

Aus dem Institut für Transfusionsmedizin
des Instituts für Immunologie und Transfusionsmedizin
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. Andreas Greinacher)
der Universitätsmedizin der Universität Greifswald

Thema:

**Validierungsuntersuchungen zum Einfluss von Lagertemperatur, Lagerdauer
und Methylenblau-Photoaktivierung auf die Gerinnungsfaktorkapazität von
aufgetautem Therapieplasma.**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des akademischen

Grades

Doktor der Medizin
(Dr. med.)

der

Universitätsmedizin

der

Universität Greifswald

2021

vorgelegt von: Sarah Kellner
geboren am: 12.09.1985
in: Berlin-Köpenick

Dekan: Prof. Dr. med. Karlhans Endlich

1. Gutachter/in: Prof. Dr. rer. nat. Uwe Völker

2. Gutachter/in: Prof. Dr. med. Andreas Greinacher

Ort, Raum: Greifswald, Raum P0.75

Tag der Disputation: 08.09.2022

Inhaltsverzeichnis

I	Abbildungsverzeichnis	5
II)	Tabellenverzeichnis.....	6
III)	Abkürzungsverzeichnis.....	7
1	Einleitung.....	10
1.1	Notfallmanagement starker Blutungen.....	10
1.2	Lagerung von gefrorenem Frischplasma	11
1.3	Pathogenreduktionsverfahren mit Metylenblau/Rotlicht.....	12
1.4	Untersuchung von gefrorenem Frischplasma mittels Proteomanalyse	13
1.5	Ziele der Arbeit	15
2	Material und Methoden	16
2.1	Probengenerierung – Plasmapherese und Aliquotierung	16
2.1.1	Plasmapherese.....	16
2.1.2	Aliquotierung.....	16
2.2	Sterilitätsprüfungen.....	20
2.3	Gerinnungstests.....	20
2.3.1	Einzelfaktorenanalyse.....	21
2.3.2	Globaltests der Blutgerinnung.....	21
	Endogenes Thrombinbildungspotential (ETP).....	23
	ProC®-Global-Test.....	26
2.4	Vorbereitung der Massenspektrometrie.....	26
2.4.1	Proteinbestimmung nach Bradford	27
2.4.2	Proteindepletion.....	27
2.4.3	TCA-Fällung.....	29
2.4.4	Proteinverdau	29
2.4.5	Reinigung der Peptidextrakte über C18-Material	30
2.5	Durchführung der Massenspektrometrie (LC-ESI MS/MS)	31
2.6	Gelbasierte Elektrophorese	33
2.6.1	Rehydratisierung.....	33
2.6.2	Isoelektrische Fokussierung	34

2.6.3 Polyacrylamidgelelektrophorese	35
2.6.4 Visualisierung der Proteinspots mit Silbernitrat	36
2.7 Statistische Analyse.....	37
3 Ergebnisse.....	39
3.1 Einfluss der Lagertemperatur auf die Gerinnungsfaktorkapazität von aufgetautem Therapieplasma	40
3.2 Einfluss der Lagerdauer auf die Gerinnungsfaktorkapazität von aufgetautem Therapieplasma	43
3.3 Einfluss des Pathogenreduktionsverfahrens mit Methylenblau/Rotlicht auf die Gerinnungsfaktorkapazität von aufgetautem Therapieplasma	45
3.3.1 Soforteffekte von MB/Rotlicht auf die Gerinnungsfaktorkapazität.....	45
3.3.2 Einfluss der Lagerungsbedingungen auf die Gerinnungsfaktorkapazität von MBP	46
3.3.3 Vergleich der Gerinnungsfaktorkapazität von MBP und unbehandeltem GFP nach 7 Tagen Lagerung bei 2-6 °C	47
3.4 FVIIa-Aktivität	50
3.5 Sterilitätsprüfung.....	51
3.6 Ergebnisse der 1D- und 2D-Gelelektrophorese.....	51
3.7 Ergebnisse der Massenspektrometrie (LC-ESI MS/MS).....	54
4 Diskussion	58
5 Zusammenfassung	67
6 Literaturverzeichnis	68
7 Eidesstattliche Erklärung	75
VI Anhangverzeichnis	76

I Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Studiendesign.....	17
Abb. 2: THERAFLEX® MB Set.....	18
Abb. 3: MACOTRONIC® B2 Illuminator	19
Abb. 4: Thrombinbildungskurve.	24
Abb. 5: Funktionsprinzip der MARS-6 Säule.....	28
Abb. 6: Einfluss der Lagertemperatur und -dauer auf die Protein S-Aktivität (A) und FVII-Aktivität (B).....	41
Abb. 7: Einfluss der Lagertemperatur und -dauer auf die Globaltests aPTT (A), Quick-Wert (B), ProC-Global NR (C) und ETP (D).....	42
Abb. 8: Einfluss der Lagertemperatur und -dauer auf die FVIII-Aktivität	44
Abb. 9: Übersicht über die Soforteffekte der MB/Rotlicht-Behandlung	45
Abb. 10: Einfluss der Lagerdauer auf die FVII-Aktivität von MBP.....	46
Abb. 11: Vergleich der FVIII-Aktivität von MBP und unbehandeltem GFP (4 °C)	47
Abb. 12: Vergleich der VII-Aktivität von MBP und unbehandeltem GFP (4 °C)	48
Abb. 13: Vergleich der Globaltests aPTT (A), Quick-Wert (B), ProC-Global NR (C) und ETP (D) von MBP und unbehandeltem GFP (4 °C).....	49
Abb. 14: Ergebnisse der 1D-Gelelektrophorese	52
Abb. 15: Proteinmuster nach 2D-Gelelektrophorese	53
Abb. 16: Overlay Image der 2D-Gelelektrophorese	53
Abb. 17: Proteinabundanz nach Normalisierung.....	54
Abb. 18: Einfluss der Lagerdauer, -temperatur und der Pathogenreduktion mit MB/Rotlicht auf die Aktivität des vWF-Ag	56
Abb. 19: Vulkan-Plots Massenspektrometrie C7 vs. C0 (A), C7 vs. A7 (B), B7 vs. B0 (C)	57

II) Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht der durchgeführten Gerinnungstests.....	20
Tabelle 2: Materialien für die Gerinnungsfaktorenanalyse	22
Tabelle 3: Materialien für die Durchführung der Globaltests.....	22
Tabelle 4: Parameter der Thrombinbildungskurve	24
Tabelle 5: Materialien für das Reduzieren und Alkylieren von Proben vor Flüssigverdau	30
Tabelle 6: Herstellung von Puffer A	30
Tabelle 7: Zusammensetzung 10 x RH (= Rehydratisierungslösung).....	34
Tabelle 8: Zusammensetzung 1 x UT (= Pufferlösung).....	34
Tabelle 9: 3-Stufen Programm der isoelektrischen Fokussierung.....	34
Tabelle 10: Zusammensetzung Puffer A und Puffer B.....	35
Tabelle 11: Zusammensetzung der Trenngele	36
Tabelle 12: Zusammensetzung des Trennpuffers.....	36
Tabelle 13: Zusammensetzung des Laufpuffers	36
Tabelle 14: Materialien für Fixierung, Waschen und Sensitivierung	37
Tabelle 15: Zusammensetzung der Färbelösung.....	37
Tabelle 16: Zusammensetzung der Entwicklerlösung.....	37
Tabelle 17: Einfluss der Lagertemperatur (2-6 °C und 20-24 °C) auf die Aktivität der Gerinnungsfaktoren und Inhibitoren von aufgetautem GFP nach 7 Tagen Lagerung.....	40
Tabelle 18: FVII- und VIIa-Aktivität einer Stichprobe (n = 7 aus 50)	51

III) Abkürzungsverzeichnis

ABC	Ammoniumbicarbonat
ACN	Acetonitril
AP	apheresed plasma „Aphereseplasma“ (mittels Plasmapherese gewonnenes Plasma)
APC	Aktiviertes Protein C
APCC	activated prothrombin complex concentrate „Aktiviertes Prothrombinkomplex-Konzentrat“
APS	Ammoniumpersulfat
aPTT	activated partial thromboplastin time „aktivierte Thromboplastinzeit“
AT	Antithrombin
AUC	area under the curve „Fläche unter der Kurve“
BCS	Behring Coagulation System (Gerinnungsmessgerät der Firma Behring)
BL	baseline „Basislinie, Vergleichslinie“
CAT	calibrated automated thrombin generation „geeichte automatisierte Thrombinbildung“
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethyl-ammonio]-1-propansulfonat
1D	eindimensional
2D	zweidimensional
DE	Deutschland
DEHP	Di(2-ethylhexyl)phthalat
DTT	Dithiothreitol
EHEC	Enterohämorrhagische Escherichia coli
EK	Erythrozytenkonzentrat
ETP	Endogenes Thrombinbildungspotential
F	Gerinnungsfaktor

FDR	false discovery rate „Falscherkennungsrate“
GFP	Gefrorenes Frischplasma
HCl	Chlorwasserstoffsäure (Salzsäure)
IAA	Iodacetamid
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IgA	Immunglobulin A
IgG	Immunglobulin G
INR	International Normalized Ratio „Internationale normalisierte Ratio“
IPG	Immobilisierter pH-Gradient
Log	Logarithmus
LT	lag time „Latenzzeit“
LC-ESI MS/MS	Liquid Chromatography-Electrospray-Interface tandem mass spectrometry „Flüssigchromatographie durch Elektrospray-Ionisation gekoppelt mit Tandem-Massenspektrometrie“
MA	Massachusetts
MARS-6	Multiple Affinity Removal System Human 6
MB	Methylenblau
MBP	Methylenblau/Rotlicht behandeltes Plasma
MS	Massenspektrometrie
NR	Normalized Ratio „normalisierte Ratio“
PCAT	protein C activity depending clotting time „Protein C-Aktivität abhängige Gerinnungszeit“
ProC-Global NR	Normalisierte Ratio der „Protein C-Aktivität abhängigen Gerinnungszeit“ (in der Literatur auch PCAT-NR)
PF2D	Digital Flow Switch for Deionized Water and Chemical Liquids (hier: Gerät zur Proteindepletion der Firma Beckmann-Coulter)
PL	Phospholipide

ppm	parts per million „Anteile pro Million“ (10^{-6})
PT	prothrombin time „Prothrombinzeit“, Synonym: Thromboplastinzeit
rFVIIa	rekombinanter aktivierter Faktor VII
RH	Rehydratisierung
RP	recovered plasma „aus Vollblutspende gewonnenes Plasma“
RVV	Russell's Viper Venom
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis „Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese“
SOP	standard operating procedure „Standardvorgehensweise“
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TF	tissue factor „Gewebefaktor“
TFPI	tissue factor pathway inhibitor „Inhibitor des gewebefaktorinduzierten Wegs“
TIC	trauma-induced coagulopathy „Trauma-induzierte Koagulopathie“
TK	Thrombozytenkonzentrat
TTP	time to peak „Zeit bis zum Maximum“
u. a.	unter anderem
UT	Pufferlösung bestehend aus Harnstoff, Thioharnstoff und Aqua dest.
vWF-Ag	Von-Willebrand-Faktor-Antigen
z. B.	zum Beispiel

1 Einleitung

1.1 Notfallmanagement starker Blutungen

Patienten, deren Leben durch eine schwere Blutung z. B. nach Verkehrsunfall oder im Rahmen einer großen Operation bedroht ist, bedürfen einer komplexen Behandlung. Die Trauma-induzierte Koagulopathie (TIC) führt zu einer signifikant gesteigerten Morbidität und Mortalität¹ und stellt somit eine wichtige Säule im Management des Traumapatienten dar. Die TIC entwickelt sich infolge verschiedener pathophysiologischer Mechanismen²: Durch die Gewebedestruktion mit Inflammation kommt es einerseits zur Gerinnungsaktivierung mit konsekutivem Verbrauch der Gerinnungsfaktoren (Verbrauchskoagulopathie). Die Gewebshypoxie infolge des hämorrhagischen Schocks führt andererseits zur Aktivierung der Fibrinolyse. Zudem gehen durch die Hämorrhagie funktionelle Bestandteile wie Gerinnungsfaktoren und Thrombozyten verloren (Verlustkoagulopathie). Die Blutungsneigung wird durch Begleiteffekte des Blutverlustes wie Azidose, Hypothermie, Hypokalzämie und die Anämie verstärkt. Erschwerend ist eine vorbestehende Dauermedikation mit Antikoagulanzen oder Thrombozytenaggregationshemmern. In Ermangelung von Blutprodukten sollte die prähospital Gabe von Volumenersatzmitteln zur Kreislaufstabilisierung restriktiv erfolgen³, weil sonst eine Verdünnungskoagulopathie komplizierend hinzutreten kann. Bei einem Fibrinogenspiegel < 1 g/l oder einem Abfall des Quick-Wertes unter 50 %, sind zusätzliche mikrovaskuläre Blutungen zu erwarten⁴.

Neben der Transfusion von Erythrozytenkonzentraten (EK) zur Bereitstellung von Sauerstoffträgern, ist die frühzeitige Transfusion von gefrorenem Frischplasma (GFP) zur Substitution der Gerinnungsfaktoren unerlässlich. Darüber hinaus werden Thrombozytenkonzentrate (TK) und Gerinnungsfaktorenkonzentrate transfundiert. Jedoch stehen nicht alle Gerinnungsfaktoren als Konzentrat zur Verfügung, wohingegen GFP alle Gerinnungsfaktoren in ihren physiologischen Konzentrationen enthält.

Je frühzeitiger die Transfusion von GFP bei schwerer Hämorrhagie erfolgt, desto besser ist das Überleben von Patienten, die Massivtransfusionen bedürfen⁵. Darüber

hinaus kann der zügige Einsatz von GFP den Verbrauch von EK im weiteren Krankheitsverlauf reduzieren⁵. 2008 zeigten Holcomb et al., dass eine höhere Transfusionsratio von $\geq 1:2$ von GFP:EK mit einem verbesserten Überleben von Patienten in den ersten 30 Tagen nach traumatischer Hämorrhagie im Vergleich zu einer niedrigeren Transfusionsratio ($< 1:2$) einhergeht (60 % vs. 40 %, $p < 0,01$)⁶. In der 2015 veröffentlichten „Pragmatic Randomized Optimal Platelet and Plasma Ratios“-Studie (PROPPR) konnte durch die balancierte 1:1:1 Transfusion von TK, GFP und EK der Anteil an Patienten gesenkt werden, die innerhalb der ersten 24 Stunden bzw. 30 Tage infolge schwerer Blutungen starben. Der Unterschied zur 1:1:2 Transfusion war jedoch nicht signifikant⁷. Die Subgruppenanalyse ergab infolge einer signifikanten Reduktion der verblutenden Patienten während der Primärversorgung nach Erreichen der Klinik sowie einer signifikanten Erhöhung des Anteils erreichter Blutstillungen einen Vorteil für die 1:1:1 Transfusionsstrategie. Die Ergebnisse der prospektiven multizentrischen Traumastudie (PROMMTT)⁸ zeigten, dass Patienten mit einer niedrigeren GFP:EK-Ratio ($< 1:2$) in den ersten 6 Stunden ein 3-4fach höheres Risiko haben, zu versterben, als Patienten die anteilig mehr GFP erhielten ($\geq 1:1$). Wurden die ersten 24 Stunden überlebt, zeigte sich die 30-Tage-Mortalität in Kongruenz zu den Ergebnissen der PROPPR-Studie unabhängig von der Transfusionsstrategie vergleichbar. Jedoch kann eine Transfusionsratio von $\geq 1:2$ GFP:EK nicht mit Beginn der Transfusion gewährleistet werden, weil GFP routinemäßig bei -30 °C tiefgefroren gelagert wird und vor der Transfusion aufgetaut werden muss. Es müssen daher Konzepte etabliert werden, um dieses Problem zu lösen.

1.2 Lagerung von gefrorenem Frischplasma

Therapeutisches Plasma wird durch Plasmapherese oder durch Zentrifugation von Vollblut eines Spenders gewonnen. Die Aktivität der Gerinnungsfaktoren (F) V, VIII, IX und XI ist in mittels Plasmapherese hergestelltem GFP höher als in GFP aus Vollblut⁹. Um die Aktivität der Gerinnungsfaktoren und damit die therapeutische Effektivität der Plasmakonserven bestmöglich zu erhalten, muss das gewonnene Plasma innerhalb von 6-8 Stunden (GFP), spätestens jedoch 24 Stunden (FP24) nach Phlebotomie auf eine

Temperatur von weniger als -30 °C abgekühlt werden (in Europa)¹⁰. Bei -30 °C ist Blutplasma bis zu 3 Jahre haltbar¹⁰. Wird therapeutisches Plasma zur Behandlung eines Patienten angefordert, wird es bei 37 °C über etwa 30 min aufgetaut und zum Patienten transportiert. Im Gegensatz dazu werden Erythrozytenkonzentrate bei 2-6 °C flüssig gelagert und sind somit schneller verfügbar. In Deutschland wurde nach den bis 2017 gültigen Hämotherapierichtlinien der Bundesärztekammer empfohlen, Blutplasma anders als Erythrozytenkonzentrate für maximal 6 Stunden nach dem Auftauen flüssig zu lagern⁴, während in den USA eine Transfusion von GFP bis zu 24 Stunden nach dem Auftauen möglich ist¹¹. Basierend auf den Daten von Scott et al.¹² wurde in den USA schließlich auch akzeptiert, wenn auch nicht empfohlen, die Lagerung bei 1-6 °C (liquid plasma) auf bis zu 5 Tage auszudehnen¹¹. Damit war es in den USA anders als in Deutschland möglich, therapeutisches Plasma für eine begrenzte Zeit flüssig zu lagern und es somit im Falle eines Blutungsnotfalls ohne Zeitverzögerung zur Verfügung zu stellen.

1.3 Pathogenreduktionsverfahren mit Methylenblau/Rotlicht

Mit Methylenblau/Rotlicht behandeltes Plasma (MBP) ist seit 1993 zur klinischen Anwendung zugelassen. Für dieses Verfahren werden Einzelplasmaeinheiten gefrorenen Frischplasmas (circa 250 mL) in ein spezielles Beutelsystem überführt. Ein integrierter Zellfilter reduziert korpuskuläre Bestandteile und damit auch zellständige Viren im Plasma. Anschließend wird das Plasma mit dem Phenothiazin-Farbstoff Methylenblau (MB) angereichert, welcher in im Plasma enthaltenen Nukleinsäuren interkaliert und durch kurzwelliges Licht einer bestimmten Wellenlänge (rotes Licht) aktiviert wird. Dabei werden Elektronen von MB auf Sauerstoff übertragen. MB wird dementsprechend oxidiert und Sauerstoff reduziert, wodurch Sauerstoffradikale (Hyperoxidanionen) entstehen. Diese oxidieren wiederum die Base Guanin, wodurch Strangbrüche der Virus-DNA und -RNA erzeugt werden, sodass eine virale Replikation verhindert wird¹³. Das MB/Rotlicht-Verfahren inaktiviert die meisten klinisch relevanten Viren effektiv⁴. Weil Viren, die in sehr hoher Konzentration vorkommen können, wie z. B. das Parvovirus B19, unter Umständen nicht vollständig inaktiviert werden⁴, wird in dieser Arbeit stets der Begriff „Pathogenreduktionsverfahren“ mit MB/Rotlicht

verwendet. Aufgrund des Wirkprinzips bestehen Bedenken über eine potentielle Toxizität von MB¹⁴. Jedoch wurden bisher keine schädlichen Reaktionen beobachtet, wie zum Beispiel beim Einsatz von MB als Antidot bei der Methämoglobinämie in einer Dosis von 1-5 mg/kg Körpergewicht. In MBP ist die Konzentration von MB und dessen Derivaten weitaus niedriger. Pro Plasmaeinheit von ~250 mL werden 85 µg MB aufgelöst. Anschließend werden MB und seine Photoprodukte durch einen MB-Filter weitestgehend entfernt. Es verbleibt ein Restgehalt von circa 0,00003 mg/kg Körpergewicht bzw. 0,5 µg pro Plasmaeinheit¹³. Damit liegt der Gehalt von MB und seinen Derivaten deutlich unterhalb von 30 µg pro Plasmaeinheit, wie es von den „Blood Transfusion Services“ der UK gefordert wird¹⁵. Bisher wurde nach Gabe von MBP nicht von schädlichen Reaktionen, Neoantigenizität oder Genotoxizität berichtet. Auch Ratten, die chronisch MB exponiert wurden, indem sie über 13 Wochen oral MB in einer Tagesdosis von 200 mg/kg aufnahmen, zeigten keine Zeichen von Toxizität¹⁶. MB beeinflusst die Aktivität aller Gerinnungsfaktoren, mit Ausnahme der Inhibitoren der Blutgerinnung^{17,18}. Bisher ist noch unklar, wie sich die Pathogenreduktion mit MB/Rotlicht auf die Gerinnungsfaktoren und Inhibitoren von GFP nach dem Auftauen und bei Lagerung über mehrere Tage auswirkt. Dies wird im Rahmen der vorliegenden Arbeit näher untersucht.

1.4 Untersuchung von gefrorenem Frischplasma mittels Proteomanalyse

Bisher wurde in zahlreichen Studien die Messung der Aktivität der Gerinnungsfaktoren und Globaltests der Blutgerinnung genutzt, um den Einfluss von Lagertemperatur und -dauer^{12,19-24} sowie der Pathogenreduktion mit MB/Rotlicht^{18,25,26} auf aufgetautes Therapieplasma zu evaluieren. Möglicherweise ist die Proteomanalyse eine sinnvolle, ergänzende Untersuchungsmethode, um Auswirkungen von Lagerungs- bzw. Behandlungsverfahren auf das Plasmaproteom festzustellen. Denn die technische Weiterentwicklung auf dem Gebiet der Proteomanalyse, insbesondere der Massenspektrometrie, erlaubt eine schnelle und hochsensitive Identifikation sowie qualitative und quantitative Analyse tausender Proteine²⁷. So sind Aussagen über Veränderungen der Zusammensetzung sowie über die Funktionalität und Modifikation²⁸ relevanter Proteine möglich. Obwohl humanes Plasma im klinischen

Alltag zur Behandlung schwerer Koagulopathien oder schwerer Blutungen regelmäßig transfundiert wird, gibt es nur wenige Studien, die das Plasmaproteom von Therapieplasma untersuchen. Steil et al. führten eine *in vitro* Charakterisierung von 24 Monate gelagertem, lyophilisiertem Plasma durch und fanden keine Veränderungen des Plasmaproteoms²⁹. Darüber hinaus sind lediglich Daten über Proteomanalysen von FVIII- und FVIII/Von-Willebrand-Faktor-Konzentraten³⁰, FIX-Konzentraten³¹ und Prothrombin-Komplex-Konzentraten³² verfügbar. Nach dem Auftauen flüssig gelagertes Plasma wurde erstmals im Rahmen der vorliegenden Arbeit einer Proteomanalyse unterzogen.

Proteomdaten von pathogenreduziertem, humanem Plasma sind rar. Crettaz et al. zeigten, dass die Pathogenreduktion mit MB/Rotlicht zur Modifikation der Gamma-Kette von Fibrinogen, Transthyretin und Apolipoprotein A-I führt³³. Tissot et al. konnten hingegen keine Proteomveränderungen nach Behandlung mit MB/Rotlicht nachweisen³⁴.

Humane Plasmaproben enthalten eine hochkomplexe Proteinzusammensetzung. Es wurden bereits über 10.000 Proteine in humanem Blutplasma identifiziert³⁵. Um bessere Untersuchungsergebnisse zu erreichen, ist eine Präfraktionierung vor Durchführung der Massenspektrometrie erforderlich. Bei Plasmaproben ist dies durch die Entfernung hochabundanter Plasmaproteine, u. a. von Albumin und Immunglobulinen möglich. So können niedrigabundante Proteine, zu denen auch die Gerinnungsfaktoren zählen, besser detektiert und untersucht werden³⁶. Das Agilent Multiple Affinity Removal System Human 6 (MARS-6)³⁷ ermöglicht es durch gebundene Antikörper, sechs hochabundante Proteine (Albumin, IgG, Antitrypsin, IgA, Transferrin und Haptoglobin) in einem Schritt aus Plasma zu extrahieren, um bessere Voraussetzungen zur Untersuchung der verbliebenen niedrigabundanten Proteine zu schaffen. Weitere Möglichkeiten die Komplexität des Plasmaproteoms zu reduzieren sind gelbasierte Strategien, wie z. B. die zweidimensionale (2D) Gelelektrophorese³⁸ und nicht gelbasierte Strategien, wie z. B. chromatographische Verfahren.

Die Proteomanalyse erfolgt in dieser Arbeit mittels Massenspektrometrie nach vorheriger Proteindepletion durch die MARS-6 Säule und wird zur Validierung des Einflusses von Lagertemperatur, Lagerdauer und Pathogenreduktion mit MB/Rotlicht auf das Plasmaproteom von aufgetautem Therapieplasma genutzt.

1.5 Ziele der Arbeit

Diese Arbeit wurde erstellt, um Lagerungsbedingungen für therapeutisches Plasma und dessen Haltbarkeit für den Aufbau einer Flüssigplasmabank an der Universitätsmedizin Greifswald zu validieren. Darüber hinaus sollte der Einfluss der Pathogenreduktion mit MB/Rotlicht auf die Gerinnungsfaktoraktivität in aufgetautem GFP untersucht werden, damit in besonderen Mangelsituationen gefrorenes Quarantäneplasma noch vor Ablauf der Quarantänefrist zur Therapie freigegeben werden kann.

Zur Evaluierung der Plasmaqualität wird die Messung der Aktivität der Gerinnungsfaktoren und Inhibitoren der Blutgerinnung sowie der Globaltests Quick-Wert/INR und aPTT herangezogen. Darüber hinaus werden in dieser Arbeit neue Globaltests, wie der ProC®-Global-Test und das endogene Thrombingenerierungspotential (ETP) herangezogen, um den Einfluss der Flüssiglagerung und der MB/Rotlicht-Behandlung auf die Thrombinbildung bzw. die antikoagulatorische Kapazität therapeutischer Plasmaeinheiten zu untersuchen. Um Veränderungen des Proteoms von Flüssigplasma durch die Lagerungsbedingungen bzw. durch die Pathogenreduktion mit MB/Rotlicht zu untersuchen, wurde des Weiteren eine massenspektrometrische Analyse durchgeführt.

Durch die Validierung von Lagerungsbedingungen für aufgetautes GFP im Rahmen dieser Arbeit wurden seit 2012 Voraussetzungen geschaffen, die erste Flüssigplasmabank in Deutschland an der Universitätsmedizin Greifswald zu etablieren.

2 Material und Methoden

2.1 Probengenerierung – Plasmapherese und Aliquotierung

Für diese Arbeit wurde das Plasma von gesunden Spendern (n = 50) aus dem Spenderpool der Abteilung für Transfusionsmedizin der Universitätsmedizin Greifswald durch Plasmapherese gewonnen. Zuvor wurde die Spendertauglichkeit entsprechend der Hämotherapie-Richtlinien ermittelt sowie die Einwilligung des Spenders zur Nutzung von Blutbestandteilen zu wissenschaftlichen Zwecken eingeholt. Dieses Vorgehen wurde von der zuständigen Ethikkommission der Universitätsmedizin Greifswald zustimmend bewertet.

2.1.1 Plasmapherese

Nach Punktion der Kubitalvene erfolgte die apparative Trennung (*Plasma Collection System 2, Haemonetics, Braintree, Massachusetts*) von Vollblut mittels Zentrifugation in dessen korpuskuläre Elemente und Plasmabestandteile (Plasmapherese). Während die korpuskulären Blutbestandteile, d.h. die Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten wieder zum Spender zurückfließen, wird das mit Natriumcitrat antikoagulierte Blutplasma in die dafür vorgesehenen 750 mL Plasmabeutel (*PCS2, Haemonetics, Braintree, Massachusetts*) aufgenommen. Im Anschluss wurde das gewonnene Blutplasma innerhalb von 6 Stunden nach der Spende unter standardisierten Bedingungen eingefroren (bei -30 °C; Einfrierzeit ≤ 1h; *plasma freezer, HOF, Lohra, Deutschland*) und anschließend bei -30 °C gelagert.

2.1.2 Aliquotierung

Wöchentlich, über einen Zeitraum von insgesamt 13 Wochen, wurden je 4 Plasmen aufgetaut. Der Auftauvorgang des bei -30 °C gelagerten Plasmas erfolgte bei 37 °C über 60 min in einem Auftaugerät (*Plasmatherm, Labortechnik Barkley,*

Leopoldshoehe, Deutschland). Das Gerät taut das Plasma auf, indem sich Plastikpads, zwischen denen jeweils ein Plasmabeutel liegt, mit warmem Wasser füllen. Leichte wellenförmige Bewegungen ermöglichen ein gleichmäßiges Auftauen des Plasmas. Jeder Plasmabeutel wurde nach dem Auftauen in drei biologisch gleiche Portionen (Aliquote) von der Größe einer therapeutischen Einheit aufgeteilt (**Abbildung 1**).

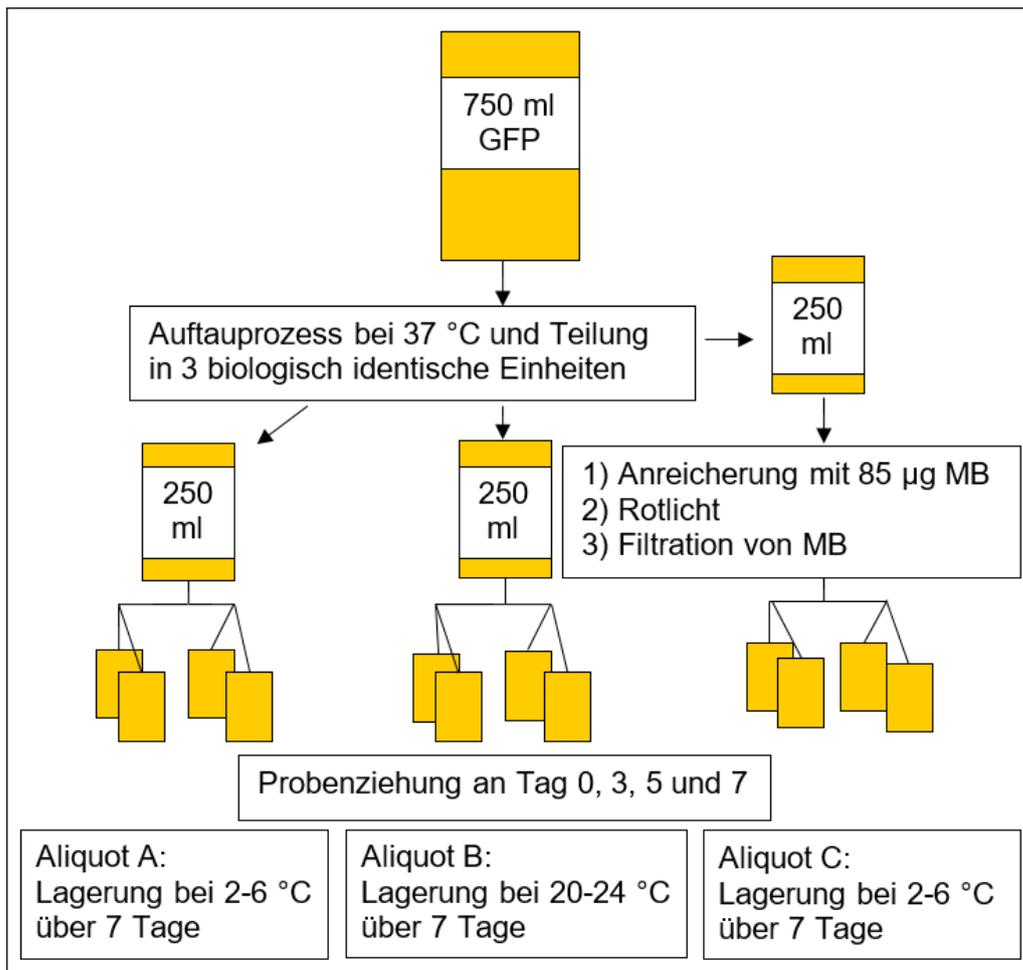


Abbildung 1: Studiendesign. Jeder Plasmabeutel wurde nach dem Auftauen in drei biologisch gleiche Portionen von der Größe einer therapeutischen Einheit aufgeteilt. Anschließend erfolgte die Lagerung bei 2-6 °C über 7 Tage (Aliquot A), die Lagerung bei Raumtemperatur über 7 Tage (Aliquot B) oder die Behandlung mit Methylenblau/Rotlicht und Lagerung bei 2-6 °C über 7 Tage (Aliquot C). Jeweils an Tag 0, 3, 5 und 7 wurden Proben zur weiteren Diagnostik entnommen (siehe Fließtext).

