

**Aus dem Zentrum der Inneren Medizin des Klinikums
der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main
Medizinische Klinik III**

**Schwerpunkt : Hämostaseologie
Direktor: Prof. Dr. med. A. Zeiher**

**Präanalytische Bedingungen
zur Untersuchung der
von Willebrand-Faktor-Parameter**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
des Fachbereiches Humanmedizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main**

vorgelegt von

**Susanne Täschner
aus Leipzig**

Frankfurt am Main, 2005

Dekan: Prof. Dr. J. Pfeilschifter

Referentin: Prof. Dr. I. Scharrer

Koreffferent: Prof. Dr. V. Seifert

Tag der mündlichen Prüfung: 09.05.2006

Inhaltsverzeichnis

1. Abstract	1
2. Einleitung	3
3. Material und Methoden	8
3.1. Blutentnahme	8
3.2. Herstellung der Plasmaproben	9
3.3. Testverfahren	11
3.3.1. Ristocetin-Cofaktor	11
3.3.2. von Willebrand-Faktor-Antigen	12
3.3.3. APTT	15
3.3.4. Faktor VIII-Aktivität	17
3.3.5. Kollagen-Bindungstest	19
3.4. Probanden	22
3.5. Methode der statistischen Auswertung	24
4. Ergebnisse	27
4.1. Kontrollgruppe	27
4.1.1. Ristocetin-Cofaktor	28
4.1.2. von Willebrand-Faktor-Antigen	30
4.1.3. APTT	31
4.1.4. Faktor VIII-Aktivität	33
4.1.5. Kollagen-Bindungstest	34
4.1.6. Ristocetin-Cofaktor - VWF-Antigen –Quotient	36
4.1.7. Kollagenbindungstest - VWF-Antigen – Quotient	37
4.1.8. Signifikanz	38
4.1.9. graphische Zusammenfassung	41
4.2. von Willebrand Patienten, Typ 1	42
4.2.1. Ristocetin-Cofaktor	43
4.2.2. von Willebrand-Faktor-Antigen	44
4.2.3. APTT	46

4.2.4. Faktor VIII-Aktivität	47
4.2.5. Kollagen-Bindungstest	49
4.2.6. Ristocetin-Cofaktor - VWF-Antigen –Quotient	50
4.2.7. Kollagenbindungstest - VWF-Antigen – Quotient	52
4.2.8. Signifikanz	53
4.2.9. graphische Zusammenfassung	56
4.3. von Willebrand Patienten, Typ 2	57
4.3.1. Ristocetin-Cofaktor	58
4.3.2. von Willebrand-Faktor-Antigen	59
4.3.3. APTT	60
4.3.4. Faktor VIII-Aktivität	61
4.3.5. Kollagen-Bindungstest	62
4.3.6. Ristocetin-Cofaktor - VWF-Antigen –Quotient	63
4.3.7. Kollagenbindungstest - VWF-Antigen – Quotient	64
4.3.8. Signifikanz	65
4.3.9. graphische Zusammenfassung	68
4.4. Patienten der Neurochirurgie	69
4.4.1. Ristocetin-Cofaktor	70
4.4.2. von Willebrand-Faktor-Antigen	71
4.4.3. APTT	73
4.4.4. Faktor VIII-Aktivität	74
4.4.5. Kollagen-Bindungstest	76
4.4.6. Ristocetin-Cofaktor - VWF-Antigen –Quotient	77
4.4.7. Kollagenbindungstest - VWF-Antigen – Quotient	79
4.4.8. Signifikanz	80
4.4.9. graphische Zusammenfassung	83
4.5. Pearson-Korrelation aller Probanden	84
4.5.1. Pearson-Korrelation zwischen Ausgangswert und relativem Verlust bei sechsständiger Lagerung von Citratvollblut bei –5°C (Kühlakku)	84

4.5.2. Pearson-Korrelation zwischen den Veränderungen verschiedener VWF-Parameter bei sechsstündiger Lagerung bei -5°C (Kühlakku)	84
5. Diskussion	86
5.1. Ristocetin-Cofaktor	89
5.2. von Willebrand-Faktor-Antigen	91
5.3. APTT	92
5.4. Faktor VIII-Aktivität	95
5.5. Kollagen-Bindungstest	96
5.6. Ristocetin-Cofaktor - VWF-Antigen –Quotient	98
5.7. Kollagenbindungstest - VWF-Antigen – Quotient	99
5.8. Pearson-Korrelation aller Probanden	101
5.8.1. Pearson-Korrelation zwischen Ausgangswert und relativem Verlust bei sechsstündiger Lagerung von Citratvollblut bei -5°C (Kühlakku)	101
5.8.2. Pearson-Korrelation zwischen den Veränderungen verschiedener VWF-Parameter bei sechsstündiger Lagerung bei -5°C (Kühlakku)	101
5.9. Empfehlungen für die Behandlung von Blutproben für die Gerinnungsdiagnostik	104
6. Zusammenfassung	106
7. Literatur	108
8. Danksagung	121
9. Lebenslauf	122
10. Ehrenwörtliche Erklärung	123

1. Abstract

The importance of pre-analytic conditions on the determination of VWF parameters

It is well established that cold promotes a shortening of PT by FXII mediated activation of FVII in whole blood and in plasma (Palmer et al, 1984). Favalaro et al. (2001) found that cold promotes a reduction of the high-molecular vWF-Multimers in samples stored as citrated whole blood at 4°C. However the effect of low temperature on vWF parameters has not been studied in detail. We therefore conducted a study to investigate the pre-analytic processing of blood samples on VWF:RCo, VWF:Ag, VWF:CB, APTT and FVIII:C. We collected 90 ml citrated blood from 10 apparently healthy individuals, 10 patients with mild VWD, type 1, 5 patients with VWD, type 2 and 10 patients from a neurochirurgical station. 30 ml of the blood was directly centrifuged (40 min, 4°C and 4000g) and either immediately frozen at -80°C (normally processed) or stored at room-temperature (RT) or on crashed ice for 3 and 6 hours, respectively. The remaining citrated whole blood was either stored at RT, on crashed ice or between two iced-storage akkus for 3 and 6 hours prior centrifugation and storage at -80°C.

Storage on crashed ice or between two iced-storage akkus as citrated whole blood induced in samples from healthy individuals, from patients with VWD, type 1 and from patients from the neurochirurgical station a time dependent decrease of VWF:RCo, VWF:Ag, VWF:CB and FVIII:C and a lengthening of APTT.

There was a significant reduction of all investigated parameters ($p < 0,05$, Wilcoxon-matched-pairs-test) in samples from healthy individuals stored as citrated whole blood on crashed ice or between two iced-storage akkus in all test we have done. In addition we found a significant reduction of VWF:CB in samples were stored as plasma at RT for three hours. FVIII:C was significant reduced under all investigated storage condition except storage of citrated whole blood at RT for three hours. APTT was significant prolonged under all storage conditions.

The patients with mild VWD, type 1 demonstrated a significant reduction of all investigated parameters ($p < 0,05$, Wilcoxon-matched-pairs-test) in samples stored as citrated whole blood on crashed ice or between two iced-storage. In addition we found a significant reduction of vWF:Ag stored as plasma at RT for three hours and for every storage conditions for APTT and FVIII:C.

The patients from the neurochirurgical station showed a significant reduction of ($p < 0,05$, Wilcoxon-matched-pairs-test) the samples stored as plasma at RT for three or six hours (VWF:Ag), in samples stored as citrated whole blood on crashed ice for six hours or between two iced-storage akkus for three or six hours (VWF:RCo), in samples stored as citrated whole blood between two iced-storage akkus for six hours (VWF:CB). FVIII:C was significant reduced under all investigated storage condition. APTT was significant prolonged under all storage conditions except storage of citrated whole blood at RT for three hours.

Three of the five patients with VWD, type 2 showed in the normally processed sample unmeasurable VWF:RCo ($< 5\%$). Storage of citrated whole blood on crashed ice did not induce a significant loss of VWF:Ag, VWF:Rco, FVIII:C, VWF:CB and a lengthening of APTT in these patients with VWD. For patients with VWD, type 2 we did not find any significant change for storage as plasma or as citrated whole blood.

We thus suggest that the drastic cold-induced loss of VWF:RCo, VWF:Ag, VWF:CB, FVIII:C and the lengthening of APTT is dependent on the presence of platelets and of HMW:VWF.

It is well established, that cold induces an extensive platelet shape change by intracellular cytoskeletal rearrangement (Berger et al, 1998). It has recently been shown that chilling of platelets induces a clustering of the GPIb receptor on the cell surface. (Hoffmeister et al, 2003). We hypothesise that cold-induced loss of VWF in citrated whole blood is due to cold-promoted binding of VWF to platelets probably due to increased susceptibility of GPIb α subunit for VWF.

Our results demonstrate that blood destined for analysing VWF parameters should be stored at RT rather than at 4°C.

2. Einleitung

Die Erstbeschreibung des von Willebrand-Syndroms als „Hereditär Pseudothrombophilie“ erfolgte durch Erik Adolf von Willebrand im Jahre 1926, nachdem er bei 62 Bewohnern der finnischen Åland-Inseln eine bis dahin noch nicht bekannte Form einer angeborenen Blutungsneigung feststellte.

Das Gen des von Willebrand-Faktors besteht aus 52 Exons und 51 Introns und ist auf dem kurzen Arm des Chromosoms 12 (12p12 (Ruggeri, 1999)) lokalisiert (Mazurier et al, 1996; Scharrer, 1997). Der von Willebrand-Faktor (VWF) wird im menschlichen Körper von Endothelzellen und Megakaryozyten als primäres Translationsprodukt einer Größe von 2813 Aminosäuren synthetisiert (Jaffe et al, 1974; Nachman et al, 1977; Schlokot et al, 1995). In der intrazellulären Reifung wird zunächst ein 22 Aminosäuren langes Sekretionspeptid abgespalten, die entstandenen Monomere werden sulfatiert, glykosiliert und am carboxyterminalen Ende zum Protomer dimerisiert. Anschließend erfolgt die Multimerisierung der Dimere über Disulfidbrücken am N-terminalen Ende und die Abspaltung der 741 Aminosäuren langen Propeptide (Schneppenheim, 1997). Die Multimere, welche eine wichtige Rolle in der Thrombozytenadhäsion und -aggregation spielen, werden vom Endothel ins Blut sezerniert oder in den Weibel-Palade-Körpern gespeichert. Ein weiterer Speicherort sind die α -Granuolen der Thrombozyten. (Schlokot et al, 1995). Die VWF-Multimere mit dem höchsten Molekulargewicht zeigen auch den größten Einfluss auf die Hämostase (Federici et al, 1989; Fischer et al, 1996; Santoro, 1983). Die Plasmakonzentration des VWF beträgt ca. 7mg/l, seine Größe variiert zwischen 250 000 Dalton (Monomer) bis ca. $20 \cdot 10^6$ Dalton (Multimere) (Müller, 1993; Ruggeri, 1999; Sadler, 1998). Die Plasmahalbwertszeit ist biphasisch mit einer ersten Halbwertszeit von drei Stunden und einer langsameren Halbwertszeit von 12 bis 24 Stunden (Barthels et al, 2002).

Während der primären Hämostase vermittelt der von Willebrand-Faktor, besonders bei hohen Strömungsgeschwindigkeiten (Budde et al, 1999; Ruggeri et al, 1999; Wu et al, 2000), die Adhäsion der Thrombozyten sowohl untereinander als auch an das Subendothel. VWF verbindet sich mit dem Subendothel und vollzieht einen Konformationswechsel, anschließend koppelt er mit seiner A1-Domäne an den GP Ib/IX Rezeptor der Thrombozyten und initiiert die reversible Plättchenadhäsion. Durch ein intrazelluläres Signal produzieren die Plättchen einen GPIIb/IIIa-Komplex auf ihrer Membran, der VWF bindet mit seiner C1-Domäne (RGD-Sequenz (Berliner et al, 1988; Bombeli, 2002)) dort, es kommt zu einer irreversiblen Adhäsion und Aggregation der Thrombozyten. Für die Förderung der Thrombozytenaggregation sind besonders die größten Multimere geeignet, da sie mit ihren

zahlreichen Bindungsstellen eine optimale Vernetzung gewährleisten (von Depka Prondzinski, 2002). Außerdem bindet VWF an seinem N-terminalen Ende den zirkulierenden Faktor VIII und schützt diesen dadurch vor der Inaktivierung durch Protein C oder Faktor Xa und verlängert so dessen Halbwertszeit (Mazurier et al, 1996) von einer Stunde auf zwölf Stunden (Lutze et al, 1999).

Das von Willebrand-Syndrom kann angeboren oder erworben sein. Erworbene Formen des von Willebrand-Syndroms können durch stenosierende Herzvitien mit erhöhten Scherkräften des Blutes und dadurch bedingten Verlust der großen Multimere (Gill et al, 1986; Pareti et al, 2000; von Depka Prondzinski, 2002), Systemischen Lupus erythematodes, B-Zell-Neoplasien, maligne Neoplasien (Budde et al, 1984; Jakway, 1991), Makroglobulinämie Waldenström, Hypothyreose (Dalton et al, 1987) und Medikamente (Griseofulvin, Ciprofloxacin, Valproinsäure, Carbamazepin, HAES, Gelatine) verursacht werden, alle beschriebenen Fälle waren entweder Typ 1 oder Typ 2a (Berkowitz et al, 1995).

Das von Willebrand-Syndrom kann in verschiedene Typen unterteilt werden. Typ 1 und 3 stellen einen quantitativen Defekt des VWF dar, Typ 2 liegt hingegen ein qualitativer Defekt zu Grunde.

VWS, Typ 1 (100 pro eine Million Einwohner, ca. 70% bis 75% aller Patienten (Berkowitz et al, 1995)) wird autosomal dominant vererbt und zeigt eine Vielzahl an Mutationen. Viele der betroffenen Patienten besitzen die Blutgruppe 0, bei der die VWF-Parameter um ca. 25% bis 35% reduziert sind (Israels et al, 2002; Sarode et al, 2000).

Dem autosomal rezessiv vererbten Typ 3 (0,5 bis 5 Patienten pro eine Million Einwohner (Mazurier et al, 1996), ca. 6% bis 17% aller Patienten (Tilsner et al, 1986)) liegen ebenfalls mehrere Mutationen (33 (Favaloro, 1999)) zu Grunde, die häufigste in der deutschen Bevölkerung ist eine Leserastermutation im Exon 18 (Schneppenheim, 1997).

Von Willebrand-Syndrom Typ 2 (12% bis 23% der Patienten (Tilsner et al, 1986)) kann in die Typen 2a, 2b, 2m und 2n unterteilt werden. Der autosomal dominant oder rezessiv vererbte Typ 2a (10% bis 15% der Patienten (von Depka Prondzinski, 2002)) besitzt 54 Mutationen (Favaloro, 1999), mit einem Defekt der A2 Domäne (Israels et al, 2002). Dieser ist durch die Abwesenheit von großen und intermediären Multimeren im Plasma und in den Plättchen (Scharrer, 1997) gekennzeichnet. Der autosomal dominant vererbte Typ 2b (5% der Patienten (von Depka Prondzinski, 2002)), besitzt eine gesteigerte Affinität für den Thrombozytenrezeptor GPIIb/IIIa (A1 Domäne) (Nichols et al, 1997; (Sadler, 1994) und weist einen Verbrauch großer Multimere (Schneppenheim, 1997) auf. Bei ihm wurden 45 Mutationen nachgewiesen (Favaloro, 1999). Der autosomal rezessiv vererbte Typ 2n (3% der

Patienten (von Depka Prondzinski, 2002)) besitzt eine gestörte Faktor VIII-Bindung mit der Folge einer erniedrigten Faktor VIII-Aktivität durch multiple Mutationen (28 (Favaloro, 1999)) am N-terminalen Bereich des VWF (Domäne D' und D3), wobei 73% eine Mutation am Exon 20 zeigen (Eikenboom et al, 1993). Eine sehr seltene Form ist der autosomal dominant vererbte Typ 2m (<1% der Patienten (Bombeli, 2002) mit Mutationen der A1 Domäne (Hillery et al, 1998; Israels et al, 2002) und damit verbundener verminderter Plättchenbindung, die nicht auf dem Fehlen hochmolekularer VWF-Multimere beruhen (Hiller et al, 1998).

Für die Diagnose des von Willebrand-Syndroms werden Anamnese, Blutungszeit, APTT als orientierende Diagnostik, Faktor VIII-Aktivität, Ristocetin-Cofaktor und VWF-Antigen als erweiterte Diagnostik und der Kollagen-Bindungstest, Ristocetin-induzierte Aggregation (RIPA), Multimeranalyse, VWF-Parameter in Thrombozyten und Faktor VIII-Bindungskapazität des VWF als spezielle Diagnostik empfohlen (Budde et al, 1999).

Beim VWS, Typ 1 sind VWF-Antigen, Ristocetin-Cofaktor, Kollagen-Bindungstest und Faktor VIII-Aktivität erniedrigt. Die Faktor VIII-Aktivität und VWF sind reduziert, wobei die relative Verminderung der beiden Faktoren meistens gleich groß ist (Berkowitz, 1995). Die APTT korreliert mit der Faktor VIII-Aktivität und ist bei milden VWS meistens normal (Israels et al, 2002).

Beim VWS, Typ 2 ist VWF-Antigen, Ristocetin-Cofaktor und VWF:CB erniedrigt und Faktor VIII-Aktivität vermindert oder normal. Die Funktionstests (Ristocetin-Cofaktor, Kollagenbindungstest) fallen bei Typ 2a, 2b und 2m meist niedriger aus, als die Konzentration des VWF:Ag (Barthels, 2002; Favaloro, 1999)

Beim Typ 2a fehlen die großen und mittelgroßen Multimere im Plasma und den Thrombozyten. Beim Typ 2b fehlen die großen Multimere im Plasma, sind jedoch in den Thrombozyten vorhanden. Beim Typ 2n ist nur die Faktor VIII-Aktivität erniedrigt (2% bis 25% (Bombeli, 2002)), VWF-Antigen, Ristocetin-Cofaktor und die Multimere im Plasma und in den Thrombozyten sind normal. Beim Typ 2m ist der Ristocetin-Cofaktor vermindert, Faktor VIII-Aktivität und VWF-Antigen sind normal, die Multimere zeigen normale oder abnormale Strukturen.

Beim Typ 3 beträgt das VWF-Antigen <1%, Faktor VIII-Aktivität liegt bei 2% bis 10% und Ristocetin-Cofaktor, VWF:CB und alle Multimere fehlen (Beutel et al, 2000; Budde et al, 1999; Heimpel et al, 1996; Israels et al, 2002)).

Die VWF:RCo/VWF:Ag und VWF:CB/VWF:Ag zeigen eine deutliche Abhängigkeit von der Multimerisation (Barthels, 1987). Ristocetin-Cofaktor und Kollagen-Bindungstest reagieren auf den Verlust der großen Multimere aus dem zirkulierenden Blut (Israels et al, 2002).

Typisch für das von Willebrand-Syndrom sind Schleimhautblutungen aus Nase, Mund, Magen-Darm-Trakt, sowie Menorrhagien, außerdem kommt es zu Sofortblutungen und Reblutungen am 7. bis 10. Tag nach operativen Eingriffen. Unter Kontrazeption, am Ende der Schwangerschaft (Ostendorf et al, 1991), im Alter (ab ca. 40 Jahren (Gill et al, 1987)) und nach der Menopause nimmt die Blutungsneigung ab (Scharrer, 1997).

Es treten jedoch nicht nur Veränderungen der Hämostase auf, auch Veränderungen der Gefäßmorphologie werden beschrieben. Es kommt zu einer erhöhten Tortuosität sowie Dilatation der arteriellen und venösen Kapillarschenkel (Stephan et al, 1997). Es wird vermutet, dass die Veränderungen der Gefäßstruktur in engem Zusammenhang mit der Interaktion der Plättchen mit der Gefäßwand (O'Brien, 1996), insbesondere mit der vom VWF vermittelten Interaktion (Foutch, 1993) stehen. Auffällig sind besonders kapilläre Blutungen und extravasale Blutzellen in unterschiedlicher Ausprägung (Mörsdorf et al, 1997). Therapiert wird das von Willebrand Syndrom mit der Gabe von Desmopressin (Minirin®), welches eine Freisetzung des in den Endothelien gespeicherten VWF bewirkt. Bei intravenöser Gabe werden Dosen von 0,4 µg/kg KG, bei nasaler Applikation Dosen von 4 µg/kg KG gegeben. Desmopressin wird bei mäßigen und starken Blutungen sowie bei Operationen eingesetzt. Das Faktor VIII-Hochkonzentrat Haemate® erweist sich als sehr wirksam bei der Behandlung des VWS Typ 3 und des Typs 2b, kann aber auch bei den anderen Typen des VWS gegeben werden. Minirin® sollte bei diesen Typen nicht eingesetzt werden, da es entweder keine Wirkung zeigt (Typ 3) oder die Gefahr der Auslösung einer Thrombozytenagglutination birgt (Typ 2b) (Hiller et al, 1998).

Kälte induziert in Plasma und in Vollblut eine Aktivierung von FVII und eine damit einhergehende Verkürzung der PT (Palmer et al, 1984). Der Einfluss niedriger Temperaturen auf die VWF-Parameter ist demgegenüber bislang nicht systematisch untersucht worden. Favaloro et al. (2001) dokumentierten einen Kälte-induziertem Verlust der hochmolekularen VWF-Multimere bei Lagerung von Vollblut bei 4°C.

Die vorliegende Studie wurde durchgeführt, um den Einfluss der präanalytischen Temperatur- und Lagerungsbedingungen für die Bestimmung der VWF-Parameter eingehender zu untersuchen. Wir untersuchten bei 10 gesunden Personen, 10 Patienten mit von Willebrand-Syndrom Typ 1, 5 Patienten mit VWS Typ 2 und 10 Patienten der neurochirurgischen Klinik

den Einfluss verschiedener Lagerungsbedingungen auf VWF:RCo, VWF:Ag, VWF:CB, APTT und FVIII:C.

3. Material und Methoden

3.1. Blutentnahme

Material:

Venenpunktionsbesteck	Venofix [®] , B.Braun Melsungen AG, Deutschland
Stauschlauch	
Einmalhandschuhe	
Baumwoll-Zellulose-Tupfer	Hartmann Verbandstoffe, Deutschland
Hautdesinfektion	NeoKodan [®] auf Propanol- und Octeniderm [®] -Basis, Schülke & Mayr GmbH, Deutschland
Multiadapter	Sarstedt, Deutschland
Sicherheits-Monovetten [®]	9NC mit Trinatriumcitrat, Sarstedt, Deutschland
Pflaster	Leukosilk S [®] , Beiersdorf AG, Deutschland

Durchführung:

Die Blutentnahme wurde zwischen 8.00 und 9.00 Uhr im Sitzen oder Liegen unter Ruhebedingungen durchgeführt. Nach Anlegen des Stauschlauches und Desinfektion wurde eine oberflächliche Vene der Cubitalregion punktiert und das Schlauchsystem des Punktionsbesteckes vollständig mit Blut gefüllt. Nach Lockern des Stauschlauches wurden die Monovetten[®] mit leichtem Sog bis zur Markierung gefüllt. Pro Patient waren neun Röhrchen a 9 ml (81 ml) erforderlich. Nach Beendigung der Entnahme wurde die Punktionsnadel entfernt und die Einstichstelle mit Tupfer und Pflasterstreifen versorgt. Die gefüllten Monovetten[®] wurden anschließend sofort nach folgendem Schema aufbewahrt (siehe Methode).

Fehlerquellen:

Mögliche Fehlerquellen lagen in der ungenauen Punktion der Vene, wodurch es durch Beimengungen von Gewebsflüssigkeit zur Aktivierung der Gerinnung durch Gewebethrombokinasen (exogene Aktivierung) oder durch Kollagen und Zellfragmente (endogene Aktivierung) kommen konnte. Ein zu starker Sog, eine zu kleinlumige Kanüle, sowie Schaumbildung bei der Blutabnahme könnte ebenfalls die Gerinnung aktivieren und so die gemessenen Gerinnungsparameter erniedrigen (Thomas, 1995). Ebenso konnte eine zu lange oder zu kräftige Stauung am Oberarm die Gerinnung beeinflussen (Greiling et al, 1995) und

zu einer Aktivierung der Fibrinolyse führen (Fiedler et al, 2004). Zum Beispiel verkürzte sich die APTT und es kam zu einer Erhöhung der Faktor VIII-Aktivität um 20% (Lutze et al, 1999). Das auf Grund der großen Menge des abzunehmenden Blutes verwendete Venofix® stellte ebenfalls eine Fehlerquelle dar, da das ungenügende Füllen des Schlauchsystems zu einer verminderten Füllmenge im ersten Röhrchen führen würde, damit wäre das richtige Mischungsverhältnis zwischen Citrat und Blut nicht mehr gegeben und es würde zu einer Verlängerung der Gerinnungszeiten (Lutze et al, 1999) und einer Verminderung der Gerinnungsfaktoren (Fiedler et al, 2004) kommen. Auch auf eine gründliche Mischung der Röhrchen war zu achten, da sonst die einsetzende Gerinnung zu falsch niedrigen Werten geführt hätte. Im Falle einer sichtbaren Gerinnselbildung oder Hämolyse durfte die Probe nicht für eine Gerinnungsanalyse eingesetzt werden, da eine vorzeitige Aktivierung von Gerinnungsfaktoren angenommen werden musste.

Die genaue Beschriftung der Proben vermied das Vertauschen der Blutröhrchen.

3.2. Herstellung der Plasmaproben

Material:

Zentrifuge	Rotina 48RS, Hettich-Zentrifuge, Deutschland
Gefriertruhe	Colora UF 85-300T, Deutschland
Reagenzgläser	Greiner-Bioone, Deutschland
Eppendorffcups	Reagenzgefäße-Microtubes, 1,5ml, Sarstedt, Deutschland
Pipetten	Eppendorff Reference 100 µl, Deutschland Eppendorff Reference 1000 µl, Deutschland
Pipettenspitzen	100 µl, Starlab, Deutschland 1000 µl, Starlab, Deutschland
Trockeneis	
Kühlakkus	Siberin Kühlakku, Italien
Reagenzlashalter	
Parafilm „M“	Laboratory Film – American National Can, USA
Pappkisten	

Durchführung:

Jedem Patienten wurden neun Monovetten mit Trinatriumcitrat a 9 ml Blut (gesamt 81 ml) entnommen. Drei Monovetten wurden sofort bei 4000 U für 40 Minuten zentrifugiert.

Anschließend wurde der Überstand abpipettiert. Es wurden sofort 600 µl für Faktor VIII-Aktivität und APTT, 500 µl für Ristocetin-Cofaktor, je 150 µl für VWF:CB und VWF:Ag und zwei Reserven a 500 µl bei -80°C eingefroren. Der restliche Plasmaüberstand wurde auf zwei Reagenzgläser verteilt und einmal bei Raumtemperatur (ca. 22°C) und einmal in Eis (ca. 4°C) für drei bzw. sechs Stunden gelagert.

Von dem nicht zentrifugierten Vollblut wurden je zwei Röhrchen für drei bzw. sechs Stunden bei Raumtemperatur (ca. 22°C), in Eis (ca. 4°C) oder zwischen zwei Kühllakkus (ca. -5°C) gelagert und anschließend bei 4000 U für 40 Minuten zentrifugiert. Der Plasmaüberstand wurde abpipettiert und pro Probe 600 µl für Faktor VIII-Aktivität und APTT, 500 µl für Ristocetin-Cofaktor, je 150 µl für VWF:CB und VWF-Ag und zwei Reserven a 500 µl bei -80°C eingefroren.

Pro Patient entstanden so folgende Proben:

- | | |
|---------|--|
| PS | Das Blut (ein Röhrchen) wurde sofort zentrifugiert und der Überstand anschließend bei -80°C eingefroren. |
| CR3/CR6 | Das Citratblut (zwei Röhrchen) wurde für drei bzw. sechs Stunden bei Raumtemperatur gelagert, daraufhin zentrifugiert und eingefroren.. |
| CE3/CE6 | Das Citratblut (zwei Röhrchen) wurde für drei bzw. sechs Stunden in Eis gelagert, dann zentrifugiert und eingefroren. |
| CK3/CK6 | Das Citratblut (zwei Röhrchen) wurde für drei bzw. sechs Stunden zwischen zwei Kühllakkus gelagert, anschließend zentrifugiert und eingefroren. |
| PR3/PR6 | Der Plasmaüberstand aus einem Citratröhrchen wurde nach der Zentrifugation abpipettiert, auf zwei Reagenzgläser verteilt und für drei bzw. sechs Stunden bei Raumtemperatur gelagert und danach eingefroren. |
| PE3/PE6 | Der Plasmaüberstand aus einem Citratröhrchen wurde nach dem Zentrifugieren abpipettiert, auf zwei Reagenzgläser verteilt und für drei bzw. sechs Stunden in Eis gelagert und nachfolgend eingefroren. |

Fehlerquellen

Durch Herausnehmen der Monovetten aus der Zentrifuge und anschließendes Zurückstellen kam es zu Erschütterungen, die zu kleinsten Verwirbelungen und dadurch zu erneutem Durchmischen des Plasmaüberstandes mit Blutzellen führen konnten. Auch beim Abpipettieren des klaren Überstandes war auf ausreichenden Abstand zur Zellschicht zu achten, um ein Ansaugen von Zellen zu vermeiden. Bei Blutproben mit hohem Hämatokrit und entsprechend wenig Plasma konnte dies zu geringerer Materialausbeute und so zum

Fehlen der „Reserven“ kommen. Durch das Öffnen und Schließen des gekühlten Zentrifugen-Innenraumes kam es zu Temperaturschwankungen. Obwohl an zwei Zentrifugen parallel gearbeitet wurde, waren Verzögerungen in der Weiterverarbeitung der Proben nicht komplett zu vermeiden.

3.3. Testverfahren

3.3.1. Ristocetin-Cofaktor

Material:

Patientenplasma

BCT	Dade Behring, Deutschland
Messrotoren	Dispo-System, Dade Behring, Deutschland
Probencups	Kartell Spa, Italien
Pipetten	Eppendorff Reference 1000 µl, Deutschland
Pipettenspitzen	1000 µl, Starlab, Deutschland
Wasserbad	julaboR5, Deutschland
Rüttler	Heidolph Reax 2000, Deutschland
Imidazol-Puffer	Technodone GmbH, Italien
BC VWF-Reagenz	Dade Behring, Deutschland
Kontrolllösungen	Kontrollplasma N, Dade Behring, Deutschland Kontrollplasma P, Dade Behring, Deutschland

Durchführung:

Die zu untersuchenden Proben wurden zügig bei 37°C im Wasserbad aufgetaut, durchmischt und in den Probenrotor gestellt. Die Untersuchung musste unverzüglich vorgenommen werden, da die Stabilität verschiedener Faktoren nach dem Auftauen herabgesetzt war (Lutze et al, 1999). Es konnten drei Patienten zu je elf Proben gleichzeitig gemessen werden. In den Behring-Coagulation-Timer (BCT) wurden die Kontrolllösungen, der Imidazolpuffer und die BC von Willebrand-Reagenz eingesetzt, sowie die Messrotoren mit Rührstäbchen (für ca. 30 Messungen) erneuert. Ein Transferarm mit Probennadel pipettierte sowohl Plasma als auch Reagenzien in die zwei Messrotoren. Der Ristocetin-Cofaktor der Probe verursachte in Gegenwart von Ristocetin eine Agglutination der im von Willebrand-Reagenz enthaltenen, stabilisierten Plättchen durch eine Konformationsänderung im VWF und wahrscheinlich auch

im GPIb-Molekül. Die abgelaufenen Agglutination verminderte die Trübung des Reaktionsansatzes. Zwischen den beiden Messrotoren befand sich ein Anthos-Photometer, welches sich durch eine hohe Lichtempfindlichkeit auszeichnete. Eine Halogenlampe sendete ein weißes Licht durch eine Blende auf ein Filtrerrad. Vom Filtrerrad aus wurde das entstandene monochromatische Licht über Glasfaserkabel zur Küvette in der Messposition geleitet. In der Küvette, in der sich ein Rührstäbchen zur Durchmischung des Reaktionsansatzes befand, wurde das Licht absorbiert und gestreut. Ein Lichtempfänger wandelte das Lichtsignal in eine Spannung um, ein Bus-System transportierte diese zum PC. Dort erfolgte die Berechnung des Rohwertes, welcher anhand einer Kalibrationskurve in die benötigte Einheit umgerechnet wurde. (nach Keller, 1995)

Die Proben wurden jeweils in Doppelbestimmung untersucht und der Mittelwert berechnet, welcher für die weiteren Aussagen genutzt wurde.

Die gemessenen Ergebnisse besaßen die Einheit "% vom Normwert". Bei Frauen sollten die Werte zwischen 60 und 129% und bei Männern zwischen 75 und 150% liegen.

Erhöhte Ristocetin-Cofaktor-Konzentrationen zeigen sich bei Lebererkrankungen, Malignomen, Entzündungen und im Alter (Barthels,1987). Erniedrigte Werte zeigen sich beim VWS, Sichelzellanämie, Polycythaemia vera und anderen Erkrankungen (Barthels,1987).

Fehlerquellen

Es war darauf zu achten, dass die Reagenzien und Kontrollplasmen vollständig und hinreichend lange gelöst und richtig durchgemischt waren. Außerdem war es notwendig, ein rasches und vollständiges Auftauen tiefgefrorener Proben im 37°Celsius warmen Wasserbad und eine sofortige Analyse zu gewährleisten.

Bei der Benutzung des Analysegerätes war darauf zu achten, dass das Spülprogramm vor Beginn der Testung aktiviert wurde und keine Verunreinigungen in den Probecups vorhanden waren.

Außerdem bestand die Gefahr, die Proben beim Einsetzen in den Probenrotor zu vertauschen.

3.3.2. von Willebrand-Faktor-Antigen

Material:

Patientenplasma

Mikrotiterplatte Maxi-Sorp, Dänemark

Multipette	Eppendorff Multipette®plus, Deutschland
Combitip	Eppendorff Combitips®plus, Deutschland
Pipetten	Starlab, Deutschland
Pipettenspitzen	Starlab, Deutschland
Reagenzgläser	Greiner-Bioone, Deutschland
Magnetrührer	Länge 8mm, Durchmesser 3 mm, Fischer, Deutschland
Magnetrührgerät	Carl Roth GmbH, Deutschland
Wasserbad	julaboR5, Deutschland
PH-Meter	Radiometer analytica CI 116
Brutschrank	Memmert, Deutschland
Kühlschrank	Liebherr, Deutschland
Waschautomat	Tecan, Deutschland
Rüttler	Heidolph Reax 2000, Deutschland
Photometer	STL Labinstruments GmbH, Deutschland
Karbonatpuffer	0,53 g Na ₂ CO ₃ 0,42 g NaHCO ₃ 0,05 g NaN ₃ ad.100,00 ml Aqua dest. pH 9,6 mit 20%iger Essigsäure einstellen
Stammlösung	1 l 0,9%ige NaCl-Lösung 6,05 g 50mM TRIS-Puffer pH 7,4 mit 5M Salzsäure einstellen
Waschlösung	1 l Stammlösung 1, 00 g Albumin (Albumine bovine, Sigma, Deutschland)
Blockierlösung	0,1 l Stammlösung 3.00 g Albumin (Albumine bovine, Sigma, Deutschland)
Antiseren	Anti-Human von Willebrand Faktor vom Kaninchen, A 0082, DAKO, Dänemark Peroxidasekonjugiertes Anti-human von Willebrand Faktor vom Kaninchen, P 0226, DAKO, Dänemark
Farbreaktion	Aqua dest. OPD (2,9% 1,2-Phenylendiamindihydrochlorid, DAKO, Dänemark) H ₂ O ₂
Reaktion stoppen	3M H ₂ SO ₄

Kontrolllösungen Kontrol N, Immuno,
 Kontrol A, Immuno,

Durchführung:

Einen Tag vor der VWF:Ag-Bestimmung mussten die Mikrotiterplatten vorbereitet werden. Der Karbonatpuffer wurde mit 50 µl Antiserum vermischt und je 100 µl in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte gegeben. Die so beschichteten Platten wurden 24 Stunden im Kühlschrank inkubiert. Nach dieser Zeit wurde dreimal gewaschen, anschließend je 100 µl Blockierlösung aufgetragen und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Nach erneutem dreimaligen Waschen wurden die Standardverdünnungen und die zu untersuchenden Proben, welche zügig bei 37°C im Wasserbad aufgetaut und anschließend durchmischt worden waren zu je 100 µl aufgetragen und für zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Die Untersuchung musste unverzüglich vorgenommen werden, da die Stabilität verschiedener Faktoren nach dem Auftauen herabgesetzt war (Lutze et al, 1999). Da die Untersuchungsergebnisse des VWF-Antigens mit den Werten des Ristocetin-Cofaktors korrelierten, richteten sich die aufgetragenen Konzentration des Plasmas nach diesem. Werte unter 10 % wurden in einer 1:5 Verdünnung (100 µl Plasma und 400 µl Blockierlösung), Werte zwischen 11 % und 35 % mit einer 1:20 Verdünnung (30 µl Plasma und 570µl Blockierlösung), Werte zwischen 35% und 150 % mit einer 1:40 Verdünnung (20 µl Plasma und 780 µl Blockierlösung) und Werte ab 150 % mit einer 1:80 Verdünnung (25 µl Plasma und 1975 µl Blockierlösung) zu je 100 µl aufgetragen. Des weiteren wurde eine Eichkurve über eine Verdünnungsreihe eines Plasmapools (20 männliche und 20 weibliche Normalpersonen) ermittelt (400%, 200%, 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25%), ein Leerwert eingerichtet und die Kontrolllösungen aufgetragen.

Nach dreimaligen Waschen wurde die Immunreaktion mit einer Suspension aus 10 ml Blockierlösung und 25 µl Antiserum P 0226 zu je 100 µl aktiviert und für zwei Stunden bei 37°C inkubiert.

In 10 ml destilliertem Wasser wurden zwei OPD-Tabletten (2,9% 1,2-phenylendiamin-dihydrochlorid) gelöst und 100 µl Wasserstoffperoxid zugegeben. Dies wurde als Substrat zu je 100 µl auf die Mikrotiterplatte verteilt und nach ca. 8 Minuten mit je 50 µl 3 M Schwefelsäure gestoppt.

Anschließend wurde die Platte in das Photometer gestellt und mittels PC ausgewertet. Von den Doppelbestimmungen wurden die Mittelwerte errechnet, welche für die weiteren Ausführungen benutzt wurden.

Die gemessenen Ergebnisse besitzen die Einheit "% vom Normwert". Bei Frauen sollten die Werte zwischen 58 und 135% und bei Männern zwischen 82 und 138% liegen.

Wurde der VWF-Antigen-Test allein durchgeführt, war er nur in der Lage VWS, Typ 1 und VWS, Typ 3 zu erkennen. Bei VWS, Typ 2 fielen die Werte oft „normal“ aus (Sadler et al, 2000; Favaloro, 2001).

Fehlerquellen

Bei der Herstellung der verschiedenen Reagenzien war eine exakte Abmessung der benutzten Inhaltsstoffe sowie eine optimale Durchmischung sicherzustellen. Rasches und vollständiges Auftauen der tiefgefrorenen Proben im 37°Celsius warmen Wasser und eine sofortige Analyse waren zu gewährleisten.

Bei der Verwendung der Mikrotiterplatten war darauf zu achten, dass die Inkubationszeiten eingehalten wurden, da alle Proben nur nacheinander und manuell aufgetragen und mit den Reagenzien versetzt werden konnten. Wichtig war also, dass die Mikrotiterplatten immer im gleichen Rhythmus beschichtet wurden. Darüber hinaus konnte es zu Verunreinigungen von benachbarten Proben durch herausspritzende Reagenzien beim Pipettieren kommen.

3.3.3. APTT

Material:

Patientenplasma

ACL 300TM Instrumentation Laboratory, Deutschland

Reaktiosrotor IL, USA

Probenrotor Instrumentation Laboratory, Deutschland

Probencups Kartell Spa, Italien

Multipette Eppendorff Multipette®plus, Deutschland

Combitip Eppendorff Combitips®plus, Deutschland

Pipetten Starlab, Deutschland

Pipettenspitzen 1000 µl, Starlab, Deutschland

100 µl, Starlab, Deutschland

Wasserbad julaboR5, Deutschland

Rüttler Heidolph Reax 2000, Deutschland

Aqua dest. Braun, Deutschland

Cephalin IL TestTM APTT Silica Lyophilisiert, IL Company, Italien

Kalziumchlorid	IL Test TM APTT Silica Lyophilisiert, IL Company, Italien
Kalibrationsplasma	IL Calibrationsplasma, IL Company, Italien
Kontrolllösungen	Abnormal-Kontroll-Plasma Bereich I, Italien Abnormal-Kontroll-Plasma Bereich II, Italien

Durchführung:

Zunächst wurde das lyophilisierte APTT-Reagenz (Cephalin) mit 9,0 ml destilliertem Wasser, das Kalibrationsplasma und die beiden Kontrollplasmen mit 1,0 ml destilliertem Wasser aufgelöst. Die Plasmaproben wurden in der Zwischenzeit zügig bei 37°Celsius im Wasserbad aufgetaut, durchmischt und zusammen mit dem Kalibrationsplasma und den Kontrolllösungen in den Probenrotor des ACL gestellt. Die Untersuchung musste unverzüglich vorgenommen werden, da die Stabilität verschiedener Faktoren nach dem Auftauen herabgesetzt war (Lutze et al, 1999). Des weiteren wurde Cephalin und Kalziumchlorid in die dafür vorgesehenen Vertiefungen gegeben.

