

Aus der Universitätsklinik
für Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie Tübingen

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. med. G. Ziemer

**Untersuchungen zur Biokompatibilität von
Oxygenatoren in einem
Herz-Lungen-Maschinen-Modell –
Vergleich von unbeschichteten gegen
heparinbeschichtete Oberflächen**

INAUGURAL-DISSERTATION

**zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Anton Abler
aus Leutkirch**

2002

Dekan:

Professor Dr. C. D. Claussen

1. Berichterstatter:

Professor Dr. G. Ziemer

2. Berichterstatter:

Professor Dr. W. Lindemann

Für Emma, Franz und Luzia

Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. G. Ziemer für die Überlassung des Themas und die Bereitstellung von Arbeitsplatz und Materialien.

Herrn Dr. rer. nat. H. P. Wendel danke ich ganz besonders für die kompetente wissenschaftliche Betreuung und Diskussionsbereitschaft, sowie für die wertvollen Ratschläge bei der Durchführung und Fertigstellung der Arbeit.

Bei allen Mitarbeitern des Forschungslabors der Abteilung für Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie, insbesondere Frau Doris Armbruster, möchte ich mich für die stets freundlichen und brauchbaren Hilfestellungen sowie für die medizinisch-technische Assistenz herzlich bedanken.

Herrn Dr. rer. nat. E. Hahn vom Zentrum für Datenverarbeitung der Universität Tübingen danke ich für die Beratung bei der Auswahl geeigneter statistischer Verfahren.

Besonders danke ich meiner Familie für den Rückhalt und die Förderung während des gesamten Studiums und meiner Frau Dr. rer. nat. Luzia Heil, die mich durch alle Höhen und Tiefen der vorliegenden Arbeit begleitet hat.

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	Einführung und Zielsetzung	1
1.2	Oberflächeneigenschaften	5
1.2.1	Natürliches Endothel	5
1.2.2	Carmeda bioaktive Oberfläche™ (CBAS™)	6
1.3	Die Blutgerinnungskaskade	8
1.3.1	Blutgerinnung	8
1.3.2	Inhibition	11
1.3.3	Fibrinolyse	12
1.4	Heparin	14
1.5	Gerinnungsmarker	17
1.5.1	Prothrombinfragment F 1+2	17
1.5.2	Thrombin-Antithrombin III-Komplex (TAT)	18
1.5.3	Fibrinopeptid A (FPA)	19
1.6	Zelluläre Parameter	19
1.6.1	Hämolyse	19
1.6.2	PMN-Elastase	20
1.6.3	Thrombozyten und Thrombozytenaktivierung	21
2.	MATERIAL UND METHODEN	25
2.1	Versuchsaufbau	25
2.1.1	In-vitro-Modell der Herz-Lungen-Maschine (HLM)	25
2.1.2	Aufbau der Oxygenatoren	27
2.2	Untersuchungsmaterial und Verarbeitung	29
2.2.1	Untersuchungsmaterial	29
2.2.2	Abnahmemodus	30
2.2.3	Probengewinnung	31
2.3	Laborchemische Bestimmungen	32
2.3.1	Heparin	35
2.3.2	Prothrombinfragment F 1+2	36
2.3.3	Thrombin-Antithrombin III-Komplex (TAT)	37
2.3.4	Fibrinopeptid A (FPA)	38
2.3.5	Hämolyse	39
2.3.6	PMN-Elastase	40

2.3.7	β-Thromboglobulin	41
2.4	Statistische Auswertung	41
3.	ERGEBNISSE	43
3.1	Heparinkonzentration	43
3.2	Prothrombinfragment F 1+2	45
3.3	Thrombin-Antithrombin III-Komplex (TAT)	47
3.4	Fibrinopeptid A	49
3.5	Hämolyse	51
3.6	PMN-Elastase	53
3.7	Thrombozytenkonzentration	55
3.8	β-Thromboglobulin	57
4.	DISKUSSION	59
4.1	Heparin	59
4.2	Prothrombinfragment F 1+2	61
4.3	Thrombin-Antithrombin III-Komplex (TAT)	62
4.4	Fibrinopeptid A	63
4.5	Hämolyse	64
4.6	PMN-Elastase	65
4.7	Thrombozyten	67
4.8	β-Thromboglobulin	68
4.9	Zukunftsperspektiven	70
5.	ZUSAMMENFASSUNG	72
6.	LITERATURVERZEICHNIS	74

1. Einleitung

1.1 Einführung und Zielsetzung

Die Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems gehören in den industrialisierten Ländern zu den häufigsten Todesursachen. In der Bundesrepublik Deutschland starben 1999 insgesamt 846330 Personen wobei in 406122 Fällen die Todesursache auf Erkrankungen des Kreislaufsystems zurückzuführen war. An zweiter Stelle stehen mit 210837 Todesfällen bösartige Neubildungen. Bei den Erkrankungen des Kreislaufsystems steht die koronare Herzkrankheit (KHK) als Einzelerkrankung im Vordergrund und macht häufig eine Bypass-Operation mit Einsatz der Herz-Lungen-Maschine (HLM) erforderlich. Die HLM kann die Aufgabe von Herz und Lunge, die in der Aufrechterhaltung der Kreislaufzirkulation und der Gewährleistung des Gasaustausches besteht, zumindest für eine begrenzte Zeit übernehmen. Das Herz als Kreislaufpumpe steht während der Operation am offenen Herzen still; die Perfusion der Organsysteme muss trotzdem gewährleistet werden. Die extrakorporale Zirkulation (EKZ) mit der HLM ist für Operationen am offenen Herzen eine Voraussetzung und die Fortschritte in der operativen Behandlung von Herzkrankheiten ließen die Anwendung der HLM zu einem Routineeingriff werden. Der Einsatz der HLM ist aber nicht nur bei der häufig durchgeführten Bypass-Operation indiziert, sondern kommt auch bei Operationen am Vorhof- oder Ventrikelseptum, bei Klappenkorrekturen oder Herzklappenersatz und bei der Herztransplantation vor.

Bereits 1898 wurde in Tübingen ein sogenannter Pumpenoxygenator gebaut, um die Funktion der Niere außerhalb des Körpers zu studieren. Dem Amerikaner John Gibbon gelang es 1937 erstmals Herz und Lunge durch künstliche Oxygenierung vorübergehend ohne Schäden am Organismus aufrecht zu erhalten. Im Jahr 1953 war es wiederum Gibbon, der die erste erfolgreiche Operation am offenen Herzen durchführte. Eine Patientin wurde an einem Vorhofseptumdefekt operiert und war für 45 Minuten an einer HLM angeschlossen, die sie 26 Minuten lang vollständig versorgte (MELROSE 1986).

Die künstliche Lunge (Oxygenator) arbeitet in ihrem technischen Aufbau nach einem unphysiologischen Gasaustauschprinzip (TAYLOR 1986). Dabei sind je nach Konstruktion drei verschiedene Gasphasen möglich. Die heute verwendeten Oxygenatoren lassen sich somit in drei verschiedene Gruppen einteilen:

1. Blut- in Gasphase, die bei den Filmoxygenatoren Anwendung fand. Der Blutfilm wird hierbei entweder über mehreren stationären Gittern oder rotierenden Scheiben gebildet;
2. Gas- in Blutphase, findet als Dispersionsoxygenator oder „Bubble-bag“ ihre Anwendung;
3. Gas- und Blutphase getrennt, eine Gasaustauschform, wie sie in einem Membranoxygenator stattfindet und den physiologischen Bedingungen am nächsten kommt.

Der erste Oxygenator war ein Mayo-Gibbon-Sieboxygenator und funktionierte nach dem Prinzip eines Filmoxygenators (GIBBON 1954). Die Funktion der Kreislaufpumpe wird meistens von einer Rollerpumpe übernommen, da diese im Vergleich mit anderen Pumpsystemen (z.B. Ventilpumpe) eine geringere mechanische Traumatisierung des Blutes verursachen (SCHLEPPER und HEHRLEIN 1981). Allerdings ist die HLM auch heute noch ein unzureichender Ersatz von Herz und Lunge und eine Weiterentwicklung ist Ziel vieler Versuchsansätze. Problematisch sind insbesondere die Aufrechterhaltung der Hämodynamik und die Ausschaltung der Blutgerinnung.

In der Initialphase der EKZ kommt es zu einem systemischen Blutdruckabfall, der durch die Freisetzung vasoaktiver Substanzen wie Bradykinin und die Aktivierung des Kallikrein-Kinin-Systems bedingt ist. Bradykinin führt zu einer Gefäßweitstellung, dem sich ein relativer Volumenmangel anschliesst. Durch den Abfall des Blutflusses in den Pulmonalarterien und einen zu langsamen Anstieg des Blutflusses in der HLM wird diese Situation weiter begünstigt (DEKLERK et al. 1977, FUHRER et al. 1985). Es ist kaum möglich den arteriellen Druck über 80 - 90 mmHg konstant zu halten. Durch niedere Flussraten bis hin zur Stase und durch Scherkräfte kommt es zu einem ausgiebigen Kontakt der korpuskulären Blutbestandteile mit den unphysiologischen Oberflächen. Durch Thrombozytenadhäsion und -aggregation kommt es zur Freisetzung

von thrombozytären Faktoren und zur Aktivierung der intrinsischen Gerinnungskaskade. Als Folge tritt eine Thrombozytopenie und eine verstärkte Hämolyse auf (BARTLETT und GAZZANIGA 1981, RIEDEMEISTER 1982). Während der Perfusionsdauer befindet sich der Patient in einem kompensierten Schockzustand, der Störungen der Mikro- und Makrozirkulation der verschiedenen Organsysteme zur Folge haben kann (HELLER et al. 1987).

Die Überwachung und Regulierung der Gerinnung und Fibrinolyse ist eine wichtige Aufgabe während des Einsatzes der HLM. Die Hemmung der Gerinnung während der EKZ erfolgt mittels hochdosierter Gabe von Heparin. So wird beispielsweise die ACT (Activated Clotting Time) während einem vollständigen cardiopulmonalem Bypass auf das vier- bis sechsfache der Norm angehoben (IRELAND et al. 1989). Die notwendige Dosierung wird anhand des Körpergewichtes (300 internationale Einheiten Heparin pro kg Körpergewicht i.v.) oder der Körperoberfläche ermittelt. Aus Sicherheitsgründen wird höher dosiert, was allerdings zu Blutungskomplikationen während und auch nach der Operation führen kann. Die Hemmung der Blutgerinnung wird postoperativ durch Antagonisierung mit Protaminchlorid oder Protaminsulfat aufgehoben. Protamin ist ein basisches Protein und wird aus einem Extrakt aus Fischesperma gewonnen (KAROW und LANG 1998). Bei Patienten mit einer Allergie auf Fischeiweiß stellt dies insofern eine Gefahr dar, da Protamin einen anaphylaktischen Schock verursachen kann. Es kommt zur Kontraktion der Lungengefäße, Verringerung des Herz-Minuten-Volumens und Zerstörung der Thrombozyten (SHANBERGE et al. 1986).

Der Kontakt von Blut mit unphysiologischen Oberflächen bringt ein weiteres Risiko der EKZ mit sich. Die Thrombogenität eines Materials besteht in der Unfähigkeit des Materials den Prozess der Inhibierung und Auflösung von Thromben zu imitieren. Eine gefürchtete Komplikation ist das sogenannte Postperfusionssyndrom, welches mit verminderter Lungencompliance, erhöhter Entzündungsanfälligkeit, Vasokonstriktion und Hämolyse einhergeht (TAYLOR 1996, WESTABY 1983). Das natürliche Gefäßendothel wirkt über die Inaktivierung von Thrombin durch Antithrombin III, welches mit Heparansulfat an den Endothelzellen angelagert ist, antithrombogen (MARCUM et al. 1985). Es ist deshalb der Versuch unternommen worden, Heparin an die Oberfläche der Oxygenatoren, Schlauchsysteme und Konnektoren kovalent zu

binden, um die Eigenschaften des natürlichen Endothels zu simulieren. Im Jahr 1983 wurde von LARM et al. die Methode des Endpunkt-Attachments™ (End-Point-Attachment™) von Heparin erstmals beschrieben. Das Polysaccharid Heparin wird hierbei mit speziell vorbehandelten Oberflächen kovalent gebunden. Das schwedische Unternehmen Carmeda AB hat diese Technologie der Oberflächenbeschichtung weiterentwickelt und bezeichnet ihre heparinbeschichteten Oberflächen als Carmeda bioaktive Oberfläche™ (CBAS™).

Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist eine In-vitro-Studie zur Untersuchung zellulärer und plasmatischer Veränderungen in einem geschlossenen HLM-Modell hinsichtlich der Eigenschaft verschiedener Oberflächenbeschichtungen von Oxygenatoren, Schlauchsystemen und Konnektoren. Die Untersuchungen gliedern sich in drei Gruppen von denen die erste, mit je 9 beschichteten bzw. unbeschichteten Oxygenatoren, als Hauptgruppe bezeichnet werden kann.

In den Gruppen zwei und drei werden nochmals 9 Oxygenatoren perfundiert, die in drei Untergruppen mit jeweils verschiedenen Beschichtungen aufgespalten sind. Diese sollen als Vorversuche zur ersten Datenerhebung neuer Oberflächenbeschichtungen dienen. Analysiert wurde der zeitliche Konzentrationsverlauf folgender Parameter während einer 90 minütigen Zirkulationsdauer:

- Heparinkonzentration
- Prothrombinfragment F 1+2
- Thrombin-Antithrombin III Komplex (TAT)
- Fibrinopeptid A (FPA)
- Hämolyse
- PMN-Elastase
- Thrombozytenkonzentration
- β -Thromboglobulin

1.2 Oberflächeneigenschaften

1.2.1 Natürliches Endothel

Das Endothel repräsentiert die bedeutendste Grenzfläche unseres Körpers. Die geschätzte Gesamtoberfläche beträgt etwa 6000-8000 m². Die Endothelzellen sind keine einheitliche Zellpopulation, sondern besitzen eine grosse Heterogenität entsprechend den vielfältigen Aufgaben in den verschiedenen Geweben und Organen. Neben Unterschieden in der Ultrastruktur der Endothelzelle zwischen grossen und kleinen Gefässen, zwischen Arterien, Venen und Lymphgefässen und zwischen kontinuierlichen und diskontinuierlichen Kapillaren, lassen sich biochemisch fassbare Unterschiede im Enzymmuster und Zytoskelett feststellen.

Die Wand der grösseren Blutgefässe besitzt einen charakteristischen dreischichtigen Aufbau mit Adventitia, Media und Intima. Die Abgrenzung der Media zur Adventitia erfolgt durch die *Elastica externa* und zur Intima durch die *Elastica interna*, die beide als elastische Fasernetze gelten. Die Arterien als Hochdruckgefässe besitzen im Gegensatz zu den Venen dickere Wandstrukturen, um dem höheren Druck stand zu halten.

Die Auskleidung der Gefässe zur Blutseite hin realisiert ein einschichtiges flaches Plattenepithel, das Endothel. Die Intima wird vom Endothel mit der zugehörigen Basalmembran und dem angrenzenden subendothelialen Raum bestehend aus Bindegewebe und vereinzelt Zellen gebildet. Das natürliche intakte Gefässendothel besitzt eine aktive antithrombogene Wirkung. Folgende Mechanismen tragen zu dieser Schutzfunktion bei:

- Inaktivierung von Thrombin durch AT III, das über Heparin an die Endotheloberfläche gebunden wird
- PGI₂-Freisetzung durch Faktor IIa, Faktor Xa und ADP
- Hemmung von Thrombin im Komplex mit Thrombomodulin
- Aktivierung von Protein C
- Bildung und Freisetzung des Kofaktors Protein S

- Freisetzung von Gewebe-Plasminogen-Aktivator (t-PA)

Über die Bildung und Freisetzung nachfolgend aufgeführter Substanzen kommt die Endothelzelle auch der Funktion zur Förderung der Hämostase nach:

- von Willebrand-Faktor
- Plättchen-aktivierender Faktor
- Fibronektin
- Thrombospondin
- Faktor V
- Plasminogen-Aktivator-Inhibitoren

Ausserdem regt die Einwirkung von Interleukin I, Tumor-Nekrose-Faktor, und Endotoxin auf Endothelzellen die Bildung von Gewebethromboplastin mit Aktivierung des intrinsischen Gerinnungssystems an (LECHLER 1991).

1.2.2 Carmeda bioaktive Oberfläche™ (CBAS™)

Die Heparinbeschichtungsmethode der Firma Carmeda AB wurde 1983 entwickelt und ist seit mehr als 10 Jahren im klinischen Einsatz. Die CBAS™-Beschichtung ist eine in vielen experimentellen und klinischen Studien genau untersuchte Beschichtungstechnik. Es konnten viele Vorteile heparinbeschichteter Systeme aufgezeigt werden. Als Vorteile sind die geringere zelluläre und humorale Aktivierung (KORN et al. 1996, MOEN et al. 1996, WENDEL et al. 1994), eine reduzierte Sauerstoffradikalbildung (BOZDAYI et al. 1996) und eine Verkürzung des Klinikaufenthaltes mit weniger Komplikationen (SVENMARKER et al. 1997) zu nennen.

Durch spezielle kovalente Kopplungsmechanismen wird eine Endpunktbefestigung der Heparinmoleküle erzielt. Die kovalente Anbindung erfolgt durch die chemische Reaktion an der End-Aldehydgruppe des reduzierten Heparins. Die aktive Sequenz, das spezifisch Antithrombin III bindende Polysaccharid, bleibt erhalten. Hiermit kann die

Funktion der Heparansulfat-Glykoproteine der natürlichen Endotheloberfläche nachgeahmt werden, wie in Abbildung 1.1 erkennbar ist.

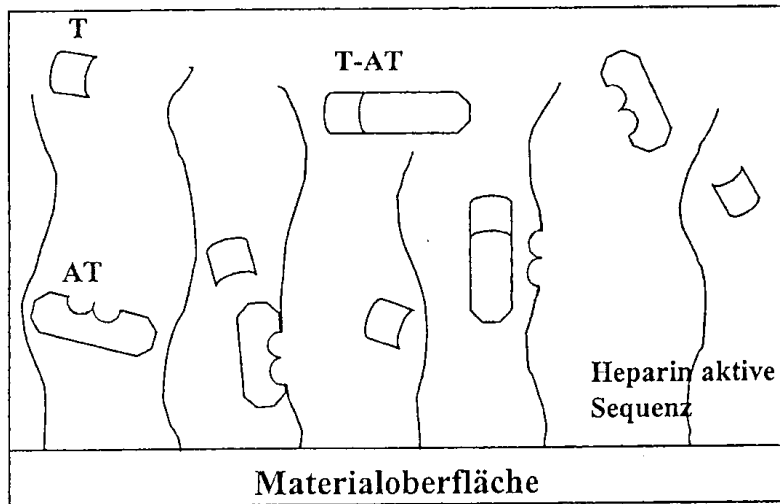


Abb. 1.1: Prinzip der Antikoagulation der CBAS™ Endpunkt-Heparin-Beschichtung

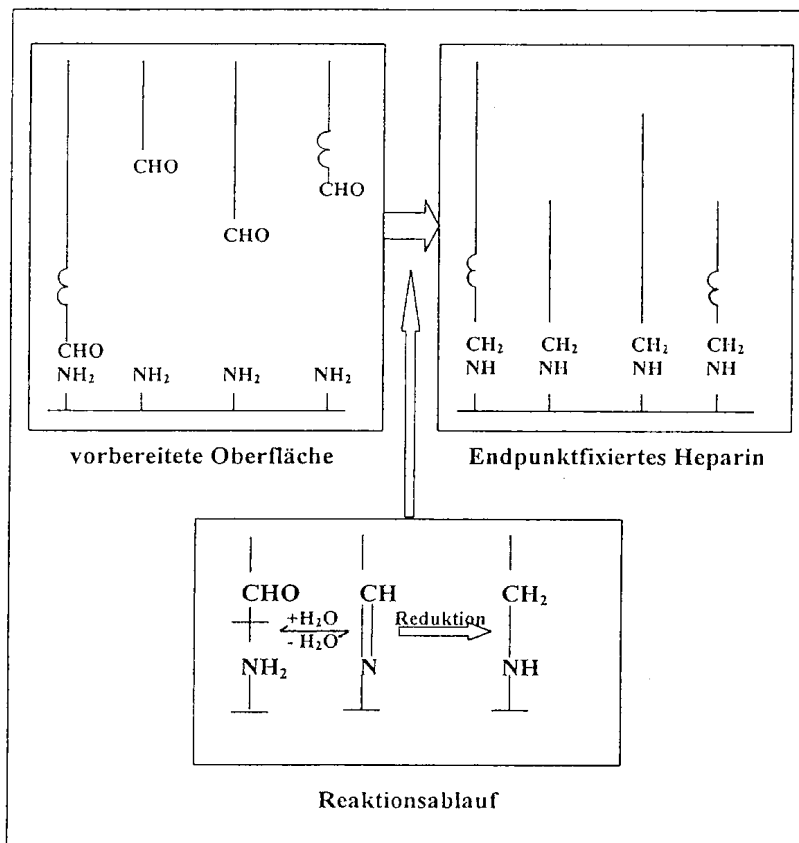


Abb. 1.2: Struktur der CBAS™-Beschichtung

1.3 Die Blutgerinnungskaskade

1.3.1 Blutgerinnung

Die Aufrechterhaltung der normalen, geregelten Hämostase setzt den reibungslosen Ablauf verschiedener Enzymsysteme voraus. Eine verstärkte Gerinnungs- oder Blutungsneigung wird durch ein übergreifendes Zusammenspiel von gerinnungsfördernden und gerinnungshemmenden Faktoren verhindert. An der Blutgerinnung sind insbesondere Plasmafaktoren, Thrombozyten und das Endothel beteiligt. Unter physiologischen Bedingungen befindet sich das Gerinnungssystem in einem Gleichgewicht zwischen Gerinnungsaktivierung und Fibrinolyse. Die verschiedenen Aktivatoren und Inhibitoren werden teilweise parallel aktiviert und sorgen für eine Aufrechterhaltung des Gleichgewichtes (MAMMEN 1991).

Nach einer Verletzung der Gefäßwand mit Endothelläsion erfolgt die Aktivierung der Blutgerinnung, indem unter Mitwirkung des von Willebrand Faktors Thrombozyten adhären, ADP freisetzen und u.a. Thromboxan A₂ synthetisieren. Die Ausbildung eines Thrombozytenpfropfes und eine Vasokonstriktion sind die Folge. Parallel hierzu bewirkt die Endothelläsion eine Aktivierung des plasmatischen Gerinnungssystems.

Blutgerinnungsfaktoren

I	Fibrinogen
II	Prothrombin
III	Gewebethromboplastin
IV	Calciumionen
V	Proakzelerin, Plasma-Akzelerator-Globulin, labiler Faktor
VI	Akzelerin, syn. Faktor Va
VII	Prokonvertin, stabiler Faktor, Prothrombinogen, Serum prothrombin conversion accelerator (SPCA)
VIII	antihämophiles Globulin (AGH), antihämophiler Faktor (AHF)
IX	Christmas-Faktor, Plasma thromboplastin component (PTC)
X	Stuart-Power-Faktor
XI	Rosenthal-Faktor, Plasma thromboplastin antecedent (PTA)
XII	Hageman-Faktor
XIII	fibrinstabilisierender Faktor (FSF)

Tabelle 1.1: Blutgerinnungsfaktoren

Die plasmatischen Gerinnungsfaktoren sind Glykoproteine und liegen im Blut als Proenzyme vor. Im Verlauf des Gerinnungsprozesses werden die Faktoren II, VII, IX, X, XI und XII in ihre aktivierte Form überführt. Die aktivierten Faktoren V und VIII sind keine Enzyme, jedoch als Kofaktoren entscheidend an der Aktivierung beteiligt. Die Faktoren des Prothrombinkomplexes (Faktor II, VII, IX und X) werden Vitamin K-abhängig von den Hepatozyten synthetisiert. In Anwesenheit von Vitamin K erfolgt eine Carboxylierung zu Gamma-Carboxy-Glutaminsäure, welche in der Lage ist Calcium in hoher Menge zu binden und auf diese Weise die Fixierung der Vitamin K-abhängigen Proteine an negativ geladene Phospholipidoberflächen zu vermitteln (FURIE 1988, MÜLLER-BERGHAUS 1998).

Obwohl man je nach auslösendem Mechanismus zwischen der extrinsischen und intrinsischen Gerinnungskaskade unterscheidet existieren zwischen beiden Wegen Querverbindungen, so dass eine strikte Trennung der beiden Systeme eigentlich nicht korrekt ist, den Ablauf der einzelnen Reaktionen aber besser veranschaulichen soll.

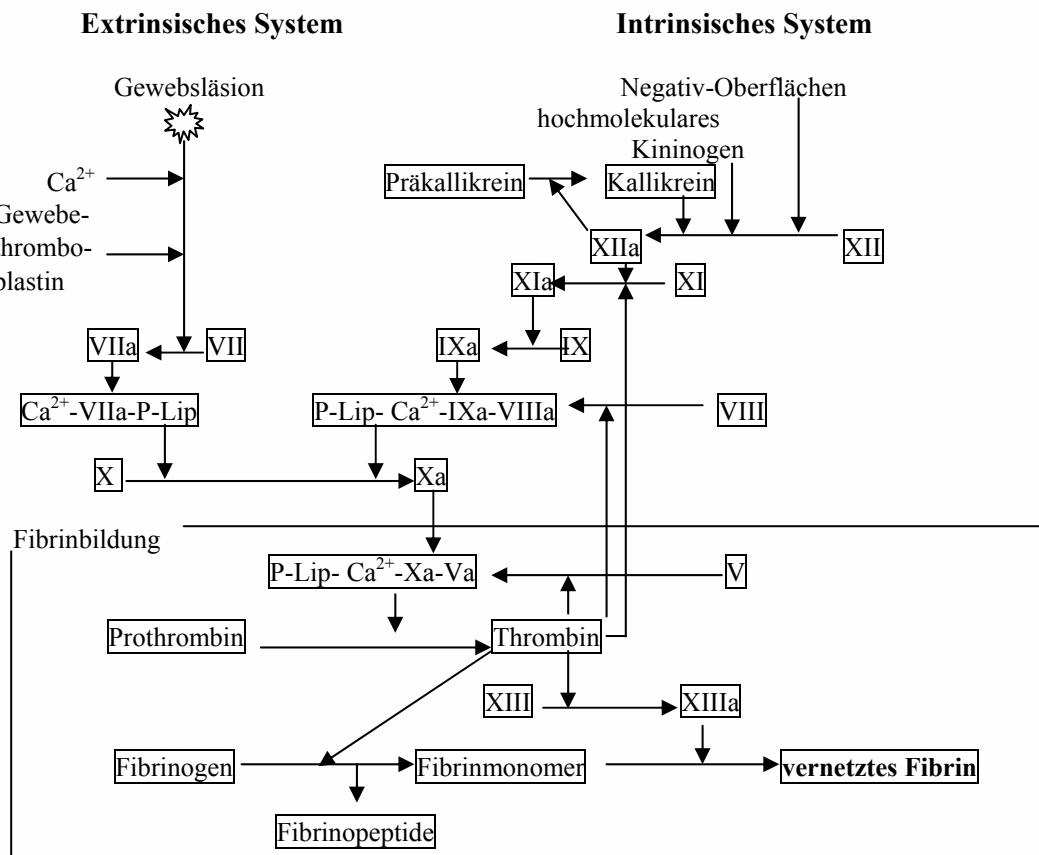


Abb. 1.3: Blutgerinnungskaskade

Bei der Bindung von Plasma an negativ geladene Oberflächen kommt es zur Anlagerung von oberflächensensiblen Faktor XII (Hageman-Faktor), der durch Autoaktivierung in Faktor XIIa umgewandelt wird. Das ebenfalls an die Oberfläche gebundene Präkallikrein wird über die Vermittlung von hochmolekularem Kininogen (HMWK), welches durch den Faktor XIIa aktiviert wird, zu Kallikrein. Kallikrein führt über einen positiven Rückkopplungsmechanismus zu einer weiteren Aktivierung von Faktor XII. Die Aktivierung von Faktor XI zu Faktor XIa an der Oberfläche findet durch Faktor XIIa in Verbindung mit HMWK statt, wodurch es zum Ablauf der intrinsischen Gerinnungskaskade kommt (LECHLER 1991). Dieser als Kontaktaktivierung bezeichnete Vorgang wird als ein Verstärkervorgang verstanden und bewirkt eine erhebliche Potenzierung eines initialen Stimulus bei Endothelläsionen. Neben der Aktivierung der intrinsischen Blutgerinnung beeinflusst die Kontaktphasenaktivierung auch das fibrinolytische System (GOLDSMITH et al. 1978, KAPLAN et al. 1987).

