

**Aus der Universitätsklinik
für Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie Tübingen
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. Dr. h. c. G. Ziemer**

**Untersuchungen zur Hämokompatibilität
von
biopassiven Oberflächenbeschichtungen**

**INAUGURAL – DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnheilkunde**

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

**vorgelegt von
Philipp David Futter
aus
Tübingen**

2007

Dekan:

Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter:

Professor Dr. Dr. h. c. G. Ziemer

2. Berichterstatter:

Professor Dr. G. Gomez-Roman

Für meine Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	1
1.	Hämostase	2
1.1	Extrinsisches System	3
1.2	Intrinsisches System	3
2.	Fibrinolyse	4
3.	Gerinnungsparameter	5
3.1	Thrombozyten	5
3.2	β -Thromboglobulin	7
3.3	Thrombin-Antithrombin-III-Komplex (TAT)	8
3.4	Hämolyse (Freies Hämoglobin)	9
4.	Das Komplementsystem	10
5.	Inflammatorische Marker	13
5.1	SC5b-9 (TCC)	13
5.2	Leukozyten	14
5.3	PMN-Elastase	16
6.	Das Endothel	18
7.	Biokompatibilität künstlicher Oberflächen	19
8.	JOSTRA Safeline	21
9.	Fragestellung und Ziele der Arbeit	22
II.	MATERIAL UND METHODEN	24
1.	Versuchsdurchführung	24

2.	Herz-Lungen-Maschine	28
3.	Testmethoden	31
3.1	Leukozyten und Thrombozyten	31
3.2	β -Thromboglobulin	33
3.3	Thrombin-Antithrombin-III-Komplex (TAT)	34
3.4	Hämolyse (freies Hämoglobin)	36
3.5	PMN-Elastase	37
3.6	SC5b-9 (TCC)	39
4.	Statistische Auswertung der Ergebnisse	41
4.1	Hämatokrit-Korrektur	41
4.2	Statistischer Vergleich	42
III.	ERGEBNISSE	43
1.	Thrombozyten	43
2.	β -Thromboglobulin	48
3.	Thrombin-Antithrombin-III-Komplex (TAT)	54
4.	Hämolyse (freies Hämoglobin)	59
5.	SC5b-9 (TCC)	64
6.	Leukozyten	69
7.	PMN-Elastase	75
IV.	DISKUSSION	81
1.	Thrombozyten	81
2.	β -Thromboglobulin	83
3.	Thrombin-Antithrombin-III-Komplex (TAT)	85
4.	Hämolyse (freies Hämoglobin)	86
5.	SC5b-9 (TCC)	87
6.	Leukozyten	89

7.	PMN-Elastase	91
V.	ZUSAMMENFASSUNG	93
VI.	LITERATURVERZEICHNIS	96

I. EINLEITUNG

Um eine Operation am offenen, stillgelegten Herzen durchführen zu können, bedarf es der Simulation von sowohl Herz als auch Lunge mit Hilfe der Herz-Lungen-Maschine. Hierbei wird die Funktion des Herzens von einer Rollerpumpe übernommen, die für einen gleichmäßigen Blutfluss während dem kardiopulmonalen Bypass sorgt. Die adäquate Sauerstoffversorgung des Blutes wird von einem Oxygenator gewährleistet, der zur Imitation der Lungenfunktion eingesetzt wird. Die früher verwendeten Bubble-Oxygenatoren wurden dabei in den 70er Jahren mehr und mehr durch den so genannten Hohlfasermembran-Oxygenator ersetzt, der eine bis zu drei Quadratmeter große Oberfläche besitzt und aufgrund seiner mikroporösen Membranen den Eintritt von Gas ins Blut verhindert und so die Entstehung von Mikroemboli reduziert.

Die weltweit erste erfolgreiche Operation am offenen Herzen mit der Herz-Lungen-Maschine wurde am 6. Mai 1953 von Dr. John H. Gibbon durchgeführt. In den nächsten 50 Jahren wurde die extrakorporale Zirkulation in Bezug auf die Technik aber auch bezüglich der verwendeten Materialien stetig optimiert und stellt heutzutage vor allem im Rahmen der Koronar- und Herzklappenchirurgie ein routiniertes Verfahren dar. In den Vereinigten Staaten erreichte man durch die Behandlung von Herzerkrankungen unter Einsatz der Herz-Lungen-Maschine eine Erhöhung der Lebenserwartung um 12,9 %.