Das ACL 300TM-Analysegerät, ein Zentrifugalanalysator arbeitet nach dem Prinzip der Nephelometrie (Lichtstreuungsmessung). Dieser zeichnet sich durch rotierende Reaktionskammern aus, die zentral mit Reagenzien und Substrat bestückt wurden, die aber erst durch anschließende Rotation in der Peripherie zusammenkamen und reagierten. Dadurch wurde ein gleichzeitiger Reaktionsbeginn in allen Reaktionskammern des Rotors gewährleistet. Durch die Rotation konnte jede Reaktion anhand der Änderung der Lichtstreuung in kürzesten Abständen gemessen werden, wobei die Zeit bis zum Erreichen des Maximums des Messsignals wiedergegeben wurde. Licht definierter Wellenlänge und Intensität wurde beim Durchtritt durch die Probe je nach Trübung gestreut und das Streulicht von einem Detektor als Messsignal aufgefangen. Mittels standardisierter Referenzproben erstellte das Gerät eine Eichkurve, anhand derer die Messergebnisse der Proben automatisch abgelesen und in der Einheit Sekunden angegeben wurden.

Die Werte sollten zwischen 29,9 und 41,7 Sekunden liegen.

Die APTT reagiert auf Störungen der Faktoren I, II, V, VIII, IX, X, XI und XII (Favaloro, 1999).

Fehlerquellen

Es war darauf zu achten, dass die Reagenzien und lyophilisierten Plasmen vollständig und ausreichend lange gelöst und richtig durchmischt waren. Das rasche und vollständige

Auftauen der tiefgefrorenen Proben im 37°Celsius warmen Wasserbad und die sofortige Analyse waren zu gewährleisten.

Bei der Verwendung des ACL 300 war darauf zu achten, dass das Spülprogramm vor Beginn der Testung aktiviert wurde und keine Verunreinigungen in den Probecups vorhanden waren. Außerdem bestand die Gefahr, die Proben und standardisierten Plasmen an falsche Positionen auf dem Probenrotor zu setzen oder die Reagenzien zu vertauschen.

3.3.4. Faktor VIII-Aktivität

Material:

Patientenplasma

ACL 300TM Instrumentation Laboratory, Deutschland

Reaktionsrotor IL, USA

Probenrotor Instrumentation Laboratory, Deutschland

Probencups Kartell Spa, Italien

Multipette Eppendorff Multipette®plus, Deutschland

Combitip Eppendorff Combitips®plus, Deutschland

Pipetten Starlab, Deutschland

Pipettenspitzen 1000 µl, Starlab, Deutschland

100 µl, Starlab, Deutschland

Reagenzgläser Greiner-Bioone, Deutschland

Wasserbad julaboR5, Deutschland

Rüttler Heidolph Reax 2000, Deutschland

Aqua dest. Braun, Deutschland

Cephalin IL TestTM APTT Silica Lyophilisiert, IL Company, Italien

Kalziumchlorid IL TestTM APTT Silica Lyophilisiert, IL Company, Italien

Kalibrationsplasma IL Calibrationsplasma, IL Company, Italien

Kontrolllösungen Normal-Kontroll-Plasma, IL Company, Italien

Faktor VIII Abnormal-Kontroll-Plasma, IL Company, Italien

Faktor Diluent IL TestTM Factor Diluent, Instrumentation Laboratory, USA

Mangelplasma IL TestTM Faktor-Mangelplasma Faktor VIII, Italien

Durchführung:

Zunächst wurde das lyophilisierte APTT-Reagenz (Cephalin) mit 9,0 ml destilliertem Wasser, das Faktor VIII-Mangelplasma, das Kalibrationsplasma und die beiden Kontrollplasmen mit 1,0 ml destilliertem Wasser aufgelöst. Die Untersuchung der im Wasserbad aufgetauten Proben musste unverzüglich vorgenommen werden, da die Stabilität verschiedener Faktoren nach dem Auftauen herabgesetzt war (Lutze et al, 1999). Die Plasmaproben wurden ebenso wie die Kontroll- und Kalibrationsplasmen 1:4 mit Faktor Diluent verdünnt. Hierzu wurden 100 µl Plasma mit 400 µl Faktor Diluent verdünnt. Lagen die so ermittelten Werte über 180 % wurde erneut verdünnt, dabei wurden 200 µl der verdünnten Probe mit nochmals 200 µl Faktor Diluent verdünnt. Lagen die ermittelten Werte unter 15% wurde nicht das Plasma, sondern das Kalibrationsplasma, sowie die Kontrolllösungen zu je 25 µl mit 1975 µl Faktor Diluent verdünnt und zu je 500 µl in die Cups verteilt.

Die verdünnten Proben (nur ein Patient a elf Proben) wurden zusammen mit dem Kalibrationsplasma, den Kontrolllösungen, dem Faktor VIII-Mangelplasma und dem Faktor Diluent in die vorgegebenen Positionen des Probenrotors des ACL gestellt. Des weiteren wurde Cephalin und Kalziumchlorid in die dafür vorgesehenen Vertiefungen gegeben.

Das ACL 300TM-Analysegerät, ein Zentrifugalanalysator arbeitet nach dem Prinzip der Nephelometrie (Lichtstreuungsmessung). Dieser zeichnet sich durch rotierende Reaktionskammern aus, die zentral mit Reagenzien und Substrat bestückt wurden, diese aber erst durch anschließende Rotation in der Peripherie zusammenkamen und reagierten. Dadurch wurde ein gleichzeitiger Reaktionsbeginn in allen Reaktionskammern des Rotors gewährleistet. Das verdünnte Plasma wurde mit Faktor VIII-Mangelplasma (enthält alle Gerinnungsfaktoren, außer Faktor VIII) gemischt, die dadurch entstandene Veränderung der APTT war proportional zum Gehalt des Faktor VIII in der zu untersuchenden Probe. Durch die Rotation konnte jede Reaktion anhand der Änderung der Lichtstreuung in kürzesten Abständen gemessen werden, wobei die Zeit bis zum Erreichen des Maximums des Messsignals wiedergegeben wurde. Licht definierter Wellenlänge und Intensität wurde beim Durchtritt durch die Probe je nach Trübung gestreut und das Streulicht von einem Detektor als Messsignal aufgefangen. Mittels standardisierter Referenzproben erstellte das Gerät eine Eichkurve, anhand derer die Messergebnisse der Proben automatisch abgelesen und in der Einheit „Prozent“ angegeben wurden.

Die Werte sollten zwischen 64% und 167% liegen.

Personen mit der Blutgruppe 0 zeigen niedrigere Werte, erhöhte Werte werden bei Einnahme von Ovulationshemmern, Schwangerschaft, Akutphasereaktionen (CRP-Erhöhung)), Stress,

nach Operationen, Lebererkrankungen, Tumore, Gefäßerkrankungen und steigendem Alter gefunden (Barthels, 2002).

Fehlerquellen

Neben den möglichen Pipettierfehlern war darauf zu achten, dass die Reagenzien und lyophilisierten Plasmen vollständig und ausreichend lange gelöst und richtig durchmischt waren. Das rasche und vollständige Auftauen der tiefgefrorenen Proben im 37°Celsius warmen Wasserbad und die sofortige Analyse waren zu gewährleisten.

Bei der Verwendung des ACL 300 war darauf zu achten, dass das Spülprogramm vor Beginn der Testung aktiviert wurde und keine Verunreinigungen in den Probecups vorhanden waren. Außerdem bestand die Gefahr, die Proben und standardisierten Plasmen an falsche Positionen auf dem Probenrotor zu setzen oder die Reagenzien zu vertauschen.

Eine Vortäuschung höherer Faktor VIII-Aktivitäten war zum Beispiel durch in-vitro-Aktivierung der Gerinnung mit unerwünschter Thrombinbildung, die zu einer Verkürzung der Gerinnungszeit führten, möglich. Auch eine Vortäuschung niedriger Faktor VIII-Aktivitäten durch Verbrauch von Faktor VIII in vitro oder durch Hemmung der Gerinnung (Heparin) ist möglich (Barthels, 2002), die Halbwertszeit liegt bei 10 bis 18 Stunden (von Depka Prondzinska, 2002).

3.3.5. Kollagen-Bindungstest (CBA)

Material:

Patientenplasma

Mikrotiterplatten Nunc-ImmunoTM Plate MaxiSorpTM, Nalge Nunc International, Dänemark

Multipette Eppendorff Multipette®plus, Deutschland

Combitip Eppendorff Combitips®plus, Deutschland

Pipetten Starlab, Deutschland

Pipettenspitzen 1000 µl, Starlab, Deutschland

100 µl, Starlab, Deutschland

20 µl, Starlab, Deutschland

Reagenzgläser Greiner-Bioone, Deutschland

Magnetrührer Länge 8mm, Durchmesser 3 mm, Fischer, Deutschland

Magnetrührgerät Carl Roth GmbH, Deutschland

Wasserbad	julaboR5, Deutschland
Brutschrank	Memmert, Deutschland
Waschautomat	Tecan, Deutschland
Rüttler	Heidolph Reax 2000, Deutschland
Photometer	STL Labinstruments GmbH, Deutschland
Stammlösung:	87,6 g NaCl 57 g Na ₂ HPO ₄ 10,8 g KH ₂ PO ₄ ad 1000 ml Aqua dest.
Gebrauchslösung	100 ml Stammlösung 900 ml Aqua dest.
Waschlösung:	925 ml Gebrauchslösung 0,925 g Albumin (Albumine Bovine, Sigma, Deutschland)
Probenpuffer:	50 ml Gebrauchslösung 2,5 g Albumin (Albumine Bovine, Sigma, Deutschland)
Verdünnungslösung	für Peroxidase-markierten Antikörper 25 ml Gebrauchslösung 0,125 g Albumin (Albumine Bovine, Sigma, Deutschland)
Plattenbeschichtung:	10 ml 0,1 M Essigsäure 100 µl Kollagen (Kollagenreagenz Horm, Nycomed; Deutschland)
Antigen:	Peroxidasekonjugiertes Anti-human von Willebrand Faktor vom Kaninchen, P 0226, DAKO, Dänemark
Farbreaktion	Aqua dest. OPD (2,9% 1,2-Phenylendiamindihydrochlorid, DAKO, Dänemark) H ₂ O ₂
Reaktion stoppen:	1,5 M H ₂ SO ₄
Kontrollösungen	Kontrol N, Immuno, Kontrol A, Immuno,

Durchführung:

1986 wurde der erste VWF-Collagen-ELISA-Test von Brown and Bosak veröffentlicht.

Die Mikrotiterplatten wurden einen Tag vor Testbeginn vorbereitet. Dazu wurden 100 µl Kollagen in 10 ml Essigsäure suspensiert und mit dem Mischer gemischt. Anschließend wurden in jede Vertiefung der Mikrotiterplatte 100 µl der Lösung gegeben. Die Platte musste

für 24 Stunden im Brutschrank (37°C) aufbewahrt werden und war gebrauchsfertig sobald die Essigsäure verdunstet war.

Am nächsten Tag wurden die Patientenproben zügig bei 37°C im Wasserbad aufgetaut und in Doppelbestimmung aufgetragen. Die Untersuchung musste unverzüglich vorgenommen werden, da die Stabilität verschiedener Faktoren nach dem Auftauen herabgesetzt war (Lutze et al., 1999). Für jeden Patienten waren 22 Plätze vorgesehen (11 Proben in Doppelbestimmung), so dass pro Platte drei Patienten untersucht werden konnten. Da die Untersuchungsergebnisse des Kollagenbindungstestes mit den Werten des Ristocetin-Cofaktors korrelierten, richteten sich die aufgetragenen Konzentrationen des Plasmas nach diesem. Werte unter 15 % wurden in einer 1:10 Verdünnung (40 µl Plasma und 360 µl Probenpuffer), Werte zwischen 16 % und 35 % mit einer 1:20 Verdünnung (20 µl Plasma und 380 µl Probenpuffer), Werte zwischen 35% und 150 % mit einer 1:40 Verdünnung (10 µl Plasma und 390 µl Probenpuffer) und Werte ab 150 % mit einer 1:80 Verdünnung (5 µl Plasma und 395 µl Probenpuffer) zu je 100 µl aufgetragen. Des Weiteren wurde eine Eichkurve über eine Verdünnungsreihe eines Plasmapools (20 männliche und 20 weibliche Normalpersonen) ermittelt (400%, 200%, 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25%), ein Leerwert eingerichtet und die Kontrollen aufgetragen.

Die Platte wurde dann 90 Minuten bei 37°C im Brutschrank inkubiert und anschließend dreimal mit der Waschlösung gewaschen.

In jede Vertiefung der Mikrotiterplatte wurden 100 µl des in Probenpuffer suspendierten von Willebrand-Faktor vom Kaninchen (10 ml Probenpuffer und 25 µl Antigen) gegeben und für 90 Minuten bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Nachfolgend wurde erneut dreimal gewaschen.

In 10 ml destilliertem Wasser wurden zwei OPD-Tabletten (2,9% 1,2-phenylendiamin-dihydrochlorid) gelöst und 100 µl Wasserstoffperoxid zugegeben. Dies wurde als Substrat zu je 100 µl auf die Mikrotiterplatte verteilt und nach ca. 15 Minuten mit je 100 µl 1,5 M Schwefelsäure gestoppt.

Anschließend wurde die Platte in das Photometer gestellt und mittels PC ausgewertet.

Von den Doppelbestimmungen wurden die Mittelwerte errechnet, welche für die weiteren Ausführungen benutzt wurden.

Die Normwerte sollten zwischen 60 und 120% liegen.

Der Test zeigt sich als sensibel für die Reduktion der großen VWF-Multimere (Israels et al, 2002) und wird als Funktionstest zur Diagnostik des Typ 2 eingesetzt (von Depka Prondzinski, 2002).

Fehlerquellen

Bei der Herstellung der verschiedenen Reagenzien war eine exakte Abmessung der benutzten Inhaltsstoffe sowie eine optimale Durchmischen sicherzustellen. Rasches und vollständiges Auftauen der tiefgefrorenen Proben im 37°Celsius warmen Wasser und eine sofortige Analyse waren zu gewährleisten.

Bei der Verwendung der Mikrotiterplatten war zu beachten, dass die Inkubationszeiten eingehalten wurden, da alle Proben nur nacheinander und manuell aufgetragen und mit den Reagenzien versetzt werden konnten. Es war also darauf zu achten, dass die Mikrotiterplatten immer im gleichen Rhythmus beschichtet wurden. Darüber hinaus konnte es zu Verunreinigungen von benachbarten Proben durch herausspritzende Reagenzien beim Pipettieren kommen.

Eine weitere Fehlerquelle war, dass es bei der Beschichtung der Mikrotiterplatten mit Kollagen zu ungleichmäßiger Verteilung desselben kommen konnte. Fiel dies nach Beendigung des Testes durch extrem erhöhte oder erniedrigte Werte auf, war der Test zu wiederholen.

3.4. Probanden

Für die Untersuchungen stellten sich insgesamt 35 Probanden zur Verfügung: 21 Frauen zwischen 22 und 79 Jahren und 14 Männer im Alter von 31 Jahren bis 74 Jahren.

Bei den Probanden war darauf zu achten, dass sie nicht an bestimmte Krankheiten litten, die eine Veränderung der von Willebrand-Parameter verursachen würden. Eine Verminderung der von Willebrand-Parameter wird zum Beispiel durch Blutgruppe 0, Hypothyreose, Medikamente (Griseofulvin, Ciprofloxacin, Valproinsäure, Carbamazepin, HAES, Gelatine) (Bombeli, 2002), erhöhte Scherkräfte (Herzvitien) (Barthels, 2002) ausgelöst. Eine Erhöhung der Werte wird durch Stress, adrenerge Stimuli, Lebererkrankungen, Diabetes mellitus, Akutphasereaktion (Entzündung, Schwangerschaft, post-operativ), erhöhte Östrogenspiegel (orale Kontrazeptiva, Schwangerschaft, Stillzeit) (Bombeli, 2002), erhöhtes Alter (>70-jährige 15% höher als 20-jährige), venöse Thromboembolien (Bathels, 2002), Urämie, Hypertonie (Müller-Berghaus et al, 1999) verursacht.

Untersuchungen sollten deshalb zu einem Zeitpunkt ohne Blutung, Schwangerschaft, akute Infekte oder körperliche Anstrengung durchgeführt werden (Hiller et al, 1998).

APTT und Blutungszeit sind bei 60-70% der Patienten mit VWS normal (Bathels, 2002).

Die Probanden wurden in verschiedene Gruppen unterteilt.

10 Probanden ohne bekannte Gerinnungsstörung: 7 Frauen im Alter von 22 Jahren bis 51 Jahren und 3 Männer zwischen 38 und 50 Jahren (Median: 38 Jahre).

10 Probanden litten an VWS Typ 1: 6 Frauen zwischen 29 und 58 Jahren sowie 4 Männer zwischen 36 und 69 Jahren (Median: 41,5 Jahre).

5 Probanden litten an VWS Typ 2 (1x Typ 2a, 2x Typ 2b, 2x Typ 2n): 2 Frauen im Alter von 33 und 79 Jahren und 3 Männer zwischen 31 und 49 Jahren (Median: 37 Jahre).

10 Probanden waren Patienten neurochirurgischer Stationen der Universitätsklinik Frankfurt am Main: 6 Frauen zwischen 35 und 72 Jahren und 4 Männer im Alter von 33 Jahren bis 74 Jahren (Median 56 Jahre).

Durch diese Einteilung entstanden Gruppen mit unterschiedlichen Ristocetin-Cofaktor-Werten:

- VWS Typ 2: sehr niedrige Ristocetin-Cofaktor-Werte,
- VWS Typ 1: niedrige Ristocetin-Cofaktor-Werte,
- Kontrollgruppe: normale Ristocetin-Cofaktor-Werte und
- Patienten der Neurochirurgie: hohe Ristocetin-Cofaktorwerte.

Tabelle 3.4.: Typische Laborbedingungen bei vWS (Favaloro, 1999)

	vWS, Typ1	Typ 2a	Typ 2b	Typ 2n	Typ 2m	Typ 3
VWF:Rco	↓	↓↓ (<30%)	↓	normal (/ ↓)	↓ (/normal)	↓↓↓ (<5%)
VWF:Ag	↓ (<50%)	↓ (/normal)	↓ (/normal)	normal (/ ↓)	normal (/ ↓)	↓↓↓ (<5%)
APTT	↑ (/normal)	↑ (/normal)	normal (/ ↑)	↑ (/normal)	normal (/ ↑)	↑
F VIII:C	↓ (/normal)	↓ (/normal)	↓ (/normal)	↓	normal (/ ↓)	↓↓ (<20%)
VWF:CB	↓	↓↓ (<15%)	↓ (<40%)	normal (/ ↓)	↓ (/normal)	↓↓↓ (<5%)
VWF:RCo/ VWF:Ag	>0,6	<0,6	<0,6	>0,6	<0,6	nicht verwendbar
VWF:CB/ VWF:Ag	>0,6	<0,6	<0,6	>0,6	<0,6	nicht verwendbar
VWF- Multimere	alle reduziert	hoch/mittel reduziert	hoch reduziert	normal	normal	alle fehlen

Die VWF:RCo/VWF:Ag und VWF:CB/VWF:Ag zeigen eine deutliche Abhängigkeit von der Multimerisation (Barthels, 1987). Ristocetin-Cofaktor und Kollagen-Bindungstest zeigen den Verlust der großen Multimere aus dem zirkulierenden Blut (Israels et al, 2002).

Beim VWS, Typ 1 sind VWF-Antigen, Ristocetin-Cofaktor, VWF:CB und Faktor VIII-Aktivität erniedrigt. Faktor VIII-Aktivität und VWF sind vermindert, wobei die relative Verminderung der beiden Faktoren meistens gleich groß ist (Berkowitz, 1995). Die APTT korreliert mit der Faktor VIII-Aktivität und ist bei milden VWS meistens normal (Israels et al, 2002).

Beim VWS, Typ 2 ist VWF-Antigen, Ristocetin-Cofaktor und Kollagenbindungstest erniedrigt und Faktor VIII-Aktivität erniedrigt oder normal. Die Funktionstests (Ristocetin-Cofaktor, Kollagenbindungstest) fallen bei Typ 2a, 2b und 2m meist niedriger aus, als die Konzentration des VWF:Ag (Barthels, 2002; Favaloro, 1999)

Beim Typ 2a fehlen die großen und mittelgroßen Multimere im Plasma und den Thrombozyten. Beim Typ 2b fehlen die großen Multimere im Plasma, sind jedoch in den Thrombozyten vorhanden.

Beim Typ 3 beträgt das VWF-Antigen <1%, Faktor VIII-Aktivität liegt bei 2% bis 10% und Ristocetin-Cofaktor, VWF:CB und alle Multimere fehlen (Heimpel et al, 1996; Beutel et al, 2000).

3.5. Methode der statistischen Auswertung

Deskriptive Statistik

Für die Charakterisierung der Daten und für den Vergleich einzelner Datengruppen bezüglich ihrer Lage und Streuung wurden Median, Minimum, Maximum und Perzentilen als Maßzahlen verwendet. Auf Grund des relativ kleinen Stichprobenumfanges wurde auf die Verwendung von Mittelwert und Standardabweichung verzichtet.

Median

Der Median liegt in der Mitte aller beobachteten Werte (Harms, 1997). Er entspricht dem mittleren, nach der Größe geordneten, Wert bei ungerader Anzahl und dem arithmetischen Mittel der beiden mittleren Werte bei gerader Anzahl von Beobachtungen. Der Median stellt sich gegenüber dem Mittelwert als relativ robust dar, da Ausreißer und schiefe Verteilungen

ihn weniger stark beeinflussen. Er wird daher bei wenigen Meßwerten, schiefen oder unbekanntem Verteilungen und Verdacht auf Ausreißer verwendet.

Minimum und Maximum

Minimum gibt den niedrigsten, Maximum den höchsten Wert in einer Stichprobe wieder (Harms, 1997).

Percentilen

Percentilen geben an, welcher Meßwert von einem bestimmten Anteil (in %) aller Werte unterschritten oder erreicht wird (Harms, 1997). Für den Meßwert auf zum Beispiel der 25. Perzentile bedeutet dies, dass 25% aller Meßwerte kleiner oder gleich sind. Percentilen können als Streuungsmaßzahlen von Meßwerten verwendet werden, die nicht symmetrisch oder normalverteilt vorliegen. Die 25. Perzentile wird oftmals auch als 1. Quartile, die 75. Perzentile als 3. Quartile bezeichnet; die 50. Perzentile stimmt mit dem Median beziehungsweise der 2. Quartile überein.

Wilcoxon-matched-pairs-Test

Der Wilcoxon-matched-pairs-Test ist ein nicht-parametrischer Test zum Vergleich zweier verbundener Stichproben und prüft, ob die Differenzen paarig angeordneter Beobachtungen symmetrisch um den Median "Null" verteilt sind (Sachs, 1997; Harms, 1997). Bei diesem Test wird aber nicht mit den Messwerten selbst, sondern mit den Rangplätzen der Paardifferenzen der beiden Messwerte gerechnet, d.h. den Differenzen aus den beiden verbundenen Messwerten werden der Größe nach Rangplätze zugewiesen. Paare mit der Differenz „Null“ werden nicht berücksichtigt und von der Anzahl der Paare (Stichprobenumfang) n abgezogen (Reststichprobe). Bei gleichen Paardifferenzen werden mittlere Rangplätze vergeben. Rangplätze für positive und negative Differenzen werden getrennt addiert. Als Testgröße R wird die kleinere der beiden Rangsummen verwendet. Die zuvor zweiseitig formulierte Nullhypothese wird abgelehnt, wenn die Testgröße kleiner oder gleich dem tabellierten kritischen Wert $R(n;\alpha)$ ist (CIBA-GEIGY AG, 1985).

Tabelle 3.5.: kritische Werte für $R(n;\alpha)$; Auszug aus den wissenschaftlichen Tabellen Geigy

n	R(n;0,05)	R(n;0,01)	R(n;0,001)
6	0		
7	2		
8	3	0	
9	5	1	
10	8	3	
11	10	5	0
15	25	15	6
25	89	68	45
50	434	373	304

Pearson-Korrelation

Mittels der Korrelationsanalyse kann man stochastische Zusammenhänge zwischen Zufallsvariablen anhand einer Stichprobe untersuchen. Ein Maß für die Stärke und Richtung eines linearen Zusammenhanges ist der Korrelationskoeffizient r . Ist er gleich „0“ besteht kein Zusammenhang. Für $r = \pm 1$ besteht zwischen den untersuchten Variablen ein funktionaler Zusammenhang, alle Punkte liegen auf einer Geraden.

P gibt den Wert für die Überschreitungswahrscheinlichkeit wieder.

4. Ergebnisse

4.1. Kontrollgruppe

Dieses Kollektiv bestand aus 10 Probanden ohne bekannte Gerinnungsstörung: 7 Frauen im Alter von 22 Jahren bis 51 Jahren und 3 Männer zwischen 38 und 50 Jahren (Median: 38 Jahre). Bei allen Probanden wurde darauf geachtet, dass in den letzten sechs Monaten keine Operationen oder schwerwiegende Erkrankungen stattgefunden hatten, da diese die von Willebrand-Parameter erhöhen würden (Lutze et al, 1999). Auch durften keine anderen Erkrankungen wie koronare Herzkrankheit, venöse Verschlusskrankheit, Diabetes mellitus, Urämie, Tumore oder übermäßiger Stress vorliegen, da diese ebenfalls die von Willebrand-Werte erhöhen könnten. Eine Probandin gab eine Schilddrüsenunterfunktion an, welche aber gut medikamentös eingestellt war und deshalb keinen senkenden Einfluss auf die von Willebrand-Parameter haben sollte.

Durch verschiedene Lagerung entstanden pro Patient folgende Proben:

- | | |
|---------|--|
| PS | Das Blut (ein Röhrchen) wurde sofort zentrifugiert und der Überstand anschließend bei -80°C eingefroren. |
| CR3/CR6 | Das Citratblut (zwei Röhrchen) wurde für drei bzw. sechs Stunden bei Raumtemperatur gelagert, daraufhin zentrifugiert und eingefroren.. |
| CE3/CE6 | Das Citratblut (zwei Röhrchen) wurde für drei bzw. sechs Stunden in Eis gelagert, dann zentrifugiert und eingefroren. |
| CK3/CK6 | Das Citratblut (zwei Röhrchen) wurde für drei bzw. sechs Stunden zwischen zwei Kühlakkus gelagert, anschließend zentrifugiert und eingefroren. |
| PR3/PR6 | Der Plasmaüberstand aus einem Citratröhrchen wurde nach der Zentrifugation abpipettiert, auf zwei Reagenzgläser verteilt und für drei bzw. sechs Stunden bei Raumtemperatur gelagert und danach eingefroren. |
| PE3/PE6 | Der Plasmaüberstand aus einem Citratröhrchen wurde nach dem Zentrifugieren abpipettiert, auf zwei Reagenzgläser verteilt und für drei bzw. sechs Stunden in Eis gelagert und nachfolgend eingefroren. |

In den nachfolgenden Tabellen wurden die Mittelwerte (erste Zahl) der durchgeführten Doppelbestimmungen aufgeführt. Die zweite Zahl gab den Prozentsatz von PS wieder und zeigte somit wie sich die Werte bei bestimmten Lagerungen veränderten.

Am Ende der Tabelle wurde der Median (MD), sowie der minimale (Min.) und maximale (Max.) Wert der Prozentsätze von PS angegeben.

Bei den Abbildungen wurden nur noch der Median und die Spanne der Prozentsätze von PS berücksichtigt.

4.1.1. Ristocetin-Cofaktor

Tabelle 4.1.1.: Ristocetin-Cofaktor

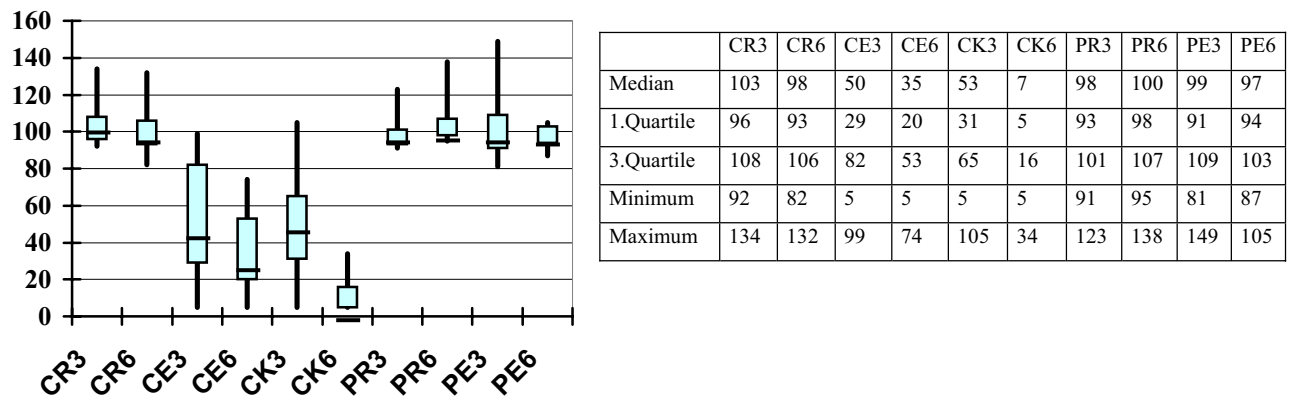
Die Einheit des ermittelten Ristocetin-Cofaktors war „Prozent vom Normwert“ (erste Zahl).

Die zweite Zahl gab den Prozentwert von PS wieder.

Beispiel: Bei B.,M. lag der Wert des ermittelten Ristocetin-Cofaktors von PS bei 47 („Prozent vom Normwert“). Dieser Wert wurde als 100% angenommen. Wollte man nun sehen wie sich der Wert bei dreistündiger Lagerung des Citratblutes zwischen Kühlakkus (CK3) veränderte, sah man, dass er nur noch bei 8 („Prozent vom Normwert“) lag. Dies entsprach einer Absenkung des Wertes auf 17% von PS. Die weiteren Tabellen folgten dem gleichen Schema.

Prob.	PS	CR3	CR6	CE3	CE6	CK3	CK6	PR3	PR6	PE3	PE6
B.,M.	47 100%	63 134%	62 132%	26 55%	22 47%	8 17%	<5 11%	58 123%	65 138%	70 149%	48 102%
K.,A.	92 100%	98 107%	104 113%	91 99%	68 74%	55 60%	<5 7%	86 93%	99 108%	90 98%	94 102%
K.,M.	95 100%	105 110%	92 97%	<5 5%	<5 5%	99 105%	<5 5%	93 98%	93 98%	103 108%	99 105%
M.,M.	71 100%	65 92%	66 93%	57 80%	30 42%	33 46%	<5 7%	65 92%	70 99%	66 93%	62 87%
P.,B.	70 100%	68 97%	65 93%	35 50%	24 34%	43 61%	5 7%	64 91%	74 106%	70 100%	66 94%
P.,F.	113 100%	106 94%	93 82%	38 34%	34 30%	86 76%	32 28%	116 103%	109 96%	92 81%	109 96%
S.,B.	100 100%	102 102%	103 103%	26 26%	17 17%	<5 5%	<5 5%	100 100%	100 100%	110 110%	92 92%
T.,H.	64 100%	68 106%	64 100%	56 88%	44 69%	31 48%	22 34%	63 98%	61 95%	70 109%	67 105%
T.,R.	82 100%	84 102%	80 98%	41 50%	28 35%	47 58%	10 12%	80 98%	80 98%	75 91%	80 98%
V.,T.	107 100%	110 103%	103 96%	32 30%	23 21%	37 35%	<5 5%	104 97%	110 103%	97 91%	101 94%
MD	100%	103%	98%	50%	35%	53%	7%	98%	100%	99%	97%
Min	100%	92%	82%	5%	5%	5%	5%	91%	95%	81%	87%
Max	100%	134%	132%	99%	74%	105%	34%	123%	138%	149%	105%

Abbildung 4.1.1.: Ristocetin-Cofaktor-Veränderungen bezogen zu PS (Ausgangswert)



Bei der Lagerung von Citratplasma veränderte sich der Wert des Ristocetin-Cofaktors, sowohl bei Raumtemperatur als auch bei der Lagerung auf Eis, kaum. Citratvollblut zeigte nur bei der Lagerung bei Raumtemperatur relativ konstante Werte, bei gekühlter Lagerung wurden nach drei Stunden nur noch ca. 50% (Median) des Ausgangswertes PS gemessen. Nach sechs Stunden waren die Werte im Mittel auf 35% (Lagerung in Eis, ca. 4°C) bzw. 7% (Lagerung zwischen Kühlakkus, ca. -5°C) von PS abgefallen. Teilweise lagen diese Werte in einem zu kleinen Messbereich (<5) für das BCT (in solchen Fällen wurde für die Ermittlung des Prozentwertes der Wert „5“ angenommen).

4.1.2. von Willebrand-Faktor-Antigen

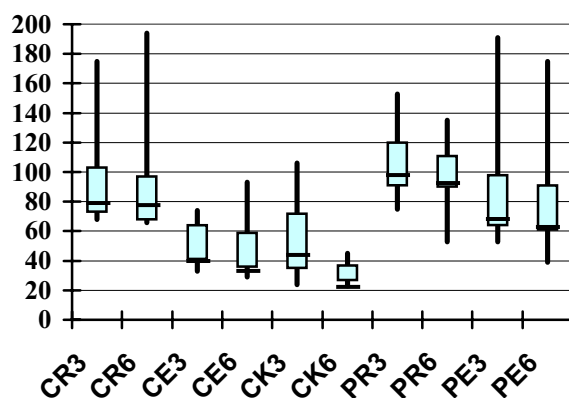
Tabelle 4.1.2.: von Willebrand-Faktor-Antigen

Die Einheit des von Willebrand-Faktor-Antigens war „Prozent vom Normwert“ (erste Zahl).

Die zweite Zahl gab den Prozentwert von PS wieder.

Prob.	PS	CR3	CR6	CE3	CE6	CK3	CK6	PR3	PR6	PE3	PE6
B.,M.	61 100%	62 102%	57 93%	26 43%	24 39%	18 30%	15 25%	46 75%	57 93%	56 92%	46 75%
K.,A.	68 100%	70 103%	67 99%	50 74%	63 93%	64 94%	26 38%	72 106%	65 96%	57 84%	57 84%
K.,M.	65 100%	114 175%	126 194%	27 42%	24 37%	69 106%	22 34%	75 115%	88 135%	124 191%	114 175%
M.,M.	112 100%	85 76%	76 68%	63 56%	49 44%	60 54%	39 35%	107 96%	111 99%	75 67%	75 67%
P.,B.	139 100%	130 94%	130 94%	90 65%	79 57%	78 56%	51 37%	212 153%	175 126%	163 117%	155 112%
P.,F.	142 100%	96 68%	96 68%	55 39%	54 38%	87 61%	46 32%	190 134%	151 106%	78 55%	55 39%
S.,B.	191 100%	142 74%	126 66%	62 33%	59 31%	45 24%	53 28%	199 104%	156 82%	131 69%	133 69%
T.,H.	95 100%	68 72%	72 76%	60 63%	63 66%	49 52%	43 45%	97 102%	96 101%	68 72%	61 64%
T.,R.	122 100%	116 95%	117 96%	65 53%	62 51%	79 65%	41 33%	126 103%	120 98%	109 90%	97 80%
V.,T.	205 100%	150 75%	150 75%	85 41%	59 29%	74 36%	47 23%	154 76%	109 53%	110 53%	102 50%
MD	100%	85%	85%	48%	42%	55%	34%	104%	99%	78%	72%
Min.	100%	68%	66%	33%	29%	24%	23%	75%	53%	53%	39%
Max.	100%	175%	194%	74%	93%	106%	45%	153%	135%	191%	175%

Abbildung 4.1.2.: Von Willebrand-Faktor-Antigen – Veränderungen bezogen auf PS



	CR3	CR6	CE3	CE6	CK3	CK6	PR3	PR6	PE3	PE6
Median	85	85	48	42	55	34	104	99	78	72
1.Quartile	73	68	41	36	35	27	91	90	64	61
3.Quartile	103	97	64	59	72	37	120	111	98	91
Minimum	68	66	33	29	24	23	75	53	53	39
Maximum	185	194	74	93	106	45	153	135	191	175

Sowohl bei der Lagerung von Citratvollblut bei Raumtemperatur, als auch bei Citratplasma auf Eis zeigte sich ein leichter Abfall der Mediane von ca. 15% (Citratvollblut bei Raumtemperatur) bzw. 25 % (Citratplasma auf Eis). Bei der Lagerung von Citratplasma bei Raumtemperatur zeigten die Mediane die konstantesten Werte in Bezug zu PS. Bei der gekühlten Lagerung von Citratvollblut fielen die gemessenen Werte nach drei Stunden auf ca. 50% des Ausgangswertes ab, nach weiteren drei Stunden betragen die Werte im Median nur noch 42% (Eis, 4°C) bzw. 34% (Kühlakkus, -5°C).

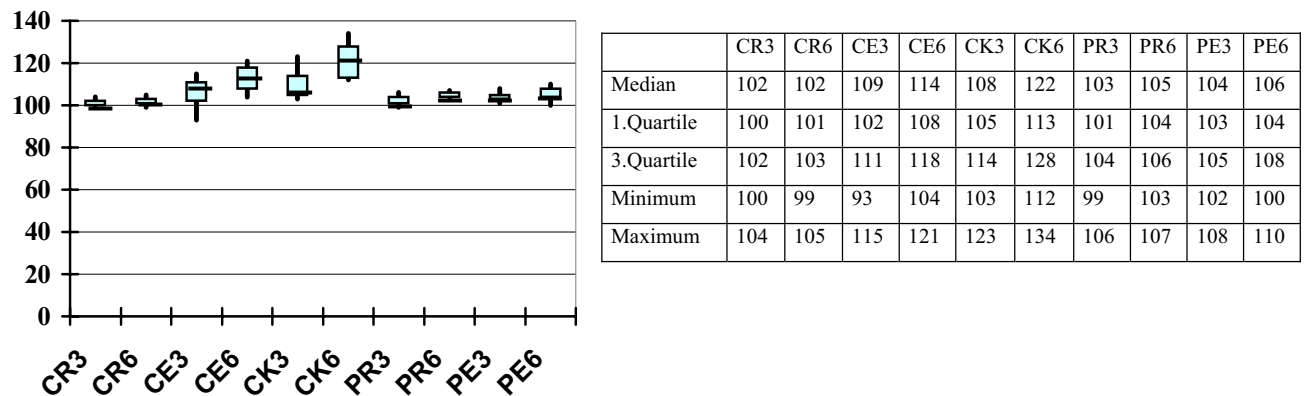
4.1.3. APTT

Tabelle 4.1.3.: APTT

Die Einheit der APTT lautete Sekunden (erste Zahl). Die zweite Zahl gab den Prozentwert von PS wieder.

Prob.	PS	CR3	CR6	CE3	CE6	CK3	CK6	PR3	PR6	PE3	PE6
B.,M.	34,4 100%	35,4 103%	35,9 104%	39,4 115%	40,9 119%	42,4 123%	44,2 128%	36,4 106%	36,7 107%	36,4 106%	37,4 109%
K.,A.	33,7 100%	33,7 100%	33,9 101%	34,2 102%	35,9 107%	35,4 105%	41,9 124%	34,2 101%	34,9 104%	34,2 104%	35,2 104%
K.,M.	33,2 100%	33,2 100%	32,9 99%	36,7 111%	37,7 114%	34,2 103%	39,2 118%	32,9 99%	34,2 103%	33,7 102%	34,7 105%
M.,M.	33,2 100%	34,4 104%	34,7 105%	34,7 105%	36,7 111%	36,4 110%	39,7 120%	34,4 104%	34,9 105%	34,9 105%	35,7 108%
P.,B.	30,9 100%	31,2 101%	31,2 101%	28,7 93%	33,7 108%	32,4 105%	34,9 113%	31,4 102%	32,2 104%	31,7 103%	30,9 100%
P.,F.	32,9 100%	33,4 102%	33,4 102%	36,7 111%	37,9 115%	34,2 104%	37,2 113%	33,9 103%	34,7 106%	34,2 104%	34,7 105%
S.,B.	26,9 100%	27,2 101%	27,4 102%	30,2 112%	31,4 117%	31,9 119%	34,4 128%	28,3 105%	28,2 105%	27,7 103%	27,9 104%
T.,H.	34,9 100%	34,9 100%	35,7 102%	35,7 102%	36,2 104%	37,2 107%	39,2 112%	34,9 100%	36,4 104%	36,2 104%	37,4 107%
T.,R.	32,3 100%	32,8 102%	33,0 102%	34,8 108%	36,8 114%	34,8 108%	39,6 123%	32,9 102%	33,9 105%	33,6 104%	34,3 106%
V.,T.	29,2 100%	29,7 102%	30,2 103%	31,9 109%	35,2 121%	32,7 112%	39,2 134%	30,4 104%	30,9 106%	31,4 108%	32,2 110%
MD	100%	102%	102%	109%	114%	108%	122%	103%	105%	104%	106%
Min.	100%	100%	99%	93%	104%	103%	112%	99%	103%	102%	100%
Max.	100%	104%	105%	115%	121%	123%	134%	106%	107%	108%	110%

Abbildung 4.1.3.: APTT – Veränderungen bezogen auf PS



Die Messung der APTT ergab relativ konstante Werte für die Lagerung von Citratplasma bei Raumtemperatur (Median 103% bzw. 105% in Bezug zum Normalwert ohne Lagerung) oder gekühlt (Median 104% bzw. 106%), sowie für Citratvollblut bei Raumtemperatur (Median 102%). Alle gemessenen Werte dieser Lagerungen lagen zwischen 99% und 110%.

