

**JAN GUNDERMANN**

---

Einfluss der **Lagerung von kaninem konservierten Vollblut** auf die Aktivität von plasmatischer Gerinnung, natürlichen Gerinnungsinhibitoren und Fibrinolyse unter Berücksichtigung zweier Konservierungsmedien



Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades eines  
**Dr. med. vet.**  
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

**Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei dem Autor dieses Werkes.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2025

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publisher.

1<sup>st</sup> Edition 2025

© 2025 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

STAUFENBERGRING 15, 35396 GIESSEN, GERMANY  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)

Aus dem Klinikum Veterinärmedizin  
Klinische Pathophysiologie & Klinische Laboratoriumsdiagnostik  
Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen  
Betreuer: Prof. Dr. Andreas Moritz

**Einfluss der Lagerung von kaninem konservierten Vollblut auf die Aktivität  
von plasmatischer Gerinnung, natürlichen Gerinnungsinhibitoren und  
Fibrinolyse unter Berücksichtigung zweier Konservierungsmedien**

**INAUGURAL-DISSERTATION**  
zur Erlangung des Grades eines  
Dr. med. vet.  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

**Jan Gundermann**  
Tierarzt aus Rüdesheim

Gießen 2025

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin der Justus-Liebig-  
Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. Stefan Arnhold

Gutachter: Prof. Dr. Andreas Moritz

Prof. Ross G. Douglas, PhD

Tag der Disputation: 15.09.2025

In Gedenken an meine Großeltern Heinz und Hannelore Bockius

## Eigene Publikationen

Teile der vorliegenden Arbeit wurden im Rahmen des im Folgenden aufgeführten Fachvortrags vorgestellt:

J. Gundermann, H. Lehmann, N. Bauer (2024): Einfluss der Lagerung von kaninem konservierten Vollblut auf die Aktivität von plasmatischer Gerinnung, natürlichen Gerinnungsinhibitoren und Fibrinolyse unter Berücksichtigung zweier Konservierungsmedien. 32. Jahrestagung der FG „Innere Medizin und klinische Labordiagnostik“ der DVG (InnLab), 02./03.02.24; Hannover

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der "Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis" niedergelegt sind, eingehalten."

Jan Gundermann

Tierarzt aus Rüdesheim

---

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis .....	I
Abbildungsverzeichnis .....	III
Tabellenverzeichnis .....	V
1. Einleitung .....	1
2. Literaturübersicht .....	3
2.1 Gerinnungssystem.....	3
2.1.1 Primäre Hämostase.....	3
2.1.2 Sekundäre Hämostase .....	5
2.1.3 Gerinnungsinhibition und Fibrinolyse.....	8
2.1.3.1 Fibrinolyse.....	8
2.1.3.2 Gerinnungsinhibition.....	9
2.1.4 Neue Einteilung (Zell-basiertes Modell).....	11
2.2 Ausgewählte Diagnostik der sekundären Hämostase, Gerinnungsinhibition sowie Fibrinolyse.....	13
2.2.1 Präanalytik.....	13
2.2.2 Analytik .....	16
2.2.2.1 Screeningtests.....	17
2.2.2.2 Spezialtests .....	18
2.3 Arten von Blutprodukten, deren Herstellung und Indikationen.....	20
2.4 Hämostatische Aktivität des Plasmaanteils von kaninem konservierten Vollblut	29
2.5 Verfügbarkeitsprobleme und Logistik von Blutprodukten .....	35
3. Eigene Untersuchungen .....	40
3.1 Material und Methoden .....	40
3.1.1 Blutspende .....	40
3.1.1.1 Einschlusskriterien .....	40
3.1.1.2 Gesundheitsprüfung der Versuchstiere.....	41
3.1.1.3 Weitere Verarbeitung und Messung der Proben .....	42
3.1.1.4 Gewinnung des Blutprodukts .....	44
3.1.2 Erstellung der Probenpools .....	45
3.1.3 Aufbewahrung der Transferbeutel und Probenentnahme .....	47
3.1.4 Gerinnungsdiagnostik.....	48

---

3.1.4.1	Vorbereitung der Proben .....	49
3.1.4.2	STA Compact Max 3® .....	49
3.1.4.3	Vorbereitung der bisher nicht etablierten Tests .....	51
3.1.4.4	Qualitätskontrolle .....	52
3.1.4.5	Assays .....	53
3.1.4.5.1	Prothrombinzeit und aktivierte partielle Thromboplastinzeit.....	53
3.1.4.5.2	Gerinnungsfaktoren (Faktor V, Faktor VII, Faktor VIII, Faktor IX, Faktor X) .....	54
3.1.4.5.3	Protein C und Protein S .....	56
3.1.4.5.4	Fibrinogen .....	58
3.1.4.5.5	Antithrombin .....	58
3.1.4.5.6	D-Dimere und von-Willebrand-Faktor-Antigen.....	59
3.1.4.6	Inter-Assay Variabilität.....	60
3.1.5	Statistische Analyse .....	63
3.2	Ergebnisse .....	65
3.2.1	Versuchstiere, Voruntersuchungen sowie Gewinnung der Blutprodukte .....	65
3.2.1.1	Hundepopulation und Laboruntersuchungen vor der Blutspende .....	65
3.2.1.2	Gewinnung Blutkonserven .....	66
3.2.2	Einfluss von Lagerung und Medium.....	66
3.2.2.1	(Prokoagulatorische) Faktoren .....	67
3.2.2.1.1	Faktor V .....	67
3.2.2.1.2	Faktor VII.....	68
3.2.2.1.3	Faktor VIII .....	69
3.2.2.1.4	Faktor IX.....	70
3.2.2.1.5	Faktor X.....	71
3.2.2.1.6	Fibrinogen .....	72
3.2.2.1.7	Von-Willebrand-Faktor-Antigen.....	73
3.2.2.2	Inhibitoren/Fibrinolysemarker .....	74
3.2.2.2.1	Antithrombin .....	74
3.2.2.2.2	Protein C .....	75
3.2.2.2.3	Protein S .....	76
3.2.2.2.4	D-Dimere .....	77

---

3.2.2.3 Gerinnungszeiten .....	78
3.2.2.3.1 Prothrombinzeit .....	78
3.2.2.3.2 Aktivierte partielle Thromboplastinzeit .....	79
3.2.3 Inter-Assay Variabilität .....	80
4. Diskussion .....	81
4.1 Einfluss des zeitlichen Verlaufs der Lagerung .....	82
4.2 Einfluss des verwendeten Antikoagulans bzw. der Additivlösung .....	84
4.3 Inter-Assay Variationskoeffizient .....	88
5. Limitationen .....	94
6. Schlussfolgerung .....	97
7. Zusammenfassung .....	98
8. Summary .....	100
9. Literaturverzeichnis .....	102
10. Anhang .....	164
11. Danksagung .....	170

## Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg FEU/ml	Mikrogramm FEU pro Milliliter
µl	Mikroliter
1 :2-Kontrolle	niedrige/pathologische Kontrolle
2, 3-DPG	2, 3-Diphosphoglycerat
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
APC	aktiviertes Protein C
aPTT	aktivierte partielle Thromboplastinzeit
ASVCP	American Society for Veterinary Clinical Pathology
AT	Antithrombin
ATP	Adenosintriphosphat
BCS	Body Condition Score
BVL	Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CP2D	Citrat-Phosphat-Doppeldextrose
CPD	Citrat-Phosphat-Dextrose
CPDA	Citrat-Phosphat-Dextrose-Adenin
CT	Clotting time
CV	coefficient of variation (Variationskoeffizient)
DDIM	D-Dimere
DEA	Dog Erythrocyte Antigen
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (Enzymimmunoassay)
EPCR	endothelial protein C receptor (endothelialer Protein C-Rezeptor)
ESCCAP	European Scientific Counsel Companion Animal Parasites
EU	Europäische Union
FEU	Fibrinogen Equivalent Units (Fibrinogen-äquivalenten Einheiten)
FFP	fresh-frozen plasma (gefrorenes Frischplasma)
FIATA	Fibrinogen Antigenic Turbidimetric Assay
Fib	Fibrinogen
FIFTA	Fibrinogen Functional Turbidimetric Assay
FIX	Faktor IX
FP	gefrorenes plasma (gefrorenes Plasma)
FSP	Fibrin-/Fibrinogenspaltprodukte
FV	Faktor V
FVII	Faktor VII
FVIII	Faktor VIII
FX	Faktor X
FXII	Faktor XII
g	-fache Erdbeschleunigung, Gramm
G	Gauge
g/l	Gramm pro Liter
GP	Glykoprotein
HMWK	High-molecular-weight kininogen (Hochmolekulares Kininogen)
HMWKa	aktiviertes HMWK
INR	International Normalized Ratio
ISI	International Sensitivity Index

## Abkürzungsverzeichnis

---

kg	Kilogramm
MA	Maximum Amplitude
MAD	mittlerer arterieller Druck
MCF	Maximum clot firmness
mg/L	Milligramm pro Liter
ml	Milliliter
N-Kontrolle	Normalkontrolle
nm	Nanometer
PAGGS-M	Phosphat, Adenin, Glukose, Guanosin und Mannitol
PAI-1	Plasminogen activator inhibitor-1 (Plasminogen-Aktivator-Inhibitor Typ 1)
PAR	Protease-activated receptor (Protease-aktivierter Rezeptor)
PC	Protein C
PCI	Protein C Inhibitor
PF-24	Plasma frozen within 24 hours after phlebotomy
PS	Protein S
PT	Prothrombinzeit
RCPA	The Royal College of Pathologists of Australasia
StIKo Vet	Ständige Impfkommision Veterinärmedizin
TACO	transfusion-associated circulatory overload (Transfusions-assoziierte zirkulatorische Überladung)
TAFI	thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor (Thrombin-aktivierbarer Fibrinolyseinhibitor)
TAMG	Tierarzneimittelgesetz
TE <sub>a</sub>	allowable total error/total allowable error (zulässiger Gesamtfehler)
TEG	Thrombelastography (Thrombelastographie)
TE <sub>obs</sub>	total observed error/observed total error (beobachteter Gesamtfehler)
TFPI	Tissue Factor Pathway Inhibitor
tPA	Tissue Plasminogen Activator (Gewebsplasminogenaktivator)
uPA	Urokinase-Type Plasminogen Activator (Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator/Urokinase)
VB	Vollblut mit CPD
VB-PAGGS	VB mit zusätzlichem PAGGS-M
vWF	Von-Willebrand-Faktor
vWF-Ag	Von-Willebrand-Faktor-Antigen
WHO	World Health Organization (Weltgesundheitsorganisation)

# Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Graphische Darstellung der hierarchischen Probenaufbereitung der Blutprodukte. Abkürzungen: VB = Vollblut mit Citrat-Phosphat-Dextrose (CPD), VB-PAGGS = VB mit zusätzlichem/r Phosphat, Adenin, Glukose, Guanosin, Kochsalzlösung und Mannitol (PAGGS-M). .....	47
Abbildung 2: Faktor V-Aktivität zum jeweiligen Entnahmezeitpunkt während der 28-tägigen Lagerung unter den zuvor genannten Bedingungen. Beide Medien (VB und VB-PAGGS) sind dargestellt. Abgebildet sind Box-Whisker-Plots. Die mittleren 50 % (1. bis 3. Quartil) der Daten stellt die Box dar, deren horizontale Unterteilung den Median anzeigt. Die Whisker reichen bis zum Minimal- bzw. Maximalwert. Angegeben sind die globalen $p$ -Werte für die Faktoren „Zeit“, „Medium“ und die Wechselwirkung (Interakt) zwischen den Faktoren. Die Asterisken und liegenden eckigen Klammern zeigen die Ergebnisse des Post-Hoc-Tests für den Faktor „Zeit“ an. Signifikante Unterschiede der Mittelwerte der Aktivitäten der beiden Medien zwischen zwei Messzeitpunkten sind mit einer liegenden eckigen Klammer markiert. Das Signifikanzniveau ist hierbei an den Klammern wie folgt gekennzeichnet: $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***) bzw. $p < 0,0001$ (****). Die Signifikanz für den Post-Hoc-Test für den Faktor „Medium“ sind im Text aufgeführt. Das Signifikanzniveau liegt bei $p < 0,05$ . Abkürzungen: VB = Vollblut mit Citrat-Phosphat-Dextrose (CPD), VB(-)PAGGS = VB mit zusätzlichem/r Phosphat, Adenin, Glukose, Guanosin, Kochsalzlösung und Mannitol (PAGGS-M).....	67
Abbildung 3: Darstellung der nach dem Zeitpunkt der Entnahme aufgegliederten Aktivitäten von Faktor VII über die Lagerungsdauer. Sowohl VB als auch VB-PAGGS sind abgebildet. Bezüglich der Beschreibung der Box-Whisker-Plots sowie für den Schlüssel der angegebenen Signifikanzniveaus sei auf Abbildung 2 verwiesen. Abkürzungen: VB = Vollblut mit Citrat-Phosphat-Dextrose (CPD), VB(-)PAGGS = VB mit zusätzlichem/r Phosphat, Adenin, Glukose, Guanosin, Kochsalzlösung und Mannitol (PAGGS-M) .....	68
Abbildung 4 Präsentation der Messwerte von Faktor VIII nach den Tagen der Lagerung, an denen Proben entnommen wurden. Beide Blutproduktgruppen sind dargestellt. Bezüglich der Beschreibung der Box-Whisker-Plots sowie für den Schlüssel der angegebenen Signifikanzniveaus sei auf Abbildung 2 verwiesen. Abkürzungen: VB = Vollblut mit Citrat-Phosphat-Dextrose (CPD), VBPAGGS = VB mit zusätzlichem/r Phosphat, Adenin, Glukose, Guanosin, Kochsalzlösung und Mannitol (PAGGS-M).....	69
Abbildung 5: Ergebnisse der Messungen der Faktor IX-Aktivität nach Beprobungszeitpunkt in beiden Medien über die 28-tägige Lagerung. Bezüglich der Beschreibung der Box-Whisker-Plots sowie für den Schlüssel der angegebenen Signifikanzniveaus sei auf Abbildung 2 verwiesen. Abkürzungen: VB = Vollblut mit Citrat-Phosphat-Dextrose (CPD), VBPAGGS = VB mit zusätzlichem/r Phosphat, Adenin, Glukose, Guanosin, Kochsalzlösung und Mannitol (PAGGS-M).....	70
Abbildung 6: Faktor X-Aktivität zum jeweiligen Entnahmezeitpunkt während der 28-tägigen Lagerung unter den zuvor genannten Bedingungen. Beide Medien (VB und VB-PAGGS) sind dargestellt. Bezüglich der Beschreibung der Box-Whisker-Plots sowie für den Schlüssel der angegebenen Signifikanzniveaus sei auf Abbildung 2 verwiesen. Abkürzungen: VB = Vollblut mit Citrat-Phosphat-Dextrose (CPD), VB(-)PAGGS = VB mit zusätzlichem/r Phosphat, Adenin, Glukose, Guanosin, Kochsalzlösung und Mannitol (PAGGS-M).....	71
Abbildung 7: Ergebnisse der Messungen des Fibrinogengehalts nach Beprobungszeitpunkt in beiden Medien über die 28-tägige Lagerung. Bezüglich der Beschreibung der Box-Whisker-Plots sowie für den Schlüssel der angegebenen Signifikanzniveaus sei auf Abbildung 2 verwiesen. Abkürzungen: g/L = Gramm pro Liter, VB = Vollblut mit Citrat-Phosphat-Dextrose (CPD), VB(-)PAGGS = VB mit zusätzlichem/r Phosphat, Adenin, Glukose, Guanosin, Kochsalzlösung und Mannitol (PAGGS-M).....	72

Abbildung 8: Darstellung der nach dem Zeitpunkt der Entnahme aufgegliederten Aktivitäten von von-Willebrand-Faktor-Antigen über die Lagerungsdauer. Sowohl VB als auch VB-PAGGS sind abgebildet. Bezüglich der Beschreibung der Box-Whisker-Plots sowie für den Schlüssel der angegebenen Signifikanzniveaus sei auf Abbildung 2 verwiesen. Abkürzungen: VB = Vollblut mit Citrat-Phosphat-Dextrose (CPD), VB(-)PAGGS = VB mit zusätzlichem/r Phosphat, Adenin, Glukose, Guanosin, Kochsalzlösung und Mannitol (PAGGS-M)..... 73

Abbildung 9: Präsentation der Messwerte von Antithrombin nach den Tagen der Lagerung, an denen Proben entnommen wurden. Beide Blutproduktgruppen sind dargestellt. Bezüglich der Beschreibung der Box-Whisker-Plots sowie für den Schlüssel der angegebenen Signifikanzniveaus sei auf Abbildung 2 verwiesen. Abkürzungen: VB = Vollblut mit Citrat-Phosphat-Dextrose (CPD), VBPAGGS = VB mit zusätzlichem/r Phosphat, Adenin, Glukose, Guanosin, Kochsalzlösung und Mannitol (PAGGS-M)..... 74

Abbildung 10: Ergebnisse der Messungen der Protein C-Aktivität nach Beprobungszeitpunkt in beiden Medien über die 28-tägige Lagerung. Bezüglich der Beschreibung der Box-Whisker-Plots sowie für den Schlüssel der angegebenen Signifikanzniveaus sei auf Abbildung 2 verwiesen. Abkürzungen: VB = Vollblut mit Citrat-Phosphat-Dextrose (CPD), VBPAGGS = VB mit zusätzlichem/r Phosphat, Adenin, Glukose, Guanosin, Kochsalzlösung und Mannitol (PAGGS-M)..... 75

Abbildung 11: Protein S-Aktivität zum jeweiligen Entnahmezeitpunkt während der 28-tägigen Lagerung unter den zuvor genannten Bedingungen. Beide Medien (VB und VB-PAGGS) sind dargestellt. Bezüglich der Beschreibung der Box-Whisker-Plots sowie für den Schlüssel der angegebenen Signifikanzniveaus sei auf Abbildung 2 verwiesen. Abkürzungen: VB = Vollblut mit Citrat-Phosphat-Dextrose (CPD), VB(-)PAGGS = VB mit zusätzlichem/r Phosphat, Adenin, Glukose, Guanosin, Kochsalzlösung und Mannitol (PAGGS-M)..... 76

Abbildung 12: Darstellung der nach dem Zeitpunkt der Entnahme aufgegliederten Gehalte an D-Dimeren über die Lagerungsdauer. Sowohl VB als auch VB-PAGGS sind abgebildet. Bezüglich der Beschreibung der Box-Whisker-Plots sowie für den Schlüssel der angegebenen Signifikanzniveaus sei auf Abbildung 2 verwiesen. Abkürzungen: µg FEU/ml = Mikrogramm Fibrinogen Equivalent Units (Fibrinogen-äquivalente Einheiten) pro Milliliter, VB = Vollblut mit Citrat-Phosphat-Dextrose (CPD), VB(-)PAGGS = VB mit zusätzlichem/r Phosphat, Adenin, Glukose, Guanosin, Kochsalzlösung und Mannitol (PAGGS-M) . ..... 77

Abbildung 13: Präsentation der Messwerte der Prothrombinzeit nach den Tagen der Lagerung, an denen Proben entnommen wurden. Beide Blutproduktgruppen sind dargestellt. Bezüglich der Beschreibung der Box-Whisker-Plots sowie für den Schlüssel der angegebenen Signifikanzniveaus sei auf Abbildung 2 verwiesen. Abkürzungen: VB = Vollblut mit Citrat-Phosphat-Dextrose (CPD), VBPAGGS = VB mit zusätzlichem/r Phosphat, Adenin, Glukose, Guanosin, Kochsalzlösung und Mannitol (PAGGS-M) . ..... 78

Abbildung 14: Ergebnisse der Messungen der aktivierten partiellen Thromboplastinzeit nach Beprobungszeitpunkt in beiden Medien über die 28-tägige Lagerung. Bezüglich der Beschreibung der Box-Whisker-Plots sowie für den Schlüssel der angegebenen Signifikanzniveaus sei auf Abbildung 2 verwiesen. Abkürzungen: VB = Vollblut mit Citrat-Phosphat-Dextrose (CPD), VBPAGGS = VB mit zusätzlichem/r Phosphat, Adenin, Glukose, Guanosin, Kochsalzlösung und Mannitol (PAGGS-M)..... 79

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Durchgeführte Untersuchungen/Verrichtungen zu den jeweiligen Probenentnahmezeitpunkten. ....	48
Tabelle 2: CVs der neu etablierten Parameter im physiologischen Bereich (N-Kontrolle). Die Mittelwerte und Standardabweichungen sind auf zwei, die CVs auf eine Nachkommastelle gerundet angegeben. ....	80
Tabelle 3: CVs der neu etablierten Parameter im pathologischen Bereich (1 :2-Kontrolle). Die Mittelwerte und Standardabweichungen sind auf zwei, die CVs auf eine Nachkommastelle gerundet angegeben. ....	80
Tabelle 4: Gegenüberstellung von ermittelten SDs und Inter-Assay CVs der neu etablierten Parameter im physiologischen Bereich (N-Kontrolle) mit den entsprechenden, in der Literatur (drei veterinärmedizinische und eine humanmedizinische Studie) beschriebenen Inter-Assay CVs, der vom Hersteller angegebenen Inter-Assay CVs, publizierten TE <sub>as</sub> s sowie den daraus abgeleiteten Ziel-CV-Werten. ....	89
Tabelle 5: Gegenüberstellung von ermittelten SDs und Inter-Assay CVs der neu etablierten Parameter im pathologischen Bereich (1 :2-Kontrolle) mit den vom Hersteller angegebenen Inter-Assay CVs, publizierten TE <sub>as</sub> s sowie den daraus abgeleiteten Ziel-CV-Werten. ....	90



# 1. Einleitung

Bei Hunden und Katzen kommen verschiedene Gerinnungsstörungen vor. Beschrieben sind sowohl hyper- (1–3) als auch hypokoagulable (4–6) Zustände. Darüber hinaus kommen Anämien variabler Ursachen vor (7–9).

Die Behandlung dieser Erkrankungen benötigt je nach Situation unter anderem die Therapie mittels Blutprodukten (Erythrozytenkonzentrat, Thrombozytenkonzentrat oder Blutplasma [in verschiedenen Aufbereitungen]) (10, 11). Es besteht daher ein Bedarf an Blutprodukten in der Kleintiermedizin.

Allerdings ist die Einrichtung und Aufrechterhaltung einer Blutbank für Tierkliniken organisatorisch und rechtlich eng reglementiert, wie unter anderem anhand der Leitlinie des Bundesamtes für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL) zu Blut und Blutprodukten im Veterinärbereich deutlich wird (12). Aus diesem Grund werden bei Bedarf häufig Notfall-Vollblutspenden von einem Spender-Tier auf das in der akuten Situation zu behandelnde Empfänger-Tier durchgeführt. Gerade in Notfallsituationen sind Blutspender jedoch nicht schnell verfügbar. Hinzu kommt die mit maximal 35 Tagen begrenzte Lagerungsdauer von konservierten Vollblutkonserven bei Hund und Katze (13), weshalb es insbesondere bei der Behandlung von Notfallpatienten zu Engpässen in der Verfügbarkeit von Blutprodukten kommen kann.

Dieser Zustand wird durch die unzureichende kommerzielle Verfügbarkeit von Tierblutprodukten in Deutschland erschwert.

Die bestmögliche Ausnutzung der vorhandenen Ressourcen ist deshalb von besonderer Bedeutung. Die Verarbeitung von Vollblutkonserven in einzelne Blutkomponenten ist ein Ansatz, die Lagerungsstabilität mancher Komponenten sowie die Spezifität und Effektivität der Therapie zu verbessern und darüber hinaus das Risiko von Transfusionsreaktionen zu vermindern (14–17). So lassen sich durch Abtrennung der zellulären Bestandteile Erythrozytenkonzentrate sowie Plasma gewinnen. Letzteres kann beispielsweise als „frisch gefrorenes Plasma“ („fresh-frozen plasma“, FFP) oder „gefrorenes Plasma“ („frozen plasma“, FP) aufgearbeitet werden (12, 18). Problematisch sind bei der Weiterverarbeitung/Lagerung von Blutprodukten jedoch die hohen Kosten und der apparative Aufwand (12, 18, 19). Hinzu kommt, dass insbesondere in Notfallsituationen das Auftauen von Plasmakonserven einen zu hohen Zeitaufwand darstellen kann (20). Alternative zeitsparende Mikrowellen-basierte Auftausysteme sorgen dagegen für einen teils signifikanten Abfall der Gerinnungsfaktoren im Vergleich zu herkömmlichen Verfahren (21).

Deshalb werden auch weiterhin frische, nicht tiefgefrorene Blutprodukte benötigt. Im Rahmen dieser Arbeit ist besonders die Nutzung des Plasmaanteils von gekühlten Vollblutkonserven von Interesse.

Plasmaprodukte werden zur Substitution hämostatisch aktiver Proteine bei verschiedenen Gerinnungsstörungen eingesetzt. So kann Plasma zum Beispiel bei Patienten mit Cumarin-Intoxikation und lebensbedrohlichen Blutungskomplikationen verwendet werden (22), um die Vitamin-K-abhängigen Faktoren II, VII, IX und X (23) zu substituieren. Bei einer disseminierten intravasalen Gerinnung wiederum könnte der Ersatz von verbrauchten natürlichen Gerinnungsinhibitoren (Antithrombin, Protein C und Protein S) (24) je nach Phase von Interesse sein.

Um eine evidenzbasierte Verwendung des Plasmaanteils von Vollblutkonserven beim Hund zu ermöglichen, werden weitere Studien benötigt. Zwar finden sich Studien zur Gerinnungsaktivität von gelagertem, nicht tiefgefrorenem kaninen Plasma (25–27), nach Wissen des Autors jedoch nur ganz vereinzelte Veröffentlichungen zu dieser Thematik bei dem Plasmaanteil von kaninem Vollblut zu Transfusionszwecken (28–30). Es fehlen insbesondere Untersuchungen mit Betrachtung der natürlichen Inhibitoren der Gerinnung oder unterschiedlichen Konservierungsmedien. Dies erschwert aktuell die zielgerichtete Weiterverarbeitung der gelagerten Vollblutkonserven, beziehungsweise deren längere Nutzung mit den Vorteilen von Vollblut.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist daher die Untersuchung des Einflusses zweier Konservierungsmedien (Citrat-Phosphat-Dextrose [CPD] [VB] bzw. CPD + Phosphat, Adenin, Glukose, Guanodin und Mannitol [PAGGS-M] [VB-PAGGS]) auf die Aktivität von Gerinnungsfaktoren und natürlichen Gerinnungsinhibitoren des Plasmaanteils von Vollblutkonserven während einer 28-tägigen Lagerung. Die erste Hypothese des Autors ist hierbei, dass sich eine Aktivität von oder über fünfzig Prozent der Ausgangsaktivität von Gerinnungsfaktoren und natürlichen Inhibitoren im Blutprodukt im Verlauf der ersten fünfzehn Lagerungstage findet. Diese Qualitätsanforderung ergibt sich aus der entsprechenden Leitlinie zur Gewinnung, Lagerung, Transport und Verabreichung von Blut und Blutprodukten im Veterinärbereich; 2011 (12).

Die zweite Hypothese ist, dass sich kein signifikanter Unterschied der Faktor/Inhibitor-Aktivitäten/Gehalte bzw. Gehalte der Fibrinolysemarker beim Vergleich der beiden verschiedenen Nährmedien (mit Ausnahme von Faktor V) zeigt.

Thrombozyten internalisieren Faktor V, daher ist bei dem Thrombozyten ärmeren VB-PAGGS mit einer höheren Faktor V-Aktivität zu rechnen (31, 32).

Bei Bestätigung der Hypothesen wäre für die Plasma-Komponente der Vollblutkonserve die Haltbarkeit bewiesen, wodurch sich die Möglichkeit einer Aufarbeitung (nicht gebrauchter) unterschiedlich konservierter Vollblutkonserven zu Plasmakonserven bzw. die Nutzung der Konserven mit den Vorteilen von Vollblut ergeben würde.

## 2. Literaturübersicht

### 2.1 Gerinnungssystem

Nebst externen potenziellen Traumata der Gefäße wie Schnittverletzungen, treten unter physiologischen Belastungen des Organismus täglich Mikrotraumata des Gefäßsystems auf. Diese Verletzungen der Gefäßintegrität bedingen die Notwendigkeit eines Gerinnungssystems (Hämostase) zur Verhinderung von Blutverlusten. Eine Aufrechterhaltung dieses Systems ist dementsprechend überlebenswichtig. Die normale Funktionalität wird hierbei durch ein Zusammenspiel verschiedenster zellulärer (Gefäße, Thrombozyten) als auch plasmatischer (Gerinnungsfaktoren, Inhibitoren der Gerinnung, Fibrinolyse) Systeme sichergestellt (33). Insbesondere von Bedeutung ist hierbei die Balance zwischen prokoagulatorischen Faktoren und Fibrinolyse (34).

Kommt es zu einer Schädigung des Gefäßsystems, läuft eine mehrschrittige Reaktion ab, die nach einem klassischen oder einem neuen Modell betrachtet werden kann. Das neue Modell wird hierbei unter Berücksichtigung neuer Erkenntnisse des vornehmlichen Zell-assoziierten Ablaufens der Gerinnung als sogenanntes Zell-basiertes Modell („cell-based model“) bezeichnet (35) und wird im weiteren Verlauf dieser Dissertation erläutert. Da jedoch die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen leichter unter Betrachtung des klassischen Systems zu verstehen sind (35), wird zur Verdeutlichung der physiologischen Vorgänge überwiegend dieses Modell verwendet.

Die Reaktion nach dem klassischen Modell lässt sich in drei Prozesse gliedern, die entsprechend ihrer Abfolge als primäre und sekundäre Hämostase sowie Gerinnungsinhibition und Fibrinolyse bezeichnet werden (36, 37).

Im Folgenden sollen die drei Prozesse erläutert werden. Insofern nicht anders vermerkt beziehen sich die Ausführungen auf den Menschen. Auf wichtige Abweichungen/Kenngrößen beim Hund wird hingewiesen.

#### 2.1.1 Primäre Hämostase

Die primäre Hämostase wird über die Gefäße und Thrombozyten vermittelt. Die Kontraktion der Gefäßmuskulatur proximal des geschädigten Bereiches ist der erste Schritt der primären Hämostase (38). Hierdurch wird die Flussgeschwindigkeit im Bereich der Schädigung reduziert. Die reduzierte Fließgeschwindigkeit schafft bessere Bedingungen für die Anlagerung der Thrombozyten an die Strukturen der Gefäßwand. Außerdem fließt somit weniger Blut pro Zeit an der Läsion vorbei, was den Volumenverlust reduziert. Ursache für die Spasmen der glatten Muskulatur sind in die Zirkulation freigegebene Moleküle z. B. Vasopressin und Thrombin (38).

## 2. Literaturübersicht

---

Unter physiologischen Bedingungen kommt es nicht zu einer derartigen Reaktion, da das intakte Endothel eine Initiierung der Hämostase unterdrückt (38). Die Inhibition wird hierbei durch zwei verschiedene Systeme bedingt:

1. Biochemische Inhibition
2. Strukturelle Organisation

Die biochemischen aktiven Moleküle die inhibitorisch (auf Thrombozyten bzw. plasmatische Gerinnung) oder fibrinolytisch wirken, werden überwiegend aus den Endothelzellen sezerniert. Die restlichen Stoffe sind an die Oberfläche der Zellen gebunden. Freigesetzt werden z. B. der Gewebsplasminogenaktivator („Tissue Plasminogen Activator“, tPA) und die Urokinase („Urokinase-Type Plasminogen Activator“, uPA) (38), welche Plasminogen zum aktiven Plasmin umwandeln (s. 2.1.3.1 Fibrinolyse)(39). Des Weiteren werden Stickstoffmonoxid sowie Prostacyclin freigesetzt, die die Aggregation von Thrombozyten hemmen und vasodilatativ wirken (40–43). Es soll im Folgenden auf zwei der gebundenen Effektoren eingegangen werden. Thrombomodulin bildet einen reversiblen Komplex mit Thrombin (44, 45). Die Umwandlung von Protein C zu aktiviertem Protein C (s. 2.1.3.2 Gerinnungsinhibition) erfährt durch diesen Komplex eine ausgeprägte Potenzierung im Vergleich zum reinen Thrombineinfluss (45, 46). Gleichzeitig verhindert die Komplexbildung die Effekte des Thrombins (s. 2.1.2 Sekundäre Hämostase) auf Faktor V und Fibrinogen (47). Der zweite gebundene Effektor sind Heparansulfate, die wie Heparin die Affinität des Antithrombins zur Komplexbildung erhöhen (48, 49). Die genaue Beschreibung des Effekts des Antithrombins findet sich hierbei im weiteren Verlauf der vorliegenden Arbeit.

Die Unterteilung des Querschnittes in ein Blutkompartiment und ein Gefäßkompartiment durch das Endothel dient als strukturelle Vermeidung der Hämostase. Hintergrund ist, dass die Freilegung des Subendotheliums die Hämostase durch die Anheftung von Thrombozyten initiiert (38).

Die subendotheliale Matrix weist für die Anheftung von Thrombozyten verschiedene Liganden auf, die je nach Schergeschwindigkeit im Gefäß von Bedeutung sind (50). Die Schergeschwindigkeit hängt hierbei von der Art des betroffenen Gefäßes ab (37). Von-Willebrand-Faktor sorgt z. B. für die erste Bindung bei hohen Scherkräften (51, 52). Dieser kann hierbei bereits fest gebunden sein oder im Verlauf gebunden werden. Bei letzterem Vorgang wird der an ihn gebundene Faktor VIII (53) freigesetzt (54). Von-Willebrand-Faktor wird in den Endothelzellen des Gefäßsystems sowie in den Megakaryozyten gebildet (55–57). Anschließend wird er in den alpha-Granula von Megakaryozyten und Thrombozyten bzw. den Weibel-Palade Körperchen der Endothelzellen gespeichert (58–60). Das Glykoprotein (GP) Ib-V-XI der Thrombozyten, genauer dessen Ib $\alpha$ -GP-Domäne, bindet an den von-Willebrand-Faktor (51, 52). Die Bindung weist hierbei nur eine kurze Halbwertszeit auf (61). Durch die Abbremsung der Thrombozytenbewegung, in Folge der wiederholten Bindungen, kann dann über die

entsprechenden Rezeptoren eine irreversible Bindung erfolgen (61, 62). Eine initiale Bindung an Kollagen, Fibronectin oder Laminin erfolgt bei geringen Schergeschwindigkeiten (63–66).

Die anschließende Aktivierung der Thrombozyten wird durch die vorangegangene Adhäsion ausgelöst. Mediert wird dies über verschiedene Mechanismen. Die Thrombozyten erfahren im Rahmen der Aktivierung eine Vielzahl von Veränderungen. Die Veränderungen sind in diesem Rahmen sowohl struktureller als auch funktioneller Natur. Zum einen vergrößern die Thrombozyten ihr Oberflächen-Volumen-Verhältnis und passen die Zusammensetzung ihrer Phospholipiddoppelmembran durch eine prokoagulatorisch wirkende Erhöhung des Phosphatidylserin-Anteils an (67–70). Zum anderen wird eine Vielzahl von Stoffen aus den sogenannten alpha- und dense-Granula sowie den Lysosomen freigesetzt, darunter Adenosindiphosphat (ADP), Adenosintriphosphat (ATP), Serotonin, von-Willebrand-Faktor und Calcium (70–72). Diese dienen wie Thromboxan  $A_2$  zum Teil der Aktivierung weiterer Thrombozyten am Ort der Läsion (37, 73). Hunde zeigen jedoch zu einem großen Teil keine Aggregation als Folge der Exposition zu Thromboxan  $A_2$ , auch wenn sie dieses produzieren. Die Sekretion auf Thromboxan  $A_2$  lässt sich jedoch durch den Einfluss von Adrenalin wiederherstellen (74–76). Beim Vorliegen ausgeprägter Scherkräfte fungiert ADP als Aktivator (77–79). Darüber hinaus ist ein weiterer Schritt der Aktivierung die Ermöglichung der Fibrinogenbindung zwischen Thrombozyten über die Konformationsänderung des  $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Rezeptors (80–82).

Der letzte Schritt der primären Hämostase ist die Aggregation der Thrombozyten, die einen weißen Thrombus/Thrombozytenpfropf zur Folge hat. Die Verknüpfung der Thrombozyten untereinander wird hierbei über Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  und Fibrinogen hergestellt (83). Durch den entstehenden weißen Thrombus können Wunden verschlossen werden, bei größeren Verletzungen wird zusätzlich die sekundäre Hämostase benötigt.

### 2.1.2 Sekundäre Hämostase

Die sekundäre Hämostase stabilisiert den weißen Thrombus über die Ausbildung eines Fibrinpolymers (84). Die sekundäre Hämostase lässt sich in drei Abschnitte gliedern: Das intrinsische System und das extrinsische System, die jeweils die Gerinnungsreaktion starten können, sowie den gemeinsamen Weg, als Endstrecke beider Startwege der sekundären Hämostase (85, 86). Die Bezeichnungen extrinsisch und intrinsisch beziehen sich hierbei auf die Herkunft des Auslösers der Gerinnungsreaktion; nicht im bzw. im Blutgefäß (87). Jedoch sind diese Bezeichnungen irreführend, da extern zugeführte Stoffe den intrinsischen Weg initialisieren können (88–90). Beteiligt sind in allen oben genannten Prozessen die Gerinnungsfaktoren sowie weitere Stoffe, darunter vor allem Calcium und Phospholipide (90). Die Gerinnungsfaktoren werden mit römischen Ziffern benannt, wobei die aktiven Formen mit einem

nachgestellten kleinen „a“ gekennzeichnet werden (91, 92). Die Synthese der Gerinnungsfaktoren erfolgt im Leberparenchym (93, 94). Die Faktoren X, IX, VII und II werden hierbei carboxyliert, wofür Vitamin K essentiell notwendig ist (23, 85). Faktor VIII wird als einziger der Gerinnungsfaktoren nicht im funktionellen Gewebe der Leber, sondern nach aktuellem Wissensstand vermutlich im Endothel der Lebersinusoiden gebildet (95, 96). Die Reaktionen der Gerinnungsfaktoren sind kaskadenartig hintereinander angeordnet (Gerinnungskaskade) (90, 91), wobei der jeweils vorgeschaltete Gerinnungsfaktor den darauffolgenden von seiner inaktiven Form (Zymogen) (97) in seine enzymatisch aktive Form überführt (90, 91). Da es sich beim überwiegenden Teil der Gerinnungsfaktoren um Serinproteasen handelt, wird die Aktivierung meist über die Spaltung von Peptidbindungen vermittelt (38, 87).

### Extrinsisches System

Die Aktivierung des extrinsischen Weges der sekundären Hämostase erfolgt über die Komplexbildung von Faktor VII mit dem Gewebefaktor (Faktor III) (98). Dieser wird unter physiologischen Bedingungen nur auf Gewebezellen, die keinen direkten Kontakt zu Blut haben, exprimiert (99) und wird dementsprechend durch ein Trauma in Verbindung mit dem Blut gebracht. Der Komplex führt zur Umwandlung von Faktor X zu Faktor Xa, was wiederum zur Fortführung der Gerinnungskaskade über den gemeinsamen Weg führt (98, 100).

### Intrinsisches System

Über die Bindung von Faktor XII an polyanionische Oberflächen wie z. B. von Thrombozyten freigesetzte Polyphosphate, kommt es zur Auslösung der intrinsischen Kettenreaktion. Ursache ist die durch die Bindung verursachte Aktivierung geringer Mengen von Faktor XII (101–103). Faktor XIIa spaltet in der Folge das Hochmolekulare Kininogen („High-molecular-weight kininogen“, HMWK) in seine aktivierte Form (HMWKa) sowie Bradykinin (104, 105). HMWKa bindet daraufhin stärker an negativ geladene Oberflächen (104). Präkallikrein und Faktor XI, die jeweils einen Komplex mit HMWK bilden (106–108), werden ebenfalls durch Faktor XIIa aktiviert (102, 109). Die durch die Oberflächenbindung der HMWKa-Komplexe bedingte Annäherung an den lokalisierten Faktor XIIa ermöglicht hierbei den Prozess der Aktivierung der Substrate von Faktor XIIa (107). Das entstehende Kallikrein wird zum Teil freigesetzt (109) und überführt seinerseits in einer positiven Rückkopplung Faktor XII in Faktor XIIa (110) sowie HMWK zu HMWKa mit seiner leichten und schweren Kette (104). Die oben beschriebene Komplexbildung mit Präkallikrein und Faktor XI wird hierbei über die leichte Kette bzw. den diese enthaltenden Bereich vermittelt (108). Ein negatives Feedback wird wiederum über den aktivierten Faktor XI bewirkt, der zwar HMWK aktiviert, aber durch weitere Spaltung des aktivierten HMWK die prokoagulatorischen Wirkungen des HMWK hemmt (111). Faktor IX wird daraufhin durch seinen

aktiven Vorgänger (Faktor XIa) aktiviert (112). Anschließend entsteht der sogenannte Tenase-Komplex aus den aktivierten Formen von Faktor VIII und IX sowie Calcium. Lokalisiert ist dieser hierbei auf einer Phospholipiddoppelmembran, auf der er über das Calcium gebunden ist (97, 113, 114). Der Tenase-Komplex initiiert die gemeinsame Endstrecke der sekundären Hämostase, indem er Faktor X zu Faktor Xa umwandelt (97, 115).

Zwischen dem extrinsischen und dem intrinsischen System besteht eine Verbindung, so können Faktor VII und der Gewebefaktor, zusammen mit Calcium als Cofaktor, Faktor IX zu Faktor IXa umwandeln (116), was nach dem Erstbeschreiber als sogenannte „Josso-Schleife“ bezeichnet wird (36, 117).

### Gemeinsamer Weg

Der die Umwandlung von Prothrombin (Faktor II) zu Thrombin (Faktor IIa) katalysierende Prothrombinase-Komplex entsteht aus dem durch Faktor Xa aktivierten Faktor Va und Faktor Xa. Auch hier findet die Reaktion auf einer Phospholipidmembran statt, was von Calcium vermittelt wird (118–120). Die Fibrinogenmoleküle, die in Kontakt mit Thrombin kommen, werden durch dieses gespalten (121). Hierbei werden nebst Fibrinmonomeren, die sich zu einem Fibrinpolymer verbinden können (122–124) auch Spaltprodukte der Fibrinogenketten (Fibrinopeptid A und Fibrinopeptid B) freigesetzt (121, 125, 126). Die Faktoren V, VIII, XI und XIII werden ebenso durch Thrombin in ihren aktiven Zustand überführt (127–131), wie Protein C (s. 2.1.3.2 Gerinnungsinhibition) sowie Thrombozyten (s. 2.1.4 Neue Einteilung (Zell-basiertes Modell)). Der Einfluss auf die ersten drei genannten Faktoren bedingt einen positiven Feedback-Mechanismus (132, 133). Abschließend wird das Fibrinpolymer stabilisiert, indem durch Faktor XIII Querverbindungen eingeführt werden (134–136). Dies geschieht am Fibrin über die D-Domänen des Fibrins (137–140).

Das in diesem Abschnitt dargelegte Modell der sekundären Hämostase stellt eine artifizielle Vorstellung der Verhältnisse in vivo dar, wie im Abschnitt über das „cell-based modell“ näher dargelegt. Allerdings sind auf diesem Verständnis die später dargestellten Testsysteme aufgebaut bzw. umgekehrt basiert die Vorstellung auf den Testsystemen (141), was deren Verständnis im Folgenden erleichtert. Darüber hinaus sei anzumerken, dass sich die Aktivitäten der Gerinnungsfaktoren der Spezies Hund im Vergleich zum Menschen deutlich unterscheiden. So zeigt der Hund bei den Faktoren V, VII, VIII und XI deutlich höhere Aktivitäten. Ausgeprägt ist der Effekt hierbei insbesondere bei Faktor V und VIII (142, 143).

### 2.1.3 Gerinnungsinhibition und Fibrinolyse

Die oben aufgeführten Gerinnungsvorgänge (s. 2.1.1 Primäre Hämostase und 2.1.2 Sekundäre Hämostase) würden aufgrund ihres kaskadenartigen Ablaufs offensichtlich zu einer überschießenden Gerinnungsreaktion führen, weshalb ein hemmendes System benötigt wird. Die Regulation erfolgt hierbei über die Inhibitoren der Gerinnung sowie die Fibrinolyse. Die Fibrinolyse umfasst die Prozesse, die mit der Auflösung des Fibrinpolymers einhergehen (144–146). Sie läuft parallel zu den oben beschriebenen Gerinnungsvorgängen ab. Die Inhibition der Gerinnung hemmt die aktuell ablaufende Gerinnungsreaktion. Beide Prozesse lokalisieren und beschränken die Gerinnungsreaktion. Das Auflösen bestehender Gerinnungsprodukte und die Verhinderung einer zu großen Thrombusbildung normalisieren hierbei die Perfusion des Gefäßsystems (36, 93, 144, 145, 147, 148).

#### 2.1.3.1 Fibrinolyse

Der zentrale Effektor der Fibrinolyse ist das Plasmin (146, 149, 150), welches Fibrin (146) und Fibrinogen (151) spaltet. Die Peptidasen tPA, uPA, Faktor XIa, Faktor XIIa und Kallikrein (144, 152–155) aktivieren das hepatisch synthetisierte (156) Plasminogen zu aktivem Plasmin. Zuvor erfährt tPA nach seiner Freisetzung aus den Endothelzellen (s. 2.1.1 Primäre Hämostase) selbst eine ausgeprägte Stimulation seiner katalytischen Leistungsfähigkeit durch Fibrin (157, 158). tPA und uPA haben unterschiedliche Affinitäten für Plasminogen, so interagiert uPA vor allem mit gebundenem Plasminogen, tPA hingegen mit freiem Plasminogen (159). Während der sekundären Hämostase wird Plasminogen über die Bindung an Fibrin in das entstehende Fibrinpolymer eingelagert (146, 160). Vorteil dieser Bindung ist die Lokalisierung des Effekts des Plasmins ebenso wie die Intensivierung des Effekts durch eine vermehrte Aktivierung (157). Die Aktivität von Plasmin bedingt die Entstehung von Spaltprodukten seiner Substrate (Fibrin-/Fibrinogenspaltprodukte, „fibrin/fibrinogen degradation products“, FSP). Die FSP hemmen die Gerinnung u. a. durch die Hemmung von Thrombin (161–163). Außerdem von Bedeutung sind die sogenannten D-Dimere, die nur bei der Lyse von durch Faktor XIII stabilisiertem Fibrin vorkommen (164–166). Aus diesem Grund beinhalten sie die oben (s. 2.1.2 Sekundäre Hämostase) genannten D-Domänen (164). Sie werden diagnostisch eingesetzt (s. 2.2.2.2 Spezialtests). Um eine zu starke Fibrinolyse (Hyperfibrinolyse) zu vermeiden, wird auch die Fibrinolyse reguliert. Hierbei findet die Regulation des Systems auf drei Ebenen statt. Einerseits kann Plasmin direkt gehemmt werden, andererseits gibt es eine Hemmung der Aktivierung des Plasmins sowie darüber hinaus einen Einfluss, der über Fibrin vermittelt wird. Alpha2-Antiplasmin sorgt durch Bindung des Plasmins für eine Unterbrechung der Enzymfunktion (167–169). Gebunden wird sowohl freies als auch mit Fibrin assoziiertes Plasmin. Das freie Plasmin wird hierbei schneller gehemmt (146). Die Aktivierung des Plasmins wird über den Plasminogen-Aktivator-Inhibitor Typ 1 (PAI-1) mittels Komplexierung

desselbigen mit tPA/uPA gehemmt (169–171). Gegensätzlich dazu kann die Bindung von tPA an endständige Lysin-Moleküle des quervernetzten Fibrins eine Potenzierung der Affinität von tPA zu Plasminogen bedingen (157). Die endständigen Lysin-Moleküle des Fibrins können durch den Thrombin-aktivierbaren Fibrinolyseinhibitor (TAFI) abgespalten werden, wodurch die Bindung von Plasminogen behindert wird (172).

### 2.1.3.2 Gerinnungsinhibition

Nebst der Fibrinolyse, die bereits gebildete Produkte der Gerinnung abbaut, kommt der Inhibition der ablaufenden Gerinnung eine wichtige Rolle zu. An der Gerinnungsinhibition sind neben den spezifischen Faktoren auch unspezifische Mechanismen beteiligt. So wurde die Rolle des Endothels bereits hinreichend dargelegt (s. 2.1.1 Primäre Hämostase). Des Weiteren werden die aktiven Formen der prokoagulatorischen Proteine schnell abgebaut (173, 174) sowie durch den kontinuierlichen Blutfluss im Gefäßsystem vom Ort der Entstehung weggeschwemmt (85). Darüber hinaus findet das Zusammenspiel des komplexen Systems der Gerinnung unter physiologischen Bedingungen nur am Ort eines Gefäßtraumas statt, da nur hier die nötigen zellulären Voraussetzungen (s. 2.1.4 Neue Einteilung (Zell-basiertes Modell)) gegeben sind (67, 175–179). Ebenso inaktivieren die Inhibitoren insbesondere nicht mehr Zell-gebundene prokoagulatorische Proteine (35).

Von den spezifischen Akteuren der Gerinnungsinhibition soll im Folgenden auf Antithrombin; Protein C, S und Z; Tissue Factor Pathway Inhibitor (TFPI), Heparin Cofaktor II sowie  $\alpha$ 1-Antitrypsin eingegangen werden. Bezüglich Thrombomodulin sei auf die zuvor aufgeführten Erläuterungen (s. 2.1.1 Primäre Hämostase) verwiesen. Besonders Antithrombin und das Protein C/Protein S-System sind hierbei bedeutend (145, 180, 181).

Antithrombin ist ein glykosyliertes Protein der  $\alpha$ 2-Globulinfraktion der Plasmaproteine (182). Die Produktion erfolgt hepatisch (183). Es ist der Haupteffektor der Gerinnungsinhibition (145, 181). Seine Hemmwirkung basiert auf einer Komplexbildung mit den zu hemmenden Serinproteasen (184, 185). Gehemmt werden u. a. Thrombin (182, 185), Faktor Xa (184, 186), IXa (187), XIa (188) XIIa (189) und Kallikrein (190), aber auch die Akteure der Fibrinolyse: Plasmin (191) und die Plasminogenaktivatoren (190). Die Hemmwirkung von Antithrombin auf Thrombin kann über die Bindung an Thrombomodulin beschleunigt werden (192). Die stärkste Beschleunigung seiner Wirkung (um mehrere Zehnerpotenzen (193)) erfährt Antithrombin jedoch über die Interaktion mit Heparinderivaten (193–195). Der Effekt wird sowohl über endogene Heparane (48, 49)(s. 2.1.1 Primäre Hämostase) als auch über exogene Heparine (196, 197) ausgelöst.

Protein S und Protein C werden unter dem Einfluss von Vitamin K hepatozytär produziert (198, 199). Protein C liegt ungebunden und wie für Serinproteasen üblich, nicht aktiviert im Blut vor (200–202).

Protein S hingegen kann komplexiert oder nicht komplexiert im Blut vorkommen. Die Komplexierung findet mit einem Bestandteil des Komplexsystems, dem „C4b-binding protein“ statt (203). Nach der Aktivierung von Protein C zum aktivierten Protein C (APC) durch Thrombin oder den Thrombin-Thrombomodulin-Komplex (204–206) dient diesem Protein S als Cofaktor (198). Unterstützt wird der Prozess der Protein C-Aktivierung durch den endothelialen Protein C-Rezeptor (EPCR), der durch das Herstellen räumlicher Nähe zwischen Protein C und an Thrombomodulin gebundenem Thrombin die Aktivierung fördert (205, 207). APC inaktiviert mit Calcium als Cofaktor, Phospholipiddoppelmembran gebunden, (208) die Faktoren V (204) und VIII (208), wobei hauptsächlich, aber nicht ausschließlich (205, 208), die aktivierten Faktoren betroffen sind. Die Verstärkung der Fibrinolyse ist eine weitere Wirkung von Protein C (206, 209, 210). Die Wirkung des Protein S als Cofaktor von APC basiert auf verschiedenen Mechanismen. Zum einen bindet APC unter Einfluss von Protein S stärker an Phospholipiddoppelmembranen mit negativer Ladung (205, 211, 212). Zum anderen macht es Faktor Va im Prothrombinasekomplex für APC verfügbar, indem es die Bindung zu Faktor Xa aufhebt (213). Außerdem ist Protein S mit Faktor V ein die Reaktion verstärkender Cofaktor bei der Spaltung von aktiviertem Faktor VIII (205). Protein S zeigt darüber hinaus eine kompetitive Hemmung am Prothrombinase-Komplex, was die Aktivierung von Faktor II behindert. Die kompetitive Hemmung von Faktor IIa geschieht hierbei an Faktor Va (213). Nebst der direkten Interaktion von Protein S mit den Faktoren, wurde insbesondere für die APC unabhängigen Effekte eine Vermittlung des Effekts über die Blockierung von Phospholipid-haltigen Oberflächen diskutiert (214).

Der aktivierte Faktor X wird durch den Protein Z-abhängigen Protease Inhibitor inaktiviert. Als Cofaktor dient hierbei Protein Z (215–218). TFPI wird auf Endothelzellen exprimiert und behindert den extrinsischen Gerinnungsweg durch die Hemmung des Gewebefaktor-Faktor VII-Komplexes und dem aktivierten Faktor X (219–223). Die Bindung von TFPI an den aktivierten Faktor X, der letzteren Effekt bedingt, wird durch Protein S als Cofaktor begünstigt. Die Interaktion läuft hierbei mit Bindung an einer Phospholipiddoppelmembran ab (224, 225).

Eine Hemmung von aktiviertem Faktor II wird nebst den oben erwähnten Mechanismen durch Heparin Cofaktor II in Anwesenheit von Heparin verursacht (226). Aktivierter Faktor XI und aktiviertes Protein C können wiederum ihre Wirkung durch die Bindung von  $\alpha$ 1-Antitrypsin verlieren (205, 227, 228). Aktiviertes Protein C wird darüber hinaus durch Bindung mit dem Protein C Inhibitor (PCI) gehemmt (229).

### 2.1.4 Neue Einteilung (Zell-basiertes Modell)

Wie alle Modelle zur Veranschaulichung komplexer Sachverhalte weist das oben beschriebene Kaskaden-/Wasserfallmodell (s. 2.1.2 Sekundäre Hämostase) Limitationen auf. So betrachtet dieses vor allem nicht im Detail die Interaktion zwischen der primären und sekundären Hämostase (35), welche in vivo durch Wechselwirkungen zwischen Membranen (von Thrombozyten) und Gerinnungsfaktoren gegeben ist (179). Diese Interaktionen sind in vitro durch das Abtrennen der Thrombozyten bzw. durch das Fehlen von Gefäßen ausgeschaltet. Entsprechend gibt es Situationen, deren Erläuterung mit ihm nicht möglich sind (35). Erkenntnisse, die die Abhängigkeit der Gerinnungsreaktion von der Phospholipiddoppelmembran von Zellen/Zellfragmenten aufzeigen, führten somit schließlich zur Entwicklung des Zell-basierten Modells der Gerinnung („cell-based model of hemostasis“) (35). Die pro- oder antikoagulatorische Wirkung der Membranen hängt hierbei von den Proteinen auf/in der Membran der Zelle und vom Verhältnis der Phospholipide zueinander ab (35, 67, 230). Der dreischrittige Ablauf aus Initiation, Amplifikation und Propagation zeigt Überlagerungen der einzelnen Teilabschnitte (35), folgt allerdings nicht der klassischen Einteilung in den intrinsischen, extrinsischen und gemeinsamen Gerinnungsweg (s. 2.1.2 Sekundäre Hämostase). Die nach dem klassischen Modell beschriebenen Vorgänge finden sich auch im Zell-basierten Modell wieder, jedoch in einer anderen zeitlichen Abfolge und mit der beschriebenen Assoziation zu Zellmembranen.

In der Initiationsphase erfolgt die Aktivierung des plasmatischen Gerinnungssystems über den extrinsischen Weg. Da der Gewebefaktor, wie zuvor beschrieben, zellulär gebunden ist, findet mit diesen Zellen assoziiert auch die Umwandlung der Faktoren X und IX in ihre aktiven Formen statt (116, 230). Die anschließende Bildung des Prothrombinaktivator-Komplexes setzt in der Folge wenige Moleküle von Faktor II zum aktiven Thrombin um (230, 231). Der gebildete Faktor IIa verteilt sich über Diffusion ausgehend vom Ort seiner Bildung (230). Wird ein gewisser Grenzwert der Menge des aktivierten Faktors überschritten, bindet er im Folgenden an Thrombozyten in der Nähe und es kommt zur vollständigen Aktivierung dieser mit anschließender Aktivierung der Gerinnungsreaktion (35, 230). Die Aktivierung wird durch Protease-aktivierte Rezeptoren (PAR) vermittelt (232–235). Von den PAR-Isoformen liegen beim Hund wahrscheinlich alle Subformen (PAR1, PAR2, PAR3 und PAR4) im Körper vor, wobei PAR2 nicht auf den Thrombozyten exprimiert wird. Ihre exakte Wirkweise ist beim Hund noch nicht vollständig geklärt (236–238). Die Bindung läutet die Amplifikationsphase ein, im Rahmen derer es zu einer Verstärkung der in Gang gebrachten Gerinnungsreaktion kommt. Der an die Thrombozyten gebundene Faktor IIa spielt dabei eine entscheidende Rolle (35). Er vermittelt vor allem zwei Effekte: Erstens werden die Inhaltsstoffe der alpha-Granula z. B. Faktor V als Reaktion auf die Aktivierung der PARs abgegeben (230, 239, 240). Zweitens erfolgt eine Umwandlung der inaktiven Faktoren V, VIII und XI zu ihren jeweils aktiven Pendanten (131, 241–243). Die Aktivierung von Faktor VIII

## 2. Literaturübersicht

---

beruht auf der Spaltung der Verbindung zum von-Willebrand-Faktor. Letzterer kann anschließend in der primären Hämostase wirken (242, 244). Faktor XIa setzt auf den Thrombozyten den intrinsischen Gerinnungsweg in Gang (242–245). Die einzelnen Vorgänge laufen auf der Membran der Thrombozyten nah beieinander ab, was für eine effektive Gerinnungsreaktion sorgt (35). In der abschließenden Propagation kommt es schließlich zur Ausbildung von Tenase- und Prothrombinasekomplexen (s. 2.1.2 Sekundäre Hämostase) (242), die zunächst für die Bildung von aktiviertem Faktor X bzw. anschließend für die Produktion von großen Mengen Thrombin (35) („thrombinburst“) (246) sorgen, was schließlich, wie oben beschrieben (s. 2.1.2 Sekundäre Hämostase) zur Bildung von Fibrin führt (35).

## 2.2 Ausgewählte Diagnostik der sekundären Hämostase, Gerinnungsinhibition sowie Fibrinolyse

### 2.2.1 Präanalytik

Die Gerinnungsdiagnostik ist anfällig für präanalytische Fehler (247, 248). Unter anderem zu beachtende Punkte sind die Entnahmetechnik, die Menge und Konzentration der verwendeten Antikoagulanzen sowie die anschließende Bearbeitung der Blutprobe (s. u.), auf die im Folgenden eingegangen werden soll.

Der Blutprobenentnahme sollte keine lange Stauung des Gefäßes vorangehen. Des Weiteren ist eine möglichst atraumatische Venenpunktion ideal. Beide Maßnahmen reduzieren die prokoagulatorischen Auswirkungen der Blutentnahme (u. a. durch Veränderungen des Blutflusses) auf ein Minimum (93, 249–252). Zusätzlich kann die atraumatische Venenpunktion auch als prophylaktische Maßnahme zur Vermeidung von Blutungskomplikationen der dafür prädisponierten Patienten betrachtet werden (253). Sollte bei der Blutprobenentnahme eine traumatische Punktion durchgeführt worden sein, empfiehlt sich der Verwurf eines zunächst gefüllten Serumröhrchens („discard tube“) oder die vorherige Befüllung eines anderen Blutprobenröhrchens wie beispielsweise eines EDTA-antikoagulierten Probengefäßes für hämatologische Untersuchungen. Dies vermeidet nachteilige Beeinflussungen der Gerinnungsanalyse durch eine Aktivierung der Gerinnung (252).

Als Antikoagulans für Gerinnungsuntersuchungen wird überwiegend Citrat verwendet (254, 255). Citrat erlaubt die Herstellung eines reversibel nicht gerinnungsfähigen Plasmas über die Bildung von Chelatkomplexen mit den im Blut enthaltenen Calcium-Ionen (256). Die verwendete Citrat-Konzentration der Citrat-Lösung beträgt gängiger Weise 3,2 oder 3,8 % (109 bzw. 129 mmol/L), wobei sich signifikante Unterschiede zwischen den beiden Lösungen bei den überprüften Tests der sekundären Hämostase nur bei der aktivierten partiellen Thromboplastinzeit (aPTT) fanden (254, 255, 257, 258). Nichtsdestotrotz sollte eine Variante zur Verwendung festgelegt werden. Spezifische Referenzbereiche sind eine Alternative. Beide Möglichkeiten, mit den unterschiedlichen Konzentrationen des Citrats umzugehen, erhöhen die Sensitivität der Methoden, Störungen der Hämostase zu detektieren (254, 255).

In den Probenentnahmeröhrchen mit Citrat finden sich bei korrekter Befüllung (bis zur entsprechenden Markierung) in aller Regel 1 Anteil Antikoagulans und 9 Teile Blut (255, 259). Somit ergibt sich eine finale Citrat-Konzentration von 10,9 bzw. 12,9 mmol/L, wie sie in entsprechenden Guidelines empfohlen wurde (260). Da das Citrat-Volumen im Probenröhrchen auf das Nennfüllvolumen angepasst ist, bedingt eine unzureichende Füllmenge des Probengefäßes durch die höhere Citratkonzentration des Gemisches, eine signifikante Erhöhung von Prothrombinzeit (PT), aPTT sowie

## 2. Literaturübersicht

---

falsch niedrige Messungen der Faktor VIII-Aktivität und des von-Willebrand-Faktor-Antigens, was bei Hunden nachgewiesen wurde (259). Eine um 20 % vermehrte Füllung bedingte hingegen keine signifikanten Abweichungen in einer Studie (259). Eine humanmedizinische Studie zeigte bezüglich eines erhöhten Anteils von Blut zu Antikoagulans ebenfalls nur geringfügige Effekte. Dieselbe Studie zeigte ebenso ausgeprägte Effekte bei einer unzureichenden Füllung (261). Proben, die mit 3,2%igem Citrat versetzt wurden, zeigten bei einer Unterfüllung mit humanem Blut geringere Verlängerungen der Gerinnungszeiten (PT und aPTT) im Vergleich zu 3,8 %igem Citrat. Die PT war hierbei weniger empfindlich und zeigte auch bei einer Befüllung von nur 60 % des Nennvolumens ausschließlich nicht signifikante Veränderungen (262). Dies deckte sich mit den Ergebnissen einer anderen humanmedizinischen Studie (263). Da sich die Citrat-Menge in den Entnahmeröhrchen an der vorhandenen Plasmamenge (für einen gewissen Hämatokritbereich) orientiert, kommt es auch mit einer exakten Befüllung bei einer Hämokonzentration zu statistisch signifikanten Verlängerungen von PT und aPTT analog zu den Ergebnissen bei unterfüllten Probenröhrchen mit humanem Probenmaterial (264). Dieser Effekt beruht wahrscheinlich auf zwei Mechanismen. Zum einen auf einer Verdünnung durch das resultierende erhöhte Verhältnis von Antikoagulans zu Plasma sowie zum anderen auf der daraus folgenden vermehrten Calcium-Bindung (264–266). In derselben Studie konnten statistisch signifikant erniedrigte Fibrinogenkonzentrationen, Faktor VIII- sowie Protein C-Aktivitäten nachgewiesen werden, wobei diese als klinisch begrenzt relevant eingestuft wurden (264). Bei Hunden mit Hämatokritwerten von 55 % oder höher konnte hingegen nur eine aPTT-Verlängerung nachgewiesen werden (267). Der gegenteilige Zustand einer Anämie bzgl. der Citratkonzentration, entsprechend einer Überfüllung des Probengefäßes, bedingte hingegen in einer humanmedizinischen Studie bei Patienten mit Hämatokritwerten zwischen 14,2 und 24,4 % signifikant verkürzte, aber nicht klinisch signifikante aPTT-Werte (248).

