

Ein Artikel aus dem Fachmagazin:

> BVOU Infobrief 01/2023 <

# Von der Kunst, eine Teilchenkonzentration in PRP zu bestimmen

Dr. med. Paul Borgmann, Dr. Norbert Laube, M. Sc. Christoph

regenlab®



TISSUE  
ENGINEERING  
SPECIALISTS

# VON DER KUNST, EINE TEILCHENKONZENTRATION IN PRP ZU BESTIMMEN

Blut ist nicht nur biologisch, biochemisch und physikalisch eine komplex zusammengesetzte Suspension, deren vielfältige Komponenten untereinander aber auch mit ihrer „Umgebung“ Wechselwirkungen eingehen können.

Im Infobrief-Beitrag 03/2021 haben wir versucht aufzuzeigen, wie schwer es ist, aus dem Vollblut bestimmte Partikelfractionen zu isolieren. In diesem Beitrag möchten wir, nach einer kurzen Einführung in die Welt der Partikel, einen „flüchtigen“ Eindruck über die Herausforderungen der Partikelzählung – genauer der Thrombozytenzählung in plättchenreichem Plasma – vermitteln.

## EINFÜHRUNG

Die Physik bietet eine allgemeine Definition für den Begriff „Partikel“; er leitet sich vom lateinischen Wort *particula* für „Teilchen“ ab und beschreibt – allgemein – „einen Körper, der klein gegenüber dem Maßstab des betrachteten Systems ist“.

Je nach Standpunkt des Betrachters können mit diesem Begriff also sowohl feinste, nur wenige Nanometer ( $10^{-9}$  m) große, feste oder flüssige Stoffe, die in einem Zimmer von z. B.  $48 \text{ m}^3$  schweben, aber auch die im leeren „von den besten Teleskopen beobachtbarem Universum“ (Radius 13,8 Mrd. Lichtjahre  $\approx 1,306 \times 10^{26}$  m) verteilten Galaxien ( $r \approx 4,75 \times 10^{20}$  m) beschrieben werden.

Befinden sich Partikel in einer Flüssigkeit, so spricht man von einer Suspension; die Partikel sind in der flüssigen Phase „suspendiert“.

In allen Maßstäben können sich die untersuchten Partikel in vielerlei Hinsicht in ihren physikalischen Eigenschaften unterscheiden, z. B. in: Art, Größe, Form, Farbe, Aufbau, Alter. Je nach beobachteter Suspension können zahlreiche weitere Partikelmerkmale unterschieden werden.

## METHODEN DER PARTIKELZÄHLUNG UND GRÖSSENANALYSE

Für die Bestimmung der Partikelanzahl in einem Probenvolumen und der zugehörigen Verteilung der Partikelgrößen und der Partikelarten stehen vielfältige Messmethoden zur Verfügung.<sup>1</sup> Sie nutzen primär, insbesondere die unterschiedlichen physikalischen Eigenschaften der zu analysierenden Partikelsysteme aus; die konkrete Wahl des Verfahrens ist abhängig u.a. von der/den Partikelgröße(n), der Partikelkonzentration, der vorherrschenden kontinuierlichen Phase.

Gegebenenfalls müssen die Proben vor der Analyse, z. B. durch Verdünnung oder Abreicherung von Störpartikeln, aufbereitet werden.

Bei komplexen Partikelsystemen, z. B. bei Blutuntersuchungen kommen ggf. abgeleitete und/oder kombinierte Verfahren zum Einsatz.

## BLUT – EIN HETEROGENES STOFFGEMISCH AUS VERSCHIEDENEN IN PLASMA SUSPENDIERTEN BIOLOGISCHEN PARTIKELN

Das morphologisch als flüssiges mesenchymales Organsystem anzusprechende Blut übernimmt im Körper zentrale Vitalfunktionen. Seine Zusammensetzung wird daher permanent über verschiedene z.T. redundante Mechanismen in engen Grenzen konstant gehalten. Sämtliche Blutkomponenten unterliegen einem ständigen Auf- und Abbau, wobei die verschiedenen Blutpartikel unterschiedliche Halbwertszeiten aufweisen; während die Lebensdauer der Thrombozyten ca. 3–10 Tage beträgt, überleben die Erythrozyten zwischen 30 und 120 Tage. Während ihrer Lebenszeit können die Zellen ihre Morphologie ändern, wodurch sich zelltypcharakteristische Größen-Häufigkeitsverteilungen ergeben, die bei einer Störung des Gleichgewichts zwischen den jeweiligen Auf- und Abbauraten typische Verschiebungen erfahren.

Die Neubildung der Blutzellen, die Hämatopoese, führt dazu, dass im Blut ein breites Spektrum von morphologisch unterscheidbaren Bestandteilen der verschiedenen Zellarten koexistiert (Abb. 1). Hierzu gehören jeweils die Zellen der Erythropoese, der Granulozytopoese, der Lymphozytopoese, der Monozytopoese, und der Thrombozytopoese.

