

# EPINEPHRIN 100 - REAGENZ FÜR DIE AGGREGATION



## Gebrauchsanleitung

### Verwendungszweck

Epinephrin (R)-1-(3,4-Dihydroxyphenyl)-2-(N-methylamino)-ethanol, auch als „Adrenalin“ bezeichnet, dient zur Untersuchung der Plättchenfunktion. Es gilt als „schwacher“ Agonist.

### Zusammenfassung

Epinephrin ist ein Hormon und Neurotransmitter, das über eine Aktivierung des G-Protein-gekoppelten  $\alpha_2$ -Adrenozeptors seine Wirkung entfaltet. Durch Zusatz von Epinephrin zu plättchenreichem Plasma (PRP) kommt es ohne das Phänomen des „Shape Change“ direkt zu einer Exposition von Fibrinogenrezeptoren, Ausschüttung von Calcium aus dem endoplasmatischen Retikulum und Hemmung der Adenylatcyclase, was eine reversible Bildung von Aggregaten auslöst. Eine zweite Aggregationswelle wird dann durch Ausschüttungsreaktionen von z.B. ADP und Thromboxan  $A_2$  der Plättchengranula induziert, tritt aber oft auch gar nicht auf. Generell ist die Reaktivität gegenüber Epinephrin stark von den Reaktionsbedingungen (Konzentration, Inkubationszeiten etc.) abhängig.<sup>1</sup>

### Prinzip der Methode

Lichttransmissionsaggregometrie: Plättchenreiches Plasma (PRP) wird in einer Küvette mit dem Epinephrin-Reagenz versetzt. Die Trübungsabnahme des Plasmas durch Aggregation der Thrombozyten wird im Aggregometer unter konstantem Rühren gemessen. Es kommt zu einer Änderung der Lichttransmission. In die Auswertung kommen die Zeit vom Zusatz des Reagenzes bis zum Beginn des Shape-Change bzw. der Aggregation, die Aggregationsgeschwindigkeit (Slope) sowie die maximale Aggregation. Siehe das Gerätehandbuch für weitere Angaben.

### Reagenz

REF 72 400 (2 x 1ml)

**Zusammensetzung:** (-)-Epinephrin-(+)-bitartrat, Stabilisatoren, lyophilisiert

**Warnhinweis:** Gebrauch für *in vitro* Diagnostik.

**Lagerung:** Bei 2-8°C lagern und nur bis zum aufgedruckten Verfallsdatum verwenden.

**Rekonstitution des Reagenz:** Stopfen vorsichtig entfernen und mit 1 ml frischem bidestillierten Wasser (ohne Konservierungsmittel) rekonstituieren, 10 min stehen lassen, dann vorsichtig schwenken. Man erhält so eine Konzentration von 100  $\mu$ M Epinephrin im Reagenz und 10  $\mu$ M Epinephrin im Reaktionsansatz (bei 1 Vol. Reagenz + 9 Vol. Probe).

**Aufbewahren nach Rekonstitution:** Das angesetzte Reagenz ist verschlossen bei 2-8°C im Originalfläschchen zu lagern.

**Haltbarkeit nach Rekonstitution:** Bei Rekonstitution mit 1 ml frischem bidestillierten Wasser ist das Reagenz verschlossen im Originalfläschchen bei 2-8°C für 30 Tage stabil, bei 15-25°C für 24 Stunden. Nicht einfrieren.

### Empfohlenes Material und Geräte

- Aggregometer, Aggregometerküvetten mit Rührstäbchen
- Bidestilliertes Wasser, kalibrierte Pipetten und saubere Pipettenspitzen
- Kunststoffeinmalpipetten, Kunststoffröhrchen
- Blutentnahmeröhrchen, Zentrifuge

Dieses Reagenz kann mit handelsüblichen Aggregometern für Lichttransmissionsaggregometrie eingesetzt werden. Der Betrieb sollte nach Angaben des Herstellers erfolgen. Insbesondere ist auf eine Standardisierung der Rührgeschwindigkeit zu achten.