Bei der gekühlten Lagerung von Citratvollblut zeigten sich größere Schwankungen der Messwerte (93% bis 134%). Im Mittel lagen die Werte nach dreistündiger Lagerung bei 109% (4°C) bzw. 108% (-5°C), nach sechs Stunden waren sie bereits auf 114% (Eis) bzw. 122% (Kühlakkus) angestiegen.

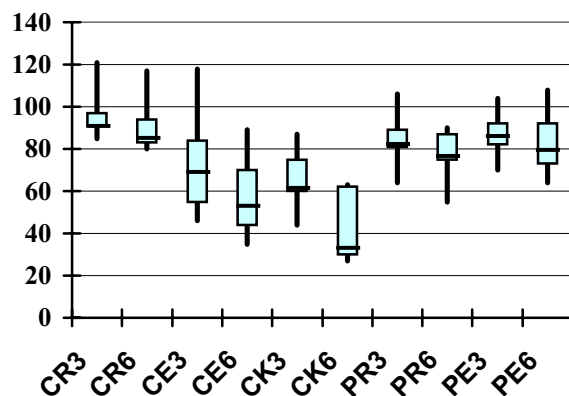
4.1.4. Faktor VIII-Aktivität

Tabelle 4.1.4.: Faktor VIII-Aktivität

Die Einheit der Faktor VIII-Aktivität wurde in „Prozent vom Normwert“ angegeben (erste Zahl). Die zweite Zahl gab den Prozentwert von PS wieder.

Prob.	PS	CR3	CR6	CE3	CE6	CK3	CK6	PR3	PR6	PE3	PE6
B.,M.	102 100%	97 95%	95 93%	80 78%	74 73%	66 65%	63 62%	90 88%	88 86%	91 89%	90 88%
K.,A.	71 100%	86 121%	83 117%	84 118%	63 89%	57 80%	22 31%	75 106%	64 90%	74 104%	77 108%
K.,M.	121 100%	115 95%	109 90%	60 50%	45 37%	105 87%	38 31%	98 81%	86 71%	103 85%	90 74%
M.,M.	90 100%	83 92%	84 93%	79 88%	57 63%	58 64%	36 40%	79 88%	73 81%	89 99%	78 87%
P.,B.	103 100%	103 100%	92 89%	58 56%	53 51%	45 44%	29 28%	88 85%	84 82%	92 89%	97 94%
P.,F.	107 100%	94 88%	88 82%	49 46%	49 46%	78 73%	45 42%	100 93%	87 81%	82 77%	73 68%
S.,B.	137 100%	131 96%	130 95%	108 79%	94 69%	92 67%	85 62%	115 84%	123 90%	122 89%	124 91%
T.,H.	123 100%	105 85%	98 80%	102 83%	77 63%	77 63%	77 63%	108 88%	100 81%	103 84%	100 81%
T.,R.	98 100%	92 94%	88 90%	71 72%	54 55%	69 70%	39 40%	79 81%	75 77%	86 88%	78 80%
V.,T.	150 100%	139 93%	124 83%	86 57%	52 35%	75 50%	41 27%	96 64%	83 55%	105 70%	96 64%
MD	100%	95%	90%	75%	59%	66%	40%	87%	81%	89%	84%
Min.	100%	85%	80%	46%	35%	44%	27%	64%	55%	70%	64%
Max.	100%	121%	117%	118%	89%	87%	63%	106%	90%	104%	108%

Abbildung 4.1.4.: Faktor VIII-Aktivität – Veränderungen bezogen auf PS



	CR3	CR6	CE3	CE6	CK3	CK6	PR3	PR6	PE3	PE6
Median	95	90	75	59	66	40	87	81	89	84
1.Quartile	91	83	55	44	60	30	81	75	82	73
3.Quartile	97	94	84	70	75	62	89	87	92	92
Minimum	85	80	46	35	44	27	64	55	70	64
Maximum	121	117	118	89	87	63	106	90	104	108

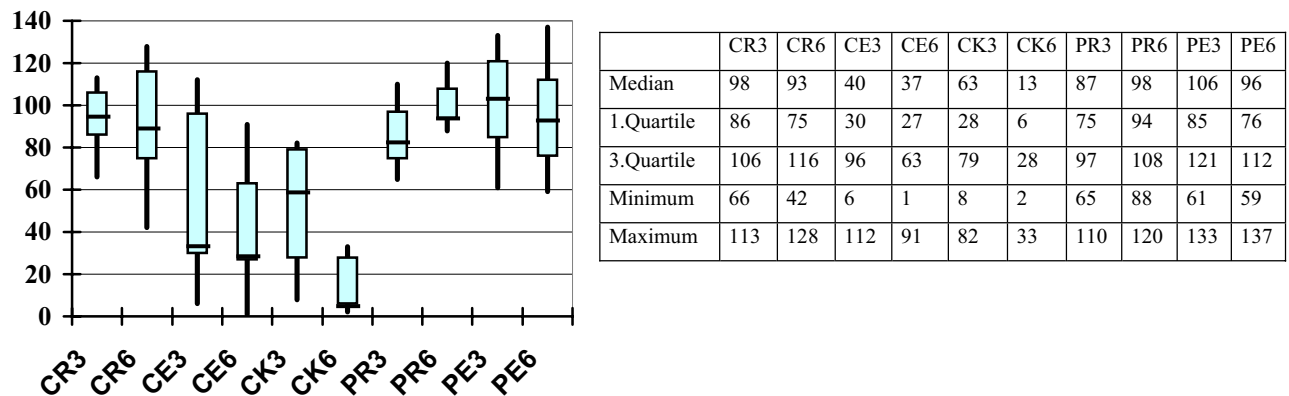
Bei der Lagerung von Citratplasma zeigten sich leichte Abfälle der Mediane sowohl bei Raumtemperatur (87% bzw. 81%) als auch bei Lagerung in Eis (89% bzw. 84%). Bei der Lagerung von Citratvollblut zeigten sich die konstantesten Werte (Median 95% bzw. 90%). Gekühlte Lagerungen des Citratvollblutes zeigten einen deutlicheren Verlust der Faktor VIII-Aktivität auf 75% (CE3) bzw. 59% (CE6) bei der Lagerung in Eis bzw. 66% (CK3) und 40% (CK6) bei der Lagerung zwischen Kühlakkus.

4.1.5. Kollagen-Bindungstest

Tabelle 4.1.5.: Kollagen-Bindungstest

Die Einheit des ermittelten Kollagen-Bindungstestes war „Prozent vom Normwert“ (erste Zahl). Die zweite Zahl gab den Prozentwert von PS wieder.

Prob.	PS	CR3	CR6	CE3	CE6	CK3	CK6	PR3	PR6	PE3	PE6
B.,M.	95,0 100%	74,6 79%	55,9 59%	36,1 38%	28,0 29%	12,9 14%	14,6 15%	61,6 65%	89,5 94%	58,2 61%	55,9 59%
K.,A.	56,4 100%	58,7 104%	50,7 90%	57,5 102%	49,6 88%	44,1 78%	6,2 11%	53,0 94%	65,8 112%	72,0 128%	42,0 74%
K.,M.	141,1 100%	123,9 112%	127,4 90%	9,1 6%	1,7 1%	91,2 65%	2,2 2%	117,8 83%	131,0 92%	187,8 133%	193,3 137%
M.,M.	55,2 100%	36,7 66%	44,1 80%	51,8 94%	30,5 55%	45,1 82%	15,9 29%	42,0 76%	58,7 106%	50,7 92%	53,0 96%
P.,B.	80 100%	77 96%	83 104%	99 41%	32 40%	26 33%	3 4%	84 105%	78 98%	86 108%	80 100%
P.,F.	67,0 100%	65,8 98%	86,1 128%	24,8 37%	22,1 33%	55,2 82%	18,9 28%	56,4 84%	58,7 88%	73,2 109%	61,0 91%
S.,B.	172,9 100%	174,5 101%	73,4 42%	36,1 21%	33,8 20%	13,7 8%	10,9 6%	124,4 72%	161,7 94%	110,6 64%	131,6 76%
T.,H.	96,6 100%	108,6 112%	109,4 113%	107,8 112%	87,5 91%	58,5 61%	31,7 33%	86,0 89%	97,4 101%	99,7 103%	108,6 112%
T.,R.	91,3 100%	88,2 97%	86,7 95%	51,1 56%	39,6 43%	58,4 64%	13,5 15%	80,8 89%	89,5 98%	93,6 103%	86,7 95%
V.,T.	134,5 100%	152,4 113%	164,9 123%	44,2 33%	46,1 34%	49,1 37%	8,5 6%	147,8 110%	161,7 120%	160,2 119%	150,9 112%
MD	100%	98%	93%	40%	37%	63%	13%	87%	98%	106%	96%
Min.	100%	66%	42%	6%	1%	8%	2%	65%	88%	61%	59%
Max.	100%	113%	128%	112%	91%	82%	33%	110%	120%	133%	137%

Abbildung 4.1.5.: Kollagen-Bindungstest – Veränderungen bezogen auf PS

Bei dem Kollagen-Bindungstest zeigten die gemessenen Werte relativ große Schwankungen. Die Lagerung von Citratvollblut bei Raumtemperatur (98% bzw. 93%) zeigte neben der Lagerung von Citratplasma in Eis (106% bzw. 96%) und der sechsstündige Lagerung von Citratplasma bei Raumtemperatur (98%) die konstantesten Werte. Die dreistündige Lagerung von Citratplasma bei Raumtemperatur (87%) lag knapp unter dem gewählten Bereich der akzeptierten Abweichung von 10% (also 90% bis 110% von PS). Bei der gekühlten Lagerung des Citratvollblutes zeigten sich deutliche Veränderungen bei der Lagerung in Eis (40% bzw. 37%) sowie bei der Lagerung bei ca. -5°C , bei der nach drei Stunden Werte von 63% gemessen wurden, die nach weiteren drei Stunden auf 13% absanken.

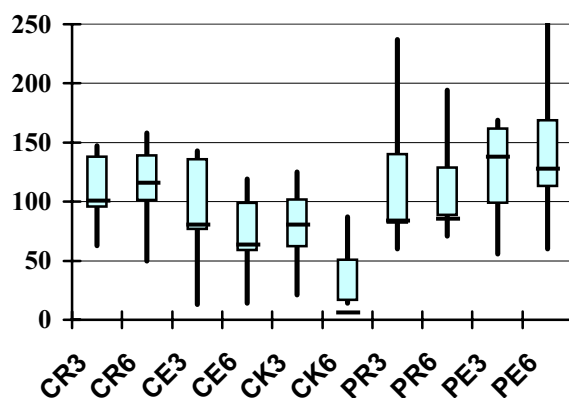
4.1.6. Ristocetin-Cofaktor - VWF-Antigen –Quotient

Tabelle 4.1.6.: Ristocetin-Cofaktor/VWF:Ag

Der Ristocetin-Cofaktor/VWF:Ag - Koeffizient besaß keine Einheit (erste Zahl). Die zweite Zahl gab den Prozentwert von PS wieder.

Pat.	PS	CR3	CR6	CE3	CE6	CK3	CK6	PR3	PR6	PE3	PE6
B.,M.	0,77 100%	1,02 132%	1,09 142%	1,0 130%	0,92 119%	0,44 57%	0,33 43%	1,27 165%	1,14 148%	1,25 162%	1,04 135%
K.,A.	1,35 100%	1,41 104%	1,54 114%	1,82 135%	1,08 80%	0,86 64%	0,19 14%	1,19 88%	1,52 113%	1,59 118%	1,64 122%
K.,M.	1,47 100%	0,92 63%	0,73 50%	0,19 13%	0,21 14%	1,45 99%	0,23 16%	1,23 84%	1,05 71%	0,83 56%	0,88 60%
M.,M.	0,63 100%	0,76 121%	0,87 138%	0,9 143%	0,61 97%	0,55 87%	0,13 21%	0,61 97%	0,58 92%	0,88 140%	0,83 132%
P.,B.	0,5 100%	0,52 104%	0,5 100%	0,39 78%	0,3 60%	0,55 110%	0,1 20%	0,3 60%	0,42 84%	0,43 86%	0,43 86%
P.,F.	0,79 100%	1,1 139%	0,97 123%	0,69 87%	0,63 80%	0,99 125%	0,69 87%	0,61 77%	0,72 91%	1,18 149%	2,0 253%
S.,B.	0,52 100%	0,72 138%	0,82 158%	0,42 81%	0,29 56%	0,11 21%	0,09 17%	0,5 96%	0,64 123%	0,84 162%	0,69 133%
T.,H.	0,68 100%	1,0 147%	0,88 129%	0,93 137%	0,7 103%	0,63 93%	0,51 75%	0,65 96%	0,64 94%	1,03 152%	1,1 162%
T.,R.	0,67 100%	0,72 107%	0,68 101%	0,63 94%	0,45 67%	0,6 90%	0,24 36%	1,59 237%	0,67 100%	0,69 103%	0,83 124%
V.,T.	0,52 100%	0,38 73%	0,68 131%	0,38 73%	0,39 75%	0,5 96%	0,11 21%	0,68 131%	1,01 194%	0,88 169%	0,99 190%
MD	100%	114%	126%	91%	78%	92%	21%	96%	97%	145%	133%
Min.	100%	63%	50%	13%	14%	21%	14%	60%	71%	56%	60%
Max.	100%	147%	158%	143%	119%	125%	87%	237%	194%	169%	253%

Abbildung 4.1.6.: Ristocetin-Cofaktor/VWF:Ag – Veränderungen bezogen auf PS



	CR3	CR6	CE3	CE6	CK3	CK6	PR3	PR6	PE3	PE6
Median	114	126	91	78	92	21	96	97	145	133
1.Quartile	96	101	77	59	62	17	82	89	99	113
3.Quartile	138	139	136	99	102	51	140	129	162	169
Minimum	63	50	13	14	21	14	60	71	56	60
Maximum	147	158	143	119	125	87	237	194	169	253

Am konstantesten waren die Mediane bei der Lagerung von Citratplasma bei Raumtemperatur (96% bzw.97% nach drei und sechs Stunden). Bei der Lagerung von Citratplasma in Eis stiegen die Werte der Mediane auf 145% bzw. 133%. Auch bei Lagerung von Citratvollblut bei Raumtemperatur zeigten sich Anstiege der Mediane auf 114% bzw. 126%. Die gekühlte Lagerung von Citratvollblut zeigte nach drei Stunden noch Werte im akzeptablen Bereich von 90% bis 110% des Ausgangswertes PS (CE3: 91%, CK3: 92%). Bei der sechsstündigen Lagerung von Citratvollblut in Eis lag der Median bei 78%, nach sechsstündiger Lagerung bei ca. -5°C sank er sogar auf 21%.

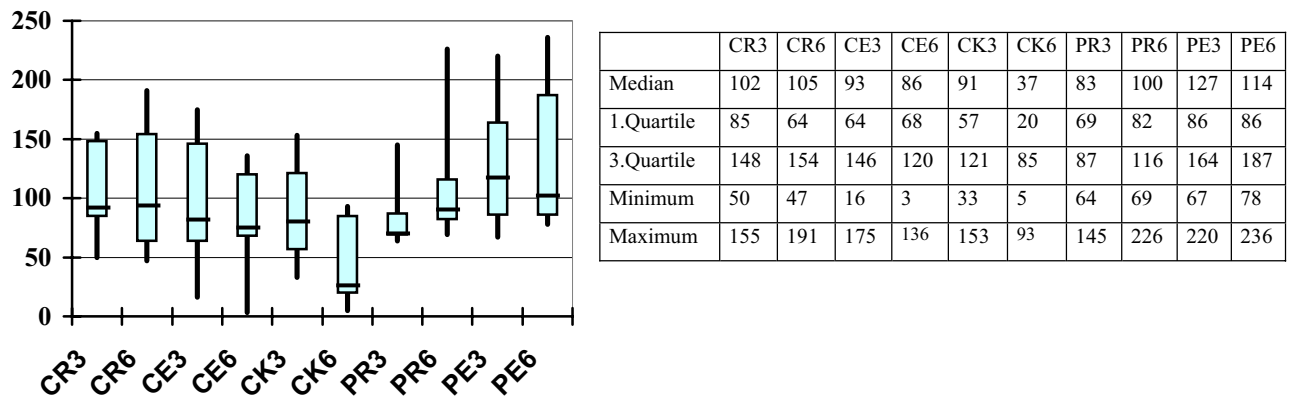
4.1.7. Kollagenbindungstest - vWF-Antigen - Quotient

Tabelle 4.1.7.: VWF:CB/VWF:Ag

Der VWF:CB/VWF:Ag - Koeffizient besaß keine Einheit (erste Zahl). Die zweite Zahl gab den Prozentwert von PS wieder.

Pat.	PS	CR3	CR6	CE3	CE6	CK3	CK6	PR3	PR6	PE3	PE6
B.,M.	1,56 100%	1,2 77%	0,98 63%	1,39 89%	1,16 74%	0,86 55%	0,97 62%	1,33 85%	1,56 100%	1,04 67%	1,22 78%
K.,A.	0,83 100%	0,84 101%	0,75 90%	1,15 139%	0,79 95%	0,69 83%	0,24 29%	0,74 89%	1,01 122%	1,27 153%	0,74 89%
K.,M.	2,17 100%	1,09 50%	1,01 47%	0,34 16%	0,07 3%	1,32 61%	0,1 5%	1,56 72%	1,49 69%	1,52 70%	1,7 78%
M.,M.	0,49 100%	0,43 88%	0,58 118%	0,82 167%	0,62 127%	0,75 153%	0,41 84%	0,39 80%	0,49 100%	0,68 139%	0,7 143%
P.,B.	0,58 100%	0,59 102%	0,64 110%	0,37 64%	0,4 69%	0,33 57%	0,06 10%	0,4 69%	0,45 78%	0,53 91%	0,52 90%
P.,F.	0,47 100%	0,68 145%	0,9 191%	0,45 96%	0,41 87%	0,63 134%	0,41 87%	0,3 64%	0,39 83%	0,93 198%	1,11 236%
S.,B.	0,91 100%	1,23 135%	0,58 64%	0,58 64%	0,57 63%	0,3 33%	0,21 23%	0,63 69%	1,04 114%	0,85 93%	0,99 109%
T.,H.	1,02 100%	1,58 155%	1,52 149%	1,79 175%	1,39 136%	1,19 117%	0,74 73%	0,88 86%	1,01 99%	1,47 144%	1,79 175%
T.,R.	0,75 100%	0,76 101%	0,74 99%	0,79 105%	0,64 85%	0,74 99%	0,33 44%	0,64 85%	0,75 100%	0,86 115%	0,89 119%
V.,T.	0,66 100%	1,02 155%	1,1 167%	0,52 79%	0,78 118%	0,66 100%	0,18 27%	0,96 145%	1,49 226%	1,45 220%	1,47 223%
MD	100%	102%	105%	93%	86%	91%	37%	83%	100%	127%	114%
Min.	100%	50%	47%	16%	3%	33%	5%	64%	69%	67%	78%
Max.	100%	155%	191%	175%	136%	153%	87%	145%	226%	220%	223%

Abbildung 4.1.7.: VWF:CB/VWF:Ag – Veränderungen bezogen auf PS



Bei der Bestimmung des VWF:CB - VWF:Ag – Quotienten zeigte sich eine sehr große Spannweite der Ergebnisse. Am konstantesten waren die Mediane bei der Lagerung von Citratvollblut bei Raumtemperatur (102% bzw. 105%) und bei der sechsständigen Aufbewahrung von Citratplasma bei Raumtemperatur. Bei der dreistündigen Lagerung von Citratplasma bei Raumtemperatur sanken die Werte der Mediane auf 83%. Auch bei Lagerung von Citratplasma in Eis zeigten sich Anstiege der Mediane auf 127% bzw. 114%. Die gekühlte Lagerung von Citratvollblut zeigte nach drei Stunden noch Werte im akzeptablen Bereich von 90% bis 110% des Ausgangswertes PS (CE3: 93%, CK3: 91%). Bei der sechsständigen Lagerung von Citratvollblut in Eis lag der Median bei 86%, nach sechsständiger Lagerung bei ca. -5°C sank er auf 37% ab.

4.1.8. Signifikanz

Die Testung auf Signifikanz wurde mit dem Wilcoxon-matched-pairs-Test durchgeführt.

Tabelle 4.1.8.1.: Signifikante Veränderungen der unterschiedlichen Lagerungen zum Ausgangswert (PS)

Untersuchung	CR3	CR6	CE3	CE6	CK3	CK6	PR3	PR6	PE3	PE6
Ristocetin-Cofaktor	n.s.	n.s.	0,002	0,002	0,004	0,002	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
VWF-Antigen	n.s.	n.s.	0,002	0,002	0,006	0,002	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
APTT	0,016	0,006	0,014	0,002	0,002	0,002	0,012	0,002	0,002	0,004
Faktor VIII-Aktivität	n.s.	0,049	0,01	0,002	0,002	0,002	0,004	0,002	0,006	0,006
Kollagen-Bindungstest	n.s.	n.s.	0,014	0,002	0,002	0,002	0,014	n.s.	n.s.	n.s.
VWF:RCo/VWF:Ag	n.s.	n.s.	n.s.	0,02	n.s.	0,002	n.s.	n.s.	0,037	0,049
VWF:CB/VWF:Ag	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0,002	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Bei dieser Tabelle wurden alle veränderten Größen, also Lagerungszeit, Lagerungstemperatur und ob es sich um Citratvollblut oder Citratplasma handelte, mit einbezogen.

Bei der Messung des Ristocetin-Cofaktors und des VWF-Antigens zeigten sich nur bei der gekühlten Lagerung von Citratvollblut signifikante Unterschiede zum Ausgangswert PS. Die APTT und die Faktor VIII-Aktivität schienen sensibler gegenüber Verzögerungen bei der Weiterverarbeitung der Proben zu sein, da es bei allen Lagerungen, außer CR3 bei der Faktor VIII-Aktivität, zu signifikanten Veränderungen im Vergleich zu PS kam. Der Kollagen-Bindungstest zeigte sowohl bei der gekühlten Lagerung von Citratvollblut, als auch bei der dreistündigen Lagerung von Citratplasma bei Raumtemperatur signifikante Veränderungen im Vergleich zu PS. Der Ristocetin-Cofaktor – vWF-Antigen – Quotient zeigte bei der sechsstündigen Lagerung von Citratvollblut in Eis bzw. zwischen Kühlakkus sowie bei der Aufbewahrung von Citratplasma in Eis signifikante Veränderungen. Der VWF:CB - VWF-Antigen – Quotient erbrachte nur bei CK6 signifikante Werte.

Tabelle 4.1.8.2.: Signifikante Veränderungen bezüglich der Lagerung von Citratvollblut bzw. Citratplasma bei gleicher Lagerungszeit und gleicher Temperatur

Untersuchung	CR3-PR3	CR6-PR6	CE3-PE3	CE6-PE6
Ristocetin-Cofaktor	n.s.	n.s.	0,004	0,002
VWF-Antigen	n.s.	n.s.	0,002	0,02
APTT	n.s.	0,004	n.s.	0,006
Faktor VIII-Aktivität	0,014	0,006	0,027	0,002
Kollagen-Bindungstest	n.s.	n.s.	0,01	0,004
VWF:RCo/VWF:Ag	n.s.	n.s.	0,027	0,002
VWF:CB/VWF:Ag	0,049	n.s.	n.s.	0,006

Bei dem Vergleich zwischen der Lagerung von Citratvollblut bzw. Citratplasma bei Raumtemperatur für jeweils drei Stunden ergab sich nur bei der Faktor VIII-Aktivität und den VWF:CB – VWF:Ag – Quotienten eine Signifikanz. Bei sechsstündiger Lagerung bei Raumtemperatur wurde bei der APTT und der Faktor VIII-Aktivität eine Signifikanz festgestellt. Bei gekühlter Lagerung in Eis ergab sich im Vergleich Citratvollblut zu Citratplasma, außer bei dreistündiger Lagerung für die APTT und den VWF:CB - VWF-Antigen – Quotienten, immer eine Signifikanz.

Tabelle 4.1.8.3.: Signifikante Veränderungen in Abhängigkeit von der Lagerungszeit

Untersuchung	CR3-CR6	CE3-CE6	CK3-CK6	PR3-PR6	PE3-PE6
Ristocetin-Cofaktor	n.s.	0,004	0,004	n.s.	n.s.
VWF-Antigen	n.s.	n.s.	0,004	n.s.	0,016
APTT	n.s.	0,002	0,002	0,004	0,049
Faktor VIII-Aktivität	0,006	0,004	0,004	0,014	n.s.
Kollagen-Bindungstest	n.s.	0,006	0,004	0,006	n.s.
VWF:RCo/VWF:Ag	n.s.	0,01	0,002	n.s.	n.s.
VWF:CB/VWF:Ag	n.s.	n.s.	0,004	0,004	n.s.

Im Vergleich zwischen der drei- bzw. sechsständigen Lagerung von Citratvollblut bei Raumtemperatur ergab sich nur für die Faktor VIII-Aktivität eine Signifikanz. Bei dem Vergleich zwischen der Aufbewahrung für drei bzw. sechs Stunden von Citratvollblut in Eis zeigten sich signifikante Werte für den Ristocetin-Cofaktor, APTT, Faktor VIII-Aktivität, den Kollagen-Bindungstest und den VWF:RCo – VWF:Ag - Quotienten. Wurde das Citratvollblut zwischen zwei Kühlakkus gelagert, ließ sich für alle durchgeführten Tests eine signifikante Veränderung zwischen drei- bzw. sechsständiger Lagerung feststellen. Wurde Citratplasma bei Raumtemperatur für drei bzw. sechs Stunden gelagert, führte dies zu signifikanten Veränderungen von APTT, Faktor VIII-Aktivität, Kollagen-Bindungstest und VWF:CB - VWF-Antigen – Quotient. Ein signifikanter Unterschied zwischen der Lagerung von Citratplasma auf Eis für drei bzw. sechs Stunden zeigte sich nur für vWF-Antigen und APTT.

Tabelle 4.1.8.4.: Signifikante Veränderungen in Abhängigkeit der Lagerungstemperatur

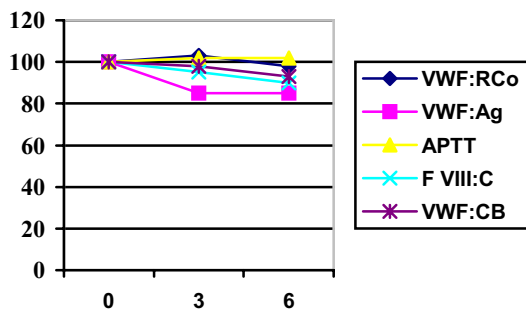
Untersuchung	CR3-CE3	CR6-CE6	CR3-CK3	CR6-CK6	CE3-CK3	CE6-CK6	PR3-PE3	PR6-PE6
Ristocetin-Cofaktor	0,002	0,002	0,002	0,002	n.s.	0,004	n.s.	n.s.
VWF-Antigen	0,002	0,002	0,002	0,002	n.s.	0,002	n.s.	n.s.
APTT	0,027	0,002	0,002	0,002	n.s.	0,004	n.s.	n.s.
Faktor VIII-Aktivität	0,002	0,002	0,002	0,002	n.s.	0,004	n.s.	n.s.
Kollagen-Bindungstest	0,012	0,002	0,006	0,002	n.s.	0,004	0,02	n.s.
VWF:RCo/VWF:Ag	n.s.	0,002	n.s.	0,002	n.s.	0,01	n.s.	n.s.
VWF:CB/VWF:Ag	n.s.	n.s.	n.s.	0,002	n.s.	0,008	0,01	n.s.

Verglich man die Lagerung von Citratvollblut bei Raumtemperatur mit der Lagerung in Eis bzw. bei -5°C (zwischen zwei Kühlakkus), stellte man nach drei Stunden signifikante Unterschiede von Ristocetin-Cofaktor, VWF-Antigen, APTT, Faktor VIII-Aktivität und Kollagen-Bindungstest fest. Bei der vergleichenden sechsständigen Aufbewahrung zwischen Citratvollblut bei Raumtemperatur und in Eis, sowie Citratvollblut bei Raumtemperatur und bei -5°C , und zwischen Citratvollblut in Eis und bei -5°C zeigte sich immer, außer bei CR6-CE6 für den VWF:CB – VWF:Ag – Quotienten, eine Signifikanz. Für die dreistündige

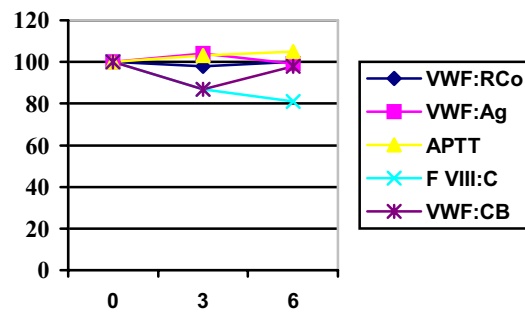
vergleichende Lagerung zwischen Eis und Kühlakku ließen sich keine signifikanten Unterschiede feststellen. Bei dem Vergleich der Temperaturbeeinflussung bei der Aufbewahrung von Citratplasma ließ sich nur für den Kollagen-Bindungstest und den VWF:CB - VWF-Antigen – Quotienten bei dreistündiger Lagerung eine Signifikanz feststellen.

4.1.9. graphische Zusammenfassung

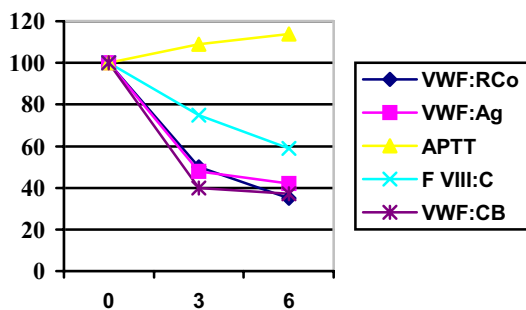
4.1.9.1.: Citratvollblut bei RT



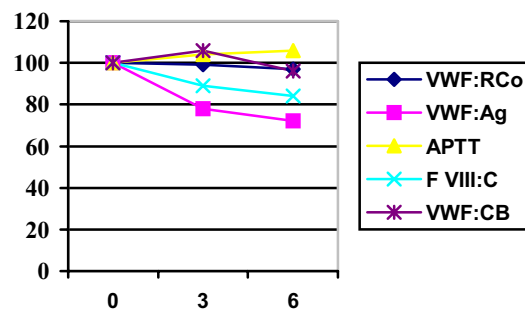
4.1.9.2.: Citratplasma bei RT



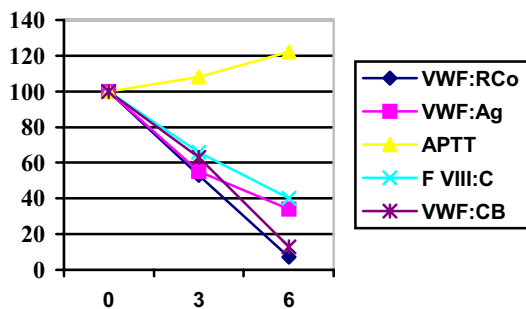
4.1.9.3.: Citratvollblut in Eis



4.1.9.4.: Citratplasma in Eis



4.1.9.5.: Citratvollblut zwischen Kühlakkus



4.2. Von Willebrand-Patienten, Typ 1

Dieses Kollektiv bestand aus 6 Frauen zwischen 29 und 58 Jahren sowie 4 Männer zwischen 36 und 69 Jahren (Median: 41,5 Jahre) mit einem von Willebrand-Syndrom, Typ 1. Bei allen Patienten wurde darauf geachtet, dass in den letzten sechs Monaten keine Operationen oder schwerwiegende Erkrankungen stattgefunden hatten, da diese die von Willebrand-Parameter erhöhen würden (Lutze et al, 1999). Auch durften keine anderen Erkrankungen wie koronare Herzkrankheit, venöse Verschlusskrankheit, Diabetes mellitus, Urämie, Tumore oder übermäßiger Stress vorliegen, da diese ebenfalls die von Willebrand-Werte erhöhen könnten. Eine Patientin gab eine Schilddrüsenunterfunktion an, welche aber gut medikamentös eingestellt war und deshalb keinen senkenden Einfluss auf die von Willebrand-Parameter haben sollte.

Durch verschiedene Lagerung entstanden pro Patient folgende Proben:

- | | |
|---------|--|
| PS | Das Blut (ein Röhrchen) wurde sofort zentrifugiert und der Überstand anschließend bei -80°C eingefroren. |
| CR3/CR6 | Das Citratblut (zwei Röhrchen) wurde für drei bzw. sechs Stunden bei Raumtemperatur gelagert, daraufhin zentrifugiert und eingefroren.. |
| CE3/CE6 | Das Citratblut (zwei Röhrchen) wurde für drei bzw. sechs Stunden in Eis gelagert, dann zentrifugiert und eingefroren. |
| CK3/CK6 | Das Citratblut (zwei Röhrchen) wurde für drei bzw. sechs Stunden zwischen zwei Kühlakkus gelagert, anschließend zentrifugiert und eingefroren. |
| PR3/PR6 | Der Plasmaüberstand aus einem Citratröhrchen wurde nach der Zentrifugation abpipettiert, auf zwei Reagenzgläser verteilt und für drei bzw. sechs Stunden bei Raumtemperatur gelagert und danach eingefroren. |
| PE3/PE6 | Der Plasmaüberstand aus einem Citratröhrchen wurde nach dem Zentrifugieren abpipettiert, auf zwei Reagenzgläser verteilt und für drei bzw. sechs Stunden in Eis gelagert und nachfolgend eingefroren. |

In den nachfolgenden Tabellen wurden die Mittelwerte (erste Zahl) der durchgeführten Doppelbestimmungen aufgeführt. Die zweite Zahl gab den Prozentsatz von PS wieder und zeigte somit wie sich die Werte bei bestimmten Lagerungen veränderten.

Am Ende der Tabelle wurde der Median (MD), sowie der minimale (Min.) und maximale (Max.) Wert der Prozentsätze von PS angegeben. Bei den Abbildungen wurden nur noch der Median und die Spanne der Prozentsätze von PS berücksichtigt.

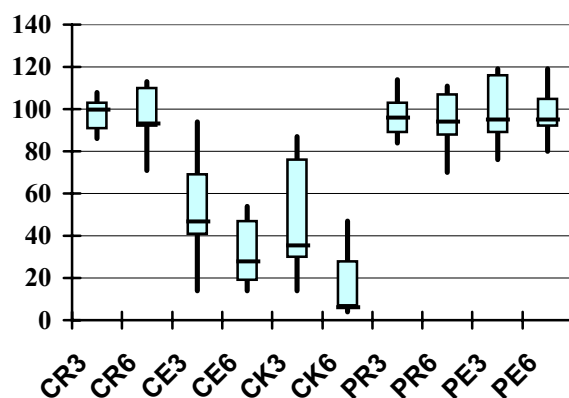
4.2.1. Ristocetin-Cofaktor

Tabelle 4.2.1.: Ristocetin-Cofaktor

Die Einheit des ermittelten Ristocetin-Cofaktors war „Prozent vom Normwert“ (erste Zahl). Die zweite Zahl gab den Prozentwert von PS wieder.

Pat.	PS	CR3	CR6	CE3	CE6	CK3	CK6	PR3	PR6	PE3	PE6
B.,G.	89 100%	81 91%	98 110%	61 69%	35 39%	50 56%	37 42%	84 94%	78 88%	76 85%	92 82%
B.,M.	36 100%	39 108%	40 111%	<5 14%	<5 14%	<5 14%	<5 14%	41 114%	40 111%	43 119%	43 119%
D.,B.	53 100%	54 102%	50 94%	28 53%	18 34%	39 74%	25 47%	54 102%	58 109%	61 115%	60 113%
E.,J.	93 100%	88 95%	89 96%	36 39%	18 19%	30 32%	<5 5%	83 89%	84 90%	90 97%	90 97%
J.,K.	71 100%	74 104%	67 94%	67 94%	38 54%	29 41%	16 23%	70 99%	68 96%	72 101%	73 102%
K.,H.	60 100%	61 102%	68 113%	29 48%	16 27%	24 40%	7 12%	59 98%	59 98%	54 90%	57 95%
M.,V.	77 100%	79 103%	72 94%	36 47%	26 34%	19 25%	6 8%	78 101%	77 100%	75 97%	70 91%
M.,W.	67 100%	68 101%	68 101%	28 42%	13 19%	58 87%	<5 7%	70 104%	58 87%	66 99%	66 99%
O.,S.	47 100%	42 89%	41 87%	30 64%	24 51%	18 38%	<5 11%	41 87%	50 106%	56 113%	48 102%
P.,M.	122 100%	105 86%	87 71%	84 69%	56 46%	102 84%	<5 4%	102 84%	85 70%	93 76%	97 80%
MD	100%	102%	95%	51%	34%	41%	12%	99%	97%	98%	98%
Min.	100%	86%	71%	14%	14%	14%	4%	84%	70%	76%	80%
Max.	100%	108%	113%	94%	54%	87%	47%	114%	111%	119%	119%

Abbildung 4.2.1.: Ristocetin-Cofaktor – Veränderungen bezogen auf PS



	CR3	CR6	CE3	CE6	CK3	CK6	PR3	PR6	PE3	PE6
Median	102	95	51	34	41	12	99	97	98	98
1.Quartile	91	92	41	19	30	7	89	88	89	92
3.Quartile	103	110	69	47	76	28	103	107	116	105
Minimum	86	71	14	14	14	4	84	70	76	80
Maximum	108	113	94	54	87	47	114	111	119	119

Bei der Bestimmung des Ristocetin-Cofaktors bei Probanden mit von Willebrand-Syndrom Typ 1 lagen die Mediane der Lagerung von Citratplasma bei Raumtemperatur oder in Eis, sowie von Citratvollblut bei Raumtemperatur im gewählten Akzeptanzbereich von 90% bis 110% vom Ausgangswert PS. Gekühltes Citratvollblut zeigte bereits nach dreistündiger Lagerung einen Abfall der ermittelten Mediane auf 51% (Eis, 4°C) bzw. 41% (Kühlakkus, -5°C). Nach sechsstündiger Lagerung fielen die Werte auf 34% (4°C) bzw. 12% (-5°C) ab.

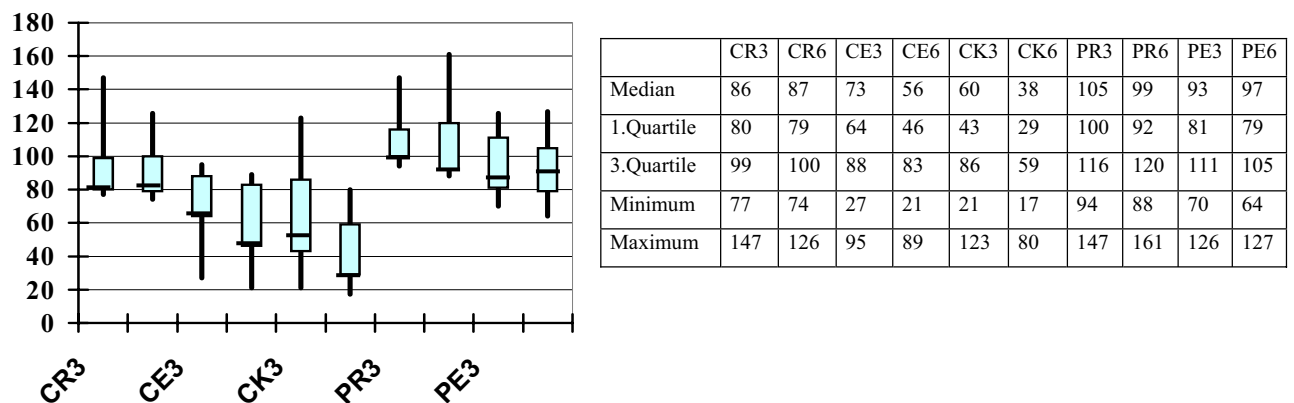
4.2.2. von Willebrand-Faktor-Antigen

Tabelle 4.2.2.: von Willebrand-Faktor-Antigen

Die Einheit des von Willebrand-Faktor-Antigens war „Prozent vom Normwert“ (erste Zahl). Die zweite Zahl gab den Prozentwert von PS wieder.

Pat.	PS	CR3	CR6	CE3	CE6	CK3	CK6	PR3	PR6	PE3	PE6
B.,G.	97 100%	81 84%	77 79%	67 69%	56 58%	63 65%	67 69%	102 105%	140 144%	74 76%	70 72%
B.,M.	48 100%	40 83%	44 92%	13 27%	10 21%	10 21%	8 17%	54 113%	46 96%	40 83%	39 81%
D.,B.	64 100%	56 88%	57 89%	48 75%	34 53%	52 81%	51 80%	94 147%	103 161%	80 125%	81 127%
E.,J.	68 100%	100 147%	83 122%	48 71%	30 44%	42 62%	20 29%	64 94%	61 90%	72 106%	74 109%
J.,K.	74 100%	58 78%	62 84%	70 95%	60 81%	42 57%	31 42%	78 105%	79 107%	76 103%	76 103%
K.,H.	101 100%	94 93%	93 92%	78 77%	90 89%	102 101%	56 55%	102 101%	102 101%	95 94%	100 99%
M.,V.	64 100%	49 77%	49 77%	36 56%	30 47%	28 44%	19 30%	69 108%	62 97%	45 70%	41 64%
M.,W.	43 100%	50 116%	54 126%	37 86%	33 77%	53 123%	17 40%	54 126%	48 112%	54 126%	42 98%
O.,S.	85 100%	68 80%	63 74%	56 66%	44 52%	40 47%	31 36%	82 96%	75 88%	76 89%	75 88%
P.,M.	74 100%	67 91%	62 84%	69 93%	65 88%	30 41%	20 27%	78 105%	69 93%	67 91%	70 95%
MD	100%	86%	87%	73%	56%	60%	38%	105%	99%	93%	97%
Min.	100%	77%	74%	27%	21%	21%	17%	94%	88%	70%	64%
Max.	100%	147%	126%	95%	89%	123%	80%	147%	161%	126%	127%

Abbildung 4.2.2.: Von Willebrand-Faktor-Antigen – Veränderungen bezogen auf PS



Die konstantesten Werte zeigten sich bei der Lagerung von Citratplasma bei Raumtemperatur 105% bzw. 99%) oder in Eis (93% und 97%). Bei der Lagerung von Citratvollblut bei Raumtemperatur zeigten sich geringe Abfälle der ermittelten Mediane auf 86% (nach drei Stunden) bzw. 87% (nach sechs Stunden). Bei gekühlter Lagerung von Citratvollblut in Eis fielen die Werte auf 73% (CE3) und 56% (CE6). Nach dreistündiger Lagerung zwischen zwei Kühlakkus sanken die Werte auf 60%, nach sechs Stunden sogar auf 38% ab.

