,29			2,09				3,27		2,55
PT	sec.	MW	11,47			11,60				11,90		11,57
		SD	0,30			0,41				1,14		0,51
INR	-	MW	0,85			0,86				0,90		0,88
		SD	0,05			0,05				0,14		0,07

## 12 Anhang

---

Tabelle 12-24: Hemmung der Thrombozytenfunktion bei Pferden: Serumkonzentration der Salicylsäure ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) zu verschiedenen Messzeitpunkten (T, in Stunden) nach Medikation mit ASS (<sup>#</sup> 4,7-5 mg/kg, <sup>##</sup>1-1,3 mg/kg) bei 10 Pferden

Pferd	T0 <sup>#</sup>	T6	T12	T24 <sup>##</sup>	T96 <sup>##</sup>	T144
1	0,35	5,58	3,53	0,58	<0,2	0,24
2	0,29	5,25	5,25	0,65	<0,2	0,21
3	0,25	5,76	5,09	0,81	0,54	<0,2
4	0,34	6,20	4,51	0,79	0,34	<0,2
5	<0,2	5,59	2,71	0,48	0,26	<0,2
6	0,31	6,15	4,07	0,64	0,33	0,26
7	0,37	7,21	2,64	0,51	0,38	0,26
8	<0,2	7,53	2,97	0,45	0,41	0,34
9	0,22	3,46	1,31	0,36	<0,2	0,20
10	0,61	2,87	4,64	0,95	0,70	0,73

## 12 Anhang

Tabelle 12-25: Hemmung der Thrombozytenfunktion bei Pferden: Thrombozytenfunktion am Multiplate® Analyzer zu verschiedenen Messzeitpunkten (T, in Stunden) nach Medikation mit Acetylsalicylsäure (#4,7-5,0 mg/kg, ##1,0-1,3 mg/kg) bei 10 Pferden

Pferd	Test [%]	T0 <sup>#</sup>	T6	T12	T24 <sup>##</sup>	T48 <sup>##</sup>	T72 <sup>##</sup>	T96 <sup>##</sup>	T144	T192	T240
1	ADPtest	200	175	192	191	210	188	227	204	242	181
	ASPItest	85	44	40	63	32	77	76	163	191	69
	COLtest	364	346	396	376	393	362	414	391	403	345
2	ADPtest	256	277	259	234	259	178	200	191	160	149
	ASPItest	133	80	84	35	41	30	21	37	55	90
	COLtest	365	330	362	362	373	314	338	366	314	366
3	ADPtest	145	148	208	196	181	111	108	167	161	152
	ASPItest	69	28	78	40	49	43	49	78	68	70
	COLtest	219	175	184	228	235	201	250	195	257	261
4	ADPtest	126	148	126	94	139	110	129	107	103	96
	ASPItest	81	47	0	17	17	13	2	49	72	69
	COLtest	328	317	286	176	300	185	213	300	271	265
5	ADPtest	144	233	153	166	142	126	151	181	219	n.d.
	ASPItest	117	146	198	130	84	117	52	150	204	112
	COLtest	226	214	292	356	279	307	315	398	352	n.d.
6	ADPtest	177	124	137	129	132	180	125	147	118	130
	ASPItest	81	34	35	30	63	62	52	97	94	55
	COLtest	338	278	295	270	227	291	270	294	276	312
7	ADPtest	195	83	118	122	154	164	141	167	133	164
	ASPItest	72	0	19	22	44	45	25	92	41	50
	COLtest	401	278	262	300	339	272	286	376	308	333
8	ADPtest	220	217	282	223	207	238	183	191	210	201
	ASPItest	182	185	201	189	160	136	88	123	115	155
	COLtest	353	327	371	346	239	376	337	391	324	356
9	ADPtest	134	142	153	109	118	133	131	141	133	120
	ASPItest	67	8	5	6	11	76	28	75	71	57
	COLtest	403	338	370	326	355	378	350	370	359	395
10	ADPtest	332	314	321	230	320	243	259	248	n.d.	n.d.
	ASPItest	181	188	199	129	179	196	171	226	-.	175
	COLtest	452	422	408	369	421	413	400	402	n.d.	n.d.

## 12 Anhang

Tabelle 12-26: Hemmung der Thrombozytenfunktion bei Equiden: Hämatologie, klinische Chemie und plasmatische Gerinnung nach Medikation mit Clopidogrel zu verschiedenen Messzeitpunkten (T, in Stunden) bei 10 Pferden; Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SD); \*\*  $p < 0,01$ , \*  $p < 0,05$

