

Der Thrombozyt in der Analyse – manchmal eine Herausforderung

Die Geschichte der Thrombozyten

Seit dem Beginn des 19. Jahrhunderts haben Blutplättchen (Thrombozyten) für Faszination gesorgt. Zu Beginn der Forschung bezeichnete man die Thrombozyten als «seltsame kleine Kügelchen» (Hermann Nasse (1807 – 1892)). Thrombozyten wurden nicht als eigenständige Blutbestandteile, sondern als ausgestoßene Zellkerne betrachtet. Die Eigenständigkeit der Thrombozyten und den Zusammenhang mit der Blutgerinnung erkannte erst Giulio Bizzozero (1816 – 1901) und beschrieb dies in seinem Aufsatz «Über einen neuen Formbestand des Blutes und dessen Rolle bei der Thrombose und der Blutgerinnung». Der Plättchenursprung wurde aber erst durch James H. Wright (1869 – 1928) geklärt. Dieser erkannte die Thrombozyten als Abschnürungen der Plasmamembran der Megakaryozyten im Knochenmark. Seit diesen ersten Beschreibungen der Thrombozyten wurde das Wissen über die Physiologie und die Pathophysiologie sehr erweitert. Der Thrombozyt entwickelte sich zu einem großen wissenschaftlichem Forschungsgebiet, dem wir heute die Vielzahl an Informationen, insbesondere auf dem Gebiet vaskulärer Krankheitsbilder, verdanken.

Der Thrombozyt und seine Entstehung

Wie erstmals von Wright beschrieben, sind Thrombozyten kleine kernlose Abschnürungen von Megakaryozyten. Megakaryozyten sind die Vorläuferzellen der Thrombozyten. Sie werden auch «Riesenzellen des Knochenmarks» genannt. Diese Zellen gehören zu den größten Zellen des menschlichen Organismus und haben eine Größe von 50 – 150 µm. Der Kern der Megakaryozyten ist stark gebuchtet bis lobuliert, hat meist zahlreiche Segmente, jedoch keine isoliert liegenden Kerne. Die Grundfarbe des Zytoplasmas in der Pappenheim – Färbung ist basophil, aber durch die präformierten Thrombozyten, die als rötliche Granula zu sehen sind, rot – violett feinkörnig gemustert. Im weiteren Reifungszyklus der Thrombozyten werden um die Granula Membranen gebildet, die sich im Zytoplasma als Plättchenuntereinheiten abgrenzen. Nach vollständiger Reifung werden die Thrombozyten durch Abschnürung in das zirkulierende Blut freigesetzt. Dabei verhält sich die Zahl der abgegebenen Plättchen proportional zur Menge des Zytoplasmas der Megakaryozyten.

Entwicklungsgeschichtlich geht der Megakaryozyt im Laufe der Thromopoese aus einer Stammzelle hervor. Die Stammzelle differenziert sich im Knochenmark zum Megakaryoblasten. Die auch im Knochenmark befindlichen Megakaryoblasten sind die Vorläuferzellen der Megakaryozyten.

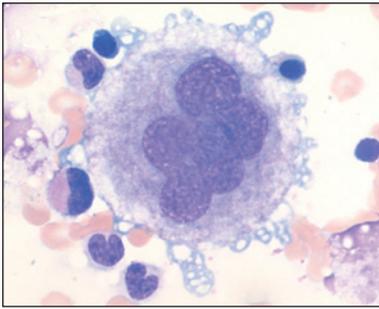


Abb. 1: Megakaryozyt

Megakaryoblasten sind unreif, das heißt, sie enthalten keine Granula. Diese entwickeln sich erst im späteren Reifungsverlauf. Weist das Zytoplasma Granula auf, so wird dann schon von einem Megakaryozyten gesprochen. Die Megakaryozyten zeigen verschiedene Reifegrade, die durch die unterschiedliche Dichte der Granulation im Zytoplasma zu erkennen sind. Die einzelnen Entwicklungsschritte sind somit: Stammzelle – Megakaryoblast – Megakaryozyt – Thrombozyt. Die gesamte Plättchenproduktion wird durch das Wachstumshormon Thrombopoetin gesteuert. Die Bildung der Plättchen dauert im Schnitt 4 Tage.