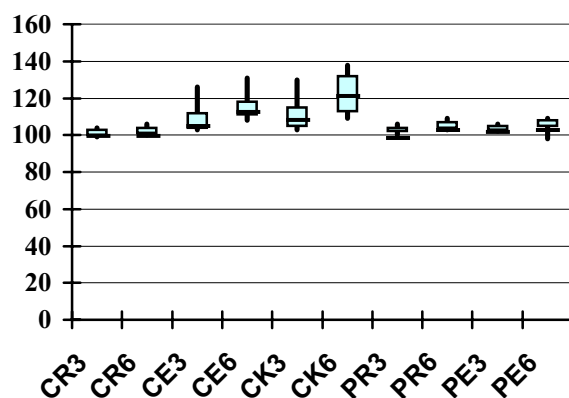
4.2.3. APTT

Tabelle 4.2.3.: APTT

Die Einheit der APTT lautete Sekunden (erste Zahl). Die zweite Zahl gab den Prozentwert von PS wieder.

Pat.	PS	CR3	CR6	CE3	CE6	CK3	CK6	PR3	PR6	PE3	PE6
B.,G.	38,4 100%	38,9 101%	38,9 101%	39,4 103%	42,2 110%	41,9 109%	41,7 109%	39,9 104%	41,2 107%	40,4 105%	41,9 109%
B.,M.	30,4 100%	31,4 103%	31,4 103%	38,2 126%	39,7 131%	39,4 130%	41,9 138%	31,2 103%	32,9 108%	31,7 104%	32,7 108%
D.,B.	32,7 100%	33,9 104%	32,9 101%	35,2 108%	36,4 111%	33,9 104%	36,2 111%	33,4 102%	34,2 105%	34,4 105%	34,7 106%
E.,J.	30,4 100%	30,2 99%	30,4 100%	32,9 108%	35,2 116%	33,4 110%	34,7 114%	30,7 101%	31,7 104%	31,2 103%	29,9 98%
J.,K.	23,7 100%	23,7 100%	24,4 103%	24,4 103%	25,7 108%	26,2 111%	27,4 116%	24,4 103%	24,9 105%	24,2 102%	24,9 105%
K.,H.	31,9 100%	32,9 103%	33,9 106%	35,9 113%	37,2 117%	36,4 114%	39,7 124%	33,9 106%	34,7 109%	33,4 105%	33,9 106%
M.,V.	35,4 100%	35,4 100%	35,4 100%	39,2 111%	40,7 115%	40,9 116%	43,7 123%	36,7 104%	36,7 104%	36,4 103%	37,2 105%
M.,W.	37,7 100%	38,7 103%	39,2 104%	41,9 111%	46,2 123%	38,7 103%	50,2 133%	38,7 103%	39,9 106%	39,9 106%	40,4 107%
O.,S.	31,4 100%	32,4 103%	32,7 104%	33,4 106%	34,9 111%	35,7 114%	38,2 122%	31,4 100%	32,2 103%	32,4 103%	33,2 106%
P.,M.	29,4 100%	30,4 103%	31,2 106%	30,7 104%	33,4 114%	30,9 105%	38,7 132%	30,9 105%	31,4 107%	30,9 105%	31,7 108%
MD	100%	103%	103%	108%	115%	111%	123%	103%	106%	105%	106%
Min.	100%	99%	100%	103%	108%	103%	109%	100%	103%	102%	98%
Max.	100%	104%	106%	126%	131%	130%	138%	106%	109%	106%	109%

Abbildung 4.2.3.: APTT – Veränderungen bezogen auf PS



	CR3	CR6	CE3	CE6	CK3	CK6	PR3	PR6	PE3	PE6
Median	103	103	108	115	111	123	103	106	105	106
1.Quartile	100	101	104	111	105	113	102	104	103	105
3.Quartile	103	104	112	118	115	132	104	107	105	108
Minimum	99	100	103	108	103	109	100	103	102	98
Maximum	104	106	126	131	130	138	106	109	106	109

Bei der Untersuchung der lagerungsabhängigen Veränderung der APTT zeigte sich, dass bei der Lagerung von Citratplasma bei Raumtemperatur bzw. in Eis und bei der Lagerung von Citratvollblut bei Raumtemperatur die gesetzten Akzeptanzgrenzen von 90% bis 110% von PS nicht überschritten wurden. Alle gemessenen Werte lagen zwischen 98% und 109%. Bei der gekühlten Lagerung von Citratvollblut zeigten sich größere Schwankungen. Zwar war auch der Median bei dreistündiger Lagerung auf Eis (108%) noch im akzeptablen Bereich, jedoch nach sechsständiger Lagerung zeigten sich deutliche Verlängerungen der APTT (Median 115%). Auch bei der Lagerung bei -5°C verlängerte sich die APTT deutlich, nach drei Stunden betrug sie im Mittel 111 % vom Ausgangswert PS (ohne Lagerung), nach sechs Stunden 123%.

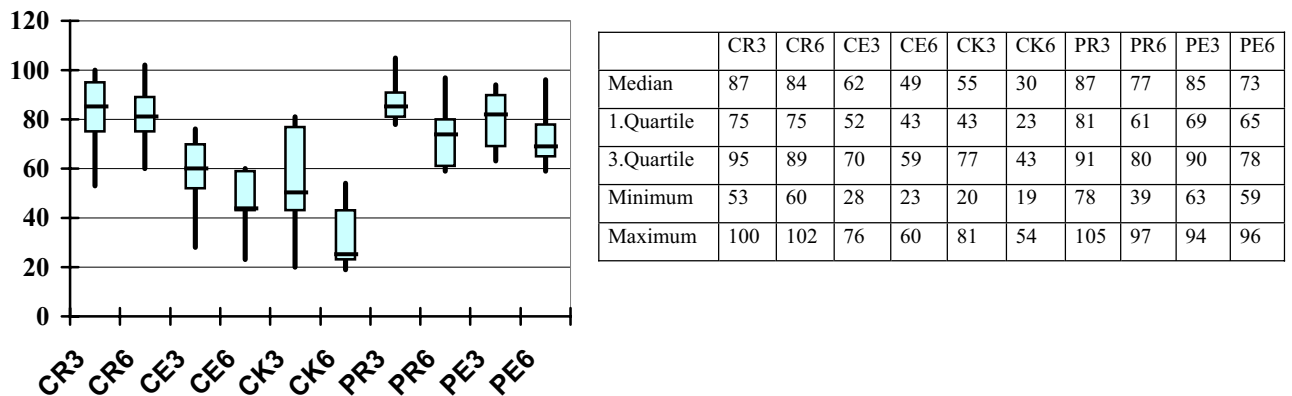
4.2.4. Faktor VIII-Aktivität

Tabelle 4.2.4.: Faktor VIII-Aktivität

Die Einheit der Faktor VIII-Aktivität wurde in „Prozent vom Normwert“ angegeben (erste Zahl). Die zweite Zahl gab den Prozentwert von PS wieder.

Pat.	PS	CR3	CR6	CE3	CE6	CK3	CK6	PR3	PR6	PE3	PE6
B.,G.	76 100%	71 93%	71 93%	58 76%	42 55%	48 63%	41 54%	69 91%	59 78%	60 79%	56 74%
B.,M.	90 100%	61 68%	66 73%	25 28%	21 23%	18 20%	17 19%	72 80%	53 59%	77 86%	66 73%
D.,B.	85 100%	45 53%	51 60%	52 61%	38 45%	66 78%	45 53%	66 78%	50 59%	54 64%	52 61%
E.,J.	93 100%	81 87%	95 102%	59 63%	43 46%	51 55%	25 27%	98 105%	90 97%	85 91%	89 96%
J.,K.	182 100%	182 100%	160 88%	130 71%	109 60%	99 54%	71 39%	160 88%	144 79%	167 92%	133 73%
K.,H.	123 100%	114 93%	107 87%	70 57%	73 59%	56 46%	45 37%	105 85%	94 76%	111 90%	96 78%
M.,V.	100 100%	100 100%	84 84%	43 43%	48 48%	32 32%	23 23%	84 84%	78 78%	63 63%	59 59%
M.,W.	53 100%	45 85%	43 81%	29 55%	19 36%	41 77%	12 23%	48 90%	35 66%	50 94%	35 66%
O.,S.	98 100%	86 87%	82 84%	69 70%	58 59%	51 52%	31 32%	89 91%	79 81%	82 84%	76 78%
P.,M.	146 100%	113 77%	109 75%	98 67%	71 49%	118 81%	32 22%	118 81%	89 61%	103 71%	99 68%
MD	100%	87%	84%	62%	49%	55%	30%	87%	77%	85%	73%
Min.	100%	53%	60%	28%	23%	20%	19%	78%	59%	63%	59%
Max.	100%	100%	102%	76%	60%	81%	54%	105%	97%	94%	96%

Abbildung 4.2.4.: Faktor VIII Aktivität – Veränderungen bezogen auf PS



Bei der Lagerung von Citratplasma stellten wir leichte Abfälle der Mediane bei Raumtemperatur (87% bzw. 77%) und bei Lagerung in Eis (85% bzw. 73%) fest. Bei der Lagerung von Citratvollblut ergaben sich ebenfalls leichte Abfälle bei Raumtemperatur (Median 87% bzw. 84%). Gekühlte Lagerungen des Citratvollblutes zeigten einen deutlicheren Verlust der Faktor VIII-Aktivität auf 62% (CE3) bzw. 49% (CE6) bei der Lagerung in Eis bzw. 55% (CK3) und 30% (CK6) bei der Lagerung zwischen Kühlakkus.

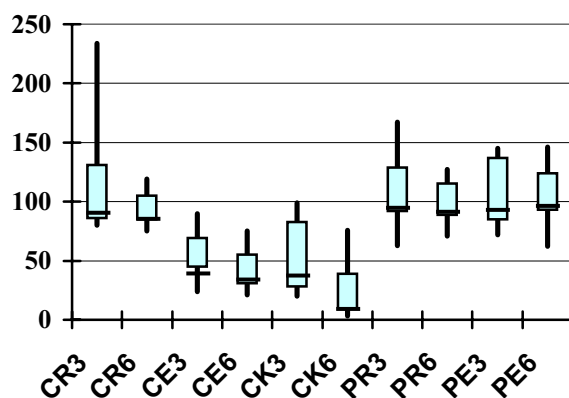
4.2.5. Kollagen-Bindungstest

Tabelle 4.2.5.: Kollagen-Bindungstest

Die Einheit des ermittelten Kollagen-Bindungstestes war „Prozent vom Normwert“ (erste Zahl). Die zweite Zahl gab den Prozentwert von PS wieder.

Pat.	PS	CR3	CR6	CE3	CE6	CK3	CK6	PR3	PR6	PE3	PE6
B.,G.	121,8 100%	105,1 86%	128,5 106%	92,4 76%	63,8 52%	85,9 71%	92,9 76%	154,9 127%	124,7 102%	105,1 86%	117,5 96%
B.,M.	68,1 100%	93,7 138%	71,4 105%	16,3 24%	14,2 21%	13,6 20%	5,1 7%	91,4 134%	86,8 127%	98,5 145%	86,0 126%
D.,B.	63,9 100%	149,5 234%	58,0 91%	35,4 55%	28,2 44%	55,5 87%	37,6 59%	106,7 167%	70,8 111%	87,9 138%	78,7 123%
E.,J.	100,6 100%	104,6 104%	99,6 99%	47,3 47%	33,6 33%	46,3 46%	19,2 19%	106,7 106%	126,7 126%	101,6 101%	146,8 146%
J.,K.	71,9 100%	68,3 95%	54,0 75%	34,3 48%	46,3 64%	21,9 30%	18,1 25%	45,2 63%	63,7 89%	98,2 137%	64,1 89%
K.,H.	111 100%	89 80%	83,4 75%	58,4 53%	47,7 43%	58,9 53%	35,5 32%	110 99%	107 96%	95 86%	104 94%
M.,V.	101,2 100%	129,2 128%	120,3 119%	68,1 67%	45,6 45%	23,4 23%	9,4 9%	94,3 93%	98,7 98%	103,2 102%	112,6 111%
M.,W.	109,4 100%	98,9 90%	99,7 91%	43,7 40%	26,9 25%	108,6 99%	3,0 3%	109,4 100%	78,1 71%	78,8 72%	67,3 62%
O.,S.	77,6 100%	65,1 84%	68,3 88%	39,2 51%	40,7 52%	33,8 44%	22,7 29%	88,3 114%	82,2 106%	64,3 83%	77,6 100%
P.,M.	127,7 100%	135,0 106%	133,9 105%	115,4 90%	96,1 75%	104,2 82%	17,5 14%	111,9 88%	113,6 89%	160,9 126%	152,8 120%
MD	100%	100%	95%	52%	45%	50%	22%	103%	100%	102%	106%
Min.	100%	80%	75%	24%	21%	20%	3%	63%	71%	72%	62%
Max.	100%	234%	119%	90%	75%	99%	76%	167%	127%	145%	146%

Abbildung 4.2.5.: Kollagen-Bindungstest – Veränderungen bezogen auf PS



	CR3	CR6	CE3	CE6	CK3	CK6	PR3	PR6	PE3	PE6
Median	100	95	52	45	50	22	103	100	102	106
1.Quartile	86	85	45	31	28	9	92	89	85	93
3.Quartile	131	105	69	55	83	39	129	115	137	124
Minimum	80	75	24	21	20	3	63	71	72	62
Maximum	234	119	90	75	99	76	167	127	145	146

Bei dem Kollagen-Bindungstest ergaben die gemessenen Werte relativ große Schwankungen. Die Lagerung von Citratvollblut bei Raumtemperatur (100% bzw. 95%) zeigte neben der Lagerung von Citratplasma bei Raumtemperatur (103% bzw. 100%) und in Eis (102% bzw. 106%) die konstantesten Werte in dem gewählten Bereich der akzeptierten Abweichung von 10% (also 90% bis 110% von PS). Bei der gekühlten Lagerung des Citratvollblutes stellten wir deutliche Veränderungen bei der Lagerung in Eis (52% bzw. 45%) sowie bei der Lagerung bei ca. -5°C (50% bzw. 22%) fest.

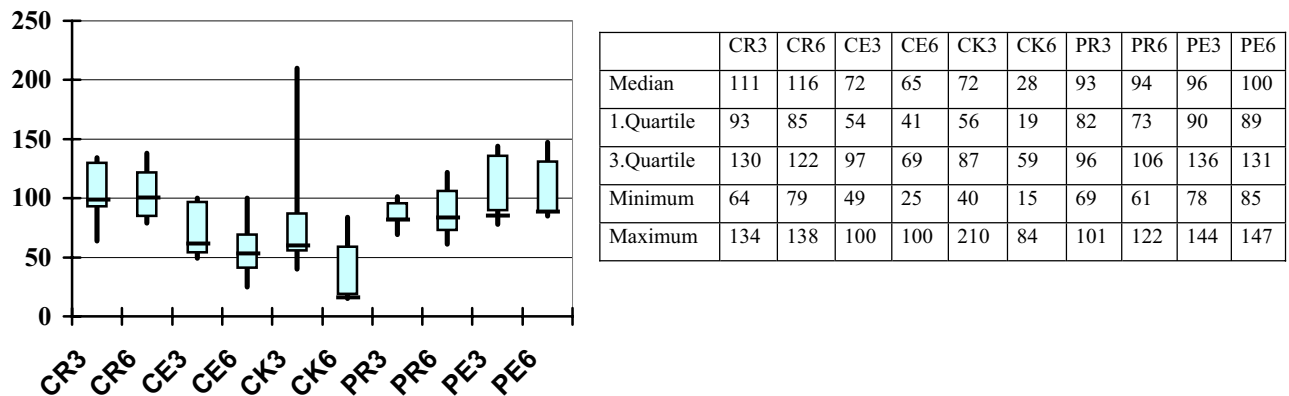
4.2.6. Ristocetin-Cofaktor - VWF-Antigen – Quotient

Tabelle 4.2.6.: Ristocetin-Cofaktor/VWF:Ag

Der Ristocetin-Cofaktor/VWF:Ag - Koeffizient besaß keine Einheit (erste Zahl). Die zweite Zahl gab den Prozentwert von PS wieder.

Pat.	PS	CR3	CR6	CE3	CE6	CK3	CK6	PR3	PR6	PE3	PE6
B.,G.	0,92 100%	1,0 109%	1,27 138%	0,91 99%	0,63 68%	0,79 86%	0,55 60%	0,83 90%	0,56 61%	1,03 112%	1,18 128%
B.,M.	0,75 100%	0,97 129%	0,91 121%	0,38 51%	0,5 67%	0,5 67%	0,63 84%	0,76 101%	0,87 116%	1,08 144%	1,1 147%
D.,B.	0,83 100%	0,96 116%	0,88 106%	0,58 70%	0,53 64%	0,75 90%	0,49 59%	0,57 69%	0,56 67%	0,76 92%	0,74 89%
E.,J.	1,37 100%	0,88 64%	1,08 79%	0,75 55%	0,6 44%	0,71 52%	0,25 18%	1,3 95%	1,37 100%	1,25 91%	1,22 89%
J.,K.	0,96 100%	1,28 133%	1,08 113%	0,96 100%	0,63 66%	0,69 72%	0,52 54%	0,9 94%	0,86 90%	0,94 98%	0,96 100%
K.,H.	0,6 100%	0,65 108%	0,73 122%	0,37 62%	0,18 30%	0,24 40%	0,13 22%	0,58 97%	0,58 97%	0,56 93%	0,57 95%
M.,V.	1,2 100%	1,61 134%	1,47 123%	1,0 83%	0,87 73%	0,68 57%	0,32 27%	1,14 95%	1,23 103%	1,67 139%	1,69 141%
M.,W.	1,56 100%	1,35 87%	1,27 81%	0,76 49%	0,39 25%	1,1 71%	0,29 19%	1,3 83%	1,2 77%	1,22 78%	1,56 100%
O.,S.	0,55 100%	0,62 113%	0,65 118%	0,53 96%	0,55 100%	0,45 82%	0,16 29%	0,5 91%	0,67 122%	0,74 135%	0,64 116%
P.,M.	1,64 100%	1,56 95%	1,41 86%	1,22 74%	0,86 52%	3,45 210%	0,25 15%	1,32 80%	1,23 75%	1,39 85%	1,39 85%
MD	100%	111%	116%	72%	65%	72%	28%	93%	94%	96%	100%
Min.	100%	64%	79%	49%	25%	40%	15%	69%	61%	78%	85%
Max	100%	133%	138%	100%	100%	210%	84%	101%	122%	144%	147%

Abbildung 4.2.6.: Ristocetin-Cofaktor/VWF:Ag – Veränderungen bezogen auf PS



Am konstantesten waren die Mediane bei der Lagerung von Citratplasma bei Raumtemperatur (93% bzw. 94%) und in Eis (96% bzw. 100%). Bei der Aufbewahrung von Citratvollblut bei Raumtemperatur stiegen die Werte nach drei Stunden auf 111%, nach sechs Stunden auf 116%. Die gekühlte Lagerung von Citratvollblut zeigte nach drei Stunden Werte von 72% (Eis und Kühlakku). Bei der sechsstündigen Lagerung von Citratvollblut in Eis lag der Median bei 65%, nach sechsstündiger Lagerung bei ca. -5°C bei 28%.

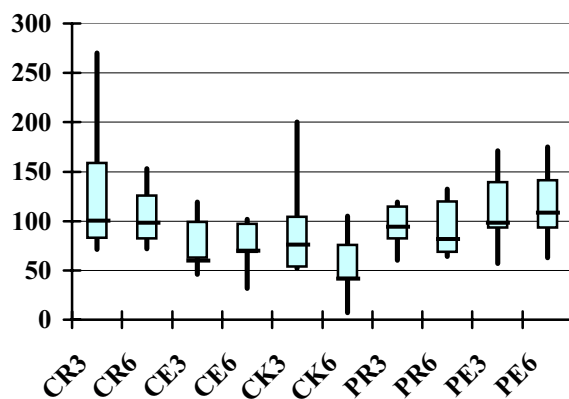
4.2.7. Kollagenbindungstest - VWF-Antigen - Quotient

Tabelle 4.2.7.: VWF:CB/VWF:Ag

Der VWF:CB/VWF:Ag - Koeffizient besaß keine Einheit (erste Zahl). Die zweite Zahl gab den Prozentwert von PS wieder.

Pat.	PS	CR3	CR6	CE3	CE6	CK3	CK6	PR3	PR6	PE3	PE6
B.,G	1,33 100%	1,3 98%	1,67 126%	1,37 103%	1,14 86%	1,37 103%	1,39 105%	1,52 114%	0,89 67%	1,43 108%	1,67 126%
B.,M.	1,43 100%	2,33 163%	1,61 113%	1,25 87%	1,43 100%	1,35 94%	0,64 45%	1,69 118%	1,89 132%	2,44 171%	2,22 155%
D.,B.	1,0 100%	2,7 270%	1,02 102%	0,74 74%	0,83 83%	1,06 106%	0,74 74%	1,14 114%	0,69 69%	1,1 110%	0,97 97%
E.,J.	1,47 100%	1,04 71%	1,2 82%	0,99 67%	1,12 76%	1,1 75%	0,96 65%	1,67 114%	1,75 119%	1,41 96%	2,0 136%
J.,K.	0,97 100%	1,18 122%	0,87 90%	0,49 51%	0,77 79%	0,52 54%	0,58 60%	0,58 60%	0,81 84%	1,3 134%	0,84 87%
K.,H.	1,1 100%	0,94 85%	0,89 81%	0,75 68%	0,53 48%	0,58 53%	0,63 57%	1,08 98%	1,05 95%	1,0 91%	1,04 95%
M.,V.	1,59 100%	2,5 157%	2,44 153%	1,89 119%	1,52 96%	0,83 52%	0,5 31%	1,37 86%	1,59 100%	2,27 143%	2,78 175%
M.,W.	2,56 100%	1,96 77%	1,85 72%	1,18 46%	0,81 32%	2,04 80%	0,18 7%	2,04 80%	1,64 64%	1,45 57%	1,61 63%
O.,S.	0,91 100%	0,96 105%	1,09 120%	0,7 77%	0,93 102%	0,85 93%	0,73 80%	1,08 119%	1,1 121%	0,85 93%	1,03 113%
P.,M.	1,72 100%	2,0 116%	2,17 126%	1,67 97%	1,47 85%	3,45 200%	0,88 51%	1,43 83%	1,64 95%	2,38 138%	2,17 126%
MD	100%	111%	108%	76%	84%	87%	59%	106%	95%	109%	120%
Min.	100%	71%	72%	46%	32%	52%	7%	60%	64%	57%	63%
Max.	100%	270%	153%	119%	102%	200%	105%	119%	132%	171%	175%

Abbildung 4.2.7.: VWF:CB/VWF:Ag– Veränderungen bezogen auf PS



	CR3	CR6	CE3	CE6	CK3	CK6	PR3	PR6	PE3	PE6
Median	111	108	76	84	87	59	106	95	109	120
1.Quartile	83	82	63	69	54	42	82	69	93	93
3.Quartile	159	126	99	97	104	76	115	120	139	141
Minimum	71	72	46	32	52	7	60	64	57	63
Maximum	270	153	119	102	200	105	119	132	171	175

Am konstantesten waren die Mediane bei der Lagerung von Citratvollblut bei Raumtemperatur (111% bzw. 108%) und die Lagerung von Citratplasma bei Raumtemperatur

(106% bzw. 95%). Auch bei dreistündigen Lagerung von Citratplasma in Eis lag der ermittelte Median (109%) noch im Akzeptanzbereich (90% bis 110% von PS). Nach sechsstündiger Lagerung wurde der ermittelte Wert jedoch mit 120% außerhalb dessen gemessen. Die gekühlte Lagerung von Citratvollblut zeigte nach drei Stunden Werte von 76% (4°C) bzw. 87% (-5°C). Bei der sechsstündigen Lagerung von Citratvollblut in Eis ergab der Median Werte von 84%, nach sechsstündiger Lagerung bei ca. -5°C sank er auf 59%.

4.2.8. Signifikanz

Die Testung auf Signifikanz wurde mit dem Wilcoxon-matched-pairs-Test durchgeführt.

Tabelle 4.2.8.1.: Signifikante Veränderungen der unterschiedlichen Lagerungen zum Ausgangswert (PS)

Untersuchung	CR3	CR6	CE3	CE6	CK3	CK6	PR3	PR6	PE3	PE6
Ristocetin-Cofaktor	n.s.	n.s.	0,002	0,002	0,002	0,002	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
VWF-Antigen	n.s.	n.s.	0,002	0,002	0,014	0,002	0,048	n.s.	n.s.	n.s.
APTT	0,023	0,008	0,002	0,002	0,002	0,002	0,004	0,002	0,002	0,004
Faktor VIII-Aktivität	0,008	0,004	0,002	0,002	0,002	0,002	0,004	0,002	0,002	0,002
Kollagen-Bindungstest	n.s.	n.s.	0,002	0,002	0,002	0,002	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
VWF:RCo/VWF:Ag	n.s.	n.s.	0,004	0,004	n.s.	0,002	0,004	n.s.	n.s.	n.s.
VWF:CB/VWF:Ag	n.s.	n.s.	0,027	0,008	n.s.	0,004	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Bei dieser Tabelle wurden alle veränderten Größen, also Lagerungszeit, Lagerungstemperatur und ob es sich um Citratvollblut oder Citratplasma handelte, mit einbezogen.

Bei der Messung des Ristocetin-Cofaktors und des Kollagen-Bindungstestes zeigten sich nur bei der gekühlten Lagerung von Citratvollblut signifikante Unterschiede zum Ausgangswert PS. Bei der Messung des VWF-Antigens ergab sich zusätzlich noch eine Signifikanz für die dreistündige Lagerung von Citratplasma bei Raumtemperatur. Die APTT und die Faktor VIII-Aktivität scheinen sensibler gegenüber Verzögerungen bei der Weiterverarbeitung der Proben zu sein, da es bei allen Lagerungen zu signifikanten Veränderungen im Vergleich zu PS kam. Der Kollagenbindungstest - VWF-Antigen - Quotient sowie der Ristocetin-Cofaktor - VWF-Antigen - Quotient erbrachten bei gekühlter Lagerung von Citratvollblut in Eis bzw. bei sechsstündiger Lagerung bei -5°C signifikante Werte. Bei dem VWF:RCo/VWF:Ag - Quotienten zeigten sich zusätzlich signifikante Werte bei der dreistündigen Lagerung von Citratplasma bei Raumtemperatur.

Tabelle 4.2.8.2.: Signifikante Veränderungen bezüglich der Lagerung von Citratvollblut bzw. Citratplasma bei gleicher Lagerungszeit und gleicher Temperatur

Untersuchung	CR3-PR3	CR6-PR6	CE3-PE3	CE6-PE6
Ristocetin-Cofaktor	n.s.	n.s.	0,002	0,002
VWF-Antigen	n.s.	n.s.	0,004	0,002
APTT	n.s.	0,006	0,02	0,002
Faktor VIII-Aktivität	n.s.	0,002	0,002	0,002
Kollagen-Bindungstest	n.s.	n.s.	0,002	0,002
VWF:RCo/VWF:Ag	0,037	0,049	0,004	0,002
VWF:CB/VWF:Ag	n.s.	n.s.	0,002	0,002

Bei dem Vergleich zwischen der Lagerung von Citratvollblut bzw. Citratplasma bei Raumtemperatur für jeweils drei Stunden ergab sich nur bei dem Ristocetin-Cofaktor – VWF-Antigen - Quotient eine Signifikanz. Bei sechsständiger Lagerung bei Raumtemperatur wurde bei der APTT, der Faktor VIII-Aktivität sowie bei dem VWF:RCo/VWF:Ag – Quotienten eine Signifikanz festgestellt. Bei gekühlter Lagerung in Eis zeigte sich im Vergleich Citratvollblut zu Citratplasma immer eine Signifikanz.

Tabelle 4.2.8.3.: Signifikante Veränderungen in Abhängigkeit von der Lagerungszeit

Untersuchung	CR3-CR6	CE3-CE6	CK3-CK6	PR3-PR6	PE3-PE6
Ristocetin-Cofaktor	n.s.	0,004	0,004	n.s.	n.s.
VWF-Antigen	n.s.	0,027	0,01	n.s.	n.s.
APTT	n.s.	0,002	0,004	0,004	n.s.
Faktor VIII-Aktivität	n.s.	0,014	0,002	0,002	0,02
Kollagen-Bindungstest	n.s.	n.s.	0,006	n.s.	n.s.
VWF:RCo/VWF:Ag	n.s.	0,027	0,004	n.s.	n.s.
VWF:CB/VWF:Ag	n.s.	n.s.	0,027	n.s.	n.s.

Im Vergleich zwischen der drei- bzw. sechsständigen Lagerung von Citratvollblut bei Raumtemperatur konnte keine Signifikanz ermittelt werden. Bei dem Vergleich zwischen der Aufbewahrung für drei bzw. sechs Stunden von Citratvollblut in Eis zeigten sich signifikante Werte für den Ristocetin-Cofaktor, VWF-Antigen, APTT, Faktor VIII-Aktivität und den Kollagenbindungstest - VWF-Antigen– Quotienten. Wurde das Citratvollblut zwischen zwei Kühlakkus gelagert, ließ sich für alle durchgeführten Test eine signifikante Veränderung zwischen drei- bzw. sechsständiger Lagerung feststellen. Wurde Citratplasma bei Raumtemperatur für drei bzw. sechs Stunden gelagert, führte dies zu signifikanten Veränderungen von APTT und Faktor VIII-Aktivität. Ein signifikanter Unterschied zwischen der Lagerung von Citratplasma auf Eis für drei bzw. sechs Stunden zeigte sich nur für die Faktor VIII-Aktivität.

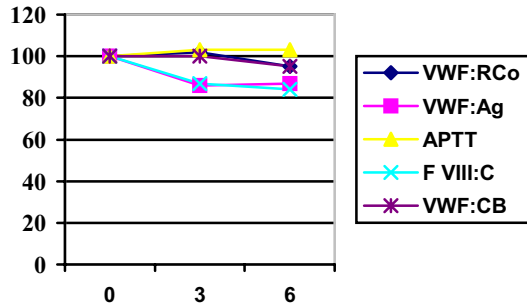
Tabelle 4.2.8.4.: Signifikante Veränderungen in Abhängigkeit der Lagerungstemperatur

Untersuchung	CR3-CE3	CR6-CE6	CR3-CK3	CR6-CK6	CE3-CK3	CE6-CK6	PR3-PE3	PR6-PE6
Ristocetin-Cofaktor	0,002	0,002	0,002	0,002	n.s.	0,027	n.s.	n.s.
VWF-Antigen	0,037	0,01	0,02	0,002	n.s.	0,049	0,027	n.s.
APTT	0,002	0,002	0,008	0,002	n.s.	0,02	n.s.	n.s.
Faktor VIII-Aktivität	0,004	0,002	0,014	0,002	n.s.	0,01	n.s.	n.s.
Kollagen-Bindungstest	0,002	0,002	0,004	0,002	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
VWF:RCo/VWF:Ag	0,002	0,002	n.s.	0,002	n.s.	0,027	n.s.	0,049
VWF:CB/VWF:Ag	0,006	0,002	n.s.	0,002	n.s.	0,027	n.s.	0,027

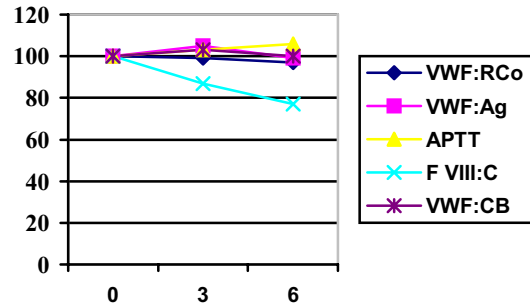
Verglich man die Lagerung von Citratvollblut bei Raumtemperatur mit der Lagerung in Eis, ergaben sich sowohl nach drei als auch nach sechs Stunden signifikante Unterschiede von allen Test, das gleiche traf für den Vergleich Citratvollblut bei Raumtemperatur und bei Lagerung zwischen zwei Kühlakkus für jeweils sechs Stunden zu. Beim Vergleich zwischen der dreistündigen Lagerung von Citratvollblut bei Raumtemperatur und bei -5°C stellte man bei Ristocetin-Cofaktor, VWF-Antigen, APTT, Faktor VIII-Aktivität und Kollagen-Bindungstest eine Signifikanz fest. Vergleich man die Lagerung von Citratvollblut in Eis und zwischen zwei Kühlakkus zeigte sich bei dreistündiger Lagerung keine Signifikanz, bei sechsstündiger Lagerung war jedoch, außer bei dem Kollagen-Bindungstest, immer eine Signifikanz ermittelbar. Bei dem Vergleich der Temperaturbeeinflussung bei der Aufbewahrung von Citratplasma ließ sich bei dreistündiger Lagerung nur für VWF-Antigen und bei sechsstündiger Lagerung für Ristocetin-Cofaktor – VWF-Antigen – Quotient und Kollagenbindungstest - VWF-Antigen - Quotient eine Signifikanz feststellen.

4.2.9. graphische Zusammenfassung

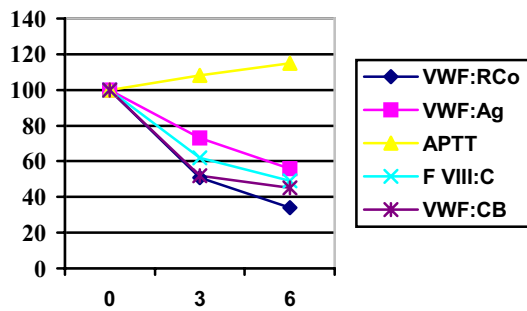
4.2.9.1.: Citratvollblut bei RT



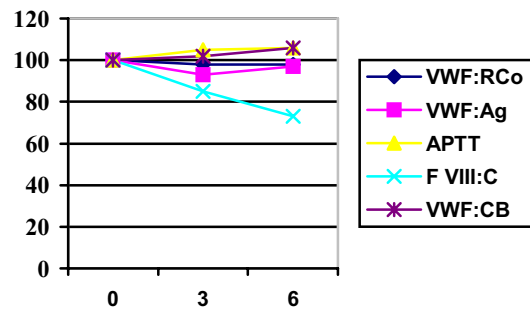
4.2.9.2.: Citratplasma bei RT



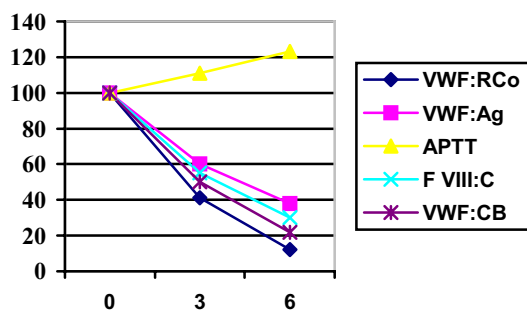
4.2.9.3.: Citratvollblut in Eis



4.2.9.4.: Citratplasma in Eis



4.2.9.5.: Citratvollblut zwischen Kühlakkus



4.3. Von Willebrand-Patienten, Typ 2

Dieses Kollektiv bestand aus 2 Frauen im Alter von 33 und 79 Jahren und 3 Männer zwischen 31 und 49 Jahren (Median: 37 Jahre) mit einem von Willebrand-Syndrom, Typ 2 (1x Typ 2a, 2x Typ 2b, 2x Typ 2n). Bei den Patienten wurde darauf geachtet, dass in den letzten sechs Monaten keine Operationen oder schwerwiegende Erkrankungen stattgefunden hatten, da diese die von Willebrand-Parameter erhöhen würden (Lutze et al, 1999). Auch durften keine anderen Erkrankungen wie koronare Herzkrankheit, venöse Verschlusskrankheit, Diabetes mellitus, Urämie, Tumore oder übermäßiger Stress vorliegen, da diese ebenfalls die von Willebrand-Werte erhöhen könnten.

Durch verschiedene Lagerung entstanden pro Patient folgende Proben:

- | | |
|---------|--|
| PS | Das Blut (ein Röhrchen) wurde sofort zentrifugiert und der Überstand anschließend bei -80°C eingefroren. |
| CR3/CR6 | Das Citratblut (zwei Röhrchen) wurde für drei bzw. sechs Stunden bei Raumtemperatur gelagert, daraufhin zentrifugiert und eingefroren.. |
| CE3/CE6 | Das Citratblut (zwei Röhrchen) wurde für drei bzw. sechs Stunden in Eis gelagert, dann zentrifugiert und eingefroren. |
| CK3/CK6 | Das Citratblut (zwei Röhrchen) wurde für drei bzw. sechs Stunden zwischen zwei Kühlakkus gelagert, anschließend zentrifugiert und eingefroren. |
| PR3/PR6 | Der Plasmaüberstand aus einem Citratröhrchen wurde nach der Zentrifugation abpipettiert, auf zwei Reagenzgläser verteilt und für drei bzw. sechs Stunden bei Raumtemperatur gelagert und danach eingefroren. |
| PE3/PE6 | Der Plasmaüberstand aus einem Citratröhrchen wurde nach dem Zentrifugieren abpipettiert, auf zwei Reagenzgläser verteilt und für drei bzw. sechs Stunden in Eis gelagert und nachfolgend eingefroren. |

In den nachfolgenden Tabellen wurden die Mittelwerte (erste Zahl) der durchgeführten Doppelbestimmungen aufgeführt. Die zweite Zahl gab den Prozentsatz von PS wieder und zeigte somit, wie sich die Werte bei bestimmten Lagerungen veränderten.

Am Ende der Tabelle wurde der Median (MD), sowie der minimale (Min.) und maximale (Max.) Wert der Prozentsätze von PS angegeben. Bei den Abbildungen wurden nur noch der Median und die Spanne der Prozentsätze von PS berücksichtigt.

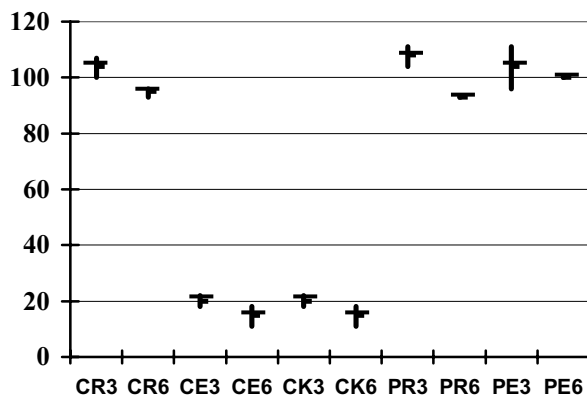
4.3.1. Ristocetin-Cofaktor

Tabelle 4.3.1.: Ristocetin-Cofaktor

Die Einheit des Ristocetin-Cofaktors war „Prozent vom Normwert“. Da die ermittelten Werte teilweise unterhalb der Messgrenze lagen und somit keine Angabe eines Prozentwertes zuließen, konnten nur die beiden Patienten mit Typ 2n für den Median, den Minimalwert oder den Maximalwert herangezogen werden

Pat.	PS	CR3	CR6	CE3	CE6	CK3	CK6	PR3	PR6	PE3	PE6
B.,M. (2a)	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5
G.,T. (2n)	28 100%	30 107%	27 96%	<5 18%	<5 18%	<5 18%	<5 18%	31 111%	26 93%	27 96%	28 100%
K.,I. (2b)	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5
K.,R. (2b)	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5
S.,G. (2n)	45 100%	45 100%	42 93%	10 22%	5 11%	10 22%	5 11%	47 104%	42 93%	50 111%	45 100%
MD	100%	104%	95%	20%	15%	20%	15%	108%	93%	104%	100%
Min.	100%	100%	93%	18%	11%	18%	11%	104%	93%	96%	100%
Max.	100%	107%	96%	22%	18%	22%	18%	111%	93%	111%	100%

Abbildung 4.3.1.: Ristocetin-Cofaktor - Veränderungen bezogen auf PS



	CR3	CR6	CE3	CE6	CK3	CK6	PR3	PR6	PE3	PE6
Median	104	95	20	15	20	15	108	93	104	100
Minimum	100	93	18	11	18	11	104	93	96	100
Maximum	107	96	22	18	22	18	111	93	111	100

Da bei drei der fünf Patienten nicht messbare Ristocetin-Cofaktor-Werte vorlagen, wurden zur Berechnung des Median nur zwei Werte verwendet. Es zeigte sich, dass bei der Lagerung von Citratvollblut bei Raumtemperatur und bei Citratplasma bei Raumtemperatur und in Eis die ermittelten Mediane im gewählten Toleranzbereich von 10% des ohne Lagerung gemessenen Wertes PS lagen. Bei der gekühlten Lagerung von Citratvollblut sanken die

ermittelten Werte nach drei Stunden in Eis bzw. zwischen den Kühlakkus auf 20% von PS ab, nach sechs Stunden waren nur noch Werte von 15% messbar.