Variable	Einheit		T0	T6	T12	T24	T48	T72	T96	T144	T192	T240
WBC	10 <sup>9</sup> /l	MW	7,93	7,95	7,80	7,64	7,71	7,75	7,68	7,76	8,08	7,76
		SD	1,45	1,52	1,51	1,45	1,21	1,40	1,84	1,49	1,51	1,81
Neutrophile Granulozyten	10 <sup>9</sup> /l	MW	4,33	4,27	4,17	4,25	4,30	4,32	4,16	4,27	4,63	4,37
		SD	1,19	0,97	1,17	1,08	0,97	0,84	1,15	0,93	1,03	1,12
Lymphozyten	10 <sup>9</sup> /l	MW	2,95	3,04	3,01	2,79	2,82	2,80	2,90	2,88	2,89	2,80
		SD	0,91	1,02	0,92	1,06	0,88	0,92	1,00	0,99	1,10	1,12
Monozyten	10 <sup>9</sup> /l	MW	0,33	0,29	0,30	0,30	0,28	0,31	0,29	0,30	0,28	0,26
		SD	0,15	0,14	0,12	0,15	0,12	0,13	0,10	0,13	0,12	0,08
Eosinophile Granulozyten	10 <sup>9</sup> /l	MW	0,25	0,30	0,26	0,25	0,26	0,27	0,26	0,25	0,23	0,25
		SD	0,16	0,21	0,15	0,14	0,14	0,15	0,18	0,15	0,15	0,19
Basophile Granulozyten	10 <sup>9</sup> /l	MW	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,02
		SD	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02	0,02	0,02	0,02	0,01
RBC	10 <sup>12</sup> /l	MW	7,62	8,20	7,54	7,37	7,53	7,63	7,44	7,58	7,61	7,27
		SD	0,71	1,35	0,62	0,83	0,72	0,81	0,84	0,85	0,90	0,56
Hämoglobin	mmol/l	MW	7,73	8,37	7,61	7,49	7,63	7,66	7,54	7,59	7,58	7,34
		SD	0,63	1,27	0,55	0,83	0,67	0,74	0,97	0,73	0,67	0,63
Hämatokrit	l/l	MW	0,37	0,40	0,37	0,36	0,37	0,37	0,37	0,37	0,37	0,37
		SD	0,03	0,06	0,03	0,04	0,03	0,04	0,04	0,03	0,03	0,03
Retikulozyten	10 <sup>9</sup> /l	MW	4,56	6,91	2,27	3,28	5,59	4,36	2,56	4,10	4,96	4,68
		SD	6,12	7,83	0,80	1,53	2,06	3,17	1,00	1,98	2,23	3,52
MCV	fl	MW	49,21	48,73	49,31	49,12	48,90	48,93	49,60	49,06	49,01	49,00
		SD	3,21	2,89	3,11	3,21	2,84	2,99	2,92	2,80	2,65	2,64
MCH	fmol/l	MW	1,03	1,04	1,03	1,03	1,03	1,02	1,03	1,02	<b>1,02*</b>	1,03
		SD	0,06	0,06	0,05	0,07	0,06	0,06	0,05	0,06	<b>0,05</b>	0,06
MCHC	mmol/l	MW	20,99	<b>21,32*</b>	20,89	20,98	21,05	20,85	20,75	20,76	20,72	20,93
		SD	0,29	<b>0,27</b>	0,51	0,43	0,21	0,44	0,46	0,28	0,25	0,27
CHCM	mmol/l	MW	21,75	<b>22,03**</b>	21,68	21,81	21,72	21,73	21,58	21,59	21,60	21,61
		SD	0,48	<b>0,53</b>	0,53	0,43	0,45	0,42	0,43	0,43	0,46	0,49
PLT	10/l	MW	132,50	123,50	<b>131,10**</b>	134,70	131,30	135,40	126,33	133,10	135,30	<b>125,70*</b>
		SD	31,46	30,99	<b>35,79</b>	32,14	33,31	36,16	33,92	32,38	33,94	<b>38,54</b>
MPC	g/dl	MW	23,81	23,07	21,51	24,29	23,90	24,11	23,24	23,85	24,01	22,47
		SD	2,57	2,86	2,90	2,32	2,51	2,48	3,47	2,34	1,90	2,79
Harnstoff	mmol/l	MW	4,21			4,41				4,15		3,79
		SD	0,97			0,94				0,79		0,73
Kreatinin	µmol/l	MW	108,50			107,50				118,60		116,40
		SD	7,98			12,75				13,02		16,06
Na+	mmol/l	MW	134,70			135,20				135,60		134,50
		SD	1,95			1,87				1,78		1,65
Cl-	mmol/l	MW	99,90			100,00				99,80		99,60
		SD	1,73			2,21				1,55		1,43
K+	mmol/l	MW	3,16			2,94				3,09		3,32
		SD	0,45			0,56				0,50		0,23
Ca++	mmol/l	MW	1,64			1,66				1,64		1,62
		SD	0,08			0,08				0,10		0,09
P-	mmol/l	MW	1,04			1,09				1,06		0,90
		SD	0,26			0,22				0,24		0,11
Mg++	mmol/l	MW	0,54			0,51				0,54		0,56
		SD	0,09			0,05				0,05		0,13
Gesamtprotein	g/l	MW	68,87			68,04				68,41		67,50
		SD	5,40			8,10				4,87		6,14
Albumin	g/l	MW	32,40			32,24				33,13		32,53
		SD	2,07			3,07				1,68		2,37
Globuline	g/l	MW	36,47			35,80				35,28		34,97
		SD	4,81			6,00				4,68		4,90
Fibrinogen	g/l	MW	1,63			1,67				1,78		1,66
		SD										

## 12 Anhang

Variable	Einheit		T0	T6	T12	T24	T48	T72	T96	T144	T192	T240
		SD	0,36			0,30				0,42		0,25
Bilirubin gesamt	µmol/l	MW	34,15			32,95				33,83		36,46
		SD	12,39			11,27				9,89		12,65
Bilirubin direkt	µmol/l	MW	4,04			3,89				4,01		3,85
		SD	1,15			0,96				0,85		1,05
AP	U/l	MW	169,30			159,90				182,30		159,10
		SD	48,11			51,09				40,28		41,02
GLDH	U/l	MW	3,30			2,90				3,10		3,00
		SD	1,57			1,37				1,29		1,15
γ-GT	U/l	MW	23,20			22,30				20,20		21,90
		SD	9,39			8,85				7,11		9,80
Gallensäuren	µmol/l	MW	6,80			7,10				7,40		7,10
		SD	1,23			1,10				2,12		1,52
AST	U/l	MW	311,30			298,80				288,70		<b>281,60*</b>
		SD	48,58			52,04				50,16		<b>45,40</b>
CK	U/l	MW	193,90			186,50				179,60		180,70
		SD	25,38			29,48				30,86		37,68
LDH	U/l	MW	379,40			362,60				370,60		356,50
		SD	74,64			89,39				114,10		104,13
aPTT	sec.	MW	41,68			41,78				41,22		41,12
		SD	2,85			2,40				1,43		2,06
PT	sec.	MW	11,39			11,53				11,47		<b>11,72*</b>
		SD	0,32			0,37				0,46		<b>0,48</b>
INR		MW	0,84			0,86				0,85		0,89
		SD	0,05			0,05				0,05		0,06

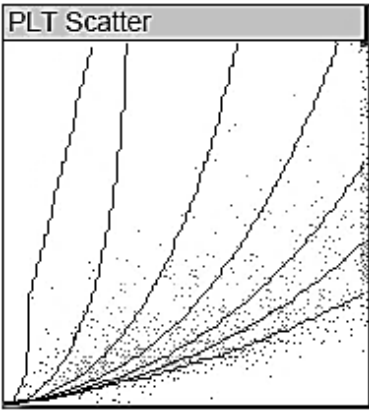
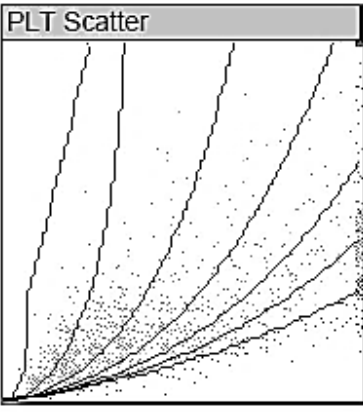
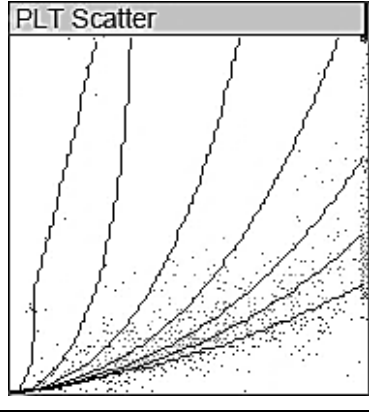
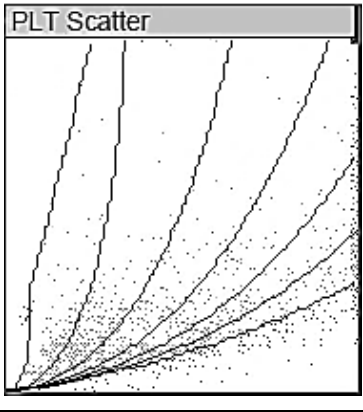
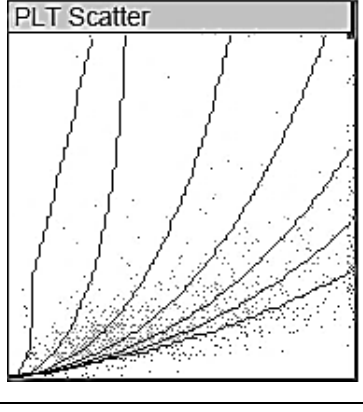
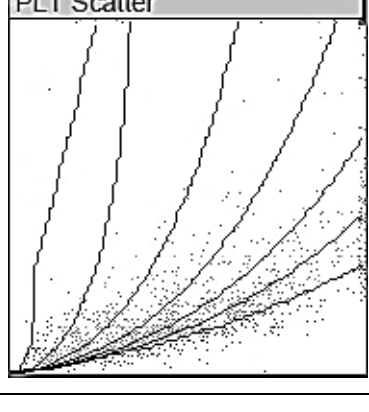
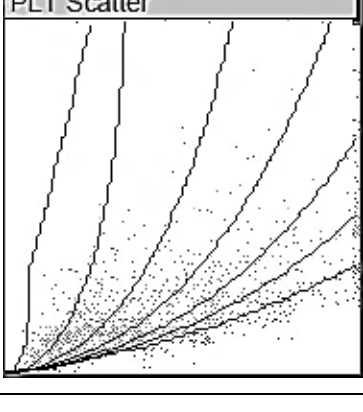
## 12 Anhang

