

# Einfluss von Herstellungstechnik und Lagerungsbedingungen auf die Stabilität ausgesuchter Gerinnungsfaktoren in tiefgefrorenem Plasma des Pferdes

Karsten Feige<sup>1</sup>, Jessika-M. Müller<sup>1</sup>, Franziska B. Ehrhart<sup>2</sup> und Sabine B. R. Kästner<sup>2</sup>

Klinik für Pferde<sup>1</sup>, Klinik für Kleintiere<sup>3</sup>, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover und Pferdeklinik der Vetsuisse Fakultät der Universität Zürich<sup>2</sup>

## Zusammenfassung

Blutplasma wird beim Pferd unter anderem zur Therapie von aktiven Blutungen und Koagulopathien empfohlen. Für das Pferd existieren bezüglich der Stabilität von Gerinnungsfaktoren in Plasmapräparaten keine Untersuchungen. Ziel der vorliegenden Arbeit war es deshalb, den Einfluss von Lagerungsdauer und Lagerungstemperatur auf die Haltbarkeit von Gerinnungsfaktoren in verschiedenen hergestellten Plasmapräparaten zu untersuchen. In die Studie wurden 6 gesunde Freiburger-Pferde als Spendertiere einbezogen. Sie wurden zunächst einer Plasmapherese und 4 Wochen später einer Vollblutspende mit anschließender Plasmagewinnung durch Blutbeutel-Zentrifugation oder Schwerkraft-Sedimentation unterzogen. Die Plasmapräparate wurden unmittelbar nach deren Gewinnung tiefgefroren und anschliessend bei -20° C oder bei -70° C gelagert. Die aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT), die Prothrombinzeit (PT), die Thrombinzeit (TZ), Faktor (F) V und F VIII sowie Antithrombin (AT) III wurden unmittelbar vor dem Einfrieren und anschliessend nach 90, 180, 270 und 360 Tagen untersucht. Das Herstellungsverfahren wirkte sich nur unbedeutend auf die Eigenschaften des Plasmas während der Lagerung aus. Alle gemessenen Parameter waren über den Untersuchungszeitraum von 360 Tagen bei einer Lagerungstemperatur von -70° C im Wesentlichen stabil im Referenzbereich, wohingegen bei einer Lagerungstemperatur von -20° C eine signifikante Verlängerung der Prothrombinzeit (PT), der aktivierten partiellen Thrombinzeit (aPTT) und der Thrombinzeit (TZ) sowie ein Aktivitätsverlust von Faktor (F) V und F VIII festgestellt werden konnte. Der Plasmaproteingehalt und die Antithrombin III-Aktivität waren auch bei -20° C grösstenteils stabil. Bei einer Lagerungstemperatur von -20° C waren die Globaltests gegenüber einer Lagerungstemperatur von -70° C während der Lagerung signifikant länger ( $P < 0.05$ ). Die Aktivität der Faktoren V und VIII war bei -20° C signifikant geringer als bei -70° C ( $P < 0.05$ ), wohingegen sich die AT III-Aktivität bei Lagerungstemperaturen von -20° C und -70° C nicht unterschied. Nach den Ergebnissen der vorliegenden Untersuchung ist die Lagerung von Pferdeplasma bei einer Temperatur von -70° C gegenüber einer Lagerung von -20° C zu bevorzugen, da über die Dauer von mindestens 1 Jahr ein unverändertes Gerinnungspotenzial aufrecht erhalten werden kann. Auf Grund dieser Eigenschaften bietet bei -70° C gelagertes Pferdeplasma optimale Voraussetzungen zur Therapie von Erkrankungen mit einem Mangel an Gerinnungsfaktoren.

**Schlüsselwörter:** Plasmapherese, Plasma, Pferd, Gerinnungsfaktoren, Lagerung

## Effects of collection technique and storage conditions on the stability of coagulation factors in frozen equine plasma

The purpose of the present study was to determine the effects of temperature and duration of storage on the stability of coagulation factors in equine plasma produced using three different methods. Six clinically healthy Freiburger horses weighing  $513 \pm 45$  kg (mean  $\pm$  SD) were used as blood donors. In all horses, plasma was collected via plasmapheresis and 4 weeks later, whole blood was collected for plasma production by blood-bag centrifugation and gravity sedimentation. Aliquots of plasma were frozen at -20 °C and -70 °C immediately after collection. Partial thromboplastin time (aPTT), prothrombin time (PT), thrombin time (TT), factor V, factor VIII, antithrombin (AT) and total plasma protein content were determined before freezing and after 90, 180, 270 and 360 days of storage. The method of production of plasma did not affect the measured parameters in frozen equine plasma. The values for PT, aPTT, TT, factors V and VIII and antithrombin in all samples stored at -70 °C did not differ significantly from baseline values after 360 days. In contrast, all determined plasma parameters but AT changed significantly from baseline values when stored at -20 °C ( $p < 0.05$ ). The global clotting times of samples stored at -20 °C became significantly longer than those stored at -70 °C during the time of storage ( $p < 0.05$ ). Activities of factors V and VIII in samples stored at -20 °C were significantly lower ( $p < 0.05$ ) than in samples stored at -70 °C. It was concluded that independently of the collection technique equine plasma should be stored at -70 °C rather than -20 °C to ensure preservation of coagulation factors for up to one year.