Der Thrombozyt

Thrombozyten haben im Ausstrich eine Größe von 1–4 µm bzw. ein Zellvolumen von 2–20 fl. Die jungen Thrombozyten sind dabei größer als die älteren. Die Thrombozyten sind die kleinsten Blutkörperchen, haben keinen Zellkern, aber einen Rest mRNA aus den Megakaryozyten. Im Ausstrich stellen sich die Thrombozyten als kernlose Zellen mit einer blassbasophilen Grundfarbe und rötlicher Granula dar.

Von den Thrombozyten zirkulieren ca. 70–80 % im Blut. Die übrigen 20–30 % werden in der Milz gespeichert. Der Abbau der Thrombozyten erfolgt auch in der Milz und teilweise in der Leber. Ihre durchschnittliche Lebensdauer beträgt, je nach Literatur, 5–12 Tage, mit einem Mittelwert von 7 Tagen. Eine Verkürzung der Thrombozytenüberlebensdauer wird bei einer Splenomegalie (Milzvergrößerung) oder vorhandenen antithrombozytären Antikörpern, wie bei der idiopathischen thrombozytopenischen Purpura (ITP), gesehen. Umgekehrt kann es nach einer Splenektomie (Entfernung der Milz) zu einem starken Anstieg der Blutplättchen kommen. Die normale Zahl der Thrombozyten beträgt im Blut 150.000–300.000 /µl (je nach Literaturangabe).

Die Funktion der Thrombozyten

Thrombozyten spielen eine wichtige physiologische Rolle in der Blutgerinnung. Vor allem in den Arterien mit ihrer starken Strömung sind die Blutplättchen die primären Faktoren für die Blutgerinnung, indem sie sich an freiliegende Kollagenfasern verletzter Blutgefäße in der ersten noch reversiblen Phase der Thrombozytenadhäsion (Anhaftung) zunächst anlagern und zusammenballen. Dieser Vorgang entsteht durch die Bindung von Thrombozytenrezeptoren (GPIb) an den von-Willebrand-Faktor, welcher am Subendothel (Gewebe) gebunden ist. Während der Adhäsion kommt es zu einer Formveränderung der Thrombozyten, zur Bildung von Pseudopodien, wodurch eine effektive Abdichtung der Gefäßläsion begünstigt wird, und zur Freisetzung der Inhaltsstoffe aus den Granula. Diese Inhaltsstoffe aktivieren andere Thrombozyten. In der zweiten und irreversiblen Phase der Thrombozytenaggregation (Adhäsion zwischen zwei Thrombozyten) werden Prostaglandine sowie sogenannte «vasoaktive Substanzen» gebildet.

Möglichkeiten zur Zählung von Thrombozyten:

Trennung der Zellen nach Volumen – das Impedanzmeßprinzip

Früher erfolgte die Zählung der Thrombozyten in der Zählkammer. Heute werden die Thrombozyten fast ausschließlich, zusammen mit dem restlichen Blutbild, automatisiert mit einem Hämatologiesystem gemessen. Die automatisierte Bestimmung der Thrombozytenzahl hat die Kammerzählung in den Laboren massiv vereinfacht und qualitativ deutlich verbessert. Trotzdem ist die technische Validierung der Thrombozytenzahl nicht ganz einfach. Störfaktoren machen die automatisierte Messung manchmal überprüfungsbedürftig.

Zur Bestimmung der Zellkonzentration werden die Zellen beim Impedanzmeßprinzip (Widerstandsmeßprinzip) nacheinander durch eine Kapilaröffnung geleitet. Dabei gibt die Zelle beim Durchtritt ein elektronisches Signal, welches proportional zum Volumen der Zelle ist. Somit werden die Zellen anhand ihrer Größe identifiziert und in einer Volumenverteilungskurve dargestellt. Erythrozyten und Thrombozyten werden entsprechend ihres Volumens voneinander getrennt. Bei dieser Methode kann es aber zu messtechnischen Irritationen kommen, wenn Erythrozyten und Thrombozyten nicht eindeutig getrennt werden können. Dies kann der Fall sein, wenn die

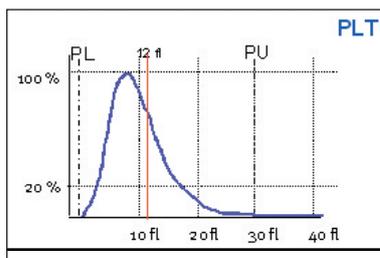


Abb. 2: Thrombozytenverteilungskurve

Thrombozyten ein größeres Volumen haben als 30 fl (Pseudothrombopenie verursacht durch z. B. Riesenthrombozyten) oder die Erythrozyten kleiner als 25 fl (Pseudothrombozytose durch z. B. Fragmentozyten) sind. Das hämatologische Meßsystem gibt eine entsprechende Warnmeldung und der Anwender muss die Probe mit einer zweiten Methode auf Plausibilität testen.