Dazu wurden zunächst zwei 250 mL Compoflex Leerbeutel (*Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland*) nacheinander über Sterildocking (*Terumo TSCD-II, Terumo Corp., Tokyo, Japan*) an den 750 mL Beutel angeschweißt und unter Nutzung einer Waage (*Digi 2000, WEDO, Dieburg, Deutschland*) mit Plasma befüllt. Beutel 1 wurde

in der Kühlzelle bei 2-6 °C (Aliquot A) und Beutel 2 in einem temperaturüberwachten Raum bei 20-24 °C (Aliquot B) gelagert. Beutel 3 (Aliquot C) entstand durch Sterildocking und Umfüllen des Plasmas in das THERAFLEX® MB Beutelsystem (Macopharma®, Mouvaux, Frankreich). Darin durchläuft das Plasma im Gegensatz zu Aliquot A und B einen zusätzlichen Zellfilter (PLASMAFLEX® PLAS 4, Porengröße 0,65 µm) und passiert das im Beutelsystem integrierte 85 µg MB-Trockenkügelchen, welches sich bei Kontakt mit dem Plasma auflöst¹³ (**Abbildung 2**).

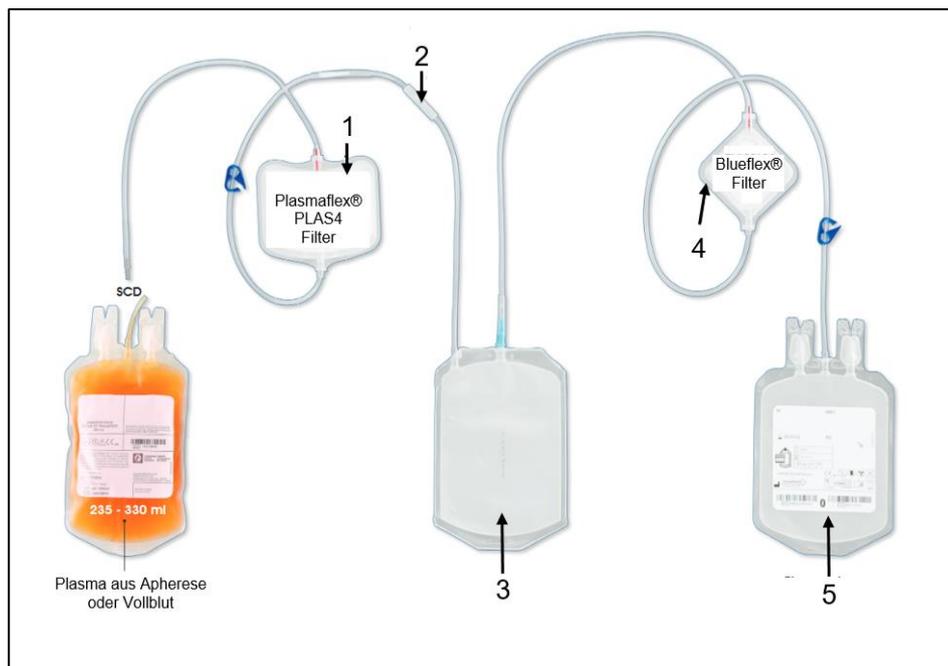


Abbildung 2: THERAFLEX® MB Set (Einmalgebrauch, Macopharma®, Mouvaux, Frankreich) für die Pathogenreduktion mit Methylenblau/Rotlicht (Grafik modifiziert).

Bildquelle: <https://www.macopharma.com/products/blueflex-mb-removal-filter/>

- 1 Leukozytenfiltration mittels Zellfilter PLASMAFLEX® PLAS 4.
- 2 Lösen des Methylenblau-Trockenkügelchens (85µg).
- 3 Illuminationsbeutel, welcher im MACOTRONIC® B2 Illuminator mit Rotlicht (590 nm) behandelt wird
- 4 Depletion von Methylenblau mittels BLUEFLEX® Filter
- 5 Lagerungsbeutel für das MB/Rotlicht behandelte Plasma

Der Hersteller gibt für eine optimale Wirkung des MB ein Plasmavolumen von 235-315 mL an. Bei 266 mL ist eine MB-Konzentration von 1 µM zu erwarten. Anschließend wurde das mit MB angereicherte Plasma im doppelseitigen MACOTRONIC® B2 Illuminator (Macopharma®, Mouvaux, Frankreich) mit einer Wellenlänge von 590 nm ca. 15 min temperaturüberwacht belichtet (**Abbildung 3, S. 19**). Nachfolgend wurde

MB und dessen Derivate durch einen im Beutelsystem integrierten BLUEFLEX® Filter (Macopharma®, Mouvaux, Frankreich) dem Plasma zu etwa 95 % entzogen und gelangte schließlich in den zweiten Beutel des Doppelbeutelsystems¹³. Anschließend wurde das pathogenreduzierte Plasma bei 2-6 °C gelagert. Alle Plasmaeinheiten der Aliquote wurden für jeweils 7 Tage gelagert.



Abbildung 3: MACOTRONIC® B2 Illuminator (Macopharma®, Mouvaux, Frankreich) zur Rotlichtbestrahlung der Plasmen im Rahmen der Pathogenreduktion mit Methyleneblau.
Bildquelle: https://www.macopharma.com/category_products/transfusion/plasma-preparation/

Aus den so entstandenen Aliquoten wurden an Tag 0, 3, 5 und 7 Proben zur Durchführung von Gerinnungstests entnommen. Bei Aliquot C erfolgte an Tag 0 die erste Plasmaprobenentnahme zur Durchführung der Gerinnungstests erst nach der MB/Rotlicht-Behandlung (MB BL/MB baseline). An jedes Aliquot wurde zur Wahrung der Sterilität ein Plasmabeutelset à vier 150 mL Beutel (Macopharma®, Mouvaux, Frankreich) per Sterildocking angeschweißt. Jeder der vier Beutel steht für den entsprechenden Probenziehtag. Am jeweiligen Probenziehtag wurde ein 150 mL Plasmabeutel (Füllvolumen jeweils ca. 40 mL) abgetrennt, aufgeschnitten und durch Umfüllen in zwei 3 mL Vacutainer Glasröhrchen (Becton Dickinson, Belliver Industrial Estate, Plymouth, United Kingdom) und je ein 1,5- bzw. 2 mL Eppendorfgefäß (1,5 mL: Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland; 2 mL: Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) überführt. Die Vacutainer Glasröhrchen wurden dem Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin der Universitätsmedizin Greifswald zur Untersuchung der Gerinnungsfaktoren und Inhibitoren weitergeleitet und innerhalb einer Stunde nach der

Probenziehung mit den jeweiligen Testkits entsprechend den Herstellerangaben untersucht (*BCS-XP Analyzer, Siemens Healthcare Diagnostics, Deutschland*). Die Eppendorfgefäße wurden für die Durchführung der Globaltests der Gerinnung bei -80 °C eingefroren, gelagert und für die Messungen einmal über 10 min in einem Wasserbad bei 37 °C (*GFL, Burgwedel, Deutschland*) aufgetaut.

2.2 Sterilitätsprüfungen

Am Ende der Lagerzeit von 7 Tagen wurden alle Restbeutel (insgesamt 150 Stück) mikrobiologisch untersucht, um die Sterilität zu prüfen und eine Kontamination mit Bakterien und Pilzen auszuschließen. Dazu wurde das Plasma in aerobe und anaerobe Blutkulturflaschen (*Bactec Plus Aerob und Bactec Lytic/10 Anaerob; Bactec, Heidelberg, Deutschland*) aufgenommen und für 7 Tage bei 37 °C inkubiert.

2.3 Gerinnungstests

Um die Funktion der Blutgerinnung beurteilen zu können, wurden Globaltests der Blutgerinnung herangezogen. Zur Detailanalyse wurde die Aktivität der Gerinnungsfaktoren und Inhibitoren bestimmt. Eine Übersicht über die durchgeführten Gerinnungstests gibt **Tabelle 1**.

Tabelle 1: Übersicht der durchgeführten Gerinnungstests

Globaltests	Einzelfaktoren	
Quick-Wert/ INR, aPTT, ProC®-Global, ETP	prokoagulatorisch	antikoagulatorisch
	Fibrinogen, FII, FV, FVII, FVIIa, FVIII, FIX, FX, FIX, FXII, FXIII, vWF-Ag	Protein C und S, Antithrombin
aPTT = aktivierte partielle Thromboplastinzeit ETP = Endogenes Thrombinbildungspotential vWF-Ag = Von-Willebrand-Faktor-Antigen		

2.3.1 Einzelfaktorenanalyse

Für die Messung der Aktivität der Gerinnungsfaktoren und Inhibitoren der Blutgerinnung wurden handelsübliche Tests verwendet. Die Aktivität der Gerinnungsfaktoren (F) II, V, VII, VIII, IX, X, XI, XII und des Inhibitors Protein S wurde unter Verwendung von Mangelplasma koagulometrisch gemessen (*BCS-XP Analyzer, Siemens Healthcare Diagnostics, Eschborn, Deutschland*). Die Aktivität von Faktor XIII sowie der Inhibitoren Antithrombin und Protein C wurde durch Anwendung eines chromogenen Messverfahrens ermittelt. Die Messung von Fibrinogen erfolgte nach der Methode nach Clauss. Von-Willebrand-Faktor-Antigen und D-Dimere wurden immunturbidimetrisch bestimmt.

Darüber hinaus erfolgte nachträglich die Messung der FVIIa-Aktivität mit dem Testkit Staclo[®] VIIa-rTF entsprechend den Herstellerangaben im Thrombostat (*Behnk Elektronik GmbH&Co., Norderstedt, Germany*) anhand einer Stichprobe. Hierbei handelt es sich um einen Prothrombinzeit-basierten Gerinnungstest. Die Stichprobe umfasste 7 von 50 Plasmen des Aliquots A (unbehandeltes, bei 2-6 °C über 7 Tage gelagertes Plasma). Die FVIIa-Aktivität wurde an Tag 0 in Einfachbestimmung und an Tag 7 nach dem Auftauen in Doppelbestimmung gemessen. **Tabelle 2 (S. 22)** fasst die verwendeten Materialien für die Analyse der Aktivität der Gerinnungsfaktoren und Inhibitoren zusammen.

2.3.2 Globaltests der Blutgerinnung

Globaltests untersuchen das Zusammenwirken der pro- und antikoagulatorischen Gerinnungsfaktoren und erlauben Aussagen über bestimmte Abschnitte der Hämostase. Um die Gerinnungskapazität von aufgetautem Therapieplasma zu charakterisieren, wurden in dieser Arbeit die Prothrombinzeit (Quick-Wert/INR), die aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT), das Endogene Thrombinbildungspotential (ETP) sowie der ProC[®]-Global-Test herangezogen. Für die Messung der Globaltests wurden Rückstellproben aus der Lagerungsstudie verwendet, die bis dahin bei -80 °C gelagert wurden. **Tabelle 3 (S. 22)** gibt einen Überblick über die verwendeten Materialien für die Durchführung der Globaltest.

Tabelle 2: Materialien für die Gerinnungsfaktorenanalyse

Testkit	Hersteller
Multifibren® U	Siemens, Marburg, Deutschland
Faktor II-Mangelplasma	Siemens, Marburg, Deutschland
Faktor V-Mangelplasma	Siemens, Marburg, Deutschland
Faktor VII-Mangelplasma	Siemens, Marburg, Deutschland
Faktor X-Mangelplasma	Siemens, Marburg, Deutschland
Faktor VIII-Mangelplasma	Siemens, Marburg, Deutschland
Faktor IX-Mangelplasma	Siemens, Marburg, Deutschland
Faktor XI-Mangelplasma	Siemens, Marburg, Deutschland
Faktor XII-Mangelplasma	Siemens, Marburg, Deutschland
Berichrom® Faktor XIII	Siemens, Marburg, Deutschland
Von-Willebrand-Faktor-Antigen®	Siemens, Marburg, Deutschland
Berichrom® AT III	Siemens, Marburg, Deutschland
Aktiviertes Protein C Reagenz	Siemens, Marburg, Deutschland
Protein S Ac	Siemens, Marburg, Deutschland
Innovance® D-Dimer	Siemens, Marburg, Deutschland
Staclot® VIIa-rTF	Diagnostica Stago, Asnières, Frankreich
Kontrollen	
Kontrollplasma N	Siemens, Marburg, Deutschland
Kontrollplasma P	Siemens, Marburg, Deutschland
Innovance D-Dimer Kontrollen	Siemens, Marburg, Deutschland
Kalibratoren	
D-Dimer-Kalibrator	Siemens, Marburg, Deutschland
Standard-Human-Plasma	Siemens, Marburg, Deutschland
Fibrinogen-Kalibrator-Kit	Siemens, Marburg, Deutschland
Puffer	
Owren´s Veronalpuffer	Siemens, Marburg, Deutschland
Chemikalien	
Calciumchloridlösung 0,025 mol/L	Siemens, Marburg, Deutschland

Tabelle 3: Materialien für die Durchführung der Globaltests

Globaltest	Testkitbestandteile	Hersteller
aPTT	- Dade® Actin® FS Reagenz - Calciumchloridlösung 0,025 mol/L - Kontrollplasma N - Kontrollplasma P	Siemens, Marburg, Deutschland
Quick-Wert/INR	- Dade® Innovin - Calciumchloridlösung 0,025 mol/L - Kontrollplasma N - Kontrollplasma P - PT Multikalibrator	Siemens, Marburg, Deutschland
ETP	- PPP Reagent 5 pM - FluCaKit - Thrombin Kalibrator	Thrombinoscope BV, Maastricht, Niederlande
ProC®-Global	- APTT Reagenz für ProC®-Global - Aktivator Reagenz für ProC®-Global - Puffer für ProC®-Global - Calciumchloridlösung 0,025 mol/L	Siemens, Marburg, Deutschland

Die Messung von Quick-Wert/INR sowie der aPTT sind vertraute Globaltests im klinischen Alltag, um sich zügig ein Bild von der Blutgerinnung des Patienten zu verschaffen. Im Folgenden wird ausführlicher auf die Methoden der neuen Globaltests ETP und ProC®-Global-Test eingegangen.

Endogenes Thrombinbildungspotential (ETP)

Das Endogene Thrombinbildungspotential (ETP) misst die Fähigkeit des Plasmas, Thrombin zu bilden. Es ist ein Gerinnungstest, der aktuell nur für Forschungszwecke verwendet wird. Dabei zeigte sich, dass für Patienten sowohl eine Blutungs- (erniedrigtes ETP) als auch Thromboseneigung (überschießendes ETP) angezeigt werden kann^{39–42}. Aufgrund der im Vergleich zu Quick-Wert und aPTT aufwändigeren und preisintensiveren Messtechnik findet das Thrombingenerierungspotential im klinischen Alltag derzeit keine Anwendung. Das ETP wird genutzt, um therapeutische Plasmapräparate^{21,43} und MB/Rotlicht-behandelte Plasmen zu untersuchen^{44–46}.

Die Messung des ETPs basiert auf einem chromogenen Messverfahren. Durch Zugabe von Calcium, Phospholipiden (PL) und Gewebefaktor („tissue factor“, TF) zu plättchenarmen Plasma wird die Gerinnungskaskade gestartet und Thrombin gebildet. Durch Thrombin reagiert das fluorogene Substrat zum fluoreszierenden Amino-Methyl-Coumadin. Die Fluoreszenz wird mittels Thrombinoskop detektiert und somit sind Rückschlüsse auf die Menge des gebildeten Thrombins über die Zeit möglich. An der Thrombinbildungskurve (**Abbildung 4, S. 24**) lassen sich die in **Tabelle 4 (S. 24)** erläuterten Parameter ablesen. Ab einer Bildung von > 10 nmol Thrombin spricht man vom einsetzenden Thrombinburst. Die Thrombingenerierungsrate entspricht der Steigung der Thrombinbildungskurve und lässt sich mit folgender Formel errechnen.

$$\text{Thrombinbildungsrate} = \frac{\text{peak thrombin}}{(\text{time to peak} - \text{lag time})}$$

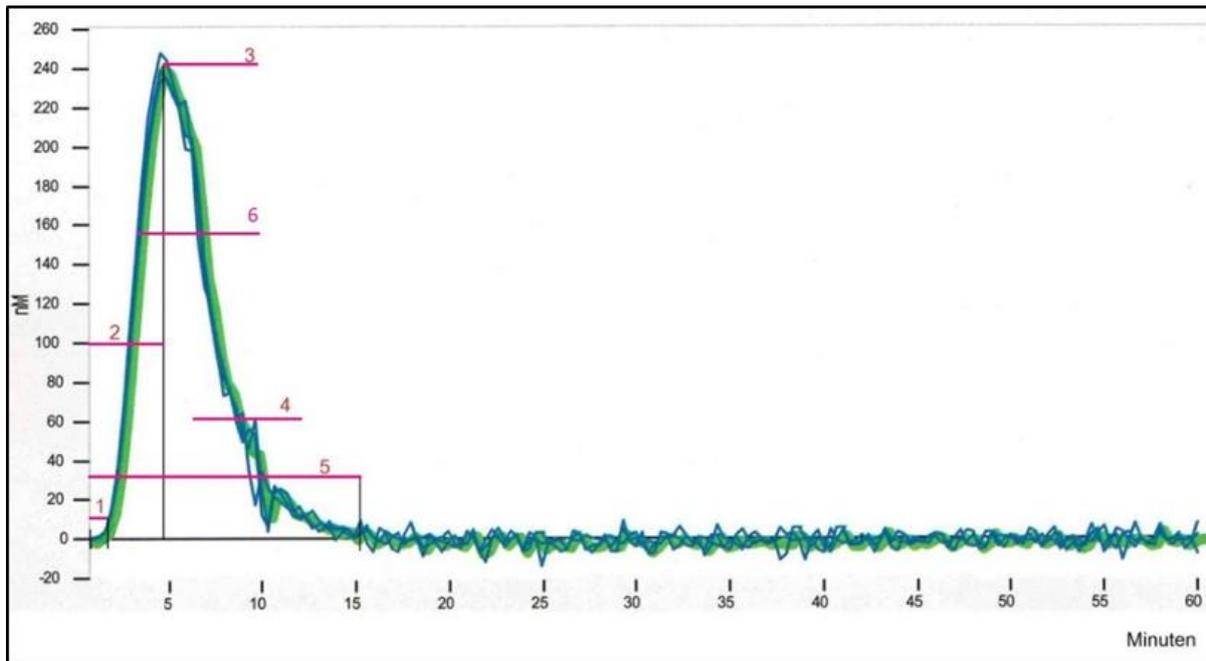


Abbildung 4: Thrombinbildungskurve.

Beispiel einer normalen Thrombinbildungskurve mit Darstellung der Kurvenparameter:

1 lag time [min]; 2 time to peak [min]; 3 peak thrombin [nmol]; 4 area under curve (AUC) [nmol]; 5 start tail [min]; 6 rate of thrombin generation [nmol/min]. Erläuterungen siehe Tabelle 4.

Tabelle 4: Parameter der Thrombinbildungskurve

Parameter	Bedeutung
lag time [min]	Zeit bis zur Bildung von 10 nmol Thrombin
time to peak [min]	Zeit bis zum Erreichen der maximalen Thrombinbildung
peak thrombin [nmol]	Menge des maximal gebildeten Thrombins
area under curve (AUC, Fläche unter der Kurve) [nmol]	Entspricht dem Endogenen Thrombinbildungspotential, d.h. der Menge des gesamten, gebildeten Thrombins;
start tail [min]	Zeit bis zum Erliegen der Thrombinbildung
rate of thrombin generation [nmol/min]	Thrombinbildungsrate (entspricht der Steigung der Thrombinbildungskurve, Berechnungsformel siehe unten)

Für die Messung des ETP wurden „PPP Reagent 5 pM“^{73a}, „FluCaKit“^{73b} bestehend aus „Fluo Buffer“ (Calciumchlorid) und „Fluo Substrate“ (fluorogenes Substrat) sowie „Thrombin Kalibrator“ (*jeweils Thrombinoscope BV, Maastricht, Niederlande*) benötigt und nach Vorgabe der 2010 in der Abteilung für Transfusionsmedizin der Universitätsmedizin Greifswald erstellten **SOP Nr. 8.1, Version 1 (siehe Anhang)** für Calibrated Automated Thrombogram (CAT) angewendet. Durch den Thrombin

Kalibrator (Thrombinoscope BV, Maastricht, Niederlande) wurden methodenbedingte Messartefakte durch Kalibration vermieden. Er korrigierte das Messergebnis um die Aktivität des alpha2-Makroglobulin-Thrombin-Komplexes, den Substratverbrauch über die Zeit sowie den inneren Filter-Effekt. Die Messungen im Thrombinoskop (Exzitation bei 390 nm und Emission bei 460 nm) erfolgten unter Nutzung der zugehörigen Software (*Thrombinoscope BV, Maastricht, Niederlande*).

Vorbereitend wurden 15 mL destilliertes Wasser und der „Fluo Buffer“ im Wasserbad bei 37 °C über 10 min erwärmt. Anschließend wurde das lyophilisierte „PPP Reagent 5 pM“ (beinhaltet 5 pmol Gewebefaktor und 4 µM Phospholipide) sowie der lyophilisierte „Thrombin Kalibrator“ mit der laut Hersteller angegebenen Menge destilliertem Wasser unter vorsichtigem Schwenken aufgelöst. Die Reagenzien waren danach für 4 Stunden stabil. Alle Pipettierschritte wurden invers durchgeführt, um Luftbläschen zu vermeiden. Pro Plasma des jeweiligen Lagerungstages wurden 3 Wells der U-förmigen 96-Well Mikrotiterplatte (*Immulon 2HB, VWR International, Darmstadt, Deutschland*) mit 20 µL „PPP Reagent 5 pM“ befüllt und weitere 3 Wells mit 20 µL „Thrombin Kalibrator“, sodass pro Aliquot/Tag eine Dreifachmessung durchgeführt wurde. Sowohl zum „PPP Reagent 5 pM“ als auch zum „Thrombin Kalibrator“ wurden jeweils 80 µL des plättchenarmen Plasmas gegeben. Anschließend wurde die befüllte Platte im Thrombinoskop (*Fluorskan Ascent, ThermoLab Systems, Helsinki, Finnland*)⁷⁴ für 10 min aufgewärmt und schließlich die Messung gestartet. In dieser Zeit wurden 40 µL „Fluo Substrate“ in das auf 37 °C vorgewärmte Fläschchen „Fluo Buffer“ (Verhältnis 1:40) gegeben und mittels Vortexer gut vermischt. Das so hergestellte Fluo Reagenz ist für eine Stunde stabil. Das Reagenz musste manuell über einen kleinen Ansaugschlauch in das Thrombinoskop gegeben werden. Das Gerät befüllte zum Start der Thrombinbildung die entsprechenden Wells mit dem Fluo Reagenz. Die Thrombinbildung wurde anschließend über 40 min gemessen, woraus sich eine Thrombinbildungskurve mit typischem Verlauf ergab (**Abbildung 4, S. 23**). Die Fluoreszenz-Rohdaten wurden über die verwendete Thrombinoskop-Software in die zum jeweiligen Zeitpunkt gebildete Thrombinmenge (in nmol) umgerechnet.

ProC®-Global-Test

Der ProC®-Global-Test ist ein koagulometrischer Gerinnungstest zur Bestimmung der antikoagulatorischen Kapazität von Protein C und seinem Kofaktor Protein S (Protein C-System) in humanem Plasma. Der Test wird zur Detektion hereditärer (z. B. Faktor Va Leiden) oder erworbener Mangelzustände des Protein C-Systems, die mit einem gesteigerten Thromboserisiko einhergehen, genutzt. Das aktivierte Protein C (APC) und sein Kofaktor Protein S inaktivieren die prokoagulatorischen Faktoren VIIIa und Va und wirken somit einer überschießenden Gerinnungsaktivierung entgegen.

Für den Test wurde zunächst die aPTT gemessen. Anschließend wurde der Plasmaprobe ein Protein C Aktivator entsprechend den Herstellerangaben (*ProC®-Global, Siemens Healthcare Diagnostics*) zugesetzt. Die intrinsische Gerinnungskaskade wurde durch Hinzufügen von Calcium gestartet und erneut die Zeit zur Gerinnung (protein C activity dependent clotting time/PCAT) gemessen. Durch Aktivierung des Protein C-Systems verlängerte sich die Zeit bis zur Gerinnungsbildung. In Plasmen mit einer Funktionsbeeinträchtigung des Protein C-Systems ist die PCAT weniger stark verlängert. Zur besseren Vergleichbarkeit der Ergebnisse verschiedener Laboratorien, wurde die normalisierte Ratio der PCAT (ProC-Global NR) errechnet. Eine Zunahme der ProC-Global NR bedeutet eine gute/gesteigerte Funktion des Protein C-Systems und somit gute/gesteigerte antikoagulatorische Kapazität. Eine Abnahme der ProC-Global NR spricht für eine verringerte Funktion des Protein C-Systems und somit reduzierte antikoagulatorische Kapazität. Der ProC®-Global-Test wurde in dieser Arbeit erstmals genutzt, um therapeutisches Plasma zu untersuchen.

2.4 Vorbereitung der Massenspektrometrie

In dieser Arbeit wird neben den oben aufgeführten Gerinnungstests die Massenspektrometrie genutzt, um therapeutisches Plasma im Rahmen der Etablierung einer Flüssigplasmabank zu validieren.

Ausgangsmaterial zur Untersuchung des Plasmaproteoms waren Plasmaproben (n = 50 je Aliquot) aus der Lagerungsstudie, welches zweifach eingefroren wurden. Das in Eppendorfgefäßen bei -80 °C gelagerte Plasma wurde auf Eis langsam

aufgetaut. Anschließend wurden jeweils die an Tag 0 und 7 gewonnenen Plasmaproben jedes Aliquots (A, B, C) gepoolt (A0, A7, B0, B7, C0, C7). Jeder Pool besteht somit aus Plasma von 50 verschiedenen Spendern. Von jedem Plasmapool wurden jeweils drei technische Replikate hergestellt (z. B. A0-1, A0-2, A0-3), die wie folgt prozessiert wurden:

2.4.1 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinkonzentration der Plasmaproben wurde mittels Bradford-Test (*Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland*) ermittelt. Bei diesem Assay (**SOP siehe Anhang**) kommt es durch Proteinbindung zur Verschiebung des Coomassie-Absorptionsmaximums von 470 nm nach 595 nm. Nach Messung der Absorption der Plasmaprobe bei 595 nm mit dem Photometer Ultraspec 2100pro (*GE Healthcare, München, Deutschland*) konnte anhand einer Kalibrationsreihe mit Rinderserumalbumin (*Sigma Aldrich Chemie GmbH*) die Proteinkonzentration in der Probe abgeleitet werden. Für die sich anschließende Proteindepletion war es wichtig, dass maximal 1600 µg Protein in der Probe enthalten ist.

2.4.2 Proteindepletion

Die Entfernung/Depletion hochabundanter, d.h. zahlreich im Plasma vorkommender Proteine soll der besseren Detektion und Identifikation niedrigabundanter Proteinfractionen in der später durchgeführten Massenspektrometrie dienen. In der vorliegenden Arbeit wurden die 6 größten Proteinfractionen Albumin, Immunglobuline G (IgG) und A (IgA), Transferrin, Haptoglobin und Antitrypsin an der MARS-6 Säule (*4,6 x 50 mm Säule, Multiple Affinity Removal System Human 6, Agilent, Santa Clara, CA, USA, **Abbildung 5, S. 28***) über immobilisierte Antikörper gebunden³⁷. Sie machen etwa 85-90 % der gesamten Proteinmasse aus. Niedrigabundante Proteinfractionen, wozu auch die Gerinnungsfaktoren zählen, passieren die Säule und werden in der Durchflussfraktion angereichert.

Für diesen Vorgang wurden 25 µL der zu untersuchenden Probe mit 75 µL Agilent Puffer A (Santa Clara, CA, USA) vermischt und über 4 min bei 4 °C und 12000 rpm durch einen 0,22 µm Spin Filter zentrifugiert (Heraeus Fresco 17, Thermo Fisher Scientific Inc., USA), um die Probe vor Beladen der Säule von Partikeln zu befreien. Von dem 100 µL Gemisch wurden lediglich 80 µL (d.h. 20 µL Plasma) vom ProteomeLab PF2D System (Beckman Coulter, Kent, Ohio, USA, **Abbildung der Hardware siehe Anhang S. 81**) aufgenommen. Puffer A dient dem Beladen, Waschen und Äquilibrieren der MARS-6 Säule. Zudem wirken die darin enthaltenen Proteaseinhibitoren dem Proteinabbau entgegen. Im ProteomeLab PF2D System erfolgte die Proteinauflösung chromatographisch bei einer Extinktion von 280 nm (**Abbildung eines typischen Chromatogramms siehe Anhang S. 82**). Zunächst wurde so die Durchflussfraktion detektiert und in zwei 1,5 ml Eppendorfgefäßen aufgefangen. Zur Elution der gebundenen hochabundanten Proteine wurde die MARS-6 Säule anschließend mit Agilent Puffer B (Santa Clara, CA, USA) gespült. Die Elutionsfraktion wurde in einem 2 mL Eppendorfgefäß aufgefangen. Anschließend wurden die Proben bei -80 °C eingefroren.