### Blutentnahme und Probenvorbereitung

Blut für die Durchführung der Aggregation sollte so schonend wie möglich in handelsübliche Entnahmeröhrchen aus Kunststoff oder Silikon-beschichtetem Glas gewonnen werden. Als **Antikoagulant** eignet sich Natriumzitrat (0,11 M). BAPA (Xipla®) (Benzylsulfonil-d-Arg-Pro-4-amidinobenzylamid), ein dualer synthetischer Inhibitor von FXa und FIIa, ist NICHT geeignet.<sup>2</sup> Die **Blutentnahme** muss äußerst sorgfältig durch vorsichtige Venenpunktion, wenn möglich ohne Stau, erfolgen. Blut und Antikoagulant müssen sofort nach Abnahme schonend durch vorsichtiges Schwenken gemischt werden. Die Aufbewahrung erfolgt bei 15-25°C. Ein Abkühlen des Blutes auf niedrigere Temperaturen als 15°C während Lagerung oder Transport ist unbedingt zu vermeiden, ebenso eine mechanische Belastung durch Schütteln, da es zu einer Schädigung der Thrombozyten kommen kann. Ein Transport des Blutes über Druckluftsysteme (Rohrpost) wird nicht empfohlen.

### Probenstabilität:

- In Zitrat: maximal 4 h (von der Blutentnahme bis zum Abschluss aller Schritte)

Zur **Herstellung von plättchenreichem Plasma (PRP)** wird das Blut bei Raumtemperatur für 10 min bei 150 x g zentrifugiert. Ggf. muss noch einmal für 5 min zentrifugiert werden, wenn

sich noch Erythrozyten im Überstand befinden. Zur besseren Vergleichbarkeit der Messwerte sollte immer mit derselben Zentrifuge gearbeitet werden. Das PRP wird schonend mit einer Kunststoffeinmalpipette oder einer Pipette mit Kunststoffspitze in ein sauberes Kunststoffröhrchen überführt und dieses luftdicht verschlossen. Das PRP sollte vor der Analyse ca. 30 min ruhen. Es empfiehlt sich, die Thrombozytenzahl zu bestimmen, da je nach Gerät eine gewisse Mindest- oder Höchstzahl von Thrombozyten für eine verlässliche Messung erforderlich ist. Eine Einstellung der Thrombozytenzahl durch Mischen von PRP mit Plasma derselben Probe wird heute allerdings außer bei extremen Thrombozytenzahlen eher kritisch gesehen.<sup>3, 4</sup> Zur Herstellung von plättchenarmem Plasma (PPP) wird das restliche Blut (oder eine separate Probe desselben Patienten) nochmals für 20 min bei 1500 x g zentrifugiert und der Überstand schonend mit einer Kunststoffeinmalpipette oder einer Pipette mit Kunststoffspitze in ein anderes sauberes Röhrchen überführt.

### Durchführung des Tests

Bitte folgen Sie den Angaben im Gerätehandbuch.

Beispiel:

1. Stellen Sie durch Pipettieren von 250  $\mu$ l PPP in eine Küvette einen Leerwert her
2. Pipettieren Sie 225  $\mu$ l PRP in eine Küvette mit Rührstäbchen
3. Inkubation (5 min)
4. Wenn erforderlich: 0 und 100% Grundlinie gemäß Gerätehandbuch einstellen
5. Epinephrin-Reagenz durch Schwenken des Fläschchens vorsichtig aufmischen, dann 25  $\mu$ l direkt dem PRP zusetzen (nicht an die Küvettenwand pipettieren!), Spitze danach immer verwerfen
6. Aggregometrieurve für den gewünschten Zeitraum (mindestens 6 min) aufzeichnen.

### Ergebnisse

Die **Normalwerte** von PRP von gesunden Probanden mit 10  $\mu$ M Epinephrin im Test liegen üblicherweise bei >60 % Aggregation. Es können viele präanalytische Einflüsse (Punktion der Vene, Staubbedingungen, Kanüle, Antikoagulant, Typ des Röhrchens, Zentrifugationsbedingungen, Restzahl von Erythrozyten im PRP, Rührgeschwindigkeit u.a.m.) hier zu mehr oder weniger großen Abweichungen führen. Daher sollte jedes Labor seine eigenen Referenzwerte bestimmen. Zur Interpretation der Ergebnisse bei **Patientenproben** sollten Tests mit anderen Aggregationsreagenzien und andere Laborparameter (z.B. Fibrinogen, von Willebrand Faktor, Blutbild, Plättchenzahl, Flowzytometrie) hinzugezogen werden. Siehe Gerätehandbuch sowie Fachliteratur für weitere Informationen. Unbedingt zu beachten ist, dass sich Ergebnisse nur dann vergleichen lassen, wenn standardisierte Reagenzien und diese in einer standardisierten Konzentration verwendet werden.