Eine Anpassung der Citratkonzentration (Citratkorrektur) mit exakter Vorlage der nötigen Menge Citrat-Lösung ist möglich, sollte jedoch entsprechend der oben genannten Punkte, wenn überhaupt, nur bei hohen Hämatokritwerten (mehr als 55 %) beim Hund in Betracht gezogen werden (264, 267). Eine Formel zur Berechnung der nötigen Menge an Citrat-Lösung, aufgeführt vom Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (268), findet sich im Folgenden modifiziert zur Endangabe der Menge der Citrat-Lösung in Mikrolitern:

$$\text{Citratvolumen (in } \mu\text{l)} = 1,85 * \text{Blutvolumen (in ml)} * (100 - \text{Hkt (in \%)})$$

Hkt = Hämatokrit

Bei Einsatz von entsprechenden Citrat-haltigen Probengefäßen ist die vorgelegte Menge an Citrat-Lösung zu beachten (255). Dementsprechend muss bei hämokonzentrierten Tieren Citrat-Lösung entnommen werden. Eine Alternative stellt die Verwendung von Spritzen mit selbst aufgezogener Citrat-Lösung dar. Die Citratkorrektur sollte nur nach genauer Abwägung erfolgen, da Fehler bei der Anpassung des Volumens (Pipettierfehler, Berechnungsfehler) der Citrat-Lösung zu Beeinflussungen der Ergebnisse führen können. So kann es besonders bei der Zugabe von Citrat bei anämischen Proben zu Verdünnungseffekten mit falsch hohen Werten der Screeningtests kommen (261). Darüber hinaus ist die klinische Relevanz fraglich, weil PT- und aPTT-Messungen von hämokonzentrierten Patienten/unterfüllten Proben, die sich in ihren Messungen teils hypokoagulabel zeigen (s. o.), bei Messwerten im Referenzbereich keine Gerinnungsstörung erwarten lassen (269). Trotzdem sind bei hohen Hämatokritwerten (s. o.) die Detektion von geringfügigen Koagulopathien oder die Überwachung eines Heparineffekts angegebene mögliche Indikationen (255).

Nach entsprechender Durchmischung der Probe sollte der Plasmaanteil innerhalb von sechs Stunden nach Lagerung bei Raumtemperatur abgetrennt werden, wobei längere zu tolerierende Zeiträume je nach Parameter oder bei gekühlter Lagerung etabliert werden können (255, 270–272). Die Abtrennung sollte im Fall der Untersuchung von Fibrinolysemarkern schneller erfolgen (273). Auch sollten für Analysen der sekundären Hämostase nur Plasmaproben (vs. Vollblut) per Fahrzeug transportiert werden, auch wenn die maximale empfohlenen Dauer vor der Analyse (s. o.) eingehalten wird (255, 274). Diese Empfehlung ergibt sich aus dem Nachweis einer klinisch signifikanten Beeinflussung der PT nach einem entsprechen Transport in einer humanmedizinischen Studie (274).

Die hierfür notwendige Zentrifugation sollte mit  $\geq 1500$ -facher Erdbeschleunigung (g) für fünfzehn Minuten durchgeführt werden (255, 273). In der Humanmedizin sind abweichende Protokolle etabliert worden (275, 276). Weitere Erläuterungen zu einem von uns verwendeten abweichenden Protokoll und den hierfür zu erfüllenden Anforderungen sind unter „3.1.1.3 Weitere Verarbeitung und Messung der Proben“ aufgeführt. Thrombozytenzahlen im Plasma über den gewünschten Werten können durch eine reduzierte Dauer der Zentrifugation bedingt sein (277), was im Falle eines Einfrierens der Probe vor der Analyse durch daraus folgende Messwertveränderungen problematisch ist (278). Grundsätzlich ist es daher ratsam, ein standardisiertes Verfahren zu verwenden (255). Geronnene und hämolytische Proben müssen verworfen werden (255, 279). Es wird empfohlen, das von den zellulären Bestandteilen abgetrennte Plasma in ein Probengefäß ohne Antikoagulantien umzufüllen. Um eine Kontaktaktivierung zu vermeiden, sollten das Probengefäß sowie die verwendete Pipette bzw. die Pipettenspitze aus Plastik bestehen. Beim Transfer ist es wichtig, eine Kontaminierung der Probe mit zellulären Bestandteilen durch in Suspension bringen des „buffy coats“ zu vermeiden (255).

Nach dem Abtrennen sollten die Proben innerhalb von einer Stunde untersucht werden, wobei abweichende Vorgehensweisen nach entsprechender Testung eingeführt werden können (255). Grundsätzlich sind in der Veterinärmedizin verschiedene Zeiträume je nach Lagerungstemperatur und verwendeten Testungsmodalitäten beschrieben. Eine Lagerung des Plasmas bei mittleren Raumtemperaturen zwischen 20 und 23 °C für bis zu 24 Stunden (272, 280, 281) konnte mit teils kleinen Verlusten des Gehalts an Fibrinogen (281) ebenso verwendet werden wie eine Lagerung bei 4 °C für bis zu 48 Stunden (272, 281). Jedoch gibt es zur gekühlten Lagerung auch abweichende Ergebnisse bei höheren und niedrigeren Temperaturen, die kürzere bzw. längere Lagerungszeiten erlaubten (282, 283). Ist das Ziel, die Proben länger als die oben genannten Zeiträume zu lagern, empfiehlt es sich, die Proben einzufrieren (283–285). Es ist ratsam, die eingefrorenen Proben schonend mittels eines Wasserbades unter kontrollierten Bedingungen aufzutauen (255, 286, 287). Wichtig ist zu vermerken, dass sich die Angaben des letzten Absatzes auf unmittelbar abzentrifugierte Proben beziehen. Probenmaterial, das später aufgetrennt wurde, muss separat auf seine Haltbarkeiten überprüft werden.

### 2.2.2 Analytik

Gerinnungsdiagnostik wird insbesondere bei Tieren mit Blutungen/Blutungsdiathese und bei entsprechenden Risikopatienten vor invasiven Eingriffen z. B. Operationen eingesetzt (288). Bei den Gerinnungstests der sekundären Hämostase muss zwischen Screeningtests (PT, aPTT) und speziellen Tests (Faktormessungen, Fibrinogenbestimmung, Messung der Inhibitoren) unterschieden werden (4, 289). Die Screeningtests überprüfen die Funktion mehrerer Faktoren (s. 2.2.2.1 Screeningtests) und können auch als „Bedside“-Tests eingesetzt werden (253, 290, 291). Die „Point-of-Care“-Tests erhöhen hierbei die Verfügbarkeit solcher Tests, die sonst in der Veterinärmedizin auf große Einrichtungen und den Tagdienst beschränkt sind (288, 292). Bei Abweichungen erfolgt dann eine weitere Aufarbeitung mittels der Spezialtests (289). Diese Spezialtests sind allerdings, ihrer Spezifität entsprechend, teuer in der Durchführung (293). Die Analyse der Inhibitoren der Gerinnung, an der Fibrinolyse beteiligten Proteine sowie der Aktivierungsmarker (D-Dimere) erfolgt gezielt, bezogen auf die einzelnen Proteine (s. 2.2.2.2 Spezialtests). Auf weitere Ausführungen des Therapiemonitorings von Antikoagulantien sowie zu genetischen Untersuchungen soll aufgrund der fehlenden Relevanz für die vorliegende Arbeit verzichtet werden. Aus demselben Grund wurden gesonderte Informationen hierzu im Abschnitt über die Präanalytik ausgespart.

### 2.2.2.1 Screeningtests

Die zwei wichtigsten/am häufigsten in der Veterinärmedizin eingesetzten Screeningtests für die sekundäre Hämostase sind die PT und aPTT (254). Es sei hier jedoch vermerkt, dass nach verschiedenen Studien ein Anstieg der PT und aPTT über den Referenzbereich erst nach dem Verlust von 38 bis 91 % des Gehalts eines isolierten beteiligten Faktors erfolgt. Die Schwelle ist hierbei Faktor- und Reagenz-abhängig (21, 294–296). Von klinischer Bedeutung sind Erhöhungen der beiden Tests von 25 % über den Referenzbereich (14, 21). Dies bedingt eine verhältnismäßig niedrige klinische Sensitivität nebst der fehlenden Spezifität für die einzelnen Faktoren (297). Beeinträchtigt wird diese darüber hinaus durch im Vergleich zu menschlichen Proben kurzen Gerinnungszeiten bei Klein- und Heimtieren (298).

Störungen von Faktor VII werden mit der PT, Störungen des intrinsischen Weges (einschließlich Präkallikrein und Kininogen) hingegen mit der aPTT getestet. Beide Assays untersuchen auch den gemeinsamen Endabschnitt der sekundären Hämostase. Allerdings erfolgt keine Erfassung der Faktor XIII-Aktivität, da die Quervernetzung überwiegend nach dem Testzeitraum stattfinden würde (299).

Der PT-Test (auch „one stage prothrombin time“ (OSPT) genannt (93, 298, 300)) beruht auf der Rekalzifizierung einer Plasmaprobe, der parallel Thromboplastin zugesetzt und die anschließend bei 37 °C inkubiert wird (298, 299). Thromboplastin enthält nebst Phospholipiden den Gewebefaktor. Folge ist dementsprechend eine Aktivierung von Faktor VII (s. 2.1.2 Sekundäre Hämostase) und somit des extrinsischen Gerinnungsweges, der in der Aktivierung der gemeinsamen Endstrecke mündet. Wobei die PT den zeitlichen Abstand zwischen der artifiziellen Aktivierung der Gerinnung und der Feststellung (chronometrisch, photometrisch (s. 3.1.4.2 STA Compact Max 3®)) der Bildung des vernetzten Fibrins darstellt (298, 299). Da es sich bei Thromboplastin nebst rekombinanten Varianten (301) teils um Gewebsextrakte handelt, ist mit Abweichungen der Messergebnisse zwischen den verwendeten Chargen und Ursprüngen zu rechnen (298, 302–304), was durch den Einsatz verschiedener Analysegeräte bzw. manueller Methoden aggraviert wird (301). Um eine Vergleichbarkeit zu ermöglichen, können die Messwerte in die International Normalized Ratio (INR) umgerechnet werden. Benötigt wird hierfür eine Chargen-abhängige, durchschnittliche Normal-PT, welche einen geometrischen Mittelwert von gesunden Individuen darstellt. Benötigt werden zwanzig oder mehr Tiere, wobei die Einzelmessungen an mindestens drei Testtagen erfolgen sollten. Zusätzlich wird als Korrektur der International Sensitivity Index (ISI) miteinbezogen. Dieser ist eine Eigenschaft, welche die Sensitivität eines verwendeten Thromboplastins in Relation zu einem internationalen Standard der World Health Organization (WHO) setzt. Die verwendete Formel ist (304, 305):

$$INR = \left( \frac{PT \text{ gemessen (in Sekunden)}}{PT \text{ Normalplasma (in Sekunden)}} \right)^{ISI}$$

INR = International Normalized Ratio; ISI = International Sensitivity Index

Die INR wird aufgrund der Komplexität ihrer Bereitstellung in der Tiermedizin nicht standardmäßig verwendet und Versuche einer Etablierung zeigten variable Ergebnisse der Korrelation mit PT-Werten (303, 304). Aus diesem Grund gibt es zu ihrem Einsatz nur wenige Empfehlungen und ihre Verwendung wird nicht angeraten (255, 306).

Das Testprinzip der aPTT ähnelt dem der PT, jedoch erfolgt hier die Vorlage eines Kontaktaktivators (z. B. Kaolin (307)) sowie partiellen Thromboplastins ohne den Gewebefaktor (Phospholipide mit prokoagulatorischen Eigenschaften) zum Plasma, getrennt von Calcium (299, 308, 309). Der Einsatz eines Aktivators im Vergleich zum ursprünglichen Testprotokoll unter Einsatz von Glas, bedingt den Zusatz „aktiviert“ im Namen (307, 309). Der Namenszusatz „partiell“ ergibt sich wiederum durch die veränderte Zusammensetzung des Thromboplastins ohne Gewebefaktor (308). Die abschließende Rekalzifizierung initiiert die Reaktion (299). Die Registrierung der Gerinnung erfolgt analog zur PT (s. o.).

### 2.2.2.2 Spezialtests

Im folgenden Abschnitt soll auf die spezialisierten Tests zur Gerinnungsdiagnostik eingegangen werden. In diesem Zusammenhang wird jeweils eine Auswahl von in der Humanmedizin beschriebener Tests erwähnt und an entsprechenden Stellen auf Verhältnisse in der Veterinärmedizin beim Hund sowie in der vorliegenden Arbeit hingewiesen.

#### Faktorentests

Bei Verdacht auf einen Mangel oder Überschuss eines spezifischen Faktors werden für diesen spezielle Tests eingesetzt. Diese gerinnungsbasierten Tests beruhen auf Plasma, welchem der entsprechende Faktor fehlt (Mangelplasma) (299). Weitere Erläuterungen zu den Faktorentests finden sich im Material- und Methoden-Teil (3.1.4.5.2 Gerinnungsfaktoren (Faktor V, Faktor VII, Faktor VIII, Faktor IX, Faktor X)) der vorliegenden Arbeit. Alternative Tests basieren auf dem Einsatz von chromogenen Substraten, die von den Faktoren gespalten werden oder auf immunologischen Nachweisen (310–312). Bei den immunologischen Tests kann auf Mangelplasmen verzichtet werden. Immunologische Nachweise prüfen jedoch nicht die Funktionalität/Aktivität des jeweiligen Faktors, sondern nur dessen Menge (310). Zur Unterscheidung zwischen den Ergebnissen der immunologischen Assays und den

## 2. Literaturübersicht

---

Tests mit Überprüfung der Funktion wird diesen häufig die Ergänzung :Ag bzw. :C beigefügt (313, 314). Bei anderen Testsystemen werden teils andere Suffixe angefügt (s. u.).

In der vorliegenden Arbeit wurde aufgrund der vorherigen Erfahrungen mit dem Einsatz von Mangelplasma-basierten Tests und der Bedeutung von funktionellen Gerinnungsfaktoren für die Effektivität von Plasmatransfusionen ein ebensolcher Ansatz gewählt.

Die Bestimmung von Protein C und S (3.1.4.5.3 Protein C und Protein S) wurde in der vorliegenden Arbeit auch mittels Mangelplasmen durchgeführt, weshalb sie hier analog zu betrachten sind.

### Fibrinogenbestimmung

Fibrinogen kann mittels vieler verschiedener Testverfahren bestimmt werden. Als die am häufigsten verwendete Methode wird im Allgemeinen die Methode nach Clauss angegeben (315, 316). Daneben kommen z. B. die Thrombinzeit (93, 317), die auf der PT basierende „Derived Fibrinogen“-Methode (221, 316, 318, 319), Hitzepräzipitationsverfahren (320) oder Immunoassays (321) in Frage. Neuere Methoden basieren unter anderem auf der Turbidometrie zum funktionellen (Fibrinogen Functional Turbidimetric Assay, FIFTA) bzw. antigenen („Fibrinogen Antigenic Turbidimetric Assay“, FIATA) Nachweis (322, 323). Die Methode nach Clauss sowie die Thrombinzeit beruhen beide auf der Zugabe von Thrombin zum Plasma (324). Erfasst wird folglich jeweils nur funktionell aktives Fibrinogen (321). Die Unterschiede zwischen beiden Tests beruhen auf den Verhältnissen der verwendeten Materialien als auch auf der Maßeinheit des Ergebnisses (324).

Eine Beschreibung der Clauss-Methode findet sich unter: 3.1.4.5.4 Fibrinogen. Die Clauss-Methode wurde hierbei aus denselben Gründen (Erfahrung, Funktionalität) wie die Messmethode der Faktoren gewählt.

### Von-Willebrand-Faktor

Die Messung des von-Willebrand-Faktors (vWF) kann analog zu den Einzeltests auf Gerinnungsfaktoren im Wesentlichen auf zwei Arten (Immunoassay vs. Funktionsassay) erfolgen. Die verschiedenen Immunoassays geben einen von-Willebrand-Faktor :Ag-Wert (vWF-Ag) in Relation zu einer Poolplasmakalibrationskurve an und werden meist zur Diagnose einer von-Willebrand-Erkrankung verwendet (325–328). Ein solches Verfahren wurde aus Praktikabilitätsgründen für die durchgeführten Untersuchungen eingesetzt. Bezüglich der Funktionsprüfung sind verschiedene Tests beschrieben, so der vWF-Kollagen-Bindungstest (vWF :CB), welcher auch beim Hund eingesetzt werden kann (329, 330). Die von-Willebrand-Faktor-Ristocetin-Cofaktor-Aktivität (vWF :RCo), die beim Menschen u. a. zur Unterstützung der Differenzierung der Subtypen der von-Willebrand-Erkrankung verwendet wird

(331), findet beim Hund keine standardmäßige Anwendung. Ursächlich hierfür sind, trotz eines beschriebenen Tests (332), wahrscheinlich die komplexe Anpassung des Testprotokolls an den Hund im Vergleich zu humanen Tests bzw. die nicht einheitliche Aggregation durch Ristocetin beim Hund (333–335).

Entsprechend des multimeren Aufbaus des vWFs besteht darüber hinaus noch die Möglichkeit, die Multimerzusammensetzung des vWF-Gehalts des Plasmas zu untersuchen (336–338).

### Antithrombin

Auch die Messung von Antithrombin kann als Antigen (immunologisch) oder funktionell durchgeführt werden (339). Die funktionellen Tests setzen meist die Spaltung von farbgebenden Substanzen durch die proteolytische Aktivität von Gerinnungsfaktoren ein, die je nach dessen Plasmakonzentration, mehr oder weniger durch die Hemmwirkung des Antithrombins beeinflusst werden. Üblich ist hierbei die Verwendung von Faktor II und X basierten Tests (340). Genau beschrieben findet sich das Testprinzip unter Verwendung von Thrombin unter: 3.1.4.5.5 Antithrombin.

### D-Dimere

Neben der in dieser Arbeit verwendeten Turbidimetrie (3.1.4.5.6 D-Dimere und von-Willebrand-Faktor-Antigen) (292, 341) können weitere Tests zum Nachweis von D-Dimeren verwendet werden. So kommt der Einsatz von „Enzyme-Linked Immunosorbent Assays“ (ELISAs) (342), auf diesen basierenden „Fluoreszenz-Enzym-Immunoassays“ (343) oder von Latex-Agglutinationstests (341, 342, 344) in Frage. Letztere Methode ist wiederum Teil der in der Studie eingesetzten kombinierten Methode, welche aufgrund der vorherigen Erfahrungswerte gewählt wurde.

## 2.3 Arten von Blutprodukten, deren Herstellung und Indikationen

Im Folgenden soll auf die gängigsten Blutprodukte eingegangen werden. Neben diesen gibt es weitere Entwicklungen, die meist Lagerungs- und Herstellungsalternativen darstellen. Auf diese soll nicht eingegangen werden, da sie zum Verständnis der vorliegenden Arbeit nicht von Bedeutung sind und diesbezüglich sei auf die entsprechende Literatur verwiesen.

Die Gewinnung von Blutprodukten beginnt mit der Blutentnahme bei den Spendertieren. Der genaue Ablauf eines Blutspende-prozederes wird in „3.1.1.4 Gewinnung des Blutprodukts“ beschrieben. Hierbei wird in aller Regel von den Spendertieren Vollblut entnommen (345). Die Verwendung von Apherese-

## 2. Literaturübersicht

---

Verfahren, die der Entfernung einzelner Blutbestandteile aus dem Gefäßsystem im Rahmen der Entnahme dient (346), ist in der Tiermedizin unter anderem für die Gewinnung von Thrombozytenkonzentraten (347, 348) und Plasma (349) beschrieben, aber nicht weltweit verbreitet. Das gewonnene Vollblut kann nach der Entnahme frisch verwendet oder gekühlt und konserviert gelagert werden. Bei einer Temperatur von  $4 \pm 2$  °C ist es bei Hund und Katze bis zu 35 Tagen haltbar (12, 13). Alternativ kann es zu anderen Blutprodukten weiterverarbeitet werden. Das Vollblut wird obligatorisch mit Stabilisatoren (Antikoagulation, Membranstabilität Erythrozyten) versetzt, wobei häufig CPD(-Adenin (CPDA)) verwendet wird (350, 351).

Frisches und gekühlt gelagertes Vollblut enthält, falls keine Leukozytendepletion stattfindet, noch alle Blutbestandteile (Anteil je nach Lagerungsdauer) und wird bei Anämien, akuten Blutungen (im frischen Zustand insbesondere bei durch Thrombozytopenien bedingten Blutungen) eingesetzt (12). Auch scheint es bei traumatischen Blutungen besonders gute Effekte zu erzielen (s. 2.5 Verfügbarkeitsprobleme und Logistik von Blutprodukten). Die Ergebnisse der dieser Dissertation vorangehenden Arbeit zeigen jedoch, dass auch gekühltes Vollblut fünfzehn Lagerungstage lang eine genügende Thrombozytenfunktion aufweist (32) und somit entsprechende in vivo Studien bei Hunden vorausgesetzt, zur Thrombozytensubstitution eingesetzt werden könnte. Die nationalen Leitlinien des BVLS geben für das Vollblut ebenso wie für Erythrozytenkonzentrate, FFP und FP entsprechende, überwiegend auf den Hund zu beziehende Qualitätskriterien an. So muss der Hämatokrit der Vollblutkonserven während der gesamten Lagerungszeit mehr als oder gleich 25 % (bzw. Hämoglobingehalt  $\geq 8$  g/dl) betragen. Ebenso darf die Hämolyse am Ende der Haltbarkeit nur bei weniger als 0,8 % der Erythrozytenmasse liegen, die Konserven müssen eine Sterilitätsprüfung bestehen und zu jeder Zeit ohne makroskopische Auffälligkeiten sein (12). Nach humanmedizinischer Definition wird bei einer Lagerung bei Raumtemperatur bis zu 24 Stunden von frischem Vollblut, bei einer Aufbewahrung in einem Blutproduktkühlschrank nach spätestens acht Stunden auf die Entnahme folgend von gekühltem Vollblut gesprochen (352, 353). Eine humanmedizinische Studie konnte aber auch Hinweise auf eine potenziell mögliche Lagerungsdauer von 72 Stunden als frisches Vollblut finden (353). Die Haltbarkeit von gekühltem Vollblut wird mit 35 (13) bis 42 Tagen (354) angegeben, wobei die Haltbarkeit vom verwendeten Stabilisator und/oder der gegebenenfalls eingesetzten Additivlösung abhängt (353).

Wenn das Vollblut weiterverarbeitet werden soll, muss im nächsten Schritt eine Separierung der zellulären und flüssigen Anteile voneinander stattfinden. Dies geschieht durch Zentrifugation (in der Institution des Autors bei 1440 g für zwanzig Minuten) und anschließendes Abpressen des Erythrozytenanteils und Plasmaanteils, wobei der Leukozyten- und Thrombozyten-haltige „buffy coat“ zurückbleibt (18, 355). Beim Abpressen mittels Separators wird der Plasmaanteil in einen, ausgehend

## 2. Literaturübersicht

---

vom Entnahmebeutel oben befindlichen Beutel, die Erythrozyten in einen unten befindlichen Beutel des Mehrfachbeutelsystems transferiert (Top/Bottom-Methode) (355, 356). Alternativ kann die Auftrennung von Plasma und Erythrozyten durch alternative Zentrifugations-unabhängige Systeme erfolgen, wobei ein solches System in einer Studie mit Hundeblood jedoch keine ausreichende Qualität des gewonnenen Plasmas bedingen konnte (357).

Aus dem hergestellten Erythrozytenkonzentrat kann anschließend mittels Leukozytenfilter die Zahl an noch in diesem vorhandenen Leukozyten vor der Lagerung reduziert werden. Alternativ kann dies auch bereits mit dem Vollblut durchgeführt werden (358). Eine Leukozytenreduktion erscheint sinnvoll, da die übertragenen Leukozyten, wie in der Humanmedizin nachgewiesen, Transfusionsreaktionen (febrile, nicht hämolytische Transfusionsreaktionen) bedingen können (359–361). Verschiedene Studien in der Humanmedizin konnten entsprechend eine Reduktion dieser durch eine Leukozytenreduktion aufzeigen (362, 363). Allerdings wird, auch wenn sich die Reduktion per Filter in der Entfernung der Leukozyten in der Tiermedizin als effektiv zeigt (364), die Verwendung aufgrund der zum Zeitpunkt der entsprechenden offiziellen Empfehlung bestehenden geringen Datenlage, die keine Reduktion des Anteils an Transfusionsreaktionen zeigen konnte, weder empfohlen noch von dieser abgeraten (358). Es konnte jedoch ein fehlender Anstieg von Entzündungsparametern bei der verzögerten Autotransfusion von kaninem Erythrozytenkonzentrat bei leukozytendepletierten Konserven im Vergleich zu nicht entsprechend gefilterten Einheiten gezeigt werden (365). Drei nach und eine vor der entsprechenden Empfehlung erschienene Studien zeigten wiederum uneinheitliche Resultate. So konnte eine Reduktion der Frequenz von febrilen, nicht hämolytischen Transfusionsreaktionen in einer 2022 veröffentlichten Studie von Davidow et al. (366) gezeigt, bei Hall et al. (367), Radulescu et al. (368) und Bosch Lozano et al. (369) aber wiederum nicht nachvollzogen werden.

Neben dem möglichen Einfluss der Leukozytendepletion auf die Häufigkeit des Auftretens von Transfusionsreaktionen hat diese offenbar noch weitere Effekte. So konnte z. B. ein positiver Effekt der Leukozytendepletion auf den ATP-Gehalt und die Menge an antioxidativen Molekülen in den Erythrozyten bei kaninen Erythrozytenkonzentraten nachgewiesen werden. Verantwortlich hierfür war eine Förderung der entsprechenden Stoffwechselwege (370). Des Weiteren findet sich ein Einfluss auf die Gerinnung (s. 2.4 Hämostatische Aktivität des Plasmaanteils von kaninem konservierten Vollblut).

Insgesamt scheint die Leukoreduktion in der Tiermedizin nicht standardmäßig eingesetzt zu werden, so setzten laut einer entsprechenden Online-Umfrage, die im Jahr 2012 durchgeführt wurde, nur vier Prozent der Institutionen dieses Verfahren ein (371). In der neueren Arbeit von Hall waren ca. 27 % der Erythrozytenkonzentrate leukozytendepletiert. Zum Vergleich waren in derselben Studie ca. 5 % und ca. 33 % der Vollblutkonserven bzw. Plasmaprodukte entsprechend gefiltert (367). Zusätzlich kann dem

Erythrozytenkonzentrat eine weitere Nährlösung zur Verbesserung der Haltbarkeit der Erythrozyten zugefügt werden (351). Gängige Beispiele für diese sind SAGM, Adsol, PAGGS-M und PAGGGM. Wobei alle Lösungen Dextrose, Adenin und Mannitol sowie mit Ausnahme von PAGGGM Natriumchlorid in variablen Mengen enthalten. PAGGS-M sowie PAGGGM enthalten darüber hinaus Guanosin, Natriumdihydrogenphosphat sowie Dinatriumhydrogenphosphat. PAGGGM wird darüber hinaus Natriumgluconat zugesetzt (32, 372). Dextrose unterstützt als Ausgangsstoff für die Glykolyse ebenso wie Adenin die Synthese von ATP, was die Viabilität der Erythrozyten positiv beeinflusst (373–379). Andere Monosaccharide (Fructose, Mannose) bzw. Zuckeralkohole (Sorbitol) könnten bei niedrigen intrazellulären pH-Werten die Glykolyse, durch eine Umgehung der unter diesen Bedingungen gehemmten Phosphofruktokinase, fördern (380–391). Der Wirkmechanismus von Adenin beruht wahrscheinlich auf der Bereitstellung der Nukleinbase für die Generierung des Nucleotids Adenosinmonophosphat (AMP) (392, 393). Dieses wird ebenso wie Adenin während seines Abbaus desaminiert, wobei Ammoniak freigesetzt wird (392, 394). Guanosin konnte in humanmedizinischen Studien die ATP-Produktion zusätzlich unterstützen (380, 395). Des Weiteren kompensiert es auch Adenin-verursachte Verluste an 2, 3-Diphosphoglycerat (2, 3-DPG) (s. u.) (395). Der Wirkmechanismus basiert hierbei auf dem Abbau des von den Erythrozyten aufgenommenen Guanosins zu Ribose-1-phosphat und Guanin. Ribose-1-phosphat wird in der Folge zu Ribose-5-phosphat umgewandelt (396). Das vermehrte Angebot von Ribose-5-phosphat für den nicht-oxidativen Teil des Pentosephosphatwegs, bedingt eine Verschiebung der Reaktionsgleichgewichte des Pentosephosphatweges in Richtung Glykolyse (395). Infolgedessen schleust dieser vermehrt Fructose-6-phosphat (und Glycerinaldehyd-3-phosphat) in die Glykolyse ein (397, 398), was die Phosphofruktokinase stimuliert (395, 399). Dies fördert dann schlussendlich die Produktion von ATP und 2, 3-DPG. Adenin beeinflusst die Auswirkungen des Guanosins. So bedingt Adenin eine Verschiebung der Guanosinnutzung weg von der Glykolyse hin zum Purinnucleotid-Salvage, was den Verbrauch von phosphorylierten Ribosen erhöht. Dies reduziert den Zustrom der oben genannten Intermediate in die Glykolyse (395). Zusätzlich sorgt Adenin wahrscheinlich für einen bevorzugten Ablauf der Glykolyse gegenüber dem Rapoport-Luebering-Zyklus (395, 400–403). In dessen Rahmen 2, 3-DPG entsteht (402, 403), welches die Sauerstoffbindungskurve nach rechts verschiebt (niedrigere Affinität des Hämoglobins für Sauerstoff) und somit die Bereitstellung von Sauerstoff für das Gewebe erleichtert (404, 405). Insgesamt sorgt Adenin so als Nebeneffekt in Summe für die Reduktion der Menge an 2, 3-DPG im Erythrozyten (395). Mannitol dient wiederum möglicherweise als Radikalfänger und reduziert die Volumenzunahme der Erythrozyten durch osmotische Effekte, wobei die Effekte zusammen den Anteil hämolyzierter Erythrozyten verringern (406, 407). Der Ersatz von Natriumchlorid durch Natriumgluconat bei PAGGGM sorgt für eine Alkalisierung des Zytoplasmas der Erythrozyten durch eine Hemmung des Hamburger-Shifts bzw. dessen Umkehr als Folge des geringen Chlorid-

## 2. Literaturübersicht

---

Gehalts des umgebenden Mediums, was sich positiv auf metabolische Vorgänge auswirkt (380, 408–410). So wird die 2, 3-DPG-Bildung durch das alkalische Milieu begünstigt (399). Die Zugabe von Phosphat dient der Produktion energiereicher Phosphatverbindungen als Puffersubstanz für einen höheren pH-Wert (auch intrazellulär) und bedingt länger einen hohen 2,3-DPG-Gehalt in den Erythrozyten (380, 409). Darüber hinaus hat sich auch ein höheres Volumen der Nährlösung in der Humanmedizin als vorteilhaft für die Lagerungsstabilität der Erythrozyten erwiesen (411). Verschiedene nicht gängige Zusätze wurden bzw. werden in Bezug auf ihren Einfluss auf die Lagerbarkeit von Blutprodukten getestet. So wurde Vitamin C einzeln (412) und in Kombination mit N-Acetylcystein (413) als Zusatz in Hinblick auf mögliche positive Auswirkungen der antioxidativen Wirkungen auf die Lagerung von Erythrozytenkonzentraten untersucht. Vitamin C bedingte hierbei in einem Mausmodell einen höheren Anteil viabler Spendererythrozyten post Transfusion sowie einen niedrigeren Titer an Alloantikörpern beim Empfängertier. Die positive Wirkung zeigte sich allerdings nur in einem bestimmten Dosisbereich (412). Der Zusatz von N-Acetylcystein und Vitamin C konnte in einer humanmedizinischen Studie zwar den oxidativen Stress reduzieren und die lagerungsbedingte Hämolyse reduzieren, hemmte allerdings die Glykolyse (413). Der Einsatz von Apoptose- und Nekrose-Inhibitoren als Zusatz zu Additivlösungen für Vollblutkonserven bzw. gekühlt gelagerte Thrombozytenkonzentrate zur Verbesserung der Haltbarkeit (der Thrombozyten) ist Gegenstand aktueller humanmedizinischer Forschung (414–416). Bezüglich der Additivlösungen sei vermerkt, dass sich keine gezielten Untersuchungen zu den Auswirkungen der einzelnen Inhaltsstoffe auf gelagerte Blutprodukte von Hunden finden. Hinsichtlich der weiteren Verbesserung von Additivlösungen für die Tiermedizin sind diese jedoch vonnöten, da Untersuchungen zu Enzymaktivitäten der Erythrozyten deutliche Unterschiede zwischen den Spezies aufzeigen (417–422). Entsprechend ist von einer Erfordernis speziesspezifischer Stoffwechselbeeinflussungen für optimale Lagerungsergebnisse auszugehen. Ebenso müssen Unterschiede in der Permeabilität der Erythrozyten beachtet werden. Die im Vergleich zum Menschen ineffektive Aufnahme des analogen Purin-Nukleosids Adenosin durch Hunderythrozyten macht z. B. eine mögliche Wirkung von zugesetztem Guanosin fraglich (423, 424). Insofern ist eine sichere Übertragbarkeit von Effekten der Zusätze bei menschlichen Erythrozyten auf Erythrozyten von Tieren nicht gegeben.

Auf weitere Ausführungen zum Metabolismus der Erythrozyten während der Lagerung, Einfluss der Nährmedien und dem daraus resultierenden Einfluss auf die Haltbarkeit der Blutprodukte, wird im Folgenden aufgrund der zuvor erfolgten Ausführungen (32) verzichtet.

Das anschließend fertiggestellte Erythrozytenkonzentrat wird unter den gleichen Bedingungen wie Vollblut gelagert, kann aber bis zu 42 Tage für die Therapie von Anämien eingesetzt werden (12, 16, 425). Eine Studie an kaninen und humanen Erythrozytenkonzentraten konnte in diesem

## 2. Literaturübersicht

---

Zusammenhang aber Hinweise darauf finden, dass die Lagerung im niedrigeren Bereich des angegebenen Temperaturreanges eine bessere Haltbarkeit der Erythrozyten sowie höhere Überlebensraten der Erythrozyten beim Empfänger bedingt (426).

Aus dem übrig gebliebenen „buffy coat“ kann im Folgenden ein Thrombozytenkonzentrat hergestellt werden. Hierfür wird der Inhalt der ursprünglichen Konserve mit den Thrombozyten und Leukozyten („buffy coat“) sowie Resten von Plasma und Erythrozyten mit Anteilen des Spenderplasmas und/oder einer Nährlösung versetzt und anschließend bei niedrigen Umdrehungszahlen zentrifugiert („soft spin“, in der Institution des Autors mit 266 g für 9,5 Minuten durchgeführt (32)). Das aus dem Überstand zu gewinnende Plättchen-reiche-Plasma stellt dann die Thrombozytenkonserve dar (427–429). Die Herstellung der Thrombozytenkonzentrate kann mit einzelnen „buffy coats“ durchgeführt oder der entsprechende Anteil von mehreren Blutgruppen-kompatiblen Konserven kann gepoolt werden (32, 427, 430–434). Alternative Methoden der Gewinnung stellen die Thrombozyten-reiche Plasma-Methode (427, 435, 436) und die Apherese (347, 348) dar. Die erste Alternativmethode verwendet hierbei ein umgekehrtes Zentrifugationsschema und beginnt mit einem „soft spin“ (427, 435, 436). Aufgrund der hohen Ausbeute bei der Thrombozytengewinnung ist ein Pooling bei der Apherese nicht nötig (436, 437). Es besteht die Möglichkeit die Thrombozytenkonzentrate, je nach Herstellungsmethode, vor oder nach (kurz vor der Transfusion) der Lagerung zu leukodepletieren (362, 431, 438, 439). Wird keine Leukozytendepletierung durchgeführt, zeigten in einer Untersuchung die mit der Thrombozyten-reichem Plasma-Methode im Vergleich zu den per „buffy coat“-Methode produzierten kaninen Thrombozytenkonzentrate eine geringere Zellkontamination sowie höhere in vitro Aggregationsaktivitäten und weniger Hinweise auf Lagerungsschäden ihrer Thrombozyten (440). Die unabhängig von der Methode gewonnenen Konzentrate werden unter konstanter Bewegung bei 20–24 °C gelagert. Unter diesen Bedingungen werden sie in der Humanmedizin gewöhnlich für 5 Tage aufbewahrt (427, 441), jedoch gibt es drei Studien an Thrombozytenkonserven von Hunden, die eine mögliche Lagerungszeit von sieben (442, 443) bzw. dreizehn (444) Tagen aufzeigen konnten. Bei langer Lagerungsdauer ist jedoch die Funktion der Thrombozyten möglicherweise eingeschränkt (442). Bei 4 °C gekühlt gelagerte Thrombozytenkonzentrate zeigten hingegen in einer Studie am 7. Tag (445) sowie in einer anderen Studie auch am 21. Tag (446) der Lagerung noch eine adäquate ex vivo Funktion. Nichtsdestotrotz muss die Transfusionseffektivität für die nach den verschiedenen Protokollen gelagerten Thrombozytenkonzentrate überprüft werden (444). Indikationen für Thrombozytenkonzentrate sind hochgradige (durch Erkrankungen der Thrombozyten verursachte (436)) Blutungen (447, 448) und mittel- bis hochgradige Thrombozytopenien, je nachdem, ob ein zusätzlicher zu erwartender Trigger für Blutungen vorliegt oder nicht (32, 354). Zusätzlich können sie bei Thrombozytopathien eingesetzt werden (354, 436).

## 2. Literaturübersicht

---

Das von den zellulären Bestandteilen abgetrennte Plasma (s. o.) kann im Folgenden auf verschiedene Arten weiterverwendet werden. So kann es nach der Leitlinie des BVLs innerhalb von sechs Stunden nach der Blutspende bei -30 °C als FFP oder nach mehr als sechs Stunden aber maximal 24 Stunden bzw. innerhalb von sechs Stunden bei -20 °C als FP eingefroren werden (12). International werden die Voraussetzungen für die Deklaration des gefrorenen Plasmas als FFP jedoch breiter gefasst. Gleiches gilt für die Lagerung, die nach deutschen veterinärmedizinischen Leitlinien bei (-27 –) -30 °C zu erfolgen hat und eine Haltbarkeit von einem bis zwei Jahr(en) bedingt (12, 449). Andere Angaben geben jedoch Temperaturen zum Einfrieren innerhalb von acht Stunden bei -18 °C (15) bzw. nach derselben Zeit bei -20 – -30 °C (19) an, hierbei werden Lagerungstemperaturen zwischen -20 und -30 °C (19, 20, 25) verwendet. Es finden sich auch mögliche Angaben von der Entnahme des Vollblutes bis zum Einfrieren von 24 Stunden (450). Normalerweise wird nach einem Jahr Lagerung des FFPs von FP gesprochen, welches weitere vier Jahre (insgesamt also fünf Jahre) haltbar ist (12, 449, 451). Durch das alternative Einfrierschema nach der deutschen Leitlinie erzeugte FP (s. o.) ist folglich fünf Jahre haltbar. Die Lagerung erfolgt in diesem Fall bei (-17 –) -20 °C (12). In den beiden oben genannten Plasmazubereitungen sind pro- und antikoagulatorische Proteine, darunter die Gerinnungsfaktoren und von-Willebrand-Faktor, sowie Albumin enthalten, wobei der Gehalt an labilen Stoffen (insbesondere Gerinnungsfaktoren) im FP niedriger ist (354, 452, 453). Zusätzlich enthalten die Plasmaprodukte Immunglobuline, Elektrolyte und Lipide (354). Koagulopathien besonders bei aktiven Blutungen sind entsprechend des Gehalts an Gerinnungsfaktoren ein Anwendungsgebiet von FFP und FP (12, 14, 454–456), wobei sich FP aufgrund des Verlusts von labilem Faktor VIII besonders zur Substitution der Vitamin K-abhängigen Gerinnungsfaktoren II, VII, IX und X eignet (15, 457). Weitere Indikationen sind die passive Immunisierung (14, 354), der Volumenersatz (14, 354, 367, 456, 458), die Substitutionstherapie bei Hypoproteinämie (12, 367)/Hypoalbuminämie (367, 455, 456) sowie extrakorporale Therapieverfahren (367). Der Einsatz von FFP bei Vorliegen einer Hypoalbuminämie wird aufgrund der geringeren Albumingehalte im Vergleich zu Albuminlösungen und anderen Plasmaprodukten sowie dem somit fehlenden suffizienten Albuminanstieg post Transfusion kritisch diskutiert (453, 455, 459). Der Einsatz zum Volumenersatz wird in der Humanmedizin bei schweren Blutungen empfohlen (447, 460). FFP sollte aufgrund seines recht vollständigen Gerinnungsfaktorprofils bevorzugt bei (initial) ursächlich unklaren Koagulopathien eingesetzt werden (354).

Insgesamt ist der richtige Umgang mit FFP und folglich ableitbar anderen Plasmaprodukten in der Veterinärmedizin umstritten (461). Wie zuvor erwähnt geben die oben genannten Leitlinien Qualitätsstandards für FFP und FP an. Neben einer optischen und bakteriologischen Prüfung vor dem Gefrierschritt bzw. zu einem Zeitpunkt während der Haltbarkeit sind auch Obergrenzen an Zellrestmengen in Anschluss an die Produktion (Leukozyten  $< 1 \cdot 10^9/l$  (1.000/ $\mu$ l), Thrombozyten  $< 30$

## 2. Literaturübersicht

---

\*  $10^9/l$  (30.000/ $\mu$ l) sowie Erythrozyten  $< 3 * 10^9/l$  (3.000/ $\mu$ l)) sowie Mindestgehalte an Gerinnungsfaktoren sicherzustellen. Bezüglich der Gerinnungsfaktoren ist ein Gehalt von mehr als 50 % des Ausgangswertes von Faktor VIII im auf die Produktion folgenden Monat sowie kurz vor Ablauf der Konserve festgelegt (12). Faktor VIII wurde hier wahrscheinlich aufgrund seiner Labilität (462) als Sentinel-Parameter ausgewählt. Nebst der standardmäßigen Tiefkühlung des vollständigen Plasmas kann das Plasma nach der Abtrennung auf weitere Arten weiterverwendet werden. So kann das Plasma zum einen nicht tiefgefroren und als „Liquid/Never-Frozen-Plasma“ nur gekühlt gelagert werden, zum anderen kann nach dem Tiefgefrieren eine Aufbereitung zu Kryopräzipitat und kryoarmem Plasma erfolgen.

„Liquid Plasma“ wird in der Humanmedizin für in aller Regel maximal 4 Wochen bei  $4 \pm 2/3,5 \pm 2,5$  °C gelagert (463, 464). Die exakte Haltbarkeit hängt von dem Haltbarkeitsdatum des zur Herstellung verwendeten Vollbluts ab, da das „Liquid Plasma“ fünf Tage über dessen Haltbarkeitsdatum hinaus verwendbar bleibt (464, 465). Wobei die Fraktionierung zu einem beliebigen Zeitpunkt der Haltbarkeit der Vollblutkonserve liegen kann (464). Die hämostatische Aktivität (s. 2.4 Hämostatische Aktivität des Plasmaanteils von kaninem konservierten Vollblut) und Indikationen (hier sei auch auf 2.5 Verfügbarkeitsprobleme und Logistik von Blutprodukten verwiesen) werden im weiteren Verlauf der vorliegenden Dissertation diskutiert.

Eine Lagerung für 24 bis 120 Stunden (5 Tage) ist darüber hinaus für aufgetaute Plasmaprodukte, namentlich FFP und innerhalb von 24 Stunden eingefrorenes (-20 °C) Plasma (PF-24) möglich (aufgetautes Plasma, „thawed plasma“). Der einzuhaltende Temperaturbereich liegt hierbei bei  $3,5 \pm 2,5$  °C (427, 463). Dies ist von Bedeutung, da FFP im Zeitraum eines Tages nach erneuter Verflüssigung übertragen werden sollte, anderenfalls muss es als aufgetautes Plasma umgelabelt werden (464, 465). Alternativ können kanine und feline FFPs nach erstmaligem Auftauen erneut eingefroren werden, sofern die Zeit der flüssigen Lagerung eine Stunde nicht übersteigt (452). Mit Ausnahme der Korrektur von Faktor V- und VIII-Mangelzuständen wird PF-24 bei nicht verzögerter Verwendung, ebenso wie FFP eingesetzt (465).

Die Aufbereitung zu Kryopräzipitat erfolgt in Anlehnung an die Erstbeschreibung (462, 466) über eine Ausfällung der gewünschten Inhaltsstoffe durch ein Auftauen bei niedrigen Temperaturen ( $3,5 \pm 2,5$  °C) (427, 465). Ausgangsmaterial stellen hierbei FFP, PF-24 oder FP dar (427, 465, 467, 468). Zur Trennung vom flüssigen Anteil (kryoarmes Plasma, „cryopoor plasma/plasma cryoprecipitate reduced“) erfolgt nach der Ausfällung eine Zentrifugation (sechs Minuten bei 5000 g). Das Kryopräzipitat wird (mit einer kleinen Restmenge Plasma) ebenso wie das kryoarme Plasma innerhalb von einer bzw. 24 Stunden bei -18 °C oder einer niedrigeren Temperatur eingefroren (465, 468). Bei diesen Temperaturen gelagertes Kryopräzipitat ist ein Jahr haltbar, wohingegen bei kryoarmem Plasma Haltbarkeiten von sechs Jahren

beschrieben sind (453, 468, 469). In der Tiermedizin werden mit -10 bis zu empfohlenen -30 - -70 °C sehr variable Lagerungsbedingungen angegeben (469). Abweichende Herstellungsverfahren sind möglich (468). So kann das Ausgangsmaterial gepoolt werden (465). In den USA ist außerdem lyophilisiertes kanines Kryopräzipitat mit einer Haltbarkeit von 1,5 Jahren kommerziell verfügbar (469). Kanines Kryopräzipitat zeigt/enthält, wie bei der Herstellung aus humanem Blut, hohe Aktivitäten/Gehalte an Faktor VIII, von-Willebrand-Faktor und Fibrinogen (453, 469). Wobei auch hohe Aktivitäten/Gehalte an Faktor XIII beschrieben sind (469, 470). Hingegen enthält kanines Kryopräzipitat im Vergleich zu FFP niedrigere Aktivitäten/Gehalte an Faktor V, Albumin sowie folglich einen geringeren kolloidosmotischen Druck (453). Das weniger beachtete kanine kryoarme Plasma weist entsprechend niedrigere Gehalte/Aktivitäten von Faktor VIII auf. Darüber hinaus zeigt es eine im Vergleich zu FFP und Kryopräzipitat niedrigere Aktivität von Faktor IX. Dahingegen ist der Gehalt an Albumin im kryoarmen Plasma höher als in FFP und Kryopräzipitat und es weist dementsprechend einen höheren kolloidosmotischen Druck auf. Demzufolge kann Kryopräzipitat zur Substitution der Faktoren VIII und IX, von-Willebrand-Faktor sowie Fibrinogen eingesetzt werden (453). Somit kommt in der Tiermedizin vor allem die Behandlung der von-Willebrand-Krankheit sowie der Hämophilie A als Indikation in Frage, besonders, da es veterinärmedizinisch an kommerziell verfügbaren Konzentraten mangelt und das geringe benötigte Volumen von Kryopräzipitat im Vergleich zu FFP eine Hypervolämie durch die Transfusion (Transfusion-assoziierte zirkulatorische Überladung, „transfusion-associated circulatory overload“ (TACO)) vermeidet (360, 469, 471, 472). Ausreichende Studien für präzise Empfehlung hinsichtlich des Einsatzes zur Substitution von Fibrinogen gibt es in der Tiermedizin nicht (469). Der Einsatz des kryoarmen Plasmas kann hinsichtlich seiner oben beschriebenen Charakteristika, die weitestgehend FP entsprechen (473), zur Substitution von Albumin bei vermindertem kolloidosmotischem Druck sowie zur Behandlung von Vitamin K-Intoxikationen erfolgen, wobei die entsprechende Evidenz in der Veterinärmedizin gering ist (453, 474–476). Hier werden demzufolge zwar weitere Studien benötigt, aber aufgrund des Fehlens von speziesspezifischen Albuminkonzentrat in Deutschland und anderen Ländern (453), der Gefahr für anaphylaktische Reaktionen beim Einsatz von humanem Albumin (477–479) und den teils erheblichen unerwünschten Arzneimittelwirkungen von Plasmaexpandern, die an anderer Stelle im Mensch-Tier-Vergleich aufgearbeitet wurden (480), könnte kryoarmes Plasma eine wertvolle Alternative darstellen. Insbesondere auch, weil in einer Studie aus dem Jahr 2023 von Terradas Crespo et al. selbst beim Einsatz von gefriergetrocknetem kaninen Albumin in 20,3 % der Fälle Transfusionsreaktionen auftraten (481). Somit ist dieses nicht risikoärmer als die in zwei Studien mit 4,5 % für Plasmaprodukte im allgemeinen (367) und im Schnitt 8,2 % bei FFP sowie 3,8 % für FP (473) angegebenen Raten an Transfusionsreaktionen. Hingegen empfehlen die deutschen Leitlinien zurzeit die Verwendung von Plasmaprodukten nicht zur Korrektur von Hypovolämien und Verminderungen des kolloidosmotischen

Drucks (12). Kryopräzipitat und demzufolge kryoarmes Plasma erscheint jedoch generell selten hergestellt, erworben und verwendet zu werden (367, 371), letzteres könnte auch auf eine seltene bzw. fehlende Verfügbarkeit zurückzuführen sein (482).

### **2.4 Hämostatische Aktivität des Plasmaanteils von kaninem konservierten Vollblut**

Zu den Einflüssen verschiedener Faktoren auf die hämostatische Aktivität von Vollblut bzw. des Plasmaanteils von Vollblut gibt es in der human- und tiermedizinischen Literatur verschiedene Studien. Untersucht wurden (indirekt) exemplarisch beispielsweise der Einfluss der Rasse der Spendertiere (29, 450, 483), einer etwaigen Leukozytenreduktion (30, 484–488), der Lagerungsdauer (28–30), der Lagerungstemperatur (450, 489, 490), des verwendeten Antikoagulans/Nährmediums der Konserven (32, 416, 491) sowie die verwendeten Blutkonservenbeutel (492).

Bezüglich des Einflusses von Rasseunterschieden sind vor allem Unterschiede von Greyhounds im Vergleich zu anderen Rassen untersucht worden. Dieser Umstand ist durch die zahlreichen klinisch pathologischen Besonderheiten (493) der Greyhounds bedingt. Eine Untersuchung aus dem Jahr 2023 (29) konnte zeigen, dass die gekühlten CPD-Vollblutkonserven von Greyhounds ( $n = 10$  vs. zehn Kontrolltiere) während einer 42-tägigen gekühlten Lagerung niedrigere Gerinnungsaktivitäten aufwiesen. So zeigte deren Vollblut niedrigere Aktivitäten von Faktor II, V, IX und XIII (Antigen), welche bei Faktor II durch einen stärkeren Abfall pro Zeit bedingt war. Ein ebenso ausgeprägter Abfall fand sich bei Faktor VIII, was ein früheres Unterschreiten (3. Tag vs. 7. Tag der Lagerung) der von den Autoren bei 50 % der Ausgangsaktivität gesetzten Grenze zur Folge hatte. Die anderen Parameter hatten eine gleiche Kinetik zwischen den beiden Gruppen. Ebenfalls unterschritten die Faktoren V und XIII den 50 % Grenzwert, was der bei Kontrollgruppe während der gesamten Lagerung nicht der Fall war. Zudem lag der Fibrinogengehalt vom Tag der Einlagerung an bei den Greyhounds unterhalb des Hundereferenzintervalls für die verwendete Methode. Die durchgeführten viskoelastischen Untersuchungen zeigten ebenso eine Hypokoagulabilität des Greyhound-Blutes im Vergleich zu den Tieren der anderen Rassen an. Die zuvor beschriebene Studie deckt sich hinsichtlich des niedrigeren Fibrinogengehalts im Blut von Greyhounds mit einer Veröffentlichung von Walton et al. (450). In dieser konnte zudem eine niedrigere Faktor X- und von-Willebrand-Faktor-Aktivität beobachtet werden. Dies war in der Studie von Cooper et al. (29) nicht nachweisbar. Interessanterweise zeigten sich hingegen in der Arbeit von Cooper sogar höhere von-Willebrand-Faktor-Antigen-Werte als in der Kontrollgruppe. Insgesamt passen die Ergebnisse der beiden Studien aber zu einer weiteren Studie (483), die Thrombelastographie(TEG)-Untersuchungen bei Greyhounds durchführte und hier im Vergleich zu anderen Hunderassen hypokoagulable Messverläufe (längere r-Zeit, höherer k-Wert, niedrigerer alpha-

## 2. Literaturübersicht

---

angle, niedrigere „Maximum Amplitude“ (MA)) nachwies. Jedoch fanden sich hierbei wiederum keine niedrigeren Fibrinogen-Werte. Insgesamt besteht bei Greyhounds also eine geringere Gerinnungsaktivität von Vollblut im Vergleich zu anderen Hunderassen.

Auch wenn die Leukozytenreduktion, wie zuvor ausgeführt, in der Tiermedizin eine selten eingesetzte Maßnahme ist, ist ihr Einfluss auf die Gerinnung von Interesse, denn die Filtration stellt den Kontakt des Blutes mit einer artifiziellen Oberfläche dar. Dieser kann somit zu einer Gerinnungsaktivierung führen. In einer tiermedizinischen Studie (30) wurde der Einfluss der Leukoreduktion auf die Qualitätsparameter von Vollblutkonserven (CPDA-1) und Erythrozytenkonserven (CPD + SAGM) während einer 35-tägigen Lagerung untersucht. Als Gerinnungsprofil wurden die Gerinnungszeiten (PT/aPTT), die Gerinnungsfaktoren (VII, VIII, IX, XI und XII) sowie Fibrinogen gemessen. Im Vergleich der leukoreduzierten Vollblutkonserven mit den nicht leukoreduzierten Konserven wurden niedrigere Aktivitäten an Faktor IX, niedrigere Gehalte an Fibrinogen sowie eine verlängerte aPTT beobachtet. Darüber hinaus zeigten sich die Aktivitäten der Faktoren XI und XII erniedrigt, welche jedoch aufgrund einer hohen Variabilität zwischen den Konserven nicht statistisch untersucht wurden. Unterschiede in den anderen Gerinnungsparametern waren nicht nachweisbar. Einschränkend muss bezüglich der Studie von Stefani et al. (30) vermerkt werden, dass aufgrund der sehr geringen Zahl an Versuchstieren (n = 5) die interindividuellen Schwankungen der Gerinnungsfaktoraktivitäten möglicherweise zu Verfälschungen der Ergebnisse geführt haben. Eine andere Studie an Probenmaterial von Hunden wies ähnlich niedrige Zahlen an Individuen auf (n = 8) (485). Zwar wurde bei dieser FFP untersucht, da dieses jedoch von zuvor leukoreduzierten bzw. nicht leukoreduzierten Vollblut abgetrennt wurde, ist auch diese Studie geeignet, entsprechende Unterschiede als Folge der Leukozytendepletierung aufzudecken. Insgesamt fanden sich hier keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen für die Faktoren V, VII, VIII, X, XI, Antithrombin, Protein C, den Fibrinogengehalt sowie für die Gerinnungszeiten (PT und aPTT). Nebst der geringen Anzahl an Tieren liegt eine wesentliche Limitation dieser Studie in der Monomorphie der Hundepopulation, da lediglich eine Hunderasse (Treeing Walker Coonhound) verwendet wurde. Studien aus der Humanmedizin wiesen hinsichtlich des Einflusses der Leukozytenreduktion von Vollblut teils variable Ergebnisse der hämostatischen Beeinflussung auf. Zum Teil decken sich die Ergebnisse mit den Ergebnissen aus der Veterinärmedizin. So zeigten sich analog Reduktionen der Faktoren IX, XI und XII (487) sowie eine Verlängerung der aPTT (488). Allerdings wurde hauptsächlich eine negative Beeinflussung von Faktor V und VIII (484, 486, 487) nachgewiesen. Zusätzlich zeigte sich eine verkürzte PT in einer humanmedizinischen Studie (488). In der Studie von Solheim et al. (486) fand sich aber bei den Konserven nach dem initialen filtrationsbedingten Abfall der Faktor V und VIII-Werte ein geringerer bzw. langsamerer Abfall während der weiteren Lagerung im Vergleich zu den nicht gefilterten Konserven. Anzumerken ist, dass in den veterinärmedizinischen Studien immer nur ein Typ Filter verwendet wurde, was mögliche Differenzen der Effekte zwischen

## 2. Literaturübersicht

---

verschiedenen Filtersystemen (487) vernachlässigt. Hier werden entsprechend weitere Studien mit einer höheren Zahl an eingeschlossenen Tieren benötigt.

Darüber hinaus legen Studien zum Einfluss der Leukozytendepletion auf Erythrozytenkonzentrate nahe, dass durch den Prozess verursachte Veränderungen der Erythrozyten die Gerinnungswirkung von leukoreduziertem Vollblut beeinflussen könnten (494, 495). So wurden in einer wissenschaftlichen Veröffentlichung aus dem Jahr 2015 (494) im flüssigen Kompartiment kaniner Erythrozytenkonzentrate weniger prokoagulatorische Phospholipide sowie ein geringerer Anstieg dieser in der leukoreduzierten als in der nicht-leukoreduzierten Gruppe gefunden. Die Unterschiede zeigten sich allerdings nicht initial und waren durch einen Abfall der Konzentrationen der prokoagulatorische Phospholipide im mittleren Lagerungszeitraum unterbrochen. Analog konnten Herring et al. (495) eine verminderte Anzahl von Mikropartikeln, welche das prokoagulatorische Phospholipid Phosphatidylserin enthalten, in leukozytendepletierten Erythrozytenkonzentraten nachweisen. Unter Mikropartikeln versteht man hierbei Membranvesikel, die von Zellen (u. a. Erythrozyten, Leukozyten, Thrombozyten) abgeschnürt werden (495). Unterschiede zwischen den Konserven mit und ohne Leukozytendepletion konnten hierbei ab dem 14. von 35 Lagerungstagen beobachtet werden. Ebenso war der Anstieg der Anzahl der Mikropartikel in der gefilterten Gruppe flacher (495). In einer anderen Studie (496), in der u. a. der Phosphatidylserin-Gehalt der Erythrozytenmembran in Abhängigkeit von der Durchführung einer Leukozytendepletion untersucht wurde, fand sich hierbei jedoch kein Unterschied.

Verschiedene Studien haben sich mit der hämostatischen Aktivität von kühl gelagertem kaninen Vollblut beschäftigt und konnten jeweils einen Abfall dieser über die Lagerungsdauer (28 bis 42 Tage) nachweisen (28–30). Nebst den klassischen Gerinnungsanalysen wurde dies auch anhand von viskoelastischen Tests deutlich. So fiel einerseits die Aktivität der Gerinnungsfaktoren II, V (29), VII (30), VIII, IX (29, 30), X (29), XI, XII (30) sowie XIII (29) konstant ab. Wobei nur Faktor VIII in der Studie von Cooper et al. (29) unter die zuvor beschriebene 50 % Grenze fiel. Analog zum Abfall der Faktoraktivitäten stiegen die Gerinnungszeiten in den Studien an (28–30). Auch der von-Willebrand-Faktor fiel in der Studie von Cooper et al. im Laufe des beobachteten 42 Tage Zeitraums unter die 50 % Grenze ab (29). Der Fibrinogengehalt verhielt sich in den Studien unterschiedlich. In zwei der drei Studien sank der Fibrinogengehalt mit der Zeit signifikant ab (29, 30). Konstante Fibrinogengehalte konnten wiederum in der Studie von Edwards et al. (28), deren Ziel die Untersuchung der hämostatischen Kapazität von gekühltem Vollblut war, festgestellt werden. Hierzu kamen CPD-antikoagulierte Vollblutkonserven von zehn Einsatzhunden zum Einsatz, die 28 Tage gelagert wurden. Die viskoelastischen Tests zeigten andererseits einen erhöhten k-Wert (28), einen Abfall des „alpha-angles“ sowie eine Abnahme der MA/„Maximum clot firmness“ (MCF) (28, 29). Daten zu Inhibitoren der Gerinnung oder Markern der Fibrinolyse über die Lagerungsdauer sind in der

## 2. Literaturübersicht

---

veterinärmedizinischen Literatur nicht vorhanden. Für eine Besprechung der humanmedizinischen Literatur zu diesem Thema sei auf 4.1 Einfluss des zeitlichen Verlaufs der Lagerung verwiesen.

Die Arbeiten zu Abweichungen der Lagerungstemperatur betrachten im Gegensatz zu den Studien, die den Zeiteinfluss untersuchen, überwiegend kürzere Zeiträume. In der Studie von Walton et al. aus dem Jahr 2014 (450) wurden aus über einen variablen Zeitraum bei Raumtemperatur gelagerten kaninen Vollblutkonserven Plasmaprodukte hergestellt. Die Dauer bis zur Verarbeitung betrug hierbei ca. acht, zwölf oder 24 Stunden. In dieser Studie wirkte sich eine längere, der Aufbereitung vorangehende Lagerung positiv auf die Faktor VIII- und X-Aktivität der gewonnenen Plasmaprodukte aus. So waren die entsprechenden Aktivitäten der 24 Stunden gelagerten Konserven höher als die der acht als auch zwölf Stunden gelagerten Vollblutkonserven. Der bessere Erhalt der Faktor VIII-Aktivität konnte auch in einer humanmedizinischen Studie (489) mit der Lagerung von Vollblutkonserven bei 22 °C über drei Tage gegenüber einer Lagerung bei 4 °C nachgewiesen werden. Des Weiteren fanden sich mit der Lagerung bei höheren Temperaturen ein besser erhaltener „alpha-angle“ sowie ein Anstieg der MCF im INTEM-Assay (489). Hingegen wurde in den warm gelagerten Konserven über die Zeit ein leichter Abfall der MCF des FIBTEM nachgewiesen (489), was durch einen Abfall des Gehalts an Gerinnungsfaktoren (Faktor XIII (497), extrinsische Faktoren (498)), die Zunahme von Fibrinolyseprodukten in der Probe (499), einen Anstieg des Hämatokrits (500–502) und/oder ein Polymerisationsproblem des Fibrinogens (in Anbetracht des konstanten Fibrinogengehalts) (497, 503, 504) bedingt sein kann. Zudem fand sich ein Anstieg der r-Zeit bzw. der „Clotting time“ (CT) ebenso wie eine Aufhebung der Aggregation der Thrombozyten, womit die Aggregation im Vergleich zu den kühl gelagerten Konserven schlechter erhalten war (489). Ausnahme war die über PARs vermittelte Aggregation (489). In derselben Studie (489) wurde auch der Einfluss einer Lagerung bei 32 °C über 2 Stunden untersucht. Wobei sich hier neben der überwiegenden Abnahme der Thrombozytenaggregation in einer geringen Größenordnung (Ausnahme u. a. geringfügige Zunahme Reaktion auf Stimulation PARs) nur ein geringfügiger Anstieg der CT bzw. r-Zeit zeigte. Insgesamt wurden die Veränderungen hier vom Autor der Veröffentlichung als irrelevant eingestuft (489). Eine andere Studie derselben humanmedizinischen Arbeitsgruppe (490) untersuchte Vollblutkonserven, die durchgängig bei 4 °C gelagert wurden im Vergleich zu solchen, die wöchentlich vier Stunden einer Temperatur von 28 °C ausgesetzt wurden. Untersucht wurden hinsichtlich der Gerinnung sowohl PT, aPTT, Faktor VIII, Fibrinogen als auch TEG. Nebst dem zu erwartenden Abfall gewisser Gerinnungsfaktoren in beiden Gruppen, fand sich eine geringere Beeinflussung der Geschwindigkeit der Gerinnselverfestigung (alpha-angle) an den beiden Beprobungen der Tage 28 und 35 in der zyklisch erwärmten Gruppe. Ebenso verhielten sich andere viskoelastische Gerinnungsparameter (k-Wert, MA) an Tag 35. Die zyklische Erwärmung führte transient am 7. Tag zu einem verlängerten r-Wert im Vergleich zur Kontrollgruppe. Insgesamt zeigen die humanmedizinischen Studien, wie im

## 2. Literaturübersicht

---

vorhergehenden Abschnitt deutlich wird, gewisse Gemeinsamkeiten. So scheint es bei der Lagerung mit höheren Temperaturen nach der viskoelastischen Gerinnungsdiagnostik teils zu einem verstärkten Verlust an Gerinnungsfaktoren zu kommen, ebenso wie einer reduzierten Thrombozytenfunktion. Trotzdem konnten tendenziell höhere maximale Amplituden beobachtet werden. Um analog die Auswirkungen verschiedener Lagerungstemperaturen auf die Gerinnungsaktivität von kaninen Vollblutkonserven zu untersuchen und idealerweise die zugrundeliegenden Mechanismen aufzudecken, werden weitere tiermedizinische Studien über längere Zeiträume benötigt.