**Keywords:** plasmapheresis, plasma, horse, coagulation variables, storage

## Einleitung

Blutplasma wird beim Pferd unter anderem zur Therapie von aktiven Blutungen und Koagulopathien empfohlen (Morris 1998, Semrad 1999, Feige et al. 2002). Voraussetzung für eine effektive Therapie ist Plasma mit einem hohen Gehalt aller Gerinnungsfaktoren. Neben frisch gewonnenem Plasma (Fresh Plasma, FP) ist frisch gefrorenes Plasma (Fresh Frozen Plasma,

FFP) dazu am besten geeignet. FFP wird innerhalb von 6 - 8 Stunden nach der Gewinnung des Plasmas auf unter -18° C gefroren (Mooney 1992, Vengelen-Tyler 1999a) und enthält sowohl die stabilen wie auch die labilen Faktoren des Gerinnungssystems in physiologischen Konzentrationen (Authement et al. 1987). Wird mit dem Einfrieren länger als 8 Stunden gewartet, so nimmt die Aktivität der Gerinnungsfaktoren ab (Authement et al. 1987, Mooney 1992, Schneider 1995).

Weitere Einflüsse, die die Plasmaqualität beeinträchtigen, sind die Blut- bzw. Plasmaentnahmetechnik, die Herstellung des Plasmas, die Einfriertechnik sowie die Lagerungs- und Auftaubedingungen (Kellner et al. 1985, Sohngen et al. 1987). Als Methode der Wahl zur Plasmaherstellung beim Pferd muss die Plasmapherese betrachtet werden, da auf diesem Weg qualitativ hochwertiges Plasma mit einer geringen Zellzahl und mit einer gegenüber dem Spendertier unveränderten Aktivität der Gerinnungsfaktoren gewonnen werden kann (Feige et al. 2003). Eine geringe Zellzahl ist zur Vermeidung immunogener Reaktionen von Bedeutung (Becht und Gordon 1987, Morris 1998, Vengelen-Tyler 1999a) und verhindert eine Aktivierung des Gerinnungssystems während des Einfriervorganges (Illert 1986, Neumeyer et al. 1993, Bundesärztekammer 2001).

In Bezug auf die Haltbarkeit von Gerinnungsfaktoren in gefrorenem Plasma existieren für den Menschen sehr unterschiedliche zeitliche Angaben. Als besonders labile Gerinnungsfaktoren gelten Faktor V und Faktor VIII (Nilsson et al. 1983, Vengelen-Tyler 1999a). Angaben über deren Stabilität bei einer Lagerungstemperatur von  $-30^{\circ}\text{C}$  reichen von 1 Jahr (Blajchman et al. 1979, Smak Gregoor et al. 1993, Vengelen-Tyler 1999a) bis zu 3 Jahren (Kotitschke et al. 2000). In anderen Arbeiten wird ein erheblicher Verlust der Faktor VIII-Aktivität unter ähnlichen Lagerungsbedingungen beschrieben (Rock 1983, Ofosu et al. 1985, Schmotzer et al. 1985).

Für das Pferd existieren bezüglich der Stabilität von Gerinnungsfaktoren in Plasmapräparaten keine Untersuchungen. Ziel der vorliegenden Arbeit war es deshalb, den Einfluss von Lagerungsdauer und Lagerungstemperatur auf die Haltbarkeit von Gerinnungsfaktoren in Plasmapräparaten zu untersuchen, die mit verschiedenen Techniken hergestellt wurden.

## Material und Methodik

### Pferde

Als Spendertiere dienten 6 Pferde der Freiburger-Rasse (5 Stuten, 1 Wallach) im Alter von 4 bis 14 ( $\pm s = 9.4 \pm 4.6$ ) Jahren. Sie waren klinisch gesund und zeigten vor Versuchsbeginn weder in der hämatologischen noch in der blutchemischen Untersuchung Abweichungen von der Norm. Ihr Körpergewicht betrug  $513.3 \pm 45.0$  kg. Alle Pferde wurden in Einzelboxen gehalten, mit Heulage und Hafer sowie mit einem mineralstoffhaltigen Zusatzfuttermittel gefüttert und täglich eine Stunde in einer Führmaschine bewegt. Sie waren entwurmt und gegen equine Influenza und Tetanus geimpft.

### Studiendesign

Die Untersuchung wurde als „Cross-over-trial“ durchgeführt, bei dem zunächst bei allen Pferden eine Plasmaspende mit Hilfe einer maschinellen Plasmapherese und vier Wochen später eine Vollblutspende erfolgte. Die Herstellung des Plasmas erfolgte während der Plasmapherese (Blutzellseparator AS 104, Fresenius AG) durch direkte Entnahme des Plasmas in Auffangbeutel (COMPOFLEX<sup>®</sup>, 450 ml, NPBI RUNDE ZZ 41, Emmer Compasuum, Niederlande). Im Zusammenhang mit der Vollblutspende wurde das gespendete Blut je zur Hälfte

in Zweifachbeuteln (PL 146-CPDA-1-63 ml, Fenwal<sup>®</sup> BAXTER S.A., Maurepas, Frankreich) oder in 500 ml-Glasflaschen mit 50 ml 3.8%-Natriumzitrat aufgefangen. Unmittelbar im Anschluss an die Vollblutspende wurde Plasma mit Hilfe der Blutbeutel-Zentrifugationsmethode (ROTIXA 50 RS, Hettich Laborzentrifugen, Bäch, Schweiz) oder durch dekantieren des Plasmaüberstandes nach 24stündiger Sedimentation in den Glasflaschen (Schwerkraft-Sedimentationsverfahren) hergestellt.