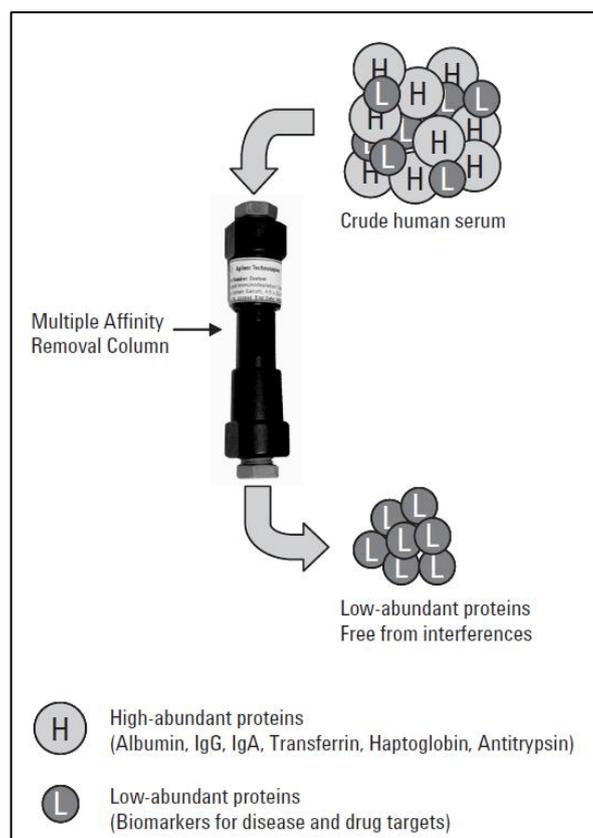


Abbildung 5: Funktionsprinzip der MARS-6 Säule (Multiple Affinity Removal System Human 6)

Bildquelle: <https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/5990-7232.pdf>

2.4.3 TCA-Fällung

Ausschließlich die depletierten Proben (Durchflussfraktion) wurden nach erneutem Auftauen für bessere Ergebnisse in der Massenspektrometrie durch Präzipitation mit Trichloressigsäure (TCA) konzentriert (**SOP siehe Anhang**). Zur TCA-Fällung wurden 85 µL 100 % TCA (*Carl Roth GmbH&Co.KG, Karlsruhe*) zu 500 µL depletiertem Plasma gegeben, durch vortexen vermischt und anschließend für 60 min bei 4 °C inkubiert. Danach erfolgte die Zentrifugation über 30 min bei 13000 rpm und bei 4 °C (*Heraeus Fresco 17, Thermo Fisher Scientific Inc., USA*). Nun wurde das Produkt mit 500 µL 100%igem kalten Aceton gewaschen, durch vortexen vermischt und erneut 10 min bei 13000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Anschließend erfolgte die Trocknung über 10 min in der Speedvac (*Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland*). Das verbleibende Konzentrat wurde mit 100 µL UT-Puffer auf dem Schüttler (*Thermomixer, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland*) bei 1400 rpm über 20 °C bei 20 min resuspendiert, dann für weitere 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert und der Überstand schließlich in ein neues Eppendorfgefäß gegeben. Anschließend erfolgte die Proteinbestimmung nach Bradford.

2.4.4 Proteinverdau

Um die Proteine in der Massenspektrometrie identifizieren zu können, müssen sie in einzelne Peptide aufgespalten werden (**SOP siehe Anhang**). Dazu wurde zu 4 µg Protein in der jeweiligen depletierten Plasmaprobe 20 mM Ammoniumbicarbonat (ABC) zu einer Gesamtmenge von 18 µL aufgefüllt und mit 2 µL Dithiothreitol (DTT) versetzt (Endkonzentration 2,5 mM DTT, **Tabelle 5, S. 30**). Anschließend wurde das Gemisch während einer Inkubationszeit von 60 min im Thermomixer (*Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland*) reduziert. Nachfolgend wurde die jeweilige Probe durch Hinzugabe von 16 µL 20 mM ABC und 4 µL 100 mM Iodacetamid (IAA, Endkonzentration 10 mM IAA, **Tabelle 5, S. 30**) während einer Inkubationszeit von 30 min bei 37 °C alkyliert. Dadurch wurden die Disulfidbrücken der Proteine getrennt und eine optimale Entfaltung erreicht. Die entfaltenen Proteine wurden nun durch Hinzugabe von 160 ng der Serinprotease Trypsin in einem Verhältnis von 1:25 über

Nacht bei 37 °C enzymatisch in Fragmente mit charakteristischer Masse (Peptide) gespalten. Am Folgetag wurde der Verdau durch Hinzugabe von 5%iger Essigsäure (Endkonzentration 1 %) beendet.

Tabelle 5: Materialien für das Reduzieren und Alkylieren von Proben vor Flüssigverdau

Menge/ Chemikalie	Endkonzentration	Hersteller
30 mg 25 mM DTT 25 + 8 mL 20 mM ABC	2,5 mM DTT	GE Healthcare, München
18 mg 100 mM Iodacetamid + 1 mL 20 mM ABC	10 mM IAA	GE Healthcare, München

2.4.5 Reinigung der Peptidextrakte über C18-Material

Die mit Trypsin verdauten Proben wurden anschließend an C18-reversed phase Material (*ZipTip μ -18 Millipore Corporation, Billerica, MA*) aufgereinigt (**SOP siehe Anhang**). Die C18-Matrix ist ein hydrophobes Granulat und bindet die Peptide der jeweiligen Probe. Vorbereitend wurde die C18-Matrix in absteigender Acetonitrilkonzentration (ACN) in 1%iger Essigsäure äquilibriert. In die äquilibrierten Zip-Tip-Spitzen, welche maximal 2 μ g Protein binden können, wurden 10 μ L der zu untersuchenden Probe aufgenommen und die darin enthaltenen Peptide durch 15fache Aspiration und Dispension an der C18-Matrix gebunden. Durch Aufnahme 1%iger Essigsäure wurden die gebundenen Peptide von Lösungsmitteln und Salzen befreit. Zuletzt wurden die auf der C18-Matrix gebundenen Peptide eluiert und in das für die Massenspektrometrie vorgesehene Microvial überführt. Die Entfernung von ACN erfolgte durch Zentrifugation in der Speedvac bis zur Reduktion auf ein Restvolumen von circa 2 μ L. Anschließend wurden die Proben durch Zugabe von 18 μ L Puffer A (**Zusammensetzung Puffer A siehe Tabelle 6**) resuspendiert.

Tabelle 6: Herstellung von Puffer A (für 100 mL) zur Resuspension nach Reinigung der Peptidextrakte über C18-Material.

Substanz	Menge	Endkonzentration	Hersteller
Essigsäure 5 %	2 mL	0,1 %	Carl Roth GmbH&Co.KG, Karlsruhe
Acetonitril 100 %	2 mL	2 %	Avantor Performance Materials B.V., Niederlande
Aqua dest.	96 mL	-	Braun, Melsungen, Deutschland

2.5 Durchführung der Massenspektrometrie (LC-ESI MS/MS)

Zusammenfassend erfolgte vor Durchführung der Massenspektrometrie die Proteindepletion an der MARS-6 Säule, die TCA-Fällung, der Proteinverdau und die Reinigung der Peptidextrakte über C18- Material der jeweils depletierten Triplikate der insgesamt sechs Plasmapools (A0, A7, B0, B7, C0, C7), sodass sich insgesamt 18 Messungen ergeben.

Die massenspektrometrischen Messungen zur peptidbasierten Proteinidentifikation erfolgten durch die Mitarbeiter des Institutes für funktionelle Genomforschung (Direktor: Prof. Dr. rer. nat. U. Völker) der Universitätsmedizin Greifswald. Die in den flüssigverdauten, aufgereinigten Proben enthaltenen Peptide wurden mit Hilfe einer Kombination aus Flüssigchromatographie (*EASY-nLC 1000, Thermo Scientific*) und zwei in Reihe geschalteten Massenspektrometern (*Linear Trap Quadrupole Orbitrap Velos 4, Thermo Scientific*), kurz LC-ESI MS/MS, während eines Gradienten von 85 min aufgezeichnet und identifiziert. Dabei wurden die Peptide nach ihrer Hydrophobizität eluiert. Die Schnittstelle zwischen Chromatographie und Massenspektrometrie bildete ein Ionisierungsverfahren, die Elektrospray-Ionisation (ESI). Die ionisierten Peptide wurden hierbei in Abhängigkeit von Molekulargewicht und Ladung im variablen elektromagnetischen Feld der Quadrupol-Massenspektrometer abgelenkt und konnten so identifiziert und/oder quantifiziert werden. Durch die Verwendung zweier Massenspektrometer wurde die Genauigkeit der Identifikation gesteigert. Letztlich wurde jeder Punkt (Spot) eines Chromatogramms einem Massenspektrum zugeordnet. Eine Zu- bzw. Abnahme der Intensität eines Punktes bedeutet eine Zu- bzw. Abnahme der Proteinabundanz. Die Proteinabundanz ist die Proteinmenge in Relation zum übrigen Proteom der Probe. Die entstehende große Datenmenge wurde mit einer speziellen Software (*Proteome Discover Version 2.2, Thermo Scientific*) verarbeitet. Die Interpretation der Massenspektren erfolgte unter Zuhilfenahme der Datenbanken UniProt/ Swiss Prot mit den Suchmaschinen Mascot und Sequest auf humane Sequenzen.

Durch eine inkomplette Proteolyse oder vorbereitende chemische Schritte kann die Peptididentifikation erschwert werden, sodass falsche Rückschlüsse auf die Proteinquantität und -qualität resultieren. Daher werden mehrere Bedingungen definiert, um den Fehler möglichst gering zu halten. So wurden zum Beispiel pro Peptid

maximal 2 Fehlsplattungen im Rahmen der Proteolyse toleriert und die Oxidation von Methionin, die Acetylierung des N-Terminus sowie die Carbamidomethylierung von Cystein bei der Erkennung von Peptiden beachtet. Des Weiteren wurde als Gütekriterium der Peptididentifikation eine Falscherkennungsrate (FDR) $< 0,01$ berücksichtigt. Die massenspektrometrisch gewonnenen Daten wurden in Vulkan-Plots aufgearbeitet. Hierbei handelt es sich um Streudiagramme, mit denen Änderungen in großen Datensätzen aus Replikatdaten, schnell identifiziert werden können. So können signifikante Unterschiede des Proteoms von gefrorenem Frischplasma, welches verschiedenen Lagerungs- und Behandlungsbedingungen ausgesetzt wurde, gut sichtbar gemacht werden. An der y-Achse ist der negative Logarithmus zur Basis 10 des p-Wertes abzulesen. Dieser wurde durch Vergleich der gemessenen Proteinabundanzen zwischen zwei Plasmapools mittels t-Test ermittelt. Hierbei gilt ein p-Wert $< 0,05$ als signifikant (entspricht $> 1,3 -\log_{10}$ p-value, Bereich oberhalb der roten Linie). Datenpunkte mit niedrigen p-Werten, d.h. es liegt eine hochsignifikante Veränderung vor, erscheinen daher im oberen Bereich der Grafik. Auf der x-Achse wird der Logarithmus der „fold-change“ abgebildet. „Fold-change“ ist eine Messgröße, die das Ausmaß einer Veränderung zwischen zwei Bedingungen beschreibt. Sie ist definiert als eine Ratio zwischen zwei Quantitäten. In der vorliegenden Arbeit ist es die Ratio der Proteinabundanz des Proteins X zweier gegenübergestellter Plasmapools (z.B. vor der Pathogenreduktion mit MB/Rotlicht (Pool C0) und nach der Pathogenreduktion mit MB/Rotlicht und Lagerung für 7 Tage bei 4 °C (Pool C7). Nimmt z. B. die Proteinabundanz von Protein X von 100 (Pool C0) auf 50 (Pool C7) ab, beträgt die „fold-change“ 0,5 („twofold decrease“/Halbierung). Nimmt sie hingegen von 50 (Pool C0) auf 100 (Pool C7) zu, ist die „fold-change“ 2 („twofold increase“/Verdopplung). Der Logarithmus der „fold-change“ wurde in zwei Richtungen mit gleichem Abstand zum Achsmittelpunkt aufgetragen. Datenpunkte/Proteine mit einer geringen Änderung ihrer Abundanz wurden grau dargestellt. Dies sind Proteine, deren Abundanz sich im Vergleich von zwei Behandlungs-/Lagerungsbedingungen weder halbiert ($\text{fold-change} > 0,5 = -1 \log_2$) noch verdoppelt hat ($\text{fold-change} < 2 = 1 \log_2$). Von Interesse sind demnach vor allem Datenpunkte, die im oberen Diagrammbereich weit rechts (signifikante Zunahme der Abundanz, rechter oberer Quadrant) oder links (signifikante Abnahme der Abundanz, linker oberer Quadrant) liegen.

2.6 Gelbasierte Elektrophorese

Unabhängig von der durchgeführten Proteomanalyse mittels Massenspektrometrie erfolgte eine gelbasierte Elektrophorese, um den Effekt der Proteindepletion mittels der MARS-6 Säule zu demonstrieren. Für die eindimensionale (1D) Gelelektrophorese wurde jeweils eine zweifach gefrorene und wieder aufgetaute Plasmaprobe von Aliquot A0 und C0 depletiert. Nach entsprechender Aufbereitung wurden die Durchflussfraktionen (A0-D, C0-D) und Elutionsfraktionen (A0-EF, C0-EF) der Aliquote gegen die undepletierte Kontrolle A0 aufgetragen.

Für die zweidimensionale (2D) Gelelektrophorese wurde eine zweifach gefrorene und wieder aufgetaute Plasmaprobe von Aliquot A0 und dessen Durchflussfraktion (A0-D) verwendet. Nach dem Einsatz der MARS-6 Säule erfolgte die Ermittlung der Proteinkonzentration der undepletierten Probe (A0) sowie ihrer Durchflussfraktion (A0-D) mittels Bradford-Methode (**siehe S. 27**). Anschließend erfolgte die Proteinfällung mit Trichloressigsäure (**siehe S. 29**). Die weiteren Prozessierungsschritte werden nachfolgend erläutert. Am Ende wurden A0 und A0-D jeweils auf ein Gel aufgetragen.

2.6.1 Rehydratisierung

36 µg Protein des depletierten und undepletierten Plasmas wurden in 20 µL 10 x Rehydratisierungslösung (**Zusammensetzung von RH siehe Tabelle 7, S. 34**) aufgenommen, auf 200 µL mit 1 x UT (**Pufferlösung, Zusammensetzung siehe Tabelle 8, S. 34**) aufgefüllt und mit Bromphenolblau angefärbt. Durch Urea und Thiourea kommt es zur Denaturierung der Proteine, 3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propansulfonat (CHAPS) verhindert deren Aggregation, Dithiothreitol (DTT) spaltet Disulfidbrücken und hält die Proteine in reduzierter Form. Das Proteingemisch wurde für 30 min bei 20 °C und 1400 rpm auf dem Thermomixer comfort (*Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland*) inkubiert und anschließend bei 13000 U (*Heraeus Fresco 17, Thermo Fischer Scientific Inc.; USA*) über 10 min abzentrifugiert. Nachfolgend wurde die Suspension auf ein 11 cm Gradientengel mit

immobilisiertem pH-Wert (IPG-Streifen, pH 4-7, 11 cm) entsprechend den Herstellerangaben übertragen (*GE Healthcare, München*). Zur Verhinderung der Austrocknung der IPG-Streifen wurden diese mit Dry Strip Cover Fluid (*GE Healthcare, München*) überschichtet. Die Streifen wurden für 18-24 Stunden rehydratisiert.

Tabelle 7: Zusammensetzung 10 x RH (= Rehydratisierungslösung)

Substanz	Menge	Endkonzentration	Hersteller
CHAPS	80 mg	2 %	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München
Pharmalyte 3-10	52,5 µL	-	GE Healthcare, München
DTT	17,5 mg	-	GE Healthcare, München
1 x UT	ad 400 µL	-	siehe Tabelle 8

Tabelle 8: Zusammensetzung 1 x UT (= Pufferlösung)

Substanz	Menge	Endkonzentration	Hersteller
Urea	1,92 g	8 M	Merck KGaA, Darmstadt
Thiourea	0,61 g	2 M	Merck KGaA, Darmstadt
Aqua dest.	ad 400 µL	-	Braun, Melsungen, Deutschland

2.6.2 Isoelektrische Fokussierung (IEF)

Nach der Rehydratisierung wurden die IPG-Streifen in die Mulden der IEF-Apparatur (*Multiphor II, GE Healthcare, München*) positioniert. Durch Anlage einer elektrischen Spannung erfolgte die Auftrennung der Proteine entlang eines pH-Gradienten nach ihrem isoelektrischen Punkt (1. Dimension). Die isoelektrische Fokussierung erfolgte entsprechend der in **Tabelle 9** aufgeführten Parameter.

Tabelle 9: 3-Stufen Programm der isoelektrische Fokussierung.

(Isoelektrische Fokussierung von 11 cm IPG-Streifen eines pH-Bereiches von 4-7.)

Stufe	Spannung	Stromstärke	Leistung	Spannungsstunden	Zeit
1	300 V	2 mA	5 W	1 Vh	0:01 h
2	3500 V	2 mA	5 W	2900 Vh	1:30 h
3	3500 V	2 mA	5 W	12100 Vh	3:30 h
Total				15000 Vh	5:00 h

2.6.3 Polyacrylamidgelelektrophorese

Durch die Polyacrylamidgelelektrophorese erfolgte die Auftrennung der Proteine nach ihrer Molekülgröße (2. Dimension). Dies geschah in zwei Äquilibrierungsschritten, wobei die IPG-Streifen nacheinander mit Puffer A und Puffer B (**Zusammensetzung siehe Tabelle 10**) für jeweils 15 min auf dem Gelschüttler (*GFL 3005, Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland*) inkubiert wurden. Durch das in Puffer A enthaltene Natriumdodecylsulfat (SDS) wurden die Proteine denaturiert, durch Harnstoff, Glycerol und DTT reduziert und durch Trishydroxymethylaminomethan (Tris) der pH für die Elektrophorese im optimalen Bereich gehalten. Durch das in Puffer B enthaltene Iodacetamid (IAA) wurden die frei werdenden SH-Gruppen alkyliert. Anschließend wurden die Proteinproben in 12,5%igen Trenngelen in der Protean R plus Dodeca TM Cell (*Bio Rad Laboratories GmbH*) bei 20 mA pro Gel und 20 °C aufgetrennt.

Für 6 Trenngele (**Zusammensetzung siehe Tabelle 11, S. 36**) wurde Acrylamid, Tris und SDS in Aqua dest. verdünnt. Nach Zugabe von Ammoniumpersulfat (APS) und Tetramethylethylendiamin (TEMED) wurde die Lösung gut gemischt, in die Glasplatten gefüllt und für 1 h auspolymerisiert. Bis zum Gebrauch wurden die Gele kühl gelagert (4 °C). Die Zusammensetzung des dafür notwendigen Lauf- und Trennpuffers wird in **Tabelle 12 und 13 (S. 36)** aufgeführt.

Tabelle 10: Zusammensetzung Puffer A und B. Puffer A dient der Reduktion der Proteine und Puffer B der Alkylierung der freiwerdenden SH-Gruppen (SDS-Äquilibrierung für 4 IPG-Streifen).

Substanz	Menge	Endkonzentration	Hersteller
Harnstoff	7,2 g	6 M	Merck KGaA, Darmstadt
1,5 M Tris pH 8,8	5 mL	375 mM	Merck KGaA, Darmstadt
Glycerol (87 %)	4,6 mL	20 %	Carl Roth GmbH&Co.KG, Karlsruhe
SDS (20 %)	4 mL	4 %	Carl Roth GmbH&Co.KG, Karlsruhe
Aqua dest.	ad 20 mL	-	Braun, Melsungen, Deutschland
Puffer A = 10 mL Lösung + 100 mg DTT (GE Healthcare, München)			
Puffer B = 10 mL Lösung + 250 mg IAA (GE Healthcare, München)			

Tabelle 11: Zusammensetzung der Trenngele (Für 6 Gele)

Substanz	Menge	Endkonzentration	Hersteller
Acrylamid (40 %)	158,8 mL	12,5 %	AppliChem, Darmstadt
Trenngelpuffer	127 mL	375 mM	Merck KGaA, Darmstadt
APS (10 %)	2,5 mL	0,05 %	GE Healthcare, München
TEMED	0,125 mL	0,025 %	GE Healthcare, München
Aqua dest.	219,5 mL	-	Braun, Melsungen, Deutschland

Tabelle 12: Zusammensetzung des Trennpuffers (Für 2 L)

Substanz	Menge	Endkonzentration	Hersteller
Tris HCl pH 8,8	364 g	1,5 M	Merck KGaA, Darmstadt
SDS (20 %)	40 mL	0,4 %	Carl Roth GmbH&Co.KG, Karlsruhe
Aqua dest.	ad 2 L	-	Braun, Melsungen, Deutschland

Tabelle 13: Zusammensetzung des Laufpuffers (Für SDS-Page; 1 L).

Substanz	Menge	Endkonzentration	Hersteller
Tris	3 g	25 mM	Merck KGaA, Darmstadt
Glycin	14,4 g	200 mM	Carl Roth GmbH&Co.KG, Karlsruhe
SDS (20 %)	5 mL	0,1 %	Carl Roth GmbH&Co.KG, Karlsruhe
Aqua dest.	ad 100 mL	-	Braun, Melsungen, Deutschland

2.6.4 Visualisierung der Proteinspots mit Silbernitrat

Die Fixierung der Proteinspots in den Gelen erfolgte durch eine 30-minütige Inkubation der Gele in 50%igem Methanol und 12%iger Essigsäure. Anschließend wurden sie 2 x 20 min in 50%igem Ethanol gewaschen, dann 1 min in 0,02%igem Natriumthiosulfat-Pentahydrat sensitiviert und schließlich 3 x 20 sek mit Aqua dest. abgespült (**dafür notwendige Materialien siehe Tabelle 14, S. 37**). Nach dieser Vorbereitung erfolgte die Färbung mit Silbernitrat, einer sehr sensitiven Methode, um bereits kleinste Mengen an Protein sichtbar zu machen. Hierfür wurden die Gele 20 min in der Färbelösung (**Zusammensetzung siehe Tabelle 15, S. 37**) inkubiert. Nach erneutem Waschen mit Aqua dest. für 2 x 20 sek wurden die Gele für 3 min in die Entwicklerlösung getaucht (**Zusammensetzung siehe Tabelle 16, S. 37**), wodurch die Proteinspots sichtbar wurden. Durch das anschließende Waschen über 20 sek mit 1%igem Glycin (*Carl Roth GmbH&Co.KG, Karlsruhe*), gefolgt von der 10-minütigen

Inkubation in 1%igem Glycin wurde die Reaktion beendet. Zuletzt wurden die Gele 30 min in Aqua dest. gewaschen und abschließend eingescannt (*Silver Fast Epson, Meerbusch*) und eingeschweift.

Tabelle 14: Materialien für Fixierung, Waschen und Sensitivierung im Rahmen der Visualisierung der Proteinspots mit Silbernitrat.

Substanz	Endkonzentration	Hersteller
Methanol 50 %	50 %	Merck, KGaA, Darmstadt
Essigsäure 12 %	12 %	Carl Roth GmbH&Co.KG, Karlsruhe
Formaldehyd 37 %	0,05 %	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München
Ethanol 50 %	50 %	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumthiosulfat-Pentahydrat	0,02 %	Merck KGaA, Darmstadt
Aqua dest.	-	Braun, Melsungen, Deutschland

Tabelle 15: Zusammensetzung der Färbelösung (für 1 L) zur Visualisierung der Proteinspots mit Silbernitrat.

Substanz	Menge	Endkonzentration	Hersteller
Silbernitrat	2 g	0,2 %	AppliChem, Darmstadt
Formaldehyd 37 %	0,75 mL	0,08 %	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München
Aqua dest.	1000 mL	-	Braun, Melsungen, Deutschland

Tabelle 16: Zusammensetzung der Entwicklerlösung (für 1L)

Substanz	Menge	Endkonzentration	Hersteller
Natriumthiosulfat-Pentahydrat	4 mg	-	Merck, KGaA, Darmstadt
Natriumcarbonat	60 g	-	Merck KGaA, Darmstadt
Formaldehyd 37 %	0,5 mL	0,05 %	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München
Aqua dest.	ad 1 L	-	Braun, Melsungen, Deutschland

2.7 Statistische Analyse

Die erhobenen Gerinnungsmesswerte umfassen die Aktivität der Gerinnungsfaktoren und Inhibitoren sowie der Globaltests der Blutgerinnung. Da die erhobenen Daten nicht normalverteilt sind, werden die Resultate als Median angegeben. Die Signifikanz der Veränderung der Gerinnungsmesswerte über die Zeit wurde mittels nichtparametrischer Tests berechnet. Der Wilcoxon-Rangsummentest für zwei

unabhängige Stichproben wurde angewandt, um einerseits den Einfluss der Lagerungstemperatur (z. B. A7 vs. B7) und andererseits der Pathogenreduktion mit MB/Rotlicht (z. B. A0 vs. C0; A7 vs. C7) herauszuarbeiten. Der Wilcoxon-Vorzeichen-Rangtest für zwei gepaarte Stichproben wurde angewandt, um Veränderungen der Gerinnungsmesswerte eines Aliquots über die Lagerungsdauer zu zeigen (z.B. A0 vs. A7). Statistische Signifikanz besteht für p-Werte $< 0,05$. Um breit für Hypothesen aufgestellt zu sein, wird auf multiples Testen mittels der Bonferroni-Methode verzichtet. Stattdessen werden die Veränderungen der erhobenen Gerinnungsmesswerte zur besseren Einschätzung ihrer klinischen Relevanz in „starke“, „schwache“ und „keine relevanten Veränderungen“ klassifiziert: Als „starke Veränderung“ wird ein Median der jeweiligen Aktivität eines Gerinnungsfaktors oder Inhibitors der Blutgerinnung bzw. des Globaltests außerhalb des Referenzbereiches definiert. Als „schwache Veränderung“ wird ein Median definiert, der um mehr als 10 % (Absolutwert) vom Ausgangswert ansteigt oder abfällt, jedoch insgesamt innerhalb des Referenzbereiches bleibt. Als „keine Veränderung“ wird ein Median definiert, der weniger als 10 % (Absolutwert) vom Ausgangswert ansteigt oder abfällt.

3 Ergebnisse

Ein Teil der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit ist in folgenden wissenschaftlichen Arbeiten (**Vollversionen siehe Anhang**) enthalten:

1) Thiele T, **Kellner S**, Hron G, Wasner C, Nauck M, Zimmermann K, Wessel A, Warkentin TE, Greinacher A, Selleng K. Storage of thawed plasma for a liquid plasma bank: impact of temperature and methylene blue pathogen inactivation. *Transfusion* 2012; 52: 529–536.

2) Thiele T, Hron G, **Kellner S**, Wasner C, Westphal A, Warkentin TE, Greinacher A, Selleng K. Thrombin generation, ProC®-Global, prothrombin time and activated partial thromboplastin time in thawed plasma stored for seven days and after methylene blue/light pathogen inactivation. *Blood Transfusion = Transfusione del sangue* 2016; 14: 66–72.

Fünzig Plasmapheresep拉斯men verschiedener Blutgruppen (Blutgruppe A, n = 15; Blutgruppe B, n = 10; Blutgruppe 0, n = 24; Blutgruppe AB, n = 1) wurden im Mittel nach 256 Tagen (14-408 Tage) Lagerung bei -30 °C aufgetaut. Das mittlere Volumen der Plasmaprodukte betrug 741 mL (455¹-845 mL). Das Volumen der Aliquote betrug bei Aliquot A (n = 50) 219 ± 27 mL, bei Aliquot B (n = 50) 218 ± 26 mL und bei Aliquot C (n = 50) 210 ± 10 mL.

Die Resultate der Analyse der Gerinnungsfaktoren und Inhibitoren wurden in „starke“, „schwache“ und „keine relevanten Veränderungen“ klassifiziert (**Definition siehe 2.7, S. 37**). Eine Übersicht über die Höhe und den Verlauf der Aktivität aller untersuchten Gerinnungsfaktoren und Inhibitoren sowie der Globaltests der Blutgerinnung unter den verschiedenen Behandlungs- und Lagerbedingungen über die Zeit geben die **im Anhang aufgeführten Boxplots**. Im folgenden Fließtext wird lediglich gezielt auf besonders wichtige Medianwerte eingegangen.

¹ Bei einem der 50 Plasmen konnte aufgrund eines Gesamtvolumens von weniger als 600 mL nur die Einzelfaktorenanalyse und die Messung der Parameter des Thrombinbildungspotentials durchgeführt werden.

3.1 Einfluss der Lagertemperatur auf die Gerinnungsfaktorkapazität von aufgetautem Therapieplasma

Die Lagertemperatur wirkt sich auf die Aktivitäten der Gerinnungsfaktoren und Inhibitoren unterschiedlich stark aus. **Tabelle 17** gibt einen Überblick über die Veränderung der Aktivität der untersuchten pro- und antikoagulatorisch wirksamen Gerinnungsfaktoren im Sinne von starken, schwachen und keinen Veränderungen nach 7-tägiger Lagerung jeweils bei 2-6 °C und 20-24 °C von unbehandeltem GFP.

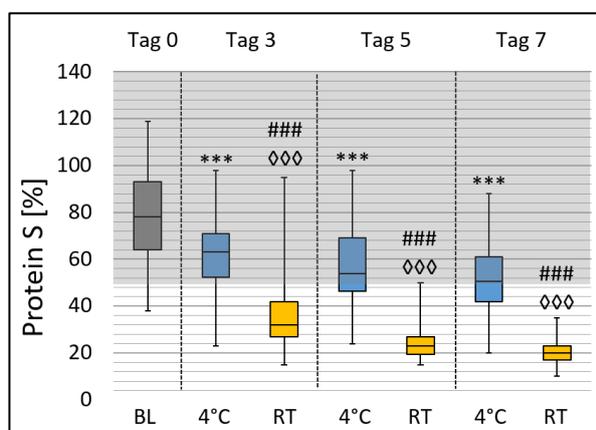
Tabelle 17: Einfluss der Lagertemperatur (2-6 °C und 20-24 °C) auf die Aktivität der Gerinnungsfaktoren und Inhibitoren von aufgetautem GFP nach 7 Tagen Lagerung.

	Starke Veränderungen	Schwache Veränderungen	Keine Veränderung
2-6 °C	FVIII	Protein S, FV, FVII, VWF-Ag	Fibrinogen, FII, FIX, FX, FXI, FXII, FXIII, Protein C, AT
20-24 °C	Protein S, FVIII, FVII	FV, FIX, FX, FXII	Fibrinogen, FII, FXI, FXIII, Protein C, AT, VWF-Ag
Die mediane Aktivität des Gerinnungsfaktors bzw. Inhibitors zeigt nach 7 Lagerungstagen eine: 1) starke Veränderung, d.h. liegt außerhalb des Referenzbereiches. 2) schwache Veränderung, d.h. der Median ist um mehr als 10 % vom Ausgangswert angestiegen oder abgefallen, liegt jedoch innerhalb des Referenzbereiches. 3) nicht relevante/keine Veränderung, d.h. der Median ist um weniger als 10 % vom Ausgangswert angestiegen oder abgefallen 4) Aktivitätszunahme (Fettdruck).			