Nacheinander werden dann die Faktoren IX und X aktiviert. Faktor VIIIa beschleunigt gemeinsam mit Phospholipiden und Calcium die Aktivierung des Faktor X zu Xa, wobei Faktor IXa als Enzym und Faktor VIIIa als Kofaktor wirkt. Der Faktor VIII wird durch Thrombin in Faktor VIIIa umgewandelt (MÜLLER-BERGHAUS 1998). Zusätzlich wird durch eine Komplexierung von Plasmafaktoren an Oberflächenstrukturen eine Konzentrierung der zirkulierenden Proteine erreicht und die Wirkung des Faktors Xa durch Komplexbildung mit Prothrombin um das 300.000-fache gesteigert (COLMAN et al. 1994).

Beim extrinsischen System erfolgt die Aktivierung gemeinsam durch Faktor VIIa und Kofaktor TF (tissue factor). Phospholipide und TF bilden gemeinsam das Gewebethromboplastin. Durch Expression von Gewebethromboplastin auf der Endotheloberfläche beginnt eine beschleunigte Aktivierung der Gerinnung, da Faktor VII in geringer Konzentration aktiviert im Plasma vorliegt. Faktor VIIa aktiviert sowohl Faktor IX als auch Faktor X, welcher zusammen mit TF zur Verstärkung beiträgt, die in kurzer Zeit zu hoher Faktor Xa-Aktivität führt (HEMKER 1994). Beide Wege führen zu einer Aktivierung des Faktors Xa und münden in eine kaskadenförmig ablaufende

Reaktion, bei der am Ende das vernetzte Fibrin als Blutgerinnsel vorliegt (PREISSNER et al. 1986).

Der aktivierte Faktor X stellt zusammen mit dem Faktor Va die Prothrombinase dar, die Prothrombin in Thrombin überführt. Bei dieser Reaktion wird das Prothrombinfragment F1+2 abgespalten. Thrombin seinerseits katalysiert die Umwandlung von Fibrinogen in Fibrin, bei der Fibrinopeptid A und B abgespalten wird. Nach der Abspaltung von Fibrinopeptid A entsteht monomeres Fibrin, das unter dem Einfluss des Thrombin aktivierten Faktor XIII polymerisiert und mit den vorhandenen Thrombozytenaggregaten vernetzt (HENSCHEN 1994, LÜSCHER 1986).

1.3.2 Inhibition

Als wichtiger Inhibitor der Blutgerinnung fungiert das Antithrombin III (auch Heparinkofaktor I genannt), welches mit Thrombin einen Komplex bildet, der Thrombin-Antithrombin III-Komplex (TAT) genannt wird. In Anwesenheit von Heparin kann die inhibitorische Wirkung von AT III bis zum 1000-fachen beschleunigt werden. Weitere wichtige Inhibitoren sind Heparinkofaktor II, Protein C und S, α_2 -Makroglobulin, α_1 -Proteinaseninhibitor und C₁-Esterase Inhibitor (PIXLEY et al. 1985, TRAVIS et al. 1983). Der Heparinkofaktor II inhibiert zusammen mit Heparin ebenfalls die Gerinnung, jedoch ohne Faktor Xa - wie beim Heparin-Antithrombin-Komplex - zu aktivieren. Protein C und Protein S werden Vitamin K- abhängig in der Leber synthetisiert und sind an der Inhibition mittels negativen Rückkopplungsmechanismus beteiligt. Protein C bindet zusammen mit Thrombin an den Endothelzellmembranrezeptor Thrombomodulin und wird so zu aktiviertem Protein C (APC). Das APC spaltet unter Beteiligung von Protein S die aktivierten Kofaktoren V und VIII und hemmt den Ablauf der Blutgerinnung. α_2 -Makroglobulin kann Kallikrein, Thrombin und Plasmin hemmen und gilt als ein sekundärer Inhibitor (MÜLLER-BERGHAUS 1998). Der α_1 -Proteinaseninhibitor - auch α_1 -Antitrypsin genannt - inaktiviert Trypsin und Chymotrypsin und gilt als wichtigster Inhibitor von Faktor XIa (MEIJERS et al. 1988). Der C₁-Esterase Inhibitor ist ein Plasma-Proteasen-Inhibitor,

der an der Regulation des Komplementsystems und der Kontaktaktivierung beteiligt ist. Er gilt als einziger Inhibitor der Komplementfaktoren C1r und C1s und als wichtiger Inhibitor von Faktor XIIa (DAVIS 1989, DE AGOSTINI et al. 1984, GRONSKI et al. 1986).

1.3.3 Fibrinolyse

Das fibrinolytische System steht unter physiologischen Bedingungen - wie oben bereits erwähnt - mit dem Gerinnungssystem im Gleichgewicht und beide sind über verschiedene Feedback-Mechanismen miteinander verknüpft (PAQUES und HEIMBURGER 1986, PREISSNER et al. 1986). Das vernetzte Fibrin wird durch die enzymatische Aktivität des Plasmins, welches aus Plasminogen entsteht, in Fibrin-spaltprodukte (D-Dimere u.a.) aufgelöst.

Das einkettige Glykoprotein Plasminogen mit einem Molekulargewicht von 90 000 Dalton liegt mit einer Konzentration von 120 mg/l im Plasma vor und wird von den Hepatozyten synthetisiert. In der nativen Form befindet sich an der N-terminalen Seite Glutaminsäure, und es wird demzufolge als Glu-Plasminogen bezeichnet, welches durch Proteolyse in Lys-Plasminogen umgewandelt wird (COLLEN et al. 1975). Lys-Plasminogen kann durch Plasminaktivatoren im Vergleich zu Glu-Plasminogen schneller zu Plasmin aktiviert werden. Der Abbau von Fibrin durch Plasmin verstärkt die Bindung von Glu-Plasminogen an Fibrin und beschleunigt den thrombolytischen Prozess durch den positiven Rückkopplungsmechanismus. Mit einer als Kringle-Loop bezeichneten Struktur bindet Plasminogen über Lysinbindungsstellen an Fibrin. Die Thrombolyse wird hiermit auf den Ort der Fibrinbildung lokalisiert (BACHMANN 1994).

Für die Plasminogenaktivierung wird wie bei dem Gerinnungssystem ein extrinsischer und intrinsischer Weg beschrieben. Die extrinsische Aktivierung erfolgt durch Freisetzung von Gewebs-Plasminogen-Aktivator (tissue-type plasminogen activator (t-PA)) und Urokinase (u-PA) aus dem Endothel. Die intrinsische Plasminogenaktivierung erfolgt über Faktor XIIa, Faktor XIa und Kallikrein, welche aus Prourokinase auch

Urokinase freisetzen können (GALLIMORE et al. 1978, GOLDSMITH et al. 1978, HAUERT et al. 1985).

Die Protease t-PA liegt im Plasma als Komplex mit dem Plasminogenaktivator-Inhibitor 1 (PAI-1) vor und wird bei körperlicher Anstrengung vermehrt gebildet. Die Synthese findet in den Endothelzellen statt. Bereits als einkettiges Molekül besitzt t-PA enzymatische Aktivität und Fibrin, das als Katalysator des t-PA wirkt, steigert die Plasminogenaktivierung (HEIMBURGER 1994, HOYLAERTS et al. 1982, ICHINOSE et al. 1984, KLÖCKING 1991).

Die Urokinase wird in epithelialen Zellen der Nierentubuli synthetisiert. Die einkettige Prourokinase (single-chain u-PA) wird bereits durch geringe Konzentration von Plasmin in ein zweikettiges Molekül (two-chain u-PA), die eigentliche Urokinase, überführt. Die Urokinase spaltet an der gleichen Stelle wie t-PA das Plasminogenmolekül (BACHMANN 1994).

An der Hemmung der Fibrinolyse sind mehrere Inhibitoren beteiligt. Das α_2 -Antiplasmin als wichtigster Inhibitor kann in Bruchteilen einer Sekunde an Plasmin binden, die Adsorption von Plasminogen an Fibrin verhindern und durch Faktor XIIIa an Fibrin quervernetzt werden. Das α_2 -Makroglobulin gilt als sekundärer Inhibitor und inaktiviert relativ langsam verschiedene Komponenten des Fibrinolyseystems. Die Plasminogenaktivator-Inhibitoren (PAI-1, PAI-2, PAI-3) sind ebenfalls an der Hemmung der Fibrinolyse beteiligt. Der Wichtigste unter ihnen ist PAI-1, der innerhalb kurzer Zeit mit t-PA und u-PA komplexiert und die Fibrinolyse inaktiviert. Die Inaktivierung von PAI-1 findet durch aktiviertes Protein C (APC) statt und spiegelt die enge Verknüpfung der Feedbackmechanismen wieder (DE FOUW et al. 1987, HEEB et al. 1987, MÜLLER-BERGHAUS 1998).

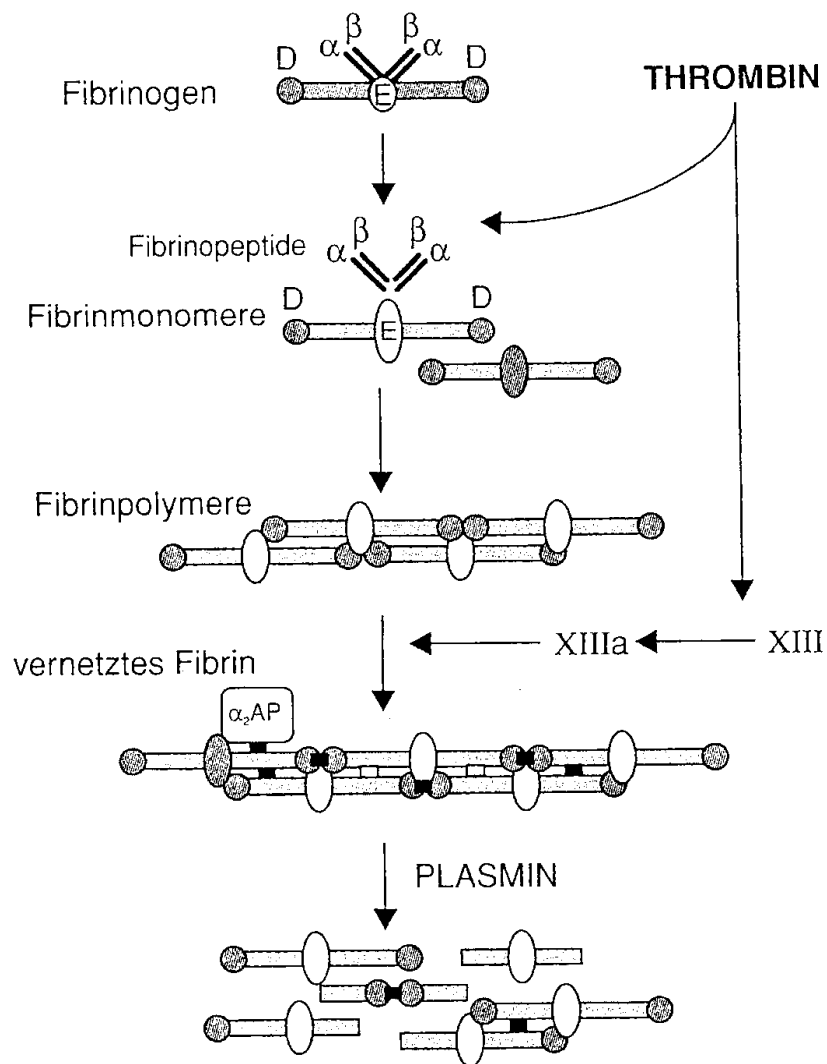


Abb. 1.4: Bildung und Modifizierung von Fibrin

1.4 Heparin

Eine zentrale Bedeutung für die Fortschritte der extrakorporalen Zirkulation war die Entdeckung des Heparins durch McLean im Jahr 1916. Die gerinnungshemmende Substanz wurde aus der Leber isoliert und ist auch in Lungen-, Herz- und Muskelgewebe sowie in Dünndarmmukosa, basophilen Granulozyten und in Mastzellen zu finden. Der Heparin Gehalt eines Gewebes entspricht weitestgehend der Anzahl an Mastzellen im jeweiligen Gewebe, welche vermutlich den wichtigsten Bildungsort für Heparin darstellen (BRUHN 1990).

Heparine sind ein Gemisch aus wasserlöslichen, stark negativ geladenen sauren Glykosaminoglykanen, die im Bezug auf Struktur, Molekulargewicht und Kettenlänge beträchtliche Unterschiede aufweisen. Das durchschnittliche Molekulargewicht unfraktionierter Heparine liegt zwischen 10 000 und 20 000 Dalton; niedermolekulare Heparine haben Molekulargewichte zwischen 3 000 und 7 000 Dalton. Das Molekül ist aus zwei unterschiedlichen Disaccharideinheiten aufgebaut, die sich jeweils aus einem Aminozucker (D-Glucosamin) und einer Uronsäure (D-Glucuron- bzw. L-Induronsäure) zusammensetzen und über eine 1,4-alpha-glykosidische Bindung miteinander verknüpft sind. Die funktionellen Gruppen der Heparine sind Sulfatreste, welche pro Disaccharid auf maximal drei begrenzt sind. Zwei der Sulfatreste liegen als Schwefelsäureester, einer als Sulfonamidgruppe vor (ROSENBERG und DAMUS 1973).

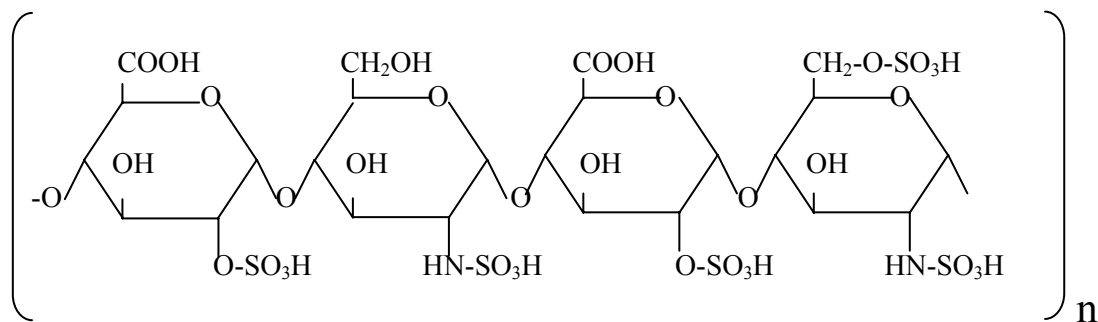


Abb. 1.5: Tetrasaccharidstruktur der sich im Heparinmolekül wiederholenden Untereinheiten

Heparin hat im Blut eine Konzentration von etwa 0,15 µg/ml und eine Halbwertszeit von etwa 90 Minuten. Standardheparine werden über das Gefäßendothel und das retikulo-endotheliale System aufgenommen und dort abgebaut oder über die Niere eliminiert. Niedermolekulare Heparine werden bevorzugt renal ausgeschieden, was die verlängerte Halbwertszeit im Blut erklären kann. Bei verminderter Antithrombin III-Konzentration und bei erhöhtem Fibrinogenspiegel hat Heparin eine abgeschwächte antithrombotische Wirkung (YOUNG et al. 1992).

Die reduzierte Thrombogenität der heparinbeschichteten Oberflächen kommt über die geringere bzw. selektivere Adhäsion von Plasmaproteinen zustande, die einerseits zu

einer schnellen Bildung einer hämophilen Sekundärmembran auf der Oberfläche führt und andererseits eine weitere Denaturierung und Aktivierung der adhärenen Proteine verhindert (WENDEL und ZIEMER 1999). Die Fähigkeit von Antithrombin III, die Gerinnungsfaktoren Thrombin, Faktor Xa und Faktor XIa zu inhibieren, wird durch eine heparininduzierte Konformationsänderung des AT III gesteigert (VILLANEUVA und DANISHEFSKY 1977). Heparin ist in der Lage sowohl AT III als auch Thrombin gleichzeitig zu binden und die beiden Reaktionspartner einander näher zu bringen, insofern es aus mehr als 18 Sacchariden besteht. Die alleinige Bindung von AT III an Heparin ist für die Inaktivierung von Thrombin nicht ausreichend.

Die Faktor Xa-Inaktivierung wird durch die Molekülgrösse kaum beeinflusst und ist folglich bei niedermolekularen Heparinen nicht herabgesetzt (RASCHE 1988). Bei hohen Konzentrationen wirkt Heparin auf die Faktoren VIII, IXa, X und Prothrombin direkt hemmend (HOLMER et al. 1981, OFOSU et al. 1980). Ausserdem sind neben einer Hemmung der Kontaktphase des intrinsischen Gerinnungssystems auch Effekte auf Endothelzellen und Thrombozyten zu verzeichnen.

Die Aktivität des Endothel Cell Growth Factor (ECGF) kann durch die Bindung der Endothelzelle, die eine zentrale Stellung beim Ablauf der Gerinnung und Fibrinolyse hat, mit Heparin erhöht werden. Zusammen mit ECGF kann Heparin die Freisetzung von Prostaglandin aus Endothelzellen hemmen und die Adhäsion und Aggregation von Thrombozyten stimulieren. Die Adhäsion von Thrombin an Endothelzellen ist unter Heparin allerdings herabgesetzt.

Die Aktivität von t-PA und von Urokinase kann durch Heparin um das 5- bis 25fache gesteigert werden. Die Konzentration von t-PA wird durch Heparin erhöht und aktiviert die Fibrinolyse, diejenige von PAI-1 ist erniedrigt (FEARS 1988). Die PAI-1-Bindungsstelle des Vitronektins, an welches PAI-1 im Plasma gebunden ist, ist mit der Heparinbindungsstelle des Thrombin identisch. In Anwesenheit von Heparin zeigt PAI-1 eine beschleunigte Reaktion gegenüber bestimmten Serinproteasen. Wie bei AT III dient Heparin auch hier als Inhibitor und Protease (EHRlich et al. 1991).

Die Thrombozyten interagieren ebenfalls mit Heparin. Es kommt sowohl zu spontanen Plättchenaggregationen als auch zu Thrombozytopenien. Diese Effekte sind bei den niedermolekularen Heparinen, durch die Konkurrenz von AT III und Thrombozyten um

die Bindungsstelle, im Gegensatz zu hochmolekularen Heparinen weniger stark ausgeprägt.

Als weitere Effekte des Heparins sind ausserdem zu nennen:

- die Hemmung von Sensibilisierungsreaktionen
- die Hemmung der Komplementfaktoren und eine Verstärkung des C1-Inhibitors
- die Wirkung auf Hormone (z. B. Freisetzung von Thyroxin)
- die Wirkung auf Zellen (Aktivierung von Makrophagen und Eosinophilen, Abnahme der Lymphozyten, Abnahme der Plättchenzahl, Inhibition der Proliferation von Endothel- und glatten Gefäßmuskelzellen)
- verstärkte Blutungsneigung
- Heparin induzierte Thrombozytopenie 1 und 2 (insbesondere bei hochmolekularen Heparinen)
- Osteoporose und Lipolyse
- Anstieg der Transaminasen (HASLER et al. 1992)

Die Wirkung von Heparin kann durch Protaminsulfat oder -chlorid rasch aufgehoben werden. Nach adäquater Neutralisierung durch Protamin kann es zum sogenannten Heparin-Rebound und daraus resultierend zur erneuten Blutung kommen. Eine Erklärung für diesen Effekt bietet eine im Plasma vorkommende Protaminase, die überschüssiges Protamin spaltet (KUITUNEN et al. 1991, SUBRAMANIAM et al. 1995).

1.5 Gerinnungsmarker

1.5.1 Prothrombinfragment F1+2

Das Prothrombinfragment F1+2 wird bei der Aktivierung von Prothrombin zu Thrombin mittels Faktor Xa, Faktor Va, Phospholipide und Ca^{2+} abgespalten und gilt neben dem Thrombin-Antithrombin III-Komplex als indirektes Mass für die Thrombinbildung. Die Halbwertszeit liegt bei 90 Minuten, der Referenzbereich im Blut

beträgt 0,4 - 1,1 nmol/l. Mit dem Prothrombinfragment F1+2 können sowohl Hyper- als auch Hypokoagulopathien erfasst werden, wie beispielsweise tiefe Beinvenenthrombose, disseminierte intravasale Gerinnung (DIC). Die Sensitivität bei der DIC ist sehr hoch und es zeigen sich schon erhöhte Werte bevor klinisch manifeste Zeichen auftreten.

Ausserdem kann es auch als Verlaufskontrolle einer Antikoagulantientherapie mit Cumarinderivaten verwendet werden. Bei einer Antikoagulantientherapie mittels Cumarin kann es initial zu einem Anstieg der Plasmakonzentration von Prothrombinfragment F1+2 kommen, die jedoch im Verlauf unterhalb des Referenzbereiches liegt. Der INR steigt entsprechend an (MILLENSON et al. 1992, WAGNER und DATI 1998).

1.5.2 Thrombin-Antithrombin-III Komplex (TAT)

Das Glykoprotein Antithrombin III ist ein Serinproteaseinhibitor mit einem Molekulargewicht von 58 000 – 65 000 Dalton und besteht aus 425 Aminosäuren. Die gebildeten Einzelketten sind über Disulfidbrücken miteinander verknüpft (GLUSA et al. 1996, TRAVIS und SALVESEN 1983).

Bei der Komplexbildung von Thrombin mit Antithrombin entsteht TAT, das - wie oben bereits erwähnt - zusammen mit Prothrombinfragment F1+2 als Mass für die Gerinnungsaktivierung gilt. Es können Hyperkoagulopathien unterschiedlicher Genese erkannt werden. Als wichtige Erkrankungen sind die akute und chronische intravasale Gerinnung (DIC), tiefe Venenthrombose, Lungenembolie, Gerinnungsaktivierung bei malignen Erkrankungen, thrombophile Zustände, Fibrinolyse bei akutem Herzinfarkt und die Überwachung bei Gabe von AT-Konzentrat zu nennen. Eine erhöhte Konzentration von TAT und auch Prothrombinfragment F 1+2 deuten auf eine Hyperkoagulabilität hin. Als Folge besteht durch eine übermässige Fibrinbildung oder Plättchenaggregation ein erhöhtes Risiko für thromboembolische Komplikationen. Die Halbwertszeit von TAT im Blut beträgt 10 - 15 Minuten, und der Referenzbereich beträgt 1,0 - 4,1 µg/l.

1.5.3 Fibrinopeptid A (FPA)

Das Spaltprodukt Fibrinopeptid A entsteht bei der Umwandlung von Fibrinogen zu Fibrin. Das in der Leber synthetisierte Fibrinogen ist ein grosses dimeres Molekül mit einem Molekulargewicht von 340 000 Dalton und besteht aus zwei identischen Molekülen, die jeweils aus drei unterschiedlichen Polypeptidketten - einer Alpha-, Beta- und Gammakette - an ihren N-terminalen Enden durch Disulfidbrücken miteinander verknüpft sind. Jede der drei Ketten wird von einem anderen Gen kodiert und ist an verschiedenen Segmenten zu einer kugelförmigen Domäne gefaltet (FURIE 1988).

Durch Thrombin werden vom aminoterminalen Ende der beiden Alpha- und Betaketten durch Spaltung einer Arginyl-Glycyl-Bindung kurze Stücke abgetrennt. Diese als Fibrinopeptid A und B bezeichneten Spaltprodukte haben ein Molekulargewicht von 2000-3000 Dalton. Das entstehende Fibrinmonomer verbindet sich durch End- zu End- und Seit- zu Seit-Anlagerungen. Durch kovalente Bindungen zwischen zwei Alpha- oder Gammaketten, die durch Faktor XIII katalysiert werden, entsteht eine stabile dreidimensionale Quervernetzung, in die sich zusätzlich Thrombozyten einlagern (DOOLITTLE 1982, WITT 1995).

1.6 Zelluläre Parameter

1.6.1 Hämolyse

Der in den Erythrozyten enthaltene rote Blutfarbstoff wird als Hämoglobin bezeichnet. Das Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 65 000 Dalton besteht aus einem Globinanteil, der sich in vier Peptidketten gliedert, und einer Hämgruppe. Der Mensch ist in der Lage vier verschiedene Peptidketten zu bilden (alpha, beta, gamma und delta). Als Globinanteil kommt hauptsächlich das Hb A1 vor, dessen vier Peptidketten aus dem Typ alpha mit 141 Aminosäuren und aus dem Typ beta mit 146 Aminosäuren bestehen.

An diese Peptidketten ist je eine Hämgruppe gebunden. Häm besteht aus einem Porphyringerüst, das ein zweiwertiges Eisenatom bindet, welches eine reversible Bindung mit Sauerstoff eingeht. Die Synthese des Hämoglobins erfolgt in den Erythroblasten des Knochenmarks (KREUTZIG 1993, THEWS 1997).

Der Referenzbereich für Hämoglobin beträgt für Männer 140 - 180 g/l und für Frauen 120 - 160 g/l. Der Abbau von Hämoglobin erfolgt nach dem Untergang der Erythrozyten, die eine Lebensdauer von 120 Tagen haben. Das Porphyringerüst des Häm wird über verschiedene Abbaustufen zum Bilirubin umgewandelt. Desweiteren gibt es mehrere Hämoglobinopathien, wie beispielsweise die Sichelzellanämie, die einen gesteigerten Abbau zur Folge haben. (KLINKE und SILBERNAGEL 1996).

