Aus der Klinik für Anästhesiologie mit Schwerpunkt operative Intensivmedizin
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Untersuchung der Gerinnungsproteinaktivität in aufgetautem und gelagertem Solvent/Detergent-behandeltem Plasma mit Prioneneliminierung unter Berücksichtigung der mikrobiologischen Qualität, der Lagerungsstabilität sowie der klinischen Relevanz

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Martin Krebs
aus Göttingen

Gutachter:	1.	Prof. Dr. med. C. von Heymann
	2.	Prof. Dr. med. T. Volk
	3.	Prof. Dr. J. Biscoping

Datum der Promotion: 22. März 2013

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung **6**
1.1 Überblick über die Entwicklung der Transfusionsmedizin 6
1.2 Überblick über die Physiologie der Blutgerinnung 8
1.3 Indikationen und Anwendung von Plasmapräparaten 10
1.4 Herstellung von Plasmapräparaten 11
1.4.1 Blutspende 11
1.4.2 Gewinnung und Weiterverarbeitung von Plasma 11
1.4.3 Verfügbare Plasmapräparationen 12
1.4.3.1 Gefrorenes Frischplasma, Methylenblau-Licht-behandeltes Plasma und Lyophilisiertes Plasma 13
1.4.3.2 Solvent/Detergent-behandeltes Plasma 14
1.4.3.3 Solvent/Detergent-behandeltes Plasma mit Prionenelimi-nierung 15
1.5 Problemstellung aus dem Kontext der klinischen Anwendung 16
1.6 Bisherige Daten zur Lagerung von aufgetauten Präparaten 18

2 Zielstellung der Arbeit **20**

3 Material und Methoden **21**
3.1 Plasmamaterial 21
3.2 Auswahl der untersuchten Gerinnungsproteine 21
3.3 Festlegung der Messzeitpunkte 22
3.4 Festlegung der Referenzwerte 23
3.5 Untersuchungsprotokoll 24
3.5.1 Auftauvorgang 24
3.5.2 Lagerungstemperatur 25
3.5.3 Versuchsablauf 25
3.5.4 Mikrobiologische Qualitätssicherung 25
3.6 Hämostaseologische Messmethodik 26
3.6.1 Fibrinogen 27
3.6.2 Gerinnungsfaktoren II, V, VII 27
3.6.3 Gerinnungsfaktoren VIII, IX, XI 27
3.6.4 Protein C und Plasmininhibitor 28
3.6.5 Freies Protein S 28
3.7 Statistische Analyse 29

4 Ergebnisse **31**
4.1 Mikrobiologische Qualitätskontrolle . . . 31
4.2 Lagerungsstabilität im Zeitverlauf . . . 31
4.2.1 Statistischer Einfluss der Lagerungsdauer . . . 31
4.2.2 Messzeitpunktbezogene Datenanalyse . . . 37
4.3 Vergleich der Messergebnisse mit Referenzwerten . . . 39
4.3.1 Ausgangssituation nach dem Auftauen . . . 39
4.3.2 Situation nach Lagerung über sechs Stunden . . . 46
4.3.3 Situation nach Lagerung über 24 Stunden . . . 47
4.3.4 Situation nach Lagerung über 144 Stunden . . . 47
4.3.5 Aktivitätsverlauf des Faktors VIII über den Untersuchungszeitraum 49

5 Diskussion **51**
5.1 Mikrobiologische Sicherheit . . . 52
5.2 Lagerungsstabilität . . . 52
5.2.1 Lagerungsstabile Gerinnungsproteine . . . 53
5.2.1.1 Fibrinogen . . . 53
5.2.1.2 Faktor II . . . 53
5.2.1.3 Faktor IX . . . 54
5.2.1.4 Plasmininhibitor . . . 54
5.2.1.5 Protein C . . . 55
5.2.1.6 Freies Protein S . . . 55
5.2.2 Lagerungsinstabile Gerinnungsproteine . . . 56
5.2.2.1 Faktor V . . . 56
5.2.2.2 Faktor VII . . . 57
5.2.2.3 Faktor VIII . . . 58
5.2.2.4 Faktor XI . . . 59
5.3 Klinische Bedeutung des Referenzwertvergleichs . . . 59
5.3.1 Bedeutung des Faktors VIII . . . 63
5.4 Methodenkritik und Ausblick . . . 64

6 Zusammenfassung **66**

7 Literaturverzeichnis **68**

8 Lebenslauf **75**

9 Eigene Publikationen **76**
9.1 Kongressbeiträge . . . 76

10 Selbständigkeitserklärung **78**

11 Danksagung **79**

1 Einleitung

1.1 Überblick über die Entwicklung der Transfusionsmedizin

Aus der modernen Medizin ist der therapeutische Einsatz von Blutprodukten, d. h. Erythrozyten- und Thrombozytenkonzentraten sowie Plasma und seinen Derivaten, nicht mehr wegzudenken. Durch die flächendeckende Verfügbarkeit von aus Spenderblut gewonnenen Präparaten können heute aufwändigste chirurgische Eingriffe durchgeführt, schwerstverletzte Polytraumatisierte behandelt, optimierte onkologische Therapien ermöglicht und seltene Erkrankungen therapiert werden (Seifried et al. 2011). Eine Transfusion von Blutkomponenten erfolgt dabei zur Therapie einer klinisch bedeutsamen Mangelsituation, in der sich ein Patient befindet, also z. B. eines Mangels an Erythrozyten oder plasmatischen Gerinnungsfaktoren. Bisher existiert für keine der drei Blutkomponenten Erythrozyten, Thrombozyten oder Plasma ein artifizieller Ersatz, der den Einsatz von Präparaten aus Spenderblut obsolet machen würde, auch obwohl bereits einzelne Gerinnungsfaktoren wie z. B. Faktor VII und VIII rekombinant hergestellt werden können.

Betrachtet man die Geschichte der Medizin, so findet man die wichtigste Grundlage für die Transfusionsmedizin in der erstmalig korrekten anatomischen Beschreibung des menschlichen Blutkreislaufs durch William Harvey (1578–1657) im Jahr 1628. In den folgenden Jahrzehnten wurden in Europa zahlreiche Bluttransfusionen von Tieren, zumeist von Lämmern, auf Menschen durchgeführt. Die hohe Rate an damit verbundenen Todesfällen führte schließlich um 1660 zu einem generellen Verbot von Transfusionen in Italien und Frankreich. Erst zum Ende des 18. Jahrhunderts wurden erneut Transfusionsversuche, vorerst an Tieren, durchgeführt. Im Jahr 1825 führte James Blundell (1790–1877) in England eine bahnbrechende Fremdbluttransfusion an einer postpartal zu verbluten drohenden Frau erfolgreich durch (Welck et al. 2010). Den nächsten Meilenstein stellte die Entdeckung des AB0-Blutgruppensystems durch Karl Landsteiner (1868–1943) im Jahr 1901 dar (Landsteiner 1901). Hiermit wurde der wichtigste naturwissenschaftliche Grundstein für die moderne Transfusionsmedizin gelegt, wofür Landsteiner im Jahr 1930 den Nobelpreis für Medizin erhielt. In den folgenden Jahrzehnten wurden weitere wichtige

Erkenntnisse zur Blutgruppenserologie gewonnen, wie etwa durch die Entdeckung des Rhesussystems durch Karl Landsteiner und Alexander Solomon Wiener (1907–1976) im Jahr 1940, die zu einer deutlichen Erhöhung der Patientensicherheit in der Transfusionsmedizin führten (Landsteiner und Wiener 1941). Erst durch die Verwendung von Zitrat als Antikoagulans, die durch Richard Lewisohn (1875–1961) in den 1910er Jahren propagiert wurde sowie durch den Zusatz von glukosehaltigen Stabilisatoren zur Haltbarkeitsverbesserung von Erythrozytenkonzentraten wurde eine längere Lagerung der gewonnenen Präparate realisierbar (Lewisohn 1916). Dadurch wurden die indirekte Bluttransfusion, d. h. die Transfusion von zwischengelagerten Blutkomponenten und folglich die flächendeckende Versorgung mit diesen Präparaten möglich.

Erste Blutbanken wurden 1920 in Paris und 1937 in Chicago gegründet. Ab 1950 etablierten sich dann erste Blutspendedienste auch in Deutschland. Die anfangs durchgeführte Vollbluttransfusion wurde im Verlauf zugunsten der Blutkomponententherapie, also der selektiven Transfusion der Blutbestandteile Erythrozyten, Thrombozyten und Plasma, verlassen (Wright-Kanuth und Smith 2002), da entscheidende technische Entwicklungen wie die Hämapherese zur selektiven Thrombozyten- oder Plasmaspende eine vereinfachte Gewinnung von Blutprodukten und eine den einzelnen Blutbestandteilen angepasste Zwischenlagerung ermöglichte. Der Einsatz von biochemischen und biophysikalischen Aufbereitungs- und Reinigungsverfahren, Separations- und Fällungstechniken für einzelne Gerinnungsfaktoren sowie die Möglichkeiten der Konservierung, wie z. B. die Lyophilisierung, führten zur weiteren Optimierung der Herstellung von Blutprodukten. Nach der Trennung der Blutspende in zelluläre Bestandteile und Plasma durch direkte Zentrifugation in Blutspendegefäßen aus Glas, wie sie noch zum Ende des zweiten Weltkriegs verwendet wurden, waren die Präparate noch der Gefahr einer möglichen mikrobiellen Kontamination ausgesetzt. Mit der Einführung eines geschlossenen Beutelsystems aus Polyvinylchlorid (PVC) in den 1950er Jahren zur Blutentnahme und gleichzeitigen Weiterverarbeitung konnten die Blutbestandteile rasch und ohne die Gefahr der Kontamination getrennt und anschließend unter jeweils optimalen Bedingungen gelagert werden (Walter und Murphy 1952). Für humanes Plasma bedeutete dies, dass es steril in einem der Beutel des Entnahmesystems tiefgefroren werden konnte. Bereits in den 1940er Jahren wurden Lagerungsversuche bei Raumtemperatur mit dem damals verfügbaren Plasmamaterial durchgeführt. Da noch nicht alle Gerinnungsfaktoren und vor allem keine differenzierte Nachweismethodik derselben bekannt waren, wurde die Lagerung des Plasmamaterials bis zu 24 Monate anhand der Ergebnisse der damaligen laborchemischen Untersuchungen als unproblematisch eingestuft (Lozner et al. 1944). Die experimentelle Anwendung von über

vier Wochen bis zu 18 Monaten gelagertem Plasma führte allerdings zu dem Verdacht, dass durch die Lagerung eine „toxische Substanz“ entstehe, die Versuchstiere tötet und bei Menschen vergiftungsähnliche Effekte auslöst (Gilding und Nutt 1944). In den folgenden Jahrzehnten wurde mit zunehmender Kenntnis des Gerinnungsystems u. a. durch die neu entwickelten globalen Gerinnungstests (s. u.) eine Abnahme der Gerinnungsfähigkeit des gelagerten Plasmas festgestellt (z. B. Fantl und Nance 1948). Heute wird Blutplasma mit seiner Vielzahl von biologisch aktiven Proteinen des Gerinnungs- und des Immunsystems je nach Herstellungsverfahren (s. u.) tiefgefroren oder in lyophilisierter Form bei Raumtemperatur gelagert und weist je nach Herstellerangabe eine Haltbarkeit zwischen 12 und 30 Monaten auf.

1.2 Überblick über die Physiologie der Blutgerinnung

Erst durch die Kenntnis der komplexen physiologischen und pathophysiologischen Zusammenhänge innerhalb der verschiedenen Systeme der Blutgerinnung wurde die Entwicklung der modernen Transfusionsmedizin insbesondere im Hinblick auf Plasmatransfusionen ermöglicht. Die Systeme der Blutgerinnung werden sowohl über zelluläre Komponenten (Zellen und zellgebundene Proteine) als auch über prokoagulatorische (gerinnungsfördernde) und fibrinolytische (gerinnungshemmende) Proteine des Blutplasmas vermittelt. Veränderungen in diesen Systemen führen entweder zu einer gesteigerten Blutungsneigung oder zu einer gesteigerten Blutgerinnung, die in thrombotischen und thrombembolischen Gefäßverschlüssen münden kann. Zum besseren Verständnis der Messmethodik für die Konzentrations- bzw. Aktivitätsbestimmungen der einzelnen Gerinnungsfaktoren (s. u.) wird im Folgenden neben der aktuellen Theorie zur Physiologie der Blutgerinnung auch das traditionelle Lehrmodell kurz dargestellt.

Das traditionelle Lehrmodell der Gerinnung unterteilt diese in eine primäre und eine sekundäre Hämostase, wobei die primäre Hämostase aus der Thrombozytenaggregation besteht, welche durch eine Freisetzung des von-Willebrandt-Faktor-Proteins aus verletzten Endothelzellen der Gefäßwände aktiviert wird. Die sekundäre Hämostase bezeichnet die sogenannte plasmatische Gerinnung, an der die plasmatischen Gerinnungsfaktoren und -inhibitoren beteiligt sind. Im traditionellen Modell, das auch als Wasserfall-Modell bezeichnet wird (Davie und Ratnoff 1964; MacFarlane 1964), besteht diese aus einer Kaskade nacheinander ablaufender bzw. ineinander greifender biochemischer Reaktionen, die ihre jeweiligen Substrate von einer inaktiven in eine aktivierte Form überführen (z. B. durch enzymatische Spaltung), welche dann selbst als Katalysatoren oder Substrate in

Folgereaktionen eingehen. Innerhalb des Gerinnungssystems steht das prokoagulatorische System mit dem fibrinolytischen System in einem Fließgleichgewicht.

Mit dem traditionellen Wasserfall-Modell lassen sich allerdings bestimmte klinische Krankheitsbilder wie z. B. die Hämophilien oder kongenitale Faktorenmangelerkrankungen nicht vollständig erklären, da das extrinsische und das intrinsische System keine redundanten Systeme darstellen. Das bedeutet, dass das Fehlen eines Faktors und damit ein Funktionsverlust in einem System tatsächlich nicht durch das andere, davon nicht betroffene System der plasmatischen Gerinnung kompensiert werden kann (Hoffman und Monroe 2007). Das aktuelle theoretische Modell der Gerinnung *in vivo* beruht auf dem Konzept einer zellulär basierten Hämostase und geht auf den Ansatz zurück, dass die Hämostase vornehmlich an Zelloberflächen und nicht frei im Blutplasma abläuft (Hoffman 2003; Hoffman und Monroe 2001; Monroe et al. 2007; Roberts et al. 2004). Prinzipiell werden in diesem Modell drei Phasen unterschieden, die zwar getrennt voneinander betrachtet werden können, tatsächlich aber überlappend ineinandergreifen (Hoffman und Monroe 2001). Die erste Phase beschreibt die Initiierung (*initiation*), die durch die Präsentation des Gewebsfaktors (*tissue factor*) auf einer Zellmembran ausgelöst wird, z. B. auf der Membran eines Fibroblasten bei einer Gefäßwandverletzung oder eines Monozyten (hier z. B. bei der disseminierten intravasalen Gerinnung). Dieser Stimulus, die Präsentation des Gewebsfaktors, aktiviert über die Faktoren VII und IX den Faktor X, der die Umwandlung einer ersten geringen Menge Faktor II (Prothrombin) zu Thrombin katalysiert und damit auch erste Thrombozyten binden und aktivieren kann, sofern dies nicht durch Inhibitoren (z. B. Antithrombin III) verhindert wird. Durch die Aktivierung der Thrombozyten beginnt die zweite Phase, die Amplifikation (*amplification*), die dann nicht mehr an der Fibroblastenoberfläche, sondern an der Oberfläche der aktivierten Thrombozyten abläuft. Auf der Thrombozytenoberfläche werden dann die Faktoren VIII, XI und V aktiviert, die damit die Voraussetzung schaffen, dass Faktor X in großem Maße aktiviert werden kann. In der dritten Phase der Ausbreitung (*propagation*) wird Faktor X über die Faktoren IX und VIII aktiviert und katalysiert dann gemeinsam mit Faktor V die endgültige Thrombinproduktion, wodurch es zur Ausbildung eines Thrombus kommt (Hoffman und Monroe 2001; Monroe et al. 2007; Roberts et al. 2004). Anhand dieses Modells einer primär oberflächenvermittelten Gerinnung können verschiedene klinische Krankheitsbilder, z. B. Faktorenmangelerkrankungen, besser erklärt werden (Hoffman 2003).

Patient	kompatibles Plasma
A	A oder AB
B	B oder AB
AB	AB
0	0, A, B oder AB

Tabelle 1.1: AB0-kompatible Plasmatransfusion

1.3 Indikationen und Anwendung von Plasmapräparaten

Der klinische Einsatz von Plasma, das grundsätzlich AB0-gleich bzw. AB0-kompatibel transfundiert wird (Tab. 1.1), ist heute bestimmten Indikationen vorbehalten (Bundesärztekammer 2008). Die Indikation für eine Plasmatransfusion besteht grundsätzlich bei einer aktiven oder drohenden Blutung, die auf einen globalen Mangel an Gerinnungsfaktoren zurückzuführen ist. Auch im Rahmen von Massivtransfusionen bei akuten Blutungen polytraumatisierter Patienten oder bei einem anhaltenden Blutverlust, auch z. B. im Rahmen von Tumoroperationen, die eine Retransfusion des eigenen Patientenbluts verbieten, ist neben dem Ersatz von Erythrozyten die Gabe von Plasma zur Aufrechterhaltung der Homöostase indiziert (AABB Circular 2009; Bundesärztekammer 2008; Geeraedts et al. 2007; Goldstein et al. 2006; O'Shaughnessy et al. 2004; Rossaint et al. 2010; Stanworth 2007; Stanworth et al. 2007; www.transfusionguidelines.org.uk). Seltener ist die schnelle Reversierung der oralen Antikoagulantien Phenprocoumon oder Warfarin ein Einsatzgebiet für Plasma, sofern keine ausreichende Verfügbarkeit eines Prothrombinkonzentrats, d. h. eines Kombinationspräparats aus den Vitamin K-abhängigen Gerinnungsfaktoren (Faktoren II, VII, IX, X), gegeben ist (Goldstein et al. 2006; Ozgonenel et al. 2007). Bei angeborenen Mangelerkrankungen wie dem Faktor V- oder dem Faktor XI-Mangel, für die es keine Einzelfaktorpräparate gibt, sind prophylaktische Plasmagaben von 15 bis 20 ml/kg Körpergewicht vor chirurgischen Eingriffen indiziert (Bolton-Maggs et al. 2004). In seltenen Fällen muss hier auch ein Plasmaaustausch in Erwägung gezogen werden, sofern mit Plasmatransfusionen kein suffizienter Aktivitätsanstieg der Faktoren V oder XI möglich sein sollte. Ein Plasmaaustausch kann ebenfalls z. B. im Rahmen einer thrombotisch-thrombopenischen Purpura (TTP) indiziert sein (Hellmann et al. 2010; O'Shaughnessy et al. 2004). Auch seltene Erkrankungen wie z. B. das Guillain-Barré-Syndrom (GBS) werden noch in einzelnen Fällen mit einer Austauschplasmapherese behandelt (Cortese et al. 2011). Bei einer Austauschplasmapherese wird das Plasmavolumen des Erkrankten durch 40 bis 60 ml Spenderplasma pro Kilogramm Körpergewicht ersetzt. Dies erfordert

große Plasmavolumina, für einen 70 kg schweren Erwachsenen sind dies etwa 2 800 bis 4 200 ml Plasma.

1.4 Herstellung von Plasmapräparaten

1.4.1 Blutspende

Zur Sicherstellung einer optimalen Qualität der therapeutisch zu verwendenden Blutprodukte, insbesondere zur Vermeidung von übertragbaren Krankheiten, gehört zum einen eine gezielte Auswahl der Spender und zum anderen eine sichere Testmethodik, um Infektionen detektieren zu können. Somit kann gleich zu Beginn des Gewinnungs- und Verarbeitungsprozesses Einfluss auf die Endprodukte genommen werden. Der Kriterienkatalog zum Ausschluss von Blutspendern wird regelmäßig überarbeitet und aktuellen Gegebenheiten angepasst. So werden z. B. neue Risikogebiete für Erkrankungen wie Malaria oder Infektionen mit dem West-Nil-Virus in den Ausschlusskatalog eingefügt bzw. zeitliche Sicherheitssperren für Reisende angepasst. Um einen kommerziellen Handel mit Blutspenden bzw. Blutprodukten auszuschließen, empfiehlt die Weltgesundheitsorganisation (*World Health Organisation,* WHO), dass jedes Land ein eigenständiges System aufbauen solle, um den eigenen Bedarf decken zu können (World Health Organisation 2009). Die Blutspender sollen demnach ohne Zwang und, abgesehen von einer geringen Aufwandsentschädigung, unentgeltlich spenden. Diese Freiwilligkeit kann ebenfalls die Sicherheit in der Transfusionsmedizin erhöhen, da bei freiwilligen Spendern ohne einen wirtschaftlichen Anreiz keine Notwendigkeit existiert, bestehende Erkrankungen zu verschweigen (Contreras 1994). Zu den routinemäßig durchgeführten Untersuchungen des gespendeten Bluts und damit des Spenders (Tab. 1.2) gehören heute die Feststellung der AB0-Blutgruppe mit Rhesusfaktor, die Testung auf HBs-Antigen (*hepatitis B surface antigen*), auf Antikörper gegen HIV-1, HIV-2, HCV, HBc-Antigen (*hepatitis B core antigen*) und *Treponema pallidum* sowie die Untersuchungen auf HIV-1- und HCV-RNA mittels Nukleinsäureamplifikationstechniken (NAT) (Bundesärztekammer 2010).

1.4.2 Gewinnung und Weiterverarbeitung von Plasma

Humanplasma zur therapeutischen Anwendung kann heute auf verschiedene Arten und Weisen gewonnen werden. Zum einen als Nebenprodukt der klassischen Vollblutspende, wobei hier das Plasma nach Trennung von den Erythrozyten entweder leukozytenfiltriert wird oder das Vollblut nach Leukozytenfilitration vom Plasma getrennt und dann tiefgefroren oder weiterverarbeitet wird. Zum anderen durch Plasmapherese, bei der Vollblut

Parameter	Anforderungen
Blutgruppe: AB0, Rhesusformel	bestimmt
anti-HIV-1/-2-Antikörper	negativ
Anti-HCV-Antikörper	negativ
HBs-Antigen	negativ
Anti-HBc	negativ
HCV-Genom (NAT)	negativ
HIV-1-Genom (NAT)	negativ
Antikörper gegen *Treponema pallidum*	negativ
Antikörpersuchtest	keine klinisch relevanten Antikörper

Tabelle 1.2: Laboruntersuchungen vor Freigabe einer Blutspende

entnommen und, mit Zitrat versetzt, portionsweise in einem automatisierten Vorgang zentrifugiert wird, damit das Plasma selektiv gewonnen werden kann. Dieser Vorgang wird dabei so häufig wiederholt, bis eine Plasmaspende mit einem Volumen von ca. 750 ml inklusive der Additiva, wie z. B. Zitrat als Antikoagulans, gewonnen ist. Die Erythrozyten werden dem Spender dann nach jedem Zentrifugationsvorgang retransfundiert. Außerdem kann heute die Multikomponentenspende eingesetzt werden, bei der dem Spender eine bestimmte Menge Vollblut entnommen und aufgetrennt werden kann. Die Trennung in Erythrozyten, Thrombozyten und Plasma erfolgt in einem extrakorporalen geschlossenen System, so dass die Komponenten sofort weiterverarbeitet werden können bzw. zur Tieffrierung und Lagerung bereit sind (Matthes et al. 1994).

1.4.3 Verfügbare Plasmapräparationen

In Deutschland sind derzeit vier große Gruppen von Plasmapräparationen, die sich durch spezifische Herstellungsprozesse unterscheiden, durch das Paul-Ehrlich-Institut zugelassen und werden in der klinischen Routine eingesetzt: Frischplasma, Methylenblau-Licht-behandeltes Plasma, lyophilisiertes Plasma und Solvent/Detergent-behandeltes Plasma (Heim et al. 2010; Mayr 2010). Gefrorenes Frischplasma (GFP), das den größten Teil der 110 zugelassenen Plasmapräparate ausmacht (Stand: Mai 2012), bildet die erste Gruppe. Diese Präparationen stammen überwiegend aus Einzelspenden an den transfusionsmedizinischen Instituten großer Kliniken und öffentlicher Einrichtungen. In die zweite Gruppe gehören Methylenblau-Licht-behandelte Plasmapräparate, die auch aus Einzelspenden hergestellt werden. Die dritte Gruppe beinhaltet die ebenfalls aus Einzelspenden gewonnenen lyophilisierten, d. h. durch Gefriertrocknung bei Raumtemperatur haltbar gemachten Plas-

mapräparate. Die zur vierten Gruppe zählenden, mit dem Solvent/Detergent-Verfahren behandelten Plasmapräparate, sind großtechnisch hergestellte Produkte, die nicht aus Einzelspenden, sondern aus gepoolten Spenden hergestellt werden und die sich anhand unterschiedlicher zusätzlicher Verarbeitungsschritte in weitere Untergruppen einteilen lassen (s. u.). Im Folgenden werden die genannten Gruppen von Plasmapräparationen mit ihren speziellen Eigenschaften kurz charakterisiert.

1.4.3.1 Gefrorenes Frischplasma, Methylenblau-Licht-behandeltes Plasma und Lyophilisiertes Plasma

GFP (auch *fresh frozen plasma*, FFP) ist das älteste aller Plasmapräparate. Es stammt von einem einzelnen Spender, und zwar entweder aus der Plasmaseparation einer Vollblutspende, aus einer Multikomponentenspende oder aus einer reinen Plasmaspende mittels Plasmapherese (Bundesärztekammer 2010). Das frische Plasma wird tiefgefroren und zunächst für vier Monate quarantänegelagert (Roth 2010). Bei der nächsten Spende desselben Spenders wird eine erneute Blutspenderuntersuchung durchgeführt. Nur bei wiederholt unauffälligen Untersuchungsergebnissen ohne Nachweis einer übertragbaren Erkrankung kann die Quarantänelagerung beendet und das Plasma zur Transfusion freigegeben werden (Hellstern und Haubelt 2002). Für die Lagerung des GFP sind zugelassene Tiefkühleinrichtungen notwendig, um eine konstante Lagerungstemperatur von $-30 \pm 3\,°C$ zu halten. Unter diesen Bedingungen sind die Plasmapräparate dann je nach Herstellerangabe bis zu zwei Jahren haltbar.

Bei Methylenblau-Licht-behandeltem Plasma handelt es sich wie bei GFP um Plasma aus einer Vollblut- oder Multikomponentenspende bzw. aus einer Plasmapherese eines einzelnen Spenders. Das Plasma wird in der Weiterverarbeitung zunächst mit Methylenblau versetzt und in einem zweiten Schritt mit Licht einer definierten Wellenlänge von 590 nm bestrahlt. Eine Filtrierung entfernt anschließend das Methylenblau. Das Methylenblau-Licht-Verfahren ist ein zugelassenes Verfahren zur Inaktivierung klinisch relevanter Viren, wobei hohe Viruskonzentrationen möglicherweise nicht vollständig inaktiviert werden, was z. B. bei Parvovius B19 der Fall sein kann (Hellstern 2008).

Das zugelassene lyophilisierte Plasmapräparat LyoPlas N-w® des Blutspendedienstes West (Deutsches Rotes Kreuz) ist ebenfalls ein quarantänegelagertes Präparat aus Einzelspenderplasma. Diesem wird durch Lyophilisierung (Gefriertrocknung) das Wasser entzogen. Als Quarantäneplasma wird lyophilisiertes Plasma wie GFP erst dann zur Transfusion freigegeben, wenn sich der Spender einer erneuten Blutspenderuntersuchung

unterzogen hat und diese wiederholt ohne Nachweis einer übertragbaren Erkrankung geblieben ist. Die Lagerung von lyophilisiertem Plasma erfolgt zwischen 2 und 25 °C. Vor der Transfusion muss das lyophilisierte Präparat zunächst rekonstituiert, d. h. mit einem geeigneten Lösungsmittel aufbereitet werden (Bakaltcheva et al. 2007).