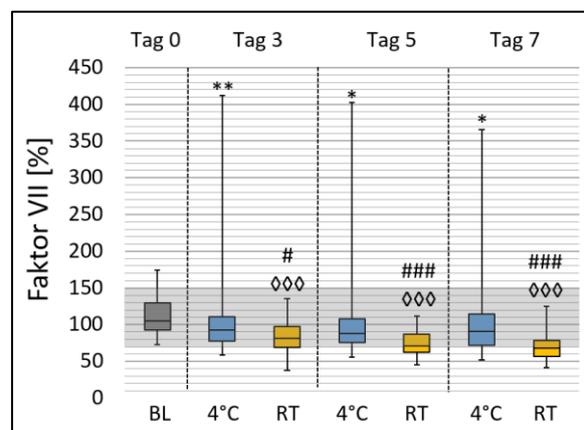
Vergleicht man nach 7 Lagerungstagen die Aktivität der Gerinnungsfaktoren und Inhibitoren, ist die Aktivität von Protein S (51 vs. 20 %, $p < 0,0001$), FII (104 vs. 96 %, $p = 0,0220$), FV (91 vs. 71 %, $p < 0,0001$), FVII (91 vs. 69 %, $p < 0,0001$), FIX (94 vs. 86 %, $p = 0,0354$) und FX (112 vs. 91%, $p < 0,0001$) bei Kühlung signifikant höher als bei Raumtemperatur. Es besteht kein signifikanter Unterschied in der medianen Aktivität der Gerinnungsfaktoren Fibrinogen, FVIII, FXI, FXIII, vWF-Ag sowie des Inhibitors Antithrombin. Interessant ist eine bei Kühlung signifikant niedrigere Aktivität von FXII als bei Raumtemperatur (100 vs. 113 %, $p = 0,0025$).

Insbesondere die Protein S-Aktivität ist an den Messtagen 3, 5 und 7 bei Raumtemperatur ~ 30 % niedriger als bei Kühlung (jeweils $p < 0,0001$; **Abbildung 6A, S. 41**). Bereits zwischen dem 1. und 3. Messtag wird die untere

Referenzwertgrenze unterschritten. Trotz stabilem Protein C resultiert daraus eine bei Raumtemperatur beeinträchtigte inhibitorischen Kapazität des antikoagulatorischen Protein C-Systems, gemessen an einer signifikant niedrigeren und unterhalb der unteren Referenzwertgrenze liegenden ProC-Global NR im Vergleich zur Kühlung Lagerung ($p \leq 0,0001$ ab Tag 5; **Abbildung 7C, S. 42**). Die FVII-Aktivität bleibt bei 2-6 °C stets im Normbereich, während nach 7 Lagerungstagen bei Raumtemperatur im Median die untere Referenzwertgrenze unterschritten wird (**Abbildung 6B**). Interessanterweise steigt die FVII-Aktivität in 20 % der kühl gelagerten Plasmen über 7 Tage an. Bei Raumtemperatur ist dieser Effekt nicht zu beobachten. Die mediane FVIII-Aktivität fällt sowohl bei Raumtemperatur als auch bei Kühlung Lagerung stark ab. Die untere Referenzwertgrenze wird jeweils bereits nach 3 Lagerungstagen unterschritten (**Abbildung 8, S. 44**). Es besteht jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den Lagertemperaturen, allenfalls ein geringer Vorteil für die Kühlung Lagerung. Die mediane Aktivität aller übrigen Gerinnungsfaktoren und Inhibitoren der Blutgerinnung bleiben sowohl bei Raumtemperatur als auch bei Kühlung Lagerung von Therapieplasmen innerhalb der Referenzwertgrenzen.



6A



6B

Abbildung 6A+B: Einfluss der Lagertemperatur und -dauer auf die Protein S-Aktivität (A) und FVII-Aktivität (B).

Die Messung erfolgte direkt nach dem Auftauen an Tag 0 (baseline, BL, dunkelgrau), sowie nach 3, 5 und 7 Tagen Lagerung bei 2-6 °C (4 °C, blau) und 20-24 °C (RT, gelb). Die grau schattierte Fläche spiegelt den Referenzbereich entsprechend den Herstellerangaben wieder.

Für 4 °C vs. RT jeweils an Tag 3, 5 und 7: # Signifikanz mit $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$; n. s. nicht signifikant.

Für BL vs. 4 °C: * Signifikanz mit $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; n. s. nicht signifikant.

Für BL vs. RT: ◊ Signifikanz mit $p < 0,05$; ◊◊ $p < 0,01$; ◊◊◊ $p < 0,001$; n. s. nicht signifikant.

Die Kapazität des exogenen und endogenen Gerinnungssystems wird bei Kühlung nicht relevant gestört. Quick-Wert und aPTT bleiben durchgehend im Normbereich. Nach 5 Lagerungstagen bei Raumtemperatur liegen Quick-Wert und aPTT unterhalb des Normbereiches und sind signifikant niedriger bzw. länger ($p < 0,0001$) als bei Kühlung (**Abbildung 7A und B**). Das ETP ist bei Raumtemperatur nach 7 Lagerungstagen signifikant niedriger ($p = 0,0006$) als bei Kühlung (**Abbildung 7D**). Es besteht kein Unterschied in der Thrombinbildungsrate, „lag time“, „peak thrombin“ und „time to peak“. Aus der Lagerung von flüssigem Plasma resultiert weder bei Kühlung noch bei Raumtemperatur eine gesteigerte Fibrinbildung und Fibrinolyse, belegt durch niedrige D-Dimere.

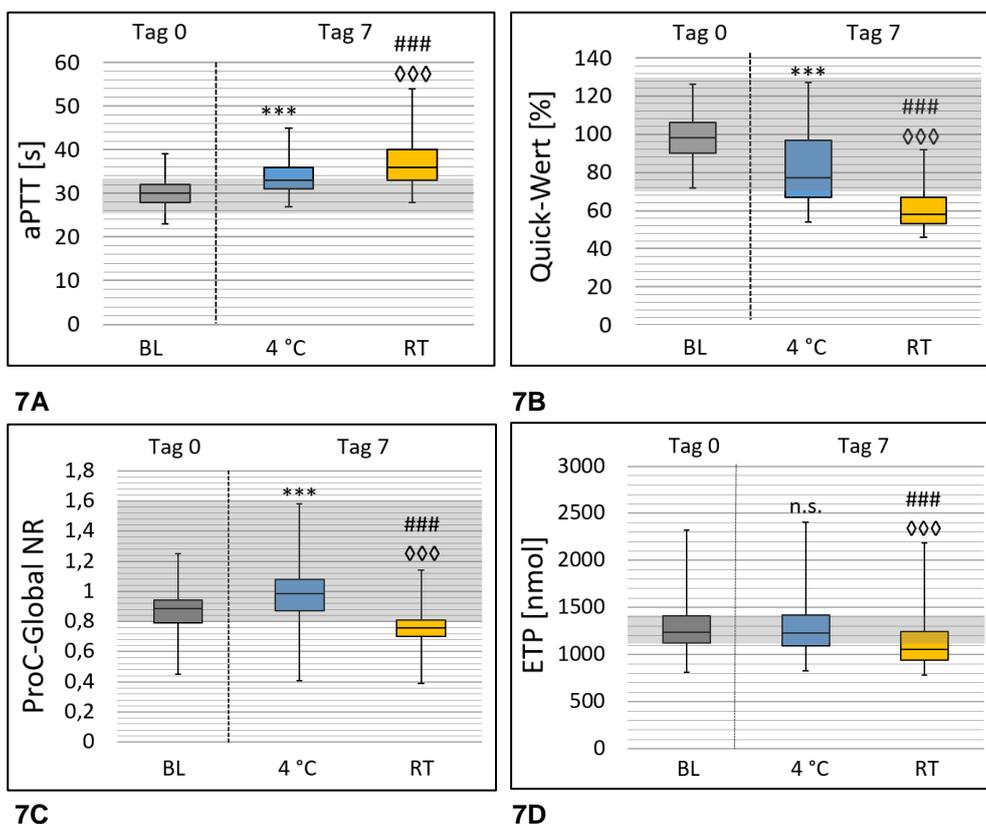


Abbildung 7A-D: Einfluss der Lagertemperatur und -dauer auf die Globaltests aPTT (A), Quick-Wert (B), ProC-Global NR (C) und ETP (D).

Die Messung erfolgte direkt nach dem Auftauen an Tag 0 (baseline, BL, dunkelgrau), sowie nach 3, 5 und 7 Tagen Lagerung bei 2-6 °C (4 °C, blau) und 20-24 °C (RT, gelb). Die grau schattierte Fläche spiegelt den Referenzbereich entsprechend den Herstellerangaben wieder.

Für 4 °C vs. RT jeweils an Tag 3, 5 und 7: # Signifikanz mit $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$; n. s. nicht signifikant.

Für BL vs. 4 °C: * Signifikanz mit $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; n. s. nicht signifikant.

Für BL vs. RT: ◊ Signifikanz mit $p < 0,05$; ◊◊ $p < 0,01$; ◊◊◊ $p < 0,001$; n. s. nicht signifikant.

Zusammenfassend ist die Aktivität der überwiegenden Gerinnungsfaktoren und Inhibitoren, insbesondere von Protein S und FVII, unter Raumtemperatur signifikant niedriger als bei Kühlung. Als Ausdruck der Beeinträchtigung des gesamten Gerinnungssystems sind die Ergebnisse von Quick-Wert, aPTT, ProC®-Global-Test und Thrombinbildungspotential bei Raumtemperatur signifikant schlechter als bei Kühlung und liegen außerhalb des Normbereiches. Die Plasmalagerung bei Raumtemperatur kann daher nicht empfohlen werden bzw. sollte vor der unmittelbaren Transfusion stets so kurz wie möglich gehalten werden.

3.2 Einfluss der Lagerdauer auf die Gerinnungsfaktorkapazität von aufgetautem Therapieplasma

Da die Lagerung bei Raumtemperatur aufgrund der unter 3.1. geschilderten Ergebnisse keine Option für die Lagerung von GFP in einer Flüssigplasmabank ist, wird im Folgenden lediglich der Einfluss der Lagerdauer auf aufgetautes und anschließend kühl gelagertes GFP betrachtet:

Lediglich die FVIII-Aktivität fällt während der 7-tägigen Lagerung stark ab. Zwischen Messtag 0 und 3 kommt es zum Hauptaktivitätsverlust mit Unterschreitung der unteren Referenzwertgrenze (mediane Aktivität von 105 % vor Lagerung fällt auf 64 % an Tag 3, 61 % an Tag 5 und 56 % an Tag 7, Tag 0 vs. Tag 3, 5 und 7 jeweils mit $p < 0,0001$; **Abbildung 8, S. 44**). Daher zählt FVIII zu den besonders labilen Gerinnungsfaktoren nach dem Auftauen. Die Lagertemperatur spielt hierbei keine Rolle. Nach 7 Lagerungstagen bestehen schwache Veränderungen der medianen Aktivität von Protein S (78 vs. 51 %, $p < 0,0001$), FV (110 vs. 91 %, $p < 0,0001$), FVII (106 vs. 91 %, $p = 0,0439$) und vWF-Ag (114 vs. 103 %, $p < 0,0001$). Interessanterweise kommt es in 20 % der untersuchten, kühl gelagerten Plasmen zu einer Zunahme der FVII-Aktivität. Die Aktivität der Gerinnungsfaktoren Fibrinogen, FII, FIX, FXI, FXII und FXIII sowie der Inhibitoren Protein C und Antithrombin verändert sich bei der Kühlung über 7 Tage nicht und wird daher als stabil erachtet.

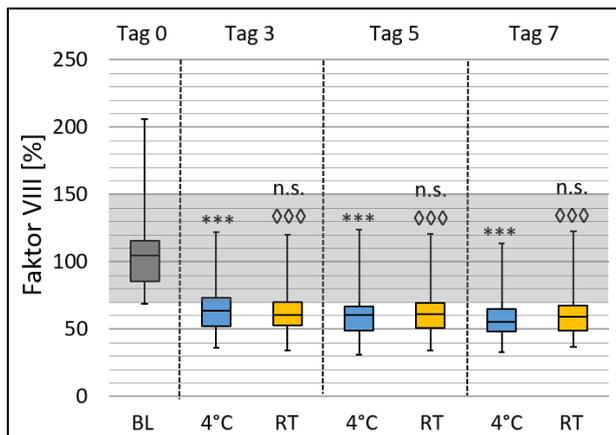


Abbildung 8: Einfluss der Lagertemperatur und -dauer auf die FVIII-Aktivität.

Die Messung erfolgte direkt nach dem Auftauen an Tag 0 (baseline, BL, dunkelgrau) sowie nach 3, 5 und 7 Tagen Lagerung bei 2-6 °C (4 °C, blau) und 20-24 °C (RT, gelb). Die grau schattierte Fläche spiegelt den Referenzbereich entsprechend den Herstellerangaben wieder.

Für 4 °C vs. RT des jeweiligen Lagerungstages: # Signifikanz mit $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$; n. s. nicht signifikant.

Für BL vs. 4 °C: * Signifikanz mit $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; n. s. nicht signifikant.

Für BL vs. RT: ◊ Signifikanz mit $p < 0,05$; ◊◊ $p < 0,01$; ◊◊◊ $p < 0,001$; n. s. nicht signifikant.

Aufgrund der Stabilität der überwiegenden Gerinnungsfaktoren bei 2-6 °C liegen auch die Medianwerte von aPTT und Quick-Wert nach 7 Lagerungstagen im Normbereich (**Abbildungen 7A und B, S. 42**). Ein Quick-Wert ≤ 50 % tritt in keinem, eine aPTT ≥ 34 sek in ~47 % der Plasmen nach 7 Tagen Kühlung auf. Die geringe Protein S-Aktivität reicht aus, um bei stabilem Protein C eine gute antikoagulatorische Kapazität, gemessen an einer normwertigen ProC-Global NR zu gewährleisten (**Abbildung 7C, S. 42**). Trotz einer geringeren Thrombinbildungsrate und „peak thrombin“ bleibt das Gesamt-ETP unbeeinflusst (**Abbildung 7D, S. 42**). Die Zunahme von „lag-time“ und „time to peak“ zeigt, dass die Gerinnungsaktivierung verlangsamt abläuft.

Zusammenfassend fällt lediglich die Aktivität von FVIII bei der Kühlung über 7 Tage unter den Referenzbereich von Gerinnungsgesunden. Jedoch, gemessen an stabilen Ergebnissen der Globaltests, wird die Funktionalität des Gerinnungssystems in der Gesamtheit auch nach einer Lagerdauer von 7 Tagen nicht wesentlich beeinträchtigt. Interessanterweise steigt die FVII-Aktivität in 20 % der Plasmen bei Kühlung an.

3.3 Einfluss des Pathogenreduktionsverfahrens mit Methylenblau/Rotlicht auf die Gerinnungsfaktorkapazität von aufgetautem Therapieplasma

3.3.1 Soforteffekte von MB/Rotlicht auf die Gerinnungsfaktorkapazität

Die Behandlung mit MB/Rotlicht beeinflusst im Gegensatz zu unbehandeltem, aufgetauten GFP mehr Gerinnungsfaktoren, jedoch kommt es nicht zu starken Veränderungen, denn alle erhobenen Werte verbleiben direkt nach der Prozedur im Normbereich. In **Abbildung 9** wird die Aktivität der Gerinnungsfaktoren und Inhibitoren von GFP vor und direkt nach der Behandlung mit MB/Rotlicht verglichen. Dies ist hinsichtlich der Anwendung des MB/Rotlicht-Verfahrens an aufgetautem GFP zur Pathogenreduktion klinisch relevant. Schwache Veränderungen mit signifikantem medianen Aktivitätsverlust sofort nach der MB/Rotlicht-Behandlung zeigen in absteigender Reihenfolge FVIII (-23 %, $p < 0,0001$), FV (-17 %, $p < 0,0001$), FXI (-13 %, $p < 0,0001$), FX (-11 %, $p = 0,003$) und FIX (-11 %, $p = 0,0011$). Die Aktivität von Fibrinogen, FII, FVII, FXII, FXIII, vWF-Ag sowie der Inhibitoren Protein C, Protein S und Antithrombin wird durch die Behandlung mit MB/Rotlicht nicht beeinflusst.

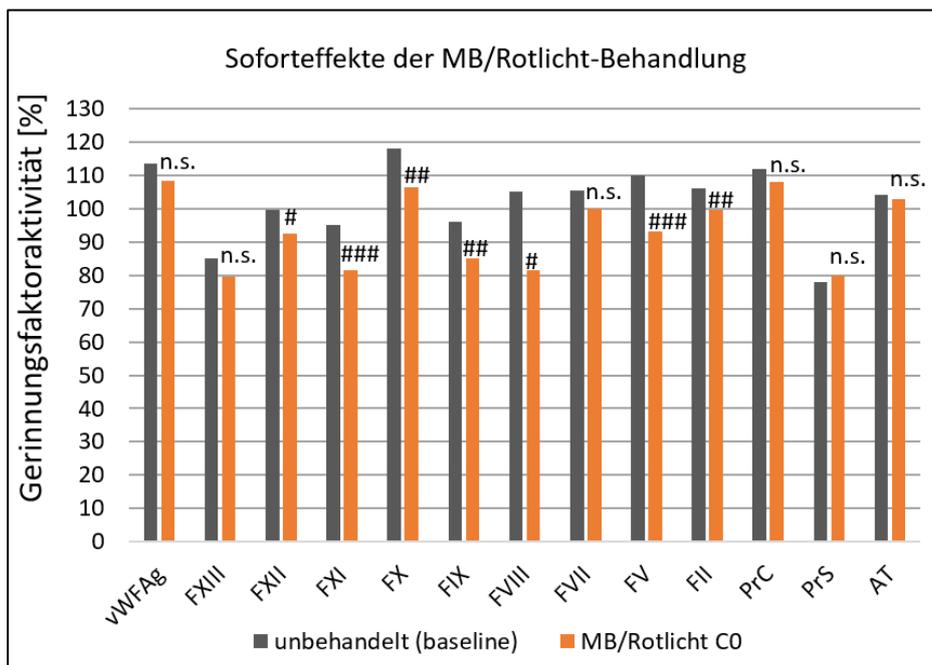


Abbildung 9: Übersicht über die Soforteffekte der MB/Rotlicht-Behandlung.

Gegenübergestellt wird die mediane Gerinnungsfaktoraktivität vor (grau) und nach MB/Rotlicht-Behandlung (rot) an Tag 0. # Signifikanz mit $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$; n. s. nicht signifikant.

Es resultieren Normwerte für Quick-Wert und aPTT sowie stabile Werte für ETP, „lag time“ und „peak thrombin“ und somit eine erhaltene prokoagulatorische Kapazität. Die signifikante Verkürzung der „time to peak“ ($p = 0,004$) bei signifikant zunehmender Thrombinbildungsrate ($p = 0,0014$) zeigt eine schnellere Gerinnungsaktivierung infolge der MB/Rotlicht-Behandlung an. Die ProC-Global NR nimmt als Ausdruck einer guten antikoagulatorischen Kapazität signifikant zu ($p = 0,0326$).

3.3.2 Einfluss der Lagerungsbedingungen auf die Gerinnungsfaktorkapazität von MBP

Wird MBP 7 Tage bei 2-6 °C gelagert, werden starke Veränderungen bei FVIII (mediane Aktivität fällt von 82 auf 47 %, $p < 0,0001$) und dem Inhibitor Protein S (mediane Aktivität fällt von 80 auf 49 %, $p < 0,0001$) beobachtet. Schwache Veränderungen zeigen Fibrinogen (-0,4 g/L, $p < 0,0001$), FV (-12 %, $p < 0,0001$) und vWF-Ag (-12 %, $p < 0,0001$). Die Aktivität von FII, FIX, FXI, FXII, FXIII sowie der Inhibitoren Protein C und Antithrombin bleibt unverändert. Interessant ist eine starke Aktivitätszunahme von FVII (mediane Aktivität steigt von 100 auf 150 %, $p < 0,0001$; **Abbildung 10**) und FX (mediane Aktivität steigt von 107 auf 126 %, $p < 0,0001$).

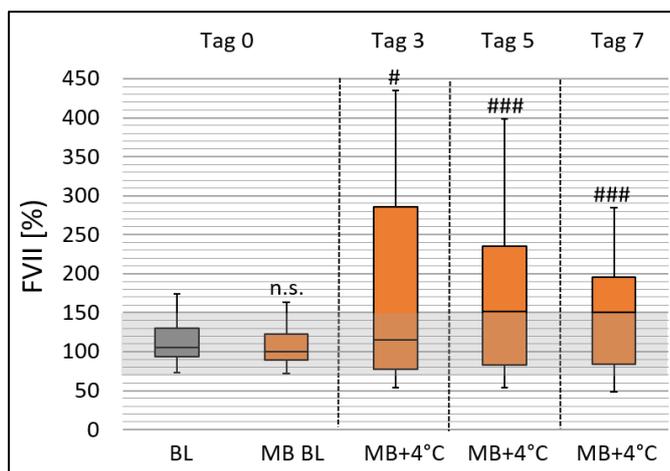


Abbildung 10: Einfluss der Lagerdauer auf die FVII-Aktivität von MBP.

Die Messung erfolgte direkt nach dem Auftauen an Tag 0 (baseline, BL, grau) sowie nach Behandlung mit MB/Rotlicht an Tag 0 (MB BL, orange) sowie nach 3, 5 und 7 Tagen Lagerung bei 2-6 °C. Die graue schattierte Fläche spiegelt den Referenzbereich entsprechend den Herstellerangaben wieder.

Für BL vs. MB BL und MB BL vs. MB + 4 °C: #Signifikanz mit $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$, n. s. nicht signifikant

In MBP kommt es nach 7-tägiger Lagerung bei 2-6 °C zu einer signifikanten Verlängerung der aPTT oberhalb des Normbereiches (27-35 sek). Quick-Wert, ProC-Global NR, Thrombinbildungsrate und „time to peak“ bleiben stabil. „Lag time“ und „peak thrombin“ fallen während der Lagerung signifikant ab ($p = 0,003$ und $p = 0,012$); Das endogene Thrombinbildungspotential fällt signifikant ($p = 0,0004$), jedoch vom Ausmaß nicht besonders stark ab.

3.3.3 Vergleich der Gerinnungsfaktorkapazität von MBP und unbehandeltem GFP nach 7 Tagen Lagerung bei 2-6 °C

Nach 7 Tagen besteht in MBP im Vergleich zu unbehandeltem Plasma eine signifikant niedrigere Aktivität der Gerinnungsfaktoren Fibrinogen (1,9 g/L vs. 2,3 g/L, $p < 0,0001$), V (81 % vs. 91 %, $p = 0,0337$), VIII (47 % vs. 56 %, $p = 0,0007$, **Abbildung 11**), IX (79 % vs. 94 %, $p = 0,0002$), XI (78 % vs. 95 %, $p < 0,0001$), XII (91 % vs. 100 %, $p = 0,0174$) sowie der Inhibitoren Protein C (99 % vs. 110 %, $p = 0,0029$) und Antithrombin (100 % vs. 104 %, $p = 0,0401$). Die Aktivität der Faktoren II, X, XIII, vWF-Ag sowie des Inhibitors Protein S unterscheidet sich nicht.

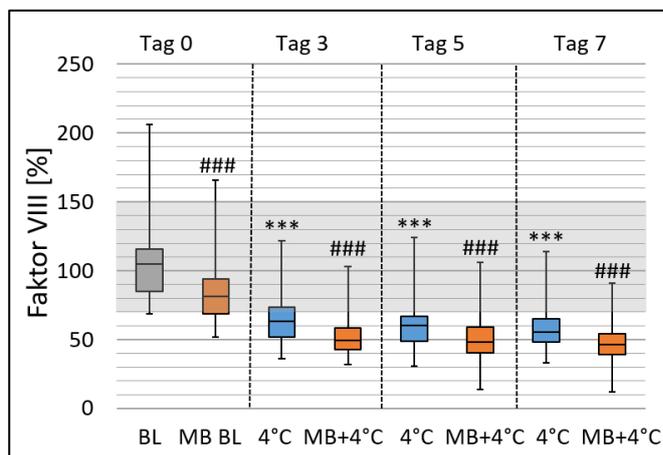


Abbildung 11: Vergleich der FVIII-Aktivität von MBP und unbehandeltem GFP (4 °C).

Die Messung erfolgte direkt nach dem Auftauen an Tag 0 (baseline, BL, grau) sowie nach Behandlung mit MB/Rotlicht an Tag 0 (MB BL, orange) sowie nach 3, 5 und 7 Tagen Lagerung bei 2-6 °C (4 °C, blau bzw. MB + 4 °C, orange). Die grau schattierte Fläche spiegelt den Referenzbereich entsprechend den Herstellerangaben wieder.

Für BL vs. 4 °C: *Signifikanz mit $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, n. s. nicht signifikant

Für BL vs. MB BL und 4 °C vs. MB + 4 °C des jeweiligen Lagerungstages: #Signifikanz mit $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$, n. s. nicht signifikant

Interessant ist, dass es auch in MBP unter Kühlung zu einer Aktivitätszunahme von FVII kommt. Während es bei unbehandeltem, kühl gelagerten GFP in 20 % der Plasmen zu einer Aktivitätszunahme von FVII kam, zeigt sich dieser Effekt in MBP in 64 % der Plasmen. Die FVII-Aktivität ist an den Messtagen 3, 5 und 7 in MBP signifikant höher ($p = 0,044$ an Tag 3, $p = 0,007$ an Tag 5 und 7) als in unbehandeltem GFP (**Abbildung 12**).

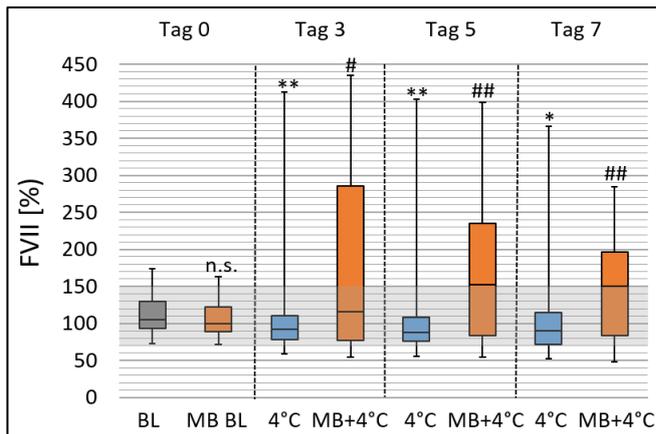


Abbildung 12: Vergleich der FVII-Aktivität von MBP und unbehandeltem GFP (4 °C).

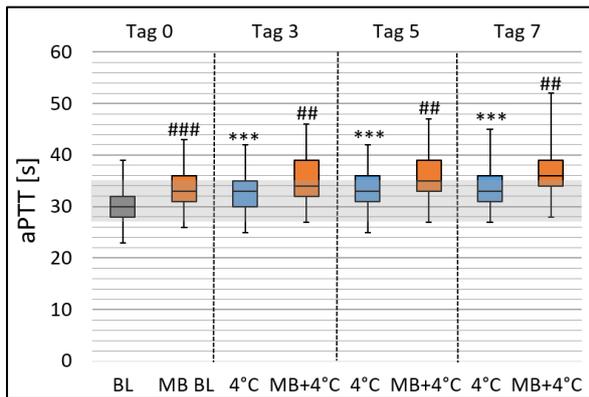
Die Messung erfolgte direkt nach dem Auftauen an Tag 0 (baseline, BL, grau) sowie nach Behandlung mit MB/Rotlicht an Tag 0 (MB BL, orange) sowie nach 3, 5 und 7 Tagen Lagerung bei 2-6 °C (4 °C, blau bzw. MB + 4 °C, orange). Die grau schattierte Fläche spiegelt den Referenzbereich entsprechend den Herstellerangaben wieder.

Für BL vs. 4 °C: *Signifikanz mit $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, n. s. nicht signifikant

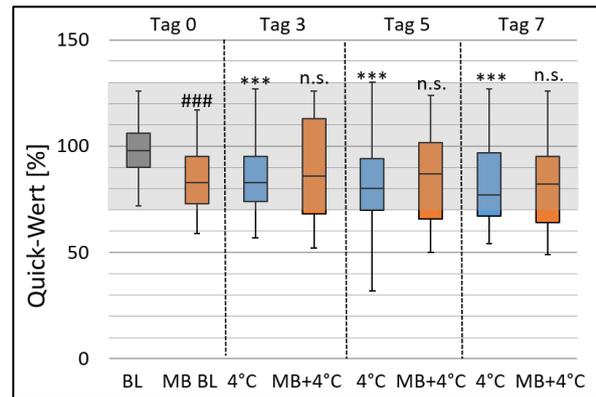
Für BL vs. MB BL und 4 °C vs. MB + 4 °C des jeweiligen Lagerungstages: #Signifikanz mit $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$, n. s. nicht signifikant

In 100 % der MBP zeigt sich infolge der erhöhten FVII-Aktivität eine gesteigerte FX-Aktivität und in ~94 % der Plasmen eine zunehmende FII-Aktivität. Das ETP nimmt jedoch lediglich in ~28 % der betroffenen Plasmen mit erhöhter FVII-Aktivität zu, bleibt im Median jedoch unbeeinflusst (**Abbildung 13D, S. 49**).

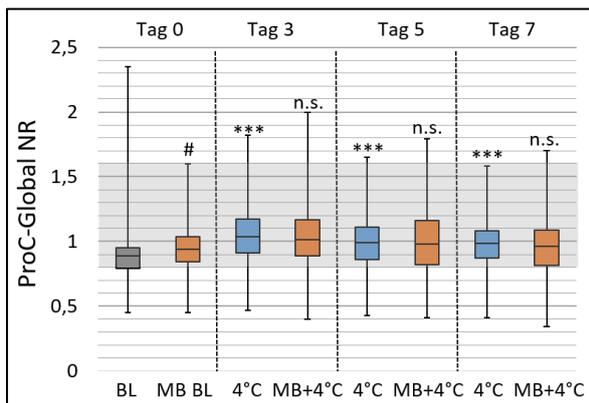
In MBP besteht eine signifikant stärkere Verlängerung der aPTT im Vergleich zu unbehandeltem GFP (36 sek vs. 33 sek, $p = 0,0022$), während Quick-Wert und ProC-Global NR unbeeinflusst bleiben (**Abbildung 13A-C, S. 49**). Die Thrombinbildungsrate und „peak thrombin“ sind in MBP signifikant höher ($p < 0,0001$ bzw. $p = 0,0020$) und „lag time“, „time to peak“ und „start tail“ signifikant kürzer (jeweils $p < 0,0001$) als in unbehandeltem Plasma. Somit besteht in MBP eine schnellere Gerinnungsaktivierung mit einem stärkeren Thrombinburst als in unbehandeltem GFP.