Nach der Plasmapherese und nach der Blutbeutel-Zentrifugation wurden je 8 Aliquots des gewonnenen Plasmas zunächst in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Anschliessend wurden je 4 Aliquots bei  $-20^{\circ}\text{C}$  und bei  $-70^{\circ}\text{C}$  über die Dauer von bis zu 1 Jahr gelagert. Das nach Schwerkraft-Sedimentation gewonnene Plasma wurde nicht schockgefroren, sondern lediglich bei  $-20^{\circ}\text{C}$  in 4 Glasflaschen tiefgefroren und ebenfalls 1 Jahr aufbewahrt. Zur Untersuchung wurde das tiefgefrorene Plasma in einem Wasserbad bei  $37^{\circ}\text{C}$  aufgetaut.

### Laboruntersuchungen

Zur Erstellung basaler Vergleichswerte (Tag 0) wurden alle untersuchten Parameter unmittelbar vor dem Einfrieren des Plasmas bestimmt. Weitere Messungen erfolgten 90, 180, 270 und 360 Tage später.

Die aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT) (Dade<sup>®</sup> Actin<sup>®</sup> FS Activated PTT Reagent, Dade Behring Marburg GmbH, Marburg), die Prothrombinzeit (PT) (Dade<sup>®</sup> Innovin<sup>®</sup>, Dade Behring Marburg GmbH, Marburg) und die Thrombinzeit (TZ) (Rinderthrombin, 5000 U in 2 ml; Diagnostec; Liestal, Schweiz) wurden auf einem Coagulation Analyzer (BCS<sup>®</sup> Coagulation Analyzer, Dade Behring Marburg GmbH, Marburg) bestimmt. Die Bestimmung der Faktor V- (Gerinnungsfaktor V-Mangelplasma, Dade Behring Marburg GmbH, Marburg), Faktor VIII- (Gerinnungsfaktoren VIII-, IX-, XI- und XII-Mangelplasma, Dade Behring Marburg GmbH, Marburg) und der Antithrombin III-Aktivität (Chromogenix-Instrumentation Laboratory SpA, Mailand, Italien) erfolgte mit dem gleichen Gerät. Zur Kalibrierung wurde humanes Standard-Normalplasma verwendet. Die Proben wurden routinemässig im Verhältnis 1:2 mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt. Das Messergebnis wurde anschliessend entsprechend der Verdünnung multipliziert. Der Gesamtplasmaproteingehalt wurde ebenfalls automatisiert gemessen (COBAS INTEGRA Total Protein; COBAS INTEGRA Analyzer; Roche Diagnostis).

### Statistik

Die statistischen Berechnungen erfolgten mit einer Computer Software (Systat<sup>®</sup> 7.0 für Windows<sup>®</sup>, SPSS, Chicago, USA). Auf Grund der Normalverteilung aller Messwerte wurde jeweils der Mittelwert ( $\pm s$ ) angegeben. Veränderungen über die Zeit innerhalb einer Gruppe sowie der Vergleich mehrerer Gruppen untereinander wurden mit Hilfe einer Varianzanalyse für wiederholte Messungen (ANOVA) durchgeführt. Bei signifikanter F-Statistik erfolgte eine weitere Untersuchung entweder mit einem t-Test oder mit einem gepaarten t-Test, die jeweils Bonferroni-korrigiert wurden.

## Ergebnisse

### Einfluss des Herstellungsverfahrens

Das Herstellungsverfahren wirkte sich nur unbedeutend auf die Eigenschaften des Plasmas während der Lagerung aus. Bei gleichen Lagerungstemperaturen lag der Proteingehalt an Tag 0 und an Tag 90 (Lagerungstemperatur  $-70^{\circ}\text{C}$ ) in Plasma, das durch Plasmapherese gewonnen wurde, signifikant über dem Proteingehalt von Plasma, das nach Blutbeutel-Zentrifugation oder Schwerkraft-Sedimentation gewonnen wurde ( $P < 0.05$ ; Abb. 1). In Bezug auf die Gerinnungszeiten waren bei Lagerungstemperaturen von  $-70^{\circ}\text{C}$  in Plasmapherese-Plasma lediglich die aPTT ( $P < 0.05$ ) an 2 Tagen und die TZ ( $P < 0.01$ ) immer signifikant kürzer als in Plasma, das nach Blutbeutel-Zentrifugation präpariert wurde (Abb. 2). Die Aktivitäten von F V, F VIII und AT III zeigten bei gleichen Lagerungstemperaturen keine signifikanten Unterschiede nach den verschiedenen Herstellungsverfahren (Abb. 3).

### Einfluss der Lagerungsdauer

Der Plasmaproteingehalt sank im Plasmapherese-Plasma sowohl bei einer Lagerungstemperatur von  $-20^{\circ}\text{C}$  wie auch bei einer von  $-70^{\circ}\text{C}$  in den ersten 90 bis 180 Tagen nach dem Einfrieren signifikant ab ( $P < 0.01$ ), blieb aber während des ganzen Untersuchungszeitraumes im Bereich der unteren Referenzwertgrenze (Abb. 1). Im Vergleich dazu zeigte der Plasmaproteingehalt in Plasma, das mit Hilfe der beiden anderen Verfahren hergestellt wurde, keine signifikanten Veränderungen während des Untersuchungszeitraumes. Es fiel jedoch auf, dass der Basalwert (Tag 0) bei den Pferden, die einer Vollblutspende unterzogen worden waren, geringgradig erniedrigt war (Abb. 1).