Gemeinsam sind allen Einzelspenderplasmen sowohl interindividuell als auch intraindividuell schwankende Konzentrationen bzw. Aktivitäten einiger gerinnungsaktiver Proteine (v. a. Faktor V, Faktor VIII, Fibrinogen; Atance et al. 2001). Der Gesetzgeber schreibt z. B. für die Aktivität des Gerinnungsfaktors VIII in Einzelspenderplasmen eine Mindestaktivität von 70 % vor, die nach dem ersten Monat nach Herstellung bzw. am Ende des angegebenen Haltbarkeitszeitraumes nachzuweisen sein muss (Bundesärztekammer 2008).

1.4.3.2 Solvent/Detergent-behandeltes Plasma

In den 1990er Jahren war der amerikanische Biologe Bernard Horowitz maßgeblich an der Entwicklung des Solvent/Detergent-Verfahrens beteiligt, das sich als sichere großtechnische Methode zur Virusinaktivierung weit verbreitet hat (Prince et al. 1986). Das aus Blutspenden gewonnene Plasma verschiedener Spender wird in einem Pool aus 300 bis 1 500 Einzelspenderplasmen zusammengeführt und dann gemeinsam weiter prozessiert, weshalb es auch als Poolplasma bezeichnet wird. Das Solvent/Detergent-Verfahren (S/D-Verfahren) zerstört mit Hilfe des Lösungsmittels Tri-N-Butyl-Phosphat (TNBP) und des Detergens Triton® X-100 umhüllte Viren und macht diese somit unschädlich (Horowitz et al. 1985; Horowitz et al. 1988). Der Plasmapool wird mit den Reagenzien bis zu einer jeweiligen Konzentration von 1 % vol. versetzt und für vier Stunden bei 30 °C inkubiert. Das S/D-Verfahren zerstört alle umhüllten Viren (HIV, HBV, HCV), hat aber eine Lücke bei nicht umhüllten Viren wie z. B. Parvovirus B19 und Hepatitis A. Die S/D-Additive werden nach der vierstündigen Inkubation filtriert und chromatographisch entfernt. Das Plasma wird dann in Portionen à 200 ml abgefüllt, schockgefroren und bei höchstens −18 °C gelagert (Octapharma 2009). Es kann ohne vorhergehende Quarantänelagerung sofort zur Transfusion freigegeben werden. Das mit dem S/D-Verfahren behandelte Plasma hat als Poolplasma besondere, von den bisher genannten Plasmapräparationen abweichende Eigenschaften in Bezug auf die darin enthaltenen Gerinnungsproteine. Die Zusammenführung des aufgetauten Frischplasmas von 300 bis 1 500 Einzelspendern in einen großen Pool führt zu einer Nivellierung der Konzentrationen von Gerinnungsfaktoren und -inhibitoren sowie zu einer Verdünnung von anderen Proteinen wie z. B. spezifischen Antikörpern (Beeck und Hellstern 1998). Mindestaktivitäten bestimmter Gerinnungsfaktoren in den mittels Pooling hergestellten Präparaten werden durch das Europäische Arzneibuch vor-

geschrieben und betragen für S/D-behandeltes Plasma mindestens 0,5 IU/ml oder 50 % (Pharmacopœia Europæa 2008).

1.4.3.3 Solvent/Detergent-behandeltes Plasma mit Prioneneliminierung

Ein relativ junges Problem in der Transfusionsmedizin hat seine Entdeckung zu Anfang des 20. Jahrhunderts. Anfang der 1920er Jahre veröffentlichten die Neurologen Hans-Gerhard Creutzfeldt (1885–1964) und Alfons Maria Jakob (1884–1931) Schriften über eine bis dato unbekannte neurodegenerative Erkrankung des menschlichen Gehirns, die nach beiden Beschreibern seitdem als Creutzfeldt-Jakob-Krankheit bezeichnet wird. Auch bei Tieren konnten ähnliche Erkrankungen nachgewiesen werden, die schwammartige Veränderungen des Hirngewebes hervorriefen, so z. B. BSE (bovine spongiforme Enzephalopathie) bei Rindern. 1982 endeckte Stanley Prusiner ein Protein, das er maßgeblich für diese Erkrankungen verantwortlich machte und gab ihm den Namen Prion (von *proteinaceous infectious particle;* Prusiner 1982). Prusiners neue Theorie beinhaltete, dass sowohl fehlgefaltete körpereigene Proteine als auch infektiöse Proteinpartikel Erkrankungen auslösen können. Das humane körpereigene Prionprotein wird allgemein als PrP^{C} und die infektiöse Variante als PrP^{Sc} abgekürzt. In den folgenden Jahrzehnten konnte im Tiermodell gezeigt werden, dass BSE durch die Transfusion von Vollblut übertragen werden kann (Houston et al. 2000). 2001 wurde deshalb durch eine Änderung des Transfusiongesetzes die Leukozytendepletion von Erythrozyten- und Thrombozytenkonzentraten vorgeschrieben. Dies soll einerseits als Vorsichtsmaßnahme gegen eine Transmission von Prionen dienen (Brown 2007), andererseits wird somit auch das Übertragungsrisiko zellständiger Viren (z. B. Cytomegalie-Virus) minimiert. Auch wenn bisher keine Prionen in Plasma bzw. Leukozyten nachgewiesen werden konnten (Brown 2007; Bruce et al. 2001; Knight 2010; Millar und Makris 2012; Wadsworth et al. 2001), wird bis heute weiterhin von einer möglichen Übertragungsgefahr durch zelluläre Blutprodukte und Plasma ausgegangen (Brown et al. 1998; Cervenakova et al. 2003; Dobra und Bennett 2006; Peden et al. 2010).

Octaplas® LG (Ligand/Gel; Octapharma GmbH, Langenfeld, Deutschland), das einzige bislang erhältliche Plasmapräparat in der Gruppe der S/D-Plasmen mit Prioneneliminierung (Stand: Mai 2012) ist ebenfalls ein Poolplasma, das durch Zusammenführung von 300 bis 1 500 Einzelspenderplasmen mit einem modifizierten S/D-Verfahren hergestellt wird. Im Unterschied zum herkömmlichen S/D-Verfahren wurde bei Octaplas® LG die Inkubationszeit des mit S/D-Reagenzien behandelten Plasmapools von vier auf eine bis eineinhalb Stunden reduziert, wobei die Virusinaktivierung auch bei Verkürzung des Inkubationsschrittes gewährleistet bleibt (Biesert und Suhartono 1998). Die gefrore-

nen Einzelspenderplasmen werden hierbei in einen großen Pool zusammengeführt und kontrolliert aufgetaut. Dies führt einerseits zur Äquilibrierung der Konzentrationen der Gerinnungsfaktoren und -inhibitoren, insbesondere des Fibrinogens und des Faktors VIII, deren Konzentrationen größeren interindividuellen Schwankungen unterliegen. Andererseits werden dadurch in den Einzelspenderplasmen vorhandene Antikörper soweit verdünnt, dass nach Transfusion des Poolplasmas keine klinisch relevanten Antikörper-vermittelten Immunreaktionen mehr zu erwarten sind. Anschließend werden dem Plasmapool das Solvens Triton® X-100 und das Detergens TNBP bis zu einer jeweiligen Konzentration von 1 % vol. zugesetzt. Das Gemisch wird dann für eine bis anderthalb Stunden bei 30 °C inkubiert. Triton® X-100 ist ein nicht-ionisches Tensid, das zusammen mit dem Phosphorsäureester TNBP Membranen umhüllter Viren auflösen kann, ohne die Plasmaproteine und insbesondere die Gerinnungsproteine zu denaturieren. Durch die Auflösung der Lipidhülle umhüllter Viren werden diese inaktiviert und unschädlich gemacht. Die S/D-Reagenzien werden nach dem Inkubationsschritt chromatographisch entfernt. Im Anschluss findet der Prioneneliminierungsschritt statt, während dessen das Plasma über eine Gelmatrix geleitet wird. An diese Gelmatrix sind PrP^{Sc}-Antikörper gebunden, die pathologische bzw. infektiöse Prionproteine binden können. Die Gelmatrix ist nur einmal verwendbar und wird am Ende dieses Aufbereitungssschritts entsorgt. Im Anschluss wird das Plasma steril filtriert und unter aseptischen Bedingungen in Infusionsbeutel à 200 ml abgefüllt, mit einer Folie umverpackt und innerhalb kurzer Zeit auf −60 °C tiefgefroren. Die Lagerung erfolgt bei höchstens −18 °C, wobei eine Haltbarkeit von 30 Monaten in der Herstellerinformation angegeben wird (Octapharma 2009). Da in einer Tieffriervorrichtung häufig verschiedene Plasmapräparationen lagern, bestimmt diejenige Plasmapräparation mit der tiefsten Lagerungstemperatur (meist GFP mit höchstens -30 ± 3 °C) die Lagerungstemperatur für alle Präparate. Das S/D-Plasma mit Prioneneliminierung erfährt wie auch herkömmliches S/D-Poolplasma durch das Pooling eine Nivellierung der Konzentrationen von Plasmaproteinen, weist daher auch eine homogenere Gerinnungsfaktoraktivität als Einzelspenderplasma auf und kann ohne Einhaltung einer Quarantänezeit zur Transfusion freigegeben werden.

1.5 Problemstellung aus dem Kontext der klinischen Anwendung

Mit Inkrafttreten des Transfusionsgesetzes vom 7. 7. 1998 schrieb der Gesetzgeber erstmals die Einführung von Qualitätssicherungsmaßnahmen für die Anwendung von Blutprodukten vor (Transfusionsgesetz 1998). Diese beinhalten zum einen die Ausbildung und Kontrolle

der Anwender, also der transfundierenden Ärzte und zum anderen die Gewährleistung der Versorgung mit sicheren und qualitativ hochwertigen Präparaten. Aufgrund der angenommenen Instabilität der Gerinnungsfaktoren in den aufgetauten Plasmapräparaten und aufgrund eines vermeintlich steigenden Risikos einer mikrobiellen Kontamination derselben Präparate schreiben die gesetzlichen Vorgaben eine Transfusion von Blutprodukten innerhalb von maximal sechs Stunden nach dem Auftauvorgang, nach der Rekonstitution bzw. nach Unterbrechung der Kühlkette vor (Bundesärztekammer 2008, 2010). Die Sicherstellung der Versorgung schließt weiterhin einen ökonomischen Umgang mit Blutprodukten ein. Betrachtet man bereits analysierte und veröffentlichte Zahlen aus der Charité-Universitätsmedizin Berlin (von Heymann et al. 2005), so wurden im Jahr 2001 am Campus Mitte der Charité 950 Plasmabeutel verworfen. Nach der Einführung des Qualitätssicherungssystems konnte die Zahl der verworfenen Plasmabeutel im Jahr 2003 auf 146 gesenkt werden. Auch wenn die Einführung von standardisierten Qualitätssicherungsmaßnahmen zu einer Reduktion des Verwurfs führen konnte und ökonomische Aspekte bei diesen Bestrebungen Beachtung finden, so besteht diesbezüglich weiterhin noch Optimierungspotential.

Am Beispiel eines polytraumatisierten Notfallpatienten kann gut dargestellt werden, weshalb es gerade bei Plasmapräparaten zu einem mittlerweile durch die standardisierten Qualitätssicherungsmaßnahmen zwar reduzierten, aber immer noch relevanten Überschuss von aufgetauten Präparaten kommt, die verworfen werden müssen. Ein solcher Patient wird in der Regel als schwerstverletzt in der Rettungsstelle einer Unfallklinik angekündigt. Nach Eintreffen in der Klinik erfolgt durch ein multidisziplinäres Team die initiale Notfallbehandlung, in deren Algorithmen auch ein Schnelltest zur Blutgruppenbestimmung für die Bereitstellung von Blutpräparaten verankert ist. Bei akutem Blutverlust des Patienten ist in aller Regel bereits durch das Notfallpersonal am Unfallort eine Infusionstherapie mit kolloidalen und kristalloiden Volumenersatzmitteln begonnen worden. Nach der Indikationsstellung für einen dringenden Einsatz von Erythrozytenkonzentraten und Plasmapräparaten in der Akutsituation werden diese in der Blutbank bestellt, notfalls aus Zeitmangel auch ohne erfolgte Kreuzprobe im Fall der Erythrozytenkonzentrate, bzw. Butgruppenbestimmung des Patienten. Die eintreffenden Erythrozytenkonzentrate können sofort transfundiert werden, Plasmapräparate, die tiefgekühlt geliefert werden, müssen hingegen erst aufgetaut werden. Die aktuellen Leitlinien zur Versorgung von polytraumatisierten Patienten empfehlen den Einsatz von Plasma bei schweren Blutverlusten, um die Gerinnungssituation bis zu einer Laborkontrolle zu beherrschen und eine Verdünnungskoagulopathie zu vermeiden (Ozier 2008; Rossaint et al. 2010). Diese

durch den Auftauvorgang bedingte zeitliche Einschränkung in der Akuttransfusion von Plasma muss hinsichtlich der weiteren Versorgung antizipiert werden, was so auch in der Querschnittsleitlinie Hämotherapie empfohlen wird (Bundesärztekammer 2008). Allerdings kann dies dazu führen, dass vorausschauend aufgetautes Plasma nicht mehr benötigt wird, sei es, weil der Patient entgegen der ersten Einschätzung einen geringeren Bedarf an Blutprodukten hat oder weil der Patient z. B. den Folgen eines Polytraumas erliegt. Das Vorhalten von bereits aufgetauten Präparaten, z. B. in Plasmabanken, könnte diese Diskrepanz zwischen akutem Bedarf und unnötigem Verwurf von bereits aufgetauten Präparaten schließen (Thiele et al. 2012). Eine solche Praxis ist in Deutschland bisher jedoch nicht zulässig, vielmehr ist der Verwurf von aufgetauten und nicht verwendeten Plasmapräparaten nach sechs Stunden vorgeschrieben.

1.6 Bisherige Daten zur Lagerung von aufgetauten Präparaten

Im Gegensatz zur bislang in Deutschland geltenden Vorschrift, bereits aufgetaute Plasmapräparate spätestens nach sechs Stunden zu verwerfen, existieren in der wissenschaftlichen Literatur viele Hinweise auf eine längere Verwendbarkeit (Boström et al. 2009; Buchta et al. 2004; Keller et al. 2012; Naghadeh et al. 2011; von Heymann et al. 2009; Yazer et al. 2008). Ausdruck dessen ist die Tatsache, dass z. B. innerhalb Europas mit der Anwendung von aufgetautem Plasma unterschiedlich verfahren wird. Die Verwendung von aufgetautem und gelagertem GFP ist z. B. in Schweden noch nach bis zu zweiwöchiger Lagerung bei $4 \pm 2\,°C$ gängige Praxis (Norda et al. 2007), die auf Ergebnisse einiger Lagerungsstudien aus den 1980er Jahren zurückgeht (Blombäck et al. 1984; Nilsson et al. 1983). Dagegen ist in Großbritannien eine Verwendung von aufgetautem GFP nach Lagerung bei $4 \pm 2\,°C$ bis zu 24 Stunden gestattet und in den Transfusionsrichtlinien des *National Health Service* (NHS) festgeschrieben (National Blood Service 2005). In den Vereinigten Staaten von Amerika ist die Verwendung von aufgetautem GFP durch die *Food and Drug Administration* (FDA) bis zu 24 Stunden zugelassen (www.fda.gov / 21 CFR 640.120). Darüber hinaus ist dort eine Verwendung von aufgetautem und bis zu fünf Tagen gelagertem GFP zumindest gestattet (AABB Circular 2009; Downes et al. 2001).

Lagerungsversuche zu Plasmastabilität bzw. Koagulabilität wurden bereits seit den 1940er Jahren durchgeführt. Dabei wurde das Plasma meist für mehrere Wochen bis zu drei Jahren bei 6 °C gelagert (Lozner et al. 1944). Zur Erfassung der Wirksamkeit wurde die Prothrombinzeit in Sekunden gemessen, die sich nach vier Wochen deutlich

verlängert darstellte (Fantl und Nance 1948). Bisherige Untersuchungen zu GFP haben trotz größerer Messwertstreuungen im Rahmen der interindividuellen Schwankungen die mögliche Einsetzbarkeit nach fünftägiger (Naghadeh et al. 2011; Yazer et al. 2008) und sechstägiger Lagerung (von Heymann et al. 2009) ermittelt. Sowohl Nilsson et al. (1983) als auch Blombäck et al. (1984) befanden die nach zweiwöchiger Lagerung in GFP gemessene Aktivitätabnahme kurzwirksamer Gerinnungsfaktoren (hier insb. Faktor VIII) um 50 % noch für ausreichend und gaben demnach 14 Tage als möglichen Anwendungszeitraum für aufgetautes GFP an. Die einzigen Studien, die Gerinnungsproteine in S/D-Plasma ohne Prioneneliminierung, also in aufbereitetem Poolplasma, über einen längeren Zeitraum untersuchten, stellten eine mögliche Verwendbarkeit bis mindestens 24 Stunden (Keller et al. 2012) bzw. bis zu sechs Tagen nach dem Auftauen fest (Buchta et al. 2004). Keller et al. (2012) beurteilten ihre Ergebnisse anhand der Lagerungsstabilität der Gerinnungsproteine, die durch eine Aktivitätsabnahme der gerinnungsaktiven Proteine von nicht mehr als 20 % im Vergleich zur Ausgangsaktivität definiert worden war. Dieses Qualitätskriterium wurde von den Faktoren VII und VIII nur bis 24 Stunden nach dem Auftauen erfüllt, wobei die Aktivität des Faktors VIII auch nach sechs Tagen noch oberhalb des durch das europäische Arzneibuch vorgeschriebenen Grenzwerts von 50 % lag. Dagegen empfehlen Heger et al. (2005) in einer Studie zur Kurzzeitstabilität einen Einsatz von S/D-Plasma ohne Prioneneliminierung nur bis zu acht Stunden nach dem Auftauen.

Das hier untersuchte S/D-Präparat mit Prioneneliminierung Octaplas® LG ist bisher noch nicht in aufgetautem Zustand auf die Konzentrationen bzw. Aktivitäten von Gerinnungsfaktoren und -inhibitoren im Lagerungsverlauf hin charakterisiert worden. Die Herstellerfirma Octapharma GmbH formuliert für das Präparat nur die Empfehlung, das Plasma „innerhalb kurzer Zeit“ nach dem Auftauen zu transfundieren (Octapharma 2009), woraus ebenfalls ersichtlich wird, dass noch nicht genügend Daten zur Stabilität bzw. zur Wirksamkeit der Bestandteile dieses Arzneimittels nach dem Auftauen und der weiteren Lagerung vorliegen.

2 Zielstellung der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollte das bisher einzige verfügbare S/D-Plasmapräparat mit Prioneneliminierung, Octaplas® LG, in aufgetautem Zustand über 144 Stunden bei $4 \pm 2\,°C$ gelagert und auf Veränderungen der Konzentrationen und Aktivitäten von Gerinnungsproteinen untersucht werden. Es konnte bereits gezeigt werden, dass durch den im Vergleich zu seinen Vorgängerprodukten veränderten Herstellungsprozess des Präparats die Konzentrationen und Aktivitäten von Gerinnungsproteinen in S/D-Plasma mit Prioneneliminierung direkt nach dem Auftauen nicht negativ beeinflusst werden. Inwieweit die Langzeitstabilität der Gerinnungsproteine in aufgetautem und gelagertem Octaplas® LG durch die zusätzliche Prionenelimierung während des Aufbereitungsprozesses beeinflusst wird, wurde bislang noch nicht untersucht. Hierzu sollten die Konzentrationen und Aktivitäten von Gerinnungsfaktoren und -inhibitoren im aufgetauten und über 144 Stunden bei $4 \pm 2\,°C$ gelagerten Plasmapräparat an definierten Zeitpunkten während der Lagerung bestimmt werden. Es wurde die Lagerungsstabilität der Gerinnungsproteine als ein Qualitätskriterium der Plasmapräparation untersucht. Weiterhin sollte eine quantitative Einordnung der gemessenen Konzentrationen und Aktivitäten zu bestehenden gesetzlich vorgegebenen Mindestaktivitäten und anderen relevanten Grenzwerten durchgeführt werden. In Kombination mit einer mikrobiologischen Untersuchung zur Erfassung einer möglichen bakteriellen Kontamination des Präparats während der Lagerung sollte anhand der erhobenen Daten der Zeitraum bestimmt werden, in dem die Qualität des aufgetauten und gelagerten Plasmas den gesetzlichen Vorgaben genügt und somit für eine Substitutionsbehandlung geeignet wäre. Eine genauere Kenntnis über die Lagerungsstabilität von Gerinnungsproteinen in aufgetautem und gelagertem Octaplas® LG könnte möglicherweise zu einer Verlängerung des Verwendungszeitraums führen, unnötigen Verwurf reduzieren und damit Kosten senken.

3 Material und Methoden

3.1 Plasmamaterial

Für diese Arbeit wurden insgesamt 24 Plasmabeutel à 200 ml des Präparats Octaplas® LG (Octapharma GmbH, Langenfeld, Deutschland) zur Verfügung gestellt, die aus unterschiedlichen Plasmachargen, also unterschiedlichen Plasmapools stammten. Es wurden für die Untersuchungen jeweils fünf Plasmabeutel pro AB0-Blutgruppe aufgetaut und unter Kühlung (s. u.) gelagert. Dem Untersuchungsprotokoll folgend wurden den einzelnen Plasmabeuteln während der Lagerungszeit zu bestimmten Zeitpunkten Proben entnommen und analysiert (s. u.). Darüber hinaus wurde je ein weiterer Plasmabeutel pro AB0-Blutgruppe aufgetaut und ungeöffnet unter denselben Bedingungen bis zu einer mikrobiologischen Untersuchung nach Tag 6 (s. u.) gelagert.

3.2 Auswahl der untersuchten Gerinnungsproteine

Bei der Auswahl der zu untersuchenden Gerinnungsproteine für die vorliegende Studie (Tab. 3.1) wurde berücksichtigt, dass eine gesetzlich vorgeschriebene Mindestaktivität für die Faktoren V, VIII und XI in S/D-Plasmapräparaten existiert (Pharmacopœia Europæa 2008), so dass die Untersuchung dieser Faktoren für die Bearbeitung der Fragestellung unerlässlich ist. Als weitere zu untersuchende Proteine wurden Faktor VII mit einer vergleichsweise kurzen physiologischen Halbwertszeit von 3–6 h und Faktor IX mit einer Halbwertszeit von 18–24 h gewählt (Roberts et al. 2004). Faktor V bildet mit Faktor X den Prothrombinasekomplex, der Prothrombin zu Thrombin (Faktor II) umwandelt. Protein C inhibiert in seiner aktivierten Form Faktor V und Faktor VIII und hemmt dadurch die Gerinnung. Das hier untersuchte freie Protein S zählt als Kofaktor des Protein C zu den inhibierenden Gerinnungsproteinen. Durch das S/D-Verfahren kann freies Protein S bekanntermaßen eine Verringerung seiner Aktivität erfahren (Hellstern et al. 1992). Faktor II ist als enzymatisch aktives Gerinnungsprotein für die Spaltung des Fibrinogens zu Fibrin zuständig und induziert damit über die Bereitstellung von Fibrin-Monomeren dessen Polymerisierung zur Bildung eines Blutgerinnsels. Plasmininhibitor als wichtigster

Gegenspieler des Plasmins, welcher die Fibrinspaltung übernimmt, ist seit der Einführung des S/D-Verfahrens ein Gerinnungsprotein mit bekanntermaßen erniedrigter Aktivität, so dass dieses Protein im Rahmen der Untersuchung des aktuellen S/D-Plasmapräparats mit verändertem Herstellungsprozess von besonderem Interesse ist (Heger et al. 2009; Rock 2011).

3.3 Festlegung der Messzeitpunkte

Proteine unterliegen einem physiologischen Umsatz, d. h. sie werden im Organismus ständig abgebaut und neu synthetisiert, um eine konstante Konzentration bzw. enzymatische Aktivität aufrechtzuerhalten (Guggenheim 1991; Schönheimer 1937; Tavill 1972). Unter der jeweiligen Halbwertszeit eines Proteins versteht man die Zeitdauer, in der seine Konzentration bzw. enzymatische Aktivität um 50 % abnimmt. Das Blutplasma enthält eine Vielzahl von speziellen gerinnungsaktiven Proteinen, die unterschiedlich lange Halbwertszeiten aufweisen. Faktor VII hat z. B. eine sehr kurze physiologische Halbwertszeit von wenigen Stunden (3–6 h), wohingegen Faktor II eine vergleichsweise lange Halbwertszeit von 60–70 Stunden aufweist (Roberts et al. 2004). Die Abnahme der Konzentration bzw. Aktivität verhält sich unter physiologischen Bedingungen hyperbolisch, so dass die größte Abnahme nach den ersten Halbwertszeiten zu verzeichnen ist. Die physiologischen Halbwertszeiten der gerinnungsaktiven Plasmaproteine, also der Gerinnungsfaktoren und -inhibitoren, gelten im menschlichen Organismus bei 37 °C und optimalem Säure-Basen-Haushalt (pH = 7,4), so dass diese Halbwertszeiten nicht mit den Halbwertszeiten unter unphysiologischen Lagerungsbedingungen gleichgesetzt werden können (Cohen und West 2011). Denn entgegen der Situation im Organismus sind die Gerinnungsproteine in den Plasmapräparaten in einer unphysiologischen Umgebung beispielsweise einer bereits mit dem Auftauvorgang beginnenden Degradation ausgesetzt. Unter der Annahme, dass die anzunehmenden Konzentrations- bzw. Aktivitätsabnahmen der in der vorliegenden Arbeit untersuchten gerinnungsaktiven Proteine während der Lagerungsdauer in unphysiologischer Umgebung trotzdem zumindest näherungsweise den physiologischen Verläufen entsprechen, wurden diese zunächst als Grundlage für die Auswahl der Messzeitpunkte herangezogen. Neben den biochemischen Überlegungen zur hyperbolischen Aktivitätsabnahme der Gerinnungsfaktoren flossen die aktuell geltenden Vorgaben in die Auswahl der Messzeitpunkte ein: diese schreiben einen Zeitraum von sechs Stunden vor, in denen das Plasma nach dem Auftauen transfundiert werden muss (Bundesärztekammer 2008, 2010). Aus diesen Rahmenbedingungen resultierend wurden die Messzeitpunkte nach zwei, nach vier und nach sechs Stunden gewählt, um den Abfall

der Konzentrationen bzw. Aktivitäten der Gerinnungsfaktoren und -inhibitoren innerhalb der Vorgaben der Bundesärztekammer mit dem Paul-Ehrlich-Institut zu erfassen. Die folgenden Messzeitpunkte nach 24, 48, 72, 96, 120 und 144 Stunden dienten der Erfassung der weiteren Degradation, um den Zeitpunkt ermitteln zu können, an dem die Qualitätsvorgaben des Europäischen Arzneibuchs bzw. die hier eingeführten Grenzwerte für die Konzentrationen bzw. Aktivitäten der Gerinnungsproteine (s. u.) unterschritten werden. Denn unabhängig von den oben genannten rein zeitlichen Vorgaben sind im Europäischen Arzneibuch Qualitätsanforderungen an S/D-Plasmapräparate in Form von absoluten Mindestaktivitäten bestimmter Gerinnungsfaktoren festgeschrieben.