Tabelle 12-27: Hemmung der Thrombozytenfunktion bei Pferden: Thrombozytenfunktion am Multiplate® Analyzer zu verschiedenen Messzeitpunkten (T, in Stunden) nach Medikation mit Clopidogrel (<sup>#</sup>6,0-6,5 mg/kg, <sup>##</sup>1,2-1,4 mg/kg) bei 10 Pferden

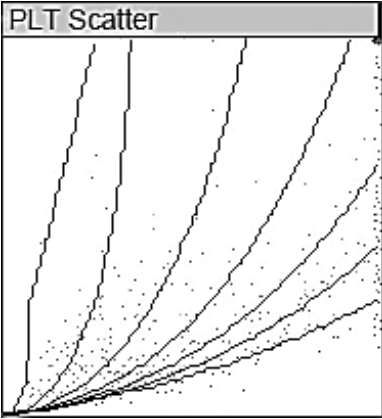
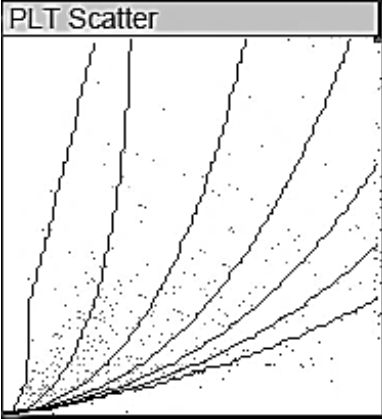
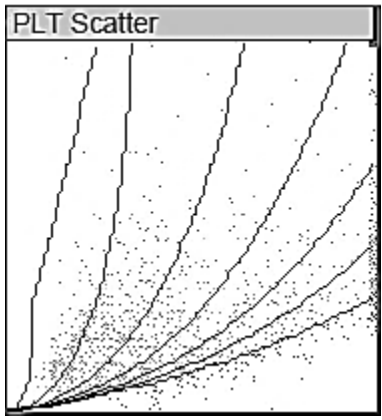
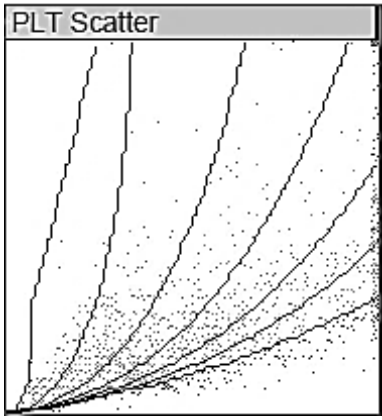
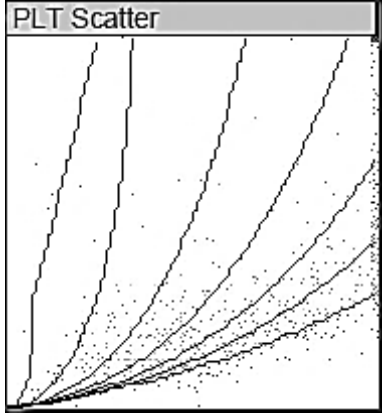
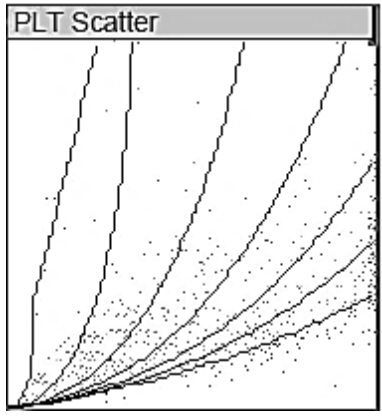
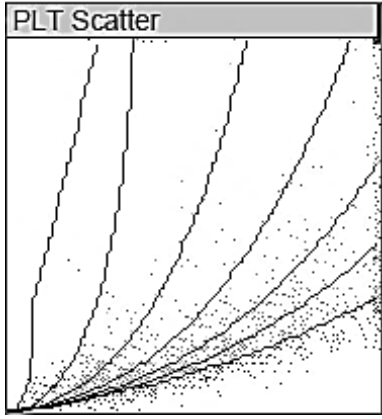
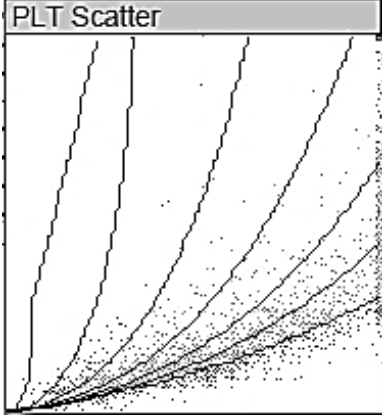
Pferd	Test [%]	T0 <sup>#</sup>	T6	T12	T24 <sup>##</sup>	T48 <sup>##</sup>	T72 <sup>##</sup>	T96 <sup>##</sup>	T144	T192	T240
<b>1</b>	ADPtest	259	188	136	139	140	163	150	159	150	260
	ADPtestHS	192	154	113	96	107	106	137	116	147	176
	ASPItest	150	79	60	46	50	54	56	73	74	95
	COLtest	376	401	301	276	411	423	421	150	339	381
<b>2</b>	ADPtest	210	187	222	188	178	146	234	186	217	232
	ADPtestHS	208	160	169	126	159	102	177	191	198	192
	ASPItest	68	47	61	23	53	25	74	83	128	65
	COLtest	280	282	273	275	390	321	333	287	245	327
<b>3</b>	ADPtest	199	48	143	113	127	128	79	169	127	83
	ADPtestHS	136	92	85	76	63	89	79	85	66	131
	ASPItest	133	95	99	36	61	80	24	90	77	52
	COLtest	312	240	222	155	311	276	245	286	263	301
<b>4</b>	ADPtest	158	88	79	64	39	51	56	50	89	80
	ADPtestHS	106	62	67	58	40	34	30	43	66	84
	ASPItest	139	28	14	26	37	39	13	31	74	86
	COLtest	363	278	301	293	277	316	352	365	330	297
<b>5</b>	ADPtest	176	73	66	49	53	64	67	50	72	63
	ADPtestHS	116	25	24	35	31	42	29	23	37	60
	ASPItest	136	21	27	27	33	27	47	38	52	41
	COLtest	284	280	296	348	303	307	229	322	315	351
<b>6</b>	ADPtest	177	110	179	122	119	76	108	114	108	149
	ADPtestHS	126	57	142	97	76	51	74	78	95	120
	ASPItest	152	78	9	29	34	33	60	18	45	38
	COLtest	303	229	424	299	323	345	323	347	277	284
<b>7</b>	ADPtest	185	133	150	141	126	128	73	171	238	203
	ADPtestHS	147	85	123	83	80	144	50	157	152	180
	ASPItest	122	96	74	51	58	53	39	166	193	261
	COLtest	174	160	353	389	302	342	326	211	210	249
<b>8</b>	ADPtest	105	74	70	90	25	28	34	33	33	97
	ADPtestHS	77	55	44	56	15	17	21	26	35	65
	ASPItest	55	9	20	23	14	18	15	37	30	54
	COLtest	264	358	304	360	341	399	343	363	379	393
<b>9</b>	ADPtest	176	144	162	140	128	106	122	117	133	217
	ADPtestHS	115	89	91	49	87	68	72	62	70	100
	ASPItest	174	92	48	89	110	70	65	55	104	127
	COLtest	380	362	369	349	348	359	368	346	353	391
<b>10</b>	ADPtest	164	134	104	122	84	79	105	101	116	272
	ADPtestHS	110	96	69	61	55	44	66	84	125	207
	ASPItest	163	36	56	43	33	84	41	68	100	107
	COLtest	377	380	396	348	347	371	318	386	338	425