Für die Überprüfung des Zählwertes bei Verdacht auf eine Fehlbestimmung kommen verschiedene Möglichkeiten in Frage:

Die Kammerzählung:

Das Prinzip der Zählkammerzählung berücksichtigt das Lyseverhalten der Zellen. In der Neubauer-Kammer werden die Erythrozyten lysiert, während die Thrombozyten intakt bleiben. Somit ist eine klare Trennung der beiden Zellpopulationen gegeben. Wie aber schon erwähnt, wurde die Zählkammerbestimmung für die Thrombozyten in der Routine weitgehend abgeschafft. Neben der Zeitersparnis durch die automatisierte Zählung ist einer der wichtigsten Gründe der hohe statistische Fehler. Gerade bei niedrigen Thrombozytenzahlen ist die manuell bestimmte Thrombozytenzahl sehr ungenau, es bedarf einer gewissen Routine bei dieser Methode.

Wird die verstaubte Zählkammer nur selten aus dem Schrank geholt, so verursacht die mangelnde Routine häufig ein ungenaues Zählergebnis.

Die richtige Kammer muss gewählt (Neubauer-Kammer) und diese auch ausreichend von Schmutz und Fetttropfchen gereinigt werden. Weitere Fehlerquellen können in der richtigen Erstellung der Verdünnung und der homogenen Verteilung der Zellen in der Kammer liegen. Somit sollte die manuelle Zählmethode nur bei klarer Indikation und mit dem nötigen Respekt vor der Richtigkeit angewandt werden. Die Zählkammer kann aber trotzdem eine Richtigkeitskontrolle des automatisierten Zählwertes sein. Ein weiterer Vorteil ist, dass zudem meistens die Zählkammer als Notfallsystem vorliegt.

Thrombozytenschätzung nach Fonio:

Eine weitere Möglichkeit, einen Zählfehler auszuschließen, ist die Methode nach Fonio. Diese Methode gilt als quantitative Schätzung der Thrombozyten und wird bei bei 1000facher Vergrößerung (Okular 10, Objektiv 100) durchgeführt. Dabei gilt, dass 1 Thrombozyt pro Blickfeld 20.000/ μL Thrombozyten im zirkulierenden Blut entspricht. Die Werte erlauben eine orientierende Beurteilung, können aber nicht exakt sein. Es lässt sich mit dieser Methode, wie auch mit der Kammerzählung, eine Richtigkeitskontrolle des automatisch gezählten Thrombozytenwertes, z.B. bei Riesenthrombozyten, durchführen. Zudem ist bei der Beurteilung der Thrombozyten im Ausstrich auch auf Aggregate zu achten. Thrombozytenaggregate befinden sich häufig in der Fahne des Ausstriches, da sie aufgrund ihrer Größe leicht dorthin verschoben werden.

Zählung der Thrombozyten mittels RNA-Anfärbung und Durchflusszytometrie

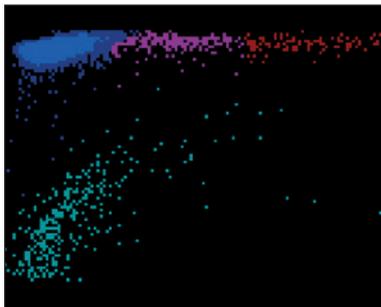


Abb. 3: Das PLT-fl Scattergramm

Eine andere Alternative zur Kontrolle des Thrombozytenwertes ist die Anfärbung der Thrombozyten mit einem RNA-Fluoreszenzfarbstoff. Dabei wird die RNA der Thrombozyten mit einem patentierten Fluoreszenzfarbstoff angefärbt, der speziell für Diodenlaser entwickelt wurde. Anschließend werden die Thrombozyten durchflusszytometrisch mittels Halbleiterlasertechnologie erfasst. Diese RNA/DNA-Färbung versetzt das System in die Lage, Riesenthrombozyten (gleiches Volumen wie Erythrozyten, aber Unterscheidung durch RNA-Gehalt) und Fragmentozyten (haben keine RNA) richtig einzuordnen. Somit wird anhand der Fluoreszenzaktivität und des Volumens der Zellen der exakte Thrombozytenwert automatisiert ermittelt. Die Hämatologiesysteme der X-Serie von SYSMEX mit Retikulozytenkanal haben die RNA-Anfärbung der Thrombozyten als Methode integriert. Bei diesem Meßsystem schaltet das System im Falle von Interferenzen mittels eines automatischen Algorithmus auf den Fluoreszenzthrombozytenwert PLT-O um. Riesenthrombozyten und Proben mit Fragmentozyten werden somit z. B. mit der ersten automatischen Messung richtig gemessen. Diese kostengünstige, vollautomatisierte fluoreszenzmarkierte Thrombozytenmessung zeigt eine exzellente Korrelation mit der Referenzmethode (die immundurchflusszytometrische Bestimmung mittels CD-61).