Ein Parameter für den Abbau der Erythrozyten und damit für den Zustand des Blutes ist die Hämolyse. Die Konzentration an freiem Hämoglobin gilt bis 40 mg/dl als normal.

1.6.2 PMN-Elastase

Die PMN-Elastase ist in den polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten enthalten. Es handelt sich hierbei um ein Enzym mit einem Molekulargewicht von 30000 bis 36000 Dalton, das verschiedene Substrate durch proteolytische Spaltung inaktivieren kann. Der Name des Enzyms resultierte aus seiner Fähigkeit die Ketten der Aminosäuren Alanin und Glycin, die vermehrt in dem Protein Elastin vorkommen, zu spalten. Die PMN-Elastase arbeitet normalerweise intrazellulär in den Lysosomen und dient dort zum Abbau phagozitierten Materials. Die Serumkonzentration beträgt 58 bis 115 µg/l (HIGUCHI et al. 1992, OHLSSON 1978).

Bei der Stimulation und Aktivierung der Granulozyten, bei Entzündungsreaktionen und der Phagozytose von Antigen-Antikörper-Komplexen wird das Enzym freigesetzt. Als Folge der Freisetzung von PMN-Elastase kann es zur Destruktion von elastischem Knorpel, Lungengewebe und zur Schädigung von Arterienwänden kommen. Die PMN-Elastase ist in der Lage mehrere Gerinnungsfaktoren (z.B. AT III) und deren Inhibitoren

zu inaktivieren, sowie Komplement auf dem alternativen Weg zu aktivieren (Abspaltung von C 3a und C 5a) (DUSWALD 1983, TRAVIS 1988).

Die Inaktivierung der PMN-Elastase übernimmt vor allem Alpha-1-Antitrypsin, indem es einen irreversiblen 1:1-Komplex bildet, der von Makrophagen abgebaut wird. Aber auch Alpha-2-Makroglobulin ist an der Enzyminaktivierung beteiligt (OHLSSON 1978).

1.6.3 Thrombozyten und Thrombozytenaktivierung

Die auch als Blutplättchen bezeichneten Thrombozyten sind kernlose korpuskuläre Blutbestandteile mit einem Durchmesser von 1 - 4 μm und etwa 1 μm Dicke. Der Referenzbereich beträgt 150 000 bis 300 000 Thrombozyten/ μl Blut. Sie liegen meist in kleinen Gruppen zusammen und werden durch Plasmaabschnürung von Megakaryozyten des roten Knochenmarks gebildet. Die Lebensdauer beträgt etwa 7 Tage; der Abbau erfolgt in der Milz.

Neben einer Vasokonstriktion und der bereits beschriebenen Gerinnungsaktivierung ist die Ausbildung eines Thrombus eine weitere Reaktion des Blutes auf eine Gefäßwandläsion. Nach einer Endothelläsion bleiben zunächst Thrombozyten an den freigelegten subendothelialen Strukturen haften. Durch Freisetzung der in den Granula enthaltenen Substanzen wird eine weitere Plättchenaggregation induziert. Thrombozyten enthalten drei morphologisch verschiedene Speichergranula: alpha-Granula, elektronenoptisch dichte Granula und Lysosomen.

Ein offenes kanalikuläres System verbindet die Granula mit der Oberfläche der Thrombozyten. Über diese Kanäle werden Substanzen wie ADP, ATP und Serotonin aus den dichten Granula, sowie β -Thromoglobulin, Plättchenfaktor 4, Fibrinogen, von Willebrand-Faktor (vWF), hochmolekulares Kininogen, Faktor V, Thrombospondin und Wachstumsfaktoren aus den alpha-Granula an die Oberfläche der Thrombozyten sezerniert. In den Lysosomen sind vor allem saure Hydrolasen enthalten. Nach einer

Sekretion erscheinen die Thrombozyten elektronenoptisch als leere, degranulierte Hüllen (HOLMSEN 1994, NIEWIAROWSKI 1994).

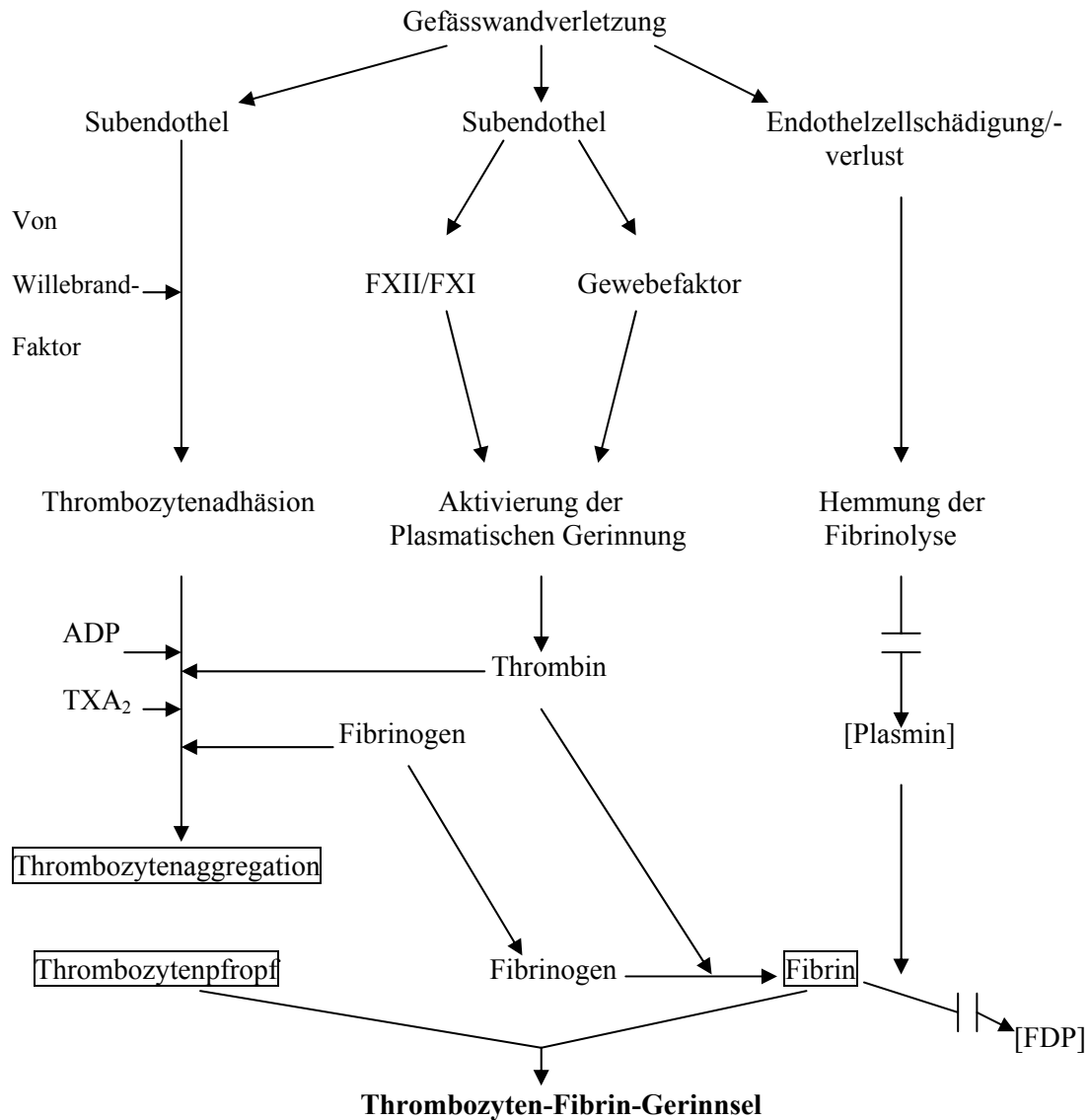


Abb. 1.6: Entstehung eines Thrombus

An der Adhäsion von Thrombozyten an subendotheliale Strukturen, nicht aber an intaktes Endothel, sind der vWF und Membranglykoproteine der Thrombozyten beteiligt. Der vWF ist eines der grössten Plasmaproteine und erfährt beim Kontakt mit geschädigtem Gefässendothel eine Konformationsänderung, durch die maskierte

Bindungsstellen für Plättchen freigelegt werden. Über die Glykoproteine Ib und IIb/IIIa der Plättchenmembran bindet der vWF an den Plättchen und wird selbst über Calciumionen an den subendothelialen Strukturen fixiert. Der Glykoprotein-IIb/IIIa-Komplex bindet neben Fibrinogen, das den Thrombus stabilisiert, auch andere adhäsive Proteine, wie beispielsweise Fibronectin. Fibronectin ist in den alpha-Granula enthalten und für die Anhaftung der Thrombozyten an Fremdoberflächen wichtig (HYNES 1991). Die Aggregation, welche durch Heparin gehemmt werden kann, ist auch von Fibrinogen abhängig. Über die C-terminale Region der Gamma-Kette und über die Alpha-Kette bindet Fibrinogen an den Glykoprotein-IIb/IIIa-Komplex und bildet Brücken zwischen den einzelnen Thrombozyten aus. Faktor V kann ebenfalls die Aggregation der Plättchen untereinander oder an Oberflächen begünstigen.

Die physiologische Hemmung der Thrombozytenfunktion wird vor allem durch Prostaglandine wahrgenommen. Das Prostacyclin ist Gegenspieler des Thromboxan A₂, welches als stärkster Stimulator der Thrombozytenfunktion gilt; beide werden aus der mehrfach ungesättigten Arachidonsäure gebildet. Das Thromboxan A₂ wird aus den Thrombozyten freigesetzt; Prostacyclin wird vorzugsweise in den Endothelzellen gebildet. Folglich kommt es unter physiologischen Bedingungen nicht zu einer spontanen Thrombozytenadhäsion an das Endothel (MÜLLER-BERGHAUS 1998).

Die Aktivierung der Thrombozyten lässt sich anhand der Konzentration von β -Thromboglobulin abschätzen. β -Thromboglobulin ist in den alpha-Granula der Thrombozyten vorhanden und wird bei deren Aktivierung freigesetzt. Das Protein ist in der Lage die Prostacyclinsynthese der Endothelzellen zu hemmen. Der Referenzbereich liegt bei etwa 35 ng/ml.

Bei der Storage-Pool-Defizienz vom Typ II und III, einer relativ häufigen Thrombozytopathie, liegt β -Thromboglobulin vermindert vor. Erhöhte Werte finden sich bei atherothrombotischen Krankheitsbildern, wie beispielsweise die Lungenarterienembolie. Eine Plättchenaktivierung findet auch durch den Kontakt mit Fremdoberflächen statt. Die Konzentrationen repräsentieren den

β -Thromboglobulingehalt von nur etwa 1% der Plättchen bei normalen Konzentrationen (PATSCHEKE und RUF 1998, OVRUM et al. 1996).

2. Material und Methoden

2.1 Versuchsaufbau

2.1.1 In-vitro-Modell der Herz-Lungen-Maschine (HLM)

Zur Erfassung der hämatologischen Veränderungen durch die extrakorporale Zirkulation wurde ein in-vitro-Testmodell entwickelt (HELLER et al.1991), mit dem die Situation der extrakorporalen Zirkulation, ohne Einflussfaktoren wie die Reaktionslage des Patienten, die Art der Operation oder das Operationsteam, realitätsnah simuliert wurden. Mit dem in-vitro-Modell können somit auch neue Antikoagulantien und einzelne Komponenten der Herz-Lungen-Maschine hinsichtlich ihrer klinischen Verwendbarkeit überprüft werden. In der folgenden Abbildung ist das in-vitro-Modell der HLM schematisch dargestellt.

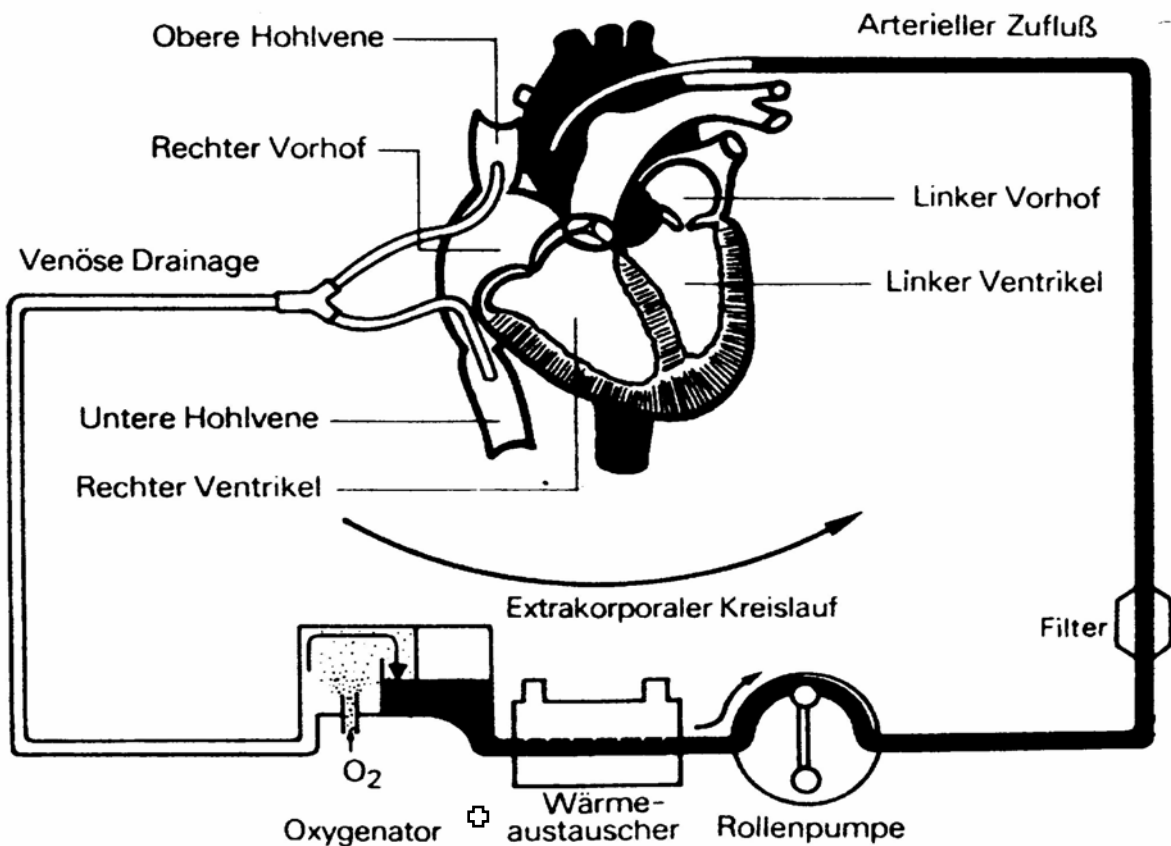


Abb. 2.1: Prinzip der extrakorporalen Zirkulation

Das Modell der Herz-Lungen-Maschine bestand aus einem geschlossenen System, das mit einem Schlauchsystem definierter Länge und einer Vollblutkonserve über 90 Minuten unter Oxygenierung und Aufbau des arteriellen Gegendrucks rezirkuliert wurde. Die Temperatur des Blutes wurde mit einem Hypothermiegerät mit Wasserreservoir (Typ Q 102, Fa. Haake, Berlin, BRD) konstant auf 28°C gehalten. Die Temperatur sollte Operationsbedingungen simulieren und wurde während der Versuchsdauer über einen Temperaturregler überwacht. Bei 28°C ist der myokardiale Sauerstoffverbrauch geringer, und am Patienten kommt es zusätzlich zu einer Abnahme der Herzfrequenz. Dem Oxygenator wurde in einem Gasgemisch 77% N₂, 20% O₂ und 0,3% CO₂ zugeführt. Der hohe N₂-Flow war notwendig, damit der O₂-Partialdruck nicht zu stark anstieg, weil in einem geschlossenem System der O₂-Verbrauch sehr gering ist (WENDEL et al.1992). Eine Sarns Rollerpumpe (Nr.2327, Fa. SARNS Inc. Cardiovascular equipment, Ann Arbor, Michigan, USA) war für die Zirkulation des Blutes verantwortlich und war mit einem Schlauchsystem von insgesamt 205 cm Länge mit dem Oxygenator und dem venösen Reservoir verbunden. Der Schlauchdurchmesser betrug 3/8 Zoll und ist mit Konnektoren am Reservoir und am Oxygenator, sowie einem Dreiwegehahn, aus welchem die Blutentnahme stattfand, verbunden. Das geschlossene System wurde 30 Minuten mit 1000 ml Ringerlactat vorgespült und anschliessend wieder abgelassen. Um das Zirkulationsvolumen der Operationssimulation anzupassen, wurde zusätzlich das unten aufgeführte Primevolumen von 300 ml zugegeben:

- 78,3 ml 5% Glucoselösung (Delta-Pharma GmbH, Pfullingen, BRD)
- 182 ml Ringerlactat (Fresenius, Bad Homburg, BRD)
- 15,7 ml 8,4% NaHCO₃ (Braun Melsungen AG, Melsungen, BRD)
- 24 ml 10% Calciumchlorid (0,89 M) zur Citratantagonisierung in der Blutkonserve.

Zur Versuchsdurchführung wurde die Zufuhr der Druckluft auf 1 l/min, die CO₂-Zufuhr auf 0,03 l/min, die Kühltemperatur auf 28°C und die Druckeinstellung auf 60 mmHg eingestellt. Die Reglerstellung der Pumpe wurde initial auf 25 Umdrehungen pro Minute justiert und nach jeder Abnahme um 1,5 Einheiten verringert, um das

Zirkulationsvolumen pro Zeit konstant zu halten. Die Fördermenge der Rollerpumpe war somit auf 1,86 l/min eingestellt.

2.1.2 Aufbau der Oxygenatoren

Im Versuchsansatz mit der in-vitro-HLM wurde der Maxima Plus PRF™ Hollow Fiber Oxygenator Modell MAX-PRF gegen den Maxima Plus PRF™ Hollow Fiber Oxygenator mit Carmeda® Bio Active Surface (CBAS™) Modell CBMAX-PRF (Medtronic Cardiopulmonary Division, Anaheim, CA 92807, USA) getestet.

Der Maxima Plus PRF™ Hollow Fiber Oxygenator ist ein Membranoxygenator mit einer verbesserten plasmaresistenten Faser. Die Hohlfaser besteht aus mikroporösem Polypropylen und wird von Sauerstoff durchströmt. Das Blut fließt um die Hohlfaser und wird - ohne mit dem Gas in Kontakt zu treten - per Diffusion mit Sauerstoff angereichert und von CO₂ befreit. Die Bluttemperatur wird durch einen integrierten Wärmetauscher auf der venösen Seite kontrolliert. Der Blutfluß um den Wärmetauscher erfolgt im Gegenstromprinzip.

Der Maxima Plus PRF™ Hollow Fiber Oxygenator mit Carmeda® Bio Active Surface (CBAS™) ist ein vergleichbarer Membranoxygenator. Zusätzlich sind hier alle mit Blut in Kontakt tretenden Oberflächen, einschliesslich der Konnektoren, heparinbeschichtet. Beide Oxygenatoren können im klinischen Einsatz bis zu 6 Stunden verwendet werden.

Als Vorexperimente wurden zusätzlich 2 Gruppen mit je 3 Oxygenatoren mit verschiedener Oberflächenbeschichtung getestet, um ein erstes Screening einer neuen Produktpalette zu erheben. Für jede Oberflächenbeschichtung standen drei Oxygenatoren zur Versuchsdurchführung bereit. Aufgrund der geringen Stichprobenanzahl wurden lediglich die Mittelwerte und Standardfehler aufgeführt. Eine Varianzanalyse wurde nicht durchgeführt.

Die Gruppen 2 und 3 bestehen jeweils aus einer Gruppe mit ZX + Heparinbeschichtung, einer Gruppe mit ZX-Beschichtung (neu entwickelte Heparinbeschichtung) und einer unbeschichteten Kontrollgruppe.

Die exakte Beschreibung der Heparinbeschichtungsmethoden ZX + Heparin und ZX, die im wesentlichen auf Silikon- bzw. Silikonölbasis basieren, wurden aus patentrechtlichen Gründen von der Firma Medtronic (Medtronic Cardiopulmonary Division, Anaheim, CA 92807, USA) noch nicht freigegeben.

1. Venöser Zugang
2. Arterielle Rezirkulation
3. Arterieller Ausfluss
4. Arterielle Temperaturmes
5. Luer Anschluss
6. Gasgemischeinstrom
7. Gasgemischausstrom
8. Kühlwasserzufluss
9. Kühlwasserabfluss

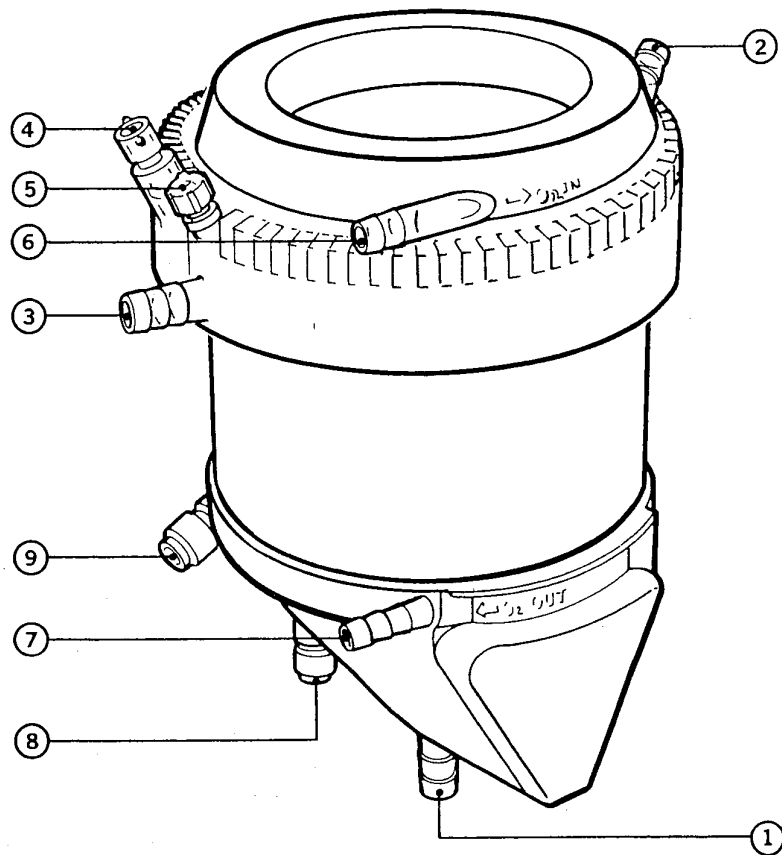


Abb. 2.2: Aufbau eines CBAS™-Hohlfaser-Oxygenators

2.2.1 Untersuchungsmaterial

Als Ausgangsmaterial dienten Blutkonserven aus der Abteilung für Transfusionsmedizin der Universitätsklinik Tübingen, die nicht länger als 24 h bei 4°C gelagert worden waren. Das Spenderalter und die Blutgruppe der Blutkonserven blieben unberücksichtigt.

Jeder Konservenbeutel der Firma BIOTRANS Pharma, Dreieich, Deutschland, enthält durchschnittlich 500 ml Vollblut, das durch Zugabe von 70 ml Stabilisator CPDA-1 ungerinnbar gemacht wurde. Die CPDA-1 Lösung gilt als verträgliche Konservierungslösung und setzt sich wie folgt zusammen:

3,27 g Citronensäure x H₂O
26,3 g Natriumcitrat x 2H₂O
31,9 g Glucose-Monohydrat
2,51 g Natriumdihydrogenphosphat x 2H₂O
275 mg Adenin
ad 1000ml Aqua ad injectibilia.

Citrat komplexiert mit den Ca²⁺-Ionen aus dem Blut und inhibiert dadurch die Gerinnung. Natriumdihydrogenphosphat wird der Konserve als Puffer zugesetzt, um einen durch die Alterung der Erythrozyten abfallenden pH-Wert in den sauren Bereich zu verhindern.

Für die Aufrechterhaltung des Energiestoffwechsels von Erythrozyten und Thrombozyten wird Glucose verwendet. Der Zusatz der Purinbase Adenin verlängert die Lagerungszeit der Konserve, da diese die Synthese von ATP und 2,3-DPG (Diphosphoglycerat) fördert. Citronensäure erlaubt ebenfalls die Lagerungszeit zu verlängern (STANGEL 1988).

Nach Durchmischen der Blutkonserve (30 Minuten) bei Raumtemperatur zur Homogenisierung der Blutbestandteile, wurde die erste Probe (AZP1) direkt aus der Konserve entnommen. In allen Versuchsdurchläufen wurde das Vollblut mit Liquemin® heparinisiert und nochmals 10 Minuten durchmischt. Die Heparinmenge

wurde so gewählt, dass eine Heparinendkonzentration von 3 IU/ml im Reservoir des Oxygenators resultierte. Diese wurde wie folgt berechnet:

Konservengewicht [g] – Beutelgewicht (30 g) = Blutgewicht [g]

Blutvolumen [ml] = Blutgewicht [g] / Blutdichte (1,07 kg/l)

Versuchsvolumen [ml] = Blutvolumen [ml] – 21,7ml (AZP1) + 300 ml (Primevol.)

Benötigte Gesamtheparinmenge [IU] = Versuchsvolumen [ml] x Heparin [3IU/ml]

Zuerst wurde das Primevolumen und anschliessend das Blut über ein Transfusionsbesteck (Firma Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) zusammen mit den anderen Zusätzen - Glucoselösung zur energetischen Versorgung der Erythrozyten, Calcium zur Recalcifizierung, Ringerlactat zur Hämodilution und Natriumhydrogenphosphat zur Pufferung - in das in-vitro-Modell gefüllt. Dieses wurde zuvor 30 Minuten mit Ringerlactat und einer Durchflußrate von 2 l/min bei 28°C gespült. Die HLM wurde dann in Betrieb genommen und der Versuchsablauf gestartet.

2.2.2 Abnahmemodus

Der Abnahmemodus der Blutentnahme wurde wie folgt gewählt:

Abnahme 1	direkt aus der Konserve	Abnahmezeitpunkt 1
Abnahme 2	nach 1 min Rezirkulation	Abnahmezeitpunkt 2
Abnahme 3	nach 5 min Rezirkulation	Abnahmezeitpunkt 3
Abnahme 4	nach 10 min Rezirkulation	Abnahmezeitpunkt 4
Abnahme 5	nach 20 min Rezirkulation	Abnahmezeitpunkt 5
Abnahme 6	nach 30 min Rezirkulation	Abnahmezeitpunkt 6
Abnahme 7	nach 60 min Rezirkulation	Abnahmezeitpunkt 7
Abnahme 8	nach 90 min Rezirkulation	Abnahmezeitpunkt 8

2.2.3 Probengewinnung

Es wurden zu jedem Abnahmezeitpunkt Blutproben für die Bestimmung verschiedener Parameter (z. T. nicht Gegenstand dieser Arbeit) gewonnen und wie nachfolgend beschrieben, behandelt:

Vorbereitung der Blutabnahmemonovetten

1. 10 ml Citratmonovetten (Firma Sarstedt): gebrauchsfertig
2. 2,7 ml EDTA-Monovetten (Firma Sarstedt). Gebrauchsfertig
3. 4,5 ml CTAD-Monovette: In eine 4,5 ml Neutralmonovette (Firma Sarstedt) werden 450 µl C.T.A.D.-Medium aus einem C.T.A.D.-Vacutainer (Firma Boehringer Mannheim, BestNr. 1004999) überpipetiert. Bis zum Gebrauch werden diese Monovetten im Kühlschrank gelagert.
4. 4,5 ml Neutralmonovetten mit 450 µl Lösung aus dem FPA-Kit (Firma Boehringer Mannheim, Best.Nr. 759 406) füllen und bis zum Gebrauch im Kühlschrank lagern.