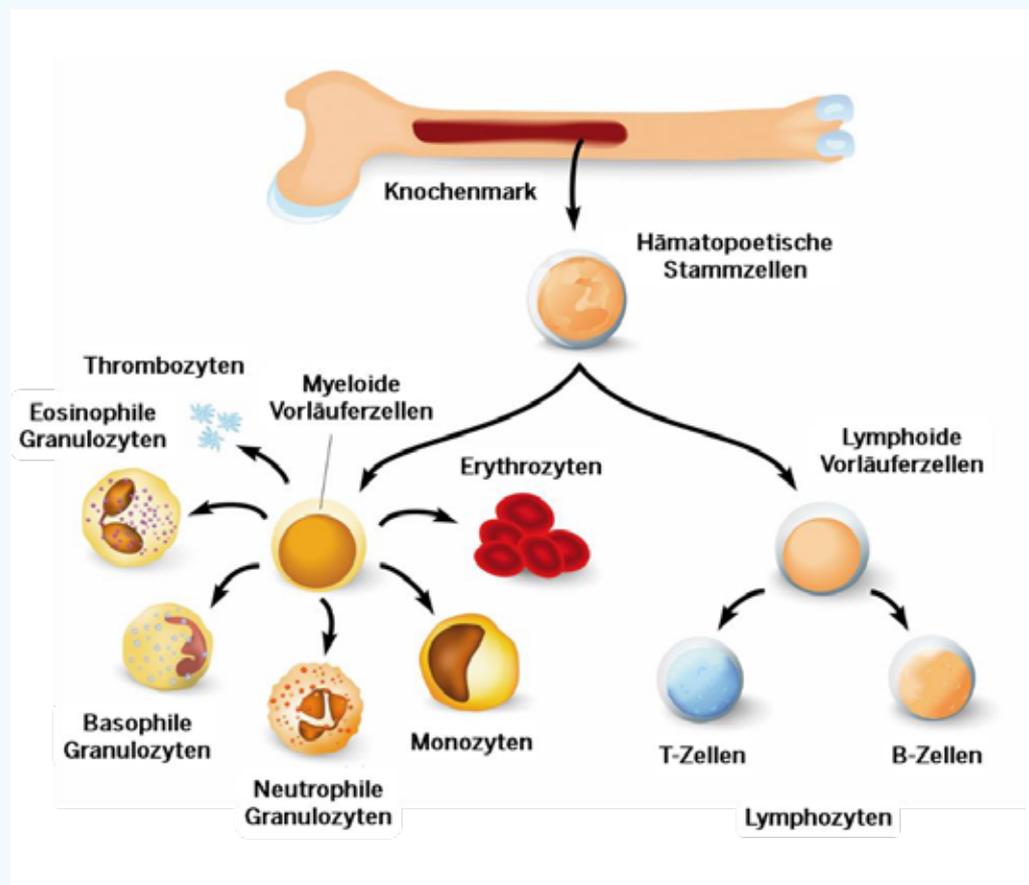
## DIE BLUTPARTIKELANALYSE

Die Tatsache, dass die Blutplasmazusammensetzung sowie die Häufigkeiten der Blutpartikel und deren jeweiligen morphologischen Beschaffenheit von zentraler Bedeutung für die Gesundheit sind, lässt die Untersuchung des Blutbilds eine zentrale Rolle bei der Diagnose von Erkrankungen einnehmen. Ziel hämatologischer Untersuchungen ist daher die Zählung und Differenzierung der unterschiedlichen korpuskulären Bestandteile und u.a. die Detektierung pathologischer Zustände. Hierzu werden u.a. die Zellmerkmale: Größe, Form des Kerns und Größenvergleich zwischen Kern und Zelle, Chromatinstruktur des Kerns, Granula im Zytoplasma und deren Größe und Verteilung, sowie die Anfärbbarkeit der verschiedenen Zellbestandteile, mit unterschiedlichen Methoden untersucht.

Nicht nur die Konzentrationen der Plasmabestandteile müssen in ihren jeweils eng begrenzten Referenzbereichen

vorliegen, sondern auch jede Partikelart in ihrer typischen Häufigkeits- und Größenverteilung. Eine Abweichung von der physiologischen Norm weist direkt (spezifisch) oder indirekt auf eine akute und/oder chronische pathologische Form metabolischen oder hämatopoetischen Geschehens sowie eine verringerte Blutfunktionalität (u.a.  $O_2$ - $CO_2$ -Transport, Gerinnungsfähigkeit, Puffereigenschaften) hin. Die Untersuchung des Blutbilds im Hinblick auf (jedwede) pathologische Veränderungen ist daher für diagnostische Zwecke, aber auch zur Therapieerfolgskontrolle, unersetzlich.

Im Folgenden soll eine der wichtigsten Methoden der Partikelanalyse zur Erfassung von Blutwertabweichungen skizzenhaft beleuchtet werden und dabei die Komplexität des Messverfahrens, das sonst hinter der „Black-Box“ des Analysegeräts verborgen ist, angedeutet werden.



1 u.a.: Diffusionsladungsanalytik, dynamische Lichtstreuung, elektrische Mobilitätsanalyse, Filter-/Siebanalyse, Fluoreszenzspektroskopie, Impaktionsabscheidung, Impedanzspektroskopie (dielektrische Spektroskopie), Kondensationskernzählung, Laserbeugung, Lichtmikroskopie, Opazimetrie, Photoakustische Spektroskopie, Photosedimentation, Reflektionsmessung, Schalldämpfungsspektroskopie, Ultraschalldämpfungsspektroskopie, Wägung.

Abb. 1: Zahlreiche verschiedene Partikel sind im Blut suspendiert (Beispiele). Neben den von der klinischen Chemie erbrachten Analysen der aus dem Blutplasma gewonnenen Parametern, ist die Analyse der Häufigkeiten und Morphologien der korpuskulären Blutbestandteile von zentraler diagnostischer Bedeutung.

**IMPEDANZSPEKTROSKOPISCHE ANALYSE DER KORPUSKULÄREN BLUTBESTANDTEILE**

Die Bestimmung der sich in einem Volumen befindlichen Teilchenanzahl und der Teilchengrößen erfolgt in der Zellbiologie in der Regel mit einem impedanzspektroskopischen Verfahren (Durchflusszytometrie zum Zählen mikroskopischer Teilchen vorgegebenen Typs und vorgegebener Größe).

Zur Bestimmung des kleinen Blutbilds und des Differentialblutbilds mit den jeweils abgeleiteten Kennzahlen zur Charakterisierung der zellulären Blutzusammensetzung werden u.a. aus den Primärinformationen „Anzahl“ und „Größe“ detektierter Partikel auf Basis von (vereinfachten) Modellannahmen Rückschlüsse auf das Vorliegen konkreter Zelltypen gezogen.

Die Theorie ist „beliebig komplex“ und die praktischen Vorrichtungen messtechnisch anspruchsvoll; das zugrundeliegende Messprinzip wird daher hier nur sehr vereinfacht skizziert und versucht eine Sensibilisierung für die nicht immer offensichtlichen Fallstricke der Blutpartikelmessetechnik zu schaffen. Dies auch vor dem Hintergrund der Messung der für die Beurteilung der Qualität von plättchenreichem Plasma (PRP) oftmals – grob vereinfachend und dabei die Komplexität des Produkts vernachlässigend – alleinig herangezogenen Werte der Thrombozytenkonzentration in den jeweiligen PRP-Zubereitungen.<sup>2</sup>

Das klassische Analysegerät in der medizinischen Labor Diagnostik zur Bestimmung der Leuko- und Erythrozytenkonzentration ist das 1947 von Wallace Henry Coulter erfundene Durchflusszytometer, dem Coulter-Zähler. Zahlreiche Modifikationen und Erweiterungen dieser Grundtechnologie sowie messtechnische Ergänzungen haben zu den heutigen vollautomatischen „On-desk“-Hämoanalysegeräten zur gleichzeitigen Bestimmung sämtlicher Routine-Blutparameter geführt.