Bei klinisch gesunden Personen wird gelegentlich eine stark abgeschwächte Reaktion auf Epinephrin beobachtet, darunter auch das Ausbleiben der zweiten Aggregationswelle. Aber auch eine Hyperreaktivität wird gefunden,<sup>5</sup> vermutlich aufgrund genetischer Ursachen.<sup>6, 7</sup> Defekte des thrombozytären  $\alpha_2$ -Adrenozeptors können zu einer Blutungsneigung führen.<sup>8</sup> Bei anderen kongenitalen Plättchenfunktionsstörungen kann die Reaktivität gegenüber Epinephrin heterogen ausfallen. Abnormale Werte werden z.B. meist, aber nicht immer, beim Bernard Soulier Syndrom, bei Storage Pool Defekt und bei Thrombasthenie Glanzmann gefunden. Die Reaktivität bei Aspirin ist heterogen.

Ergebnisse sind zu einem gewissen Grad je nach Gerät mehr oder weniger von der Thrombozytenzahl abhängig. Oft werden bei Thrombozytenzahlen von < 75/nl niedrigere Ergebnisse gefunden. Es ist zu beachten, dass viele diätetische oder medikamentöse Faktoren die Plättchenfunktion beeinflussen können.<sup>9</sup> Bei der Lichttransmissionsaggregometrie können Lipämie, Bilirubin oder Hämoglobin je nach Gerät die Ergebnisse beeinflussen.

### Qualitätskontrolle

Zur Sicherstellung der Qualität wird empfohlen, mit jeder Serie von Patientenproben frisches Blut von einem bekannten gesunden Spender ohne Einnahme von Medikamenten wie eine Patientenprobe aufzubereiten und zu untersuchen.



Probe & go Labordiagnostica GmbH  
Lagesche Str. 15e, D-32657 Lemgo  
T +49 (0) 5261 / 920 7120  
F +49 (0) 5261 / 920 7122  
[info@probe-go.de](mailto:info@probe-go.de) [www.probe-go.de](http://www.probe-go.de)



## Referenzen

- <sup>1</sup> Zhou L, Schmaier AH. Platelet aggregation testing in platelet-rich plasma: description of procedures with the aim to develop standards in the field. *Am J Clin Pathol.* 2005; 123: 172-83.
- <sup>2</sup> Haubelt H, Vogt A, Hellstern P. Preservation of platelet aggregation and dense granule secretion during extended storage of blood samples in the presence of a synthetic dual inhibitor of factor Xa and thrombin. *Platelets.* 2008;19:496-501
- <sup>3</sup> Linnemann B, et al. Standardization of light transmittance aggregometry for monitoring antiplatelet therapy: an adjustment for platelet count is not necessary. *J Thromb Haemost.* 2008;6:677-83
- <sup>4</sup> Cattaneo M, et al. Platelet aggregation studies: autologous platelet-poor plasma inhibits platelet aggregation when added to platelet-rich plasma to normalize platelet count. 2007;92: 694-7.
- <sup>5</sup> Berger JS, Becker RC, Kuhn C, Helms MJ, Ortel TL, Williams R. Hyperreactive platelet phenotypes: relationship to altered serotonin transporter number, transport kinetics and intrinsic response to adrenergic co-stimulation. *Thromb Haemost.* 2013;109:85-92
- <sup>6</sup> Peace AJ, Mangiacapra F, et al.  $\alpha$ 2A-Adrenergic receptor polymorphism potentiates platelet reactivity in patients with stable coronary artery disease carrying the cytochrome P450 2C19\*2 genetic variant. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2014; 34: 1314-9.
- <sup>7</sup> Tatarunas V, Jankauskiene L, Kupstyte N, Skipskis V, Gustiene O, Grybauskas P, Lesauskaite V. The role of clinical parameters and of CYP2C19 G681 and CYP4F2 G1347A polymorphisms on platelet reactivity during dual antiplatelet therapy. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2014;25:369-74
- <sup>8</sup> Rao AK, Willis J, Kowalska MA, et al. Differential requirements for platelet aggregation and inhibition of adenylate cyclase by epinephrine: studies of a familial platelet alpha 2-adrenergic receptor defect. *Blood.* 1988; 71: 494-501.
- <sup>9</sup> Bachmair EM, Ostertag LM, Zhang X, de Roos B. Dietary manipulation of platelet function. *Pharmacol Ther.* 2014; 144:97-113.