## 12 Anhang

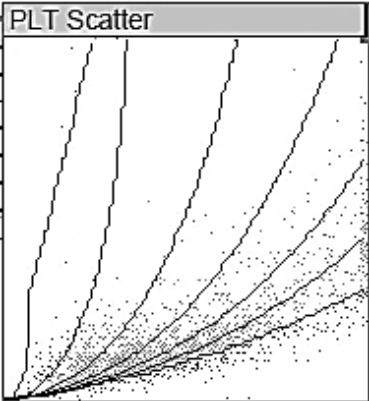
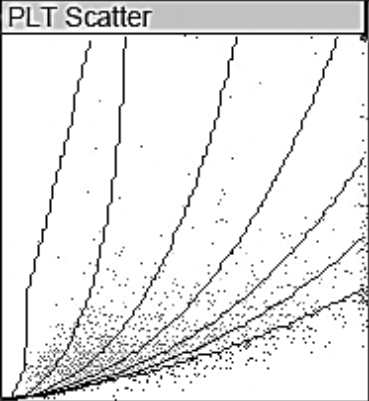
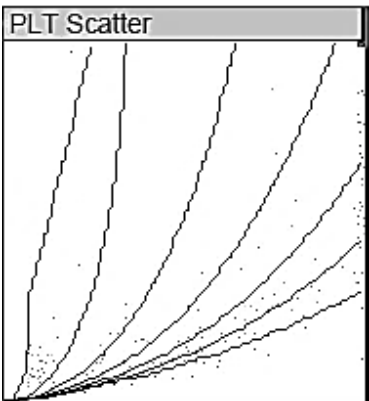
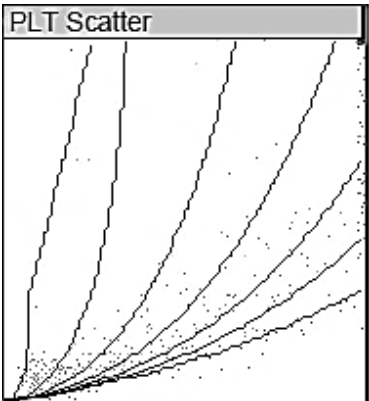
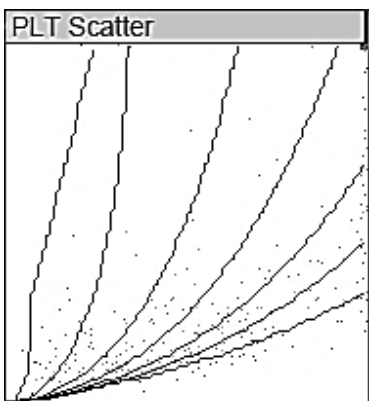
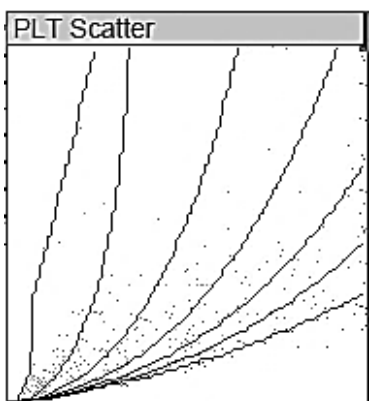
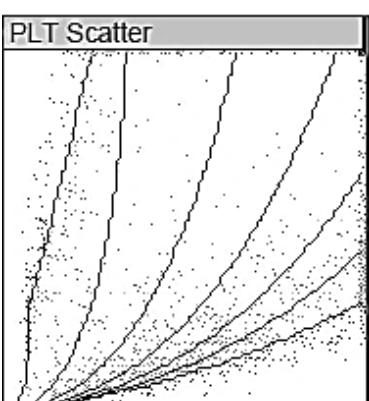
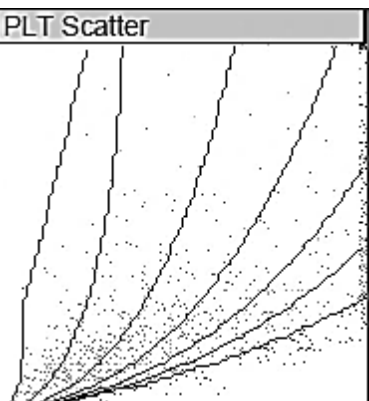
Tabelle 12-28: Thrombozytenfunktion bei Equiden mit systemischer Entzündung (SIRS): Thrombozyten-Zytogramme und PCDW der 20 Individuen am ADVIA® 2120