**MESSPRINZIP**

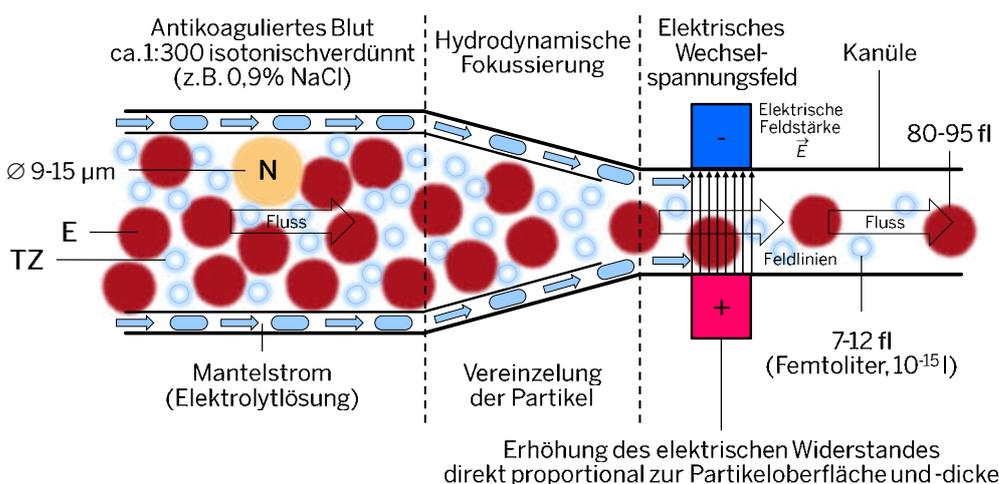
Prinzipiell können alle Arten von Partikeln impedanzspektroskopisch detektiert werden, die nur schwach- oder (besser) nicht elektrisch leitend sind (Dielektrikum) und in einer Elektrolytlösung suspendiert sind.

Passiert ein solches Teilchen ein von außen angelegtes elektrisches Feld geeigneter Stärke, wird in diesem Teilchen eine Ladungstrennung induziert; das Teilchen wird polarisiert und erzeugt dabei ein eigenes elektrisches Feld, wodurch der Stromfluss in der Messzelle verringert wird (Abb. 2).

Liegt ein (sinusförmiges) Wechselfeld an, ist die Änderung der Polarisation auf Grund der beschränkten Beweglichkeit der Ladungsträger gegenüber der Änderung des elektrischen Feldes zeitlich verschoben. Hierdurch kommt es zu einer zeitlichen Verschiebung (Phasenwinkel  $\varphi$ ) des Strom- und Spannungsverlaufs zwischen den außen anliegenden felderzeugenden Elektroden. Das Ausmaß der frequenzabhängigen Verschiebung ist teilchenmaterialspezifisch (u.a. Dielektrizitätskonstante  $\epsilon$ , Leitfähigkeit  $\kappa$ ) und unabhängig von der Teilchenmorphologie.

Die Höhe des vom Teilchen erzeugten Wechselstromwiderstands [Ohm,  $\Omega$ ] wird als Impedanz (lat. *impediere* „hemmen“, „hindern“) bezeichnet; die gemessene Höhe der durch das Teilchen verursachten Änderung des Stromflusses im Messsystem ist direkt proportional zum Teilchenvolumen.

Wie bei allen quantitativen Messungen muss die zur Analyse kommende Probe bezüglich der Zusammensetzung der „Grundgesamtheit“ repräsentativ sein, um auch die Konzentrationen selten oder außergewöhnlich (weil pathologisch) vorkommender Partikel mit statistisch hinreichender Genauigkeit „richtig“ abbilden zu können. Dies setzt den Einsatz eines (homogenen) Mindestprobenvolumens bzw. der Zählung einer „Mindestanzahl aus der Probe zu zählender Partikel“<sup>3</sup> voraus.



2 Eine gute Alternative zum Konzentrationswert ist der Parameter „Thrombozytenwiedergewinnung“;  $r = (c_{PRP} \times V_{PRP}) / V_{Blut}$ , mit  $c_{PRP}$  = TZ-Konzentration,  $V_{PRP}$  = gewonnenes PRP-Volumen,  $V_{Blut}$  = abgenommenes Vollblutvolumen. Die Einheit von  $r$  ist [TZ-Anzahl im PRP pro  $\mu$ l Vollblut].

Abb. 2: Stark vereinfachte Darstellung des Messprinzips eines Durchflusszytometers. Passiert z. B. ein (Blut-) Partikel die Messkammer, so bewirkt es im, durch eine sinusförmigen Wechselfeld erzeugten elektrischen Feld, eine frequenz- und amplitudenabhängige spezifische Widerstandsänderung, die sich als Spannungs- oder Stromimpuls messen lässt. Die Partikelkonzentration der Probe ergibt sich aus der Anzahl von detektierten Impulsen und dem Probenvolumen, das während der Messung durch die Kanüle geströmt ist. Typische Kanüledurchmesser sind 20  $\mu$ m bis 400  $\mu$ m. E = Erythrozyt, N = Neutrophiler Granulozyt, TZ = Thrombozyt.

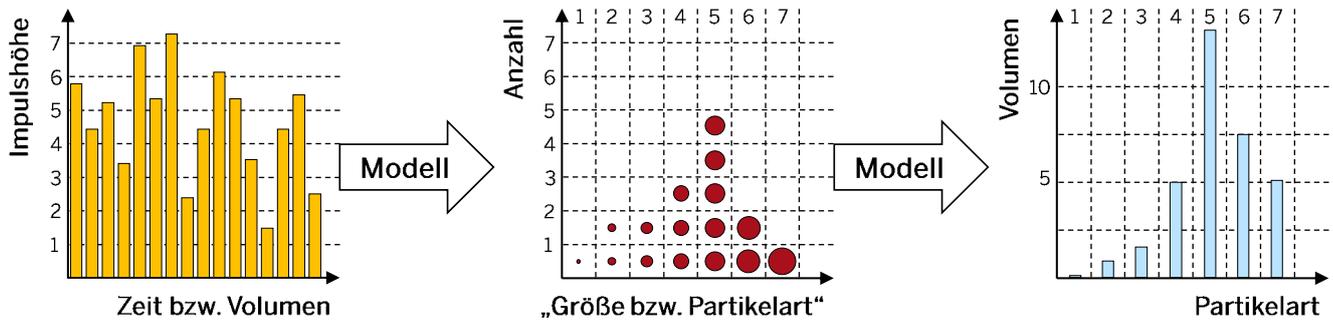


Abb. 3: Überführung der Messsignale (links) in eine Partikelgrößenverteilung (Mitte) und Partikelvolumenverteilung (rechts) unter Zuhilfenahme verschiedener Modelle. Voraussetzung in diesem Beispiel ist, dass a) jeder Impuls genau einem Teilchen entspricht und b) die Impulshöhe eine Funktion der Partikelgröße ist. Um c) im nächsten Schritt die Partikelgröße einer Partikelart zuweisen zu können, muss (idealerweise) jede Partikelart durch eine distinkte (eindeutige) Größe gekennzeichnet sein. Theoretisch könnten in diesem Beispiel sieben Partikelarten erfasst worden sein. Um hierüber Klarheit zu bekommen, müssen weitere Informationen über die Partikel in die Ergebnisinterpretation einfließen.