Die Werte von PT, aPTT und TZ zeigten bei einer Lagerungstemperatur von  $-70^{\circ}\text{C}$  innerhalb von einem Jahr gegenüber dem Ausgangswert an Tag 0 nur unbedeutende, nicht signifikante Veränderungen und lagen immer im Referenzbereich (Abb. 2). Im Gegensatz dazu kam es bei einer Lagerungstemperatur von  $-20^{\circ}\text{C}$  im Vergleich zu den Ausgangswerten in den ersten 3 bis 6 Monaten zu einer signifikanten Verlängerung von PT, aPTT und TZ ( $P < 0.05$ ), obwohl die einzelnen Messwerte nur geringgradig ausserhalb des Referenzbereiches lagen.

Die F V-Aktivität (Referenzbereich: 285.5 - 429.1 %) blieb bei einer Lagerungstemperatur von  $-70^{\circ}\text{C}$  unabhängig vom Herstellungsverfahren des Plasmas während des ganzen Beobachtungszeitraumes stabil im Referenzbereich (Abb. 3). Im Gegensatz dazu kam es bei Lagerungstemperaturen von  $-20^{\circ}\text{C}$  zu einem hochgradigen und signifikanten Abfall der F V-Aktivität von  $393.5 (\pm 34.0) \%$ , (P-Pher),  $350.0 \pm 35.4$  (B-Zentr) und  $335.0 \pm 34.3$  (S-Sed) auf zum Teil unter 200 % ( $P < 0.01$ ).

Analog der F V-Aktivität verhielt sich die F VIII-Aktivität. Während sie bei einer Lagerungstemperatur von  $-70^{\circ}\text{C}$  unabhängig vom Herstellungsverfahren des Plasmas über den ganzen Beobachtungszeitraum stabil im Referenzbereich blieb, kam es bei einer Lagerungstemperatur von  $-20^{\circ}\text{C}$  zu einem signifikanten Abfall ( $P < 0.05$ ) bis knapp unterhalb des Referenzbereiches.

### Einfluss der Lagerungstemperatur

Signifikante Unterschiede des Plasmaproteingehaltes bei unterschiedlichen Lagerungstemperaturen von Plasma, das nach den gleichen Verfahren hergestellt wurde, bestanden nicht (Abb. 1).

Die Gerinnungszeiten bei einer Lagerungstemperatur von  $-20^{\circ}\text{C}$  waren gegenüber denen bei einer Lagerungstemperatur von  $-70^{\circ}\text{C}$  nach 100 bis 360 Tagen in der Regel signifikant länger ( $P < 0.05$ ; Abb. 2).

Die Aktivität der gemessenen Gerinnungsfaktoren V und VIII lag bei einer Temperatur von  $-20^{\circ}\text{C}$  mit Ausnahme einzelner Tage immer signifikant unter der Aktivität ( $P < 0.05$ ), die bei Lagerungstemperaturen von  $-70^{\circ}\text{C}$  gemessen wurde (Abb. 3). Im Gegensatz dazu wurde die Antithrombin III-Aktivität weder durch die Lagerung bei  $-70^{\circ}\text{C}$  noch durch die Lagerung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  wesentlich beeinflusst und lag während des Untersuchungszeitraumes immer im Referenzbereich (Abb. 3).

## Diskussion

In der vorliegenden Untersuchung konnte gezeigt werden, dass die Stabilität der gemessenen Parameter im Wesentlichen von der Lagerungstemperatur und nur in geringem Masse von der Methode der Herstellung des Plasmas abhängig ist. Bei gleichen Lagerungstemperaturen konnten beim Vergleich der 3 verschiedenen Herstellungsverfahren nur an einzelnen Tagen unbedeutende Unterschiede bei den gemessenen Parametern festgestellt werden. In früheren Untersuchungen wurde dagegen weniger die Lagerungstemperatur, sondern vor allem die Dauer der Präparationsphase und die Einfriergeschwindigkeit als entscheidend für die Stabilität der Gerinnungsfaktoren im Plasma betrachtet (Koerner und Stampe 1984, Sohngen et al. 1987).

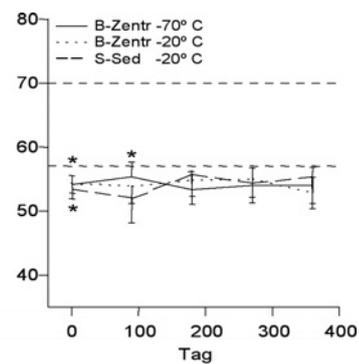
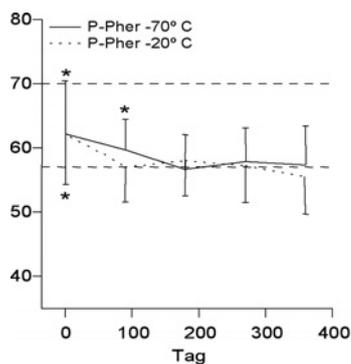
Der Gesamtplasmaproteingehalt blieb während des gesamten Untersuchungszeitraumes unabhängig von der Präparationsmethode und von der Lagerungstemperatur des Plasmas stabil. Es fiel jedoch auf, dass die Ausgangswerte vor der Vollblutspende (Tag 0) signifikant geringer waren als vor der Plasmapherese. Obwohl nach einer Plasmapherese von einer vollständigen Regeneration der Plasmaproteinwerte innerhalb von 30 Tagen ausgegangen wird (Magdesian et al. 1992), sind die in der vorliegenden Untersuchung festgestellten, erniedrigten Gesamtplasmaproteinwerte möglicherweise als eine Folge des Proteinverlustes im Zusammenhang mit der Plasmapherese zu betrachten, die 4 Wochen vor der Vollblutspende durchgeführt wurde.

