

## **E. Zusammenfassung**

Das Ziel der vorliegenden Untersuchung war im Hinblick auf eine breitere klinische Anwendung von Thrombozytenkonzentrat (TK) beim Hund, die Lagerfähigkeit von automatisch gewonnenem TK des Hundes unter verschiedenen Lagerungsbedingungen zu untersuchen.

Hierfür wurden 27 TK vom Hund mit Hilfe eines automatischen Zellseparators in zwei verschiedenen Separationssets, dem C4-Set mit Lagerungsbeuteln aus einer geringgradig gasdurchlässigen Di(ethylhexyl)phthalat-haltigen Polyvinylchlorid (PVC)-Folie und dem für die Lagerung konzipierten C4L-Set mit Beuteln aus einer hochgradig gasdurchlässigen Polyolefin(PO)-Folie, gewonnen und für 10 Tage unter permanenter Agitation auf einem Horizontalschüttler unter verschiedenen Lagerungsbedingungen gelagert:

1. C4/22°C (n = 10): Lagerung bei 22 °C in Beuteln des C4-Sets
2. C4L/22°C (n = 11): Lagerung bei 22 °C in Beuteln des C4L-Sets
3. C4L/4°C (n = 6): Lagerung bei 4 °C in Beuteln des C4L-Sets

Die caninen TK, die unmittelbar nach Gewinnung im Mittel der einzelnen Lagerungsbedingungen Zellgesamtzahlen von  $1,55-1,66 \times 10^{11}$  Thrombozyten,  $0,82-1,18 \times 10^7$  Leukozyten und  $1,1-2,0 \times 10^9$  Erythrozyten enthielten, wurden unmittelbar nach der Herstellung, nach sechstündiger Lagerung und jeden weiteren Tag während der insgesamt 10tägigen Lagerung makroskopisch untersucht sowie die Thrombozytenzahl (automatisch mit Zellzählgerät und Zelldifferenzierungsautomaten und visuell), die Zahl der Aggregate, das mittlere Plättchenvolumen (MPV), die Funktionsfähigkeit der Thrombozyten hinsichtlich ihrer Aggregationsfähigkeit und im Resonanzthrombogramm (RTG) sowie der pH-Wert, die Glukose-, Laktat-, Bikarbonat-, Kaliumionen-, Albumin- und Gesamteiweißkonzentration als auch die Laktat-Dehydrogenase(LDH)-Aktivität im Plasma ermittelt.

Die Thrombozytenzahl in den untersuchten TK blieb während der Lagerung sowohl nach der automatischen wie auch der visuellen Bestimmung überwiegend konstant.

Die nur mit den automatischen Zellzählverfahren teilweise gegen Lagerungsende in bei 22°C gelagertem TK registrierten geringfügigen Abnahmen der Thrombozytenzahl können unter anderem auf die besonders bei 22°C-Lagerung deutlich zunehmende Zahl von mikroskopisch in der Zählkammer nachgewiesenen Thrombozytenaggregaten zurückzuführen sein. Der Anteil der in Aggregaten zusammengelagerten Thrombozyten betrug unter den verschiedenen Lagerungsbedingungen am Lagerungsende im Mittel 21 - 42 %. Dies könnte neben einer parallel zum pH-Abfall zunehmenden Schwellung bzw. durch Kälteeinwirkung bedingten Abkuglung der Thrombozyten eine mögliche Erklärung für den bei 22°C-Lagerung mit dem Zellzählgerät gefundenen Anstieg des MPV sein, der sich allerdings mit dem Zelldifferenzierungsautomaten nicht nachweisen ließ.

Der Verlust der Funktionstüchtigkeit bei Kollagen- wie Adenosindiphosphat-induzierter Thrombozytenaggregation zeigte eine auffällige Abhängigkeit von den Lagerungsbedingungen. Die gelagerten Thrombozyten verloren ihre Aggregationsfähigkeit unter C4/22°C-Bedingungen nach 2tägiger, unter C4L/22°C- nach 4tägiger und unter C4L/4°C-Bedingungen erst nach 8tägiger Lagerung. Das vorherige Waschen und Resuspendieren der Thrombozyten in Frischplasma verzögerte dabei den Funktionsverlust. Da ein Verlust der im RTG beschriebenen Funktionstüchtigkeit unwesentlich später auffällig wurde, ist eine Lagerung von caninem TK bei permanenter Agitation bei 22 °C in PVC-Beuteln für 48 Stunden, in PO-Beuteln für 4 Tage zu empfehlen. Unter Kühlung in PO-Beuteln erhielt das canine TK für 8 bis 9 Tage seine In-vitro-Funktion.

Der während der Lagerung in deutlicher Abhängigkeit von den Lagerungsbedingungen unterschiedlich lange fortdauernde Energiestoffwechsel der Thrombozyten wurde auch anhand des zwischen den Lagerungsbedingungen deutlich variierenden Glukoseverbrauchs und der Laktatproduktion deutlich. Als wesentliches Ergebnis ist der hieraus resultierende Abfall des pH-Wertes hervorzuheben, der aufgrund der geringen Gasdurchlässigkeit der PVC-Beutels (C4/22°C) bereits nach 3tägiger Lagerung im Mittel unter den Meßbereich des für die Messung herangezogenen Blutgasanalysegerätes (pH = 6,0) fiel, während er in Folge der hohen Gasdurchlässigkeit der PO-Beutel diesen Wert bei 22°C-Lagerung (C4L/22°C) im

Mittel erst nach 6tägiger Lagerung und bei 4°C-Lagerung (C4L/4°C) innerhalb der Lagerungsdauer von 10 Tagen überhaupt nicht erreichte.