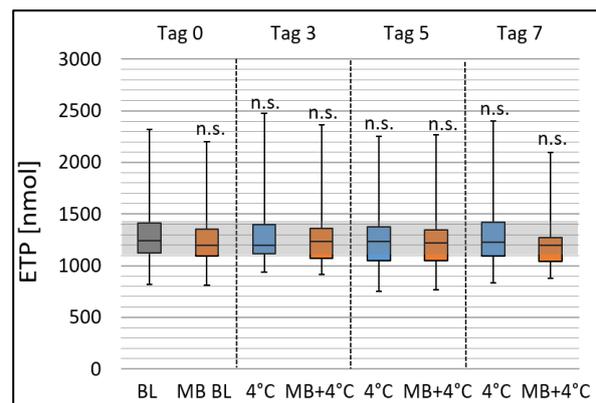
13A



13B



13C



13D

Abbildung 13 A-D: Vergleich der Globaltests aPTT (A), Quick-Wert (B), ProC-Global NR (C) und ETP (D) von MBP und unbehandeltem GFP (4 °C).

Die Messung erfolgte direkt nach dem Auftauen an Tag 0 (baseline, BL, grau) sowie nach Behandlung mit MB/Rotlicht an Tag 0 (MB BL, orange) sowie nach 3, 5 und 7 Tagen Lagerung bei 2-6 °C (4 °C, blau), 20-24 °C (RT, gelb) und nach 7 Tagen Lagerung bei 2-6 °C von MB/Rotlicht behandeltem Plasma (MB + 4 °C, orange). Die grau schattierte Fläche zeigt den Referenzbereich an.

Für BL vs. 4 °C: *Signifikanz mit $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, n. s. nicht signifikant

Für BL vs. MB BL und 4 °C vs. MB + 4 °C des jeweiligen Lagerungstages: #Signifikanz mit $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$, n. s. nicht signifikant

Zusammenfassend wird die Aktivität der Gerinnungsfaktoren unmittelbar durch die Pathogenreduktion mit MB/Rotlicht im Vergleich zu unbehandeltem GFP nur in geringem Maße beeinträchtigt. Alle direkt nach der Prozedur erhobenen Messwerte der Einzelfaktoren und Globaltests bleiben innerhalb der entsprechenden Referenzbereiche. Daher ist die klinische Anwendung des MB/Rotlicht-Verfahrens an aufgetautem GFP zur Pathogenreduktion praktikabel. Jedoch sind die Gerinnungsfaktoren bei der 2-6 °C Lagerung über 7 Tage von MBP stärker beeinträchtigt als in unbehandeltem, kühl gelagertem Plasma. Die Lagerung von MBP bei 2-6 °C in einer Flüssigplasmabank wird daher nicht empfohlen.

3.4 FVIIa-Aktivität

Aufgrund der drastischen Zunahme der FVII-Aktivität in 20 % der unbehandelten und 64 % der MB/Rotlicht behandelten, kühl gelagerten Plasmen der Lagerungsstudie, erfolgte eine nachträgliche Analyse des aktivierten FVII (FVIIa) in einer Stichprobe.

Die Stichprobe umfasste 7 Plasmaproben des Aliquots A der Lagerungsstudie (unbehandeltes, bei 2-6 °C über 7 Tage gelagertes Plasma).

Direkt nach dem Auftauen an Tag 0 zeigte sich in den Proben eine individuell deutlich variierende FVII- und FVIIa-Aktivität (73-140 % und 6,2-41 mU/mL). Nach Lagerung über 7 Tage bei 2-6 °C war in einer von sieben Plasmaproben eine drastische Zunahme der FVII- und FVIIa-Aktivität messbar (Zunahme FVII von 104 auf 294 % und Zunahme von FVIIa von 28 auf 800 mU/mL). In diesem Plasma zeigte sich eine Abnahme der „lag-time“ von 2,51 auf 1,51 sek und der „time to peak“ von 6,19 auf 4,52 sek. Das heißt der Zeitpunkt der maximalen Thrombinbildung wurde infolge einer schnelleren Gerinnungsaktivierung bzw. -geschwindigkeit früher erreicht. In den sechs verbleibenden Proben bestand bei abnehmender FVII- und FVIIa-Aktivität entsprechend eine Zunahme der „lag time“ und „time to peak“ und somit eine reduzierte Gerinnungsaktivierung bzw. -geschwindigkeit. Die Messergebnisse sind in **Tabelle 18 (S. 51)** aufgeführt.

In der Lagerungsstudie wiesen 20 % der unbehandelten GFPs und 64 % der MBPs (jeweils n = 50) während der Kühlagerung über 7 Tage eine zunehmende FVII-Aktivität auf. Davon bestand bei 100 % eine Abnahme der „lag time“ und „time to peak“. In den verbleibenden unbehandelten GFPs und MBPs ging eine fallende FVII-Aktivität, bis auf eine Ausnahme, mit einer Zunahme der „lag time“ und „time to peak“ einher.

Zusammenfassend muss anhand der Ergebnisse der hier näher untersuchten Stichprobe und der Lagerungsstudie angenommen werden, dass sich die FVIIa-Aktivität kongruent zur FVII-Aktivität verhält. Aufgrund der sehr kleinen Stichprobe kann dies jedoch abschließend nicht sicher beurteilt werden. Zudem geht eine erhöhte FVII- bzw. FVIIa-Aktivität mit einer kürzeren „lag time“ und „time to peak“ einher. Die Gerinnungsaktivierung bzw. -geschwindigkeit nimmt demnach zu.

Tabelle 18: FVII- und FVIIa-Aktivität einer Stichprobe (n = 7 aus 50). Ergänzende Darstellung von „lag time“ und „time to peak“ von GFP gemessen an Tag 0 (d0, sofort nach dem Auftauen) und nach 7 Tagen (d7) Lagerung bei 2-6 °C.

	FVII d0→d7 [%]		FVIIa d0→d7 [mU/mL]		lag time d0→d7 [sek]		time to peak d0→d7 [sek]	
1	140 → 109	(-)	41 → 34	(-)	2,33 → 3,11	(+)	6,33 → 8,22	(+)
2	104 → 294	(+)	28 → 800	(+)	2,51 → 1,51	(-)	6,19 → 4,52	(-)
3	124 → 94	(-)	22 → 20	(-)	2,89 → 3,0	(+)	5,78 → 6,33	(+)
4	106 → 78	(-)	21 → 10,25	(-)	2,33 → 2,67	(+)	4,78 → 5,33	(+)
5	93 → 68	(-)	22 → 9,25	(-)	2,67 → 3,11	(+)	5,33 → 6,33	(+)
6	79 → 58	(-)	11 → 4,05	(-)	2,33 → 3,11	(+)	5,67 → 8,78	(+)
7	73 → 58	(-)	6,2 → 5,35	(-)	1,92 → 2,47	(+)	4,03 → 4,81	(+)
(-) Abnahme, (+) Zunahme								

3.5 Sterilitätsprüfung

In allen Aliquoten war nach 7 Tagen Plasmalagerung bei 2-6 °C bzw. 20-24 °C sowie einer sich anschließenden Inkubationszeit von 7 Tagen bei 37 °C in anaeroben bzw. aeroben Blutkulturflaschen kein Pilz- oder Bakterienwachstum nachweisbar.

3.6 Ergebnisse der 1D- und 2D-Gelelektrophorese

In dieser Studie wird die gelbasierte Elektrophorese genutzt, um die Funktionalität der MARS-6 Säule zu demonstrieren. In der 1D-Gelelektrophorese (**Abbildung 14, S. 52**) erfolgt anhand einer Stichprobe die Darstellung der Proteinbanden vor und nach Entfernung (Depletion) der sechs hochabundanten Proteine Albumin, IgG, IgA, Transferrin, Haptoglobin und Antitrypsin. Aufgetragen wurde unbehandeltes und MB/Rotlicht behandeltes, kühl gelagertes GFP vor der Depletion an Tag 0 (Säule 1 bzw. Säule 3). Hier dominieren hochabundante Proteine durch die kräftige Coomassie-Färbung die Darstellung. Die verbleibenden Proteinfractionen sind nur schemenhaft erkennbar. Nach der Depletion zeigt sich eine intensivere Färbung der verbleibenden Banden niedrigabundanter Proteine und es werden darüber hinaus mehr

Proteinbanden sichtbar (Säule 2 und 4). Säule 5 zeigt die Proteinbanden der hochabundanten Proteine, die in der Elutionsfraktion enthalten sind.

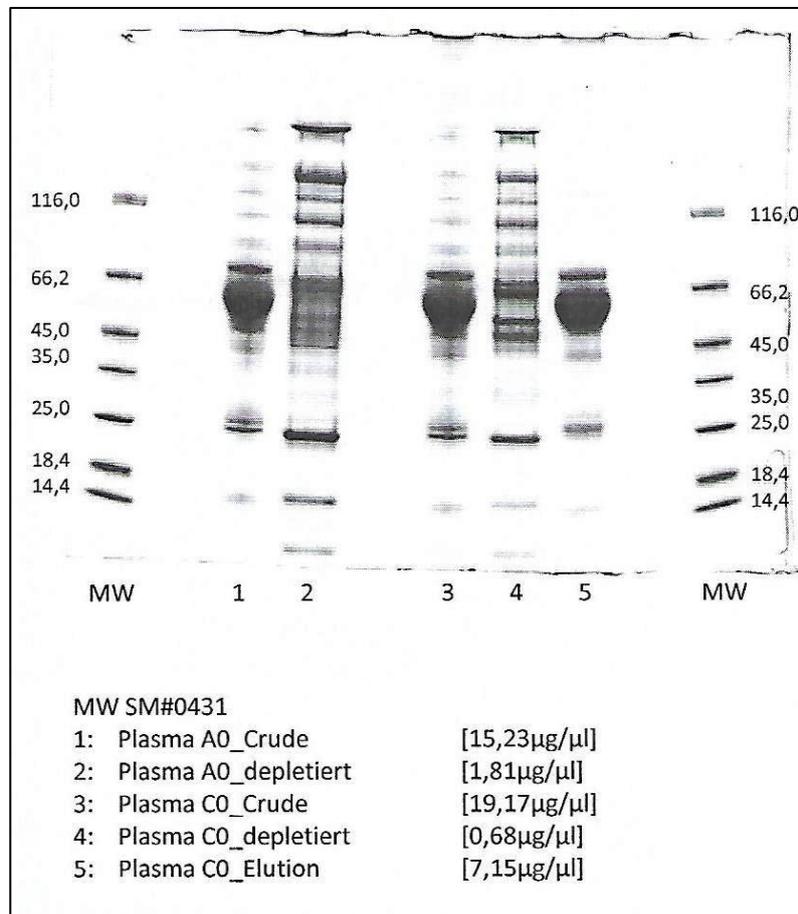


Abbildung 14: Ergebnisse der 1D-Gelelektrophorese.

Es wurden 20 µg Protein pro Spur aufgetragen und mittels Coomassie-Färbung visualisiert.

Säule 1: bei 4 °C gelagertes, undepletiertes Plasma an Tag 0

Säule 2: bei 4 °C gelagertes, depletiertes Plasma an Tag 0

Säule 3: Mit MB/Rotlicht behandeltes, bei 4 °C gelagertes, undepletiertes Plasma an Tag 0

Säule 4: Mit MB/Rotlicht behandeltes, bei 4 °C gelagertes, depletiertes Plasma an Tag 0

Säule 5: Elutionsfraktion in MB/Rotlicht behandeltem, bei 4 °C gelagertem Plasma an Tag 0.

Abbildung 15 (S. 53) zeigt das Ergebnis einer 2D-Gelelektrophorese von undepletiertem (Abbildung 15 links) und depletiertem gefrorenen Frischplasma (Abbildung 15 rechts). In der depletierten Plasmaprobe sind einerseits mehr Proteinspots sichtbar und andererseits die einzelnen Proteinspots deutlicher bzw. größer. Durch Überlagerung der Proteinmuster (**Overlay Image, Abbildung 16**) können die Unterschiede noch besser sichtbar gemacht werden.

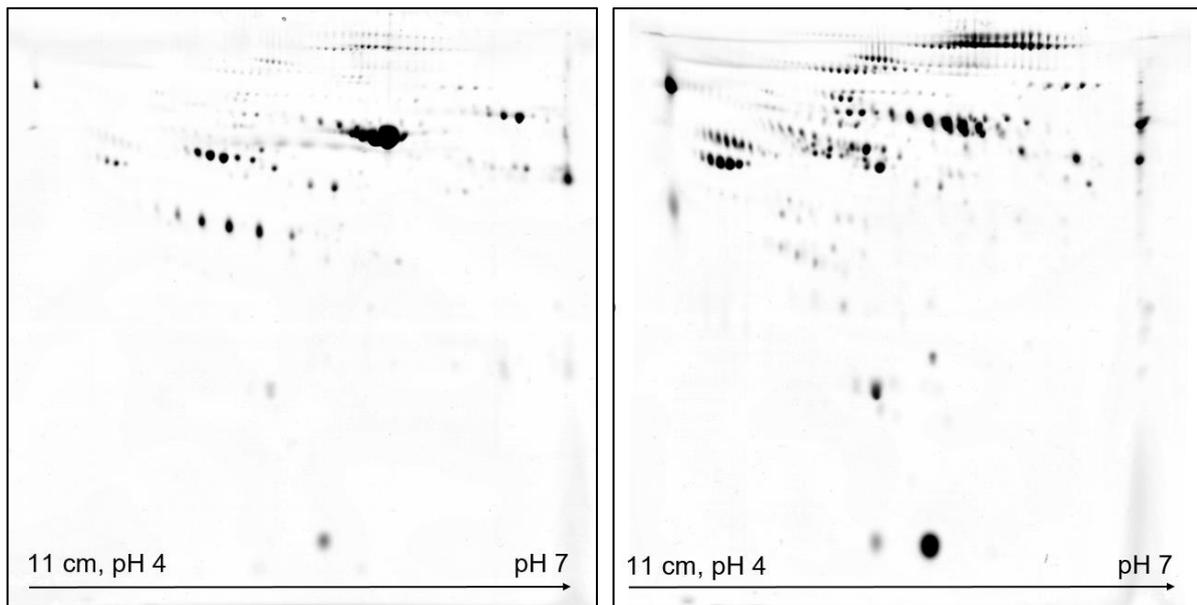


Abbildung 15: Proteinmuster nach 2D-Gelelektrophorese (11cm, pH Gradient 4-7).
 Es wurden jeweils 36 μg Protein aufgetragen und mittels Silberfärbung nach Bloom visualisiert (links: A0 undepletiert, rechts: A0 depletiert).

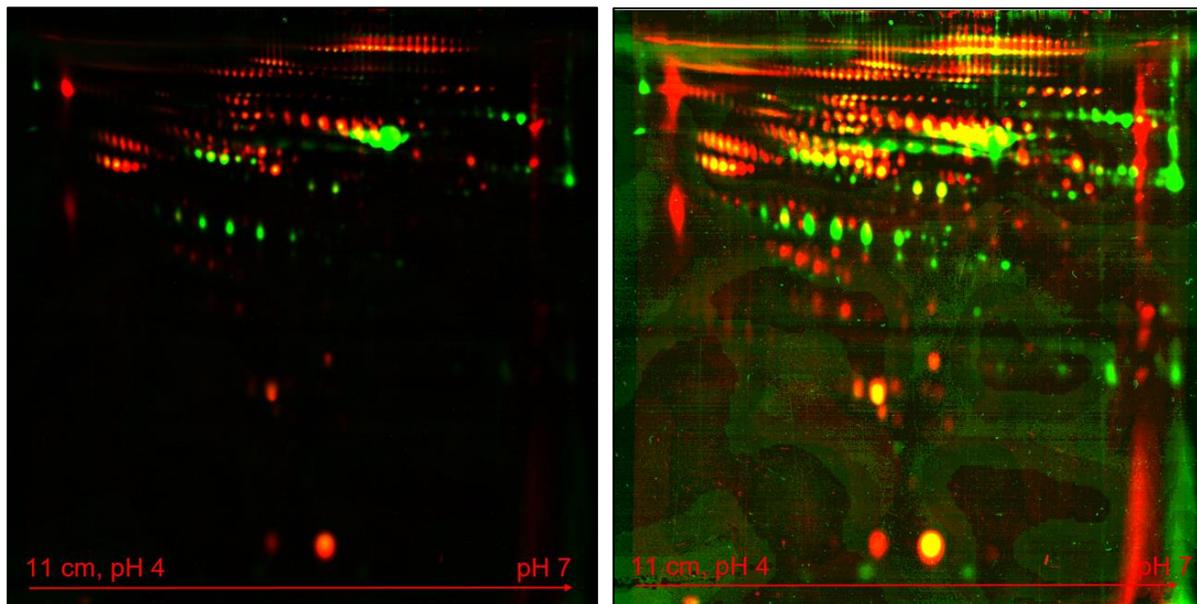


Abbildung 16: Overlay Image der 2D-Gelelektrophorese (11cm, pH Gradient 4-7).
 Es wurden 36 μg Protein aufgetragen und mittels Silberfärbung nach Bloom visualisiert. Durch die Überlagerung (Overlay) der Proteinmuster (grün: A0 undepletiert, rot: A0 depletiert) können die Unterschiede sichtbar gemacht werden.

3.7 Ergebnisse der Massenspektrometrie (LC-ESI MS/MS)

Massenspektrometrisch konnten insgesamt 239 Proteine anhand ihrer typischen Peptidstrukturen identifiziert werden. Dazu mussten von einem Protein mindestens zwei typische Peptide nachgewiesen werden. **Abbildung 17** zeigt die Verteilung der Proteinabundanz der Triplikate des jeweiligen Aliquots A0, A7, B0, B7, C0 und C7 nach Normalisierung. Die Normalisierung dient als Qualitätskontrolle. Es wird deutlich, dass die Proben ähnliche Proteinabundanz aufweisen und daher gut vergleichbar sind. In der Massenspektrometrie zeigten 14 der 239 nachweisbaren Proteine (5,86 %) unter bestimmten Lagerungs- und Behandlungsbedingungen signifikante Veränderungen ihrer Abundanz („fold-change“ bzw. Abundanz-Ratio > 2 bzw. $< 0,5$ mit $p < 0,05$). Hierzu zählen Fibronectin, S100-A8 (= Calprotectin), C-reaktives Protein, Cadherin-5, Vascularin und Neural cell adhesion molecule sowie insbesondere Von-Willebrand-Faktor und Kininogen-1, weil sie in der Gerinnungskaskade von Bedeutung sind.

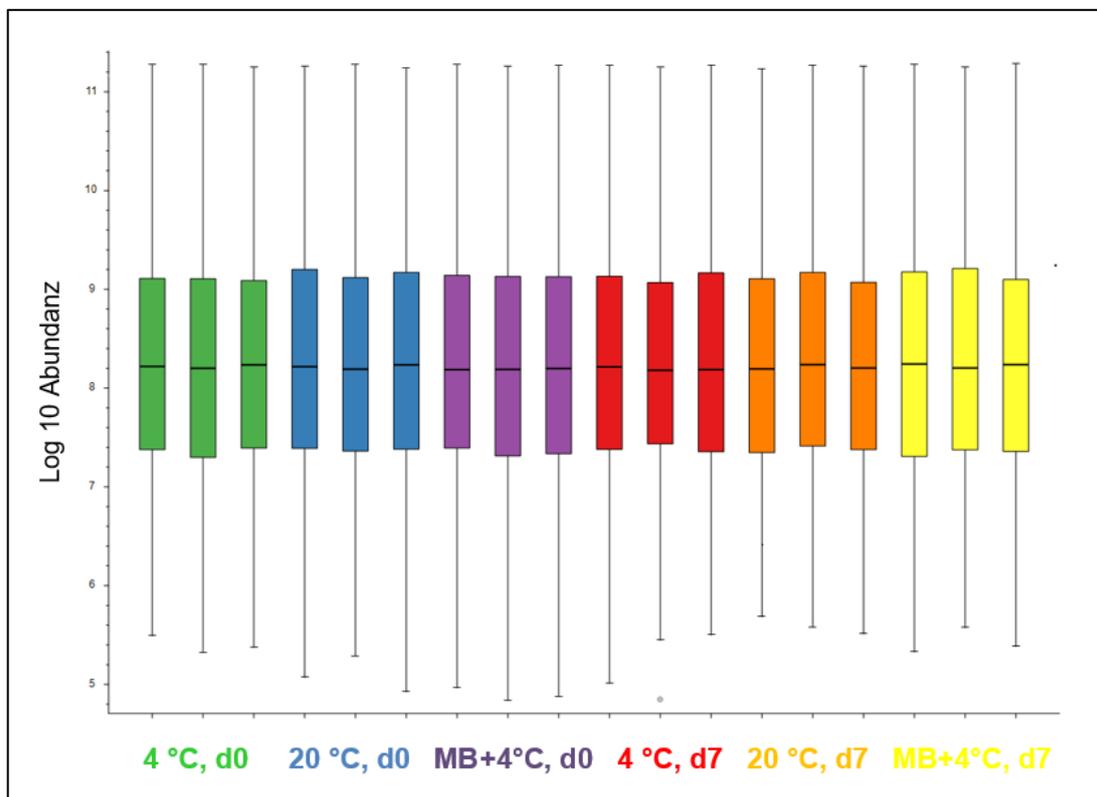


Abbildung 17: Proteinabundanz nach Normalisierung.

Darstellung der Triplikate pro Aliquot A, B und C gemessen an Tag 0 (grün: 4 °C; blau: 20-24 °C; lila: nach Behandlung mit MB/Rotlicht) sowie nach 7 Tagen Lagerung (rot: 4 °C; orange: 20-24 °C; gelb: nach Behandlung mit MB/Rotlicht).

Die verbleibenden 6 der 14 Proteine gelten als Haut- und Haar-assoziierte Proteine (verschiedene Keratine, Dermcidin etc.), deren Vorkommen am ehesten auf Kontamination der Probe beruht. Sie werden daher in der Auswertung nicht weiter berücksichtigt. In dieser Studie massenspektrometrisch erfasste Gerinnungsfaktoren bzw. Inhibitoren bzw. das Gerinnungssystem beeinflussende Proteine sind Protein C und S, alpha-, beta- und gamma-Kette von Fibrinogen, Prothrombin, FV, FIX, FX, FXI, FXII, alpha- und beta-Kette von FXIII, Antithrombin III, Protein Z-abhängiger Proteaseinhibitor, Vitronectin, Kallikrein, Plasminogen, Alpha-2-Antiplasmin und Alpha-2-Makroglobulin. Sie zeigten weder durch die Lagerbedingungen noch durch die Pathogenreduktion mit MB/Rotlicht signifikante Veränderungen. FVII und FVIII konnten trotz der nachweislich guten Aktivität in der funktionellen Gerinnungsfaktorenanalyse massenspektrometrisch in keinem Aliquot erfasst werden. Neben den Gerinnungsfaktoren wurden trotz Depletion mittels der MARS-6 Säule die hochabundanten Proteine Albumin, Fragmente von Immunglobulinen (leichte und schwere Ketten), Transferrin, Haptoglobin sowie alpha-1-Antitrypsin detektiert.

Die Vulkan-Plots (**Abbildung 19A-C, S. 57**) bilden ab, unter welcher Lagerungs- bzw. Behandlungsbedingung es zu einer signifikanten Veränderung des vWF bzw. Kininogen-1 kam. Bei allen weiteren detektierten Gerinnungsfaktoren bzw. deren Fragmenten waren keine signifikanten Veränderungen nachweisbar. Die Von-Willebrand-Faktor-Abundanz reduzierte sich durch die Behandlung mit MB/Rotlicht nur gering („fold-change“ = 0,561; $p = 0,049$). Sie nimmt jedoch über die 7-tägige Kühlung von MBP signifikant ab („fold-change“ = 0,11; $p = 0,00003$; **Abbildung 19A, S. 57**) und ist nach 7 Lagerungstagen bei 2-6 °C signifikant niedriger als in unbehandeltem GFP („fold-change“ = 0,08; $p = 0,0016$; **Abbildung 19B, S. 57**). Passend dazu zeigte sich in der Funktionstestung des vWF-Ag eine stabile Aktivität direkt nach Behandlung mit MB/Rotlicht, eine signifikante Reduktion der Aktivität über die 7-tägige Kühlung von MBP ($p < 0,0001$) als auch eine signifikant niedrigere Aktivität im Vergleich zu unbehandeltem, kühl gelagerten GFP nach 7 Lagerungstagen ($p < 0,0001$, **Abbildung 18, S. 56**).

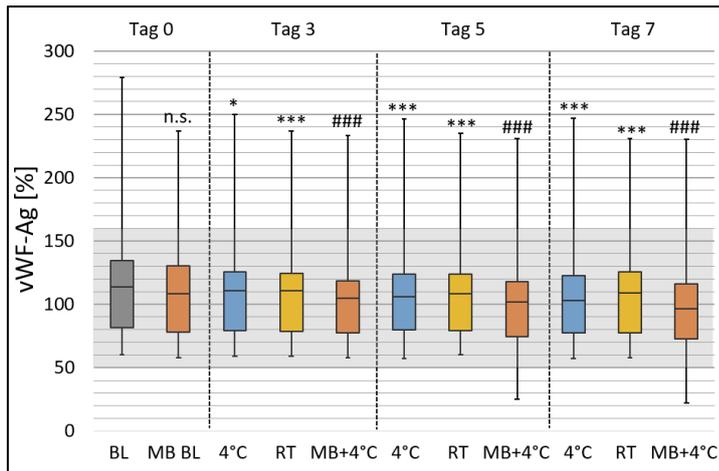


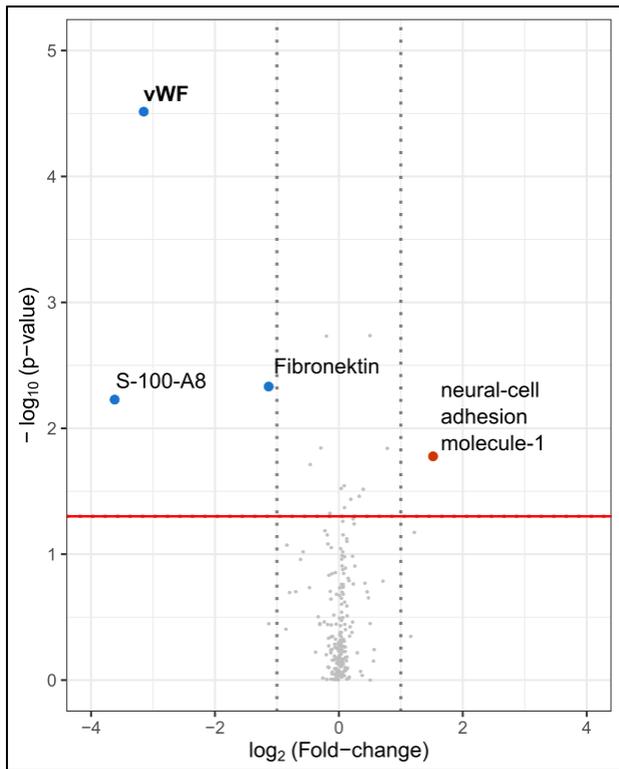
Abbildung 18: Einfluss der Lagerdauer, -temperatur und der Pathogenreduktion mit MB/Rotlicht auf die Aktivität des vWF-Ag.

Die Messung erfolgte direkt nach dem Auftauen an Tag 0 (baseline, BL, grau) sowie nach Behandlung mit MB/Rotlicht an Tag 0 (MB BL, orange) sowie nach 3, 5 und 7 Tagen Lagerung von unbehandeltem GFP bei 2-6 °C (4 °C, blau) bzw. 20-24 °C (RT, gelb) und von MB/Rotlicht behandeltem Plasma (MB + 4 °C, orange). Die grau schattierte Fläche spiegelt den Referenzbereich wieder entsprechend den Herstellerangaben des verwendeten Gerinnungsfaktortestkits.

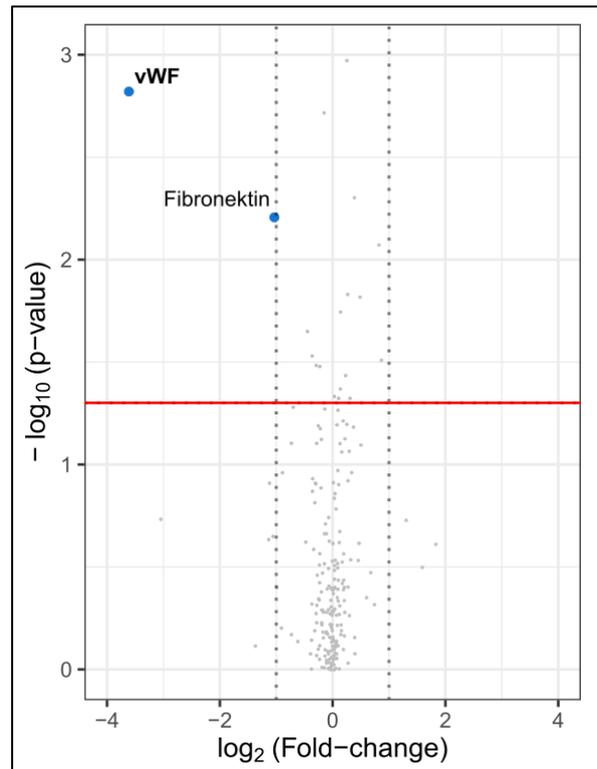
BL vs. jeweils MB BL / 4 °C / RT: *Signifikanz mit $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; n. s. nicht signifikant
 MB BL vs. MB + 4 °C. #Signifikanz mit $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$; n. s. nicht signifikant

In der Massenspektrometrie wurden überwiegend Peptide der schweren Kette von Kininogen-1 nachgewiesen. Die Abundanz von Kininogen-1 nimmt ausschließlich unter Lagerung von GFP bei Raumtemperatur über 7 Tage signifikant zu („fold-change“ = 3,2; $p = 0,046$), während bei Kühlung Lagerung von unbehandeltem und MB/Rotlicht behandeltem Plasma keine Unterschiede festzustellen sind ($p > 0,05$; **Abbildung 19C, S. 57**). Kininogen-1 spielt als Kontaktfaktor in der endogenen Gerinnungskaskade eine Rolle. Passend dazu imponierte in der Funktionsanalyse eine signifikante Zunahme der FXII-Aktivität bei Lagerung bei Raumtemperatur, während sich bei Kühlung Lagerung von unbehandeltem und MB/Rotlicht behandeltem Plasma keine signifikante Aktivitätszunahme zeigte ($p > 0,05$).