Vor dem Hintergrund, dass die Globaltests die Gerinnungsaktivität in gefrorenem und wieder aufgetautem Plasma repräsentieren, muss davon ausgegangen werden, dass das gesamte Gerinnungspotential in gefrorenem Plasma bei einer Lagerungstemperatur von  $-70^{\circ}\text{C}$  überhaupt nicht und bei einer Lagerungstemperatur von  $-20^{\circ}\text{C}$  innerhalb eines Jahres nur geringgradig beeinflusst wird.

Die Verlängerung der PT bei einer Lagerungstemperatur von  $-20^{\circ}\text{C}$  kann im Zusammenhang mit dem Verlust der F V-Aktivität gesehen werden. Da F V über das extrinsische System

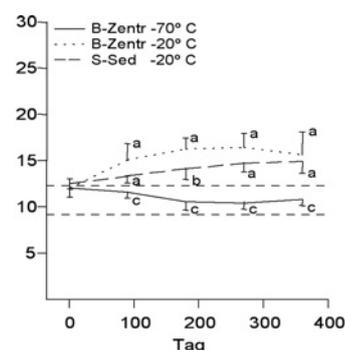
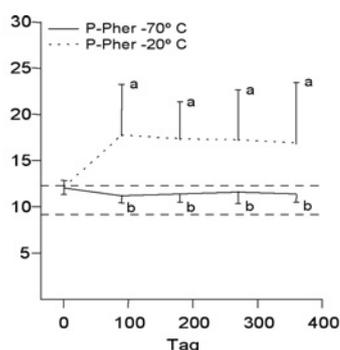
**Abb. 1** Verlauf des Plasmaproteingehaltes in Plasma, das mit Hilfe einer Plasmapherese (P-Pher), nach Blutbeutel-Zentrifugation (B-Zentr) oder nach Schwerkraft-Sedimentation (S-Sed) gewonnen wurde und anschliessend bei verschiedenen Temperaturen gelagert wurde. Signifikante Unterschiede ( $P < 0.05$ ) zwischen P-Pher und B-Zentr bzw. zwischen P-Pher und S-Sed bei gleichen Lagerungstemperaturen sind durch \* gekennzeichnet. Die horizontalen Linien geben den Referenzbereich an.

The concentration of total protein in plasma collected via plasmapheresis (P-Pher), blood-bag centrifugation (B-Zentr) and gravity sedimentation (S-Sed) and stored at two different temperatures. Comparisons are made within and between individual graphs. Significant differences ( $p < 0.05$ ) between P-Pher and B-Zentr and between P-Pher and S-Sed under the same storage conditions are marked with \*. The broken horizontal lines represent the reference range.



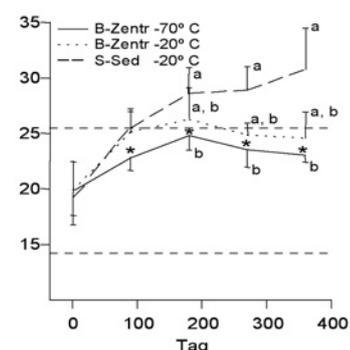
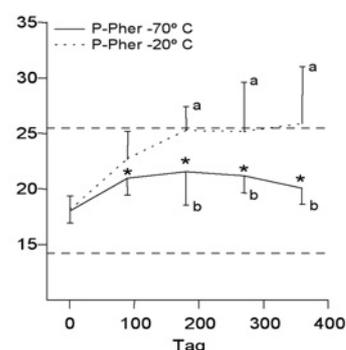
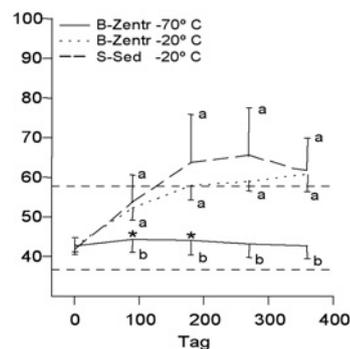
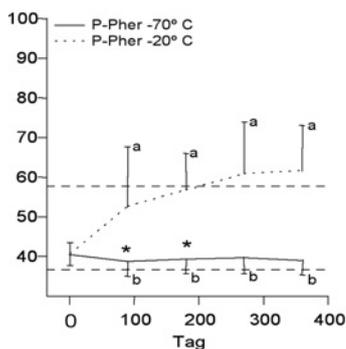
der Gerinnungskaskade aktiviert wird, ist bei einem F V-Aktivitätsverlust mit einer Verlängerung der PT zu rechnen (Smak Gregoor et al. 1993, Morris 1997). Analog kann die Verlängerung der aPTT nach den Ergebnissen dieser Untersuchung als eine Folge der abnehmenden F VIII-Aktivität betrachtet werden, da die aPTT im Wesentlichen die intrinsische Gerinnungskaskade repräsentiert und F VIII auf diesem Weg aktiviert wird. Als Grund für die Verlängerung der TZ wird die Freisetzung von Thromboplastin aus den Thrombozyten ange-