3.4 Festlegung der Referenzwerte

Die für diese Lagerungsstudie entscheidenden Vorgaben des europäischen Arzneibuchs schreiben eine Mindestaktivität der Gerinnungsfaktoren V, VIII und XI mit jeweils 0,5 IU/ml bzw. 50 % vor (Pharmacopœia Europæa 2008). Da für Fibrinogen, die Faktoren II, VII, IX, Protein C, freies Protein S und Plasmininhibitor weder Vorgaben durch das Europäische Arzneibuch noch durch eine nationale Vorschrift existieren, wurden für diese Gerinnungsproteine in dieser Studie eigene Vergleichswerte eingeführt. Es wurden als Qualitätssicherungsmarker jeweils die unteren Grenzen der physiologischen Referenzbereiche gewählt, da sie im Hinblick auf klinische Sicherheit bekannte Größen darstellen und ferner unabhängig von den Charakteristika verschiedener Plasmapräparate ermittelt wurden. Aus der Literatur ist bekannt, dass die Aktivität des Plasmininhibitors in S/D-Plasma ohne Prioneneliminierung (z. B. Octaplas®), für die ebenfalls keine verbindliche Mindestanforderung besteht, nach dem Aufbereitungsprozess vergleichsweise gering ist, so dass der physiologische Referenzbereich unterschritten wird (Heger et al. 2005; Mast et al. 1999; Solheim et al. 2003). Daher wurden die hier gemessenen Aktivitäten des Plasmininhibitors in Octaplas® LG sowohl mit dem unteren Grenzwert des physiologischen Referenzbereichs in humanem Plasma als auch mit der in einer vorangegangenen Studie unter gleichen Versuchsbedingungen ermittelten Ausgangsaktivität des Plasmininhibitors im Vorgängerprodukt Octaplas® (Keller et al. 2009) verglichen, um eine Einordnung vornehmen zu können. Eine Übersicht aller in der vorliegenden Arbeit verwendeten Referenzwerte findet sich in Tabelle 3.1.

	Referenzbereich	Vergleichswert – Rationale
Fibrinogen [g/l]	2,38–4,98	2,38 – Minimum d. Referenzbereichs
Faktor II [%]	79,0–131,0	79,0 – Minimum d. Referenzbereichs
Faktor VII [%]	50,0–129,0	50,0 – Minimum d. Referenzbereichs
Faktor IX [%]	65,0–150,0	65,0 – Minimum d. Referenzbereichs
Plasmininhibitor [%]	98,0–122,0	98,0 – Minimum d. Referenzbereichs
		33,2 – Ausgangsaktivität in Octaplas®
Protein C [%]	70,0–140,0	70,0 – Minimum d. Referenzbereichs
freies Protein S [%]	♀: 55,0–124,0	
	♂: 75,0–146,0	75,0 – Minimum d. Referenzbereichs
Faktor V [%]	62,0–139,0	50,0 – Vorschrift d. Eur. Arzneibuchs
Faktor VIII [%]	50,0–150,0	50,0 – Vorschrift d. Eur. Arzneibuchs
Faktor XI [%]	65,0–150,0	50,0 – Vorschrift d. Eur. Arzneibuchs

Tabelle 3.1: Übersicht der verwendeten Referenzwerte. Proteine ohne verbindliche Vorgaben oberhalb der durchgezogenen Linie, darunter die Gerinnungsfaktoren mit gesetzlich vorgeschriebener Mindestaktivität.

3.5 Untersuchungsprotokoll

3.5.1 Auftauvorgang

Für den Auftauvorgang wurde ein Mikrowellen-Auftaugerät (transfusio-therm 2000®, EIC-Umwelttechnik, Heilbad Heiligenstadt, Deutschland) verwendet. In diesem Gerät können drei Plasmabeutel in einer sich bewegenden Vorrichtung gleichzeitig aufgetaut werden. Während des Auftauvorgangs wird die Oberflächentemperatur jedes einzelnen Plasmabeutels mit zwei Temperatursensoren überwacht und die Leistung des Mikrowellengenerators entsprechend gesteuert (Hirsch et al. 2003). Das Gerät schaltet automatisch ab, wenn die Plasmabeutel vollständig aufgetaut sind, wobei die Zieltemperatur auf maximal 37 °C begrenzt ist. Ein vollständiges Auftauen wird üblicherweise nach ca. sechs Minuten erreicht, wonach die Temperatur der aufgetauten Plasmabeutel bei etwa 25 °C liegt (von Heymann et al. 2006). Das verwendete Mikrowellengerät zum Auftauen des tiefgefrorenen Plasmas ermöglicht einen schnelleren Auftauvorgang im Vergleich zu beheizten Wasserbädern (Churchill et al. 1992; von Heymann et al. 2006). Bis auf den zeitlichen Unterschied des Auftauvorgangs haben die verschiedenen Geräte keinen Einfluss auf die Aktivität der Gerinnungsproteine direkt nach dem Auftauen und während der anschließenden Lagerung (von Heymann et al. 2006).

3.5.2 Lagerungstemperatur

Die Wahl der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Temperatur von 4 ± 2 °C für die Lagerung von Octaplas® LG gründet sich in erster Linie auf die Ergebnisse einer Untersuchung des direkten Vorgängerpräparats Octaplas®, die zeigte, dass gerade die temperaturlabilen Gerinnungsfaktoren wie Faktor VIII bei dieser Temperatur eine bessere Stabilität als bei Raumtemperatur aufweisen (Heger et al. 2005). Auch für GFP konnte gezeigt werden, dass die Lagerung bei 22 °C im Vergleich zu 4 °C zu einer schnelleren Aktivitätsabnahme der Gerinnungsfaktoren führt (Thiele et al. 2012).

3.5.3 Versuchsablauf

Insgesamt 20 Plasmabeutel wurden seriell aufgetaut und nach dem Auftauen mit einem Entnahmeadapter angestochen. Über den Adapter wurden unter sterilen Kautelen die ersten Proben entnommen und für die automatisierte hämostaseologische Analyse (s. u.) in Messküvetten pipettiert. Die angestochenen Plasmabeutel wurden nach der ersten Probenentnahme bis zur nächsten Entnahme bei 4 ± 2 °C gelagert. Für die folgenden Probenentnahmen wurden die Plasmabeutel aus dem Kühlschrank entnommen, vorsichtig bewegt, um eine möglichst gleichmäßige Durchmischung zu erzielen und nach der Probenentnahme in den Kühlschrank zurückgelegt.

3.5.4 Mikrobiologische Qualitätssicherung

Neben der pharmazeutischen Qualität ist die fehlende mikrobiologische Kontamination eine unabdingbare Grundvoraussetzung für eine mögliche Anwendung eines Plasmapräparats auch nach länger andauernder Lagerung in aufgetautem Zustand. Es kann vorausgesetzt werden, dass das im Aufbereitungsprozess sterilfiltrierte und aseptisch verpackte Octaplas® LG direkt nach dem Auftauen keine mikrobiologischen Verunreinigungen aufweist (Heger et al. 2009). Die Transfusionsbeutel sind mit einer weiteren Umverpackung aus PVC versehen, wodurch während einer Lagerung nach dem Auftauen ein zusätzlicher Schutz vor Verunreinigungen gegeben sein sollte. Falls nun unter den für diese Arbeit gewählten Lagerungsbedingungen bei 4 ± 2 °C dennoch eine mikrobiologische Verunreinigung am Ende des Untersuchungszeitraums detektiert würde, so ließe sich davon ausgehen, dass diese nur während der Lagerung aufgetreten sein könnte. Für die mikrobiologische Qualitätssicherung wurden vier separate Plasmabeutel, jeweils ein Beutel jeder AB0-Blutgruppe, aufgetaut und in der ungeöffneten PVC-Umverpackung unter denselben kontrollierten Bedingungen über 144 Stunden gelagert. Somit konnten in diesen Plasmabeuteln akzidentelle Verunreinigungen des Beutelinhalts, wie sie möglicherweise

während serieller Probenentnahmen für die Analysen der Gerinnungsproteine entstehen könnten, sicher ausgeschlossen werden. Die für die mikrobiologische Qualitätssicherung vorgesehenen Beutel wurden nach der sechstägigen Lagerung unter sterilen Kautelen angestochen. Je 5 ml Inhalt wurden in handelsübliche aerobe und anaerobe Blutkulturflaschen (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) gefüllt, die für sechs Tage bei $35 \pm 1{,}5\,°C$ inkubiert und nach den Herstellervorgaben ausgewertet wurden.

3.6 Hämostaseologische Messmethodik

Einige der unterschiedlichen Testmethoden, mit denen die laboranalytischen Bestimmungen der Konzentrationen und Aktivitäten der in dieser Arbeit untersuchten Gerinnungsproteine erfolgte, basieren auf den nach wie vor klinisch verwendeten Globaltests der plasmatischen Gerinnung, die deshalb im Folgenden kurz beschrieben werden. Diese Bestimmungen erfolgen in aus Vollblut abzentrifugiertem Plasma, das bei der Blutabnahme mit einer standardisierten Menge Zitrat versetzt wird, welches als Chelator im Plasma gelöste Kalzium-Ionen komplexiert, die als Kofaktor für den Ablauf der enzymatischen Gerinnungsreaktionen unerlässlich sind. Hierdurch wird die plasmatische Gerinnung zunächst gehemmt. Zur Bestimmung der sogenannten Thromboplastinzeit (TPZ) oder der partiellen Thrompoblastinzeit (*partial thromboplastin time,* PTT) wird eine Probe mit Kalzium-Ionen rekalzifiziert, um die Zitratwirkung aufzuheben und mit mit Gewebsthromboplastin (TPZ) oder Phospholipiden und Kaolin als Katalysator mit einer negativ geladenen Oberfläche (PTT) versetzt, um die Gerinnung zu aktivieren. Die Gerinnungszeit, d. h. die Zeit bis zur Bildung von Fibrin-Polymeren, kann nun standardisiert in Sekunden gemessen werden.

Die in einer Plasmaprobe gemessene Aktivität von einzelnen enzymatisch aktiven Gerinnungsproteinen (katalytischer Umsatz einer bestimmten Stoffmenge eines Substrats pro Zeiteinheit) wird mit der Aktivität derselben Proteine in einem Referenzplasma (Poolplasma) verglichen. Je nach Gerinnungsprotein wird ein Mangelplasma eingesetzt, in dem das zu bestimmende Gerinnungsprotein bekanntermaßen in der Aktivität erniedrigt ist oder gänzlich fehlt (Appert-Flory et al. 2007). Analog der TPZ bzw. der PTT werden dann die Gerinnungszeiten gemessen und mit Referenztabellen verglichen. Die Aktivität eines Gerinnungsproteins in 1 ml Referenzplasma wird dabei gleich 1 oder 100 % gesetzt und als Internationale Einheit (*international unit,* IU) pro Milliliter angegeben (Milos et al. 2009). Daraus folgt die Angabe der Aktivitäten in Internationalen Einheiten oder in Prozent, wobei beide Angaben gebräuchlich sind. In der vorliegenden Arbeit

wurden die den aufgetauten und gelagerten Plasmabeuteln entnommenen Proben mit einem automatisierten Gerinnungsanalyseroboter (ACL TOP Analyzer®, Instrumentation Laboratory GmbH, Kirchheim, Deutschland) analysiert. Als Testreagenzien für alle untersuchten Gerinnungsproteine kamen die vom Hersteller vorgesehenen HemosIL®-Reagenzien (Instrumentation Laboratory GmbH, Kirchheim, Deutschland) zum Einsatz (Appert-Flory et al. 2007). Die grundlegenden Prinzipien der Messmethoden, die den automatisierten Konzentrations- bzw. Aktivitätsbestimmungen der gerinnungsaktiven Proteine zugrunde liegen, werden im Folgenden kurz erläutert.

3.6.1 Fibrinogen

Die Konzentration des Fibrinogens (Referenzbereich 2,38–4,98 g/l) wird quantitativ mit der Methode nach Clauss bestimmt (Clauss 1957). Mit dieser Methode wird die Gerinnungszeit in Citratplasma nach Rekalzifizierung in Gegenwart eines Thrombinüberschusses gemessen und daraus die Fibrinogenkonzentration errechnet. Der Thrombinüberschuss bei der Messreaktion ermöglicht, dass die enzymatische Umwandlung des Fibrinogens zu Fibrin durch Thrombin nicht durch eine zu geringe Aktivität des Thrombins in der zu untersuchenden Probe limitiert wird. Daraus folgt, dass die gemessene Gerinnungszeit allein von der Konzentration des in der Probe enthaltenen Fibrinogens abhängig ist. Die gemessene Gerinnungszeit verhält sich umgekehrt proportional zur Konzentration des Fibrinogens in der gemessenen Plasmaprobe.

3.6.2 Gerinnungsfaktoren II, V, VII

Die Aktivitäten der in dieser Arbeit betrachteten Gerinnungsfaktoren Faktor II (Referenzbereich 79–131 %), Faktor V (Referenzbereich 62–139 %) und Faktor VII (Referenzbereich 50–129 %), werden über die Messung der modifizierten Thromboplastinzeit bestimmt. Als Testreagenz werden hierbei sogenannte Mangelplasmen eingesetzt, denen der jeweils zu bestimmende Faktor fehlt und die mit der zu untersuchenden Plasmaprobe in einem standardisierten Verhältnis gemischt werden. Der Zusatz der speziellen Mangelplasmen stellt hierbei die Modifikation im Vergleich zur oben beschriebenen TPZ-Bestimmung dar. Die Verkürzung der Gerinnungszeit im Vergleich zum Mangelplasma ist somit proportional zur Aktivität des untersuchten Faktors in der Plasmaprobe.

3.6.3 Gerinnungsfaktoren VIII, IX, XI

Die Aktivitäten der Faktoren VIII (Referenzbereich 50–150 %), IX (Referenzbereich 65–150 %) und XI (Referenzbereich 65–150 %), also der hier betrachteten Faktoren des

extrinsischen plasmatischen Gerinnungssystems, werden mit einer modifizierten partiellen Thromboplastinzeit bestimmt. Die Messung der Gerinnungszeit wird auch hierbei, analog zur oben beschriebenen partiellen Thromboplastinzeit, mit Mangelplasmen als Testreagenzien durchgeführt, denen der jeweils zu untersuchende Faktor fehlt. Die Verkürzung der Gerinnungszeit im Vergleich zum Mangelplasma verhält sich ebenfalls proportional zur Aktivität des untersuchten Faktors in der Probe.

3.6.4 Protein C und Plasmininhibitor

Protein C (Referenzbereich 70–140 %) und Plasmininhibitor (Referenzbereich 98–122 %) werden über chromogene Tests bestimmt. In einem chromogenen Test wird einer Probe ein synthetisches Substrat zugesetzt, das von dem zu untersuchenden Enzym umgesetzt wird. Das Enzym, hier Protein C, spaltet das chromogene Substrat und setzt damit einen Farbstoff, in diesem Fall Paranitroanillin, frei, der dann in der Probe photometrisch bestimmt wird. Zur Bestimmung der Aktivität des Protein C wird dieses erst in seine enzymatisch aktive Form überführt und dann mit dem chromogenen Substrat versetzt. Die Konzentrationszunahme des Farbstoffs ist proportional zur Aktivität des Protein C in der untersuchten Plasmaprobe (Odegaard et al. 1987).

Die Aktivitätsbestimmung des Plasmininhibitors findet in zwei Stufen statt. Zunächst wird die zu untersuchende Plasmaprobe mit Plasmin in einer überschüssigen, definierten Stoffmenge inkubiert. Abhängig von der Aktivität des Plasmininhibitors in der Probe wird das im Überschuss vorhandene Plasmin während einer definierten Zeit teilweise inaktiviert. Im zweiten Schritt wird nach Zugabe eines chromogenen Substrats die Restaktivität des Plasmins über die Freisetzung von Paranitroanillin bestimmt. Die photometrisch gemessene Konzentration des Farbstoffs verhält sich somit umgekehrt proportional zur Aktivität des Plasmininhibitors in der Probe (Witt 1991).

3.6.5 Freies Protein S

Freies Protein S (Referenzbereich Frauen 55–124 %, Männer 75–146 %) wird über einen Latex-Immunoassay bestimmt. In diesem Immunoassay wird die Probe zunächst mit Latexpartikeln versetzt, welche einen Antikörper tragen, der freies Protein S mit einer hohen Affinität bindet. In einem zweiten Schritt werden ebenfalls an Latexpartikel gebundene anti-Protein S-Antikörper hinzugefügt. Diese Antikörper agglutinieren nun in einer zweiten Antigen-Antikörper Reaktion mit den bereits an Latexpartikel gebundenen Protein S-Molekülen, was sich als Trübung der Probe zeigt. Der Grad der Trübung wird

photometrisch erfasst und verhält sich proportional zur Konzentration bzw. Aktivität des freien Protein S (Kappel und Ehm 2010).

3.7 Statistische Analyse

Zur Beurteilung der Lagerungsstabilität der untersuchten Proteine wurde die über den gesamten Messzeitraum registrierte maximale relative Konzentrations- bzw. Aktivitätsabnahme δ_{max} jedes Proteins berechnet. Diese wird hier in „von Hundert“ (v.H.) angegeben, um eine klare Abgrenzung zu „Prozent“ (%) als Maß der Enzymaktivität zu gewährleisten. Seien c_{t_0} die Ausgangskonzentration des Fibrinogens direkt nach dem Auftauen und c_{min} die geringste im Verlauf gemessene Konzentration am Zeitpunkt $t_{c_{min}}$, so wurde die maximale relative Konzentrationsbnahme δ_{max} bis zu diesem Zeitpunkt nach folgender Formel berechnet:

$$\delta_{max} = \frac{(c_{min} - c_{t_0}) \cdot 100}{c_{t_0}}. \tag{3.1}$$

Analog wurden für die enzymatisch aktiven Gerinnungsfaktoren und -inhibitoren die jeweiligen maximalen relativen Abnahmen ihrer Aktivitäten a berechnet nach:

$$\delta_{max} = \frac{(a_{min} - a_{t_0}) \cdot 100}{a_{t_0}}. \tag{3.2}$$

Anhand dieser Maßzahlen lässt sich die Stabilität der Konzentrations- bzw. Aktivitätsverläufe quantifizieren, so dass die hier untersuchten Gerinnungsproteine in zwei Gruppen unterteilt werden konnten. Proteine, deren maximale relative Konzentrations- bzw. Aktivitätsabnahmen einen Betrag von 10 v.H. nicht übersteigen ($|\delta_{max}| < 10$ v.H.), wurden als vergleichsweise stabile Gerinnungsproteine definiert, die aufgrund ihrer geringeren Degradation eine untergeordnete Bedeutung für die Lagerungsstabilität des gesamten Plasmapräparats aufweisen. Gerinnungsproteine mit $|\delta_{max}| > 10$ v.H. wurden demgegenüber als vergleichsweise instabile Gerinnungsproteine definiert, die aufgrund ihrer stärkeren Degradation den größten Einfluss auf die Lagerungsstabilität des gesamten Plasmapräparats haben und bei denen deshalb eine detailliertere Analyse des zeitlichen Verlauf der Konzentrations- bzw. Aktivitätsänderungen notwendig war. Hierfür wurden für jedes Gerinnungsprotein die absoluten Konzentrations- bzw. Aktivitätsdifferenzen zwischen jeweils zwei aufeinander folgenden Messzeitpunkten ($\Delta_{t_a|t_b}$) berechnet.

Unter der Annahme, dass aufgrund der Anzahl der in die statistische Analyse eingehenden Fälle die Messwerte nicht normalverteilt sind, werden diese als Median mit 25. und 75. Perzentil tabellarisch und graphisch dargestellt. Es werden dementsprechend die

Ergebnisse ausschließlich nicht-parametrischer statistischer Analyseverfahren präsentiert (Altman 1991). Im ersten Teil der Analyse sollte die Frage beantwortet werden, wann bzw. zwischen welchen Messzeitpunkten die untersuchten gerinnungsaktiven Proteine ihre individuell größte Degradation erfuhren, um eine erste Aussage darüber zu treffen, ab welchem Zeitpunkt gegebenenfalls nicht mehr von einer ausreichenden Lagerungsstabilität des Plasmapräparats ausgegangen werden kann. Dazu wurden die Konzentrations- bzw. Aktivitätsverläufe der einzelnen Gerinnungsproteine im gesamten Zeitverlauf zunächst mittels Friedman-Tests analysiert (nicht-parametrischer Vergleich dreier oder mehrerer verbundener Stichproben). Die statistischen Signifikanzen der Konzentrations- bzw. Aktivitätsänderungen zwischen einzelnen Messzeitpunkten wurden dann mit Wilcoxon-Tests berechnet (nicht-parametrischer Vergleich zweier verbundener Stichproben). Um im zweiten Teil der Analyse die Messergebnisse in Bezug zu den gesetzlich festgelegten Mindestaktivitäten bzw. zu den in dieser Arbeit eingeführten Grenzwerten setzen zu können, wurden die an einzelnen Zeitpunkten gemessenen Konzentrationen bzw. Aktivitäten der Gerinnungsfaktoren und -inhibitoren mittels Rangsummentests für einzelne Stichproben mit den oben aufgeführten Grenzwerten (Tab. 3.1) verglichen (Vergleich mit einem hypothetischen Median). Alle statistischen Berechnungen wurden mit der Statistiksoftware SPSS (IBM Corp., Armonk, NY, USA) durchgeführt, wobei für alle Analysen das Signifikanzniveau bei $p < 0{,}05$ definiert war.

4 Ergebnisse

4.1 Mikrobiologische Qualitätskontrolle

Die standardisierte Auswertung nach Herstellervorgabe der mit gelagertem Plasma beimpften Blutkulturflaschen zeigte weder in den aeroben noch in den anaeroben Kulturen ein Wachstum von Bakterien oder Pilzen nach der Inkubationszeit von sechs Tagen. Es kam also weder während des Auftauvorgangs noch während der anschließenden Lagerung zur bakteriellen Kontamination des Beutelinhalts. Somit entsprach das aufgetaute Plasmapräparat auch nach der gesamten Lagerungsdauer den Sterilitätskriterien für Blutprodukte.

4.2 Lagerungsstabilität im Zeitverlauf

4.2.1 Statistischer Einfluss der Lagerungsdauer

Zur Veranschaulichung des Degradationsausmaßes und damit der Lagerungsstabilität der einzelnen Gerinnnungsproteine sind die jeweiligen maximalen relativen Konzentrations- bzw. Aktivitätsabnahmen δ_{max} vom Zeitpunkt t_0 bis zum Zeitpunkt der minimalen gemessenen Konzentration bzw. Aktivität $t_{c_{min}}$ bzw. $t_{a_{min}}$ tabellarisch aufgeführt (Tab. 4.1). Hieran sowie an den graphischen Darstellungen der Konzentrations- bzw. Aktivitätsverläufe lässt sich erkennen, dass innerhalb von 144 Stunden die maximalen relativen Abnahmen sowohl der Konzentration des Fibrinogens (Abb. 4.1) als auch der Aktivitäten der Faktoren II (Abb. 4.2) und IX (Abb. 4.3) sowie des Plasmininhibitors (Abb. 4.4), des Protein C (Abb. 4.5) und des freien Protein S (Abb. 4.6) jeweils einen Betrag von 10 v.H. nicht überstiegen. Die physiologisch kurzwirksamen Gerinnungsfaktoren V (Abb. 4.7), VII (Abb. 4.8) und VIII (Abb. 4.9) sowie Faktor XI (Abb. 4.10) wiesen demgegenüber eine deutlich größere maximale relative Aktivitätsabnahme mit einem Betrag von jeweils über 10 v.H. auf. Anhand des Betrags der maximalen relativen Konzentrations- bzw. Aktivitätsabnahmen lässt sich also eine Einteilung der hier untersuchten Gerinnungsproteine in eine Gruppe mit vergleichsweise hoher ($|\delta_{max}| < 10$ v.H.) und in eine zweite Gruppe mit vergleichsweise geringer Lagerungsstabilität im Zeitverlauf ($|\delta_{max}| > 10$ v.H.)

	δ_{max} [v.H.]	χ^2	d.f.	p
Fibrinogen	−5,0	37,7	9	< 0,01
Faktor II	−2,6	59,7	9	< 0,01
Faktor IX	−9,5	122,9	9	< 0,01
Plasmininhibitor	−2,3	29,2	9	< 0,01
Protein C	−0,9	41,3	9	< 0,01
freies Protein S	−4,7	88,7	9	< 0,01
Faktor V	−16,0	122,1	9	< 0,01
Faktor VII	−20,2	149,6	9	< 0,01
Faktor VIII	−26,7	156,6	9	< 0,01
Faktor XI	−26,9	152,0	9	< 0,01

Tabelle 4.1: Einfluss der Lagerungszeit auf die Konzentrationens- und Aktivitätsabnahmen mit statistischen Maßzahlen aus Friedman-Tests; Proteine mit vergleichsweise hoher Lagerungsstabilität oberhalb der durchgezogenen Linie, darunter die vergleichsweise instabilen Gerinnungsfaktoren

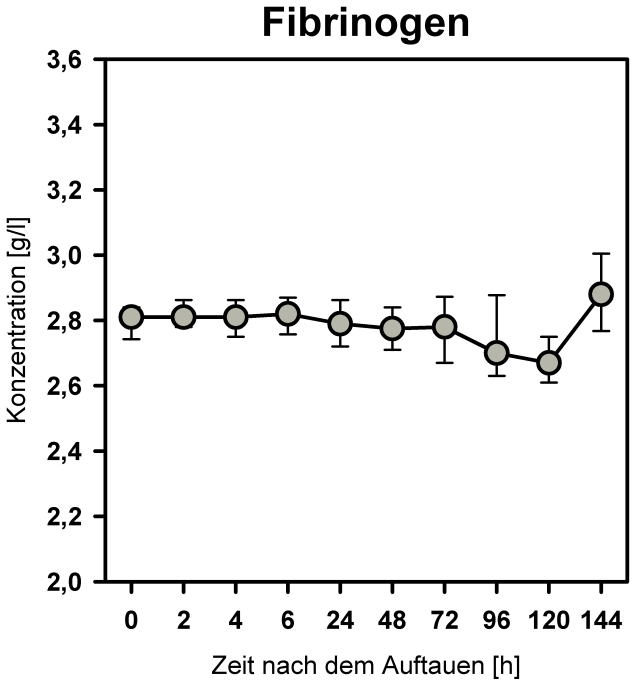

Abb. 4.1: Konzentrationsverlauf des Fibrinogens, als stabil klassifiziert mit $\delta_{max} = -5{,}0$ v.H.

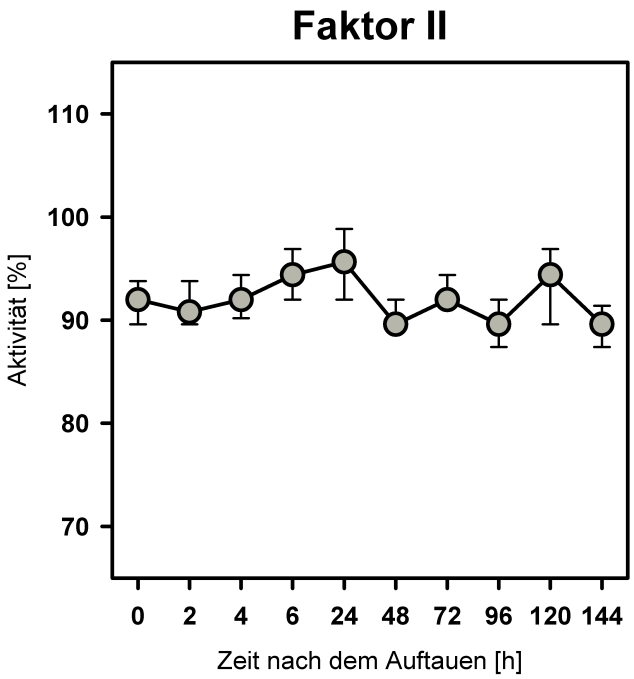

Abb. 4.2: Aktivitätsverlauf des Faktors II, als stabil klassifiziert mit $\delta_{max} = -2{,}6$ v.H.