Pat-ID	K <sub>3</sub> -EDTA	Zitrat
<b>1</b>	 <p style="text-align: center;"><b>PCDW</b> 7,8 [g/dl]</p>	 <p style="text-align: center;"><b>PCDW</b> 8,5 [g/dl]</p>
<b>2</b>	 <p style="text-align: center;"><b>PCDW</b> 6,7 [g/dl]</p>	 <p style="text-align: center;"><b>PCDW</b> 9,2 [g/dl]</p>
<b>3</b>	keine Messung Brechungsindex, daher keine Werte MPC, PCDW und kein Zytogramm	
		 <p style="text-align: center;"><b>PCDW</b> 8,3 [g/dl]</p>
<b>4</b>	 <p style="text-align: center;"><b>PCDW</b> 8,4 [g/dl]</p>	 <p style="text-align: center;"><b>PCDW</b> 8,4 [g/dl]</p>

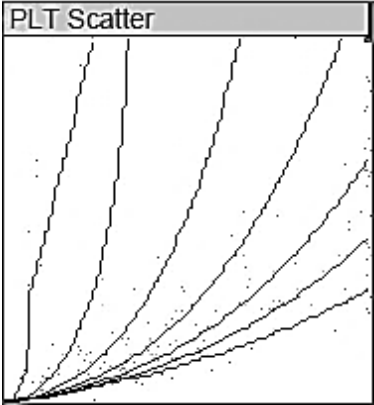
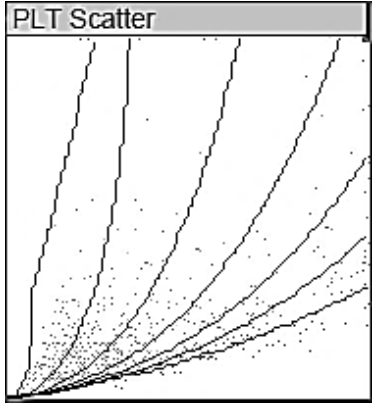
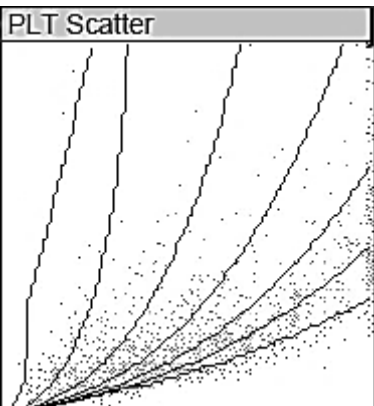
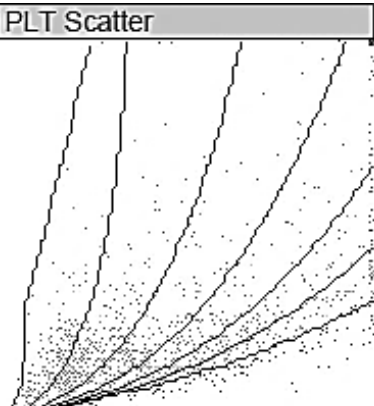
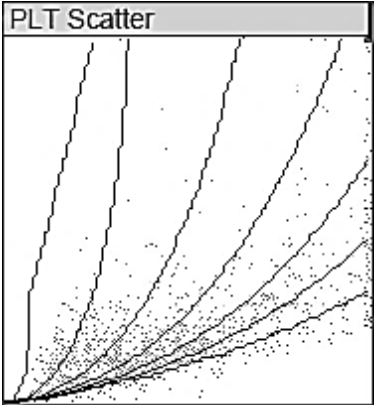
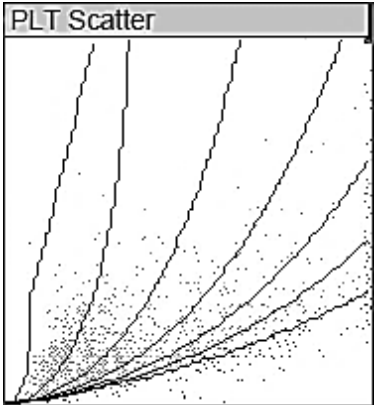
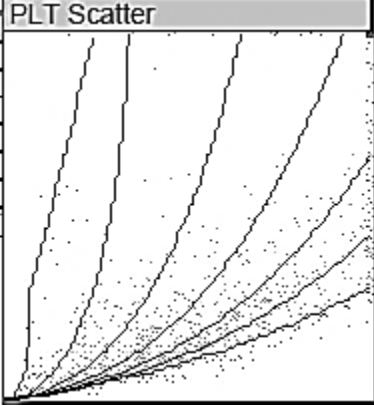
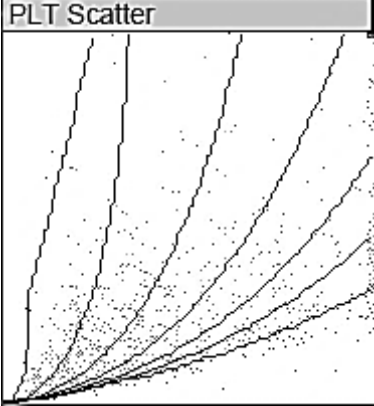
12 Anhang

Pat-ID	K <sub>3</sub> -EDTA	Zitrat
5	 <p>PLT Scatter</p> <p>PCDW 9,4 [g/dl]</p>	 <p>PLT Scatter</p> <p>PCDW 8,0 [g/dl]</p>
6	 <p>PLT Scatter</p> <p>PCDW 9,0 [g/dl]</p>	 <p>PLT Scatter</p> <p>PCDW 8,5 [g/dl]</p>
7	 <p>PLT Scatter</p> <p>PCDW 7,7 [g/dl]</p>	 <p>PLT Scatter</p> <p>PCDW 8,9 [g/dl]</p>
8	 <p>PLT Scatter</p> <p>PCDW 7,6 [g/dl]</p>	 <p>PLT Scatter</p> <p>PCDW 6,5 [g/dl]</p>