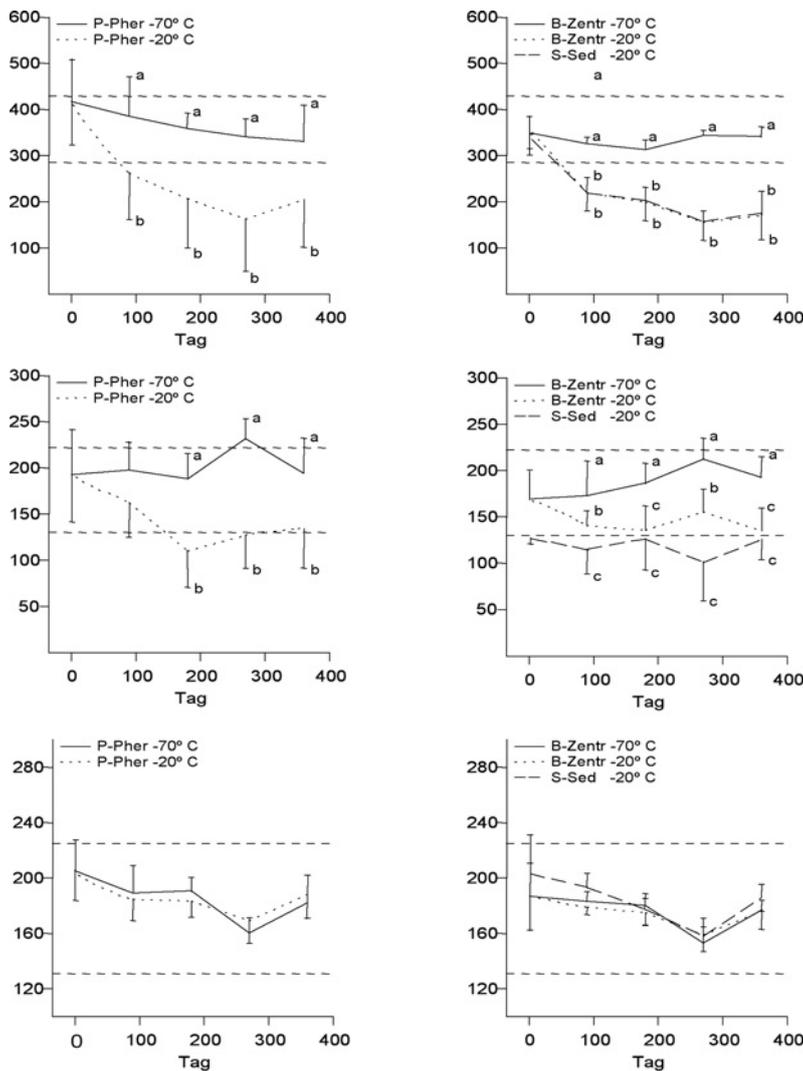
geben, die durch das Einfrieren beschädigt werden und somit zu einer Aktivierung der Gerinnung beitragen (Greene 1980). Plasmapherese-Plasma enthält signifikant mehr Thrombozyten als Plasma, das nach Blutbeutel-Zentrifugation hergestellt wird (Feige et al. 2003) und müsste Nachteile in Bezug auf das Gerinnungspotenzial aufweisen. Beim Vergleich des Verlaufes der TZ konnte dies jedoch nicht nachvollzogen werden. Ein Grund dafür ist sicher, das Plasmapherese-Plasma gegenüber den anderen Herstellungstechniken einen signifikant nie-



**Abb. 2** Verlauf von Prothrombinzeit, aktivierter partieller Thromboplastinzeit (aPTT) und Thrombinzeit in Plasma, das mit Hilfe einer Plasmapherese (P-Pher), nach Blutbeutel-Zentrifugation (B-Zentr) oder nach Schwerkraft-Sedimentation (S-Sed) gewonnen wurde und anschliessend bei verschiedenen Temperaturen gelagert wurde. Signifikante Unterschiede ( $P < 0.05$ ) zwischen P-Pher und B-Zentr bzw. zwischen P-Pher und S-Sed bei gleichen Lagerungstemperaturen sind durch \* gekennzeichnet. Unterschiedliche Indizes (a, b, c) innerhalb einer Grafik an den gleichen Untersuchungstagen repräsentieren signifikante Unterschiede zwischen den jeweiligen Messwerten ( $P < 0.05$ ). Die horizontalen Linien geben den Referenzbereich an.

The activities of prothrombin time, activated partial thromboplastin time (aPTT) and thrombin time in plasma collected via plasmapheresis (P-Pher), blood-bag centrifugation (B-Zentr) and gravity sedimentation (S-Sed) and stored at two different temperatures. For each variable, comparisons are made within and between individual graphs. Significant differences ( $p < 0.05$ ) between P-Pher and B-Zentr and between P-Pher and S-Sed under the same storage conditions are marked with \*. Different indices (a, b, c) on the same day represent significant differences among the measured values ( $p < 0.05$ ). The broken horizontal lines represent the reference ranges.





**Abb. 3** Verlauf der Aktivität von Faktor V, Faktor VIII und Antithrombin III in Plasma, das mit Hilfe einer Plasmapherese (P-Pher), nach Blutbeutel-Zentrifugation (B-Zentr) oder nach Schwerkraft-Sedimentation (S-Sed) gewonnen wurde und anschliessend bei verschiedenen Temperaturen gelagert wurde. Unterschiedliche Indizes (a, b, c) innerhalb einer Grafik an den gleichen Untersuchungstagen repräsentieren signifikante Unterschiede zwischen den jeweiligen Messwerten ( $P < 0.05$ ). Die horizontalen Linien geben den Referenzbereich an.

The activities of factor V, factor VIII and antithrombin in plasma collected via plasmapheresis (P-Pher), blood-bag centrifugation (B-Zentr) and gravity sedimentation (S-Sed) and stored at two different temperatures. Different indices on the same day represent significant differences between the measured values ( $p < 0.05$ ). The broken horizontal lines represent the reference ranges.

drigeren Gehalt an Erythrozyten und Leukozyten hat (Feige et al. 2003). Da es durch den Einfriervorgang zu einer Degeneration der Zellen mit einer Freisetzung von Zellinhalt und einer daraus resultierenden Aktivierung der Blutgerinnung kommt (Illert 1986, Neumeyer et al. 1993, Bundesärztekammer 2001), wird der Nachteil der höheren Thrombozytenzahl durch den Vorteil des wesentlich geringeren Anteils an Erythrozyten und Leukozyten aufgefangen.