Der unterschiedliche Anstieg der Enzymaktivität der im Zytosol der Thrombozyten lokalisierten LDH und die Zunahme der Konzentration der überwiegend im Zytoplasma enthaltenen Kaliumionen im TK-Plasma verdeutlichten ebenfalls die während der TK-Lagerung in Abhängigkeit von den Lagerungsbedingungen unterschiedlich schnell auftretende Permeabilitätsstörung oder Zerstörung der Zellmembran der Thrombozyten.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen die Grenzen der Lagerbarkeit von TK vom Hund auf. Die caninen Thrombozyten unterliegen während der Lagerung in Abhängigkeit von den Lagerungsbedingungen ähnlichen metabolischen, strukturellen und funktionellen Veränderungen wie menschliche, teilweise sogar mit höherer Geschwindigkeit und in stärkerem Ausmaß. Bei der Auswahl der optimalen Lagerungsbedingungen für canines TK sollten jedoch auch In-Vivo-Untersuchungen einbezogen werden, die dieser Studie anzuschließen sind.

## F. Summary

Astrid Klein (1999)

### **Influence of storage time and storage condition on the quality of platelet concentrates from dogs.**

The aim of this investigation, with regard to a more wide-spread clinical use of platelet concentrates in dogs, was to test the ability to store canine platelet concentrates which were obtained automatically under different storage conditions.

27 platelet concentrates from dogs were produced with the help of an automatic cell separator using two different cell separation sets, firstly the C4-set with a storage container consisting of **Polyvinylchlorid (PVC) foil** which contains Di(ethylhexyl) phthalate and is slightly diffusionable for gas and secondly the C4L-set, developed for storage, with a storage container consisting of **Polyolefin foil** which is highly diffusionable for gas. The storage was undertaken for a period of 10 days under permanent agitation with a flat-bed-agitator and different storage conditions:

1. C4/22°C (n = 10): storage at 22 °C in containers of the **C4-sets**
2. C4L/22°C (n = 11): storage at 22 °C in containers of the **C4L-sets**
3. C4L/4°C (n = 6): storage at 4 °C in containers of the **C4L-sets**

The canine platelet concentrates which immediately after production contained 1,55-1,66 x 10<sup>11</sup> platelets, 0,82-1,18 x10<sup>7</sup> leukocytes and 1,1-2,0 x 10<sup>9</sup> erythrocytes per unit (medians of the different storage conditions), were examined macroscopically. The platelet count (determined automatically with a blood cell counter or a cell differentiation automat and visually), the number of aggregates, the mean platelet volume (MPV) and the platelet function with regard to their ability to aggregate in vitro and in the resonance-thrombogram (RTG) were assessed. In addition the pH, the plasma concentrations of glucose, lactate, bicarbonate, potassium ions, albumin and total protein as well as the activity of lactate dehydrogenase (LDH) were measured

directly after the production of the platelet concentrate, after 6 hours and then daily until the 10<sup>th</sup> day of storage.

The platelet count of the tested platelet concentrates, measured automatically as well as visually, remained preponderantly constant over the complete storage time. A slight decrease of platelet counts assessed by automatic counting methods could partially be observed at the end of the storage period in platelet concentrates stored at 22°C. This can - among other reasons - be caused by the clear increase of the number of aggregates, which were assessed by microscopy in the counting chamber especially under 22°C-storage conditions. The part of platelets aggregated amounted to 21 - 42 % in the mean under the different storage conditions at the end of the storage period. Besides an increased swelling of thrombocytes due to the decrease of pH and their transformation into a spherical form by cold, this could also be a possible explanation for the temporary increase of MPV measured with the cell counter. This could not be demonstrated with the cell differentiation automat.

The loss of platelet function measured by aggregation induced by collagen or adenosin diphosphate showed a significant dependency of storage conditions. The stored platelets lost their ability to aggregate under C4/22°C-conditions after a storage period of 2 days, under C4L/22°C-conditions after 4 days and under C4L/4°C-conditions after 8 days of storage. Washing and resuspending of platelets in fresh plasma delayed the loss of platelet function. Because of a loss of platelet function described in the RTG became significant at nearly the same point in time, a storage of canine platelet concentrates under permanent agitation at 22 °C in PVC-containers can be recommended for 48 hours and in PO-containers for a maximum of 4 days. The canine platelet concentrate maintained its function in vitro under cold-storage conditions for 8 to 9 days.

A continued energy metabolism of the platelets for different time period which exhibited a dependency of the storage conditions, became obvious by the consumption of glucose and production of lactate in the platelet concentrate which differed significantly under the different storage conditions. Resulting from this, the pH decreased in the mean under the limit of the measurement range of the blood gas

analyzing system (pH = 6.0) already after a storage period of 3 days due to the slight capacity of gas diffusion in PVC-containers (C4/22°C). In the PO-containers at 22°C (C4L/22°C) on the other hand, this limit was not reached before a storage period of 6 days and was not reached at all during the complete 10-day storage period at 4 °C (C4L/4°C). This is seen to be due to the high gas diffusion capacity of the PO-containers.

The enzyme activity of LDH which is localized in the cytosol of platelets and the concentration of potassium ions which were preponderantly localized in the cytoplasm, showed an increase in a different extent in the plasma of platelet concentrates. This also reflects the different rapidity of development of the causal disorder of membrane permeability or the destruction of the cell membrane in dependency of the storage conditions.

The results of this study point out the limits of the ability to store platelet concentrates from dogs. Metabolic, structural and functional changes will occur in canine platelets similar to those in human thrombocytes during storage in dependency of the storage conditions, in part even with a higher rate or in a higher extent. Nevertheless, the results of in vivo examinations which still have to be performed should be included in the selection of the optimal storage conditions for canine platelet concentrates.