Blutabnahme

Vor jeder Blutabnahme die ersten 2 ml verwerfen. Es ist zu beachten, dass die Blutabnahmemonovetten langsam angesaugt werden sollen.

zu 1. nach der Blutabnahme bis zur Zentrifugation bei Raumtemperatur stehen lassen

zu 2. nach der Blutabnahme ins Eisbad stellen, zuerst Blutbild am Zellcounter bestimmen.

zu 3. nach der Blutabnahme sofort (bis über den Flüssigkeitsspiegel) ins Eisbad stellen.

zu 4. nach der Blutabnahme sofort (bis über den Flüssigkeitsspiegel) ins Eisbad stellen.

Die Proben (3. und 4.) sollen mindestens 15 min bis maximal 60 min im Eisbad gekühlt werden.

Zentrifugation

Die Blutmonovetten sollen so rasch wie möglich abzentrifugiert werden.

- zu 1. zentrifugieren bei Raumtemperatur (ca. 20°C), 2000g, 20 min
- zu 2. zentrifugieren bei Raumtemperatur, 2000g, 20 min
- zu 3. zentrifugieren bei 4°C (Kühlzentrifuge), 2000g, 30 min
- zu 4. zentrifugieren bei Raumtemperatur, 2000g, 10 min, danach zu 1 ml des Plasmaüberstandes 500 µl Bentonitlösung zugeben und 10 min schütteln. Dann 10 min bei 20°C und 2000 g zentrifugieren, erneut 1 ml des Überstandes mit 500 µl Bentonitlösung versetzen, 10 min schütteln und 10 min bei 2000 g und 20°C zentrifugieren.

Einfrieren des Plasmas

Nach dem Abzentrifugieren soll das aliquote Plasma sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren werden, und bis zur Aufarbeitung im Gefrierschrank aufbewahrt werden (mindestens -20°C bzw. -70°C für FPA).

2.2 Laborchemische Bestimmungen

Spektralphotometrie

Mit Hilfe der Spektralphotometrie kann man kleinste Mengen eines gelösten Stoffes aufgrund seiner Lichtabsorption bestimmen (GUGLIELMI et al. 1993). Eine Lichtquelle liefert ein kontinuierliches Spektrum, das mit einem Monochromator in einzelne Wellenlängen zerlegt wird. Der durch eine Spaltblende isolierte monochromatische Lichtstrahl der Intensität I_0 durchtritt die absorbierende Lösung der Konzentration c , die sich in einer Küvette der Schichtdicke d befindet. Der austretende Lichtstrahl hat eine geringere Intensität I und erzeugt beim Auftreffen auf eine Photozelle einen entsprechenden Strom, der registriert wird. Jede Substanz hat ein

charakteristisches Absorptionsspektrum, welches sich im molaren Extinktionskoeffizient ϵ ausdrückt. Diese Konstante gilt für eine einmolare Lösung bei einer bestimmten Wellenlänge λ und einer Schichtdicke d von 1cm.

Das Lambert-Beer'sche Gesetz $\log(I/I_0) = \epsilon \times c \times d = E$ gilt für Extinktionen von 0,1 bis 1,0, und anhand von Standarddeichkurven kann die Konzentration c über die gemessene Extinktion E ermittelt werden. Das Prinzip der Bestimmung basiert auf einer chromogenen Substratbestimmung, dessen abgespaltene Menge photometrisch bestimmt wird (CLAESSON et al. 1979).

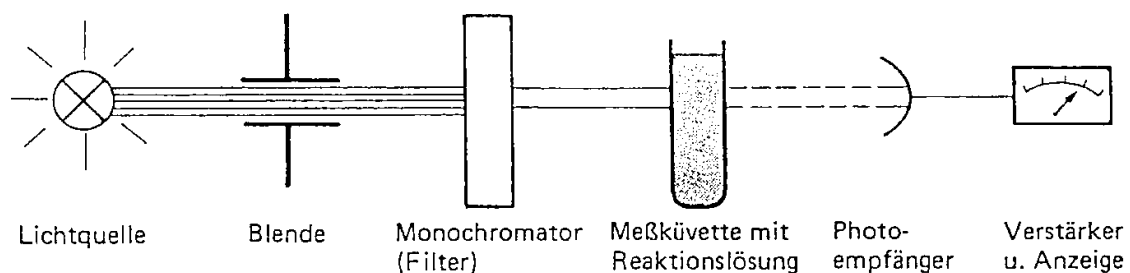


Abb. 2.3: Aufbau eines Photometers

ELISA (enzyme linked immunosorbent assay)

Der ELISA ist eine immunochemische Bestimmungsmethode zur Ermittlung einer Antigen- oder Antikörperkonzentration durch Markierung des zu bestimmenden Reagens (THOMAS 1998). Der Antikörper für das zu bestimmende Antigen ist an eine feste Phase, z.B. eine Mikrotiterplattenvertiefung oder eine Röhrchenwand gekoppelt. Diese Bindung begünstigt die Trennung des freien vom gebundenen, markierten Antigen. Wird die Probe in das Röhrchen gegeben, bindet alles korrespondierende Antigen der Probe mit dem am Reaktionsgefäß gebundenen Antikörper. Die Menge des gebundenen Antigens wird mittels eines enzymmarkierten Zweitantikörpers, der an den Antigen-Antikörperkomplex bindet, ermittelt.

Beim ELISA wird ein Einschritt- von einem Zweischritt-Assay unterschieden. Beim Einschritt-Assay liegt das zu bestimmende Antigen und der markierte Zweitantikörper

nebeneinander im Reaktionsansatz vor, und es ist deshalb nur ein Inkubationsschritt erforderlich. Beim Zweischnitt-Assay bindet in einem ersten Inkubationsschritt das zu bestimmende Antigen und in einem weiteren der markierte Zweitantikörper an den Komplex. Zwischen beiden Inkubationsschritten ist ein Waschvorgang zur Entfernung ungebundener Probenbestandteile geschaltet.

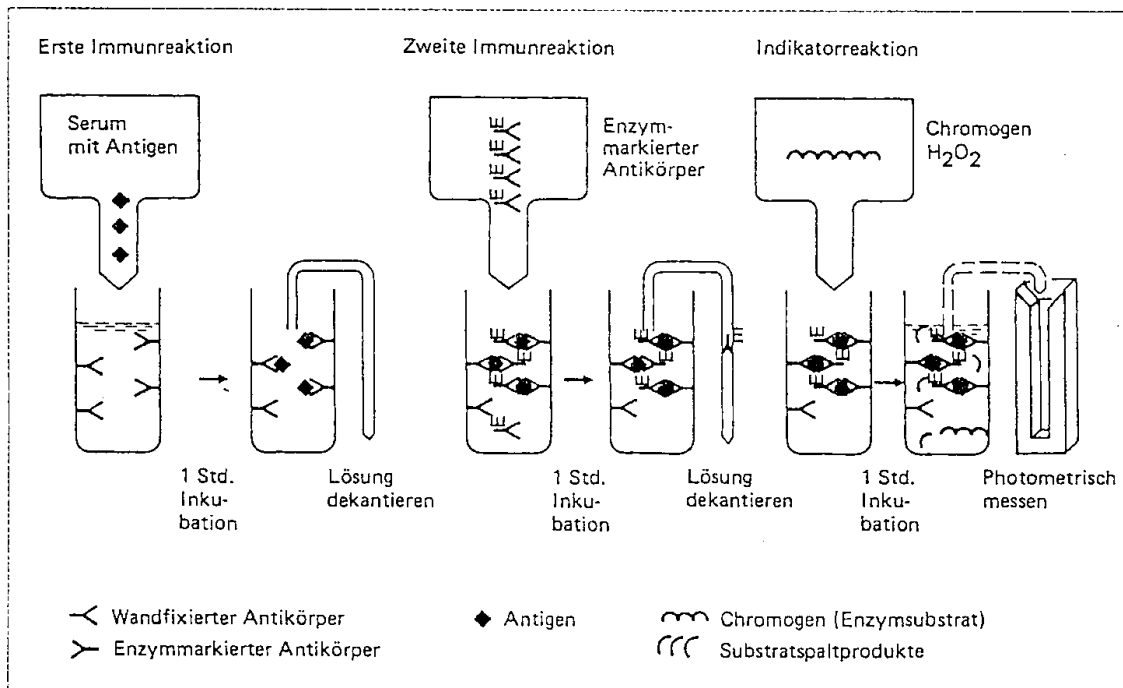


Abb. 2.4: Funktionsprinzip ELISA

Zellcounter

Die Thrombozyten-, Erythrozytenzahl, Hämatokrit und Hämoglobin wurden mit einem Coulter Counter S-Plus der Firma Coulter Electronics Ltd., London, GB ermittelt.

Die EDTA-Vollblutproben werden durch ein Blutverteilverventil angesogen, mit einer Elektrolytlösung verdünnt und teilweise hämolysiert. Die Zellsuspension wird durch eine Messstrecke zwischen zwei Platinelektroden, an denen die Spannung angelegt ist, gezogen. Befindet sich eine Zelle bestimmter Größe im elektrischen Feld, so ändert

sich der elektrische Widerstand entsprechend. Der Zellcounter ist in der Lage die verschiedenen korpuskulären Bestandteile nach der Grösse der gemessenen Widerstandsveränderung zu klassifizieren (DÖRNER 1999). Teilchen mit einer Grösse von 36 - 360 fl werden als Erythrozyten gezählt, Teilchen von 2 - 20 fl als Thrombozyten. Vor jedem Versuchsdurchlauf wird der Zellcounter mit einer Standardlösung kalibriert.

2.3.1 Heparin

Zur photometrischen Bestimmung mittels chromogener Substrate wurde in diesem wie auch in den nachfolgenden Testansätzen jeweils das oben beschriebene Photometer verwendet.

Zur Heparinbestimmung im Plasma wurde der Coatest Heparin der Firma Chromogenix AB (Möln dal, Schweden) verwendet.

Testdurchführung

Es werden 9 Teile Blut mit 1 Teil 0,1 M Natriumcitrat gemischt und bei 2000 U/min bei +4°C für 20 Minuten zentrifugiert. 200 µl der vorverdünnten Probe (100 µl Plasma, 100 µl Antithrombin III, 800 µl Puffer) werden bei 37°C für 3-4 Minuten inkubiert. Faktor Xa (FXa), welcher im nächsten Schritt im Überschuss zupipettiert wird (100 µl), wird proportional zur vorhandenen Menge an Heparin durch Bildung eines Heparin-Antithrombin III-FXa Komplexes neutralisiert. Die Probe wird gemischt und 30 Sekunden bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von Substrat S-2222 wird exakt 3 Minuten inkubiert und der verbleibende Rest an FXa katalysiert hierbei die Abspaltung von para-Nitroanilin (pNA) vom zugesetzten chromogenen Substrat S-2222.

Anschliessend wird mit 20%iger Essigsäure abgestoppt, und die Extinktion der Probe wird gegen einen Probenleerwert bei 405 nm gemessen. Mit Hilfe der erstellten Standarddeichkurve kann die Heparinkonzentration in den Proben ermittelt werden.

Erstellen einer Eichgeraden

Die Standards zur Erstellung der Eichkurve wurden aus Liquemin® N25000 hergestellt. Die Heparin-Stammlösung wird mit isotoner Kochsalzlösung verdünnt, so dass man eine Heparinkonzentration von 10 IU/ml erhält. In einem zweiten Verdünnungsschritt wird die so gewonnene Heparinlösung zu einer Standardlösung mit einer Heparinkonzentration von 0,1 IU/ml mit Puffer weiter verdünnt. Die unterschiedlichen Standardkonzentrationen zur Erstellung der Eichkurve werden aus der Heparinvorverdünnung (0,1 IU/ml), Normalplasma und Puffer wie folgt hergestellt:

Heparin	Heparinvorverdünnung 0.1IU/ml	Puffer	Humanes Normalplasma	ATIII
IU/ml	µl	µl	µl	µl
0.1	100	700	100	100
0.3	300	500	100	100
0.5	500	300	100	100
0.7	700	100	100	100

2.3.2 Prothrombinfragment F1+2

Zur Bestimmung von Human-Prothrombinfragment F1+2 wird der Enzymimmunoassay Enzygnost ® F1+2 micro der Firma Behring AG (Marburg, Deutschland) verwendet.

Testdurchführung

In jede Vertiefung der Mikrotiterplatte wird nach Vorlage von 50µl Probenpuffer F1+2 50µl Standard, Kontrolle oder Probe pipettiert. Bei der 1. Immunreaktion bindet der fixierte Kaninchen-Antikörper gegen F1+2 das in der Probe vorhandene humane F1+2-Antigen. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei 37°C werden alle Vertiefungen abgesaugt und mit 0,3ml verdünnter Waschlösung (Tween-haltige 90 mM Phosphatpufferlösung) zweimal gewaschen. Anschliessend werden 100µl

Konjugatlösung (Anti-Human-Prothrombin, POD-Konjugat) zugegeben und bei 37°C für 15 Minuten inkubiert. In dieser zweiten Immunreaktion bildet der Peroxidase-konjugierte Antikörper gegen Human-Prothrombin aufgrund freier F1+2-Determinanten mit dem fixierten Antigen-Antikörper-Komplex einen Sandwich-Komplex. Die überschüssigen Enzym-konjugierten Antikörper werden ausgewaschen (dreimal mit 0,3 ml verdünnter Waschlösung). Nach dem Waschvorgang erfolgt die Zugabe von 100µl Chromogen-Puffer/Substrat-Lösung (o-Phenylendiamin-dihydrochlorid und Wasserstoffperoxid). Nach weiteren 15 Minuten Inkubationszeit unter Lichtschutz bei 20 bis 25°C wird die Reaktion mit 100µl 0,5 N Schwefelsäure abgestoppt. Die Extinktion des entstandenen Farbstoffes wird innerhalb einer Stunde gegen destilliertes Wasser bei einer Wellenlänge von 492 nm photometrisch gemessen.

Anhand der berechneten Extinktionsmittelwerte der Standards wird die F1+2-Konzentrationen der Proben ermittelt.

2.3.3 Thrombin-Antithrombin III-Komplex (TAT)

Zur Bestimmung von Human-Thrombin Antithrombin III-Komplex wird der Enzym-immunoassay (Sandwich-Prinzip) Enzygnost® TAT micro der Firma Behring AG (Marburg, Deutschland) verwendet.

Testdurchführung

50 µl Proben-Puffer TAT werden in jede Vertiefung der mit Kaninchen-Antikörper gegen Human-Thrombin beschichteten Mikrotitrationsplatten vorgelegt und anschließend 50 µl Probe, Standard bzw. Kontrolle hinzupipettiert. In einer Immunreaktion bindet der in der Probe vorhandene Human-Thrombin-Antithrombin III-Komplex an Antithrombin. Nach einer Inkubation von 15 Minuten bei 37°C werden die Vertiefungen abgesaugt und zweimal mit 0,3 ml verdünnter Waschlösung (Tween-haltige 90 mM Phosphatpufferlösung) gewaschen. Danach werden 100 µl Konjugatlösung (Anti-Human-ATIII, POD-Konjugat) in die Mikrotitrationsplatten gefüllt und weitere 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Hierbei reagiert ein Peroxidase-

konjugierter Antikörper gegen Antithrombin III mit den freien Antithrombin III-Determinanten. Beim Waschvorgang werden die überschüssigen Enzym-konjugierten Antikörper ausgewaschen. Zuletzt werden 100 µl der Chromogen-Puffer/Substrat-Lösung (o-Phenylendiamin-dihydrochlorid und Wasserstoffperoxid) zugegeben und bei Raumtemperatur lichtgeschützt 30 Minuten inkubiert. Die enzymatische Farbreaktion wird mit 100 µl 0,5 N Schwefelsäure gestoppt. Die Extinktion des entstandenen Farbstoffes ist direkt proportional zur TAT-Konzentration der Proben und wird photometrisch bei der Wellenlänge von 492 nm gemessen.

Mit Hilfe der TAT-Standard-Plasmen S1 bis S4 (2 – 60 µg/l) wird eine Bezugskurve erstellt, aus der mittels der Extinktionswerte die TAT-Konzentration ermittelt wird.

2.3.4 Fibrinopeptid A (FPA)

Die quantitative Bestimmung von Fibrinopeptid A erfolgt mit dem enzymimmunologischen ELISA-Test der Firma Boehringer Diagnostica GmbH (Mannheim, Deutschland).

Testdurchführung

Die Ermittlung der Konzentration von FPA dauert 2 Tage. Am 1. Tag werden die ELISA-Reaktionsgefäße mit Beschichtungslösung (enthält Fibrinopeptid A) gefüllt und über Nacht inkubiert.

Zur FPA-Bestimmung werden im Vorinkubationsschritt jeweils 1000 µl der einzelnen Standardverdünnungen oder der verdünnten Proben mit FPA-Antikörper-Lösung und Verdünnungspuffer (Albumin, Tween® 20 und Phosphatpuffer) eine Stunde bei 37°C inkubiert. Der Ansatz der verdünnten Proben wird anschließend zentrifugiert. Im nächsten Schritt erfolgt der ELISA-Ansatz. Die Beschichtungslösung wird aus den ELISA-Reaktionsgefäßen abgesaugt und dreimal gewaschen. Anschliessend werden 1000 µl des Überstandes aus der Vorinkubation zupipettiert, 1 Stunde bei 15-25°C inkubiert, abgesaugt und wiederum dreimal gewaschen. Nach Zugabe von 1000 µl Antikörper-POD-Konjugat (Anti-Kaninchen-IgG-POD-Konjugat und Ziegenantikörper)

wird der Inkubations- und Waschschrift wiederholt, dann 1000 µl Substrat (o-Phenylendiamin-dihydrochlorid und Wasserstoffperoxid) zugegeben und erneut inkubiert. Zum Abstoppen der Farbreaktion wird 250 µl 3M Schwefelsäure zugegeben und anschließend 10 Minuten inkubiert. Die Extinktion wird innerhalb von 2 Stunden bei 492 nm gegen Luft gemessen.

Die entsprechende FPA-Konzentration in ng/ml der verdünnten Proben können direkt an der erstellten Bezugskurve abgelesen werden. Aufgrund der Verdünnung während der Bentonitbehandlung müssen die Werte mit 2,0 multipliziert werden, um den ursprünglichen FPA-Plasmawert zu erhalten.

2.3.5 Hämolyse

Zur Bestimmung der Hämolyse wird der Hämoglobin-Farbttest der Firma Boehringer-Ingelheim (Mannheim, Deutschland) verwendet.

Testdurchführung

Es werden 2 ml der Reaktionslösung (Kaliumhexacyanoferrat 0,6 mmol/l, Kaliumphosphatpuffer pH 7,2 und Kaliumcyanidlösung 0,75 mmol/l) mit 500 µl Testplasma gemischt und für 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Hämoglobinverbindungen im Plasma werden dabei mittels Kaliumcyanid und Kaliumhexacyanoferrat-(III) zu Hämoglobincyanid umgewandelt.

Die Extinktion wird bei 546 nm und bei 691 nm gegen die Reaktionslösung als Leerwert abgelesen. Die Hämoglobin-Aktivität steigt linear zur Differenz der beiden Werte und die Hämolyse wird als Hämoglobinkonzentration in mg /100 ml wie folgt berechnet:

$$\text{Hämoglobinkonzentration [mg/dl]} = (E\ 546\ \text{nm} - E\ 691\ \text{nm}) \times 746$$

2.3.6 PMN-Elastase

Die Bestimmung der PMN-Elastase erfolgt mit dem Enzymimmunoassay PMN-Elastase der Firma Merck (Darmstadt, Deutschland).

Testdurchführung

Es handelt sich hierbei um einen heterogenen Immunoassay zur spezifischen Bestimmung der PMN-Elastase (E) aus polynukleären Leukozyten. Die PMN-Elastase liegt im Plasma praktisch nicht frei vor, sondern nahezu vollständig im Komplex mit seinem Hauptinhibitor α_1 -Proteinaseinhibitor (PI). Deswegen spiegelt die Menge an PMN-Elastase- α_1 -PI-Komplexes die freigesetzte PMN-Elastase wider.

Im ersten Inkubationsschritt bindet der PMN-Elastase-Proteinaseinhibitor-Komplex mit seinem PMN-Elastase Teil an einen fixierten Antikörper. 500 μ l der 1:51 mit Phosphatpuffer verdünnten Proben werden mit 1000 μ l Waschlösung gewaschen, in antikörperbeschichtete Röhrchen pipettiert (anti- α_1 -PMN-Elastase-(human)-Antikörper vom Schaf) und 60 min bei 20-25°C inkubiert.

Nach dreimaligem Waschen mit je 1000 μ l Waschlösung werden 500 μ l Antikörper-Enzym-Lösung (anti- α_1 -Proteinaseinhibitor-(human)-Antikörper vom Kaninchen, alkalische Phosphatase (AP) konjugiert) im Überschuss hinzupipettiert und bei gleichen Bedingungen nochmals 30 min inkubiert. Nach Auswaschen der überschüssigen AP-markierten Antikörper folgt die Zugabe von 500 μ l Substrat (4-Nitrophenylphosphat) und eine weitere Inkubation für 30 min. Nach Abstoppen der Farbreaktion mit 100 μ l 2M NaOH werden die Extinktionen der Ansätze gegen ein Leerwertgemisch aus 500 μ l Substrat und 100 μ l Stopplösung bei 405 nm gemessen. Die Menge an gebildetem Farbstoff ist dem PMN-Elastase- α_1 Proteinaseinhibitor direkt proportional und kann mit Hilfe einer Eichkurve ermittelt werden.

2.3.7 β -Thromboglobulin

Zur quantitativen Bestimmung von β -Thromboglobulin wird der enzymimmunologische Test Asserachrom[®] β -TG der Firma Boehringer (Mannheim, Deutschland) verwendet.

Testdurchführung

Ein Teil Patientenplasma (plättchenarmes Plasma) wird mit verdünntem Pufferkonzentrat (Albumin, Tween[®] 20 und Phosphatpuffer) im Verhältnis 1:10 verdünnt. In jede Vertiefung des Mikrotitrationsstreifens (mit Anti- β -Thromboglobulin-Beschichtung) werden 200 μ l Probe bzw. Standard pipettiert.

In einer Immunreaktion mit dem vorhandenen β -TG des Plasma bildet sich ein Antigen-Antikörperkomplex. Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde bei 15-25°C wird die Flüssigkeit abgesaugt und mit 250 μ l Waschpuffer (Tween[®] 20 und NaCl) fünfmal gewaschen.

Im nächsten Schritt werden je 200 μ l Anti- β -TG-Peroxidase hinzupipettiert, die an einer weiteren Determinanten des β -TG zu einem Sandwichkomplex bindet. Nach der Inkubation und dem Waschvorgang wird sofort 200 μ l Substratlösung (Harnstoffperoxid/o-Phenylendiamin-dihydrochlorid) zugegeben und nach 3 min Inkubation die Reaktion mit 100 μ l 1M Salzsäure abgestoppt. Die Extinktion wird nach einer Inkubation von 10 Minuten bei einer Wellenlänge von 492 nm innerhalb von 2 Stunden gegen einen Reagentienleerwert am Photometer gemessen.

2.3 Statistische Auswertung

Um eine Vergleichbarkeit der verschiedenen Parameter herzustellen wird eine Hämatokritkorrektur durchgeführt, weil es durch die Zugabe von insgesamt 300 ml Primevolumen zu einem Verdünnungseffekt kommt.

Die Hämatokritkorrektur wird wie folgt vorgenommen:

Korrekturfaktor $F = ([100-B]:[100-A]) \times (A:B)$,

wobei A dem Hämatokritwert aus der Konserve und B dem aktuellen Hämatokritwert entspricht.

Dieser Faktor wird zur Aktualisierung jeder Abnahme mit dem unkorrigierten Wert multipliziert.

Zur statistischen Auswertung wurde das Programm Excel 97 von Microsoft verwendet. Aus den hämatokritkorrigierten Werten wurden die Mittelwerte berechnet und die Standardfehler angegeben. Zur Abschätzung der statistischen Signifikanz wird eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p = 0,05$ angenommen. Werte kleiner 0,01 werden als statistisch hoch signifikant gewertet. Das bedeutet, dass ein Ergebnis als signifikant gewertet wird, wenn es um mehr als 2 Standardfehler von der Nullhypothese entfernt liegt. In diesem Fall kann die Nullhypothese verworfen werden, welche besagt, dass die Mittelwerte der untersuchten Parameter während der Versuchsdauer konstant bleiben.

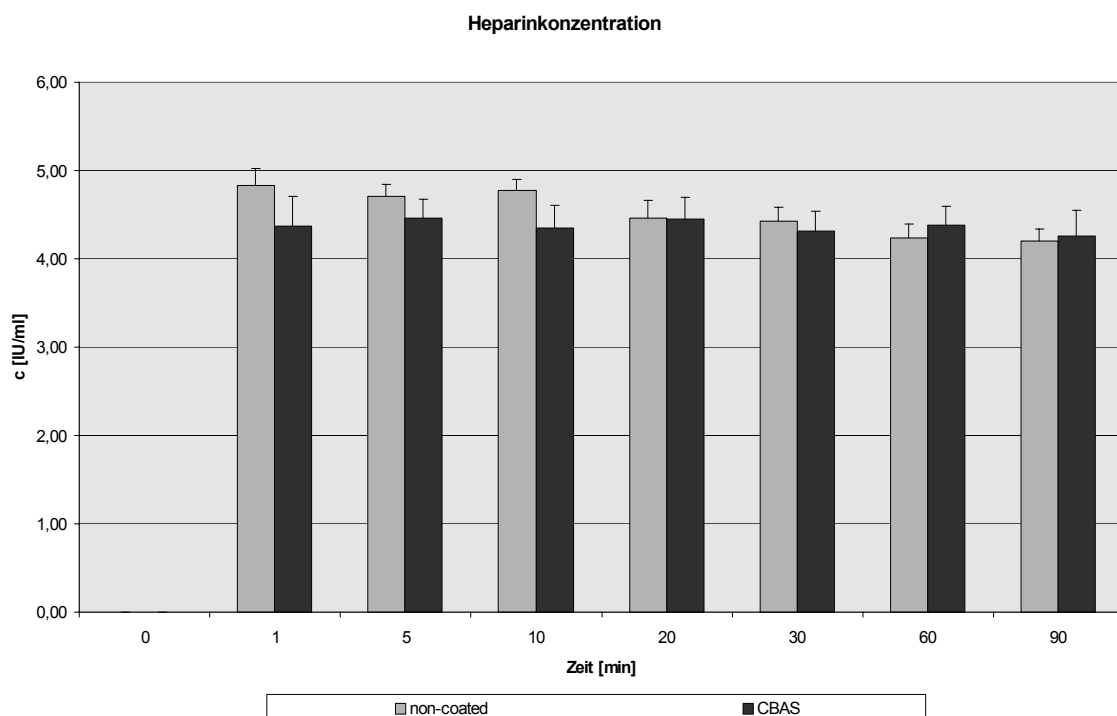
Die statistische Prüfung der Gruppen gegeneinander erfolgte mit der univariaten Varianzanalyse, die Überprüfung der Ergebnisse innerhalb der Gruppe (Abnahme 1 gegen die anderen Abnahmen) mit dem zweiseitigen t-Test nach Student.

