

# TRAP 1 - REAGENZ FÜR DIE AGGREGATION



## Gebrauchsanleitung

### Verwendungszweck

Das Peptid „TRAP“ (Thrombin Rezeptor aktivierendes Peptid) wird für die Untersuchung der Aggregation von Thrombozyten mit Hilfe der Lichttransmissionsaggregometrie im plättchenreichen Plasma (PRP)<sup>1</sup> (aus antikoaguliertem Vollblut) eingesetzt.

### Zusammenfassung

An der Aggregation von Thrombozyten durch Thrombin sind verschiedenen Rezeptoren beteiligt, darunter PAR-1, PAR-4 und andere. Der wichtigste Thrombin-abhängige Rezeptor ist PAR-1. Die Spaltung von PAR-1 durch Thrombin induziert die Aktivierung verschiedener G-Proteine. Diese lösen eine intrazelluläre Signalkette aus, die in der Bildung von Thromboxan A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>), der Ausschüttung von ADP, Serotonin und Epinephrin resultiert sowie von Adhäsivproteinen wie p-Selektin und CD40-L. Daher kommt es zur Plättchenaggregation und zur Stimulierung von prokoagulatorischen Funktionen der Plättchen.<sup>2</sup>

Das synthetische Hexapeptid TRAP (H<sub>2</sub>N-Ser-Phe-Leu-Leu-Arg-Asn-COOH, auch als „TRAP-6“ bezeichnet), aktiviert den Thrombinrezeptor PAR-1 unabhängig von der Rezeptorspaltung und ahmt damit die Wirkung von Thrombin, dem wirksamsten Aktivator der Thrombozyten, nach. Die Wirkung von TRAP wird durch Aggregationshemmer wie Aspirin oder P2Y<sub>12</sub>-Antagonisten nicht oder nur mäßig inhibiert. TRAP ist eine sinnvolle Alternative zu Thrombin als Plättchenaktivator und kann zur Erfassung der Wirkung von GPIIb/IIIa Antagonisten oder für allgemeine Funktionsuntersuchungen eingesetzt werden.

### Prinzip der Methode

Lichttransmissionsaggregometrie: Plättchenreiches Plasma (PRP) wird in einer Küvette mit dem TRAP-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 Handbuch des Gerätes für weitere Angaben.

### Reagenz

REF 72 600 (2 x 1ml)

**Zusammensetzung:** TRAP (Ser-Phe-Leu-Leu-Arg-Asn), Stabilisatoren, lyophilisiert

**Warnhinweis:** Für 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 und vorsichtig schwenken. Man erhält so eine Konzentration von 1mM TRAP im Reagenz und 100 µM TRAP im Reaktionsansatz (bei 1 Vol. Reagenz + 9 Vol. Probe).

**Aufbewahren nach Rekonstitution:** Das angesetzte Reagenz verschlossen bei 2-8°C im Originalfläschchen 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 **Antikoagulantien** eignen sich sowohl Natriumzitrat (0,11 M) wie auch BAPA (Xipla®) (Benzylsulfonyl-d-Arg-Pro-4-amidinobenzylamid), ein dualer synthetischer Inhibitor von FXa und FIIa<sup>3</sup>. BAPA (Xipla®) antikoaguliertes Blut zeigt gegenüber Zitrat mit den meisten Agonisten eine deutlich verlängerte Probenstabilität.<sup>4</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)
- In BAPA (Xipla®): bis 24h