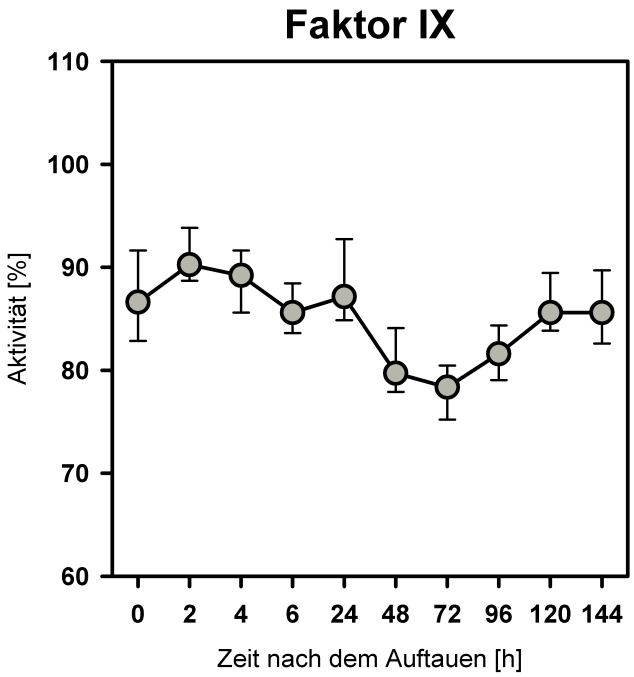

Abb. 4.3: Aktivitätsverlauf des Faktors IX, als stabil klassifiziert mit $\delta_{max} = -9{,}5$ v.H.

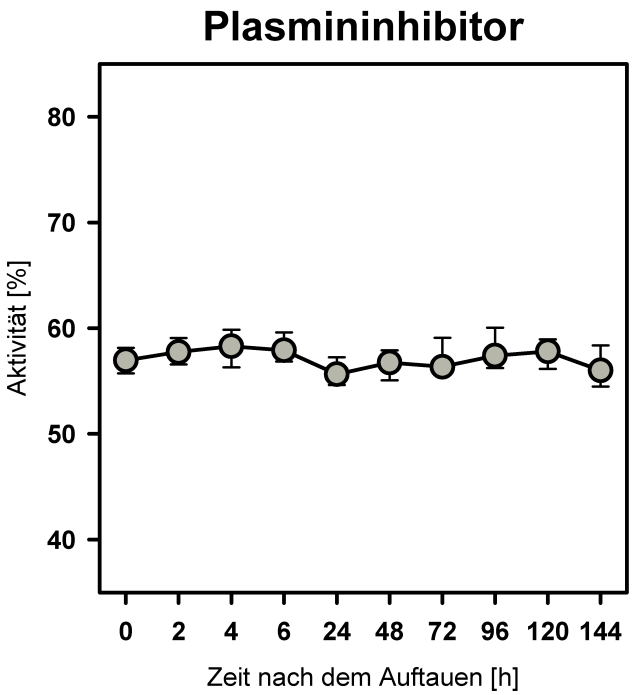

Abb. 4.4: Aktivitätsverlauf des Plasmininhibitors, als stabil klassifiziert mit $\delta_{max} = -2{,}3$ v.H.

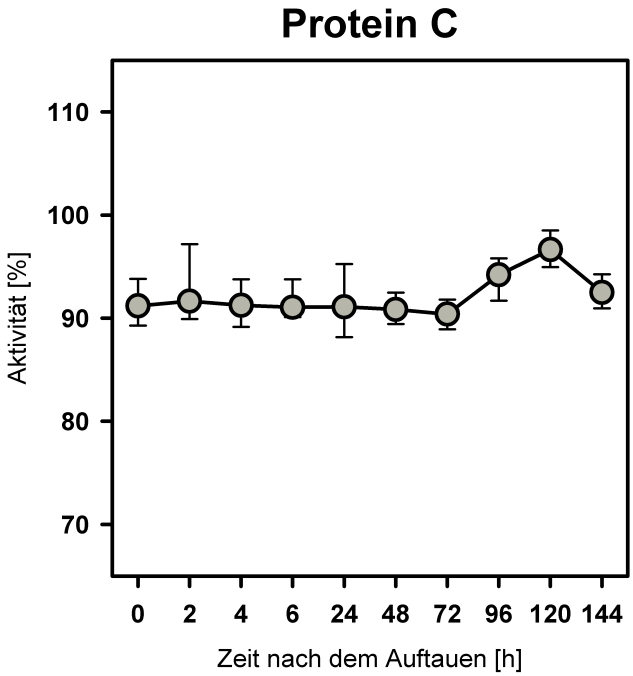

Abb. 4.5: Aktivitätsverlauf des Protein C, als stabil klassifiziert mit $\delta_{max} = -0{,}9$ v.H.

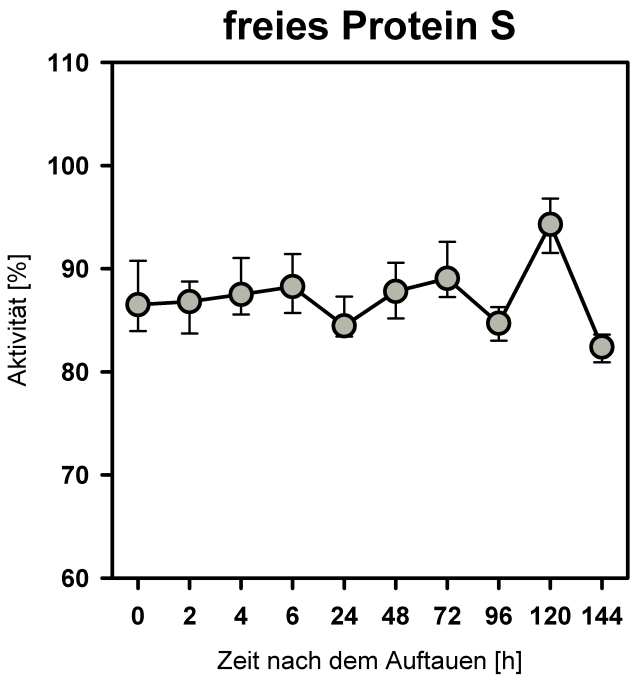

Abb. 4.6: Aktivitätsverlauf des freien Protein S, als stabil klassifiziert mit $\delta_{max} = -4{,}7$ v.H.

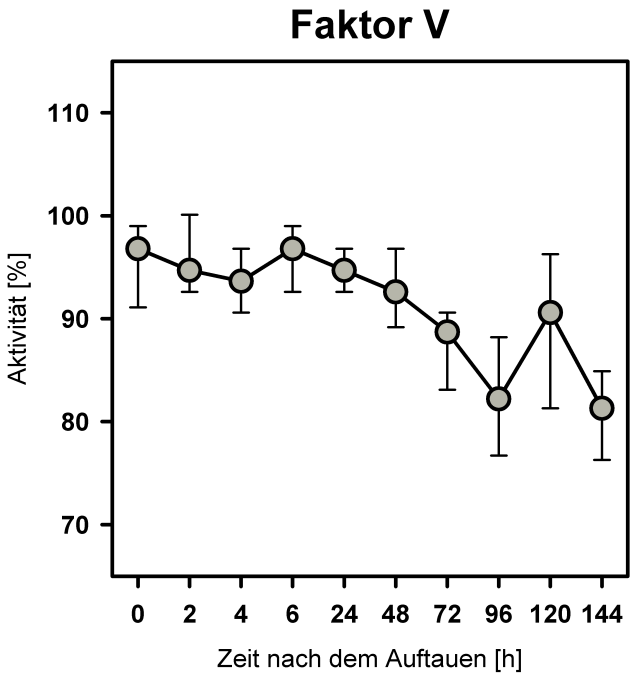

Abb. 4.7: Aktivitätsverlauf des Faktors V, als instabil klassifiziert mit $\delta_{max} = -16{,}0$ v.H.; $\Delta_{max} = -9{,}3\,\%$ zwischen 120 h und 144 h

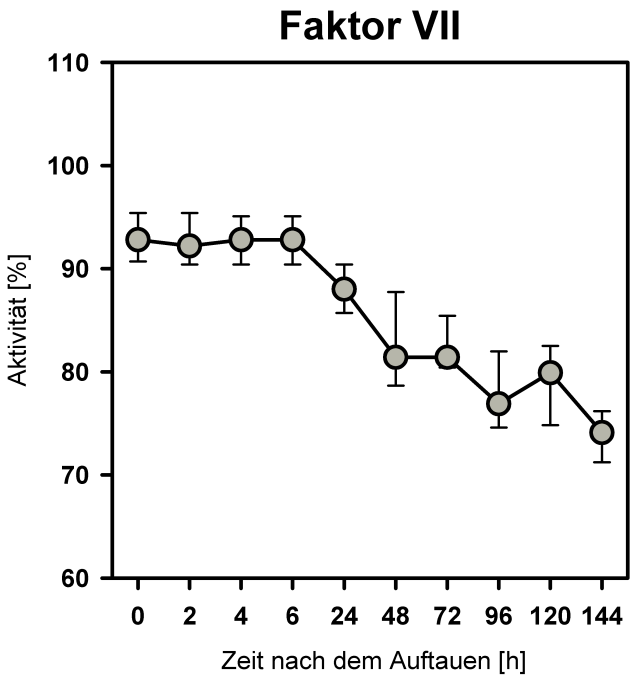

Abb. 4.8: Aktivitätsverlauf des Faktors VII, als instabil klassifiziert mit $\delta_{max} = -20{,}2$ v.H.; $\Delta_{max} = -6{,}6\,\%$ zwischen 24 h und 48 h

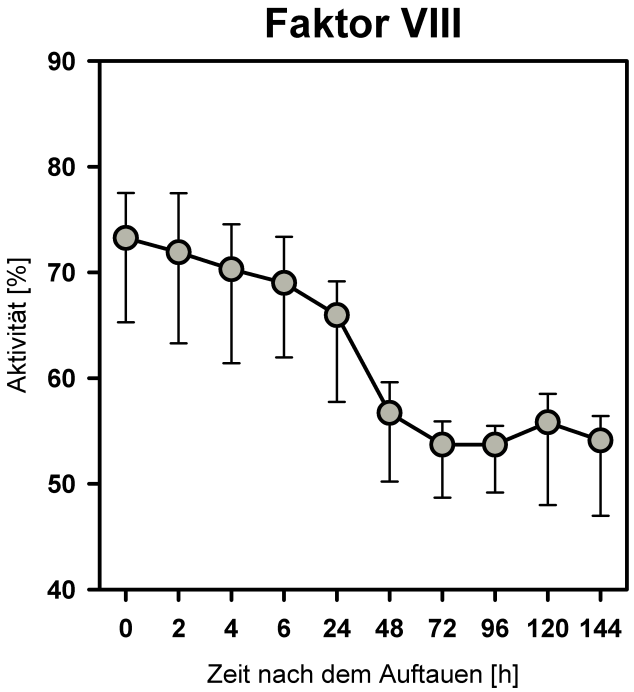

Abb. 4.9: Aktivitätsverlauf des Faktors VIII, als instabil klassifiziert mit $\delta_{max} = -26{,}7$ v.H.; $\Delta_{max} = -9{,}3\,\%$ zwischen 24 h und 48 h

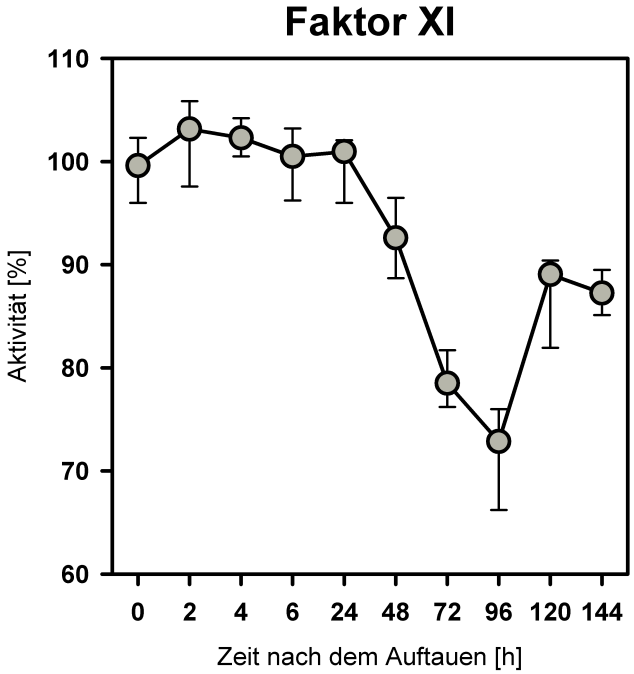

Abb. 4.10: Aktivitätsverlauf des Faktors XI, als instabil klassifiziert mit $\delta_{max} = -26{,}9$ v.H.; $\Delta_{max} = -14{,}1$ % zwischen 48 h und 72 h

vornehmen. In den folgenden tabellarischen Darstellungen der Ergebnisse werden diese Gruppen von einer durchgezogenen Linie getrennt, wobei die Proteine mit vergleichsweise hoher Lagerungsstabilität oberhalb und die vergleichsweise instabilen Gerinnungsfaktoren unterhalb der Linie stehen. Um festzustellen, ob die Lagerungszeit einen statistisch signifikanten Einfluss auf die Konzentrations- bzw. Aktivitätsabnahmen hatte, wurde für jedes untersuchte Protein ein Friedman-Test (nicht-parametrischer Vergleich dreier oder mehrerer verbundener Stichproben) durchgeführt. Die in Tabelle 4.1 aufgeführten statistischen Maßzahlen untermauern den bereits graphisch gewonnen Eindruck einer statistisch signifikanten Abnahme der Konzentrationen bzw. Aktivitäten aller hier untersuchter Gerinnungsproteine in Abhängigkeit von der Lagerungsdauer (alle $p < 0{,}01$).

4.2.2 Messzeitpunktbezogene Datenanalyse

Im diesem Teil der Analyse sollte die Frage beantwortet werden, wann bzw. zwischen welchen Messzeitpunkten die untersuchten gerinnungsaktiven Proteine ihre individuell größte Degradation erfuhren. Somit ließe sich eine erste Aussage darüber treffen, ab welchem Zeitpunkt gegebenenfalls nicht mehr von einer ausreichenden Lagerungsstabilität des Plasmapräparats ausgegangen werden kann. Dazu wurden neben den bereits

	δ_{max} [v.H.]	$\Delta_{0\|2\,\mathrm{h}}$	$\Delta_{2\,\mathrm{h}\|4\,\mathrm{h}}$	$\Delta_{4\,\mathrm{h}\|6\,\mathrm{h}}$	$\Delta_{6\,\mathrm{h}\|24\,\mathrm{h}}$	...
Fibrinogen [g/l]	−5,0	0,00	0,00	0,01	−0,03	
Faktor II [%]	−2,6	−1,2	1,2	2,4	1,3	
Faktor IX [%]	−9,5	3,7	−1,1	−3,6	1,6	
Plasmininhibitor [%]	−2,3	0,8	0,5	−0,4	−2,3‡	
Protein C [%]	−0,9	0,5	−0,4	−0,2	0,0	
freies Protein S [%]	−4,7	0,3	0,7	0,8	−3,8	
Faktor V [%]	−16,0	−2,1	−1,1	3,1	−2,1	
Faktor VII [%]	−20,2	−0,6	0,6	0,0	−4,8	
Faktor VIII [%]	−26,7	−1,3	−1,6	−1,3	−3,1	
Faktor XI [%]	−26,9	3,6	−0,9	−1,8	0,5	

...	$\Delta_{24\,\mathrm{h}\|48\,\mathrm{h}}$	$\Delta_{48\,\mathrm{h}\|72\,\mathrm{h}}$	$\Delta_{72\,\mathrm{h}\|96\,\mathrm{h}}$	$\Delta_{96\,\mathrm{h}\|120\,\mathrm{h}}$	$\Delta_{120\,\mathrm{h}\|144\,\mathrm{h}}$
	−0,02	0,00	−0,08‡	−0,03	0,21
	−6,1‡	2,4	−2,4	4,8	−4,8
	−7,5‡	−1,4	3,3	4,0	0,0
	1,1	−0,4	1,1	0,4	−1,8
	−0,3	−0,4	3,8	2,5	−4,2‡
	3,3	1,3	−4,3	9,6	−11,9‡
	−2,1	−3,9	−6,5	8,4	−9,3‡
	−6,6‡	0,0	−4,5	3,0	−5,8
	−9,3‡	−3,0	0,0	2,1	−1,7
	−8,4	−14,1‡	−5,7	16,2	−1,8

Tabelle 4.2: Darstellung der δ_{max} jedes Gerinnungsproteins mit den jeweiligen absoluten Konzentrations- bzw. Aktivitätsdifferenzen Δ zwischen zwei aufeinander folgenden Messzeitpunkten; ‡: Δ_{max} (jeweils $p < 0{,}01$); früheste Δ_{max} der instabilen Gerinnungsproteine sind fett gedruckt

im vorangegangenen Schritt berechneten maximalen relativen Konzentrations- bzw. Aktivitätsabnahmen δ_{max} auch die absoluten Konzentrations- bzw. Aktivitätsabnahmen zwischen zwei aufeinander folgenden Messzeitpunkten $\Delta_{t_a|t_b}$ ermittelt (Tab. 4.2). In der Gruppe der Gerinnungsfaktoren mit vergleichsweise großen maximalen relativen Aktivitätsabnahmen ($|\delta_{max}| > 10$ v.H.), also mit vergleichsweise geringer Lagerungsstabilität im Verlauf, traten die individuell größten absoluten Aktivitätsabnahmen zwischen 24 und 48 Stunden (Faktoren VII und VIII), zwischen 48 und 72 Stunden (Faktor XI) sowie zwischen 120 und 144 Stunden (Faktor V) auf. Diese Differenzen waren in allen vier Fällen mit jeweils $p < 0{,}01$ statistisch signifikant (Wilcoxon-Test zum Vergleich zweier verbundener Stichproben). Die Faktoren VII und VIII markierten also den Zeitraum zwischen den Messzeitpunkten $t_{24\,\mathrm{h}}$ und $t_{48\,\mathrm{h}}$ als den frühesten Zeitraum, in dem ein oder mehrere der vergleichsweise instabilen Gerinnungsfaktoren den größten Teil ihrer Ausgangsaktivität nach dem Auftauen verloren hatten.

4.3 Vergleich der Messergebnisse mit Referenzwerten

4.3.1 Ausgangssituation nach dem Auftauen

Die erste Messung, d. h. die erste automatisierte Bestimmung der Konzentration des Fibrinogens und der Aktivitäten der Faktoren II, V, VII, VIII, IX und XI sowie des Protein C, des freien Protein S und des Plasmininhibitors, erfolgte zum Zeitpunkt t_0, also direkt nach dem Auftauen der Plasmabeutel und vor der anschließenden Lagerung bei $4 \pm 2\,°\mathrm{C}$ (Tab. 4.3). Es zeigte sich, dass die gemessene Konzentration des Fibrinogens zum Zeitpunkt t_0 im Median um 0,43 g/l höher lag als der untere Grenzwert des physiologischen Referenzbereichs in humanem Plasma (Abb. 4.11). Dieser Unterschied war mit $p < 0{,}01$ statistisch signifikant (Wilcoxon-Rangsummentest für einzelne Stichproben). In gleicher Weise verhielten sich die zum Zeitpunkt t_0 gemessenen Aktivitäten der enzymatisch aktiven Gerinnungsproteine, für die keine gesetzlichen Mindestanforderungen bezüglich ihrer Aktivitäten in S/D-Plasmapräparationen bestehen (Faktor II [Abb. 4.12], Faktor IX [Abb. 4.13], Protein C [Abb. 4.14], freies Protein S [Abb. 4.15], Faktor VII [Abb. 4.16]). Die Aktivitäten aller dieser Gerinnungsproteine waren ebenfalls höher als die für die hier präsentierten statistischen Analysen eingeführten Grenzwerte (untere Grenzwerte der physiologischen Referenzbereiche in humanem Plasma, s. Tab 3.1). Sie wiesen dabei gleichermaßen jeweils statistisch signifikante Unterschiede auf (alle $p < 0{,}01$). Die Faktoren V (Abb. 4.17), VIII (Abb. 4.18) und XI (Abb. 4.19) stellen die Gruppe von Gerinnungsfaktoren dar, für die Mindestaktivitäten in S/D-behandeltem Plasma durch das europäische Arzneibuch vorgeschrieben sind. Die Aktivitäten dieser Gerinnungsfaktoren

	Median	Perzentile (25.–75.)	Referenzwert	Abweichung	Signifik. p
Fibrinogen [g/l]	2,81	2,74–2,84	2,38	0,43	$< 0{,}01$
Faktor II [%]	92,0	89,6–93,8	79,0	13,0	$< 0{,}01$
Faktor IX [%]	86,6	82,9–91,6	65,0	21,6	$< 0{,}01$
Plasmininhibitor [%]	57,0	55,7–58,2	A: 98,0	−41,0	n. a.
			B: 33,2	23,8	$< 0{,}01$
Protein C [%]	91,2	89,3–93,8	70,0	21,2	$< 0{,}01$
freies Protein S [%]	86,5	84,0–90,8	75,0	11,5	$< 0{,}01$
Faktor VII [%]	92,8	90,7–95,4	50,0	42,8	$< 0{,}01$
Faktor V [%]	96,8	91,1–99,0	**50,0**	46,8	$< 0{,}01$
Faktor VIII [%]	73,3	66,3–77,5	**50,0**	23,3	$< 0{,}01$
Faktor XI [%]	99,6	96,0–102,3	**50,0**	49,6	$< 0{,}01$

Tabelle 4.3: Messwerte nach dem Auftauen mit Lagemaßen, Abweichungen der Mediane von den definierten Referenzwerten und p-Werten; A: untere Grenze des physiologischen Referenzbereichs, B: Ausgangsaktivität in Octaplas®, n. a.: nicht angewendet; Gerinnungsfaktoren mit vorgegebener Mindestaktivität sind fett gedruckt

lagen am Zeitpunkt t_0 ebenfalls jeweils statistisch signifikant über den vorgeschriebenen Grenzwerten, die mit jeweils 50 % festgelegt sind (alle $p < 0{,}01$). Im Unterschied zu den bereits genannten Gerinnungsproteinen lag die Aktivität des Plasmininhibitors bereits zum Zeitpunkt t_0 unterhalb seines physiologischen Referenzbereichs, was sich an einer negativen Abweichung des Medians der Messwerte vom unteren Grenzwert des Referenzbereichs erkennen lässt (Abb. 4.20, Tab. 4.3). Da dies zu erwarten war (s. o.), wurde hier und in den folgenden Analysen die Aktivität des Plasmininhibitors in Octaplas® LG mit der unter gleichen Versuchsbedingungen ermittelten Ausgangsaktivität des Plasmininhibitors im Vorgängerprodukt Octaplas® verglichen, um eine weitere Einordnung möglich zu machen. Dabei ließ sich feststellen, dass die Aktivität des Plasmininhibitors im hier untersuchten Octaplas® LG zum Zeitpunkt t_0 im Median um 23,8 % und damit statistisch signifikant höher lag als in Octaplas® ($p < 0{,}01$). Zum Zeitpunkt t_0 waren demnach für alle hier untersuchten Gerinnungsproteine die gesetzlich vorgeschriebenen bzw. die in dieser Arbeit eingeführten Qualitätskriterien (Tab. 3.1) erfüllt.

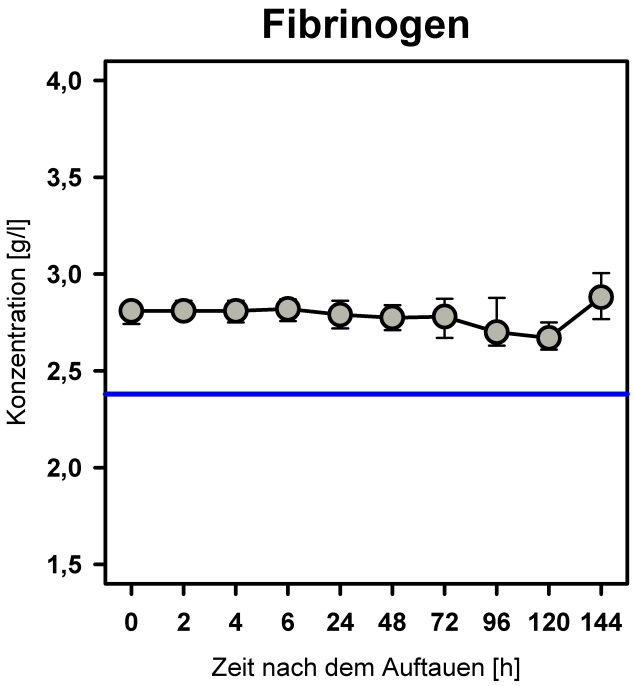

Abb. 4.11: Konzentrationsverlauf des Fibrinogens in Relation zur unteren Grenze seines physiologischen Referenzbereichs (blaue Linie)

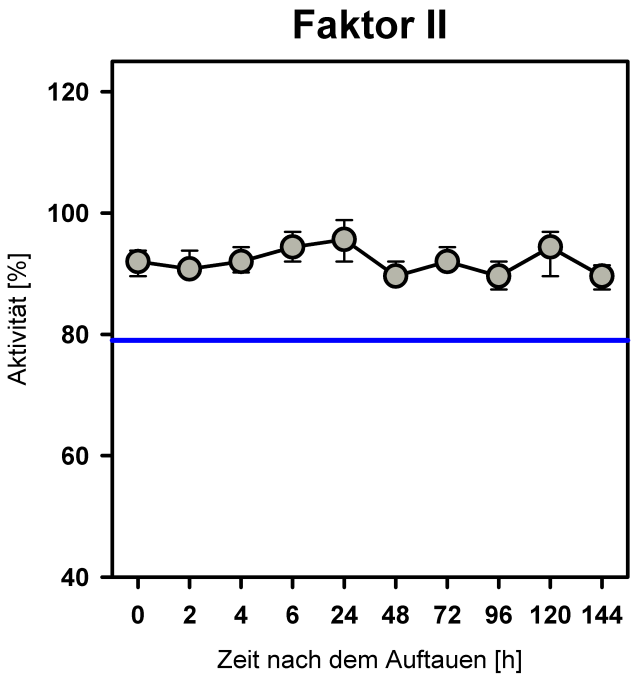

Abb. 4.12: Aktivitätsverlauf des Faktors II in Relation zur unteren Grenze seines physiologischen Referenzbereichs (blaue Linie)

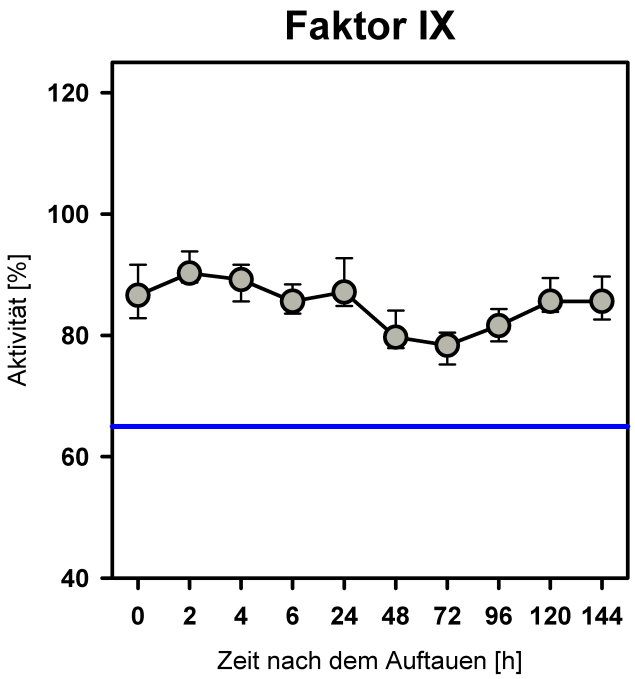

Abb. 4.13: Aktivitätsverlauf des Faktors IX in Relation zur unteren Grenze seines physiologischen Referenzbereichs (blaue Linie)