3. Ergebnisse

3.1 Heparin

Die Heparinkonzentration der mit CBAS™ beschichteten Oxygenatoren zeigte keinen Anstieg während der Zirkulationszeit. Die Mittelwerte der Heparinkonzentration der beschichteten Gruppe fielen von $4,37 \pm 0,34$ IU/ml auf $4,26 \pm 0,29$ IU/ml nach 90 Minuten ab. Die höheren Anfangswerte der nicht beschichteten Gruppe von $4,83 \pm 0,19$ IU/ml sanken etwas stärker auf einen Endwert von $4,20 \pm 0,14$ IU/ml ab. Es bestand zu keinem Zeitpunkt der 90 minütigen Zirkulationszeit ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen.

Die bei den Voruntersuchungen ermittelten Werte der beiden Gruppen mit je drei Oxygenatoren verschiedener Oberflächeneigenschaften zeigten allerdings einen Anstieg der Heparinkonzentration. Eine sinnvolle statistische Auswertung ist aufgrund der Gruppengröße nicht möglich. Die Mittelwerte mit Standardfehler sind den Tabellen 3.2 und 3.3 zu entnehmen.



Zirkulationszeit	n	non-coated 1	CBAS TM 1	p
0 Minuten	9			
1 Minuten	9	4,83±0,19	4,37±0,34	0,280
5 Minuten	9	4,71±0,14	4,46±0,22	0,372
10 Minuten	9	4,78±0,13	4,35±0,25	0,174
20 Minuten	9	4,46±0,20	4,45±0,25	0,981
30 Minuten	9	4,43±0,16	4,32±0,22	0,702
60 Minuten	9	4,24±0,16	4,39±0,21	0,604
90 Minuten	9	4,20±0,14	4,26±0,29	0,861

Tabelle 3.1: Heparinkonzentration IU/ml (Mittelwert ± Standardfehler, p-Werte)

Zirkulationszeit	n	ZX-Heparin 2	ZX-coated 2	Control 2
0 Minuten	3			
1 Minuten	3	4,97±0,23	3,74±0,32	4,49±0,43
5 Minuten	3	5,28±0,33	4,95±0,06	4,90±0,30
10 Minuten	3	5,12±0,11	4,73±0,25	5,01±0,26
20 Minuten	3	5,23±0,11	4,63±0,11	5,06±0,11
30 Minuten	3	5,44±0,24	4,58±0,31	5,22±0,27
60 Minuten	3	4,44±0,37	4,53±0,20	4,90±0,36
90 Minuten	3	5,33±0,34	5,05±0,21	4,75±0,26

Tabelle 3.2: Heparinkonzentration IU/ml (Mittelwert ± Standardfehler)

Zirkulationszeit	n	ZX-Heparin 3	ZX-coated 3	Control 3
0 Minuten	3	9,77±2,46	8,43±1,59	8,23±0,30
1 Minuten	3	6,17±0,02	6,06±0,10	8,52±0,03
5 Minuten	3	6,34±0,26	6,22±0,13	8,52±0,05
10 Minuten	3	6,35±0,49	5,79±0,02	8,47±0,11
20 Minuten	3	6,42±0,32	5,79±0,07	8,32±0,20
30 Minuten	3	6,67±0,50	5,58±0,20	8,11±0,26
60 Minuten	3	6,01±0,37	4,93±0,17	8,37±0,11
90 Minuten	3	6,26±0,43	4,77±0,20	8,47±0,41

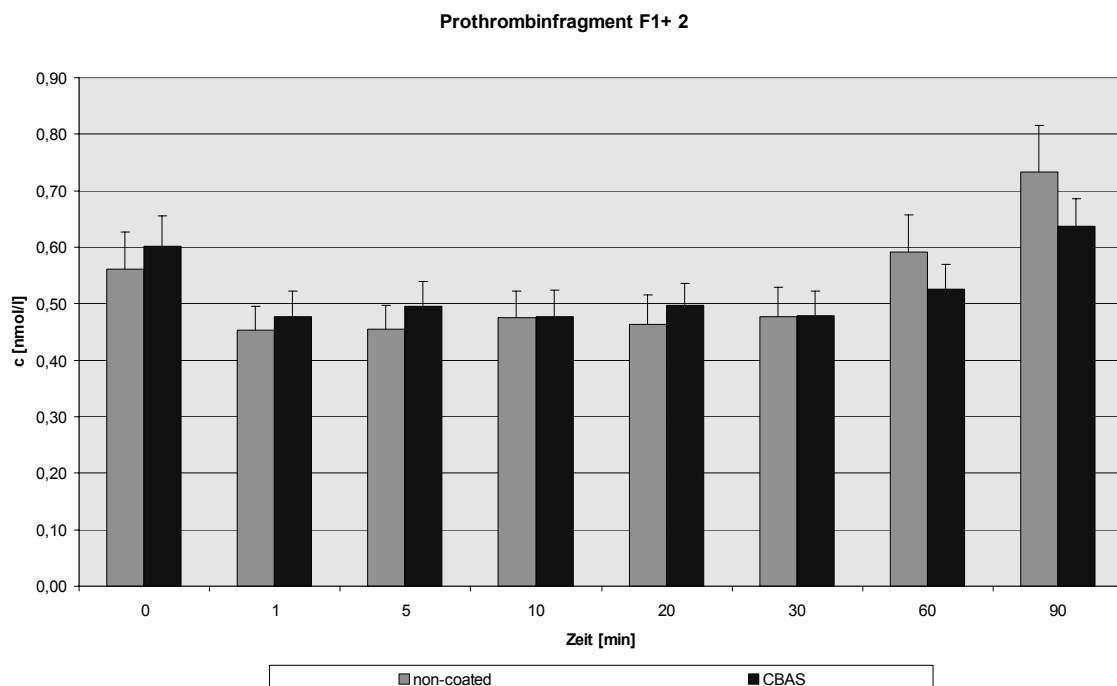
Tabelle 3.3: Heparinkonzentration IU/ml (Mittelwert ± Standardfehler)

3.2 Prothrombinfragment F 1+2

Die Aktivität von Faktor X, der hier durch die intrinsische Gerinnung mitbegründet wird, führt zu einer Änderung von Prothrombin zu Thrombin. Während dieser Umwandlung spaltet sich das Prothrombinfragment F 1+2 ab.

Die Konzentration von Prothrombinfragment F 1+2 fällt initial in der CBAS™-Gruppe sowie auch in der Kontrollgruppe ab und steigt insbesondere nach einer Zirkulationszeit von 60 Minuten an. Ein statistischer Unterschied zwischen den beiden Gruppen und auch die statistische Auswertung innerhalb der Gruppe, verglichen mit der ersten Abnahme, zeigten keine signifikanten Unterschiede. Dennoch zeigt sich ein Trend zu etwas höheren Werten bei der nicht beschichteten Gruppe.

Die Veränderung der Mittelwerte während der Versuchsdauer bei den Gruppen für die Vorversuche der Silikonbeschichtung sind in Tabellen 3.5 und 3.6 zusammengestellt. Für die Beschichtung ZX + Heparin der Gruppe 3 wurde nur ein Oxygenator ausgewertet und es konnte deshalb kein Standardfehler errechnet werden.



Zirkulationszeit	n	non-coated 1	CBAS 1	p
0 Minuten	9	0,56±0,07	0,60±0,05	0,665
1 Minuten	9	0,45±0,04	0,48±0,04	0,704
5 Minuten	9	0,45±0,04	0,49±0,04	0,544
10 Minuten	9	0,48±0,05	0,48±0,05	0,971
20 Minuten	9	0,46±0,05	0,50±0,04	0,635
30 Minuten	9	0,48±0,05	0,48±0,04	0,975
60 Minuten	9	0,59±0,06	0,53±0,04	0,433
90 Minuten	9	0,73±0,08	0,64±0,05	0,366

Tabelle 3.4: Prothrombinfragment F 1+2-Konzentration nmol/ml (Mittelwert ± Standardfehler, p-Werte)

Zirkulationszeit	n	ZX-Heparin 2	ZX-coated 2	Control 2
0 Minuten	3	0,45±0,07	0,52±0,03	0,50±0,05
1 Minuten	3	0,34±0,05	0,42±0,02	0,40±0,06
5 Minuten	3	0,40±0,07	0,46±0,03	0,44±0,06
10 Minuten	3	0,40±0,08	0,50±0,04	0,41±0,06
20 Minuten	3	0,42±0,08	0,49±0,04	0,49±0,03
30 Minuten	3	0,39±0,07	0,45±0,04	0,43±0,05
60 Minuten	3	0,41±0,07	0,49±0,03	0,46±0,07
90 Minuten	3	0,40±0,05	0,50±0,03	0,50±0,06

Tabelle 3.5: Prothrombinfragment F 1+2-Konzentration nmol/ml (Mittelwert ± Standardfehler)

Zirkulationszeit	n	ZX-Heparin 3	ZX-coated 3	Control 3
0 Minuten	3	0,35±0,00	0,56±0,05	0,74±0,08
1 Minuten	3	0,22±0,00	0,44±0,04	0,51±0,03
5 Minuten	3	0,18±0,00	0,44±0,06	0,49±0,04
10 Minuten	3	0,25±0,00	0,47±0,05	0,51±0,05
20 Minuten	3	0,27±0,00	0,48±0,04	0,51±0,05
30 Minuten	3	0,35±0,00	0,49±0,04	0,56±0,06
60 Minuten	3	1,34±0,00	0,55±0,05	0,62±0,06
90 Minuten	3		0,74±0,16	0,72±0,10

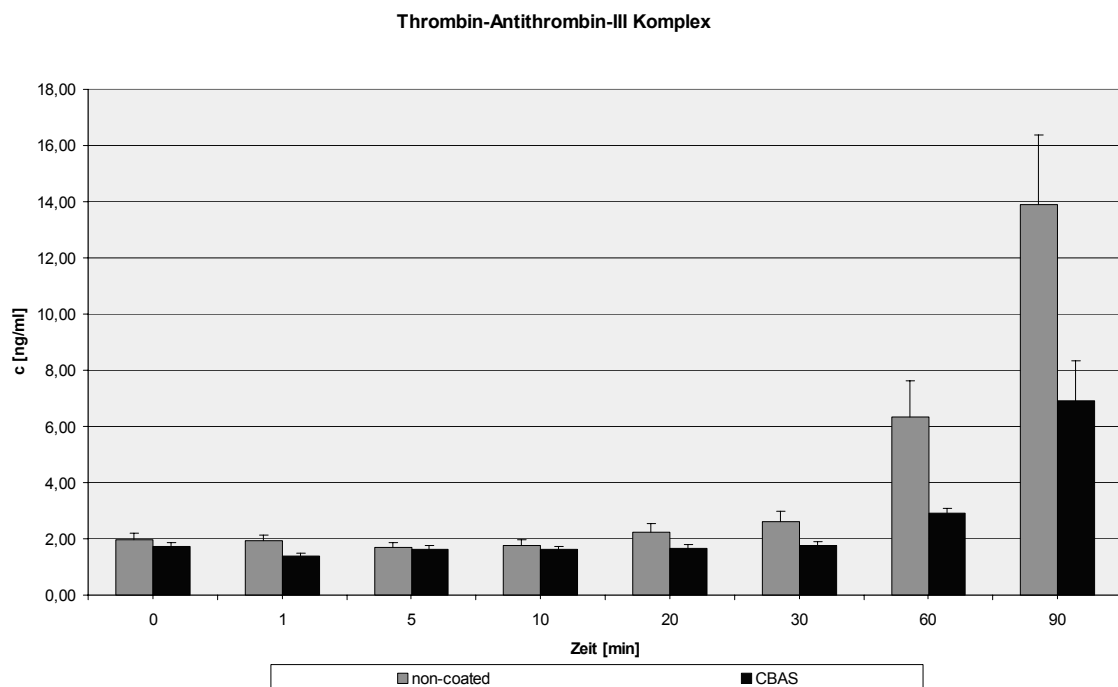
Tabelle 3.6: Prothrombinfragment F 1+2-Konzentration nmol/ml (Mittelwert ± Standardfehler)

3.3 Thrombin-Antithrombin-III Komplex (TAT)

Das aktivierte Thrombin bildet mit Antithrombin III einen Komplex und wird inaktiviert. Während der ersten 30 Minuten des Versuches war nur ein geringer Anstieg der TAT-Konzentration zu verzeichnen. In der heparinbeschichteten Gruppe war nach 60 und 90 Minuten eine statistisch signifikante geringere Konzentration gegenüber der unbeschichteten Kontrollgruppe feststellbar.

Die TAT-Konzentration in der unbeschichteten Gruppe stieg von $1,97 \pm 0,22$ ng/ml auf einen Mittelwert von $13,89 \pm 2,49$ ng/ml an. Die CBASTM beschichteten Oxygenatoren lagen mit einem Anstieg von $1,73 \pm 0,14$ ng/ml auf $6,90 \pm 1,45$ ng/ml deutlich darunter.

Bei der Vorversuchsgruppe lagen die Mittelwerte nach 90 Minuten zwischen $3,68 \pm 0,89$ ng/ml und $124,13 \pm 0,00$ ng/ml. Auch hier war bei der ZX + Heparinbeschichtung nur ein Oxygenator verwendbar.



Zirkulationszeit	n	non-coated 1	CBAS 1	p
0 Minuten	9	1,97±0,22	1,73±0,14	0,397
1 Minuten	9	1,92±0,21	1,38±0,12	0,049
5 Minuten	9	1,71±0,16	1,64±0,12	0,751
10 Minuten	9	1,76±0,23	1,62±0,11	0,616
20 Minuten	9	2,25±0,29	1,65±0,14	0,098
30 Minuten	9	2,61±0,38	1,76±0,13	0,065
60 Minuten	9	6,35±1,29	2,92±0,17	0,025
90 Minuten	9	13,89±2,49	6,90±1,45	0,036

Tabelle 3.7: Konzentration des Thrombin-Antithrombin III-Komplexes ng/ml (Mittelwert ± Standardfehler, p-Werte)

Zirkulationszeit	n	ZX-Heparin 2	ZX-coated 2	Control 2
0 Minuten	3	1,86±0,43	1,89±0,13	2,05±0,19
1 Minuten	3	1,55±0,29	1,94±0,19	2,15±0,27
5 Minuten	3	1,76±0,45	2,45±0,40	2,32±0,11
10 Minuten	3	1,56±0,41	2,24±0,42	2,34±0,18
20 Minuten	3	1,77±0,48	2,66±0,41	2,60±0,20
30 Minuten	3	1,88±0,57	2,61±0,29	2,81±0,18
60 Minuten	3	2,87±0,73	3,41±0,50	3,93±0,44
90 Minuten	3	3,68±0,89	5,56±0,59	6,84±1,42

Tabelle 3.8: Konzentration des Thrombin-Antithrombin III-Komplexes ng/ml (Mittelwert ± Standardfehler)

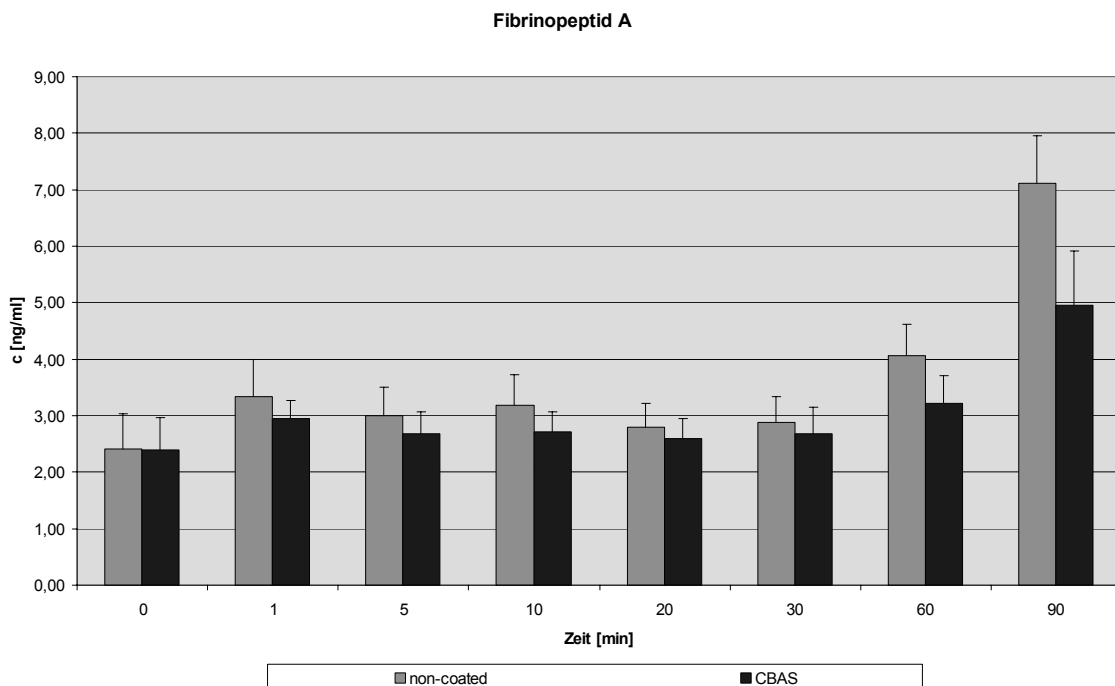
Zirkulationszeit	n	ZX-Heparin 3	ZX-coated 3	Control 3
0 Minuten	3	1,83±0,00	3,24±0,61	6,79±0,74
1 Minuten	3	1,86±0,00	3,87±0,65	5,42±0,36
5 Minuten	3	3,12±0,00	3,59±0,41	4,49±0,27
10 Minuten	3	2,75±0,00	3,48±0,29	5,05±0,18
20 Minuten	3	3,12±0,00	4,37±0,79	4,98±0,50
30 Minuten	3	7,21±0,00	5,20±0,89	6,00±0,79
60 Minuten	3	65,17±0,00	9,86±3,25	6,93±0,62
90 Minuten	3	124,13±0,00	24,45±13,84	10,10±2,94

Tabelle 3.9: Konzentration des Thrombin-Antithrombin III-Komplexes ng/ml (Mittelwert ± Standardfehler)

3.4 Fibrinopeptid A

Die beiden Spaltprodukte Fibrinopeptid A und B entstehen, wenn Fibrinogen in Fibrin umgewandelt wird. Die Konzentration von FPA stieg in der unbeschichteten Gruppe von einem Ausgangswert von $2,42 \pm 0,61$ ng/ml auf $7,10 \pm 0,86$ ng/ml nach Zirkulationsende. Die Oxygenatoren mit CBAS™-Beschichtung hatten Ausgangswerte von $2,39 \pm 0,57$ ng/ml und stiegen auf $4,96 \pm 0,96$ ng/ml an. Der Normwert für FPA liegt unter 3 ng/ml. Ein signifikanter Unterschied in der Gruppe 1 konnte nicht festgestellt werden.

Die mittlere Konzentration von FPA der Vorversuchsgruppen lagen nach der 90 minütigen Perfusion zwischen $4,31 \pm 0,76$ ng/ml und $79,62 \pm 0,00$ ng/ml. Die Messwerte der Beschichtung ZX + Heparin der Gruppe 3 wurden nur von einem Oxygenator ermittelt, da diese Beschichtung auch bei diesem Parameter als ungenügend gewertet wurde.



Zirkulationszeit	n	non-coated 1	CBAS 1	p
0 Minuten	9	2,42±0,61	2,39±0,57	0,973
1 Minuten	9	3,33±0,67	2,94±0,33	0,633
5 Minuten	9	2,99±0,51	2,68±0,38	0,655
10 Minuten	9	3,19±0,54	2,72±0,35	0,497
20 Minuten	9	2,80±0,42	2,59±0,36	0,730
30 Minuten	9	2,89±0,44	2,67±0,48	0,760
60 Minuten	9	4,07±0,55	3,21±0,50	0,294
90 Minuten	9	7,10±0,86	4,96±0,96	0,135

Tabelle 3.10: Fibrinopeptid A-Konzentration ng/ml (Mittelwert ± Standardfehler, p-Werte)

Zirkulationszeit	n	ZX-Heparin 2	ZX-coated 2	Control 2
0 Minuten	3	1,75±0,51	2,20±0,70	1,39±0,08
1 Minuten	3	2,77±0,62	2,79±0,46	2,16±0,13
5 Minuten	3	2,37±0,53	2,78±0,45	2,23±0,19
10 Minuten	3	2,40±0,27	2,68±0,31	2,05±0,17
20 Minuten	3	2,25±0,39	2,75±0,43	2,13±0,09
30 Minuten	3	2,58±0,43	3,18±0,74	2,25±0,25
60 Minuten	3	3,07±0,42	4,66±0,96	3,57±0,27
90 Minuten	3	4,31±0,76	6,82±2,14	4,48±0,72

Tabelle 3.11: Fibrinopeptid A-Konzentration ng/ml (Mittelwert ± Standardfehler)

Zirkulationszeit	n	ZX-Heparin 3	ZX-coated 3	Control 3
0 Minuten	3	0,29±0,00	2,60±0,55	4,25±1,54
1 Minuten	3	0,80±0,00	1,65±0,20	2,75±0,01
5 Minuten	3	0,49±0,00	2,34±0,38	3,82±0,53
10 Minuten	3	1,06±0,00	2,44±0,42	4,21±0,28
20 Minuten	3	0,54±0,00	2,16±0,36	5,33±0,33
30 Minuten	3	1,93±0,00	2,88±0,42	6,73±0,44
60 Minuten	3	14,12±0,00	7,15±1,94	14,23±3,88
90 Minuten	3	79,62±0,00	16,15±7,61	16,28±2,30

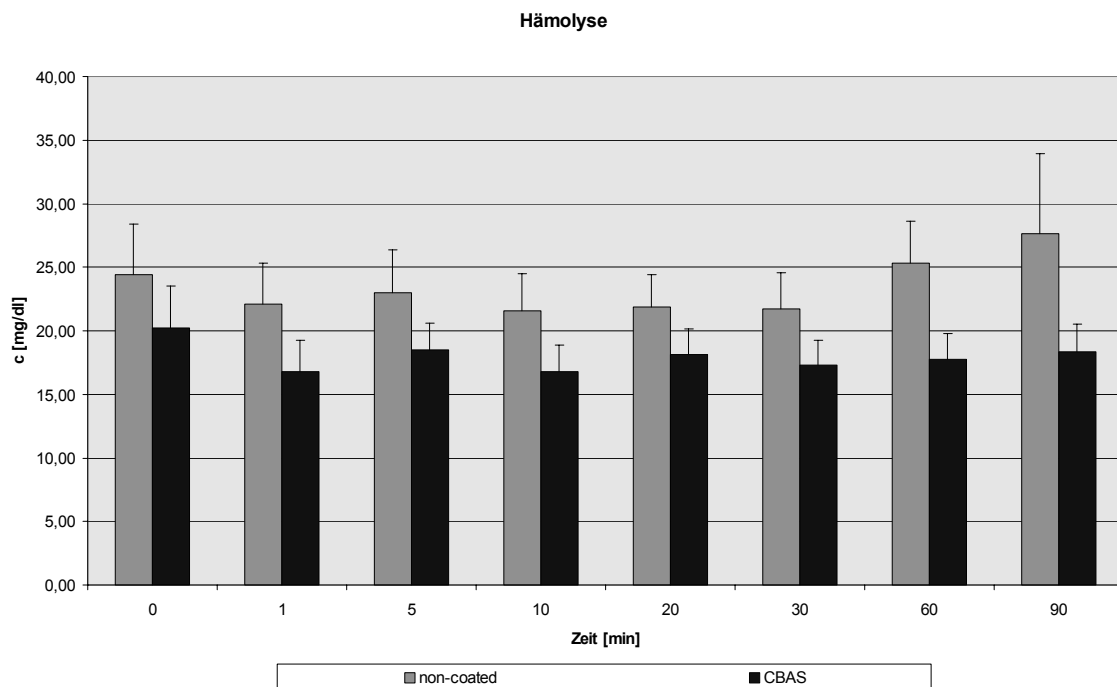
Tabelle 3.12: Fibrinopeptid A-Konzentration ng/ml (Mittelwert ± Standardfehler)

3.5 Hämolyse

Innerhalb der Gruppe 1 betrug die Ausgangskonzentration bei den unbeschichteten Oxygenatoren im Mittel $24,45 \pm 3,95$ mg/dl und bei den heparinbeschichteten Oxygenatoren $20,22 \pm 3,32$ mg/dl. Die Hämolysewerte stiegen für die unbeschichtete Gruppe bis zum Zirkulationsende auf einen Wert von $27,63 \pm 6,28$ mg/dl an und zeigten eine deutlichere Hämolyse als bei der CBAS™-Beschichtung, in der die Werte sogar auf $18,38 \pm 2,15$ mg/dl zurückgingen.

Ein statistisch signifikanter Unterschied konnte anhand der Varianzanalyse allerdings nicht gezeigt werden.

Die Mittelwerte der Vorversuchsgruppe waren denen der Gruppe 1 ähnlich, hatten aber im Durchschnitt viel höhere Standardfehler. Die Tabellen 3.15 und 3.16 zeigen die ermittelten Werte, wobei hier für die ZX + Heparinbeschichtung der Gruppe 3 keine Auswertung vorgenommen wurde.