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 verschließen. 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>5, 6</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 einen Leenwert her durch Pipettieren von 250 µl PPP in eine Küvette
2. Pipettieren Sie 225 µl PRP in eine Küvette mit Rührstäbchen
3. Inkubation (5 min)
4. Wenn erforderlich: 0 und 100% Grundlinie gemäß Gerätehandbuch einstellen
5. TRAP-Reagenz durch Schwenken des Fläschchens vorsichtig aufmischen, dann 25 µl 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 TRAP bei 100 µM im Test liegen üblicherweise bei >70 % 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 Aggregationshemmern vom Typ der GPIIb/IIIa-Antagonisten (Aggrastat, Abciximab, Integrilin) wird die Plättchenaggregation durch TRAP konzentrationsabhängig gehemmt.<sup>7, 8, 9</sup> Bei P2Y<sub>12</sub>-Antagonisten wurde eine partielle Hemmung beobachtet:<sup>10</sup> Bei Patienten mit peripherer arterieller Erkrankung nach einer Angioplastie wurde bei dualer Anti-Plättchentherapie über eine Aggregationsmessung mit TRAP eine verminderte Wirkung der Therapie beobachtet.<sup>11</sup> PAR-1-Antagonisten (Voraxapar) erzeugen eine konzentrationsabhängige Hemmung der Thrombozytenaggregation mit TRAP.<sup>12, 13</sup>

### Einschränkungen

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>14</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 Strasse 15e | 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> Cattaneo M, et al. Recommendations for the Standardization of Light Transmission Aggregometry: A Consensus of the Working Party from the Platelet Physiology Subcommittee of SSC/ISTH. J Thromb Haemost. 2013;11:1183–1189
- <sup>2</sup> Angiolillo DA et al. Platelet thrombin receptor antagonism and atherothrombosis. Eur Heart J. 2010; 31: 17–28
- <sup>3</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>4</sup> Hellstern P, et al. Preservation of in vitro function of platelets stored in the presence of a synthetic dual inhibitor of factor Xa and thrombin. J Thromb Haemost. 2007;5:2119-26
- <sup>5</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>6</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>7</sup> Chung AW, Jurasz P, Hollenberg MD, Radomski MW. Mechanisms of action of proteinase-activated receptor agonists on human platelets. Br J Pharmacol. 2002;135:1123-32.
- <sup>8</sup> Matzdorff AC, Kühnel G, Kemkes-Matthes B, Voss R. Comparison of GP IIB/IIIa inhibitors and their activity as measured by aggregometry, flow cytometry, single platelet counting, and the rapid platelet function analyzer. J Thromb Thrombolysis. 2001;12:129-39.
- <sup>9</sup> Dickfeld T, Ruf A, Pogatsa-Murray G, Müller I, Engelmann B, Taubitz W, Fischer J, Meier O, Gawaz M. Differential antiplatelet effects of various glycoprotein IIb-IIIa antagonists. Thromb Res. 2001;101: 53-64.
- <sup>10</sup> Behan MW, Fox SC, Heptinstall S, Storey RF. Inhibitory effects of P2Y12 receptor antagonists on TRAP-induced platelet aggregation, procoagulant activity, microparticle formation and intracellular calcium responses in patients with acute coronary syndromes. Platelets. 2005 Mar;16:73-80.
- <sup>11</sup> Gremmel T, Xhelili E, Steiner S, Koppensteiner R, Kopp CW, Panzer S. Response to antiplatelet therapy and platelet reactivity to thrombin receptor activating peptide-6 in cardiovascular interventions: Differences between peripheral and coronary angioplasty. Atherosclerosis. 2014;232:119-24.
- <sup>12</sup> Kosoglou T, et al. Pharmacodynamics and pharmacokinetics of the novel PAR-1 antagonist vorapaxar (formerly SCH 530348) in healthy subjects. Eur J Clin Pharmacol. 2012;68:249-58.
- <sup>13</sup> Storey RF et al. Effects of vorapaxar on platelet reactivity and biomarker expression in non-ST-elevation acute coronary syndromes. The TRACER Pharmacodynamic Substudy. Thromb Haemost. 2014;111:883-91
- <sup>14</sup> Bachmair EM, Ostertag LM, Zhang X, de Roos B. Dietary manipulation of platelet function. Pharmacol Ther. 2014; 144:97-113.

|  |  |  |
|--|--|--|
|  = Bestellnummer               |  = Chargenbezeichnung   |  = Verwendbar bis             |
|  = Gebrauchsanweisung beachten |  = nicht steril         |  = nicht zur Wiederverwendung |
|  = Lagerung 5°C - 25°C         |  = in vitro Diagnostika |  |