### MESSTECHNISCHE BESCHRÄNKUNGEN

Wie jedes Messverfahren ist auch die Impedanzspektroskopie durch prinzipielle Randbedingungen limitiert. Nicht nur das Volumen des Partikels, sondern u.a. auch seine Form und Position im elektrischen Feld nehmen Einfluss auf die elektrischen Phänomene und damit auf die Höhe, Dauer und Form des ausgelösten Messsignals: Da das sich im Messbereich befindliche Teilchen – bildlich gesprochen – einen „elektrischen Schatten“ erzeugt, ergeben sich Effekte, welche die Messgenauigkeit beeinträchtigen. Zum Beispiel täuschen kugelförmige Partikel Volumina vor, die ca. 1,5-mal größer sind als die wahren.

Abweichungen von der Kugelgestalt, z.B. bei Blutzellen, natürlich (physiologischer<sup>4</sup> oder pathologischer Natur<sup>5</sup>) oder durch äußere Einflüsse (z. B. als Folge von Verformungen während der Passage durch die Messkanüle) verursacht, erschweren zusätzlich die Analytik. „Weichere“ Zellen, die sich durch die strömungserzeugten Scherkräfte leicht verformen können, erscheinen häufig kleiner, als sie sind. Die Größenbestimmung bei volumengleichen, aber nicht gleichförmigen Partikeln ist beim Impedanzverfahren erschwert.

Im Randbereich des elektrischen Felds registrierte Partikel erscheinen wiederum größer, wodurch z.B. ein Thrombozyt einen Impuls auslösen kann, der die Größe eines (kleinen) Erythrozyten vortäuscht.<sup>6</sup>

Ebenso ist das Verfahren prinzipiell empfindlich gegenüber der Messung mehrerer gleichzeitig oder sehr kurz hintereinander die Messzelle passierender Partikeln (Koinzidenzfehler), die dann als ein einzelnes großes Teilchen registriert werden, (Nichtlinearität zwischen Messsignal und Teilchengröße).

Deshalb sollte der Durchmesser der Messkanüle einerseits so gewählt werden, dass sich nur ein Teilchen darin befinden kann, jedoch muss andererseits gleichzeitig sichergestellt sein, dass das Messvolumen deutlich größer ist, als die größten zu zählenden Teilchen, um Verstopfungen zu vermeiden. Durchmesser (Aperturen) mit ca. dem 2- bis 50-fachem Teilchendurchmesser werden als günstig angesehen.<sup>7</sup> Der Einsatz mehrerer Kanülen gleichzeitig ermöglicht die Messungen von Suspensionen mit einem breiten Partikelspektrum.

### VON DEN ROHDATEN ZUR INFORMATION ÜBER DAS PARTIKEL

Die Überführung des Messsignals in eine differenzierende Information über die Partikeleigenschaft(en) erfolgt unter verschiedensten Annahmen über die jeweiligen physikalischen – material- bzw. zellspezifischen – Eigenschaften (u.a. Dielektrizitätskonstante  $\epsilon$ , Leitfähigkeit  $\kappa$ ) der (erwarteten) Partikel und modellhaften Vereinfachungen bezüglich u.a. deren geometrischen Merkmale (z. B. Form, Größe); (Abb. 3).

Trotz der zahlreichen modellbasierten Auswertelogiken zur Transformation des primären Messsignals in eine Ergebnisdarstellung<sup>8</sup> steht und fällt die Qualität der Analyse mit der Qualität der Probengewinnung und -aufbereitung. Dies gilt nicht nur für die Impedanzspektroskopie, sondern generell auch für die anderen Methoden der Partikelanalyse.

3 Beispiel einer statistischen Abschätzung: Es soll eine Partikelart detektiert werden, welche an der Grundgesamtheit aller Partikel einen Häufigkeitsanteil von 0,1% hat. Diese Partikelart soll mit einer 99,9% Wahrscheinlichkeit von einem Analysegerät mit einer Messgenauigkeit für diese Teilchenart von 95% mindestens **einmal** erfasst werden. Die Mindestanzahl  $n$  von Partikeln die aus der Probe untersucht werden müssen, um dieses Ereignis statistisch sicher zu erfassen beträgt 7.268, nach:  $n \geq 1/m \times [\ln(1 - a)/\ln(1 - p)]$ , mit  $m$  = Messgenauigkeit der Apparatur = 0,95;  $a$  = Mindestwahrscheinlichkeit die erreicht werden soll = 0,999;  $p$  = Wahrscheinlichkeit, einen Treffer zu erzielen = 0,001. Je nachdem, wie hoch die Trefferzahl sein muss, damit sie eine diagnostische Relevanz bekommt, muss die aus der Probe zu analysierende Gesamtteilchenzahl entsprechend erhöht werden. Unter Berücksichtigung des zur Analyse benötigten Probenverdünnungsgrads lässt sich das notwendige Mindestprobenvolumen bestimmen.

4 z. B. Erythrozyten

5 z. B. Sichelzellen

6 Rowan RM. Blood Cell Volume Analysis. London: Albert Clark, 1983.

7 Bei der Messung von ausschließlich Thrombozyten mit einer Vorrichtung, die für Analyse von Vollblut kalibriert ist, besteht also die Gefahr, dass der verwendete Kanüledurchmesser zu groß ist, um ein optimales Messergebnis zu ermöglichen.

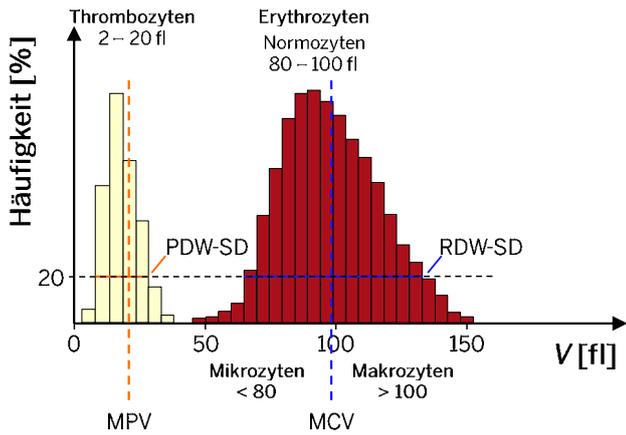


Abb. 4: Bimodale Volumen-/Häufigkeitsverteilung nach der Messung von Thrombozyten und Erythrozyten. Aus diesen Verteilungen lassen sich für Diagnosezwecke weitere Kennzahlen ableiten. Bei den Erythrozyten z. B. die Parameter MCV = Mean Corpuscular Volume, und RDW-SD = Red Cell Distribution Width. SD = Standardabweichung. Entsprechende Kennzahlen (MPV = Mean Platelet Volume, PDW-SD = Platelet Distribution Width) können auch aus der Thrombozytenverteilung bestimmt werden. Volumenangabe in Femtoliter ( $10^{-15}$  l).