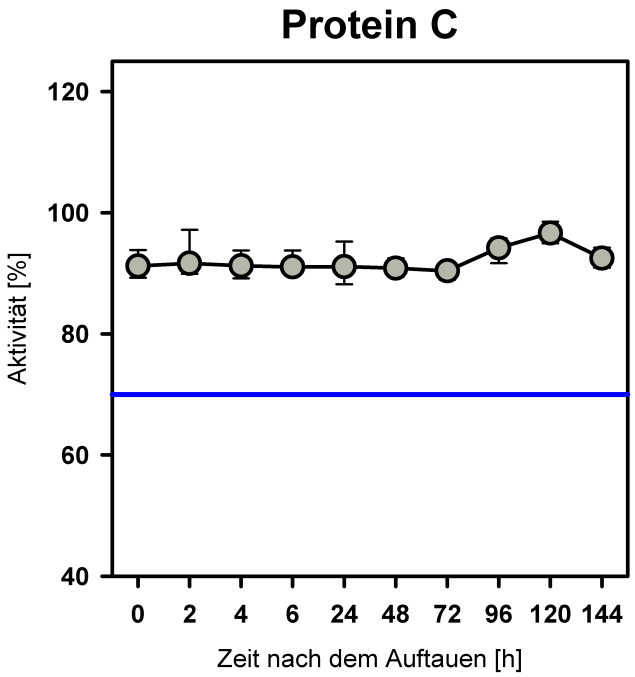

Abb. 4.14: Aktivitätsverlauf des Protein C in Relation zur unteren Grenze seines physiologischen Referenzbereichs (blaue Linie)

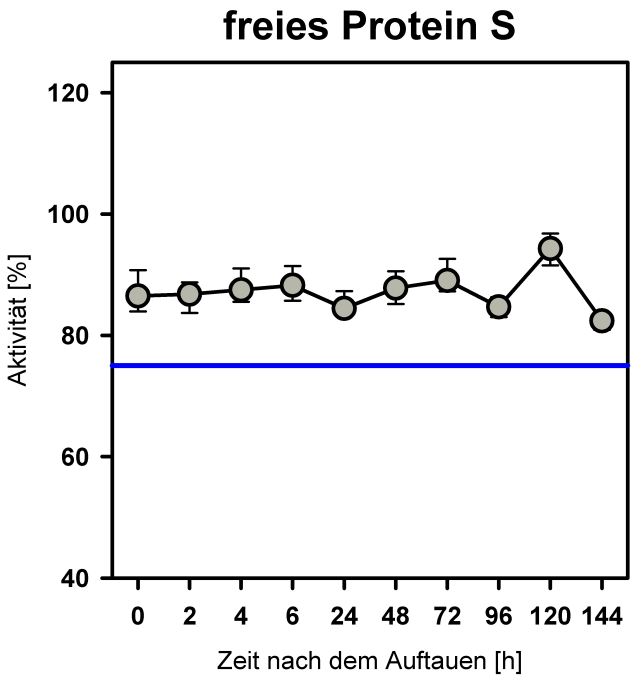

Abb. 4.15: Aktivitätsverlauf des freien Protein S in Relation zur unteren Grenze seines physiologischen Referenzbereichs bei Männern (blaue Linie)

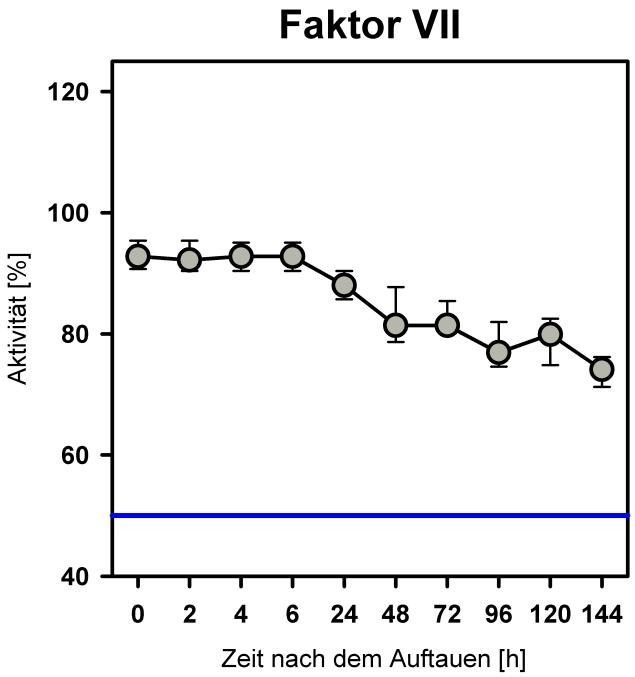

Abb. 4.16: Aktivitätsverlauf des Faktors VII in Relation zur unteren Grenze seines physiologischen Referenzbereichs (blaue Linie)

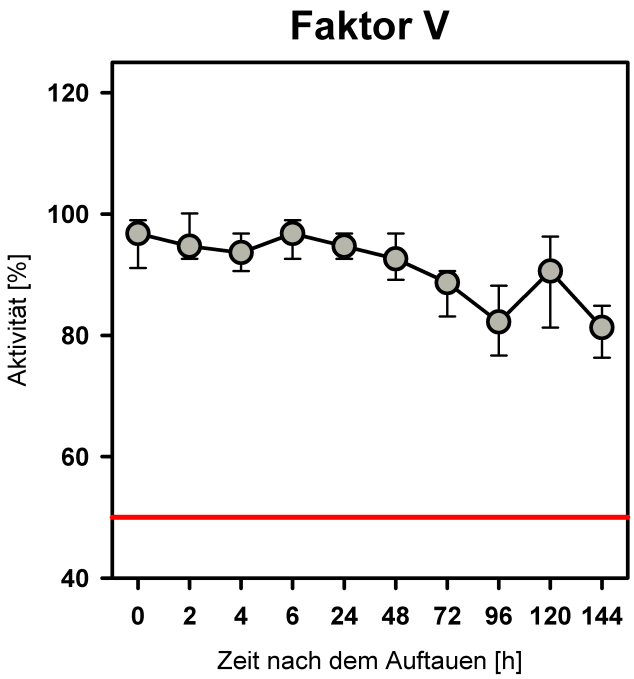

Abb. 4.17: Aktivitätsverlauf des Faktors V in Relation zu seiner geforderten Mindestaktivität (rote Linie)

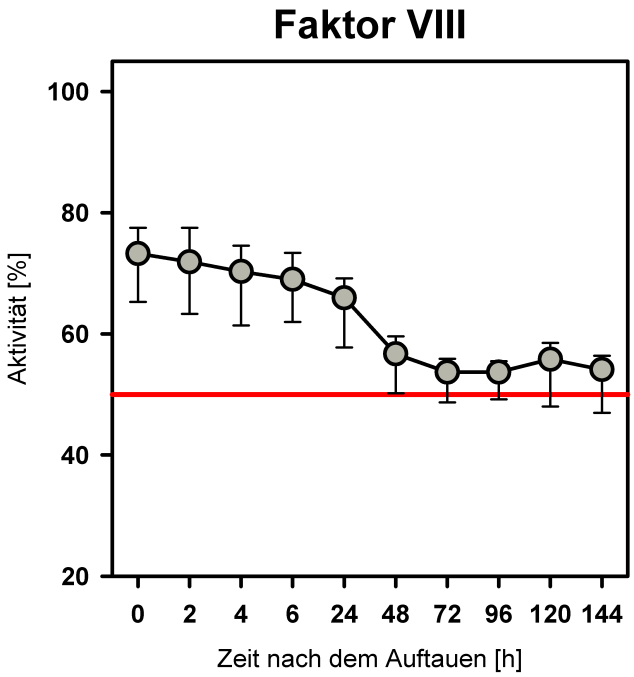

Abb. 4.18: Aktivitätsverlauf des Faktors VIII in Relation zu seiner geforderten Mindestaktivität (rote Linie)

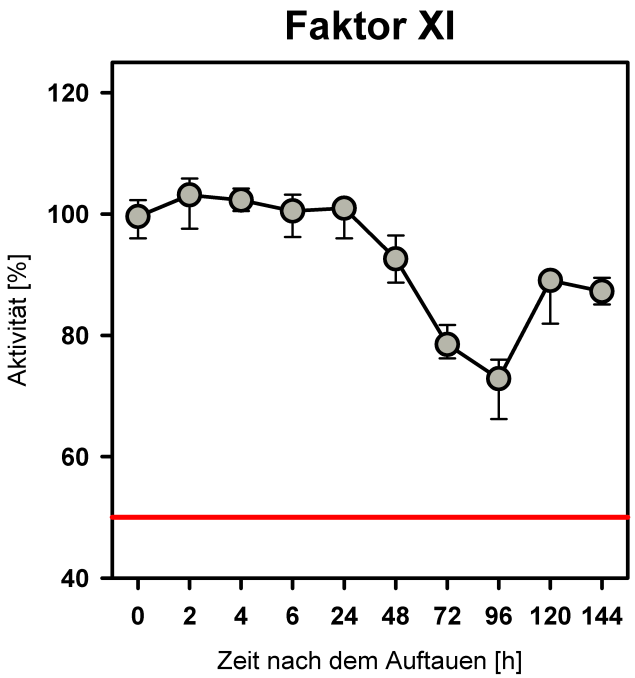

Abb. 4.19: Aktivitätsverlauf des Faktors XI in Relation zu seiner geforderten Mindestaktivität (rote Linie)

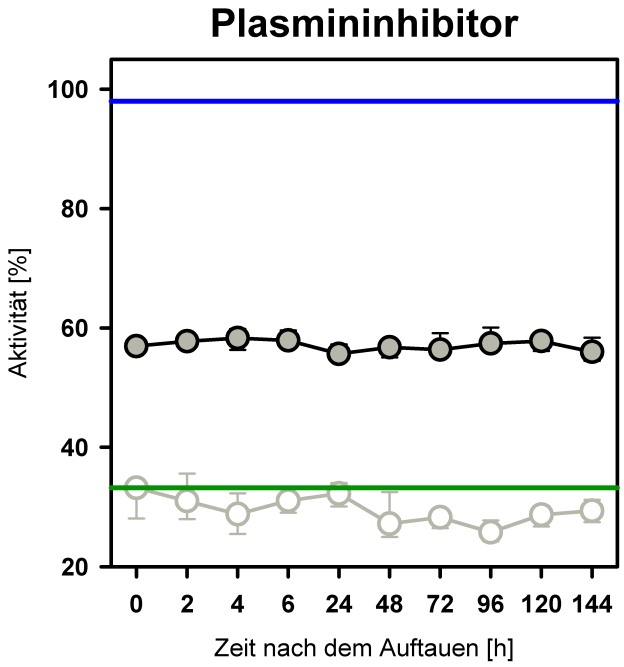

Abb. 4.20: Aktivitätsverlauf des Plasmininhibitors in Relation zur unteren Grenze seines physiologischen Referenzbereichs (blaue Linie) und zu seiner Ausgangsaktivität in Octaplas® (grüne Linie, Aktivitätsverlauf in grau)

	Median	Perzentile (25.–75.)	Referenzwert	Signifikanz p
Fibrinogen [g/l]	2,82	2,76–2,87	2,38	$< 0{,}01$
Faktor II [%]	94,4	92,0–96,9	79,0	$< 0{,}01$
Faktor IX [%]	85,6	83,6–88,4	65,0	$< 0{,}01$
Plasmininhibitor [%]	57,9	56,9–59,6	33,2	$< 0{,}01$
Protein C [%]	91,1	90,1–93,8	70,0	$< 0{,}01$
freies Protein S [%]	88,3	85,7–91,4	75,0	$< 0{,}01$
Faktor VII [%]	92,8	90,4–95,1	50,0	$< 0{,}01$
Faktor V [%]	96,8	92,6–99,0	**50,0**	$< 0{,}01$
Faktor VIII [%]	69,0	62,0–73,4	**50,0**	$< 0{,}01$
Faktor XI [%]	100,5	96,2–103,2	**50,0**	$< 0{,}01$

Tabelle 4.4: Messwerte nach Lagerung über 6 Stunden mit Lagemaßen, definierten Referenzwerten und p-Werten; Gerinnungsfaktoren mit vorgegebener Mindestaktivität sind fett gedruckt

4.3.2 Situation nach Lagerung über sechs Stunden

Der im ersten Teil der Datenanalyse festgestellte statistisch signifikante Einfluss der Lagerungszeit auf die Konzentrations- bzw. Aktivitätsverläufe nach dem Auftauen ließ noch keine eindeutige Aussage über den genauen Verlauf der Konzentrations- bzw. Aktivitätsabnahmen der einzelnen Gerinnungsproteine in Bezug auf die vorgeschriebenen Mindestaktivitäten zu. Es galt daher nun in einer *post hoc*-Analyse die Konzentrationen bzw. Aktivitäten an bestimmten Messzeitpunkten mit den gesetzlich festgeschrieben bzw. mit den für diese Analyse eingeführten Grenzwerten (Tab. 3.1) zu vergleichen. Die ersten sechs Stunden nach dem Auftauen stellen den verbindlichen Zeitraum dar, in dem das aufgetaute Plasma laut den Hämotherapierichtlinien der Bundesärztekammer transfundiert werden muss. Deshalb wurden im nächsten Schritt der Analyse die Konzentrationen bzw. Aktivitäten der betrachteten Gerinnungsproteine nach sechsstündiger Lagerung (Zeitpunkt $t_{6\,\mathrm{h}}$) mit ihren jeweiligen Referenzwerten verglichen (Wilcoxon-Rangsummentest für einzelne Stichproben). Wie Tabelle 4.4 zeigt, lagen die Mediane der Konzentrationen bzw. Aktivitäten aller betrachteter Gerinnungsproteine auch zum Zeitpunkt $t_{6\,\mathrm{h}}$ statistisch signifikant über den Referenzwerten (alle $p < 0{,}01$). Die bisherigen Ergebnisse belegen demnach, dass die in Octaplas® LG gemessenen Konzentrationen bzw. Aktivitäten der Gerinnungsproteine sowohl direkt nach dem Auftauen als auch nach den bislang maximal erlaubten sechs Stunden Lagerung die definierten Referenzwerte nicht unterschreiten.

	Median	Perzentile (25.–75.)	Referenzwert	Signifikanz p
Fibrinogen [g/l]	2,79	2,72–2,86	2,38	$< 0{,}01$
Faktor II [%]	95,7	92,0–98,9	79,0	$< 0{,}01$
Faktor IX [%]	87,2	84,9–92,7	65,0	$< 0{,}01$
Plasmininhibitor [%]	55,7	54,6–57,3	33,2	$< 0{,}01$
Protein C [%]	91,1	88,2–95,3	70,0	$< 0{,}01$
freies Protein S [%]	84,5	83,4–87,3	75,0	$< 0{,}01$
Faktor VII [%]	88,0	85,7–90,4	50,0	$< 0{,}01$
Faktor V [%]	94,7	92,6–96,8	**50,0**	$< 0{,}01$
Faktor VIII [%]	66,0	57,8–69,2	**50,0**	$< 0{,}01$
Faktor XI [%]	101,0	96,0–102,1	**50,0**	$< 0{,}01$

Tabelle 4.5: Messwerte nach Lagerung über 24 Stunden mit Lagemaßen, definierten Referenzwerten und p-Werten; Gerinnungsfaktoren mit vorgegebener Mindestaktivität sind fett gedruckt

4.3.3 Situation nach Lagerung über 24 Stunden

Die ersten 24 Stunden nach dem Auftauen bilden den im ersten Teil der Analyse ermittelten Zeitraum, nach dem die vergleichsweise instabilen Gerinnungsfaktoren VII und VIII den größten Teil ihrer Ausgangsaktivität noch nicht verloren hatten. Deshalb wurden im diesem Auswertungsschritt die Konzentrationen bzw. Aktivitäten aller Gerinnungsproteine nach eintägiger Lagerung (Zeitpunkt $t_{24\,\mathrm{h}}$) mit ihren jeweiligen Referenzwerten verglichen. Wie aus Tabelle 4.5 ersichtlich, lagen die Mediane der Konzentrationen bzw. Aktivitäten aller Gerinnungsproteine auch zum Zeitpunkt $t_{24\,\mathrm{h}}$ in gleicher Weise statistisch signifikant über den Referenzwerten (alle $p < 0{,}01$). Nach Ablauf der bislang maximal erlaubten sechs Stunden Lagerungszeit ergibt sich für Octaplas® LG demnach auch bis zu einer Dauer von 24 Stunden keine signifikante Veränderung in Bezug auf die Einhaltung der für S/D-Plasmapräparate durch das Europäische Arzneibuch geforderten bzw. der hier zusätzlich eingeführten Qualitätskriterien.

4.3.4 Situation nach Lagerung über 144 Stunden

Es stellte sich die Frage, ob es im Verlauf der gesamten Lagerungsdauer von 144 Stunden überhaupt zu einer Unterschreitung der definierten Referenzwerte eines einzelnen oder mehrerer der hier untersuchten Gerinnungsproteine kam. Um diese Frage zu beantworten,

	Median	Perzentile (25.–75.)	Referenzwert	Signifikanz p	
Fibrinogen [g/l]	2,88	2,77–3,00	2,38	$< 0{,}01$	
Faktor II [%]	89,6	87,4–91,4	79,0	$< 0{,}01$	
Faktor IX [%]	85,6	82,6–89,7	65,0	$< 0{,}01$	
Plasmininhibitor [%]	56,0	54,5–58,4	33,2	$< 0{,}01$	
Protein C [%]	92,5	91,0–94,3	70,0	$< 0{,}01$	
freies Protein S [%]	82,4	80,9–83,6	75,0	$< 0{,}01$	
Faktor VII [%]	74,1	71,2–76,2	50,0	$< 0{,}01$	
Faktor V [%]	81,3	76,3–84,9	**50,0**	$< 0{,}01$	
Faktor VIII [%]	54,1	47,0–56,4	**50,0**	$= 0{,}13$	$*$
Faktor XI [%]	87,3	85,1–89,5	**50,0**	$< 0{,}01$	

Tabelle 4.6: Messwerte nach Lagerung über 144 Stunden mit Lagemaßen, definierten Referenzwerten und p-Werten; $*$: statistisch nicht signifikanter Unterschied vom Referenzwert ($p > 0{,}05$); Gerinnungsfaktoren mit vorgegebener Mindestaktivität sind fett gedruckt

wurden im nächsten Schritt zunächst die am letzten Messzeitpunkt erhoben Messwerte betrachtet, da aus theoretischen Überlegungen am spätesten Zeitpunkt aufgrund der fortschreitenden Degradation der Proteine *in vitro* die vergleichsweise geringsten Konzentrationen bzw. Aktivitäten zu erwarten sind. Mit Ausnahme des Faktors VIII lagen am Zeitpunkt $t_{144\,\mathrm{h}}$ die Konzentrationen und Aktivitäten der übrigen Proteine in ähnlicher Weise wie am Zeitpunkt t_0 und am Zeitpunkt $t_{6\,\mathrm{h}}$ statistisch signifikant über den definierten Referenzwerten (jeweils $p < 0{,}01$). Die Aktivität des Gerinnungsfaktors VIII unterschied sich nach 144 Stunden jedoch nicht mehr statistisch signifikant von der durch das Europäische Arzneibuch geforderten Mindestaktivität von 50 % und lag im Median um 4,1 % über dieser gesetzlichen Vorgabe ($p = 0{,}13$). Da die größte Proteindegradation theoretisch zwar am Ende des Untersuchungszeitraums zu erwarten ist, tatsächlich aber einige der hier untersuchten Gerinnungsproteine schon zu früheren Messzeitpunkten ihre jeweils geringsten Konzentrationen bzw. Aktivitäten aufwiesen, wurden zur Ergänzung der obigen Analyse auch diese an den Zeitpunkten $t_{c_{min}}$ bzw. $t_{a_{min}}$ erhobenen im Median niedrigsten Messwerte mit den jeweiligen Referenzwerten verglichen (Tab. 4.7). Hier bestätigte sich, dass tatsächlich außer Faktor VIII (s. u.) kein anderes Gerinnungsprotein seinen definierten Referenzwert im Verlauf der Lagerung unterschritt bzw. sich von diesem nicht mehr signifikant unterschied, was sich auch aus den graphischen Darstellungen der Konzentrations- und Aktivitätsverläufe nachvollziehen lässt (Abb. 4.11 bis Abb. 4.20).

	$t_{c_{min}}$ $t_{a_{min}}$	Median	Perzentile (25.–75.)	Referenzwert	Signifikanz p	
Fibrinogen [g/l]	120 h	2,67	2,61–2,75	2,38	$< 0{,}01$	
Faktor II [%]	144 h	89,6	87,4–91,4	79,0	$< 0{,}01$	
Faktor IX [%]	72 h	78,4	75,2–80,5	65,0	$< 0{,}01$	
Plasmininhibitor [%]	24 h	55,7	54,6–57,3	33,2	$< 0{,}01$	
Protein C [%]	72 h	90,4	88,9–91,8	70,0	$< 0{,}01$	
freies Protein S [%]	144 h	82,4	80,9–83,6	75,0	$< 0{,}01$	
Faktor VII [%]	144 h	74,1	71,2–76,2	50,0	$< 0{,}01$	
Faktor V [%]	144 h	81,3	76,3–84,9	**50,0**	$< 0{,}01$	
Faktor VIII [%]	96 h	53,7	49,2–55,5	**50,0**	$= 0{,}15$	$*$
Faktor XI [%]	96 h	72,9	66,2–76,0	**50,0**	$< 0{,}01$	

Tabelle 4.7: In Median niedrigste Messwerte an den Zeitpunkten $t_{c_{min}}$ bzw. $t_{a_{min}}$ mit Lagemaßen, definierten Referenzwerten und p-Werten; $*$: statistisch nicht signifikanter Unterschied vom Referenzwert ($p > 0{,}05$); Gerinnungsfaktoren mit vorgegebener Mindestaktivität sind fett gedruckt

4.3.5 Aktivitätsverlauf des Faktors VIII über den Untersuchungszeitraum

Im folgenden Schritt der Analyse musste also untersucht werden, bis zu welchem Messzeitpunkt die Aktivität des Gerinnungsfaktors VIII noch statistisch signifikant über der vorgeschriebenen Mindestaktivität lag, bevor sie diesen Wert unterschritt. Dazu wurden die Messwerte aus der Aktivitätsbestimmung des Faktors VIII an allen Messzeitpunkten mit der vorgeschriebenen Mindestaktivität von 50 % verglichen. Hier zeigte sich, dass die Aktivität nach 48 Stunden hoch signifikant ($p = 0{,}001$) und nach 72 Stunden noch knapp signifikant über 50 % lag ($p = 0{,}035$), nach 96 Stunden hingegen unterschied sie sich nicht mehr signifikant von 50 % ($p = 0{,}15$; Tab. 4.8, Abb. 4.21). Letzteres galt, wie aufgrund der mit der Zeit fortschreitenden Degradation des Proteins zu erwarten war, auch nach 144 Stunden ($p = 0{,}13$). Der hier beobachtete statistisch signifikante Unterschied der Aktivität des Faktors VIII zu 50 % nach 120 Stunden erscheint in diesem Zusammenhang inhaltlich nicht plausibel und könnte bei genauerer Betrachtung der Messergebnisse einzelnen ausreißenden Messwerten geschuldet sein, die aufgrund der Anzahl der in die Datenanalyse eingehenden Fälle ($n = 20$) die statistische Berechnung beeinflusst haben könnten.

Messzeitpunkt t	Median	Perzentile (25.–75.)	Referenzwert	Signifikanz p	
0	73,3	65,3–77,5	50,0	$< 0{,}001$	
2 h	71,9	63,3–77,5	50,0	$< 0{,}001$	
4 h	70,3	61,4–74,6	50,0	$< 0{,}001$	
6 h	69,0	62,0–73,4	50,0	$< 0{,}001$	
24 h	66,0	57,8–69,2	50,0	$< 0{,}001$	
48 h	56,7	50,2–59,6	50,0	$= 0{,}001$	
72 h	53,7	48,7–55,9	50,0	$= 0{,}035$	
96 h	53,7	49,2–55,5	50,0	$= 0{,}15$	$*$
120 h	55,8	48,0–58,5	50,0	$= 0{,}01$	
144 h	54,1	47,0–56,4	50,0	$= 0{,}13$	$*$

Tabelle 4.8: Aktivität des Faktors VIII an allen Messzeitpunkten mit Lagemaßen und p-Werten aus Rangsummentests; $*$: statistisch nicht signifikanter Unterschied vom Referenzwert ($p > 0{,}05$).

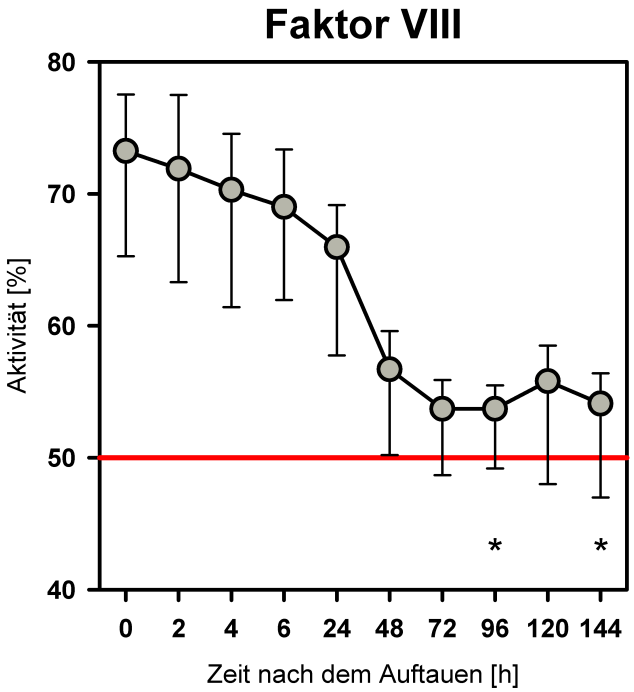

Abb. 4.21: Aktivität des Faktors VIII unterscheidet sich nach 96 h nicht mehr statistisch signifikant von der für ihn geforderten Mindestaktivität (rote Linie); $*$: $p > 0{,}05$

5 Diskussion

Die vorliegende Arbeit ist die erste Untersuchung zur Langzeitstabilität der Gerinnungsproteine in aufgetautem und gelagertem S/D-Plasma mit Prioneneliminierung, Octaplas® LG. Es wurde gezeigt, dass es in aufgetauten und ungeöffneten Plasmapräparaten nach einer Lagerung bei 4 °C über 144 Stunden zu keiner mikrobiologischen Kontamination durch Bakterien oder Pilze gekommen war. Anhand der im Verlauf der Lagerung an definierten Messzeitpunkten registrierten maximalen relativen Konzentrations- bzw. Aktivitätsabnahmen der hier untersuchten Gerinnungsproteine (Fibrinogen, Faktoren II, V, VII, VIII, IX, XI, Plasmininhibitor, Protein C, freies Protein S) ließen sich diese in eine Gruppe von vergleichsweise lagerungsstabilen und eine Gruppe von vergleichsweise lagerungsinstabilen Proteinen einteilen. Die in dieser Untersuchung als lagerungsstabil definierten Gerinnungsproteine (Fibrinogen, Faktor II, Faktor IX, Plasmininhibitor, Protein C, freies Protein S) wiesen eine relative Konzentrations- bzw. Aktivitätsabnahme von weniger als 10 v.H. über 144 Stunden auf, wobei ihre Konzentrationen bzw. Aktivitäten zu jedem Messzeitpunkt über den jeweiligen Referenzwerten lagen. Die Aktivitätsmessungen der als instabil klassifizierten Gerinnungsproteine ergaben, dass zwei dieser Proteine, die Faktoren VII und VIII, bereits zwischen den Zeitpunkten $t_{24\,\mathrm{h}}$ und $t_{48\,\mathrm{h}}$ nach dem Auftauen ihre jeweils maximalen absoluten Aktivitätsabnahmen erfuhren ($p < 0{,}01$). Diejenigen instabilen Gerinnungsproteine, für die eine Mindestaktivität von 50 % in S/D-behandeltem Plasma durch das europäische Arzneibuch vorgegeben ist (Faktoren V, VIII und XI), wurden weiterhin im Hinblick auf die Einhaltung dieser Vorgabe im Verlauf der Lagerung untersucht. Während die Faktoren V und XI dieses Kriterium innerhalb der Lagerungsdauer von 144 Stunden durchgehend und statistisch signifikant erfüllten, unterschritt die Aktivität des Faktors VIII nach 96 Stunden Lagerung diese vorgegebene Mindestaktivität. Im Folgenden werden die hier gewonnenen Ergebnisse im Kontext der vorhandenen Literatur zu etablierten Plasmapräparaten und im Hinblick auf die mögliche klinische Anwendung von aufgetautem und über längere Zeit gelagertem S/D-Plasma mit Prioneneliminierung diskutiert.