Bezüglich der Medienunterschiede fand sich, bis auf die dieser Dissertation vorangegangene Arbeit von Lehmann (32), keine veterinärmedizinische Arbeit zu dieser Thematik. Besagte Dissertation konnte bis auf eine geringfügige (ca. 4 %) aber signifikante Erniedrigung des „alpha-angles“ in der VB-PAGGS-Gruppe gegenüber der VB-Gruppe keine Unterschiede in den durchgeführten thrombelastographischen Untersuchungen nachweisen. Darüber hinaus kamen zwei humanmedizinischen Studien beim Vergleich von Medien ebenfalls nur zum Nachweis geringfügiger Unterschiede. Eine dritte Studie fand hingegen vereinzelte Unterschiede bei den Faktoraktivitäten und einzelnen viskoelastischen Parametern. So fanden Meledeo et al. (491) bis auf eine signifikante Erhöhung der MCF im EXTEM-Assay der Thrombelastometrie von Citrat-Phosphat-Doppeldextrose (CP2D) im Vergleich zu den anderen untersuchten Antikoagulanzen/Nährmedien am dritten und 28. Tag der Lagerung keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der untersuchten Parameter (Thrombination, Thrombelastometrie (EXTEM, INTEM, FIBTEM), Thrombozytenaggregation und -Kollagen-Bindungs-Assays). Verglichen wurden hierbei mit CPD, CP2D und CPDA-1 versetzte, gekühlte Vollblutkonserven über eine 35-tägige Lagerungsdauer. Die konstanten Werte in den FIBTEM-Untersuchungen lassen hierbei annehmen, dass die oben beschriebenen Veränderungen durch Veränderungen der Thrombozytenzahl- bzw. -funktion (491) und nicht durch Veränderungen der plasmatischen Gerinnung bedingt sind. Allerdings passt dies weder zu dem in den CP2D-Konserven der Studie am frühesten (ab dem dritten Tag) auftretenden signifikanten Abfall der Thrombozytenzahl noch zu der nachgewiesenen reduzierten Thrombozytenaggregation, die sich auch stärker bei CP2D und CPDA-1 zeigte, weshalb die Ursache für diese Veränderungen unklar ist. Eine zweite Studie (416) aus dem Jahr 2023, bei der die Autoren dem mit CPDA-1 versetzten Vollblut zusätzlich zu konventionellen Zusätzen (eine Puffersubstanz (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure), Natriumchlorid, Acetylcystein, Mannitol, Adenin), verschiedene Apoptose- und Nekrose-Inhibitoren zugaben, wies ebenso nur wenige Einflüsse auf die untersuchten Parameter nach. Verglichen wurden die einzelnen zugesetzten Medien mit einer Kontrolle, bei der den Vollblutkonserven statt der Additivilösungen eine 0,9%ige Natriumchlorid-Lösung hinzugefügt wurde. Während der 21-tägigen Lagerungsdauer wiesen die untersuchten Parameter über die Gruppen hinweg sehr ähnliche Profile ihrer Entwicklung über die Zeit und folglich keine signifikanten Unterschiede u. a. auch bei den

angefertigten Thrombelastogrammen mit Kaolin als Aktivator auf. Die Ausnahme hiervon bildeten zum Teil die Ergebnisse der Untersuchungen an den Thrombozyten. So zeigten die unterschiedlichen Medien gegenüber der Kontrolle transient am 14. Lagerungstag signifikant höhere Thrombozytenzahlen, die Impedanz-Aggregometrie zeigte im Vergleich zur Kontrolle generell erniedrigte Werte, die allerdings nur an einzelnen Tagen bei der Co-Stimulation mit ADP und Adrenalin signifikant waren. Auch fanden sich signifikante Veränderungen zur Kontrolle bei den Oberflächenmarkern der Thrombozyten. So wiesen die Thrombozyten in der Grund-Nährlösung sowie den zwei Gruppen mit Apoptose-Inhibitoren am 14. bzw. 14. und 21. Lagerungstag eine signifikant höhere Expression von GP  $\alpha_{IIb}$  auf. Dahingegen war die Phosphatidylserin-Präsentation in der Kontrollgruppe am 14. Lagerungstag signifikant höher. Ausgeprägte relevante Unterschiede auf die plasmatische Gerinnung zwischen den Zusätzen konnten demnach in den beiden Studien nicht nachgewiesen werden. Die dritte Studie von Schubert et al. (505) verglich als Hauptaspekt nebst dem Einfluss des Zeitraums zwischen Vollblutentnahme und Leukozytenreduktion, den Einfluss der Lagerung in CPD vs. CPDA-1 auf die Qualitätsparameter des Vollblutes. Bezüglich der hämostatischen Aktivität fanden sich einzelne Unterschiede zwischen den beiden Medien bei der Messung von Faktor II, Faktor V, Faktor VIII, der PT sowie bei viskoelastischen Gerinnungsparametern (CT, „alpha-angle“, CFT und MA). Die Veränderungen zeigten hierbei kein einheitliches Muster, so lag der Gehalt von Faktor II und V im CPDA-1 konservierten Vollblut höher. Hingegen war der Gehalt von Faktor VIII in den Konserven mit CPD höher, diese wiesen eine kürzere PT sowie überwiegend bessere viskoelastische Gerinnungsparametern auf. Zusätzlich waren diese Unterschiede während der Lagerung transient, traten häufig am Anfang der Lagerung auf und variierten zwischen den beiden zeitlichen Filtrationsgruppen, weshalb die Autoren diese nicht als relevant einstufen.

Veterinärmedizinische Literatur zum Einfluss von unterschiedlichen Blutkonservenbeuteln auf die hämostatische Aktivität von Vollblut und dessen Plasma liegen nach Wissen des Autors dieser Arbeit nicht vor. Jedoch untersuchte eine humanmedizinische Arbeit zusätzlich im Rahmen einer anderen Thematik den Einfluss zweier verschiedener Blutentnahmebeutel. Die beiden Beutelgruppen wurden hierbei jeweils zusätzlich durch die Zeit bei Raumtemperatur zwischen Blutentnahme und Leukoreduktion (früh/spät) unterteilt. Darüber hinaus erfolgte eine Einteilung in (filtrierte) bzw. den Anteil der nur gelagerten (unfiltrierten) Konserven. Nach der entsprechenden Behandlung wurden die Beutel gekühlt für 21 Tage gelagert. Bei besagter Studie von Schubert et al. (492) wurden sowohl die Gerinnungsfaktoren Faktor II, Faktor V, Faktor VIII und Fibrinogen als auch die PT bestimmt und eine Thrombelastometrie durchgeführt. Allerdings wurden die Gerinnungsfaktoren, Fibrinogen und die PT nicht in der ungefilterten Gruppe gemessen. Signifikante Unterschiede fanden sich bei diesem Parameter lediglich in der früh filtrierten Gruppe am 7. und 21. Tag sowie in der spät filtrierten Gruppe am Tag 21 der Lagerung, die Unterschiede beschränkten sich hierbei auf die CT. Diese gibt den Einfluss

der Gerinnungsfaktoren an (497, 498, 503, 506, 507), was zu den zuvor beschriebenen Veränderungen während der Lagerungszeit passen könnte. Da die Veränderungen aber nicht konstant waren, wurden sie von der Arbeitsgruppe nicht als relevant angesehen (492).

### **2.5 Verfügbarkeitsprobleme und Logistik von Blutprodukten**

In der Humanmedizin erfolgt die Bereitstellung von Blutprodukten in Deutschland über Spendeeinrichtungen (Blutspendedienste) des Deutschen Roten Kreuzes, staatlich-kommunaler Dienste, von Universitäten, der Bundeswehr, von Krankenhäusern sowie privater Anbieter. Über diese Systeme werden die Blutdepots (Blutbanken) der entsprechenden abnehmenden Institutionen bestückt und eine ausreichende Versorgung gewährleistet (508). Trotzdem kommt es saisonal und lokal zu Engpässen (509–512). In der Tiermedizin gibt es in Deutschland kein vergleichbares System und die Blutspenden müssen ebenso wie die entsprechenden Blutbanken von den transfundierenden Tierkliniken und Tierarztpraxen durchgeführt bzw. aufrechterhalten werden. Auch im veterinärmedizinischen Sektor kommt es in diesem Rahmen zu zeitweisen Reduktionen der Spendebereitschaft (513). Zwar gibt es im europäischen Ausland kommerzielle Blutbanken (514, 515), um etwaige Engpässe zu mildern, jedoch ist hier mit entsprechenden Lieferzeiten und relativ hohen Kosten zu rechnen. Dies bedingt einen hohen Aufwand. Zum einen müssen die Tiere zur Blutspende organisiert sowie deren Termine koordiniert werden. Durch die Tierkliniken gehaltene Hunde-/Katzenkolonien zum Zweck der Blutspende, wie sie in einer Online-Umfrage unter 73, überwiegend in den Vereinigten Staaten von Amerika gelegenen, Tierkliniken durch ca. 11 bzw. 40 % der Kliniken angegeben wurden (371), sind in Deutschland nach Erfahrung des Autors sehr unüblich. Zum anderen muss die Verwaltung des vorhandenen Blutproduktebestandes erfolgen. Hinzu kommen je nach Vorgehensweise in diesen Bereichen rechtliche Voraussetzungen. Diese werden durch eine entsprechende Leitlinie des BVLs (12), das Tierarzneimittelgesetz (TAMG) (516), die Verordnung der Europäischen Union (EU) 2019/6 (517) sowie angrenzende Rechtsmaterie festgelegt. Zwar ist die Leitlinie des BVLs in Bezug auf die Rechtsmaterie veraltet, da sie vor dem Inkrafttreten des TAMG veröffentlicht wurde, kann/sollte jedoch hinsichtlich der geforderten Qualitätsansprüche und Vorgehensweisen weiter Beachtung finden. Bei den unten genannten Notfallblutspenden gilt/galt die Leitlinie hingegen ohnehin nicht (12). Wiederum ist unverarbeitetes Blut von den Bestimmungen des TAMGs und der Verordnung (EU) 2019/6 nach deren Erwägungsgrund 10 sowie Artikel 2 Absatz 7 Buchstabe a) derselbigen ausgenommen, sofern es nicht vermarktet werden soll (517, 518). Die Weiterverarbeitung zu Blutprodukten ist darüber hinaus nach § 14 Absatz 2 Nr. 2 TAMG nicht erlaubnispflichtig, solange die Anfertigung in einer tierärztlichen Hausapotheke für die Patienten des Tierarztes erfolgt und die Blutprodukte von ihm selbst oder unter Aufsicht durch Dritte angewendet

werden (516). Zusätzlich müssen die Bedingungen der Artikel 103 und 104 der Verordnung (EU) 2019/6 erfüllt sein, die den (Versand-)Handel mit Tierarzneimitteln sowie die entsprechende Dokumentation regeln (516, 517). Ein Inverkehrbringen von Blut und Blutprodukten hingegen benötigt nach § 22 Absatz 1 TAMG (516, 518) eine Zulassung des Produktes sowie eine Herstellungserlaubnis nach § 28 Absatz 1 TAMG in Kombination mit Artikel 88 Absatz 1 der Verordnung (EU) 2019/6 (516–518). Andererseits sind die für den Betrieb einer Blutbank nötigen technischen Geräte zur Aufbereitung und Fraktionierung der gespendeten Konserven sowie deren Lagerung (Blutproduktkühlschränke) mit hohen (initialen) Investitionen verbunden (12, 18, 19, 21). Indes setzen aber nicht alle Institutionen auch spezielles Equipment ein. So verwenden 38 % der Tierkliniken (371) bzw. 72 % der Tierärzte (482) laut zwei Internet-gestützten Umfragen z. B. keine speziellen Einrichtungen zur Kühlung von Blutprodukten.

Aus oben besprochenen Gründen werden in kleineren kurativen Einrichtungen meistens individuelle Blutspenden von einem in der gegebenen Situation akquirierten Spendertier auf einen vorher festgelegten Patienten übertragen (Notfallblutspende) (519). In einer Umfrage unter 199 Tierärzten in Australien gaben entsprechend ca. 68 % an, entnommenes Blut direkt zu übertragen (482). Bei Notfallblutspenden kommt in aller Regel Vollblut zum Einsatz. Allerdings benötigt dieses Vorgehen Zeit und ausreichend Personal, um parallel sowohl die Behandlung des Notfallpatienten als auch die Blutspende zu realisieren (449). Zeitlich kann das Auffinden von Blutspendern schwierig sein. Verschärft wird diese Problematik bei benötigten seltenen Blutgruppen (z. B. Blutgruppe Dal-negativ des Hundes (520, 521)). Eine weitere Problematik in diesem Zusammenhang ist der Zeitaufwand von der Gewinnung des Spenders bis zum fertigen Blutprodukt. Bei perakuten Prozessen (z. B. Traumapatienten) kann diese Verzögerung nicht toleriert werden. Chronisch kranke Patienten oder Tiere vor elektiven Eingriffen erlauben im Gegensatz dazu längere Verzögerungen, was ein solches Modell bei ihnen weniger problematisch macht.

Auch bei einer vorhandenen Blutbank ist eine durchgehende Versorgung nicht per se einfach. Die Blutprodukte weisen nur eine begrenzte Haltbarkeit (s. 2.3 Arten von Blutprodukten, deren Herstellung und Indikationen) auf, nach deren Ablauf die Konserven verworfen werden müssen. Eine Verringerung des Ausschusses kann über ein System mit genereller Priorisierung der Verwendung von älteren Blutkonserven im Gegensatz zu einem System mit Zustimmung zu älteren Konserven erreicht werden. Dies führt allerdings auch zum vermehrten Einsatz länger gelagerter Konserven (522). Andererseits gaben in einer Online-Umfrage unter Tierkliniken 56 % der Häuser an, bei der Behandlung von Hunden und Katzen grundsätzlich die älteste verfügbare Konserve einzusetzen (371). Die Verwendung älterer Blutkonserven bedingte in manchen Studien jedoch höherer Inzidenzen von Transfusionsreaktionen und höhere Schweregrade dieser Reaktionen (366, 367, 523) und wurde bei

Hunden in Verbindung gebracht mit Störungen der Gerinnung sowie darüber hinaus mit einer verringerten Überlebensrate beim Vorliegen einer immunmedierten hämolytischen Anämie (524). Deshalb muss eine bedarfsgerechte Produktion erfolgen, die auch unerwartete Bedarfsspitzen miteinkalkuliert, ohne jedoch zu viele am Ende der Haltbarkeit zu verwerfende oder alt zu nutzende Konserven zu generieren. Zur Verbesserung der Planbarkeit wurden in der Humanmedizin bereits verschiedene Künstliche Intelligenz-Modelle zur Vorhersage des Bedarfs entwickelt, bisher jedoch mit mäßigem Erfolg (525, 526). Alternativ werden in der Tiermedizin Ersatzprodukte für herkömmliche Blutprodukte getestet, was langfristig die Chance bietet, die Acquisition von Material zu umgehen (527).

Insgesamt bedingen die oben genannten Punkte wiederkehrende Engpässe bei der Verfügbarkeit von Blutprodukten in der Tiermedizin, speziell im Bereich von Notfallpatienten.

Aus diesem Grund sind Strategien zur bestmöglichen Verfügbarmachung von Blutprodukten sowie Verwendung der vorhandenen Blutprodukte essenziell. Grundsätzlich senkt ein rationaler Umgang mit Blutkonserven und entsprechende Vorbereitungen (Unterstützung der Hämatopoese) der Patienten den Bedarf an Blutkonserven, wie in der Humanmedizin an Patienten mit herzchirurgischen Eingriffen gezeigt werden konnte. Die Maßnahmen waren hierbei teils eines Patienten Blut Management Strategie (528). Eine solche Strategie kann hierbei viele weitere Strategien wie ein Anämiemanagement oder Optimierungen der Gerinnungsaktivität umfassen (529). Auch können Autotransfusionssysteme eingesetzt werden. Zwar konnten diese in einer Studie an einer Überweisungstierklinik keine Reduktion der homologen kaninen Bluttransfusionen zeigen, jedoch ist aufgrund eines Anstiegs der Gesamttransfusionszahl bei Konstantbleiben der homologen Bluttransfusionen von einem insgesamt Bluttransfusions-sparenden Effekt auszugehen (530). Eine weitere wichtige Maßnahme ist die optimale Ausnutzung jeder gewonnenen Blutspende. Da nicht jeder Patient grundsätzlich jeden Blutbestandteil des Vollblutes benötigt, kann mit einer gespendeten Vollblutkonserve mehreren Tieren mit unterschiedlichen Blutprodukten spezifischer geholfen werden. Dies erhöht die Effektivität und senkt zusätzlich das Risiko für Transfusionsreaktionen (14, 15). Die Risikoreduktion ergibt sich u. a. durch die reduzierte Transfusionsmenge (15). Einschränkend sei vermerkt, dass eine Reduktion der Rate an Transfusionsreaktionen in einer kürzlich veröffentlichten Studie bei Hunden jedoch nicht nachgewiesen werden konnte (367). Zusätzlich steigt die Haltbarkeit einzelner Komponenten an, wenn sie von den übrigen Blutbestandteilen getrennt werden. Besonders deutlich wird dieser Effekt bei Plasmaprodukten, die danach eingefroren werden und wie oben angegeben (s. 2.3 Arten von Blutprodukten, deren Herstellung und Indikationen) bis zu mehreren Jahren haltbar sind. Auch ist eine Verlängerung der möglichen Lagerungsdauer von

Erythrozytenkonzentraten über die Haltbarkeit von konservierten Vollblutkonserven hinaus möglich (s. 2.3 Arten von Blutprodukten, deren Herstellung und Indikationen).

Außerdem konnte in einer kürzlich veröffentlichten Studie von Edwards et al. gezeigt werden, dass die Kombination aus Erythrozytenkonzentrat und FFP im Vergleich zu gekühltem Vollblut nach Aufhebung eines hämorrhagischen Schocks bei Hunden signifikant höhere mittlere arterielle Drücke (MADs) erzeugte. Jedoch fanden sich zum Ende der Beobachtungsperiode bei dem rekonstituierten Blut niedrigere Albuminkonzentrationen im Blutplasma (531).

Dies scheint im Gegensatz zu Untersuchungen in der Humanmedizin zu stehen, die eine Reduktion der Mortalität beim Einsatz von konserviertem Vollblut im Vergleich zu einer Blutkomponententherapie bei traumatisch bedingten Blutungen zeigen konnten (532, 533) sowie der aus dieser Beobachtung abgeleiteten veterinärmedizinischen Empfehlung Vollblut als Volumenersatz bei kaninen hämorrhagischen Schockzuständen zu verwenden (458, 534). Wobei letztere Empfehlung auf dem häufigen Verbluten als Todesursache (folglich einem hämorrhagischen Schockgeschehen) von Militärhunden fußt (535).

Die Verwendung von fraktioniertem Blut weist eben jedoch auch Probleme auf. So ist die Rekonstitution von Vollblut aus einzelnen Blutprodukten teurer (s. o.). Des Weiteren ist es durch Wartezeiten (s. u.), den nötigen Einsatz von mehr verschiedenen Konserven (352, 536), das höhere Infektionsrisiko durch den vermehrten Kontakt zu Spendern (536, 537) sowie die unphysiologische Zusammensetzung des rekonstituierten Blutes (352, 538, 539) aufwändig bzw. nachteilig. Auch werden normalerweise gefrorene Plasmaprodukte mittels eines Wasserbades oder eines entsprechenden Gerätes unter Einsatz von warmem Wasser in einem geschlossenen System aufgetaut (Trockensystem) (531, 540), was Zeit in Anspruch nimmt (25). In einer Notfallsituation kann es dabei zu kritischen Verzögerungen kommen (20, 541, 542). Aus diesem Grund werden Plasmakonserven teils im Voraus aufgetaut, was das Risiko eines späteren ungenutzten Verwurfs bedingt (541). Hinzu kommt ein schnellerer Verlust von hämostatischen Proteinen sowie eine erhöhte Gefahr eines Sterilitätsverlusts (20, 541). Als Alternative stehen Mikrowellen-basierte Systeme zur Verfügung, welche die Plasmakonserven schneller auftauen (20, 21, 541, 543). Jedoch zeigten sich variable Ergebnisse bezüglich der hämostatischen Aktivität der kaninen Konserven nach dem Auftauen, wobei der Vergleich zwischen den Studien aufgrund der abweichenden Methodik schwierig ist (21, 543, 544). Zudem fand sich in einer Studie eine teilweise Trübung der Konserven, die vereinzelt mit der Bildung von Präzipitaten einherging, was auf eine mögliche lokale Überschreitung einer kritischen Temperaturschwelle hinweist (21, 513).

Ein alternativer Lösungsansatz, um eine Zeitverzögerung durch das Auftauen zu umgehen bzw. eine Alternative (bis zur Verfügbarkeit der aufgetauten Konserven) zu haben, ist der Einsatz nicht gefrorener Plasmaprodukte („Liquid-Plasma“, s. 2.3 Arten von Blutprodukten, deren Herstellung und Indikationen) (27, 465, 542, 545, 546) oder von aufgetauten und anschließend gekühlt gelagertem FFP (20) bzw. FP (451)(s. auch 2.3 Arten von Blutprodukten, deren Herstellung und Indikationen). So eignet sich „Liquid-Plasma“ in der Humanmedizin zum Beispiel zur Behandlung von durch Cumarinderivaten verursachten Blutungen und wird darüber hinaus bei aktiven Blutungen z. B. nach Traumata eingesetzt (465). Darüber hinaus konnten zwei humanmedizinischen Studien keinen Unterschied in der Mortalität innerhalb der ersten 24 Stunden zu aufgetauten Plasmaprodukten finden (545, 546). Eine dieser Studien konnte auch keinen Unterschied in der Gesamtmortalität, nebst anderen wichtigen Parametern, feststellen (546). In einer 2020 veröffentlichten Studie von Beattie et al. konnten darüber hinaus bei Massentransfusionen Hinweise auf positive Einflüsse hinsichtlich des Outcomes der Patienten gefunden werden, wenn „Liquid-Plasma“ statt FFP eingesetzt wurde (542).

Entsprechend der möglichen Herstellung von „Liquid-Plasma“ aus konservierten Vollblutkonserven (464, 465) ist die hämostatische Aktivität des Plasmaanteils dieser von Bedeutung. In der Tiermedizin gibt es hierzu nach Wissen des Autors nur ganz vereinzelte Studien (28–30), die jedoch die Inhibition der Gerinnung und die Fibrinolyse nicht betrachten. Darüber hinaus gibt es keine vergleichenden Untersuchungen beim Einsatz verschiedener Nährmedien. Im Rahmen dieser Arbeit sollten diese Bereiche untersucht werden. Eine Restaktivität im Bezug zur Ausgangsaktivität der pro- und antikoagulatorischen Proteine von 50 % oder mehr am fünfzehnten Lagerungstag wurde ebenso wie ein fehlender signifikanter Unterschied der Aktivitäten zwischen den Nährmedien als Hypothese angenommen. Die Ausnahme bezüglich Faktor V wurde in der Einleitung entsprechend diskutiert.

## 3. Eigene Untersuchungen

### 3.1 Material und Methoden

Das Probenmaterial der vorliegenden Untersuchungen wurde im Rahmen eines vorangegangenen Dissertationsprojektes (32) gewonnen. Die entsprechende Studie ist hierbei beim Regierungspräsidium Gießen unter dem Aktenzeichen V 54 - 19 c 20 15 h 02 Gl 18/17 kTV 16/2020 vermerkt.

Zwischen dem 13. Januar und 1. März 2021 wurden hierfür im Rahmen des freiwilligen Blutspendeprogramms der Klinik für Kleintiere der Justus-Liebig-Universität Gießen 21 gesunde Hunde rekrutiert, deren Besitzer zuvor in das Prozedere eingewilligt hatten.

Ziel der entsprechenden Probenentnahme war, nebst dem eigentlichen Thema der Arbeit, die Gewinnung von Plasmaproben zur Untersuchung des Einflusses zweier Konservierungsmedien CPD bzw. PAGGS-M auf die Aktivität von Gerinnungsfaktoren und natürlichen Gerinnungsinhibitoren des Plasmaanteils von Vollblutkonserven während einer 28-tägigen Lagerung bei vier Grad Celsius (°C).

Um interindividuelle Unterschiede in den Gerinnungseigenschaften der Tiere auszugleichen (15, 21), kamen Poolproben von jeweils drei Tieren zum Einsatz.

#### 3.1.1 Blutspende

##### 3.1.1.1 Einschlusskriterien

Als Einschlusskriterien der Versuchstiere wurden folgende Voraussetzungen festgesetzt:

1. Hunde zwischen einem (Tier muss ausgewachsen sein) und zehn Jahren
2. Körpergewicht > 27 Kilogramm (kg) (Voraussetzung: physiologischer „Body Condition Score“ (BCS))
3. Ruhiger Habitus (Spende ohne Sedation möglich)
4. Ausführliche Anamnese (angelehnt an die Leitlinien zur Gewinnung, Lagerung, Transport und Verabreichung von Blut und Blutprodukten im Veterinärbereich (12))
5. Impfung nach dem Schema der Ständigen Impfkommision Veterinärmedizin (StIKo Vet) sowie Entwurmung entsprechend der Leitlinien der European Scientific Counsel Companion Animal Parasites (ESCCAP) Guidelines
6. Klinische Untersuchung ohne besonderen Befund
7. Hämatologie und klinisch chemische Untersuchung (einschließlich C-reaktivem Protein) ohne besonderen Befund

Als Ausschlusskriterien der Versuchstiere wurden folgende Punkte festgelegt:

1. (Vorangegangene) Trächtigkeit
2. Grunderkrankungen mit Beeinflussung der Gerinnung
3. Vorherige Verabreichung von Blutprodukten
4. Auslandsaufenthalte (nach Abwägung)

Die Festlegung des Gewichts für die kaninen Spender auf über 27 kg wurde durch die verhältnismäßig große benötigte Blutmenge (s. 3.1.1.4 Gewinnung des Blutprodukts) bedingt und stellte eine, wie zuvor beschrieben, tolerable Kreislaufbelastung der Tiere sicher (345, 547, 548).

Der Ausschluss von trächtigen Tieren zielte darauf ab, diese keiner zusätzlichen, nicht notwendigen Kreislaufbelastung auszusetzen. Darüber hinaus diente der Ausschluss von zuvor trächtigen Tieren dem Ziel, etwaige anhand der Blutgruppe nicht zu erwartende Inkompatibilitäten durch eine Alloimmunisierung während der Trächtigkeit zu vermeiden. Dies hätte beim anschließenden Pooling (s. 3.1.2 Erstellung der Probenpools) Probleme verursacht. Allerdings handelte es sich um eine reine Vorsichtsmaßnahme, da eine fetomaternalen Alloimmunisierung im Vergleich zum beispielsweise Mensch (549) und Pferd (550, 551) beim Hund bisher nicht nachgewiesen werden konnte (552–554). In Hinblick auf mögliche nicht bekannte Blutgruppen-Antigene erschien dies nichtsdestotrotz sinnvoll.

Aufgrund der Gefahr der Alloimmunisierung wurden ebenso Hunde ausgeschlossen, die zuvor Blutprodukte verabreicht bekamen, da dieses Phänomen bei selbigen im Rahmen von Transfusionen gut beschrieben und zu erwarten ist (555–558).

Tiere mit Auslandsaufhalten sollten zur Risikominimierung von subklinischen Infektionen mit Vektor-übertragenen Erkrankungen vermieden werden, stellten jedoch nach Abwägung der zu erwartenden Expositionsgefahr (Aufenthaltsort, Prophylaxe) keine absolute Kontraindikation dar.

#### **3.1.1.2 Gesundheitsprüfung der Versuchstiere**

Alle verwendeten Tiere waren bekannte Spender im Rahmen des Blutspendeprogramms, die an den Ablauf der Blutspende bereits gewöhnt waren. Um die Belastung der Tiere weiterhin zu reduzieren und überflüssige Zeit zwischen Ankunft und den Blutentnahmen zu vermeiden, wurden entsprechend dem üblichen Ablauf sämtliche Blutspenden nur nach Terminvergabe in einem extra für Blutspenden vorgesehenen Raum durchgeführt. Nach Betreten des Raumes erhielten die Tiere eine Gewöhnungszeit von wenigen Minuten. Zur Bestätigung der Einschlusskriterien wurde vor jeder Spende von den Besitzern ein Anamnesebogen ausgefüllt.

### 3. Eigene Untersuchungen

---

Im Anschluss an die Gewöhnungsphase wurden die Tiere klinisch untersucht. Danach wurde bei den Hunden eine periphere Venenpunktion mittels einer 21 Gauge (G) Kanüle durchgeführt. Voraussetzung hierfür war, dass sich anamnestisch und klinisch keine Hinweise ergaben, die der Blutspende entgegenstanden. Verwendet wurden die *Vena cephalica antebrachii* oder die *Vena saphena lateralis* nach vorherigen aseptischen Maßnahmen am Ort der Punktion (Scheren, Desinfektion mittels 2-Propanol<sup>1</sup>). Die Hunde standen während der Probenentnahme, wobei der Besitzer zur Beruhigung am Kopf des Tieres positioniert war. Entnommen wurden insgesamt zwölf Milliliter (ml), die sich wie folgt aufteilten:

2 x 1,3 ml Lithiumheparin-Röhrchen<sup>2</sup>

2 x 1,3 ml EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)-Röhrchen<sup>3</sup>

4 x 1,3 ml Citrat-Röhrchen<sup>4</sup>

1 x 1,6 ml Hirudin Monovette<sup>5</sup> (32)

Die Abfolge der Blutentnahme entsprach hierbei der Abfolge der Auflistung.

#### 3.1.1.3 Weitere Verarbeitung und Messung der Proben

Das erste der beiden Lithiumheparin-Röhrchen wurde im Rahmen des vorherigen Dissertationsprojektes initial verwendet, um eine Blutgasanalyse<sup>6</sup> durchzuführen. Die Messung erfolgt hierbei innerhalb von vier Minuten. Der Rest der Probe wurde anschließend für die Thrombozytenfunktionsanalyse verwendet. Das zweite Röhrchen wurde für die klinische Chemie eingesetzt, welche an einem automatisierten klinisch chemischen Analyser<sup>7</sup> gemessen wurde.

Eines der EDTA-Röhrchen wurde unverarbeitet belassen. Das zweite Röhrchen wurde zentrifugiert, um Plasma und die zellulären Bestandteile voneinander zu trennen. Das unverarbeitete EDTA-Röhrchen wurde für die Hämatologie verwendet. Zum Einsatz kam hierfür das Hämatologiesystem ADVIA® 2120i (Softwareversion 6.11.7)<sup>8</sup> (32). Insofern die Blutgruppe bei vorherigen Spenden nicht ermittelt wurde, wurde diese aus derselben Probe per immunchromatographischem Schnelltest<sup>9</sup> bestimmt. Aus dem Plasma der abzentrifugierten Probe wurde im Rahmen der vorherigen Arbeit der Gehalt an freiem

---

<sup>1</sup> Isopropyl-Alkohol, Henry Schein VET GmbH, Hamburg, Deutschland

<sup>2</sup> Mikro-Probengefäß 1,3 ml Lithiumheparin, Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland

<sup>3</sup> Mikro-Probengefäß 1,3 ml EDTA KE, Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland

<sup>4</sup> Mikro-Probengefäß 1,3 ml Citrat 3,2%, Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland

<sup>5</sup> S-Monovette Hirudin 1,6 ml, Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland

<sup>6</sup> cobas® b 123 System, Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim, Deutschland

<sup>7</sup> ABX Pentra 400, HORIBA ABX SAS, Montpellier, Frankreich

<sup>8</sup> ADVIA® 2120i, Siemens Healthcare GmbH, Erlangen, Deutschland

<sup>9</sup> Lab Test Blood Typing Canine, Alvedia, Limonest, Frankreich

### 3. Eigene Untersuchungen

---

Hämoglobin gemessen. Verwendet wurde hierfür ein Küvettensystem<sup>10</sup> (32). Des Weiteren wurde für die vorherige Arbeit der Ammoniakgehalt des Plasmas bestimmt. Dies erfolgte mittels eines mehrschichtigen analytischen Films<sup>11</sup>, welcher mit dem zugehörigen automatisierten trockenchemischen Analysegerät<sup>12</sup> ausgelesen wurde (32). Aufgrund der Labilität des Ammoniaks betrug die Zeit zwischen Entnahme und Messung der Probe maximal fünf Minuten (32).

Die citrierten Proben wurden auf drei Gruppen aufgeteilt. Ein Citrat-Röhrchen wurde in der vorherigen Studie für eine TEG verwendet. Verwendet wurde hierbei das an der Institution zuvor beschriebene Protokoll (559). Ein weiteres Citrat-Röhrchen wurde wie weiter unten beschrieben für die Thrombozytenfunktionsanalyse aufbewahrt. Die zwei übrigen Proben wurden für die weiteren Untersuchungen asserviert. Hierzu wurden sie mittels zweifacher zehnmütiger Zentrifugation<sup>13</sup> bei 806 g und Überführen des Plasmaüberstandes zwischen den Zentrifugationsschritten in ein neues Behältnis<sup>14</sup> aufbereitet (32). Die doppelte Zentrifugation diente hierbei der möglichst vollständigen Entfernung von Thrombozyten und Mikrovesikeln von Thrombozyten (287). Die Zentrifugationskraft entsprach hierbei nicht den vom CLSI zu diesem Zeitpunkt empfohlenen 1500 g. Jedoch wurde auf die Möglichkeit der Etablierung alternativer Zentrifugationsprotokolle hingewiesen, solange diese einen Thrombozytengehalt von  $\leq 10 \times 10^9$  Thrombozyten pro Liter garantierten (560). Diese Qualitätsanforderung konnte wie zuvor beschrieben mittels unseres Protokolls eingehalten werden (561). Nach bis zu 21-tägiger Lagerung bei -30 °C in einem Blutplasmafroster<sup>15</sup> wurden die Proben in einen Gefrierschrank mit -80 °C überführt (32).

Die hirudinierte Probe wurde im Rahmen der vorangegangenen Studie ebenso für die Thrombozytenfunktionsanalyse verwendet. Zum Einsatz kamen bei allen Untersuchungen hierbei ein auf ADP sowie ein auf Kollagen basierender Test in einem Impedanzaggregometrie-System<sup>16</sup> (32). Die Untersuchungen erfolgten alle nach vierzigminütigem Ruhen des Blutes (32).

Die Hämatologie, Klinische Chemie sowie die Blutgruppenbestimmung wurden durch die MitarbeiterInnen des Zentrallabors der Klinik für Kleintiere – Innere Medizin durchgeführt. Die TEGs und Thrombozytenfunktionsanalyse erfolgten durch den Verfasser der vorangehenden Dissertation (32).

---

<sup>10</sup> HemoCue® Plasma Low Hb Analyser, HemoCue AB, Ängelholm, Sweden

<sup>11</sup> NH3-PII FUJI DRI-CHEM SLIDE, FUJIFILM Corporation, Tokio, Japan

<sup>12</sup> FUJI DRI-CHEM NX500i, FUJIFILM Corporation, Tokio, Japan

<sup>13</sup> MIKRO 120, Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen, Deutschland

<sup>14</sup> Mikroröhre 2 ml mit Verschluss, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

<sup>15</sup> FROSTER BL 730 PRO-ACTIVE, Philipp Kirsch GmbH, Willstätt-Sand, Deutschland

<sup>16</sup> Multiplate Analyzer, Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim, Deutschland

#### 3.1.1.4 Gewinnung des Blutprodukts

Für die eigentliche Blutspende wurde eine der beiden *Venae jugulares* punktiert, wobei sich das manuell an den Gliedmaßen fixierte Tier in der kontralateralen Seitenlage befand. Um auch im eigentlichen Prozess der Blutentnahme die Aufregung des Tieres zu reduzieren, erfolgte ein „medical training“; während der Vorbereitung und der Durchführung der Spende wurde/n die BesitzerIn des Tieres erneut am Kopf positioniert, hiermit wurde die Möglichkeit einer physischen und verbalen Interaktion mit dem Tier geschaffen.

Die aseptische Vorbereitung der Punktionsstelle erfolgte dreischrittig. Zunächst wurde die betreffende Region ausgeschoren. Im zweiten Schritt wurde das Hautfett sowie Schmutz, der nach dem Scheren verblieben war, entfernt. Hierfür wurde erneut 2-Propanol<sup>1</sup> verwendet. Der letzte Schritt bestand aufgrund der Herz-nahen Gefäßpunktion in einer erneuten Desinfektion. Hierzu wurde zweimal im Abstand von dreißig Sekunden eine alkoholische Povidon-Jod-Lösung<sup>17</sup> aufgetragen (32). Nach anschließender dreißigsekündiger Wartezeit erfolgte die Punktion. Diese stellt den Startzeitpunkt der Dauer der Blutspende dar.

Hierzu wurde die zu dem Erythrozytenkonzentrat-Inlinesystem<sup>18</sup> gehörige Punktionsnadel (16 G) in die von einer Hilfsperson im Bereich der *Apertura thoracis cranialis* gestaute Jugularvene eingeführt (32). Der ausgeprägte Schärfegrad der Kanüle sorgte hierbei für eine geringe Schmerzhaftigkeit. Ziel war eine Entnahme von 450 ml Vollblut, was einem Höchstvolumen von fünfzehn ml pro Kilogramm entsprach. Zu große oder kleine Volumina wurden durch das Wiegen des Blutbeutels während der Spende über eine Blutmischwaage<sup>19</sup> verhindert. Die Blutspende endete mit dem Ziehen der Kanüle aus der Jugularvene nach Aufhebung der Stauung des Gefäßes. In den letzten Momenten der Blutspende wurden 0,5 ml für die Durchführung einer Blutgasanalyse aus einem alternativen Entnahmeweg des Blutbeutels entzogen. Die Dauer des Prozederes wurde festgehalten. Anschließend wurde Druck auf das Gefäß ausgeübt. Ziel dieser Maßnahme war es, das Austreten von Blut nach außen oder in das umliegende Gewebe zu reduzieren (32). Verwendet wurden hierfür mit einer wässrigen Povidon-Jod-Lösung<sup>20</sup> getränkten Kompressen. Die Tiere mussten bis auf die letzten beiden Minuten der Kompression weiterhin in Seitenlage liegen, danach war eine Positionierung in der Brust-Bauch-Lage möglich. Die erste Überprüfung der Punktionsstelle erfolgte fünf Minuten nach Ende der Entnahme. Bei ausgeprägtem Auftreten der zuvor genannten Veränderungen wurde darüber hinaus ein Schutzverband eingesetzt. Der Verband wurde hierbei zwei Stunden belassen.

---

<sup>17</sup> Braunoderm®, B.Braun SE, Melsungen, Deutschland

<sup>18</sup> COMPOSELECT 4F T&B 63CPD/SAG-M RCC+PDS-V, Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg, Deutschland

<sup>19</sup> Compoguard®, Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland

<sup>20</sup> Braunol®, B.Braun, Melsungen, Deutschland

Alle Tiere erhielten nach der ersten Kontrolle der Entnahmestelle eine kleine Menge Hundefutter. Dies sollte eine positive Assoziation zu dem Vorgehen schaffen. Eine zweite Kontrolle der Entnahmestelle erfolgte im Anschluss an die Verabreichung des Futters. Ebenso schloss sich eine klinische Untersuchung an.

Um eine zusätzliche Belastung des Kreislaufsystems nach der großvolumigen Blutentnahme zu vermeiden, wurde den BesitzerInnen abgeraten, den Hund am selbigen Tag schweren körperlichen Aktivitäten auszusetzen. Darüber hinaus wurde auf die Notwendigkeit einer tierärztlichen Untersuchung bei auftretenden Auffälligkeiten hingewiesen. Etwaige Probleme nach der Blutspende wurden bei den BesitzerInnen am nächsten Tag abgefragt. Hierzu wurden die Besitzer angerufen.

#### **3.1.2 Erstellung der Probenpools**

Die mit ca. 450 ml befüllte Blutkonserve wurde nach der Spende mit dem Ziel einer optimalen Verteilung des Antikoagulans im Blutvolumen für weitere fünf Minuten auf der Blutmischwaage belassen und anschließend deren Gewicht<sup>21</sup> und Temperatur bestimmt. Die Umrechnung des Gewichtes der Konserve auf ein entsprechendes Volumen erfolgte anhand des in der Literatur für Vollblut beschriebenen spezifischen Gewichtes in Gramm (g) pro Milliliter von 1.058 (562, 563). Mit einer zeitlich dokumentierten Verzögerung erfolgte die Weiterverarbeitung zu den für die Studie verwendeten Gruppen (Pools). Die Weiterverarbeitung ist hierbei zu Übersichtszwecken in Abbildung 1 dargestellt. In der Zwischenzeit wurde die Temperatur der Konserven zügig normiert reduziert. Ziel war eine Konserventemperatur von 20 °C. Wobei die tatsächlich erreichten Temperaturen überprüft und festgehalten wurden. Verwendet wurde hierfür ein für diesen Zweck vorgesehenes Kühlsystem für Blutkonserven<sup>22</sup>.

Erythrozytenkonzentrat-Inlinesysteme<sup>23</sup> wurden im Weiteren für die Gruppenbildung von jeweils drei Tieren verwendet. Das Pooling wurde durchgeführt, um wie bereits oben erwähnt (s. 3.1 Material und Methoden) etwaige interindividuelle Unterschiede in der Thrombozytenfunktion und plasmatischen Gerinnung auszugleichen. Aus den leeren Blutbeutelssystemen wurden hierfür zunächst die Stabilisatoren und die Nährlösung unter sterilen Kautelen entfernt (32). Anschließend wurde der Poolbeutel nacheinander mit den drei von den Spendertieren gewonnenen Blutkonserven verbunden und jeweils ein Blutvolumen von 220 ml übertragen. Es wurden ausschließlich Hunde mit gleicher Blutgruppe (Dog Erythrocyte Antigen 1.1 (DEA 1.1)) für einen Pool kombiniert, um immunologische

---

<sup>21</sup> Laborwaage Typ BP6100-OCE, Sartorius Lab Instruments GmbH & Co. KG, Göttingen, Deutschland

<sup>22</sup> CompoCool Kühlelement, Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland

<sup>23</sup> COMPOSELECT 4F T&B 70CPD/PAGGSM RCC+PDSV, Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland

### 3. Eigene Untersuchungen

---

Reaktionen zu vermeiden. Die Übertragung wurde hierbei durch sterile Konnektierung des Poolbeutels mit den Spenderkonserven mittels einer Heidelberger Verlängerung<sup>24</sup> erreicht. Die sterile Konnektierung erfolgte mittels eines kommerziellen Schlauchverbindingssystems<sup>25</sup>. Nach jeder Übertragung wurden die Beutel mit einem Schlauchversiegler wieder voneinander getrennt, bevor der nächste Beutel angeschlossen wurde. Das Endvolumen des Poolbeutels betrug nach den Übertragungen 660 ml. Die vollständige Vermischung der Blutanteile wurde anschließend durch eine fünfminütige Lagerung auf einer Blutmischwaage<sup>26</sup> sichergestellt. Insgesamt wurden auf diese Weise sieben Poolbeutel generiert.

Anschließend wurden aus jedem Poolbeutel zwei leere 150 ml Transferbeutel<sup>27</sup> mit fünfzig Milliliter des Poolgemischs gefüllt. Für die Übertragung wurde dasselbe Verfahren verwendet, wie für die Befüllung der Poolbeutel oben beschrieben. Das restliche Volumen der Poolbeutel wurde im Rahmen einer anderen Forschungsarbeit verwendet. In die Transferbeutel wurde zusätzlich ein Blutentnahmesystem<sup>28</sup> integriert, um eine einfache und sterile Probenentnahme im Verlauf des Versuchs zu ermöglichen.

Jeweils einer der Transferbeutel wurde ohne weitere Aufarbeitung belassen. Dieser Beutel wurde im Folgenden als VB(-Beutel) gehandelt. Dem zweiten Beutel wurde die Additivlösung PAGGS-M (aus dem zweitem Mehrfachbeutelssystem entnommen (s. o.)), mit dem Ziel der Haltbarkeitsverbesserung der Erythrozyten, zugesetzt und dieser anschließend mit VB-PAGGS(-Beutel) gekennzeichnet. Verwendet wurden elf Milliliter der Additivlösung, deren Zusammensetzung im Folgenden aufgeführt ist. Die zugegebene Menge PAGGS-M entsprach hierbei verhältnismäßig der Menge, die der Erythrozytenmasse in einem konventionellen Erythrozytenkonzentrat gewonnen aus der entsprechenden Vollblutmenge mit CPD als Antikoagulans zugesetzt worden wäre.

Zusammensetzung PAGGS-M-Additivlösung auf 100 ml:

– Dinatriumhydrogenphosphat	0,1432 g
– Natriumdihydrogenphosphat	0,1255 g
– Adenin	0,0194 g
– Glukose-Monohydrat	0,9400 g
– Guanosin	0,0408 g
– Natriumchlorid	0,4209 g

---

<sup>24</sup> Verlängerungsleitung Typ Heidelberger, 3 x 4,1 mm, 140 cm, B. Braun Deutschland GmbH & Co. KG, Melsungen, Deutschland

<sup>25</sup> CompoDock, Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland

<sup>26</sup> MW5001 electronic, Biotrans GmbH, Dreieich, Deutschland

<sup>27</sup> Teleflex Transfer Bag 150 ml Transferbeutel, Terumo Corporation, Tokyo, Japan

<sup>28</sup> Sampling Coupler, Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland

### 3. Eigene Untersuchungen

- Mannitol 1,0000 g
- Aqua ad iniectabilia ad 100 ml

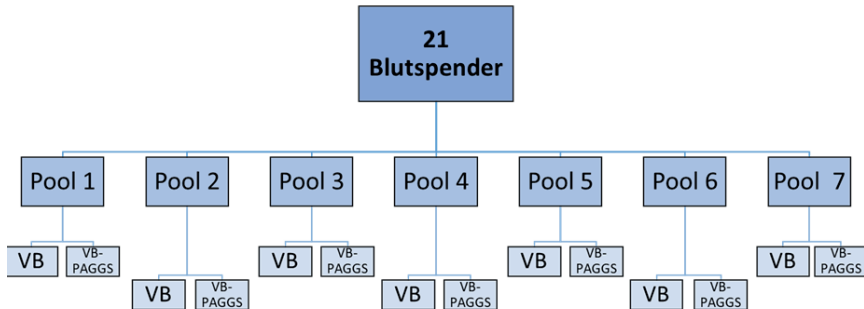


Abbildung 1: Graphische Darstellung der hierarchischen Probenaufbereitung der Blutprodukte. Abkürzungen: VB = Vollblut mit Citrat-Phosphat-Dextrose (CPD), VB-PAGGS = VB mit zusätzlichem/r Phosphat, Adenin, Glukose, Guanosin, Kochsalzlösung und Mannitol (PAGGS-M).

#### 3.1.3 Aufbewahrung der Transferbeutel und Probenentnahme

Die unterschiedlich konservierten, mit Vollblut gefüllten Transferbeutel wurden ab dem Zeitpunkt ihrer Herstellung, wie in Blutbanken üblich, vertikal in dafür vorgesehenen Vorrichtungen in einem Blutkonserven-Kühlschrank<sup>29</sup> aufbewahrt. Die Lagerungstemperatur betrug 4 °C, wobei eine konstante Temperatur durch eine elektronische Programm-basierte<sup>30</sup> Überwachung sichergestellt wurde.

Eine fünfmalige Invertierung der Transferbeutel alle zwei Tage stellte sicher, dass es zu keiner ausgeprägten Sedimentation der zellulären Blutbestandteile kam. Dies sicherte die Verfügbarkeit der mit dem Blut zugesetzten Nährstoffen für alle Zellen und verhinderte andererseits eine dauerhafte Kompartimentierung der Zellen. Eine Kompartimentierung hätte zu ungleichmäßigen Einflüssen auf die Zellen geführt.

Mittels einer Injektionsnadel (21 G) wurden aus den Entnahmesystemen unter sterilen Kautelen Blutproben für Analysen während der Lagerung entnommen, wobei sich die Zeitpunktangaben auf die Tage nach der Herstellung der Transferbeutel beziehen. Folgende Untersuchungen wurden im Verlauf der Tage, wie oben beschrieben (s. 3.1.1.3 Weitere Verarbeitung und Messung der Proben), durchgeführt:

<sup>29</sup> Kirsch BL-720, Philipp Kirsch GmbH, Willstätt-Sand, Deutschland

<sup>30</sup> Kirsch Datenet, Philipp Kirsch GmbH, Willstätt-Sand, Deutschland

### 3. Eigene Untersuchungen

Probenentnahme- Zeitpunkt (in Tagen)	0	1	3	5	10	15	21	28
<b>Parameter</b>								
Ammoniak	X	X	X	X	X	X	X	X
Blutgasanalyse	X	X	X	X	X	X	X	X
Hämatologische Untersuchung	X	X	X	X	X	X	X	X
Freies Hämoglobin	X	X	X	X	X	X	X	X
Klinische Chemie (s. u.)	X	X	X	X	X	X	X	X
Thrombozytenfunktion	X	X	X	X	X	X	X	X
Thrombelastographie	X	X	X	X	X	X	X	X
Sterilitätskontrolle	X		X	X		X		X
Asservierung Proben für vorliegende Arbeit	X	X	X	X	X	X	X	X

Tabelle 1: Durchgeführte Untersuchungen/Verrichtungen zu den jeweiligen Probenentnahmezeitpunkten.

Für die Sterilitätskontrolle wurde jeweils ein steriles Probengefäß<sup>31</sup> mit 0,5 ml des Vollblutes gefüllt.

Detaillierte Beschreibungen zu den einzelnen Verfahren sowie deren Ergebnisse finden sich in der vorangegangenen Dissertationsschrift. Im Folgenden soll ausschließlich auf die Testverfahren eingegangen werden, die für die vorliegende Arbeit verwendet wurden. Die hierfür asservierten citrierten Proben wurden nach einer doppelten Zentrifugation und Umfüllung in ein neues Probenröhrchen erst bei -30 °C eingefroren, bis sie nach spätestens 21 Tagen bei -80 °C bis zur Gerinnungsanalytik tiefgefroren wurden.

#### 3.1.4 Gerinnungsdiagnostik

Um eine globale Übersicht über die Gerinnungseigenschaften der Blutkonserven zu erhalten, wurden folgende Parameter aus den für die Gerinnungsanalytik asservierten Plasmaproben bestimmt:

1. (prokoagulatorische) Faktoren:
  - a. Faktor V (FV)
  - b. Faktor VII (FVII)
  - c. Faktor VIII (FVIII)
  - d. Faktor IX (FIX)
  - e. Faktor X (FX)
  - f. Fibrinogen (Fib)
  - g. Von-Willebrand-Faktor-Antigen (vWF-Ag)

<sup>31</sup> CryoPure 1,2 ml Röhrchen mit Außengewinde weiß, Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland

#### 2. Gerinnungsinhibitoren/Fibrinolyse

- a. Antithrombin (AT)
- b. Protein C (PC)
- c. Protein S (PS)
- d. D-Dimere (DDIM)

#### 3. Gerinnungszeiten:

- a. Prothrombinzeit (PT)
- b. Aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT)

#### 3.1.4.1 Vorbereitung der Proben

Für die Durchführung der Messungen wurden zunächst die bei -80 °C gelagerten citrierten Proben in einem Wasserbad<sup>32</sup> bei 37 °C gruppenweise (drei bis fünfzehn Proben) verflüssigt, um ein unvollständiges Auftauen des Kryopräzipitates zu vermeiden (287). Die maximale Lagerungsdauer entsprach hierbei ca. 22 Monaten und lag somit unter der Haltbarkeit von mindestens 39 Monaten für die Sentinelparameter PT, aPTT, Fib, AT, PC, PS, FVIII und DDIM, die unsere Arbeitsgruppe zuvor beschrieben hatte (285). Anschließend erfolgte eine Abtrennung nicht löslicher Stoffe vom Plasma mittels erneuter Zentrifugation bei 2418 g für fünfzehn Minuten, in Anlehnung an vorherige Vorgehensweisen in der Arbeitsgruppe (293). Zentrifugiert wurden die Proben mit einer Mikroliter Zentrifuge<sup>33</sup>. Die zentrifugierten Probenröhrchen wurden anschließend in in unserem Labor verwendeten Metallhülsen eingesetzt. Dies dient der Längenvergrößerung der Mikro-Probengefäße, was den Einsatz der kleineren Probengefäße im Vergleich zu den eigentlich vorgesehenen größeren humanmedizinischen Blutentnahmeröhrchen erlaubt. Anschließend wurden die Probengefäße mit den Metallhülsen an die entsprechenden Probenpositionen des Gerätes eingesetzt.

#### 3.1.4.2 STA Compact Max 3<sup>®</sup>

Für die Untersuchungen wurde ein automatisiertes Gerinnungsanalysegerät<sup>34</sup> verwendet, welches manuell lediglich mit dem für die Messungen benötigten Material (Kalibratoren, Qualitätskontrollen, Reagenzien, Patientenproben und Küvetten) bestückt werden muss. Hierfür stehen im Gerät jeweils feste Plätze zur Verfügung. Im Probenrack mit 96 Plätzen werden die zu messenden Proben untergebracht. Bei den Patientenproben handelt es sich hierbei standardmäßig um Citratplasma. Im Produktrack finden sich Kalibratoren, Qualitätskontrollen und Reagenzien. Die Messungen des Gerätes

---

<sup>32</sup> Wasserbad Typ 1012; LAUDA DR. R. WOBSE GmbH & CO. KG, Lauda-Königshofen, Deutschland

<sup>33</sup> Mikro 200 (REF 2400), Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland

<sup>34</sup> STA Compact Max 3<sup>®</sup>, DIAGNOSTICA STAGO S.A.S., Asnières sur Seine, Frankreich

### 3. Eigene Untersuchungen

---

laufen grundsätzlich in Einmalplastikküvetten<sup>35</sup> ab, die jeweils eine bewegliche Edelstahlkugel enthalten. Die Küvetten sind vor Benutzung in einer Spule im Gerät angeordnet. Die Küvettenspule fasst hierbei 1000 Küvetten. Von der Spule werden die Küvetten im Bereich der Küvetten-Ladestation mittels eines Shuttles zum Messblock (bestehend aus Inkubationszone mit sechzehn Plätzen und der Messzone mit vier Plätzen) verbracht. Von hier aus wird die Küvette mittels des Greifkopfes des Gerätes in die Inkubationszone verbracht, in der die Messung vorbereitet wird. Nach der entsprechenden Vorbereitung wird die Küvette durch den Greifarm zur Messzone bewegt. Nach der Messung findet eine Verbringung in den Küvettenabfallbehälter statt. Der STA Compact Max 3<sup>®</sup> verfügt über einen Pipettierkopf mit drei Nadeln. Die Nadeln haben jeweils unterschiedliche Aufgaben. Die Bestückung der Küvetten mit Probenmaterial und Reagenzien findet im Verlauf der Untersuchung je nach einprogrammierten Testprotokoll mittels bis zu drei dieser Nadeln statt. Nadel 1 dient der Pipettierung von zu messenden Proben (Kalibrator, Qualitätskontrolle und Patient) in die Küvetten, die zuvor in eine Inkubationsposition platziert wurden. Nadel 2 pipettiert Reagenzien, die vor dem ersten Inkubationsschritt in die Küvette gegeben werden. Inkubiert wird grundsätzlich bei 37 °C. Nadel 3 wiederum wird für die Reagenzien verwendet, die auf den ersten Inkubationsschritt folgend in die Küvette gegeben werden. Bei diesen handelt es sich meistens um die die Gerinnungsreaktion in Gang bringenden Substanzen. Reagenzien, die mit Nadel 3 pipettiert werden, können darüber hinaus vorgewärmt werden. Hierzu dient ein entsprechendes Heizelement. Zwischen den einzelnen Pipettierschritten werden die Nadeln automatisiert gereinigt (564).

Der STA Compact Max 3<sup>®</sup> verwendet zwei grundsätzliche Messmethoden, zum einen eine chronometrische und zum anderen eine photometrische Messmethode.

Bei der chronometrischen Messmethode wird die Edelstahlkugel, die in den Küvetten auf einer Leitbahn beweglich ist, auf dieser gleichbleibend oszillierend bewegt. Die Bewegung kommt hierbei durch zwei sich gegenüberliegende Spulen (Antriebsspulen), die ein paralleles, wechselndes elektromagnetisches Feld aufbauen und somit eine Kraft auf die Kugel ausüben, zustande. Die Stärke des Feldes ist abhängig von der während des Tests zu erwartenden Gerinnselfestigkeit. Die Auslenkung der Kugel wird durch ein System aus zwei weiteren, sich gegenüberliegende Spulen (Sende- und Empfängerspule), die orthogonal zu den Antriebsspulen angeordnet sind, erfasst. Das von der Sendespule ausgesendete elektromagnetische Feld wird je nach Position der Metallkugel unterschiedlich von der Empfängerspule detektiert. Dies ermöglicht die Bestimmung der Position der Kugel. Folglich lässt sich auf die Amplitude der Auslenkung und Gerinnungszeiten zurückschließen. Zu diesem Zweck wird ein entsprechender Algorithmus verwendet (564). Die Abstraktion der

---

<sup>35</sup> STA-Cuvettes (REF 38669), DIAGNOSTICA STAGO S.A.S., Asnières sur Seine, Frankreich

Gerinnungszeiten ist möglich, weil bei zunehmender Gerinnungsbildung im Rahmen der Gerinnungsreaktion die Amplitude der Kugelbewegung bei gleichbleibender äußerer Krafteinwirkung abnimmt. Die chronometrische Messung kann bei einem Füllvolumen der Küvette von 150 – 400 Mikroliter ( $\mu\text{l}$ ) durchgeführt werden (564).

Die photometrische Messung bestimmt die Konzentration bzw. den Gehalt der zu messenden Substanz über die Absorption von durch die zu testende Probe geleitetem monochromatischem Licht nach einer farbgebenden (kolorimetrischen) oder trübenden (immunologische) Reaktion. Die Absorption wird in diesem Zusammenhang auch als optische Dichte bezeichnet. Die Lichtquelle stellt im STA Compact Mac 3<sup>®</sup> eine zum Photometriemodul gehörende Wolfram-Halogen-Lampe dar. Um Licht einer definierten Wellenlänge (405 bzw. 540 Nanometer (nm) je nach Test) zu gewährleisten, werden bewegliche Filter verwendet. Das gefilterte Licht ( $I_0$ ) wird anschließend über einen Lichtleiter zur und durch die zu testende Probe im Bereich des Messkopfes geleitet. Die optische Dichte wird dann indirekt durch die Messung des durchgeleiteten (transmittierten) Lichtes bestimmt. Die Messung des transmittierten Lichtes erfolgt hierbei als Doppelmessung mit kurzem zeitlichen Versatz. Bei der ersten Messung findet eine Detektion des gesamten transmittierten Lichtes ( $I_1$ ) statt, welches sich nebst dem erzeugten, durch die Probe geleiteten Licht aus dem Licht etwaiger Störlichtquellen ( $I_p$ ) zusammensetzt. Bei der zweiten Messung wird das einfallende Licht unterbrochen, wodurch nur etwaige Störquellen gemessen werden. Die Differenz von  $I_1$  und  $I_p$  ergibt somit das tatsächlich transmittierte Licht ( $I$ ), welches eine Fraktion von  $I_0$  darstellt. Grundsätzlich wird das transmittierte über weitere Lichtleiter vom Messbereich zu einem Sensor der Photometrie-Messkarte geleitet und das Signal anschließend von einem Computer verarbeitet. Zum Photometriemodul gehört auch ein Referenzlichtleiter, der als Vergleichspunkt für die optischen Dichten dient. Die optische Dichte lässt sich anschließend als negativer dekadischer Logarithmus des Quotienten von  $I$  und  $I_0$ , wobei  $I_0$  den Divisor darstellt, herleiten. Das Analysegerät errechnet dann die Konzentration der chromogenen/trübenden Substanz mittels der vom Lambert Beer'schen Gesetzes beschriebenen Proportionalität aus der optischen Dichte. Dies erlaubt anschließend Rückschlüsse auf die Konzentration/den Gehalt des nachzuweisenden Moleküls. Die Untergrenze der Küvettenbefüllung liegt bei der photometrischen Messung bei 250  $\mu\text{l}$ , die Obergrenze bleibt bestehen (564).

#### **3.1.4.3 Vorbereitung der bisher nicht etablierten Tests**

Nebst den weiter unten beschriebenen (s. 3.1.4.5 Assays), in unserer Arbeitsgruppe bereits etablierten Tests wurden in der vorliegenden Dissertation auch in unserem Labor noch nicht verwendete Tests eingesetzt. Dabei handelte es sich um die Tests für FV, FVII, FIX, FX und vWF-Ag. Die Verwendung der Tests setzte eine Anpassung dieser voraus, insbesondere, weil keine speziesspezifischen Tests sowie

### 3. Eigene Untersuchungen

---

kein entsprechender Analyser zur Verfügung standen. Dies ist gerade im Falle von hämostatischen Untersuchungen von Bedeutung, da hier große Unterschiede in den Faktorenaktivität zwischen unterschiedlichen Spezies bestehen (142, 143, 565). Deshalb wurden initial jeweils Messungen des Hundepoolplasmas (s. 3.1.4.4 Qualitätskontrolle) mit den Standardeinstellungen der humanmedizinischen Tests durchgeführt. Da die Ergebnisse hierbei große Abweichungen von den erwarteten Werten der humanen normalen Qualitätskontrolle zeigten, wurde die Kalibrationskurve durch eine Kalibrationskurve abgeleitet von Verdünnungsstufen von Hundepoolplasma ersetzt. Unverdünntes Poolplasma stellte hierbei per Definition eine Aktivität von 100 % dar. Ziel war es, mit den gewählten Verdünnungsstufen einen möglichst linearen Zusammenhang zu erzeugen, wobei dies anhand der Graphen als auch dem jeweiligen Korrelationskoeffizienten (Zielwert : -1) beurteilt wurde. Die folgenden vier bis sechs Verdünnungsstufen wurden hierbei für die jeweiligen Tests verwendet:

FV :	1 :100, 1 :80, 1 :60, 1 :40
FVII :	1 :100, 1 :80, 1 :40, 1 :20
FIX :	1 :400, 1 :200, 1 :80, 1 :40, 1 :15, 1 :6
FX :	1 :80, 1 :40, 1 :20, 1 :10
vWF-Ag :	1 :6, 1 :3, 1 :2, Owren-Koller-Puffer <sup>36</sup>

Bei jedem Wechsel der Reagenziencharge wurde das Kalibrationsprotokoll mittels Hundepoolplasma und den oben genannten Verdünnungen erneut durchgeführt. Ebenso wurden alle bereits etablierten Tests, die auf Hundepoolplasma als Kalibrationsstandard beruhen, entsprechend den für sie festgelegten Verdünnungen vor den ersten Messungen und bei jedem Chargenwechsel analog kalibriert. Ersteres erfolgte auch, um etwaige Veränderungen des Poolplasmas während der Lagerung zu berücksichtigen.

#### 3.1.4.4 Qualitätskontrolle

An den Messtagen wurde für jeden Parameter Qualitätskontrollmaterial zu Zwecken der Qualitätskontrolle untersucht. Wenn die gemessenen Werte hierbei im Rahmen der festgelegten Grenzen lagen, erfolgten anschließend die Messungen der Studienproben. Für die Parameter, bei denen humanes Kalibrationsmaterial verwendet wurde, kamen die entsprechenden Qualitätskontrollen des Herstellers zum Einsatz. Zwei zu rekonstituierende gefriergetrocknete citrierte

---

<sup>36</sup> STA® - Owren-Koller, Owren-Koller-Puffer für Gerinnungstests (REF 00360), DIAGNOSTICA STAGO S.A.S, Asnières sur Seine, Frankreich

Humanplasmen<sup>37,38</sup> dienten hierbei als Qualitätskontrollmaterial für PT und aPTT sowie für Fib und AT. Die beiden Qualitätskontrollen stellten hierbei eine physiologische bzw. eine pathologische Kontrolle dar. Die Qualitätskontrolle der DDIM wurden mittels eines Sets mit einem normalen und einem anormalen Kontrollmaterial (gefriergetrocknete citrierte Humanplasmen<sup>39</sup>) durchgeführt. Als Qualitätskontrolle der mittels eines Hundepoolplasmakalibrationsstandards kalibrierten Assays (PC, PS, FV, FVII, FVIII, FIX, FX und vWF-Ag) dienten Aliquote desselben. Wie in zurückliegenden Veröffentlichungen unserer Arbeitsgruppe bereits beschrieben (293, 561), wurde ein unverdünntes Aliquot des in unserem Haus etablierten Plasmapools als Normkontrolle (N-Kontrolle) sowie ein 1 :2 mit steriler Kochsalzlösung verdünntes Aliquot als niedrige/pathologische Kontrolle (1 :2-Kontrolle) verwendet. Die Aliquote werden bis zur Analyse bei -80 °C Celsius gelagert. An jedem Messtag wurde jeweils mindestens eine der Qualitätskontrollen aus Hundepoolplasma gemessen.