Trennung durch Erkennung der Membranrezeptoren CD61, CD41.

Die immunologische Markierung der Thrombozyten mit spezifischen monoklonalen Antikörpern ist eine gute Möglichkeit, den Wert zu überprüfen. Für die Membranrezeptorererkennung werden die monoklonalen Antikörper CD-61 und CD-41 verwendet. Diese CD-61/CD-41-Ratio-Methode hat seit einigen Jahren die Kammerzählung als Referenzmethode abgelöst. Vorteil dieser Methode ist die extrem gute Erkennung aller Thrombozytengrößen. Der Nachteil dieser Methode liegt darin, dass sie nicht immer routinetauglich und leider auch sehr teuer ist.

Analytische Interferenzen der Thrombozyten

Analytische Interferenzen können eine Pseudothrombozytopenie oder eine Pseudothrombozytose verursachen. So kann eine Pseudothrombozytopenie durch Riesenthrombozyten, retikulierte Thrombozyten oder Thrombozytenaggregate und EDTA- Unverträglichkeit verursacht werden. Eine Pseudothrombozytose kann durch das Vorhandensein von Fragmentozyten oder auch eventuell durch Bakterien verursacht werden.

Die im Folgenden beschriebenen Interferenzen beziehen sich rein auf Messmethoden, die nur nach Volumen bzw. Größe zwischen Erythrozyten und Thrombozyten trennen (Impedanzmeßprinzip).

Riesenthrombozyten, retikulierte Thrombozyten

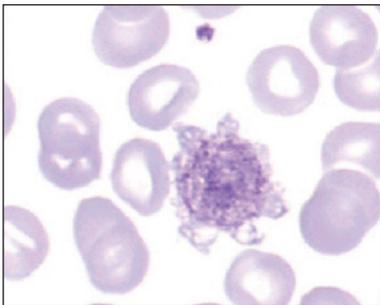


Abb. 4: Riesenthrombozyt

Als Riesenthrombozyten werden sehr große Thrombozyten bezeichnet. Riesenthrombozyten können angeborene Erkrankungen, wie das Bernard Soulier Syndrom, als Ursache haben, aber auch «Begleiterscheinungen» von erworbenen Erkrankungen, wie die Essentielle Thrombozythämie, sein. Retikulierte Thrombozyten (unreife Thrombozyten) entstehen häufig bei einem gesteigerten Thrombozytenbedarf. Sie sind ein bis zwei Tage alte Thrombozyten, die durch Abschnürung aus den Megakaryozyten gebildet werden. Retikulierte Thrombozyten sind größer als reife Thrombozyten und beinhalten mehr RNA. Ein erhöhter Wert von retikulierten Thrombozyten ist ein Anzeichen dafür, dass das Knochenmark sehr aktiv ist und vermehrt neue Thrombozyten gebildet werden. Das Knochenmark reagiert damit, größere Thrombozyten von den Megakaryozyten abzuschneiden.

Wie schon beschrieben, werden die Thrombozyten messtechnisch entsprechend ihrer Größe von den Erythrozyten getrennt und separat gezählt. Riesenthrombozyten oder retikulierte Thrombozyten können aufgrund ihrer Größe oberhalb des Thrombozytenschwellenwertes liegen. Sie können selbst die gleiche Größe wie Erythrozyten haben. Dadurch kann es bei automatisierten Messmethoden, die rein nach der Größentrennung verfahren, zu einem Zählproblem kommen. Dies wird entsprechend mit einer Warnmeldung angegeben. Die großen Thrombozyten werden fälschlicherweise als Erythrozyten gezählt und, wird die Warnmeldung missachtet, kann es zur Angabe einer Pseudothrombozytopenie kommen. Für die Bestimmung der korrekten Thrombozytenzahl bedeutet dies, dass der Wert mit einer der oben genannten Methoden kontrolliert werden muss.