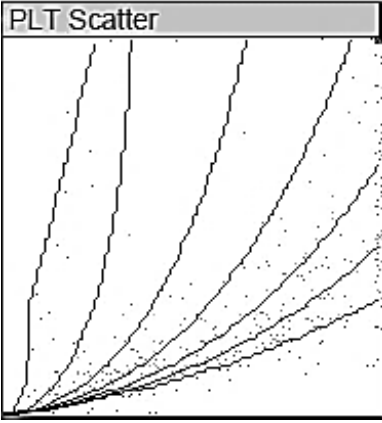
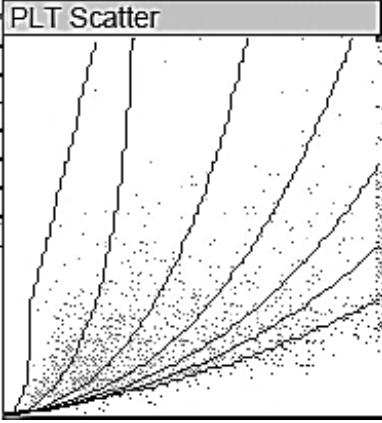
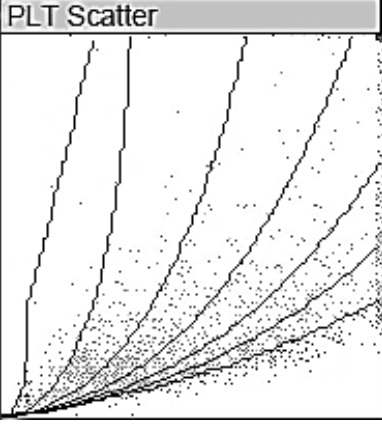
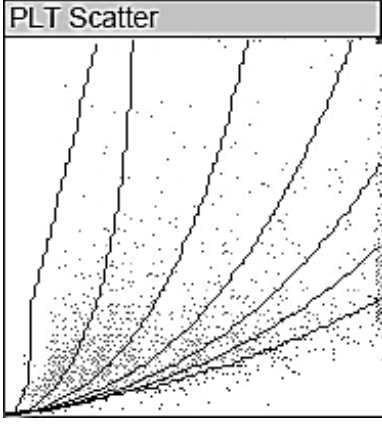
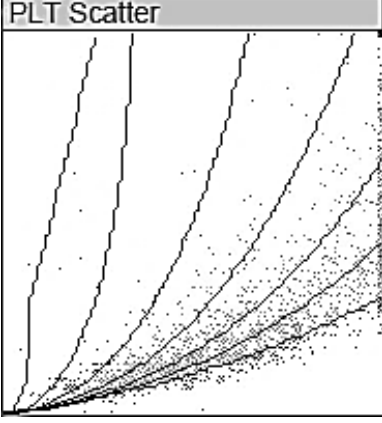
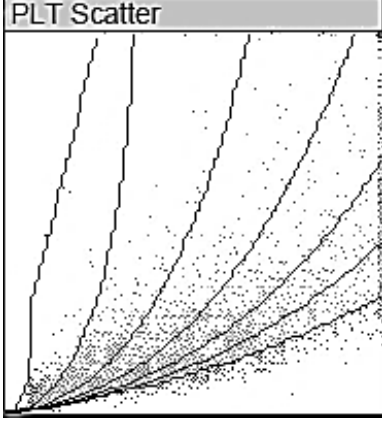
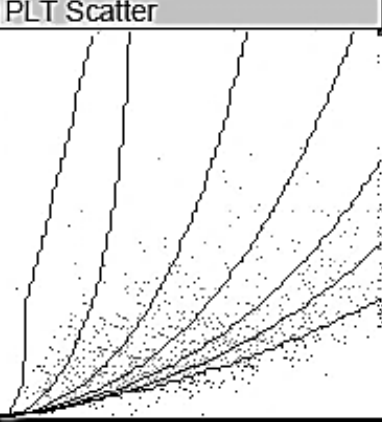
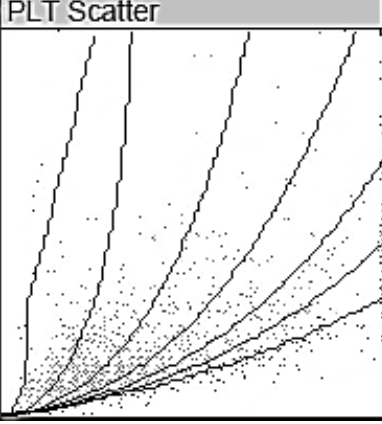
12 Anhang

Pat-ID	K <sub>3</sub> -EDTA	Zitrat
9	 <p data-bbox="778 443 858 542">PCDW 7,8 [g/dl]</p>	 <p data-bbox="1311 443 1391 542">PCDW 8,7 [g/dl]</p>
10	 <p data-bbox="778 878 858 976">PCDW 10,2 [g/dl]</p>	 <p data-bbox="1311 878 1391 976">PCDW 8,7 [g/dl]</p>
11	 <p data-bbox="778 1312 858 1411">PCDW 8,2 [g/dl]</p>	 <p data-bbox="1311 1312 1391 1411">PCDW 9,4 [g/dl]</p>
12	 <p data-bbox="778 1747 858 1845">PCDW 10,2 [g/dl]</p>	 <p data-bbox="1311 1747 1391 1845">PCDW 8,9 [g/dl]</p>

12 Anhang

Pat-ID	K <sub>3</sub> -EDTA	Zitrat
13	 <p data-bbox="778 443 858 544">PCDW 7,7 [g/dl]</p>	 <p data-bbox="1310 443 1390 544">PCDW 8,8 [g/dl]</p>
14	 <p data-bbox="778 880 858 981">PCDW 8,4 [g/dl]</p>	 <p data-bbox="1310 880 1390 981">PCDW 9,2 [g/dl]</p>
15	 <p data-bbox="778 1339 858 1440">PCDW 8,4 [g/dl]</p>	 <p data-bbox="1310 1339 1390 1440">PCDW 8,7 [g/dl]</p>
16	 <p data-bbox="778 1798 858 1899">PCDW 7,8 [g/dl]</p>	 <p data-bbox="1310 1798 1390 1899">PCDW 8,9 [g/dl]</p>

12 Anhang

Pat-ID	K <sub>3</sub> -EDTA	Zitrat
17	 <p>PLT Scatter</p> <p>PCDW 7,5 [g/dl]</p>	 <p>PLT Scatter</p> <p>PCDW 9,0 [g/dl]</p>
18	 <p>PLT Scatter</p> <p>PCDW 8,8 [g/dl]</p>	 <p>PLT Scatter</p> <p>PCDW 9,0 [g/dl]</p>
19	 <p>PLT Scatter</p> <p>PCDW 5,7 [g/dl]</p>	 <p>PLT Scatter</p> <p>PCDW 8,2 [g/dl]</p>
20	 <p>PLT Scatter</p> <p>PCDW 8,8 [g/dl]</p>	 <p>PLT Scatter</p> <p>PCDW 8,3 [g/dl]</p>

## 12 Anhang

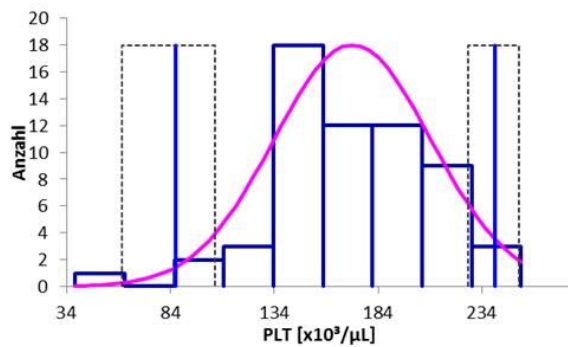
Abbildung 12-1: ADVIA® 2120 - Diskussion: Histogramme der Thrombozytenzählung der klinisch unauffälligen Kleinpferde (Reference Value Advisor, V2.1)

1: K<sub>3</sub>-EDTA, n = 60; 2: K<sub>3</sub>-EDTA, n = 58, Ausschluss der EDTA-PTCP; 3: Zitrat, n = 60