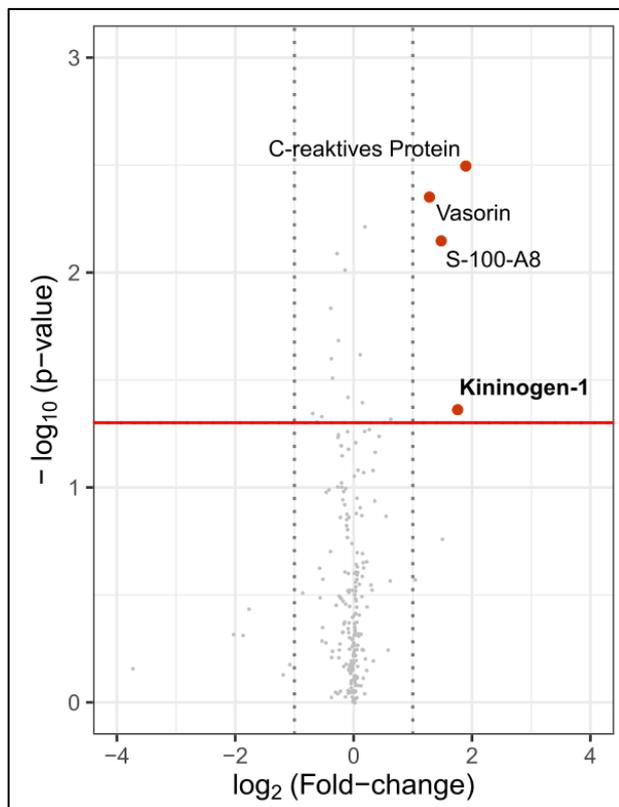
Zusammenfassend konnte massenspektrometrisch eine signifikante Reduktion des vWF in 7 Tage bei 2-6 °C gelagertem MBP und eine signifikante Zunahme von Kininogen-1 in 7 Tage bei Raumtemperatur gelagertem, aufgetauten GFP festgestellt werden. Für alle anderen auch funktionell untersuchten Gerinnungsfaktoren ergab die Proteomanalyse keine relevanten Veränderungen.



19A (C7 vs. C0)



19B (C7 vs. A7)



19C (B7 vs. B0)

Abbildung 19: Vulkan-Plots Massenspektrometrie C7 vs. C0 (A), C7 vs. A7 (B), B7 vs. B0 (C). Jeder Punkt beschreibt ein Protein. Liegt der Punkt auf der x-Achse in der Nähe des Wertes 0 hat sich die Abundanz-Ratio des Proteins (fold-change) im Vergleich der Lagerungsbedingungen nicht verändert. Wandert der Punkt entlang der x-Achse nach rechts, nimmt die Abundanz-Ratio zu. Die Abundanz-Ratio ist der Quotient aus der Proteinabundanz von Protein X unter der jeweiligen Lager-/Behandlungsbedingung (z. B. X(C7) / X(C0)). Wandert der Punkt entlang der x-Achse nach links, nimmt die Abundanz ab. Punkte oberhalb der roten Linie ($p\text{-Wert} < 0,05 = 1,3 \cdot \log_{10}$) beschreiben Proteine, deren Abundanz sich signifikant verändert hat. Blaue Punkte ($< -1\log_2$, entspricht einer abundance ratio $< 0,5$) bzw. rote Punkte ($> 1\log_2$, entspricht einer abundance ratio > 2) erfahren die größten Veränderungen im Sinne einer Ab- bzw. Zunahme der Abundanz mit hoher statistischer Signifikanz. Alle übrigen Proteinspots sind grau dargestellt.

Aliquot **A**: Lagerung bei 2-6 °C über 7d
 Aliquot **B**: Lagerung bei 22-24 °C über 7d
 Aliquot **C**: Behandlung mit MB/Rotlicht und Lagerung bei 2-6 °C über 7d

4 Diskussion

Diese Studie konnte zeigen, dass die Funktion aller Gerinnungsfaktoren und Inhibitoren, mit Ausnahme von FVIII, in aufgetautem Frischplasma bei einer Lagerung über 7 Tage bei 4 °C erhalten bleibt⁴⁷. Weil die selektive Messung der Aktivität der Gerinnungsfaktoren und Inhibitoren keine Aussage über die Gesamtkapazität des Gerinnungssystems zulässt, untersuchte diese Studie im Weiteren verschiedene Globaltests. Bei der Beurteilung der Ergebnisse ist zu beachten, dass die Analyse der Aktivität von Gerinnungsfaktoren und Inhibitoren an einmal tiefgefrorenem und wieder aufgetautem Plasma und die Messung der Globaltests an zweimal tiefgefrorenem und wieder aufgetautem Plasma erfolgte. Die Ergebnisse von Quick-Wert/INR, aPTT, ProC®-Global-Test und Thrombinbildungspotential bestätigen, dass sich die 4 °C-Lagerung von aufgetautem GFP über 7 Tage kaum auf die Funktionalität des gesamten Gerinnungssystems auswirkt²⁵. Unter diesen Bedingungen gelagertes Plasma ist somit in einer Flüssigplasmabank einsetzbar, um z. B. eine rasche Behandlung im Blutungsfall zu beginnen. Zur alleinigen Therapie von Patienten mit bekanntem Faktorenmangel ist es jedoch ungeeignet. Hierfür ist die Gabe von Faktorenkonzentraten notwendig. Zu diesem Ergebnis kommen auch Downes et al., die 2001 zeigten, dass es mit Ausnahme von FVIII zu keinem signifikanten Abfall der Gerinnungsfaktoren II, V, VII, X und Fibrinogen in aufgetautem, bei 1-6 °C über 5 Tage gelagertem GFP kam. FVIII fiel in 5 Tagen um 35-41 % mit einem Median unterhalb der unteren Referenzwertgrenze²⁰. Sidhu et al. untersuchten 2006 das bakterielle Wachstum sowie die Gerinnungsfaktoraktivität von FII, V, VII, VIII, X, XI und Fibrinogen in aufgetautem und über 5 Tage bei 1-6 °C gelagertem GFP. Es zeigte sich ein signifikanter Aktivitätsverlust von FV und FVIII bei jeweils noch normwertiger medianer Gerinnungsfaktoraktivität an Tag 5. Bakteriellies Wachstum konnte in allen Proben ausgeschlossen werden²³. Scot et al. untersuchten ebenfalls aufgetautes und bei 1-6 °C über 5 Tage gelagertes GFP. Ein Abfall der Gerinnungsfaktoraktivität um mehr als 10 % bestand bei FV (-21 %), FVII (-33 %) und FVIII (-47 %), wohingegen FII, FX und der Inhibitor Protein S um weniger als 10 % fielen¹². Heymann et al. untersuchten 2009 die Aktivität der Gerinnungsfaktoren Fibrinogen und der Faktoren II, V, VII, VIII, IX, X, XI, XII, XIII, vWF-Ag sowie der Inhibitoren Antithrombin, Protein C und S nach

dem Auftauen von GFP sowie nach Lagerung bei 4 °C über 6 Tage. FII (-8 %), FV (-16 %), FVII (-31 %), FVIII (-47 %), FIX (-12 %) und FX (-10 %) zeigten 6 Tage nach dem Auftauen einen signifikanten Aktivitätsverlust. Alle untersuchten Gerinnungsfaktoren und Inhibitoren blieben jedoch innerhalb der Referenzwertgrenzen¹⁹. Vor Initialisierung dieser Studie wurde die Qualität von Therapieplasma primär durch die Aktivitätsbestimmung vulnerabler Gerinnungsfaktoren und Inhibitoren untersucht. Diese Studie zeigt, dass nicht nur altbewährte Globaltests wie Quick-Wert/INR und aPTT, sondern auch neue Methoden wie die Messung des Endogenen Thrombinbildungspotentials und der ProC®-Global-Test in der Lage sind, Auswirkungen auf das Zusammenspiel der Gerinnungsfaktoren und Inhibitoren zu untersuchen. Erstmals wurde in der vorliegenden Arbeit der ProC®-Global-Test genutzt, um therapeutisches Plasma systematisch zu untersuchen. Nur wenige Arbeitsgruppen nutzten das Thrombingenerierungspotential, um Auswirkungen der Lagerdauer und -temperatur auf therapeutisches Plasma zu untersuchen. Cookson et al. fanden in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie keine Veränderungen von „lag time“ und ETP, jedoch einen Abfall der Spitzenthrombinbildung in aufgetautem und bei 4 °C über 4 Tage gelagertem Plasma. Interessanterweise entsprachen die Messwerte nach 6 Tagen wieder den Ausgangswerten⁴³. Gosselin et al. zeigten einen Abfall des ETP von aufgetautem Frischplasma um circa 50 % nach 15-tägiger Lagerung bei 1-6 °C²¹.

In den USA kann gemäß der American Association of Blood Banks (AABB) therapeutisches Plasma nach dem Auftauen für maximal 5 Tage bei 1-6 °C gelagert werden⁴⁸. Insbesondere in Traumazentren der USA wird aufgetautes GFP der Blutgruppe AB für den Blutungsnotfall bereitgehalten⁴⁹. In Schweden wird bereits seit 1980 ein kleiner Vorrat an flüssig gelagertem Plasma für Notfälle bereitgehalten⁵⁰. Derzeit ist in Schweden die Lagerung von Plasma bei 2-6 °C für bis zu 14 Tage möglich⁵¹. In Deutschland durfte therapeutisches Plasma bis 2017 nach den bis dahin gültigen Hämotherapierichtlinien nach dem Auftauen für maximal 6 Stunden gelagert werden, bis es bei Nichtgebrauch verworfen werden musste⁴. Eine zügige Versorgung des Patienten im Blutungsnotfall mit Blutplasma war somit vielfach nicht möglich. Durch die Ergebnisse der vorliegenden Validierungsstudie wird seit 2012 an der Universitätsmedizin Greifswald die erste Flüssigplasmabank Deutschlands praktiziert. Es wird lediglich eine kleine Anzahl von Plasmakonserven jeder Blutgruppe à 250 mL

aufgetaut und bei 2-6 °C über maximal 7 Tage gelagert. Zur Reduktion des Verwurfs aufgetauter Plasmen werden diese für jede Plasmaanforderung zur Transfusion ausgegeben.

Im Weiteren zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass die Lagerung von aufgetautem GFP bei Raumtemperatur aufgrund des deutlichen Verlusts der Aktivität der Gerinnungsfaktoren und Inhibitoren, insbesondere FVIII, FVII und Protein S, ungeeignet ist⁴⁷. Die verringerte prokoagulatorische Kapazität spiegelt sich in einer signifikanten Beeinträchtigung von Quick-Wert, aPTT und endogenem Thrombingenerierungspotential wieder. Die Lagerung von aufgetautem Plasma bei Raumtemperatur über 7 Tage führte zu einem deutlichen Abfall der ProC-Global NR, d.h. zu einer Abnahme der antikoagulatorischen Kapazität des Protein C-Systems. Dies wird auf die stark abfallende Protein S-Aktivität deutlich unterhalb der unteren Referenzwertgrenze bei Lagerung bei Raumtemperatur⁴⁷ zurückgeführt. Unter Berücksichtigung dessen, kann die Lagerung von aufgetautem GFP bei Raumtemperatur nicht empfohlen werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit demonstrieren, dass die Pathogenreduktion mit MB/Rotlicht unmittelbar nur geringe Auswirkungen auf die Aktivität der Gerinnungsfaktoren bzw. Inhibitoren hat. Die Aktivität von FVIII und FV zeigte die stärksten Verluste, die Globaltests Quick-Wert/INR, aPTT, Thrombingenerierungspotential und ProC-Global NR blieben innerhalb der vorgegebenen Referenzwertgrenzen. Es ergeben sich somit keine relevanten Auswirkungen auf die pro- und antikoagulatorische Kapazität des gesamten Gerinnungssystems direkt nach der MB/Rotlicht-Behandlung von aufgetautem GFP. Diese Ergebnisse sind gut mit den Resultaten anderer Studien über die Pathogenreduktion mit MB/Rotlicht von GFP vergleichbar^{26,52}. Garwood et al. zeigten 2003, dass sich das MB/Rotlicht-Verfahren bei Frischplasma weniger negativ auf die Gerinnungsfaktorenaktivität auswirkt, als bei aufgetautem gefrorenem Frischplasma¹⁸. Cardigan et al. berichten von einer Reduktion des ETPs unmittelbar nach MB/Rotlicht-Behandlung von aufgetautem GFP⁴⁴. Weitere Autoren beschrieben eine Verkürzung der „time to peak“ infolge der Pathogenreduktion mit MB/Rotlicht^{45,46}, wie es auch in der vorliegenden Arbeit beobachtet werden konnte. Unterschiede im Aufbereitungsprozess der Plasmakonserven, der Thrombozytengehalt in der jeweiligen Plasmaprobe während der Messungen, Lagerbedingungen des Plasmas

vor dem Auftauprozess und die genutzten Reagenzien zur Messung des ETP können für die leicht unterschiedlichen Messwerte in den genannten Studien ursächlich sein^{53,54}. Die Pathogenreduktion mit MB/Rotlicht ist nach den Ergebnissen der vorliegenden Validierungsstudie eine mögliche Option, innerhalb weniger Stunden die Vorräte an therapeutischem Plasma im Falle eines erhöhten Bedarfs oder Mangels an zur Verfügung stehenden quarantänegegelagerten Konserven, aufzufüllen. Dies steigert die Flexibilität von Blutbanken bei der Bereitstellung von Plasma, insbesondere von Zentren, die ihre Patienten vorrangig mit Quarantäneplasma versorgen. Dennoch sind die Gerinnungsfaktoren bei der 4 °C-Lagerung über 7 Tage von aufgetautem MB/Rotlicht behandeltem GFP stärker beeinträchtigt als in aufgetautem, unbehandeltem und bei 4 °C gelagertem GFP. Vorangegangene Studien berichteten zwar über tolerierbare Messwerte für Gerinnungsfaktorenaktivität⁵⁵ und Thrombinbildung⁴⁴ nach 24-stündiger Lagerung von aufgetautem, MB/Rotlicht behandeltem GFP, eine Verlängerung der Lagerdauer auf bis zu 7 Tage kann jedoch nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit nicht empfohlen werden.

Interessanterweise kam es unter Kühllagerung in 20 % der unbehandelten und 64 % der MB/Rotlicht behandelten Plasmen zu einer Aktivitätszunahme von FVII. Suontaka et al. zeigten anhand der Kühllagerung (2-5 °C) von 100 Plasmen über 28-42 Tage, dass es mit zunehmender Lagerungsdauer zu einer kältebedingten Aktivierung des Gerinnungs- und Kontaktsystems kommt. Es wurde u.a. eine steigende FVIIa-Aktivität in 5 % der Plasmen an Tag 7, 18 % an Tag 28 und 49 % an Tag 42 beobachtet⁵⁶. Auffallend waren große individuelle Unterschiede der FVIIa-Aktivität der Spender zu Untersuchungsbeginn, wie es auch in der vorliegenden Arbeit der Fall ist. Dass es nach Behandlung mit MB/Rotlicht in weitaus mehr Plasmen zu einer gesteigerten FVII-Aktivität kommt verglichen mit unbehandelten, kühl gelagerten Plasmen, wurde bisher nicht beschrieben. Es wird angenommen, dass die Behandlung mit MB/Rotlicht den tissue factor pathway inhibitor (TFPI) beeinträchtigt. Der TFPI inhibiert durch Interaktion sowohl mit FVII als auch FX die Aktivierung der extrinsischen Gerinnungskaskade⁵⁷⁻⁵⁹. Durch Inhibition des TFPI steigt konsekutiv die Aktivität von FVII und FX an. Weitere Studien sind notwendig, um den molekularen Mechanismus dieser Beobachtung zu untersuchen. Möglich ist auch eine gesteigerte Aktivierung von FVII an der Oberfläche des BLUEFLEX®-Filters des MB-Beutelsystems. Garwood et al. beschrieben eine leichte Zunahme der FVII-Aktivität nach MB-Filtration¹⁸. Die

Ergebnisse dieser Arbeit weisen darauf hin, dass eine erhöhte FVII-Aktivität sowohl mit einer gesteigerten FVIIa-Aktivität als auch mit einer kürzeren „lag time“ und „time to peak“ einhergeht. Die Gerinnungsaktivierung bzw. -geschwindigkeit nimmt demnach zu. Bildlich gesprochen kommt es zu einer Linksverschiebung der Thrombinbildungskurve mit steilerem Anstieg²⁵. Ob eine stark gesteigerte FVIIa-Aktivität mit einem erhöhten thrombogenen Risiko einhergeht, ist unklar und kann anhand der vorliegenden Ergebnisse nicht geklärt werden, da die Stichprobe zur FVIIa-Analyse zu klein war. Helfend können zur Klärung dieser Frage zahlreiche Studien, die das Auftreten thrombembolischer Komplikationen nach Gabe von rekombinantem aktiviertem FVII (rFVIIa) untersuchen, hinzugezogen werden. rFVIIa wird zur Behandlung der Hemmkörperhämophilie, erworbenen Hämophilie, bei angeborenem FVII-Mangel und der Glanzmann Thrombasthenie verwendet und zunehmend für zulassungsüberschreitende Anwendungen (off-label use) bei Patienten mit lebensbedrohlichen Blutungen genutzt. Gallistl et al. beobachteten in vitro nach Gabe von rFVIIa keine Zunahme des ETP⁶⁰. Neufeld et al. veröffentlichten, dass es nach Gabe von ca. 5,4 Millionen Standarddosen des rFVIIa für alle zugelassenen Indikationen (s.o.) in einem Zeitraum von 1996-2016 zu 249 thrombembolischen Ereignissen (~0,005 %) kam⁶¹. Cameron et al. fassten in einer großen retrospektiven Auswertung (n = 694) aus dem „Australian and New Zealand Haemostasis Register“ zusammen, dass 4 % von Nicht-Hämophilie-Patienten mit lebensbedrohlicher Blutung ein thrombembolisches Ereignis entwickelten, welches wahrscheinlich oder möglicherweise in Verbindung mit der Gabe von rFVIIa steht. Insbesondere traten thrombembolische Komplikationen in der Gruppe mit kardiochirurgischen Eingriffen auf⁶². Randomisierte kontrollierte Studien stehen aus. Das bisher dokumentierte geringe Auftreten thrombembolischer Komplikationen nach Gabe von rFVIIa wird seinem speziellen Wirkmechanismus zugeschrieben: FVIIa kann nur im Komplex mit dem Gewebefaktor (tissue factor, TF, auch FIII genannt) seine volle hämostatische Wirksamkeit durch Aktivierung von FIX und FX entfalten⁶³. TF kommt in zahlreichen Geweben vor, subendothelial in besonders hohen Konzentrationen. Darüber hinaus wird er von verschiedenen Zellen exprimiert, z. B. Thrombozyten und Endothelzellen, ist jedoch in deren Zellmembran irreversibel verankert. Erst bei Kontakt mit zirkulierendem Blut, kann sich der hämostatisch wirksame TF-FVIIa-Komplex bilden, jedoch erfolgt durch die strenge Lokalisierung und

Immobilisierung des TF-FVIIa-Komplexes die Gerinnungsaktivierung nach rFVIIa-Gabe am Ort der Gefäßverletzung und eine unerwünschte systemische Ausweitung wird verhindert⁶⁴. Ein erhöhtes thrombogenes Risiko haben Patienten bei Vorliegen zusätzlicher Risikofaktoren. Beispielsweise führen freiwerdende inflammatorische Zytokine im Rahmen einer Sepsis zu einer vermehrten TF-Expriemierung auf Endothelzellen und somit zur Prokoagulation⁶³. Zusammenfassend ist theoretisch bei einer isolierten Erhöhung von FVIIa in Therapieplasma nicht von einem erhöhten thrombembolischen Risiko auszugehen. Untersuchungen an einem größeren Patientenkollektiv unter Berücksichtigung klinischer Symptome können helfen, diese Hypothese weiter zu untermauern.

Während eine Flüssigplasmabank logistische Vorteile bietet, besteht jedoch das Risiko mikrobiellen Wachstums in den Plasmakonserven. Die praktischen Erfahrungen in der Routinelagerung von Erythrozytenkonzentraten, welche unter gleichen Lagerbedingungen über weitaus längere Zeit gelagert werden, zeigen, dass das Risiko mikrobiellen Wachstums bei 4 °C verhältnismäßig gering ist. Reichenberg et al. zeigten, dass durch die Prozessierung von Plasma im Rahmen des Pathogenreduktionsverfahrens mit MB/Rotlicht unter Nutzung des THERAFLEX® MB Systems die Belastung mit transfusionsrelevanten Pathogenen bis unterhalb der Nachweisgrenze verringert wird⁶⁵.

Bei der Beurteilung der gewonnenen Ergebnisse sollte beachtet werden, dass es sich hierbei ausschließlich um eine *in vitro* Studie handelt. Es ist keine Aussage über die therapeutische Effektivität von aufgetautem unbehandeltem bzw. MB/Rotlicht behandeltem und über 7 Tage bei verschiedenen Temperaturen gelagertem GFP möglich. Dies gilt insbesondere für pathogenreduziertes Plasma, da klinische Untersuchungen eine reduzierte Effektivität von MB/Rotlicht behandeltem GFP zeigten⁶⁶, während andere von einem sicheren und effektiven Gebrauch von MB/Rotlicht behandelten Plasmaprodukten berichten^{13,67}.

Therapeutisches Plasma wird sowohl durch Plasmapherese (AP = plasma collected by automated apheresis) als auch durch Zentrifugation aus Vollblut (RP = recovered plasma) gewonnen. Beeck und Runkel et al. wiesen signifikant höhere Aktivitäten der Gerinnungsfaktoren V, VIII, IX und XI in AP im Vergleich zu RP nach^{9,68}. Dies wird unter anderem auf die stärkere Verdünnung des RP durch die im Plasmabeutel

enthaltene Citratlösung im Vergleich zu AP zurückgeführt. Zudem ist die Zeit bis zum Tieffrieren bei RP aufgrund der weiteren Prozessierung inklusive Ruhezeit, Leukozytenfiltration und Zentrifugation länger im Vergleich zu AP. So beträgt die Zeit von der Spende bis zum Tieffrieren bei AP bis zu 6 h und bei RP bis zu 8 Stunden. Vollblut wird während dieser Zeit üblicherweise bei Raumtemperatur und nicht gekühlt gelagert, weil dies Voraussetzung für die Herstellung von Thrombozytenkonzentraten aus Vollblut ist. Runkel et al. zeigten, dass es in RP nach einer prolongierten Lagerung bei Raumtemperatur (15 vs. 3 h von der Spende bis zum Tieffrieren) zu einem verstärkten Verlust der Gerinnungsfaktoren VIII und XI sowie des Inhibitors Protein S kommt⁹. Die findet Übereinstimmung zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit mit unter Raumtemperatur signifikanter Reduktion der Aktivität aller Gerinnungsfaktoren, insbesondere FVII, FVIII und des Inhibitors Protein S⁴⁷. Zusammenfassend wird daher empfohlen, das Zeitintervall der Lagerung bei Raumtemperatur nach der Spende bis zum ersten Tieffrieren von RP und AP möglichst kurz zu halten. Ob auch Plasma aus Vollblut für eine Flüssigplasmabank geeignet ist, sollte im Rahmen einer weiteren Validierungsstudie als Entscheidungsgrundlage untersucht werden.

Abschließend wird darauf hingewiesen, dass in den USA Plasma bei -18 °C tiefgekühlt gelagert wird, während in dieser Studie Plasma untersucht wurde, welches vor dem ersten Auftauen bei -30 °C gelagert wurde. Da sich zwischen einer Lagerung bei -20 °C und -40 °C keine Unterschiede in der Plasmaqualität ergeben⁶⁹, sind die Ergebnisse dieser Studie auch für Blutbanken der USA geeignet.

In dieser Studie wurde erstmals die Massenspektrometrie (LC-ESI MS/MS) zur Proteomanalyse von Plasma genutzt. Es konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit MB/Rotlicht in der Kombination mit 7-tägiger Kühlung zu einer signifikanten Reduktion des vWF in der Proteomanalyse und im Labortest führt. Eine mögliche Erklärung der Reduktion des vWF ist die Aktivierung der ADAMTS-13 im Rahmen der MB/Rotlicht-Behandlung. ADAMTS-13 spaltet vWF-Multimere. Messungen der ADAMTS-13 nach längeren Lagerungsperioden vergleichbar zu dieser Studie sind bisher nicht erfolgt. Zur weiteren Klärung wäre eine Multimeren-Analyse des vWFs sinnvoll. Auch Crettaz et al. untersuchten den Einfluss der MB/Rotlicht-Behandlung auf das Plasmaproteom: Durch die Kombination der 2D-Gelelektrophorese und

Massenspektrometrie konnten lediglich unter hohen Konzentrationen von MB (50 µM) in Kombination mit einer verlängerten Belichtungszeit (3 Stunden) komplexe Veränderungen von Plasmaproteinen, wie Transthyretin, Apolipoprotein A-I und der gamma-Kette von Fibrinogen beobachtet werden. Im Gegensatz dazu zeigten sich unter normalen MB-Konzentrationen (1 µM), wie sie bei der Pathogenreduktion verwendet werden, keine höhergradigen Veränderungen des Plasmaproteoms³³. Darüber hinaus zeigte sich massenspektrometrisch nach Lagerung von GFP bei Raumtemperatur über 7 Tage eine Zunahme von Kininogen und FXII. Weil insbesondere Peptide der schweren Kette von Kininogen nachgewiesen wurden, könnte es sich auch um ein Spaltprodukt dessen handeln. Hochmolekulares Kininogen (HMWK oder Fitzgerald-Faktor) führt als Kofaktor der endogenen Gerinnungskaskade zur Aktivierung von FXII⁷⁰. Eine Erklärung für diese Beobachtung wäre eine verstärkte Aktivierung von FXII durch Spaltung von Kininogen zu Bradykinin. Dies wiederum führt durch den aktivierten FXII (FXIIa) im Rahmen eines negativen Feedback-Mechanismus zum vermehrten Auftreten von Kininogenspaltprodukten^{70,71}. Zusammenfassend kann die Proteomanalyse eine sinnvolle Ergänzung zu den bislang etablierten Methoden der Qualitätskontrolle von Blutprodukten sein^{28,32}. Durch dieses Verfahren wurden in dieser Arbeit zusätzliche Informationen zur Auswirkung von Lagerung und Pathogenreduktion auf therapeutisches Plasma gewonnen, welches verschiedenen Lagerungs- und Behandlungsbedingungen ausgesetzt wurde.

Bei der Beurteilung der folgenden Arbeit sollten folgende Limitationen berücksichtigt werden. Zunächst wurde als Validierungsgrundlage zur Machbarkeit einer Flüssigplasmabank lediglich Aphereseplasma verwendet. Es wird empfohlen eine ergänzende Untersuchung mit Vollblutplasma durchzuführen. Diese Studie untersuchte das Therapieplasma *in vitro*. Eine klinische Studie zur Untersuchung der Wirksamkeit von in einer Flüssigplasmabank gelagertem Plasma ist notwendig. Des Weiteren wurde in dieser Arbeit nicht der Einfluss von in den Beutelsystemen verwendeten Weichmachern auf die Gerinnungsfaktoraktivität bzw. deren Toxizität untersucht. Ein viel verwendeter Weichmacher ist z. B. Di(2-ethylhexyl)phthalat (DEHP). Sheffield et al. zeigten, dass der Gehalt von DEHP in aufgetautem therapeutischem Plasma während der Lagerung bei 2-6 °C über 5 Tage je nach

Hersteller unterschiedlich stark ansteigt, sich hinsichtlich der Gerinnungsfaktoraktivität jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den Beutelsystemen ergaben⁷².

Die Proteomanalyse gewann in der Vergangenheit zunehmende Bedeutung in der Untersuchung von Blutprodukten. Dennoch ist die Beuteilbarkeit von Studienergebnissen infolge fehlender einheitlicher Standards eingeschränkt. Robuste, reproduzierbare Arbeitsabläufe in der präanalytischen Probenvorbereitung und Durchführung der proteomanalytischen Experimente sind, ebenso wie Wege der Interpretation proteomanalytischer Daten, in der Entwicklung²⁷.

5 Zusammenfassung

Sowohl die Lagerung von therapeutischem Plasma nach dem Auftauen als auch die Pathogenreduktion mit MB/Rotlicht beeinflussen die pro- und antikoagulatorische Kapazität. Diese Veränderungen können durch die Messung der Aktivität von Gerinnungsfaktoren und Inhibitoren sowie die Durchführung von Globaltests, einschließlich neuer Messmethoden wie ProC®-Global-Test und endogenes Thrombinbildungspotential, detektiert werden. Die Massenspektrometrie stellt eine sinnvolle Ergänzung dieser Funktionstests dar, um Effekte auf das Plasmaproteom zu untersuchen.

Diese Studie zeigt zwei Möglichkeiten auf, die Patientenversorgung mit therapeutischem Plasma zu optimieren. Erstens konnte gezeigt werden, dass die Flüssiglagerung von Plasma bei 2-6 °C über 7 Tage ohne größere Einbußen der Gerinnungsfaktorenaktivität, mit Ausnahme von FVIII, machbar ist. Damit kann die Etablierung einer Flüssigplasmabank gerechtfertigt werden. Es ist eine zügige Bereitstellung von therapeutischem Plasma im Notfall, dank Einsparung der Zeit für den Auftauprozess, möglich. Zweitens konnte gezeigt werden, dass therapeutisches Plasma bei Versorgungsengpässen vorzeitig aus der Quarantänelagerung gelöst und ergänzend mit MB/Rotlicht behandelt werden kann, um die gewohnte Sicherheit zu gewährleisten. Im Gegensatz dazu wird die Lagerung von therapeutischem Plasma bei Raumtemperatur oder von MB/Rotlicht behandeltem Plasma bei 2-6 °C über 7 Tage aufgrund der ausgeprägten Reduktion der Aktivität der Gerinnungsfaktoren und Inhibitoren nicht empfohlen.

Zur Etablierung einer Flüssigplasmabank wird vorgeschlagen, lediglich eine kleine Anzahl von Plasmakonserven (z. B. 4 Plasmakonserven jeder Blutgruppe à 250 mL) bei 2-6 °C über maximal 7 Tage bereitzuhalten, um im Blutungsnotfall eine unverzügliche Versorgung von Patienten zu ermöglichen. Patienten, die darüber hinaus Plasmakonserven benötigen, sollten im weiteren Verlauf mit frisch aufgetautem GFP versorgt werden. So wird eine möglichst hohe Aktivität der Gerinnungsfaktoren und Inhibitoren gewährleistet.

Es werden klinische Studien benötigt, um die *in vitro* beobachteten Veränderungen der Gerinnungsfaktoren in Plasmaprodukten *in vivo* zu untersuchen.