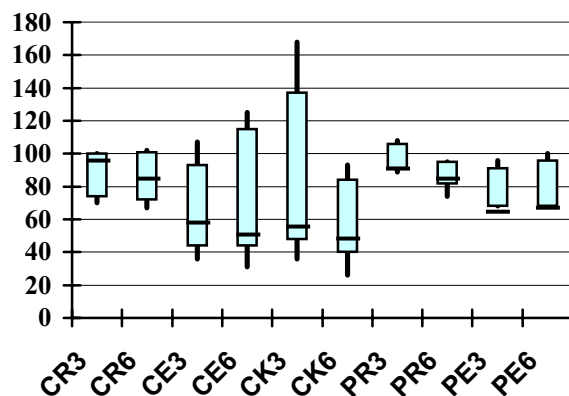
4.3.2. von Willebrand-Faktor-Antigen

Tabelle 4.3.2.: von Willebrand-Faktor-Antigen

Die Einheit des von Willebrand-Faktor-Antigens war „Prozent vom Normwert“ (erste Zahl). Die zweite Zahl gab den Prozentwert von PS wieder.

Pat.	PS	CR3	CR6	CE3	CE6	CK3	CK6	PR3	PR6	PE3	PE6
B.,M. (2a)	19 100%	19 100%	19 100%	15 79%	20 105%	20 105%	14 74%	17 89%	18 95%	13 68%	13 68%
G.,T. (2n)	39 100%	30 77%	30 77%	14 36%	12 31%	14 36%	10 26%	38 97%	37 95%	27 69%	28 72%
K.,I. (2b)	73 100%	51 70%	49 67%	47 64%	43 59%	43 59%	39 53%	79 108%	67 92%	50 68%	50 68%
K.,R. (2b)	28 100%	28 100%	25 89%	30 107%	35 125%	47 168%	26 93%	29 104%	25 89%	27 96%	28 100%
S.,G. (2n)	50 100%	50 100%	51 102%	26 52%	28 56%	31 62%	28 56%	46 92%	37 74%	43 86%	46 92%
MD	100%	100%	89%	64%	59%	62%	56%	97%	92%	69%	72%
Min.	100%	70%	67%	36%	31%	36%	26%	89%	74%	68%	68%
Max.	100%	100%	102%	107%	125%	168%	93%	108%	95%	96%	100%

Abbildung 4.3.2.: von Willebrand-Faktor-Antigen - Veränderungen bezogen auf PS



	CR3	CR6	CE3	CE6	CK3	CK6	PR3	PR6	PE3	PE6
Median	100	89	64	59	62	56	97	92	69	72
1.Quartile	74	72	44	44	48	40	91	82	68	68
3.Quartile	100	101	93	115	137	84	106	95	91	96
Minimum	70	67	36	31	36	26	89	74	68	68
Maximum	100	102	107	125	168	93	108	95	96	100

Die konstantesten Werte zeigten sich bei der Lagerung von Citratplasma bei Raumtemperatur (Mediane 97% und 92%), bei der Lagerung in Eis fielen die Werte auf 69% (nach drei Stunden) bzw. 72% nach sechs Stunden. Bei der Lagerung von Citratvollblut bei Raumtemperatur wurde nach dreistündiger Lagerung im Mittel 100% von dem ohne Lagerung ermittelten Wert PS gemessen, nach sechs Stunden zeigten sich geringe Abfälle des ermittelten Median auf 89%. Bei gekühlter Lagerung von Citratvollblut in Eis fielen die

Werte auf 64% (CE3) und 59% (CE6). Nach dreistündiger Lagerung zwischen zwei Kühlakkus sanken die Werte auf 62%, nach sechs Stunden auf 56% ab.

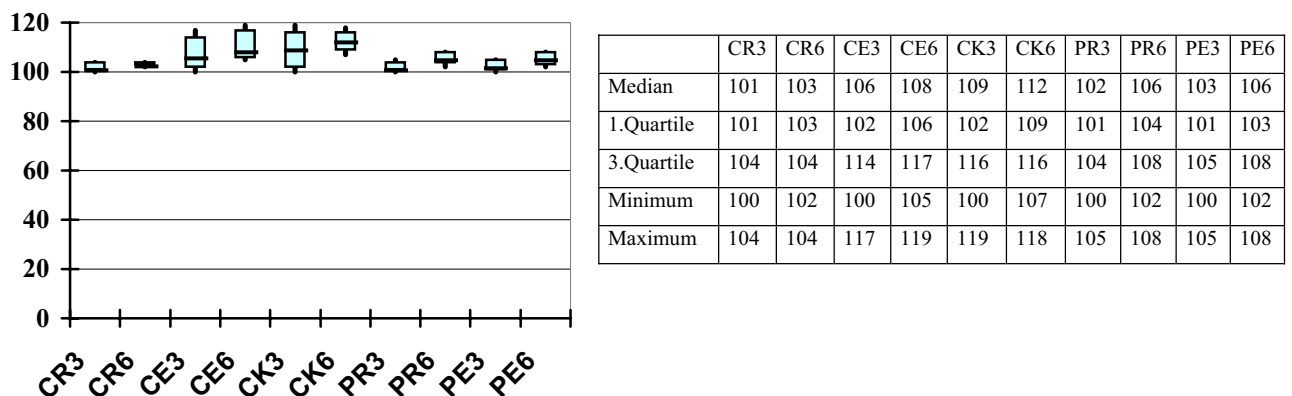
4.3.3. APTT

Tabelle 4.3.3.: APTT

Die Einheit der APTT lautete Sekunden (erste Zahl). Die zweite Zahl gab den Prozentwert von PS wieder.

Pat.	PS	CR3	CR6	CE3	CE6	CK3	CK6	PR3	PR6	PE3	PE6
B.,M. (2a)	38,7 100%	38,9 101%	40,2 104%	40,9 106%	41,9 108%	42,2 109%	43,2 112%	39,2 101%	40,7 105%	40,2 104%	41,7 108%
G.,T. (2n)	49,7 100%	51,7 104%	51,4 103%	54,9 110%	56,9 114%	55,9 112%	56,2 113%	50,7 102%	53,4 107%	52,4 105%	53,7 108%
K.,I. (2b)	37,2 100%	37,7 101%	38,7 104%	38,2 103%	39,7 107%	38,4 103%	40,9 110%	37,9 102%	39,4 106%	37,7 101%	38,4 103%
K.,R. (2b)	44,4 100%	44,4 100%	45,2 102%	44,2 100%	46,4 105%	44,4 100%	47,7 107%	44,4 100%	45,4 102%	44,4 100%	45,4 102%
S.,G. (2n)	39,2 100%	40,2 103%	40,2 103%	45,7 117%	46,7 119%	46,7 119%	46,2 118%	41,2 105%	42,4 108%	40,2 103%	41,7 106%
MD	100%	101%	103%	106%	108%	109%	112%	102%	106%	103%	106%
Min.	100%	100%	102%	100%	105%	100%	107%	100%	102%	100%	102%
Max.	100%	104%	104%	117%	119%	119%	118%	105%	108%	105%	108%

Abbildung 4.3.3.: APTT - Veränderungen bezogen auf PS



Die ermittelten Mediane lagen alle, bis auf die sechsstündige Lagerung von Citratvollblut bei -5°C (CK6, 112%), im akzeptierten Schwankungsbereich von 90% bis 110%. Bei gekühlter Lagerung des Citratvollblutes traten jedoch größere Schwankungen der Messwerte auf.

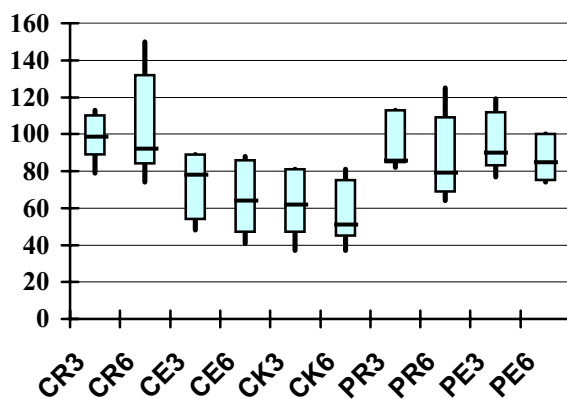
4.3.4. Faktor VIII-Aktivität

Tabelle 4.3.4.: Faktor VIII-Aktivität

Die Einheit der Faktor VIII-Aktivität wurde in „Prozent vom Normwert“ angegeben (erste Zahl). Die zweite Zahl gab den Prozentwert von PS wieder.

Pat.	PS	CR3	CR6	CE3	CE6	CK3	CK6	PR3	PR6	PE3	PE6
B.,M. (2a)	16 100%	18 113%	24 150%	14 88%	14 88%	13 81%	13 81%	18 113%	20 125%	19 119%	16 100%
G.,T. (2n)	4,9 100%	5 102%	5,6 114%	2,9 59%	2,6 53%	2,8 57%	2,9 59%	5,5 112%	4,5 92%	5,1 104%	4,9 100%
K.,I. (2b)	44 100%	44 100%	41 93%	39 89%	37 84%	30 68%	23 52%	36 82%	37 84%	41 93%	31 90%
K.,R. (2b)	53 100%	42 79%	39 74%	44 83%	37 70%	43 81%	36 68%	46 87%	34 64%	41 77%	40 76%
S.,G. (2n)	27 100%	29 107%	26 96%	13 48%	11 41%	10 37%	10 37%	24 89%	20 74%	24 89%	20 74%
MD	100%	102%	96%	83%	70%	68%	59%	89%	84%	93%	90%
Min.	100%	79%	74%	48%	41%	37%	37%	82%	64%	77%	74%
Max.	100%	113%	150%	89%	88%	81%	81%	113%	125%	119%	100%

Abbildung 4.3.4.: Faktor VIII Aktivität – Veränderungen bezogen auf PS



	CR3	CR6	CE3	CE6	CK3	CK6	PR3	PR6	PE3	PE6
Median	102	96	83	70	68	59	89	84	93	90
1.Quartile	89	84	54	47	47	45	85	69	83	75
3.Quartile	110	132	89	86	81	75	113	109	112	100
Minimum	79	74	48	41	37	37	82	64	77	74
Maximum	113	150	89	88	81	81	113	125	119	100

Bei der Lagerung von Citratvollblut bei Raumtemperatur ergaben sich die konstantesten Werte (Median 102% nach drei Stunden bzw. 96% nach sechs Stunden). Gekühlte Lagerungen des Citratvollblutes zeigten einen Verlust der Faktor VIII-Aktivität auf 83% (CE3) bzw. 70% (CE6) bei der Lagerung in Eis bzw. 68% (CK3) und 59% (CK6) bei der Lagerung zwischen Kühlakkus. Bei der Lagerung von Citratplasma wurden leichte Abfälle der Mediane bei Raumtemperatur (89% bzw. 84%) und bei Lagerung in Eis (93% bzw. 74%) gemessen.

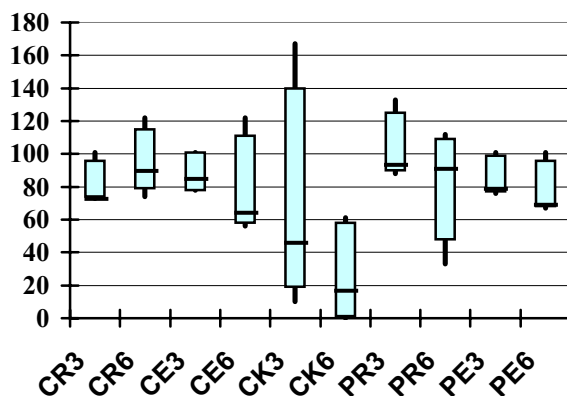
4.3.5. Kollagen-Bindungstest

Tabelle 4.3.5.: Kollagen-Bindungstest

Die Einheit des ermittelten Kollagen-Bindungstestes war „Prozent vom Normwert“ (erste Zahl). Die zweite Zahl gab den Prozentwert von PS wieder

Pat.	PS	CR3	CR6	CE3	CE6	CK3	CK6	PR3	PR6	PE3	PE6
B.,M. (2a)	0,9 100%	0,7 78%	1,1 122%	0,7 78%	1,1 122%	1,5 167%	0 0%	1,2 133%	0,3 33%	0,7 78%	0,6 67%
G.,T. (2n)	38 100%	31 82%	35 92%	30 79%	24 63%	18 47%	18,5 49%	36 95%	38 100%	29 76%	27 71%
K.,I. (2b)	14,7 100%	14,8 101%	13,6 93%	14,8 101%	8,3 56%	8,8 60%	8,9 61%	15 102%	16,5 112%	14,8 101%	14,8 101%
K.,R. (2b)	zu	gering	-	nicht	nach-	weis-	bar				
S.,G. (2n)	99 100%	72 73%	73 74%	100 101%	76 77%	10 10%	2 2%	87 88%	90 91%	91 92%	80 81%
MD	100%	80%	93%	90%	70%	54%	26%	99%	96%	85%	76%
Min.	100%	73%	74%	78%	56%	10%	0%	88%	33%	76%	67%
Max.	100%	101%	122%	101%	122%	167%	61%	133%	112%	101%	101%

Abbildung 4.3.5.: Kollagen-Bindungstest - Veränderungen bezogen auf PS



	CR3	CR6	CE3	CE6	CK3	CK6	PR3	PR6	PE3	PE6
Median	80	93	90	70	54	26	99	96	85	76
1.Quartile	74	79	78	58	19	1	90	48	77	68
3.Quartile	96	115	101	111	140	58	125	109	99	96
Minimum	73	74	78	56	10	0	88	33	76	67
Maximum	101	122	101	122	167	61	133	112	101	101

Bei dem Kollagen-Bindungstest ergaben die gemessenen Werte relativ große Schwankungen. Die Lagerung von Citratplasma bei Raumtemperatur (99% bzw. 96%) zeigte die konstantesten Werte in dem gewählten Bereich der akzeptierten Abweichung von 10% (also 90% bis 110% von PS). Wurde Citratplasma in Eis aufbewahrt, sanken die gemessenen Werte auf 85% nach drei Stunden bzw. 76% nach sechs Stunden. Bei der Lagerung von Citratvollblut bei Raumtemperatur reduzierten sich die Werte der ermittelten Mediane auf 80% nach drei Stunden bzw. 93% nach sechs Stunden. Bei gekühlten Lagerung des Citratvollblutes zeigten sich bei der Lagerung in Eis Verluste auf 90% (CE3) bzw. 70%

(CE6). Bei der Lagerung bei ca. -5°C wurden nach drei Stunden Werte von 54% gemessen wurden, die nach weiteren drei Stunden auf 26% absanken.

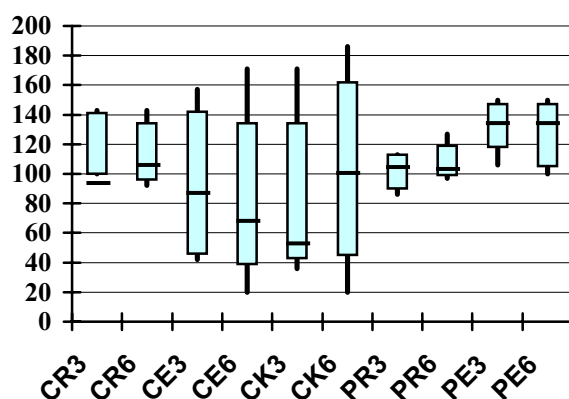
4.3.6. Ristocetin-Cofaktor - VWF-Antigen – Quotient

Tabelle 4.3.6.: Ristocetin-Cofaktor/VWF:Ag

Der Ristocetin-Cofaktor/VWF:Ag - Koeffizient besaß keine Einheit (erste Zahl). Die zweite Zahl gab den Prozentwert von PS wieder.

Pat.	PS	CR3	CR6	CE3	CE6	CK3	CK6	PR3	PR6	PE3	PE6
B.,M. (2a)	0,26 100%	0,26 100%	0,26 100%	0,33 127%	0,25 96%	0,25 96%	0,36 138%	0,29 112%	0,28 108%	0,39 150%	0,39 150%
G.,T. (2n)	0,72 100%	1,0 139%	0,9 125%	0,36 50%	0,42 58%	0,36 50%	0,5 69%	0,81 113%	0,7 97%	1,0 139%	1,0 139%
K.,I. (2b)	0,07 100%	0,1 143%	0,1 143%	0,11 157%	0,12 171%	0,12 171%	0,13 186%	0,06 86%	0,07 100%	0,1 143%	0,1 143%
K.,R. (2b)	0,18 100%	0,18 100%	0,2 111%	0,17 94%	0,14 78%	0,11 61%	0,19 106%	0,17 94%	0,2 111%	0,19 106%	0,18 100%
S.,G. (2n)	0,9 100%	0,9 100%	0,83 92%	0,38 42%	0,18 20%	0,32 36%	0,18 20%	1,02 113%	1,14 127%	1,16 129%	0,98 109%
MD	100%	100%	111%	94%	78%	61%	106%	112%	108%	139%	139%
Min.	100%	100%	92%	42%	20%	36%	20%	86%	97%	106%	100%
Max	100%	143%	143%	157%	171%	171%	186%	113%	127%	150%	150%

Abbildung 4.3.6.: Ristocetin-Cofaktor – VWF-Antigen - Veränderungen bezogen auf PS



	CR3	CR6	CE3	CE6	CK3	CK6	PR3	PR6	PE3	PE6
Median	100	111	94	78	61	106	112	108	139	139
1.Quartile	100	96	46	39	43	45	90	99	118	105
3.Quartile	141	134	142	134	134	162	113	119	147	147
Minimum	100	92	42	20	36	20	86	97	106	100
Maximum	143	143	157	171	171	186	113	127	150	150

Bei der Bestimmung des Ristocetin-Cofaktor - VWF-Antigen – Quotienten ergaben sich, gerade bei der gekühlten Lagerung von Citratvollblut, große Spannweiten der Werte. Am konstantesten waren die Mediane bei der Lagerung von Citratvollblut bei Raumtemperatur (100% bzw. 111%) sowie bei der Lagerung von Citratplasma bei Raumtemperatur (112% bzw. 108%). Bei der Lagerung von Citratplasma in Eis lagen die ermittelten Mediane sowohl

nach drei als auch nach sechs Stunden bei 139%. Die gekühlte Lagerung von Citratvollblut in Eis zeigte nach drei Stunden Werte von 94%, nach weiteren drei Stunden 78%. Bei der Lagerung von Citratvollblut bei -5°C (Kühlakku) lag der Median nach dreistündiger Lagerung bei 61%, nach sechsstündiger Lagerung bei 106%.

4.3.7. Kollagenbindungstest - VWF-Antigen-Quotient

Tabelle 4.3.7.: VWF:CB/VWF:Ag

Der VWF:CB/VWF:Ag - Koeffizient besaß keine Einheit (erste Zahl). Die zweite Zahl gab den Prozentwert von PS wieder. Da die ermittelten Werte des VWF:CB von K.,R. unterhalb der Messgrenze lagen und somit keine Angabe eines Quotienten und eines Prozentwertes zuließen, war es auch nicht möglich den Median, den Minimalwert oder den Maximalwert anzugeben

Pat.	PS	CR3	CR6	CE3	CE6	CK3	CK6	PR3	PR6	PE3	PE6
B.,M (2a)	0,05 100%	0,04 80%	0,06 120%	0,05 100%	0,05 100%	0,08 160%	0,0 0%	0,07 140%	0,02 40%	0,05 100%	0,05 100%
G.,T (2n)	0,97 100%	1,03 106%	1,16 120%	2,13 220%	2,0 206%	1,28 132%	1,85 191%	0,94 97%	1,03 106%	1,08 111%	0,96 99%
K.,I. (2b)	0,2 100%	0,29 145%	0,28 140%	0,31 155%	0,19 95%	0,2 100%	0,23 115%	0,19 95%	0,25 125%	0,3 150%	0,3 150%
K.,R (2b)	CBA	zu	ge-	ring	-	daher	nicht	er-	mittel-	bar	
S.,G. (2n)	1,96 100%	1,45 74%	1,43 73%	3,85 196%	2,7 138%	0,32 16%	0,07 4%	1,89 96%	2,44 124%	2,13 109%	1,72 88%
MD	100%	93%	120%	176%	119%	116%	60%	97%	115%	110%	100%
Min.	100%	74%	73%	100%	95%	16%	0%	95%	40%	100%	88%
Max	100%	145%	140%	220%	206%	160%	191%	140%	125%	150%	150%

Bei dieser Tabelle wurden alle veränderten Größen, also Lagerungszeit, Lagerungstemperatur und ob es sich um Citratvollblut oder Citratplasma handelte, mit einbezogen.

Bei allen Lagerungen konnten keine signifikanten Veränderungen im Vergleich zum Ausgangswert PS ermittelt werden, obwohl man es bei der Betrachtung der Mediane vermutet hätte. Da aber die Werte zu sehr differierten, ließ sich keine Signifikanz berechnen.

Tabelle 4.3.8.2.: Signifikante Veränderungen bezüglich der Lagerung von Citratvollblut bzw. Citratplasma bei gleicher Lagerungszeit und gleicher Temperatur

Untersuchung	CR3-PR3	CR6-PR6	CE3-PE3	CE6-PE6
Ristocetin-Cofaktor	Stichproben-	umfang zu	klein - keine	Angabe mögl
VWF-Antigen	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
APTT	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Faktor VIII-Aktivität	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Kollagen-Bindungstest	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
VWF:RCo/VWF:Ag	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
VWF:CB/VWF:Ag	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Vergleich man die verschiedenen Lagerungen von Citratvollblut mit Citratplasma so zeigten sich keine signifikanten Veränderungen.

Tabelle 4.3.8.3.: Signifikante Veränderungen in Abhängigkeit von der Lagerungszeit

Untersuchung	CR3-CR6	CE3-CE6	CK3-CK6	PR3-PR6	PE3-PE6
Ristocetin-Cofaktor	Stichproben-	umfang zu	klein - keine	Angabe mögl	
VWF-Antigen	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
APTT	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Faktor VIII-Aktivität	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Kollagen-Bindungstest	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
VWF:RCo/VWF:Ag	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
VWF:CB/VWF:Ag	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Bei dem Vergleich zwischen drei- bzw. sechsständiger Lagerung ließ sich keine Signifikanz feststellen.

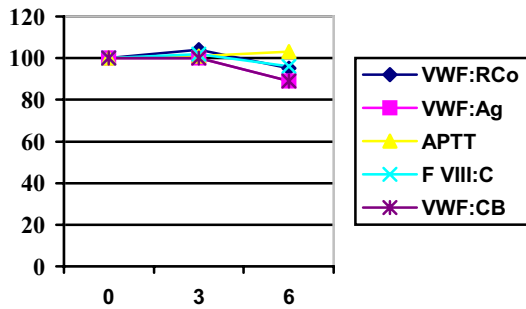
Tabelle 4.3.8.4.: Signifikante Veränderungen in Abhängigkeit der Lagerungstemperatur

Untersuchung	CR3- CE3	CR6- CE6	CR3- CK3	CR6- CK6	CE3- CK3	CE6- CK6	PR3- PE3	PR6- PE6
Ristocetin-Cofaktor	Stich-	proben-	umfang	zu klein	-	keine	Angabe	möglich
VWF-Antigen	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
APTT	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Faktor VIII-Aktivität	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Kollagen-Bindungstest	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
VWF:RCo/VWF:Ag	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
VWF:CB/VWF:Ag	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

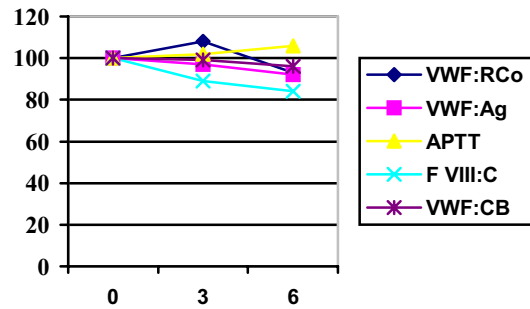
Es ließ sich keine Signifikanz bei verschieden temperierter Lagerung feststellen.

4.3.9. graphische Zusammenfassung

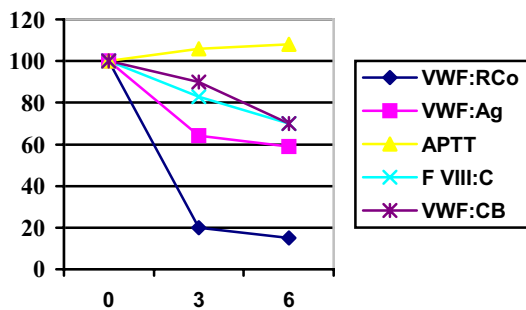
4.3.9.1.: Citratvollblut bei RT



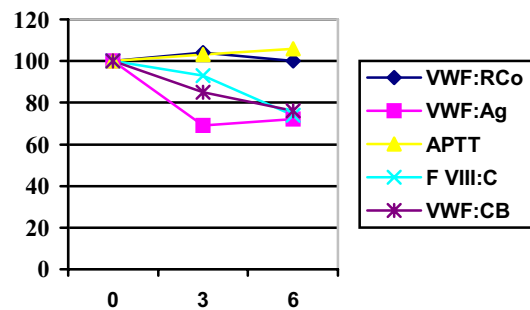
4.3.9.2.: Citratplasma bei RT



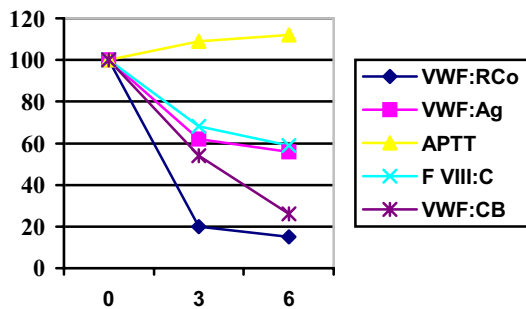
4.3.9.3.: Citratvollblut in Eis



4.3.9.4.: Citratplasma in Eis



4.3.9.5.: Citratvollblut zwischen Kühlakkus



4.4. Patienten der Neurochirurgie

Dieses Kollektiv bestand aus vier Männern im Alter von 33 Jahren bis 74 Jahren und sechs Frauen zwischen 35 und 72 Jahren (Median 56 Jahre). Bei dieser Gruppe sollte die Temperaturabhängigkeit bei höheren Werten überprüft werden, zum Beispiel nach Operationen oder bei Tumoren, da diese die von Willebrand-Parameter erhöhen würden (Lutze et al, 1999). Drei Patientinnen gaben eine Schilddrüsenunterfunktion an, welche aber gut medikamentös eingestellt waren und deshalb keinen senkenden Einfluss auf die von Willebrand-Parameter haben sollten.

Die Patienten litten an folgenden Erkrankungen:

- Subdurales Hämatom, Hirnödem (G.,P.)
- Bandscheibenvorfall (M.,A.)
- Glioblastom 2x (M.,M.; S.,H.)
- Hirnmetastasen eines Melanoms (M.,W.)
- Aneurysma 2x (P.,B.; S.,E.)
- Epilepsie, erhöhter Hirndruck (P.,J.)
- Falxmeningeom (R.,K.)
- Einblutung in Myelocoele (Z.,A.)

Durch verschiedene Lagerung entstanden pro Patient folgende Proben:

- PS Das Blut (ein Röhrchen) wurde sofort zentrifugiert und der Überstand anschließend bei -80°C eingefroren.
- CR3/CR6 Das Citratblut (zwei Röhrchen) wurde für drei bzw. sechs Stunden bei Raumtemperatur gelagert, daraufhin zentrifugiert und eingefroren..
- CE3/CE6 Das Citratblut (zwei Röhrchen) wurde für drei bzw. sechs Stunden in Eis gelagert, dann zentrifugiert und eingefroren.
- CK3/CK6 Das Citratblut (zwei Röhrchen) wurde für drei bzw. sechs Stunden zwischen zwei Kühlakkus gelagert, anschließend zentrifugiert und eingefroren.
- PR3/PR6 Der Plasmaüberstand aus einem Citratröhrchen wurde nach der Zentrifugation abpipettiert, auf zwei Reagenzgläser verteilt und für drei bzw. sechs Stunden bei Raumtemperatur gelagert und danach eingefroren.
- PE3/PE6 Der Plasmaüberstand aus einem Citratröhrchen wurde nach dem Zentrifugieren abpipettiert, auf zwei Reagenzgläser verteilt und für drei bzw. sechs Stunden in Eis gelagert und nachfolgend eingefroren.

In den nachfolgenden Tabellen wurden die Mittelwerte (erste Zahl) der durchgeführten Doppelbestimmungen aufgeführt. Die zweite Zahl gab den Prozentsatz von PS wieder und zeigte somit, wie sich die Werte bei bestimmten Lagerungen veränderten.

Am Ende der Tabelle wurde der Median (MD), sowie der minimale (Min.) und maximale (Max.) Wert der Prozentsätze von PS angegeben. Bei den Abbildungen wurden nur noch der Median und die Spanne der Prozentsätze von PS berücksichtigt.

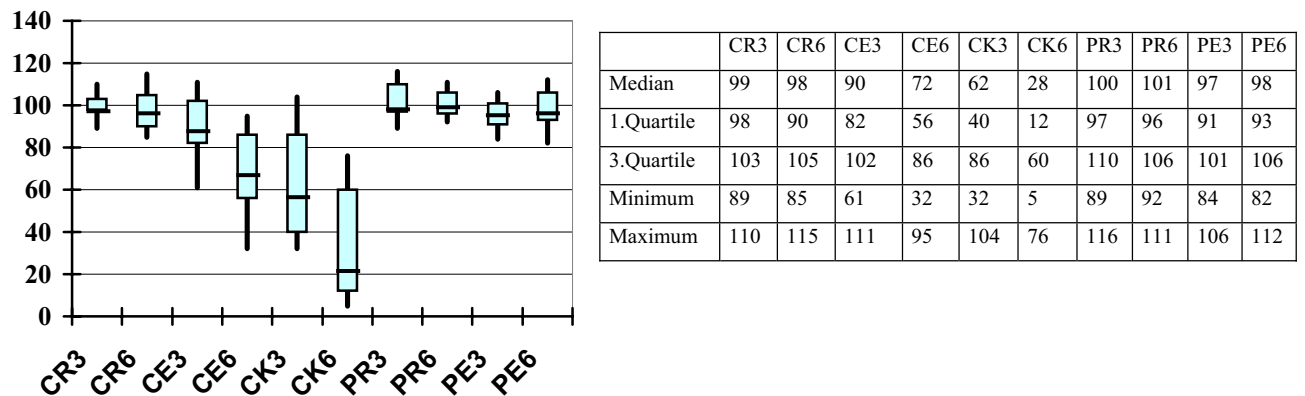
4.4.1. Ristocetin-Cofaktor

Tabelle 4.4.1.: Ristocetin-Cofaktor

Die Einheit des ermittelten Ristocetin-Cofaktors war „Prozent vom Normwert“ (erste Zahl). Die zweite Zahl gab den Prozentwert von PS wieder.

Bei dem Median, dem Minimal- und Maximalwert wurden die Patienten M.,W. und S.,H nicht einbezogen, da ihre Werte zu hoch waren und deshalb keine Veränderungen unter verschiedenen Lagerungen ersichtlich waren.

Pat.	PS	CR3	CR6	CE3	CE6	CK3	CK6	PR3	PR6	PE3	PE6
G.,P.	198 100%	206 104%	203 103%	206 104%	189 95%	148 75%	120 61%	198 100%	188 95%	187 94%	200 101%
M.,A.	106 100%	105 99%	112 106%	65 61%	34 32%	43 41%	<5 5%	106 100%	108 102%	107 101%	104 98%
M.,M.	131 100%	116 89%	116 89%	108 82%	75 57%	52 40%	29 22%	126 96%	120 92%	110 84%	108 82%
M.,W	>363	>363	>363	>363	>363	>363	>363	>363	>363	>363	>363
P.,B.	113 100%	112 99%	130 115%	125 111%	85 75%	36 32%	63 56%	126 112%	125 111%	120 106%	122 108%
P.,J.	103 100%	101 98%	88 85%	94 91%	92 89%	93 90%	27 26%	102 99%	100 97%	103 100%	96 93%
R.,K.	144 100%	159 110%	146 101%	139 97%	79 55%	79 55%	12 8%	148 103%	147 102%	141 98%	161 112%
S.,E.	362 100%	354 98%	337 93%	300 83%	260 72%	245 68%	106 29%	321 89%	363 100%	325 90%	340 94%
S.,H.	>363	>363	>363	>363	238	>363	>363	>363	>363	>363	>363
Z.,A.	192 100%	192 100%	181 94%	169 88%	139 72%	199 104%	145 76%	222 116%	205 107%	184 96%	189 98%
MD	100%	99%	98%	90%	72%	62%	28%	100%	101%	97%	98%
Min.	100%	89%	85%	61%	32%	32%	5%	89%	92%	84%	82%
Max.	100%	110%	115%	111%	95%	104%	76%	116%	111%	106%	112%

Abbildung 4.1.1.: Ristocetin-Cofaktor – Veränderungen bezogen auf PS

Bei der Lagerung von Citratplasma veränderte sich der Wert des Ristocetin-Cofaktors, sowohl bei Raumtemperatur als auch bei der Lagerung auf Eis, kaum. Citratvollblut zeigte nur bei der Lagerung bei Raumtemperatur relativ konstante Werte, bei gekühlter Lagerung in Eis wurden nach drei Stunden zwar noch ca. 90% (Median) des Ausgangswertes PS gemessen, nach sechs Stunden waren die Werte im Mittel auf 72% von PS abgefallen. Bei der Lagerung von Citratvollblut bei -5°C (Kühlakku) lag der Median nach drei Stunden bei 62%, nach weiteren drei Stunden nur noch bei 28% vom Ausgangswert PS (ohne Lagerung). Teilweise lagen diese Werte in einem zu kleinen Messbereich (<5) für das BCT (in solchen Fällen wurde für die Ermittlung des Prozentwertes der Wert „5“ angenommen). Die beiden Patienten (M.,W.; S.,H.) mit gemessenen Ristocetin-Cofaktor-Werten von über 363% wurden nicht berücksichtigt.

4.4.2. von Willebrand-Faktor-Antigen

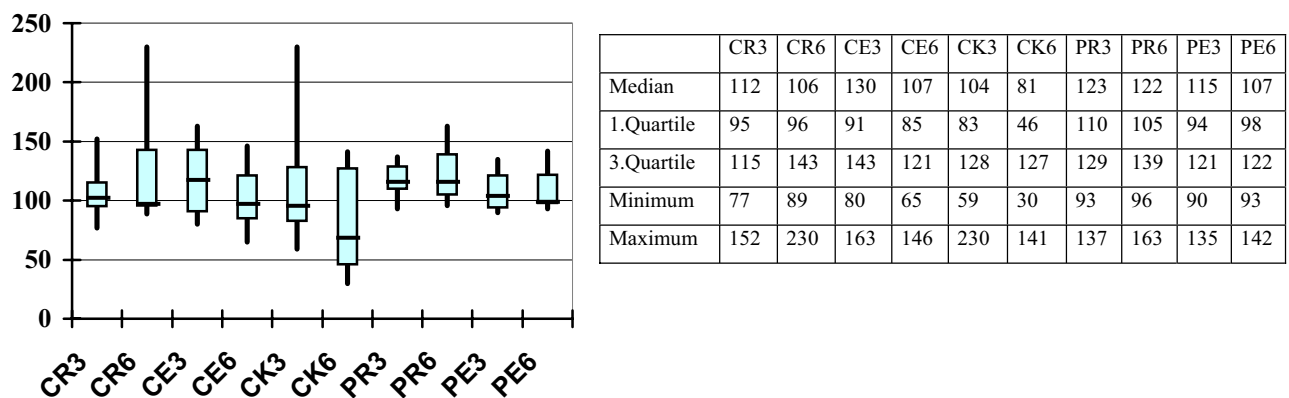
Tabelle 4.4.2.: von Willebrand-Faktor-Antigen

Die Einheit des von Willebrand-Faktor-Antigens war „Prozent vom Normwert“ (erste Zahl). Die zweite Zahl gab den Prozentwert von PS wieder.

Bei dem Median, dem Minimal- und Maximalwert wurde der Patient M.,W. nicht einbezogen, da seine Werte zu hoch waren und deshalb keine Veränderungen unter verschiedenen Lagerungen ersichtlich waren.

Pat.	PS	CR3	CR6	CE3	CE6	CK3	CK6	PR3	PR6	PE3	PE6
G.,P.	174 100%	202 116%	>400 230%	226 130%	226 130%	>400 230%	240 138%	162 93%	192 110%	194 111%	162 93%
M.,A.	114 100%	173 152%	154 135%	91 80%	87 76%	100 88%	34 30%	142 125%	186 163%	108 95%	117 103%
M.,M.	100 100%	98 98%	105 105%	141 141%	107 107%	104 104%	60 60%	123 123%	116 116%	117 117%	114 114%
M.,W	>400	>400	>400	>400	>400	>400	>400	>400	>400	>400	>400
P.,B.	122 100%	139 114%	129 106%	199 163%	133 109%	139 114%	99 81%	159 130%	156 128%	146 120%	173 142%
P.,J.	75 100%	69 92%	72 96%	72 96%	70 93%	72 96%	63 84%	103 137%	112 149%	86 115%	80 107%
R.,K.	123 100%	139 113%	118 96%	104 85%	80 65%	72 59%	50 41%	132 107%	123 100%	111 90%	114 93%
S.,E.	223 100%	245 110%	199 89%	297 133%	237 106%	174 78%	112 50%	252 113%	213 96%	208 93%	228 102%
S.,H.	330 100%	368 112%	498 151%	478 145%	368 112%	452 137%	464 141%	418 127%	402 122%	444 135%	412 125%
Z.,A.	175 100%	134 77%	205 117%	180 103%	255 146%	206 118%	202 115%	211 121%	218 125%	213 122%	209 119%
MD	100%	112%	106%	130%	107%	104%	81%	123%	122%	115%	107%
Min.	100%	77%	89%	80%	65%	59%	30%	93%	96%	90%	93%
Max.	100%	152%	230%	163%	146%	230%	141%	137%	163%	135%	142%

Abbildung 4.4.2.: Von Willebrand-Faktor-Antigen – Veränderungen bezogen auf PS



Bei der Lagerung von Citratvollblut bei Raumtemperatur zeigten sich geringe Anstiege der ermittelten Mediane auf 112% (nach drei Stunden) bzw. 106% (nach sechs Stunden). Bei gekühlter Lagerung von Citratvollblut in Eis stiegen die Werte im Mittel auf 130% (CE3) und 107% (CE6). Nach dreistündiger Lagerung zwischen zwei Kühlakkus stiegen die Werte (Median) auf 104%, nach sechs Stunden sanken sie wieder auf 81% ab. Bei der Lagerung von Citratplasma bei Raumtemperatur zeigten sich Werte von 123% nach drei Stunden und 122%

nach sechs Stunden. Bei der Aufbewahrung in Eis wurden nach dreistündiger Lagerung Mediane von 115%, nach sechs Stunden von 107% ermittelt. Der Patient M.,W. wurde wegen seiner nicht messbar hohen VWF-Antigen-Werte nicht berücksichtigt.

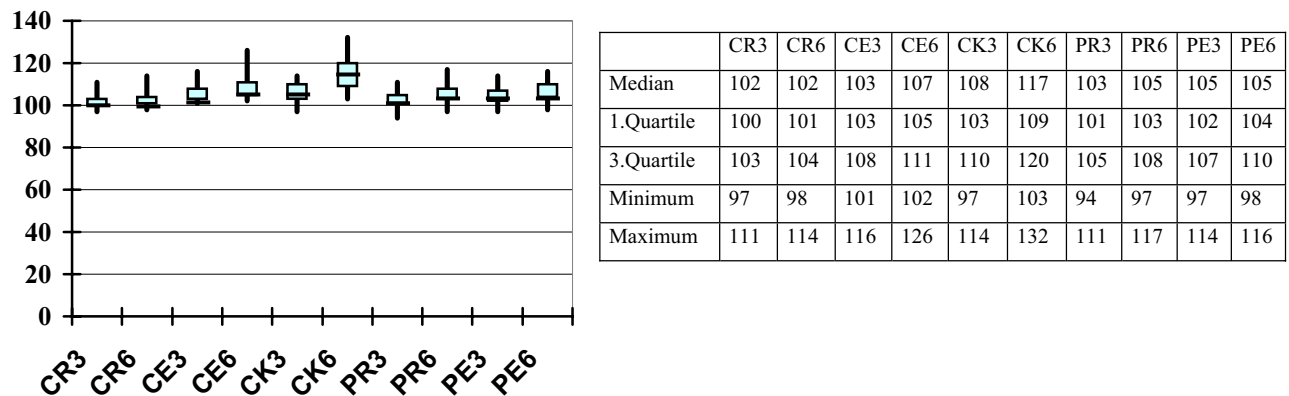
4.4.3. APTT

Tabelle 4.4.3.: APTT

Die Einheit der APTT lautete Sekunden (erste Zahl). Die zweite Zahl gab den Prozentwert von PS wieder.