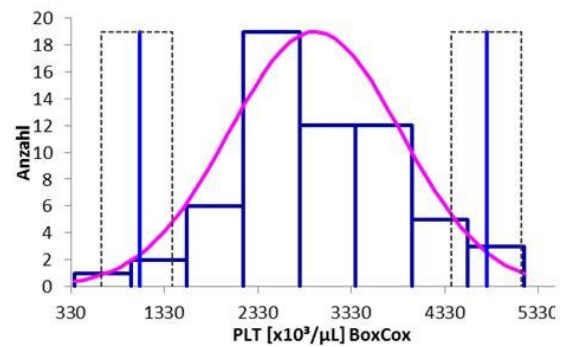
A: nichtparametrisch robust; B: Box-Cox-Transformation

Dunkelblaue Balken: gemessene Verteilung; Pinke Kurve: angepasste Verteilung; blaue senkrechte Linien: Referenzlimits, gestichelte graue senkrechte Linien: 90% Konfidenzintervall

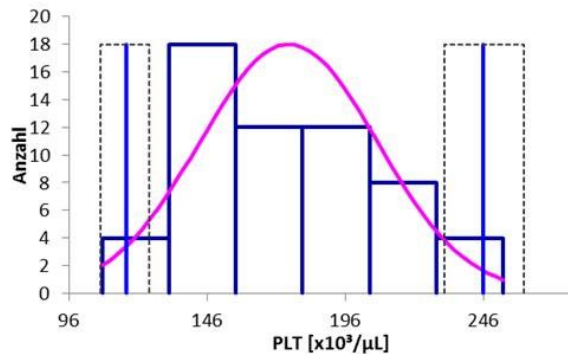
**1 A**



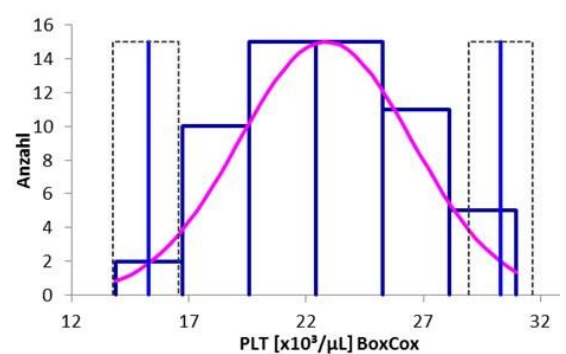
**1 B**



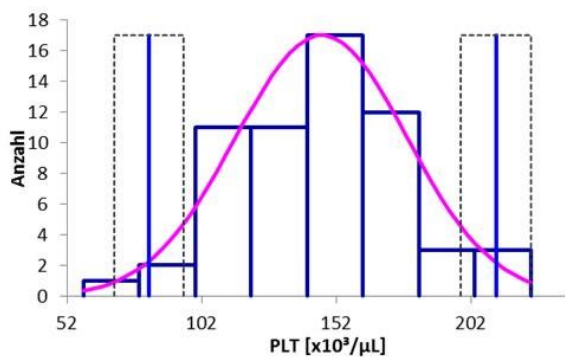
**2 A**



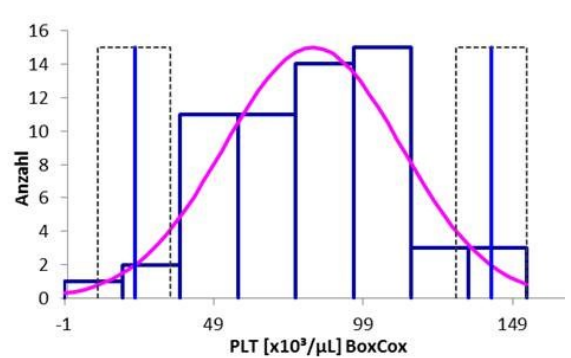
**2 B**



**3 A**



**3 B**



## 12 Anhang

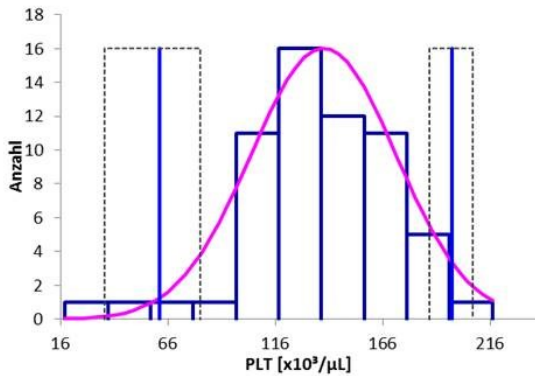
Abbildung 12-2: ADVIA® 2120 - Diskussion: Histogramme der Thrombozytenzählung der klinisch unauffälligen Warmblüter (Reference Value Advisor, V2.1)

1: K<sub>3</sub>-EDTA, n = 60; 2: K<sub>3</sub>-EDTA, n = 57, Ausschluss der EDTA-PTCP; 3: Zitrat, n = 60

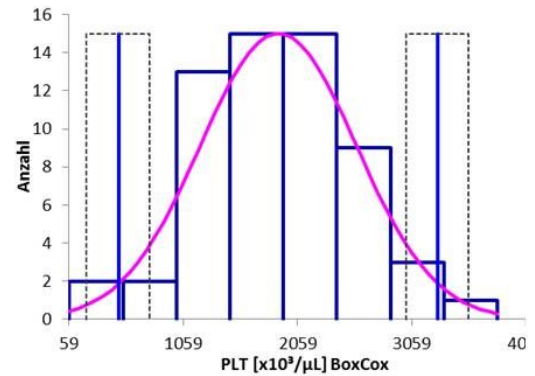
A: nichtparametrisch robust; B: Box-Cox-Transformation

Dunkelblaue Balken: gemessene Verteilung; Pinke Kurve: angepasste Verteilung; blaue senkrechte Linien: Referenzlimits, gestichelte senkrechte Linien: 90% Konfidenzintervall