Zirkulationszeit	n	non-coated 1	CBAS 1	p
0 Minuten	9	24,45±3,95	20,22±3,32	0,451
1 Minuten	9	22,11±3,24	16,80±2,46	0,236
5 Minuten	9	23,03±3,31	18,51±2,11	0,294
10 Minuten	9	21,59±2,89	16,80±2,07	0,223
20 Minuten	9	21,89±2,54	18,14±2,04	0,294
30 Minuten	9	21,76±2,80	17,34±1,91	0,236
60 Minuten	9	25,32±3,30	17,73±2,05	0,084
90 Minuten	9	27,63±6,28	18,38±2,15	0,207

Tabelle 3.13: Konzentration des Hämoglobins mg/dl im Plasma (Mittelwert ± Standardfehler, p-Werte)

Zirkulationszeit	n	ZX-Heparin 2	ZX-coated 2	Control 2
0 Minuten	3	32,57±12,67	24,87±14,21	11,69±4,72
1 Minuten	3	17,94±4,13	16,06±6,38	9,34±0,01
5 Minuten	3	21,84±2,72	12,89±6,36	15,57±3,50
10 Minuten	3	23,79±3,67	14,49±5,08	15,96±2,30
20 Minuten	3	25,73±4,51	18,39±8,27	13,23±2,54
30 Minuten	3	24,57±3,98	22,32±9,60	8,95±0,84
60 Minuten	3	24,18±5,56	24,66±10,49	12,84±0,54
90 Minuten	3	22,61±5,13	23,87±10,36	15,18±1,64

Tabelle 3.14: Konzentration des Hämoglobins mg/dl im Plasma (Mittelwert ± Standardfehler)

Zirkulationszeit	n	ZX-Heparin 3	ZX-coated 3	Control 3
0 Minuten	3		30,83±4,57	38,30±13,83
1 Minuten	3		24,00±3,74	26,02±7,66
5 Minuten	3		24,82±4,56	26,03±8,08
10 Minuten	3		24,42±4,84	24,86±7,14
20 Minuten	3		24,00±4,51	25,60±6,17
30 Minuten	3		25,61±5,51	25,63±7,34
60 Minuten	3		23,21±4,96	26,03±7,58
90 Minuten	3		23,21±3,15	26,80±7,27

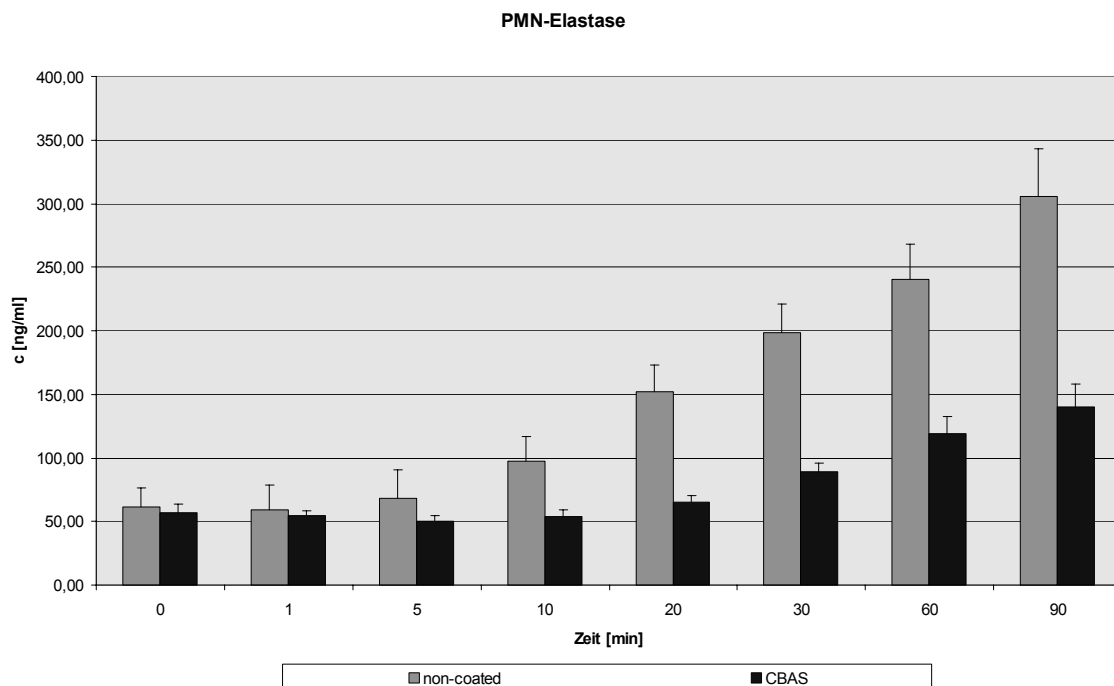
Tabelle 3.15: Konzentration des Hämoglobins mg/dl im Plasma (Mittelwert ± Standardfehler)

3.6 PMN-Elastase

Die Aktivierung von polymorphkernigen (PMN) Granulozyten bewirkt eine Freisetzung von Elastase aus deren Granula. Der Normbereich liegt bei $22 \pm 10 \mu\text{g/l}$.

In der Gruppe 1 der unbeschichteten Oxygenatoren war ein Konzentrationsanstieg von $61,13 \pm 14,98 \text{ ng/ml}$ auf $305,67 \pm 37,08 \text{ ng/ml}$ nach 90 Minuten Blutzirkulation zu verzeichnen. Der Anstieg in der heparinbeschichteten Gruppe war wesentlich geringer, und der Mittelwert lag am Ende der Blutzirkulation bei $140,41 \pm 17,28 \text{ ng/ml}$. Bereits nach 20 Minuten bestand ein statistisch signifikanter Unterschied ($p < 0,05$), der nach 30 Minuten hoch signifikant ist ($< 0,01$). Auch bei der statistischen Auswertung innerhalb der Gruppe war nach 20 Minuten bei der unbeschichteten, bzw. nach 30 Minuten bei der heparinbeschichteten Gruppe der Unterschied im t-test hoch signifikant.

Die Mittelwerte der Gruppen 2 und 3 verzeichneten teilweise ebenfalls einen starken Konzentrationsanstieg bis auf $399,60 \pm 75,72 \text{ ng/ml}$ am Ende der Perfusionszeit. Die gemessenen Werte sind in den Tabellen 3.17 und 3.18 aufgelistet.



Zirkulationszeit	n	non-coated 1	CBAS 1	P
0 Minuten	9	61,13±14,98	56,91±7,01	0,813
1 Minuten	9	59,54±18,80	54,49±4,09	0,808
5 Minuten	9	68,44±22,24	50,13±4,77	0,459
10 Minuten	9	97,24±19,87	54,20±5,30	0,066
20 Minuten	9	152,28±21,00	65,42±4,66	0,002
30 Minuten	9	198,30±22,95	89,03±6,95	0,001
60 Minuten	9	240,18±28,28	119,09±13,12	0,002
90 Minuten	9	305,67±37,08	140,41±17,28	0,002

Tabelle 3.16: Konzentration des PMN-Elastase- α_1 -Proteinase Inhibitor-Komplexes ng/ml (Mittelwert \pm Standardfehler, p-Werte)

Zirkulationszeit	n	ZX-Heparin 2	ZX-coated 2	Control 2
0 Minuten	3	76,76±24,14	61,73±8,24	51,73±5,85
1 Minuten	3	62,57±22,10	44,32±12,69	50,29±4,93
5 Minuten	3	81,40±18,87	52,32±11,53	57,90±6,04
10 Minuten	3	95,92±23,33	96,31±26,18	82,19±6,37
20 Minuten	3	142,90±44,52	166,77±27,64	114,49±13,67
30 Minuten	3	193,03±47,20	231,22±51,07	163,66±19,98
60 Minuten	3	278,28±47,81	271,44±46,69	218,29±31,76
90 Minuten	3	324,97±63,86	303,64±62,44	234,90±29,45

Tabelle 3.17: Konzentration des PMN-Elastase- α_1 -Proteinase Inhibitor-Komplexes ng/ml (Mittelwert \pm Standardfehler)

Zirkulationszeit	n	ZX-Heparin 3	ZX-coated 3	Control 3
0 Minuten	3	44,88±6,71	43,30±14,06	77,96±15,10
1 Minuten	3	30,42±1,07	34,04±8,55	58,87±7,57
5 Minuten	3	42,01±6,91	34,79±15,85	61,60±10,93
10 Minuten	3	43,80±4,31	37,94±3,88	80,10±15,53
20 Minuten	3	69,92±1,50	37,51±4,38	233,38±52,54
30 Minuten	3	64,21±12,58	46,47±11,12	348,36±54,89
60 Minuten	3	93,20±24,86	86,29±12,42	394,62±95,16
90 Minuten	3	118,40±38,77	81,52±3,65	399,60±75,72

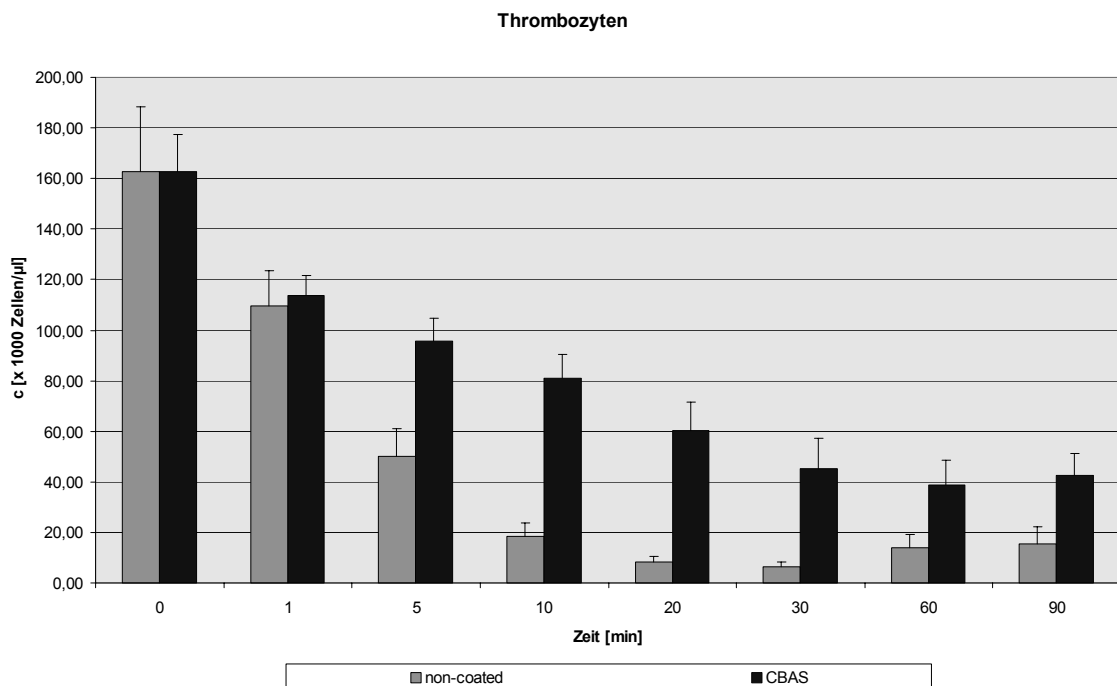
Tabelle 3.18: Konzentration des PMN-Elastase- α_1 -Proteinase Inhibitor-Komplexes ng/ml (Mittelwert \pm Standardfehler)

3.7 Thrombozyten

Bei den unbeschichteten Oxygenatoren der Gruppe 1 hatte die Anfangskonzentration im Mittel $162,67 \pm 25,69 \times 10^3/\mu\text{l}$ betragen und fiel auf $6,40 \pm 2,01 \times 10^3/\mu\text{l}$ nach 30 Minuten. Im weiteren Verlauf stieg die Konzentration wieder auf $15,63 \pm 6,62 \times 10^3/\mu\text{l}$ an. Der Verlauf der Oxygenatoren mit CBASTM-Beschichtung zeigte einen deutlich geringeren maximalen Abfall auf $38,69 \pm 9,81 \times 10^3/\mu\text{l}$ nach 60 Minuten Zirkulation und eine Konzentration von $42,48 \pm 8,78 \times 10^3/\mu\text{l}$ nach 90 Minuten.

Der starke Abfall der Thrombozyten bei den unbeschichteten Oxygenatoren war bereits nach 5 Minuten statistisch signifikant und während der Zirkulation von 5 bis 30 Minuten hoch signifikant. Die Auswertung innerhalb der Gruppe ergab bei den unbeschichteten Oxygenatoren nach 5 Minuten, bei den beschichteten Oxygenatoren bereits nach einer Minute einen statistisch signifikanten Unterschied.

Bei den Untersuchungen der Gruppe 2 und 3 lagen die tiefsten Konzentrationen nach 30 Minuten bei $2,09 \pm 1,13 \times 10^3/\mu\text{l}$ und nach 90 Minuten bei $5,21 \pm 2,25 \times 10^3/\mu\text{l}$. Der Verlauf der ZX-Beschichtung der Gruppe 3 zeigte im Vergleich den geringsten Konzentrationsabfall auf $70,47 \pm 24,71 \times 10^3/\mu\text{l}$, allerdings mit grosser Streubreite.



Zirkulationszeit	n	non-coated 1	CBAS 1	p
0 Minuten	9	162,67±25,69	162,87±14,52	0,995
1 Minuten	9	109,70±13,89	113,92±7,78	0,806
5 Minuten	9	50,09±10,83	95,51±9,34	0,009
10 Minuten	9	18,46±5,38	80,80±9,74	0,000
20 Minuten	9	8,19±2,24	60,10±11,56	0,003
30 Minuten	9	6,40±2,01	45,14±11,95	0,008
60 Minuten	9	14,06±5,08	38,69±9,81	0,052
90 Minuten	9	15,63±6,62	42,48±8,78	0,040

Tabelle 3.19: Anzahl der Thrombozyten x 10³/μl (Mittelwert ± Standardfehler, p-Werte)

Zirkulationszeit	n	ZX-Heparin 2	ZX-coated 2	Control 2
0 Minuten	3	169,00±23,21	146,33±23,20	167,33±18,28
1 Minuten	3	84,16±8,55	51,46±8,66	80,29±21,61
5 Minuten	3	43,39±6,16	15,78±5,34	41,70±14,55
10 Minuten	3	18,82±4,62	6,31±1,96	10,94±4,10
20 Minuten	3	4,18±0,43	4,72±1,96	2,61±1,54
30 Minuten	3	2,09±1,13	3,66±2,99	0,00±0,00
60 Minuten	3	9,93±4,26	10,99±7,14	2,08±1,13
90 Minuten	3	18,28±7,58	18,37±8,65	5,21±2,25

Tabelle 3.20: Anzahl der Thrombozyten x 10³/μl (Mittelwert ± Standardfehler)

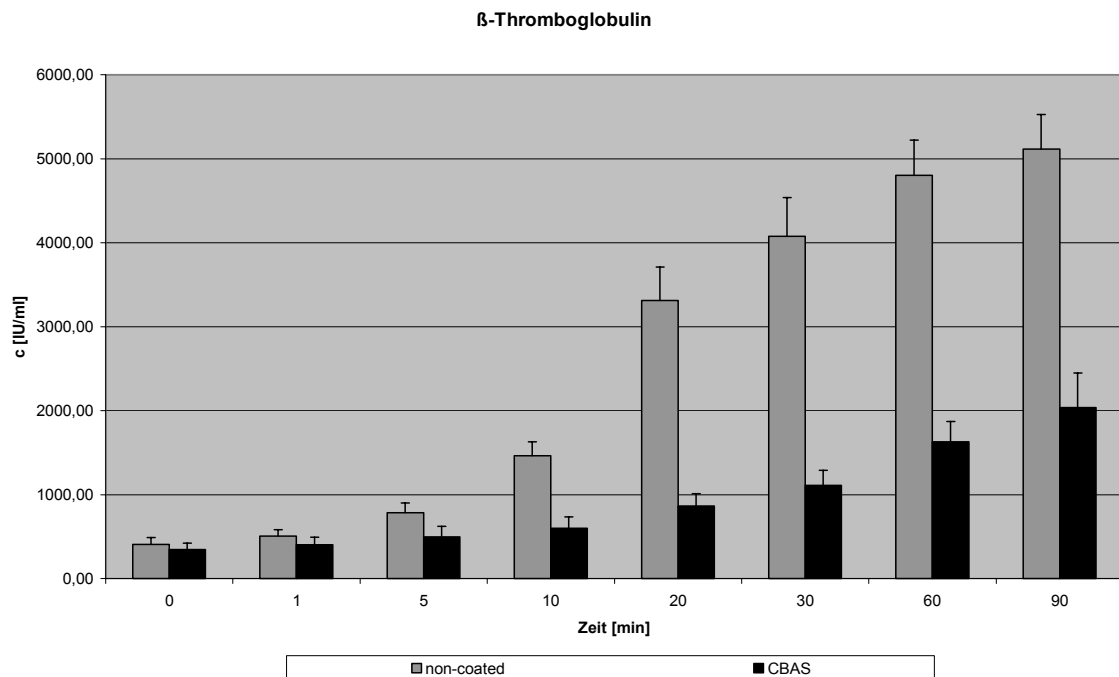
Zirkulationszeit	n	ZX-Heparin 3	ZX-coated 3	Control 3
0 Minuten	3	204,67±7,46	185,67±27,22	175,67±11,80
1 Minuten	3	153,97±10,34	146,35±8,62	117,96±3,31
5 Minuten	3	105,05±28,74	120,20±16,88	50,00±11,09
10 Minuten	3	72,52±30,56	99,40±28,66	15,17±5,06
20 Minuten	3	41,19±22,66	69,94±26,74	7,32±4,08
30 Minuten	3	19,59±8,01	52,78±25,19	6,25±2,68
60 Minuten	3	22,05±10,27	46,85±22,78	5,72±2,60
90 Minuten	3	43,39±15,36	70,47±24,71	6,74±1,08

Tabelle 3.21: Anzahl der Thrombozyten x 10³/μl (Mittelwert ± Standardfehler)

3.8 β -Thromboglobulin

Die Aktivierung der Thrombozyten erfolgt unter anderem durch die Freisetzung von β -Thromboglobulin. Die Oxygenatoren der Gruppe 1 ohne Beschichtung zeigten einen steileren Anstieg bei der Freisetzung von β -Thromboglobulin als die beschichteten Oxygenatoren. Der Anstieg in der unbeschichteten Gruppe ging von $405,08 \pm 84,25$ IU/ml auf $5114,66 \pm 412,61$ IU/ml. Die Oxygenatoren mit CBASTM-Beschichtung stiegen von einer Anfangskonzentration von $343,45 \pm 77,31$ IU/ml auf weniger als die Hälfte im Vergleich zur unbeschichteten Kontrollgruppe an. Nach einer Zirkulationszeit von 10 Minuten waren diese Werte statistisch hoch signifikant. Innerhalb der Gruppe war eine Signifikanz bei den beschichteten Oxygenatoren nach 20 Minuten, bei den unbeschichteten Oxygenatoren schon nach 5 Minuten nachweisbar.

Bei den Vorversuchen der Gruppe 2 und 3 stellte sich die ZX-Beschichtung der Gruppe 3 mit einer Maximalkonzentration von $3269,17 \pm 702,58$ IU/ml nach Zirkulationsende am günstigsten dar. Der höchste Anstieg war bei der ZX-Beschichtung der Gruppe 2 zu verzeichnen.



Zirkulationszeit	n	non-coated1	CBAS 1	p
0 Minuten	9	405,08±84,25	343,45±77,31	0,618
1 Minuten	9	505,86±78,03	404,30±89,78	0,433
5 Minuten	9	783,51±116,17	497,66±123,85	0,132
10 Minuten	9	1461,02±169,71	600,44±133,01	0,002
20 Minuten	9	3312,24±396,91	863,6±148,27	0,000
30 Minuten	9	4075,18±462,23	1111,34±178,15	0,000
60 Minuten	9	4802,68±417,66	1629,13±241,84	0,000
90 Minuten	9	5114,66±412,61	2036,80±410,19	0,000

Tabelle 3.22: Konzentration des freigesetzten β -Thromboglobulin IU/ml (Mittelwert \pm Standardfehler, p-Werte)

Zirkulationszeit	n	ZX-Heparin 2	ZX-coated 2	Control 2
0 Minuten	3	198,86±58,48	522,03±107,29	251,91±46,13
1 Minuten	3	397,72±45,65	1069,68±290,11	542,80±117,69
5 Minuten	3	754,45±120,70	2587,17±977,30	976,69±108,29
10 Minuten	3	1427,97±52,61	3741,08±1313,28	1610,06±139,42
20 Minuten	3	3906,39±93,02	5281,79±1365,77	4036,16±417,05
30 Minuten	3	4700,28±257,17	6010,53±1436,93	4979,53±580,08
60 Minuten	3	5334,81±430,50	6769,51±1340,51	5314,29±658,23
90 Minuten	3	5358,04±360,47	6596,16±1196,74	5741,46±619,39

Tabelle 3.23: Konzentration des freigesetzten β -Thromboglobulin IU/ml (Mittelwert \pm Standardfehler)

Zirkulationszeit	n	ZX-Heparin 3	ZX-coated 3	Control 3
0 Minuten	3	437,48±50,30	213,53±20,72	393,97±103,22
1 Minuten	3	437,91±60,83	233,80±16,39	485,69±154,77
5 Minuten	3	544,15±44,85	276,69±27,25	753,80±127,77
10 Minuten	3	1133,10±392,93	502,80±113,68	1629,22±129,89
20 Minuten	3	2389,24±821,55	1144,48±313,17	3813,97±210,53
30 Minuten	3	2751,74±756,69	1570,97±313,15	4581,43±226,41
60 Minuten	3	4598,12±227,53	3002,72±688,11	4950,21±112,52
90 Minuten	3	4938,03±204,53	3269,17±702,58	5234,47±21,43

Tabelle 3.24: Konzentration des freigesetzten β -Thromboglobulin IU/ml (Mittelwert \pm Standardfehler)

4. Diskussion

Beim Einsatz der Herz-Lungen-Maschine fließt Blut durch das oberflächenbeschichtete Schlauchsystem. Trotz weitreichender Fortschritte auf dem Gebiet der Biokompatibilität innerhalb der letzten Jahre kommt es durch den ausgiebigen Kontakt des Blutes mit der Fremdoberfläche zu postoperativen Komplikationen, die neben der Kontaktphasenaktivierung und der Aktivierung der Blutgerinnungskaskade auch das Postperfusionsyndrom beinhalten.

Das Postperfusionssyndrom bezeichnet eine systemische Entzündungsreaktion und wird durch eine verstärkte Blutungsneigung, Lungen- und Nierendysfunktion, neurologische Veränderungen und Fieber ohne infektiöse Ursache charakterisiert (WESTABY 1987). Metabolische Veränderungen im Säure-Basen- und Elektrolythaushalt (STEPHAN et al. 1992) müssen ebenso wie die Hypothermie als Ursachen für die multiple Organdysfunktionen in Betracht gezogen werden. Desweiteren kann die Produktion von Zytokinen und Endotoxin zu einer Organschädigung führen (SONG WAN et al. 1997). Die Blutungsneigung wird sowohl durch die mechanische Schädigung der Thrombozyten, als auch durch die Hämodilution beim Einsatz der HLM initiiert; die verminderte Inhibition der Fibrinolyse ist ebenfalls ein wichtiger Grund für die verlängerte Blutungszeit.

Die Suche nach einem dem physiologischen Gefäßendothel möglichst perfekt gleichenden Oberflächenersatzmaterial ist Gegenstand vieler experimenteller und klinischer Studien; die Entwicklung und der Einsatz neuer Oberflächenbeschichtungen soll auftretende Operationsrisiken weiter vermindern.

4.1 Heparin

Die Voraussetzung zur Reduzierung der postoperativen Komplikationen ist eine Verbesserung der Biokompatibilität der eingesetzten Materialien. Die derzeit stabilste und auch im Langzeiteinsatz wirksamste Heparinbeschichtungsmethode wurde 1983

von LARM et al. entwickelt. Hierbei bindet das Heparinmolekül durch End-Punkt-Befestigung kovalent an die Oberfläche, ohne die aktiven Sequenzen zu beeinträchtigen.

Die exakten Wechselwirkungen, die sich beim Kontakt von Blut mit heparinbeschichteten Oberflächen abspielen sind bisher nicht endgültig geklärt. Man kann allerdings davon ausgehen, dass die Vorteile der Heparinbeschichtung in der geringeren und selektiveren Adhäsion von Plasmaproteinen liegen. Diese sind in der Lage eine hämophile Sekundärmembran auf der Fremdoberfläche zu bilden und können so die weitere Denaturierung und Aktivierung der adhärennten Proteine verhindern (WENDEL und ZIEMER 1999). Die Adhäsion von Plasmaproteinen wie Faktor XIIa, Fibrinogen, Vitronektin, etc. an Oberflächen ist ein wesentliches Kriterium für deren Thrombogenität (ANDRADE 1992, BRASH et al. 1988, CORNELIUS und BRASH 1993, VROMAN 1988). Die Hypothese, dass die reduzierte Thrombogenität der heparinbeschichteten Oberflächen allein durch die katalytische Wirkung auf Antithrombin III und verstärkte Thrombinkomplexierung zustande kommt, kann nicht mehr aufrecht erhalten werden.

Als direkte Wirkung des Heparins auf das Gerinnungssystem ist die Aktivierung des Kallikrein-Kinin-Systems zu nennen, dem eine zentrale Bedeutung bei der intrinsischen Gerinnung, der Fibrinolyse und der Komplementaktivierung zukommt (KONSGAARD et al. 1991). Ausserdem verstärkt Heparin die Thrombozytenaggregation und Freisetzung von Plättchenfaktor 4 und kann eine Thrombozytopenie induzieren.

Die Effekte auf das fibrinolytische System beruhen auf einer Freisetzung von t-PA aus Endothelzellen, welches wiederum über die Aktivierung von Plasminogen thrombolytisch wirkt.

Durch eine adäquate Heparinisierung lässt sich die Kontaktphasenaktivierung trotzdem nicht völlig vermeiden, aber die nachfolgenden Kaskadenreaktionen können zumindest minimiert werden.

Die Heparinkonzentration der CBASTM-beschichteten Gruppe 1 fiel von initial $4,37 \pm 0,34$ IU/ml auf $4,26 \pm 0,29$ IU/ml weniger stark ab als die nicht beschichtete Kontrollgruppe, die von $4,83 \pm 0,19$ IU/ml auf $4,20 \pm 0,14$ IU/ml absank. Dies bestätigt die qualitativ hochwertige Beschichtung mit CBASTM. Der etwas stärkere Abfall der nicht beschichteten Kontrollgruppe resultiert vermutlich auf der Inaktivierung des

Heparins durch den aus aktivierten Thrombozyten stammenden Plättchenfaktor 4. Mit steigendem Molekulargewicht des Heparins nimmt die Affinität des Plättchenfaktor 4 zu, der mit AT III um die Bindungsstellen des Heparins konkurriert (COWAN et al. 1986). Diese Vermutung würde bei einer Konzentrationsbestimmung von Plättchenfaktor 4 durch einen Anstieg während der Zirkulationszeit bewiesen. Auf die Konzentration von Antithrombin III soll später noch genauer eingegangen werden.

4.2 Prothrombinfragment F 1+2

Bei der Aktivierung von Prothrombin zu Thrombin mittels Prothrombinase-Komplex, der aus Faktor Xa, Faktor Va, Phospholipide und Ca^{2+} besteht, wird Prothrombinfragment F 1+2 abgespalten. Prothrombinfragment F 1+2 dient zum Erkennen von hypo- und hyperkoagulablen Zuständen und kann auch zur Verlaufskontrolle einer Antikoagulantientherapie mit Cumarinderivaten eingesetzt werden. Prothrombinfragment F 1+2 gilt neben dem Thrombin-Antithrombin III-Komplex als indirektes Mass der Thrombinbildung und wird auch als Aktivierungsmarker bezeichnet.