Pat.	PS	CR3	CR6	CE3	CE6	CK3	CK6	PR3	PR6	PE3	PE6
G.,P.	31,4 100%	31,9 102%	31,9 102%	32,2 103%	32,4 103%	34,2 109%	34,4 110%	32,4 103%	32,9 105%	32,9 105%	33,4 106%
M.,A.	30,4 100%	30,2 99%	30,7 101%	32,4 107%	34,2 126%	32,9 108%	40,2 132%	30,7 101%	31,7 104%	31,7 104%	31,7 104%
M.,M.	28,9 100%	29,4 102%	29,9 103%	30,4 105%	31,4 109%	31,9 110%	34,9 121%	30,2 104%	30,9 107%	30,7 106%	31,2 108%
M.,W	25,4 100%	25,4 100%	25,7 101%	25,7 101%	26,7 105%	25,7 101%	26,9 106%	25,7 101%	26,2 103%	25,9 102%	26,4 104%
P.,B.	31,2 100%	31,4 101%	31,7 102%	31,4 101%	32,9 105%	33,4 107%	35,4 113%	31,7 102%	33,2 107%	32,7 105%	32,7 105%
P.,J.	31,4 100%	31,9 102%	32,4 103%	32,4 103%	32,9 105%	32,4 103%	37,2 118%	32,2 103%	32,4 103%	31,9 102%	32,7 104%
R.,K.	35,2 100%	35,2 100%	34,7 99%	36,4 103%	38,2 109%	37,9 108%	42,2 120%	35,9 102%	35,7 101%	35,7 101%	36,2 103%
S.,E.	31,2 100%	30,4 97%	30,7 98%	32,2 103%	31,7 102%	30,2 97%	32,2 103%	29,4 94%	30,4 97%	30,4 97%	30,7 98%
S.,H.	23,7 100%	26,4 111%	26,9 114%	27,4 116%	25,7 108%	26,9 114%	27,7 117%	26,4 111%	27,7 117%	26,9 114%	27,4 116%
Z.,A.	34,9 100%	37,4 107%	37,8 108%	38,9 111%	40,2 115%	38,9 111%	40,9 117%	37,7 108%	37,9 109%	38,4 110%	39,7 114%
MD	100%	102%	102%	103%	107%	108%	117%	103%	105%	105%	105%
Min.	100%	97%	98%	101%	102%	97%	103%	94%	97%	97%	98%
Max.	100%	111%	114%	116%	126%	114%	132%	111%	117%	114%	116%

Abbildung 4.4.3.: APTT – Veränderungen bezogen auf PS



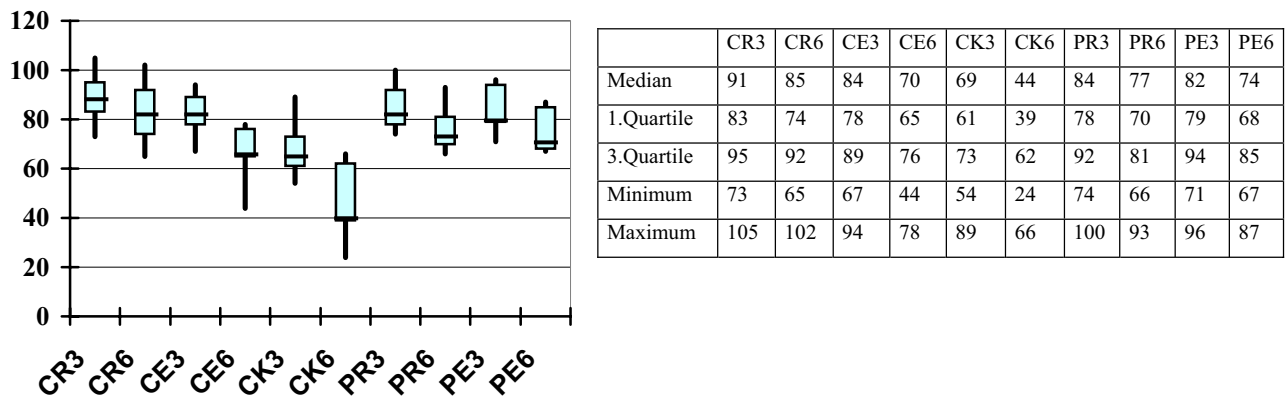
Alle ermittelten Mediane, außer bei sechsständiger Lagerung von Citratvollblut bei -5°C (CK6, 117%), lagen im gewählten Akzeptanzbereich von 10% (also 90% bis 110% von PS).

4.4.4. Faktor VIII-Aktivität

Tabelle 4.4.4.: Faktor VIII-Aktivität

Die Einheit der Faktor VIII-Aktivität wurde in „Prozent vom Normwert“ angegeben (erste Zahl). Die zweite Zahl gab den Prozentwert von PS wieder.

Pat.	PS	CR3	CR6	CE3	CE6	CK3	CK6	PR3	PR6	PE3	PE6
G.,P.	205 100%	159 78%	168 82%	168 82%	159 78%	127 62%	127 62%	191 93%	146 71%	165 80%	174 85%
M.,A.	185 100%	169 91%	163 88%	135 73%	82 44%	104 56%	44 24%	137 74%	155 84%	178 96%	158 85%
M.,M.	226 100%	203 90%	216 96%	212 94%	157 69%	151 67%	85 38%	188 83%	180 80%	208 92%	154 68%
M.,W	688 100%	644 94%	617 90%	604 88%	520 76%	478 69%	423 61%	542 79%	509 74%	554 81%	539 78%
P.,B.	177 100%	150 85%	136 77%	140 79%	119 67%	95 54%	77 44%	140 79%	116 66%	143 81%	129 73%
P.,J.	164 100%	148 90%	133 81%	140 85%	126 77%	131 80%	71 43%	143 87%	129 79%	116 71%	118 72%
R.,K.	120 100%	126 105%	122 102%	111 93%	77 64%	85 71%	47 39%	120 100%	112 93%	114 95%	104 87%
S.,E.	294 100%	281 96%	264 90%	253 86%	205 70%	201 68%	124 42%	270 92%	205 70%	223 76%	201 68%
S.,H.	552 100%	403 73%	364 66%	371 67%	419 76%	394 71%	343 62%	419 76%	379 69%	456 83%	371 67%
Z.,A.	161 100%	153 95%	105 65%	133 83%	104 65%	144 89%	107 66%	137 85%	127 79%	149 93%	121 75%
MD	100%	91%	85%	84%	70%	69%	44%	84%	77%	82%	74%
Min.	100%	73%	65%	67%	44%	54%	24%	74%	66%	71%	67%
Max.	100%	105%	102%	94%	78%	89%	66%	100%	93%	96%	87%

Abbildung 4.4.4.: Faktor VIII Aktivität – Veränderungen bezogen auf PS

Bei der Lagerung von Citratvollblut bei Raumtemperatur sanken die ermittelten Mediane nach drei Stunden auf 91% nach sechs Stunden auf 85% ab. Gekühlte drei- bzw. sechsstündige Lagerungen des Citratvollblutes ergaben einen Verlust der Faktor VIII-Aktivität auf 84% (CE3) bzw. 70% (CE6) bei der Lagerung in Eis bzw. 69% (CK3) und 44% (CK6) bei der Lagerung zwischen Kühlakkus. Bei der Lagerung von Citratplasma zeigten sich leichte Abfälle der Mediane bei Raumtemperatur (84% bzw. 77%) und bei Lagerung in Eis (82% bzw. 74%).

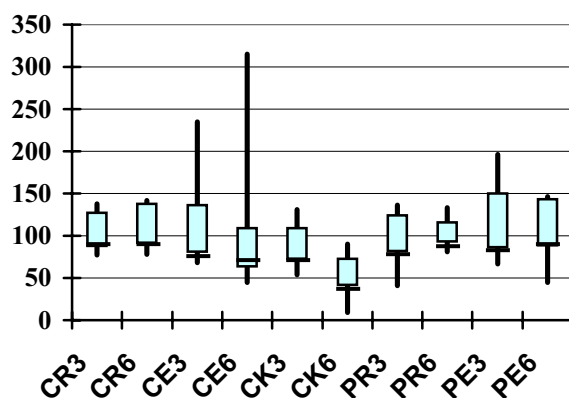
4.4.5. Kollagen-Bindungstest

Tabelle 4.4.5.: Kollagen-Bindungstest

Die Einheit des ermittelten Kollagen-Bindungstestes war „Prozent vom Normwert“ (erste Zahl). Die zweite Zahl gab den Prozentwert von PS wieder.

Pat.	PS	CR3	CR6	CE3	CE6	CK3	CK6	PR3	PR6	PE3	PE6
G.,P.	70,1 100%	86,2 123%	97,6 139%	93,9 134%	68,8 98%	80,9 115%	58,9 84%	95,5 136%	70,9 101%	94,8 135%	99,3 142%
M.,A.	72,9 100%	75,7 104%	68,2 94%	70,9 97%	58,5 80%	39,6 54%	6,6 9%	61,4 84%	80,4 110%	71,6 98%	86,7 119%
M.,M.	76,9 100%	67,5 88%	60,1 78%	67,0 87%	73,8 96%	68,1 89%	33,6 44%	74,0 96%	82,0 107%	77,9 101%	67,5 88%
M.,W	204,8 100%	282,2 138%	269,8 132%	244,2 119%	239,0 117%	170,6 83%	185,0 90%	269,8 132%	272,8 133%	394,6 193%	297,2 145%
P.,B.	37,5 100%	51,4 137%	53,1 142%	88,3 235%	118,2 315%	40,1 107%	21,3 57%	45,3 121%	45,3 121%	73,7 196%	54,9 146%
P.,J.	122,7 100%	146,5 119%	124,1 101%	90,0 73%	95,5 78%	89,7 73%	45,6 37%	93,1 76%	99,0 81%	99,8 81%	115,2 94%
R.,K.	47,8 100%	45,4 95%	52,9 111%	42,2 88%	29,4 62%	42,4 89%	21,7 45%	42,1 88%	41,1 86%	45,3 95%	42,6 89%
S.,E.	93,2 100%	106,4 114%	127,8 137%	63,0 68%	42,4 45%	84,8 91%	55,9 60%	95,0 102%	106,4 114%	104,6 112%	84,2 90%
S.,H.	113,2 100%	87,2 77%	110,6 98%	160,8 142%	130,0 106%	80,4 71%	61,2 54%	46,8 41%	111,4 98%	76,4 67%	51,4 45%
Z.,A.	74,6 100%	65,5 88%	64,6 87%	62,8 84%	47,9 64%	97,9 131%	51,4 69%	86,3 116%	70,9 95%	64,6 87%	86,3 116%
MD	100%	109%	106%	93%	88%	89%	56%	99%	104%	100%	105%
Min.	100%	77%	78%	68%	45%	54%	9%	41%	81%	67%	45%
Max.	100%	138%	142%	235%	315%	131%	90%	136%	133%	196%	146%

Abbildung 4.4.5.: Kollagen-Bindungstest – Veränderungen bezogen auf PS



	CR3	CR6	CE3	CE6	CK3	CK6	PR3	PR6	PE3	PE6
Median	109	106	93	88	89	56	99	104	100	105
1.Quartile	88	92	81	64	73	42	82	93	86	89
3.Quartile	127	138	136	109	109	73	124	116	150	143
Minimum	77	78	68	45	54	9	41	81	67	45
Maximum	138	142	235	315	131	90	136	133	196	146

Im Akzeptanzbereich von 10% lagen die ermittelten Mediane der Lagerung von Citratplasma bei Raumtemperatur (99% bzw. 104%) und in Eis (100% bzw. 105%), sowie von Citratvollblut bei Raumtemperatur (109% bzw. 106%) und bei dreistündiger Aufbewahrung in Eis (93%). Bei sechsstündiger Lagerung von Citratvollblut in Eis (88%) sowie bei dreistündiger Aufbewahrung bei -5°C (Kühlakku; 89%) zeigten sich die ermittelten Werte nur knapp unter dem akzeptierten Toleranzbereich. Nur bei sechsstündiger Lagerung von Citratvollblut zwischen Kühlakkus reduzierten sich die Werte stark (56%).

4.4.6. Ristocetin-Cofaktor - VWF-Antigen – Quotient

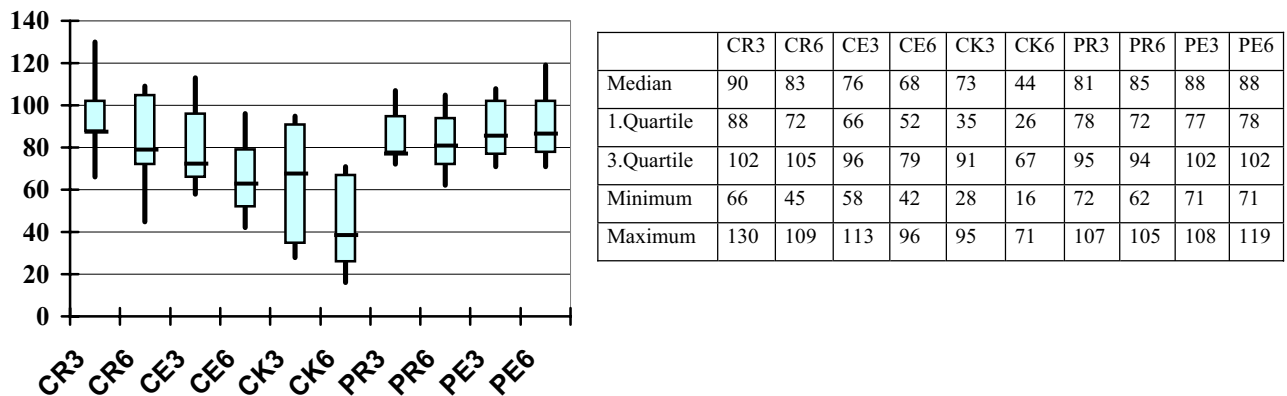
Tabelle 4.4.6.: Ristocetin-Cofaktor/VWF:Ag

Der Ristocetin-Cofaktor/VWF:Ag - Koeffizient besaß keine Einheit (erste Zahl). Die zweite Zahl gab den Prozentwert von PS wieder.

Bei dem Median, dem Minimal- und Maximalwert wurde der Patient M.,W. nicht einbezogen, da sowohl der Ristocetin-Cofaktor als auch das VWF:Ag außerhalb des Messbereiches lagen und somit seine Werte nicht ermittelbar waren.

Pat.	PS	CR3	CR6	CE3	CE6	CK3	CK6	PR3	PR6	PE3	PE6
G.,P.	1,14 100%	1,02 89%	0,51 45%	1,09 96%	0,83 73%	0,37 32%	0,5 44%	1,22 107%	0,98 86%	0,96 84%	1,23 108%
M.,A.	0,93 100%	0,61 66%	0,72 77%	0,71 76%	0,39 42%	0,43 46%	0,15 16%	0,75 81%	0,58 62%	0,99 106%	0,88 95%
M.,M.	1,32 100%	1,19 90%	1,1 83%	0,76 58%	0,7 53%	0,5 38%	0,48 36%	1,02 77%	1,03 78%	0,94 71%	0,94 71%
M.,W	nicht	er-	mittel	bar							
P.,B.	0,93 100%	0,81 87%	1,01 109%	0,63 68%	0,64 69%	0,26 28%	0,64 69%	0,79 85%	0,8 86%	0,82 88%	0,7 75%
P.,J.	1,37 100%	1,47 107%	1,22 89%	1,3 95%	1,32 96%	1,3 95%	0,43 31%	0,99 72%	0,89 65%	1,2 88%	1,2 88%
R.,K.	1,18 100%	1,15 97%	1,23 104%	1,33 113%	0,99 84%	1,1 93%	0,24 20%	1,12 95%	1,19 101%	1,27 108%	1,41 119%
S.,E.	1,61 100%	1,45 90%	1,69 105%	1,01 63%	1,1 68%	1,41 88%	0,94 58%	1,27 79%	1,69 105%	1,56 97%	1,49 93%
S.,H.	1,1 100%	0,99 90%	0,73 66%	0,76 69%	0,65 59%	0,8 73%	0,78 71%	0,87 79%	0,9 82%	0,82 75%	0,88 80%
Z.,A.	1,1 100%	1,43 130%	0,88 80%	0,93 85%	0,55 50%	0,96 87%	0,72 65%	1,05 95%	0,94 85%	0,86 78%	0,9 82%
MD	100%	90%	83%	76%	68%	73%	44%	81%	85%	88%	88%
Min.	100%	66%	45%	58%	42%	28%	16%	72%	62%	71%	71%
Max.	100%	130%	109%	113%	96%	95%	71%	107%	105%	108%	119%

Abbildung 4.4.6.: Ristocetin-Cofaktor/VWF:Ag – Veränderungen bezogen auf PS



Bei der Bestimmung des Ristocetin-Cofaktor – VWF-Antigen - Quotienten ergaben sich, gerade bei der gekühlten Lagerung von Citratvollblut, größere Schwankungsbereiche. Die ermittelten Mediane bei der Lagerung von Citratplasma bei Raumtemperatur ergaben Werte von 81% nach drei Stunden bzw. 85% nach sechs Stunden und bei der Aufbewahrung in Eis jeweils Werte von 88%. Bei der Aufbewahrung von Citratvollblut bei Raumtemperatur zeigten die ermittelten Mediane einen Abfall gegenüber dem Ausgangswert PS auf 90% nach drei Stunden bzw. 83% nach sechs Stunden. Die gekühlte Lagerung von Citratvollblut ergab nach drei Stunden Werte von 76% (Eis) und 73% (Kühlakku). Bei der sechsstündigen Lagerung von Citratvollblut in Eis lag der Median bei 68%, nach sechsstündiger Lagerung bei ca. -5°C sank er auf 44%.

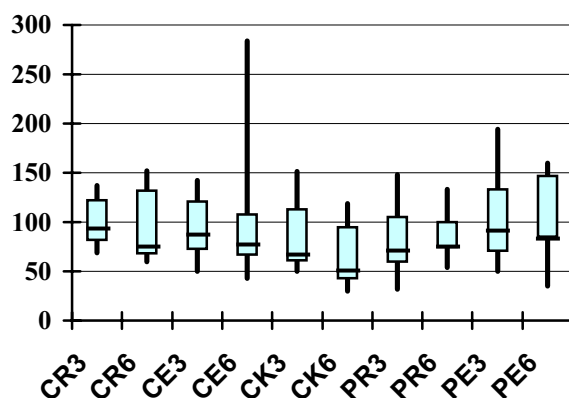
4.4.7. Kollagenbindungstest - VWF-Antigen - Quotient

Tabelle 4.4.7.: VWF:CB/VWF:Ag

Der VWF:CB/VWF:Ag - Koeffizient besaß keine Einheit (erste Zahl). Die zweite Zahl gab den Prozentwert von PS wieder.

Pat.	PS	CR3	CR6	CE3	CE6	CK3	CK6	PR3	PR6	PE3	PE6
G.,P.	0,4 100%	0,43 108%	0,24 60%	0,41 103%	0,3 75%	0,2 50%	0,25 63%	0,59 148%	0,37 93%	0,49 123%	0,61 153%
M.,A.	0,64 100%	0,44 69%	0,44 69%	0,78 122%	0,67 105%	0,4 63%	0,19 30%	0,43 67%	0,43 67%	0,66 103%	0,74 116%
M.,M.	0,77 100%	0,69 90%	0,57 74%	0,48 62%	0,69 90%	0,65 84%	0,56 73%	0,6 78%	0,71 92%	0,67 87%	0,59 77%
M.,W	0,51 100%	0,7 137%	0,68 133%	0,61 120%	0,6 118%	0,43 84%	0,46 90%	0,68 133%	0,68 133%	0,99 194%	0,74 145%
P.,B.	0,31 100%	0,37 119%	0,41 132%	0,44 142%	0,88 284%	0,29 94%	0,22 71%	0,28 90%	0,29 94%	0,51 164%	0,32 103%
P.,J.	1,64 100%	2,13 130%	1,72 105%	1,25 76%	1,37 84%	1,25 76%	0,72 44%	0,65 40%	0,88 54%	1,16 71%	1,45 88%
R.,K.	0,39 100%	0,33 85%	0,45 115%	0,41 105%	0,37 95%	0,59 151%	0,43 110%	0,32 82%	0,33 85%	0,41 105%	0,37 95%
S.,E.	0,42 100%	0,43 102%	0,64 152%	0,21 50%	0,18 43%	0,49 117%	0,5 119%	0,38 90%	0,5 119%	0,5 119%	0,67 160%
S.,H.	0,34 100%	0,24 71%	0,22 65%	0,34 100%	0,35 103%	0,18 53%	0,13 38%	0,11 32%	0,28 82%	0,17 50%	0,12 35%
Z.,A.	0,43 100%	0,49 114%	0,32 74%	0,35 81%	0,19 44%	0,48 112%	0,25 58%	0,41 95%	0,33 77%	0,3 70%	0,41 95%
MD	100%	105%	90%	102%	93%	84%	67%	86%	89%	104%	99%
Min.	100%	69%	60%	50%	43%	50%	30%	32%	54%	50%	35%
Max.	100%	137%	152%	142%	284%	151%	119%	148%	133%	194%	160%

Abbildung 4.4.7.: vWF-Ag/CBA – Veränderungen bezogen auf PS



	CR3	CR6	CE3	CE6	CK3	CK6	PR3	PR6	PE3	PE6
Median	105	90	102	93	84	67	86	89	104	99
1.Quartile	82	68	73	67	61	43	60	75	71	85
3.Quartile	122	132	121	108	113	95	105	100	133	147
Minimum	69	60	50	43	50	30	32	54	50	35
Maximum	137	152	142	284	151	119	148	133	194	160

Bei der Lagerung von Citratvollblut bei Raumtemperatur lagen die ermittelten Mediane nach drei Stunden bei 105%, nach sechs Stunden bei 90%. Die gekühlte Aufbewahrung von Citratvollblut in Eis zeigte nach drei Stunden Werte von 102% nach weiteren drei Stunden Werte von 93%. Bei der Lagerung zwischen Kühlakkus lagen die ermittelten Mediane bei 84% (CK3) bzw. 67% (CK6). Bei der Lagerung von Citratplasma bei Raumtemperatur ergaben sich nach drei Stunden Werte von 86%, nach sechs Stunden Werte von 89%. Bei der Aufbewahrung von Citratplasma in Eis lagen die ermittelten Mediane nach drei Stunden bei 104%, nach sechs Stunden bei 99%.

4.4.8. Signifikanz

Die Testung auf Signifikanz wurde mit dem Wilcoxon-matched-pairs-Test durchgeführt.

Tabelle 4.4.8.1.: Signifikante Veränderungen der unterschiedlichen Lagerungen zum Ausgangswert (PS)

Untersuchung	CR3	CR6	CE3	CE6	CK3	CK6	PR3	PR6	PE3	PE6
Ristocetin-Cofaktor	n.s.	n.s.	n.s.	0,008	0,016	0,008	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
VWF-Antigen	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0,012	0,016	n.s.	n.s.
APTT	n.s.	0,037	0,002	0,002	0,01	0,002	0,049	0,01	0,014	0,004
Faktor VIII-Aktivität	0,01	0,004	0,002	0,002	0,002	0,002	0,004	0,002	0,002	0,002
Kollagen-Bindungstest	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0,002	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
VWF:RCo/VWF:Ag	n.s.	n.s.	0,02	0,004	0,004	0,004	0,02	0,02	0,04	n.s.
VWF:CB/VWF:Ag	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0,02	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Bei dieser Tabelle wurden alle veränderten Größen, also Lagerungszeit, Lagerungstemperatur und ob es sich um Citratvollblut oder Citratplasma handelte, mit einbezogen.

Bei der Messung des Ristocetin-Cofaktors ergaben sich nur bei der sechsständigen Lagerung von Citratvollblut in Eis und bei der Lagerung von Citratvollblut bei -5°C signifikante Unterschiede zum Ausgangswert PS. Bei der Bestimmung des VWF-Antigens zeigten sich nur bei der Lagerung von Citratplasma bei Raumtemperatur signifikante Unterschiede zum Ausgangswert PS. Die APTT und die Faktor VIII-Aktivität scheinen sensibler gegenüber Verzögerungen bei der Weiterverarbeitung der Proben zu sein, da es bei allen Lagerungen, außer CR3 (also Citratvollblut bei dreistündiger Lagerung bei Raumtemperatur) bei der APTT, zu signifikanten Veränderungen im Vergleich zu PS kam. Der Kollagen-Bindungstest ergab, ebenso wie der Kollagenbindungstest - VWF-Antigen – Quotient, nur bei der sechsständigen Lagerung von Citratvollblut bei -5°C (Kühlakku) signifikante Veränderungen im Vergleich zu PS. Der Ristocetin-Cofaktor – VWF-Antigen – Quotient zeigte signifikante Veränderungen bei der gekühlten Lagerung von Citratvollblut (Eis bzw. Kühlakku), bei der

Lagerung von Citratplasma bei Raumtemperatur und bei der dreistündigen Lagerung von Citratplasma in Eis.

Tabelle 4.4.8.2.: Signifikante Veränderungen bezüglich der Lagerung von Citratvollblut bzw. Citratplasma bei gleicher Lagerungszeit und gleicher Temperatur

Untersuchung	CR3-PR3	CR6-PR6	CE3-PE3	CE6-PE6
Ristocetin-Cofaktor	n.s.	n.s.	n.s.	0,008
VWF-Antigen	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
APTT	n.s.	0,012	n.s.	n.s.
Faktor VIII-Aktivität	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Kollagen-Bindungstest	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
VWF:RCo/VWF:Ag	n.s.	n.s.	n.s.	0,012
VWF:CB/VWF:Ag	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Bei dem Vergleich zwischen der Lagerung von Citratvollblut bzw. Citratplasma bei Raumtemperatur für jeweils drei Stunden ergab sich keine Signifikanz. Bei sechsstündiger Lagerung bei Raumtemperatur wurde bei der APTT eine Signifikanz festgestellt. Bei gekühlter Lagerung in Eis zeigte sich im Vergleich Citratvollblut zu Citratplasma bei dreistündiger Lagerung keine Signifikanz, nach sechsstündiger Lagerung wurde eine signifikante Veränderung für den Ristocetin-Cofaktor und den Ristocetin-Cofaktor – VWF-Antigen –Quotienten ermittelt.

Tabelle 4.4.8.3.: Signifikante Veränderungen in Abhängigkeit von der Lagerungszeit

Untersuchung	CR3-CR6	CE3-CE6	CK3-CK6	PR3-PR6	PE3-PE6
Ristocetin-Cofaktor	n.s.	0,008	0,039	n.s.	n.s.
VWF-Antigen	n.s.	n.s.	0,012	n.s.	n.s.
APTT	0,027	n.s.	0,002	0,012	0,008
Faktor VIII-Aktivität	n.s.	0,01	0,004	0,037	0,014
Kollagen-Bindungstest	n.s.	n.s.	0,004	n.s.	n.s.
VWF:RCo/VWF:Ag	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
VWF:CB/VWF:Ag	n.s.	n.s.	0,037	n.s.	n.s.

Im Vergleich zwischen der drei- bzw. sechsstündigen Lagerung von Citratvollblut bei Raumtemperatur ergab sich nur für die APTT eine Signifikanz. Bei dem Vergleich zwischen der Aufbewahrung für drei bzw. sechs Stunden von Citratvollblut in Eis zeigten sich signifikante Werte für den Ristocetin-Cofaktor und die Faktor VIII-Aktivität. Wurde das Citratvollblut zwischen zwei Kühlakkus gelagert, ließ sich für alle, außer den Ristocetin-Cofaktor – VWF-Antigen –Quotienten, eine signifikante Veränderung zwischen drei- bzw. sechsstündiger Lagerung feststellen. Wurde Citratplasma bei Raumtemperatur bzw. in Eis für

drei bzw. sechs Stunden gelagert, führte dies zu signifikanten Veränderungen von APTT und Faktor VIII-Aktivität.

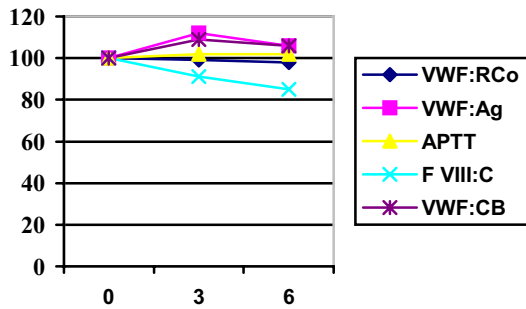
Tabelle 4.4.8.4.: Signifikante Veränderungen in Abhängigkeit der Lagerungstemperatur

Untersuchung	CR3-CE3	CR6-CE6	CR3-CK3	CR6-CK6	CE3-CK3	CE6-CK6	PR3-PE3	PR6-PE6
Ristocetin-Cofaktor	n.s.	0,016	0,016	0,008	0,039	0,016	n.s.	n.s.
VWF-Antigen	n.s.	n.s.	n.s.	0,004	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
APTT	0,004	0,037	0,004	0,002	n.s.	0,002	0,014	n.s.
Faktor VIII-Aktivität	0,01	0,027	0,002	0,004	0,014	0,004	n.s.	n.s.
Kollagen-Bindungstest	n.s.	n.s.	0,049	0,002	n.s.	0,014	n.s.	n.s.
VWF:RCo/VWF:Ag	n.s.	n.s.	0,004	0,012	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
VWF:CB/VWF:Ag	n.s.	n.s.	n.s.	0,006	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

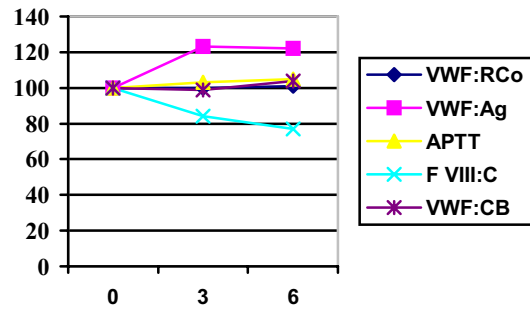
Verglich man die Lagerung von Citratvollblut bei Raumtemperatur mit der Lagerung in Eis, stellte man nach drei bzw. sechs Stunden signifikante Unterschiede von der APTT und der Faktor VIII-Aktivität fest. Zusätzlich war nach sechsständiger Lagerung noch eine Signifikanz für den Ristocetin-Cofaktor ermittelbar. Bei der Gegenüberstellung der Lagerung von Citratvollblut bei Raumtemperatur und zwischen Kühlakkus ergaben alle Tests bei dreistündiger Lagerung, außer VWF-Antigen und Kollagenbindungstest - VWF-Antigen – Quotient, einen signifikanten Unterschied zu PS. Nach sechs Stunden wurden für alle Tests signifikante Unterschiede ermittelt. Verglich man die Lagerung von Citratvollblut in Eis und zwischen zwei Kühlakkus zeigte sich bei dreistündiger Lagerung nur für den Ristocetin-Cofaktor und die Faktor VIII-Aktivität eine Signifikanz, bei sechsständiger Lagerung war zusätzlich bei der APTT und dem Kollagen-Bindungstest eine Signifikanz ermittelbar. Bei dem Vergleich der Temperaturbeeinflussung bei der Aufbewahrung von Citratplasma ließ sich bei dreistündiger Lagerung nur für die APTT eine Signifikanz feststellen. Nach sechsständiger Lagerung war keine signifikante Veränderung zwischen der Lagerung von Citratplasma bei Raumtemperatur oder in Eis ermittelbar.

4.4.9. graphische Zusammenfassung

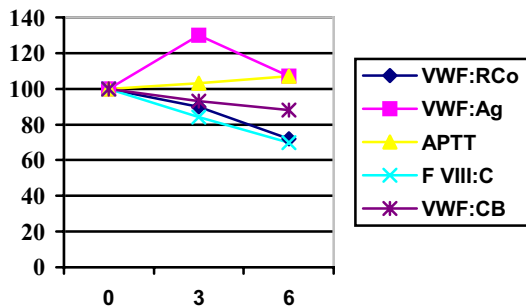
4.4.9.1.: Citratvollblut bei RT



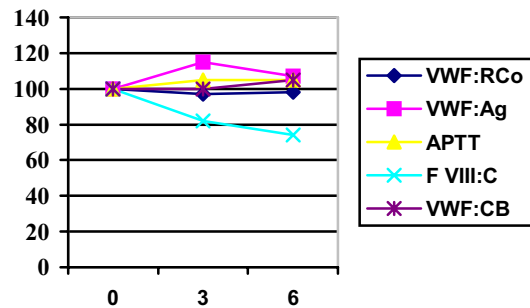
4.4.9.2.: Citratplasma bei RT



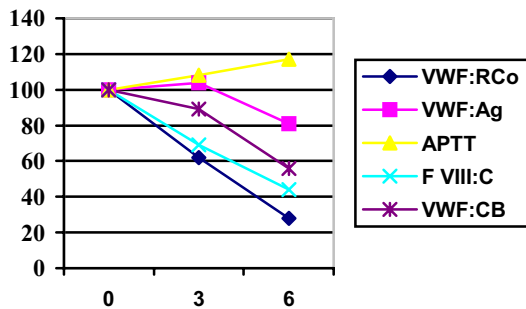
4.4.9.3.: Citratvollblut in Eis



4.4.9.4.: Citratplasma in Eis



4.4.9.5.: Citratvollblut zwischen Kühlakkus



4.5. Pearson-Korrelation aller Probanden

4.5.1. Pearson-Korrelation zwischen Ausgangswert und relativem Verlust bei sechsstündiger Lagerung von Citratvollblut bei -5°C (Kühlakku)

Bei diesem Test wurden alle Probanden mit einbezogen. Der relative Verlust der Faktoren bei sechsstündiger Lagerung zwischen zwei Kühlakkus (CK6) wurde im Vergleich zum Ausgangswert PS herangezogen. Es sollte damit überprüft werden, ob die Höhe der Ausgangswerte PS mit dem Verlust bei Lagerung korrelierten. Dies wurde am Beispiel für die sechsstündige Lagerung von Citratvollblut bei -5°C (Kühlakku) durchgeführt. Es wurde der Korrelationskoeffizient r und die dazugehörige Überschreitungswahrscheinlichkeit p angegeben.

Es ergaben sich folgende Werte:

Ristocetin-Cofaktor:	$r = 0,37$	$p = 0,0411$
VWF-Antigen:	$r = 0,38$	$p = 0,0236$
APTT:	$r = -0,22$	$p = 0,2125$
Faktor VIII-Aktivität:	$r = 0,18$	$p = 0,3126$
Kollagen-Bindungstest:	$r = -0,008$	$p = 0,9628$

Signifikante Korrelationen zwischen dem Ausgangswert PS und dem Verlust bei sechsstündiger Lagerung von Kühlakkus zeigte sich nur bei dem Ristocetin-Cofaktor ($r = 0,37$, $p = 0,0411$) und bei dem VWF-Antigen ($r = 0,38$, $p = 0,0236$). Bei den übrigen durchgeführten Tests ergaben sich keine signifikanten Korrelationen zwischen dem Ausgangswert PS und der Veränderung bei Lagerung.

4.5.2. Pearson-Korrelation zwischen den Veränderungen verschiedener VWF-Parameter bei sechsstündiger Lagerung bei -5°C (Kühlakku)

Bei diesem Test wurden alle Probanden mit einbezogen. Der relative Verlust der Faktoren bei sechsstündiger Lagerung zwischen zwei Kühlakkus (CK6) wurde im Vergleich zum Ausgangswert PS herangezogen. Verglichen wurde dann jeweils der relative Verlust zwischen: Ristocetin-Cofaktor, VWF-Antigen, Faktor VIII-Aktivität und Kollagen-Bindungstest untereinander. Es wurde der Korrelationskoeffizient r und die dazugehörige Überschreitungswahrscheinlichkeit p angegeben.

Es ergaben sich folgende Werte:

Ristocetin-Cofaktor und VWF-Antigen:	$r = 0,75$	$p = 0,000001$
Ristocetin-Cofaktor und Faktor VIII-Aktivität:	$r = 0,50$	$p = 0,0048$
Ristocetin-Cofaktor und Kollagen-Bindungstest:	$r = 0,57$	$p = 0,0011$
VWF-Antigen und Faktor VIII-Aktivität:	$r = 0,60$	$p = 0,0002$
VWF-Antigen und Kollagen-Bindungstest:	$r = 0,67$	$p = 0,00002$
Faktor VIII-Aktivität und Kollagen-Bindungstest:	$r = 0,51$	$p = 0,0023$.

Der größte Zusammenhang des Faktorverlustes bei Kälte zeigte sich für Ristocetin-Cofaktor und VWF-Antigen ($r = 0,75$, $p = 0,000001$). Das heißt also, ging viel Ristocetin-Cofaktor durch die sechsstündige Lagerung bei -5°C verloren, lagen auch die Werte für VWF-Antigen deutlich niedriger, als ohne Lagerung. Weitere hochsignifikante Korrelationen ($p < 0,001$) ergaben sich für den Vergleich VWF-Antigen und Faktor VIII-Aktivität ($r = 0,60$) sowie für VWF-Antigen und Kollagen-Bindungstest ($r = 0,67$). Auch die anderen Kombinationen zeigten signifikante Korrelationen ($0,001 < p < 0,05$).

5. Diskussion

Das von Willebrand-Syndrom stellt eine der häufigsten Störungen der Hämostase mit ca. 1% bis 2% Betroffener dar. Als Ursache zeigen sich angeborene, vererbte Störungen der Struktur des von Willebrand-Faktors oder erworbene Störungen durch stenosierende Herzvitien mit erhöhten Scherkräften des Blutes und dadurch bedingten Verlust der großen Multimere (Gill et al, 1986; Pareti et al, 2000; von Depka Prondzinski, 2002), Systemischen Lupus erythematodes, B-Zell-Neoplasien, maligne Neoplasien (Budde et al, 1984, Jakway, 1992), Makroglobulinämie Waldenström, Hypothyreose (Dalton et al, 1987) und Medikamente (Berkowitz et al, 1995).

Während der primären Hämostase vermittelt der von Willebrand-Faktor, besonders bei hohen Strömungsgeschwindigkeiten (Budde et al, 1999; Ruggeri et al, 1999; Wu et al, 2000), die Adhäsion der Thrombozyten sowohl untereinander als auch an das Subendothel. Der VWF bindet sich an das Subendothel und vollzieht einen Konformationswechsel, anschließend koppelt er mit seiner A1-Domäne an den GPIIb/IX Rezeptor der Thrombozyten und initiiert die reversible Plättchenadhäsion. Durch ein intrazelluläres Signal produzieren die Plättchen einen GPIIb/IIIa-Komplex auf ihrer Membran, bindet der VWF mit seiner C1-Domäne (RGD-Sequenz (Berliner et al, 1988; Bombeli, 2002)) dort, kommt es zu einer irreversiblen Adhäsion und Aggregation der Thrombozyten. Für die Förderung der Thrombozytenaggregation sind besonders die größten Multimere geeignet (Santoro, 1983; Federici et al, 1989; Fischer et al, 1996), da sie mit ihren zahlreichen Bindungsstellen eine optimale Vernetzung gewährleisten (von Depka Prondzinski, 2002). Außerdem besitzt der VWF an seinem N-terminalen Ende eine Bindungsstelle für den zirkulierenden Faktor VIII und schützt diesen dadurch vor der Inaktivierung durch Protein C oder Faktor Xa und verlängert so dessen Halbwertszeit (Mazurier et al, 1996) von einer Stunde auf zwölf Stunden (Lutze et al, 1999).

Das von Willebrand-Syndrom kann in verschiedene Typen unterteilt werden. Typ 1 und 3 stellen einen quantitativen Defekt des VWF dar, Typ 2 liegt hingegen ein qualitativer Defekt zu Grunde.

VWS, Typ 1 (100 pro eine Million Einwohner, ca. 70% bis 75% aller Patienten (Berkowitz et al, 1995)) wird autosomal dominant vererbt und zeigt eine Vielzahl an Mutationen. Viele der betroffenen Patienten besitzen die Blutgruppe 0, bei der die VWF-Parameter um ca. 25% bis 35% reduziert sind (Israels et al, 2002; Sarode et al, 2000).

Dem autosomal rezessiv vererbten Typ 3 (0,5 bis 5 Patienten pro eine Million Einwohner (Mazurier et al, 1996), ca. 6% bis 17% aller Patienten (Tilsner et al, 1986)) liegen ebenfalls

mehrere Mutationen (33 (Favaloro, 1999)) zu Grunde, die häufigste in der deutschen Bevölkerung ist eine Leserastermutation im Exon 18 (Schneppenheim, 1997).

Von Willebrand-Syndrom Typ 2 (12% bis 23% der Patienten (Tilsner et al, 1986)) kann in die Typen 2a, 2b, 2m und 2n unterteilt werden.

Der autosomal dominant oder rezessiv vererbte Typ 2a (10% bis 15% der Patienten (von Depka Prondzinski, 2002)) besaß 54 Mutationen (Favaloro, 1999), die mit einem Defekt der A2 Domäne (Israels et al, 2002) einhergehen. Dadurch kommt es zu einer Abwesenheit von großen und intermediären Multimeren im Plasma und in den Plättchen (Scharrer, 1997).

Der autosomal dominant vererbte Typ 2b (5% der Patienten (von Depka Prondzinski, 2002)), besitzt eine gesteigerte Affinität für den Thrombozytenrezeptor GPIb (A1 Domäne) (Nichols et al, 1997; Sadler, 1994) und weist einen Verbrauch großer Multimere (Schneppenheim, 1997) auf. Bei ihm sind 45 Mutationen bekannt (Favaloro, 1999).

Der autosomal rezessiv vererbte Typ 2n (3% der Patienten (von Depka Prondzinski, 2002)) weist eine gestörte Faktor VIII-Bindung auf. Dies hat eine erniedrigte Faktor VIII-Aktivität durch multiple Mutationen (28 (Favaloro, 1999)) am N-terminalen Bereich des VWF (Domäne D' und D3) zur Folge, wobei 73% eine Mutation am Exon 20 zeigten (Eikenboom et al, 1993).