8 Hinter den Modellen der „Black-Box-Automaten“ sind u.a. auch „Fuzzy-Logic“-Routinen versteckt, die versuchen, aus unscharfen Informationen Störfaktoren zu erfassen und diese bei der Ergebnisberechnung „im Hintergrund“ zu berücksichtigen, um hierdurch z.B. klare(re) Mengenzuweisungen zu ermöglichen.

9 Präanalytische Fehler, die eine Blutpartikelgrößenverteilungsanalyse beeinflussen, müssen unbedingt vermieden werden; hierzu gehören u.a.: unachtsame Blutentnahme, falsches Antikoagulant-Blut-Verhältnis, verzögerte Probenverarbeitung (Lagerungseffekte), zu hohe Lagerungstemperatur, nicht-isotonische Probenverdünnung, etc.; die Verwendung falscher Zentrifugationsparameter ( $\rightarrow$  u.a. In-vitro-Hämolyse) oder eine unsachgemäße Extraktion der Zielpartikel vom Zentrifugat sind weitere potenzielle Fehlerquellen.

### DIE BESTIMMUNG DER THROMBOZYTEN-KONZENTRATION IN BLUT UND PRP - EINE MESSTECHNISCHE HERAUSFORDERUNG

Aufgrund ihrer geringen Größe und intrinsischen Fähigkeit zur Interaktion ist die Untersuchung der Thrombozytenanzahl und der zugehörigen Volumenverteilung (Abb. 4) in einer Blut- bzw. PRP-Probe im Vergleich zur Bestimmung der gleichen Parameter für die anderen Blutpartikel besonders schwierig. Das Auftreten von induzierten Partikelfragmenten, z.B. in Folge einer unsachgemäßen Probennahme und -aufbereitung,<sup>9</sup> kann die Zählstatistik relevant beeinflussen, indem die Anzahl kleiner Partikel auf Kosten der Anzahl der großen ( $\rightarrow$  Erythrozyten) falsch hoch angegeben wird.

Neben der manuell durchgeführten Kammerzählung mittels Phasenkontrastmikroskopie als Referenzmethode kommen bei der automatisierten Untersuchung der Thrombozyteneigenschaften und -funktionalität auch folgende Methoden zum Einsatz:

- Durchflusszytometrische Bestimmung
- Optische Streulichanalyse
- Widerstandsmessverfahren

Zur Erhöhung der Messgenauigkeit werden diese Verfahren oft auch in Kombination durchgeführt.

Das Ergebnis einer Thrombozytenmessung hängt von zahlreichen Faktoren ab, die zum Teil schwer zu kontrollieren sind. Der Vergleich zweier Messergebnisse, die von unterschiedlich aufbereiteten und prozessierten Proben eines Patienten gewonnen worden sind, wird hierdurch erschwert und ggf. unmöglich.

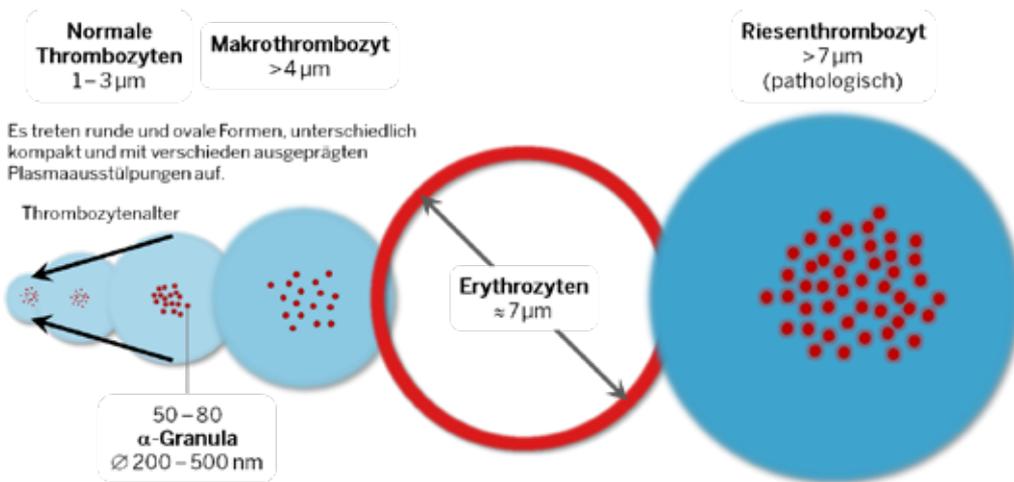


Abb. 5: Größenvariabilität der Thrombozyten im Vergleich zu einem „Standard-Erythrozyten“.

Während die deskriptiven Patientenmerkmale Geschlecht, Alter, etc. einfach „herausgerechnet“ (Referenzbereiche) werden können, ist dies bei zahlreichen weiteren Einflussfaktoren kaum lösbar. Bereits die Vorgehensweise bei der Blutabnahme (u.a. Tageszeit, Patientenvorbereitung, Stauung, Aufziehggeschwindigkeit, Füllmenge, ungenügendes Mischen der Blutprobe mit dem Antikoagulans) kann Effekte, die u.a. die Thrombozytenaktivierung und -aktivierungsgrad sowie das Ausmaß der Aggregation beeinflussen, auslösen, die zum Teil irreversibel sind. Nicht ohne Grund müssen die Probenentnahmen z.B. bei der Überprüfung der Thrombozytenaktivierung mittels Antigen-Antikörper-Reaktion (Durchflußzytometer) oder zur Klärung von Thrombozytenfunktionsstörungen mittels induzierter Thrombozytenaggregation (Photometer) möglichst schonend vorgenommen werden, da die Messmethoden und damit die klinisch-chemischen Befunde besonders störanfällig für Fehler in der Präanalytik sind.

Die Wahl des Antikoagulans (u.a. EDTA, Citrat<sup>10</sup>) und gewählte Konzentration, das Material des Zentrifugenröhrchens, die Lagerbedingungen (u.a. Temperatur, aber auch Bewegung und Zeitspanne zwischen Blutabnahme und Analyse), die folgende Blut- bzw. PRP-Aufbereitung und sogar die Wahl des Gerätetyps nehmen weiteren Einfluss auf die Thrombozytenparameter.