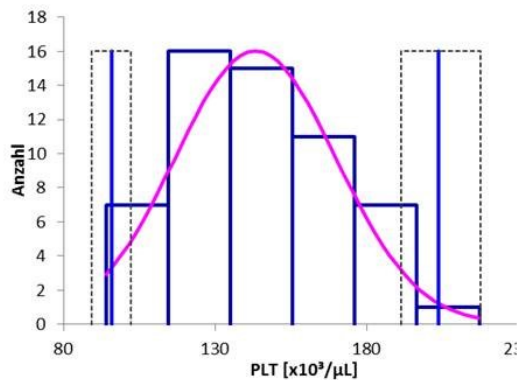
**1 A**



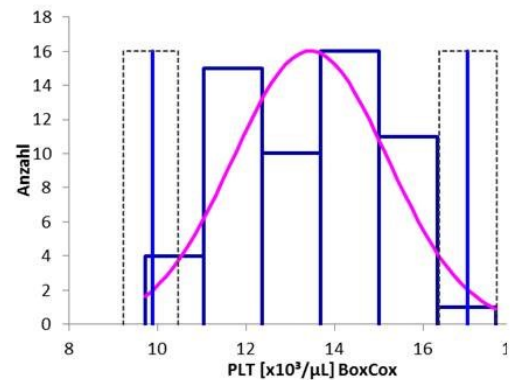
**1 B**



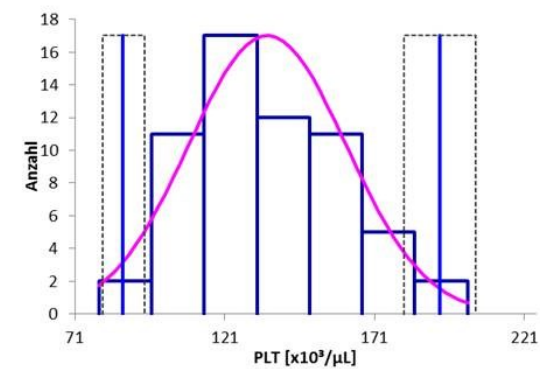
**2 A**



**2 B**



**3 A**



**3 B**

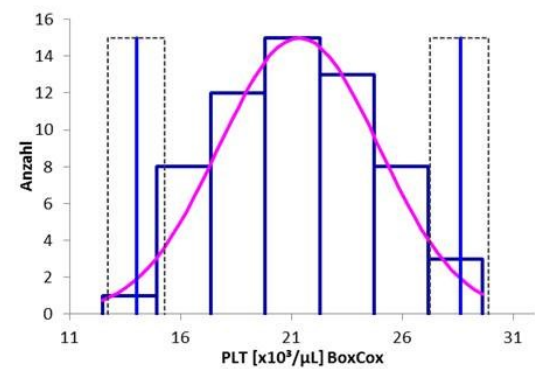
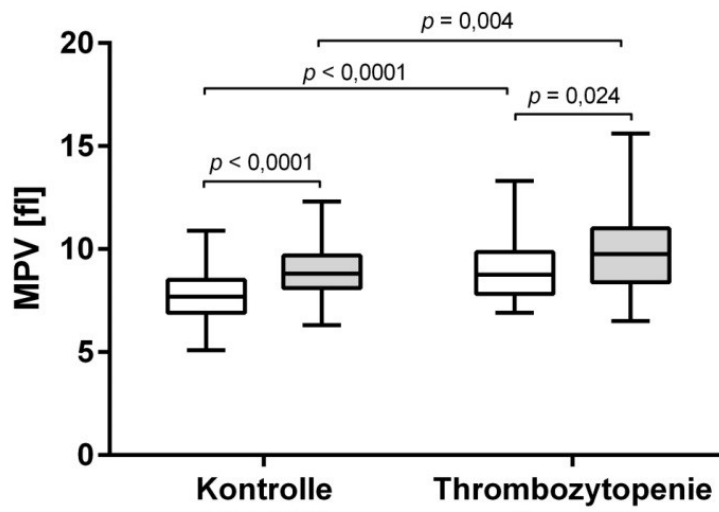


Abbildung 12-3: MPV [fl] bei klinisch unauffälligen Equiden (n = 120) und Equiden mit Thrombozytopenie (n = 22) im K<sub>3</sub>-EDTA-Blut (weiße Box) und Zitratblut (graue Box); ; (Median, 25/75%, min-max)





### 13 DANKSAGUNG

Ich möchte allen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, auch wenn sie im Folgenden nicht namentlich erwähnt werden.

Unserem ehemaligen Chef Herrn Prof. Hermann Sasse danke ich dafür, dass er mir 2003 die Möglichkeit gegeben hat aus der Praxis an die Universität zurückzukehren, nachdem ich eigentlich nach der Dissertation mit der akademischen Karriere abgeschlossen hatte.

Frau Prof. Kerstin Fey, die mich in meiner gesamten wissenschaftlichen Karriere und auch in vielen anderen Lebenslagen in den vergangenen mehr als 2 Jahrzehnten immer gefördert und unterstützt hat gilt ein ganz besonderer Dank. Nur durch ihr unerschütterliches Vertrauen in meine wissenschaftlichen Ideen konnte ich eigenständig meine Pläne verwirklichen und letztlich diese Arbeit fertigstellen. Nicht ganz unbeteiligt am Gelingen der Arbeit ist auch Herr Prof. Andreas Moritz. Ohne die vielen Diskussionen zur Methodik und den Messergebnissen von "seinem" ADVIA, Finanzierung vieler Laboruntersuchungen und fachlicher Unterstützung bei der Methodenetablierung der Fluoreszenz-Durchflusszytometrie des Dissertationsprojektes von Kim Theuerkauf wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Die letztgenannten Untersuchungen waren darüber hinaus nur durch die vollkommen unkomplizierte Kooperation mit Herrn Prof. Carsten Staszuk und seiner Doktorandin Dr. Carmen Obach-Schröck möglich. Diese Kooperation beinhaltete nicht nur die Benutzung des Gerätes, sondern vor allem die umfangreiche fachliche Unterstützung bei der schwierigen Methodenetablierung im Rahmen zahlreicher Treffen.

Die praktische Durchführung der meisten Untersuchungen dieser Arbeit wäre ohne die fleißige und oft auch nächtliche Arbeit der Doktorandinnen Julia Engel, Dr. Lisa Held, Emma Hübers und Kim Theuerkauf unmöglich gewesen – einen ganz besonders großen Dank hierfür!

Nicht zuletzt gilt mein Dank dem Team des Zentrallabors: Martina Becker, Claudia Bender, Walter Gilbert, Elisabeth Jüngst-Carter und Sabine Zielinsky. Ohne ihre kollegiale Unterstützung wären laborbasierte Arbeiten wie die meine in der Durchführung nicht möglich. Die statistischen Berechnungen wären ohne die Unterstützung von Herrn Dr. Klaus Failing, seiner Mitarbeiterin Frau Sparenberg und Frau Prof. Natali Bauer ebenfalls nicht möglich gewesen.

Ein großer Dank auch allen aktiven und ehemaligen Tierärztinnen, Tierärzten, Tierpflegerinnen, Tierpflegern, Famulantinnen und Famulanten der Klinik für die

## 13 Danksagung

---

Unterstützung in der praktischen Durchführung vieler Untersuchungen und dafür, dass sie mich auch in angespannten Situationen moralisch unterstützt und ertragen haben!

Der größte Dank gilt natürlich meiner Familie: meiner Mutter und meinem leider viel zu früh verstorbenen Vater, ohne deren Unterstützung weder mein Studium noch meine weitere wissenschaftliche Karriere möglich gewesen wären und Steffen einfach dafür, dass er da ist.



ISBN  
978-3-86345-503-3

**Verlag der DVG Service GmbH**  
Friedrichstraße 17 • 35392 Gießen  
Tel.: 0641 / 24466 • Fax: 0641 / 25375  
E-Mail: [info@dvg.de](mailto:info@dvg.de) • Web: [www.dvg.de](http://www.dvg.de)