Eine sehr seltene Form ist der autosomal dominant vererbte Typ 2m (<1% der Patienten (Bombeli, 2002) mit Mutationen der A1 Domäne (Hillery et al, 1998; Israels et al, 2002) und damit verbundener verminderter Plättchenbindung, die nicht auf dem Fehlen hochmolekularer VWF-Multimere beruhen (Hiller et al, 1998).

Für die Diagnose des von Willebrand-Syndroms werden Anamnese, Blutungszeit und APTT als orientierende Diagnostik, Faktor VIII-Aktivität, Ristocetin-Cofaktor und VWF-Antigen als erweiterte Diagnostik und der Kollagen-Bindungstest, Ristocetin-induzierte Aggregation (RIPA), Multimeranalyse, VWF-Parameter in Thrombozyten und Faktor VIII-Bindungskapazität des VWF als spezielle Diagnostik empfohlen (Budde et al, 1999).

Beim VWS, Typ 1 sind VWF-Antigen, Ristocetin-Cofaktor, Kollagenbindungstest und Faktor VIII-Aktivität erniedrigt. Bei dem Vergleich der Werte für die Faktor VIII-Aktivität und den VWF zeigt die relative Verminderung der beiden Faktoren meist gleich große Werte (Berkowitz, 1995). Die APTT korreliert mit der Faktor VIII-Aktivität und ist bei milden VWS meist normal (Israels et al, 2002).

Beim VWS, Typ 2 ist VWF-Antigen, Ristocetin-Cofaktor und VWF:CB erniedrigt und die Faktor VIII-Aktivität erniedrigt oder normal. Die Funktionstests (Ristocetin-Cofaktor,

Kollagenbindungstest) fallen bei Typ 2a, 2b und 2m meist niedriger aus, als die Konzentration des VWF-Ag (Barthels, 2002; Favaloro, 1999)

Beim Typ 2a fehlen die großen und mittelgroßen Multimere im Plasma und den Thrombozyten, die Vererbung ist meist autosomal dominant, es kommen jedoch auch autosomal rezessive Vererbungen vor. Beim Typ 2b fehlen die großen Multimere im Plasma, sind jedoch in den Thrombozyten vorhanden. Beim Typ 2n ist nur die Faktor VIII-Aktivität erniedrigt (2% bis 25% (Bombeli, 2002)), VWF-Antigen, Ristocetin-Cofaktor und die Multimere im Plasma und in den Thrombozyten sind normal. Beim Typ 2m ist der Ristocetin-Cofaktor vermindert, Faktor VIII-Aktivität und vWF-Antigen ergeben normale Werte, die Multimere zeigen normale oder abnormale Strukturen.

Beim Typ 3 beträgt das VWF-Antigen <1%, Faktor VIII-Aktivität liegt bei 2% bis 10% und Ristocetin-Cofaktor, VWF:CB und alle Multimere fehlen (Beutel et al, 2000; Budde et al, 1999; Heimpel et al, 1996; Israels et al, 2002)).

Die VWF:Rco/VWF:Ag und VWF:CB/VWF:Ag zeigen eine deutliche Abhängigkeit von der Multimerisation (Barthels, 1987). Ristocetin-Cofaktor und Kollagen-Bindungstest zeigen den Verlust der großen Multimere aus dem zirkulierenden Blut an (Israels et al, 2002).

Tabelle 5.1.: Typische Laborbedingungen bei VWS (Favaloro, 1999)

	VWS, Typ1	Typ 2a	Typ 2b	Typ 2n	Typ 2m	Typ 3
VWF:RCo	↓	↓↓ (<30%)	↓	normal (/ ↓)	↓ (/normal)	↓↓↓ (<5%)
VWF:Ag	↓ (<50%)	↓ (/normal)	↓ (/normal)	normal (/ ↓)	normal (/ ↓)	↓↓↓ (<5%)
APTT	↑ (/normal)	↑ (/normal)	normal (/ ↑)	↑ (/normal)	normal (/ ↑)	↑
F VIII:C	↓ (/normal)	↓ (/normal)	↓ (/normal)	↓	normal (/ ↓)	↓↓ (<20%)
VWF:CB	↓	↓↓ (<15%)	↓ (<40%)	normal (/ ↓)	↓ (/normal)	↓↓↓ (<5%)
VWF:RCo/ VWF:Ag	>0,6	<0,6	<0,6	>0,6	<0,6	nicht verwendbar
VWF:CB/ VWF:Ag	>0,6	<0,6	<0,6	>0,6	<0,6	nicht verwendbar
VWF- Multimere	alle reduziert	hoch/mittel reduziert	hoch reduziert	normal	normal	alle fehlen

Der Ablauf der labormedizinischen Untersuchung lässt sich in drei Phasen, Präanalytik, Analytik und Postanalytik einteilen. Die Qualität der medizinischen Laboruntersuchung (Analytik) wird durch die Richtlinien der Bundesärztekammer (RILIBÄK) definiert. Damit wird ein hohes Maß an analytischer Qualität gewährleistet, so dass die Fehlerrate in der analytischen Phase gering sind (Fiedler et al, 2004). Für die prä- und postanalytische Phase existieren derartige Standards nicht. Stattdessen erscheinen lediglich Empfehlungen zur Definition der Qualität von Untersuchungsmaterialien. Diese befassen sich unter anderem mit der Wahl der Probengefäße und Antikoagulanzen, der Probennahme, dem optimalen Probenvolumen, den Stabilitätskriterien während Transport und Lagerung von Untersuchungsmaterial sowie dem Umgang mit hämolytischen, lipämischen und ikterischen Proben (Narayanan et al, 2002). Mit Abstand der häufigste Fehler im Ablauf einer labormedizinischen Untersuchung tritt heutzutage in der präanalytischen Phase auf (Bonini et al, 2002). Verschiedene Einflussgrößen und Störfaktoren nehmen Einfluss auf die Laborergebnisse. Hierzu gehören neben der Lagerung der Proben, falschen Probengefäßen, Kontaminationen, Probenqualität (Hämolyse) und falscher Wahl der Antikoagulanzen (Störfaktoren) auch Alter, Abstammung, Geschlecht, Ernährung, Alkohol, Nikotin und Arzneimittel (Einflussgrößen) (Guder et al, 2000; Narayanan, 2000; Thomas, 2000).

So sollen hämostaseologische Proben sofort ungeöffnet und bei Raumtemperatur in das Labor geschickt und innerhalb von vier Stunden analysiert werden. Dies gilt auch für Einzelfaktoren mit Ausnahme des Faktor VIII, der innerhalb von zwei Stunden bestimmt werden sollte. Ein Transport auf Eis oder die Aufbewahrung im Kühlschrank können zu einer Kälteaktivierung von Gerinnungsfaktoren und damit zu einer Veränderung der Gerinnungszeiten führen. Wenn eine zeitnahe Analyse nicht gewährleistet werden kann, soll thrombozytenreiches Citratplasma gewonnen und bei -20°C bzw. -70°C eingefroren werden (Guder et al, 2000; Guder et al, 2002; Narayanan, 2000).

5.1. Ristocetin-Cofaktor

Die Messung des Ristocetin-Cofaktors erfolgte mit dem Behring-Coagulation-Timer (BCT). Die Proben wurden jeweils in Doppelbestimmung untersucht und der Mittelwert berechnet, welcher für die weiteren Aussagen genutzt wurde.

Die gemessenen Ergebnisse besaßen die Einheit "% vom Normwert". Bei Frauen sollten die Werte zwischen 60 und 129% und bei Männern zwischen 75 und 150% liegen.

Erhöhte Ristocetin-Cofaktor-Konzentrationen zeigen sich bei Lebererkrankungen, Malignomen, Entzündungen und im Alter (Barthels,1987). Erniedrigte Werte ergeben sich

beim VWS, Sichelzellanämie, Polycythaemia vera und anderen Erkrankungen (Barthels, 1987).

Da sich die Kontrollgruppe und die Patienten mit von Willebrand-Syndrom Typ 1 in Bezug auf ihre Signifikanz gleich verhielten, wurden sie in dieser Auswertung zusammengefasst. Bei der Kontrollgruppe lagen die Ausgangswerte (PS), außer bei B.,M. (47%) in den angegebenen Normgrenzen von 60% bis 150%. Bei den Patienten mit VWS Typ 1 lagen die Ausgangswerte zwischen 36% und 122%. Es zeigten sich signifikante Verluste der Ristocetin-Cofaktor-Werte in Bezug auf PS bei gekühlter Lagerung von Citratvollblut in Eis und zwischen zwei Kühlakkus für jeweils drei und sechs Stunden. Bei den übrigen Lagerungen war keine Signifikanz festzustellen. Verglich man die Lagerung von Citratplasma und Citratvollblut, so zeigte sich bei gekühlter Aufbewahrung, sowohl bei drei als auch bei sechs Stunden ein signifikanter Unterschied. Signifikante Veränderungen ergaben sich in Abhängigkeit von der Lagerungszeit für drei- bzw. sechsstündige Lagerung von Citratvollblut in Eis und bei -5°C (Kühlakku). Eine signifikante Abhängigkeit in Bezug auf die Aufbewahrungstemperatur ergab sich bei dem Vergleich der Lagerung von Citratvollblut bei Raumtemperatur zu Eis und -5°C bei jeweils drei und sechs Stunden, sowie bei der vergleichenden Aufbewahrung von Citratvollblut in Eis und zwischen Kühlakku für sechs Stunden. Bei der Untersuchung ließ sich kein signifikanter Unterschied für die Lagerung von Citratplasma zwischen Raumtemperatur und Eis feststellen.

Beim von Willebrand-Syndrom Typ 2 lagen die Ristocetin-Cofaktor-Werte von den Typen 2a und 2b unterhalb der Messgrenze des BCT, so konnten nur die Messwerte des Typs 2n in die Berechnungen mit einbezogen werden, es waren jedoch keine Signifikanzen zu ermitteln, obwohl auch hier die Werte bei gekühlter Lagerung von Citratvollblut absanken ($<25\%$ von PS). Man könnte also davon ausgehen, dass sich die Patienten mit VWS Typ 2n ähnlich den Patienten mit Typ 1 oder den Kontrollpersonen verhalten.

Die Patienten der neurochirurgischen Station zeigten erhöhte Ristocetin-Cofaktor-Werte, die zwischen 103% und $>363\%$ lagen. Signifikante Veränderungen in Bezug auf PS waren für die sechsstündige Lagerung von Citratvollblut in Eis sowie für die drei- und sechsstündige Aufbewahrung bei -5°C (Kühlakku) ermittelbar. Bei dem Vergleich zwischen Citratvollblut und Citratplasma zeigte sich eine signifikante Veränderung für die gekühlte Lagerung in Eis für sechs Stunden. Signifikante Unterschiede ergaben sich in Abhängigkeit von der Lagerungszeit für drei- bzw. sechsstündiger Lagerung von Citratvollblut in Eis und bei -5°C (Kühlakku). Eine signifikante Abhängigkeit in Bezug auf die Aufbewahrungstemperatur ergab sich bei dem Vergleich der Lagerung von Citratvollblut bei Raumtemperatur zu Eis bei

sechs Stunden, bei Raumtemperatur zu -5°C bei drei und sechs Stunden, sowie bei der vergleichenden Aufbewahrung von Eis und Kühlakku für drei und sechs Stunden. Bei der Untersuchung ließ sich kein signifikanter Unterschied für die Lagerung von Citratplasma zwischen Raumtemperatur und Eis feststellen.

Man sieht also für fast alle Probanden einen signifikanten Verlust des Ristocetin-Cofaktors bei gekühlter Lagerung von Vollblut.

Farrugia et al fanden 1993 ebenfalls eine Erniedrigung der Ristocetin-Aktivität nach der Lagerung von Vollblut bei 4°C .

Favaloro et al berichtete 1996 über einen leichten Verlust an VWF:RCo bei einer Lagerung von Citratplasma oder Citratvollblut bei der siebentägigen Lagerung bei Raumtemperatur.

5.2. VWF-Antigen

Die Messung des VWF-Antigens erfolgte mit einem Elisa-Testverfahren. Die Proben wurden jeweils in Doppelbestimmung untersucht und der Mittelwert berechnet, welcher für die weiteren Aussagen genutzt wurde.

Die gemessenen Ergebnisse besaßen die Einheit "% vom Normwert". Bei Frauen sollten die Werte zwischen 58 und 135% und bei Männern zwischen 82 und 138% liegen.

Bei der Kontrollgruppe lagen die Ausgangswerte PS im Bereich von 61% und 205%. Es zeigten sich signifikante Verluste des von Willebrand-Faktor-Antigens in Bezug auf PS bei gekühlter Lagerung von Citratvollblut in Eis und zwischen zwei Kühlakkus für jeweils drei und sechs Stunden. Bei den übrigen Lagerungen war keine Signifikanz festzustellen. Vergleich man die Lagerung von Citratplasma und Citratvollblut, so zeigte sich bei gekühlter Aufbewahrung in Eis, sowohl bei drei als auch bei sechs Stunden ein signifikanter Unterschied. Signifikante Veränderungen ergaben sich in Abhängigkeit von der Lagerungszeit für drei- bzw. sechsstündige Lagerung von Citratvollblut bei -5°C (Kühlakku), sowie bei der Lagerung von Citratplasma in Eis. Eine signifikante Abhängigkeit in Bezug auf die Aufbewahrungstemperatur ergab sich bei dem Vergleich der Lagerung von Citratvollblut bei Raumtemperatur zu Eis und -5°C bei jeweils drei und sechs Stunden, sowie bei der vergleichenden Aufbewahrung von Eis und Kühlakku für sechs Stunden. Bei der Untersuchung ließ sich kein signifikanter Unterschied für die Lagerung von Citratplasma zwischen Raumtemperatur und Eis feststellen.

Die Ausgangswerte für die Patienten mit von Willebrand-Syndrom Typ 1 lagen zwischen 43% und 101%. Es zeigten sich signifikante Verluste des von Willebrand-Faktor-Antigens in Bezug zu PS bei gekühlter Lagerung von Citratvollblut in Eis und zwischen zwei Kühlakkus

für jeweils drei und sechs Stunden, sowie für die dreistündige Lagerung von Citratplasma bei Raumtemperatur. Signifikante Unterschiede zwischen der Aufbewahrung von Citratvollblut und Citratplasma zeigten sich bei drei- bzw. sechsständiger Lagerung in Eis. Eine signifikante Abhängigkeit in Bezug auf die Aufbewahrungszeit ergab sich bei dem Vergleich von drei- bzw. sechsständiger Lagerung von Citratvollblut in Eis und bei -5°C (Kühlakku). Signifikante Unterschiede ergaben sich in Abhängigkeit von der Aufbewahrungstemperatur bei dem Vergleich der Lagerung von Citratvollblut bei Raumtemperatur zu Eis und -5°C bei jeweils drei und sechs Stunden, sowie bei der vergleichenden Aufbewahrung von Eis und Kühlakku für sechs Stunden und für die dreistündige Lagerung von Citratplasma bei Raumtemperatur gegenüber in Eis.

Bei den Patienten mit von Willebrand-Syndrom Typ 2 lagen die Ausgangswerte PS zwischen 19% und 73%. Es ergaben sich für das VWF-Antigen keinerlei signifikante Veränderungen. Die Mediane ergaben zwar bei der gekühlten Lagerung von Citratvollblut Erniedrigungen auf ca. 60% , die Streuungen der Werte waren jedoch zu groß, um eine Signifikanz zu ermitteln. Es war jedoch auffällig, dass die Spanne der ermittelten Werte bei gekühlter Lagerung von Citratvollblut größer war, als bei den übrigen Aufbewahrungen.

Die Patienten der neurochirurgischen Station zeigten erhöhte VWF-Antigen-Werte, die zwischen 75% und $>400\%$ lagen. Signifikante Veränderungen in Bezug auf PS waren für die drei- bzw. sechsständige Lagerung von Citratplasma bei Raumtemperatur ermittelbar. Bei dem Vergleich zwischen Citratvollblut und Citratplasma zeigte sich keine signifikante Veränderung. Eine signifikante Abhängigkeit in Bezug auf die Aufbewahrungszeit ergab sich bei dem Vergleich von drei- bzw. sechsständiger Lagerung von Citratvollblut bei -5°C (Kühlakku). Signifikante Unterschiede ergaben sich in Abhängigkeit von der Aufbewahrungstemperatur bei dem Vergleich der sechsständigen Lagerung von Citratvollblut bei Raumtemperatur zu -5°C .

Man sieht auch hier, zumindest für die Kontrollgruppe und die Patienten mit VWS Typ 1, einen signifikanten Verlust des VWF-Antigens bei gekühlter Lagerung von Vollblut.

5.3. APTT

Die Messung der APTT erfolgte mit dem ACL 300TM-Analysegerät, einem Zentrifugalanalysator, der nach dem Prinzip der Nephelometrie (Lichtstreuungsmessung) arbeitete.

Die Werte sollten zwischen 29,9 und 41,7 Sekunden liegen. Die APTT reagiert auf Störungen der Faktoren I, II, V, VIII, IX, X, XI und XII (Favaloro, 1999).

Bei der Kontrollgruppe lagen die Ausgangswerte (PS), außer bei S.,B. (26,9s) und V.,T. (29,2s) in den angegebenen Normgrenzen von 29,9 und 41,7 Sekunden. Signifikante Zunahmen der APTT-Werte in Bezug auf PS zeigten sich bei allen Aufbewahrungsmodalitäten. Signifikante Veränderungen bei der Lagerung von Citratvollblut zu Citratplasma waren bei der sechsständigen Aufbewahrung bei Raumtemperatur und in Eis zu ermitteln. Signifikante Unterschiede zeigten sich zwischen der drei- und sechsständigen Aufbewahrung von Citratvollblut in Eis und bei -5°C (Kühlakku), sowie von Citratplasma bei Raumtemperatur und in Eis. Eine signifikante Abhängigkeit in Bezug auf die Aufbewahrungstemperatur ergab sich bei dem Vergleich der Lagerung von Citratvollblut bei Raumtemperatur zu Eis und -5°C bei jeweils drei und sechs Stunden, sowie bei der vergleichenden Aufbewahrung von Eis und Kühlakku für sechs Stunden. Bei der Untersuchung ließ sich kein signifikanter Unterschied für die Lagerung von Citratplasma zwischen Raumtemperatur und Eis feststellen.

Die Ausgangswerte für die Patienten mit von Willebrand-Syndrom Typ 1 lagen zwischen 23,7 und 38,4 Sekunden. Es zeigten sich signifikante Zunahmen der APTT-Werte in Bezug auf PS bei allen Aufbewahrungen. Signifikante Unterschiede zwischen der Lagerung von Citratvollblut und Citratplasma ergaben sich bei sechsständiger Aufbewahrung bei Raumtemperatur und drei- bzw. sechsständiger Lagerung in Eis. Vergleich man die Werte unterschiedlicher Aufbewahrungszeiten (drei bzw. sechs Stunden) bei ansonsten gleichen Bedingungen, zeigten sich signifikante Unterschiede bei der Aufbewahrung von Citratvollblut in Eis und bei -5°C (Kühlakku), sowie bei der Lagerung von Citratplasma bei Raumtemperatur. Signifikante Unterschiede ergaben sich in Abhängigkeit von der Aufbewahrungstemperatur bei dem Vergleich der Lagerung von Citratvollblut bei Raumtemperatur zu Eis und -5°C bei jeweils drei und sechs Stunden, sowie bei der vergleichenden Aufbewahrung von Eis und Kühlakku für sechs Stunden.

Die Ausgangswerte der APTT lagen bei den Patienten mit von Willebrand-Syndrom Typ 2 zwischen 37,2 und 38,4 Sekunden. Es ließen sich keine signifikanten Veränderungen feststellen.

Die Ausgangswerte der Patienten der neurochirurgischen Station ergaben Werte von 23,7 bis 35,2 Sekunden. Es zeigten sich signifikante Zunahmen der APTT-Werte in Bezug auf PS bei allen Aufbewahrungsmodalitäten, außer der dreistündigen Lagerung von Citratvollblut bei Raumtemperatur. Signifikante Veränderungen bei der Lagerung von Citratvollblut zu Citratplasma ließen sich bei der sechsständigen Aufbewahrung bei Raumtemperatur erkennen. Signifikante Unterschiede zeigten sich zwischen der drei- und sechsständigen

Aufbewahrung von Citratvollblut bei Raumtemperatur und bei -5°C (Kühlakku), sowie von Citratplasma bei Raumtemperatur und in Eis. Eine signifikante Abhängigkeit in Bezug auf die Aufbewahrungstemperatur ergab sich bei dem Vergleich der Lagerung von Citratvollblut bei Raumtemperatur zu Eis und -5°C bei jeweils drei und sechs Stunden, sowie bei der vergleichenden Aufbewahrung von Eis und Kühlakku für sechs Stunden. Bei dreistündiger Lagerung von Citratplasma bei Raumtemperatur zu Aufbewahrung in Eis zeigten sich ebenfalls signifikante Unterschiede.

Da sich die APTT als relativ empfindlicher Parameter erwies, zeigte er besonders bei gekühlter Lagerung größere Abweichungen. So stiegen zum Beispiel bei sechsstündiger Lagerung bei -5°C die APTT-Werte um 1-12 Sekunden an.

Bereits 1975 wurde von Koepke et al veröffentlicht, dass sich die Werte der APTT nach 24-stündiger Lagerung bei Raumtemperatur um ca. 10% bis 15% verlängern.

Ähnliche Ergebnisse wurden von Adcock et al 1998 publiziert. Er beobachtete bei der Lagerung von Citratvollblut gesunder Probanden nach vier Stunden bei Raumtemperatur eine Erhöhung der APTT um 1,5%, nach sechs Stunden um 4,7% und nach 24 Stunden um 12,1%. Bei der Aufbewahrung von Citratvollblut bei 4°C änderten sich die APTT-Werte um 6,6% nach vier Stunden, um 10,2 % nach sechs Stunden und um 16,7% nach 24 Stunden. Bei der Lagerung von Citratplasma bei Raumtemperatur stiegen die APTT-Werte lediglich um 0,6% nach vier Stunden, 2,5 % nach sechs Stunden und 8,3% nach 24 Stunden an. Bei der Aufbewahrung von Citratplasma in Eis veränderten sich die Werte um 2,5% nach vier Stunden, nach sechs Stunden um 3,1% und nach 24 Stunden um 9,9%.

Auch Heil et al publizierten 1998 ähnliche Ergebnisse. Sie untersuchten die Stabilität der APTT in Plasma bei der Lagerung bei 6°C . Die APTT sei für acht Stunden stabil gewesen, das heißt, dass die Abweichungen vom Ausgangswert kleiner als 10% waren.

Neofotitos et al berichteten 1998 über eine Erhöhung der APTT bei der achtstündigen Lagerung von Plasma bei Raumtemperatur um weniger als 1,2 Sekunden (ein Proband von 20 zeigte eine Verlängerung von mehr als 1,2 Sekunden).

Lutze et al zeigten 1999 eine Verlängerung der APTT bei der achtstündigen Lagerung von Plasma bei Raumtemperatur von durchschnittlich 35,5 Sekunden auf 40,6 Sekunden bei 20 Probanden.

Rao et al verbreiteten 2000, dass es nach 24-stündiger Lagerung von Plasma und Vollblut bei Raumtemperatur oder bei 4°C zu einer signifikanten Erhöhung der APTT kam, welche die klinische Interpretation des Befundes stark beeinflusste.

5.4. Faktor VIII-Aktivität

Die Messung der Faktor VIII-Aktivität erfolgte mit dem ACL 300TM-Analysegerät, einem Zentrifugalanalysator, der nach dem Prinzip der Nephelometrie (Lichtstreuungsmessung) arbeitet.

Die Werte sollten zwischen 64% und 167% liegen. Personen mit der Blutgruppe 0 zeigen niedrigere Werte, erhöhte Werte werden bei Einnahme von Ovulationshemmern, Schwangerschaft, Akutphasereaktionen (CRP-Erhöhung), Stress, nach Operationen, Lebererkrankungen, Tumore, Gefäßerkrankungen und steigendem Alter gefunden (Barthels, 2002).

Bei der Kontrollgruppe lagen die Ausgangswerte PS im Bereich von 71% und 150%. Es zeigten sich signifikante Verluste der Faktor VIII-Aktivität in Bezug auf PS bei allen Lagerungen, außer der dreistündigen Lagerung von Citratvollblut bei Raumtemperatur. Vergleich man die Lagerung von Citratplasma und Citratvollblut, so zeigten sich bei allen Aufbewahrungsformen signifikante Ergebnisse. Signifikante Unterschiede ergaben sich in Abhängigkeit von der Lagerungszeit für drei- bzw. sechsstündige Lagerung von Citratvollblut bei Raumtemperatur, in Eis und bei -5°C (Kühlakku), sowie bei der Lagerung von Citratplasma bei Raumtemperatur. Eine signifikante Abhängigkeit in Bezug auf die Aufbewahrungstemperatur ergab sich bei dem Vergleich der Lagerung von Citratvollblut bei Raumtemperatur zu Eis und -5°C bei jeweils drei und sechs Stunden, sowie bei der vergleichenden Aufbewahrung von Eis und Kühlakku für sechs Stunden. Bei der Untersuchung ließ sich kein signifikanter Unterschied für die Lagerung von Citratplasma zwischen Raumtemperatur und Eis feststellen.

Die Ausgangswerte für die Patienten mit von Willebrand-Syndrom Typ 1 lagen zwischen 53% und 182%. Es zeigten sich signifikante Verluste der Faktor VIII-Aktivität in Bezug auf PS bei allen Lagerungsmodalitäten. Signifikante Unterschiede zwischen der Aufbewahrung von Citratvollblut und Citratplasma zeigten sich bei allen Lagerungen, außer der dreistündigen Aufbewahrung bei Raumtemperatur. Eine signifikante Abhängigkeit in Bezug auf die Aufbewahrungszeit ergab sich bei dem Vergleich von drei- bzw. sechsstündiger Lagerung von Citratvollblut in Eis und bei -5°C (Kühlakku), sowie von Citratplasma bei Raumtemperatur und in Eis. Signifikante Unterschiede zeigten sich in Abhängigkeit von der Aufbewahrungstemperatur bei dem Vergleich der Lagerung von Citratvollblut bei Raumtemperatur zu Eis und -5°C bei jeweils drei und sechs Stunden, sowie bei der vergleichenden Aufbewahrung von Eis und Kühlakku für sechs Stunden.

Bei den Patienten mit von Willebrand-Syndrom Typ 2 lagen die Ausgangswerte PS zwischen 4,9% und 53%. Es ergaben sich für die Faktor VIII-Aktivität keinerlei signifikante Veränderungen.

Die Patienten der neurochirurgischen Station zeigten erhöhte Faktor VIII-Aktivitäten, die zwischen 120% und 688% lagen. Signifikante Veränderungen in Bezug auf PS waren für alle Lagerungen ermittelbar. Bei dem Vergleich zwischen Citratvollblut und Citratplasma zeigte sich keine signifikante Veränderung. Eine signifikante Abhängigkeit in Bezug auf die Aufbewahrungszeit erkannte man bei dem Vergleich von drei- bzw. sechsständiger Lagerung von Citratvollblut bei -5°C (Kühlakku), sowie von Citratplasma bei Raumtemperatur und in Eis. Signifikante Unterschiede ergaben sich in Abhängigkeit von der Aufbewahrungstemperatur bei dem Vergleich der Lagerung von Citratvollblut bei Raumtemperatur zu Eis und -5°C bei jeweils drei und sechs Stunden, sowie bei der vergleichenden Aufbewahrung von Eis und Kühlakku für drei und sechs Stunden.

An Hand dieser Ergebnisse sieht man, dass die Faktor VIII-Aktivität einen sehr labilen Faktor darstellt, bei dem auf jeden Fall eine Verzögerung der Untersuchung zu unterlassen ist. Obwohl fast alle Aufbewahrungen signifikante Veränderungen zu dem Ausgangswert PS verursachten (ausgenommen VWS, Typ 2), zeigten sich bei gekühlter Lagerung von Citratvollblut die größten Unterschiede. Deshalb sollte auch hier auf keinen Fall eine gekühlte Aufbewahrung der Proben erfolgen.

Durch Einfrieren und Auftauen von plättchenfreien Plasmaproben verlieren Faktor V und Faktor VIII signifikant an Aktivität (Girolami et al, 1994; Trossaert et al, 1995) weshalb auf eine zügige Verarbeitung der Proben zu achten ist.

Auch Heil et al publizierten 1998 ähnliche Ergebnisse. Sie untersuchten die Stabilität des Faktor VIII in Plasma bei der Lagerung bei 6°C . Die Faktor VIII-Aktivität zeigte nach acht Stunden einen Verlust von 18% gegenüber dem Ausgangswert.

5.5. Kollagen-Bindungstest

Die Messung des Kollagen-Bindungstests erfolgte mit einem Elisa-Testverfahren. Die Proben wurden jeweils in Doppelbestimmung untersucht und der Mittelwert berechnet, welcher für die weiteren Aussagen genutzt wurde.

Die gemessenen Ergebnisse besaßen die Einheit "% vom Normwert". Die Normwerte sollten zwischen 60 und 120% liegen. Der Test zeigt sich als sensibel für die Reduktion der großen VWF-Multimere (Favaloro et al, 1995; Israels et al, 2002) und wird als Funktionstest zur Diagnostik des Typ 2 eingesetzt (von Depka Prondzinski, 2002).

Bei der Kontrollgruppe lagen die Ausgangswerte PS im Bereich von 55,2% und 172,9%. Es zeigten sich signifikante Verluste des VWF:CB in Bezug auf PS bei gekühlter Lagerung von Citratvollblut in Eis und zwischen zwei Kühlakkus für jeweils drei und sechs Stunden, sowie für die dreistündige Aufbewahrung von Citratplasma bei Raumtemperatur. Bei den übrigen Lagerungen war keine Signifikanz festzustellen. Vergleich man die Lagerung von Citratplasma und Citratvollblut, so zeigte sich bei gekühlter Aufbewahrung in Eis, sowohl bei drei als auch bei sechs Stunden ein signifikanter Unterschied. Signifikante Unterschiede ergaben sich in Abhängigkeit von der Lagerungszeit für drei- bzw. sechsstündige Lagerung von Citratvollblut in Eis, bei -5°C (Kühlakku), sowie bei der Lagerung von Citratplasma bei Raumtemperatur. Eine signifikante Abhängigkeit in Bezug auf die Aufbewahrungstemperatur ergab sich bei dem Vergleich der Lagerung von Citratvollblut bei Raumtemperatur zu Eis und -5°C bei jeweils drei und sechs Stunden, bei der vergleichenden Aufbewahrung von Eis und Kühlakku für sechs Stunden, sowie bei dem Vergleich der dreistündigen Lagerung von Citratplasma bei Raumtemperatur und in Eis.

Die Ausgangswerte für die Patienten mit von Willebrand-Syndrom Typ 1 lagen zwischen 63,9% und 127,7%. Es zeigten sich signifikante Verluste des VWF:CB in Bezug auf PS bei gekühlter Lagerung von Citratvollblut in Eis und zwischen zwei Kühlakkus für jeweils drei und sechs Stunden. Signifikante Unterschiede zwischen der Aufbewahrung von Citratvollblut und Citratplasma ließen sich bei drei- bzw. sechsstündiger Lagerung in Eis erkennen. Eine signifikante Abhängigkeit in Bezug auf die Aufbewahrungszeit ergab sich bei dem Vergleich von drei- bzw. sechsstündiger Lagerung von Citratvollblut bei -5°C (Kühlakku). Signifikante Unterschiede ergaben sich in Abhängigkeit von der Aufbewahrungstemperatur bei dem Vergleich der Lagerung von Citratvollblut bei Raumtemperatur zu Eis und -5°C bei jeweils drei und sechs Stunden, sowie bei der vergleichenden Aufbewahrung von Eis und Kühlakku für sechs Stunden und für die dreistündige Lagerung von Citratplasma bei Raumtemperatur gegenüber in Eis.

Bei den Patienten mit von Willebrand-Syndrom Typ 2 lagen die Ausgangswerte PS zwischen 0,9% und 99%. Es ergaben sich für den Kollagen-Bindungstest keinerlei signifikante Veränderungen.

Die Patienten der neurochirurgischen Station zeigten VWF:CB-Werte, die zwischen 37,5% und 204,8 % lagen. Signifikante Veränderungen in Bezug auf PS waren für die sechsstündige Lagerung von Citratvollblut bei -5°C (Kühlakku) ermittelbar. Bei dem Vergleich zwischen Citratvollblut und Citratplasma zeigte sich keine signifikante Veränderung. Eine signifikante Abhängigkeit in Bezug auf die Aufbewahrungszeit ergab sich bei dem Vergleich von drei-

bzw. sechsständiger Lagerung von Citratvollblut bei -5°C (Kühlakku). Signifikante Unterschiede zeigten sich in Abhängigkeit von der Aufbewahrungstemperatur bei dem Vergleich der Lagerung von Citratvollblut bei Raumtemperatur zu Eis und -5°C bei jeweils drei und sechs Stunden, sowie bei der vergleichenden Aufbewahrung von Eis und Kühlakku für sechs Stunden.

Man sieht auch hier zumeist einen signifikanten Verlust des Kollagen-Bindungstests bei gekühlter Lagerung von Vollblut.

Farrugia beschrieb 1993 einen Verlust an VWF:CB bei einer zweitägigen Lagerung von Blutkonserven bei 4°C .

Favaloro et al berichteten 1996 über einen leichten Verlust an VWF:CB bei einer Lagerung von Citratplasma oder Citratvollblut bei der siebentägigen Lagerung bei Raumtemperatur.

5.6. Ristocetin-Cofaktor – VWF-Antigen –Quotient

Die Verwendung des Ristocetin-Cofaktor – VWF-Antigen –Quotienten ermöglicht eine bessere Unterscheidung zwischen den einzelnen Typen des von Willebrand-Syndroms. Bei Normalpersonen, Patienten mit VWS, Typ 1 und Typ 2n sind die ermittelten Werte größer als 0,6, bei Patienten mit vWS, Typ 2a und 2b sollten die Werte unter 0,6 liegen.

Bei der Kontrollgruppe lagen die Ausgangswerte PS im Bereich von 0,5 und 1,47. Es zeigten sich signifikante Veränderungen des Ristocetin-Cofaktor – VWF-Antigen –Quotienten in Bezug auf PS bei sechsständiger gekühlter Lagerung von Citratvollblut in Eis und bei -5°C (Kühlakku) sowie bei drei- und sechsständiger Aufbewahrung von Citratplasma in Eis. Bei den übrigen Lagerungen war keine Signifikanz festzustellen. Verglich man die Lagerung von Citratplasma und Citratvollblut, so zeigte sich bei gekühlter Aufbewahrung in Eis, sowohl bei drei als auch bei sechs Stunden ein signifikanter Unterschied. Signifikante Unterschiede ergaben sich in Abhängigkeit von der Lagerungszeit für drei- bzw. sechsständige Lagerung von Citratvollblut in Eis und bei -5°C (Kühlakku). Eine signifikante Abhängigkeit in Bezug auf die Aufbewahrungstemperatur ergab sich bei dem Vergleich der Lagerung von Citratvollblut bei Raumtemperatur zu Eis und -5°C bei jeweils sechs Stunden, sowie bei der vergleichenden Aufbewahrung von Eis und Kühlakku für sechs Stunden. Bei der Untersuchung ließ sich kein signifikanter Unterschied für die Lagerung von Citratplasma zwischen Raumtemperatur und Eis feststellen.

Die Ausgangswerte für die Patienten mit von Willebrand-Syndrom Typ 1 lagen zwischen 0,55 und 1,64. Es zeigten sich signifikante Veränderungen des Ristocetin-Cofaktor – VWF-Antigen –Quotienten in Bezug auf PS bei gekühlter Lagerung von Citratvollblut in Eis für

drei und sechs Stunden, bei dreistündiger Lagerung zwischen zwei Kühlakkus sowie für die dreistündige Lagerung von Citratplasma bei Raumtemperatur. Signifikante Unterschiede zwischen der Aufbewahrung von Citratvollblut und Citratplasma zeigten sich bei allen Aufbewahrungsmodalitäten. Eine signifikante Abhängigkeit in Bezug auf die Aufbewahrungszeit ergab sich bei dem Vergleich von drei- bzw. sechsständiger Lagerung von Citratvollblut in Eis und bei -5°C (Kühlakku). Signifikante Unterschiede ergaben sich in Abhängigkeit von der Aufbewahrungstemperatur bei dem Vergleich der Lagerung von Citratvollblut bei Raumtemperatur zu Eis bei drei und sechs Stunden, bei der sechsständigen vergleichenden Lagerung zwischen Raumtemperatur und -5°C (Kühlakku), sowie bei der vergleichenden Aufbewahrung von Eis und Kühlakku für sechs Stunden und für die sechsständige Lagerung von Citratplasma bei Raumtemperatur gegenüber in Eis.

Bei den Patienten mit von Willebrand-Syndrom, Typ 2a und 2b lagen die Ausgangswerte PS zwischen 0,07 und 0,26, bei vWS, Typ 2n ergaben sich Ausgangswerte PS zwischen 0,72 und 0,9. Es konnten keinerlei signifikante Veränderungen für den Ristocetin-Cofaktor – VWF-Antigen –Quotienten ermittelt werden. Es ist jedoch auffällig, dass die Spanne der ermittelten Werte bei gekühlter Lagerung von Citratvollblut größer ist, als bei den übrigen Aufbewahrungen.

Die Patienten der neurochirurgischen Station zeigten Ausgangswerte zwischen 0,93 und 1,61. Signifikante Veränderungen in Bezug auf PS waren für die drei- bzw. sechsständige Lagerung von Citratvollblut in Eis und bei -5°C , von Citratplasma bei Raumtemperatur und bei dreistündiger Aufbewahrung von Citratplasma in Eis ermittelbar. Bei dem Vergleich zwischen Citratvollblut und Citratplasma zeigte sich bei der sechsständigen Lagerung in Eis eine signifikante Veränderung. Eine signifikante Abhängigkeit in Bezug auf die Aufbewahrungszeit ergab sich nicht. Signifikante Unterschiede ergaben sich in Abhängigkeit von der Aufbewahrungstemperatur bei dem Vergleich der Lagerung von Citratvollblut bei Raumtemperatur zu -5°C bei jeweils drei und sechs Stunden.

Man sieht eine signifikante Veränderung des Ristocetin-Cofaktor – VWF-Antigen –Quotient bei gekühlter Lagerung von Vollblut (außer bei VWS, Typ 2).

5.7. Kollagenbindungstest - VWF-Antigen – Quotient

Die Verwendung des Kollagenbindungstest - VWF-Antigen– Quotienten ermöglicht eine bessere Unterscheidung zwischen den einzelnen Typen des von Willebrand-Syndroms. Bei Normalpersonen, Patienten mit VWS, Typ 1 und Typ 2n sind die ermittelten Werte größer als 0,6, bei Patienten mit VWS, Typ 2a und 2b sollten die Werte unter 0,6 liegen.

Bei der Kontrollgruppe lagen die Ausgangswerte PS im Bereich von 0,47 und 2,17. Es zeigten sich signifikante Veränderungen des Kollagenbindungstest - VWF-Antigen- Quotienten in Bezug auf PS bei sechsstündiger gekühlter Lagerung von Citratvollblut zwischen zwei Kühlakkus. Bei den übrigen Lagerungen war keine Signifikanz festzustellen. Vergleich man die Lagerung von Citratplasma und Citratvollblut, so zeigte sich bei dreistündiger Lagerung bei Raumtemperatur und bei sechsstündiger gekühlter Aufbewahrung in Eis eine signifikante Veränderung. Signifikante Unterschiede ergaben sich in Abhängigkeit von der Lagerungszeit für drei- bzw. sechsstündiger Lagerung von Citratvollblut bei -5°C (Kühlakku) und für drei- bzw. sechsstündige Aufbewahrung von Citratplasma bei Raumtemperatur. Eine signifikante Abhängigkeit in Bezug auf die Aufbewahrungstemperatur ergab sich bei dem Vergleich der sechsstündigen Lagerung von Citratvollblut bei Raumtemperatur zu -5°C und bei der sechsstündigen Aufbewahrung zwischen Eis und -5°C sowie bei der vergleichenden Aufbewahrung von Citratplasma bei Raumtemperatur und in Eis für drei Stunden.

Die Ausgangswerte für die Patienten mit von Willebrand-Syndrom Typ 1 lagen zwischen 0,91 und 2,56. Es zeigten sich signifikante Veränderungen des Kollagenbindungstest - VWF-Antigen- Quotienten in Bezug auf PS bei gekühlter Lagerung von Citratvollblut in Eis für drei und sechs Stunden und zwischen zwei Kühlakkus für sechs Stunden. Signifikante Unterschiede zwischen der Aufbewahrung von Citratvollblut und Citratplasma zeigten sich bei drei- bzw. sechsstündiger Lagerung in Eis. Eine signifikante Abhängigkeit in Bezug auf die Aufbewahrungszeit ergab sich bei dem Vergleich von drei- bzw. sechsstündiger Lagerung von Citratvollblut bei -5°C (Kühlakku). Signifikante Unterschiede ergaben sich in Abhängigkeit von der Aufbewahrungstemperatur bei dem Vergleich der Lagerung von Citratvollblut bei Raumtemperatur zu Eis bei drei und sechs Stunden und zu -5°C für sechs Stunden, sowie bei der vergleichenden Aufbewahrung von Eis und Kühlakku für sechs Stunden und für die sechsstündige Lagerung von Citratplasma bei Raumtemperatur gegenüber in Eis.