Ein weiteres Beurteilungskriterium für die Plasma-Qualität stellt die Aktivität der Gerinnungsfaktoren dar. Die Faktoren V und VIII sind in humanem Plasma die instabilsten Faktoren (Illert 1986, Riggert et al. 1997, Vengelen-Tyler 1999b). So führt z.B. die Lagerung von Frischplasma bei 4° C innerhalb von 4 Wochen zu einem Aktivitätsverlust von mehr als 40 % bei F V und von bis zu 80 % bei F VIII (Smak Gregoor et al. 1993). Dementsprechend wird Faktor VIII als wesentliches Kriterium für die Qualitätsbeurteilung von FFP herangezogen (Illert 1986, Riggert et al. 1997). Damit die Stabilität der Faktoren V und VIII bei einer Lagerungstemperatur von -18° C bis -30° C über die Dauer von einem Jahr gewährleistet werden kann ist es notwendig, dass das Plasma innerhalb von 6 - 8 Stunden nach der Herstellung tiefgefroren wird (Vengelen-Tyler 1999a). Dieser Forderung wurde mit der Herstellung des Plasmas durch Plasmapherese und nach Blutbeutel-Zentrifugation mit unmittelbar anschliessendem Einfrieren im

Rahmen dieser Untersuchung Rechnung getragen. Trotzdem konnte bei einer Lagerungstemperatur von -20° C ein geringgradiger, aber signifikanter Abfall der F VIII-Aktivität bis an die untere Grenze des Referenzbereiches und bei F V sogar ein signifikanter Abfall bis deutlich unterhalb des Referenzbereiches festgestellt werden. Entgegen den Erkenntnissen der Humanmedizin kann also eine Lagerungstemperatur von -20° C nicht als ausreichend für eine gerinnungsfaktorenstabile Lagerung betrachtet werden. Daneben muss nach den Resultaten der vorliegenden Untersuchung F V als der labilere Gerinnungsfaktor beim Pferd betrachtet werden.

Im aufgetauten Plasma sollten mindestens 70 % der ursprünglichen Aktivität messbar sein, damit ein ausreichendes Gerinnungspotenzial im Plasma vorhanden ist (Vengelen-Tyler 1999b, Bundesärztekammer 2001). Dieses Ziel wird entsprechend den vorliegenden Untersuchungsergebnissen bei Lagerungstemperaturen von -70° C bei allen gemessenen Parametern vollumfänglich erreicht. Bei einer Lagerungstemperatur von -20° C werden die Grenzwerte bei F V jedoch zum Teil schon nach 3 Monaten erreicht oder knapp unterschritten. Obwohl auch bei F VIII ein Abfall der Gerinnungsaktivität feststellbar ist, verhält er sich bei einer Temperatur von -20° C doch deutlich lagerungsstabiler. Die vergleichsweise niedrige F VIII-Aktivität an Tag 0, die in dieser Untersuchung nach der Schwerkraft-Sedimentation festgestellt wurde,

ist vor allem auf die Herstellungstechnik zurückzuführen. In einer vorausgegangenen Untersuchung konnte gezeigt werden, dass die Dauer der Sedimentation während des Schwerkraft-Sedimentationsverfahrens mit einem ca. 30%igen Abfall der F VIII-Aktivität verbunden ist (Feige et al. 2003).

Die AT III-Aktivität erwies sich in der vorliegenden Untersuchung unabhängig vom Herstellungsverfahren und von der Lagerungstemperatur als sehr stabil und blieb während des ganzen Untersuchungszeitraumes im Referenzbereich. Diese Ergebnisse decken sich mit Resultaten, die für humanes FFP erarbeitet wurden (Riggert et al. 1997).

## Schlussfolgerung

Das Herstellungsverfahren an sich wirkt sich nur unbedeutend auf die Eigenschaften des Plasmas während der Lagerung aus. Nach den Ergebnissen der vorliegenden Untersuchung ist die Lagerung von Pferdeplasma bei einer Temperatur von  $-70^{\circ}\text{C}$  gegenüber einer Lagerung von  $-20^{\circ}\text{C}$  zu bevorzugen, da über die Dauer von mindestens 1 Jahr ein unverändertes Gerinnungspotenzial im Plasma aufrecht erhalten werden kann. Auf Grund dieser Eigenschaften bietet bei  $-70^{\circ}\text{C}$  gelagertes Pferdeplasma optimale Voraussetzungen zur Therapie von Erkrankungen mit einem Mangel an Gerinnungsfaktoren.