6 Literaturverzeichnis

- 1 Petros S. Trauma-Induced Coagulopathy. *Hamostaseologie* 2019; 39: 20–27.
- 2 Spahn DR, Bouillon B, Cerny V, Coats TJ, Duranteau J, Fernández-Mondéjar E, Filipescu D, Hunt BJ, Komadina R, Nardi G, Neugebauer E, Ozier Y, Riddez L, Schultz A, Vincent J-L, Rossaint R. Management of bleeding and coagulopathy following major trauma: an updated European guideline. *Critical care (London, England)* 2013; 17: R76.
- 3 Rossaint R, Bouillon B, Cerny V, Coats TJ, Duranteau J, Fernández-Mondéjar E, Filipescu D, Hunt BJ, Komadina R, Nardi G, Neugebauer EAM, Ozier Y, Riddez L, Schultz A, Vincent J-L, Spahn DR. The European guideline on management of major bleeding and coagulopathy following trauma: fourth edition. *Critical care (London, England)* 2016; 20: 100.
- 4 Querschnitts-Leitlinien zur Therapie mit Blutkomponenten und Plasmaderivaten. 4., aktualisierte und überarb. Aufl. Deutscher Ärzte-Verlag, Köln 2015.
- 5 Gonzalez EA, Moore FA, Holcomb JB, Miller CC, Kozar RA, Todd SR, Cocanour CS, Balldin BC, McKinley BA. Fresh frozen plasma should be given earlier to patients requiring massive transfusion. *The Journal of trauma* 2007; 62: 112–119.
- 6 Holcomb JB, Wade CE, Michalek JE, Chisholm GB, Zarzabal LA, Schreiber MA, Gonzalez EA, Pomper GJ, Perkins JG, Spinella PC, Williams KL, Park MS. Increased plasma and platelet to red blood cell ratios improves outcome in 466 massively transfused civilian trauma patients. *Annals of surgery* 2008; 248: 447–458.
- 7 Holcomb JB, Tilley BC, Baraniuk S, Fox EE, Wade CE, Podbielski JM, del Junco DJ, Brasel KJ, Bulger EM, Callcut RA, Cohen MJ, Cotton BA, Fabian TC, Inaba K, Kerby JD, Muskat P, O’Keeffe T, Rizoli S, Robinson BRH, Scalea TM, Schreiber MA, Stein DM, Weinberg JA, Callum JL, Hess JR, Matijevic N, Miller CN, Pittet J-F, Hoyt DB, Pearson GD, Leroux B, van Belle G. Transfusion of Plasma, Platelets, and Red Blood Cells in a 1:1:1 vs a 1:1:2 Ratio and Mortality in Patients With Severe Trauma: The PROPPR Randomized Clinical Trial. *JAMA* 2015; 313: 471–482.
- 8 Holcomb JB, del Junco DJ, Fox EE, Wade CE, Cohen MJ, Schreiber MA, Alarcon LH, Bai Y, Brasel KJ, Bulger EM, Cotton BA, Matijevic N, Muskat P, Myers JG, Phelan HA, White CE, Zhang J, Rahbar MH. The Prospective, Observational, Multicenter, Major Trauma Transfusion (PROMTTT) Study: Comparative Effectiveness of a Time-varying Treatment with Competing Risks. *JAMA surgery* 2013; 148: 127–136.
- 9 Runkel S, Haubelt H, Hitzler W, Hellstern P. The quality of plasma collected by automated apheresis and of recovered plasma from leukodepleted whole blood. *Transfusion* 2005; 45: 427–432.

- 10 Richtlinie zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten (Richtlinie Hämotherapie), Gesamtnovelle 2017.
<https://www.bundesaerztekammer.de/aerzte/medizin-ethik/wissenschaftlicher-beirat/veroeffentlichungen/haemotherapie-transfusionsmedizin/richtlinie/>, Zugriff: 22.09.2018.
- 11 AABB. Circular of Information for the Use of Human Blood and Blood Components.
- 12 Scott E, Puca K, Heraly J, Gottschall J, Friedman K. Evaluation and comparison of coagulation factor activity in fresh-frozen plasma and 24-hour plasma at thaw and after 120 hours of 1 to 6°C storage. *Transfusion* 2009; 49: 1584–1591.
- 13 Seghatchian J, Struff WG, Reichenberg S. Main Properties of the THERAFLEX MB-Plasma System for Pathogen Reduction. *Transfusion medicine and hemotherapy : offizielles Organ der Deutschen Gesellschaft für Transfusionsmedizin und Immunhamatologie* 2011; 38: 55–64.
- 14 Seghatchian J. What is happening? Are the current acceptance criteria for therapeutic plasma adequate? *Transfusion and apheresis science : official journal of the World Apheresis Association : official journal of the European Society for Haemapheresis* 2004; 31: 67–73.
- 15 Specific Specifications for Blood Components in Guidelines for the Blood Transfusion Services in the United Kingdom, 8th edition. Fresh Frozen Plasma, Neonatal Use, Methylene Blue Treated and Removed, Leucocyte Depleted.
<https://www.transfusionguidelines.org/red-book/chapter-7-specifications-for-blood-components/7-27-fresh-frozen-plasma-neonatal-use-methylene-blue-treated-and-removed-leucocyte-depleted>, Zugriff: 22.01.2019.
- 16 Little AD. National Toxicology Program. Executive summary of safety and toxicity information: methylene blue. Cambridge, MA 1990.
- 17 Williamson LM, Cardigan R, Prowse CV. Methylene blue-treated fresh-frozen plasma: what is its contribution to blood safety? *Transfusion* 2003; 43: 1322–1329.
- 18 Garwood M, Cardigan RA, Drummond O, Hornsey VS, Turner CP, Young D, Williamson LM, Prowse CV. The effect of methylene blue photoinactivation and methylene blue removal on the quality of fresh-frozen plasma. *Transfusion* 2003; 43: 1238–1247.
- 19 Heymann C von, Keller MK, Spies C, Schuster M, Meinck K, Sander M, Wernecke K-D, Kiesewetter H, Pruss A. Activity of clotting factors in fresh-frozen plasma during storage at 4 degrees C over 6 days. *Transfusion* 2009; 49: 913–920.
- 20 Downes KA, Wilson E, Yomtovian R, Sarode R. Serial measurement of clotting factors in thawed plasma stored for 5 days. *Transfusion* 2001; 41: 570.
- 21 Gosselin RC, Marshall C, Dwyre DM, Gresens C, Davis D, Scherer L, Taylor D. Coagulation profile of liquid-state plasma. *Transfusion* 2013; 53: 579–590.
- 22 Lamboo M, Poland DCW, Eikenboom JCJ, Harvey MS, Groot E, Brand A, Vries RRP de. Coagulation parameters of thawed fresh-frozen plasma during storage

- at different temperatures. *Transfusion medicine* (Oxford, England) 2007; 17: 182–186.
- 23 Sidhu RS, Le T, Brimhall B, Thompson H. Study of coagulation factor activities in apheresed thawed fresh frozen plasma at 1-6 degrees C for five days. *Journal of clinical apheresis* 2006; 21: 224–226.
 - 24 Yazer MH, Cortese-Hassett A, Triulzi DJ. Coagulation factor levels in plasma frozen within 24 hours of phlebotomy over 5 days of storage at 1 to 6 degrees C. *Transfusion* 2008; 48: 2525–2530.
 - 25 Thiele T, Hron G, Kellner S, Wasner C, Westphal A, Warkentin TE, Greinacher A, Selleng K. Thrombin generation, ProC(®)Global, prothrombin time and activated partial thromboplastin time in thawed plasma stored for seven days and after methylene blue/light pathogen inactivation. *Blood transfusion = Trasfusione del sangue* 2016; 14: 66–72.
 - 26 Zeiler T, Riess H, Wittmann G, Hintz G, Zimmermann R, Müller C, Heuft HG, Huhn D. The effect of methylene blue phototreatment on plasma proteins and in vitro coagulation capability of single-donor fresh-frozen plasma. *Transfusion* 1994; 34: 685–689.
 - 27 Thiele T, Steil L, Völker U, Greinacher A. Transfusion medicine and proteomics. Alliance or coexistence? *Blood transfusion = Trasfusione del sangue* 2010; 8 Suppl 3: s16-25.
 - 28 Thiele T, Steil L, Völker U, Greinacher A. Proteomics of blood-based therapeutics: a promising tool for quality assurance in transfusion medicine. *BioDrugs : clinical immunotherapeutics, biopharmaceuticals and gene therapy* 2007; 21: 179–193.
 - 29 Steil L, Thiele T, Hammer E, Bux J, Kalus M, Völker U, Greinacher A. Proteomic characterization of freeze-dried human plasma: providing treatment of bleeding disorders without the need for a cold chain. *Transfusion* 2008; 48: 2356–2363.
 - 30 Clifton JG, Huang F, Kovac S, Yang X, Hixson DC, Josic D. Proteomic characterization of plasma-derived clotting factor VIII-von Willebrand factor concentrates. *Electrophoresis* 2009; 30: 3636–3646.
 - 31 Clifton J, Huang F, Gaso-Sokac D, Brilliant K, Hixson D, Josic D. Use of proteomics for validation of the isolation process of clotting factor IX from human plasma. *Journal of proteomics* 2010; 73: 678–688.
 - 32 Brigulla M, Thiele T, Scharf C, Breitner-Ruddock S, Venz S, Völker U, Greinacher A. Proteomics as a tool for assessment of therapeutics in transfusion medicine: evaluation of prothrombin complex concentrates. *Transfusion* 2006; 46: 377–385.
 - 33 Crettaz D, Sensebe L, Vu D-H, Schneider P, Depasse F, Bienvenut W-V, Quadroni M, Tissot J-D. Proteomics of methylene blue photo-treated plasma before and after removal of the dye by an absorbent filter. *Proteomics* 2004; 4: 881–891.
 - 34 Tissot JD, Hochstrasser DF, Schneider B, Morgenthaler JJ, Schneider P. No evidence for protein modifications in fresh frozen plasma after photochemical

- treatment: an analysis by high-resolution two-dimensional electrophoresis. *British journal of haematology* 1994; 86: 143–146.
- 35 Omenn GS, States DJ, Adamski M, Blackwell TW, Menon R, Hermjakob H, Apweiler R, Haab BB, Simpson RJ, Eddes JS, Kapp EA, Moritz RL, Chan DW, Rai AJ, Admon A, Aebersold R, Eng J, Hancock WS, Hefta SA, Meyer H, Paik Y-K, Yoo J-S, Ping P, Pounds J, Adkins J, Qian X, Wang R, Wasinger V, Wu CY, Zhao X, Zeng R, Archakov A, Tsugita A, Beer I, Pandey A, Pisano M, Andrews P, Tammen H, Speicher DW, Hanash SM. Overview of the HUPO Plasma Proteome Project: results from the pilot phase with 35 collaborating laboratories and multiple analytical groups, generating a core dataset of 3020 proteins and a publicly-available database. *Proteomics* 2005; 5: 3226–3245.
 - 36 Ahmed N, Barker G, Oliva K, Garfin D, Talmadge K, Georgiou H, Quinn M, Rice G. An approach to remove albumin for the proteomic analysis of low abundance biomarkers in human serum. *Proteomics* 2003; 3: 1980–1987.
 - 37 (PDF) Agilent Multiple Affinity Removal System for the Depletion of High-Abundant Proteins from Human Serum - A New Technology from Agilent Application.
https://www.researchgate.net/publication/238674319_Agilent_Multiple_Affinity_Removal_System_for_the_Depletion_of_High-Abundant_Proteins_from_Human_Serum_-_A_New_Technology_from_Agilent_Application, Zugriff: 05.10.2019.
 - 38 Görg A, Weiss W, Dunn MJ. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics* 2004; 4: 3665–3685.
 - 39 Tripodi A, Legnani C, Chantarangkul V, Cosmi B, Palareti G, Mannucci PM. High thrombin generation measured in the presence of thrombomodulin is associated with an increased risk of recurrent venous thromboembolism. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 2008; 6: 1327–1333.
 - 40 Tripodi A, Branchi A, Chantarangkul V, Clerici M, Merati G, Artoni A, Mannucci PM. Hypercoagulability in patients with type 2 diabetes mellitus detected by a thrombin generation assay. *Journal of thrombosis and thrombolysis* 2011; 31: 165–172.
 - 41 Hron G, Kollars M, Binder BR, Eichinger S, Kyrle PA. Identification of patients at low risk for recurrent venous thromboembolism by measuring thrombin generation. *JAMA* 2006; 296: 397–402.
 - 42 Saibeni S, Saladino V, Chantarangkul V, Villa F, Bruno S, Vecchi M, Franchis R de, Sei C, Tripodi A. Increased thrombin generation in inflammatory bowel diseases. *Thrombosis research* 2010; 125: 278–282.
 - 43 Cookson P, Lawrie A, Green L, Dent E, Proffitt S, Bashir S, Thomas S, Cardigan R. Thrombin generation and coagulation factor content of thawed plasma and platelet concentrates. *Vox sanguinis* 2015; 108: 160–168.
 - 44 Cardigan R, Philpot K, Cookson P, Luddington R. Thrombin generation and clot formation in methylene blue-treated plasma and cryoprecipitate. *Transfusion* 2009; 49: 696–703.

- 45 Gravemann U, Kusch M, Koenig H, Mohr H, Mueller TH. Thrombin Generation Capacity of Methylene Blue-Treated Plasma Prepared by the Theraflex MB Plasma System. *Transfusion medicine and hemotherapy : offizielles Organ der Deutschen Gesellschaft fur Transfusionsmedizin und Immunhamatologie* 2009; 36: 122–127.
- 46 Coene J, Devreese K, Sabot B, Feys HB, Vandekerckhove P, Compernelle V. Paired analysis of plasma proteins and coagulant capacity after treatment with three methods of pathogen reduction. *Transfusion* 2014; 54: 1321–1331.
- 47 Thiele T, Kellner S, Hron G, Wasner C, Nauck M, Zimmermann K, Wessel A, Warkentin TE, Greinacher A, Selleng K. Storage of thawed plasma for a liquid plasma bank: impact of temperature and methylene blue pathogen inactivation. *Transfusion* 2012; 52: 529–536.
- 48 Matijevic N, Kostousov V, Wang Y-WW, Wade CE, Wang W, Letourneau P, Hartwell E, Kozar R, Ko T, Holcomb JB. Multiple levels of degradation diminish hemostatic potential of thawed plasma. *The Journal of trauma* 2011; 70: 71-9; discussion 79-80.
- 49 Hess JR, Holcomb JB, Hoyt DB. Damage control resuscitation: the need for specific blood products to treat the coagulopathy of trauma. *Transfusion* 2006; 46: 685–686.
- 50 Cardigan R, Green L. Thawed and liquid plasma--what do we know? *Vox sanguinis* 2015; 109: 1–10.
- 51 Norda R, Knutson F, Berseus O, Akerblom O, Nilsson-Ekdahl K, Stegmayr B, Nilsson B. Unexpected effects of donor gender on the storage of liquid plasma. *Vox sanguinis* 2007; 93: 223–228.
- 52 Hornsey VS, Drummond O, Young D, Docherty A, Prowse CV. A potentially improved approach to methylene blue virus inactivation of plasma: the Maco Pharma Maco-Tronic system. *Transfusion medicine (Oxford, England)* 2001; 11: 31–36.
- 53 Gerotziapas GT, Depasse F, Busson J, Leflem L, Elalamy I, Samama MM. Towards a standardization of thrombin generation assessment: the influence of tissue factor, platelets and phospholipids concentration on the normal values of Thrombogram-Thrombinoscope assay. *Thrombosis journal* 2005; 3: 16.
- 54 Matijevic N, Wang Y-WW, Kostousov V, Wade CE, Vijayan KV, Holcomb JB. Decline in platelet microparticles contributes to reduced hemostatic potential of stored plasma. *Thrombosis research* 2011; 128: 35–41.
- 55 Osselaer J-C, Debry C, Goffaux M, Pineau J, Calomme G, Dubuc E, Chatelain B, Vandendaele M-C, Hsu J, Rheinschmidt M, Lin L. Coagulation function in fresh-frozen plasma prepared with two photochemical treatment methods: methylene blue and amotosalen. *Transfusion* 2008; 48: 108–117.
- 56 A. M. Suontaka, A. Silveira, T. Söderström, M. Blombäck. Occurrence of cold activation of transfusion plasma during storage at +4 °C. *Vox sanguinis* 2005; 88: 172–180.

- 57 Rapaport SI. Inhibition of factor VIIa/tissue factor-induced blood coagulation: with particular emphasis upon a factor Xa-dependent inhibitory mechanism. *Blood* 1989; 73: 359–365.
- 58 Chand HS, Foster DC, Kisiel W. Structure, function and biology of tissue factor pathway inhibitor-2. *Thrombosis and haemostasis* 2005; 94: 1122–1130.
- 59 Lwaleed BA, Bass PS. Tissue factor pathway inhibitor: structure, biology and involvement in disease. *The Journal of pathology* 2006; 208: 327–339.
- 60 Gallistl S, Cvirn G, Muntean W. Recombinant factor VIIa does not induce hypercoagulability in vitro. *Thrombosis and haemostasis* 1999; 81: 245–249.
- 61 Neufeld EJ, Négrier C, Benchikh El Fegoun S, Cooper DL, Rojas-Rios A, Seremetis S. Recombinant activated factor VII in approved indications: Update on safety. *Haemophilia : the official journal of the World Federation of Hemophilia* 2018; 24: e275-e277.
- 62 Isbister J, Phillips L, Dunkley S, Jankelowitz G, McNeil J, Cameron P. Recombinant activated factor VII in critical bleeding: experience from the Australian and New Zealand Haemostasis Register. *Internal medicine journal* 2008; 38: 156–165.
- 63 Witkowski M, Landmesser U, Rauch U. Tissue factor as a link between inflammation and coagulation. *Trends in cardiovascular medicine* 2016; 26: 297–303.
- 64 Heuer L, Blumenberg D. Rekombinanter Faktor VIIa (NovoSeven). Ein Überblick über aktuelle und mögliche zukünftige Indikationen. *Der Anaesthetist* 2002; 51: 388–399.
- 65 Reichenberg S, Gravemann U, Sumian C, Seltsam A. Challenge study of the pathogen reduction capacity of the THERAFLEX MB-Plasma technology. *Vox sanguinis* 2015; 109: 129–137.
- 66 del Río-Garma J, Alvarez-Larrán A, Martínez C, Muncunill J, Castellà D, La Rubia J de, Zamora C, Corral M, Viejo A, Peña F, Rodríguez-Vicente P, Contreras E, Arbona C, Ramírez C, Garcia-Erce JA, Alegre A, Mateo J, Pereira A. Methylene blue-photoinactivated plasma versus quarantine fresh frozen plasma in thrombotic thrombocytopenic purpura: a multicentric, prospective cohort study. *British journal of haematology* 2008; 143: 39–45.
- 67 Noens L, Vilariño MD, Megalou A, Qureshi H. International, prospective haemovigilance study on methylene blue-treated plasma. *Vox sanguinis* 2017; 112: 352–359.
- 68 Beeck H, Becker T, Kiessig ST, Kaeser R, Wolter K, Hellstern P. The influence of citrate concentration on the quality of plasma obtained by automated plasmapheresis: a prospective study. *Transfusion* 1999; 39: 1266–1270.
- 69 Koerner K, Stampe D. Die Stabilität von Faktoren des Gerinnungssystems im tiefgefrorenen Frischplasma während der Lagerung bei -20 grade C und -40 grade C. *Infusionstherapie und klinische Ernährung* 1984; 11: 46–50.

- 70 Schmaier AH. The contact activation and kallikrein/kinin systems: pathophysiologic and physiologic activities. *Journal of thrombosis and haemostasis* : JTH 2016; 14: 28–39.
- 71 Didiasova M, Wujak L, Schaefer L, Wygrecka M. Factor XII in coagulation, inflammation and beyond. *Cellular signalling* 2018; 51: 257–265.
- 72 Sheffield WP, Bhakta V, Mastronardi C, Ramirez-Arcos S, Howe D, Jenkins C. Changes in coagulation factor activity and content of di(2-ethylhexyl)phthalate in frozen plasma units during refrigerated storage for up to five days after thawing. *Transfusion* 2012; 52: 493–502.
- 73 Packungsbeilage des jeweiligen Testkits von Stago (Asnières sur Seine, Frankreich), www.thrombinoscope.com, 03/2008
 - [73a] PPP Reagent 5pM
 - [73b] FluCaKit
- 74 The Thrombogram Guide, Thrombinoscope BV, Maastricht, Niederlande, www.thrombinoscope.com, 2007

7 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Die Dissertation ist bisher keiner anderen Fakultät und keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung vorgelegt worden.

Ich erkläre, dass ich bisher kein Promotionsverfahren erfolglos beendet habe und dass eine Aberkennung eines bereits erworbenen Doktorgrades nicht vorliegt.

Datum

Unterschrift

VI Anhangverzeichnis

1 Standardarbeitsanweisungen (SOP).....	S. 79
1.1 Automated Thrombogramm (Nr. 8.1, Version 1, Auszug).....	S. 79
1.2 Proteinbestimmung nach Bradford.....	S. 81
1.3 PF2D.....	S. 82
1.4 TCA-Fällung.....	S. 85
1.5 Trypsinverdau.....	S. 86
1.6 Proteinanreicherung (Zip Tip).....	S. 87
2 E-Mail Korrespondenz Macopharma©.....	S. 89
3 Übersicht Boxplots.....	S. 90
3.1 Einzelfaktoren (Abbildung 20A-N).....	S. 90
3.2 Globaltests	S. 92
3.2.1 ProC-Global NR (Abbildung 21).....	S. 92
3.2.2 aPTT und Quick-Wert (Abbildung 22A-B).....	S. 93
3.2.3 Parameter der Thrombinbildung (Abbildung 23A-F).....	S. 93
4 Publikationen.....	S. 95

1 Standardarbeitsanweisungen (SOP)

1.1 SOP Automated Thrombogramm (Nr. 8.1, Version 1, Auszug)

1. Allgemeines/benötigte Geräte

Messmethode:	Floureszenzmessung
Probenmaterial:	600 µL des zu testenden plättchenarmen Plasmas
Geräte:	Flourosan Ascent FL Wasserbad, auf 37 °C temperiert Stoppuhr Vortexer
Labormaterial:	1 Thermo Immulon 2 HB Rundboden Platte 2 Plexiglasröhrchen 15 mL 1 Pipette blau 200 µL - 1mL 1 Pipette gelb 20 µL - 200 µL Pipettenspitzen blau/gelb Abwurfbehälter
Reagenzien:	15 mL destilliertes Wasser 1 Fläschen Thrombin Kalibrator 1 Fläschen "PPP Reagent" 5 pm 1 Fläschen "Fluo Buffer" 1 Fläschen "Fluo Substrat (bei Raumtemperatur lagern)

2. Arbeitsanleitung zur Messung der Thrombinbildung

- a) Mit Fluoroscan verbundenen Computer anschalten und einloggen.
- b) Fluoroscan einschalten.
- c) "Plate in" am Fluoroscan drücken, um Messlade vorzuwärmen.
- d) Dokumentationsblatt ausfüllen.
- e) Eingabe der Plattenbelegung und Eingabe des Kalibrators.
- f) 15 mL destilliertes Wasser und 1 Fläschen Fluo Buffer ins 37 °C Wasserbad stellen (damit kann die Thrombinbildung in max. 8 unterschiedlichen Plasmen gemessen werden).

- g) Auf "settings"/ "Set Calibrator" drücken; dort Batch Nummer und Aktivität des "Thrombin Kalibrator" eingeben; auf "save" drücken.
- h) Vorlegen von Reagenz, Kalibrator und Plasma
- 1) Lyophilisiertes "PPP Reagent 5 pm" und lyophilisierten "Thrombin Kalibrator" mit der auf der Packung angegebenen Menge destilliertem Wasser auflösen. Beide Fläschchen vorsichtig schütteln (Luftblasen vermeiden, in keinem Fall vortexen). Beide Reagenzien bleiben nach Auflösen 4 Stunden stabil.
 - 2) Bei allen folgenden Schritten invers pipettieren, um Luftblasen zu vermeiden.
 - 3) In Wells A1-A3 20 µL "PPP Reagent 5 pm" invers pipettieren.
 - 4) In Wells A4-A6 20 µL "Thrombin Kalibrator" invers pipettieren.
 - 5) In Wells A1-A6 80 µL plättchenarmes Plasma invers pipettieren.
 - 6) Punkt 2-5 für jeden Patienten wiederholen.
 - 7) Platte in Gerät einlegen, 10 min aufwärmen lassen.
- i) Nach 10 Minuten Wartezeit 40 µL "Fluo Substrat" in das auf 37 °C vorgewärmte Fläschchen "Fluo Buffer" pipettieren, sofort vortexen. Das Reagenz bleibt nach Auflösen 1 Stunde stabil.
- j) Dispenser vorbereiten und Experiment starten
- 1) 10 mL auf 37 °C vorgewärmtes destilliertes Wasser und ein leeres Plastikröhrchen in das Gerät stellen.
 - 2) Auf "Start" klicken und den Anweisungen am Bildschirm folgen.
 - 3) Die Thrombinbildung über 40 Minuten gemessen, danach wird die Messung automatisch beendet.
- k) Datei speichern
- l) Ausdrucken der Ergebnisse.
- m) Reinigen des Dispensers [...]
- n) Programm Thrombinoskop beenden, Fluorocan und Computer ausschalten.

1.2 SOP Proteinbestimmung nach Bradford

Proteinbestimmung per Photometer (Ultrospec 2100pro)

Principle

The Bio-Rad Assay is a dye-binding assay in which a differential color change of a dye occurs in response to various concentrations of protein.

The absorbance maximum for an acidic solution of Coomassie Brilliant Blue G-250 dye shifts from 465nm to 595nm when binding to protein occurs. The Coomassie blue dye binds to primarily basic and aromatic amino acid residues, especially arginine. [BioRad, 2008]

1. Preparation Protein Standard

prepare dilutions of a protein standard into a clean, dry test tube

µg BSA (0,1 mg/mL)	0	1	2	4	6	8	10	12
µl BSA	0	10	20	40	60	80	100	120
µL A.bidest	800	790	780	760	740	720	700	680

add 200 µL of dye reagent concentrate (Bradford Protein Assay) to each tube
and vortex

measure absorbance at 595 nm

if the standard curve is ok, prepare the samples for measurement

2. Sample Preparation

the samples are diluted 1:10 and 10 µL are used in the assay
(10 µL diluted sample + 790 µL A.bidest + 200 µL Bradford reagent)

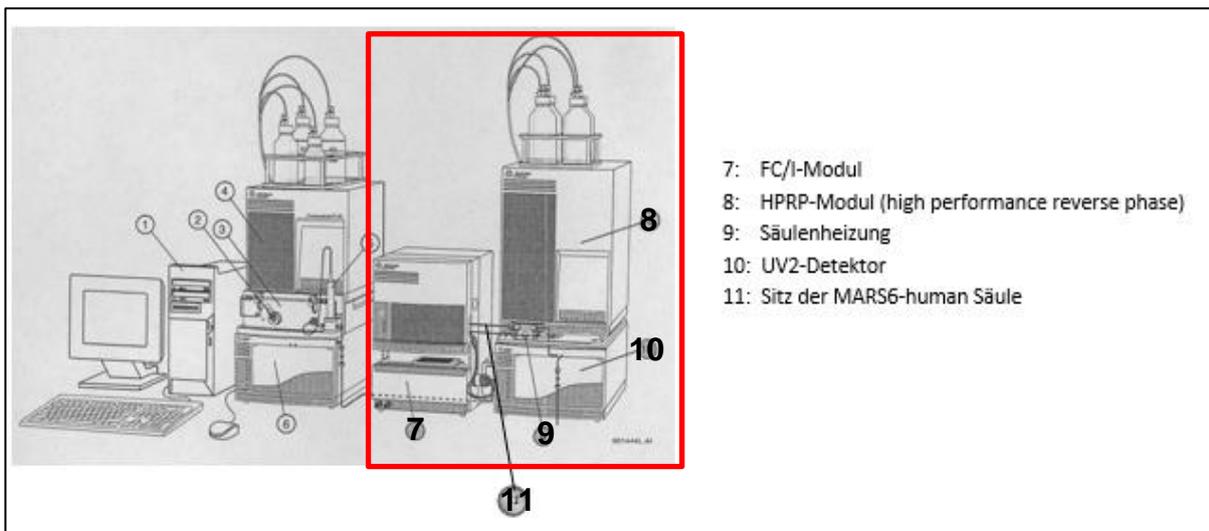
the measurement makes it necessary to prepare a blank sample
(800 µL A.bidest + 200 µL Bradford reagent)

1.3 SOP PF2D

ProteomeLab PF2D (MARS6-human) – Kurzanleitung

1. Systemübersicht

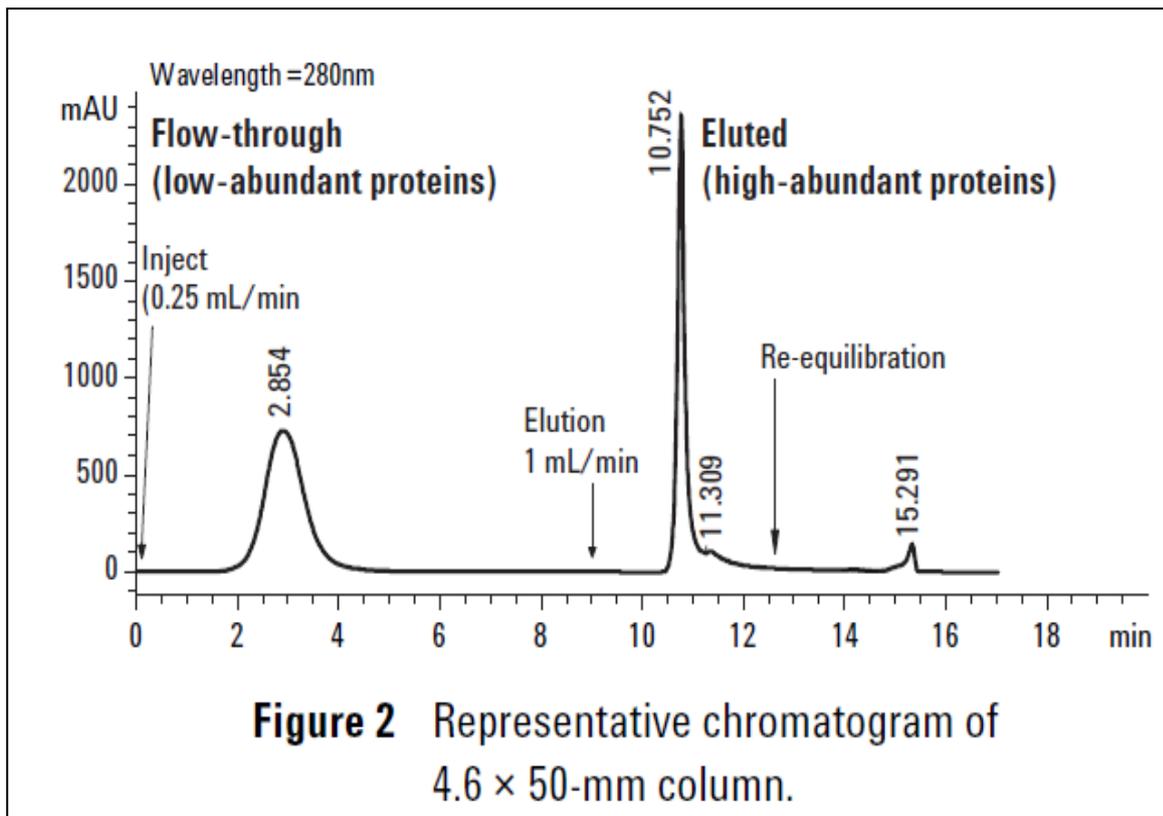
Im Folgenden sind die Systemkomponenten dargestellt. Für die Proteindepletion an der Mars-6 Säule wurden lediglich die rot eingerahmten Module (Nr. 7-11) benötigt.