Thrombozytenaggregation, EDTA-Unverträglichkeit

Ein fehlerhafter niedriger Thrombozytenwert ist häufig Folge von Thrombozytenaggregaten oder seltener auch von Satellitenbildung. Thrombozytenaggregate können durch Aktivierung der Thrombozyten, z.B. abnahmebedingt bei schwieriger Venenpunktion oder anderen Möglichkeiten der Fehlannahme, entstehen. Aber auch antikörpervermittelte Thrombozytenaggregate können vorkommen. Hierbei handelt es sich meistens um eine EDTA-Unverträglichkeit. In selteneren Fällen können aber auch die Antikoagulanzen Heparin oder Citrat die Ursache sein. Auch die Satellitenbildung ist ein antikörpervermitteltes EDTA-abhängiges Phänomen. Diese durch Antikoagulanzen verursachten Thrombozytenaggregationen stellen aber in vivo kein Problem dar. Lediglich nach der Abnahme kann dieses Phänomen zu einer falschen Zellzahlbestimmung führen. Die Richtigkeit einer unerwartet niedrigen Thrombozytenzellzahl muss immer überprüft werden. In vielen Fällen wird zwar vom Hämatologiesystem eine entsprechende Warnmeldung generiert und eine abnormale Verteilungskurve angezeigt. Man muss aber auch damit rechnen, dass das Thrombozytenaggregat durch eine inhomogene Verteilung der Probe nicht vom System angesaugt wurde, sondern sich noch im Röhrchen befindet. Dies kann vor allem bei großen Aggregaten der Fall sein. Eine Überprüfung des Röhrchens und gegebenenfalls eine neue Abnahme sind notwendig. Ist die Thrombozytenaggregation durch das Antikoagulanzen ausgelöst, muss eine neue Probe mit einem anderen Antikoagulanzen (z.B. Citrat) angefordert werden. Generell gilt, dass ein Thrombozytenwert, der trotz Bestätigung im Ausstrich als unplausibel gilt, mit einer neuen Abnahme bestätigt werden sollte.

Fragmentozyten

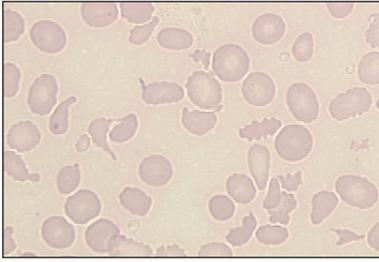


Abb. 5: Dysplastische Erythrozyten eines MDS-Patienten

Fälschlich erhöhte Thrombozytenwerte können durch Erythrozytenfragmente oder dysplastische Erythrozyten (z.B. bei MDS-Patienten) verursacht werden. Zahlreiche Fragmente sind kleiner als 25 fl und fallen somit unter den oberen messtechnischen Schwellenwert für Thrombozyten. Selbst mit variablen Schwellenwerten ist es nicht immer möglich, sehr kleine Erythrozyten oder Erythrozytenfragmente von den Thrombozyten zu trennen. Eine genaue Thrombozytenzahl kann in diesen Fällen durch die Fluoreszenzmarkierung der Thrombozyten oder auch, unter Berücksichtigung des statistischen Fehlers, durch die Kammerzählung bestimmt werden.

Bakterien

Sehr kleine Partikel wie WBC-Fragmente oder «Nicht-Zell-Anteile», wie z.B. Bakterien, können fälschlicherweise als Thrombozyten gezählt werden. Da die Partikelgröße aber zumeist weniger als 2 fl beträgt, wird vom System eine Warnmeldung generiert und der Anwender zur Leerwertüberprüfung und anschließender Reinigung aufgefordert, wenn sich die Warnmeldung bestätigt.

Quellnachweis:

- (1) »Das Blutplättchen« (Meinrad Gawaz)
- (2) »Manual zum Mikroskopierkurs Hämatologie 2005« (R. Fuchs, J. Thomalla)
- (3) »Roche Grundkurs hämatologische Morphologie« (Barbara J. Bain, Dieter Huhn)
- (4) »SYSMEX Case Forum« (www.sysmex-europe.com/caseforum/)
- (5) »XE-2100: Bedeutung der Fluoreszenzmarkierten Thrombozyten-Bestimmung im Vergleich zur CD-61-markierten Thrombozyten-Bestimmung« (SYSMEX Xtra)
- (6) »Thrombozytenverteilungskurven: Interpretationen, Möglichkeiten und Grenzen« (SYSMEX Xtra)