#### 3.1.4.5 Assays

Im Folgenden sollen die Testprotokolle für die im Rahmen der Gerinnungsdiagnostik der Studie verwendeten Tests beschrieben werden. Die Abläufe liefen hierbei automatisiert im Analysegerät ab.

##### 3.1.4.5.1 Prothrombinzeit und aktivierte partielle Thromboplastinzeit

Für die Messung der PT und aPTT wurde jeweils ein vom Hersteller für jede Charge vorkalibriertes Reagens<sup>40,41</sup> verwendet, welches die Gerinnungszeiten nach dem chronometrischen Messprinzip bestimmt. Die Proben wurden hierbei zuvor unverdünnt in das Gerät eingesetzt (302, 566).

Für die Bestimmung der PT wurden zunächst 50 µl der Probe in die Küvette pipettiert und anschließend vier Minuten lang inkubiert, ehe 100 µl des vorgewärmten PT-Reagenzes<sup>40</sup> hinzugegeben wurden, um die Gerinnung zu aktivieren. Das PT-Reagens besteht hierbei aus einer Mischung zweier Reagenzien; einerseits einem gefriergetrockneten Thromboplastin, welchem zusätzlich ein Hemmstoff für Heparin zugesetzt ist. Das Ursprungsgewebe des Thromboplastins stellt hierbei Gehirngewebe von Kaninchen dar. Sowie andererseits aus einem Solvent, welches zur Rekalzifizierung des Citratplasmas Calcium enthält (302). Die anschließend detektierte Gerinnungszeit wurde in Sekunden reportiert, wobei eine

---

<sup>37</sup> STA® - Quali-Clot I, Normales Kontrollplasma zur Bestimmung von Gerinnungsparametern (REF 00982), DIAGNOSTICA STAGO S.A.S, Asnières sur Seine, Frankreich

<sup>38</sup> STA® - Quali-Clot II, Anormales Kontrollplasma zur Bestimmung von Gerinnungsparametern (REF 00988), DIAGNOSTICA STAGO S.A.S, Asnières sur Seine, Frankreich

<sup>39</sup> STA® - Liatest® Control N+P, Kontrollplasmen für die immunologischen Trübungstests (REF 00526),

DIAGNOSTICA STAGO S.A.S., Asnières sur Seine, Frankreich

<sup>40</sup> STA® - NeoPTimal 5. Bestimmung der Prothrombinzeit (REF 01163), DIAGNOSTICA STAGO S.A.S., Asnières sur Seine, Frankreich

<sup>41</sup> STA® - C.K. Prest® 5. Bestimmung der Kaolin-aktivierten partiellen Thromboplastinzeit (APTT) (REF 00597), DIAGNOSTICA STAGO S.A.S., Asnières sur Seine, Frankreich

### 3. Eigene Untersuchungen

---

Mindestmesszeit von drei Sekunden bis zu einer maximalen Messzeit von neunzig Sekunden festgelegt war.

Die Messung der aPTT (308, 567) startete mit der Vorlage von 50 µl Probenmaterial in die Küvette, gefolgt von 50 µl des aPTT-Reagenzes<sup>41</sup>. Das aPTT-Reagenz besteht wie das PT-Reagenz aus zwei gemischten Reagenzien. Eines der Reagenzien enthält ein gefriergetrocknetes Phospholipid (Cephalin), das ebenso wie das weiter oben erwähnte Thromboplastin (s. 2.2.2.1 Screeningtests) aus Hirngewebe von Kaninchen extrahiert wird (566). Es dient dem Ersatz einer Thrombozytensuspension, welche schwierig konstant herzustellen ist (568). Das zweite Reagenz enthält Kaolin in einer Konzentration von fünf Milligramm pro Milliliter, welches Faktor XII (FXII) aktiviert (566). Die anschließende Rekalzifikation mittels 50 µl einer vorgewärmten Calcium-Lösung<sup>42</sup> aktivierte die Gerinnung, die anschließend detektiert wurde (minimale Messzeit sechs Sekunden, maximale Messzeit drei Minuten). Auch hier wurde das Ergebnis in Sekunden reportiert.

Sowohl in das Reagenzienbehältnis des PT- als auch des aPTT-Reagenzes wurde jeweils ein Magnetrührer<sup>43,44</sup> eingelegt.

#### 3.1.4.5.2 Gerinnungsfaktoren (Faktor V, Faktor VII, Faktor VIII, Faktor IX, Faktor X)

Für die Messung von FV, FVII, FVIII, FIX und FX wurde jeweils ein gefriergetrocknetes humanes Plasma, aus dem jeweils der zu messende Faktor entfernt wurde (Mangelplasma), verwendet<sup>45,46,47,48,49</sup>. Alle anderen für die Tests relevanten Faktoren sind in diesen Plasmen jeweils im Überschuss vorhanden. Somit hängt die Geschwindigkeit der Gerinnungsreaktion nur von der über die Patientenprobe zugesetzten Faktorenaktivität ab (569–571). Die Messung erfolgte dann nach dem chronometrischen Messprinzip, wobei je nach Zuordnung des Faktors zum extrinsischen bzw. gemeinsamen (FV, FVII, FX) oder intrinsischen (FVIII, FIX) Gerinnungssystem, die Gerinnungsreaktion durch das verwendete PT bzw. aPTT-Reagenz<sup>40,41</sup> (s. 3.1.4.5.1 Prothrombinzeit und aktivierte partielle Thromboplastinzeit) ausgelöst

---

<sup>42</sup> STA® - CaCl<sub>2</sub> 0.025 M, CaCl<sub>2</sub> 0.025 M Lösung für Gerinnungstests (REF 00367), DIAGNOSTICA STAGO S.A.S., Asnières sur Seine, Frankreich

<sup>43</sup> Weißer Magnetrührer (REF 27425), DIAGNOSTICA STAGO S.A.S., Asnières sur Seine, Frankreich

<sup>44</sup> Roter Magnetrührer (REF 26674), DIAGNOSTICA STAGO S.A.S., Asnières sur Seine, Frankreich

<sup>45</sup> STA® - Deficient V. Substratplasma für die quantitative Bestimmung von Faktor V (REF 00744), DIAGNOSTICA STAGO S.A.S., Asnières sur Seine, Frankreich

<sup>46</sup> STA® - Deficient VII. Immunadsorbiertes Plasma für die quantitative Bestimmung von Faktor VII (REF 00743), DIAGNOSTICA STAGO S.A.S., Asnières sur Seine, Frankreich

<sup>47</sup> STA® - Deficient VIII. Immunadsorbiertes Plasma für die quantitative Bestimmung von Faktor VIII (REF 00725), DIAGNOSTICA STAGO S.A.S., Asnières sur Seine, Frankreich

<sup>48</sup> STA® - ImmunoDef IX. Immunadsorbiertes Plasma für die quantitative Bestimmung von Faktor IX (REF 00734), DIAGNOSTICA STAGO S.A.S., Asnières sur Seine, Frankreich

<sup>49</sup> STA® - Deficient X. Immunadsorbiertes Plasma für die quantitative Bestimmung von Faktor X (REF 00738), DIAGNOSTICA STAGO S.A.S., Asnières sur Seine, Frankreich

### 3. Eigene Untersuchungen

---

wird. Grundsätzlich werden die Proben für diese Tests unverdünnt in das Gerät eingesetzt (572–576). Die Ergebnisse wurden als Prozentwerte in Bezug zum unverdünnten Hundepoolplasma (100 %) angegeben.

Für die Bestimmung der FV-Aktivität wurden entsprechend des von uns festgelegten Testprotokolls, vom automatisierten Gerinnungsanalysegerät 1,25 µl der Probe mit 48,75 µl Owren-Koller-Puffer<sup>36</sup> versetzt (1 :40 Verdünnung). Dem 50 µl Proben-Puffer-Gemisch wurden anschließend 50 µl des Mangelplasmas<sup>45</sup> zugesetzt. Daraufhin wurde die Probe für vier Minuten inkubiert. Zum Starten der Gerinnungsreaktion wurden zu dem inkubierten Gemisch dann 100 µl des auf 37 °C vorgewärmten PT-Reagenzes<sup>40</sup> pipettiert. Danach schloss sich die Detektion der Gerinnungszeit an. Hierbei wurde eine Zeitspanne von zehn Sekunden (minimale Messzeit) bis drei Minuten (maximale Messzeit) als Zeitraum der Messung definiert. Bei Aktivitäten kleiner als 10 % Faktoraktivität im Vergleich zum unverdünnten Hundepoolplasma, erfolgte eine erneute Messung bei reduzierter Verdünnung (1 :3). Bei Aktivitäten über 200 % wurde eine Wiederholungsmessung initialisiert.

Die Bestimmung der FVII-Aktivität startete mit der Verdünnung von 2,5 µl der Probe mit 47,5 µl Owren-Koller-Puffer<sup>36</sup> (1 :20 Verdünnung). Anschließend wurden dem 50 µl Proben-Puffer-Gemisch 50 µl des Mangelplasmas<sup>46</sup> hinzu pipettiert. Es schloss sich eine vierminütige Inkubationszeit an. Der Start der Gerinnungsreaktion wurde durch Zugabe von 100 µl des auf 37 °C vorgewärmten PT-Reagenzes<sup>40</sup> ausgelöst. Danach erfolgte die Detektion der Gerinnungszeit. Die Messzeitspanne wurde von zehn Sekunden (minimale Messzeit) bis sechs Minuten (maximale Messzeit) festgelegt. Bei Aktivitäten kleiner als 15 % Faktoraktivität in Bezug zum unverdünnten Hundepoolplasma, erfolgte eine erneute Messung bei niedrigerer Verdünnung (1 :5). Bei Aktivitäten über 150 % wurde eine Wiederholungsmessung mit höherer Verdünnung (1 :40) durchgeführt.

Die Messung der FVIII-Aktivität erfolgte analog zu dem zuvor in unserer Arbeitsgruppe beschriebenen Verfahren (modifizierte „one-stage aPTT“) (293). Zweck war es, wie bei den anderen Faktorentests mit hohen Ausgangsverdünnungen etabliert, der Beeinflussung der humanmedizinischen Koagulationstests durch die hohen FV- und FVIII-Aktivitäten des kaninen Plasmas entgegenzuwirken (143). Die vornehmliche Abwandlung bestand hier in der Verwendung der entsprechenden Nachfolgereagenzien. Wie bereits beschrieben, wurde zunächst eine hohe Verdünnung (1 :40) des zu messenden Plasmas durchgeführt, die sich aus der Mischung von 1,25 µl der Probe mit 48,75 µl Puffer<sup>36</sup> ergab. Zu dem Gemisch wurden anschließend 50 µl des Mangelplasmas<sup>47</sup> sowie 50 µl des aPTT-Reagenzes<sup>41</sup> hinzugefügt. Daraufhin folgte eine vierminütige Inkubationsperiode, ehe die Gerinnung mit 50 µl einer Calcium-Lösung<sup>42</sup> aktiviert wurde. Die minimale und maximale Messzeit für die Gerinnungsreaktion lagen bei zwanzig Sekunden bzw. zehn Minuten. Automatisierte

### 3. Eigene Untersuchungen

---

Wiederholungsmessungen erfolgten bei weniger als 10 % (1 :10 Verdünnung) und mehr als 150 % (1:60 Verdünnung) Referenzaktivität.

Zu Beginn der FIX-Aktivitätsbestimmung wurden 5 µl Probenmaterial mit 45 µl Owren-Koller-Puffer<sup>36</sup> versetzt (1 :10 Verdünnung). Danach wurden analog zu den vorher beschriebenen Faktoranalysen 50 µl des entsprechenden Mangelplasmas<sup>48</sup> in die Küvette pipettiert. Nach dem Mangelplasma wurden, wie bei der FVIII-Bestimmung, 50 µl des aPTT-Reagenzes<sup>41</sup> hinzugegeben und nach der vierminütigen Inkubationsperiode die Gerinnungsreaktion mit 50 µl Calcium-Lösung<sup>42</sup> gestartet. Die anschließende Periode für die Erfassung valider Ergebnisse umfasste eine minimale Messzeit von zwanzig Sekunden sowie eine maximale Messzeit von drei Minuten und zwanzig Sekunden. Wenn sich eine Aktivität von weniger als 3,3 % ergab, wurde die Messung mit einer 1 :2-Verdünnung wiederholt, entsprechend wurde bei einer Aktivität von mehr als 150 % die Messung mit einer 1 :40-Verdünnung erneut durchgeführt.

Die FX-Messung wurde mit einer 1 :10-Verdünnung (5 µl Probenmaterial und 45 µl Owren-Koller-Puffer<sup>36</sup>) des Probenplasmas gestartet. Zu dieser Verdünnung pipettierte der Analyzer 50 µl des entsprechenden Reagenzes für die FX-Bestimmung<sup>49</sup>, gefolgt von 100 µl vorgewärmter PT-Reagenz<sup>40</sup>, nach einer vierminütigen Inkubationsphase. Der Ablauf der Gerinnungsreaktion wurde anschließend detektiert, wobei die minimale Messzeit zehn Sekunden und die maximale Messzeit drei Minuten betrug. Bei einer Aktivität von weniger als 10 % im Vergleich zum unverdünnten Hundepoolplasma oder mehr als 150 % erfolgte eine erneute Bestimmung mit einer 1 :5 bzw. 1 :40 Verdünnung.

#### 3.1.4.5.3 Protein C und Protein S

Die Messung von PC und PS erfolgte mit geringfügigen Abwandlungen im Testablauf im Vergleich zu den Faktoren chromometrisch. Auch hier wurde das verwendete Hundepoolplasma im unverdünnten Zustand als 100 % Aktivität festgelegt und die Tests wie oben beschrieben (s. 3.1.4.3 Vorbereitung der bisher nicht etablierten Tests) mit diesem kalibriert. Darüber hinaus wurden auch die Proben für die Bestimmung von PC und PS unverdünnt in das Gerät eingesetzt.

Die Messung von PC erfolgte in Anlehnung an das bereits zuvor verwendete Prozedere (293), wobei auch hier unter anderem das Nachfolgereagenz<sup>50</sup> verwendet wurde. Der Test verwendet ein gefriergetrocknetes humanes Mangelplasma, welches kein PC mehr enthält. Dementsprechend ist der Gehalt im Testsystem nach Rekonstitution und Zugabe des Testmaterials nur durch den PC-Gehalt der zu messenden Probe bestimmt. Die Aktivierung des PC durch einen Auszug des Giftes einer

---

<sup>50</sup> STA® - Staclo® Protein C 1. Quantitative Bestimmung der Protein C-Aktivität (REF 00747), DIAGNOSTICA STAGO S.A.S., Asnières sur Seine, Frankreich

### 3. Eigene Untersuchungen

---

Giftschlange (*Agkistrodon contortrix contortrix* (Südlicher Kupferkopf)) bedingt dann die proportionale Spaltung von FV und FVIII. Der Abbau der Faktoren führt zu einer Beeinflussung der intrinsischen Gerinnung mit Verlängerung der Gerinnungszeit im aPTT-Assay (293, 577). Anhand der Kalibrationskurve kann dann, wie zuvor beschrieben, auf die Aktivität von PC zurückgeschlossen werden. Das Testprotokoll lief wie folgt ab: 10 µl der Probe wurden mit 40 µl Owren-Koller-Puffer<sup>36</sup> verdünnt (1 :5 Verdünnung). Dann wurden nacheinander 50 µl des Mangelplasmas (Reagenz 1) sowie 50 µl des PC-Aktivators (Reagenz 2) in die Küvette pipettiert. Die beiden Reagenzien sind gefriergetrocknet und müssen vor dem Einsetzen ins Gerät rekonstituiert werden (577). Auf den letzten Pipettierschritt folgte eine dreiminütige Inkubationsphase, ehe die Gerinnung durch die Zugabe von 50 µl einer vorgewärmten, Calcium-haltigen Lösung<sup>42</sup> aktiviert wurde. Die minimale und maximale Messzeit wurden auf zehn Sekunden bzw. vier Minuten und zehn Sekunden festgesetzt. Bei weniger als 15 % der Referenzaktivität wurde die Messung mit einer 1 :2-Verdünnung sowie bei mehr als 150 % mit einer 1 :20-Verdünnung wiederholt.

Auch für PS wurde sich an dem Testprotokoll orientiert, dass zuvor in unserem Labor etabliert wurde (293). Anpassungen fanden mit der Nutzung des Nachfolgereagenzes<sup>51</sup> und der Veränderung des Wiederholungsprotokolls statt. Die Bestimmung des PS basierte erneut auf dem Einsatz eines entsprechenden humanen Mangelplasmas, mit dem die verdünnte Probe versetzt wird. Das somit nur vom Gehalt der Patientenprobe abhängige PS aktiviert zugesetztes humanes PC, welches eine Reaktion entsprechend der Beschreibung beim PC-Test hervorruft. Jedoch stammte hier der aktivierte FV aus einem Rinderplasma und lag somit im Überschuss vor (293, 578, 579). Der Testablauf begann mit der Verdünnung von 10 µl der zu messenden Probe mit 40 µl Puffer-Lösung (1 :5-Verdünnung). Daraufhin wurden 50 µl Mangelplasma ohne PS (Reagenz 1), 50 µl aktiviertes PC (Reagenz 2) gefolgt von 50 µl aktiviertem FV (Reagenz 3) in die Küvette hinzu pipettiert. Die drei Reagenzien sind gefriergetrocknet und müssen vor dem Einsetzen ins Gerät rekonstituiert werden (578). Es schloss sich eine vierminütige Inkubationsphase, gefolgt von der Zugabe von 50 µl Calciumchlorid<sup>42</sup> an. Die Gerinnungszeit wurde detektiert und die daraus abzuleitende Aktivität wie im PC-Assay bestimmt. Minimale und maximale Messzeit ebenso wie die Wiederholungsgrenzen und die ihnen zugeordneten Verdünnungen waren identisch mit dem PC-Test.

---

<sup>51</sup> STA® - Staclot® Protein S. Quantitative Bestimmung der Protein S-Aktivität (REF 00746), DIAGNOSTICA STAGO S.A.S., Asnières sur Seine, Frankreich

#### 3.1.4.5.4 Fibrinogen

Die Bestimmung der Fibrinogen-Konzentration erfolgte mittels einer chromometrischen Messmethode (Claus-Methode). Der Test beruht auf der Zufuhr von humanem Thrombin (aktivierter Faktor II) mit Calciumzusatz in großer Menge. Die Fibrinogen-Konzentration kann dann aus der Gerinnungsdauer abgeleitet werden, da ein direkter Zusammenhang besteht (324, 580). Die Kalibration des Assays wurde hierbei mit einem vom Hersteller des Tests<sup>52</sup> produzierten humanen Kalibrator<sup>53</sup> durchgeführt. Die Proben werden für diesen Assay unverdünnt in das Gerät eingesetzt. Für den Test wurden 7,5 µl Probenmaterial mit 142,5 µl Owren-Koller-Puffer<sup>36</sup> in die Küvette pipettiert (1 :20-Verdünnung) und anschließend für vier Minuten inkubiert. Dann erfolgte die Zugabe von 50 µl des Reagenzes. Die Gerinnungsdauer wurde detektiert, wobei die minimale Messzeit bei drei Sekunden, die maximale Messzeit bei einer Minute und zehn Sekunden lag. Die Ergebnisse wurden nach Vergleich mit der Kalibrationskurve in Gramm pro Liter (g/l) angegeben. Bei weniger als 1 g/l erfolgte eine erneute Bestimmung mit einer Ausgangsverdünnung der Probe von 1 :8 sowie bei mehr als 8 g/l mit 1 :40.

#### 3.1.4.5.5 Antithrombin

Die Messung des Antithrombins erfolgte ebenso wie die des Fibrinogens mittels eines mit einem humanen Kalibrator<sup>53</sup> kalibrierten Tests<sup>54</sup> und wurde bereits zuvor in unserer Arbeitsgruppe verwendet (293). Die verwendete Methode ist hierbei eine kolorimetrische Photometrie, wobei mit Licht der Wellenlänge 405 nm gemessen wird. Die Messung wird mittels der synthetischen chromogenen Substratmethode (581) durchgeführt. Bei dieser wird ein Peptid mit angehängtem Farbstoff (chromogenes Substrat) enzymatisch durch Thrombin gespalten. Als freigesetzter Farbstoff dient hier *p-Nitroanilin*. Da jedoch das dem zu testenden Plasma im Überschuss zugesetzte Thrombin durch das AT im Plasma gehemmt wird, da auch Heparin zugesetzt wird, besteht eine Antiproportionalität der AT-Aktivität der Probe zu der Konzentration des Farbstoffs. Das verwendete Thrombin wird vom Rind gewonnen (581, 582). Die ausgeprägte Aktivitätssteigerung des AT durch Heparin führt zu einer Erhöhung der Spezifität des Assays, da der Effekt anderer plasmatischer Inhibitoren hierdurch in den Hintergrund rückt (340). Die Verwendung von Thrombins bovinen Ursprung verringert die Empfindlichkeit des Assays gegenüber dem ebenfalls Heparin-beeinflussten Heparin Cofaktor II im Vergleich zum Einsatz von humanem Thrombin in humanmedizinischen Proben (340, 583). Der Testablauf war wie folgt festgelegt. Zunächst wurde eine 1 :20-Verdünnung der Probe in der Küvette

---

<sup>52</sup> STA® - Liquid Fib. Quantitative Fibrinogen-Bestimmung nach Claus (REF 00673), DIAGNOSTICA STAGO S.A.S., Asnières sur Seine, Frankreich

<sup>53</sup> STA® - Unicalibrator, Kalibrationsplasma für Gerinnungstests (REF 00675), DIAGNOSTICA STAGO S.A.S., Asnières sur Seine, Frankreich

<sup>54</sup> STA® - Stachrom® AT III 3. Kolorimetrische Bestimmung von Antithrombin (REF 00596), DIAGNOSTICA STAGO S.A.S., Asnières sur Seine, Frankreich

### 3. Eigene Untersuchungen

---

angelegt (5 µl unverdünnt eingesetzte Probe und 95 µl Owren-Koller-Puffer<sup>56</sup>), dann wurden 100 µl des im Lösungsmittel mit Zusatz von Heparin gelösten Thrombins (Reagenz 1 + 3) hinzugegeben und die Mischung eine Minute und zwanzig Sekunden inkubiert. Auf die Inkubation folgend wurden 100 µl der vorgewärmten farbgebenden Substanz (Reagenz 2) hinzu pipettiert. Die Messung erfolgte dann zwischen zehn und vierzig Sekunden nach der Zugabe von Reagenz 2. Bei Aktivitäten über 120 % erfolgte eine Wiederholungsmessung bei einer Ausgangsverdünnung von 1 :40.

#### 3.1.4.5.6 D-Dimere und von-Willebrand-Faktor-Antigen

Beide Tests verwenden die immuno-turbidimetrische Photometrie. Der Test für die Bestimmung der DDIM<sup>55</sup> ist bereits vom Hersteller vorkalibriert (584), wohingegen der Test auf vWF-Ag<sup>56</sup>, wie oben beschrieben, mit Hundepoolplasma kalibriert wurde. Die Proben wurden jeweils, wie vom Hersteller angegeben, unverdünnt in das Gerät eingesetzt (584, 585).

Zunächst soll eine Beschreibung des DDIM-Tests erfolgen. Der Vorgänger Test des verwendeten Assays auf DDIM wurde in unserer Arbeitsgruppe in einer Vergleichsstudie verwendet (292). In der zuvor genannten Studie wurde der Test exakt nach den Vorgaben seiner Beschreibung in einer humanmedizinischen Arbeit (586) eingesetzt. Die Anpassung der neuen Testvariante<sup>55</sup> besteht lediglich in Anpassungen der Verhinderung von Kreuzreaktivitäten (s. u.), die eine Verbesserung der Spezifität bedingen (584, 587), weshalb eine ausreichende Vergleichbarkeit gegeben war. Das Testsystem beruht auf zwei Schritten: Zunächst wird die unverdünnte Probe für ein entsprechendes Reaktionsmilieu mit *Tris(hydroxymethyl)aminomethan* (Reagenz 1) als Puffer versetzt. Der Puffer enthält hierbei einen Inhaltsstoff, der Kreuzreaktivitäten mit Antikörpern in der zu testenden Probe reduziert (584). Die eigentliche Reaktion wird dann über eine Suspension von Latexpartikeln in Rinderalbumin ausgelöst. An die Latexpartikel mit einem Durchmesser von 0,08 bis 0,12 µm sind monoklonale Anti-Human-Antikörper murinen Ursprungs gegen DDIM-Epitope gebunden. Verwendet werden hierbei zwei verschiedene sich ergänzende Antikörper. Die sich bildenden Immunkomplexe führen zu einer reduzierten Transmission, welche vom Analyzer mit Licht einer Wellenlänge von 540 nm gemessen wird. Wobei die Lichtundurchlässigkeit des Mediums proportional zum DDIM-Gehalt ist. Die Ergebnisse werden in Fibrinogen-äquivalenten Einheiten (FEU) reportiert (292, 584, 586). Die aus einer ein Milligramm pro Liter (mg/L) Fibrinogen-Lösung hervorgehende Menge an Fibrin-Spaltprodukten entspricht hierbei einem Mikrogramm FEU pro Milliliter (µg FEU/ml) (292). Der Ablauf des Tests

---

<sup>55</sup> STA® - Liatest®D-Di PLUS. Immunturbidimetrische Bestimmung von D-Dimer (REF 00662), DIAGNOSTICA STAGO S.A.S., Asnières sur Seine, Frankreich

<sup>56</sup> STA®-Liatest® VWF:Ag. Immunturbidimetrische Bestimmung des von Willebrand Faktors (REF 00518), DIAGNOSTICA STAGO S.A.S., Asnières sur Seine, Frankreich

erfolgte im Analysegerät genauso wie zuvor beschrieben (586): 50 µl der Probe wurden mit 100 µl des Puffers in eine Küvette pipettiert und anschließend für vier Minuten inkubiert, ehe 150 µl der Latex-haltigen Suspension zugeben wurden. Die photometrische Messung erfolgte dann zwischen zwölf Sekunden und zwei Minuten und zwanzig Sekunden nach dem Auslösen der Reaktion. Bei Werten über 4 µg FEU/ml wurde die Probe mit einer Ausgangsverdünnung von 1 :5 erneut gemessen.

Die Messung des vWF-Ag weist viele Ähnlichkeiten zu der Bestimmung der DDIM auf. Auch der Test für die quantitative Bestimmung des vorgenannten Antigens<sup>56</sup> verwendet Latex-Teilchen, die in einem Rinderalbumin-haltigen Medium suspendiert sind (Reagenz 2). Jedoch wird dieses zusätzlich mit einer Lösung mit Glycin (Reagenz 3) verdünnt. Auch wird hier ein anderer Glycin-haltiger Puffer (Reagenz 1) verwendet. Die verwendeten Antikörper sind Anti-Human-Antikörper leprinen Ursprungs. Die Messung der veränderten Lichtleitung erfolgt analog zur Messung der DDIM (585). Das Testprotokoll wurde wie folgt durchgeführt. Zunächst wurde die Probe in der Küvette 1 :2 verdünnt (25 µl Probe und 25 µl Puffer<sup>36</sup>). Dann erfolgte die Zugabe von 100 µl Reagenz 1 mit einer sich anschließenden vierminütigen Inkubation. Daraufhin wurde mit 150 µl einer Mischung aus Reagenz 2 und 3 die Messreaktion gestartet. Die photometrische Messung erfolgte zwischen zwölf Sekunden und vier Minuten und zwanzig Sekunden nach dem Auslösen der Reaktion. Bei Aktivitäten von weniger als 10 % der Aktivität des Hundepoolplasmas wurde die Probe ohne eine Vorverdünnung erneut gemessen. Bei mehr als 105 % Aktivität erfolgte eine 1 :8-Verdünnung.

#### **3.1.4.6 Inter-Assay Variabilität**

Die Inter-Assay Variabilität, die im Rahmen einer Langzeit Replikationsstudie bestimmt wird, ist ein Präzisionsmaß der Messungen. Folglich gibt sie Auskunft über den zufälligen Fehler der Messungen (Reproduzierbarkeit eines Messergebnisses) und macht Aussagen über die Performance eines Assays über mehrere Messtage (255, 588, 589). Dies bildet den Ablauf in einem Diagnostiklabor nach. Im Gegensatz hierzu wird die Intra-Assay Variabilität (Kurzzeit Replikationsstudie) über Wiederholungsmessungen während eines Arbeitszyklus bestimmt. Für die Datengenerierung der Inter-Assay Variabilität werden mindestens zwanzig Messungen über mindestens fünf Tage empfohlen. Die Streuung wird dann aus diesen Daten als Standardabweichung in der entsprechenden Maßeinheit oder Variationskoeffizient (CV) in Prozent ohne Maßeinheit (Formel s. 3.1.5 Statistische Analyse) ausgedrückt. Aus der Inter-Assay Variabilität und dem Bias lässt sich sodann der absolut beobachtete Gesamtfehler ( $TE_{obs}$ ) berechnen (255). Die Formel für den von den spezifischen Gegebenheiten (auch Höhe des Messwertes) abhängigen  $TE_{obs}$  lautet hierbei wie folgt:

### 3. Eigene Untersuchungen

---

$$TE_{obs}(in\ %) = 2 * CV (in\ %) + |Bias|/(in\ %)$$

oder

$$TE_{obs}(in\ Einheit\ der\ Messung) = 2 * SD (in\ Einheit\ der\ Messung) + |Bias| / (in\ Einheit\ der\ Messung)$$

$TE_{obs}$  = absolut beobachteter Gesamtfehler;  $CV$  = coefficient of variation;  $SD$  = Standardabweichung

Wobei der Bias als Maß für den systematischen Fehler (Ungenauigkeit) verwendet wird. Der Bias gibt die Abweichung der Messung zu dem Ergebnis einer Vergleichsmessung an und kann hierbei konstant und/oder proportional sein. Neben der Möglichkeit des Vergleiches zu einer Standardmethode kann ein Vergleich zum Zielwert einer Qualitätskontrolle oder eine Wiederfindungsstudie durchgeführt werden (255, 588). In der vorliegenden Studie wurde auf die Bestimmung des Bias verzichtet, da wie oben (s. 3.1.4.3 Vorbereitung der bisher nicht etablierten Tests) und unten beschrieben, weder kommerzielle Qualitätskontrollen oder Kalibratoren noch eine entsprechende Referenzmethode zur Verfügung standen. Zudem wurden alle Messungen mit demselben Assay durchgeführt, wodurch sich insbesondere ein konstanter Bias nicht ausgewirkt hätte.

Nach der Berechnung des  $TE_{obs}$  kann dieser, ebenso wie die zuvor berechneten Parameter, mit dem zulässigen absoluten Gesamtfehler ( $TE_a$ ) verglichen werden (588). Dieser stellt einen Grenzwert für den/die maximal zu tolerierenden Fehler/tolerierende Variation einer Messung für einen sinnvollen klinischen Einsatz dar (590). Die Festlegung kann auf verschiedene Arten erfolgen (Expertenmeinung, Ableitung von klinischen Entscheidungsgrenzen oder der biologischen Variation) (255, 590). Als Richtwert für den Bezug der Inter-Assay Variabilität zum  $TE_a$  gilt  $SD < 0,33 * TE_a$  (255).

Für die PT und aPTT sowie für Fib, AT, PC, PS, FVIII und DDIM wurden in unserer Arbeitsgruppe bereits Inter (561) - und, mit Ausnahme von Fib, Intra-Assay (292, 293) - Variabilitäten bei vergleichbaren Tests unter der Verwendung des Vorgängergerätes des verwendeten Analysegerätes bei Hundeplasma beschrieben. Darüber hinaus wurden Intra- und Inter-Assay Variabilitäten für das Vorgängergerät bei Katzenproben unter Verwendung der in der vorliegenden Studie eingesetzten Tests für aPTT, AT, PC, PS, FVIII und DDIM bestimmt (591). Jedoch fehlten entsprechende Untersuchungen aufgrund der Neuetablierung der Parameter im Rahmen der Studie für FV, FVII, FIX, FX und vWF-Ag. Deshalb erfolgte die Berechnung des CV als Ausdruck der Inter-Assay Variabilität im normalen (N-Kontrolle) als auch im niedrigen/pathologischen (1 :2-Kontrolle) Messbereich anhand der verfügbaren Messwerte der täglichen Kontrollen der Messtage. Für die Verwendung der Qualitätskontrollen zur Berechnung der Inter-Assay Variabilität wurde sich aus zwei Gründen entschieden. Zum einen wurden somit zusätzliche Messungen und folglich Kosten gespart. Zum anderen gibt es kein kommerziell verfügbares kanines

### 3. Eigene Untersuchungen

---

Kontrollmaterial oder Kalibratoren für die oben genannten Testsysteme, welche alternativ hätten verwendet werden können. Schlussendlich hätte entsprechend per se auf weitere gepoolte Patientenproben zurückgegriffen werden müssen. Allerdings ist eine konstante Versorgung mit ausreichenden Mengen Probenmaterial von gesunden Tieren, abgesehen vom vorhandenen Pool, schwierig zu realisieren. Daher wurde entgegen der Empfehlung, keine gleichen Chargen von Kalibrator und Qualitätskontrollen zu verwenden (255), das Poolplasma sowohl zu Kalibrations-, Qualitätskontrollzwecken als auch zur Bestimmung des CVs verwendet.

Die Messungen der Kontrollen erfolgten hierbei ebenso wie die Untersuchung der Studienproben überwiegend durch eine technische Mitarbeiterin des Zentrallabors der Klinik für Kleintiere – Innere Medizin.

#### 3.1.5 Statistische Analyse

Die Messwerte der Gerinnungsanalytik des STA Compact Max 3<sup>®</sup> wurden im Falle der Standardparameter des Labors automatisiert und im Fall der neu etablierten Parameter (s. 3.1.4.3 Vorbereitung der bisher nicht etablierten Tests) händisch in das Laborinformationssystem LabMan<sup>®57</sup> übertragen. Aus diesem erfolgte im Nachhinein eine Exportierung der Daten in tabellarischer Form mittels eines entsprechenden Zusatzprogramms<sup>58</sup>. Die Bearbeitung der Datentabelle fand dann manuell in Microsoft<sup>®</sup> Excel<sup>®59</sup> statt. Hier wurden die Proben nach Zugehörigkeit zum jeweiligen Pool, zu den beiden Gruppen VB und VB-PAGGS sowie zum Entnahmezeitpunkt der Proben sortiert. Anschließend wurden Ausreißer mittels Sortierung der Daten nach Höhe der Werte bestimmt und diese mit den Rohdaten des Systems verglichen. Etwaige Fehlübertragungen wurden in diesem Rahmen korrigiert, ebenso wie die absoluten Werte der DDIM-Messungen unterhalb des in unserem Labor festgelegten Cut-offs im niedrigen Bereich ( $< 0,27 \mu\text{g FEU/ml}$ ) eingefügt. So konnten die realen Ausreißer bestimmt werden. Bei fehlenden Werten wurde ebenso in den Rohdaten des Gerätes kontrolliert, ob es zu Übertragungsfehlern gekommen war und aufzufindende Werte nachgetragen. Während der Datendurchsicht wurde in diesem Zusammenhang festgestellt, dass drei der asservierten Proben fehlten. Hierbei handelte es sich um die Proben des VB- und VB-PAGGS-Beutels von Tag zehn des dritten Pools sowie die Probe des VB-PAGGS-Beutels von Tag null (Tag der Einlagerung) des ersten Pools. Darüber hinaus konnten aufgrund einer zu geringen Plasmamenge an Tag zehn im VB-Transferbeutel des vierten Pools die folgenden Parameter nicht bestimmt werden: Fib, aPTT, AT und DDIM. Die DDIM konnten außerdem nicht an Tag drei des VB-PAGGS-Beutels des vierten Pools bestimmt werden. Zur Ermöglichung einer statistischen Auswertung, trotz Fehlens der entsprechenden Werte, wurden Zensierungsmaßnahmen angewendet. Aufgrund der großen fehlenden Datenmenge im dritten Pool in Kombination mit dem zufälligen Fehlen der Proben in Bezug der Gesamtprobenzahl wurde sich dazu entschieden, den dritten Pool im Sinne eines fallweisen Ausschlusses („listwise deletion“) vollständig aus der Analyse auszuschließen. Die restlichen fehlenden Werte wurden mittels einer Substitution durch den Mittelwert („group mean imputation“) der vorhandenen Werte des Parameters über die Zeit in der jeweiligen Gruppe (gleicher Pool und gleiches Medium) ersetzt.

Die anschließende Analyse der Daten fand unter Einsatz des Statistikprogramms GraphPad Prism<sup>®60</sup> statt. Die Normalverteilung der Daten wurde hierbei mittels des Shapiro-Wilk-Tests überprüft. Lag keine Normalverteilung vor, wurde eine logarithmische Transformation durchgeführt, mit dem Versuch, eine

---

<sup>57</sup> LabMan<sup>®</sup>, INGWIS Software GmbH, Lich, Deutschland

<sup>58</sup> EBefEx (1.0.2.2), INGWIS Software GmbH, Lich, Deutschland

<sup>59</sup> Microsoft<sup>®</sup> Excel<sup>®</sup> 2016 (16.0.5448.1000), Microsoft<sup>®</sup> Office Professional Plus 2016 (16.0.5452.1000), Microsoft Corporation, Redmond, USA

<sup>60</sup> GraphPad Prism<sup>®</sup> 6 for Windows (Version 6.01), GRAPHPAD SOFTWARE, LLC, Boston, USA

### 3. Eigene Untersuchungen

---

Normalverteilung herzustellen. Zum Vergleich der Gruppen wurde eine zweifaktorielle Varianzanalyse mit Messwiederholung („Two-way ANOVA with repeated measures“) eingesetzt und als anschließende Post-Hoc-Tests ein Dunnett- bzw. Sidak-Mehrfachvergleichstest verwendet. Das Signifikanzniveau wurde auf  $p = 0,05$  festgelegt.

Bezüglich der Analyse des Einflusses der Lagerungsdauer wurden die Mittelwerte der Messwerte der verschiedenen Zeitpunkte Medien- und Pool-übergreifend mit dem Mittelwert zum Zeitpunkt null verglichen. Für die Untersuchung des Einflusses des Mediums wurden die Mittelwerte der abhängigen Variable Aktivität/Gehalt Pool-übergreifend zu einem Zeitpunkt zwischen den Medien verglichen. Fanden sich signifikante Interaktionen zwischen den beiden unabhängigen Variablen Zeit und Medium wurde zusätzlich zu den beschriebenen Vergleichen eine nach Medium aufgetrennte Analyse des Einflusses der Lagerungsdauer durchgeführt.

Die Berechnung des CV für die Inter-Assay Variabilität erfolgte mittels der folgenden Formel (255) jeweils für Werte im physiologischen (N-Kontrolle) als auch im pathologischen (niedrigen)(1 :2-Kontrolle) Bereich in Excel<sup>®61</sup>:

$$CV (\%) = \frac{SD}{Mean} * 100$$

*SD* = Standardabweichung; *Mean* = arithmetischer Mittelwert

Die im Ergebnisteil präsentierten Graphen wurden ebenfalls mit Hilfe des Statistikprogramms GraphPad Prism<sup>®60</sup> erstellt, wobei zur Darstellung der Daten Box-Whisker-Plots verwendet wurden. Die Plots bestehen hierbei aus einer Box und den Whiskern. Die Box stellt die mittleren 50 % der Daten (Interquartilsabstand) dar und reicht entsprechend vom 1. Quartil (25. Perzentil der Daten) bis zum 3. Quartil (75. Perzentil der Daten). In der Box befindet sich eine horizontale Linie, die den Median darstellt. Die Whisker stellen den jeweiligen Minimal- bzw. Maximal-Wert dar. Signifikanzen der Analyse des Einflusses der Lagerungsdauer wurden durch eine liegende eckige Klammer markiert. Das jeweilige Signifikanzniveau wurde hierbei an der Klammer mittels Asterisken nach dem folgenden Schema gekennzeichnet:  $p \leq 0,05$  (\*),  $p \leq 0,01$  (\*\*),  $p \leq 0,001$  (\*\*\*) bzw.  $p \leq 0,0001$  (\*\*\*\*).

---

<sup>61</sup> Microsoft® Excel®, Microsoft® 365 MSO, Microsoft Corporation, Redmond, USA

## 3.2 Ergebnisse

### 3.2.1 Versuchstiere, Voruntersuchungen sowie Gewinnung der Blutprodukte

#### 3.2.1.1 Hundepopulation und Laboruntersuchungen vor der Blutspende

Nach Ausschluss der drei Spendertiere aus dem dritten Pool wurden in die vorliegende Studie 18 Hunde eingeschlossen. Das Signalement der Tiere stellte sich hierbei wie folgt dar: Die Tiere waren im Median 4,2 Jahre (Range: 2,2 – 8,0 Jahre) alt. Das mediane Gewicht betrug 34,9 kg (Range: 27,1 – 52,0 kg). Weiblich-intakt waren 5/18 (ca. 27,8 %), weiblich-kastriert 5/18 (ca. 27,8 %), männlich-intakt 7/18 (ca. 38,9 %) sowie männlich-kastriert 1/18 (ca. 5,6 %) Hunde. Die am häufigsten vertretene Hunderasse waren Schäferhunde mit 8/18 Tieren (ca. 44,4 %), gefolgt von 4/18 Alaskan Malamute (ca. 22,2 %) sowie 2/18 Labrador Retrievern (ca. 11,1 %). Die restlichen Hunderassen (American Staffordshire Terrier, Golden Retriever, Landseer, Rottweiler) waren jeweils nur einmal vertreten (jeweils ca. 5,6 %). Die klinische Untersuchung vor der Blutentnahme war bei allen Tieren ohne besonderen Befund. Die Laboruntersuchungen (Hämatologie, Klinische Chemie, Ammoniak und TEG) waren ebenfalls nach Interpretation durch den studienleitenden Tierarzt der Vorgängerstudie unauffällig. Im Rahmen der Gesamtsituation konnten deshalb die vereinzelt moderaten Abweichungen von den vom Labor zu diesem Zeitpunkt verwendeten Referenzbereichen toleriert werden. In der Hämatologie bezogen sich Abweichungen mit gleich oder mehr als 20 % Abweichung überwiegend auf für diese Studie nicht relevante Thrombozytenparameter. Die niedrige Relevanz ergab sich in diesem Zusammenhang durch die Entfernung des überwiegenden Teils der Thrombozyten bei der Plasmaaufbereitung. Die Abweichung des Ranges (ca. 24 %) der Gesamtleukozytenzahl in den Bereich einer Leukopenie wurde für gesunde, unaufgeregte Tiere als nicht relevant befunden. Es handelt sich hierbei nach unserer Beobachtung um eine häufig auftretende Veränderung. Eine weitere zu detektierende Abweichung war die Verschiebung des Ranges der Zahl an eosinophilen Granulozyten in den Bereich einer gering- bis mittelgradigen Eosinophilie (103 %). Die Abweichungen der klinisch chemischen Parameter lagen überwiegend unterhalb von 10 %. Größere Abweichungen fanden sich bei den Ranges von Bilirubin (ca. 13 % über dem Referenzintervall), Cholesterin (ca. 86 % über dem Referenzintervall), Totalprotein (ca. 12 % über dem Referenzintervall), Globulin (ca. 24 % über dem Referenzintervall), Harnstoff (ca. 10 % über dem Referenzintervall), Magnesium (ca. 11 % unter dem Referenzintervall), Triglyceride (ca. 228 % über dem Referenzintervall), DGGR-Lipase (182 % über dem Referenzintervall) sowie C-reaktives Protein (31 % über dem Referenzintervall).

Die angelegten bakteriologischen Untersuchungen verliefen alle negativ, sodass von keiner bakteriellen Kontamination der Blutprodukte auszugehen war.

Ausführlichere Daten dieses Untersuchungsbereichs können der vorangegangenen Dissertation entnommen werden (32).

#### **3.2.1.2 Gewinnung Blutkonserven**

Während und nach den Blutspenden kam es zu keinen Zwischenfällen. Die Entnahmemenge an Vollblut lag im Median bei 454 ml Vollblut (Range: 435 – 464 ml). Bezogen auf das Gewicht der Tiere wurden somit im Mittel 12,9 ml/kg (Standardabweichung: 2,0 ml/kg; Range: 8,8 – 16,7 ml/kg) gespendet. Die Zeitspanne vom Einführen der Entnahmenadel des Blutspendesystems bis zur Beendigung der Blutspende lag im Median bei sechs Minuten (Range: fünf bis zehn Minuten).

Die Zeitspanne zwischen der Blutspende und der Herstellung des Pools (im Kühlsystem gekühlt) betrug im Mittel 7,1 Stunden (Standardabweichung: 2,7 Stunden; Range: 2,3 – 11,1 Stunden) (32).

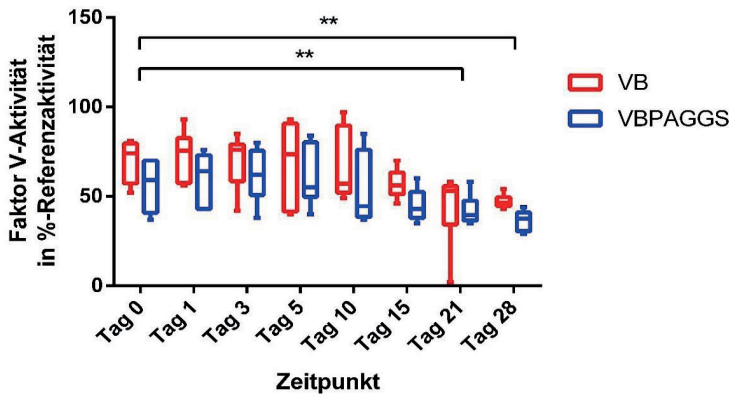
#### **3.2.2 Einfluss von Lagerung und Medium**

Im Folgenden sollen die Ergebnisse der Lagerung über die Zeit sowie des Vergleichs der Antikoagulanzen/Additiv-Lösungen präsentiert werden.

### 3.2.2.1 (Prokoagulatorische) Faktoren

#### 3.2.2.1.1 Faktor V

Die Darstellung der gemessenen Aktivitätswerte von FV mittels Box-Whisker-Plots (Abbildung 2) offenbart einen Abfall über die Zeit, was durch die entsprechende statistische Analyse gestützt wurde. Signifikant zeigten sich hierbei die Werte an Tag 21 ( $p < 0,01$ ) und 28 ( $p < 0,01$ ). Auffällig war die im Median übergreifenden Durchschnitt mit ca. 63 % niedrige Ausgangsaktivität im Vergleich zum Poolplasma. Bis Tag 28 fand sich kein Abfall der Ausgangsaktivität unter 50 % des Ausgangswertes. Zwischen den VB und VB-PAGGS konnten ebenfalls signifikante Unterschiede gefunden werden (Tag 0 ( $p < 0,05$ ), 1 ( $p < 0,05$ ), 10 ( $p < 0,05$ ) und 15 ( $p < 0,05$ )). Die Aktivitätswerte von VB-PAGGS lagen an den Tagen mit signifikanten Ergebnissen im Schnitt um 12,75 % niedriger.



Zeit:  $F(7, 35) = 8,112$ ;  $p < 0,0001$

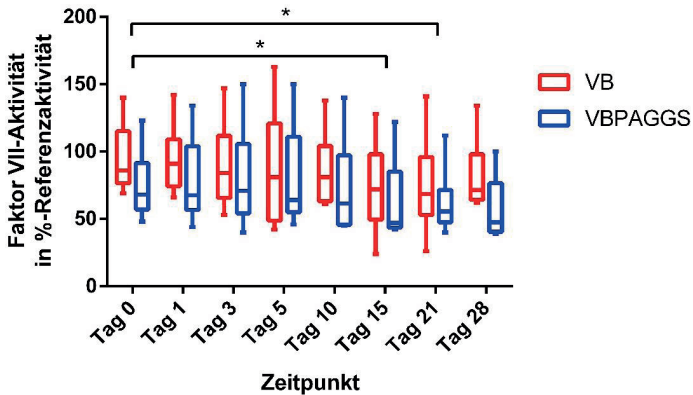
Medium:  $F(1, 5) = 86,65$ ;  $p = 0,0002$

Interakt:  $F(7, 35) = 0,8747$ ;  $p = 0,54$

Abbildung 2: Faktor V-Aktivität zum jeweiligen Entnahmezzeitpunkt während der 28-tägigen Lagerung unter den zuvor genannten Bedingungen. Beide Medien (VB und VB-PAGGS) sind dargestellt. Abgebildet sind Box-Whisker-Plots. Die mittleren 50 % (1. bis 3. Quartil) der Daten stellt die Box dar, deren horizontale Unterteilung den Median anzeigt. Die Whisker reichen bis zum Minimal- bzw. Maximalwert. Angegeben sind die globalen  $p$ -Werte für die Faktoren „Zeit“, „Medium“ und die Wechselwirkung (Interakt) zwischen den Faktoren. Die Asterisken und liegenden eckigen Klammern zeigen die Ergebnisse des Post-Hoc-Tests für den Faktor „Zeit“ an. Signifikante Unterschiede der Mittelwerte der Aktivitäten der beiden Medien zwischen zwei Messzeitpunkten sind mit einer liegenden eckigen Klammer markiert. Das Signifikanzniveau ist hierbei an den Klammern wie folgt gekennzeichnet:  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*),  $p < 0,001$  (\*\*\*) bzw.  $p < 0,0001$  (\*\*\*\*). Die Signifikanzen für den Post-Hoc-Test für den Faktor „Medium“ sind im Text aufgeführt. Das Signifikanzniveau liegt bei  $p < 0,05$ . Abkürzungen: VB = Vollblut mit Citrat-Phosphat-Dextrose (CPD), VB(-)PAGGS = VB mit zusätzlichem/r Phosphat, Adenin, Glukose, Guanosin, Kochsalzlösung und Mannitol (PAGGS-M).

3.2.2.1.2 Faktor VII

Der Abfall der FVII-Aktivität im Medium war, wie in Abbildung 3 zu erkennen ist, geringfügig, trotzdem fand sich ein signifikanter Abfall am 15. ( $p < 0,05$ ) sowie am 21. ( $p < 0,05$ ) Lagerungstag. Ein Aktivitätsverlust von mehr als 50 % fand sich während der 28-tägigen Lagerung nicht. Signifikante Unterschiede in der Aktivität zwischen den Medien fanden sich am Einlagerungstag ( $p < 0,01$ ), dem ersten Tag ( $p < 0,05$ ) der Lagerung sowie an Tag 28 ( $p < 0,001$ ). Der Mittelwert der Differenz an den Tagen mit signifikantem Unterschied betrug ca. 20,11 %.



Zeit:  $F(7, 35) = 4,277; p = 0,0017$

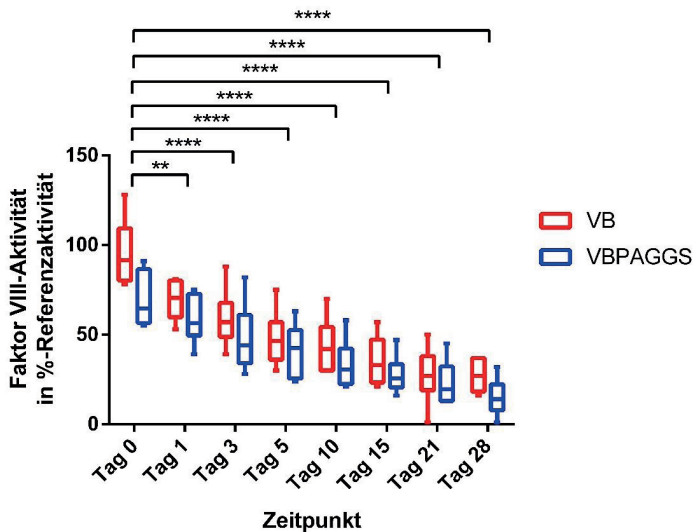
Medium:  $F(1, 5) = 136,1; p < 0,0001$

Interakt:  $F(7, 35) = 1,022; p = 0,43$

Abbildung 3: Darstellung der nach dem Zeitpunkt der Entnahme aufgegliederten Aktivitäten von Faktor VII über die Lagerungsdauer. Sowohl VB als auch VB-PAGGS sind abgebildet. Bezüglich der Beschreibung der Box-Whisker-Plots sowie für den Schlüssel der angegebenen Signifikanzniveaus sei auf Abbildung 2 verwiesen. Abkürzungen: VB = Vollblut mit Citrat-Phosphat-Dextrose (CPD), VB(-)PAGGS = VB mit zusätzlichem/r Phosphat, Adenin, Glukose, Guanodin, Kochsalzlösung und Mannitol (PAGGS-M).

3.2.2.1.3 Faktor VIII

Über die Zeit war ein deutlicher Aktivitätsabfall von FVIII zu erkennen, wobei die deutlich signifikante Interaktion der unabhängigen Variablen Zeit und Medium auf einen von einer Kombination der beiden Faktoren abhängigen Effekt hindeutete. Der signifikante Abfall der Aktivität vom Einlagerungstag zum ersten Lagerungstag war hierbei durch einen signifikanten Abfall in der VB-Gruppe getragen, der sich nicht in der VB-PAGGS-Gruppe fand. Die restlichen Abfälle an allen Lagerungstagen waren in beiden Gruppen signifikant. Ein Abfall über 50 % der Ausgangsaktivität fand sich ab dem 10. Lagerungstag. Signifikante Unterschiede zwischen den Medien fanden sich am Einlagerungstag ( $p < 0,0001$ ) sowie an Tag 28 ( $p < 0,05$ ), wobei die VB-PAGGS-Gruppe durchgängig niedrigere Aktivitäten aufwies. Die durchschnittliche Differenz der Aktivitäten betrug an den Tagen mit signifikantem Unterschied ca. 19,09 %, wobei sich am Einlagerungstag eine Differenz von 26 % fand.

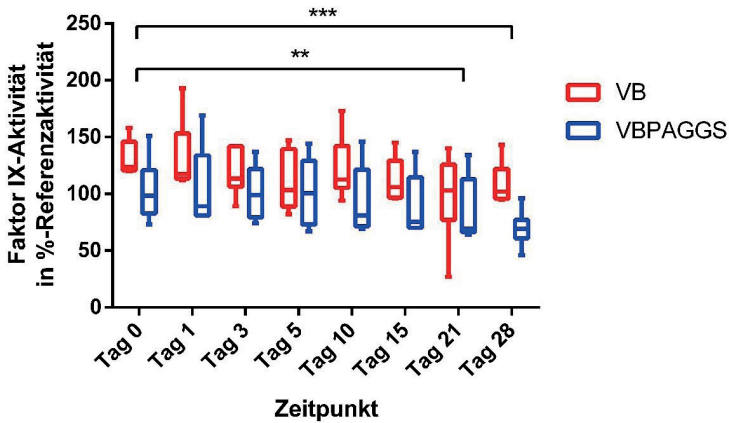


Zeit:  $F(7, 35) = 33,22; p < 0,0001$   
 Medium:  $F(1, 5) = 37,92; p = 0,0016$   
 Interakt:  $F(7, 35) = 2,931; p = 0,016$

Abbildung 4 Präsentation der Messwerte von Faktor VIII nach den Tagen der Lagerung, an denen Proben entnommen wurden. Beide Blutproduktgruppen sind dargestellt. Bezüglich der Beschreibung der Box-Whisker-Plots sowie für den Schlüssel der angegebenen Signifikanzniveaus sei auf Abbildung 2 verwiesen. Abkürzungen: VB = Vollblut mit Citrat-Phosphat-Dextrose (CPD), VBPAGGS = VB mit zusätzlichem/r Phosphat, Adenin, Glukose, Guanosin, Kochsalzlösung und Mannitol (PAGGS-M).

3.2.2.1.4 Faktor IX

Wie in Abbildung 5 erkennbar ist, fanden sich signifikante Unterschiede sowohl im zeitlichen Verlauf der FIX-Aktivität als auch in der Aktivität zwischen den Medien. Signifikante Unterschiede im Verlauf der Zeit fanden sich an Tag 21 ( $p < 0,01$ ) sowie Tag 28 ( $p < 0,001$ ). Ein Abfall um über 50 % der Ausgangsaktivität konnte im Beobachtungszeitraum nicht detektiert werden. Die Aktivitäten lagen in der VB-PAGGS-Gruppe am Tag der Einlagerung ( $p < 0,05$ ), nach einem ( $p < 0,05$ ), zehn ( $p < 0,05$ ) und 28 Tagen ( $p < 0,001$ ) signifikant niedriger, wobei an diesen Tagen im Schnitt eine Differenz der Aktivität von ca. 30,83 % vorlag.

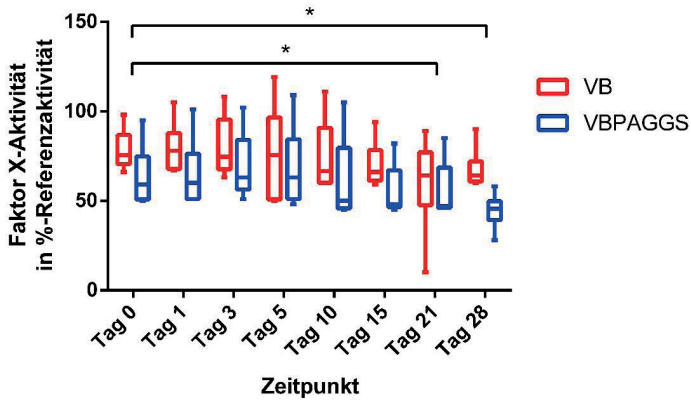


Zeit:  $F(7, 35) = 6,056; p = 0,0001$   
 Medium:  $F(1, 5) = 225,7; p < 0,0001$   
 Interakt:  $F(7, 35) = 1,440; p = 0,22$

Abbildung 5: Ergebnisse der Messungen der Faktor IX-Aktivität nach Beprobungszeitpunkt in beiden Medien über die 28-tägige Lagerung. Bezüglich der Beschreibung der Box-Whisker-Plots sowie für den Schlüssel der angegebenen Signifikanzniveaus sei auf Abbildung 2 verwiesen. Abkürzungen: VB = Vollblut mit Citrat-Phosphat-Dextrose (CPD), VBPAGGS = VB mit zusätzlichem/r Phosphat, Adenin, Glukose, Guanosen, Kochsalzlösung und Mannitol (PAGGS-M).

3.2.2.1.5 Faktor X

FX zeigte in Hinblick auf den zeitlichen Verlauf der Aktivitäten ein ähnliches Bild wie FIX, jedoch liegt hier ein noch weniger ausgeprägter Abfall vor, weshalb die Signifikanzniveaus der im Vergleich der zum Einlagerungstag signifikant niedrigen Aktivitäten an Tag 21 und 28 mit jeweils  $p < 0,05$  gering ausfielen. Die Ausgangsaktivität fiel mit 71 % des Poolplasmas gering aus. Mehr als 50 % Aktivitätsverlust im Vergleich zum Tag der Einlagerung fanden sich allerdings zu keinem Zeitpunkt. Nur an Tag 28 fand sich ein signifikanter, jedoch ausgeprägter Unterschied zwischen VB und VB-PAGGS ( $p < 0,001$ ), wobei letzteres Blutprodukt an diesem Tag im Mittel der Pools ca. 23 % weniger Aktivität aufwies.



Zeit:  $F(7, 35) = 4,491; p = 0,0012$

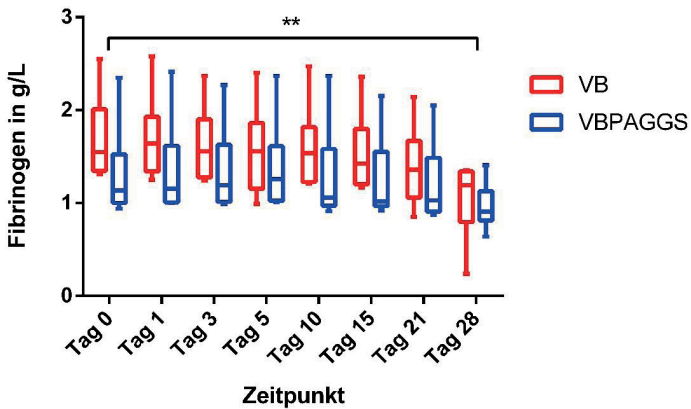
Medium:  $F(1, 5) = 139,9; p < 0,0001$

Interakt:  $F(7, 35) = 1,093; p = 0,39$

Abbildung 6: Faktor X-Aktivität zum jeweiligen Entnahmezeitpunkt während der 28-tägigen Lagerung unter den zuvor genannten Bedingungen. Beide Medien (VB und VB-PAGGS) sind dargestellt. Bezüglich der Beschreibung der Box-Whisker-Plots sowie für den Schlüssel der angegebenen Signifikanzniveaus sei auf Abbildung 2 verwiesen. Abkürzungen: VB = Vollblut mit Citrat-Phosphat-Dextrose (CPD), VB(-)PAGGS = VB mit zusätzlichem/r Phosphat, Adenin, Glukose, Guanodin, Kochsalzlösung und Mannitol (PAGGS-M).

**3.2.2.1.6 Fibrinogen**

Sowohl im zeitlichen Verlauf als auch zwischen den Medien fanden sich beim Fib-Gehalt signifikante Unterschiede, wie in Abbildung 7 vermerkt ist. Der Gehalt nahm jedoch nur langsam ab, weshalb eine signifikante Differenz der medienübergreifenden Mittelwerte erst an Tag 28 ( $p < 0,01$ ) nachgewiesen werden konnte. Ein Abfall des durchschnittlichen Gehalts des Fibs unter 50 % des Ausgangswertes konnte innerhalb der 28 Tage nicht nachgewiesen werden. Signifikant niedrigere Werte fanden sich bei VB-PAGGS am Tag der Einlagerung ( $p < 0,01$ ) sowie einen ( $p < 0,01$ ), drei ( $p < 0,05$ ), zehn ( $p < 0,05$ ) und fünfzehn ( $p < 0,05$ ) Tage später. Der Unterschied lag an diesen Tagen im Schnitt bei ca. 0,32 g/L.

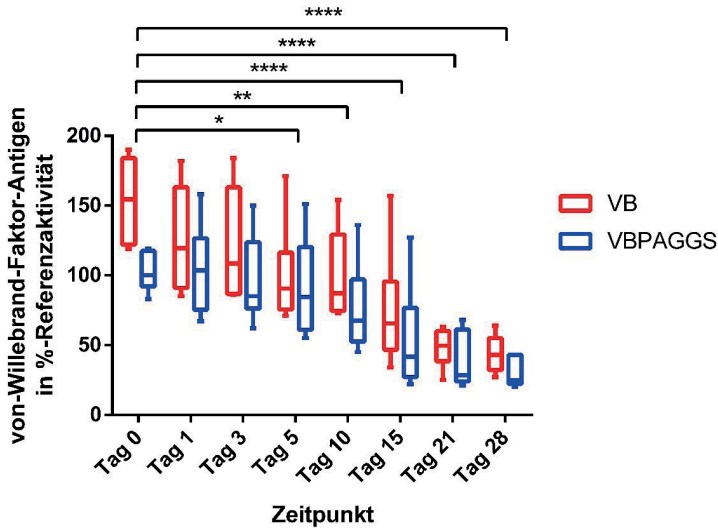


Zeit:  $F(7, 35) = 3,832; p = 0,0034$   
 Medium:  $F(1, 5) = 14,43; p = 0,013$   
 Interakt:  $F(7, 35) = 1,124; p = 0,37$

Abbildung 7: Ergebnisse der Messungen des Fibrinogengehalts nach Beprobungszeitpunkt in beiden Medien über die 28-tägige Lagerung. Bezüglich der Beschreibung der Box-Whisker-Plots sowie für den Schlüssel der angegebenen Signifikanzniveaus sei auf Abbildung 2 verwiesen. Abkürzungen: g/L = Gramm pro Liter, VB = Vollblut mit Citrat-Phosphat-Dextrose (CPD), VB(-)PAGGS = VB mit zusätzlichem/r Phosphat, Adenin, Glukose, Guanosin, Kochsalzlösung und Mannitol (PAGGS-M).