Bei den Patienten mit von Willebrand-Syndrom, Typ 2a und 2b lagen die Ausgangswerte PS zwischen 0,05 und 0,2, bei vWS, Typ 2n ergaben sich Ausgangswerte PS zwischen 0,97 und 1,96. Es ergaben sich für den Kollagenbindungstest - VWF-Antigen- Quotienten keinerlei signifikante Veränderungen. Es war jedoch auffällig, dass die Spanne der ermittelten Werte bei gekühlter Lagerung von Citratvollblut größer war, als bei den übrigen Aufbewahrungen.

Die Patienten der neurochirurgischen Station zeigten Werte zwischen 0,31 und 1,64. Signifikante Veränderungen in Bezug auf PS waren für die sechsstündige Lagerung von Citratvollblut bei -5°C ermittelbar. Bei dem Vergleich zwischen Citratvollblut und

Citratplasma zeigten sich keine signifikanten Veränderungen. Eine signifikante Abhängigkeit in Bezug auf die Aufbewahrungszeit ergab sich bei dem Vergleich von drei- bzw. sechsständiger Lagerung von Citratvollblut bei -5°C (Kühlakku). Signifikante Unterschiede ergaben sich in Abhängigkeit von der Aufbewahrungstemperatur bei dem Vergleich der sechsständigen Lagerung von Citratvollblut bei Raumtemperatur zu -5°C .

Man sieht eine signifikante Veränderung des Kollagenbindungstest - VWF-Antigen-Quotienten bei gekühlter Lagerung von Vollblut (außer bei vWS, Typ 2).

Favaloro et al publizierten 2001 ähnliche Ergebnisse. Drei Probanden mit bekanntem VWS, Typ 1 wurden getestet. Der Kollagenbindungstest - VWF-Antigen-Quotienten veränderte sich bei der Lagerung von Citratplasma bei 37°C und von Citratvollblut bei 4°C so, dass anstatt eines VWS, Typ 1 ein VWS, Typ 2 diagnostiziert wurde. Bei zwei von neun gesunden Probanden zeigten sich ebenfalls signifikant angestiegene Kollagenbindungstest - VWF-Antigen-Quotienten bei der Lagerung von Citratvollblut bei 4°C über vier Stunden.

5.8. Pearson-Korrelation aller Probanden

5.8.1. Pearson-Korrelation zwischen Ausgangswert und relativem Verlust bei sechsständiger Lagerung von Citratvollblut bei -5°C (Kühlakku)

Bei diesem Test wurden alle Probanden mit einbezogen. Der relative Verlust der Faktoren bei sechsständiger Lagerung zwischen zwei Kühlakkus (CK6) wurde im Vergleich zum Ausgangswert PS herangezogen. Es sollte damit überprüft werden, ob die Höhe der Ausgangswerte PS mit dem Verlust bei Lagerung korrelierten. Signifikante Korrelationen zwischen dem Ausgangswert PS und dem Verlust bei sechsständiger Lagerung von Kühlakkus zeigte sich nur bei dem Ristocetin-Cofaktor ($r = 0,37$, $p = 0,0411$) und bei dem VWF-Antigen ($r = 0,38$, $p = 0,0236$). Bei den übrigen durchgeführten Tests ergaben sich keine signifikanten Korrelationen zwischen dem Ausgangswert PS und der Veränderung bei Lagerung.

5.8.2. Pearson-Korrelation zwischen den Veränderungen verschiedener VWF-Parameter bei sechsständiger Lagerung bei -5°C (Kühlakku)

Bei diesem Test wurden alle Probanden mit einbezogen. Der relative Verlust der Faktoren bei sechsständiger Lagerung zwischen zwei Kühlakkus (CK6) wurde im Vergleich zum Ausgangswert PS herangezogen. Verglichen wurden dann jeweils der relative Verlust zwischen: Ristocetin-Cofaktor, VWF-Antigen, Faktor VIII-Aktivität und Kollagen-Bindungstest untereinander. Der größte Zusammenhang des Faktorverlustes bei Kälte zeigte

sich für Ristocetin-Cofaktor und VWF-Antigen ($r = 0,75$, $p = 0,000001$). Das heißt also, geht viel Ristocetin-Cofaktor durch die sechsstündige Lagerung bei -5°C verloren, liegen auch die Werte für VWF-Antigen deutlich niedriger, als ohne Lagerung. Weitere hochsignifikante Korrelationen ($p < 0,001$) ergaben sich für den Vergleich VWF-Antigen und Faktor VIII-Aktivität ($r = 0,60$) sowie für VWF-Antigen und Kollagen-Bindungstest ($r = 0,67$). Auch die anderen Kombinationen zeigten signifikante Korrelationen ($0,001 < p < 0,05$).

Wie man an Hand der Ergebnisse sehen kann, verursacht die gekühlte Lagerung von Citratvollblut teilweise dramatische Veränderungen der Ausgangswerte PS. Gerade der Verlust von Ristocetin-Cofaktor durch gekühlte Lagerung hat weitere Auswirkungen auf andere Gerinnungsanalysen. So ist eine Aufgabe des VWF der Schutz des Faktor VIII vor einem vorzeitigen Abbau. Die Halbwertszeit des Faktor VIII verändert sich von 12 Stunden (bei Vorhanden sein von VWF) auf eine Stunde (ohne VWF) (Lutze et al, 1999). Der Faktor VIII wird auch als der labilste Faktor beschrieben. Er verliert bei Temperaturen über 37°C und auch bei gekühlter Lagerung rasch an Aktivität (Barthels et al, 2002).

Zusammenfassend fanden wir keine Kälte-induzierte Erniedrigung der VWF-Parameter im Plasma und bei Patienten mit VWS, Typ 2 ohne messbare Ristocetin-Cofaktor-Aktivität. Auf Grund dieser Ergebnisse nehmen wir an, dass der Kälte-induzierte Verlust der VWF-Parameter und der Faktor VIII-Aktivität zum einen die Gegenwart von Thrombozyten und zum anderen die Anwesenheit hochmolekularer VWF-Multimere benötigt.

Bereits vor 50 Jahren (1954) publizierten Zucker und Borelli, dass sich Thrombozyten bei Temperaturen unter 15°C einem Gestaltswechsel unterziehen. Auch bei höheren Temperaturen werden mehrere morphologische Veränderungen festgestellt (Maurer-Spurej et al, 2001).

Kälte induziert *in vitro* einen Gestaltswandel der Thrombozyten von der diskoiden in die sphärische Form (Hoffmeister et al, 2003) über eine Veränderung des Aktingerüsts (Hartwig, 1992). Die sphärische Form zeigt unter dem Elektronenmikroskop viele lamellenförmige Vorwölbungen und Ausstülpungen, sogenannten Lamellopodien, die eine Vervielfachung der gesamten Oberfläche bewirken. Dieser Gestaltswechsel ist dem der durch Thrombin aktivierten Thrombozyten sehr ähnlich, sollte jedoch nicht mit ihm gleichgesetzt werden. Gekühlte Thrombozyten zeigen beispielsweise keine gesteigerte P-Selektin-Expression auf der Zelloberfläche (Berger et al, 1998).

Eine Temperatur von 4°C bewahrt nach Aussagen von Wallace et al, 1980 und Winokur et al, 1995 vor einer Aktivierung der Thrombozyten durch Thrombin oder durch Oberflächen wie

Glas. Es wird dabei das Ausschütten von Plättcheninhaltsstoffen unterbunden (van den Besselaar et al, 1987). Um eine Aktivierung von Thrombozyten zu verhindern, sollen Blutproben bei Temperaturen von 4°C zentrifugiert werden. Durch Wiedererwärmen auf 37°C kommt es zu einer raschen, vollständigen Thrombozytenaktivierung (Wallace et al, 1980). Elektronenmikroskopisch unterscheiden sich vollständig aktivierte Thrombozyten nicht von reversibel veränderten Thrombozyten in Temperaturen unter 15°C. Allerdings führt die vollständige Thrombozytenaktivierung zur Bildung von Mikropartikeln, kleine, von der Oberfläche der Thrombozyten abgeschnürte Zytoplasmavesikel mit einem Durchmesser von 0,1 µm (Dahlbäck et al, 1992). Bei der Zentrifugation lassen sich diese Mikropartikel im Überstand der Plasmaproben nachweisen. Diese Mikropartikel haben in Bezug auf die prokoagulatorische und antikoagulatorische Wirkung den gleichen Effekt wie Thrombozyten selbst (Tans et al, 1991).

In vivo induziert Kälte-Stress eine Thrombozytopenie (Deveci et al, 2001; Hata et al, 1992), eine Verminderung von Antithrombin III, Fibrinogen, APTT und PT (Khatun et al, 1999).

Gekühlte Thrombozyten werden nach Transfusionen schnell abgebaut (Becker et al, 1973; Berger et al, 1998). Die Lagerung bei Raumtemperatur limitiert sich jedoch auf Grund der kurzen Halbwertszeit von fünf Tagen und dem erhöhten Risiko bakterieller Infektionen (Engelfriet et al, 2000). Bei Temperaturen unter 37°C zeigen sich die Thrombozyten empfänglicher für eine Aktivierung über thrombotische Stimuli (Faraday et al, 1998; Hoffmeister et al, 2001).

Hofmeister et al fanden 2003, dass Kälte eine Agglomeration von GPIIb/IIIa-Rezeptoren auf der Zelloberfläche induziert.

Angesichts dieser Ergebnisse vermuten wir für den beschriebenen Kälteeffekt folgenden Mechanismus: Kälte führt zu einer Agglomeration von GPIIb/IIIa-Rezeptoren auf der Thrombozyten-Zelloberfläche im Vollblut. Dies könnte zu einer spontanen Bindung hochmolekularer VWF-Multimere an die Thrombozyten führen. Bei der Herstellung von thrombozytenarmen Plasma durch hochtourige Zentrifugation präzipitiert der gebundene VWF mit den Thrombozyten, was den Verlust des VWF-Antigen, Ristocetin-Cofaktors und der Faktor VIII-Aktivität in der Plasmaprobe erklären könnte.

Diese Hypothese wird durch eine Arbeit von Farrugia et al aus dem Jahre 1993 bestätigt. Die Autoren fanden eine Erniedrigung der Ristocetin-Aktivität nach der Lagerung von Vollblut bei 4°C. Diese Erniedrigung der Ristocetin-Aktivität kann verhindert werden, wenn Blut vor der Lagerung bei 4°C durch einen Leukozytenfilter (welcher auch die Thrombozyten entfernte) filtriert wird.

Palmer et al veröffentlichten bereits 1982 eine durch Lagerung von Vollblut bei 4°C induzierte Verminderung der Prothrombinzeit (PT), welche direkt mit einem Verlust des Faktor VII korreliert. Die PT verändert sich nicht bei Kälte, wenn nur eine unzureichende Menge an Faktor XII (Gordon et al, 1987), Fletcher-Faktor oder hochmolekularem Kininogen (Palmer et al, 1984) vorhanden ist.

Kälte induziert in Plasma und in Vollblut eine Aktivierung von FVII und eine damit einhergehende Verkürzung der PT (Palmer et al, 1984).

Favaloro et al. (2001) dokumentierten einen Kälte-induzierten Verlust der hochmolekularen VWF-Multimere bei Lagerung von Vollblut bei 4°C.

Mitropoulos et al berichteten 1995 von einem Verlust an Faktor VIIa und Faktor XIIa bei der Lagerung von Citratplasma hochschwangerer Patientinnen in Eis für 24 Stunden.

Thomas empfahl 2000, dass plättchenarmes Citratplasma für die Globaltests in der Gerinnungsdiagnostik innerhalb von acht Stunden bei Raumtemperatur verarbeitet werden sollen. Die Aktivität von Einzelfaktoren soll innerhalb von drei Stunden bestimmt werden, das Plasma muss bis dahin bei 4°C gelagert werden.

5.9. Empfehlungen für die Behandlung von Blutproben für die Gerinnungsdiagnostik:

Die Blutentnahme soll wegen der möglichen tageszeitlichen Schwankungen zwischen 7.00 Uhr und 9.00 Uhr erfolgen. Eine lange und intensive Venenstauung ist zu vermeiden. Die Blutabnahme soll mit einer großlumigen Kanüle, unter einem gleichmäßigen und zügigem Bluteinstrom, erfolgen. Bei der Abnahme mehrerer Blutentnahmeröhrchen soll die Gerinnungsdiagnostik erst als zweites oder drittes Röhrchen entnommen werden, um eine Kontamination mit Gewebsthrombokinase zu vermeiden. Das Gerinnungsröhrchen soll bis zur Markierung gefüllt sein und anschließend mehrfach geschwenkt werden, um eine gleichmäßige Durchmischung von Antikoagulans und Blut zu gewährleisten (Fiedler et al, 2004).

Für eine unmittelbare Untersuchung soll die Lagerung bei Zimmertemperatur erfolgen, Aufbewahrung im Kühlschrank sollten durch Kälteaktivierung unbedingt vermieden werden, da dies zu Gerinnungszeitveränderungen führen kann. Dies steht im Gegensatz zu den NCCLS-Richtlinien von 1998 (Wayne, 1998), die vorgeben, dass für Gerinnungsanalysen verwendete Proben gekühlt gelagert werden sollen, wenn sie nicht innerhalb von zwei Stunden getestet werden.

Bei einer für einen späteren Zeitpunkt geplanten Untersuchungen soll Citratplasma portioniert eingefroren werden. Das Auftauen der gefrorenen Proben soll im Wasserbad bei 37°C

erfolgen, wobei auf gründliche Durchmischung und vollständige Lösung eventueller Kryopräzipitate zu achten ist. Die anschließende Untersuchung muß unverzüglich erfolgen, da die Stabilität verschiedener Faktoren nach dem Auftauen herabgesetzt ist (Lutze et al, 1999). Wiederholtes Einfrieren und Auftauen ist nicht zulässig.

Die Durchführung der Globaltests soll maximal vier Stunden nach der Blutentnahme durchgeführt werden (Guder et al, 2000; Guder et al, 2002; Narayanan, 2000; Tilsner et al, 1986). Die Bestimmung der Faktor VIII-Aktivität soll jedoch bis spätestens zwei Stunden nach der Blutentnahme abgeschlossen sein (Lutze et al, 1999; Müller, 1993).

6. Zusammenfassung

Die vorliegende Studie wurde durchgeführt, um den Einfluss der präanalytischen Temperatur- und Lagerungsbedingungen für die Bestimmung der VWF-Parameter eingehender zu untersuchen. Wir untersuchten bei 10 gesunden Personen, 10 Patienten mit von Willebrand-Syndrom Typ 1, 5 Patienten mit VWS Typ 2 und 10 Patienten der neurochirurgischen Klinik den Einfluss verschiedener Lagerungsbedingungen auf VWF:RCo, VWF:Ag, VWF:CB, APTT und FVIII:C.

Pro Patient entstanden so folgende Proben:

- PS Das Blut (ein Röhrchen) wurde sofort zentrifugiert und der Überstand anschließend bei -80°C eingefroren.
- CR3/CR6 Das Citratblut (zwei Röhrchen) wurde für drei bzw. sechs Stunden bei Raumtemperatur gelagert, daraufhin zentrifugiert und eingefroren..
- CE3/CE6 Das Citratblut (zwei Röhrchen) wurde für drei bzw. sechs Stunden in Eis gelagert, dann zentrifugiert und eingefroren.
- CK3/CK6 Das Citratblut (zwei Röhrchen) wurde für drei bzw. sechs Stunden zwischen zwei Kühlakkus gelagert, anschließend zentrifugiert und eingefroren.
- PR3/PR6 Der Plasmaüberstand aus einem Citratröhrchen wurde nach der Zentrifugation abpipettiert, auf zwei Reagenzgläser verteilt und für drei bzw. sechs Stunden bei Raumtemperatur gelagert und danach eingefroren.
- PE3/PE6 Der Plasmaüberstand aus einem Citratröhrchen wurde nach dem Zentrifugieren abpipettiert, auf zwei Reagenzgläser verteilt und für drei bzw. sechs Stunden in Eis gelagert und nachfolgend eingefroren.

Wie man an Hand der Ergebnisse sehen kann, verursachte die gekühlte Lagerung von Citratvollblut teilweise dramatische Veränderungen der Ausgangswerte PS. Zusammenfassend fanden wir keine Kälte-induzierte Erniedrigung der VWF-Parameter im Plasma und bei Patienten mit VWS, Typ 2 ohne messbare Ristocetin-Cofaktor-Aktivität. Auf Grund dieser Ergebnisse nahmen wir an, dass der Kälte-induzierte Verlust der VWF-Parameter und der Faktor VIII-Aktivität zum einen die Gegenwart von Thrombozyten und zum anderen die Anwesenheit hochmolekularer vWF-Multimere benötigte.

Wir vermuteten, dass es nur bei Anwesenheit von Thrombozyten und HMW-VWF zu einem hochgradig kälteinduzierten Verlust von VWF:RCo, VWF:Ag und FVIII:C kommt. Von Berger et al (1998) wurde bereits publiziert, dass sich die Thrombozyten bei Kälteeinwirkung in ihrer Zytoskelettstruktur verändern. Hoffmeister et al. (2003) konnten eine kälteinduzierte Zusammenlagerung der GPIb-Rezeptoren an der Thrombozyten-Zelloberfläche beobachten.

Wir nahmen an, dass der kälteinduzierte Verlust des VWF auf eine durch Kälte geförderte Bindung des VWF an Thrombozyten, wahrscheinlich durch die gesteigerte Zugänglichkeit der GPIIb/IIIa Untereinheit des vWF, zurückzuführen ist.

Auf Grund unserer Ergebnisse empfehlen wir Blut zur Analyse der vWF-Parameter bei Raumtemperatur und nicht bei 4°C zu lagern, ebenso Blutproben zur Bestimmung nicht auf Eis zu verschicken.

Empfehlungen für die Behandlung von Blutproben für die Gerinnungsdiagnostik:

Die Blutentnahme soll wegen der möglichen tageszeitlichen Schwankungen zwischen 7.00 Uhr und 9.00 Uhr erfolgen. Eine lange und intensive Venenstauung ist zu vermeiden. Die Blutabnahme sollte mit einer großlumigen Kanüle, unter einem gleichmäßigen und zügigem Bluteinstrom, erfolgen. Bei der Abnahme mehrerer Blutentnahmeröhrchen sollte die Gerinnungsdiagnostik erst als zweites oder drittes Röhrchen entnommen werden, um eine Kontamination mit Gewebsthrombokinase zu vermeiden. Das Gerinnungsröhrchen sollte bis zu Markierung gefüllt sein und anschließend mehrfach geschwenkt werden, um eine gleichmäßige Durchmischung von Antikoagulans und Blut zu gewährleisten (Fiedler et al, 2004).

Für eine unmittelbare Untersuchung sollte die Lagerung bei Zimmertemperatur erfolgen, Aufbewahrung im Kühlschrank sollten durch Kälteaktivierung unbedingt vermieden werden, da dies zu Gerinnungszeitveränderungen führen kann. Dies steht im Gegensatz zu den NCCLS-Richtlinien von 1998 (Wayne, 1998), die vorgaben, dass für Gerinnungsanalysen verwendete Proben gekühlt gelagert werden sollten, wenn sie nicht innerhalb von zwei Stunden getestet werden können.

Bei einer für einen späteren Zeitpunkt geplanten Untersuchungen sollte Citratplasma portioniert eingefroren werden. Das Auftauen der gefrorenen Proben sollte im Wasserbad bei 37°C erfolgen, wobei auf gründliche Durchmischung und vollständige Lösung eventueller Kryopräzipitate zu achten ist. Die anschließende Untersuchung muß unverzüglich erfolgen, da die Stabilität verschiedener Faktoren nach dem Auftauen herabgesetzt ist (Lutze et al, 1999). Wiederholtes Einfrieren und Auftauen ist nicht zulässig.

Die Durchführung der Globaltests sollte maximal vier Stunden nach der Blutentnahme durchgeführt worden sein (Guder et al, 2000; Guder et al, 2002; Narayanan, 2000; Tilsner et al, 1986). Die Bestimmung der Faktor VIII-Aktivität sollte jedoch bis spätestens zwei Stunden nach der Blutentnahme abgeschlossen sein (Lutze et al, 1999; Müller, 1993).

7. Literaturverzeichnis

Adcock D, Kressin D, Marlar RA:

The effect of time and temperature variables on routine coagulation tests,
Blood Coagulation and Fibrinolysis, 1998, 9: 463-470

Barthels M, von Depka M:

Das Gerinnungskompodium – Schnellorientierung, Befundinterpretation und klinische
Konsequenz,
Thieme-Verlag 2002: 82-87, 139, 175-178, 214-216, 428-443, 487-509, 604-609

Becker G, Tuccelli M, Kunicki T, Chalos M, Aster R:

Studies of platelet concentrates stored at 22°C and 4°C,
Transfusion, 1973, 13: 61-68

Berger G, Hartwell DW, Wagner DD:

P-Selectin and platelet clearance,
Blood, 1998, 92: 4446-4452

Berkowitz SD, Ruggeri ZM:

Das von Willebrand-Syndrom: Möglichkeiten der Therapie,
Die gelben Hefte 4/95, Dezember 1995: 146-155

Berliner S, Nijja K, Roberts JR, Houghten RA, Ruggeri ZM:

Generation and characterization of peptide-specific antibodies that inhibit von Willebrand
factor binding to glycoprotein Iib-IIIa without interaction with other adhesive molecules
J Biol Chem, 1988, 263: 7500-7505

Beutel G, Ganser A:

Kursbuch Hämatologie,
Blackwell Wissenschaftsverlag Berlin, 2000: 110-112

BIAS, Version: 7.07, 2003

Bombeli T:

Management von Thrombosen und Blutungen – Ein klinisches Vademecum,
Verlag Hans Huber, 2002: 130-133, 164, 236

Bonini P, Plabani M, Ceriotti F, Rubboli F:

Errors in laboratory medicine,
Clinical Chemistry, 2002, 48: 691-698

Brown JE, Bosak JO:

An ELISA test for the binding of von Willebrand factor antigen to collagen
Thromb Res, 1986, 43: 303-311

Budde U, Schäfer G, Müller N et al:

Acquired von Willebrand's disease in the myeloproliferative syndrome,
Blood, 1984, 64: 981-985

Budde U, Pötzsch B:

von-Willebrand-Faktor und Von-Willebrand-Erkrankung in:
Müller-Berghaus G, Pötzsch B: Hämostasiologie – Molekulare und zelluläre Mechanismen,
Pathophysiologie und Klinik, Springer-Verlag, 1999: 228-237

CIBA-GEIGY AG: Wissenschaftliche Tabellen Geigy,

8. Auflage, Basel, 1985

Dahlbäck B, Wiedmer T, Sims PJ:

Binding of anticoagulant Vitamin K-dependent Protein S to Platelet-derived Microparticles,
Biochemistry, 1992, 31: 12769-12777

Dalton RG, Dewar MS, Savidge GF et al:

Hypothyroidism as a cause of acquired von willebrand's disease,
Lancet, 1987, 1: 1007-1009

Deveci D, Stone PC, Egginton S:

Differential effect of cold acclimation on blood composition in rats and hamsters,
Journal of Comparative Physiology, 2001, 171: 135-143

Eikenboom JCJ, Reitsma PH, Peerlinck KMJ, Briët E:

Recessive inheritance of von Willebrand's disease type 1, *Lancet*, 1993, 341: 982-986

Engelfriet C, Reesink H, Blajchman M: Bacterial contamination of blood components,
Vox Sang, 2000, 78:59-67

Faraday N, Rosenfeld B:

In vitro hypothermia enhances platelet GPIIb-IIIa activation and P-selectin expression,
Anesthesiology, 1998, 88: 1579-1585

Farrugia A, Street A, Douglas S, Raines G, Aumann H, Whyte G, Sykes S, Oates A:
Stabilization of von Willebrand Factor in banked blood by leucocyte depletion,
Transfusion Medicine, 1993, 3: 51-57

Favaloro EJ, Facey D, Grispo L:

Laboratory assessment of von Willebrand factor. Use of different assays can influence the diagnosis of von Willebrand's disease, depend on differing sensitivity to sample preparation and differential recognition of high molecular weight VWF forms,
American Journal of Clinical Pathology, 1995, 104: 264-271

Favaloro EJ, Mehrabani PA:

Laboratory assessment of von willebrand factor: differential influence of prolonged ambient temperature specimen storage on assay results,
Haemophilia, 1996, 2: 218-223

Favaloro EJ:

Laboratory assessment as a critical component of the appropriate diagnosis and sub-classification of von Willebrand's disease,

Blood Reviews, 1999, 13: 185-204

Favaloro EJ:

Appropriate laboratory assesment as a critical facet in the proper diagnosis and sub-classification of von Willebrand's disorder,

Bailliers Clinical Haematology, 2001, 14: 299-319

Favaloro EJ, Nair SC, Forsyth CJ:

Collection and transport of samples for laboratory testing in von Willebrands disease (VWD): time for a reappraisal?,

Thrombosis and Haemostasis 2001; 86: 1589-1590

Federici AB, Bader R, Pagani S et al:

Binding of von Willebrand factor to glycoproteins Ib and Iib/IIIa complex: affinity is related to multimeric size

British journal of Haematology, 1989, 73: 93-99

Fiedler GM, Thiery J:

Der „fehlerhafte“ Laborbefund, Teil 1,

Der Internist, 2004, Band 45: 315-332

Fiedler GM, Thiery J:

Der „fehlerhafte“ Laborbefund, Teil 2,

Der Internist, 2004, Band 46: 448-449

Fischer BE, Kramer G, Mitterer A, et al:

Effect of multimerization of human and recombinant von Willebrand factor on plattelet aggregation, binding to collagen and binding of coagulation factor VIII

Thromb Res, 1996, 84: 55-66

Foutch PG:

Angiodysplasia of the gastrointestinal tract,

American Journal of Gastroenterology 88: 907-818 1993

Gill JC, Wilson AD, Endres-Brooks J, Montgomery RR:

Loss of the largest von Willebrand factor multimers from plasma of patients with congenital cardiac defects,

Blood, 1986, 67:758-761

Gill JC, Endres-Brooks J, Bauer PJ, Marks WJ, Montgomery RR:

The effect of ABO blood group on the diagnosis of von Willebrand disease

Blood, 1987, 69:1691-1695

Girolami A, Simioni P, Scarano L:

Evaluation of activated protein C resistance in stored plasma,

Lancet, 1994, 343: 1288-1289

Gordon EM, Hellerstein HK, Ratnoff OD, Arafah BM, Yamashita TS:

Augmented Hageman factor and prolactin titers, enhanced coactivation of factor VII, and spontaneous shortening of prothrombin time in survivors of myocardial infarction,

Journal of Laboratory Clinical Medicine, 1987, 109: 409-413

Greiling X, Gessner X:

Molekularbiologische Diagnostik in:

Greiling X, Gessner X, Lehrbuch der klinischen Chemie und Pathobiochemie,

Schattauer Verlag, Stuttgart, 1995: 190-195

Guder W, Narayanan S, Wisser H, Zawata B:

Proben zwischen Patient und Labor. Der Einfluss präanalytischer Faktoren auf die Qualität von Laboratoriumsbefunden,

GIT-Verlag, Darmstadt, 2000

Guder W, Egret W, da Fonseca-Wollheim F:

Die Qualität diagnostischer Proben,

Journal of Laboratory Clinical Medicine, 2002, 26: 267-283

Harms V:

Biomathematik, Statistik und Dokumentation,

Harms Verlag, Kiel, 1997

Hartwig JH:

Mechanisms of actin rearrangements mediating platelet activation,

Journal of Cell Biology, 1992, 118: 1421-1442

Hata T, Kawabata A, Itoh E:

Platelet hypoaggregability in rats exposed to SART stress (repeated cold stress),

Thromb Res, 1992, 65: 617-629

Heil W, Grunewald R, Amend M, Heins M:

Influence of time and temperature on coagulation analytes in stored plasma,

Clin Chem Lab Med, 1998, 36: 459-462

Heimpel H, Hoelzer D, Lohrmann HP, Kleihauer E:

Hämatologie in der Praxis,

Gustav-Fischer-Verlag Jena, 1996: 308-312

Hiller E, Riess H, Auberger K:

Hämorrhagische Diathese und Thrombose,

Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, 1998: 63-68

Hillery CA, Mancuso DJ, Sadler EJ et al:

Type 2M von Willebrand disease: F606I and I662F mutations in the glycoprotein Ib binding domain selectively impair ristocetin- but not botrocetin-mediated binding of von willebrand factor to platelets,

Blood, 1998, 91: 1572-1581

Hoffmeister K, Falet H, Toker A, Barkalow K, Stossel T, Hartwig J:

Mechanism of cold-induced platelet actin assembly,

The Journal of Biological Chemistry, 2001, 276: 24751-24759

Hoffmeister KM, Felbinger TW, Falet H, Denis CV, Bergmeier W, Mayadas TN, von Adrian KH, Wagner DD, Stossel TP, Hartwig JH:

The Clearance Mechanism of Chilled Blood,
Cell 2003; 112: 87-97

Israels LG, Israels ED:

Mechanisms of Hematology,
Core Health Service Inc., 2002: 341-348

Jaffe EA, Hoyer LW, Nachman RL:

Synthesis of von Willebrand factor by cultured human endothelial cells,
Proc natl acad Sci USA, 1974, 71: 1906-1909

Jakway JL:

Acquired von Willebrand's disease in malignancy,
Seminars in Thrombosis and Hemostasis, 1992, 18: 434-439

Khatun S, Kanayama N, Belayet HM, Tokunaga N, sumimoto K, Kobayashi T, Terao T:
Induction of hypercoagulability condition by chronic localized cold stress in rabbits,
Thrombosis and Haemostasis, 1999, 81: 449-455

Keller F, Bruhn HD, Dahlbäck B, Dati F, Deutsch E, Ehrenthal W, Fickenscher K, Flohr G, Greger H, Hafner G, Hofmann M, Kemkes-Matthes B, Köhler M, Kraus M, Mingers A-M, Müller-Berghaus G, Nawroth PP, Noah M, Noll T, Pindur G, Potzsch B, Prellwitz W, Riess H, Rosen S, Schwender S, Stolz H, Wankmüller H, Weinstock N, Witt I, Ziegler R, Zurborn KH:
Neue Aspekte der Hämostasiologie,
die medizinische Verlagsgesellschaft Marburg, 1995: 14-23

Koepke JA, Rodgers JL, Ollivier MJ:

Pre-instrumental variables in coagulation testing,
American Journal of Clinical Pathology, 1975, 64: 591-596

Lutze G, Breyer J, Zawka B:

Wissenswertes zur Gerinnung,

2.Auflage, Roche Diagnostics GmbH, 1999: 46-47, 178-191

Maurer-Spurej E, Pfeiler G, Maurer N, Lindner H, Glatter O, Devine D:

Room temperature activates human blood platelets,

Laboratory Investigation, 2001, 81: 581-592

Mazurier C, Meyer D:

Molecular basis of von Willebrand disease,

Baillier's clinical Haematology, 1996, Volume 9/Number 2: 229-239

Mitropoulos KA, Martin JC, Stirling Y, Morrissey JH, Cooper JA:

Activation of factors XII and VII in citrated plasma in the presence of contact surface,

Thromb res, 1995, 78: 67-75

Mörsdorf S, Jung F, Mrowietz C, Koscielny J, Seyfert UT, Wenzel E:

Hämorrheologische Veränderungen bei hereditärer und erworbener Angiodysplasie in:

Anders O, Jacob J, Hämostase und Entzündung,

7. Rostocker Symposium über klinische Probleme in der Hämostasiologie, 1997: 118-123

Müller G:

Klinisch-chemische Diagnostik,

Gustav-Fischer-Verlag, 1993: 242-248 und 260-278

Nachman R, Levine R, Jaffe EA:

Synthesis of factor VIII antigen by cultured guinea pig megakaryocytes,

Journal of Clinical Investigation, 1977, 60: 914-921

Narayanan S:

The preanalytic phase. An important component of laboratory medicine,

American journal of clinical pathology, 2000, 113: 429-452

Narayanan S, Guder W:

Präanalytische Variable und ihr Einfluss auf die Qualität von Laboratoriumsbefunden,
Journal of Laboratory Clinical Medicine, 2002, 26: 263-266

Neofotistos D, Oropeza M, Ts'ao CH:

Stability of plasma for add-on PT and APTT tests,
American Journal of Clinical Pathology, 1998, 109: 758-763

Nichols WC, Ginsburg D:

Von Willebrand disease,
Medicine, 1997, 76: 1-20

O'Brien JR:

Angiodysplasia, haemostasis and capillaries. A hypothesis.
Thromb Res, 1996, 84: 365-387

Ostendorf PC, Adam W, Anger B, Arndt R, Aumiller J, Beeser H, Begent NA, Born GVR, Büchner T, Burmester GR, Cichutek K, Clemens MR, Cusack NJ, Deicher H, Diehl V, Dörmer P, Ehninger G, Fauser AA, Freund M, Friedrich W, Gratwohl A, Günzl C, Harker LA, Hehlmann R, Hiller E, Hoelzer D, Hossfeld DK, Josten KM, Kaltwasser JP, Keeser D, Kurth R, Löffler H, Lohrmann HP, Missmahl HP, Müller CA, Müller-Schulz M, Nawroth PP, Niethammer D, Nissen C, Ostendorf PC, Pfreundschuh M, Platzer E, Poschmann A, Queißer W, Riess H, Saal JG, Scharf RE, Scharrer I, Speck B, Steinke B, Tichelli A, Weh HJ:
Hämatologie,
Urban und Schwarzenberg, 1991: 524-539

Palmer RN, Gralnick HR:

Cold-induced contact surface activation of the prothrombin time in whole blood,
Blood, 1982, 59: 38-42

Palmer RN, Gralnick HR:

Inhibition of the cold Activation of Factor VII and the prothrombin time,

American Journal of Clinical Pathology, 1984, 81:618-622

Pareti FI, Lattuada A, Bressi C, et al:

Proteolysis of von Willebrand factor and shear stress-induced platelet aggregation in patients with aortic valve stenosis,

Circulation, 2000, 102: 1290-1295

Rao LV, Okorodudu AO, Petersen JR, Elghetany MT:

Stability of prothrombin time and activated partial thromboplastin time test under different storage conditions,

Clin Chem Acta, 2000, 300: 3-21

Richtlinien der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung in medizinischen Laboratorien (RILIBÄK), 1988

Ruggeri ZM:

Structure and Function of von Willebrand Factor,

Thrombosis and Haemostasis, 1999, 82: 576-584

Ruggeri ZM, Dent JA, Saldivar E:

Contribution of distinct adhesive interactions to platelet aggregation in flowing blood,

Blood, 1999, 94: 172-178

Sachs L:

Angewandte Statistik,

Springer Verlag, 1997

Sadler JE:

A revised classification of von Willebrand disease,

Thrombosis and Haemostasis 1994, 71: 520-525

Sadler JE:

Biochemistry and genetics of von Willebrand factor,

Annu Rev Biochem, 1998, 67: 395-424

Sadler JE, Mannucci PM, Berntorp E et al:

Impact, diagnosis and treatment of von Willebrand disease

Trombosis and Haemostasis, 2000, 84: 160-174

Santoro SA:

Preferential binding of high molecular weight forms of von Willebrand factor to fibrillar collagen

Biochim Biophys Acta, 1983, 756:123-126

Sarode R, Goldstein J, Sussman II, Nagel RL, Tsai HM:

Role of A and B blood group antigens in the expression of adhesive activity of von Willebrand factor,

British Journal of Haematology, 2000, 109: 857-864

Scharrer I:

Diagnostik des v. Willebrand-Syndroms in:

Herrmann FH, Molekulargenetik hereditärer Hämostasedefekte, Lengerich, 1997: 77-81

Schlokot U, Fischer B, Mitterer A, Falkner FG, Reiter M, Grillberger L, Mundt W, Preininger A, Mohr G, Siekmann J, Turecek P, Schwarz HP, Dorner F:

Herstellung und Charakterisierung von rekombinantem von Willebrand-Faktor zur therapeutischen Anwendung in:

Scharrer I, Schramm W: 26. Hämophilie-Symposium, Hamburg 1995: 147-158

Schneppenheim R:

Molekulargenetische Diagnostik beim von Willebrand-Syndrom in:

Herrmann FH, Molekulargenetik hereditärer Hämostasedefekte, Lengerich, 1997: 82-89

Stephan B, Gross J, Mörsdorf S, Mrowietz C, Koscielny J, Jung F, Wenzel E: Mikroangiopathie und von Willebrand-Jürgens-Syndrom: zur Aussagekraft kapillarmikroskopischer Befunde in:

Scharrer I, Schramm W: 28. Hämophilie-Symposium, Hamburg 1997: 237-240

Tans G, Rosing J, Thomassen MCLGD, Heeb MJ, Zwaal RFA, Griffin JH:
Comparison of anticoagulant and procoagulant Activities of stimulated Platelets and Platelet-derived Microparticles,
Blood, 1991, 77: 2641-2648

Thomas L:
Labor und Diagnose Vol.4,
medizinische Verlagsgesellschaft Marburg, 1995: 608-609

Thomas L:
Labor und Diagnose – Indikation und Bewertung von Laborbefunden für die medizinische Diagnostik,
5.Auflage, Dade Behring, 2000: 1494-1495

Tilsner V, Heimburger N, Becker U, Göpfert H, Kolde HJ:
Gerinnungsdiagnostik für Diagnose und Therapie,
Behring Diagnostika, 1986: 111-112

Trossaert M, Conrad J, Horellou MH, Samama MM:
Influence of Storage Conditions on activated Protein C Resistance Assay,
Thrombosis and Haemostasis, 1995, 73:163-164

Van den Besselaar AMHP, Meeuwisse-Braun J, Jansen-Grüter R, Bertina RM:
Monitoring Heparin Therapy by the activated partial Thromboplastin Time – the Effect of the pre-analytical Conditions,
Thrombosis and Haemostasis, 1987, 57: 226-231

Von Depka Prondzinski M:
Blutgerinnung, aktuelle Aspekte der Physiologie, Pathophysiologie, Klinik, Diagnostik, Prophylaxe und Therapie,
Uni-Med 2002: 18-43 und 69

Von Willebrand EA:

Hereditär pseudohemofili,

Finska Läk Sällsk Handl, 1926, 68: 87-112

Wallace WC, Bensusan HP:

Protein Phosphorylation in Platelets stimulated by immobilized Thrombin at 37°C and 4°C,

The Journal of Biological Chemistry, 1980, 255: 1932-1937

Wayne PA (Hrsg.):

Collection, transport and processing of blood specimens for coagulation testing and general performance of coagulation assays,

Approved guideline H21-A2, 3rd Edition, National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), 1998

Winokur R, Hartwig JH:

Mechanism of shape change in chilled human platelets,

Blood, 1995, 85: 1798-1804

Wu YP, Vink T, Schiphorst M et al:

Platelet thrombus formation on collagen at high shear rates is mediated by von Willebrand factor-GPIIb interaction and inhibited by vWF-GPIIb:IIIa interaction,

Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2000, 20: 1661-1667

Zucker M, Borrelli J:

Reversible alteration in platelet morphology produced by anticoagulants and by cold,

Blood 1954, 28: 524-534

8. Danksagung

Ich möchte mich bei jenen bedanken, die mir die Fertigstellung dieser Arbeit ermöglichten:

Frau Prof. Scharrer für das Überlassen der Thematik dieser Arbeit, für die Möglichkeit die Versuche durchzuführen und auszuarbeiten, sowie für Geduld und wertschätzende Mitarbeiterführung.

Den Probanden und Patienten, für die bereitwillig Gabe ihres Blutes.

Allen Mitarbeitern der Hämostaseologie für die herzliche Aufnahme und die Unterstützung.

Ganz besonders Martina für die Hilfe bei den Experimenten und Veröffentlichungen.

Ingrid, Vida, Birgit, Martina und Thomas, die immer aufgeschlossenen und hilfsbereite Ansprechpartner waren um mir bei den Laborbestimmungen zu helfen.

Manu und Wolfgang für die Beantwortung sämtlicher Fragen.

Thomas für die unentbehrliche Hilfe am PC.

Carola für die bereitwillige Überlassung des Kopierers.

Stephan, meiner Familie und Freunden für die Unterstützung während dieser Zeit.

Mama, danke für das Korrekturlesen und die unendlich vielen Artikel, die du für mich besorgt hast.

9. Lebenslauf

Ich wurde am 15. November 1980 als Kind der Eheleute Heidrun Gabriele Täschner, geborene Nahrstedt und Alfred Martin Roland Täschner in Leipzig geboren.

Von 1986 bis 1990 besuchte ich die Grundschule in Leipzig. Zwischen 1990 und 1991 ging ich in die 76. Polytechnische Oberschule in Leipzig. Nach der fünften Klasse wechselte ich in das Wilhelm-Ostwald-Gymnasium zu Leipzig, wo mir im Juli 1999 meine Allgemeine Hochschulreife bescheinigt wurde.

Im August 1999 begann ich eine Ausbildung zur Arzthelferin in Leipzig, welche ich im März 2000 abbrach, um mein Medizinstudium in Frankfurt am Main anzutreten.

Seit April 2000 studierte ich Humanmedizin im Medizinischen Fachbereich der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main, wo ich im April 2006 mein Studium beendete.

Hanau, im April 2005

10. Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Humanmedizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität zu Frankfurt am Main
zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel:

Präanalytische Bedingungen
zur Untersuchung der
von Willebrand-Faktor-Parameter

Im Zentrum der Inneren Medizin, Medizinische Klinik I
Schwerpunkt: Hämostaseologie

Unter der Leitung von Frau Prof. Dr. med. I. Scharrer

Mit Unterstützung der in der Danksagung aufgeführten Personen
ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt

und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation
angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Hanau, im April 2005