Unter bestimmten Umständen können sich die Verteilungskurven im Bereich der großen Thrombozyten und kleinen Erythrozyten überlappen (Abb. 5). Hier ist der (vor-)gewählte Schwellwert zur Diskrimination (z.B. 20 fl) entscheidend; bei diffizilen Problemstellungen bedarf seine Einstellung besonderes Fingerspitzengefühl.

## PSEUDOTHROMBOZYTOPENIE

Aufgrund der Fähigkeit der Thrombozyten sich an Oberflächen zu adhären und auch miteinander zu agglomerieren können in der zu messenden Probe (in-vitro) thrombozytenspezifische Phänomene auftreten, die bei der automatischen Zytometrie ein falsch-niedriges Zählergebnis verursachen können. Hierzu gehören die durch Thrombozytensatellitismus<sup>11</sup> und Bildung von Thrombozytenagglomeraten<sup>12</sup> entstandenen Artefakte ohne Krankheitswert (Abb. 6). Sind diese Phänomene ausgeprägt, täuschen sie im Laborbefund eine pathologische Thrombozytopenie vor (Pseudothrombozytopenie).

10 Aus EDTA-Proben wird oftmals u.a. eine statistisch signifikant eine höhere TZ-Anzahl und ein höheres TZ-Volumen bestimmt als aus gleich behandelten Citratproben, wodurch ein Ergebnisvergleich zweier ungleich antikoagulierten Proben kritisch betrachtet werden muss.

11 Rosettenförmigen Anlagerung von Thrombozyten an Neutrophile oder seltenen Monozyten. Verstärkung bei zu niedriger Temperatur.

12 Häufigste Ursache: EDTA-induzierte TZ-Agglutination; weiterhin u.a.: zu niedrige Temperatur, Teilgerinnung des Blutes bei ungenügender Mischung mit dem Antikoagulans. Nur selten: Citrat-induzierte Pseudothrombozytopenie.

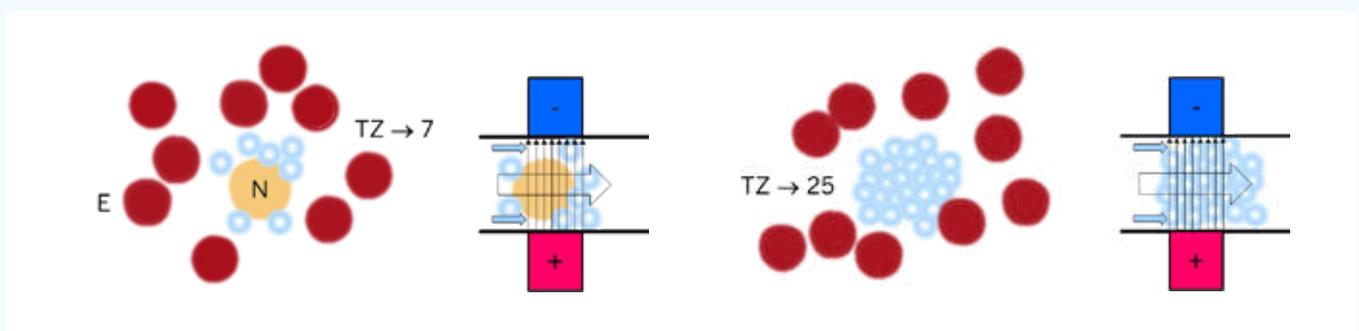


Abb. 6: Auswirkung von Thrombozytensatellitismus (links) und Pseudothrombozytopenie (rechts) auf die exakte Detektion von Thrombozyten in der Messkammer des Analysegeräts. Die Ursachen der falschniedrigen Konzentrationsbestimmungen werden deutlich. Während ersteres Phänomen im leukozytenarmen Regen PRP® insbesondere aufgrund der selektiven Abtrennung von Neutrophilen Granulozyten nicht auftritt, ist die Bildung von reversiblen Thrombozytenagglomeraten als Folge der leichten Thrombozytenaktivierung<sup>13</sup> (u.a. Borosilikat-Röhrchen) nicht unwahrscheinlich. Im gezeigten Beispiel würde die Analyse 25 Thrombozyten (TZ) nicht erfassen. Die Notwendigkeit, potentiell in der Probe vorhandene Thrombozytenagglomerate vor der Zytometrie durch saches Agitieren des Probengefäßes aufzulösen wird evident.

## PSEUDOTHROMBOZYTOPENIE BEI REGEN PRP?

Aufgrund der einzigartigen RegenLab-Trenngeltechnologie befindet sich das fertige Regen PRP® am Ende der Zentrifugation oberhalb des als physikalische Sperre dienenden Trenngels. Statt am oberen Rand eines nur schwer abzugrenzenden Buffy Coats befinden sich im RegenLab-Zentrifugenröhrchen die Thrombozyten einzeln oder – als Nebeneffekt der gewünschten und durch das Borosilikatröhrchen ausgelösten leichten PLT-Voraktivierung – gelegentlich, über ihre Dentriten ineinandergreifend, agglomeriert (unregelmäßige, längliche „Flöckchen“) auf der Trenngeloberfläche (Abb. 7a).

Um die Thrombozyten in das überstehende Plasma zu resuspendieren, muss gemäß der Regen PRP®-Herstellungsvorschrift das Zentrifugenröhrchen circa 20× sorgsam um 180° hin und her geschwenkt werden; **nicht schütteln!** Diese Prozedur führt dazu, dass sich ein homogenes Regen PRP® einstellt (Abb. 7b) und sich auch die sehr selten vorliegenden Agglomerate wieder zu einzelnen Thrombozyten auflösen (Deglomeration).<sup>14</sup>

Bei der Überführung des Regen PRP® sollte darauf geachtet werden, dass sich noch eventuell in Schwebelage befindliche Restagglomerate mit in die Spritze aufgezogen werden; bei der Passage durch den das geschlossene System bewahrende Transferadapter lösen sich diese Gebilde aufgrund der Scherkräfte auf (Abb. 7c).

## FALLBEISPIEL

Die technischen Aspekte, die bedacht werden müssen, um eine sachgerechte Messung der Thrombozytenkonzentration in einer PRP-Aufbereitung durchzuführen, sind, wie oben ausgeführt, umfangreich. Zu diesen Anforderungen kommen weitere Faktoren hinzu, welche die Bestimmung und den Vergleich von Konzentrationswerten erschweren.