3.2.2.1.7 Von-Willebrand-Faktor-Antigen

Die Aktivität des vWF-Ag nahm über die Zeit ab, nachdem sich insbesondere zu Beginn in den VB-Konserven hohe Aktivitätswerte gefunden hatten. Die nach Medium getrennte Analyse auf Signifikanzen der Aktivitäten im Verlauf der Zeit ergab, dass in der VB-Gruppe bereits ein signifikanter Abfall der Aktivitäten über die Zeit stattfand, wenn man den 1. ( $p < 0,001$ ), 3. ( $p < 0,0001$ ) und 5. ( $p < 0,0001$ ) Lagerungstag mit dem Einlagerungstag verglich. Bei den VB-PAGGS-Konserven konnte dies nicht nachgewiesen werden. Die gemittelte Aktivität der beiden Gruppen fiel ab Tag 21 unter 50 % der Ausgangsaktivität. Am Einlagerungstag ( $p < 0,0001$ ), 1. ( $p < 0,05$ ), 3. ( $p < 0,01$ ), 10. ( $p < 0,01$ ) und 15. ( $p < 0,05$ ) Lagerungstag fanden sich signifikant niedrigere Aktivitäten in den Konserven mit VB-PAGGS. Durchschnittlich betrug die Differenz an diesen Tagen zu VB als Medium ca. 28,67 %.



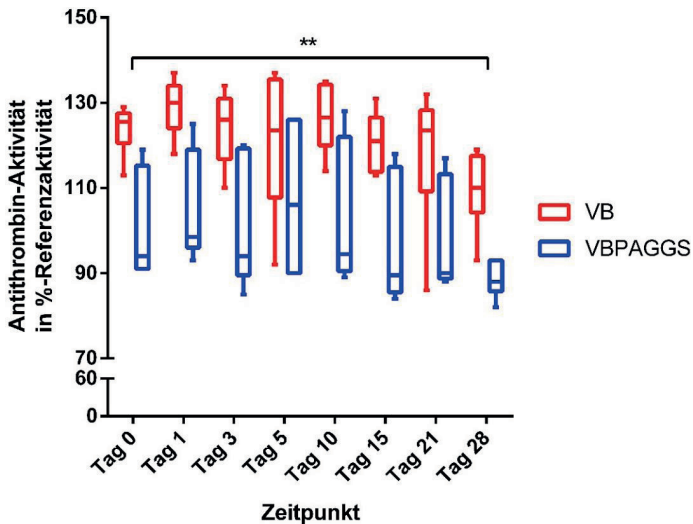
Zeit:  $F(7, 35) = 20,69; p < 0,0001$   
 Medium:  $F(1, 5) = 29,28; p = 0,0029$   
 Interakt:  $F(7, 35) = 4,636; p = 0,0009$

Abbildung 8: Darstellung der nach dem Zeitpunkt der Entnahme aufgegliederten Aktivitäten von von-Willebrand-Faktor-Antigen über die Lagerungsdauer. Sowohl VB als auch VB-PAGGS sind abgebildet. Bezüglich der Beschreibung der Box-Whisker-Plots sowie für den Schlüssel der angegebenen Signifikanzniveaus sei auf Abbildung 2 verwiesen. Abkürzungen: VB = Vollblut mit Citrat-Phosphat-Dextrose (CPD), VB(-)PAGGS = VB mit zusätzlichem/r Phosphat, Adenin, Glukose, Guanodin, Kochsalzlösung und Mannitol (PAGGS-M).

### 3.2.2.2 Inhibitoren/Fibrinolysemarker

#### 3.2.2.2.1 Antithrombin

Die AT-Aktivität blieb, wie anhand der Box-Whisker-Plots von Abbildung 9 zu erkennen ist, über lange Zeit relativ konstant. Aufgrund des stärkeren Abfalls gegen Ende der Lagerungsdauer konnte trotzdem ein signifikanter Unterschied im zeitlichen Verlauf aufgezeigt werden. An Tag 28 lag die AT-Aktivität signifikant unter der Ausgangsaktivität ( $p < 0,01$ ). Dieser Abfall reichte allerdings nicht für eine Unterschreitung der 50 % Marke bezogen auf die Ausgangsaktivität. Wie graphisch repräsentiert fanden sich deutliche Unterschiede in der Aktivität zwischen den beiden Konservierungsmedien/Additivilösungen. Signifikante Unterschiede fanden sich hierbei bis auf am fünften Lagerungstag zu allen Messzeitpunkten. Wobei alle Tage ein  $p < 0,001$  aufwiesen, mit Ausnahme von Tag 21 ( $p < 0,01$ ). Der Aktivitätsunterschied lag an den Tagen mit signifikantem Unterschied im Durchschnitt bei ca. 22,88 %.



Zeit:  $F(7, 35) = 5,576$ ;  $p = 0,0002$

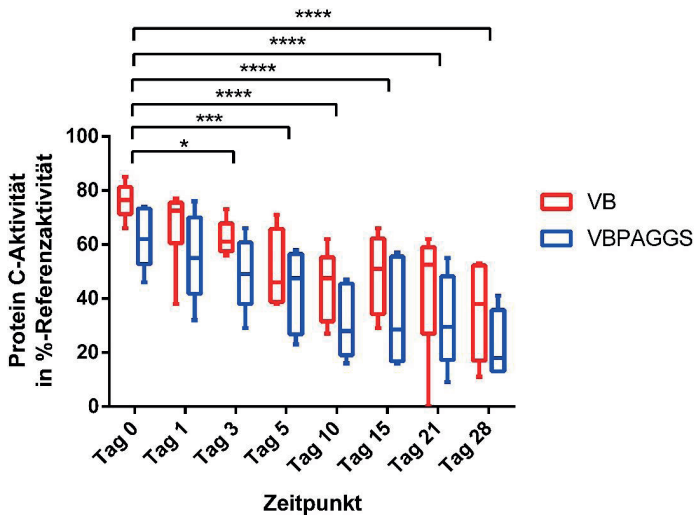
Medium:  $F(1, 5) = 36,19$ ;  $p = 0,0018$

Interakt:  $F(7, 35) = 0,5714$ ;  $p = 0,77$

Abbildung 9: Präsentation der Messwerte von Antithrombin nach den Tagen der Lagerung, an denen den Proben entnommen wurden. Beide Blutproduktgruppen sind dargestellt. Bezüglich der Beschreibung der Box-Whisker-Plots sowie für den Schlüssel der angegebenen Signifikanzniveaus sei auf Abbildung 2 verwiesen. Abkürzungen: VB = Vollblut mit Citrat-Phosphat-Dextrose (CPD), VBPAGGS = VB mit zusätzlichem/Phosphat, Adenin, Glukose, Guanosin, Kochsalzlösung und Mannitol (PAGGS-M).

3.2.2.2.2 Protein C

Die PC-Aktivität zeigte bereits am Tag der Einlagerung eine recht niedrige Aktivität, die im Verlauf der Zeit signifikant abfiel. Signifikanzen fanden sich an allen Lagerungstagen im Vergleich mit dem Einlagerungstag mit Ausnahme des ersten Tages (Tag 3  $p < 0,05$ , Tag 5  $p < 0,001$ , Tag 10  $p < 0,0001$ , Tag 15  $p < 0,0001$ , Tag 21  $p < 0,0001$ , Tag 28  $p < 0,0001$ ). Ab dem 28. Lagerungstag fand sich hierbei ein Abfall um mehr als 50 % der Ausgangsaktivität. Mit Ausnahme des 5. Lagerungstages fanden sich an allen Tagen signifikante Unterschiede zwischen den Medien  $p < 0,05$  bzw.  $p < 0,01$  an Tag fünfzehn, wobei VB-PAGGS niedrigere Aktivitätswerte aufwies. Der mittlere Unterschied lag hierbei bei 13,4 %.



Zeit:  $F(7, 35) = 16,81; p < 0,0001$

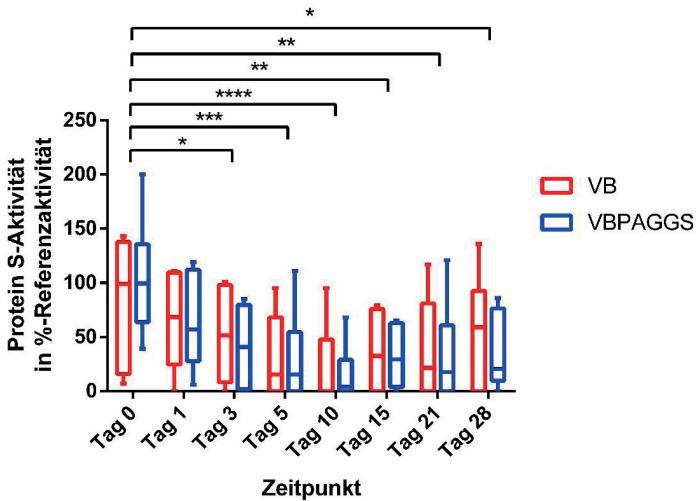
Medium:  $F(1, 5) = 32,19; p = 0,0024$

Interakt:  $F(7, 35) = 0,3644; p = 0,92$

Abbildung 10: Ergebnisse der Messungen der Protein C-Aktivität nach Beprobungszeitpunkt in beiden Medien über die 28-tägige Lagerung. Bezüglich der Beschreibung der Box-Whisker-Plots sowie für den Schlüssel der angegebenen Signifikanzniveaus sei auf Abbildung 2 verwiesen. Abkürzungen: VB = Vollblut mit Citrat-Phosphat-Dextrose (CPD), VBPAGGS = VB mit zusätzlichem/r Phosphat, Adenin, Glukose, Guanosin, Kochsalzlösung und Mannitol (PAGGS-M).

3.2.2.2.3 Protein S

Die PS-Aktivitäten zeigte zunächst einen Abfall der Aktivität bis zur Probenentnahme am 10. Lagerungstag, wobei sich signifikante Unterschiede zum Beginn der Lagerung am 3. ( $p < 0,05$ ), 5. ( $p < 0,001$ ) sowie am 10. Lagerungstag ( $p < 0,0001$ ) fanden. Danach kam es zwar wieder zu einem leichten Anstieg der Aktivität, jedoch pendelte sich diese auf einem signifikant niedrigeren Niveau im Vergleich zur Ausgangsaktivität ein. Die  $p$ -Werte des 15., 21. und 28. Lagerungstages betrug hierbei  $p < 0,01$ ,  $p < 0,01$  bzw.  $p < 0,05$ . Der 3. Lagerungstag markierte den Punkt, ab dem sich nur noch weniger als 50 % der Ausgangsaktivität in den Konserven fanden. Signifikante Unterschiede zwischen den mittleren Aktivitäten der Medien fanden sich nicht.

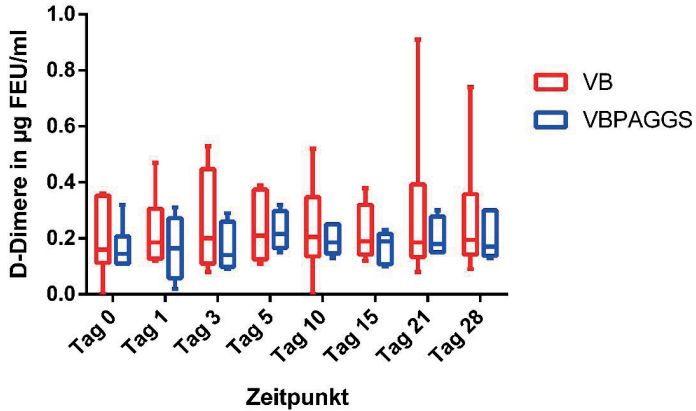


Zeit:  $F(7, 35) = 4,992; p = 0,0005$   
 Medium:  $F(1, 5) = 1,088; p = 0,34$   
 Interakt:  $F(7, 35) = 1,053; p = 0,41$

Abbildung 11: Protein S-Aktivität zum jeweiligen Entnahmezeitpunkt während der 28-tägigen Lagerung unter den zuvor genannten Bedingungen. Beide Medien (VB und VB-PAGGS) sind dargestellt. Bezüglich der Beschreibung der Box-Whisker-Plots sowie für den Schlüssel der angegebenen Signifikanzniveaus sei auf Abbildung 2 verwiesen. Abkürzungen: VB = Vollblut mit Citrat-Phosphat-Dextrose (CPD), VB(-)PAGGS = VB mit zusätzlichem/r Phosphat, Adenin, Glukose, Guanosin, Kochsalzlösung und Mannitol (PAGGS-M).

3.2.2.2.4 D-Dimere

Die Untersuchung des DDIM-Gehalts der Proben zeigte weder im zeitlichen Verlauf noch zwischen den Medien signifikante Unterschiede. Wie anhand von Abbildung 12 zu erkennen ist, blieb der Gehalt entsprechend in beiden Medien über die Zeit nahezu konstant auf einem niedrigen Niveau. Allerdings zeigten die Proben der Gruppe VB generell während der Lagerung eine progressiv höhere Variabilität der Ergebnisse als die Gruppe mit PAGGS-M Zusatz.



Zeit:  $F(7, 35) = 1,006$ ;  $p = 0,44$

Medium:  $F(1, 5) = 1,964$ ;  $p = 0,22$

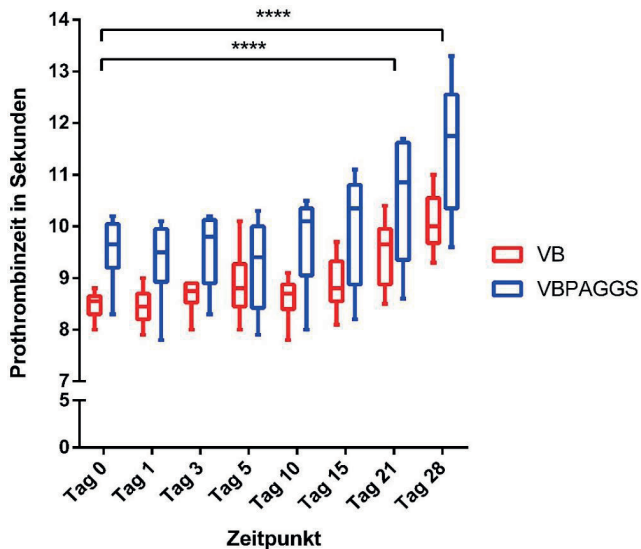
Interakt:  $F(7, 35) = 0,2952$ ;  $p = 0,95$

Abbildung 12: Darstellung der nach dem Zeitpunkt der Entnahme aufgedichteten Gehalte an D-Dimeren über die Lagerungsdauer. Sowohl VB als auch VB-PAGGS sind abgebildet. Bezüglich der Beschreibung der Box-Whisker-Plots sowie für den Schlüssel der angegebenen Signifikanzniveaus sei auf Abbildung 2 verwiesen. Abkürzungen: µg FEU/ml = Mikrogramm Fibrinogen Equivalent Units (Fibrinogen-äquivalente Einheiten) pro Milliliter, VB = Vollblut mit Citrat-Phosphat-Dextrose (CPD), VB(-)PAGGS = VB mit zusätzlichem/r Phosphat, Adenin, Glukose, Guanodin, Kochsalzlösung und Mannitol (PAGGS-M).

### 3.2.2.3 Gerinnungszeiten

#### 3.2.2.3.1 Prothrombinzeit

Die PT stieg im zeitlichen Verlauf signifikant an, wobei sich keine Unterschiede hinsichtlich der Signifikanz zwischen den Medien fanden. Der Anstieg fand vor allem am Ende der Lagerungsdauer statt, allerdings zeigten die VB-Konserven am 5. Lagerungstag einen leichten Peak bei gleichzeitig leichtem Abfall der PT in der VB-PAGGS-Gruppe. Entsprechende signifikante Anstiege der zwischen VB und VB-PAGGS gemittelten PT ergaben sich im Vergleich zur Ausgangszeit an Tag 21 und 28 ( $p$ -Wert jeweils  $p < 0,0001$ ). Unterschiede von durchschnittlich ca. 1,08 Sekunden fanden sich mit Ausnahme des 5. Lagerungstages an allen Lagerungstagen (Einlagerungstag, 10., 15., 21. und 28. Lagerungstag  $p < 0,0001$  sowie 1. und 3. Lagerungstag  $p < 0,001$ ). Grundsätzlich lag hier die PT der VB-PAGGS-Konserven über denen der VB-Gruppe.



Zeit:  $F(7, 35) = 38,29; p < 0,0001$

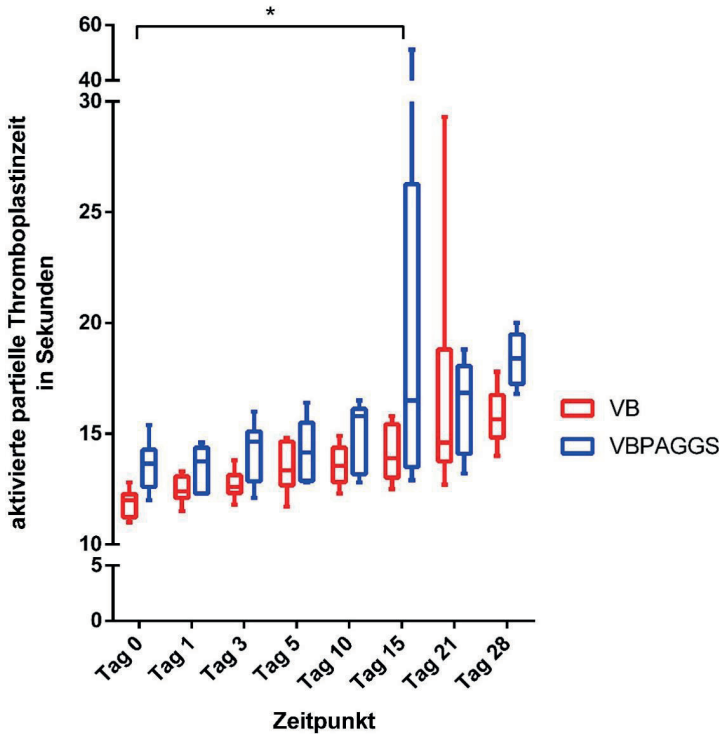
Medium:  $F(1, 5) = 23,72; p = 0,0046$

Interakt:  $F(7, 35) = 2,458; p = 0,037$

Abbildung 13: Präsentation der Messwerte der Prothrombinzeit nach den Tagen der Lagerung, an denen Proben entnommen wurden. Beide Blutproduktgruppen sind dargestellt. Bezüglich der Beschreibung der Box-Whisker-Plots sowie für den Schlüssel der angegebenen Signifikanzniveaus sei auf Abbildung 2 verwiesen. Abkürzungen: VB = Vollblut mit Citrat-Phosphat-Dextrose (CPD), VB-PAGGS = VB mit zusätzlichem/r Phosphat, Adenin, Glukose, Guanodin, Kochsalzlösung und Mannitol (PAGGS-M).

3.2.2.3.2 Aktivierte partielle Thromboplastinzeit

Die aPTT blieb über die Zeit relativ konstant. Nur zu einem Zeitpunkt (Tag 15) fand sich ein signifikanter Anstieg ( $p < 0,05$ ) im Vergleich zum Einlagerungstag. Ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Blutprodukten (Haupteffekt Medium) lag nicht vor.



Zeit:  $F(7, 35) = 2,862; p = 0,018$

Medium:  $F(1, 5) = 5,611; p = 0,064$

Interakt:  $F(7, 35) = 1,116; p = 0,38$

Abbildung 14: Ergebnisse der Messungen der aktivierten partiellen Thromboplastinzeit nach Beprobungszeitpunkt in beiden Medien über die 28-tägige Lagerung. Bezüglich der Beschreibung der Box-Whisker-Plots sowie für den Schlüssel der angegebenen Signifikanzniveaus sei auf Abbildung 2 verwiesen. Abkürzungen: VB = Vollblut mit Citrat-Phosphat-Dextrose (CPD), VB/PAGGS = VB mit zusätzlichem/r Phosphat, Adenin, Glukose, Guanosin, Kochsalzlösung und Mannitol (PAGGS-M).

### 3.2.3 Inter-Assay Variabilität

Die Ergebnisse der Berechnung der Inter-Assay Variabilitäten finden sich in Tabelle 2 sowie Tabelle 3. Des Weiteren enthalten die Tabellen die Mittelwerte und Standardabweichungen, die sich aus den Messungen der Kontrollen ergeben haben und mit denen die Inter-Assay-Variabilitäten berechnet wurden. Zudem findet sich die Anzahl der Messungen, aus denen diese bestimmt wurden.

Parameter	Anzahl Messungen N-Kontrolle	Mittelwert (in %-Referenzakt.)	Standardabweichung (in %-Referenzakt.)	CV physiol. Bereich (in %)
FV	8	67,38	12,81	19,0
FVII	8	54,75	7,32	13,4
FIX	8	113,50	9,32	8,2
FX	8	65,38	6,46	9,9
vWF-Ag	10	110,10	28,25	25,7

Tabelle 2: CVs der neu etablierten Parameter im physiologischen Bereich (N-Kontrolle). Die Mittelwerte und Standardabweichungen sind auf zwei, die CVs auf eine Nachkommastelle gerundet angegeben.

Abkürzungen: %-Referenzakt. = Prozent Referenzaktivität, CV = coefficient of variation (Variationskoeffizient), FV = Faktor V, FVII = Faktor VII, FIX = Faktor IX, FX = Faktor X, N-Kontrolle = Normalkontrolle/Kontrolle im physiologischen Bereich, physiol. = physiologisch, vWF-Ag = Von-Willebrand-Faktor-Antigen.

Parameter	Anzahl Messungen 1 :2- Kontrolle	Mittelwert (in %-Referenzakt.)	Standardabweichung (in %-Referenzakt.)	CV pathol. Bereich (in %)
FV	9	15,89	5,28	33,2
FVII	9	22,67	4,42	19,5
FIX	9	47,00	6,78	14,4
FX	8	27,88	2,85	10,2
vWF-Ag	12	54,00	13,86	25,7

Tabelle 3: CVs der neu etablierten Parameter im pathologischen Bereich (1 :2-Kontrolle). Die Mittelwerte und Standardabweichungen sind auf zwei, die CVs auf eine Nachkommastelle gerundet angegeben.

Abkürzungen: %-Referenzakt. = Prozent Referenzaktivität, 1 :2-Kontrolle = niedrige Kontrolle/Kontrolle im pathologischen Bereich, CV = coefficient of variation (Variationskoeffizient), FV = Faktor V, FVII = Faktor VII, FIX = Faktor IX, FX = Faktor X, pathol. = pathologisch, vWF-Ag = Von-Willebrand-Faktor-Antigen.

Die gemittelten CVs der Parameter betragen für FV 26,1 %, FVII 16,4 %, FIX 11,3 %, FX 10,1 % sowie für vWF-Ag 25,7 %.

### 4. Diskussion

Das in der vorliegenden Dissertation bearbeitete Thema des Einflusses der gekühlten Lagerung von Vollblut auf die plasmatische Gerinnungsaktivität ist beim Hund bisher mit direktem Fokus auf diese Thematik wenig untersucht worden (28, 29). Ergänzend finden sich nur vereinzelte Studien mit indirekter Betrachtung im Rahmen anderer Forschungsfragen (30, 450) oder bei anderen Tierarten (592). Der Fokus der Studienlage zur hämostatischen Aktivität von Blutprodukten lag/liegt in der veterinärmedizinischen Literatur hingegen bisher bei Plasmaprodukten. Gefrorene Plasmaprodukte und insbesondere FFP stellen/stellt den Fokus dar, auch wenn sich in den vergangenen Jahren vermehrt Arbeiten zu „Liquid“- und „Thawed“- (aufgetautem) Plasma sowie den Lagerungsschäden von Erythrozyten finden (20, 25–27, 420, 452). In der Humanmedizin findet hingegen aktuell eine Verschiebung des Forschungsschwerpunktes von der Blutkomponententherapie hin zu frischem und gekühltem Vollblut statt. Vollblut hat sich in neueren Studien vorteilhaft bei der Akutbehandlung des hämorrhagischen Schocks gezeigt (532, 533). So ging es z. B. in einer frühen Studie mit einer verminderten Mortalität im Vergleich zum Einsatz von Blutkomponenten einher, die nicht von anderen Faktoren abhängig war (593). Dies stellt einen Paradigmenwechsel dar, galt die Komponententherapie seit ihrer weiträumigen Verfügbarmachung Ende der sechziger/Anfang der siebziger Jahre des 20. Jahrhunderts als bevorzugte Variante der allogenen Bluttransfusion (594, 595). Angetrieben wird der Trend entsprechend des Einsatzgebietes (s. o. und s. auch 2.5 Verfügbarkeitsprobleme und Logistik von Blutprodukten), vornehmlich durch militärisch subventionierte Forschung (352, 533, 593), aber auch der zivile Sektor führt Studien zum Einsatz von Vollblut durch (532, 537). Für die Veterinärmedizin ist diese Entwicklung als mögliche Therapiestrategie von großem Interesse, da sich z. B. bei traumatischen Verletzungen im Kriegseinsatz mit dem Verbluten als Hauptursache für vermeidbare/absolute Todesfälle bei Spezialeinheiten (596) bzw. Militärhunden (535), eine entscheidende Parallele findet. Darüber hinaus zeigen sowohl Menschen (597) als auch Hunde (2, 598–601) im Rahmen von Traumata eine Trauma-induzierte Koagulopathie.

Um eine entsprechende empirische Verwendung von Vollblut zu ermöglichen bzw. um die Sinnhaftigkeit von Wirksamkeitsstudien zur evidenzbasierten Verwendung zu belegen, wurden dessen Aktivitäten von pro- und antikoagulatorischen Faktoren untersucht. Die Hypothese des Autors war, dass diese Faktoren bis zum 15. Lagerungstag  $\geq 50\%$  ihrer Ausgangsaktivität behalten würden und somit weiterhin für die Behandlung von Koagulopathien eingesetzt werden könnten. Die Verwendbarkeit bezüglich der Qualität zur Substitution von Erythrozyten und Thrombozyten wurde hierbei bereits im Vorgängerprojekt (32) überprüft. Auch hier fehlen allerdings noch Studien zur Bestätigung der in vivo Wirkung der Zellbestandteile.

## 4.1 Einfluss des zeitlichen Verlaufs der Lagerung

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zum Einfluss des zeitlichen Verlaufs auf die Aktivität der prokoagulatorischen Faktoren (klassische Gerinnungsfaktoren und vWF) decken sich überwiegend mit den bereits publizierten Werten aus den Arbeiten von Cooper et al. (29), Edwards et al. (28) und Stefani et al. (30). So fielen in den Untersuchungen zu dieser Dissertation analog die Aktivitäten von FV, FVIII, FIX, FX und vWF mit der Zeit ab (29, 30). Hierbei deckte sich der Fakt, dass von den prokoagulatorischen Faktoren nur FVIII und vWF unter die Grenze von weniger als 50 % der Ausgangsaktivität abfielen (29). Die 50 %-Grenze unterschritten FVIII und vWF in der vorliegenden Studie am 10. bzw. 21. Lagerungstag, im Gegensatz zum 7. bzw. 24. Lagerungstag (29). Ein direkter Vergleich ist jedoch nicht möglich. Bedingt ist dies durch unterschiedliche Definitionen. Der Autor dieser Studie definierte die Unterschreitung der 50 %-Schwelle (im Vergleich zur Ausgangsaktivität) durch den Abfall des Durchschnittswertes der Faktoraktivitäten des Lagerungstages unter besagte Grenze. Die Arbeitsgruppe um Cooper hingegen legte die Unterschreitung eines absoluten 50 %-Wertes durch das unter Ende des 95 %-Konfidenzintervalls des Mittelwertes fest (29). Allerdings können die 50 %-Werte trotzdem annäherungsweise miteinander verglichen werden, weil die Messwerte von Cooper et al. (29) am Einlagerungstag in der nicht-Greyhound-Gruppe, sehr genau um 100 % Aktivität liegen. Folglich stellt die 50 %-Grenze näherungsweise eine 50 %-Ausgangsaktivitätsgrenze dar. Entsprechend des 95 %-Konfidenzintervalls als Marker erreichen die Werte von Cooper früher die 50 %-Schwelle, was auch eine höhere Sicherheit im Hinblick auf die spätere Verwendbarkeit einbaut. Hinzu kommt bei FVIII die Tatsache, dass sich der Mittelwert der Faktoraktivitäten bereits am 5. Lagerungstag dem Grenzwert stark annäherte (ca. 54 % der Ausgangsaktivität), eine erneute Beprobung aber erst am 10. Lagerungstag stattfand. Folglich könnte ein früherer Abfall unter den Grenzwert, wie er durch eine frühere Beprobung bei Cooper et al. am 7. Lagerungstag festgestellt werden konnte, übersehen worden sein. Der frühere Abfall des vWF ist hingegen wahrscheinlich auf die hohen Ausgangsaktivitäten der vWF-Messungen zurückzuführen, die ihrerseits wahrscheinlich Folge der hoch angelegten Qualitätskontrolle im Normalbereich waren. Ein signifikanter Abfall von FVII im Laufe der Lagerungsdauer, wie in der vorliegenden Arbeit, fand sich in der vorliegenden Literatur nicht durchgängig. So konnte in einer Studie (29) kein Abfall detektiert werden. In einer anderen Studie (30) fand sich wiederum ein Abfall. Allerdings ist der Abfall in den vorliegenden Untersuchungen bezogen auf die Lagerungsdauer nur transient, gering und zeigt an den beiden Tagen mit signifikantem Unterschied nur eine niedrige Signifikanz, weshalb der Effekt wahrscheinlich zu vernachlässigen ist. Ebenso sind variable Ergebnisse hinsichtlich der Lagerung von Fib beschrieben. In unserer Untersuchung fand sich, wie bei Cooper (29) und Stefani (30), ein Abfall des Fibrin über die Zeit, der

analog zu erstgenannter Studie am Ende der Lagerungsdauer auftrat. Edwards (28) fand hingegen während einer 28-tägigen Lagerung keinen Abfall.

Der Anstieg der Gerinnungszeiten PT und aPTT entspricht ebenfalls den in der Literatur veröffentlichten Ergebnissen, die jeweils einen Anstieg über die Zeit zeigen konnten (28–30). Der Verlauf der Signifikanz der PT deckt sich hierbei mit den Ergebnissen von Edwards et al., der ebenfalls einen signifikanten Anstieg an den Tagen der Beprobung ab Tag 21 der Lagerung finden konnte (28). Allerdings zeigte sich in der vorliegenden Arbeit die aPTT zwar am 15. Lagerungstag signifikant erhöht, im weiteren Verlauf aber nicht mehr. Weshalb insbesondere aufgrund der deutlich ausgeprägteren Variabilität in der VB-PAGGS-Gruppe an Tag fünfzehn der Lagerung, für die keine Ursache gefunden werden konnte (s. 4.2 Einfluss des verwendeten Antikoagulans bzw. der Additivilösung), sowie der Transienz des Ergebnisses möglicherweise von einem nicht tatsächlichen vorliegenden Effekt ausgegangen werden muss. Dieser mögliche Unterschied zwischen den bereits publizierten Studien und der vorliegenden Arbeit könnte auf die unterschiedlichen Sensitivitäten der verwendeten Assays (29, 30) oder aber eine unterschiedliche Konservierung der FVIII-Aktivität (28–30) zurückzuführen sein. So kühlten die vorgenannten Autoren ihre Blutbeutel schneller mit 4 °C, was ggf. eine reduzierte FVIII-Aktivität im Vergleich zu unserer Studie und somit eine höhere aPTT bedingen könnte (s. 2.4 Hämostatische Aktivität des Plasmaanteils von kaninem konservierten Vollblut). Dies könnte zu dem oben angegebenen Unterschied in den FVIII-Aktivitäten passen. Die niedrige Sensitivität der Gerinnungszeiten bedingt allgemein, dass diese nur eingeschränkt für die Überprüfung der Qualität der plasmatischen Gerinnung von Vollblutkonserven über die Zeit geeignet sind. Zwar detektieren sie in Kombination die wesentlichen Veränderungen, zeigen aber weder deren Ausprägung korrekt (s. 4.2 Einfluss des verwendeten Antikoagulans bzw. der Additivilösung) noch den Abfall von FVIII zuverlässig an. Allerdings ist die unterschiedliche Sensitivität von Reagenzien für die aPTT bekannt (s. 2.2.2.1 Screeningtests), weshalb andere Reagenzien hier möglicherweise bessere Ergebnisse erzielen könnten.

Zu den Aktivitäten der Inhibitoren der Hämostase, AT, PC und PS sowie des Fibrinolysemarkers DDIM in Vollblutkonserven finden sich bisher keine veterinärmedizinischen Arbeiten. Deshalb müssen zur Einordnung der vorliegenden Ergebnisse die entsprechende humanmedizinische Literatur sowie tiermedizinische Arbeiten zu Plasmaprodukten herangezogen werden.

AT zeigte in der vorliegenden Arbeit einen ab dem 28. Lagerungstag signifikanten, aber geringfügigen Abfall über die Dauer der Lagerung. Ein Rückgang der Aktivität konnte nach zwei Wochen ebenfalls in Vollblutkonserven von humanen Spendern nachvollzogen werden (602). Eine andere humanmedizinische Studie konnte hingegen zwar einen Abfall im Rahmen der 49-tägigen Lagerung feststellen, der aber nicht signifikant war (603). Entsprechend der offensichtlich guten Stabilität von AT

konnten zwei veterinärmedizinische Studien an „Liquid-Plasma“ (27) und „Thawed-Plasma“ (25) keinen signifikanten Abfall über sieben Tage bzw. einen Abfall erst nach 35 Lagerungstagen nachweisen.

Die humanmedizinischen Arbeiten weisen bezüglich des Rückgangs von PC deutlich geringe Werte auf. So zeigte sich in einer Studie ein Abfall von ca. 20 % während einer 21-tägigen Lagerung von Vollblutkonserven (604) und Bormann et al. (603) wiesen während einer 49-tägigen Lagerung keinen signifikanten Abfall nach. Die Ursache für diese Differenz ist unklar.

Die Datenlage zu PS in Vollblutkonserven ist sehr eingeschränkt. Eine humanmedizinische Studie von Huish et al. (605) aus dem Jahr 2019 konnte einen deutlichen Rückgang der PS-Messungen nachweisen, wobei der Rückgang bei der PS-Aktivität mit mehr als 50 % am 14. Lagerungstag stärker ausgeprägt war als die der PS-Antigen-Messung. Die Differenz führen die Autoren hierbei auf eine Inaktivierung von PS durch Thrombin oder eine Bindung an Erythrozyten zurück. Bis zum 35. Lagerungstag fand sich sogar ein Abfall der Aktivität auf < 10 % (Detektionslimit) (605). Somit war der Abfall in etwa wie in der vorliegenden Studie. Ungewöhnlich bleibt jedoch der nachgewiesene noch stärkere Abfall am 10. Lagerungstag. Dieser könnte hierbei auf Messvarianzen oder hypothetisch möglicherweise auf eine vermehrte Freisetzung von gebundenem PS nach dem initialen Abfall zurückzuführen sein.

Die über die Zeit stabilen DDIM in dieser Arbeit decken sich mit vorangegangenen Lagerungsstudien (27, 603, 606).

Die Ursachen der Abfälle der pro- und antikoagulatorischen Proteine in der vorliegenden Dissertation sind unklar. Hier werden weitere Studien benötigt. Denkbar wären als Ursache für den Rückgang der Aktivitäten/Gehalte z. B. eine Aktivierung der Gerinnung durch Kälte („cold activation“, Kälteaktivierung) (605), ein Abbau der Proteine (s. 4.2 Einfluss des verwendeten Antikoagulans bzw. der Additivlösung) oder ein Einfluss der nachgewiesenen lagerungsbedingten Abnahme des pH-Wertes in den Konserven (32, 607).

### **4.2 Einfluss des verwendeten Antikoagulans bzw. der Additivlösung**

Von Interesse sind neben den Einflüssen von Lagerungsdauer und Temperatur auch die verwendeten Antikoagulanzen bzw. Nährlösungen, mit denen das Vollblut während der Gewinnung versetzt wird. Es gibt keinen einheitlichen Konsensus über die Verwendung der vielen kommerziell verfügbaren Antikoagulanzen/Nährlösungen und somit auch keinen Standardzusatz für Vollblut, wobei häufig CPD verwendet wird (491). Hinzu kommt, dass die verwendeten Lösungen eigentlich zur Reduktion der Lagerungsschäden („storage lesion“) der Erythrozyten vorgesehen sind (608). Um einen idealen Zusatz

für Vollblut zu finden und Wirksamkeitsstudien durchführen zu können, muss hinsichtlich der Antikoagulanzen und ggf. Nährlösungen bzw. deren Inhaltsstoffen aber festgestellt werden, wie sich diese auf die einzelnen Blutkomponenten und somit auch die plasmatische Gerinnung auswirken. Aus diesem Grund sollte dieser Effekt auch in der vorliegenden Studie betrachtet werden. Die Hypothese bezüglich der beiden verwendeten Blutzusätze war, dass sich beim Vergleich der Messwerte der untersuchten Parameter der plasmatischen Gerinnung keine signifikanten Unterschiede zwischen der VB- und VB-PAGGS-Gruppe finden würden. Ausgenommen hiervon war FV aufgrund der in der VB-PAGGS-Gruppe höher zu erwartenden (s. 1. Einleitung) Aktivität. Die Hypothese war hierbei angelehnt an die Auswertung der Vorgängerarbeit (32) und die drei bereits erwähnten humanmedizinischen Studien (416, 491, 505), die nur geringfügige Unterschiede der plasmatischen Gerinnungsaktivität beim Vergleich unterschiedlicher Medien finden konnten. Umso weniger zu erwarten waren die deutlichen Unterschiede der Aktivitäten/Gehalte zwischen den beiden verglichenen Gruppen der gelagerten kaninen Vollblutkonserven.

Bei allen prokoagulatorischen Faktoren fand sich zu mindestens einem Zeitpunkt während der Lagerung ein signifikanter Unterschied zwischen den Aktivitäten/Gehalten der Faktoren der mit CPD bzw. CPD und PAGGS-M versetzten Vollblutkonserven. Die mit PAGGS-M-Additivlösung versetzten Konserven zeigten durchgängig niedrigere Werte. Die Lagerungstage mit einem signifikanten Unterschied verteilten sich hierbei häufig auf den Beginn sowie das Ende der Lagerungsdauer. Dies legt über den mittleren zeitlichen Verlauf eigentlich eine unterschiedliche Kinetik des Verlaufs nahe, die gegebenenfalls eine bessere Präservierung der Aktivität in den mit PAGGS-M versetzten Vollblutkonserven anzeigen könnte. Dies gilt insbesondere als zutreffend, sollte sich die Hypothese zum Verdünnungseffekt (s. u.) bestätigen. Allerdings konnte bei den prokoagulatorischen Faktoren mit Ausnahme von FVIII und des vWF in der statistischen Untersuchung kein entsprechend statistisch signifikanter Interaktionswert detektiert werden. Aufgrund der kleinen Probengröße scheint hier aber ein Fehler 2. Art möglich (609, 610). Die gegebenen Unterschiede zwischen den beiden Gruppen bei den prokoagulatorischen Proteinen sind überwiegend moderat, wobei sich die größten Unterschiede bei FIX und vWF fanden. Eine Substitution von Faktoren innerhalb des Zeitrahmens des Erhalts von 50 % der gemittelten Ausgangsaktivität ist auch mit den PAGGS-M versetzten Konserven möglich, jedoch bieten die ausschließlich mit CPD versetzten Konserven aufgrund der höheren Aktivitäten/Gehalte der prokoagulatorischen Proteine ein besseres hämostatisches Profil. Die vermutete Ausnahme bezüglich FV bestätigte sich in den Untersuchungen nur bedingt. Die FV-Aktivität war entgegen der Hypothese über weite Teile der Lagerung in der VB-PAGGS-Gruppe signifikant niedriger als in der VB-Gruppe, aber es fanden sich hier im Vergleich zu den übrigen prokoagulatorischen Parametern die geringsten absoluten Unterschiede an Prozentpunkten der Aktivität. Dies könnte auf relativ gesehen geringfügig erhöhte Werte in den VB-PAGGS-Konserven hindeuten, insbesondere, da sich die Differenzen zwischen

den beiden Gruppen am Einlagerungstag im Größenrahmen eines möglichen Verdünnungseffekts (s. u.) befanden.

Die inhibitorischen Proteine AT und PC zeigten im Vergleich zu den prokoagulatorischen Proteinen ähnliche Verhältnisse zwischen den beiden Medien. Wobei sie noch frequenter niedrigere Ergebnisse in der VB-PAGGS-M-Gruppe zeigten. So fanden sich nur an Tag 5 keine signifikanten Unterschiede. Auch hier waren die absoluten Unterschiede gering (PC) bis moderat (AT). PS hingegen zeigte zwischen den Medien keine signifikanten Unterschiede über die Lagerungsdauer. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass PC und AT noch stärker als die prokoagulatorischen Faktoren durch die Lagerung mit Zusatz von PAGGS-M negativ beeinflusst werden.

Der Fibrinolysemarker DDIM zeigte während der Lagerung keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Allerdings fiel eine höhere Variabilität der Messungen in der Gruppe VB, bedingt durch vereinzelte hohe Werte (besonders an Tag 21 und 28) auf. Die erhöhte Variabilität könnte als Hinweis auf eine Aktivierung der Gerinnung in vereinzelten Pools interpretiert werden (611). In diesem Sinne wäre ggf. die Verwendung/Etablierung eines sensitiveren Markers der Fibrinolyse in weiteren Studien von Interesse, um auch sehr dezente Unterschiede zu demonstrieren. Alternativ wären größere Gruppengrößen eine Option.

Die PT war über fast die gesamte Lagerungszeit (mit Ausnahme der durch die Annäherung der Messwerte am fünften Lagerungstag bedingten fehlenden signifikanten Unterschied) in der VB-PAGGS-Gruppe gegenüber der VB-Gruppe signifikant verlängert. Darüber hinaus war die Streuung der Messwerte in der VB-PAGGS-Gruppe höher. Die höheren Werte der PT in den VB-PAGGS-Konserven lassen sich auf die niedrigeren Faktorenaktivitäten zurückführen. Allerdings zeigt sich hierbei die recht niedrige, vom verwendeten Test abhängige Sensitivität für Faktorverminderungen (612, 613) durch die prozentual deutlich geringere Abweichung der Größenordnung zum Aktivitätsabfall der Faktoren. Dies wird nochmal durch den erst zum Ende der Lagerung hin signifikanten Anstieg (s. 3.2.2.3.1 Prothrombinzeit und 4.1 Einfluss des zeitlichen Verlaufs der Lagerung) unterstrichen. Die erhöhte Streuung der Messwerte der VB-PAGGS-Gruppe lässt sich hiermit jedoch nicht erklären, da sich diese bei den Faktoraktivitäten nicht findet. Eine Beeinflussung des PT-Reagenzes durch PAGGS-M mit einem daraus resultierenden CV ist in diesem Zusammenhang denkbar.

Die aPTT zeigte hingegen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Medien, trotz deren signifikanten Differenzen in den Faktorgehalten. Dies ist wie bereits zuvor aufgeführt auf die mangelnde Sensitivität der aPTT zurückzuführen. Die erhöhten Messvariabilitäten der VB-PAGGS-Gruppe am 15. Tag bzw. der VB-Gruppe an Tag 21 der Lagerung haben wahrscheinlich unterschiedliche Ursachen. Bei den Abweichungen an Tag 21 zeigten sich analog bei den Bestimmungen der prokoagulatorischen

Faktoren, die Einfluss auf die aPTT haben (FIX, FVIII, FX, FV und Fib), vermehrte Messvariabilitäten in Richtung niedriger Messwerte. Denkbar hierfür wäre eine vorausgegangene Gerinnungsaktivierung, da die DDIM-Werte, wie oben beschrieben, hier einen Trend zum Anstieg zeigten. Die vermehrte Messvariabilität nach fünfzehn Lagerungstagen beruht auf einzelnen stark bis sehr stark verlängerten aPTT-Messungen. Gründe für diese hohen Messwerte konnten nicht identifiziert werden, da sich weder Abweichungen der Probenqualität noch erkennbare Messfehler feststellen ließen.

Die Ursache für den negativen Einfluss der Lagerung in PAGGS-M auf die pro- und antikoagulatorischen Faktoren ist unklar. Denkbar wären verschiedene Faktoren, einzeln oder in Kombination. In Frage kämen beispielsweise Unterschiede im pH-Wert der Konserven mit Beeinflussung der Aktivität der Faktoren (s. 4.1 Einfluss des zeitlichen Verlaufs der Lagerung). Zwar zeigten die Vollblutkonserven der VB-PAGGS-M-Gruppe in der Vorgängerstudie signifikant niedrigere pH-Werte als die VB-Gruppe, aber dies war durchgängig und zunehmend der Fall (32), weshalb dies nicht alleinig die variabel signifikanten Ergebnisse in dieser Studie erklärt. Eine weitere mögliche Ursache wäre ein höherer Abbau der pro- und antikoagulatorischen Proteine, wie anhand der Ammoniakmessungen der Daten von Lehmann (32, 394) vermutet werden kann. Allerdings zeigte sich auch hier ein nicht passendes kontinuierliches und zunehmendes Muster. Ebenso wenig kann der Unterschied mit einer vermehrten standardmäßigen Aktivierung der Gerinnung erklärt werden, da sich wie oben beschrieben keine statistisch signifikanten Anhaltspunkte eines Unterschieds des Fibrinolysemarkers DDIM fanden. Die dezenten Hinweise auf eine Gerinnungsaktivierung in der VB-Gruppe würden sich gegenteilig zum beobachteten Trend auswirken. Der wichtigste, zu diskutierende Faktor ist der Verdünnungseffekt. Gründe für den diesen bedingenden Versuchsaufbau werden in 5. Limitationen ausführlich diskutiert. In Frage kommt dieser Faktor insbesondere, da der Unterschied der Ausgangsaktivitäten beider Gruppen zueinander (ca. 23 – 27 %) annähernd der prozentualen Verdünnung durch die Zugabe von PAGGS-M (ca. 22 %) entspricht. Abweichende Ergebnisse zeigten hierbei FVIII (ca. 37 %), vWF (ca. 50 %), Fib (ca. 30 %) und PS (ca. -19 %), sodass bei ersten drei von zusätzlichen Mechanismen auszugehen ist. Der höhere, wenn auch nicht statistisch signifikante PS-Wert lässt sich nicht mit der Verdünnungshypothese erklären. Hier wäre ein Einfluss durch seinen teils gebundenen Zustand denkbar. Ebenso sollte auch der Verdünnungseffekt konstante Abweichungen erzeugen, sodass generell von einem multifaktoriellen Geschehen oder auch hier einem Fehler 2. Art auszugehen ist. Ein weiterer zu diskutierender Punkt ist die bereits oben erwähnten (s. 4.1 Einfluss des zeitlichen Verlaufs der Lagerung) Kälteaktivierung, bei der sich Unterschiede zwischen den Medien zeigen könnten.

Insgesamt werden weitere Studien zur Untersuchung des Einflusses von Antikoagulanzen/Nährmedien auf Lagerungsschäden von zellulären und flüssigen Bestandteilen des Vollblutes benötigt. Einerseits um ein Nährmedium zu finden, das mit seinen Eigenschaften allen Blutbestandteilen hinsichtlich ihres

bevorzugten Milieus gerecht wird und entsprechend keine/zu vernachlässigende negativen/e Auswirkungen auf einzelne Vollblutbestandteile hat. Andererseits, um die Ursachen etwaiger negativer wie positiver Einflüsse aufzudecken.

### 4.3 Inter-Assay Variationskoeffizient

Die Inter-Assay Variabilität wurde zwar im Rahmen der Untersuchungen als Beiprodukt generiert, stellt aber einen wichtigen Qualitätsmaßstab dar. So erlaubt sie alleinig oder als Teil des  $TE_{obs}$  in Relation zum  $TE_a$  die Akzeptabilität der Messungen sowie deren Beurteilbarkeit einzuschätzen (255). Dies ist wichtig, weil hohe CV-Werte Aussagen über den genauen Verlust an Faktoraktivität erschweren, da es zu Interferenzen mit der Größenordnung kommt. Dies ist umso wichtiger, weil der Effekt durch kleine Gruppengröße, wie in der vorliegenden Studie, verstärkt wird (15). In der veterinärmedizinischen Literatur gibt es zum Zeitpunkt der Erstellung dieser Dissertation allerdings keine auf Expertenmeinungen basierenden publizierten  $TE_a$ s für die in unserer Arbeitsgruppe neu etablierten Koagulationsparameter, FV, FVII, FIX, FX und vWF. Ebenso fehlt es an Studien zu deren biologischer Variabilität bei Hunden und publizierten klinischen Entscheidungsgrenzen. Klinische Entscheidungsgrenzwerte sind bei diesen Parametern schwierig festzusetzen, da Messungen von Einzelfaktoren dem klinischen Kontext entsprechend nicht bei Tieren mit normaler oder leicht reduzierter Hämostase durchgeführt werden. Der Einsatz beschränkt sich hingegen in aller Regel auf den Verdacht auf angeborene Gerinnungsstörungen, bei denen im Allgemeinen (sehr) niedrige Aktivitäten/Werte gemessen werden (295, 471), weshalb Beurteilungen des Grenzbereiches zwischen physiologischen und pathologischen Werten bei den Faktorenbestimmungen erschwert sind. Aus diesem Grund muss für die Interpretation der CV-Werte auf für die Analyten publizierte CVs in der veterinärmedizinischen Literatur sowie CVs und  $TE_a$ s aus der Humanmedizin zurückgegriffen werden. Eine entsprechende Gegenüberstellung findet sich für die Werte im physiologischen (Tabelle 4) und pathologischen (Tabelle 5) Bereich im Folgenden. Die humanmedizinischen Angaben dürfen hierbei nur als Orientierung gesehen werden. Zum einen da möglicherweise unterschiedliche Matrixeffekte (Probeneigenschaften unabhängig von der gemessenen Variable) beim Vergleich von menschlichem und tierischen Plasma bestehen (292) und zum anderen, weil Hunde, wie oben bereits erwähnt (s. 2.1.2 Sekundäre Hämostase), im Vergleich zum Menschen deutlich höhere FV- und FVIII-Aktivitäten aufweisen. Beides könnte erheblichen Einfluss auf die Performance der Assays haben.

#### 4. Diskussion

Parameter	SD N-Kontrolle (in %- Referenzaktivität)	CV physiol. Bereich (in %)	CV Cooper et al. (29) (in %)*	CV Chee et al. (26) (in %)**	CV Wardrop et al. (15) (in %)**	CV Herstellerrangabe (H. M.) (572, 573, 575, 576, 585) physiol. Bereich (in %)	CV Chen et al. (H. M.) (614) (in %)‡	TE <sub>s</sub> RCPA (H. M.) (615) (in %)	Abgeleitete Ziel-CV- Werte (H. M.) (in %)
FV	12,81	19,0	<15	<20	n. g.	6,4†	2,3	30	10
FVII	7,32	13,4	15,8	<20	15,3	4,9†	2,1	30	10
FIX	9,32	8,2	<15	<20	11,8	5,5†	4,0	30	10
FX	6,46	9,9	<15	<20	8,7	3,8†	1,7	30	10
vWF-Ag	28,25	25,7	15,9	<20	5,8	2,9†	n. g.	30	10

Tabelle 4: Gegenüberstellung von ermittelten SDs und Inter-Assay CVs der neu etablierten Parameter im physiologischen Bereich (N-Kontrolle) mit den entsprechenden, in der Literatur (drei veterinärmedizinische und eine humanmedizinische Studie) beschriebenen Inter-Assay CVs, der vom Hersteller angegebenen Inter-Assay CVs, publizierten TE<sub>s</sub>s sowie den daraus abgeleiteten Ziel-CV-Werten.

\* Verwendet wurde die humanmedizinische Normalkontrolle des Herstellers des Assays. Anzahl der Messungen und Replikate sind nicht bekannt.

\*\* Verwendet wurde eine FFP-Konserve eines gesunden Hundes (kein Greyhound). Anzahl der Messungen und Replikate sind nicht bekannt.

\*\*\* Verwendet wurde Poolplasma (CP2D-Plasma von fünf gesunden Hunden) für vWF und Citrat-Plasma (von zwanzig gesunden Hunden) für die Faktorenbestimmungen).

Anzahl der Messungen und Replikate sind nicht bekannt.

† „Within-laboratory precision“ CVs. Bei FV, VII und X wurden jeweils achtzig Messungen zur Bestimmung durchgeführt. Für FIX wurden über zwanzig Tage jeweils Duplikatmessungen durchgeführt. Das jeweilig verwendete Material wurde nicht spezifiziert.

‡ Zur Bestimmung wurden zehn Messungen durchgeführt.

‡ CV errechnet aus Replikatmessungen von zehn gesunden Probanden.

Abkürzungen: CP2D = Citrat-Phosphat-Doppeldextrose, CV = coefficient of variation (Variationskoeffizient), FFP = fresh-frozen plasma (gefrorenes Frischplasma), FV = Faktor V, FVII = Faktor VII, FIX = Faktor IX, FX = Faktor X, H. M. = Humanmedizin, n. g. = nicht gemessen (im Rahmen der Studie), N-Kontrolle = Normalkontrolle/kontrolle im physiologischen Bereich, physiol. = physiologisch, RCPA = The Royal College of Pathologists of Australasia, SD = standard deviation (Standardabweichung), TE<sub>s</sub> = allowable total error/total allowable error (zulässiger Gesamtfehler), vWF-Ag = Von-Willebrand-Faktor-Antigen.

#### 4. Diskussion

Parameter	SD 1 :2-Kontrolle (in %-Referenzaktivität)	CV pathol. Bereich (in %)	CV Herstellerausgabe (H. M.) (572, 573, 575, 576, 585) pathol. niedriger Bereich (in %)	TE <sub>a</sub> RCPA (H. M.) (615) (in %)	Abgeleitete Ziel-CV-Werte (H. M.) (in %)
FV	5,28	33,2	6,8†	30	10
FVII	4,42	19,5	5,6†	30	10
FIX	6,78	14,4	7,3†	30	10
FX	2,85	10,2	4,2†	30	10
VWF-Ag	13,86	25,7	4,4 <sup>‡</sup>	30	10

Tabelle 5: Gegenüberstellung von ermittelten SDs und Inter-Assay CVs der neu etablierten Parameter im pathologischen Bereich (1 :2-Kontrolle) mit den vom Hersteller angegebenen Inter-Assay CVs, publizierten TE<sub>a</sub>s sowie den daraus abgeleiteten Ziel-CV-Werten.

† „Within-laboratory precision“ CVs. Bei FV, VII und X wurden jeweils achtzig Messungen zur Bestimmung durchgeführt. Für FIX wurden über zwanzig Tage jeweils Duplikatsmessungen durchgeführt. Das jeweilig verwendete Material wurde nicht spezifiziert.

<sup>‡</sup> Zur Bestimmung wurden zehn Messungen durchgeführt.

Abkürzungen: 1 :2-Kontrolle = niedrige Kontrolle/Kontrolle im pathologischen Bereich, CV = coefficient of variation (Variationskoeffizient), FV = Faktor V, FVII = Faktor VII, FIX = Faktor IX, FX = Faktor X, H. M. = Humanmedizin, pathol. = pathologisch, RCPA = The Royal College of Pathologists of Australasia, SD = standard deviation (Standardabweichung), TE<sub>a</sub> = allowable total error/total allowable error (zulässiger Gesamtfehler), vWF-Ag = Von-Willebrand-Faktor-Antigen.

Die Performance der in unserem Haus neu etablierten Assays ist insgesamt akzeptabel. Die Faktoren VII, IX und X zeigen geringe Inter-Assay Variabilitäten im physiologischen Bereich, die mit Ausnahme von FX im Vergleich zu einer Studie (15) unterhalb der in der veterinärmedizinischen Literatur publizierten CV-Werte liegen. Zusätzlich ist der Unterschied zwischen dem in der vorliegenden Arbeit bestimmten und dem CV aus der Studie von Wardrop et al. für FX nur gering, sodass man von einer ähnlichen Größenordnung sprechen kann. Trotzdem sind die ermittelten CVs für die Faktoren VII, IX und X deutlich höher als die aufgeführten Werte aus einer humanmedizinischen Arbeit (614) und den Angaben des Herstellers (573, 575, 576). Bezüglich der Differenzen zwischen den humanmedizinischen Angaben von Chen et al. und den Angaben des Herstellers sei darauf verwiesen, dass es sich bei den vom Hersteller reportierten Werten nicht nur um die Inter-Assay Variabilität, sondern um eine „Within-laboratory“-Variabilität handelt, die auch Replikationsmessungen umfasst (616). Entsprechend sind bei der „Within-laboratory“-Variabilität generell höhere Werte zu erwarten.

Die Unterschiede zwischen den veterinärmedizinisch und humanmedizinisch beschriebenen CVs könnten hingegen z. B. auf etwaige Unterschiede zwischen den betrachteten Spezies (s. 2.1.2 Sekundäre Hämostase und 3.1.4.3 Vorbereitung der bisher nicht etablierten Tests) oder aber auf eine bessere analytische Diagnostik zurückzuführen sein. Letzteres erscheint möglich, da humanmedizinische Gerinnungslabore mehr Erfahrung mit der Durchführung der Tests und humanspezifische, kommerziell verfügbare Qualitätskontrollen zur Verfügung haben. Nichtsdestotrotz liegen die von uns für FVII, FIX und FX bestimmten CV-Werte nah an den mit Hilfe der Leitlinien der American Society for Veterinary Clinical Pathology (ASVCP) (255), von den TE<sub>a,s</sub>-Empfehlungen des Royal Colleges of Pathologists of Australasia (RCPA) (615) abgeleiteten Ziel-CV-Werten. FIX und FX erfüllen diese, FX liegt trotz Speziesunterschied nur geringgradig darüber. Im pathologisch niedrigen Bereich haben FVII, FIX und FX höhere CV-Werte. Ein Vergleich mit anderen publizierten Daten fällt hier schwer, da in den zuvor herangezogenen veterinärmedizinischen Studien von Cooper et al. (29), Chee et al. (26) sowie Wardrop et al. (15) keine CVs für niedrige Messbereiche bestimmt/angegeben wurden. Ebenso gibt die oben genannte humanmedizinische Studie keine entsprechenden CVs an, sodass nur ein Vergleich mit den Angaben des Herstellers und den von den empfohlenen TE<sub>a,s</sub> abgeleiteten Werten möglich ist. Hierbei zeigen FVII, FIX und FX höhere Abweichungen zu den Angaben des Herstellers und lediglich FX ist nur geringfügig über den Ziel-CV-Wert erhöht, wohingegen beide anderen Parameter deutlich höher sind als dieser. Beide Veränderungen deuten darauf hin, dass die Präzision der Messungen bei abnehmender Faktoraktivität in der Probe nachlässt. Ein bekanntes Phänomen, welches auch durch abweichende TE<sub>a,s</sub> (ca. 30 – 300 %) im sehr niedrigen Messbereich in den Empfehlungen des RCPAs (615) deutlich wird. Zwar haben die niedrig pathologischen Messungen nicht in diesem Bereich stattgefunden, doch wurde z. B. bei FVII die Bestimmung des CVs des pathologisch

niedrigen Bereiches deutlich unterhalb der Größenordnung der Versuchsanordnung des Herstellers durchgeführt, was die Zunahme von Abweichungen wahrscheinlich macht.

Im Vergleich zu den oben genannten Parametern zeigten FV und vWF-Ag in den Messungen deutlich höhere CVs. FV hatte in der vorliegenden Untersuchung den höchsten CV der neu etablierten klassischen Gerinnungsfaktoren im physiologischen wie auch im pathologisch niedrigen Messbereich. Entsprechend fanden sich bei FV sowohl im physiologischen als auch pathologisch niedrigen Messbereich große Abweichungen zu den humanmedizinisch beschriebenen CV-Werten, die etwas ausgeprägter ausfielen als bei den anderen Faktoren. Sehr ausgeprägt war insbesondere im pathologisch niedrigen Bereich die Überschreitung des CV-Zielwertes. Trotzdem lag der CV von FV zumindest im physiologischen Messbereich im veterinärmedizinisch beschriebenen Rahmen bis 20 % (26). Eine entscheidende Ursache für die hohen CVs von FV ist ein Abfall der gemessenen Aktivität des Kontrollplasmas im Verlauf des Messzeitraums. Besonders betont war dieser Abfall im physiologischen Messbereich. Der Abfall ist hierbei vermutlich nicht durch eine tatsächliche Reduktion der Aktivität des Kontrollpoolplasmas bedingt, da der Messzeitraum in Bezug auf die oben beschriebene Haltbarkeit des Poolplasmas (s. 3.1.4.1 Vorbereitung der Proben) kurz war. Wahrscheinlicher erscheint eine Interferenz durch unterschiedliche Chargen der Reagenzien, die im Verlauf der Messungen nötig waren. Der Abfall zeigt sich bei allen Faktoren, ist aber bei FV und dem vWF-Ag besonders ausgeprägt. Ein solcher Effekt ist im Verlauf von Faktormessungen bereits angegeben worden (29, 591). Eine weitere Komponente des hohen CV im pathologisch niedrigen Bereich ist, wie bei FVII, die Lage der 1:2-Kontrolle in einem sehr niedrigen Bereich, was die Präzision zusätzlich niedriger erscheinen lässt. Wie zuvor erwähnt zeigt das vWF-Ag ebenso einen Abfall der gemessenen Aktivitäten der Qualitätskontrollen (in der unverdünnten Poolplasmakontrolle am ausgeprägtesten), dieser ist jedoch von allen gemessenen Parametern am höchsten. Dies dürfte den Hauptgrund für die starken Abweichungen von den reportierten CV-Werten sein und erklären, weshalb der vWF der einzige Parameter war, der sich weder innerhalb des Ziel-CV-Wertes noch in den zuvor publizierten veterinärmedizinischen CVs bewegte. Allerdings ist die Größenordnung des CVs nicht deutlich über den zuvor reportierten Werten. Hinzu kommt, dass er als einziger Parameter sowohl in der N- als auch 1:2-Kontrolle in einer Größenordnung rangierte, die deutlich über den Versuchsaufbauten des Herstellers und den bei den zuvor publizierten veterinärmedizinischen Daten zu erwartenden Messwerten lag. Auch diese hohen Werte können die Streuung der Messwerte und damit den CV erhöhen.

Insgesamt ist die Performance aller Parameter aber, wie oben erwähnt, als mindestens akzeptabel eingeschätzt worden, da die Größenordnungen der CVs bei allen Parametern nah genug an den Literaturwerten lagen und nicht zu erwarten ist, dass die Höhe der CVs ausreichte, um ausgeprägte Abfälle der Faktorenaktivitäten/-gehalte über die Zeit oder Medienunterschiede zu kaschieren.

Zur Verbesserung der Präzision könnte eine weitergehende Standardisierung der Messbedingungen sinnvoll sein. Des Weiteren sollten etwaige Fehlerquellen gesucht und behoben werden. Um die Aussagekraft der CV-Werte zu erhöhen, könnte eine erneute/weitergehende Bestimmung mit mehr Wiederholungen erfolgen, wie sie von den entsprechenden Organisationen empfohlen wird (s. 3.1.4.6 Inter-Assay Variabilität). Im gleichen Rahmen könnten tägliche Replikationsmessungen durchgeführt werden, die auch die Bestimmung einer „Within-laboratory“-Präzision erlauben würde. Des Weiteren wären Studien zur biologischen Variabilität der Faktoren und Festlegung Spezies-spezifischer TE<sub>a</sub>s eine weitere Maßnahme zur besseren Beurteilung der Akzeptabilität der Laborperformance.

### 5. Limitationen

Die vorliegende Studie weist Limitationen auf, welche zum Großteil analog zu den Limitationen der Vorgängerstudie sind (32). Dies ergibt sich durch den bis zur Probenentnahme gleichen Versuchsaufbau.

In der vorliegenden Studie kam eine recht monomorphe Hundepopulation für die Probensammlung zum Einsatz. Ursächlich hierfür ist ein hoher Anteil von Zuchttieren im Spenderpool der Klinik für Kleintiere. Am häufigsten waren hierbei Deutsche Schäferhunde (ca. 44,4 %) vertreten. Dies ist von Bedeutung, da sich physiologische Variationen der Gerinnungsaktivität bei gewissen Rassen finden. So kommen nebst den interindividuellen physiologischen Variationen in der Gerinnungsaktivität Besonderheiten z. B. bei Greyhounds vor (29, 450). Ausführliche Untersuchungen zu verschiedenen Hunderassen fehlen allerdings, weshalb entsprechende Einflüsse nicht ausgeschlossen werden können. Weitere Untersuchungen zum Einfluss unterschiedlicher Hunderassen auf die plasmatische Gerinnungsaktivität sind dementsprechend nötig. Auch sind bei Deutschen Schäferhunden verschiedene hereditäre Gerinnungsstörungen beschrieben (617–620). Insbesondere bei der Hämophilie A sowie der von-Willebrand-Erkrankung wiesen Populationen Deutscher Schäferhund früher teils hohe Inzidenzen auf (617, 618). Hinweise auf derartige Gerinnungsstörungen hätten sich allerdings in den von uns durchgeführten Untersuchungen gefunden, sodass von keiner Verfälschung auszugehen ist. Die Hundepopulation ähnelte insgesamt der Hundepopulationen einer anderen Arbeitsgruppe im Bereich der Lagerung von Blutkonserven, die einen hohen Anteil an Diensthunden aufweist (28).