2. Prinzip

Die Proteinauflösung an der PF2D erfolgt durch eine Chromatographie bei einer Extinktion von 280 nm. Die Trennung und Fraktionierung erfolgt durch die MARS-6 Säule (Multiple Affinity Removal LC Column) in Gegenwart organischer Lösungsmittel (Agilent Buffer A und B) mit unterschiedlichen Konzentrationen.

Die Säule ist speziell entwickelt, um sechs hoch-abundante Proteine (Albumin, IgG, Antitrypsin, IgA, Transferrin und Haptoglobin) aus bspw. Serum oder Plasma zu entfernen. Dadurch werden niedrig-abundante Proteine, die sich in der Durchflussfraktion befinden, angereichert und in der Massenspektrometrie besser identifiziert. Die gesammelte Durchflussfraktion sollte durch eine TCA-Präzipitation konzentriert werden, um bessere Ergebnisse zu erzielen.



3. Vorbereitung der PF2D

- HPRP-Modul, Injektor, Detektor und Fraktionssammler anschalten
- PC hochfahren und Software 32 Karat starten
- Baker H₂O durch die Schläuche und Pumpen laufen lassen (mind. 30min.)
- Flow Rate auf 2 mL pro Minute einstellen
- Lösungsmittel A und B laufen zu 50 %
- währenddessen MARS-6 Säule auf RT äquilibriumieren
- UV-Lampe kalibrieren und anschalten
- Fraktionssammler auf 4 °C kühlen
- Schlauch A und B in Puffer A und B tauchen und mind. 30 min die Pumpen spülen
- Flow Rate auf 2 mL pro Minute einstellen
- Lösungsmittel A und B laufen zu 50 % (etwa 20 min.)
- Lösungsmittel B läuft zu 100 % (etwa 20 min.)
- Lösungsmittel A läuft zu 100 % (**mind.** 20 min.)
- MARS-6 Säule in Flussrichtung einbauen und Lösungsmittel A durchlaufen lassen (**mind.** 20 min.)

- Flow Rate auf 0,25 mL pro Minute einstellen
- die Pumpen sollten etwa den gleichen Druck haben, wenn beide Lösungsmittel zu 50 % laufen

4. Vorbereitung der Proben

- Probe 1:4 in Buffer A (Agilent) verdünnen, mixen und anzentrifugieren
- verdünnte Probe auf *UltrafreeMC 0,22µm* Filter beladen
- bei 13000 rpm, 4 °C, 2 min. zentrifugieren
- Durchfluss aus Zentrifugation in 2 mL MTP (Microtiterplatte) überführen
- in *32 Karat* Software Wizard öffnen und Sequenz erstellen (Methode: DepletionMARS6)
- Injektionsvolumen beträgt 80 µL
- Sequenz starten
- vor Patientenproben immer 1-2 Testplasmaproben starten und Chromatogramm der Testproben anschauen

5. Nach dem Probenlauf

- MARS-6 Säule mit Puffer A spülen (**mind.** 20 min.)
- anschließend die Säule zur Lagerung in den Kühlschrank legen (Querbau R113 MS-Labor)
- Schläuche A und B in Baker H₂O (nach Messung), zu je 50 %
- Flow Rate 2 mL pro Minute (**mind.** 30 min.)
- Schläuche A und B in Baker H₂O (Schleife)
- Flow Rate 0,25 mL pro Minute (O/N)

1.4 SOP TCA-Fällung

1. Sample Preparation

thaw the frozen plasma samples at room temperature, **then keep on ice**
dilute your sample 1:4 in Agilent Buffer A
add 80 µL diluted plasma to filter (Ultrafree-MC durapore PVDF 0,22µm)
centrifuge the filter at 12000 g for 2 min at 4 °C
collect supernatant in a fresh tube (1,5 mL)
deplete Plasma (PF2D)

2. TCA precipitation (1000 µL)

add 150 µL 100 % TCA (to 15% final concentration)
vortex strongly 20 s 2 times
incubate Plasma on ice for 60 min
spin down precipitated proteins at 16200 g, 4 °C for 45 min
wash the pellet twice with 500 µL 100 % cold acetone
centrifuge at 16200 g, 4 °C for 15 min
after washing discard supernatant
dry the pellet in speedvac (2 min)
resuspend the pellet in 1x UT (8 M Urae, 2 M Thiourea)
shake the pellet at 1400 rpm for 20 min at 20 °C (Thermomixer)
measure protein concentration by Bradford method

1.5 SOP Trypsinverdau

Tryptic Digest | Reduction and Alkylation

1. Preparation of

20 mM Ammonium bicarbonate (20 mg ABC in 12,5 mL Baker H₂O)

25 mM DTT in 20 mM Ammonium bicarbonate (18 mg DTT in 8 mL 20 mM ABC)

100 mM Iodacetamid in 20 mM Ammonium bicarbonate (18 mg IAA in 1 mL 20 mM ABC)

2. Sample Preparation

4 µg protein (appropriate µL) plus 20 mM Ammonium bicarbonate to get 10 µL volume

add 1µL DTT (final concentration 2,5 mM)

incubate for 1 hour at 60 °C (Thermomixer)

add 20 mM Ammonium bicarbonate up to 18µl

add 2 µL 100 mM Iodacetamid solution (final concentration 10 mM)

incubate 30 min at 37 °C

add 10/20 ng trypsin ratio 1:25

incubate overnight (16 - 18 hour) at 37 °C

3. Stop Digestion

stop digestion by adding acetic acid (final concentration 1 %)

purify the samples on C18 material

1.6 SOP Reinigung der Peptidextrakte über C18-Material (Zip Tip)

1. Preparation ZipTip

Equilibration Solution	Mixture	Pipetting steps
100% ACN	1000 µL ACN	3x
80 % ACN (in 1% acetic acid)	800 µL ACN 200 µl 5 % acetic acid	5x
50 % ACN (in 1% acetic acid)	500 µL ACN 300 µL Baker H2O 200 µL 5 % acetic acid	5x
30 % ACN (in 1% acetic acid)	300 µL ACN 500 µL Baker H2O 200 µL 5 % acetic acid	5x
1 % acetic acid	800 µL Baker H2O 200 µL 5 % acetic acid	5x

NOTE: for optimal results, all solutions should be freshly prepared

prepare per sample two tube for eluting:



pipette 5 µL 50 % ACN (in 1 % acetic acid) into a fresh MS tube



pipette 5 µL 80 % ACN (in 1 % acetic acid) into a fresh MS tube

label microtubes

adjust pipettor volume to 10µl

2. ZipTip

2.1 Equilibrating

aspirate the washing solution into the ZipTip tip

dispense to waste

repeat three times for 100 % ACN

repeat five times for the other solutions

2.2 Binding and Washing

bind peptides to the equilibrated ZipTip tip, by performing aspirate-dispense cycles (20x)

aspirate five times 1 % acetic acid solution for removal salts and detergents

dispense to waste

2.3 Eluting

elute bound peptides by performing aspirate-dispense cycles:

1.) 5 μ L 50 % ACN (in 1 % acetic acid) five times, elute in microtube

2.) 5 μ L 80 % ACN (in 1 % acetic acid) five times, elute in same microtube

2.4 Drying and Reconstitute

place samples in speedvac, to evaporate to near dryness reconstitute

samples in 20 μ L Buffer A

2 E-Mail Korrespondenz Macopharma©

Sehr geehrte Frau Kellner,

anbei ein Link zu der öffentlich verfügbaren Broschüre <https://blood-safety.macopharma.com/wp-content/uploads/sites/3/2013/12/16-PAGES-Theraflex-MB-Plasma-052019-HD.pdf> Diese wird jedes Jahr auf den neuesten Stand gebracht. Sie können selbstverständlich gern daraus und aus der Webseite (<https://blood-safety.macopharma.com/en/category/products/theraflex-mb-plasma-products/>) relevante Bilder für ihre Dissertation entnehmen. Eine Referenzierung wäre natürlich wünschenswert.

Ich stehe selbstverständlich für weitere Fragen zur Verfügung.

Mit freundlichen Grüßen

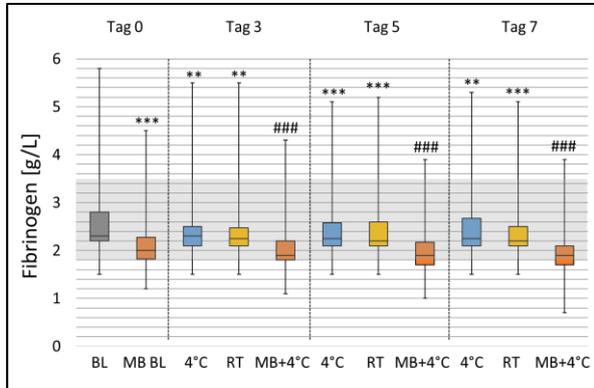
Stefan Reichenberg

Senior Medical Manager
Maco Pharma International GmbH
Robert-Bosch-Straße 11
63225 Langen
Tel: +49 6103 9008 64
Fax: +49 6103 9008 90
Mobile: +49 163 8008 921
Stefan.Reichenberg@macopharma.de

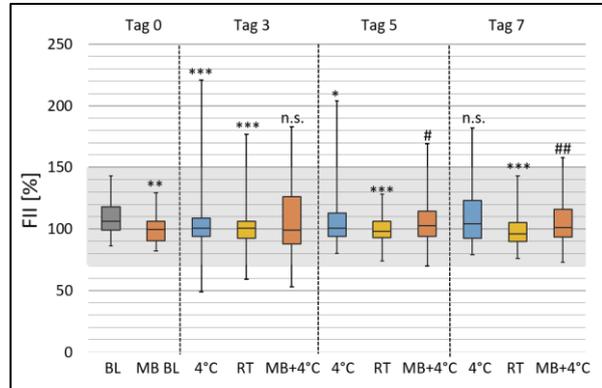
Sitz der Gesellschaft: Langen, Amtsgericht Offenbach HRB 33620, Geschäftsführer: Frank Schönfeld,
Yvan Malepart

3 Übersicht Boxplots

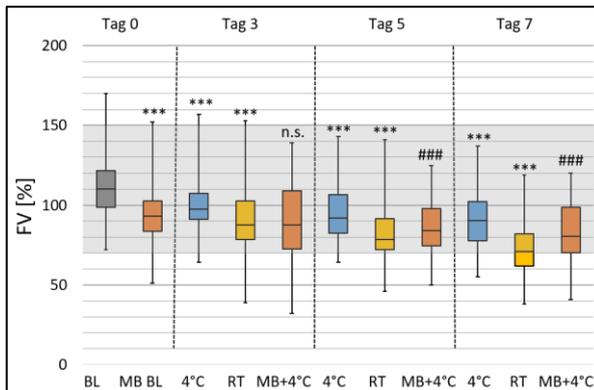
3.1 Einzelfaktoren



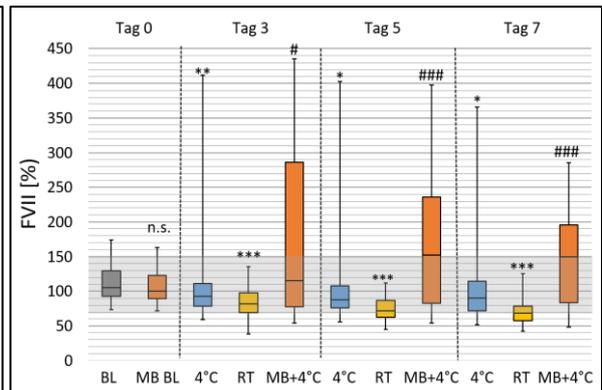
20A



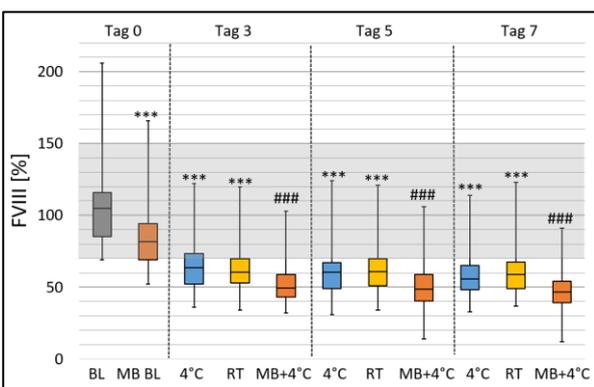
20B



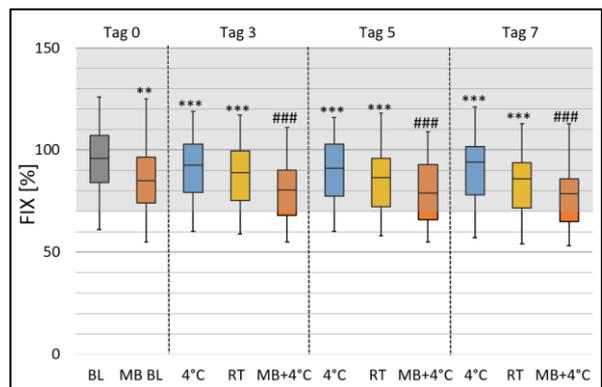
20C



20D

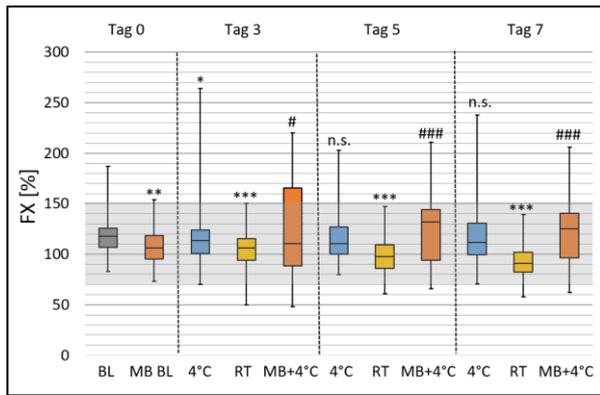


20E

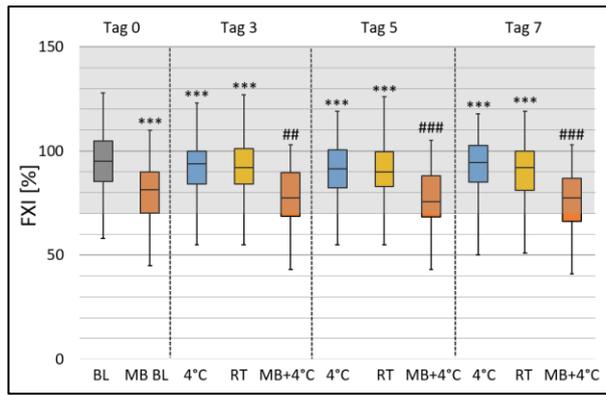


20F

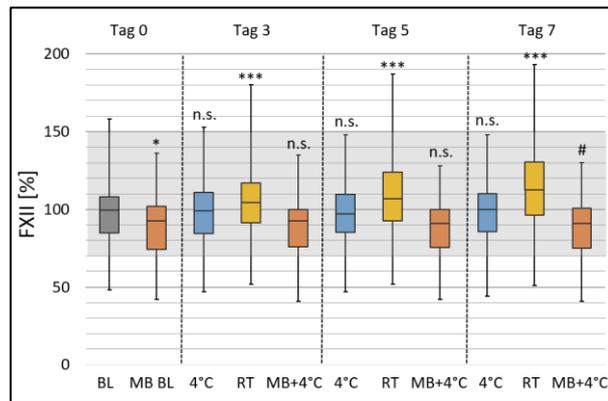
Legende siehe Seite 92



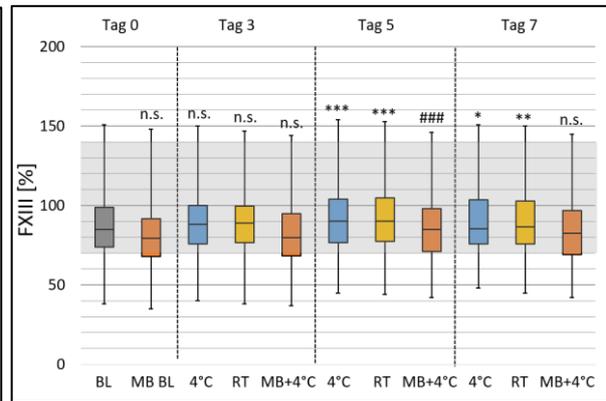
20G



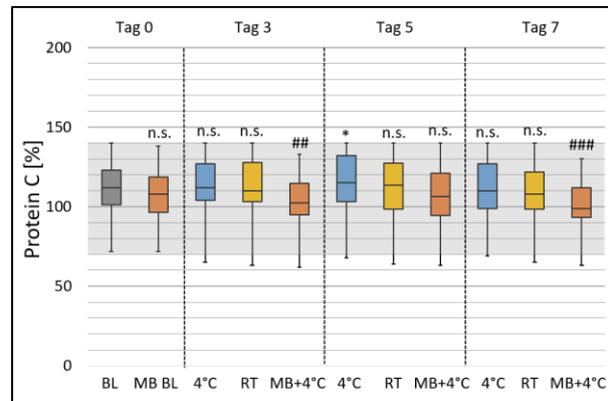
20H



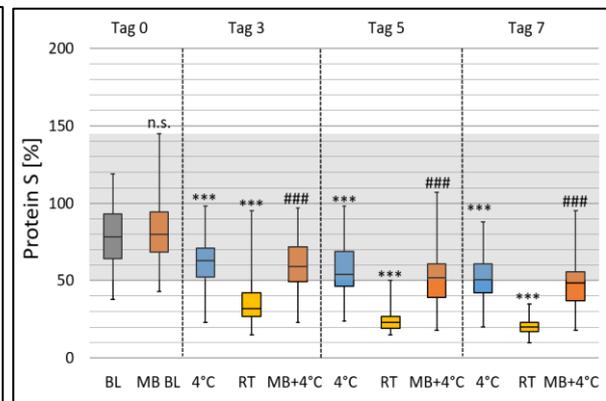
20I



20J

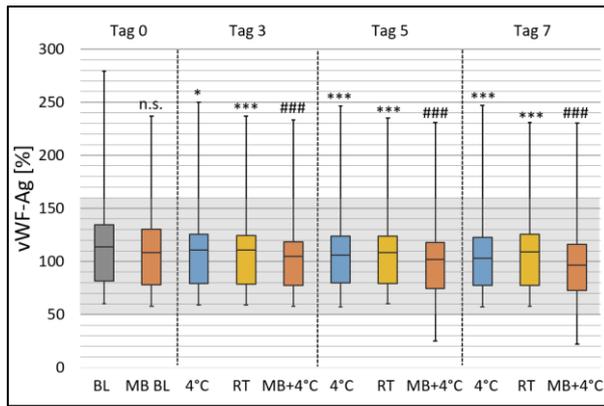


20K

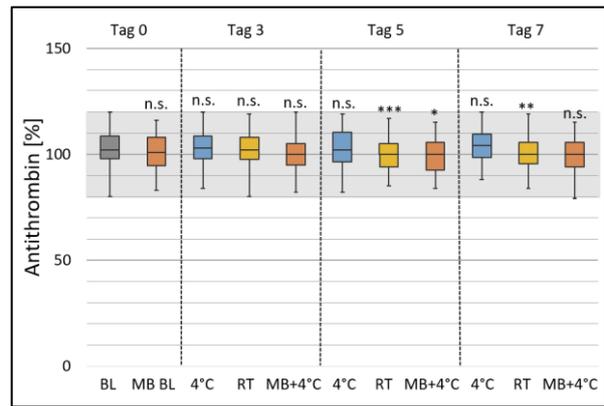


20L

Legende siehe Seite 92



20M



20N

Abbildung 20A-N: Aktivitätsprofile aller untersuchten Gerinnungsfaktoren und Inhibitoren über die Zeit. Die Messung erfolgte direkt nach dem Auftauen an Tag 0 (baseline, BL, grau) sowie nach Behandlung mit MB/Rotlicht an Tag 0 (MB BL, orange) sowie nach 3, 5 und 7 Tagen Lagerung von unbehandeltem GFP bei 2-6 °C (4 °C, blau) bzw. 20-24 °C (RT, gelb) und von MB/Rotlicht behandeltem Plasma (MB + 4 °C, orange). Die grau schattierte Fläche spiegelt den Referenzbereich wieder entsprechend den Herstellerangaben des verwendeten Gerinnungsfaktortestkits.

Für BL vs. jeweils MB BL / 4 °C / RT: *Signifikanz mit $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; n. s. nicht signifikant.

Für MB BL vs. MB + 4 °C: #Signifikanz mit $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$; n. s. nicht signifikant.

3.2 Globaltests

3.2.1 ProC-Global NR

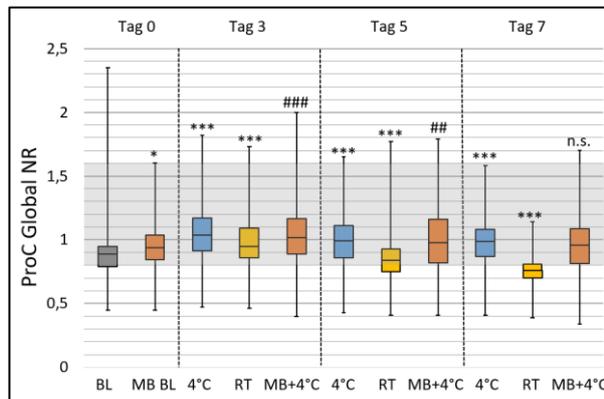
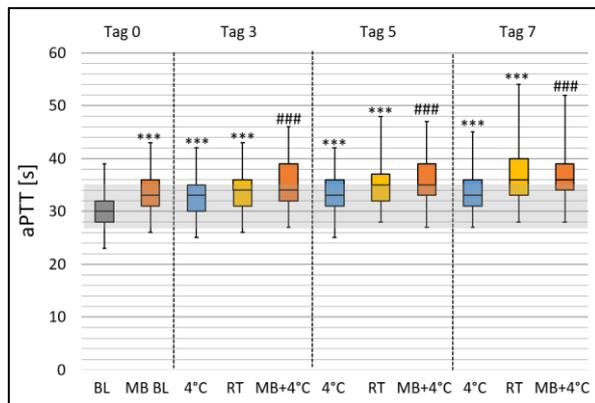


Abbildung 21: ProC-Global NR für Frischplasma nach dem Auftauen im zeitlichen Verlauf. Die ProC-Global NR wurde gemessen direkt nach dem Auftauen an Tag 0 (baseline, BL, grau) sowie nach Behandlung mit MB/Rotlicht an Tag 0 (MB BL, orange) sowie nach 3, 5 und 7 Tagen Lagerung bei 2-6 °C (4 °C, blau), 20-24 °C (RT, gelb) und nach 7 Tagen Lagerung bei 2-6 °C von MB/Rotlicht behandeltem Plasma (MB + 4 °C, orange). Die grau schattierte Fläche spiegelt den Referenzbereich entsprechend den Herstellerangaben des verwendeten Testkits wieder. Eine hohe ProC-Global NR zeigt eine Verschiebung des Gleichgewichtes auf die antikoagulatorische Seite an.

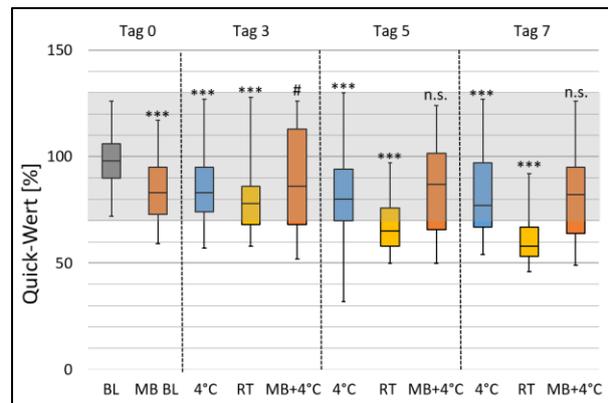
Für BL vs. jeweils MB BL/4 °C/RT: *Signifikanz mit $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; n. s. nicht signifikant.

Für MB BL vs. MB + 4 °C: #Signifikanz mit $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$; n. s. nicht signifikant.

3.2.2 aPTT und Quick-Wert



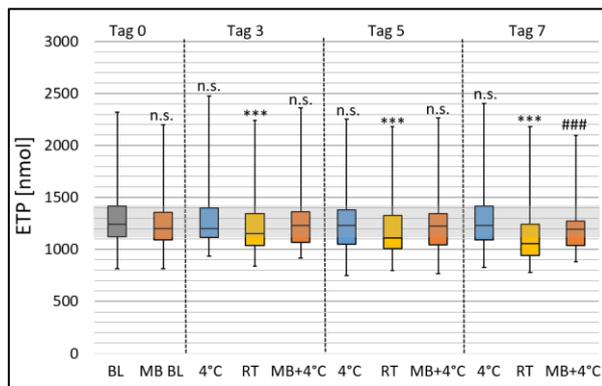
22A



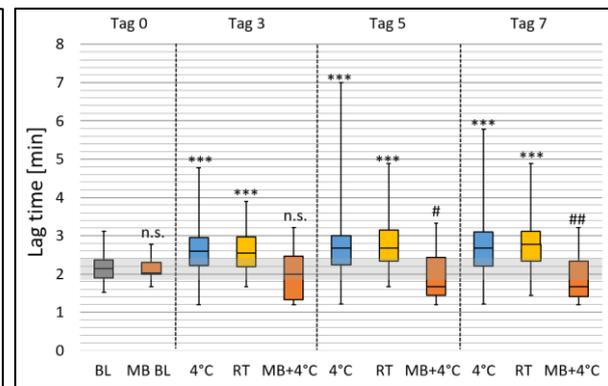
22B

Abbildung 22A-B: Darstellung der aPTT (A) und des Quick-Wertes (B) für Frischplasma nach dem Auftauen im zeitlichen Verlauf. Diese wurden gemessen direkt nach dem Auftauen an Tag 0 (baseline, BL, grau) sowie nach Behandlung mit MB/Rotlicht an Tag 0 (MB BL, orange) sowie nach 3, 5 und 7 Tagen Lagerung bei 2-6 °C (4 °C, blau), 20-24 °C (RT, gelb) und nach 7 Tagen Lagerung bei 2-6 °C von MB/Rotlicht behandeltem Plasma (MB + 4 °C, orange). Die grau schattierte Fläche spiegelt den Referenzbereich entsprechend den Herstellerangaben des verwendeten Testkits wieder. Für BL vs. jeweils MB BL/4 °C/RT: *Signifikanz mit $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; n. s. nicht signifikant. Für MB BL vs. MB + 4 °C: #Signifikanz mit $p < 0,05$; ### $p < 0,01$; #### $p < 0,001$; n. s. nicht signifikant.

3.2.3 Parameter der Thrombinbildung

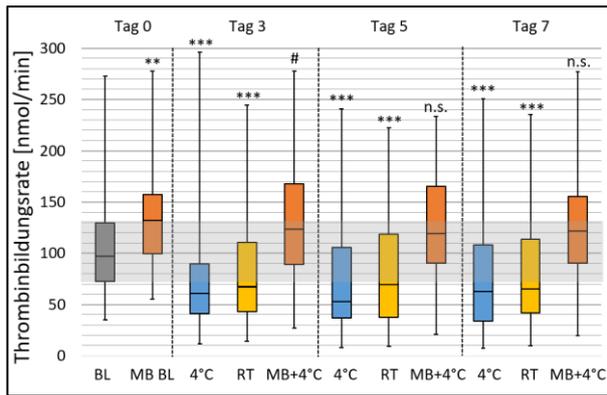


23A

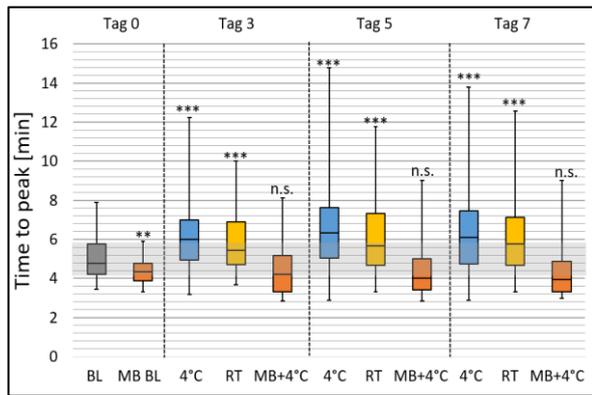


23B

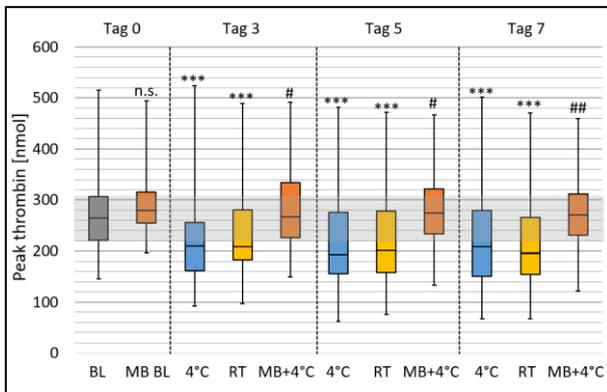
Legende siehe S. 94



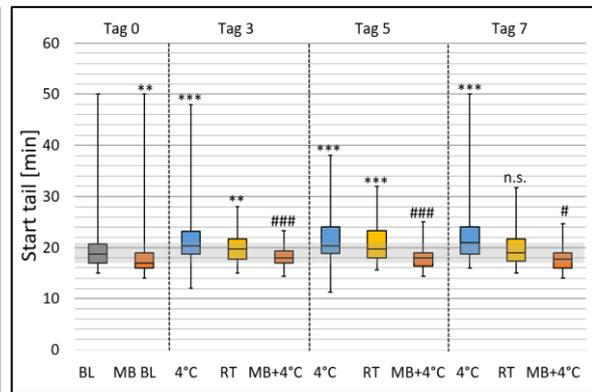
23C



23D



23E



23F

Abbildung 23A-F: Darstellung der Parameter der Thrombinbildung für Frischplasma nach dem Auftauen im zeitlichen Verlauf (A Endogenes Thrombinbildungspotential (ETP), B Lag time, C Thrombinbildungsrate, D Time to peak, E Peak thrombin, F Start tail). Diese wurden gemessen direkt nach dem Auftauen an Tag 0 (baseline, BL, grau) sowie nach Behandlung mit MB/Rotlicht an Tag 0 (MB BL, orange) sowie nach 3, 5 und 7 Tagen Lagerung bei 2-6 °C (4 °C, blau), 20-24 °C (RT, gelb) und nach 7 Tagen Lagerung bei 2-6 °C von MB/Rotlicht behandeltem Plasma (MB + 4 °C, orange). Die grau schattierte Fläche spiegelt den interquartilen Bereich von aufgetautem, unbehandeltem GFP an Tag 0 wieder.

Für BL vs. jeweils MB BL/4 °C/RT: *Signifikanz mit $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; n.s. nicht signifikant.

Für MB BL vs. MB + 4 °C: #Signifikanz mit $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$; n. s. nicht signifikant.

4 Publikationen