Hierzu gehören u.a. die Effekte der sich im individuellen circadianen Rhythmus natürlich verändernden Blutparameter, aber auch „Vorfelddaspekte“, wie z.B. die chronische Einnahme bestimmter Medikamente, psychische und physische Belastungen oder Störungen im Wasserhaushalt, welche (u.U.) einen relevanten Einfluss auf die Konzentration, die Morphologie und auch die Aggregationsfähigkeit der Thrombozyten ausüben können. Dass diese Effekte auch die PRP-Qualität beeinflussen

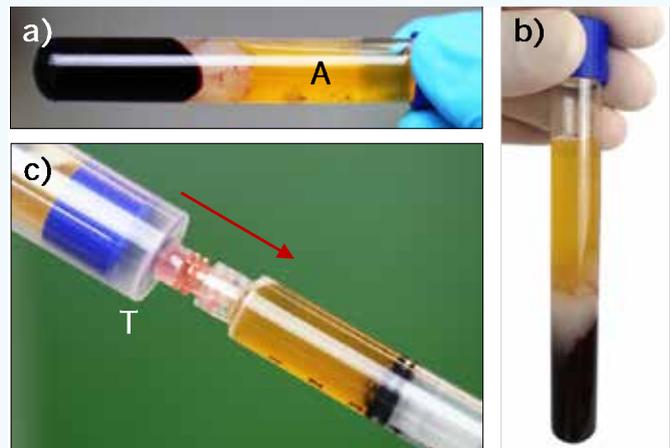


Abb. 7: a) Regen PRP® mit reversiblen Agglomeraten (A) von Thrombozyten; vor der Resuspendierung. Die Funktion des Trenngels wird deutlich. b) Regen PRP® mit resuspendierten und vereinzelt Thrombozyten; deutlich ist die Trübung durch die nun homogen dispergierten Thrombozyten erkennbar. c) sterile Überführung des fertigen Regen PRP® in die Applikationsspritze.

können, ist evident und lässt Überlegungen über die mögliche Bedeutung einer längerfristigen Patientenvorbereitung – im Sinne einer „Prehabilitation“ – bei geplanter PRP-Therapie (z. B. Vitaminsubstitution, ggf. allgemein verbesserte Ernährung, etc.) zu.

Doch auch der (akute) Patienten-„Life-style“ vor der Blutabnahme zur PRP-Gewinnung kann einen (passageren) Effekt auf die PRP-Qualität haben.

Ein besonders eindringliches Beispiel hierfür ist der Fall eines bisher metabolisch unauffälligen Patienten (♂, 32a, BMI = 24,7 kg/m<sup>2</sup>), welcher ca. 2 Stunden vor der Blutentnahme für seine 2. PRP-Injektion (CELLULAR MATRIX®, RegenLab SA,

13 **Agglomerat**: Ansammlung von Partikeln mit schwacher Partikel-Partikel-Bindung; **reversibel**. **Aggregat**: Ansammlung von Partikeln mit starker Bindung der Partikel untereinander; **irreversibel**.

14 Was im klinischen Einsatz ohne Bedeutung ist, muss jedoch im Vorfeld einer genauen Partikelkonzentrationsanalyse berücksichtigt werden: Um die PLT-Konzentration im Regen PRP® möglichst genau bestimmen zu können, wird im Rahmen der Präanalytik empfohlen, das Regen PRP® 15 Minuten sanft zu schwenken (→Tamelrollenmischer).

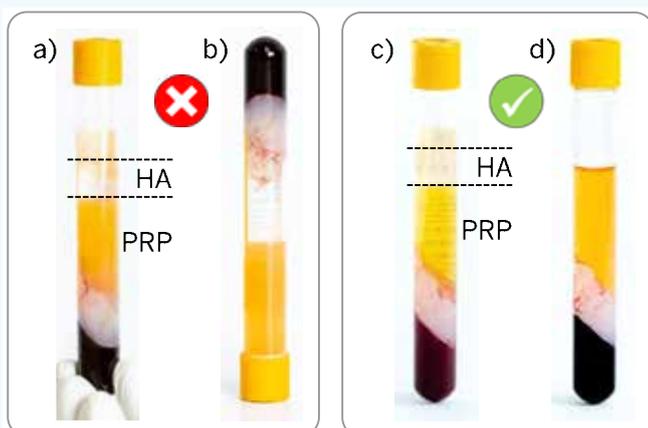


Abb. 8: a) Schon vor der Thrombozyten-Resuspendierung und der Homogenisierung mit der vorgelegten Hyaluronsäure (CELLULAR MATRIX® = Regen PRP® + Hyaluronsäure, hergestellt in einem geschlossenen System) ist die PRP-Phase des Probanden ungewöhnlich milchig-trüb. Dieser Effekt entsteht durch im PRP fein-dispergierte Lipidtröpfchen. b) Dieses sogenannte „Fatty PRP“ ist für eine Thrombozytenkonzentrationsmessung ungeeignet. Ob dieses vollständig aufbereitete PRP-Produkt eine erfolgreiche Therapie einleitet, lässt sich diskutieren; nicht nur, weil die Thrombozytenkonzentration nach dem Essen niedriger ist. c) zeigt eine gelungene CELLULAR MATRIX®-Aufbereitung mit einem klar-durchscheinendem PRP – vor dem Schwenken. d) Fertige Mischung aus Regen PRP® und HA mit der qualitätsanzeigenden Trübung als Folge der Thrombozytenresuspension.

...mit einem  
Thrombozytenkonzentrations-  
faktor von 1,6 nahe am  
theoretischen Maximum\*...

...5,5ml reines  
RegenPRP<sup>®</sup>  
gewinnen...

...dabei  
leukozytenreduziert  
und dies dank  
Trenngeltechnologie  
bei jeder Aufbereitung...

Aus 10ml  
Vollblut...

...immer und so oft Sie wollen.

Die citrat-antikoagulierte „Lab-in-the-Tube“-  
PRP-Aufbereitung in einem Schritt.



**regenLab**<sup>®</sup> ™

PRP<sup>\*</sup> & CELL THERAPY SPECIALISTS

\*In einem Einschnitt-Verfahren ist der Faktor der Thrombozytenkonzentrationserhöhung im PRP über  $(V_1 / V_2) = (c_2 / c_1)$  begrenzt. Für das RegenLab BCT-Röhrchen gilt  $V_1$  = abgenommene Blutvolumen = 10 ml und  $V_2$  = erhaltenes PRP-Volumen = 5,5 ml; damit beträgt  $V_1 / V_2 = 1,82$ . Dies führt bei dieser Konstellation der Volumina zu einer Thrombozytenausbeute von sicher über 80%. Mit der vom Anwendergeschick unabhängigen RegenLab-Trenngeltechnologie und durch die schonende Aufbereitung werden die physiologischen Bedingungen im RegenPRP<sup>®</sup> bewahrt und die natürliche Thrombozytenvitalität und -viabilität erhalten.

Schweiz) eine XXL-Portion mit reichlich Mayonnaise „getoppert“ Pommes-Frites und Salat verzehrt hat. Die PRP-Aufbereitung lieferte das in **Abbildungen 8a** und **8b** gezeigte Ergebnis, welches nicht nur als Praxisbeispiel einer nicht gelingenden Thrombozytenkonzentrationsmessung gelten kann, sondern auch das Thema „*Verhaltenstipps vor der Blutabnahme*“ in den Blickpunkt rückt.