Wie bereits in der vorhergehenden Studie diskutiert, wurde die Zugabe der Nährlösung PAGGS-M zu dem bereits mit CPD antikoagulierten Blut so durchgeführt, dass das Mischungsverhältnis dem einer Konserve mit vorgelegtem PAGGS-M entsprechen würde. Dies stellte eine realitätsnahe Vorgehensweise dar, da die Konserven so einem etwaig reell verfügbaren Äquivalent entsprechen. Dies bedingt allerdings die Verdünnung der Proben. Um entsprechend nur den Effekt der Antikoagulanzen/Nährlösungen ohne den Effekt der Verdünnung miteinander zu vergleichen, hätte wahlweise das Mischungsverhältnis angepasst oder die VB-Gruppe mit einer entsprechenden Menge Flüssigkeit gespiked werden müssen (32).

Während der Gewinnung der Untersuchungsproben wurden die Transferbeutel wiederholt der Raumtemperatur ausgesetzt, was für eine begrenzte Erwärmung des konservierten Blutes sorgte (32). Eine negative Beeinflussung der Gerinnungsaktivitäten im Sinne eines schnelleren Abbaus der Faktoren wäre hierdurch möglich gewesen. Trotzdem schien dies unwahrscheinlich, da in einer Studie an Vollblutkonserven eine wöchentliche vierstündige Inkubation bei 28 °C zu keiner negativen

Beeinflussung im Vergleich zur durchgängig bei 4 °C gekühlten Kontrollgruppe führte. Überprüft wurden in diesem Zusammenhang die FVIII-Aktivität, der Fib-Gehalt, die PT sowie TEG-Parameter der von Menschen gewonnenen Blutkonserven (490). Die Exposition der Gruppen VB und VB-PAGGS unterschied sich nicht, sodass sich selbst bei einer potenziellen Beeinflussung keine Beeinträchtigung des Gruppenvergleichs ergeben haben sollte (32). Allerdings könnte das geringfügig größere Volumen der VB-PAGGS-Transferbeutel und somit das erhöhte Volumen zu Oberflächen Verhältnis zu einer positiven, geringeren Erwärmung geführt haben. Dies legt u. a. eine humanmedizinische Studie nahe, die die Taugeschwindigkeit von FFP-Konserven im Vergleich zweier Oberflächengrößenordnungen untersuchte (621). Jedoch kann ebenso anhand der Studie von Podlasek et al. (621) hypothetisiert werden, dass das durch die Entnahme von Blut über den Verlauf der Studie sinkende Volumen-Oberflächen-Verhältnis zu einer stärkeren Erwärmung bei den Manipulationen zum Ende der Lagerung hin geführt haben könnte. Diese vermehrte Erwärmung könnte den Abfall der Faktorenaktivitäten am Ende der Lagerung übermäßig verstärkt haben. In weiteren Studien zur Gerinnungsaktivität von Vollblut sollte entsprechend mit großvolumigeren Konserven gearbeitet werden, um diese Einflüsse zu minimieren. Ebenso wurde bereits hypothetisiert, dass die häufige Beprobung von Vollblutkonserven und die damit einhergehende zusätzliche Agitation und evtl. Gaszufuhr einen Einfluss auf die Gerinnungsaktivität haben könnte, weshalb Konserven mit ausschließlicher Beprobung am Ende der Lagerung erwogen werden sollten, um derartige Effekte aufzudecken (29).

Eine weitere Limitation lag in der nötigen Zensierung der Daten. Ursächlich war ein komplett zufälliges Fehlen der Proben. Das Fehlen von zwei Proben desselben Pools und Lagerungstages scheint zwar für diese ein vollständig zufälliges Fehlen unwahrscheinlich zu machen, doch die Proben konnten im Anschluss an die Messungen wiedergefunden werden. Dies schloss einen systematischen Entnahmefehler aus. Trotz alledem war eine Messung der Proben aufgrund von Kostengründen nicht mehr möglich. Entsprechend konnten von den jeweiligen Proben keine Messwerte gewonnen werden, was die Zensierung nötig machte. Eine Zensierung kann theoretisch einen Bias einführen. Jedoch ist dies insbesondere bei einem fallweisen Ausschluss („listwise deletion“) bei einem komplett zufälligen Fehler nicht gegeben (622). Die Substitution durch den Mittelwert („mean imputation“) wurde trotz der Gefahr eines Bias aufgrund ihrer Einfachheit und der verhältnismäßig geringen Mengen an fehlenden Daten verwendet.

Die Daten zur Berechnung der Inter-Assay Variabilität umfassten nicht die mindestens empfohlenen zwanzig Messungen pro Level (255), wie anhand der Daten in Tabelle 2 und Tabelle 3 deutlich wird. Die Abweichung ergab sich hierbei durch mehrere Faktoren. Zum einen wurden die asservierten Proben in größeren Gruppen gemessen, wodurch sich weniger Messtage und somit weniger als die mindestens empfohlenen zwanzig Messungen an Qualitätskontrollmaterial ergaben. Zum anderen waren

zusätzliche Messungen, ebenso wie die tägliche Messung beider Stufen der Qualitätskontrolle an jedem Tag für jeden Parameter aus Kostengründen nicht möglich. Aus demselben Grund erfolgte keine Bestimmung der Intra-Assay Variabilität. Erschwert wurde die geringere Anzahl an Qualitätskontrollmessungen zusätzlich durch einen Verlust von Qualitätskontrolldaten durch einen Datenbankfehler. Allerdings findet sich eine Unterschreitung der empfohlenen zwanzig Messungen auch in anderen Arbeiten zur Hämostasediagnostik (Range fünf bis zwanzig Messwiederholungen) (561, 623) sowie einer entsprechenden Empfehlung aus dem Bereich der Hämatologie (590). Zudem konnte eine Studie aus dem Jahr 2020 aufzeigen, dass eine tägliche Messung einer Qualitätskontrolle über fünf Tage keine signifikanten Unterschiede im CV der Inter-Assay Variabilität im Vergleich zum selben Vorgehen über zwanzig Tage zeigte, was abweichende Protokolle zu den oben genannten Empfehlungen möglich macht. Allerdings galt dieser fehlende Unterschied nicht beim Einsatz von Poolplasma (624).

### 6. Schlussfolgerung

Wie anhand der zeitlichen Verläufe der Aktivitäten/Gehalte und des Fibrinolysemarkers DDIM deutlich wird, ist die Haltbarkeit der pro- und antikoagulatorischen Faktoren bis Tag fünfzehn mehrheitlich gegeben, womit die festgelegte Qualitätsrichtlinie teilweise erfüllt wird. Wie zuvor aufgezeigt, sind viele der oben genannten Inhaltsstoffe darüber hinaus sogar bis zum Ende der 28-tägigen Lagerungsdauer, gemäß der Qualitätsrichtlinie, ausreichend vorhanden. Somit stellt der Plasmaanteil von entsprechend gelagerten Vollblutkonserven in diesem Zeitraum eine gute Alternative zu anderen Plasmaprodukten wie FFP dar. Sollte der Fokus des therapeutischen Einsatzes des Plasmaanteils hingegen auf der Substitution von FVIII oder PS liegen, sind die entsprechend kürzeren Haltbarkeiten zu berücksichtigen und gegebenenfalls eine kurz gelagerte Konserve oder alternative Produkte zu verwenden.

PAGGS-M als Additivlösung zeigt im Vergleich zu Standard CPD-Konserven einen negativen Einfluss auf die Haltbarkeit der prokoagulatorischen und antikoagulatorischen Faktoren, weshalb der Plasmaanteil von derartig aufbereiteten Vollblutkonserven zur Substitution der oben genannten Bestandteile möglichst vermieden werden sollte, auch wenn die Unterschiede der Aktivitäten bzw. Gehalte zwar signifikant niedriger, aber gering sind. Zur Substitution von PS können die VB-PAGGS-Konserven hingegen verwendet werden.

Welche Ursachen den verringerten Haltbarkeiten zwischen den Gruppen und über die Zeit zu Grunde liegen, ist unklar. Hier werden weitere Studien benötigt.

## 7. Zusammenfassung

Die tiermedizinische Literatur zur Aktivität bzw. zum Gehalt von hämostatisch aktiven Proteinen im Plasmaanteil von kühl gelagerten Vollblutkonserven ist unzureichend, um Empfehlungen hinsichtlich des klinischen Einsatzes dieser Blutproduktkomponente als Ersatz für Plasmaprodukte zu geben. Ebenso ist unklar, ob es hämostatisch äquivalent zu frischem Vollblut ist. Insbesondere Proteine der Fibrinolyse wurden hierbei bisher nicht betrachtet. Auch fehlt die Betrachtung bei Einsatz unterschiedlicher Antikoagulanzen/Additivlösungen, was aufgrund der in der Veterinärmedizin bekannten Einflüsse auf die zellulären Bestandteile des Vollblutes und der in der Humanmedizin nachgewiesenen Veränderungen im Plasma von Interesse ist. Aus diesem Grund sollte die vorliegende Arbeit den Einfluss der Lagerungsdauer auf Aktivitäten bzw. Gehalte der prokoagulatorischen und antikoagulatorischen Faktoren bzw. Fibrinolysemarker des Plasmaanteils von Vollblutkonserven während einer 28-tägigen Lagerung bei 4 °C untersuchen. Darüber hinaus sollte der Einfluss zweier Antikoagulantien/Additivlösungen (Citrat-Phosphat-Dextrose (CPD)/Phosphat, Adenin, Glukose, Guanosin, Kochsalzlösung und Mannitol (PAGGS-M) auf die hämostatisch aktiven Proteine betrachtet werden. Die Hypothese bezüglich der Lagerungsdauer war, dass der Gehalt bzw. die Aktivität der hämostatisch aktiven Proteine an Tag fünfzehn der Lagerung über oder gleich fünfzig Prozent des Ausgangswertes liegen sollte. Darüber hinaus wurde von einem fehlenden signifikanten Unterschied der Gehalte bzw. Aktivitäten zwischen den unterschiedlich antikoagulierten/konservierten Konserven ausgegangen. Mit einer Ausnahme wurde hier bei Faktor V gerechnet. Die für die Untersuchungen benötigten Blutprodukte wurden während eines vorherigen, vom Regierungspräsidium genehmigten Dissertationsprojektes (V 54 - 19 c 20 15 h 02 Gl 18/17 kTV 16/2020) hergestellt. Hierzu wurden 21 Hunde aus dem Blutspenderpool der Klinik während einer Routineblutspende zwischen dem 13. Januar und 01. März 2021 rekrutiert. Ausgewählt wurden hierbei ausgewachsene Tiere zwischen einem und zehn Jahren, die bei physiologischem Body Condition Score ein Körpergewicht von mehr als 27 kg und einen ruhigen Habitus aufwiesen sowie entsprechend der Empfehlung der zuständigen Kommissionen/Fachgesellschaften geimpft und antiparasitär behandelt waren. Die Tiere wiesen darüber hinaus eine unauffällige Anamnese, klinische Untersuchung und Basislabordiagnostik auf. Trächtige Tiere, Tiere mit die Hämostase beeinflussenden Grunderkrankungen oder Tiere, die in ihrem Leben zuvor Blutprodukte erhalten haben, wurden ausgeschlossen. Auslandsaufenthalte wurden nach Abwägung zugelassen. Den Hunden wurden jeweils ca. 450 ml Blut entnommen und anschließend wurde das Blut von jeweils drei Tieren zu einem Pool kombiniert (220 ml je Tier). Aus den sieben Poolbeutel wurden anschließend je zweimal fünfzig Milliliter entnommen und in entsprechende Transferbeutel überführt. Einer der Transferbeutel wurde nicht weiterverarbeitet und stellte den Beutel mit CPD (VB) dar. Wohingegen dem anderen Beutel zusätzlich elf Milliliter PAGGS-M zugesetzt wurden

(VB-PAGGS). Die Transferbeutel wurden anschließend für 28 Tage bei 4 °C aufrecht gelagert und alle zwei Tage mehrfach geschwenkt. Probenentnahmen zur Gewinnung des Plasmaanteils zu Analysezwecken für die vorliegende Arbeit fanden nach null, einem, drei, fünf, zehn, fünfzehn, 21 und 28 Tagen statt. Aus den zuvor bei -80 °C gelagerten Proben wurden anschließend prokoagulatorische Faktoren (Faktor V (FV), VII (FVII), VIII (FVIII), IX (FIX), X (FX); Fibrinogen (Fib) und Von-Willebrand-Faktor-Antigen (vWF-Ag)), Gerinnungsinhibitoren und Fibrinolysemarker (Antithrombin (AT), Protein C (PC), Protein S (PS), D-Dimere (DDIM)) sowie Gerinnungszeiten (Prothrombinzeit (PT) und aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT)) bestimmt. Verwendet wurde zu diesem Zweck ein automatisiertes Gerinnungsanalysegerät (STA Compact Max 3® Diagnostica Stago S.A.S., Asnières-sur-Seine, France). Wie im Rahmen der Lagerung zu erwarten war, nahm die Aktivität bzw. der Gehalt der hämostatisch aktiven Proteine im Verlauf der Lagerung ab. Hierbei fiel der Mittelwert der Pools aller pro- und antikoagulatorischen Faktoren bis spätestens Tag 28 signifikant (FV, FVIII, vWF-Ag, PC  $p < 0,0001$ ; FIX  $p = 0,0001$ ; AT  $p = 0,0002$ ; PS  $p = 0,0005$ ; FX  $p = 0,0012$ ; FVII  $p = 0,0017$ ; Fib  $p = 0,0034$ ) ab. Allerdings blieb mit Ausnahme von FVIII und PS, die an Tag fünfzehn 62 bzw. 64 % ihrer Aktivität verloren hatten, bei den anderen hämostatisch aktiven Proteinen mehr als fünfzig Prozent der Ausgangsaktivität bzw. des Gehalts vorhanden. Bis auf PS, bei dem sich zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied der Aktivität zwischen den VB- und VB-PAGGS-Konserven fand ( $p = 0,34$ ), zeigten alle anderen Proteine zu mindestens einem Zeitpunkt signifikant niedrigere Aktivitäten (FVII, FIX, FX  $p < 0,0001$ ; FV  $p = 0,0002$ ; FVIII  $p = 0,0016$ ; AT  $p = 0,0018$ ; PC  $p = 0,0024$ ; vWF-Ag  $p = 0,0029$ ; Fib  $p = 0,013$ ) in den VB-PAGGS-Konserven. Die DDIM zeigten weder über die Zeit ( $p = 0,44$ ) noch zwischen den Medien ( $p = 0,22$ ) einen signifikanten Unterschied. Die PT ( $p < 0,0001$ ) und aPTT ( $p = 0,018$ ) zeigten einen signifikanten Anstieg über die Zeit sowie die PT signifikant erhöhte Zeiten in den VB-PAGGS-Konserven ( $p = 0,0046$ ) im Vergleich zu den VB-Konserven. Im Gegensatz dazu fanden sich bei der aPTT ( $p = 0,064$ ) keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Zusätzen. Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse kann der Plasmaanteil von Vollblutkonserven, die analog zu den in der Studie untersuchten Bedingungen gelagert wurden, als gute Alternative zu anderen Plasmaprodukten eingesetzt werden, insofern das Ziel nicht die Substitution von FVIII oder PS ist. Die Verwendung von VB-PAGGS-Konserven sollte mit Ausnahme des Einsatzes zur Substitution von PS, aufgrund der niedrigeren Aktivitäten bzw. Gehalte der hämostatisch aktiven Proteine zu diesem Zweck vermieden werden.

## 8. Summary

The veterinary scientific literature on the activity/content of hemostatic proteins in the plasma fraction of chilled whole blood is insufficient to make recommendations regarding the clinical use of this blood product component as an alternative for plasma products. It is also unclear whether it is haemostatically equivalent to fresh whole blood. Especially fibrinolytic proteins have not been assessed in this context. Furthermore, the use of different anticoagulant/additive solutions has not been examined. This is of interest due to the known influences on the cellular components of whole blood in veterinary medicine and changes in the hemostatic function of plasma demonstrated in human medicine. For this reason, the present study aimed to investigate the influence of storage time on the activities/content of procoagulatory and anticoagulatory factors and fibrinolysis markers in the plasma content of whole blood units during a 28-day storage period at four degrees Celsius. Additionally, the influence of two anticoagulants/additive solutions (citrate-phosphate-dextrose (CPD)/phosphate, adenine, glucose, guanosine, saline, and mannitol (PAGGS-M)) on the hemostatic and fibrinolytic proteins was to be investigated. The hypothesis regarding the storage time was that the content/activity of hemostatic proteins should be equal to or above fifty percent of the initial value on day fifteen of storage. In addition, it was assumed that there is no significant difference in the contents/activities between the differently anticoagulated/preserved whole blood units. Factor V was anticipated to be an expectation regarding a potential difference. The blood products required for the investigations were prepared during a previous dissertation project approved by the Regional Council (V 54 - 19 c 20 15 h 02 GI 18/17 kTV 16/2020). For this purpose, 21 dogs were recruited from the clinic's blood donor pool during a routine blood donation between the 13th of January and the 1st of March 2021. Adult animals between one and ten years of age were selected, which had a body weight of more than 27 kg with a physiological body condition score, calm habitus, and were vaccinated as well as treated with antiparasitic agents following the recommendations of the responsible commissions/specialist societies. The animals also had an unremarkable medical history, clinical examination, and basic laboratory diagnostics. Pregnant animals, animals with underlying diseases affecting hemostasis, or animals that had previously received blood products in their lifetime were excluded. Stays abroad were accepted after consideration. Approximately 450 ml of blood were taken from each dog and then the blood from three animals was combined into a pool (220 ml per dog). Two quantities of fifty millilitres were then sampled from each of the seven pool bags and transferred to corresponding transfer bags. One of the transfer bags was not further processed and represented the bag with CPD (VB). The other bag was spiked with eleven millilitres of PAGGS-M hereafter referred to as VB-PAGGS. The transfer bags were then stored in an upright position at four degrees Celsius for 28 days and inverted several times every two days. Samples were taken to produce the plasma fraction

for analysis in the present study after zero, one, three, five, ten, fifteen, 21, and 28 days. Procoagulatory factors (factors V (FV), VII (FVII), VIII (FVIII), IX (FIX), X (FX); fibrinogen (Fib) and von Willebrand factor antigen (vWF-Ag)), coagulation inhibitors and markers of fibrinolysis proteins (antithrombin (AT), protein C (PC), protein S (PS), D-dimers (DDIM)), as well as coagulation times (prothrombin time (PT) and partial thromboplastin time (aPTT)), were determined. An automated coagulation analyzer (STA Compact Max3® Diagnostica Stago S.A.S., Asnières-sur-Seine, France) was used for this purpose. As expected during storage, the activity/content of hemostatic proteins decreased. The pool mean of all pro- and anticoagulatory factors was significantly decreased by day 28 at the latest (FV, FVIII, vWF-Ag, PC  $p < 0.0001$ ; FIX  $p = 0.0001$ ; AT  $p = 0.0002$ ; PS  $p = 0.0005$ ; FX  $p = 0.0012$ ; FVII  $p = 0.0017$ ; Fib  $p = 0.0034$ ). However, except for FVIII and PS, which had lost 62 % and 64 % of their activity at day fifteen, respectively, the other hemostatic proteins retained more than fifty percent of their initial activity/content. Except for PS, for whom there was no significant difference in activity between the VB- and VB-PAGGS units at any time point ( $p = 0.34$ ), all other proteins showed significantly lower activities on at least one time point (FVII, FIX, FX  $p < 0.0001$ ; FV  $p = 0.0002$ ; FVIII  $p = 0.0016$ ; AT  $p = 0.0018$ ; PC  $p = 0.0024$ ; vWF-Ag  $p = 0.0029$ ; Fib  $p = 0.013$ ) in the VB-PAGGS units. The DDIM did not show a significant difference over time ( $p = 0.44$ ) or between media ( $p = 0.22$ ). The PT ( $p < 0.0001$ ) and aPTT ( $p = 0.018$ ) showed a significant increase over time. The PT showed significantly increased times in the VB-PAGGS ( $p = 0.0046$ ) versus the VB units in contrast to the aPTT ( $p = 0.064$ ). Based on the findings of this study, the plasma portion of whole blood units, which were stored according to our study design, can be used as an alternative to other plasma products, as long as substitution of FVIII or PS isn't the indication. Utilization of VB-PAGGS units should be avoided for this purpose, except for PS supplementation, due to the lower activity/content of hemostatic proteins.

## 9. Literaturverzeichnis

### Literatur

1. Klein MK, Dow SW, Rosychuk RA. Pulmonary thromboembolism associated with immune-mediated hemolytic anemia in dogs: ten cases (1982-1987). *J Am Vet Med Assoc* 1989; 195(2):246–50.
2. Abelson AL, O'Toole TE, Johnston A, Respass M, Laforcade AM de. Hypoperfusion and acute traumatic coagulopathy in severely traumatized canine patients. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)* 2013; 23(4):395–401. doi: 10.1111/vec.12073.
3. Fox PR, Keene BW, Lamb KE, Schober KA, Chetboul V, Luis Fuentes V et al. International collaborative study to assess cardiovascular risk and evaluate long-term health in cats with preclinical hypertrophic cardiomyopathy and apparently healthy cats: the REVEAL study. *J Vet Intern Med* 2018; 32(3):930–43. doi: 10.1111/jvim.15122.
4. Barr JW, McMichael MA. Inherited disorders of hemostasis in dogs and cats. *Top Companion Anim Med* 2012; 27(2):53–8. doi: 10.1053/j.tcam.2012.07.006.
5. Ralph AG, Brainard BM. Update on disseminated intravascular coagulation: when to consider it, when to expect it, when to treat it. *Top Companion Anim Med* 2012; 27(2):65–72. doi: 10.1053/j.tcam.2012.06.004.
6. Veterinary Poisons Information Service. Annual Report 2022 [Stand: 22.02.2024]. Verfügbar unter: [https://www.vpisglobal.com/wp-content/uploads/2023/11/VPIS\\_3006-Annual-Report-2022.pdf](https://www.vpisglobal.com/wp-content/uploads/2023/11/VPIS_3006-Annual-Report-2022.pdf).
7. Elliott J, Barber PJ. Feline chronic renal failure: clinical findings in 80 cases diagnosed between 1992 and 1995. *J Small Anim Pract* 1998; 39(2):78–85. doi: 10.1111/j.1748-5827.1998.tb03598.x.
8. Balch A, Mackin AJ. Canine immune-mediated hemolytic anemia: pathophysiology, clinical signs, and diagnosis. *Compend Contin Educ Vet* 2007; 29(4):217–25.
9. Naigamwalla DZ, Webb JA, Giger U. Iron deficiency anemia. *Can Vet J* 2012; 53(3):250–6.
10. Griot-Wenk ME, Giger U. Feline transfusion medicine. Blood types and their clinical importance. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 1995; 25(6):1305–22. doi: 10.1016/s0195-5616(95)50156-1.

11. Weingart C, Giger U, Kohn B. Whole blood transfusions in 91 cats: a clinical evaluation. *J Feline Med Surg* 2004; 6(3):139–48. doi: 10.1016/j.jfms.2004.01.005.
12. Leitlinien zur Gewinnung, Lagerung, Transport und Verabreichung von Blut und Blutprodukten im Veterinärbereich; 2011 [Stand: 09.06.2024]. Verfügbar unter: [https://www.bvl.bund.de/SharedDocs/Downloads/05\\_Tierarzneimittel/Leitlinien\\_blutprodukte.pdf;jsessionid=6DFA7B0FF500C8B5AE7A81AA2E11CDF8.internet991?\\_\\_blob=publicationFile&v=5](https://www.bvl.bund.de/SharedDocs/Downloads/05_Tierarzneimittel/Leitlinien_blutprodukte.pdf;jsessionid=6DFA7B0FF500C8B5AE7A81AA2E11CDF8.internet991?__blob=publicationFile&v=5).
13. Bücheler J, Cotter SM. Storage of feline and canine whole blood in CPDA-1 and determination of the post-transfusion viability.: Research abstract program of the 12th annual ACVIM Forum. *J Vet Intern Med* 1994; 8(2):137–89. doi: 10.1111/j.1939-1676.1994.tb03213.x.
14. Logan JC, Callan MB, Drew K, Marryott K, Oakley DA, Jefferies L et al. Clinical indications for use of fresh frozen plasma in dogs: 74 dogs (October through December 1999). *J Am Vet Med Assoc* 2001; 218(9):1449–55. doi: 10.2460/javma.2001.218.1449.
15. Wardrop KJ, Brooks MB. Stability of hemostatic proteins in canine fresh frozen plasma units. *Vet Clin Pathol* 2001; 30(2):91–5. doi: 10.1111/j.1939-165x.2001.tb00264.x.
16. Wilson CR, Pashmakova MB, Heinz JA, Johnson MC, Minard HM, Bishop MA et al. Biochemical evaluation of storage lesion in canine packed erythrocytes. *J Small Anim Pract* 2017; 58(12):678–84. doi: 10.1111/jsap.12713.
17. Ferreira RRF, Graça RMC, Cardoso IM, Gopegui RR de, Matos AJF de. In vitro hemolysis of stored units of canine packed red blood cells. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)* 2018; 28(6):512–7. doi: 10.1111/vec.12770.
18. Lucas RL, Lentz KD, Hale AS. Collection and preparation of blood products. *Clin Tech Small Anim Pract* 2004; 19(2):55–62. doi: 10.1053/j.ctsap.2004.01.007.
19. Taylor S, Spada E, Callan MB, Korman R, Leister E, Steagall P et al. 2021 ISFM consensus guidelines on the collection and administration of blood and blood products in cats. *J Feline Med Surg* 2021; 23(5):410–32. doi: 10.1177/1098612X211007071.
20. Grochowsky AR, Rozanski EA, Laforcade AM de, Sharp CR, Meola DM, Schavone JJ et al. An ex vivo evaluation of efficacy of refrigerated canine plasma. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)* 2014; 24(4):388–97. doi: 10.1111/vec.12202.

21. Pashmakova MB, Barr JW, Bishop MA. Stability of hemostatic proteins in canine fresh-frozen plasma thawed with a modified commercial microwave warmer or warm water bath. *Am J Vet Res* 2015; 76(5):420–5. doi: 10.2460/ajvr.76.5.420.
22. Mount ME. Diagnosis and therapy of anticoagulant rodenticide intoxications. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 1988; 18(1):115–30. doi: 10.1016/s0195-5616(88)50012-8.
23. Suttie JW. The metabolic role of vitamin K. *Fed Proc* 1980; 39(10):2730–5.
24. Fourrier F, Chopin C, Goudemand J, Hendrycx S, Caron C, Rime A et al. Septic shock, multiple organ failure, and disseminated intravascular coagulation. Compared patterns of antithrombin III, protein C, and protein S deficiencies. *Chest* 1992; 101(3):816–23. doi: 10.1378/chest.101.3.816.
25. Edwards TH, Meledeo MA, Peltier GC, Ruiz DD, Henderson AF, Travieso S et al. Effects of refrigerated storage on hemostatic stability of four canine plasma products. *Am J Vet Res* 2020; 81(12):964–72. doi: 10.2460/ajvr.81.12.964.
26. Chee W, Sharp CR, Boyd CJ, Claus MA, Smart L. Stability of ex vivo coagulation factor activity in never-frozen and thawed refrigerated canine plasma stored for 42 days. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)* 2022; 32(2):189–95. doi: 10.1111/vec.13152.
27. Proverbio D, Perego R, Baggiani L, Spada E. Hemostatic activity of canine never-frozen liquid plasma collected for transfusion. *Front Vet Sci* 2022; 9:1–11. doi: 10.3389/fvets.2022.731617.
28. Edwards TH, Darlington DN, Pusateri AE, Keese JD, Ruiz DD, Little JS et al. Hemostatic capacity of canine chilled whole blood over time. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)* 2021; 31(2):239–46. doi: 10.1111/vec.13055.
29. Cooper JL, Sharp CR, Boyd CJ, Claus MA, Rossi G. The hemostatic profile of cold-stored whole blood from non-greyhound and greyhound dogs over 42 days. *Front Vet Sci* 2023; 10:1–13. doi: 10.3389/fvets.2023.1135880.
30. Stefani A, Capello K, Carminato A, Wurzbürger W, Furlanello T, Bertazzo V et al. Effects of leukoreduction on storage lesions in whole blood and blood components of dogs. *J Vet Intern Med* 2021; 35(2):936–45. doi: 10.1111/jvim.16039.

31. Suehiro Y, Veljkovic DK, Fuller N, Motomura Y, Massé JM, Cramer EM et al. Endocytosis and storage of plasma factor V by human megakaryocytes. *Thromb Haemost* 2005; 94(9):585–92. doi: 10.1160/TH05-02-0141.
32. Lehmann H. Einfluss der Lagerung von kaninem konservierten Vollblut auf Erythrozytenstabilität, globale Gerinnungsaktivität und Thrombozytenfunktion [Dissertation]. 1. Auflage. Gießen: VVB Lauferweiler Verlag; 2021. (Edition scientifique).
33. Stefanini M. Basic mechanisms of hemostasis. *Bull N Y Acad Med* 1954; 30(4):239–77.
34. Fearnley GR. A concept of natural fibrinolysis. *Lancet* 1961; 1(7184):992–4.
35. Hoffman M, Monroe DM. A cell-based model of hemostasis. *Thromb Haemost* 2001; 85(6):958–65.
36. Bauer N, Moritz A. Koagulopathien bei Hund und Katze. *Tierarztl Prax Ausg K Kleintiere Heimtiere* 2008; 36(4):235–46.
37. McMichael MA. Primary hemostasis. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)* 2005; 15(1):1–8. doi: 10.1111/j.1476-4431.2005.04021.x.
38. Neubauer K, Zieger B. Endothelial cells and coagulation. *Cell Tissue Res* 2022; 387(3):391–8. doi: 10.1007/s00441-021-03471-2.
39. Loskutoff DJ, Edgington TS. Synthesis of a fibrinolytic activator and inhibitor by endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977; 74(9):3903–7.
40. Mellion BT, Ignarro LJ, Ohlstein EH, Pontecorvo EG, Hyman AL, Kadowitz PJ. Evidence for the inhibitory role of guanosine 3', 5'-monophosphate in ADP-induced human platelet aggregation in the presence of nitric oxide and related vasodilators. *Blood* 1981; 57(5):946–55. doi: 10.1182/blood.V57.5.946.946.
41. Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987; 327(6122):524–6.
42. Boullin DJ, Bunting S, Blaso WP, Hunt TM, Moncada S. Responses of human and baboon arteries to prostaglandin endoperoxides and biologically generated and synthetic prostacyclin: their relevance to cerebralarterial spasm in man. *Br J Clin Pharmacol* 1979; 7(2):139–47.

43. Moncada S, Gryglewski R, Bunting S, Vane JR. An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. *Nature* 1976; 263(5579):663–5.
44. Awbrey BJ, Hoak JC, Owen WG. Binding of human thrombin to cultured human endothelial cells. *J Biol Chem* 1979; 254(10):4092–5. doi: 10.1016/S0021-9258(18)50700-6.
45. Esmon CT, Owen WG. Identification of an endothelial cell cofactor for thrombin-catalyzed activation of protein C. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981; 78(4):2249–52.
46. Esmon NL, Owen WG, Esmon CT. Isolation of a membrane-bound cofactor for thrombin-catalyzed activation of protein C. *J Biol Chem* 1982; 257(2):859–64. doi: 10.1016/S0021-9258(19)68276-1.
47. Esmon CT, Esmon NL, Harris KW. Complex formation between thrombin and thrombomodulin inhibits both thrombin-catalyzed fibrin formation and factor V activation. *J Biol Chem* 1982; 257(14):7944–7. doi: 10.1016/S0021-9258(18)34276-5.
48. Marcum JA, McKenney JB, Rosenberg RD. Acceleration of thrombin-antithrombin complex formation in rat hindquarters via heparinlike molecules bound to the endothelium. *J Clin Invest* 1984; 74(2):341–50.
49. Marcum JA, Rosenberg RD. Heparinlike molecules with anticoagulant activity are synthesized by cultured endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1985; 126(1):365–72.
50. Jackson SP, Nesbitt WS, Kulkarni S. Signaling events underlying thrombus formation. *J Thromb Haemost* 2003; 1(7):1602–12. doi: 10.1046/j.1538-7836.2003.00267.x.
51. Ruggeri ZM. Von Willebrand factor, platelets and endothelial cell interactions. *J Thromb Haemost* 2003; 1(7):1335–42. doi: 10.1046/j.1538-7836.2003.00260.x.
52. Ware J, Ruggeri ZM. Platelet membrane glycoproteins. In: Kazazian HH, Hrsg. *Wiley Encyclopedia of Molecular Medicine*. 1st Edition. Hoboken: John Wiley & Sons, Inc; 2002. S. 2158–520.
53. Hoyer LW. The factor VIII complex: structure and function. *Blood* 1981; 58(1):1–13. doi: 10.1182/blood.V58.1.1.1.

54. Thomas S. Platelet membrane glycoproteins in haemostasis. *Clin Lab* 2002; 48(5-6):247–62.
55. Jaffe EA, Hoyer LW, Nachman RI. Synthesis of antihemophilic factor antigen by cultured human endothelial cells. *J Clin Invest* 1973; 52(11):2757–64.
56. Jaffe EA, Hoyer LW, Nachman RI. Synthesis of von Willebrand factor by cultured human endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1974; 71(5):1906–9.
57. Nachman RI, Levine R, Jaffe EA. Synthesis of factor VIII antigen by cultured guinea pig megakaryocytes. *J Clin Invest* 1977; 60(4):914–21.
58. Nachman RI, Jaffe EA. Subcellular platelet factor VIII antigen and von Willebrand factor. *J Exp Med* 1975; 141(5):1101–13.
59. Zucker MB, Broekman MJ, Kaplan KL. Factor VIII-related antigen in human blood platelets: localization and release by thrombin and collagen. *J Lab Clin Med* 1979; 94(5):675–82.
60. Wagner DD, Olmsted JB, Marder VJ. Immunolocalization of von Willebrand protein in Weibel-Palade bodies of human endothelial cells. *J Cell Biol* 1982; 95(1):355–60.
61. Savage B, Saldívar E, Ruggeri ZM. Initiation of platelet adhesion by arrest onto fibrinogen or translocation on von Willebrand factor. *Cell* 1996; 84(2):289–97.
62. Savage B, Almus-Jacobs F, Ruggeri ZM. Specific synergy of multiple substrate–receptor interactions in platelet thrombus formation under flow. *Cell* 1998; 94(5):657–66.
63. Beumer S, Ijsseldijk MJ, Groot PG de, Sixma JJ. Platelet adhesion to fibronectin in flow: dependence on surface concentration and shear rate, role of platelet membrane glycoproteins GP IIb/IIIa and VLA-5, and inhibition by heparin. *Blood* 1994; 84(11):3724–33. doi: 10.1182/blood.V84.11.3724.bloodjournal84113724.
64. Hindriks G, Ijsseldijk MJ, Sonnenberg A, Sixma JJ, Groot PG de. Platelet adhesion to laminin: role of Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> ions, shear rate, and platelet membrane glycoproteins. *Blood* 1992; 79(4):928–35. doi: 10.1182/blood.V79.4.928.928.
65. Kroll MH, Hellums JD, McIntire LV, Schafer AI, Moake JL. Platelets and shear stress. *Blood* 1996; 88(5):1525–41.

66. Nieselstein P, D'Alessio PA, Sixma JJ. Fibronectin in platelet adhesion to human collagen types I and III. Use of nonfibrillar and fibrillar collagen in flowing blood studies. *Arteriosclerosis* 1988; 8(2):200–6.
67. Bevers EM, Comfurius P, van Rijn JL, Hemker HC, Zwaal RF. Generation of prothrombin-converting activity and the exposure of phosphatidylserine at the outer surface of platelets. *Eur J Biochem* 1982; 122(2):429–36. doi: 10.1111/j.1432-1033.1982.tb05898.x.
68. Jin J, Daniel JL, Kunapuli SP. Molecular basis for ADP-induced platelet activation. II. The P2Y1 receptor mediates ADP-induced intracellular calcium mobilization and shape change in platelets. *J Biol Chem* 1998; 273(4):2030–4. doi: 10.1074/jbc.273.4.2030.
69. Lhermusier T, Chap H, Payrastre B. Platelet membrane phospholipid asymmetry: from the characterization of a scramblase activity to the identification of an essential protein mutated in Scott syndrome. *J Thromb Haemost* 2011; 9(10):1883–91. doi: 10.1111/j.1538-7836.2011.04478.x.
70. Rendu F, Marche P, Maclouf J, Girard A, Levx-Toledano S. Triphosphoinositide breakdown and dense body release as the earliest events in thrombin-induced activation of human platelets. *Biochem Biophys Res Commun* 1983; 116(2):513–9.
71. Meyers KM, Holmsen H, Seachord CL. Comparative study of platelet dense granule constituents. *Am J Physiol* 1982; 243(3):454 - 461.
72. Kamykowski J, Carlton P, Sehgal S, Storrie B. Quantitative immunofluorescence mapping reveals little functional coclustering of proteins within platelet  $\alpha$ -granules. *Blood* 2011; 118(5):1370–3. doi: 10.1182/blood-2011-01-330910.
73. Svensson J, Hamberg M, Samuelsson B. On the formation and effects of thromboxane A2 in human platelets. *Acta Physiol Scand* 1976; 98(3):285–94. doi: 10.1111/j.1748-1716.1976.tb10313.x.
74. Dunlop PC, Leis LA, Johnson GJ. Epinephrine correction of impaired platelet thromboxane receptor signaling. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000; 279(6):1760–71.
75. Chignard M, Vargaftig BB. Synthesis of thromboxane A2 by non-aggregating dog platelets challenged with arachidonic acid or with prostaglandin H2. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 1977; 14(2):222–40.

76. Johnson GJ, Leis LA, Rao GHR, White JG. Arachidonate-induced platelet aggregation in the dog. *Thromb Res* 1979; 14(1):147–54.
77. Jen CJ, McIntire LV. Characteristics of shear-induced aggregation in whole blood. *J Lab Clin Med* 1984; 103(1):115–24.
78. Moake JL, Turner NA, Stathopoulos NA, Nolasco L, Hellums JD. Shear-induced platelet aggregation can be mediated by vWF released from platelets, as well as by exogenous large or unusually large vWF multimers, requires adenosine diphosphate, and is resistant to aspirin. *Blood* 1988; 71(5):1366–74. doi: 10.1182/blood.V71.5.1366.1366.
79. Moritz MW, Reimers RC, Baker RK, Suter SP, Joist JH. Role of cytoplasmic and releasable ADP in platelet aggregation induced by laminar shear stress. *J Lab Clin Med* 1983; 101(4):537–44.
80. Frelinger AL. Using flow cytometry to monitor glycoprotein IIb-IIIa activation. *Platelets* 2018; 29(7):670–6. doi: 10.1080/09537104.2018.1478073.
81. O'Toole T, Loftus JC, Du X, Glass AA, Ruggeri ZM, Shattil SJ et al. Affinity modulation of the alpha IIb beta 3 integrin (platelet GPIIb-IIIa) is an intrinsic property of the receptor. *Cell Regul* 1990; 1(12):883–93.
82. Shattil SJ, Hoxie JA, Cunningham M, Brass LF. Changes in the platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa complex during platelet activation. *J Biol Chem* 1985; 260(20):11107–14. doi: 10.1016/S0021-9258(17)39154-8.
83. Nachman RI, Leung LLK. Complex formation of platelet membrane glycoproteins IIb and IIIa with fibrinogen. *J Clin Invest* 1982; 69(2):263–9.
84. Erne JB, Mann FA. Surgical hemostasis. *Compend Contin Educ Pract Vet* 2003; 25(10):732–40.
85. Delvos U, Müller-Berghaus G. Die Regulation der Blutgerinnung. *Naturwissenschaften* 1985; 72(9):461–9.
86. Jackson CM, Nemerson Y. Blood coagulation. *Annu Rev Biochem* 1980; 49:765–811. doi: 10.1146/annurev.bi.49.070180.004001.

87. McMichael MA. Chapter 87 Overview of Hemostasis. In: Brooks MB, Harr KE, Seelig DM, Wardrop KJ, Weiss DJ, Hrsg. Schalm's Veterinary Hematology. 7th Edition. Hoboken: John Wiley & Sons, Inc; 2022. S. 765–86.
88. Ratnoff OD, Rosenblum JM. Role of Hageman factor in the initiation of clotting by glass. *Am J Med* 1958; 25(2):160–8.
89. Margolis J. Initiation of blood coagulation by glass and related surfaces. *J Physiol* 1957; 137(1):95–109. doi: 10.1113/jphysiol.1957.sp005799.
90. Davie EW, Ratnoff OD. Waterfall sequence for intrinsic blood clotting. *Science* 1964; 145(3638):1310–2. doi: 10.1126/science.145.3638.1310.
91. Macfarlane RG. An enzyme cascade in the blood clotting mechanism, and its function as a biochemical amplifier. *Nature* 1964; 202(4931):498–9. doi: 10.1038/202498a0.
92. Wright IS. Nomenclature of blood clotting factors; acceptance by the International Committee on nomenclature of four factors, their characteristics and international number. *Can Med Assoc J* 1958; 80(8):659–61.
93. Smith JW, Day TK, Mackin AJ. Diagnosing bleeding disorders. *Comp Cont Educ Pract* 2005; 27(11):828–43.
94. Kristensen AT, Edwards ML, Devey J. Potential uses of recombinant human factor VIIa in veterinary medicine. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2003; 33(6):1437–51. doi: 10.1016/j.cvsm.2003.08.001.
95. Fahs SA, Hille MT, Shi Q, Weiler H, Montgomery RR. A conditional knockout mouse model reveals endothelial cells as the principal and possibly exclusive source of plasma factor VIII. *Blood* 2014; 123(24):3706–13. doi: 10.1182/blood-2014-02-555151.
96. Hayakawa M, Sakata A, Hayakawa H, Matsumoto H, Hiramoto T, Kashiwakura Y et al. Characterization and visualization of murine coagulation factor VIII-producing cells in vivo. *Sci Rep* 2021; 11(1):14824. doi: 10.1038/s41598-021-94307-0.
97. Hemker HC, Kahn MJ. Reaction sequence of blood coagulation. *Nature* 1967; 215(5106):1201–2. doi: 10.1038/2151201a0.

98. Mackman N. Role of tissue factor in hemostasis, thrombosis, and vascular development. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24(6):1015–22. doi: 10.1161/01.ATV.0000130465.23430.74.
99. Drake TA, Morrissey JH, Edgington TS. Selective cellular expression of tissue factor in human tissues. Implications for disorders of hemostasis and thrombosis. *Am J Pathol* 1989; 134(5):1087–97.
100. Osterud B, Berre A, Otnaess AB, Bjorklid E, Prydz H. Activation of the coagulation factor VII by tissue thromboplastin and calcium. *Biochemistry* 1972; 11(15):2853–7. doi: 10.1021/bi00765a018.
101. Weiss AS, Gallin JI, Kaplan AP. Fletcher factor deficiency. A diminished rate of Hageman factor activation caused by absence of prekallikrein with abnormalities of coagulation, fibrinolysis, chemotactic activity, and kinin generation. *J Clin Invest* 1974; 53(2):622–33. doi: 10.1172/JCI107597.
102. Müller F, Mutch NJ, Schenk WA, Smith SA, Esterl L, Spronk HM et al. Platelet polyphosphates are proinflammatory and procoagulant mediators in vivo. *Cell* 2009; 139(6):1143–56. doi: 10.1016/j.cell.2009.11.001.
103. Silverberg M, Dunn JT, Garen L, Kaplan AP. Autoactivation of human Hageman factor. Demonstration utilizing a synthetic substrate. *J Biol Chem* 1980; 255(15):7281–6.
104. Scott CF, Silver LD, Schapira M, Colman RW. Cleavage of human high molecular weight kininogen markedly enhances its coagulant activity. Evidence that this molecule exists as a procofactor. *J Clin Invest* 1984; 73(4):954–62. doi: 10.1172/JCI111319.
105. Wiggins RC. Kinin release from high molecular weight kininogen by the action of Hageman factor in the absence of kallikrein. *J Biol Chem* 1983; 258(14):8963–70. doi: 10.1016/S0021-9258(18)32151-3.
106. Mandle RJ, Colman RW, Kaplan AP. Identification of prekallikrein and high-molecular-weight kininogen as a complex in human plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1976; 73(11):4179–83.
107. Thompson RE, Mandle RJ, Kaplan AP. Association of factor XI and high molecular weight kininogen in human plasma. *J Clin Invest* 1977; 60(6):1376–80. doi: 10.1172/JCI108898.

108. Thompson RE, Mandle RJ, Kaplan AP. Studies of binding of prekallikrein and factor XI to high molecular weight kininogen and its light chain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979; 76(10):4862–6.
109. Silverberg M, Nicoll JE, Kaplan AP. The mechanism by which the light chain of cleaved HMW-kininogen augments the activation of prekallikrein, factor XI and Hageman factor. *Thromb Res* 1980; 20(2):173–89. doi: 10.1016/0049-3848(80)90383-7.
110. Cochrane CG, Revak SD, Wuepper KD. Activation of Hageman factor in solid and fluid phases. A critical role of kallikrein. *J Exp Med* 1973; 138(6):1564–83. doi: 10.1084/jem.138.6.1564.
111. Scott CF, Silver LD, Purdon AD, Colman RW. Cleavage of human high molecular weight kininogen by factor XIa in vitro. Effect on structure and function. *J Biol Chem* 1985; 260(19):10856–63. doi: 10.1016/S0021-9258(19)85161-X.
112. Schiffman S, Rapaport SI, Patch MJ. The identification and synthesis of activated plasma thromboplastin component (PTC'). *Blood* 1963; 22(6):733–49. doi: 10.1182/blood.V22.6.733.733.
113. Mann KG, Jenny RJ, Krishnaswamy S. Cofactor proteins in the assembly and expression of blood clotting enzyme complexes. *Annu Rev Biochem* 1988; 57:915–56. doi: 10.1146/annurev.bi.57.070188.004411.
114. Furie B, Furie BC. Molecular and cellular biology of blood coagulation. *NEJM* 1992; 326(12):800–6. doi: 10.1056/NEJM199203193261205.
115. Macfarlane RG, Biggs R, Ash BJ, Denson KW. The interaction of factors VIII and IX. *Br J Haematol* 1964; 10(4):530–41. doi: 10.1111/j.1365-2141.1964.tb00730.x.
116. Osterud B, Rapaport SI. Activation of factor IX by the reaction product of tissue factor and factor VII: additional pathway for initiating blood coagulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977; 74(12):5260–4. doi: 10.1073/pnas.74.12.5260.
117. Jossen F, Prou-Wartelle O. Interaction of tissue factor and factor VII at the earliest phase of coagulation. *Thromb Diath Haemorrh Suppl* 1965; 17:35–44.

118. Cole ER, Koppel JL, Olwin JH. Phospholipid-protein interactions in the formation of prothrombin activator. *Thromb Haemost* 1965; 14(03/04):431–44. doi: 10.1055/s-0038-1654880.
119. Jobin F, Esnouf MP. Studies on the formation of the prothrombin-converting complex. *Biochem J* 1967; 102(3):666–74.
120. Hemker HC, Esnouf MP, Hemker PW, Swart AC, Macfarlane RG. Formation of prothrombin converting activity. *Nature* 1967; 215(5098):248–51. doi: 10.1038/215248a0.
121. Bailey K, Bettelheim FR. The clotting of fibrinogen. I. The liberation of peptide material. *Biochim Biophys Acta* 1955; 18(4):495–503. doi: 10.1016/0006-3002(55)90140-2.
122. Blombäck B, Hessel B, Hogg D, Therkildsen L. A two-step fibrinogen-fibrin transition in blood coagulation. *Nature* 1978; 275(5680):501–5. doi: 10.1038/275501a0.
123. Ferry JD. The mechanism of polymerization of fibrinogen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1952; 38(7):566–9. doi: 10.1073/pnas.38.7.566.
124. Buluk K, Januszko T, Olbromski J. Conversion of fibrin to desmofibrin. *Nature* 1961; 191(4793):1093-1094.
125. Mosesson MW, Siebenlist KR, Meh DA. The structure and biological features of fibrinogen and fibrin. *Ann N Y Acad Sci* 2001; 936(1):11–30. doi: 10.1111/j.1749-6632.2001.tb03491.x.
126. Bettelheim FR. The clotting of fibrinogen. II. Fractionation of peptide material liberated. *Biochim Biophys Acta* 1956; 19(1):121–30. doi: 10.1016/0006-3002(56)90393-6.
127. Lorand L, Konishi K. Activation of the fibrin stabilizing factor of plasma by thrombin. *Arch Biochem Biophys* 1964; 105(1):58–67. doi: 10.1016/0003-9861(64)90235-8.
128. Pieters J, Lindhout T, Hemker HC. In situ-generated thrombin is the only enzyme that effectively activates factor VIII and factor V in thromboplastin-activated plasma. *Blood* 1989; 74(3):1021–4. doi: 10.1182/blood.V74.3.1021.1021.

129. Prentice CR, Ratnoff OD, Breckenridge RT. Experiments on the nature of the prothrombin-converting principle: alteration of proaccelerin by thrombin. *Br J Haematol* 1967; 13(6):898–914. doi: 10.1111/j.1365-2141.1967.tb08860.x.
130. Naito K, Fujikawa K. Activation of human blood coagulation factor XI independent of factor XII. Factor XI is activated by thrombin and factor XIa in the presence of negatively charged surfaces. *J Biol Chem* 1991; 266(12):7353–8. doi: 10.1016/S0021-9258(20)89453-8.
131. Gailani D, Broze GJ. Factor XI activation in a revised model of blood coagulation. *Science* 1991; 253(5022):909–12. doi: 10.1126/science.1652157.
132. Dahlbäck B. Blood coagulation. *Lancet* 2000; 355(9215):1627–32. doi: 10.1016/S0140-6736(00)02225-X.
133. Gentry PA. Comparative aspects of blood coagulation. *Vet J* 2004; 168(3):238–51. doi: 10.1016/j.tvjl.2003.09.013.
134. Lorand L. Fibrin clots. *Nature* 1950; 166(4225):694–5. doi: 10.1038/166694a0.
135. Lorand L, Konishi K, Jacobsen A. Transpeptidation mechanism in blood clotting. *Nature* 1962; 194(4834):1148–9. doi: 10.1038/1941148a0.
136. Pisano JJ, Finlayson JS, Peyton MP. Cross-link in fibrin polymerized by factor XIII: epsilon-(gamma-glutamyl)lysine. *Science* 1968; 160(3830):892–3. doi: 10.1126/science.160.3830.892.
137. Muszbek L, Yee VC, Hevessy Z. Blood coagulation factor XIII: structure and function. *Thromb Res* 1999; 94(5):271–305. doi: 10.1016/s0049-3848(99)00023-7.
138. Rosenfeld MA, Leonova VB, Shchegolikhin AN, Bychkova AV, Kostanova EA, Biryukova MI. Covalent structure of single-stranded fibrin oligomers cross-linked by FXIIIa. *Biochem Biophys Res Commun* 2015; 461(2):408–12. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.04.052.
139. Siebenlist KR, Meh DA, Wall JS, Hainfeld JF, Mosesson MW. Orientation of the carboxy-terminal regions of fibrin gamma chain dimers determined from the crosslinked products formed in mixtures of fibrin, fragment D, and factor XIIIa. *Thromb Haemost* 1995; 74(4):1113–9.

140. Weisel JW, Francis CW, Nagaswami C, Marder VJ. Determination of the topology of factor XIIIa-induced fibrin gamma-chain cross-links by electron microscopy of ligated fragments. *J Biol Chem* 1993; 268(35):26618–24. doi: 10.1016/S0021-9258(19)74357-9.
141. Brooks MB. Chapter 88 Laboratory Testing of Coagulation Disorders. In: Brooks MB, Harr KE, Seelig DM, Wardrop KJ, Weiss DJ, Hrsg. *Schalm's Veterinary Hematology*. 7th Edition. Hoboken: John Wiley & Sons, Inc; 2022. S. 787–803.
142. Mischke R. Methodische Aspekte für die koagulometrische Aktivitätsbestimmung der Gerinnungsfaktoren II, V, VII und X aus Hundeplasma. *Zentralbl Veterinarmed A* 1994; 41(6):431–42. doi: 10.1111/j.1439-0442.1994.tb00110.x.
143. Mischke R. Optimization of coagulometric tests that incorporate human plasma for determination of coagulation factor activities in canine plasma. *Am J Vet Res* 2001; 62(4):625–9. doi: 10.2460/ajvr.2001.62.625.
144. Mutch NJ, Medcalf RL. The fibrinolysis renaissance. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2023; 21(12):3304–16. doi: 10.1016/j.jth.2023.09.012.
145. Batty P, Smith JG. Haemostasis. *Surgery* 2010; 28(11):530–5.
146. Wiman B, Collen D. Molecular mechanism of physiological fibrinolysis. *Nature* 1978; 272(5653):549–50. doi: 10.1038/272549a0.
147. Stokol T. Plasma D-dimer for the diagnosis of thromboembolic disorders in dogs. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2003; 33(6):1419–35. doi: 10.1016/s0195-5616(03)00096-2.
148. Cesarman-Maus G, Hajjar KA. Molecular mechanisms of fibrinolysis. *Br J Haematol* 2005; 129(3):307–21. doi: 10.1111/j.1365-2141.2005.05444.x.
149. Christensen LR, Macleod CM. A proteolytic enzyme of serum: characterization, activation, and reaction with inhibitors. *J Gen Physiol* 1945; 28(6):559–83. doi: 10.1085/jgp.28.6.559.
150. Furie B, Furie BC. The molecular basis of blood coagulation. *Cell* 1988; 53(4):505–18. doi: 10.1016/0092-8674(88)90567-3.
151. Alkjaersig N, Fletcher AP, Sherry S. The mechanism of clot dissolution by plasmin. *J Clin Invest* 1959; 38(7):1086–95. doi: 10.1172/JCI103885.

152. Astrup T, Permin PM. Fibrinolysis in the animal organism. *Nature* 1947; 159(4046):681–2. doi: 10.1038/159681b0.
153. Colman RW. Activation of plasminogen by human plasma kallikrein. *Biochem Biophys Res Commun* 1969; 35(2):273–9. doi: 10.1016/0006-291x(69)90278-2.
154. Mandle RJ, Kaplan AP. Hageman-factor-dependent fibrinolysis: generation of fibrinolytic activity by the interaction of human activated factor XI and plasminogen. *Blood* 1979; 54(4):850–62.
155. Miles LA, Greengard JS, Griffin JH. A comparison of the abilities of plasma kallikrein, beta-factor XIIa, factor XIa and urokinase to activate plasminogen. *Thromb Res* 1983; 29(4):407–17. doi: 10.1016/0049-3848(83)90244-x.
156. Raum D, Marcus D, Alper CA, Levey R, Taylor PD, Starzl TE. Synthesis of human plasminogen by the liver. *Science* 1980; 208(4447):1036–7. doi: 10.1126/science.6990488.
157. Hoylaerts M, Rijken DC, Lijnen HR, Collen D. Kinetics of the activation of plasminogen by human tissue plasminogen activator. Role of fibrin. *J Biol Chem* 1982; 257(6):2912–9.
158. Horrevoets AJ, Smilde A, de Vries C, Pannekoek H. The specific roles of finger and kringle 2 domains of tissue-type plasminogen activator during in vitro fibrinolysis. *J Biol Chem* 1994; 269(17):12639–44.
159. Lijnen HR. Pathophysiology of the plasminogen/plasmin system. *Int J Clin Lab Res* 1996; 26(1):1–6. doi: 10.1007/BF02644767.
160. Weisel JW, Nagaswami C, Korsholm B, Petersen LC, Suenson E. Interactions of plasminogen with polymerizing fibrin and its derivatives, monitored with a photoaffinity cross-linker and electron microscopy. *J Mol Biol* 1994; 235(3):1117–35. doi: 10.1006/jmbi.1994.1061.
161. Bick RL. The clinical significance of fibrinogen degradation products. *Semin Thromb Hemost* 1982; 8(4):302–30.
162. Fletcher AP, Alkjaersig N, Sherry S. Pathogenesis of the coagulation defect developing during pathological plasma proteolytic ("fibrinolytic") states. I. The significance of

- fibrinogen proteolysis and circulating fibrinogen breakdown products. *J Clin Invest* 1962; 41(4):896–915.
163. Olsson PI, Johnsson H. Interference of acetyl salicylic acid, heparin and fibrinogen degradation products in haemostasis of reptilase-defibrinogenated dogs. *Thromb Res* 1972; 1(2):135–46.
164. Kopeć M, Teisseyre E, Dudek-Wojciechowska G, Kloczewiak M, Pankiewicz A, Latallo ZS. Studies on the “double D” fragment from stabilized bovine fibrin. *Thromb Res* 1973; 2(3):283–91. doi: 10.1016/0049-3848(73)90091-1.
165. Monreal L. D-dimer as a new test for the diagnosis of DIC and thromboembolic disease. *J Vet Intern Med* 2003; 17(6):757–9.
166. Quinn DA, Fogel RB, Smith CD, Laposata M, Taylor B, Johnson SM et al. D-dimers in the diagnosis of pulmonary embolism. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 159(5):1445–9. doi: 10.1164/ajrccm.159.5.9808094.
167. Moroi M, Aoki N. Isolation and characterization of alpha2-plasmin inhibitor from human plasma. A novel proteinase inhibitor which inhibits activator-induced clot lysis. *J Biol Chem* 1976; 251(19):5956–65.
168. Collen D, Cock F de, Verstraete M. Immunochemical distinction between antiplasmin and alpha1-antitrypsin. *Thromb Res* 1975; 7(1):245–9. doi: 10.1016/0049-3848(75)90142-5.
169. Collen D, Lijnen HR. Basic and clinical aspects of fibrinolysis and thrombolysis. *Blood* 1991; 78(12):3114–24.
170. Kruihof EK, Tran-Thang C, Ransijn A, Bachmann F. Demonstration of a fast-acting inhibitor of plasminogen activators in human plasma. *Blood* 1984; 64(4):907–13.
171. Loskutoff DJ, van Mourik JA, Erickson LA, Lawrence D. Detection of an unusually stable fibrinolytic inhibitor produced by bovine endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1983; 80(10):2956–60. doi: 10.1073/pnas.80.10.2956.
172. Sakharov DV, Plow EF, Rijken DC. On the mechanism of the antifibrinolytic activity of plasma carboxypeptidase B. *J Biol Chem* 1997; 272(22):14477–82. doi: 10.1074/jbc.272.22.14477.

173. Deykin D. The role of the liver in serum-induced hypercoagulability. *J Clin Invest* 1966; 45(2):256–63. doi: 10.1172/JCI105338.
174. Deykin D, Cochios F, DeCamp G, Lopez A. Hepatic removal of activated factor X by the perfused rabbit liver. *Am J Physiol* 1968; 214(2):414–9. doi: 10.1152/ajplegacy.1968.214.2.414.
175. Gläsel A. Thrombelastographische Veränderungen inklusive Velocity Curve Variablen und Delta bei gesunden Pferden und Ponys nach Endotoxingabe [Dissertation]. 1. Auflage. Gießen: VVB Lauferweiler Verlag. (Edition scientifique).
176. Bevers EM, Comfurius P, Zwaal RF. Platelet procoagulant activity: physiological significance and mechanisms of exposure. *Blood Rev* 1991; 5(3):146–54. doi: 10.1016/0268-960x(91)90031-7.
177. Rodgers GM, Greenberg CS, Shuman MA. Characterization of the effects of cultured vascular cells on the activation of blood coagulation. *Blood* 1983; 61(6):1155–62. doi: 10.1182/blood.V61.6.1155.1155.
178. Rodgers GM. Hemostatic properties of normal and perturbed vascular cells. *FASEB J* 1988; 2(2):116–23. doi: 10.1096/fasebj.2.2.3277885.
179. Zwaal RF. Membrane and lipid involvement in blood coagulation. *Biochim Biophys Acta* 1978; 515(2):163–205. doi: 10.1016/0304-4157(78)90003-5.
180. Esmon CT, Ding W, Yasuhiro K, Gu J-M, Ferrell GL, Regan LM et al. The protein C pathway: new insights. *Thromb Haemost* 1997; 78(1):70–4. doi: 10.1055/s-0038-1657503.
181. Pike RN, Buckle AM, Le Bonniec BF, Church FC. Control of the coagulation system by serpins. Getting by with a little help from glycosaminoglycans. *FEBS J* 2005; 272(19):4842–51. doi: 10.1111/j.1742-4658.2005.04880.x.
182. Abildgaard U. Purification of two progressive antithrombins of human plasma. *Scand J Clin Lab Invest* 1967; 19(2):190–5. doi: 10.3109/00365516709093501.
183. Quinsey NS, Greedy AL, Bottomley SP, Whisstock JC, Pike RN. Antithrombin: in control of coagulation. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; 36(3):386–9. doi: 10.1016/s1357-2725(03)00244-9.

184. Kurachi K, Schmer G, Hermodson MA, Teller DC, Davie EW. Characterization of human, bovine, and horse antithrombin III. *Biochemistry* 1976; 15(2):368–73. doi: 10.1021/bi00647a020.
185. Lollar P, Owen WG. Clearance of thrombin from circulation in rabbits by high-affinity binding sites on endothelium. Possible role in the inactivation of thrombin by antithrombin III. *J Clin Invest* 1980; 66(6):1222–30. doi: 10.1172/JCI109973.
186. Yin ET, Wessler S, Stoll PJ. Identity of plasma-activated factor X inhibitor with antithrombin 3 and heparin cofactor. *J Biol Chem* 1971; 246(11):3712–9.
187. Rosenberg JS, McKenna PW, Rosenberg RD. Inhibition of human factor IXa by human antithrombin. *J Biol Chem* 1975; 250(23):8883–8.
188. Damus PS, Hicks M, Rosenberg RD. Anticoagulant action of heparin. *Nature* 1973; 246(5432):355–7. doi: 10.1038/246355a0.
189. Stead N, Kaplan AP, Rosenberg RD. Inhibition of activated factor XII by antithrombin-heparin cofactor. *J Biol Chem* 1976; 251(21):6481–8. doi: 10.1016/S0021-9258(17)32973-3.
190. Patnaik MM, Moll S. Inherited antithrombin deficiency: a review. *Haemophilia* 2008; 14(6):1229–39. doi: 10.1111/j.1365-2516.2008.01830.x.
191. Highsmith RF, Rosenberg RD. The inhibition of human plasmin by human antithrombin-heparin cofactor. *J Biol Chem* 1974; 249(14):4335–8.
192. Bourin MC, Boffa MC, Björk I, Lindahl U. Functional domains of rabbit thrombomodulin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986; 83(16):5924–8. doi: 10.1073/pnas.83.16.5924.
193. Olson ST, Björk I, Sheffer R, Craig PA, Shore JD, Choay J. Role of the antithrombin-binding pentasaccharide in heparin acceleration of antithrombin-proteinase reactions. Resolution of the antithrombin conformational change contribution to heparin rate enhancement. *J Biol Chem* 1992; 267(18):12528–38.
194. Howell WH, Holt E. Two new factors in blood coagulation—heparin and pro-antithrombin. *Am J Physiol* 1918; 47(3):328–41.