Während der 90 minütigen Zirkulation kam es insbesondere nach 60 und 90 Minuten zu einem Konzentrationsanstieg von Prothrombinfragment F 1+2. Innerhalb der CBASTM beschichteten Gruppe war das Maximum nach 90 Minuten von $0,64 \pm 0,05$ nmol/l gegenüber der Kontrollgruppe mit $0,73 \pm 0,08$ nmol/l allerdings deutlich geringer. Es besteht zwar kein statistisch signifikanter Unterschied, aber auch Untersuchungen von BAKSAAS et al. (1999) und OVRUM et al. (1996) weisen auf einen Anstieg sowohl bei extrakorporaler Zirkulation, als auch während koronarer Bypassoperationen hin.

Die erhöhte Konzentration von Prothrombinfragment F 1+2 verdeutlicht, dass mit zunehmender Zirkulationszeit eine Verschiebung im hämostatischen Gleichgewicht zu Gunsten einer gesteigerten Fibrinbildung oder Plättchenaggregation ausgelöst werden kann. Dies bietet auch eine Erklärung, weshalb die Konzentration der nicht beschichteten Systeme über der von CBASTM-beschichteten liegt. Das Risiko für thromboembolische Komplikationen steigt demnach mit zunehmender Perfusionsdauer

an (WAGNER und DATI 1998), kann aber mit Ermittlung der Konzentration von Prothrombinfragment F 1+2 und auch der TAT-Konzentration bereits frühzeitig erkannt werden, was die Prognose für Risikopatienten bei Zuführung einer frühzeitigen Therapie weiter verbessert (WADA et al. 1995, WADA et al. 1996).

4.3 Thrombin-Antithrombin III-Komplex (TAT)

Als wichtigster Inhibitor der Blutgerinnung ist das alpha-Glykoprotein Antithrombin III zu nennen, das mit Heparin einen Komplex bildet. Durch die Komplexbildung steigert sich die Geschwindigkeit der Gerinnungsinhibition enorm und die Serinproteasen der Gerinnungskaskade (insbesondere Thrombin und Faktor Xa) werden konzentrationsabhängig gehemmt.

Durch die Bindung von Heparin mit Thrombin und Antithrombin III kommt es zu einer Annäherung der Reaktionspartner, die schliesslich eine kovalente Bindung miteinander eingehen. Die nachfolgende Konformationsänderung im AT III-Molekül entlässt das Heparin wieder aus der Bindung, und es steht erneut als Katalysator zur Verfügung. Eine effektive Antikoagulation mittels Heparin korreliert demzufolge mit dem Antithrombin III-Spiegel. Eine hohe Heparindosis zeigt keine oder eine zu geringe Wirkung, wenn die Antithrombin III-Aktivität für eine ausreichende Inhibierung zu niedrig ist. Bereits eine Verminderung der AT III-Aktivität unter 70-80% der Norm führt zu einem deutlichen Verlust der Schutzwirkung gegenüber einer pathologischen Gerinnungsaktivierung (HELLER et al. 1985).

Bei der Versuchsdurchführung stieg die TAT-Konzentration insbesondere nach 60 und 90 Minuten Perfusionszeit an. Der Anstieg bei der CBASTM-beschichteten Gruppe fiel jedoch signifikant geringer aus ($p=0,025$ bei 60 Minuten und $p= 0,036$ nach 90 Minuten). Auch bei den Gruppen 2 und 3 war ein im Mittel deutlicher Anstieg ab einer Stunde nach Zirkulationsbeginn nachweisbar.

Die Zunahme der TAT-Komplexe deutet auf den Ablauf der Gerinnungsaktivierung mit gesteigerter Thrombinbildung hin und wurde bereits mehrfach beschrieben (GULSA et al. 1982, OVRUM et al. 1996). Die Aktivierung bei der unbeschichteten Gruppe ist allerdings mehr als doppelt so hoch und belegt, dass bei der unbeschichteten Gruppe eine stärkere Gegenregulation stattfinden muss, um die Thrombinbildung zu inhibieren. Die im Hinblick auf die Gerinnungsaktivierung besseren Oberflächeneigenschaften der CBASTM-beschichteten Gruppe erklären den wesentlich geringeren Anstieg der TAT-Komplexe und beweisen deren Vorteile.

Die hohe Konzentration von Thrombin-Antithrombin III-Komplex gibt aber nicht nur Rückschlüsse auf die Generierung von Thrombin, sondern belegt auch die Fähigkeit von Heparin die Komplexbildung zu induzieren.

4.4 Fibrinopeptid A

Am Ende der Gerinnungskaskade werden unter der Einwirkung von Thrombin die Fibrinopeptide A und B von Fibrinogen abgespalten. Das entstehende Fibrin bildet unter aktiviertem Faktor XIII ein unlösliches Netzwerk aus, in das sich Thrombozyten einlagern (WEISS und JELKMANN 1997).

Die Konzentrationszunahme von Fibrinopeptid A entsprach dem Ausmass der Aktivierung der plasmatischen Gerinnung. Ein Anstieg von Fibrinopeptid A bedeutet, dass vermehrt Fibrin gebildet wird (BAUER 1996, WATERS und LAM 1989). Die Entstehung von Fibrinopeptid A durch Spaltung der Arginyl-Glycin-Bindung ist spezifisch für Thrombin und kann nicht von anderen Proteasen übernommen werden.

Während der Versuchsdauer kam es bei allen Gruppen zu einem Anstieg der Konzentration von Fibrinopeptid A, insbesondere nach 60 bzw. 90 Minuten. Bei der Gruppe 1 konnte bei den CBASTM-beschichteten Oxygenatoren ein Anstieg auf maximal $4,96 \pm 0,96$ ng/ml nachgewiesen werden. Hingegen verzeichnete die Kontrolle der Gruppe 1 bei fast identischen Ausgangswerten von 2,4 ng/ml einen Anstieg bis auf $7,10 \pm 0,86$ ng/ml. Bei der statistischen Auswertung waren keine signifikanten

Unterschiede feststellbar. Der Konzentrationsanstieg für Fibrinopeptid A bei den Beschichtungen der Gruppen 2 lag im Bereich derer von Gruppe 1, wobei hier die ZX-Heparin Beschichtung einen geringeren Endwert erreichte als die CBASTM-Beschichtung. In der Gruppe 3 wurde bei der ZX-Heparin Beschichtung nur ein Oxygenator ausgewertet, da die Ergebnisse innerhalb der Gruppe sehr hohe Konzentrationsanstiege bis 79,62 ng/ml zeigten.

Die Ergebnisse entsprachen hier den Erwartungen der Studie, weil die Konzentration für das Spaltprodukt Fibrinopeptid A im Verlauf der extrakorporalen Zirkulation deutlich anstieg. Es konnte auch gezeigt werden, dass die CBASTM-beschichtete Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe mit einer geringeren Gerinnungsaktivierung einherging. Dies belegt die Vorteile gegenüber den unbeschichteten Oxygenatoren. Der nicht signifikante Anstieg von Fibrinopeptid A kann durch die Thrombinbindung im TAT-Komplex erklärt werden, der wie bereits beschrieben ab der 60. Minute signifikant anstieg. Das im TAT-Komplex gebundene Thrombin steht nicht mehr für die Abspaltung von Fibrinopeptid A aus Fibrinogen zur Verfügung und vermindert demzufolge einen Konzentrationsanstieg von Fibrinopeptid A.

4.5 Hämolyse

Bei der extrakorporalen Zirkulation ist das zirkulierende Blut einer höheren mechanischen Belastung ausgesetzt als im Körperkreislauf. Durch Traumatisierung insbesondere der Rollerpumpe, Scherkräfte, Turbulenzen, geringe Strömungsgeschwindigkeiten bis hin zum Sistieren des Blutflusses und dem Kontakt mit der Fremdoberfläche kommt es zur Freisetzung von Hämoglobin aus den destruierten Erythrozyten. Dieser als Hämolyse bezeichnete Vorgang betrifft aber nicht nur Erythrozyten, sondern grundsätzlich alle zirkulierenden Blutzellen (WESTABY 1983). Es fiel auf, dass es initial zu einem Abfall der Hämolysewerte um bis zu 15% bei der CBASTM-beschichteten Gruppe 1 kam. Bei der Kontrollgruppe und auch bei den Gruppen 2 und 3 war ebenfalls ein teilweise noch stärkeres Absinken zu verzeichnen. Die Werte von der ZX-Heparin beschichteten Gruppe 2 gingen sogar von $32,57 \pm 12,67$ mg/dl auf $17,94 \pm 4,13$ mg/dl zurück.

Als Grund für den initialen Abfall der Hämolysewerte ist die Hämodilution anzuführen, die durch die Volumenzunahme bedingt ist. Trotzdem kann der Verdünnungseffekt den teils stark variierenden Abfall alleine nicht erklären, da die Versuchsansätze immer identisch waren. Möglicherweise begründen die unterschiedlichen Ausgangswerte der Abnahme 1 ein ungleichmässiges Durchmischen der Blutkonserve oder eine falsche bzw. zu lange Lagerung. Vor allem bei den geringen Stichproben der Gruppe 2 und 3 wird dies bemerkbar. Die Hämodilution bringt aber auch die Vorteile der Viskositätsverminderung und einer Verbesserung der Mikrozirkulation mit sich. Ein weiterer positiver Aspekt ist die durch das Primevolumen gewährleistete Isotonie und Bereitstellung von Glucose als Energielieferant für die Erythrozyten.

Im Verlauf der Rezirkulation stieg die Konzentration an freiem Hämoglobin bei der CBASTM-beschichteten Gruppe 1 leicht an, blieb aber unter dem Ausgangswert. Die unbeschichtete Kontrolle der Gruppe 1 stieg von $24,45 \pm 3,95$ mg/dl auf $27,63 \pm 6,8$ mg/dl an, fiel aber auch initial ab. Während der gesamten Versuchsdauer bestand bei den ermittelten Konzentrationsunterschieden kein statistisch signifikanter Unterschied. Ein höherer Anstieg bei unbeschichteten Systemen wurde auch von BOROWIEC et al. (1992) bereits beschrieben.

Die Materialeigenschaften für die CBASTM-Beschichtung sind auch hier den unbeschichteten Oxygenatoren überlegen und haben eine bessere Biokompatibilität.

4.6 PMN-Elastase

Elastase ist ein proteolytisches Enzym, das insbesondere in polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN), Makrophagen und Endothelzellen vorkommt. Von diagnostischer Bedeutung in der vorliegenden Studie ist vor allem das in den polymorphkernigen Granulozyten vorkommende Enzym.

Sowohl durch unterschiedliche Reize wie Infektionen, Gewebsirritationen und Entzündungsreaktionen als auch durch mechanische Schädigungen der PMN kommt es zur Freisetzung von Elastase. Zudem stimuliert das bei der Kontaktphasenaktivierung entstehende Kallikrein neutrophile Granulozyten zu chemotaktischer Aktivität (WENDEL et al. 1999). Die Elastase kann die Komplementfaktoren C3 und C5 spalten,

und es entstehen C3a und C5a, welche chemotaktisch und aktivierend auf neutrophile Granulozyten wirken. Als weitere Reaktion des Komplementsystems wird die Permeabilität des Gefäßendothels erhöht, und vasoaktive Substanzen wie Histamin werden freigesetzt.

Zusätzlich akkumulieren die neutrophilen Granulozyten an den entstehenden Thromben und phagozytieren eingewandertes Fibrin. Dies gelingt nicht und führt zu einer weiteren Freisetzung von Elastase. Elastase ist in der Lage Gerinnungsfaktoren wie Fibrinogen und auch Inhibitoren der Blutgerinnung, als Beispiel sei hier Antithrombin III genannt, zu spalten (PLOW 1982).

Die Komplikationen im Zusammenhang mit erhöhten Elastasekonzentrationen sind insbesondere in der Zerstörung von elastischem Gewebe, wie Elastinabbau der Lungen- und Arterienwände oder im Angriff von elastischem Knorpel zu sehen. Ebenso ist Elastase auch beim ARDS (adult respiratory distress syndrome) und bei der Pneumonie von Bedeutung (HERRERA et al. 1989).

Die Konzentrationszunahme der PMN-Elastase zeigte bei der CBASTM-beschichteten Gruppe 1 einen Anstieg von $56,91 \pm 7,01$ ng/ml auf $140,41 \pm 17,28$ ng/ml. Bei fast identischen Ausgangswerten der unbeschichteten Kontrollgruppe stieg die Konzentration hier bis auf $305,67 \pm 37,08$ ng/ml an. Bereits nach 20 Minuten bestand ein hoch signifikanter statistischer Unterschied, der kontinuierlich nachweisbar ist.

Der geringste Anstieg innerhalb der Gruppe 2 und 3 war bei der ZX-Beschichtung der Gruppe 3 zu verzeichnen. Die Konzentration bei Zirkulationsende betrug hier nur $81,52 \pm 3,65$ ng/ml. Diese hier günstig erscheinende Beschichtung zeigte aber bei der TAT-Komplexbildung und der Abspaltung von Fibrinopeptid A eine überdurchschnittliche Gerinnungsaktivierung. Im Zusammenhang mit den anderen Parametern ist davon auszugehen, dass die CBASTM-Beschichtung im Hinblick auf die Forderungen einer möglichst idealen Biokompatibilität die besten Eigenschaften hat.

Der konstante Anstieg der PMN-Elastase ab der 5. Minute war innerhalb aller Versuchsreihen ersichtlich und lässt auf einen kontinuierlichen Leukozytenabbau schliessen. Dieser kann beispielsweise durch die bereits diskutierte mechanische Schädigung stattfinden. Ein weiterer Grund für die erhöhte Freisetzung von Elastase ist in der Komplementaktivierung innerhalb des Schlauchlumens zu sehen. Hier stellt der

Komplementfaktor C5a den wichtigsten Aktivator dar (HELLER et al. 1985, WESTABY 1983).

Welche der genannten Ursachen als hauptverantwortlich für den Anstieg der Elastase angesehen werden kann, ist nicht eindeutig zu klären. Insbesondere der Einfluss des Komplementsystems müsste noch weiter untersucht werden.

4.7 Thrombozyten

Der Grund für die immer wieder auftretende Blutungsneigung nach extrakorporaler Zirkulation wird zum einen in der Thrombozytopenie und zum anderen in der Veränderung der Thrombozytenfunktion gesehen (BAGGE et al. 1986, EDMUNDS et al. 1982, HOLLOWAY et al. 1988).

Während der Perfusionszeit sanken auch in dieser Studie die Thrombozytenzahlen deutlich ab und waren in der unbeschichteten Gruppe 1 von $162,67 \pm 25,69 \times 10^3/\mu\text{l}$ auf $15,63 \pm 6,62 \times 10^3/\mu\text{l}$ ab der Abnahme 3 hoch signifikant. Die Anzahl der Thrombozyten in der CBASTM-beschichteten Gruppe 1 ging von der gleichen Ausgangskonzentration auf nur $42,48 \pm 8,78 \times 10^3/\mu\text{l}$ zurück. Bei der Gruppe 2 und 3 zeigten die beschichteten Gruppen im Vergleich zu den Kontrollgruppen ebenfalls einen besseren Verlauf im Hinblick auf den Rückgang der Plättchen.

Am Beginn der Zirkulation war der Thrombozytenabfall besonders ausgeprägt. Dieser entsteht durch eine Sofortreaktion im Sinne einer Adhäsion der Thrombozyten an der Fremdoberfläche. Nachdem diese als fremd abgegrenzt ist, pendelt sich ein Gleichgewicht zwischen Thrombozytenaggregation und Thrombenauflösung ein. Die Messung der Plättchenanzahl beinhaltet allerdings nicht den Grad der Plättchendestruktion, sondern spiegelt die aktuell im Blut zirkulierende Menge wider. Die Vorteile der CBASTM-beschichteten Gruppe 1 sind hier klar zu erkennen.

Die verstärkte Aggregation der Plättchen ist nicht ausschliesslich durch den Kontakt mit fremden Oberflächen erklärbar, sondern begründet sich auch durch die Freisetzung von ADP, Serotonin und Thrombin (HYNES 1991). ADP und Serotonin werden bei der

Thrombozytenadhäsion und aus dem Erythrozytenabbau freigesetzt. Thrombin entsteht wie bereits erwähnt bei der Aktivierung des intrinsischen Gerinnungssystems.

Auch die Hämodilution erklärt den initial sehr starken Rückgang der Thrombozytenzahl und im weiteren Verlauf sah man bei der Gruppe 1 einen kontinuierlichen Abfall, der auch mit der mechanischen Traumatisierung der korpuskulären Zellen begründet werden kann (WESTABY 1983).

Der Rückgang der Thrombozytenzahl ist aber auch im Zusammenhang mit der Veränderung der Thrombozytenfunktion nach Operationen mit der Herz-Lungen-Maschine zu sehen. Die Reduktion der Fibrinogenrezeptoren ist für die Interaktion der Thrombozyten untereinander und die daraus folgende Plättchendysfunktion von essentieller Bedeutung (WACHTFOGEL et al. 1989, WENGER et al. 1989). Ausserdem ist anzumerken, dass sowohl die erzeugte Hypothermie als auch Heparin aggregationsfördernd wirken können.

Hingegen kann der Einsatz plättchenschützender Substanzen, wie Prostaglandin 2 oder Prostacyclin, die Funktionsänderung und die Abnahme der Thrombozyten positiv beeinflussen (BAGGE et al. 1986, EDMUNDS et al. 1982).

4.8 β -Thromboglobulin

Die Aktivierung der Thrombozyten erfolgt in vier Schritten. Nach dem Kontakt mit Fremdoberflächen kommt es zu einer Formänderung mit Ausstülpung pseudopodienartiger Ausläufer, die in einem zweiten Schritt zu einer Adhäsion der Plättchen an die Oberfläche führt. Als nächstes erfolgt die Aggregation der Thrombozyten und nachfolgend die Freisetzung von Plättchenfaktoren, die in den Granula enthalten sind. Die Thrombozyten enthalten dichte Granula aus denen ATP, ADP, Ca^{2+} und Serotonin freigesetzt werden. Die alpha-Granula setzen neben β -Thromboglobulin beispielsweise auch Plättchenfaktor 4 und Fibrinogen frei (HOLMSEN 1994, NIEWIAROWSKI 1994).

Während der Zirkulation kam es in der Gruppe 1 zu einem hoch signifikanten Anstieg von β -Thromboglobulin. Die geringste Zunahme zeigte die CBASTM-beschichtete

Gruppe 1 mit einem Maximum bei $2036,80 \pm 410,19$ IU/ml nach 90 Minuten, was einem knapp 6-fachem Anstieg gleichkommt. Die Werte der Kontrollgruppe 1 lagen am Zirkulationsende um über 12-fach höher als die Ausgangswerte. Bei den Versuchen der Gruppe 2 und 3 war als Minimum ein 11-facher, als Maximum ein 26-facher Anstieg der β -Thromboglobulinwerte zu verzeichnen.

Zu einer Plättchenaktivierung kam es demzufolge in allen Versuchsansätzen. Hierfür ist die unphysiologische Fremdoberfläche bzw. die Endothelläsion bei in-vivo Studien als verantwortlich zu sehen. Ausserdem korreliert der Anstieg der β -Thromboglobulinkonzentration sehr gut mit dem Abfall der Plättchenanzahl. Die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse stehen im Einklang mit den Untersuchungen von OVRUM et al. (1996) und belegen eindeutig die bessere Hämokompatibilität der CBASTM-Beschichtung.

Abschliessend kann festgehalten werden, dass die in der Studie untersuchte CBASTM-Beschichtung gegenüber herkömmlichen unbeschichteten Oxygenatoren und Schlauchsystemen klare Vorteile aufweist.

Dies konnte durch den geringeren Thrombozytenabfall und die bessere Inaktivierung der Gerinnung gezeigt werden. Die Verwendung von Oxygenatoren mit CBASTM-Beschichtung lässt es im klinischen Einsatz zu, die Heparindosierung niedriger zu wählen, wie auch BOROWIEC et al. (1992) bereits nachgewiesen hat.

Ebenso können Komplikationen wie das Postperfusionssyndrom oder die gesteigerte postoperative Blutungsneigung durch den Einsatz heparinbeschichteter Perfusionssysteme günstig beeinflusst werden.

4.9 Zukunftsperspektiven

Die CBAS™-beschichtete Oberfläche bringt die Vorteile einer besseren Biokompatibilität im Vergleich zu unbeschichteten Oberflächen mit sich. Aber auch in Zukunft wird die Weiterentwicklung einer optimal biokompatiblen Oberfläche das Ziel vieler Versuchsansätze sein, die eine Aktivierung der Plasmaproteine und korpuskulären Blutbestandteile möglichst verhindern soll.

Eine zukunftssträchtige neue Heparinbeschichtung ist die von der Firma AOT in Zusammenarbeit mit H. Tschesche entwickelte AOThel-Beschichtung (Artifizielle Organ Technologie), deren Evaluation an der Universität Tübingen durchgeführt wurde. Es handelt sich um eine Beschichtung, die seit 1996 im klinischen Einsatz ist, bei der niedermolekulares Heparin kovalent gebunden ist und alle Komponenten des extrakorporalen Systems beschichtet werden können. Sowohl im Routineeinsatz als auch während extrakorporaler Membranoxygenation zeigen sich hervorragende hämodynamische Eigenschaften. Die Beschichtung kann als mindestens gleichwertig zu den bisher etablierten Oberflächenvergütungen angesehen werden.

Die Heparinbeschichtung von Corline® wurde von dem Unternehmen Corline Systems AB entwickelt und bindet ein makromolekulares Heparinkonjugat kovalent an Glas, Metall und Polymerkunststoffe. Diese Beschichtung befindet sich seit 1998 im klinischen Einsatz und bewirkt neben einer reduzierten Aktivierung des Komplement- und Gerinnungssystems eine minimale Anlagerung und Aktivierung von Thrombozyten und Granulozyten. Bei reproduzierbaren Studienergebnissen kommt es weder zu einer Freisetzung von oberflächengebundenem Heparin noch zu einer gesteigerten Hämolyse.

Bei einer von der Firma 3M entwickelten Heparinbeschichtung wird über wasserlösliches Polyethylenamin und mehrerer Zwischenschichten oxidiertes Heparin ebenfalls kovalent an Polymer- und Metalloberflächen gebunden. Die klinischen Ergebnisse dieser Beschichtung stehen noch aus.

Neue Methoden der Oberflächenbeschichtung sind AVECOR (TBPS®), Biocompatibles und COBE(SMAR_XT™):

Trillium Bio Passive Surface® (TBPS) beruht auf einer zweischichtigen Beschichtungstechnik, die über wasserlösliche Polymere Heparin kovalent bindet und die Kontaktphasenaktivierung zu einem frühen Zeitpunkt der Kaskadenreaktion inhibiert.

Bei der Oberflächenbeschichtung von Biocompatibles werden natürliche Phospholipide von biologischen Membranen verwendet, um schliesslich eine phosphorylcholinbeschichtete Fremdoberfläche herzustellen. Diese soll eine sehr gute Thromboresistenz mit minimaler Adhäsion von Plasmaproteinen und Thrombozyten mit sich bringen.

Bei der Beschichtung von SMAR_XT™ handelt es sich um ein oberflächenveränderndes Additiv (SMA = surface modifying additive), das beim Herstellungsprozess zugeführt wird und an die Oberfläche des Basismaterials wandert. Die ladungsneutrale Oberfläche bewirkt neben einer geringen Thrombozyten- und Leukozytenanlagerung eine reduzierte Kontaktphasen- und Komplementaktivierung (WENDEL et al. 1999).

Um eine abschliessende Aussage über Vor- und Nachteile der neueren Beschichtungen gegenüber der CBAS™-Beschichtung zu treffen sind aber noch Vergleichsstudien durchzuführen. Anzustreben bleibt die Entwicklung einer bioinerten Oberfläche, die auf den situationsbedingten Patientenstatus abgestimmt ist.

5. Zusammenfassung

Operationen am offenen Herzen mittels Einsatz der Herz-Lungen-Maschine (HLM) führen zu einem ausgiebigen Kontakt des gesamten Patientenblutes mit den verschiedenen Fremdoberflächen des extrakorporalen Systems. Diese Fremdoberflächen, etwa 3 m², induzieren eine gesteigerte Gerinnungs- und Thrombozytenaktivierung, zusätzlich werden Entzündungsmediatoren aktiviert. Seit mehreren Jahren versucht die Forschung verschiedene Oberflächenbeschichtungen zu entwickeln, um diese Aktivierungsmechanismen zu minimieren.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, die unterschiedlichen Effekte von Oxygenatoren mit kovalenter Heparinbeschichtung (CBASTM) im Vergleich zu unbeschichteten Oxygenatoren während der extrakorporalen Zirkulation zu untersuchen. Ausserdem wurden neuartige Silikonoberflächenbeschichtungen im Hinblick auf die Gerinnungs- und zelluläre Aktivierung untersucht.

Zu diesem Zweck wurden Oxygenatoren mit unterschiedlichen Oberflächeneigenschaften in einem in-vitro-Modell der Herz-Lungen-Maschine unter konstanten Bedingungen über jeweils 90 Minuten mit frischem Vollblut perfundiert. Das HLM-Modell bietet hier den Vorteil, dass die Art der Operation, die individuelle Reaktionslage des Patienten und der Operateur keinen Einfluss auf die Ergebnisse nehmen. Nach einem definierten Protokoll wurden Proben zur Bestimmung verschiedener Aktivierungsmarker der Gerinnung und Fibrinolyse abgenommen.

Eine Aktivierung des intrinsischen Gerinnungssystems an den biologisch nicht inerten Fremdoberflächen konnte sowohl bei den unbeschichteten als auch bei den heparinbeschichteten Oxygenatoren nachgewiesen werden. Die CBASTM-beschichtete Gruppe 1 bewirkte im Vergleich zur Kontrollgruppe jedoch einen geringeren Abfall der systemischen Heparinkonzentration. Durch die Bestimmung der Gerinnungsmarker während der Zirkulation mit der HLM konnte gezeigt werden, dass bei der Verwendung von CBASTM-beschichteten Oxygenatoren die Gerinnungsaktivierung vermindert war; besonders deutlich war dies durch den signifikanten Anstieg der Konzentration des

Thrombin-Antithrombin III-Komplexes in der Kontrollgruppe. Der positive Effekt der CBASTM-Gruppe auf die Aktivierung des intrinsischen Gerinnungssystems wurde durch eine geringere Generierung von Fibrinopeptid A bekräftigt.

Die deutlichsten Unterschiede konnten bei den Veränderungen im zellulären Bereich festgestellt werden. Zelluläre Aktivierungen führen u.a. zu einer Freisetzung von Elastase aus den Granula der polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten. Die Elastaseaktivität wird durch die Adhäsion von Granulozyten an Thromben weiter potenziert. Durch die Adhäsion der Thrombozyten an die Fremdoberfläche wird bei der Versuchsdurchführung ein kontinuierlicher Konzentrationsabfall verursacht. Über ein kanalikuläres System wird u.a. β -Thromboglobulin sezerniert, das die Prostazyklinsynthese der Endothelzellen hemmt. Als Folge wird die hemmende Wirkung auf die Thrombozytenaggregation ausgeschaltet; diese Tatsache konnte mit dem steilen Anstieg der β -Thrombo-globulinkonzentration in der Gruppe der unbeschichteten Oxygenatoren korreliert werden.