5.1 Mikrobiologische Sicherheit

Eine Grundvoraussetzung für alle weiteren Überlegungen ist die Abwesenheit von mikrobiellen Kontaminationen der untersuchten Präparate nach der sechstägigen Lagerung. Deshalb wurden mikrobiologische Untersuchungen durchgeführt, um eine eventuelle Kontamination des aufgetauten Plasmas in den noch ungeöffneten Plasmabeuteln während der Lagerung zu detektieren, weil eine klinische Verwendung eines bereits aufgetauten und gelagerten Präparats nur bei dessen mikrobiologischer Unversehrtheit möglich wäre und sich anderenfalls verbieten würde. Die hierzu am Ende des Untersuchungszeitraums durchgeführten mikrobiologischen Untersuchungen des Plasmas aus ungeöffneten Plasmabeuteln konnten kein Bakterien- oder Pilzwachstum nachweisen. Dies deckt sich mit den Ergebnissen anderer Gruppen, die ebenfalls durch gleichartige mikrobiologische Testungen (mit gelagertem Plasma beimpfte Blutkulturflaschen) kein Wachstum nach fünftägiger (Sidhu et al. 2006), sechstägiger (von Heymann et al. 2009) oder siebentägiger Lagerung feststellen konnten (Thiele et al. 2012). Da im Herstellungsprozess von S/D-Plasmapräparaten eine Sterilfiltrierung vor dem Abfüllen stattfindet, ist eine bakterielle Verunreinigung im Herstellungsprozess unwahrscheinlich. Zudem soll die PVC-Umverpackung der Präparate das Plasma während des Auftauvorgangs und der anschließenden Lagerung zusätzlich vor Kontamination schützen. Bei der Verwendung von Aufwärmgeräten mit beheizten Wasserbädern wurden für GFP in der Literatur Kontaminationen mit Bakterien beschrieben, die in den dauerhaft auf 37 °C temperierten Wasserbädern der Geräte vergleichsweise gute Wachstumsbedingungen vorfinden (Casewell et al. 1981; Muyldermans et al. 1998). Für die in dieser Untersuchung verwendeten Mikrowellengeräte gibt es bisher keine Berichte über Kontaminationen während des Auftauvorgangs.

5.2 Lagerungsstabilität

Der Begriff Lagerungsstabilität bezieht sich hier auf die im gesamten Untersuchungszeitraum registrierten maximalen relativen Konzentrations- bzw. Aktivitätsabnahmen (δ_{max}) einzelner Gerinnungsproteine im Vergleich zu ihren Ausgangsmesswerten. Die maximale relative Konzentrations- bzw. Aktivitätsabnahme (δ_{max}) wurde als Vergleichsgröße gewählt, da sie die jeweils geringste im Lagerungsverlauf gemessene Konzentration bzw. Aktivität eines Gerinnungsproteins erfasst. Etwaige Messausreißer am Ende des Lagerungszeitraums können somit nicht zu einem fälschlicherweise als zu gering eingeschätzten Konzentrations- bzw. Aktivitätsverlust und damit nicht zu einer fälschlicherweise als zu hoch eingeschätzten Lagerungsstabilität des Plasmapräparats führen, was im Hinblick auf

die klinische Anwendung möglicherweise gravierende Konsequenzen haben könnte. Aus der vorhandenen Literatur ist hingegen meist die relative Abnahme (δ) einer Gerinnungsproteinkonzentration bzw. -aktivität am Ende des jeweiligen Untersuchungszeitsraums im Vergleich zum Ausgangswert nach dem Auftauen ersichtlich, welche nicht notwendigerweise mit der maximalen relativen Konzentrations- bzw. Aktivitätsabnahme gleichzusetzen ist. In dieser Untersuchung wurden Fibrinogen, Faktor II, Faktor IX, Plasmininhibitor, Protein C und freies Protein S als Gerinnungsproteine mit einer maximalen relativen Konzentrations- bzw. Aktivitätsabnahme mit einem Betrag von weniger als 10 v.H. über die gesamte Lagerungsdauer identifiziert und demzufolge im Kontext dieser Arbeit als lagerungsstabile Gerinnungsproteine klassifiziert.

5.2.1 Lagerungsstabile Gerinnungsproteine

5.2.1.1 Fibrinogen

Fibrinogen zeigte eine maximale relative Konzentrationsabnahme (δ_{max}) von $-5{,}0$ v.H. im gesamten Untersuchungszeitraum ($\Delta_{max\,(72\,\mathrm{h}|96\,\mathrm{h})} = -0{,}08$ g/l). Dies deckt sich mit den Ergebnissen von Buchta et al. (2004) zur Stabilität von S/D-Plasma ohne Prioneneliminierung unter gleichen Lagerungsbedingungen bei 4 °C, die nach sechs Tagen eine relative Konzentrationsänderung (δ) des Fibrinogens von $-0{,}3$ v.H. (272 mg/dl vs. 271 mg/dl) feststellen konnten. Auch in GFP konnte gezeigt werden, dass die Konzentration des Fibrinogens während einer Lagerung über sechs Tage bei 4 °C statistisch nicht signifikant abnahm (290 mg/dl vs. 275 mg/dl, $\delta = -5{,}2$ v.H.; von Heymann et al. 2009). Dieser Vergleich legt nahe, dass die Lagerungsstabilität des Fibrinogens durch die verschiedenen Virusinaktivierungs- und Prioneneliminierungsverfahren nicht differentiell beeinflusst wird.

5.2.1.2 Faktor II

Auch Faktor II zählt mit $\delta_{max} = -2{,}6$ v.H. zu den im Kontext dieser Arbeit als lagerungsstabil identifizierten Gerinnungsproteinen ($\Delta_{max\,(24\,\mathrm{h}|48\,\mathrm{h})} = -6{,}1$ %). Buchta et al. (2004) konnten in S/D-Plasma ohne Prioneneliminierung ebenfalls einen stabilen Aktivitätsverlauf des Faktors II messen, dessen relative Aktivitätsabnahme (δ) nach sechs Tagen mit $-8{,}6$ v.H. (105 % vs. 97 %) allerdings über dem hier gemessenen δ_{max} lag. In GFP wiesen Downes et al. (2001) ebenfalls einen stabilen Verlauf des Faktors II während einer Lagerungsdauer von fünf Tagen unter gleichen Bedingungen nach und belegten diesen mit einer statistisch nicht signifikanten relativen Aktivitätsabnahme (δ) von $-1{,}2$ v.H.. Eine hohe Stabilität stellten auch von Heymann et al. (2009) in GFP mit einer vergleichsweise größeren und statistisch signifikanten relativen Aktivitätsabnahme (δ) des Faktors II von

−9,6 v.H. (90 % vs. 83 %) nach einer Lagerungsdauer von sechs Tagen fest. Dies entspricht einer ähnlich hohen Lagerungsstabilität des Faktors II in GFP und in S/D-Plasma ohne Prioneneliminierung im Vergleich zum hier untersuchten Präparat, was vermuten lässt, dass das modifizierte Aufbereitungsverfahren mit Prioneneliminierung hinsichtlich der Lagerungsstabilität des Faktors II keinen Nachteil gegenüber den älteren Verfahren bietet.

5.2.1.3 Faktor IX

Mit dem hier bestimmten $\delta_{max} = -9{,}5$ v.H. zählt Faktor IX ebenfalls zu den im Kontext dieser Arbeit als stabil klassifizierten Gerinnungsproteinen ($\Delta_{max\,(24\,\mathrm{h}|48\,\mathrm{h})} = -7{,}5\,\%$). In S/D-Plasma ohne Prioneneliminierung wies Faktor IX mit einer relativen Aktivitätsabnahme (δ) von −1,3 v.H. (76 % vs. 75 %) einen stabileren Verlauf über sechs Tage auf, wie Buchta et al. (2004) zeigen konnten. In GFP stellten von Heymann et al. (2009) eine relative Aktivitätsabnahme (δ) des Faktors IX von −10,5 v.H. (114 % vs. 102 %) nach sechstägiger Lagerung fest. Dies könnte dafür sprechen, dass das veränderte Herstellungsverfahren die Lagerungsstabilität des Faktors IX im Vergleich zu S/D-Plasma ohne Prioneneliminierung möglicherweise negativ beeinflusst, wenngleich beide Verfahren einen Vorteil gegenüber der Lagerungsstabilität in GFP zu haben scheinen.

5.2.1.4 Plasmininhibitor

In dieser Arbeit betrug die maximale relative Aktivitätsabnahme (δ_{max}) des Plasmininhibitors −2,3 v.H., womit ebenfalls eine hohe Lagerungsstabilität dieses Proteins belegt werden kann ($\Delta_{max\,(6\,\mathrm{h}|24\,\mathrm{h})} = -2{,}3\,\%$). Heger et al. (2005) maßen in S/D-Plasma ohne Prioneneliminierung eine relative Aktivitätsabnahme (δ) von −3,0 v.H. (99 % vs. 96 %) und in GFP eine relative Aktivitätszunahme (δ) von +4,1 v.H. (97 % vs. 101 %), was zunächst ebenfalls jeweils stabilen Aktivitätsverläufen gleichkommt. Bei zwar gleichen Lagerungstemperaturen wie in dieser Arbeit (4 °C), aber jeweiligen Lagerungszeiträumen von nur 48 h sind diese Ergebnisse allerdings nur eingeschränkt mit den in dieser Arbeit präsentierten Daten vergleichbar. An sechs Proben aus GFP von männlichen Spendern konnte auch während einer Lagerungsdauer von 42 Tagen bei 4 °C eine hohe Lagerungsstabilität ohne statistisch signifikante Aktivitätsänderungen des Plasmininhibitors im Zeitverlauf festgestellt werden (96 % vs. 86 %, $\delta = -10{,}4$ v.H.; Suontaka et al. 2005). Nifong et al. (2002) stellten hingegen in S/D-Plasma ohne Prioneneliminierung über eine Lagerungsdauer von fünf Tagen eine relative Zunahme (δ) von +28,0 v.H. der Aktivität des Plasmininhibitors fest (25 % vs. 32 %). Aufgrund der in der genannten Studie gewählten Lagerungstemperatur von 20 °C ist jedoch keine direkte Vergleichbarkeit des

Befunds mit den hier erhobenen Daten möglich. Der Plasmininhibitor weist sowohl in GFP und S/D-Plasma ohne Prioneneliminierung als auch in S/D-Plasma mit Prioneneliminierung eine hohe Lagerungsstabilität auf, wenngleich geringere Ausgangsaktivitäten dieses Gerinnnungsproteins in Präparaten, die mit einem S/D-Verfahren hergestellt wurden, beschrieben wurden (Beck et al. 2000; s. u.).

5.2.1.5 Protein C

Protein C wies in dieser Arbeit über die Lagerungsdauer von 144 Stunden eine maximale relative Aktivitätsabnahme (δ_{max}) von $-0{,}9$ v.H. auf und kann somit ebenfalls als über den gesamten Untersuchungszeitraum als lagerungsstabil bezeichnet werden ($\Delta_{max\,(120\,\mathrm{h}|144\,\mathrm{h})} = -4{,}2\,\%$). Buchta et al. (2004) stellten in S/D-Plasma ohne Prionenliminierung nach einer fünftägigen Lagerung eine geringe relative Aktivitätszunahme (δ) von $+1{,}1$ v.H. fest (94 % vs. 95 %). Heger et al. (2005) beschrieben hingegen in S/D-Plasma ohne Prioneneliminierung eine signifikante relative Aktivitätsabnahme (δ) des Protein C von $-18{,}2$ v.H. nach einer Lagerungsdauer von 48 Stunden (99 % vs. 81 %). Aufgrund der in der betreffenden Studie untersuchten geringen Fallzahl ($n = 7$) ist eine direkte Vergleichbarkeit mit den hier präsentierten Daten jedoch nicht sicher gegeben. In GFP wurde durch Yazer et al. (2008) eine statistisch nicht signifikante relative Aktivitätsabnahme (δ) von $-6{,}0$ v.H. über eine Lagerungsdauer von fünf Tagen beschrieben (104 % vs. 96 %). S/D-Plasma mit Prioneneliminierung erscheint demnach bezüglich der Lagerungsstabilität des Protein C den GFP-Präparaten und möglicherweise auch dem S/D-behandelten Vorgänger ohne Prioneneliminierung leicht überlegen.

5.2.1.6 Freies Protein S

Freies Protein S kann mit $\delta_{max} = -4{,}7$ v.H. im Kontext dieser Arbeit ebenfalls als stabiles Gerinnungsprotein bezeichnet werden ($\Delta_{max\,(120\,\mathrm{h}|144\,\mathrm{h})} = -11{,}9\,\%$). Buchta et al. (2004) stellten nach sechstägiger Lagerung von S/D-Plasma ohne Prioneneliminierung im Gegensatz dazu eine deutliche relative Aktivitätsabnahme (δ) des freien Protein S von $-56{,}1$ v.H. fest (41 % vs. 18 %). Es könnte demnach angenommen werden, dass der veränderte Herstellungsprozess des hier untersuchten S/D-Plasmas mit Prioneneliminierung einen positiven Einfluss auf die Lagerungsstabilität des freien Protein S im Vergleich zu S/D-Plasma ohne Prioneneliminierung hat. Aufgrund der von Buchta et al. (2004) vergleichsweise kleinen untersuchten Fallzahl ($n = 5$) ist allerdings trotz gleichartiger Laboranalytik ebenfalls keine sichere Vergleichbarkeit mit den hier gemessenen Daten gegeben. In GFP konnte wiederum nach siebentägiger Lagerung eine relative Aktivitätsabnahme (δ) von $-7{,}4$ v.H.

(108 % vs. 100 %) und nach zweiwöchiger Lagerung eine relative Aktivitätsabnahme von −10,1 v.H. (108 % vs. 97 %) des freien Protein S gemessen werden (Boström et al. 2009). Daraus lässt sich folgern, dass freies Protein S in S/D-Plasma mit Prioneneliminierung im Vergleich zu S/D-Plasma ohne Prioneneliminierung und GFP als ein verhältnismäßig stabiles Protein anzusehen ist.

5.2.2 Lagerungsinstabile Gerinnungsproteine

Da die die Lagerungsstabilität des gesamten Plasmas weniger von den lagerungsstabilen, sondern maßgeblich von den lagerungsinstabilen Gerinnungsproteinen beeinflusst wird, wurden letztere im Hinblick auf denjenigen Zeitraum zwischen zwei aufeinander folgenden Messzeitpunkten ($t_a|t_b$) untersucht, in dem ihre jeweils maximalen absoluten Aktivitätsabnahmen ($\Delta_{max\,(t_a|t_b)}$) zu verzeichnen waren. Anhand dessen ließ sich der früheste Messzeitraum bestimmen, in dem der größte Teil der Aktivität eines oder mehrerer lagerungsinstabiler Gerinnungsproteine abnahm. Eine hohe Lagerungsstabilität ist ein wichtiges Qualitätskriterium für aufbereitetes Humanplasma, denn zum einen kann es in der unphysiologischen Umgebung des Präparats zu einer beschleunigten Degradation von Proteinmolekülen kommen, die zu einer Abnahme der Konzentrationen und Aktivitäten der gerinnungsaktiven Proteine führen und damit die klinische Wirksamkeit des Plasmas im Rahmen einer Substitutionsbehandlung reduzieren kann. Zum anderen kann es aber im Lagerungsverlauf auch zu einem Aktivitätsanstieg einzelner Gerinnungsproteine kommen. Obwohl das Gerinnungssystem im Plasmapräparat durch die Komplexierung von Kalzium-Ionen nach Zusatz von Zitrat gehemmt wird, können bestimmte enzymatisch aktive Gerinnungsproteine durch Kontakt mit der Oberfläche des Aufbewahrungsbehältnisses aktiviert werden (insb. Faktor VII; Seligsohn et al. 1983; Suontaka et al. 2005). Dieses Phänomen wird auch als „kalte Aktivierung“ bezeichnet, durch die es in der Folge zu Konzentrations- oder Aktivitätsabnahmen anderer Gerinnungsproteine kommen kann, wenn diese durch ein aktiviertes Gerinnungsprotein enzymatisch verändert werden (Blombäck et al. 1984; Norda et al. 2007).

5.2.2.1 Faktor V

Faktor V gehört mit $\delta_{max} = -16{,}0$ v.H. zu den im Kontext dieser Arbeit als vergleichsweise lagerungsinstabil klassifizierten Gerinnungsproteinen. Buchta et al. (2004) ermittelten eine relative Aktivtätsabnahme (δ) von −23,9 v.H. (78 % vs. 61 %) nach einer Lagerungsdauer von sechs Tagen in S/D-Plasma ohne Prioneneliminierung, die über dem in dieser Arbeit ermittelten δ_{max} liegt und damit auf eine geringere Lagerungsstabilität des Faktors V im

Vorgängerprodukt Octaplas® schließen lässt. In GFP stellten Yazer et al. (2008) nach einer Lagerungsdauer von fünf Tagen eine relative Aktivitätsabnahme (δ) des Faktors V von −33,5 v.H. als Beleg für eine ebenfalls vergleichsweise geringere Lagerungsstabilität fest (131 % vs. 87 %). Im Gegensatz dazu stehen die Ergebnisse von Nifong et al. (2002), die S/D-Plasma ohne Prioneneliminierung und GFP über eine Lagerungsdauer von fünf Tagen bei 20 °C Lagerungstemperatur untersuchten. Hier wurden über den gesamten Untersuchungszeitraum relative Aktivitätsabnahmen (δ) des Faktors V von −0,9 v.H. (109 % vs. 108 %) in S/D-Plasma ohne Prioneneliminierung und von −24,5 v.H. (118 % vs. 89 %) in GFP gemessen. Da in der genannten Studie andere Lagerungsbedingungen gewählt wurden, sind die Ergebnisse allerdings nicht problemlos mit den hier präsentierten Ergebnissen zu vergleichen. Faktor V weist also in der vorliegenden Arbeit eine höhere Lagerungsstabilität im Vergleich zu GFP und zu S/D-Plasma ohne Prioneneliminierung auf. Während des Aktivitätsverlaufs des Faktors V wurde seine größte absolute Aktivitätsabnahme (Δ) mit −9,3 % ($p < 0{,}01$) zwischen den Zeitpunkten $t_{120\,\mathrm{h}}$ und $t_{144\,\mathrm{h}}$ gemessen (Abb. 4.7, Tab. 4.2). Dabei muss in diesem Fall allerdings die Aktivitätszunahme zwischen 96 h und 120 h berücksichtigt werden, welche möglicherweise ein der hier untersuchten Fallzahl geschuldetes Artefakt darstellt. Ob der Messwert bei 120 h falsch zu hoch, oder die Messwerte bei 96 h und 144 h falsch zu niedrig gemessen wurden, ist bei der Messwertstreuung nicht sicher zu beurteilen. Deshalb könnte aus Sicherheitsüberlegungen auch die größte absolute Aktivitätsabnahme vor dem messbaren Aktivitätsanstieg (hier zwischen den Zeitpunkten $t_{72\,\mathrm{h}}$ und $t_{96\,\mathrm{h}}$) gewertet werden. In der vorhandenen Literatur gibt es zu Aktivitätszunahmen bzw. Schwankungen von Messwerten während der Lagerung kaum Erklärungen. In den meisten Studien ist über die gesamte Lagerungsdauer eine Aktivitätsabnahme zu verzeichnen, so dass geringere Messwertabweichungen bei kleinen untersuchten Fallzahlen selten thematisiert und in Langzeituntersuchungen meist nur die Messwerte nach dem Auftauen und am Ende der Lagerungsdauer diskutiert werden (z. B. Thiele et al. 2012).

5.2.2.2 Faktor VII

Faktor VII weist in dieser Untersuchung eine maximale relative Aktivitätsabnahme (δ_{max}) von −20,2 v.H. auf. In S/D-Plasma ohne Prioneneliminierung stellten Buchta et al. (2004) nach einer Lagerungsdauer von sechs Tagen eine relative Aktivitätsabnahme (δ) von −18,2 v.H. des Faktors VII fest (143 % vs. 117 %). Über eine Lagerungsdauer von sechs Tagen fanden von Heymann et al. (2009) in GFP eine relative Aktivitätsabnahme (δ) von −35,6 v.H. (115 % vs. 74 %), während diese bei Yazer et al. (2008) nach fünf Tagen nur −17,9 v.H. betrug (117 % vs. 96 %). Ebenso konnten auch Thiele et al. (2012) nach

einer siebentägigen Lagerung eine relative Aktivitätsabnahme (δ) von $-14{,}1$ v.H. des Faktors VII in GFP messen (106 % vs. 91 %; $p < 0{,}05$). Einige Autoren stellten hingegen in S/D-Präparaten ohne Prioneneliminierung einen statistisch signifikanten relativen Aktivitätsanstieg (δ) des Faktors VII im Vergleich zu seiner Ausgangsaktivität fest, so z. B. Heger et al. (2005) mit +201 v.H. nach zweitägiger Lagerung bei 4 °C ($n = 7$) oder Nifong et al. (2002) mit +91 v.H. nach fünf Tagen bei bei 20 °C ($n = 20$). In beiden Fällen, d. h. sowohl bei 4 °C als auch bei 20 °C wurde dies mit einer „kalten Aktivierung" der Proteinmoleküle durch Oberflächenkontakt erklärt. Suontaka et al. (2005) konnten in 100 bei 4 °C gelagerten Plasmaproben aus GFP bis sieben Tage nach dem Auftauen einen Aktivitätsanstieg des Faktors VII in einem Bruchteil der Fälle (5 %) nachweisen. Ob dieses Phänomen tatsächlich unabhängig von den Lagerungsbedingungen (Lagerungstemperatur, Material des Lagerungsgefäßes) oder sogar bei allen Plasmapräparationen unabhängig vom Herstellungsverfahren mit geringer Wahrscheinlichkeit auftritt, kann aus den o. g. Studien nicht abgeleitet werden. Faktor VII zeigt in der vorliegenden Arbeit keinen Aktivitätsanstieg im Verlauf der Lagerung und bietet keinen Anhalt für die Vermutung einer möglichen „kalten Aktivierung", wenngleich dieses Phänomen in dieser Studie nicht explizit untersucht wurde und anhand der hier erhobenen Daten keine hinreichende Aussage dazu getroffen werden kann. Die größte absolute Aktivitätsabnahme (Δ) des Gerinnungsfaktors VII wurde hier mit $-6{,}6$ % bereits zwischen den Zeitpunkten $t_{24\,\mathrm{h}}$ und $t_{48\,\mathrm{h}}$ gemessen ($p < 0{,}01$) und war demnach noch vor der größten absoluten Aktivitätsabnahme des Faktors V zu verzeichnen.

5.2.2.3 Faktor VIII

Der Gerinnungsfaktor VIII zeigte in der vorliegenden Studie eine maximale relative Aktivitätsabnahme (δ_{max}) von $-26{,}7$ v.H. und wurde folglich entlang der oben genannten Kriterien als lagerungsinstabil klassifiziert. Eine ebenfalls vergleichsweise geringe Lagerungsstabilität des Faktors VIII wurde auch von Buchta et al. (2004) in S/D-Plasma ohne Prioneneliminierung beschrieben, da die Autoren nach einer Lagerungsdauer von sechs Tagen eine relative Aktivitätsabnahme (δ) von $-19{,}6$ v.H. fanden (66 % vs. 53 %). Heger et al. (2005) stellten in S/D-Plasma ohne Prioneneliminierung bereits nach einer Lagerungsdauer von 48 Stunden eine ähnliche relative Aktivitätsabnahme (δ) des Faktors VIII von $-22{,}2$ v.H. fest (99 % vs. 77 %; $p < 0{,}05$). In GFP wurde mit einer relativen Aktivitätsabnahme (δ) des Faktors VIII von $-37{,}7$ v.H. (125 % vs. 78 %) nach einer Lagerungsdauer von sechs Tagen ein im Vergleich zu den hier präsentieren Ergebnissen höherer Wert gemessen (von Heymann et al. 2009). Im Vergleich zu GFP stellt sich Faktor VIII in S/D-Plasma mit Prioneneliminierung demnach als lagerungsstabiler

dar, weist allerdings in S/D-Plasma ohne Prioneneliminierung eine noch geringfügig höhere Aktivität am Ende der Beobachtungezeit auf, die als bessere Lagerungsstabilität interpretiert werden könnte. Auch bei diesem instabilen Gerinnungsfaktor war die größte absolute Aktivitätsabnahme (Δ) bereits zwischen den Messzeitpunkten $t_{24\,\mathrm{h}}$ und $t_{48\,\mathrm{h}}$ messbar und mit $-9{,}3\,\%$ statistisch signifikant ($p < 0{,}01$).

5.2.2.4 Faktor XI

Faktor XI wurde ebenfalls als instabiles Gerinnungsprotein klassifiziert, weil es mit $\delta_{max} = -26{,}9$ v.H. die vergleichsweise geringste Lagerungsstabilität von allen hier untersuchten Proteinen aufwies. Buchta et al. (2004) konnten in S/D-Plasma ohne Prioneneliminierung nach einer Lagerungsdauer von sechs Tagen bei 4 °C mit $\delta = -2{,}4$ v.H. eine solch große relative Aktivtätsabnahme nicht feststellen (82 % vs. 80 %). In GFP hingegen maßen von Heymann et al. (2009) nach einer Lagerungsdauer von sechs Tagen bei 4 °C eine geringere relative Aktivitätsabnahme (δ) von $-15{,}7$ v.H. (159 % vs. 134 %). Von Sidhu et al. (2006) wurde nach einer Lagerungsdauer von 5 Tagen eine geringe relative Aktivtätszunahme (δ) des Faktors XI in GFP von $+1{,}4$ v.H. beschrieben (105 % vs. 107 %). Demgegenüber stellten Yazer et al. (2008) in GFP nach fünftägiger Lagerung einen deutlichen Aktivitätsanstieg (δ) des Faktors XI mit $+51{,}9$ v.H. relativ zur Ausgangsaktivität fest (83 % vs. 126 %), der von den Autoren ebenfalls im Sinne einer möglichen „kalten“ Oberflächenaktivierung gedeutet wurde. Die Lagerungsstabilität des Faktors XI erscheint also in S/D-Plasma mit Prioneneliminierung geringer zu sein als in GFP oder S/D-Plasma ohne Prioneneliminierung, was durch einen differentiellen Einfluss des Herstellungsverfahrens auf die verschiedenen Gerinnungsproteine bedingt sein könnte. Die größte absolute Aktivitätsabnahme (Δ) findet bei diesem Gerinnungsfaktor zwischen 48 und 72 Stunden nach dem Auftauen statt und ist mit $-14{,}1\,\%$ ebenfalls statistisch signifikant ($p < 0{,}01$).