195. Waugh DF, Fitzgerald MA. Quantitative aspects of antithrombin and heparin in plasma. *Am J Physiol* 1956; 184(3):627–39. doi: 10.1152/ajplegacy.1956.184.3.627.
196. Batty P, Smith JG. Anticoagulation. *Surgery* 2010; 28(6):243–7.
197. Rosenberg RD. Chemistry of the hemostatic mechanism and its relationship to the action of heparin. *Fed Proc* 1977; 36(1):10–8.
198. Walker FJ. Regulation of activated protein C by a new protein. A possible function for bovine protein S. *J Biol Chem* 1980; 255(12):5521–4.
199. Stenflo J. A new vitamin K-dependent protein. Purification from bovine plasma and preliminary characterization. *J Biol Chem* 1976; 251(2):355–63.
200. Kisiel W, Ericsson LH, Davie EW. Proteolytic activation of protein C from bovine plasma. *Biochemistry* 1976; 15(22):4893–900. doi: 10.1021/bi00667a022.
201. Esmon CT, Stenflo J, Suttie JW. A new vitamin K-dependent protein. A phospholipid-binding zymogen of a serine esterase. *J Biol Chem* 1976; 251(10):3052–6.
202. Comp PC, Esmon CT. Generation of fibrinolytic activity by infusion of activated protein C into dogs. *J Clin Invest* 1981; 68(5):1221–8. doi: 10.1172/jci110368.
203. Dahlbäck B, Stenflo J. High molecular weight complex in human plasma between vitamin K-dependent protein S and complement component C4b-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981; 78(4):2512–6. doi: 10.1073/pnas.78.4.2512.
204. Kisiel W, Canfield WM, Ericsson LH, Davie EW. Anticoagulant properties of bovine plasma protein C following activation by thrombin. *Biochemistry* 1977; 16(26):5824–31. doi: 10.1021/bi00645a029.
205. Bereczky Z, Kovács KB, Muszbek L. Protein C and protein S deficiencies: similarities and differences between two brothers playing in the same game. *Clin Chem Lab Med* 2010; 48(Suppl 1):53 - 66. doi: 10.1515/CCLM.2010.369.
206. Comp PC, Jacocks RM, Ferrell GL, Esmon CT. Activation of protein C in vivo. *J Clin Invest* 1982; 70(1):127–34. doi: 10.1172/jci110584.
207. Stearns-Kurosawa DJ, Kurosawa S, Mollica JS, Ferrell GL, Esmon CT. The endothelial cell protein C receptor augments protein C activation by the thrombin-thrombomodulin

- complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93(19):10212–6. doi: 10.1073/pnas.93.19.10212.
208. Vehar GA, Davie EW. Preparation and properties of bovine factor VIII (antihemophilic factor). *Biochemistry* 1980; 19(3):401–10. doi: 10.1021/bi00544a001.
209. van Hinsbergh VWM, Bertina RM, van Wijngaarden A, van Tilburg NH, Emeis JJ, Haverkate F. Activated protein C decreases plasminogen activator-inhibitor activity in endothelial cell-conditioned medium. *Blood* 1985; 65(2):444–51.
210. Bajzar L, Nesheim ME, Tracy PB. The profibrinolytic effect of activated protein C in clots formed from plasma is TAFI-dependent. *Blood* 1996; 88(6):2093–100.
211. Stern DM, Nawroth PP, Harris KW, Esmon CT. Cultured bovine aortic endothelial cells promote activated protein C-protein S-mediated inactivation of factor Va. *J Biol Chem* 1986; 261(2):713–8. doi: 10.1016/S0021-9258(17)36151-3.
212. Walker FJ. Regulation of activated protein C by protein S. The role of phospholipid in factor Va inactivation. *J Biol Chem* 1981; 256(21):11128–31. doi: 10.1016/S0021-9258(19)68566-2.
213. Heeb MJ, Mesters RM, Tans G, Rosing J, Griffin JH. Binding of protein S to factor Va associated with inhibition of prothrombinase that is independent of activated protein C. *J Biol Chem* 1993; 268(4):2872–7.
214. van Wijnen M, Stam JG, van't Veer C, Meijers JC, Reitsma PH, Bertina RM et al. The interaction of protein S with the phospholipid surface is essential for the activated protein C-independent activity of protein S. *Thromb Haemost* 1996; 76(3):397–403.
215. Broze GJ, Miletich JP. Human protein Z. *J Clin Invest* 1984; 73(4):933–8.
216. Han X, Fiehler R, Broze GJ. Isolation of a protein Z-dependent plasma protease inhibitor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95(16):9250–5. doi: 10.1073/pnas.95.16.9250.
217. Mattock P, Esnouf MP. A form of bovine factor X with a single polypeptide chain. *Nat New Biol* 1973; 242:90–2.
218. Prowse CV, Esnouf MP. The isolation of a new warfarin-sensitive protein from bovine plasma. *Biochem Soc Trans* 1977; 5(1):255–6. doi: 10.1042/bst0050255.

219. Broze GJ, Warren LA, Novotny WF, Higuchi DA, Girard JJ, Miletich JP. The lipoprotein-associated coagulation inhibitor that inhibits the factor VII-tissue factor complex also inhibits factor Xa: insight into its possible mechanism of action. *Blood* 1988; 71(2):335–43.
220. Bajaj MS, Kuppuswamy MN, Saito H, Spitzer SG, Bajaj SP. Cultured normal human hepatocytes do not synthesize lipoprotein-associated coagulation inhibitor: evidence that endothelium is the principal site of its synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87(22):8869–73. doi: 10.1073/pnas.87.22.8869.
221. Ameri A, Kuppuswamy MN, Basu S, Bajaj SP. Expression of tissue factor pathway inhibitor by cultured endothelial cells in response to inflammatory mediators. *Blood* 1992; 79(12):3219–26.
222. Hjort PF. Intermediate reactions in the coagulation of blood with tissue thromboplastin; convertin, accelerin, prothrombinase. *Scand J Clin Lab Invest* 1957; 9(Suppl 27):1–183.
223. Novotny WF. Tissue factor pathway inhibitor. *Semin Thromb Hemost* 1994; 20(1):101–8. doi: 10.1055/s-2007-1001894.
224. Hackeng TM, Seré KM, Tans G, Rosing J. Protein S stimulates inhibition of the tissue factor pathway by tissue factor pathway inhibitor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103(9):3106–11. doi: 10.1073/pnas.0504240103.
225. Rosing J, Maurissen LFA, Tchaikovski SN, Tans G, Hackeng TM. Protein S is a cofactor for tissue factor pathway inhibitor. *Thromb Res* 2008; 122(Suppl 1):60 - 63. doi: 10.1016/S0049-3848(08)70021-5.
226. Tollefsen DM, Majerus DW, Blank MK. Heparin cofactor II. Purification and properties of a heparin-dependent inhibitor of thrombin in human plasma. *J Biol Chem* 1982; 257(5):2162–9.
227. Heck LW, Kaplan AP. Substrates of Hageman factor. I. Isolation and characterization of human factor XI (PTA) and inhibition of the activated enzyme by alpha 1-antitrypsin. *J Exp Med* 1974; 140(6):1615–30. doi: 10.1084/jem.140.6.1615.
228. Scott CF, Schapira M, James HL, Cohen AB, Colman RW. Inactivation of factor XIa by plasma protease inhibitors: predominant role of alpha 1-protease inhibitor and

- protective effect of high molecular weight kininogen. *J Clin Invest* 1982; 69(4):844–52. doi: 10.1172/jci110524.
229. Suzuki K, Nishioka J, Hashimoto S. Protein C inhibitor. Purification from human plasma and characterization. *J Biol Chem* 1983; 258(1):163–8. doi: 10.1016/S0021-9258(18)33235-6.
230. Monroe DM, Hoffman M, Roberts HR. Transmission of a procoagulant signal from tissue factor-bearing cell to platelets. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1996; 7(4):459–64. doi: 10.1097/00001721-199606000-00005.
231. Béguin S, Lindhout T, Hemker HC. The effect of trace amounts of tissue factor on thrombin generation in platelet rich plasma, its inhibition by heparin. *Thromb Haemost* 1989; 61(1):25–9.
232. Candia E de. Mechanisms of platelet activation by thrombin: a short history. *Thromb Res* 2012; 129(3):250–6. doi: 10.1016/j.thromres.2011.11.001.
233. Kahn ML, Zheng YW, Huang W, Bigornia V, Zeng D, Moff S et al. A dual thrombin receptor system for platelet activation. *Nature* 1998; 394(6694):690–4. doi: 10.1038/29325.
234. Sambrano GR, Weiss EJ, Zheng YW, Huang W, Coughlin SR. Role of thrombin signalling in platelets in haemostasis and thrombosis. *Nature* 2001; 413(6851):74–8. doi: 10.1038/35092573.
235. Vu TK, Hung DT, Wheaton VI, Coughlin SR. Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. *Cell* 1991; 64(6):1057–68. doi: 10.1016/0092-8674(91)90261-v.
236. Boudreaux MK, Catalfamo JL, Klok M. Calcium-diacylglycerol guanine nucleotide exchange factor I gene mutations associated with loss of function in canine platelets. *Transl Res* 2007; 150(2):81–92. doi: 10.1016/j.trsl.2007.03.006.
237. Chaudhary PK, Kim S. Characterization of the distinct mechanism of agonist-induced canine platelet activation. *J Vet Sci* 2019; 20(1):10–5. doi: 10.4142/jvs.2019.20.1.10.

238. Maeda S, Maeda S, Shibata S, Chimura N, Fukata T. Molecular cloning of canine protease-activated receptor-2 and its expression in normal dog tissues and atopic skin lesions. *J Vet Med Sci* 2009; 71(5):577–82.
239. Hung DT, Vu TK, Wheaton VI, Ishii K, Coughlin SR. Cloned platelet thrombin receptor is necessary for thrombin-induced platelet activation. *J Clin Invest* 1992; 89(4):1350–3. doi: 10.1172/JCI115721.
240. Monković DD, Tracy PB. Functional characterization of human platelet-released factor V and its activation by factor Xa and thrombin. *J Biol Chem* 1990; 265(28):17132–40.
241. Rapaport SI, Schiffman S, Patch MJ, Ames SB. The importance of activation of antihemophilic globulin and proaccelerin by traces of thrombin in the generation of intrinsic prothrombinase activity. *Blood* 1963; 21(2):221–36.
242. Hoffman M. Remodeling the blood coagulation cascade. *Journal Thromb Thrombolysis* 2003; 16(1-2):17–20. doi: 10.1023/B:THRO.0000014588.95061.28.
243. Oliver JA, Monroe DM, Roberts HR, Hoffman M. Thrombin activates factor XI on activated platelets in the absence of factor XII. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19(1):170–7. doi: 10.1161/01.atv.19.1.170.
244. Smith SA. The cell-based model of coagulation. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)* 2009; 19(1):3–10. doi: 10.1111/j.1476-4431.2009.00389.x.
245. Walsh PN, Sinha D, Koshy A, Seaman FS, Bradford H. Functional characterization of platelet-bound factor XIa: retention of factor XIa activity on the platelet surface. *Blood* 1986; 68(1):225–30.
246. Roberts HR, Monroe DM, Oliver JA, Chang JY, Hoffman M. Newer concepts of blood coagulation. *Haemophilia* 1998; 4(4):331–4. doi: 10.1046/j.1365-2516.1998.440331.x.
247. Adcock DM, Kressin DC, Marlar RA. Effect of 3.2% vs 3.8% sodium citrate concentration on routine coagulation testing. *Am J Clin Pathol* 1997; 107(1):105–10. doi: 10.1093/ajcp/107.1.105.
248. Siegel JE, Swami VK, Glenn P, Peterson P. Effect (or lack of it) of severe anemia on PT and APTT results. *Am J Clin Pathol* 1998; 110(1):106–10. doi: 10.1093/ajcp/110.1.106.

249. Lippi G, Salvagno GL, Montagnana M, Lima-Oliveira G, Guidi GC, Favaloro EJ. Quality standards for sample collection in coagulation testing. *Semin Thromb Hemost* 2012; 38(6):565–75. doi: 10.1055/s-0032-1315961.
250. Lippi G, Salvagno GL, Montagnana M, Guidi GC. Short-term venous stasis influences routine coagulation testing. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2005; 16(6):453–8. doi: 10.1097/01.mbc.0000178828.59866.03.
251. Lima-Oliveira G, Salvagno GL, Lippi G, Montagnana M, Scartezini M, Picheth G et al. Elimination of the venous stasis error for routine coagulation testing by transillumination. *Clin Chim Acta* 2011; 412(15-16):1482–4. doi: 10.1016/j.cca.2011.04.008.
252. Garcia-Pereira BL, Scott MA, Koenigshof AM, Brown AJ. Effect of venipuncture quality on thromboelastography. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)* 2012; 22(2):225–9. doi: 10.1111/j.1476-4431.2012.00724.x.
253. Conroy EM, Lyons BM, Koenig A. Evaluation of a whole blood point-of-care coagulation analyzer in dogs. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)* 2024; 34(5):446–54. doi: 10.1111/vec.13416.
254. Stokol T, Brooks MB, Erb HN. Effect of citrate concentration on coagulation test results in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 2000; 217(11):1672–7. doi: 10.2460/javma.2000.217.1672.
255. Arnold JE, Camus MS, Freeman KP, Giori L, Hooijberg, Jeffery U et al. ASVCP Guidelines: principles of quality assurance and standards for veterinary clinical pathology (version 3.0): developed by the American Society for Veterinary Clinical Pathology's (ASVCP) Quality Assurance and Laboratory Standards (QALS) committee. *Vet Clin Pathol* 2019; 48(4):542–618. doi: 10.1111/vcp.12810.
256. Boer W, Verbrugghe W, Hoste E, Jacobs R, Jorens PG. Unapparent systemic effects of regional anticoagulation with citrate in continuous renal replacement therapy: a narrative review. *Ann Intensive Care* 2023; 13:1–10. doi: 10.1186/s13613-023-01113-0.
257. Koepke JA, Rodgers JL, Ollivier MJ. Pre-instrumental variables in coagulation testing. *Am J Clin Pathol* 1975; 64(5):591–6. doi: 10.1093/ajcp/64.5.591.

258. Morales F, Couto CG, Iazbik MC. Effects of 2 concentrations of sodium citrate on coagulation test results, von Willebrand factor concentration, and platelet function in dogs. *J Vet Intern Med* 2007; 21(3):472–5. doi: 10.1111/j.1939-1676.2007.tb02992.x.
259. Johnstone IB. The importance of accurate citrate to blood ratios in the collection of canine blood for hemostatic testing. *Can Vet J* 1993; 34(10):627–9.
260. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Collection, transport, and processing of blood specimens for coagulation testing and performance of coagulation assays. Approved guideline.: NCCLS document H21-A2. 2th ed.: NCCLS; 1991.
261. Peterson P, Gottfried EL. The effects of inaccurate blood sample volume on prothrombin time (PT) and activated partial thromboplastin time (aPTT). *Thromb Haemost* 1982; 47(2):101–3.
262. Adcock DM, Kressin DC, Marlar RA. Minimum specimen volume requirements for routine coagulation testing: dependence on citrate concentration. *Am J Clin Pathol* 1998; 109(5):595–9. doi: 10.1093/ajcp/109.5.595.
263. Reneke J, Etzell J, Leslie S, Ng VL, Gottfried EL. Prolonged prothrombin time and activated partial thromboplastin time due to underfilled specimen tubes with 109 mmol/L (3.2%) citrate anticoagulant. *Am J Clin Pathol* 1998; 109(6):754–7. doi: 10.1093/ajcp/109.6.754.
264. Marlar RA, Potts RM, Marlar AA. Effect on routine and special coagulation testing values of citrate anticoagulant adjustment in patients with high hematocrit values. *Am J Clin Pathol* 2006; 126(3):400–5. Verfügbar unter: <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.ezproxy.uni-giessen.de/16880137/>.
265. Kurata M, Noguchi N, Kasuga Y, Sugimoto T, Tanaka K, Hasegawa T. Prolongation of PT and aPTT under excessive anticoagulant in plasma from rats and dogs. *J Toxicol Sci* 1998; 23(2):149–53. doi: 10.2131/jts.23.2\_149.
266. Silva VM, Rezende DC, Garcia ES, Cavalheiro C, Strunz CC. Effect of anticoagulant adjustment on prothrombin time test using two different PT reagents in patients with elevated hematocrit. *Pract Lab Med* 2020; 22:1 - 4. doi: 10.1016/j.plabm.2020.e00177.

267. O'Brien SR, Sellers TS, Meyer DJ. Artfactual prolongation of the activated partial thromboplastin time associated with hemoconcentration in dogs. *J Vet Intern Med* 1995; 9(3):169–70. doi: 10.1111/j.1939-1676.1995.tb03291.x.
268. Clinical and Laboratory Standards Institute. Collection, transport and processing of blood specimens for coagulation testing and performance of coagulation assays.: CLSI guideline H21-A4. 4th ed.: CLSI; 2003.
269. Goodwin AJ. Q&A column, 8/16: Q. Should a patient with a hematocrit greater than 55 percent be redrawn for correction always or only when prothrombin time and partial prothrombin time are elevated? In: Kiechle FL, Hrsg. CAP TODAY [Stand: 20.09.2024]. Verfügbar unter: <https://www.captodayonline.com/qa-column-0816/?print=pdf>.
270. Maunder CL, Costa M, Cue SM, Crawford EM, Papasouliotis K, Murphy KF. Measurement of prothrombin time and activated partial thromboplastin time in citrated whole blood samples from clinically ill dogs following storage. *J Small Anim Pract* 2012; 53(9):531–5. doi: 10.1111/j.1748-5827.2012.01255.x.
271. Salvagno GL, Lippi G, Montagnana M, Franchini M, Poli G, Guidi GC. Influence of temperature and time before centrifugation of specimens for routine coagulation testing. *Int J Lab Hematol* 2009; 31(4):462–7. doi: 10.1111/j.1751-553X.2008.01058.x.
272. Smalko D, Johnstone IB, Crane S. Submitting canine blood for prothrombin time and partial thromboplastin time determinations. *Can Vet J* 1985; 26(4):135–7.
273. Polack B, Schved JF, Boneu B, Groupe d'Etude sur l'Hémostase et la Thrombose<sup>1</sup>. Preanalytical recommendations of the 'Groupe d'Etude sur l'Hémostase et la Thrombose' (GEHT) for venous blood testing in hemostasis laboratories. *Haemostasis* 2001; 31(1):61–8. doi: 10.1159/000048046.
274. Ergin M, Erdogan S, Akturk O, Erel O. The effects of transport by car on coagulation tests. *Clin Chem Lab Med* 2017; 55(12):1943–7. doi: 10.1515/cclm-2016-0824.
275. Boissier E, Sévin-Allouet M, Le Thuaut A, Gaalon S de, Trossaërt M, Rozec B et al. A 2-min at 4500 g rather than a 15-min at 2200 g centrifugation does not impact the reliability of 10 critical coagulation assays. *Clin Chem Lab Med* 2017; 55(6):e118–121. doi: 10.1515/cclm-2016-0670.

276. Pfaefflin A, Schuster K, Braun R. Short centrifugation to ameliorate turn-around-time in routine coagulation testing. *Clin Lab* 2017; 63(11):1945–7. doi: 10.7754/Clin.Lab.2017.170702.
277. Dimeski G, Solano C, Petroff MK, Hynd M. Centrifugation protocols: tests to determine optimal lithium heparin and citrate plasma sample quality. *Ann Clin Biochem* 2011; 48(Pt 3):218–22. doi: 10.1258/acb.2010.010230.
278. Lippi G, Rossi R, Ippolito L, Zobbi V, Azzi D, Pipitone S et al. Influence of residual platelet count on routine coagulation, factor VIII, and factor IX testing in postfreeze-thaw samples. *Semin Thromb Hemost* 2013; 39(7):834–9. doi: 10.1055/s-0033-1356572.
279. Mackie IJ, Cooper PC, Lawrie A, Kitchen S, Gray E, Laffan M et al. Guidelines on the laboratory aspects of assays used in haemostasis and thrombosis. *Int J Lab Hematol* 2013; 35(1):1–13. doi: 10.1111/ijlh.12004.
280. Rizzo F, Papasouliotis K, Crawford EM, Dodkin S, Cue SM. Measurement of prothrombin time (PT) and activated partial thromboplastin time (APTT) on canine citrated plasma samples following different storage conditions. *Res Vet Sci* 2008; 85(1):166–70. doi: 10.1016/j.rvsc.2007.10.001.
281. Furlanello T, Caldin M, Stocco A, Tudone E, Tranquillo V, Lubas G et al. Stability of stored canine plasma for hemostasis testing. *Vet Clin Pathol* 2006; 35(2):204–7. doi: 10.1111/j.1939-165x.2006.tb00115.x.
282. Piccione G, Casella S, Giannetto C, Giudice E. Effect of storage conditions on prothrombin time, activated partial thromboplastin time and fibrinogen concentration on canine plasma samples. *J Vet Sci* 2010; 11(2):121–4. doi: 10.4142/jvs.2010.11.2.121.
283. Iazbik MC, Couto CG, Gray TL, Kociba G. Effect of storage conditions on hemostatic parameters of canine plasma obtained for transfusion. *Am J Vet Res* 2001; 62(5):734–5. doi: 10.2460/ajvr.2001.62.734.
284. Bateman SW, Mathews KA, Abrams-Ogg ACG, Lumsden JH, Johnstone IB. Evaluation of the effect of storage at -70 degrees C for six months on hemostatic function testing in dogs. *Can Vet J* 1999; 63(3):216–20.

285. Bauer N, Moritz A. Coagulation response in dogs with and without systemic inflammatory response syndrome - preliminary results. *Res Vet Sci* 2013; 94(1):122–31. doi: 10.1016/j.rvsc.2012.07.029.
286. Isaacs MS, Scheuermaier KD, Levy BL, Scott LE, Penny CB, Jacobson BF. In vitro effects of thawing fresh-frozen plasma at various temperatures. *Clin Appl Thromb Hemost* 2004; 10(2):143–8. doi: 10.1177/107602960401000204.
287. Bruhn HD, Schambeck CM, Hach-Wunderle V. Häufige Fehlerursachen. In: Bruhn HD, Schambeck CM, Hach-Wunderle V, Ahmadi-Simab K, Hrsg. *Hämostaseologie für die Praxis: Sicher durch den klinischen Alltag ; mit 108 Tabellen*. Stuttgart: Schattauer; 2007.
288. Tseng LW, Hughes D, Giger U. Evaluation of a point-of-care coagulation analyzer for measurement of prothrombin time, activated partial thromboplastin time, and activated clotting time in dogs. *Am J Vet Res* 2001; 62(9):1455–60.
289. Brooks MB. A review of canine inherited bleeding disorders: biochemical and molecular strategies for disease characterization and carrier detection. *J Hered* 1999; 90(1):112–8. doi: 10.1093/jhered/90.1.112.
290. Tseng LW, Hughes D, Giger U. Evaluation of a point-of-care coagulation analyzer for measurement of prothrombin time, activated partial thromboplastin time, and activated clotting time in dogs. *Am J Vet Res* 2001; 62(9):1455–60. doi: 10.2460/ajvr.2001.62.1455.
291. Yang W, Hosgood G, Luobikis K, Paul A. Agreement of point-of-care prothrombin and activated partial thromboplastin time in dogs with a reference laboratory. *Aust Vet J* 2018; 96(10):379–84. doi: 10.1111/avj.12746.
292. Bauer N, Moritz A. Evaluation of the Cardiac reader® as a point-of-care instrument for measurement of fibrin D-dimers in dogs. *Tierarztl Prax Ausg K Kleintiere Heimtiere* 2009; 37 (K)(5):319–25. doi: 10.1055/s-0038-1622809.
293. Bauer N, Eralp O, Moritz A. Reference intervals and method optimization for variables reflecting hypocoagulatory and hypercoagulatory states in dogs using the STA Compact® automated analyzer. *J Vet Diagn Invest* 2009; 21(6):803–14. doi: 10.1177/104063870902100606.
294. Italian (C.I.S.M.E.L.) Study Group, Ciavarella N, Coccheri S, Mannucci PM, Canciani MT, Mariani G et al. Activated partial thromboplastin time: A multicenter evaluation of 11

- reagents in the screening of mild haemophilia A. *Scand J Haematol* 1981; 25(4):308–17. doi: 10.1111/j.1600-0609.1981.tb01408.x.
295. Mischke R. Influence of factor VIII:C and factor IX activity in plasmas of haemophilic dogs on the activated partial thromboplastin time measured with two commercial reagents. *Haemophilia* 2000; 6(3):135–9. doi: 10.1046/j.1365-2516.2000.00392.x.
296. Toulon P, Eloit Y, Smahi M, Sigaud C, Jambou D, Fischer F et al. In vitro sensitivity of different activated partial thromboplastin time reagents to mild clotting factor deficiencies. *Int J Lab Hematol* 2016; 38(4):389–96. doi: 10.1111/ijlh.12499.
297. Mansell PD, Parry BW. Stability of canine factor VIII: coagulant activity in vitro. *Can J Vet Res* 1989; 53(3):264–7.
298. Quick AJ, Stanley-Brown M, Bancroft FW. A study of the coagulation defect in hemophilia and in jaundice. *Am J Med Sci* 1935; 190(1):501–11. doi: 10.1055/s-0038-1650068.
299. Sié P, Steib A. Central laboratory and point of care assessment of perioperative hemostasis. *Can J Anaesth* 2006; 53(Suppl 2):S. 12–20. doi: 10.1007/BF03022248.
300. Quick AJ. One-stage prothrombin time. *Can Med Assoc J* 1972; 106(5):538–9.
301. Tripodi A, Arbini A, Chantarangkul V, Mannucci PM. Recombinant tissue factor as substitute for conventional thromboplastin in the prothrombin time test. *Thromb Haemost* 1992; 67(1):42–5.
302. DIAGNOSTICA STAGO S.A.S. Packungsbeilage STA® - NeoPTimal 5: Bestimmung der Prothrombinzeit; REF 01163; 2019.
303. Mischke R. Prothrombin time standardisation in canine samples with regard to inter-batch and inter-reagent variability. *Vet J* 2011; 188(3):301–6. doi: 10.1016/j.tvjl.2010.06.005.
304. Beurlet S, Coisson C, Nguyen TT, Richet M, Carlo A, Briend-Marchal A. Comparison of STA-NeoPTimal (Stago) and STA-Neoplastine CI Plus (Stago) thromboplastin reagents using a STA Satellite Max analyzer to measure prothrombin times in dogs. *Vet Clin Pathol* 2021; 50(3):348–53. doi: 10.1111/vcp.12949.

305. WHO Expert Committee on Biological Standardization. WHO Technical Report Series No. 979, Annex 6 Guidelines for thromboplastins and plasma used to control oral anticoagulant therapy with vitamin K antagonists: Replacement of Annex 3 of WHO Technical Report Series, No. 889; 2013 62 [Stand: 25.09.2024]. Verfügbar unter: [https://cdn.who.int/media/docs/default-source/biologicals/blood-products/document-migration/trs\\_979\\_annex\\_6.pdf?sfvrsn=5c960b91\\_3&download=true](https://cdn.who.int/media/docs/default-source/biologicals/blood-products/document-migration/trs_979_annex_6.pdf?sfvrsn=5c960b91_3&download=true).
306. Sharp CR, deLaforcade AM, Koenigshof AM, Lynch AM, Thomason JM. Consensus on the rational use of antithrombotics in veterinary critical care (CURATIVE): domain 4-refining and monitoring antithrombotic therapies. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)* 2019; 29(1):75–87. doi: 10.1111/vec.12794.
307. Proctor RR, Rapaport SI. The partial thromboplastin time with kaolin. A simple screening test for first stage plasma clotting factor deficiencies. *Am J Clin Pathol* 1961; 36(3):212–9. doi: 10.1093/ajcp/36.3.212.
308. Langdell RD, Wagner RH, Brinkhous KM. Effect of antihemophilic factor on one-stage clotting tests; a presumptive test for hemophilia and a simple one-stage antihemophilic factor assay procedure. *J Lab Clin Med* 1953; 41(4):637–47.
309. White GC. The partial thromboplastin time: defining an era in coagulation. *J Thromb Haemost* 2003; 1(11):2267–70. doi: 10.1046/j.1538-7836.2003.00459.x.
310. Zimmerman TS, Ratnoff OD, Powell AE. Immunologic differentiation of classic hemophilia (factor 8 deficiency) and von Willebrand's disease, with observations on combined deficiencies of antihemophilic factor and proaccelerin (factor V) and on an acquired circulating anticoagulant against antihemophilic factor. *J Clin Invest* 1971; 50(1):244–54. doi: 10.1172/JCI106480.
311. Thompson AR. Factor IX antigen by radioimmunoassay. Abnormal factor IX protein in patients on warfarin therapy and with hemophilia B. *J Clin Invest* 1977; 59(5):900–10. doi: 10.1172/JCI108712.
312. Eich S, Kusch M, Grundmann C, Hanker C, Seitz R, König H. Factor VIII determination in patient's plasma and concentrates: a novel test equally suited for both matrices. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2003; 14(4):347–53. doi: 10.1097/00001721-200306000-00005.

313. Gill JC, Endres-Brooks J, Bauer PJ, Marks WJ, Montgomery RR. The effect of ABO blood group on the diagnosis of von Willebrand disease. *Blood* 1987; 69(6):1691–5.
314. McGrath KM, Johnson CA, Stuart JJ. Acquired von Willebrand disease associated with an inhibitor to factor VIII antigen and gastrointestinal telangiectasia. *Am J Med* 1979; 67(4):693–6. doi: 10.1016/0002-9343(79)90267-5.
315. Guven B, Can M, Tekin A. Comparison of fibrinogen concentrations determined by the Clauss method with prothrombin-derived measurements on an automated coagulometer. *J Appl Lab Med* 2022; 7(6):1337–45. doi: 10.1093/jalm/jfac066.
316. Schmitt Y, Ramirez I, Denzler B, Kolde H-J. Die simultane funktionelle Bestimmung des Fibrinogens und der Thromboplastinzeit mit einem turbidimetrischen Verfahren auf ELECTRA® 1000 C 1993; 17(1):13–9.
317. Jim RT. A study of the plasma thrombin time. *J Lab Clin Med* 1957; 50(1):45–60.
318. Rossi E, Mondonico P, Lombardi A, Preda L. Method for the determination of functional (clottable) fibrinogen by the new family of ACL coagulometers. *Thromb Res* 1988; 52(5):453–68. doi: 10.1016/0049-3848(88)90029-1.
319. Hasiuk MH, Russell KE, Jeffery U. Comparison of the prothrombin time-derived and Clauss assays for the measurement of plasma fibrinogen in hospitalized dogs. *Vet Clin Pathol* 2020; 49(3):394–400. doi: 10.1111/vcp.12878.
320. Millar HR, Simpson JG, Stalker AL. An evaluation of the heat precipitation method for plasma fibrinogen estimation. *J Clin Pathol* 1971; 24(9):827–30. doi: 10.1136/jcp.24.9.827.
321. Palareti G, Maccaferri M. Specific assays of hemostasis proteins: fibrinogen. *Ric Clin Lab* 1990; 20(2):167–76. doi: 10.1007/BF02877563.
322. Stief TW. The fibrinogen antigenic turbidimetric assay (FIATA): the X2x test-the corrected chi-square comparison against the control-mean. *Clin Appl Thromb Hemost* 2007; 13(1):73–100. doi: 10.1177/1076029606293436.
323. Stief TW. The fibrinogen functional turbidimetric assay. *Clin Appl Thromb Hemost* 2008; 14(1):84–96. doi: 10.1177/1076029607308031.

324. Clauss A. Gerinnungsphysiologische Schnellmethode zur Bestimmung des Fibrinogens. *Acta Haematol* 1957; 17(4):237–46. doi: 10.1159/000205234.
325. Benson RE, Catalfamo JL, Brooks MB, Dodds WJ. A sensitive immunoassay for von Willebrand factor. *J Immunoassay* 1991; 12(3):371–90. doi: 10.1080/01971529108055078.
326. Benson RE, Jones DW, Dodds WJ. Efficiency and precision of electroimmunoassay for canine factor VIII-related antigen. *Am J Vet Res* 1983; 44(3):399–403.
327. Burgess HJ, Woods JP, Abrams-Ogg ACG, Wood RD. Evaluation of laboratory methods to improve characterization of dogs with von Willebrand disease. *Can J Vet Res* 2009; 73(4):252–9.
328. Johnstone IB, Crane S. Quantitation of canine plasma von Willebrand factor antigen using a commercial enzyme-linked immunosorbent assay. *Can J Vet Res* 1991; 55(1):11–4.
329. Burgess HJ, Wood RD. Validation of a von Willebrand factor antigen enzyme-linked immunosorbent assay and newly developed collagen-binding assay. *Can J Vet Res* 2008; 72(5):420–7.
330. Sabino EP, Erb HN, Catalfamo JL. Development of a collagen-binding activity assay as a screening test for type II von Willebrand disease in dogs. *Am J Vet Res* 2006; 67(2):242–9. doi: 10.2460/ajvr.67.2.242.
331. Ewenstein BM. Use of ristocetin cofactor activity in the management of von Willebrand disease. *Haemophilia* 2001; 7(Suppl 1):10–5. doi: 10.1046/j.1365-2516.2001.00096.x.
332. Rosborough TK, Johnson GS, Benson RE, Swaim WR, Dodds WJ. Measurement of canine von Willebrand factor using ristocetin and polybrene. *Diagnosis of canine von Willebrand's disease. J Lab Clin Med* 1980; 96(1):47–56.
333. Johnson GS, Benson RE, Dodds WJ. Ristocetin cofactor activity of purified canine factor VIII: inhibition by plasma proteins. *Thromb Res* 1979; 15(5):835–46. doi: 10.1016/0049-3848(79)90192-0.

334. Leis LA, Rosborough TK, Johnson GS, Johnson GJ. Ristocetin-induced aggregation of canine platelets. *Thromb Res* 1980; 19(3):309–16. doi: 10.1016/0049-3848(80)90259-5.
335. Mischke R, Schulze U. Studies on platelet aggregation using the Born method in normal and uraemic dogs. *Vet J* 2004; 168(3):270–5. doi: 10.1016/j.tvjl.2004.02.009.
336. Johnstone IB. Multimeric analysis of von Willebrand factor in animal plasmas using sodium dodecyl sulfate agarose gel electrophoresis, semidry electrotransfer, and immunoperoxidase detection. *J Vet Diagn Invest* 1997; 9(3):314–7. doi: 10.1177/104063879700900316.
337. McCarroll DR, Lothrop SA, Dolan MC, McDonald TP. Canine von Willebrand factor expresses a multimeric composition similar to human von Willebrand factor. *Exp Hematol* 1987; 15(10):1060–7.
338. Hoyer LW, Shainoff JR. Factor VIII-related protein circulates in normal human plasma as high molecular weight multimers. *Blood* 1980; 55(6):1056–9. doi: 10.1182/blood.V55.6.1056.1056.
339. van Cott EM, Orlando C, Moore GW, Cooper PC, Meijer P, Marlar RA. Recommendations for clinical laboratory testing for antithrombin deficiency; Communication from the SSC of the ISTH. *J Thromb Haemost* 2020; 18(1):17–22. doi: 10.1111/jth.14648.
340. Cooper PC, Coath F, Daly ME, Makris M. The phenotypic and genetic assessment of antithrombin deficiency. *Int J Lab Hematol* 2011; 33(3):227–37. doi: 10.1111/j.1751-553X.2011.01307.x.
341. Stokol T, Brooks MB, Erb HN, Mauldin GE. D-dimer concentrations in healthy dogs and dogs with disseminated intravascular coagulation. *Am J Vet Res* 2000; 61(4):393–8. doi: 10.2460/ajvr.2000.61.393.
342. Griffin A, Callan MB, Shofer FS, Giger U. Evaluation of a canine D-dimer point-of-care test kit for use in samples obtained from dogs with disseminated intravascular coagulation, thromboembolic disease, and hemorrhage. *Am J Vet Res* 2003; 64(12):1562–9. doi: 10.2460/ajvr.2003.64.1562.
343. Kim TK, Oh SW, Mok YJ, Choi EY. Fluorescence immunoassay of human D-dimer in whole blood. *J Clin Lab Anal* 2014; 28(4):294–300. doi: 10.1002/jcla.21683.

344. Nelson OL, Andreasen C. The utility of plasma D-dimer to identify thromboembolic disease in dogs. *J Vet Intern Med* 2003; 17(6):830–4. doi: 10.1111/j.1939-1676.2003.tb02522.x.
345. Ferreira RRF, Gopegui RR de, Matos AJF de. Volume-dependent hemodynamic effects of blood collection in canine donors - evaluation of 13% and 15% of total blood volume depletion. *An Acad Bras Cienc* 2015; 87(1):381–8. doi: 10.1590/0001-3765201520140210.
346. Vrieling H, Neyrinck MM. Basics of apheresis and equipment. *Transfus Apher Sci* 2023; 62(2):1–2. doi: 10.1016/j.transci.2023.103671.
347. Adamik A, Klein A, Mischke R. Technische Aspekte bei der Gewinnung von Thrombozytenkonzentraten vom Hund mit einem automatischen Zellseparator. *Dtsch Tierärztl Wochenschr* 1997; 104(12):523–6.
348. Callan MB, Appleman EH, Shofer FS, Mason NJ, Brainard BM, Groman RP. Clinical and clinicopathologic effects of plateletpheresis on healthy donor dogs. *Transfusion* 2008; 48(10):2214–21. doi: 10.1111/j.1537-2995.2008.01803.x.
349. Donahue ME, Fernandez AL. Effects of storage over a 36-month period on coagulation factors in a canine plasma product obtained by use of plasmapheresis. *Am J Vet Res* 2019; 80(6):578–85. doi: 10.2460/ajvr.80.6.578.
350. Lanevski A, Wardrop KJ. Principles of transfusion medicine in small animals. *Can Vet J* 2001; 42(6):447–54.
351. Wardrop KJ, Young J, Wilson E. An in vitro evaluation of storage media for the preservation of canine packed red blood cells. *Vet Clin Pathol* 1994; 23(3):83–8. doi: 10.1111/j.1939-165x.1994.tb00684.x.
352. Cap AP, Beckett A, Benov A, Borgman M, Chen J, Corley JB et al. Whole blood transfusion. *Mil Med* 2018; 183(Suppl 2):44–51. doi: 10.1093/milmed/usy120.
353. Hughes JD, Macdonald VW, Hess JR. Warm storage of whole blood for 72 hours. *Transfusion* 2007; 47(11):2050–6. doi: 10.1111/j.1537-2995.2007.01429.x.
354. Allcock L, Hagley S. Using plasma products in small animal practice. *In Practice* 2024; 46(6):302–13. doi: 10.1002/inpr.458.

355. Hurtado C, Bonanad S, Soler MA, Mirabet V, Blasco I, Planelles MD et al. Quality analysis of blood components obtained by automated buffy-coat layer removal with a top & bottom system (Optipress (R)II). *Haematologica* 2000; 85(4):390–5.
356. Högman CF, Eriksson L, Hedlund K, Wallvik J. The bottom and top system: a new technique for blood component preparation and storage. *Vox Sang* 1988; 55(4):211–7. doi: 10.1111/j.1423-0410.1988.tb04699.x.
357. Lehmann H, Hindricks E, Hassdenteufel EM, Moritz A, Bauer N. Prospective comparative quality control study of a novel gravity-driven hollow-fiber whole blood separation system for the production of canine blood products. *Front Vet Sci* 2019; 6:1–13. doi: 10.3389/fvets.2019.00149.
358. Davidow EB, Blois SL, Goy-Thollot I, Harris L, Humm K, Musulin SE et al. Association of Veterinary Hematology and Transfusion Medicine (AVHTM) Transfusion Reaction Small Animal Consensus Statement (TRACS) Part 2: Prevention and monitoring. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)* 2021; 31(2):167–88. doi: 10.1111/vec.13045.
359. Brubaker DB. Clinical significance of white cell antibodies in febrile nonhemolytic transfusion reactions. *Transfusion* 1990; 30(8):733–7. doi: 10.1046/j.1537-2995.1990.30891020335.x.
360. Davidow EB, Blois SL, Goy-Thollot I, Harris L, Humm K, Musulin SE et al. Association of Veterinary Hematology and Transfusion Medicine (AVHTM) Transfusion Reaction Small Animal Consensus Statement (TRACS). Part 1: Definitions and clinical signs. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)* 2021; 31(2):141–66. doi: 10.1111/vec.13044.
361. Lin J-S, Tzeng C-H, Hao T-C, Hu H-Y, Ho Y-T, Lyou J-Y et al. Cytokine release in febrile non-hemolytic red cell transfusion reactions. *Vox Sang* 2002; 82(3):156–60. doi: 10.1046/j.1423-0410.2002.00159.x.
362. Blumberg N, Heal JM, Gettings KF, Phipps RP, Masel D, Refaai MA et al. An association between decreased cardiopulmonary complications (transfusion-related acute lung injury and transfusion-associated circulatory overload) and implementation of universal leukoreduction of blood transfusions. *Transfusion* 2010; 50(12):2738–44. doi: 10.1111/j.1537-2995.2010.02748.x.

363. Yazer MH, Podlosky L, Clarke G, Nahirniak SM. The effect of prestorage WBC reduction on the rates of febrile nonhemolytic transfusion reactions to platelet concentrates and RBC. *Transfusion* 2004; 44(1):10–5. doi: 10.1046/j.0041-1132.2003.00518.x.
364. Brownlee L, Wardrop KJ, Sellon RK, Meyers KM. Use of a prestorage leukoreduction filter effectively removes leukocytes from canine whole blood while preserving red blood cell viability. *J Vet Intern Med* 2000; 14(4):412–7. doi: 10.1111/j.1939-1676.2000.tb02249.x.
365. McMichael MA, Smith SA, Galligan AJ, Swanson KS, Fan TM. Effect of leukoreduction on transfusion-induced inflammation in dogs. *J Vet Intern Med* 2010; 24(5):1131–7. doi: 10.1111/j.1939-1676.2010.0561.x.
366. Davidow EB, Montgomery H, Mensing M. The influence of leukoreduction on the acute transfusion-related complication rate in 455 dogs receiving 730 packed RBCs: 2014–2017. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)* 2022; 32(4):479–90. doi: 10.1111/vec.13175.
367. Hall GBF, Birkbeck R, Brainard BM, Camacho F, Davidow EB, LeVine DN et al. A prospective multicenter observational study assessing incidence and risk factors for acute blood transfusion reactions in dogs. *J Vet Intern Med* 2024; 38(5):2495–506. doi: 10.1111/jvim.17175.
368. Radulescu SM, Skulberg R, McDonald C, Chan DL, Humm K. Randomized double-blinded clinical trial on acute transfusion reactions in dogs receiving leukoreduced versus nonleukoreduced packed red blood cells. *J Vet Intern Med* 2021; 35(3):1325–32. doi: 10.1111/jvim.16138.
369. Bosch Lozano L, Blois SL, Wood RD, Abrams-Ogg ACG, Bersenas AM, Bateman SW et al. A pilot study evaluating the effects of prestorage leukoreduction on markers of inflammation in critically ill dogs receiving a blood transfusion. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)* 2019; 29(4):385–90. doi: 10.1111/vec.12857.
370. Miglio A, Rocconi F, Cremoni V, D’Alessandro A, Reisz JA, Maslanka M et al. Effect of leukoreduction on the omics phenotypes of canine packed red blood cells during refrigerated storage. *J Vet Intern Med* 2024; 38(3):1498–511. doi: 10.1111/jvim.17031.

371. Jagodich TA, Holowaychuk MK. Transfusion practice in dogs and cats: an internet-based survey. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)* 2016; 26(3):360–72. doi: 10.1111/vec.12451.
372. Lacerda LA, Hlavac NRC, Terra SR, Back FP, Wardrop KJ, González FHD. Effects of four additive solutions on canine leukoreduced red cell concentrate quality during storage. *Vet Clin Pathol* 2014; 43(3):362–70. doi: 10.1111/vcp.12163.
373. Mukherjee S, Marwaha N, Prasad R, Sharma RR, Thakral B. Serial assessment of biochemical parameters of red cell preparations to evaluate safety for neonatal transfusions. *Indian J Med Res* 2010; 132(6):715–20.
374. Nakao M, Nakao T, Arimatsu Y, Yoshikawa H. A new preservative medium maintaining the level of adenosine triphosphate and the osmotic resistance of erythrocyte. *Proc Jpn Acad* 1960; 36(1):43–7. doi: 10.2183/pjab1945.36.43.
375. Nakao M, Nakao T, Tatibana M, Yoshikawa H. Phosphorus metabolism in human erythrocyte: III. Regeneration of adenosine triphosphate in long-stored erythrocyte by incubation with inosine and adenine. *J Biochem* 1960; 47(5):661–71. doi: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a127108.
376. Nakao K, Wada T, Kamiyama T, Nakao M, Nagano K. A direct relationship between adenosine triphosphate-level and in vivo viability of erythrocytes. *Nature* 1962; 194(4831):877–8. doi: 10.1038/194877a0.
377. Simon ER, Chapman RG, Finch CA. Adenine in red cell preservation. *J Clin Invest* 1962; 41(2):351–9. doi: 10.1172/JCI104489.
378. Dern RJ, Brewer GJ, Wiorkowski JJ. Studies on the preservation of human blood. II. The relationship of erythrocyte adenosine triphosphate levels and other in vitro measures to red cell storageability. *J Lab Clin Med* 1967; 69(6):968–78.
379. Kreuger A, Akerblom O. Adenine consumption in stored citrate-phosphate-dextrose-adenine blood. *Vox Sang* 1980; 38(3):156–60. doi: 10.1111/j.1423-0410.1980.tb02343.x.
380. D'Alessandro A, Reisz JA, Culp-Hill R, Korsten H, van Bruggen R, Korte D de. Metabolic effect of alkaline additives and guanosine/gluconate in storage solutions for red blood cells. *Transfusion* 2018; 58(8):1992–2002. doi: 10.1111/trf.14620.

381. Rolfsson Ó, Johannsson F, Magnúsdóttir M, Paglia G, Sigurjonsson ÓE, Bordbar A et al. Mannose and fructose metabolism in red blood cells during cold storage in SAGM. *Transfusion* 2017; 57(11):2665–76. doi: 10.1111/trf.14266.
382. Beutler E, Duron O. Studies on blood preservation. The relative capacities of hexoses, hexitols, and ethanol to maintain red cell ATP levels during storage. *Transfusion* 1966; 6(6):537–42. doi: 10.1111/j.1537-2995.1966.tb04776.x.
383. Dawson RB, Levine Z, Zuck T, Hershey RT, Myers C. Blood preservation XXVII. Fructose and mannose maintain ATP and 2,3-DPG. *Transfusion* 1978; 18(3):347–52. doi: 10.1046/j.1537-2995.1978.18378205145.x.
384. Park TJ, Reznick J, Peterson BL, Blass G, Omerbašić D, Bennett NC et al. Fructose-driven glycolysis supports anoxia resistance in the naked mole-rat. *Science* 2017; 356(6335):307–11. doi: 10.1126/science.aab3896.
385. Concha II, Velásquez FV, Martínez JM, Angulo C, Droppelmann A, Reyes AM et al. Human erythrocytes express GLUT5 and transport fructose. *Blood* 1997; 89(11):4190–5. doi: 10.1182/blood.V89.11.4190.
386. Nemkov T, Stephenson D, Earley EJ, Keele GR, Hay A, Key A et al. Biological and genetic determinants of glycolysis: Phosphofructokinase isoforms boost energy status of stored red blood cells and transfusion outcomes. *Cell Metab* 2024; 36(9):1979-1997. doi: 10.1016/j.cmet.2024.06.007.
387. Kay A, Beutler E. The effect of ammonium, phosphate, potassium, and hypotonicity on stored red cells. *Transfusion* 1992; 32(1):37–41. doi: 10.1046/j.1537-2995.1992.32192116430.x.
388. Rodríguez P, Rivas CI, Godoy A, Villanueva M, Fischbarg J, Vera JC et al. Redefining the facilitated transport of mannose in human cells: absence of a glucose-insensitive, high-affinity facilitated mannose transport system. *Biochemistry* 2005; 44(1):313–20. doi: 10.1021/bi048923k.
389. Sen AK, Widdas WF. Variations of the parameters of glucose transfer across the human erythrocyte membrane in the presence of inhibitors of transfer. *J Physiol* 1962; 160(3):404–16. doi: 10.1113/jphysiol.1962.sp006855.

390. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 2001; 414(6865):813–20. doi: 10.1038/414813a.
391. Kracke GR, Preston GG, Stanley TH. Identification of a sorbitol permease in human erythrocytes. *Am J Physiol* 1994; 266(2):343 - 350. doi: 10.1152/ajpcell.1994.266.2.C343.
392. Peck CC, Moore GL, Bolin RB, Dawson RB. Adenine in blood preservation. *Crit Rev Clin Lab Sci* 1981; 13(3):173–212. doi: 10.3109/10408368109106447.
393. Bartlett GR. Biology of free and combined adenine: distribution and metabolism. *Transfusion* 1977; 17(4):339–50. doi: 10.1046/j.1537-2995.1977.17477216862.x.
394. Waddell LS, Holt DE, Hughes D, Giger U. The effect of storage on ammonia concentration in canine packed red blood cells. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)* 2001; 11(1):23–6. doi: 10.1111/j.1476-4431.2001.tb00059.x.
395. Nishino T, Yachie-Kinoshita A, Hirayama A, Soga T, Suematsu M, Tomita M. Dynamic simulation and metabolome analysis of long-term erythrocyte storage in adenine-guanosine solution. *PLoS One* 2013; 8(8):1 - 12. doi: 10.1371/journal.pone.0071060.
396. Stoychev G, Kierdaszuk B, Shugar D. Xanthosine and xanthine. Substrate properties with purine nucleoside phosphorylases, and relevance to other enzyme systems. *Eur J Biochem* 2002; 269(16):4048–57. doi: 10.1046/j.1432-1033.2002.03097.x.
397. Brand K, Arese P, Rivera M. Der Anteil der Glykolyse und des Pentosephosphat-Weges am Glucoseumsatz in normalen und in Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase-Mangel-Erythrocyten. *Z Anal Chem* 1970; 252(2 - 3):210–4. doi: 10.1007/BF00546387.
398. Ghashghaenia M, Köberle M, Mrowietz U, Bernhardt I. Proliferating tumor cells mimick glucose metabolism of mature human erythrocytes. *Cell Cycle* 2019; 18(12):1316–34. doi: 10.1080/15384101.2019.1618125.
399. Burger P, Korsten H, Korte D de, Rombout E, van Bruggen R, Verhoeven AJ. An improved red blood cell additive solution maintains 2,3-diphosphoglycerate and adenosine triphosphate levels by an enhancing effect on phosphofructokinase activity during cold storage. *Transfusion* 2010; 50(11):2386–92. doi: 10.1111/j.1537-2995.2010.02700.x.

400. Sugita Y, Simon ER. The mechanism of action of adenine in red cell preservation. *J Clin Invest* 1965; 44(4):629–42. doi: 10.1172/JCI105176.
401. Altman KI. Some enzymologic aspects of the human erythrocyte. *Am J Med* 1959; 27(6):936–51. doi: 10.1016/0002-9343(59)90177-9.
402. Rapoport S, Luebering J. The formation of 2,3-diphosphoglycerate in rabbit erythrocytes: the existence of a diphosphoglycerate mutase. *J Biol Chem* 1950; 183(2):507–16. doi: 10.1016/S0021-9258(19)51175-9.
403. Rapoport S, Luebering J. Glycerate-2,3-diphosphatase. *J Biol Chem* 1951; 189(2):683–94. doi: 10.1016/S0021-9258(18)44885-5.
404. Benesch R, Benesch RE. The effect of organic phosphates from the human erythrocyte on the allosteric properties of hemoglobin. *Biochem Biophys Res Commun* 1967; 26(2):162–7. doi: 10.1016/0006-291x(67)90228-8.
405. N. N. Clinical implications of erythrocyte 2,3-diphosphoglycerate. *Lancet* 1972; 300(7774):414–5. doi: 10.1016/S0140-6736(72)91807-7.
406. Beutler E, Kuhl W. Volume control of erythrocytes during storage. The role of mannitol. *Transfusion* 1988; 28(4):353–7. doi: 10.1046/j.1537-2995.1988.28488265266.x.
407. Högman CF, Hedlund K, Sahleström Y. Red cell preservation in protein-poor media. III. Protection against in vitro hemolysis. *Vox Sang* 1981; 41(5-6):274–81. doi: 10.1111/j.1423-0410.1981.tb01049.x.
408. Cotterrell D, Whittam R. The influence of the chloride gradient across red cell membranes on sodium and potassium movements. *J Physiol* 1971; 214(3):509–36. doi: 10.1113/jphysiol.1971.sp009446.
409. Hess JR, Hill HR, Oliver CK, Lippert LE, Greenwalt TJ. Alkaline CPD and the preservation of RBC 2,3-DPG. *Transfusion* 2002; 42(6):747–52. doi: 10.1046/j.1537-2995.2002.00115.x.
410. Nemkov T, Hansen KC, Dumont LJ, D’Alessandro A. Metabolomics in transfusion medicine. *Transfusion* 2015; 56(4):980–93. doi: 10.1111/trf.13442.

411. Hess JR, Rugg N, Joines AD, Gormas JF, Pratt PG, Silberstein EB et al. Buffering and dilution in red blood cell storage. *Transfusion* 2006; 46(1):50–4. doi: 10.1111/j.1537-2995.2005.00672.x.
412. Stowell SR, Smith NH, Zimring JC, Fu X, Palmer AF, Fontes J et al. Addition of ascorbic acid solution to stored murine red blood cells increases posttransfusion recovery and decreases microparticles and alloimmunization. *Transfusion* 2013; 53(10):2248–57. doi: 10.1111/trf.12106.
413. Pallotta V, Gevi F, D’Alessandro A, Zolla L. Storing red blood cells with vitamin C and N-acetylcysteine prevents oxidative stress-related lesions: a metabolomics overview. *Blood Transfus* 2014; 12(3):376–87. doi: 10.2450/2014.0266-13.
414. Marini I, Pelzl L, Tamamushi Y, Maettler C-T, Witzemann A, Althaus K et al. Inhibition of GPIb- $\alpha$ -mediated apoptosis signaling enables cold storage of platelets. *Haematologica* 2023; 108(11):2959–71. doi: 10.3324/haematol.2022.282572.
415. Hegde S, Akbar H, Wellendorf AM, Nestheide S, Johnson JF, Zhao X et al. Inhibition of RHOA activity preserves the survival and hemostasis function of long-term cold-stored platelets. *Blood* 2024; 144(16):1732–46. doi: 10.1182/blood.2023021453.
416. Reddoch-Cardenas KM, McIntosh CS, Barrera G, Bynum JA. Cold storage of whole blood in an additive solution containing apoptotic and necrotic inhibitors. *Transfusion* 2023; 63(Suppl 3):189 - 198. doi: 10.1111/trf.17355.
417. Agar NS. The activity of sorbitol dehydrogenase in some mammalian erythrocytes. *Experientia* 1979; 35(6):790–1. doi: 10.1007/BF01968250.
418. Arai T, Washizu T, Sagara M, Sako T, Nigi H, Matsumoto H et al. D-glucose transport and glycolytic enzyme activities in erythrocytes of dogs, pigs, cats, horses, cattle and sheep. *Res Vet Sci* 1995; 58(2):195–6. doi: 10.1016/0034-5288(95)90078-0.
419. Smith J, Barnes JK, Kaneko JJ, Freedland RA. Erythrocytic enzymes of various animal species. *Nature* 1965; 205(4968):298–9. doi: 10.1038/205298a0.
420. Miglio A, Maslanka M, Di Tommaso M, Rocconi F, Nemkov T, Buehler PW et al. Zoomics: comparative metabolomics of red blood cells from dogs, cows, horses and donkeys during refrigerated storage for up to 42 days. *Blood Transfus* 2023; 21(4):314–26. doi: 10.2450/2022.0118-22.

421. Harvey JW, Kaneko JJ. Erythrocyte enzyme activities and glutathione levels of the horse, cat, dog and man. *Comp Biochem Physiol B* 1975; 52(4):507–10. doi: 10.1016/0305-0491(75)90226-6.
422. Harvey JW, Kaneko JJ. Glucose metabolism of mammalian erythrocytes. *J Cell Physiol* 1976; 89(2):219–24. doi: 10.1002/jcp.1040890205.
423. Jarvis SM, Hammond JR, Paterson RP, Clanachan AS. Species differences in nucleoside transport. A study of uridine transport and nitrobenzylthioinosine binding by mammalian erythrocytes. *Biochem J* 1982; 208(1):83–8. doi: 10.1042/bj2080083.
424. Möser GH, Schrader J, Deussen A. Turnover of adenosine in plasma of human and dog blood. *Am J Physiol* 1989; 256(4):799 - 806. doi: 10.1152/ajpcell.1989.256.4.C799.
425. Holowaychuk MK, Leader JL, Monteith G. Risk factors for transfusion-associated complications and nonsurvival in dogs receiving packed red blood cell transfusions: 211 cases (2008-2011). *J Am Vet Med Assoc* 2014; 244(4):431–7. doi: 10.2460/javma.244.4.431.
426. Blaine KP, Cortés-Puch I, Sun J, Wang D, Solomon SB, Feng J et al. Impact of different standard red blood cell storage temperatures on human and canine RBC hemolysis and chromium survival. *Transfusion* 2019; 59(1):347–58. doi: 10.1111/trf.14997.
427. European Committee (Partial Agreement) on Blood Transfusion. Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components. Recommendation No. R (95) 15. 2023: European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare (EDQM), Council of Europe [Stand: 10.02.2025]. Verfügbar unter: <https://www.edqm.eu/en/blood-guide>.
428. Prins HK, Brujin JCGH de, Henrichs H, Loos JA. Prevention of microaggregate formation by removal of "buffy coats": Abstract of the symposium on microfiltration of blood and pulmonary function organized by the Swiss Red Cross blood transfusion service in January, 1979. *Vox Sang* 1980; 39(1):48–51. doi: 10.1159/000467215.
429. Pietersz RNI, Reesink HW, Dekker WJA, Fijen FJ. Preparation of leukocyte-poor platelet concentrates from buffy coats: 1. special inserts for centrifuge cups. *Vox Sang* 1987; 53(4):203–7.

430. Heddle NM, Cook RJ, Blajchman MA, Barty RL, Sigouin CS, Boye DM et al. Assessing the effectiveness of whole blood-derived platelets stored as a pool: a randomized block noninferiority trial. *Transfusion* 2005; 45(6):896–903. doi: 10.1111/j.1537-2995.2005.04233.x.
431. Sweeney JD, Kouttab NM, Holme S, Kurtis JD, Cheves TA, Nelson EJ. Prestorage pooled whole-blood-derived leukoreduced platelets stored for seven days, preserve acceptable quality and do not show evidence of a mixed lymphocyte reaction. *Transfusion* 2004; 44(8):1212–9. doi: 10.1111/j.1537-2995.2004.03438.x.
432. Moroff G, Holme S, Dabay MH, Sawyer S, Heaton WA, Law P et al. Storage of pools of six and eight platelet concentrates. *Transfusion* 1993; 33(5):374–8. doi: 10.1046/j.1537-2995.1993.33593255595.x.
433. Bertolini F, Rebullia P, Riccardi D, Cortellaro M, Ranzi ML, Sirchia G. Evaluation of platelet concentrates prepared from buffy coats and stored in a glucose-free crystalloid medium. *Transfusion* 1989; 29(7):605–9. doi: 10.1046/j.1537-2995.1989.29789369678.x.
434. Murphy S. Platelets from pooled buffy coats: an update. *Transfusion* 2005; 45(4):634–9. doi: 10.1111/j.0041-1132.2005.04467.x.
435. Abrams-Ogg ACG, Kruth SA, Carter RF, Valli VE, Kamel-Reid S, Dubé ID. Preparation and transfusion of canine platelet concentrates. *Am J Vet Res* 1993; 54(4):635–42. doi: 10.2460/ajvr.1993.54.04.635.
436. Callan MB, Appleman EH, Sachais BS. Canine platelet transfusions. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)* 2009; 19(5):401–15. doi: 10.1111/j.1476-4431.2009.00454.x.
437. Vassallo RR, Wahab F, Giordano K, Murphy S. Improving technology for collecting platelets by apheresis: five-year experience in one blood center. *Transfusion Med Rev* 2004; 18(4):257–66. doi: 10.1016/j.tmr.2004.06.004.
438. Chien S-H, Huang H-Y, Chen Y-J, Tsai Y-C, Lu S-H, Lee L-H et al. Comparing transfusion reactions between pre-storage and post-storage leukoreduced apheresis platelets: an analysis using propensity score matching. *Ann Hematol* 2024; 103(4):1389–96. doi: 10.1007/s00277-024-05652-9.
439. Wit YES de, Vlaar R, Gouwerok E, Hamzeh-Cognasse H, van Mierlo G, Bulder I et al. Platelet concentrates in platelet additive solutions generate less complement activation

- products during storage than platelets stored in plasma. *Blood Transfus* 2023; 21(2):157–67. doi: 10.2450/2022.0323-21.
440. Hoareau GL, Jandrey KE, Burges J, Bremer D, Tablin F. Comparison of the platelet-rich plasma and buffy coat protocols for preparation of canine platelet concentrates. *Vet Clin Pathol* 2014; 43(4):513–8. doi: 10.1111/vcp.12195.
441. Heaton WA. Costs and benefits of PAS platelets: a mix of science, quality, and value. *Transfusion* 2013; 53(11):2597–602. doi: 10.1111/trf.12438.
442. Allyson K, Abrams-Ogg ACG, Johnstone IB. Room temperature storage and cryopreservation of canine platelet concentrates. *Am J Vet Res* 1997; 58(11):1338–47.
443. Haines JM, Hwang JK, Wardrop KJ. The effects of additive solutions on the development of storage lesions in stored canine platelet concentrates. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)* 2021; 31(2):247–55. doi: 10.1111/vec.13031.
444. Hlavac N, Lasta CS, Dalmolin ML, Lacerda LA, Korte D de, Marcondes NA et al. In vitro properties of concentrated canine platelets stored in two additive solutions: a comparative study. *BMC Vet Res* 2017; 13:1–11. doi: 10.1186/s12917-017-1236-8.
445. Ravicini S, Haines JM, Hwang JK, Wardrop KJ. The effects of additive solutions on the development of storage lesions in canine platelet concentrates stored at 4°C. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)* 2022; 32(5):592–601. doi: 10.1111/vec.13207.
446. Arjoonsingh A, Haines JM, Hwang JK, Guess SC, Wardrop KJ. Evaluation of platelet additive solution for prolonging storage of functional canine platelet concentrate. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)* 2023; 33(6):656–64. doi: 10.1111/vec.13335.
447. Holcomb JB, Wade CE, Michalek JE, Chisholm GB, Zarzabal LA, Schreiber MA et al. Increased plasma and platelet to red blood cell ratios improves outcome in 466 massively transfused civilian trauma patients. *Ann Surg* 2008; 248(3):447–58. doi: 10.1097/SLA.0b013e318185a9ad.
448. Holcomb JB, Zarzabal LA, Michalek JE, Kozar RA, Spinella PC, Perkins JG et al. Increased platelet:RBC ratios are associated with improved survival after massive transfusion. *J Trauma* 2011; 71(2 Suppl 3):S318-28. doi: 10.1097/TA.0b013e318227edbb.

449. Rozanski EA, Laforcade AM de. Transfusion medicine in veterinary emergency and critical care medicine. *Clin Tech Small Anim Pract* 2004; 19(2):83–7. doi: 10.1053/j.ctsap.2004.01.005.
450. Walton JE, Hale AS, Brooks MB, Boag AK, Barnett W, Dean R. Coagulation factor and hemostatic protein content of canine plasma after storage of whole blood at ambient temperature. *J Vet Intern Med* 2014; 28(2):571–5. doi: 10.1111/jvim.12277.
451. Urban R, Couto CG, Iazbik MC. Evaluation of hemostatic activity of canine frozen plasma for transfusion by thromboelastography. *J Vet Intern Med* 2013; 27(4):964–9. doi: 10.1111/jvim.12097.
452. Yaxley PE, Beal MW, Jutkowitz LA, Hauptman JG, Brooks MB, Hale AS et al. Comparative stability of canine and feline hemostatic proteins in freeze-thaw-cycled fresh frozen plasma. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)* 2010; 20(5):472–8. doi: 10.1111/j.1476-4431.2010.00563.x.
453. Culler CA, Iazbik MC, Guillaumin J. Comparison of albumin, colloid osmotic pressure, von Willebrand factor, and coagulation factors in canine cryopoor plasma, cryoprecipitate, and fresh frozen plasma. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)* 2017; 27(6):638–44. doi: 10.1111/vec.12671.
454. Stanworth SJ. The evidence-based use of FFP and cryoprecipitate for abnormalities of coagulation tests and clinical coagulopathy. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2007; 2007(1):179–86. doi: 10.1182/asheducation-2007.1.179.
455. Snow SJ, Jutkowitz LA, Brown AJ. Trends in plasma transfusion at a veterinary teaching hospital: 308 patients (1996-1998 and 2006-2008). *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)* 2010; 20(4):441–5. doi: 10.1111/j.1476-4431.2010.00557.x.
456. Lane WG, Sinnott-Stutzman VB. Retrospective evaluation of fresh frozen plasma use in 121 cats: 2009–2016. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)* 2020; 30(5):558–66. doi: 10.1111/vec.12972.
457. Thomer AJ, Santoro Beer KA. Anticoagulant rodenticide toxicosis causing tracheal collapse in 4 small breed dogs. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)* 2018; 28(6):573–8. doi: 10.1111/vec.12774.