## Literatur

- Authement J. M., Wolfsheimer K. J. und Catchings S. (1987) Canine Blood Component Therapy: Product Preparation, Storage, and Administration. *J. Amer. Anim. Hosp. Assoc.* 23, 483-493
- Becht J. L. und Gordon B. J. (1987) Blood and Plasma Therapy. In: *Current Therapy in Equine Medicine*, 2 edn., Ed: N.E. Robinson, Saunders, Philadelphia. pp 317-322
- Blajchman M. A., Shepherd F. A. und Perrault R. A. (1979) Clinical use of blood, blood components and blood products. *Can. Med. Assoc. J.* 121, 33-42
- Bundesärztekammer (2001) Leitlinien zur Therapie mit Blutkomponenten und Plasmaderivaten, Vorstand und wissenschaftlicher Beirat der Bundesärztekammer, Köln. pp 57-161
- Feige K., Ehrat F. B., Kästner S. B. R. und Schwarzwald C. C. (2003) Automated Plasmapheresis compared with other Plasma Collection Methods in the Horse. *J. Vet. Med. A* 50, 185-189
- Feige K., Gutknecht M., Drouard F. und Auer J. A. (2002) Substitution von Gerinnungsfaktoren mit Hilfe der "Fresh Frozen Plasma - Therapie" bei 4 Pferden mit intraabdominalen Blutungen. *Pferdeheilkunde* 18, 607-611
- Greene C. E. (1980) Coagulation Properties of Fresh-Frozen Canine Plasma During Prolonged Storage. *Amer. J. Vet. Res.* 41, 147-150.
- Illert W. E. (1986) Stabilität von gerinnungsaktivem Frischplasma: Einfluss verschiedener zeitlicher Parameter auf die Aktivität der Blutgerinnungsfaktoren V und VIII bei Herstellung, Lagerung und Rekonstitution. *Krankenhauspharmazie* 12, 530-535
- Kellner S., Stocker U. und Fürst G. (1985) Untersuchungen zur Stabilität von Gerinnungsfaktoren im Plasma, eingefroren nach 6 und 18 Stunden nach Blutentnahme. *Beitr. Infusionsther. klin. Ernähr.* 12, 208-210
- Koerner K. und Stampe D. (1984) Die Stabilität von Faktoren des Gerinnungssystems im tiefgefrorenen Frischplasma während der Lagerung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  und  $-40^{\circ}\text{C}$ . *Beitr. Infusionsther. klin. Ernähr.* 11, 46-50
- Kotitschke R., Morfeld F., Kirchmaier C. M., Koerner K. und Köhler M. (2000) Stability of Fresh Frozen Plasma: Results of 36-Month Storage at  $-20^{\circ}\text{C}$ ,  $-25^{\circ}\text{C}$ ,  $-30^{\circ}\text{C}$  and  $-40^{\circ}\text{C}$ . *Infus. Ther. Transfus. Med.* 27, 174-180
- Magdesian K. G., Brook M. S. und Wickler S. J. (1992) Temporal effects of plasmapheresis on serum proteins in horses. *Am. J. Vet. Res.* 53, 1149-1153
- Mooney S. (1992) Preparation of blood components. *Probl. Vet. Med.* 4, 594-599
- Morris D. D. (1997) Alterations in the clotting profile. In: *Large Animal Internal Medicine*, 2 edn., Eds: Smith, Mosby and Davis, California. pp 498-504
- Morris D. D. (1998) Diseases of the Hemolymphatic System. In: *Equine Internal Medicine*, 1 edn., Eds: S. M. Reed and W. M. Bayly, Saunders, Philadelphia. pp 598-601
- Neumeyer H. F., Quentin S. H. und Wieding J. U. (1993) Vergleichsanalyse verschiedener Plasmapheresemethoden-Moderne Verfahren apparativer Plasmagewinnung im Vergleich untereinander und mit dem manuellen Beutel-Zentrifugationsverfahren. *Beitr. Infusionsther.* 29, 163-189
- Nilsson L., Hedner U., Nilsson I. M. und Robertson B. (1983) Shelf-life of bank blood and stored plasma with special reference to coagulation factors. *Transfusion* 23, 377-381
- Ofori F. A., Blajchman M. A., Kaegi A. und Turc J. M. (1985) Use of segments for the quality control of the factor VIII: coagulant activity of fresh frozen plasma. *Vox Sang.* 48, 213-216
- Riggert J., Mörsdorf S., Pindur G., Köhler M. und Seyfert U. T. (1997) Quality of Fresh-Frozen Plasma during storage. *Vox Sang.* 73, 257
- Rock G. (1983) International forum: What are the critical factors in the production and quality control of frozen plasma intended for direct transfusion or for fractionation to provide medically needed labile Coagulation factors? *Vox Sang.* 44, 253-255
- Schmotzer W. B., Riebold T. W., Porter S. L. und Blauvelt S. R. (1985) Time-saving techniques for the collection, storage, and administration of equine blood and plasma. *Vet. Med.* 80, 89-94
- Schneider A. (1995) Blood components: Collection, Processing, and Storage. *Vet. Clin. North Amer. Small Anim.* 25, 1245-1261
- †Semrad S. D. (1999) Intraabdominal hemorrhage. In: *Equine Medicine and Surgery*, 5 edn., Eds: P. Colahan, I. G. Mayhew, A. Meritt and J. N. Moore, Mosby, St. Louis. pp 790-792
- Smak Gregoor P. J., Harvey M. S., Briet E. and Brand A. (1993) Coagulation parameters of CPD fresh-frozen plasma and CPD cryoprecipitate-poor plasma after storage at 4 degrees C for 28 days. *Transfusion* 33, 735-738
- Söhngen D., Eschholz W., Franke K. und Kretschmer V. (1987) Präparative Einflüsse auf die Gerinnungsaktivität von Fresh Frozen Plasma. *Beitr. Infusionsther. klin. Ernähr.* 18, 181-185
- Vengelen-Tyler V. (1999a) Blood Component Preparation, Storage, Shipping, and Transportation. In: *Technical Manual*, Ed: V. Vengelen-Tyler, American Association of Blood Banks, Bethesda. pp 339-356
- Vengelen-Tyler V. (1999b) Blood Donation and Collection. In: *Technical Manual*, Ed: V. Vengelen-Tyler, American Association of Blood Banks, Bethesda. pp 89-191

Prof. Dr. K. Feige  
Klinik für Pferde  
Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover  
Bischofsholer Damm 15  
30173 Hannover  
karsten.feige@tiho-hannover.de