## SCHLUSSFOLGERUNG

Die sachgerechte Analyse eines komplexen Partikelsystems, wie Blut es darstellt, bedarf professioneller Fachkenntnisse. Damit auch Messtechniken Routineanalysen vornehmen können, sind zahlreiche Messautomaten am Markt erhältlich.

Hinter der Funktionalität der modernen „On-desk“-Hochleistungsmessautomaten, z.B. für den Einsatz in einem praxiseigenen Labor, stehen eine Vielzahl u.a. von gebündelten Kenntnissen, Annahmen, Interpretationsmodellen und Sicherheitsabfragen, die es dem Laien ermöglichen, nahezu „garantiert-sicher“ ohne großen Aufwand eine Standardblutprobe unter Standardbedingungen bezüglich verschiedenster Blutpartikelparameter zu untersuchen. Dennoch, trotz aller (auch leidlich fehlertoleranten, weil „mitdenkenden“) Automatik bedarf der Analyseprozess nicht nur die sachgerechte Bedienung des Analysegeräts, sondern auch immer der Einhaltung der allgemeinen und fachspezifischen GLP-Regeln, von der Prä- bis zur Postanalytik; hämatologische DIN-Normen und die Guidelines der relevanten Fachgesellschaften<sup>15</sup> präzisieren die Vorgehensweisen.

Da in der Regel nicht die Rohdaten und stattdessen nur bereits die daraus abgeleiteten und vorinterpretierten (z.B. durch Einordnung in die jeweiligen Referenzbereiche) Analyseergebnisse ausgegeben werden, besteht stets die Gefahr der „unkritischen Übernahme“ des Ergebnisses bzw. Interpretationsvorschlags in die Befundung und Diagnose.

Was bei Standardanalysen noch eher unwahrscheinlich ist, trifft bei der Durchführung von Nicht-Routineanalysen – hierzu gehört sicherlich die Bestimmung der Thrombozytenkonzentration in PRP – schnell auf Grenzen. Werden hier die spezifisch notwendigen präanalytischen Maßnahmen nicht sachgerecht umgesetzt und erfasst die aktuelle (interne) Gerätekonfiguration nicht die Abweichung vom Standard, wird die Analyse zwangsläufig nicht „lege artis“ durchgeführt. Eine belastbare Ergebnisinterpretation wird unmöglich.

Solange unter GLP-Berücksichtigung abgenommene und aufbereitete Standardblutproben unter kontrollierten Standardbedingungen analysiert werden, sind die Ergebnisse automatischer Hämoanalyser für den routinemäßigen Praxisbedarf hinreichend genau, d.h. sie liefern Ergebnisse, die der „Wahrheit“ nahekommen. Zur Klärung spezieller Fragestellungen sollten hingegen spezialisierte Fachlabore für die Blutanalyse beauftragt werden.

Von ärztlicher Seite aus ist vor Beginn der PRP-Therapie darauf zu achten, dass auf die Blutzusammensetzung negativ einflussnehmende Faktoren, wie z.B. (chronische) Medikationen von Aspirin, ASS, Voltaren, Ibuprofen oder ähnliche Schmerz- und Rheumamittel (NSAR), im Rahmen einer ausführlicheren Anamnese erfasst und im Vorfeld der Behandlung ggf. temporär (3 – 7 Tage) reduziert werden.<sup>16</sup> Im Vorfeld jeder PRP-Injektion, z.B. im Rahmen des Aufklärungsgesprächs, ist immer ein an die jeweilige Patientensituation angepasstes Maß an „Prehabilitations“-Maßnahmen in Erwägung zu ziehen. In besonderen Fällen kann sogar eine länger angesetzte gezielte „Diät bzw. Nährstoffaufnahme“ zur Verbesserung u.a. der antioxidativen Kapazität des Plasmas, des Plasmalipidprofils und der Blutplättchenfunktion (z.B. „Mittelmeerdät“, vegetarisch orientierte Ernährung, ggf. ergänzt durch die Gabe von z.B. Bromelain, Glutathion, Vitamin-C- und/oder Vitamin-E-Komplexen) sinnvoll sein; zumindest sollten die Patienten angewiesen werden, 24 – 48 Stunden vor der PRP-Therapie u.a. Nahrungs- und Trinkexzesse (u.a. kein Kaffee, keine Energiegetränke) zu vermeiden und vor der Blutabnahme nüchtern zu bleiben. Nur aus einem gesundem Blut kann ein reines und hochwertiges PRP gewonnen werden.

Literatur auf Anfrage bei Regen Lab SA.

**Ansprechpartner: Für Ihre Fragen und Anmerkungen sowie für weitere Informationen stehen wir Ihnen gerne zur Verfügung. Bitte nehmen Sie mit uns über unsere Internetpräsenz <https://www.regenlab.com> Kontakt auf.**

**Korrespondenz:**  
**Dr. Norbert Laube**  
 Regen Lab SA  
 En Budron B2  
 1052 Le Mont-sur-Lausanne | Schweiz  
[sekretariat@regenlab.com](mailto:sekretariat@regenlab.com)

16 Die Einnahme von NSARs sollte, wenn möglich, auch 2 – 4 Wochen nach der PRP-Behandlung vermieden werden.

**1 Facharzt für Orthopädie & Unfallchirurgie, Diplom-Osteopath DGOM, Privatpraxis für regenerative Orthopädie und Osteopathie, Gartenstraße 28, 79098 Freiburg im Breisgau**  
 2 Regen Lab SA, Schweiz



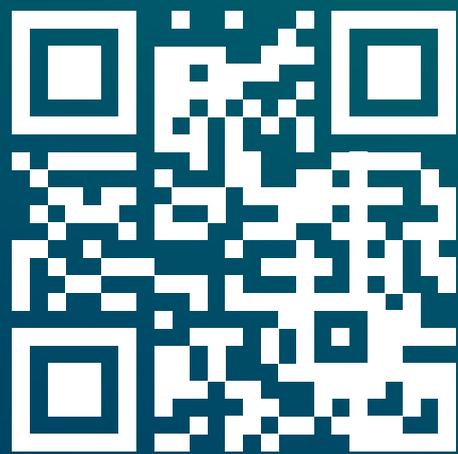
**Dr. med. Raul Borgmann<sup>1</sup>**



**Dr. rer. nat. habil. Norbert Laube<sup>2</sup>**



**M.Sc. Christoph Wille<sup>2</sup>**



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

regenlab<sup>®</sup>



TISSUE  
ENGINEERING  
SPECIALISTS