5.3 Klinische Bedeutung des Referenzwertvergleichs

Innerhalb der Gruppe der instabilen Gerinnungsfaktoren mit den vergleichsweise großen maximalen relativen Aktivitätsabnahmen (δ_{max}) treten die frühesten absoluten Aktivitätsabnahmen eines oder mehrerer Gerinnungsproteine zwischen zwei aufeinander folgenden Messzeitpunkten ($\Delta_{t_a|t_b}$) bei den Faktoren VII und VIII auf, und zwar zwischen den Messzeitpunkten $t_{24\,\mathrm{h}}$ und $t_{48\,\mathrm{h}}$ (Tab. 4.2). Man könnte also anhand der alleinigen Berücksichtigung der Lagerungsstabilität der gerinnungsaktiven Proteine postulieren, dass S/D-Plasma mit Prioneneliminierung nur bis 24 h nach dem Auftauen klinisch eingesetzt

werden sollte, um die größten Aktivitätsabnahmen der instabilen Gerinnungsproteine zu vermeiden. Da die Lagerungsstabilitätsanalyse zunächst die Veränderung der Konzentration bzw. Aktivität jedes einzelnen untersuchten Gerinnungsproteins im Zeitverlauf in Relation zu seiner eigenen Ausgangskonzentration bzw. -aktivität untersucht, ist weiterhin eine Einordnung der Messwerte zu relevanten Grenzwerten notwendig. Die dazu herangezogenen Referenzwerte sollten sowohl klinisch bedeutsam als auch produktunabhängig sein. Neben den durch das Europäische Arzneibuch für einige Gerinnungsfaktoren vorgegebenen Mindestaktivitäten erfüllen auch die unteren Grenzen der physiologischen Referenzbereiche der hier untersuchten Gerinnungsproteine diese beiden Kriterien. Der statistische Vergleich der Messwerte mit diesen Referenzwerten ist notwendig, da der einfache Vergleich eines Medians mit einem Grenzwert keine ausreichende Aussage über die Gesamtheit der Messergebnisse am jeweiligen Messzeitpunkt zulässt (Altman 1991). Im Extremfall könnte bei der Betrachtung des Medians die Hälfte aller gemessenen Werte unterhalb des Grenzwerts liegen, ohne dass sich der Median vom Grenzwert unterscheidet. Theoretisch ist einerseits möglich, dass ein Gerinnungsprotein zwar einen stabilen Aktivitätsverlauf, nicht aber eine kritische Mindestaktivität aufweist. Andererseits besteht auch die Möglichkeit, dass ein Protein einen instabilen Aktivitätsverlauf zeigt, aber trotzdem während der Lagerungsdauer eine kritische Mindestaktivität nicht unterschreitet, was sich aus einer reinen Analyse der Lagerungsstabilität noch nicht notwendigerweise erkennen ließe.

Direkt nach dem Auftauen genügten die gemessenen Konzentrationen und Aktivitäten der Gerinnungsproteine den Vorgaben des Europäischen Arzneibuchs (Faktoren V, VIII und XI) bzw. lagen deutlich über den im Kontext dieser Arbeit zusätzlich verwendeten Grenzwerten (Untergrenzen der physiologischen Referenzbereiche; Faktoren II, VII, IX, Protein C, freies Protein S). Eine Ausnahme stellte der Plasmininhibitor dar, der am ersten Messzeitpunkt mit 57 % im Median eine deutlich niedrigere Aktivität als die Untergrenze seines physiologischen Referenzbereichs (98 %) aufwies. Diese Aktivitätsminderung des Plasmininhibitors ist ein bekanntes Phänomen, das in S/D-behandeltem Plasma bereits festgestellt wurde und durch das S/D-Verfahren selbst verursacht wird, wie Hellstern et al. (1992) zeigen konnten. Mast et al. (1999) wiesen in einer Untersuchung *in vitro* nach, dass dieses Verfahren die Proteinkonformation von temperaturlabilen Serinproteasen, zu denen auch der Plasmininhibitor zählt, während der Inkubation mit den S/D-Reagenzien bei 30 °C verändern kann. Die in ihrer Konformation veränderten Proteinmoleküle könnten möglicherweise in ihrer enzymatischen Aktivität reduziert sein oder im Zuge der im Prozessablauf folgenden

chromatographischen Entfernung der S/D-Reagenzien und der Filtrierung ebenfalls teilweise entfernt werden, was mögliche Erklärungen für die erniedrigte Aktivität des Plasmininhibitors im Endprodukt darstellt. Die in der Literatur beschriebenen Aktivitäten des Plasmininhibitors in S/D-Plasmapräparaten ohne Prioneneliminierung weisen nach dem Auftauen zwar differierende Werte auf, z. B. 37 % (Heger et al. 2008; Mittelwert bei $n = 6$), 33 % (Heger et al. 2009; Mittelwert bei $n = 3$) oder 25 % (Nifong et al. 2002; Mittelwert bei $n = 20$), die jedoch unabhängig von der Lagerungsdauer immer deutlich unter allen hier gemessenen Werten in S/D-Plasma mit Prioneneliminierung lagen. Die höhere Aktivität des Plasmininhibitors in S/D-Plasma mit Prioneneliminierung scheint im veränderten S/D-Verfahren begründet zu sein, das durch die Verkürzung der Inkubationszeit mit den S/D-Reagenzien zu einer höheren Aktivität des Proteins führt (Heger et al. 2009). Daher wurde nach der bereits zu erwartenden Unterschreitung des physiologischen Referenzbereichs ein Vergleich mit dem Vorgängerprodukt Octaplas® (ohne Prioneneliminierung; Keller et al. 2012) vorgenommen, um eine bessere Einordnung der Messergebnisse im Bezug auf das veränderte S/D-Verfahren durchführen zu können. Diese Berechnungen zeigten im Vergleich zum Vorgängerprodukt durchgehend eine statistisch signifikant höhere Aktivität des Plasmininhibitors, die über die gesamte Lagerungsdauer zudem sehr geringen Schwankungen unterlag. Am Plasmininhibitor wird deutlich, weshalb eine sehr hohe Lagerungsstabilität nicht notwendigerweise auch mit hoher enzymatischer Aktivität des untersuchten Proteins einhergeht. Deshalb ist eine Analyse beider Aspekte, Lagerungsstabilität und Bezug zu bedeutsamen Referenzwerten, wichtig, um die einzelnen Gerinnungsproteine eines untersuchten Plasmapräparats genau zu charakterisieren. Denn im Fall des Plasmininhibitors ist eine hohe Aktivität gerade bei Massivtransfusionen von entscheidender Bedeutung, da eine Hyperfibrinolyse durch die Transfusion von Plasma mit niedriger Aktivität des Plasmininhibitors nicht sicher korrigiert werden kann und somit eine bestehende Hyperfibrinolyse möglicherweise aggraviert. Es gibt zu dieser Problematik keine prospektiven klinischen Studien, wobei in einer Fallstudie (Magner et al. 2007) und einer retrospektiven Untersuchung (de Jonge et al. 2002) eine gesteigerte Hyperfibrinolyse unter der Gabe von S/D-behandeltem Plasma bei Lebertransplantationen beschrieben wurde. Bei Lebertransplantationen beobachtet man aber gelegentlich auch bei Verwendung von GFP zur Korrektur eines Mangels an Gerinnungsfaktoren eine Einschränkung der Gerinnung durch den partiellen Ausfall der Leber als Syntheseorgan im Rahmen der Grunderkrankung und je nach Verlauf dieser komplexen Operation daher ebenfalls eine gesteigerte Fibrinolyse (Dzik et al. 1988). Auch der Hersteller verweist in der Packungsbeilage von Octaplas® LG

auf die Möglichkeit, dass bei Massivtransfusionen eine Hyperfibrinolyse durch den reduzierten Gehalt an Plasmininhibitor gegebenenfalls nicht korrigiert werden kann und schlägt deshalb den Einsatz antifibrinolytischer Medikamente vor (Octapharma 2009).

Das Präparat erfüllt nach dem Auftauen die gesetzlichen Vorgaben (Faktoren V, VIII, XI) und die im Kontext dieser Arbeit zusätzlich eingeführten Qualitätskriterien (Fibrinogen, Faktoren II, VII, IX, Protein C, freies Protein S). Die Aktivität des Plasmininhibitors liegt höher als in dem bereits seit längerem etablierten Vorgängerpräparat. Auch nach sechsstündiger Lagerung bei $4 \pm 2\,°C$ nach den Auftauen, dem aktuell maximalen erlaubten Zeitraum für die Transfusion von aufgetauten Plasmapräparaten, unterschieden sich ebenfalls alle Gerinnungsproteine im Hinblick auf ihre Konzentrationen und Aktivitäten statistisch signifikant von den definierten Referenzwerten (Tab. 4.4). Es stellte sich die Frage, ob die bindenden Vorgaben bzw. die hier zusätzlich verwendeten Qualitätskriterien im Verlauf der gesamten Lagerungsdauer überhaupt von einem oder mehreren Gerinnungsproteinen verletzt wurden. Dazu wurden in der weiteren Analyse die am Ende des Lagerungszeitraums erhobenen Messwerte mit den bindenden Vorgaben bzw. den eingeführten Grenzwerten statistisch verglichen, weil die zu erwartende Proteindegradation dann theoretisch am stärksten ausgeprägt sein sollte. Tatsächlich lagen nach sechstägiger Lagerung die Konzentrationen und Aktivitäten aller hier untersuchter Gerinnungsproteine mit Ausnahme des Faktors VIII statistisch signifikant über den bindenden Vorgaben bzw. den hier eingeführten Grenzwerten (Tab. 4.6), was sich auch bereits aus den graphischen Darstellungen der Konzentrations- bzw. Aktivitätsverläufe leicht nachvollziehen lässt (Abb. 4.11 bis Abb. 4.20). Die lagerungsinstabilen Gerinnungsfaktoren V, VII und XI erfüllten trotz ihrer instabilen Verläufe auch noch nach sechstägiger Lagerung die gesetzlichen Vorgaben bzw. die hier verwendeten Grenzwerte. Faktor V wies über die Lagerungsdauer von 144 Stunden eine maximale relative Aktivitätsabnahme von $\delta_{max} = -16{,}0$ v.H. auf und lag im Median mit 81,3 % auch am Zeitpunkt $t_{144\,\mathrm{h}}$ noch statistisch signifikant über dem durch das Europäische Arzneibuch vorgegebenen Grenzwert von 50 %. Faktor VII hatte nach dem Auftauen eine mediane Aktivität von 92,8 % und zum Zeitpunkt $t_{144\,\mathrm{h}}$ eine mediane Aktivität von 74,1 %. Letzterer Messwert unterschied sich ebenso statistisch signifikant von der Untergrenze des physiologischen Referenzbereichs dieses Proteins (hier ebenfalls 50 %). Faktor XI wies in der vorliegenden Arbeit mit $\delta_{max} = -26{,}9$ v.H. die größte relative Aktivitätsabnahme aller hier untersuchter Gerinnungsproteine auf (99,8 % bei t_0 vs. 87,3 % bei $t_{96\,\mathrm{h}}$). Am Beispiel des Faktors XI zeigt sich, weshalb ein instabiler Gerinnungsfaktor nicht notwendigerweise auch mit einer geringen enzymatischen Aktivität

im Lagerungsverlauf einhergehen muss, da die gemessenen Aktivitäten des Faktors XI zu jedem Zeitpunkt über den durch das Europäische Arzneibuch vorgeschriebenen 50 % lagen. Daran wird deutlich, dass ein instabiler Lagerungsverlauf allein nicht limitierend sein muss. Faktor VIII limitierte jedoch mit seiner Aktivitätsabnahme im Lagerungsverlauf offensichtlich den möglichen Einsatzzeitraum des untersuchten Präparats auf unter 144 Stunden, so dass folglich der Zeitpunkt ermittelt werden musste, bis zu dem die Aktivität des Faktors VIII noch statistisch signifikant über seinem gesetzlich festgelegten Grenzwert lag.

5.3.1 Bedeutung des Faktors VIII

In dieser Studie unterschied sich die Aktivität des Faktors VIII nach 144 Stunden nicht mehr statistisch signifikant von der durch das Europäische Arzneibuch festgelegten Mindestaktivität von 50 %, so dass in einer weiteren Analyse alle erhobenen Messwerte mit der gesetzlichen Vorgabe verglichen wurden. Wie Tabelle 4.8 zeigt, lag der Median der Aktivitätswerte des Faktors VIII an jedem Messzeitpunkt über 50 %, nicht aber die Gesamtheit der Messwerte, die in die statistische Berechnung einflossen. Die Analysen zum Aktivitätsverlauf des Faktors VIII zeigten, dass bis 72 Stunden nach dem Auftauen ein statistisch signifikanter Aktivitätsunterschied zum Grenzwert von 50 % nachzuweisen war. Dieser war am Zeitpunkt $t_{72\,\mathrm{h}}$ allerdings mit $p = 0{,}035$ nur noch knapp statistisch signifikant, zudem lag das 25. Perzentil nicht mehr über 50 %. Am Zeitpunkt $t_{48\,\mathrm{h}}$ bestand dagegen mit $p < 0{,}001$ ein statistisch hochsignifikanter Unterschied zum Grenzwert, so dass aus klinischen Erwägungen ein maximaler Zeitraum von 48 Stunden eher als 72 Stunden für eine Transfusion von aufgetautem und bei $4 \pm 2\,°\mathrm{C}$ gelagertem S/D-Plasma mit Prioneneliminierung sicher erscheint.

In der Analyse der Lagerungsstabilität konnte ein Zeitraum von 24 Stunden ermittelt werden, nach dem die instabilen Gerinnungsfaktoren noch nicht Ihre jeweils größten absoluten Aktivitätsabnahmen erfahren hatten. Nach Ablauf dieses Zeitraums waren die definierten Referenzwerte für die Konzentrationen bzw. Aktivitäten der hier untersuchten Gerinnungsproteine jedoch noch nicht unterschritten (Tab. 4.5). Anhand des Vergleichs mit den bindenden Vorgaben und den eingeführten Grenzwerten ließe sich der theoretisch mögliche Einsatzzeitraum von Octaplas® LG also noch erweitern. Erst nach 48 Stunden bestand eine nicht mehr ausreichende, d. h. eine die bindende Vorgabe nicht mehr erfüllende enzymatische Aktivität eines der untersuchten lagerungsinstabilen Gerinnungsfaktoren, nämlich des Faktors VIII. Aus der Kombination beider Analysen lässt sich eine Vervielfachung des bisher erlaubten Einsatzzeitraumes ableiten, ohne dass

die Gerinnungsfaktoraktivität kritische Grenzwerte unterschreitet und damit eine klinische Anwendung zu unsicher machen würde.

5.4 Methodenkritik und Ausblick

Die vorliegende Arbeit präsentiert erstmals Daten zur Langzeitlagerungsstabilität von Octaplas® LG, die unter kontrollierten Laborbedingungen erhoben wurden. Bei der in die durchgeführten statistischen Analysen eingehenden Fallzahl ($n = 20$) war eine Normalverteilung der Daten nicht gegeben, so dass nicht-parametrische Testverfahren angewendet wurden, um eine valide Berechnung der statistischen Maßzahlen zu gewährleisten (Altman 1991). Die Ergebnisse dieser Pilotstudie legen nahe, dass der Einsatzzeitraum des bereits aufgetauten und gelagerten Präparats entgegen den derzeit geltenden Richtlinien ausgeweitet werden könnte. Um diese Einschätzung im Hinblick auf eine mögliche Änderung der Transfusionsrichtlinien validieren und mit größerer Sicherheit belegen zu können, sollten Folgeuntersuchungen mit größeren Fallzahlen durchgeführt werden, um mit normalverteilten Daten parametrische Berechnungen durchführen zu können. Weiterhin sind die hier unter Laborbedingungen gewonnenen Ergebnisse nicht direkt auf die klinische Situation übertragbar. In der klinischen Routine werden Plasmapräparate nach dem Auftauen für die Zeit bis zur Anwendung am Patienten z. B. im Operationssaal zwischenzeitlich bei Raumtemperatur aufbewahrt, bis möglicherweise festgestellt wird, dass keine Notwendigkeit mehr für die Transfusion des Plasmas besteht. Sollte zukünftig eine Verwendung eines bereits aufgetauten Plasmapräparats auch über sechs Stunden hinaus erlaubt sein, könnte in einem solchen Fall erst nach dieser zwischenzeitlichen Aufbewahrung bei Raumtemperatur eine anschließende Lagerung bei 4 °C begonnen werden. Eine derartige zeitliche Verzögerung zwischen Auftauen und Beginn der Lagerung unter kontrollierten Bedingungen, wie sie in der klinischen Praxis vorkommen kann, ist in dieser ersten Untersuchung zur Lagerungsstabilität des bisher einzigen Plasmapräparats mit Prioneneliminierung nicht in das Untersuchungsprotokoll integriert worden. Dies war notwendig, um zunächst die Frage nach dem Einfluss der Lagerungszeit auf die Konzentrationen und Aktivitäten der gerinnungsaktiven Proteine unabhängig vom Einfluss einer zusätzlichen Veränderung der Lagerungstemperatur untersuchen und somit die Vergleichbarkeit mit der bisherigen Literatur zu anderen Plasmapräparaten gewährleisten zu können. In Kenntnis des Einflusses der Zeit auf die Lagerungsstabilität von Octaplas® LG bei gleichbleibender Temperatur sollte der zusätzliche Einfluss einer Temperaturveränderung während der Lagerungszeit in folgenden Studien berücksichtigt werden. Grundsätzlich lassen sich aus *in vitro*-Untersuchungen zur Lagerungsstabilität noch nicht unmittelbar Aussagen zur klini-

schen Effektivität des gelagerten Plasmas in der Behandlung von Gerinnungsstörungen *in vivo* ableiten. Um die arzneiliche Wirksamkeit von gelagertem Plasma zu bestätigen und um mögliche Nebenwirkungen zu erfassen, sind zukünftige klinische Anwendungsstudien notwendig.

Auch wenn unter den aktuell geltenden Transfusionsrichtlinien durch Einführung von Qualitätssicherungskonzepten Verwurf reduziert werden konnte, wie von Heymann et al. (2003, 2005) am Beispiel der Charité-Universitätsmedizin Berlin zeigen konnten, kommt es dennoch immer wieder zu einem nicht weiter verwendbaren Überschuss an aufgetautem Plasma. Besonders in Operationssälen und Rettungsstellen muss vergleichsweise schnell und vorausschauend gehandelt werden, so dass hier ein maßgeblicher Anteil aktuell nicht mehr weiter zu verwendender Plasmapräparate anfällt (Beckwith et al. 2010). Gleichzeitig würde hier ein erweiterter Einsatzzeitraum bereits aufgetauter Präparate möglicherweise wertvolle Zeit für die Behandlung weiterer Patienten sparen. Ebenso ließe sich der bislang zu verwerfende Anteil der Ressource Humanplasma möglicherweise auch dort effektiv einsetzen, wo große Mengen Plasma benötigt werden, so z. B. bei der Austauschplasmapherese. Beispielsweise kam es im Frühjahr und Sommer 2011 in Deutschland und anderen europäischen Ländern zu einer Epidemie von Infektionen mit EHEC (enterohämorrhagischer *Escherichia coli*). Diese Infektionserkrankung kann als Komplikation ein sogenanntes hämolytisch-urämisches Syndrom (HUS) auslösen, das zur Nierenschädigung bis hin zum Nierenversagen führen kann. Eine solche schwere Komplikation muss bei einem Teil der Patienten durch Plasmapherese zur Entfernung des bakteriellen Toxins behandelt werden und erfordert große Mengen Plasma. Überschüssige aufgetaute Plasmapräparate könnten bei einer Ausweitung ihres Verwendungszeitraums auch hier sinnvoll eingesetzt werden. Eine zentrale Verteilung von bereits aufgetauten Plasmapräparaten, z. B. durch Plasmabanken, könnte somit eine effizientere Nutzung ermöglichen (Thiele et al. 2012). Neben der Kostenreduktion (Downes et al. 2001; von Heymann et al. 2003) könnte durch die sinnvolle Weiterverwendung von bislang zu verwerfenden Plasmapräparaten dem ärztlichen Auftrag und Selbstverständnis, mit dem Spendermaterial umsichtig umzugehen, noch besser Rechnung getragen werden.

6 Zusammenfassung

In der klinischen Routine werden Plasmapräparate zur Therapie von Gerinnungsstörungen, die auf einen Faktorenmangel zurückzuführen sind und zur Substitution großer Blutverluste zur Aufrechterhaltung der Hämostase, wie etwa bei einem polytraumatisierten Patienten, eingesetzt. Da gerade in akuten Blutungssituationen aufgrund der für den Auftauvorgang benötigten Zeit einsatzbereite Plasmapräparate vorausschauend verfügbar gemacht werden müssen, kommt es immer wieder dazu, dass bereits aufgetaute Präparate nicht mehr benötigt werden. Da aufgetautes Humanplasma nach den aktuellen Transfusionsrichtlinien nur innerhalb von sechs Stunden nach dem Auftauen transfundiert werden darf, müssen diese Plasmapräparate nach Ablauf von sechs Stunden verworfen werden. Diese Richtlinie begründet sich durch die Annahme, dass nach einer längeren Lagerung aufgrund einer fortschreitenden Proteindegradation nicht mehr von einer ausreichenden Gerinnungsaktivität des Plasmas ausgegangen werden kann und sich das Risiko einer möglichen mikrobiellen Kontamination des Präparats erhöht.

Die vorliegende Arbeit ist die erste Studie, die das bisher einzige verfügbare S/D-Plasmapräparat mit Prioneneliminierung, Octaplas® LG, nach dem Auftauen und während einer Lagerung über 144 Stunden im Hinblick auf die Stabilität der Konzentrations- und Aktivitätsverläufe ausgewählter gerinnungsaktiver Proteine untersuchte. Weiterhin sollte die Frage beantwortet werden, bis zu welchem Zeitpunkt sich die Aktivitäten der Gerinnungsproteine im aufgetauten und gelagerten Präparat von den durch das Europäische Arzneibuch für S/D-Plasmapräparate bindend vorgegebenen Mindestaktivitäten statistisch signifikant unterscheiden.

Für diese Untersuchung wurden 24 Plasmabeutel aus unterschiedlichen Blutgruppen mit einem zugelassenen Mikrowellengerät aufgetaut und für 144 Stunden bei 4 °C gelagert. Jeweils ein Plasmapräparat pro AB0-Blutgruppe wurde ungeöffnet am Ende des Lagerungszeitraums mikrobiologisch untersucht, um eine mögliche Kontamination während der Lagerung zu detektieren. Den übrigen Präparaten wurden an definierten Zeitpunkten (direkt nach dem Auftauen, nach 2, 4, 6, 24, 48, 72, 96, 120 und 144 Stunden Lagerung) unter sterilen Kautelen Proben entnommen, in denen die Konzentration des Fibrinogens

und die Aktivitäten der Faktoren II, V, VII, VIII, IX und XI sowie des Protein C, des freien Protein S und des Plasmininhibitors standardisiert gemessen wurden.

Es wurde gezeigt, dass es in aufgetauten und ungeöffneten Plasmapräparaten nach einer Lagerung bei 4 °C über 144 Stunden zu keiner mikrobiologischen Kontamination durch Bakterien oder Pilze gekommen war. Anhand der im Verlauf der Lagerung an definierten Messzeitpunkten registrierten maximalen relativen Konzentrations- bzw. Aktivitätsabnahmen der hier untersuchten Gerinnungsproteine ließen sich diese in eine Gruppe von vergleichsweise lagerungsstabilen Proteinen ($|\delta_{max}| < 10$ v.H.: Fibrinogen, Faktoren II und IX, Plasmininhibitor, Protein C, freies Protein S) und eine Gruppe von vergleichsweise lagerungsinstabilen Proteinen ($|\delta_{max}| > 10$ v.H.: Faktoren V, VII, VIII, XI) einteilen. Die Aktivitätsmessungen der als instabil klassifizierten Gerinnungsproteine ergaben, dass zwei dieser Proteine, die Faktoren VII und VIII, bereits zwischen den Zeitpunkten $t_{24\,\mathrm{h}}$ und $t_{48\,\mathrm{h}}$ nach dem Auftauen ihre jeweils maximalen absoluten Aktivitätsabnahmen erfuhren. Weiterhin wurden diejenigen instabilen Gerinnungsproteine, für die eine Mindestaktivität von 50 % in S/D-behandeltem Plasma durch das Europäische Arzneibuch vorgeschrieben ist (Faktoren V, VIII und XI), im Hinblick auf die Einhaltung dieser Vorgabe im Verlauf der Lagerung untersucht. Während die Faktoren V und XI dieses Kriterium innerhalb der Lagerungsdauer von 144 Stunden durchgehend und statistisch signifikant erfüllten, unterschritt die Aktivität des Faktors VIII spätestens nach 96 Stunden Lagerung diese bindende Mindestaktivität. Aus beiden Analysen, der Lagerungsstabilitätsanalyse und dem Vergleich mit vorgegebenen Mindestaktivitäten, kann für aufgetautes und bei 4 °C gelagertes Octaplas® LG ein möglicher Verwendungszeitraum von 48 Stunden angegeben werden.

Eine Ausweitung des Verwendungszeitraumes von aufgetautem Humanplasma könnte in der klinischen Versorgung zur Bereitstellung von bereits aufgetauten Präparaten führen und somit einen wichtigen zeitlichen Vorteil, z.B. für akut transfusionspflichtige Patienten, bieten. Außerdem könnte der bisherige Verwurf von aufgetauten, aber nicht transfundierten Präparaten reduziert werden, was sowohl eine Kostenreduktion als auch einen umsichtigeren Umgang mit der wertvollen Ressource Humanplasma bedeuten würde. Da es sich bei dieser Arbeit um die erste *in vitro*-Untersuchung zu Solvent/Detergent-behandeltem Plasma mit Prioneneliminierung handelt, sollten diese Ergebnisse durch weitere Studien unter verschiedenen Lagerungsbedingungen ergänzt werden. Weiterhin muss die klinische Wirksamkeit der Behandlung von Koagulopathien mit aufgetautem und gelagertem Plasma durch zukünftige Anwendungsstudien überprüft werden.

7 Literaturverzeichnis

AABB Circular (2009). Circular of Information for the Use of Human Blood and Blood Components. American Association of Blood Banks (www.aabb.org).

Altman, D. G. (1991). Practical Statistics for Medical Research. London: Chapman & Hall.

Appert-Flory, A., Fischer, F., Jambou, D. und Toulon, P. (2007). Evaluation and performance characteristics of the automated coagulation analyzer ACL TOP. *Thromb Res* 120, 733–743.

Atance, R., Pereira, A. und Ramírez, B. (2001). Transfusing methylene blue-photoinactivated plasma instead of FFP is associated with an increased demand for plasma and cryoprecipitate. *Transfusion* 41, 1548–1552.

Bakaltcheva, I., O'Sullivan, A. M., Hmel, P. und Ogbu, H. (2007). Freeze-dried whole plasma: evaluating sucrose, trehalose, sorbitol, mannitol and glycine as stabilizers. *Thromb Res* 120, 105–116.

Beck, K. H., Mortelsmans, Y., Kretschmer, V. V., Höltermann, W. und Lukasewitz, P. (2000). Comparison of Solvent/Detergent-Inactivated Plasma and Fresh Frozen Plasma under Routine Clinical Conditions. *Infusionsther Transfusionsmed* 27, 144–148.

Beckwith, H., Manson, L., McFarlane, C. und Reed, M. J. (2010). A review of blood product usage in a large emergency department over a one-year period. *Emerg Med J* 27, 439–442.

Beeck, H. und Hellstern, P. (1998). In vitro characterization of solvent/detergent-treated human plasma and of quarantine fresh frozen plasma. *Vox Sang* 74 Suppl 1, 219–223.

Biesert, L. und Suhartono, H. (1998). Solvent/detergent treatment of human plasma – a very robust method for virus inactivation. Validated virus safety of Octaplas. *Vox Sang* 74 Suppl 1, 207–212.

Blombäck, M., Chmielewska, J., Netré, C. und Akerblom, O. (1984). Activation of blood coagulation, fibrinolytic and kallikrein systems during storage of plasma. *Vox Sang* 47, 355–342.

Bolton-Maggs, P. H., Perry, D. J., Chalmers, E. A., Parapia, L. A., Wilde, J. T., Williams, M. D., Collins, P. W., Kitchen, S, Dolan, G und Mumford, A. D. (2004). The rare coagulation disorders – review with guidelines for management from the United Kingdom Haemophilia Centre Doctors' Organisation. *Haemophilia* 10, 593–628.

Boström, F., Ekemar, L., Olsson, D., Egberg, N. und Lundahl, J. (2009). Rapid thawing of fresh-frozen plasma with radio wave-based thawing technology and effects on coagulation factors during prolonged storage at 4 degrees C. *Vox Sang* 97, 34–38.

Brown, P. (2007). Creutzfeldt-Jakob disease: reflections on the risk from blood product therapy. *Haemophilia* 13 Suppl 5, 33–40.