Die vorliegenden Ergebnisse erlauben den Schluss, dass es bei der Verwendung von CBASTM-beschichteten Oxygenatoren zu einer deutlich verringerten Gerinnungs- und Thrombozytenaktivierung kommt und damit eine geringere Komplikationsrate vermutet werden kann. Es bleibt aber weiterhin das Ziel, eine völlig bioinerte Oberfläche zu entwickeln, die dem situationsbedingten Patientenstatus gerecht wird.

6. Literaturverzeichnis

AOT Heparin Coating (2000)
AOTHEL-Beschichtung
Herzzentrum NRW, Bad Oeynhausen

ANDRADE, J.D.: (1992)
Needs, problems, and opportunities in biomaterials and biocompatibility
Clin Mater 11: 19-23

BACHMANN, F.: (1994)
Molecular aspects of plasminogen, plasminogen activators and plasmin.
In: Bloom, A.L.; Forbes, C.D.; Thomas, D.P.; Tuddenham, E.G.D.(Eds.):
Haemostasis and thrombosis, 3rd edition
Churchill Livingstone, Edinburgh, 575-613

BAGGE, I.; LILIENBERG, G.; NYSTRÖM, S.-O.; Tyden, H.: (1986)
Coagulation, fibrinolysis and bleeding after heart surgery
Scand J Thor Cardiovasc Surg 20: 151-160

BAKSAAS, S.T.; Videm, V.; Pedersen, T.; Karlsen, H.; Mollnes, T.E.; Brosstad, F.;
Svennevig, J.L.: (1999)
Comparison of three oxygenator-coated and one total-circuit-coated extracorporeal
devices
Perfusion 14: 119-127

BARTELLT, R.H.; Gazzaniga, A.B.: (1981)
Physiology and pathophysiology of extracorporeal circulation 1-43
In: Ionescu, M.I.(Ed.) Techniques in extracorporeal circulation.
Second Edition, Butterworths, London, Boston, Sydney, Wellington, Burbank, Toronto

BAUER, C.: (1996)
Blut: Ein flüssiges Organsystem
In: Klinke, R.; Silbernagl, S.: Lehrbuch der Physiologie 2.Aufl.
Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 185- 212

BOROWIEC, J.; Thelin, S.; Bagge, L.; Nilsson, L.; Hultman, J.; Hansson, H.E.: (1992)
Decreased blood loss after cardiopulmonary bypass using heparin-coated circuit and
50% reduction of heparin dose
Scand J Thor Cardiovasc Surg 26: 177-185

BOZDAYI, M.; Borowiec, J.; Nilsson, L.; Venge, P.; Thelin, S.; Hansson, H-E.: (1996)
Effects of heparin coating of cardiopulmonary bypass circuits on in vitro oxygen free radical production during coronary bypass surgery
Artif Organs 20: 1008-1016

BRASH, J.L.; Scott, C.F.; ten Hove, P.; Wojciechowski, P.W.; Colman, R.W.: (1988)
Mechanism of transient adsorption of fibrinogen from plasma to solid surfaces: Role of the contact and fibrinolytic systems
Blood 71: 932-939

BRUHN, H.D.: (1990)
Antithrombotische Therapie durch Heparin
Med Welt 41: 385-389

CLAESSON, G.; Aurell, L.; Karlsson, G.; Gustavsson, S.; Friberger, P.; Arielly, S.; Simonsson, R.: (1979)
Design of chromogenic peptide substrates.
In: SCULLY, M.F.; Kakkar, V.V.: Chromogenic peptide substrates: chemistry and clinical usage
Churchill Livingstone, Edinburgh, London, Melbourne, New York, 20-30

COLLEN, D.; Maeyer, L.: (1975)
Molecular biology of human plasminogen
In: Physicochemical properties and microheterogeneity
Thromb Diathes Haemorrh 34: 396-402

COLMANN R.W.; Hirsh, J.; Marder, V.J.; Salzman, E.W.: (1994)
Hemostasis and thrombosis: basic principles and clinical practice, 3rd ed.
Lippincott, Philadelphia, S. 3-18

CORLINE SYSTEMS AB (2000)
Corline Heparin Surface
JOMED, Uppsala, Schweden

CORNELIUS, R.M.; Brash, J.L.: (1993)
Identification of proteins absorbed to hemodialyser membranes from heparinized plasma
J Biomater Sci Polym Ed 4: 291-304

COWAN, S.W.; Bakshi, E.N.; Machin, K.J.; Isaacs, N.W.: (1986)
Binding of heparin to human platelet factor 4
Biochem J 234: 485-488

DAVIS, A.E.: (1989)
Structure and function of C1 inhibitor
Behring Inst Mitt 84: 142-150

DE AGOSTIN, A.; Lijnen, H.R.; Pixley, R.A.; Colman, R.W.; Schapira, M.: (1984)
Inactivation of factor XII. Active fragment in normal plasma
J Clin Invest 73: 1542-1549

DE FOUW, N.J.; van Hinsbergh, V.W.M.; de Jong, Y.F.; Haverkate, F.; Bertina, R.M.:
(1987)
The interaction of activated protein C and thrombin with the plasminogen activator
inhibitor released from human endothelial cells
Thromb Haemost 57: 176-182

DEKLERK, J.; Benzer, H.; Haider, W.; Pauser, G.; Stellwag, F.: (1977)
Beeinflussung des Kininogen-Kininensystems durch einen Kallikreinhemmer bei
Operation am offenem Herzen in extrakorporaler Zirkulation
Anaesthesist 26: 639-643

DÖRNER, K.: (1999)
Klinische Chemie, 3. Überarbeitete und ergänzte Auflage
Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart

DOOLITTLE, R.F.: (1982)
Fibrinogen: Hauptakteur bei der Blutgerinnung
Spektrum der Wissenschaft 2: 58-69

DUSWALD, K.H.: (1983)
Zur Pathobiochemie der Leukozyten-Elastase und ausgewählter Plasmaproteine nach
abdominalchirurgischen Eingriffen
G-i-T Verlag, Ernst Giebeler, Darmstadt

EDMUNDS, L.H.; Ellison, N.; Colman, R.W.; Niewiarowski, S.; Konetirao, A.;
Addonizio, V.P.; Stephenson, L.W.; Edie, R.N.: (1982)
Platelet function during cardiac operation
J Thorac Cardiovasc Surg 83: 805-812

EHRlich, H.J.; Keijer, J.; Preissner, K.T.; Klein-Gebbink, R.; Pannekoek, H.: (1991)
Functional interaction of plasminogen activator inhibitor type 1 and heparin
Biochem 30: 1021-1028

FEARS, R.: (1988)
Kinetic studies on the effect of heparin and fibrin on plasminogen activators
Biochem J 249: 77-81

FUHRER, G.; Gallimore, M.J.; Heller, W.; Hoffmeister, H.E.; Stoll, T.: (1985)
Untersuchungen zum Verhalten der Präkine während extrakorporaler Zirkulation in
der Herzchirurgie
Med Welt 36: 765-768

FURIE, B.; Furie, B.C.: (1988)
The molecular basis of blood coagulation
Cell 53: 505-518

GALLIMORE, M.J.; Fareid, E.; Stormorken, H.: (1978)
The purification of human plasma kallikrein with weak plasminogen activator activity
Thromb Res 25: 409-420

GIBBON, J.R.: (1954)
Application of a mechanical heart and lung apparatus to cardiac surgery
Minnesota Medicine 37: 171-180

GLUSA, E.; Wenzel, E.; Forth, W.; Rummel, W.: (1996)
Antikoagulantien, Aggregationshemmer, Fibrinolytika, Hemmstoffe der Fibrinolyse und
Hämostypika
In: Forth, W.; Henschler, D.; Rummel, W.; Starke, K.: Allgemeine und spezielle
Pharmakologie und Toxikologie, 7.Auflage
Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford, S. 473-501

GOLDSMITH, G.; Saito, H.; Ratnoff, O.D.: (1978)
The activation of plasminogen by Hageman factor (FXII) and Hageman factor
fragments
J Clin Invest 62: 54-60

GUGLIELMI, J.; Mecke, D.; Pfeiffer, D.: (1993)
Physiologisch-Chemisches Praktikum für Mediziner, Zahnmediziner, Biochemiker und Biologen.
Physiologisch-Chemisches Institut der Universität Tübingen

GRONSKI, P.; Bodenbender, L.; Kanzy, E.-J.; Piepenbrock, M.; Seiler, F.R.: (1986)
The functional inhibition of c1-inhibitor in normal human serum causes spontaneous consumption of the complement components c2, c3, c4 and factor b
Immunobiol. 171: 252-262

HASLER, K.; Wörner, D.; Maier, M.: (1992)
Transaminasenanstieg unter intravenöser kontinuierlicher Heparintherapie
Med Welt 43: 592-595

HAUERT, J.; Bachmann, F.: (1985)
Prourokinase activation in euglobulin fractions
Thromb Haemost 54: 122

HEEB, M.J.; Espana, F.; Geiger, M.; Collen, D.; Stump, D.; Griffin, J.H.: (1987)
Immunological identity of heparin-dependent plasma and urinary protein C inhibitor and plasminogen activator inhibitor 3
J Biol Chem 262: 15813-15816

HEIMBURGER, N.: (1994)
Entzündungsreaktionen und Hämostase
Haemostaseologie 14: 1-6

HELLER, W.; Fuhrer, G.; Frischauf, L.; Hoffmeister, H.E.; Huth, C.: (1985)
Komplementaktivierung und Immunglobulinspiegel während und nach aortokoronaren Bypassoperationen
Med Welt 36: 753-757

HELLER, W.; Fuhrer, G.; Hoffmeister, H.E.; Gallimore, M.J.: (1987)
Studies on shock during extracorporeal circulation during aorta-coronary bypass operation
First Vienna Shock Forum, A. R. Liss, Inc. S. 87-94

HELLER, W.; Koslowski, L.; Fuhrer, G.; Knewitz, W.D.: (1985)
Antithrombin-III-Spiegel bei Patienten mit malignen Erkrankungen
Med Welt 36: 673-676

HELLER, W.; Wendel, H.P.; Klaffschenkel, R.; Hoffmeister, H.E.: (1991)
Studienmodell über die Hämokompatibilität von Biomaterialien, speziell von
Hollowfiber- und Silikonmembranen
35. Jahrestagung der Gesellschaft für Thrombose- und Hämostaseforschung, Göttingen

HEMKER, H.C.: (1994)
Thrombin generation, an essential step in haemostasis and thrombosis
In: Bloom, A.L.; Forbes, C.D.; Thomas, D.P.; Tuddenham, E.G.D.(Eds.):
Haemostasis and thrombosis, 3rd ed.
Churchill Livingstone, Edinburgh, S.477-490

HENSCHEN, A.H.: (1994)
Fibrinogen-Varianten: Biochemie, Molekularbiologie und Diagnostik
Haemostaseologie 14: 184-189

HERRERA, C.; Velasco, F.; Guerrero, A.; Guerrero, R.; Alvarez, F.; Torres, A.: (1989)
Contact phase of blood coagulation in cardiogenic pulmonary oedema (CPO) and adult
respiratory distress syndrome (ARDS)
Intensive Care Med 15(2): 99-104

HIGUCHI, D.A.; Wun, T.-C.; Likert, K.M.; Broze, G.J.: (1992)
The effect of leucocyte elastase on tissue factor pathway inhibitor
Blood 79: 1712-1719

HOLLOWAY, D.S.; Summaria, L.; Sandesara, J.; Vagher, J.P.; Alexander, J.C.: (1988)
Decreased platelet number and function and increased fibrinolysis contributes to
postoperative bleeding in cardiopulmonary bypass patients
Thromb Haemost 59: 62-65

HOLMER, E.; Kurachi, K.; Söderström, G.: (1981)
The molecular weight-dependence of the rate-enhancing effect of heparin on the
inhibition of thrombin, factor IXa, factor Xa, factor XIa, factor XIIa and kallikrein by
antithrombin
Biochem J 193: 395-400

HOLMSEN, H.: (1994)
Platelet secretion and energy metabolism
In: Colman, R.W.; Hirsh, J.; Marder, V.J.; Salzman, E.W.:
Haemostasis and thrombosis: basic principles and clinical practice, 3rd Edition
Philadelphia; Lippincott, 524-545

HOYLAERTS, M.; Rijken, D.C.; Lijnen, H.R.; Collen, D.: (1982)
Kinetics of the activation of plasminogen by human tissue plasminogen activator. Role of fibrin.
J Biol Chem 257: 2912-2919

HYNES, R.O.: (1991)
The complexity of platelet adhesion to extracellular matrices
Thromb Haemost 66: 40-43

ICHINOSE, A.; Kisiel, W.; Fujikawa, K.: (1984)
Proteolytic activation of tissue plasminogen activator by plasma and tissue enzymes
FEBS Lett. 175: 412-418

IRELAND, H.; Rylance, P.B.; Kesteven, P.: (1989)
Heparin as an anticoagulant during extracorporeal circulation in Heparin
In: Chemical and Biological Properties, Clinical Applications,
Lane, D.A. and Lindahl, U. (Eds.)
CRC Boca Raton, S. 549

KAPLAN, A.P.; Silverberg, M.: (1987)
The coagulation-kinin pathway of human plasma
Blood 70: 1-15

KAROW, T.; Lang, R.: (1998)
Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie
F. Hansen, Bergisch-Gladbach

KLINKE, R.; Silbernagel, S.: (1996)
Lehrbuch der Physiologie, 2.Auflage
Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York

KLÖCKING, H.P.: (1991)
Pharmakologische Beeinflussung der Freisetzung von t-PA aus dem Gefäßendothel
Haemostaseologie 11: 76-88

KONSGAARD, U.E.; Smith-Erichsen, N.; Hysing, E.; Tollofsrud, S.; Seem, E.; Gerian, O.; Bjornskrau, L.: (1991)
Haemodynamic effects of heparin during coronary bypass surgery
Acta Anaesthesiol Scand 35: 758-761

KORN, R.L.; Fisher, C.A.; Livingston, E.R.; Stenach, N.; Fishman, S.J.; Jeevanadam, V.; Addonizio, V.P.: (1996)

The effects of Carmeda Bioactive Surface on human blood components during simulated extracorporeal circulation
J Thorac Cardiovasc Surg 111: 1073-1084

KREUTZIG, T.: (1993)

Biochemie, 7.Auflage
Jungjohann Verlagsgesellschaft Neckarsulm

KUITUNEN, A.H.; Salmenpera, M.T.; Heinonen, J.; Rasi, V.P.; Myllyla, G.: (1991)

Heparin rebound: a comparative study of protamine chloride and protamine sulfate in patients undergoing coronary artery bypass surgery
J Cardiothorac Vasc Anesth 3: 221-226

LARM, O.; Larsson,R.; Olsson,P.: (1983)

A new non-thrombogenic surface prepared by selective covalent binding of heparin via a modified reducing terminal residue
Biomater Med Res 11: 161-173

LECHLER, E.: (1991)

Hämorrhagische Diathesen
In: Classen; Diehl; Kochsiek (Hrsg.): Innere Medizin

LÜSCHER, E.F.: (1986)

Die Funktion der Thrombozyten bei der Blutgerinnung
Haemostaseologie 6: 99-101

MAMMEN, E.F.: (1991)

Blutung und Thrombose
Med Welt 42: 612-617

MARCUM, J.S.; Rosenberg, R.D.: (1985)

Heparin-like molecules with anticoagulant activity are synthesized by cultured endothelial cells
Biochem Biophys Res Com 126: 365

MEIJERS, J.C.M.; Vlooswijk, R.A.A.; Bouma, B.N.: (1988)

Inhibition of human blood coagulation factor X_{II} by α_1 -inhibitor
Biochemistry 27: 959-963

MELROSE, D.G.: (1986)

A history of cardiopulmonal bypass

In: Taylor, K.M.: Cardiopulmonary bypass;

Chapman and Hall, London, S. 1-12

MILLENSON, M.M.; Bauer, K.A.; Kistler, J.P.; Barzegar, S.; Tulin, L.; Rosenberg, R.D.: (1992)

Monitoring „mini-intensity“ anticoagulation with warfarin: comparison of the prothrombin time using a sensitive thromboplastin with prothrombinfragment F1+2 levels

Blood 79:, 2034-2038

MOEN, O.; Fosse, E.; Dregelid, E.; Brockmeier, V.; Andersson, C.; Hogasen, K.; Venge, P.; Mollness, T.E.; Kierulf, P.: (1996)

Centrifugal pump and heparin coating improves cardiopulmonary bypass biocompatibility

Ann Thorac Surg 62: 1134-1140

MÜLLER-BERGHAUS, G.: (1998)

Regulation und Dysregulation des Hämostasesystems

In: Labor und Diagnose, 5. Aufl., Lothar Thomas (Hrsg.)

TH-Books Verlagsgesellschaft mbH, Frankfurt/Main

NIEWIAROWSKI, S.: (1994)

Secreted platelet proteins

In: Bloom A.L.; Forbes, C.D.; Thomas, D.P.; Tuddenham, E.G.D.;

Haemostasis and thrombosis, 3 rd Edition

Churchill Livingstone, Edinburgh, 167-181

OFOU, F.; Blajchman, M.A.: (1980)

The inhibition by heparin of the intrinsic pathway activation of factor X in the absence of antithrombin III

Thromb Res 20: 391-403

OHLSSON, K.: (1978)

Interactions of granulocyte neutral proteases with alpha-1-antitrypsin, alpha-2-macroglobulin and alpha-1-antichymotrypsin

In: Haveman, K.; Janoff, A.: Neutral proteases of polymorphonuclear leucocytes

Urban und Schwarzenberg, München

OVRUM, E.; Brosstad, F.; Am Hølen, E.; Tangen, G.; Abdelnoor, M.; Øystese, R.: (1996)

Complete heparin-coated (CBAS) cardiopulmonary bypass and reduced systemic heparin dose; effects on coagulation and fibrinolysis
Eur J Cardiothorac Surg 10: 449-455

PAQUES, E.P.; Heimbürger, N.: (1986)

Das fibrinolytische System
Haemostaseologie 6: 139-147

PATSCHEKE, H.; Ruf, A.: (1998)

Thrombozytenfunktionstests; Marker einer in vivo-Thrombozytenaktivierung
In: THOMAS, L.: Labor und Diagnose, 5. Auflage
TH-Books Verlagsgesellschaft mbH, Frankfurt/Main, S.610-613

PIXLEY, R.A.; Schapira, M.; Colman, R.W.: (1985)

The regulation of human factor XIIa by plasma proteinase inhibitors
Biol Chem 260: 198-203

PLOW, E.F.: (1982)

Leukocyte elastase release during blood coagulation. A potential mechanism for activation of alternative fibrinolytic pathway
J Clin Invest 69: 564-572

PREISSNER, K.; Müller-Berghaus, G.: (1986)

Molekulare Wechselwirkungen zwischen Komplement-, Gerinnungs- und Fibrinolyse-System
Hämostaseologie 6: 67-81

RASCHE, H.: (1988)

Niedermolekulare Heparine
Deutsches Ärzteblatt 15: 1007-1013

REIDEMEISTER, J.C.: (1982)

Herz, Perikard und thorakale Aorta, 20.92-20.147
In: Vosschulte, K.; Kümmerle, F.; Peiper, H.-J.; Weller, S. (Hrsg.):
Lehrbuch der Chirurgie, 7. Aufl., Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York

ROSENBERG, R.D.; Damus, D.S.: (1973)
The purification and mechanism of activation of human antithrombin-heparin cofactor
J Biol Chem 248: 6490-6505

SCHLEPPER, M.; Hehrlein, F.W.: (1981)
Erworbene Herzklappenfehler
In: Vosschulte, K.; Lasch, H.G.; Heinrich, F.: Innere Medizin und Chirurgie, 2. Aufl.
Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, S. 35-67

SHANBERGE, J.N.; Murato, M.; Quattrocioni-Longe, T.; van Neste, L.: (1986)
Heparin-protamine complexes in the production heparin rebound and other
complications of extracorporeal bypass procedures
Am J C P 87: 2210-2217

SONG WAN, M.D.; LeClerk, J.L.; Vincent, J.L.: (1997)
Cytokine responses to cardiopulmonary bypass: lessons learned from cardiac
transplantation
Ann Thorac Surg 63: 269

STANGEL, W.: (1988)
In: MÜLLER-ECKHART, Ch.: Transfusionsmedizin
Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York

STEPHAN H.; Weyland, A.; Kazmaier, S.; et al.: (1992)
Acid-base management during hypothermic cardiopulmonary bypass does not affect
cerebral metabolism but does affect blood flow and neurological outcome
Br J Anaesth 69: 51

SUBRAMANIAM, P.; Skillington, P.; Tatoulis, J.: (1995)
Heparin-rebound in the early postoperative phase following cardiopulmonary bypass
Aust N Z J Surg 65: 331-333

SVENMARKER, S.; Sandström, E.; Karlsson, T.; Jansson, E.; Hänggmark, S.;
Lindholm, R.; Appelblad, M.; Aberg, T.: (1997)
Clinical effects of heparin coated surface in cardiopulmonary bypass
Eur J Cardiothorac Surg 11: 957-964

TAYLOR, K.M.: (1986)
Cardiopulmonary Bypass: Principles and Management,
Chapman and Hall Medical, London

TAYLOR, K.M.: (1996)

SIRS- The systemic inflammatory response syndrome after cardiac operations
Ann Thorac Surg 61: 1607-1608

THEWS, G.: (1997)

Atemgastransport und Säure-Basen-Status des Blutes
In: Physiologie des Menschen, 27. Auflage
Springer Verlag, Berlin, S. 606

THOMAS, L.: (1998)

Labor und Diagnose, 5. Auflage
TH-Books Verlagsgesellschaft mbH, Frankfurt/Main, S.1470-1475

TRAVIS, J.; Salvesen, G.S.: (1983)

Human plasma proteinase inhibitors
Ann Rev Biochem 52: 655-709

TRAVIS, J.: (1988)

Structure, function and control of neutrophil proteinases
Am J Med 84: 37-42

VILLANEUVA, G.B.; Danishefsky, I.: (1977)

Evidence for a heparin-induced conformational change on antithrombin III
Biochem Biophys Res Commun 74: 803-809

VROMAN, L.: (1988)

The life of an artificial device in contact with blood: initial events and their effect on its final state
Bull N Y Acad Med 64: 352-357

WACHTFOGEL, Y.T.; Harpel, P.C.; Edmunds, L.H.; Colman, R.W.: (1989)

Formation of C1s-C1-inhibitor, kallikrein-C1-inhibitor, and plasmin-alpha 2-inhibitor complexes during cardiopulmonary bypass
Blood 73(2): 468-471

WADA, H.; Minamikawa, K.; Wakita, Y.; Nakase, T.; Kaneko, T.; Ohiwa, M. et al.: (1993)

Hemostatic study before onset of disseminated intravascular coagulation
Amer J Hematol 43: 190-194

WADA,H.; Wakita, Y.; Nakase, T.; Shimura, M.; Hiyoyama, K.; Nagaya, S. et al.: (1995)

Outcome of disseminated intravascular coagulation in relation to the score when treatment was begun

Thromb Haemostas 74: 848-852

WAGNER, C.; Dati, F.: (1998)

Aktivierungsmarker: Thrombin-Antithrombin-Komplex (TAT), Prothrombinfragment F1+2

In: Labor und Diagnose, Thomas, L., 5.Aufl.:

TH-Books Verlagsgesellschaft mbH, Frankfurt/Main, S. 633-636

WATRES, D.; Lam, J.: (1989)

Fibrinopeptid A: A ubiquitous Marker

Jour Am College Cardiol 14: 595-596

WEISS, Ch.; Jelkman, W.: (1997)

Funktionen des Blutes

In: Schmidt, R.F.; Thews,G.: Physiologie des Menschen, 27. Aufl.

Springer Verlag, Berlin, 411-448

WENDEL, H.P.; Klaffschenkel, R.; Heller,W.; Hoffmeister, H.E.: (1992)

Cardio-pulmonaler Bypass unter Verzicht von Antikoagulantien?

Ex-vivo-Modelluntersuchungen mit Verwendung eines heparinbeschichteten Membranoxygenators

In: FRAEDRICH, G. et al. (Hrsg.:.) Besondere Aspekte der extrakorporalen Zirkulation
Steinkopf-Verlag

WENDEL, H.P.; Heller, W.; Gallimore, M.J.; Hoffmeister, H.E.: (1994)

Heparin-coated oxygenators significantly reduce contact system activation in an ex-vivo cardiopulmonary bypass model

Blood Coagul Fibrinolysis 5: 673-678

WENDEL, H.P.; Ziemer, G.: (1999)

Coating-techniques to improve the hemocompatibility of artificial devices used for extracorporeal circulation

Eur J Cardiothorac Surg 16: 342-350

WENGER, R.K.; Lukaszewicz, H.; Mikuta, B.S.; Niewiarowski, S.; Edmunds, L.H.:
(1989)

Loss of platelet fibrinogen receptors during clinical cardiopulmonary bypass
J Thorac Cardiovasc Surg 97(2): 235-239

WESTABY, S.: (1983)

Complement and the damaging effects of cardiopulmonary bypass
Thorax 38: 321-325

WESTABY, S.: (1987)

Organdysfunktion after cardiopulmonary bypass. A systemic inflammatory reaction
initiated by extracorporeal circuit
Intensive Care Medicine 13: 89

WITT, J.: (1995)

Hämostase und Fibrinolyse

In: Greiling, H.; Gressner, A.M.: Lehrbuch der klinischen Chemie und Pathobiochemie,
3. neubearbeitete Auflage

Schattauer, Stuttgart, S.889-946

YOUNG, E.; Prins, M.; Levine, M.N.; Hirsh, J.: (1992)

Heparin binding to plasma proteins, an important mechanism for heparin resistance
Thromb Haemost 67: 639-643

Lebenslauf

Name: Abler

Vorname: Anton

Geburtsdatum: 13.06.1971

Geburtsort: Leutkirch

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: ledig

Schulbildung: 9/1978 - 8/1982 Grund- und Hauptschule, Kirchberg
9/1982 - 8/1992 Kolleg der Schulbrüder, Illertissen

Schulabschluss: allgemeine Hochschulreife

Wehrdienst: 10/1992 - 9/1993 Sanitätsstaffel Laupheim

Ausbildung: 10/1995 Immatrikulation für das Fach Zahnmedizin an der
Eberhard-Karls- Universität Tübingen

10/1996 Zahnärztliche Vorprüfung

12/1999 Zahnärztliche Prüfung und Approbation als Zahnarzt

10/1993 Immatrikulation für das Fach Humanmedizin an der
Eberhard-Karls- Universität Tübingen

9/1995 Ärztliche Vorprüfung

3/1997 Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung

3/2000 Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung

15/5/2001 Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung

seit 01.08.2001 Arzt im Praktikum in der Klinik für Kiefer- und
Gesichtschirurgie, Plastische Operationen, Katharinenhospital,
Klinikum Stuttgart