458. Edwards TH, Parker J, Palmer LE, Majoy S, Venn EC. Transfusion for the military working dog: The Department of Defense Center of Excellence for Trauma; 2019. Joint Trauma System Clinical Practice Guidelines [Stand: 15.02.2025]. Verfügbar unter: [https://jts.health.mil/assets/docs/cpgs/Transfusion\\_in\\_Military\\_Working\\_Dog\\_10\\_Dec\\_2019\\_ID77.pdf](https://jts.health.mil/assets/docs/cpgs/Transfusion_in_Military_Working_Dog_10_Dec_2019_ID77.pdf).
459. Chan DL, Freeman LM, Rozanski EA, Rush JE. Colloid osmotic pressure of parenteral nutrition components and intravenous fluids. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)* 2001; 11(4):269–73. doi: 10.1111/j.1476-4431.2001.tb00065.x.
460. Cooper ES, Bracey AW, Horvath AE, Shanberge JN, Simon TL, Yawn DH. Practice parameter for the use of fresh-frozen plasma, cryoprecipitate, and platelets. *JAMA* 1994; 271(10):777–81. doi: 10.1001/jama.1994.03510340067036.
461. Beer KS, Silverstein DC. Controversies in the use of fresh frozen plasma in critically ill small animal patients. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)* 2015; 25(1):101–6. doi: 10.1111/vec.12280.
462. Pool JG, Hershgold EJ, Pappenhagen AR. High-potency antihæmophilic factor concentrate prepared from cryoglobulin precipitate. *Nature* 1964; 203(4942):312. doi: 10.1038/203312a0.
463. Spinella PC, Frazier E, Pidcoke HF, Dietzen DJ, Pati S, Gorkun O et al. All plasma products are not created equal: characterizing differences between plasma products. *J Trauma Acute Care Surg* 2015; 78(6 Suppl 1):18 - 25. doi: 10.1097/TA.0000000000000629.
464. Matijevic N, Wang Y-WW, Cotton BA, Hartwell E, Barbeau JM, Wade CE et al. Better hemostatic profiles of never-frozen liquid plasma compared with thawed fresh frozen plasma. *J Trauma Acute Care Surg* 2013; 74(1):S. 84–90. doi: 10.1097/TA.0b013e3182788e32.
465. Benjamin RJ, McLaughlin LS. Plasma components: properties, differences, and uses. *Transfusion* 2012; 52(Suppl 1):9 - 19. doi: 10.1111/j.1537-2995.2012.03622.x.
466. Pool JG, Shannon AE. Production of high-potency concentrates of antihemophilic globulin in a closed-bag system. *NEJM* 1965; 273(27):1443–7. doi: 10.1056/NEJM196512302732701.

467. Eder AF, Sebok MA. Plasma components: FFP, FP24, and Thawed Plasma. *Immunohematology* 2007; 23(4):150–7. doi: 10.21307/immunohematology-2019-333.
468. Callum JL, Karkouti K, Lin Y. Cryoprecipitate: the current state of knowledge. *Transfusion Med Rev* 2009; 23(3):177–88. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov.ezproxy.uni-giessen.de/19539873/>.
469. Prittie J. The role of cryoprecipitate in human and canine transfusion medicine. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)* 2021; 31(2):204–14. doi: 10.1111/vec.13034.
470. Caudill JSC, Nichols WL, Plumhoff EA, Schulte SL, Winters JL, Gastineau DA et al. Comparison of coagulation factor XIII content and concentration in cryoprecipitate and fresh-frozen plasma. *Transfusion* 2009; 49(4):765–70. doi: 10.1111/j.1537-2995.2008.02021.x.
471. Stokol T, Trepanier L, Parry BW, Finnin B. Pharmacokinetics of von Willebrand factor and factor VIII in canine von Willebrand Disease and haemophilia A. *Res Vet Sci* 1997; 63(1):23–7. doi: 10.1016/s0034-5288(97)90153-3.
472. Stokol T, Parry BW. Efficacy of fresh-frozen plasma and cryoprecipitate in dogs with von Willebrand's disease or hemophilia A. *J Vet Intern Med* 1998; 12(2):84–92. doi: 10.1111/j.1939-1676.1998.tb02100.x.
473. Elias Santo-Domingo N, Lewis DH. Indications for use and complications associated with canine plasma products in 170 patients. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)* 2021; 31(2):263–8. doi: 10.1111/vec.13047.
474. Culler CA, Balakrishnan A, Yaxley PE, Guillaumin J. Clinical use of cryopoor plasma continuous rate infusion in critically ill, hypoalbuminemic dogs. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)* 2019; 29(3):314–20. doi: 10.1111/vec.12834.
475. Cheung H, Jandrey KE, Burges J, Brooks MB, Kent MS. An in vitro study of canine cryopoor plasma to correct vitamin K–dependent coagulopathy in dogs. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)* 2021; 31(2):231–8. doi: 10.1111/vec.13049.
476. Ropski MK, Guillaumin J, Monnig AA, Townsend K, McLoughlin MA. Use of cryopoor plasma for albumin replacement and continuous antimicrobial infusion for treatment of septic peritonitis in a dog. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)* 2017; 27(3):348–56. doi: 10.1111/vec.12583.

477. Trow AV, Rozanski EA, deLaforcade AM, Chan DL. Evaluation of use of human albumin in critically ill dogs: 73 cases (2003-2006). *J Am Vet Med Assoc* 2008; 233(4):607-12. doi: 10.2460/javma.233.4.607.
478. Cohn LA, Kerl ME, Lenox CE, Livingston RS, Dodam JR. Response of healthy dogs to infusions of human serum albumin. *Am J Vet Res* 2007; 68(6):657-63. doi: 10.2460/ajvr.68.6.657.
479. Martin LG, Luther TY, Alperin DC, Gay JM, Hines SA. Serum antibodies against human albumin in critically ill and healthy dogs. *J Am Vet Med Assoc* 2008; 232(7):1004-9. doi: 10.2460/javma.232.7.1004.
480. Adamik K-N, Yozova ID. Colloids yes or no? - a "Gretchen question" answered. *Front Vet Sci* 2021; 8:1-22. doi: 10.3389/fvets.2021.624049.
481. Terradas Crespo E, Martin LG, Davidow EB. Retrospective evaluation of indications, transfusion protocols, and acute transfusion reactions associated with the administration of lyophilized canine albumin: 53 cases (2009-2020). *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)* 2023; 33(5):567-76. doi: 10.1111/vec.13316.
482. Poh D, Claus MA, Smart L, Sharp CR. Transfusion practice in Australia: an internet-based survey. *Aust Vet J* 2021; 99(4):108-13. doi: 10.1111/avj.13049.
483. Vilar P, Couto CG, Westendorf N, Iazbik MC, Charske J, Marín L. Thromboelastographic tracings in retired racing greyhounds and in non-greyhound dogs. *J Vet Intern Med* 2008; 22(2):374-9. doi: 10.1111/j.1939-1676.2008.0061.x.
484. Alhumaidan HS, Cheves TA, Holme S, Sweeney JD. The effect of filtration on residual levels of coagulation factors in plasma. *Am J Clin Pathol* 2013; 139(1):110-6. doi: 10.1309/AJCPRESG7PGIAH5.
485. Foote ML, Brooks MB, Archer TM, Wills RW, Mackin AJ, Thomason JM. Coagulation factor activity in units of leukoreduced and nonleukoreduced canine fresh-frozen plasma. *Am J Vet Res* 2019; 80(9):846-51. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31449444/>.
486. Solheim BG, Flesland O, Brosstad F, Mollnes TE, Seghatchian J. Improved preservation of coagulation factors after pre-storage leukocyte depletion of whole blood. *Transfus Apher Sci* 2003; 29(2):133-9. doi: 10.1016/S1473-0502(03)00117-4.

487. Cardigan R, Sutherland J, Garwood M, Krailadsiri P, Seghatchian J, Beard M et al. The effect of leucocyte depletion on the quality of fresh-frozen plasma. *Br J Haematol* 2001; 114(1):233–40. doi: 10.1046/j.1365-2141.2001.02907.x.
488. Kretzschmar E, Kruse F, Greiss O, Paunovic D, Kallweit T, Trobisch H. Effects of extended storage of whole blood before leucocyte depletion on coagulation factors in plasma. *Vox Sang* 2004; 87(3):156–64. doi: 10.1111/j.1423-0410.2004.00563.x.
489. Sivertsen J, Braathen H, Lunde THF, Spinella PC, Dorlac W, Strandenes G et al. Preparation of leukoreduced whole blood for transfusion in austere environments; effects of forced filtration, storage agitation, and high temperatures on hemostatic function. *J Trauma Acute Care Surg* 2018; 84(6 Suppl 1):93 - 103. doi: 10.1097/TA.0000000000001896.
490. Sivertsen J, Hervig TA, Strandenes G, Kristoffersen EK, Braathen H, Apelseth TO. In vitro quality and hemostatic function of cold-stored CPDA-1 whole blood after repeated transient exposure to 28°C storage temperature. *Transfusion* 2022; 62(Suppl 1):105 - 113. doi: 10.1111/trf.16970.
491. Meledeo MA, Peltier GC, McIntosh CS, Bynum JA, Cap AP. Optimizing whole blood storage: hemostatic function of 35-day stored product in CPD, CP2D, and CPDA-1 anticoagulants. *Transfusion* 2019; 59(Suppl 2):1549–59. doi: 10.1111/trf.15164.
492. Schubert P, Chen Z, Bhakta V, Culibrk B, Wambolt R, Sheffield WP et al. Cold-stored leukoreduced whole blood: extending the time between donation and filtration has minimal impact on in vitro quality. *Transfusion* 2021; 61(Suppl 1):131 - 143. doi: 10.1111/trf.16540.
493. Zaldívar-López S, Marín LM, Iazbik MC, Westendorf-Stingle N, Hensley S, Couto CG. Clinical pathology of Greyhounds and other sighthounds. *Vet Clin Pathol* 2011; 40(4):414–25. doi: 10.1111/j.1939-165X.2011.00360.x.
494. Smith SA, Ngwenyama TR, O'Brien M, Herring JM, Corsi R, Galligan AJ et al. Procoagulant phospholipid concentration in canine erythrocyte concentrates stored with or without prestorage leukoreduction. *Am J Vet Res* 2015; 76(1):35–41. doi: 10.2460/ajvr.76.1.35.

495. Herring JM, Smith SA, McMichael MA, O'Brien M, Ngwenyama TR, Corsi R et al. Microparticles in stored canine RBC concentrates. *Vet Clin Pathol* 2013; 42(2):163–9. doi: 10.1111/vcp.12034.
496. Muro SM, Lee JH, Stokes JV, Ross MK, Archer TM, Wills RW et al. Effects of leukoreduction and storage on erythrocyte phosphatidylserine expression and eicosanoid concentrations in units of canine packed red blood cells. *J Vet Intern Med* 2017; 31(2):410–8. doi: 10.1111/jvim.14664.
497. McMichael MA, Smith SA. Viscoelastic coagulation testing: technology, applications, and limitations. *Vet Clin Pathol* 2011; 40(2):140–53. doi: 10.1111/j.1939-165X.2011.00302.x.
498. Enk NM, Kutter APN, Kuemmerle-Fraune C, Sigrist NE. Correlation of plasma coagulation tests and fibrinogenClaus with rotational thromboelastometry parameters and prediction of bleeding in dogs. *J Vet Intern Med* 2019; 33(1):132–40. doi: 10.1111/jvim.15365.
499. Hicks DG, Connor AM, Laposata M. Laboratory diagnosis and monitoring of disseminated intravascular coagulation. *Lab Med* 1987; 18(9):585–9. doi: 10.1093/labmed/18.9.585.
500. Solomon C, Sørensen B, Hochleitner G, Kashuk J, Ranucci M, Schöchel H. Comparison of whole blood fibrin-based clot tests in thrombelastography and thromboelastometry. *Anesth Analg* 2012; 114(4):721–30. doi: 10.1213/ANE.0b013e31824724c8.
501. McMichael MA, Smith SA, McConachie EL, Lascola K, Wilkins PA. In-vitro hypocoagulability on whole blood thromboelastometry associated with in-vivo expansion of red cell mass in an equine model. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2011; 22(5):424–30. doi: 10.1097/MBC.0b013e3283464f83.
502. Shibata J, Hasegawa J, Siemens H-J, Wolber E, Dibbelt L, Li D et al. Hemostasis and coagulation at a hematocrit level of 0.85: functional consequences of erythrocytosis. *Blood* 2003; 101(11):4416–22. doi: 10.1182/blood-2002-09-2814.
503. Jud Schefer R, Heimgartner L, Stirn M, Sigrist NE. Determination of reference intervals for single vial rotational thromboelastometry (ROTEM) parameters and correlation with

- plasmatic coagulation times in 49 clinically healthy dogs. *Res Vet Sci* 2020; 129:129–36. doi: 10.1016/j.rvsc.2020.01.014.
504. Kalina U, Stöhr H-A, Bickhard H, Knaub S, Siboni SM, Mannucci PM et al. Rotational thromboelastography for monitoring of fibrinogen concentrate therapy in fibrinogen deficiency. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2008; 19(8):777–83. doi: 10.1097/MBC.0b013e32830ef90c.
505. Schubert P, Culibrk B, Bhakta V, Closas T, Sheffield WP, Devine DV et al. Minimal impact of anticoagulant on in vitro whole blood quality throughout a 35-day cold-storage regardless of leukoreduction timing. *Transfusion* 2022; 62(Suppl 1):98 - 104. doi: 10.1111/trf.16977.
506. Smith SA, McMichael MA, Gilor S, Galligan AJ, Hoh CM. Correlation of hematocrit, platelet concentration, and plasma coagulation factors with results of thromboelastometry in canine whole blood samples. *Am J Vet Res* 2012; 73(6):789–98. doi: 10.2460/ajvr.73.6.789.
507. Smith SA, McMichael MA, Galligan AJ, Gilor S, Hoh CM. Clot formation in canine whole blood as measured by rotational thromboelastometry is influenced by sample handling and coagulation activator. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2010; 21(7):692–702. doi: 10.1097/MBC.0b013e32833e9c47.
508. Wissenschaftliche Dienste des Deutschen Bundestages. Sachstand - Rechtliche Rahmenbedingungen für Blutspenden: Aktenzeichen: WD 9 - 3000 - 088/22; 2023. Verfügbar unter: <https://www.bundestag.de/resource/blob/935470/b4f18197f92ca023efeb3b51d87a45d5/WD-9-088-22-pdf.pdf> [Stand: 06.09.2024].
509. Ali A, Auvinen M-K, Rautonen J. The aging population poses a global challenge for blood services. *Transfusion* 2010; 50(3):584–8. doi: 10.1111/j.1537-2995.2009.02490.x.
510. Fendrich K, Hoffmann W. More than just aging societies: the demographic change has an impact on actual numbers of patients. *J Public Health* 2007; 15(5):345–51. doi: 10.1007/s10389-007-0142-0.

511. Fiedler SA, Henseler O, Hoffelner M, Doll M, Hutschenreuter G, Hoch J et al. Monitoring blood supply in Germany: a regulatory perspective. *Transfus Med Hemother* 2023; 50(2):129–34. doi: 10.1159/000528974.
512. Greinacher A, Weitmann K, Schönborn L, Alpen U, Gloger D, Stangenberg W et al. A population-based longitudinal study on the implication of demographic changes on blood donation and transfusion demand. *Blood Adv* 2017; 1(14):867–74. doi: 10.1182/bloodadvances.2017005876.
513. Feldman BF, Kristensen AT. Modern veterinary blood banking practices and their applications in companion animal practice. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 1995; 25(6):1231–43. doi: 10.1016/s0195-5616(95)50151-2.
514. Banco de Sangue Anima (BSA). Offizielle Webseite [Stand: 31.08.2024]. Verfügbar unter: [https://bsanimal.pt/?lang=en\\_UK](https://bsanimal.pt/?lang=en_UK).
515. Pet Blood Bank UK. Offizielle Webseite; 2024. Verfügbar unter: <https://www.petbloodbankuk.org/>.
516. Gesetz über den Verkehr mit Tierarzneimitteln und zur Durchführung unionsrechtlicher Vorschriften betreffend Tierarzneimittel: Tierarzneimittelgesetz - TAMG.
517. Office P. Verordnung (EU) 2019/6 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 11. Dezember 2018 über Tierarzneimittel und zur Aufhebung der Richtlinie 2001/82/EG.
518. Bundesrat. Drucksache 247/21: Gesetzentwurf der Bundesregierung Entwurf eines Gesetzes zum Erlass eines Tierarzneimittelgesetzes und zur Anpassung arzneimittelrechtlicher und anderer Vorschriften; 2021 26.03.2021.
519. Helm J, Knottenbelt C. Blood transfusions in dogs and cats 2. Practicalities of blood collection and administration. *In Pract* 2010; 32(6):231–7. doi: 10.1136/inpract.32.6.231.
520. Blais M-C, Berman L, Oakley DA, Giger U. Canine Dal blood type: a red cell antigen lacking in some dalmatians. *J Vet Intern Med* 2007; 21(2):281–6. doi: 10.1892/0891-6640(2007)21[281:CDBTAR]2.0.CO;2.

521. Ebelt AK, Fuchs S, Weber C, Müller E, Giger U. Survey of blood groups DEA 1, DEA 4, DEA 5, Dal, and Kai 1/Kai 2 in different canine breeds from a diagnostic laboratory in Germany. *Front Vet Sci* 2020; 7:1–10. doi: 10.3389/fvets.2020.00085.
522. Holowaychuk MK, Musulin SE. The effect of blood usage protocol on the age of packed red blood cell transfusions administered at 2 veterinary teaching hospitals. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)* 2015; 25(5):679–83. doi: 10.1111/vec.12339.
523. Maglaras CH, Koenig A, Bedard DL, Brainard BM. Retrospective evaluation of the effect of red blood cell product age on occurrence of acute transfusion-related complications in dogs: 210 cases (2010-2012). *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)* 2017; 27(1):108–20. doi: 10.1111/vec.12530.
524. Hann L, Brown DC, King LG, Callan MB. Effect of duration of packed red blood cell storage on morbidity and mortality in dogs after transfusion: 3,095 cases (2001-2010). *J Vet Intern Med* 2014; 28(6):1830–7. doi: 10.1111/jvim.12430.
525. Engelke M, Brieske CM, Parmar V, Flaschel N, Kureishi A, Hosch R et al. Predicting individual patient platelet demand in a large tertiary care hospital using machine learning. *Transfus Med Hemother* 2023; 50(4):277–85. doi: 10.1159/000528428.
526. Mitterecker A, Hofmann A, Trentino KM, Lloyd A, Leahy MF, Schwarzbauer K et al. Machine learning-based prediction of transfusion. *Transfusion* 2020; 60(9):1977–86. doi: 10.1111/trf.15935.
527. Guillaumin J, Satchell PW, Yaxley PE, Bruckman MA, Sen Gupta A. Safety profile of repeated infusion of platelet-like nanoparticles in healthy dogs. *Am J Vet Res* 2022; 83(10):1–8. doi: 10.2460/ajvr.22.04.0069.
528. Saour M, Blin C, Zeroual N, Mourad M, Amico M, Gaudard P et al. Impact of a bundle of care (intravenous iron, erythropoietin and transfusion metabolic adjustment) on post-operative transfusion incidence in cardiac surgery: a single-centre, randomised, open-label, parallel-group controlled pilot trial. *Lancet Reg Health Eur* 2024; 43:1–11. doi: 10.1016/j.lanepe.2024.100966.
529. Spahn DR, Goodnough LT. Alternatives to blood transfusion. *Lancet* 2013; 381(9880):1855–65. doi: 10.1016/S0140-6736(13)60808-9.

530. Comas Collgros N, Zapridis V, Godolphin JD, Bacon N. Impact of a cell salvage device on blood transfusions to dogs undergoing surgery at a referral veterinary hospital. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)* 2024; 34(4):376–86. doi: 10.1111/vec.13403.
531. Edwards TH, Venn EC, Le TD, Grantham LE, Hogen T, Ford R et al. Comparison of shelf-stable and conventional resuscitation products in a canine model of hemorrhagic shock. *J Trauma Acute Care Surg* 2024; 97(2 Suppl 1):105 - 112. doi: 10.1097/TA.0000000000004332.
532. Hazelton JP, Ssentongo AE, Oh JS, Ssentongo P, Seamon MJ, Byrne JP et al. Use of cold-stored whole blood is associated with improved mortality in hemostatic resuscitation of major bleeding: a multicenter study. *Ann Surg* 2022; 276(4):579–88. doi: 10.1097/SLA.0000000000005603.
533. Nessen SC, Eastridge BJ, Cronk D, Craig RM, Berséus O, Ellison R et al. Fresh whole blood use by forward surgical teams in Afghanistan is associated with improved survival compared to component therapy without platelets. *Transfusion* 2013; 53(Suppl 1):107 - 113. doi: 10.1111/trf.12044.
534. Edwards TH, Rizzo JA, Pusateri AE. Hemorrhagic shock and hemostatic resuscitation in canine trauma. *Transfusion* 2021; 61(Suppl 1):264 - 274. doi: 10.1111/trf.16516.
535. Storer AP, Edwards TH, Rutter CR, Young GE, Mullaney SB. Causes of mortality in military working dog from traumatic injuries. *Front Vet Sci* 2024; 11:1–11. doi: 10.3389/fvets.2024.1360233.
536. Spinella PC, Pidcoke HF, Strandenes G, Hervig TA, Fisher A, Jenkins D et al. Whole blood for hemostatic resuscitation of major bleeding. *Transfusion* 2016; 56(Suppl 2):190 - 202. doi: 10.1111/trf.13491.
537. Jobs DR, Sesok-Pizzini D, Friedman D. Reduced transfusion requirement with use of fresh whole blood in pediatric cardiac surgical procedures. *Ann Thorac Surg* 2015; 99(5):1706–11. doi: 10.1016/j.athoracsur.2014.12.070.
538. Armand R, Hess JR. Treating coagulopathy in trauma patients. *Transfusion Med Rev* 2003; 17(3):223–31. doi: 10.1016/s0887-7963(03)00022-1.
539. Hess JR. Resuscitation of trauma-induced coagulopathy. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2013; 2013(1):664–7.

540. Torkildsen L, Bishop MA, Barr JW, Pashmakova MB. Comparison of multiple thawing techniques on thaw time and stability of hemostatic proteins in canine plasma products. *J Small Anim Pract* 2018; 59(10):641–5. doi: 10.1111/jsap.12903.
541. Sherman LA, Dorner IM. A new rapid method for thawing fresh frozen plasma. *Transfusion* 1974; 14(6):595 - 597.
542. Beattie G, Cohan CM, Ng VL, Victorino GP. Liquid plasma: A solution to optimizing early and balanced plasma resuscitation in massive transfusion. *J Trauma Acute Care Surg* 2020; 89(3):488–95. doi: 10.1097/TA.0000000000002822.
543. Turner MA, Rahilly LJ, O'Marra SK. Ex vivo evaluation of the efficacy of canine fresh-frozen plasma thawed using a microwave plasma defroster. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)* 2018; 28(6):603–7. doi: 10.1111/vec.12768.
544. Hurst TS, Turrentine MA, Johnson GS. Evaluation of microwave-thawed canine plasma for transfusion. *J Am Vet Med Assoc* 1987; 190(7):863–5.
545. Fadeyi EA, Saha AK, Soltani S, Naal T, Palmer R, Bakht A et al. A comparison between liquid group A plasma and thawed group A plasma for massive transfusion activation in trauma patients. *Vox Sang* 2022; 117(4):513–9. doi: 10.1111/vox.13210.
546. Chehab M, Ditillo M, Obaid O, Nelson A, Poppe B, Douglas M et al. Never-frozen liquid plasma transfusion in civilian trauma: a nationwide propensity-matched analysis. *J Trauma Acute Care Surg* 2021; 91(1):200–5. doi: 10.1097/TA.0000000000003116.
547. Potkay S, Zinn RD. Effects of collection interval, body weight, and season on the hemograms of canine blood donors. *Lab Anim Care* 1969; 19(2):192–8.
548. Schneider A. Blood components.: Collection, processing, and storage. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 1995; 25(6):1245–61. doi: 10.1016/s0195-5616(95)50152-4.
549. Chown B. Anaemia from bleeding of the fetus into the mother's circulation. *Lancet* 1954; 266(6824):1213–5. doi: 10.1016/s0140-6736(54)92446-0.
550. Bruner DW, Hull EF, Doll ER. The relation of blood factors to icterus in foals. *Am J Vet Res* 1948; 9:237–42.

551. Coombs RRA, Crowhurst RC. Haemolytic disease of newborn foals due to isoimmunization of pregnancy. *J Hyg (Lond)* 1948; 46(4):403–18. doi: 10.1017/s0022172400036573.
552. Blais M-C, Rozanski EA, Hale AS, Shaw SP, Cotter SM. Lack of evidence of pregnancy-induced alloantibodies in dogs. *J Vet Intern Med* 2009; 23(3):462–5. doi: 10.1111/j.1939-1676.2009.0286.x.
553. Hohenhaus AE. Importance of blood groups and blood group antibodies in companion animals. *Transfus Med Rev* 2004; 18(2):117–26. doi: 10.1016/j.tmr.2003.12.003.
554. Swisher SN, Young LE. The blood grouping systems of dogs. *Physiol Rev* 1961; 41(3):495–520. doi: 10.1152/physrev.1961.41.3.495.
555. Goy-Thollot I, Giger U, Boisvineau C, Perrin R, Guidetti M, Chaprier B et al. Pre- and post-transfusion alloimmunization in dogs characterized by 2 antiglobulin-enhanced cross-match tests. *J Vet Intern Med* 2017; 31(5):1420–9. doi: 10.1111/jvim.14801.
556. Guidetti M, Goy-Thollot I, Boisvineau C, Giger U. Alloimmunization of a dog erythrocyte antigen 1- dog transfused with weakly dog erythrocyte antigen 1+ blood. *J Vet Intern Med* 2019; 33(5):2037–45. doi: 10.1111/jvim.15565.
557. Herter L, Weingart C, Merten N, Bock N, Merle R, Kohn B. Alloimmunization in dogs after transfusion: a serial cross-match study. *J Vet Intern Med* 2022; 36(5):1660–8. doi: 10.1111/jvim.16521.
558. Thomas-Hollands A, Hess RS, Weinstein NM, Fromm S, Chappini NA, Marrayott K et al. Evaluation of post-transfusion RBC alloimmunization in dogs using a gel-column crossmatch with and without anti-canine globulin enhancement. *J Vet Diagn Invest* 2024; 36(2):213–21. doi: 10.1177/10406387231222895.
559. Bauer N, Eralp O, Moritz A. Establishment of reference intervals for kaolin-activated thromboelastography in dogs including an assessment of the effects of sex and anticoagulant use. *J Vet Diagn Invest* 2009; 21(5):641–8. doi: 10.1177/104063870902100508.

560. Clinical and Laboratory Standards Institute. Collection, transport, and processing of blood specimens for testing plasma-based coagulation assays.: CLSI guideline H21. 5th ed.: CLSI; 2008.
561. Bauer N, Er E, Moritz A. Influence of blood collection technique on platelet function and coagulation variables in dogs. *Am J Vet Res* 2011; 72(1):64–72. doi: 10.2460/ajvr.72.1.64.
562. DeVenuto F, Wilson SM, Lowe CV. Relative viscosity and specific gravity of human blood during cold storage. *Proc Soc Exp Biol Med* 1970; 134(1):169–73. doi: 10.3181/00379727-134-34752.
563. Trudnowski RJ, Rico RC. Specific gravity of blood and plasma at 4 and 37 °C. *Clin Chem* 1974; 20(5):615–6.
564. DIAGNOSTICA STAGO S.A.S. Referenzhandbuch STA Compact Max; 2017.
565. Eralp O. Establishment of reference intervals for kaolinactivated TEG and the STA Compact automated analyzer for dogs and coagulation response in a canine model of endotoxemia [Dissertation]. 1. Auflage. Gießen: VVB Laufersweiler Verlag; 2011. (Edition scientifique).
566. DIAGNOSTICA STAGO S.A.S. Packungsbeilage STA® - C.K. Prest® 5: Bestimmung der Kaolin-aktivierten partiellen Thromboplastinzeit (APTT); REF 00597; 2018.
567. Larrieu MJ, Weiland C. Utilisation de la céphaline dans les tests de coagulation. *Rev Hematol* 1957; 12(2):199–210.
568. Bell WN, Alton HG. A brain extract as a substitute for platelet suspensions in the thromboplastin generation test. *Nature* 1954; 174(4436):880–1 [Stand: 14.07.2024]. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/13214029/>.
569. Adamis D, Sise HS, Kimball DM. The proconvertin test: a simplified method and its application to the study of anticoagulant processes. *J Lab Clin Med* 1956; 47(2):320–5.
570. Horowitz HI, Wilcox WP, Fujimoto MM. Assay of plasma thromboplastin antecedent (PTA) with artificially depleted normal plasma. *Blood* 1963; 22(1):35–43.
571. Zacharski LR, Rosenstein R. Standardization of the one-stage assay for factor VIII (antihemophilic factor). *Am J Clin Pathol* 1978; 70(2):280–6. doi: 10.1093/ajcp/70.2.280.

572. DIAGNOSTICA STAGO S.A.S. Packungsbeilage STA® - Deficient V: Substratplasma für die quantitative Bestimmung von Faktor V; REF 00744; 2017.
573. DIAGNOSTICA STAGO S.A.S. Packungsbeilage STA® - Deficient VII: Immunadsorbiertes Plasma für die quantitative Bestimmung von Faktor VII; REF 00743; 2017.
574. DIAGNOSTICA STAGO S.A.S. Packungsbeilage STA® - Deficient VIII: Immunadsorbiertes Plasma für die quantitative Bestimmung von Faktor VIII; REF 00725; 2018.
575. DIAGNOSTICA STAGO S.A.S. Packungsbeilage STA® - ImmunoDef IX: Immunadsorbiertes Plasma für die quantitative Bestimmung von Faktor IX; REF 00734; 2018.
576. DIAGNOSTICA STAGO S.A.S. Packungsbeilage STA® - Deficient X: Immunadsorbiertes Plasma für die quantitative Bestimmung von Faktor X; REF 00738; 2017.
577. DIAGNOSTICA STAGO S.A.S. Packungsbeilage STA® - Staclot® Protein C 1: Quantitative Bestimmung der Protein C-Aktivität; REF 00747; 2019.
578. DIAGNOSTICA STAGO S.A.S. Packungsbeilage STA® - Staclot® Protein S: Quantitative Bestimmung der Protein S-Aktivität; REF 00746; 2018.
579. Wolf M, Boyer-Neumann C, Martinoli JL, Leroy-Matheron C, Amiral J, Meyer D et al. A new functional assay for human protein S activity using activated factor V as substrate. *Thromb Haemost* 1989; 62(4):1144–5.
580. DIAGNOSTICA STAGO S.A.S. Packungsbeilage STA® - Liquid Fib: Quantitative Fibrinogen-Bestimmung nach Clauss; REF 00673; 2019.
581. Odegard OR, Lie M, Abildgaard U. Heparin cofactor activity measured with an amidolytic method. *Thromb Res* 1975; 6(4):287–94. doi: 10.1016/0049-3848(75)90078-x.
582. DIAGNOSTICA STAGO S.A.S. Packungsbeilage STA® - Stachrom® AT III 3: Kolorimetrische Bestimmung von Antithrombin; REF 00596; 2018.
583. Demers C, Henderson P, Blajchman MA, Wells MJ, Mitchell L, Johnston M et al. An antithrombin III assay based on factor Xa inhibition provides a more reliable test to identify congenital antithrombin III deficiency than an assay based on thrombin inhibition. *Thromb Haemost* 1993; 69(3):231–5.

584. DIAGNOSTICA STAGO S.A.S. Packungsbeilage STA® - Liatest®D-Di PLUS: Immunturbidimetrische Bestimmung von D-Dimer; REF 00662; 2019.
585. DIAGNOSTICA STAGO S.A.S. Packungsbeilage STA®-Liatest® VWF:Ag: Immunturbidimetrische Bestimmung des von Willebrand Faktors; REF 00518; 2018.
586. Oger E, Leroyer C, Bressollette L, Nonent M, Le Moigne E, Bizais Y et al. Evaluation of a new, rapid, and quantitative D-dimer test in patients with suspected pulmonary embolism. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158(1):65–70. doi: 10.1164/ajrccm.158.1.9710058.
587. S. Köhler, Sales Administration Assistant, Stago Deutschland GmbH. Bezüglich Ihrer Anfrage vom 10.06.2024 zu DDI und DDI Plus [sic] [E-Mail]; 2024 11.06.2024.
588. Harr KE, Flatland B, Nabity MB, Freeman KP. ASVCP guidelines: allowable total error guidelines for biochemistry. *Vet Clin Pathol* 2013; 42(4):424–36. doi: 10.1111/vcp.12101.
589. Westgard JO. Useful measures and models for analytical quality management in medical laboratories. *Clin Chem Lab Med* 2016; 54(2):223–33. doi: 10.1515/cclm-2015-0710.
590. Nabity MB, Harr KE, Camus MS, Flatland B, Vap LM. ASVCP guidelines: allowable total error hematology. *Vet Clin Pathol* 2018; 47(1):9–21. doi: 10.1111/vcp.12583.
591. Engelen C. De Novo Referenzintervallerstellung ausgewählter Parameter der plasmatischen Gerinnung von Katzen unter besonderer Berücksichtigung der physiologischen Inhibitoren [Dissertation]. 1. Auflage. Gießen: VVB Laufersweiler Verlag; 2018. (Edition scientifique).
592. Chae R, Nguyen C, Archdeacon C, Wattley L, Sisak S, Price A et al. Whole blood storage duration alters fibrinogen levels and thrombin formation. *J Trauma Acute Care Surg* 2024; 97(1):39–47. doi: 10.1097/TA.0000000000004317.
593. Spinella PC, Perkins JG, Grathwohl KW, Beekley AC, Holcomb JB. Warm fresh whole blood is independently associated with improved survival for patients with combat-related traumatic injuries. *J Trauma* 2009; 66(Suppl 4):69 - 76. doi: 10.1097/TA.0b013e31819d85fb.

594. Hess JR, Thomas MJG. Blood use in war and disaster: lessons from the past century. *Transfusion* 2003; 43(11):1622–33. doi: 10.1046/j.1537-2995.2003.00576.x.
595. Holcomb JB, Spinella PC. Optimal use of blood in trauma patients. *Biologicals* 2010; 38(1):72–7. doi: 10.1016/j.biologicals.2009.10.007.
596. Holcomb JB, McMullin NR, Pearse L, Caruso J, Wade CE, Oetjen-Gerdes L et al. Causes of death in U.S. Special Operations Forces in the global war on terrorism: 2001-2004. *Ann Surg* 2007; 245(6):986–91. doi: 10.1097/01.sla.0000259433.03754.98.
597. Duque P, Calvo A, Lockie C, Schöch H. Pathophysiology of trauma-induced coagulopathy. *Transfus Med Rev* 2021; 35(4):80–6. doi: 10.1016/j.tmr.2021.07.004.
598. Gottlieb DL, Prittie J, Buriko Y, Lamb KE. Evaluation of acute traumatic coagulopathy in dogs and cats following blunt force trauma. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)* 2017; 27(1):35–43. doi: 10.1111/vec.12525.
599. Herrero Y, Jud Schefer R, Muri BM, Sigrist NE. Prevalence of acute traumatic coagulopathy in acutely traumatized dogs and association with clinical and laboratory parameters at presentation. *Vet Comp Orthop Traumatol* 2021; 34(3):214–22. doi: 10.1055/s-0040-1721707.
600. Herrero Y, Schefer RJ, Muri BM, Sigrist NE. Serial evaluation of haemostasis following acute trauma using rotational thromboelastometry in dogs. *Vet Comp Orthop Traumatol* 2021; 34(3):206–13. doi: 10.1055/s-0040-1719167.
601. Holowaychuk MK, Hanel RM, Darren Wood R, Rogers L, O'Keefe K, Monteith G. Prospective multicenter evaluation of coagulation abnormalities in dogs following severe acute trauma. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)* 2014; 24(1):93–104. doi: 10.1111/vec.12141.
602. Nilsson L, Hedner U, Nilsson IM, Robertson B. Shelf-life of bank blood and stored plasma with special reference to coagulation factors. *Transfusion* 1983; 23(5):377–81. doi: 10.1046/j.1537-2995.1983.23584018713.x.
603. Bormann B von, Wirtz S, Weiler J, Bormann C von, Trobisch H. Die Qualität von Vollblut in Abhängigkeit von Herstellungsverfahren (Leukozytendepletion) und Lagerungsdauer. Bedeutung für die operationsvorbereitende Eigenblutspende.

- Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther 2000; 35(5):326–32. doi: 10.1055/s-2000-323.
604. Pidcoke HF, McFaul SJ, Ramasubramanian AK, Parida BK, Mora AG, Fedyk CG et al. Primary hemostatic capacity of whole blood: a comprehensive analysis of pathogen reduction and refrigeration effects over time. *Transfusion* 2013; 53(Suppl 1):137 - 149. doi: 10.1111/trf.12048.
605. Huish S, Green L, Curnow E, Wiltshire M, Cardigan R. Effect of storage of plasma in the presence of red blood cells and platelets: re-evaluating the shelf life of whole blood. *Transfusion* 2019; 59(11):3468–77. doi: 10.1111/trf.15549.
606. Boström F, Sjö Dahl M, Wehlin L, Egberg N, Lundahl J. Coagulation parameters in apheresis and leukodepleted whole-blood plasma during storage. *Transfusion* 2007; 47(3):460–3. doi: 10.1111/j.1537-2995.2007.01136.x.
607. Kim Y, Bae H, Yu D. The in vitro effects of acidemia and acidemia reversal on coagulation in dogs. *Front Vet Sci* 2024; 11:1–8. doi: 10.3389/fvets.2024.1427237.
608. Gulliksson H. Defining the optimal storage conditions for the long-term storage of platelets. *Transfus Med Rev* 2003; 17(3):209–15. doi: 10.1016/s0887-7963(03)00020-8.
609. Wittes J. Sample size calculations for randomized controlled trials. *Epidemiol Rev* 2002; 24(1):39–53. doi: 10.1093/epirev/24.1.39.
610. Algina J, Olejnik S. Conducting power analyses for Anova and Ancova in between-subjects designs. *Eval Health Prof* 2003; 26(3):288–314. doi: 10.1177/0163278703255248.
611. Gosselin RC, Marshall C, Dwyre DM, Gresens C, Davis D, Scherer L et al. Coagulation profile of liquid-state plasma. *Transfusion* 2013; 53(3):579–90. doi: 10.1111/j.1537-2995.2012.03772.x.
612. Mischke R, Diedrich M, Nolte I. Sensitivity of different prothrombin time assays to factor VII deficiency in canine plasma. *Vet J* 2003; 166(1):79–85. doi: 10.1016/s1090-0233(02)00250-2.
613. Mischke R, Nolte I. Optimization of prothrombin time measurements in canine plasma. *Am J Vet Res* 1997; 58(3):236–41.

614. Chen Q, Shou W, Wu W, Guo Y, Zhang Y, Huang C et al. Biological and analytical variations of 16 parameters related to coagulation screening tests and the activity of coagulation factors. *Semin Thromb Hemost* 2015; 41(3):336–41. doi: 10.1055/s-0034-1543994.
615. The Royal College of Pathologists of Australasia Quality Assurance Programs. Haematology analytical performance specifications [Stand: 03.12.2024]. Verfügbar unter: [https://rcpaqap.com.au/wp-content/uploads/2023/09/RCPA\\_302678\\_APS-Haematology-Document-Update\\_WEB.pdf](https://rcpaqap.com.au/wp-content/uploads/2023/09/RCPA_302678_APS-Haematology-Document-Update_WEB.pdf).
616. Chesher D. Evaluating assay precision. *Clin Biochem Rev* 2008; 29(Suppl 1):23 - 26.
617. Fogh JM. A study of hemophilia A in German shepherd dogs in Denmark. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 1988; 18(1):245–54. doi: 10.1016/s0195-5616(88)50019-0.
618. Dodds WJ. Canine von Willebrand's disease. *J Lab Clin Med* 1970; 76(5):713–21.
619. Feldman DG, Brooks MB, Dodds WJ. Hemophilia B (factor IX deficiency) in a family of German shepherd dogs. *J Am Vet Med Assoc* 1995; 206(12):1901–5.
620. Brooks MB, Catalfamo JL, Brown HA, Ivanova P, Lovaglio J. A hereditary bleeding disorder of dogs caused by a lack of platelet procoagulant activity. *Blood* 2002; 99(7):2434–41. doi: 10.1182/blood.v99.7.2434.
621. Podlasek SJ, Langberg AF, Sacher RA. Rapid thawing of fresh frozen plasma in two-liter bags. *Am J Emerg Med* 1990; 8(6):475–8. doi: 10.1016/0735-6757(90)90145-p.
622. Donner A. The relative effectiveness of procedures commonly used in multiple regression analysis for dealing with missing values. *Am Stat* 1982; 36(4):378–81.
623. Brazzell JL, Borjesson DL. Evaluation of plasma antithrombin activity and D-dimer concentration in populations of healthy cats, clinically ill cats, and cats with cardiomyopathy. *Vet Clin Pathol* 2007; 36(1):79–84. doi: 10.1111/j.1939-165x.2007.tb00186.x.
624. Tecles F, Muñoz A, Cerón JJ, Freeman KP. The number of replicates, and pooling versus individual measurements for analytical imprecision calculations: does it matter? *Vet Clin Pathol* 2020; 49(1):112–8. doi: 10.1111/vcp.12830.

## 10. Anhang

Nr.	Pool	Rasse	Alter in Jahren	Geschlecht	Gewicht in kg	Entnommene Blutmenge in ml <sup>†</sup>	Blutgruppe DEA 1.1
1	1	Landseer	2,6	w	46,7	457,1	positiv
2	1	Rottweiler	8,0	wk	35,0	449,5	positiv
3	1	Alaskan Malamute	2,4	m	37,0	453,3	positiv
4	2	Alaskan Malamute	4,2	m	52,0	457,1	negativ
5	2	Alaskan Malamute	7,9	m	32,0	449,5	negativ
6	2	Alaskan Malamute	5,3	wk	46,0	452,4	negativ
7 <sup>†</sup>	3	DSH	2,5	w	31,0	447,6	negativ
8 <sup>†</sup>	3	DSH	2,8	m	45,0	454,3	negativ
9 <sup>†</sup>	3	DSH	7,2	w	33,0	459,0	negativ
10	4	DSH	4,2	wk	31,0	454,3	negativ
11	4	DSH	2,2	m	34,8	455,2	negativ
12	4	DSH	3,0	w	30,6	435,2	negativ
13	5	DSH	3,1	w	27,1	453,3	negativ
14	5	DSH	7,8	m	39,6	463,8	negativ
15	5	DSH	3,1	wk	31,5	461,0	negativ
16	6	DSH	6,9	m	35,2	455,2	negativ
17	6	DSH	3,2	m	40,0	454,3	negativ
18	6	American Staffordshire Terrier	3,2	mk	32,0	459,0	negativ
19	7	Labrador Retriever	6,5	w	30,0	453,3	positiv
20	7	Labrador Retriever	7,0	wk	30,0	450,5	positiv
21	7	Golden Retriever	6,2	w	35,0	454,3	positiv

Tabelle A 1: Signalement, Poolzugehörigkeit, während der Spende entnommene Blutmenge und DEA 1.1 Status der verwendeten Versuchstiere. Das Alter der Tiere sowie die entnommene Blutmenge sind auf eine Nachkommastelle gerundet angegeben.

<sup>†</sup> Für endgültige Auswertung aufgrund des Ausschlusses des Pools nicht berücksichtigt.

<sup>‡</sup> Angabe aus dem vorhergehenden Dissertationsprojekt (32) übernommen.

Abkürzungen: DEA 1.1 = Dog Erythrocyte Antigen, DSH = Deutscher Schäferhund, kg = Kilogramm, m = männlich, mk = männlich-kastriert, ml = Milliliter, Nr. = Nummer, w = weiblich, wk = weiblich-kastriert.

10. Anhang

Pool	Medium	Zeitpunkt	Fib in g/l	FIX in %-RA	FVII in %-RA	FV in %-RA	FX in %-RA	vWF-Ag in %-RA	aPTT in s	AT3 in %-RA	DDIM in µg FEU /ml	FVIII in %-RA	PC in %-RA	PS in %-RA	PT in s
1	VB	0	1,62	142	87	73	75	182	11,3	129	0	103	79	19	8,6
1	VB	1	1,63	140	98	79	81	182	11,5	137	0,24	80	77	109	8,6
1	VB	3	1,62	142	100	77	91	184	11,8	134	0,18	88	73	97	8,8
1	VB	5	1,63	137	107	90	89	171	11,7	137	0,21	75	71	59	8,6
1	VB	10	1,59	132	93	87	84	154	12,3	134	0,19	70	62	32	8,6
1	VB	15	1,61	124	88	61	73	157	12,5	131	0,2	57	66	75	8,7
1	VB	21	1,51	121	81	55	73	63	12,7	132	0,16	50	62	117	9
1	VB	28	0,98	115	86	48	66	52	15,2	108	0,16	37	53	78	9,8
1	VBPAGGS	0	1,25†	111†	81†	61†	68†	119†	13,4†	114†	0,17†	57†	55†	72†	9,5†
1	VBPAGGS	1	1,35	122	94	72	68	158	12,3	117	0,16	75	68	110	9,3
1	VBPAGGS	3	1,41	117	91	74	78	150	12,1	119	0,09	82	66	85	9,1
1	VBPAGGS	5	1,36	115	98	79	76	151	12,8	119	0,15	63	54	36	9,1
1	VBPAGGS	10	1,32	113	83	73	71	136	12,8	120	0,25	58	47	16	9,4
1	VBPAGGS	15	1,35	107	73	50	62	127	12,9	118	0,19	47	57	62	9,1
1	VBPAGGS	21	1,3	106	58	42	63	68	13,2	112	0,18	45	55	121	9,6
1	VBPAGGS	28	0,64	96	69	40	58	43	17,4	93	0,15	32	41	73	10,6
2	VB	0	2,55	158	140	75	98	119	12	127	0,15	78	74	7	8
2	VB	1	2,58	193	142	93	105	114	12,4	132	0,12	73	74	33	7,9
2	VB	3	2,37	142	147	85	108	98	12,5	125	0,08	52	56	14	8
2	VB	5	2,4	147	163	93	119	92	13	135	0,21	48	64	0	8
2	VB	10	2,47	173	138	97	111	75	13	135	0,22	38	51	0	7,8
2	VB	15	2,36	145	128	70	94	65	13,2	124	0,15	34	61	13	8,1
2	VB	21	2,14	140	141	58	89	25	14,1	125	0,08	27	55	14	8,5
2	VB	28	0,24	143	134	54	90	27	16,4	93	0,09	25	11	41	9,3
2	VBPAGGS	0	2,35	151	123	70	95	117	12	119	0,13	85	73	104	8,3
2	VBPAGGS	1	2,41	169	134	76	101	114	12,3	125	0,02	72	76	35	7,8
2	VBPAGGS	3	2,27	137	150	80	102	85	13,1	120	0,1	39	50	2	8,3
2	VBPAGGS	5	2,37	144	150	84	109	89	12,9	126	0,21	49	56	1	7,9

10. Anhang

2	VBPAGGS	10	2,37	146	140	85	105	75	13,3	128	0,15	37	45	0	8
2	VBPAGGS	15	2,15	137	122	60	82	60	13,7	114	0,19	29	55	5	8,2
2	VBPAGGS	21	2,05	134	112	58	85	25	14,4	117	0,15	28	46	0	8,6
2	VBPAGGS	28	1,41	46	100	44	28	26	19,3	93	0,13	1	20	26	9,6
3	VB	0	1,51	118	94	79	87	186	12,9	132	0,17	73	74	99	8,7
3	VB	1	1,52	119	88	78	86	192	12,6	134	0,1	78	72	97	8,6
3	VB	3	1,44	120	93	82	73	176	12,8	136	0,21	76	65	87	8,4
3	VB	5	1,45	90	91	73	72	88	13,8	118	0,37	46	60	0	9,1
3	VB	10	†	†	†	†	†	†	†	†	†	†	†	†	†
3	VB	15	1,01	71	62	40	51	49	16,9	93	0,13	17	24	0	9,9
3	VB	21	1,38	100	79	54	68	82	14,5	127	0,15	26	44	33	9
3	VB	28	1,31	94	77	46	67	76	15,5	125	0,19	28	18	45	9,3
3	VBPAGGS	0	1,12	79	62	57	61	122	14,7	97	0,18	59	58	75	9,9
3	VBPAGGS	1	1,04	88	66	62	64	132	13,9	101	0,13	14	60	66	10
3	VBPAGGS	3	1,05	81	61	56	60	108	14,7	105	0,15	46	35	35	9,7
3	VBPAGGS	5	1,07	65	65	68	56	67	15,5	88	0,89	35	57	0	10,3
3	VBPAGGS	10	†	†	†	†	†	†	†	†	†	†	†	†	†
3	VBPAGGS	15	1,34	100	81	54	72	81	14,9	119	0,11	24	36	0	8,7
3	VBPAGGS	21	0,98	72	49	35	49	49	17,2	99	0,14	18	30	28	10,4
3	VBPAGGS	28	0,96	62	50	33	49	43	18,2	95	0,17	16	13	23	11,6
4	VB	0	1,83	125	79	81	76	190	11	124	0,35	128	85	126	8,4
4	VB	1	1,71	112	77	76	75	157	12,3	126	0,47	81	75	54	8,6
4	VB	3	1,74	115	80	76	77	156	12,7	130	0,42	54	58	11	8,7
4	VB	5	1,68	100	79	79	77	98	13,4	125	0,39	38	38	0	8,8
4	VB	10	1,6†	94	64	57	60	121	13,7†	122†	0,52†	30	33	0	8,6
4	VB	15	1,39	97	65	53	62	34	15,3	118	0,38	21	36	0	8,8
4	VB	21	1,5	94	62	54	61	52	15,3	122	0,91	25	36	0	9,6
4	VB	28	1,35	95	62	43	60	34	16,1	110	0,74	19	27	0	10,4
4	VBPAGGS	0	1,24	94	60	70	58	103	12,8	91	0,32	91	74	95	9,7
4	VBPAGGS	1	1,23	81	61	67	55	116	13,4	93	0,31	53	45	35	9,6
4	VBPAGGS	3	1,26	81	59	65	60	115	14,6	95	0,29†	36	41	13	9,6
4	VBPAGGS	5	1,19	67	58	56	52	80	15,2	93	0,32	26	28	0	9,7

10. Anhang

4	VBPAGGS	10	1,12	69	46	39	45	84	15,7	89	0,25	21	20	0	10
4	VBPAGGS	15	1,06	71	46	44	48	29	16,7	88	0,23	22	16	48	10,2
4	VBPAGGS	21	1,1	67	50	44	48	31	17,8	91	0,27	13	20	0	11,1
4	VBPAGGS	28	1,03	68	41	40	44	24	18,9	88	0,3	11	13	15	12,3
5	VB	0	1,48	122	107	79	83	123	12	123	0,36	85	66	72	8,8
5	VB	1	1,65	114	94	75	82	93	13,3	133	0,25	53	38	0	9
5	VB	3	1,49	89	88	76	72	87	13,8	119	0,53	39	61	0	8,9
5	VB	5	1,48	107	83	68	74	77	14,6	122	0,37	30	39	0	9
5	VB	10	1,48	109	82	53	70	96	14,9	130	0,29	30	27	0	9,1
5	VB	15	1,46	96	24	46	62	51	15,8	114	0,3	24	29	0	9,7
5	VB	21	0,85	27	26	2	10	43	29,3	86	0,22	1	0	0	10,4
5	VB	28	1,34	96	74	45	63	35	17,8	119	0,23	16	19	0	11
5	VBPAGGS	0	1,03	86	76	57	60	95	13,9	94	0,16	69	46	39	10
5	VBPAGGS	1	1,08	84	72	61	65	67	14,6	99	0,26	39	32	6	10,1
5	VBPAGGS	3	1,12	74	68	59	58	62	16	93	0,25	28	29	0	10
5	VBPAGGS	5	1,03	75	65	53	58	55	16,4	90	0,29	24	23	0	10,3
5	VBPAGGS	10	1	72	64	42	52	60	16,5	94	0,22	23	16	0	10,5
5	VBPAGGS	15	0,98	70	44	35	47	22	18	84	0,21	16	17	0	11,1
5	VBPAGGS	21	0,92	64	55	35	46	26	18,8	89	0,3	13	9	0	11,6
5	VBPAGGS	28	0,88	66	45	29	43	20	20	82	0,3	10	13	0	13,3
6	VB	0	1,36	121	69	59	72	139	12,1	127	0,17	81	80	136	8,5
6	VB	1	1,37	114	66	58	68	125	12,4	128	0,13	68	71	111	8,3
6	VB	3	1,29	112	53	64	69	119	12,5	127	0,22	60	66	89	8,7
6	VB	5	0,99	82	42	42	51	89	14,8	92	0,11	45	44	95	10,1
6	VB	10	1,23	114	61	49	60	73	13,4	123	0,18	46	53	95	8,8
6	VB	15	1,21	110	58	58	70	66	13,4	125	0,18	44	59	79	9,2
6	VB	21	1,13	104	65	52	67	47	14,3	127	0,21	34	50	69	9,8
6	VB	28	1,2	105	65	46	65	51	14	110	0,21	37	52	136	10,1
6	VBPAGGS	0	0,94	73	48	37	50	97	15,4	94	0,11	55	66	114	10,2
6	VBPAGGS	1	1,01	81	44	43	51	93	14,3	97	0,17	57	50	119	9,9
6	VBPAGGS	3	0,99	84	40	38	51	85	14,7	91	0,17	49	48	69	10,2
6	VBPAGGS	5	1,32	124	63	54	68	110	13,2	126	0,22	47	58	111	8,6

10. Anhang

6	VBPAGGS	10	0,91	80	45	37	46	45	16	95	0,15	30	30	68	10,3
6	VBPAGGS	15	0,92	70	42	39	45	34	16,3	91	0,1	25	27	65	10,5
6	VBPAGGS	21	0,87	67	40	37	46	21	17,4	88	0,15	18	26	35	11,7
6	VBPAGGS	28	0,87	71	39	31	47	23	17,9	87	0,14	17	16	86	12,1
7	VB	0	1,31	120	85	52	66	170	12,8	113	0,15	98	73	143	8,6
7	VB	1	1,25	121	88	56	67	85	13	118	0,13	62	68	83	8,3
7	VB	3	1,24	112	70	42	63	86	12,9	110	0,12	61	61	101	8,9
7	VB	5	1,21	91	51	40	50	71	13,3	113	0,13	51	48	31	8,8
7	VB	10	1,21	111	80	57	63	78	14,2	114	0	49	44	0	8,8
7	VB	15	1,17	102	79	54	59	75	14,4	113	0,12	32	43	52	8,8
7	VB	21	1,22	102	72	45	60	59	14,9	117	0,15	27	58	29	9,7
7	VB	28	1,18	99	69	47	61	64	15,1	117	0,18	29	49	77	9,9
7	VBPAGGS	0	1,02	103	60	42	51	83	13,9	91	0,11	60	58	200	9,6
7	VBPAGGS	1	1	94	63	43	51	78	14,1	98	0,07	56	60	79	9,4
7	VBPAGGS	3	1,02	114	74	55	66	81	14,8	85	0,11	54	59	78	10,1
7	VBPAGGS	5	1,01	86	46	40	48	63	15,1	90	0,17	38	41	30	9,9
7	VBPAGGS	10	0,99	82	59	47	48	55	15,9	91	0,13	31	26	8	10,2
7	VBPAGGS	15	0,98	80	48	42	48	49	51,1	86	0,11	26	30	11	10,7
7	VBPAGGS	21	0,96	72	56	37	46	59	16,3	89	0,18	21	33	41	10,6
7	VBPAGGS	28	0,94	70	50	35	47	43	16,8	88	0,19	19	34	13	11,4

Tabelle A 2: Messwerte der untersuchten Parameter in den verschiedenen Pools aufgeteilt nach Medien im Zeitverlauf.

† Fehlende Werte, durch „group mean imputation“ ersetzt

‡ Fehlende Messwerte, zensiert

Abkürzungen: %-RA = Prozent Referenzaktivität, µg FEU/ml = Mikrogramm Fibrinogen Equivalent Units (Fibrinogen-äquivalenten Einheiten) pro Milliliter, aPTT = aktivierte partielle Thromboplastinzeit, AT3 = Antithrombin, DDIM = D-Dimere, Fib = Fibrinogen, FV = Faktor V, FVII = Faktor VII, FVIII = Faktor VIII, FIX = Faktor IX, FX = Faktor X, g/l = Gramm pro Liter, PC = Protein C, PS = Protein S, PT = Prothrombinzeit, s = Sekunden, VB = Vollblut mit Citrat-Phosphat-Dextrose (CPD), VBPAGGS = VB mit zusätzlichem/r Phosphat, Adenin, Glukose, Guanosin, Kochsalzlösung und Mannitol (PAGGS-M), vWF-Ag = Von-Willebrand-Faktor-Antigen.

10. Anhang

Messtag	FV		FVII		FIX		FX		vWF-Ag	
	Aktivität N-KT in %-RA	Aktivität 1 :2-KT in %-RA	Aktivität N-KT in %-RA	Aktivität 1 :2-KT in %-RA	Aktivität N-KT in %-RA	Aktivität 1 :2-KT in %-RA	Aktivität N-KT in %-RA	Aktivität 1 :2-KT in %-RA	Aktivität N-KT in %-RA	Aktivität 1 :2-KT in %-RA
1	85	21	62	26	M. n. v.	M. n. v.	73	30	135	62
2	82	23	68	31	124	51	73	32	138	67
3	80	24	58	27	118	51	73	31	143	78
4	M. n. v.	M. n. v.	M. n. v.	M. n. v.	93	30	M. n. v.	M. n. v.	131	69
5	58	12	54	20	112	49	61	M. n. v.	136	69
6	M. n. v.	M. n. v.	M. n. v.	M. n. v.	M. n. v.	M. n. v.	M. n. v.	M. n. v.	78	41
7	M. n. v.	M. n. v.	M. n. v.	M. n. v.	M. n. v.	M. n. v.	M. n. v.	M. n. v.	M. n. v.	45
8	56	11	48	18	118	52	58	24	85	43
9	58	11	50	18	119	51	61	26	86	45
10	55	M. n. v.	48	M. n. v.	112	M. n. v.	61	M. n. v.	80	M. n. v.
11	M. n. v.	15	M. n. v.	22	M. n. v.	47	M. n. v.	26	M. n. v.	46
12	M. n. v.	13	M. n. v.	21	M. n. v.	46	M. n. v.	28	M. n. v.	45
13	M. n. v.	13	M. n. v.	21	M. n. v.	46	M. n. v.	26	M. n. v.	38
14	65	M. n. v.	50	M. n. v.	112	M. n. v.	63	M. n. v.	89	M. n. v.

Tabelle A 3: Ergebnisse der Qualitätskontrollmessungen mittels (unverdünntem) Poolplasma der neu etablierten Parameter im Verlauf der Messtage.

Abkürzungen: %-RA = Prozent Referenzaktivität, 1 :2-KT = niedrige Kontrolle/Kontrolle im pathologischen Bereich, FV = Faktor V, FVII = Faktor VII, FIX = Faktor IX, FX = Faktor X, M. n. v. = Messung nicht verfügbar, N-KT = Normalkontrolle/Kontrolle im physiologischen Bereich, vWF-Ag = Von-Willebrand-Faktor-Antigen.

## 11. Danksagung

Last but not least möchte ich mich bei allen bedanken, die den erfolgreichen Abschluss dieser Arbeit möglich gemacht haben. Sehr viele Menschen haben mich in den letzten Jahren auf meinem Werdegang begleitet und dazu beigetragen. Sie alle hier aufzuführen und ihnen ausreichend Dank zukommen zu lassen, würde den Rahmen dieser Arbeit bei Weitem sprengen, weshalb ich mich auf eine exemplarische Auswahl beschränken muss.

Zunächst gebührt mein Dank Herrn Prof. Dr. Andreas Moritz und Frau Prof. Dr. Natali Bauer für die Überlassung des Themas dieser Dissertation, die Betreuung dieser Arbeit in ihren verschiedenen Phasen, die Hilfestellungen bei der Testetablierung sowie für die Möglichkeiten, die mir durch die Anstellung in der Inneren Medizin und dem Zentrallabor geboten wurden. Auch weiß ich das mir von ihnen entgegengebrachte Vertrauen hinsichtlich der Durchführung von Supervisionsaufgaben in Zytologie und Zentrallabor sehr zu schätzen und bedanke mich herzlich für die wertvollen (Führungs-)Erfahrungen, die ich in diesem Rahmen sammeln durfte. Frau Prof. Dr. Natali Bauer danke ich darüber hinaus für ihr Mentoring als Laborleiterin, Chefzytologin und für ihre Begabung, stets einen anderen Blickwinkel auf die Dinge aufzuzeigen. Ihre Begeisterung war hierbei immer ansteckend!

Danken möchte ich auch dem Team der Zytologie und des Zentrallabors einschließlich aller jetzigen und ehemaligen Mitarbeiter, die mich auf meinen Weg begleitet haben. Insbesondere seien hierbei Lisa Kaiser, Franziska Schulte und Valeria Patané hervorgehoben. Ihr alle habt unser Labor zu einem besonderen Ort für mich gemacht und ich hätte mir kein besseres Team wünschen können.

Dr. Hendrik Lehmann danke ich für die Vorarbeiten, die er für diese Arbeit geleistet, die Fragen, die er zu seiner Arbeit beantwortet hat und die mir stets wertschätzend entgegenbrachten Worte.

Claudia Bender sei für die Durchführung der Messungen am „Kevin“ gedankt. Sie hat mir damit mehr als nur eine schlaflose Nacht erspart.

Max möchte ich für seine unvergleichbare Art danken, die jeden noch so langen Kliniktag aufgelockert hat. Ich bin sehr froh, dass wir ein gutes Beispiel dafür liefern, dass man auch im „fortgeschrittenen Alter“ noch neue Freunde finden kann, die es Wert sind, im Dunkeln allein auf den Parkplätzen von schwedischen Möbelhäusern zu verweilen.

Mirjam danke ich für ihre Freundschaft, ihr stets offenes Ohr zu jeder möglichen und unmöglichen Zeit, den gegenseitigen Beistand auch in schweren Zeiten, unzählige gelachte Tränen und unvergessliche Dienste in der Zytologie. So oft weiß ich nicht, was ich ohne dich getan hätte. Ich hoffe, unsere Freundschaft bleibt noch lange bestehen.

## 11. Danksagung

---

Meinen Eltern möchte ich dafür danken, dass sie diese Arbeit durch ihre uneingeschränkte Unterstützung und ihren Zuspruch über Jahre an Schule, Studium und Postgraduiertenausbildung hinweg überhaupt erst ermöglicht haben. Ich danke euch für euren Beistand in jeder Lebenslage, eure Geduld und eure stets offenen Ohren für alle meine Sorgen. Ohne euch wäre nichts von dem, was ich erreicht habe, je möglich gewesen; ich bin euch unendlich dankbar, dass ich meine Träume erfüllen durfte.

Nicht zu kurz soll auch der Dank für meine Freunde Robin, Phillip, Frank und Manuel kommen. Die unzähligen, wunderbaren Stunden, die wir in Schule, Studium und abseits davon miteinander verbracht haben, haben mich zu dem Menschen geformt, der ich heute gerne bin. Hervorzuheben ist hierbei ganz besonders Manuels mehr als geglücktes Bestreben, eine gewisse „Lebensfähigkeit“ meinerseits herzustellen.

Meiner Partnerin Joana gebührt großer Dank dafür, dass sie jeden Tag großes Durchhaltevermögen hinsichtlich meiner kleinen und großen Verrücktheiten beweist. Darüber hinaus wurde noch nie eine solch geduldige Korrektur meiner Zeichensetzung durchgeführt. Du bist die beste Motivation, über mich hinauszuwachsen, die ich mir vorstellen kann. Und du hast mir bewiesen, die besten Dinge passieren einem offensichtlich manchmal, wenn man es am wenigsten erwartet.

Ein großes Danke geht auch an Leo und Cappu für willkommene Ablenkungen, täglich vermittelte Lebensfreude und regelmäßig frisch gebackenes „Beagle-Brot“.

Zum Abschluss sei nochmal dem gesamten Team der Kleintierklinik gedankt, die diesen Arbeitsplatz mit einem Potpourri an Persönlichkeiten und Fähigkeiten auch ganz abseits der Tiermedizin, zu einem besonderen Ort; einer zweiten Heimat machen und sich jeder Widrigkeit zum Trotz, seien es Hackerangriffe, Pandemien oder Personalengpässe, aufopferungsvoll um ihre/unsere tierischen Patienten und deren BesitzerInnen kümmern.



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**  
**STAUFBENBERGRING 15**  
**D-35396 GIESSEN**

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de

**ISBN: 978 3 8359 7260 5**



9 783835 197260 5