Brown, P., Rohwer, R. G., Dunstan, B. C., MacAuley, C., Gajdusek, D. C. und Drohan, W. N. (1998). The distribution of infectivity in blood components and plasma derivatives in experimental models of transmissible spongiform encephalopathy. *Transfusion* 38, 810–816.

Bruce, M. E., McConnell, I., Will, R. G. und Ironside, J. W. (2001). Detection of variant Creutzfeldt-Jakob disease infectivity in extraneural tissues. *Lancet* 358, 208–209.

Buchta, C., Felfernig, M., Höcker, P., Macher, M., Körmöczi, G. F., Quehenberger, P., Heinzl, H. und Knöbl, P. (2004). Stability of coagulation factors in thawed, solvent/detergent-treated plasma during storage at 4 degrees C for 6 days. *Vox Sang* 87, 182–186.

Bundesärztekammer (2008). Querschnitts-Leitlinien (BÄK) zur Therapie mit Blutkomponenten und Plasmaderivaten. Hrsg.: Vorstand der Bundesärztekammer auf Empfehlung des Wissenschaftlichen Beirats. Köln: Deutscher Ärzteverlag.

– (2010). Richtlinien zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten (Hämotherapie), zweite Richtlinienanpassung 2010. Hrsg.: Bundesärztekammer im Einvernehmen mit dem Paul-Ehrlich-Institut. Köln: Deutscher Ärzteverlag.

Casewell, M. W., Slater, N. G. und Cooper, J. E. (1981). Operating theatre water-baths as a cause of *Pseudomonas* septicaemia. *J Hosp Infect* 2, 237–247.

Cervenakova, L., Yakovleva, O., McKenzie, C., Kolchinsky, S., McShane, L., Drohan, W. N. und Brown, P. (2003). Similar levels of infectivity in the blood of mice infected with human-derived vCJD and GSS strains of transmissible spongiform encephalopathy. *Transfusion* 43, 1687–1694.

Churchill, W. H., Schmidt, B., Lindsey, J., Greenberg, M., Boudrow, S. und Brugnara, C. (1992). Thawing fresh frozen plasma in a microwave oven. A comparison with thawing in a 37 degrees C waterbath. *Am J Clin Pathol* 97, 227–232.

Clauss, A. (1957). Rapid physiological coagulation method in determination of fibrinogen. *Acta Haematol* 17, 237–246.

Cohen, M. J. und West, M. (2011). Acute traumatic coagulopathy: from endogenous acute coagulopathy to systemic acquired coagulopathy and back. *J Trauma* 70, 47–49.

Contreras, M. (1994). Is the unpaid/paid donation debate for better or for worse? – advantages of unpaid donations. *Blood Coagul Fibrinolysis* 5 Suppl 4, 27–28.

Cortese, I., Chaudhry, V., So, Y. T., Cantor, F., Cornblath, D. R. und Rae-Grant, A. (2011). Evidence-based guideline update: Plasmapheresis in neurologic disorders: report of the Therapeutics and Technology Assessment Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology* 76, 294–300.

Davie, E. W. und Ratnoff, O. D. (1964). Waterfall Sequence for Intrinsic Blood Clotting. *Science* 145, 1310–1312.

de Jonge, J., Groenland, T. H., Metselaar, H. J., IJzermans, J. N., van Vliet, H. H., Visser, L. und Tilanus, H. W. (2002). Fibrinolysis during liver transplantation is enhanced by using solvent/detergent virus-inactivated plasma (ESDEP). *Anesth Analg* 94, 1127–1131.

Dobra, S. A. und Bennett, P. G. (2006). vCJD and blood transfusion: risk assessment in the United Kingdom. *Transfus Clin Biol* 13, 307–311.

Downes, K. A., Wilson, E., Yomtovian, R. und Sarode, R. (2001). Serial measurement of clotting factors in thawed plasma stored for 5 days. *Transfusion* 41, 570–570.

Dzik, W. H., Arkin, C. F., Jenkins, R. L. und Stump, D. C. (1988). Fibrinolysis during liver transplantation in humans: role of tissue-type plasminogen activator. *Blood* 71, 1090–1095.

Fantl, P. und Nance, M. H. (1948). The influence of storage on the coagulation factors of human plasma. *Aust J Exp Biol Med Sci* 26, 207–213.

Geeraedts, L. M., Demiral, H., Schaap, N. P., Kamphuisen, P. W., Pompe, J. C. und Frölke, J. P. (2007). "Blind" transfusion of blood products in exsanguinating trauma patients. *Resuscitation* 73, 382–388.

Gilding, H. P. und Nutt, M. E. (1944). Changes occurring in plasma and serum on storage and their physiological effects. *J Physiol* 102, 446–470.

Goldstein, J. N., Thomas, S. H., Frontiero, V., Joseph, A., Engel, C., Snider, R., Smith, E. E., Greenberg, S. M. und Rosand, J. (2006). Timing of fresh frozen plasma administration and rapid correction of coagulopathy in warfarin-related intracerebral hemorrhage. *Stroke* 37, 151–155.

Guggenheim, K. Y. (1991). Rudolf Schönheimer and the concept of the dynamic state of body constituents. *J Nutr* 121, 1701–1704.

Heger, A., Römisch, J. und Svae, T. E. (2005). Stability of solvent/detergent-treated plasma and single-donor fresh-frozen plasma during 48 h after thawing. *Transfus Apher Sci* 33, 257–267.

Heger, A., Römisch, J. und Svae, T. E. (2008). A biochemical quality study of a pharmaceutically licenced coagulation active plasma (Octaplas) thawed by the SAHARA-III dry tempering system compared to the regular use of a water bath. *Vox Sang* 94, 48–55.

Heger, A., Svae, T. E., Neisser-Svae, A., Jordan, S., Behizad, M. und Römisch, J. (2009). Biochemical quality of the pharmaceutically licensed plasma Octaplas LG after implementation of a novel prion protein (PrP^{Sc}) removal technology and reduction of the solvent/detergent (S/D) process time. *Vox Sang* 97, 219–225.

Heim, M. U., Hellstern, P. und Bundesärztekammer für die Hämotherapie (2010). New cross-sectional guidelines of the German Medical Association for hemotherapy with fresh frozen plasma. Evidence-based recommendations for risk-benefit assessment. *Anaesthesist* 59, 80–85.

Hellmann, M., Hallek, M. und Scharrer, I. (2010). Thrombotic-thrombocytopenic purpura. *Internist (Berl)* 51, 1138–1144.

Hellstern, P. (2008). Fresh-frozen plasma, pathogen-reduced single-donor plasma or biopharmaceutical plasma? *Transfus Apher Sci* 39, 69–74.

Hellstern, P. und Haubelt, H. (2002). Manufacture and composition of fresh frozen plasma and virus-inactivated therapeutic plasma preparations: correlation between composition and therapeutic efficacy. *Thromb Res* 107 Suppl 1, 3–8.

Hellstern, P., Sachse, H., Schwinn, H. und Oberfrank, K. (1992). Manufacture and in vitro characterization of a solvent/detergent-treated human plasma. *Vox Sang* 63, 178–185.

Hirsch, J., Bach, R., Menzebach, A., Welters, I. D., Dietrich, G. V. und Hempelmann, G. (2003). Temperature course and distribution during plasma heating with a microwave device. *Anaesthesia* 58, 444–447.

Hoffman, M. (2003). Remodeling the blood coagulation cascade. *J Thromb Thrombolysis* 16, 17–20.

Hoffman, M. und Monroe, D. M. (2001). A cell-based model of hemostasis. *Thromb Haemost* 85, 958–965.

– (2007). Coagulation 2006: a modern view of hemostasis. *Hematol Oncol Clin North Am* 21, 1–11.

Horowitz, B., Wiebe, M. E., Lippin, A. und Stryker, M. H. (1985). Inactivation of viruses in labile blood derivatives. I. Disruption of lipid-enveloped viruses by tri(n-butyl)phosphate detergent combinations. *Transfusion* 25, 516–522.

Horowitz, M. S., Rooks, C., Horowitz, B. und Hilgartner, M. W. (1988). Virus safety of solvent/detergent-treated antihaemophilic factor concentrate. *Lancet* 2, 186–189.

Houston, F., Foster, J. D., Chong, A., Hunter, N. und Bostock, C. J. (2000). Transmission of BSE by blood transfusion in sheep. *Lancet* 356, 999–1000.

Kappel, A. und Ehm, M. (2010). Immunoassays for diagnosis of coagulation disorders. *Hämostaseologie* 30, 194–201.

Keller, M. K., Pruss, A., Spies, C., Sander, M., Wernecke, K.-D. und von Heymann, C. (2009). Comparison of Clotting Factor Stability in FFP and S/D-treated Plasma and Stored for 6 days at 4 °C (Poster 691). In: *Annual Critical Care Congress*. Nashville, TN: Society of Critical Care Medicine (SCCM).

Keller, M. K., Pruss, A., Sander, M., Spies, C., Schoenfeld, H., Schuster, M., Meinck, K., Wernecke, K. D. und von Heymann, C. (2012). Thawed solvent/detergent-treated plasma: too precious to be wasted after 6 hours? *Blood Transfus*, 1–8.

Knight, R (2010). The risk of transmitting prion disease by blood or plasma products. *Transfus Apher Sci* 43, 387–391.

Landsteiner, K. (1901). Ueber Agglutinationserscheinungen normalen menschlichen Blutes. *Wiener Klinische Wochenschrift* 46, 1132–1134.

Landsteiner, K. und Wiener, A. S. (1941). Studies on an agglutinogen (Rh) in human blood blood reacting with anti-rhesus sera and with human isoantibodies. *J Exp Med* 74, 309–320.

Lewisohn, R. (1916). The Importance of the Proper Dosage of Sodium Citrate in Blood Transfusion. *Ann Surg* 64, 618–623.

Lozner, E. L., Taylor, F. H., Lemish, S., Snyder, R. und Newhouser, L. R. (1944). Preservation of Normal Human Plasma in the Liquid State. III. Studies on Chemical and Physico-Chemical Changes During the Second Year of Storage. *J Clin Invest* 23, 357–360.

MacFarlane, R. G. (1964). An Enzyme Cascade in the Blood Clotting Mechanism and its Function as a Biochemical Amplifier. *Nature* 202, 498–499.

Magner, J. J., Crowley, K. J. und Boylan, J. F. (2007). Fatal fibrinolysis during orthotopic liver transplantation in patients receiving solvent/detergent-treated plasma (Octaplas). *J Cardiothorac Vasc Anesth* 21, 410–413.

Mast, A. E., Stadanlick, J. E., Lockett, J. M. und Dietzen, D. J. (1999). Solvent/detergent-treated plasma has decreased antitrypsin activity and absent antiplasmin activity. *Blood* 94, 3922–3927.

Matthes, G., Richter, E., Tofoté, U. und Pawlow, I. (1994). Mechanical donation of whole blood simultaneous extraction of concentrated erythrocytes and fresh plasma using MCS-3P. *Beitr Infusionsther Transfusionsmed* 32, 9–11.

Mayr, W. R. (2010). Haemovigilance: are there significant differences among plasma products? *Transfus Apher Sci* 43, 407–409.

Millar, C. M. und Makris, M. (2012). Dealing with the uncertain risk of variant Creutzfeldt-Jakob disease transmission by coagulation replacement products. *Br J Haematol* 158, 442–452.

Milos, M., Herak, D., Kuric, L., Horvat, I. und Zadro, R. (2009). Evaluation and performance characteristics of the coagulation system: ACL TOP analyzer – HemosIL reagents. *Int J Lab Hematol* 31, 26–35.

Monroe, D. M., Hoffman, M. und Roberts, H. R. (2007). Fathers of modern coagulation. *Thromb Haemost* 98, 3–5.

Muyldermans, G., de Smet, F., Pierard, D., Steenssens, L., Stevens, D., Bougatef, A. und Lauwers, S. (1998). Neonatal infections with *Pseudomonas aeruginosa* associated with a water-bath used to thaw fresh frozen plasma. *J Hosp Infect* 39, 309–314.

Naghadeh, H. T., Maghsudloo, M. und Tabatabaei, M. R. (2011). Coagulation factors V, VIII, and X, prothrombin time and activated partial thromboplastin time test results in thawed plasma stored at 1–6 ℃ for 5 days. *Blood Transfus* 9, 95–98.

National Blood Service (2005). Guidelines for the Blood Transfusion Services in the United Kingdom. 7. Aufl. London: The Stationary Office.

Nifong, T. P., Light, J. und Wenk, R. E. (2002). Coagulant stability and sterility of thawed S/D-treated plasma. *Transfusion* 42, 1581–1584.

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.

Norda, R., Knutson, F., Berseus, O., Akerblom, O., Nilsson-Ekdahl, K., Stegmayr, B. und Nilsson, B. (2007). Unexpected effects of donor gender on the storage of liquid plasma. *Vox Sang* 93, 223–228.

Octapharma (2009). Gebrauchsinformation und Fachinformation für Octaplas® LG, Stand Januar 2009. Langenfeld: Octapharma GmbH.

Odegaard, O. R., Try, K. und Andersson, T. R. (1987). Protein C: an automated activity assay. *Haemostasis* 17, 109–113.

O'Shaughnessy, D. F., Atterbury, C., Bolton Maggs, P., Murphy, M., Thomas, D., Yates, S., Williamson, L. M. und British Committee for Standards in Haematology, Blood Transfusion Task Force (2004). Guidelines for the use of fresh-frozen plasma, cryoprecipitate and cryosupernatant. *Br J Haematol* 126, 11–28.

Ozgonenel, B., O'Malley, B., Krishen, P. und Eisenbrey, A. B. (2007). Warfarin reversal emerging as the major indication for fresh frozen plasma use at a tertiary care hospital. *Am J Hematol* 82, 1091–1094.

Ozier, Y. (2008). Blood transfusion and adjunctive therapy in the bleeding trauma patient. *Transfus Clin Biol* 15, 240–245.

Peden, A., McCardle, L., Head, M. W., Love, S., Ward, H. J., Cousens, S. N., Keeling, D. M., Millar, C. M., Hill, F. G. und Ironside, J. W. (2010). Variant CJD infection

in the spleen of a neurologically asymptomatic UK adult patient with haemophilia. *Haemophilia* 16, 296–304.

Pharmacopœia Europæa (2008). 6. Ausgabe, Monographie Nr. 1646. Hrsg.: European Directorate for the Quality of Medicines (EDQM). Straßburg: Council of Europe Publishing.

Prince, A. M., Horowitz, B. und Brotman, B. (1986). Sterilisation of hepatitis and HTLV-III viruses by exposure to tri(n-butyl)phosphate and sodium cholate. *Lancet* 1, 706–710.

Prusiner, S. B. (1982). Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* 216, 136–144.

Roberts, H. R., Monroe, D. M. und Escobar, M. A. (2004). Current concepts of hemostasis: implications for therapy. *Anesthesiology* 100, 722–730.

Rock, G. (2011). A comparison of methods of pathogen inactivation of FFP. *Vox Sang* 100, 169–178.

Rossaint, R., Bouillon, B., Cerny, V., Coats, T. J., Duranteau, J., Fernández-Mondéjar, E., Hunt, B. J., Komadina, R., Nardi, G., Neugebauer, E. et al. (2010). Management of bleeding following major trauma: an updated European guideline. *Crit Care* 14, DOI: `10.1186/cc8943`.

Roth, W. K. (2010). Quarantine Plasma: Quo vadis? *Transfus Med Hemother* 37, 118–122.

Schönheimer, R. (1937). The Investigation of Intermediary Metabolism with the Aid of Heavy Hydrogen: Harvey Lecture, January 21, 1937. *Bull N Y Acad Med* 13, 272–295.

Seifried, E., Klueter, H., Weidmann, C., Staudenmaier, T., Schrezenmeier, H., Henschler, R., Greinacher, A. und Mueller, M. M. (2011). How much blood is needed? *Vox Sang* 100, 10–21.

Seligsohn, U., Zivelin, A. und Bar-Shani, S. (1983). Cold-promoted activation of factor VII: is it a problem under blood bank conditions? *Haemostasis* 13, 186–191.

Sidhu, R. S., Le, T., Brimhall, B. und Thompson, H. (2006). Study of coagulation factor activities in apheresed thawed fresh frozen plasma at 1–6 degrees C for five days. *J Clin Apher* 21, 224–226.

Solheim, B. G., Bergan, A., Brosstad, F., Innes, R. und Svennevig, J. L. (2003). Fibrinolysis during liver transplant and use of solvent/detergent virus-inactivated plasma (ESDEP/Octaplas). *Anesth Analg* 96, 1230–1231.

Stanworth, S. J. (2007). The evidence-based use of FFP and cryoprecipitate for abnormalities of coagulation tests and clinical coagulopathy. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 179–186.

Stanworth, S. J., Hyde, C. J. und Murphy, M. F. (2007). Evidence for indications of fresh frozen plasma. *Transfus Clin Biol* 14, 551–556.

Suontaka, A. M., Silveira, A., Söderström, T. und Blombäck, M. (2005). Occurrence of cold activation of transfusion plasma during storage at +4 degrees C. *Vox Sang* 88, 172–180.

Tavill, A. S. (1972). The synthesis and degradation of liver-produced proteins. *Gut* 13, 225–241.

Thiele, T., Kellner, S., Hron, G., Wasner, C., Nauck, M., Zimmermann, K., Wessel, A., Warkentin, T. E., Greinacher, A. und Selleng, K. (2012). Storage of thawed plasma for

a liquid plasma bank: impact of temperature and methylene blue pathogen inactivation. *Transfusion* 52, 529–536.

Transfusionsgesetz (1998). Gesetz zur Regelung des Transfusionswesens (Transfusionsgesetz, TFG), Neufassung 2007, Änderung 2009. Bundesgesetzblatt (BGBl), S. 1752–1760.

von Heymann, C., Pruß, A., Kastrup, M., Marz, S., Braun, J., Kiesewetter, H., Kox, W. J. und Spies, C. (2003). Quality Management Regarding the Use of Blood Products with Special Respect to the Self-Inspection Program – a Report from a University Hospital. *Transfus Med Hemother* 30, 78–85.

von Heymann, C., Pruss, A., Foer, A., Volk, T., Braun, J., Röhrs, A., Kiesewetter, H. und Spies, C. (2005). Quality assurance of haemotherapy in anaesthesia. Auswertung eines 3-jährigen Erfahrungszeitraums. *Anaesthesist* 54, 107–116.

von Heymann, C., Pruss, A., Sander, M., Finkeldey, A., Ziemer, S., Kalus, U., Kiesewetter, H., Salama, A. und Spies, C. (2006). Thawing procedures and the time course of clotting factor activity in fresh-frozen plasma: a controlled laboratory investigation. *Anesth Analg* 103, 969–974.

von Heymann, C., Keller, M. K., Spies, C., Schuster, M., Meinck, K., Sander, M., Wernecke, K. D., Kiesewetter, H. und Pruss, A. (2009). Activity of clotting factors in fresh-frozen plasma during storage at 4 degrees C over 6 days. *Transfusion* 49, 913–920.

Wadsworth, J. D., Joiner, S., Hill, A. F., Campbell, T. A., Desbruslais, M., Luthert, P. J. und Collinge, J. (2001). Tissue distribution of protease resistant prion protein in variant Creutzfeldt-Jakob disease using a highly sensitive immunoblotting assay. *Lancet* 358, 171–180.

Walter, C. W. und Murphy, W. P. (1952). A closed gravity technique for the preservation of whole blood in ACD solution utilizing plastic equipment. *Surg Gynecol Obstet* 94, 687–692.

Welck, M., Borg, P. und Ellis, H. (2010). James Blundell MD Edin FRCP (1790–1877): pioneer of blood transfusion. *J Med Biogr* 18, 194–197.

Witt, I. (1991). Test systems with synthetic peptide substrates in haemostaseology. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 29, 355–374.

World Health Organisation (2009). Screening Donated Blood for Transfusion-Transmissible Infections. Genf: WHO Press.

Wright-Kanuth, M. S. und Smith, L. A. (2002). Developments in component therapy: novel components and new uses for familiar preparations. *Clin Lab Sci* 15, 116–124.

Yazer, M. H., Cortese-Hassett, A. und Triulzi, D. J. (2008). Coagulation factor levels in plasma frozen within 24 hours of phlebotomy over 5 days of storage at 1 to 6 degrees C. *Transfusion* 48, 2525–2530.

8 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

9 Eigene Publikationen

Bosse, G., Schmidbauer, W., Spies, C. D., Sörensen, M., Francis, R. C., Bubser, F., Krebs, M. und Kerner, T. (2011). Adherence to guideline-based standard operating procedures in pre-hospital emergency patients with chronic obstructive pulmonary disease. *J Int Med Res* 39, 267–276.

Keller, M. K., Krebs, M., Spies, C., Wernecke, K.-D., Heger, A. und von Heymann, C. (2012). Clotting factor activity in thawed Octaplas® LG during storage at 2–6 °C for 6 days from a quality assurance point of view. *Transfus Apher Sci* 46, 129–136.

Krebs, M. und Weber-Carstens, S. (2011). Acquired neuromuscular weakness: Underestimated problem in intensive care medicine. *Anaesthesist* 60, 885–886.

9.1 Kongressbeiträge

Keller, M. K., Krebs, M., Schuster, M., Meinck, K., Wernecke, K.-D. und von Heymann, C. (2010). Verlauf der Gerinnungsfaktoren und -inhibitoren während der Lagerung bei 2 °C–6 °C von aufgetautem Octaplas LG über 6 Tage. In: *57. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Anästhesiologie und Intensivmedizin (Deutscher Anästhesiekongress).* Nürnberg: Deutsche Gesellschaft für Anästhesiologie und Intensivmedizin (DGAI).

Krebs, M. (2011). Zucker und Eiweiß – die Sepsis verändert alles. In: *Hauptstadtkongress für Anästhesie und Intensivmedizin (HAI).* Berlin: Deutsche Gesellschaft für Anästhesiologie und Intensivmedizin (DGAI).

Krebs, M., Keller, M. K., Schuster, M., Meinck, K., Spies, C., Wernecke, K.-D. und von Heymann, C. (2010a). Comparison of the activity of clotting factors in Octaplas® and Octaplas LG® during storage at 4 °C ± 2 °C Celsius for 6 days. In: *23rd Annual Congress.* Barcelona: European Society of Intensive Care Medicine (ESICM).

Krebs, M., Keller, M. K., Schuster, M., Meinck, K., Wernecke, K.-D. und von Heymann, C. (2010b). Verlauf der Gerinnungsfaktoren und -inhibitoren während der Lagerung bei 2 °C–6 °C von aufgetautem Octaplas LG über 6 Tage. In: *Hauptstadtkongress für Anästhesie und Intensivmedizin (HAI).* Berlin: Deutsche Gesellschaft für Anästhesiologie und Intensivmedizin (DGAI).

Krebs, M., Olbricht, C., Koch, S., Rehfeld, N., Wollersheim, T., Goldmann, A., Spies, C. und Weber-Carstens, S. (2011a). Ausgeprägte Muskelschwäche bei Patienten mit *alcohol use disorder* (AUD). In: *Hauptstadtkongress für Anästhesie und Intensivmedizin (HAI).* Berlin: Deutsche Gesellschaft für Anästhesiologie und Intensivmedizin (DGAI).

Krebs, M., Luther-Schröder, A., Schneider, J., Assmann, A., Olbricht, C., Wollersheim, T., Kleber, C., Faust, K., Spranger, J., Spuler, S. und Weber-Carstens, S. (2011b). IGF 1 in ICU patients is associated with selective type II muscle fibre atrophy in early stage of sepsis. In: *24th Annual Congress*. Berlin: European Society of Intensive Care Medicine (ESICM).

Krebs, M., Luther-Schröder, A., Schneider, J., Assmann, A., Olbricht, C., Wollersheim, T., Kleber, C., Faust, K., Spranger, J., Spuler, S. und Weber-Carstens, S. (2011c). IGF 1 Plasmaspiegel sind assoziiert mit Typ II Muskelfasergröße in der Frühphase der Sepsis. In: *Hauptstadtkongress für Anästhesie und Intensivmedizin (HAI)*. Berlin: Deutsche Gesellschaft für Anästhesiologie und Intensivmedizin (DGAI).

Wollersheim, T., Assmann, A., Bierbrauer, J., Rehfeld, N., Krebs, M., Koch, S., Faust, K., Kleber, C., Spranger, J. und Weber-Carstens, S. (2011). Insulin Signaling in Skeletal Muscle during Early Critical Illness: Impact on Development of Critical Illness Myopathy. In: *24th Annual Congress*. Berlin: European Society of Intensive Care Medicine (ESICM).

Wollersheim, T., Haas, K., Krebs, M., Schuricke, V., Jesse, P. und Weber-Carstens, S. (2012a). Anwendbarkeit einer Vibrationstherapie im Sinne der whole-body-vibration zur Muskelaktivierung bei Intensivpatienten und ihre Effekte auf Hämodynamik, intrakraniellen Druck und Energiestoffwechsel. In: *59. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Anästhesiologie und Intensivmedizin (Deutscher Anästhesiekongress)*. Leipzig: Deutsche Gesellschaft für Anästhesiologie und Intensivmedizin (DGAI).

Wollersheim, T., Weber-Carstens, S., Egbers, C., Luther, A., Krebs, M., Hamati, J., Lodka, D., Kleber, C., Spies, C., Spuler und Fielitz, J. (2012b). Dynamics of skeletal muscle atrophy and atrophy gene expression in critically ill patients during ICU stay. In: *25th Annual Congress*. Lissabon: European Society of Intensive Care Medicine (ESICM).

Wollersheim, T., Haas, K., Krebs, M., Moergeli, R., Malleike, J. und Weber-Carstens, S. (2012c). Safety and Efficacy of Whole-Body-Vibration in Critically Ill Patients. In: *25th Annual Congress*. Lissabon: European Society of Intensive Care Medicine (ESICM).

10 Selbständigkeitserklärung

Ich, Martin Krebs, erkläre an Eides Statt, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Untersuchung der Gerinnungsproteinaktivität in aufgetautem und gelagertem Solvent/Detergent-behandeltem Plasma mit Prioneneliminierung unter Berücksichtigung der mikrobiologischen Qualität, der Lagerungsstabilität sowie der klinischen Relevanz“ selbst und ohne die unzulässige Hilfe Dritter verfasst, keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Berlin	7. Februar 2013	
.....	.....	.....
Ort	Datum	Martin Krebs

11 Danksagung

Ich danke Professor Dr. Christian von Heymann ganz herzlich für die freundliche Überlassung des Themas und die konstruktive Kritik bis zur Fertigstellung dieser Arbeit. Darüber hinaus begleitete und unterstützte er mich während meiner klinischen Ausbildung und hatte für alle Fragen ein offenes Ohr.

Ein herzliches Dankeschön gilt meiner Kollegin Mareike Kristina Körber für die gute Zusammenarbeit während der Vorbereitungen und der Messungen dieser Studie in Frankfurt a. d. Oder.

Den Mitarbeitern des Instituts für medizinische Diagnostik Oderland in Frankfurt a. d. Oder danke ich für die Unterstützung während der Untersuchung, insbesondere Dr. Michael Schuster und Kristian Meinck.

Ebenfalls danke ich Herrn Professor Dr. Wernecke, dem emeritierten Direktor des Institutes für Medizinische Biometrie der Charité, für die Unterstützung bei der statistischen Analyse.

All meinen Freunden, die mich mit Geduld, Unterstützung und fortwährendem Ansporn während der Fertigstellung dieser Arbeit begleitet haben, gebührt großer Dank, insbesondere Mischa Braun, der mir seit langem ein wahrer Freund ist.

Meiner Frau Ina Johanne Hälke danke ich sehr für ihre selbstlose Unterstützung und das Verständnis in der Zeit, bis diese Arbeit endlich fertiggestellt wurde.

Besonderer Dank gilt meinen Eltern für die Möglichkeit zu studieren, für die Freiheiten, die sie mir in all den Jahren eingeräumt haben, meinen eigenen Weg zu gehen und für die Bestärkung meiner Ideen und Vorhaben.