Trotz dieser Erfolge führt der Kontakt des Blutes mit der artifiziellen Oberfläche des extrakorporalen Kreislaufsystems zu einer Reihe von Komplikationen, die darauf zurückzuführen sind, dass bis heute kein dem Gefäßendothel identisches Biomaterial geschaffen werden konnte, das sowohl prokoagulatorische als auch antikoagulatorische Eigenschaften aufweist und somit ein dynamisches Gleichgewicht zwischen Blutgerinnung und Fibrinolyse herstellt.

Die Interaktion des Blutes mit der Fremdoberfläche initiiert die Aktivierung des Gerinnungs- sowie des inflammatorischen Systems mit der möglichen Folge von Blutungen, Thromboembolien sowie Organ- und Gewebeschäden.

Postoperativ kann dadurch das so genannte Post-Perfusions-Syndrom ausgelöst werden, das bis hin zum akuten Lungenversagen (ARDS), Multiorganversagen (MOF) oder zur systemischen Entzündungsreaktion (SIRS) führen kann.

Als weitere mögliche Nebenwirkungen der extrakorporalen Zirkulation sind zudem Nierenfunktionsstörungen, Hyperglykämie, Störungen des Wasser- und Elektrolythaushaltes sowie neurologische Komplikationen zu nennen.

Obwohl der Kontakt des Blutes mit der nichtendothelialen Oberfläche die Hauptursache der oben genannten Risiken darstellt, gelten auch Hämodynamik, Hämodilution, die Hypothermie und der chirurgische Eingriff selbst als Faktoren, die eine Aktivierung der zellulären und humoralen Blutkomponenten bewirken können.

(15; 19; 22; 32; 36; 40; 49; 50; 68; 81; 83; 104)

1. Hämostase

Die Hämostase wird definiert als eine Reihe von biochemischen Reaktionen, die der Blutstillung sowie –gerinnung dienen und stellt somit einen physiologischen Schutzmechanismus gegen Blutverlust dar. Voraussetzung hierfür ist ein harmonisches Zusammenspiel von Koagulation, Fibrinolyse, Thrombozyten und Gefäßwänden. (30; 52; 55; 74)

Bei Auftreten einer Gefäßwandverletzung bildet sich initial im Zuge der so genannten primären Hämostase ein Thrombozytenpfropf (s. Kap. 3.1). Der eigentliche, definitive Verschluss der Läsion erfolgt erst im Prozess der sekundären Hämostase (= plasmatische Gerinnung), die über den extrinsischen (exogenen) oder intrinsischen (endogenen) Weg initiiert werden kann und letztendlich über den aktivierten Faktor X in der thrombininduzierten Umwandlung von Fibrinogen in ein stabiles Fibrinpolymer mündet.

Die Faktoren der plasmatischen Gerinnung sind Glykoproteine, die vor allem in der Leber, aber auch in Endothelzellen (vWF) und Megakaryozyten (F XIII, vWF) gebildet werden können. Bei diesen Faktoren handelt es sich um

Proenzyme, das heißt um inaktive Vorstufen, die im Blut in nur geringer Konzentration (1-100 µg/l) zirkulieren und bei Bedarf in einer kaskadenartigen Reaktion aktiviert werden. Die im Rahmen der Aktivierung der Gerinnungsfaktoren stattfindende limitierte Proteolyse bewirkt eine Konformationsänderung der Proenzyme und somit die Freilegung der aktiven Zentren der Faktoren. (30; 52; 76; 103)

1.1 Extrinsisches System

Die Initiation des extrinsischen Systems erfolgt innerhalb weniger Sekunden durch das Lipoprotein Gewebe-Thromboplastin, das im Falle einer Läsion aus dem verletzten Gewebe freigesetzt wird und in Anwesenheit von Plättchenfaktor 3 und Calcium mit F VII eine Verbindung eingeht, die zur Aktivierung von F X führt. (103; 110)

1.2 Intrinsisches System

Die Aktivierung des endogenen Systems dagegen wird durch Kontakt des Blutes mit unphysiologischen Oberflächen wie subendotheliale Strukturen beschädigter Gefäßwände oder Fremdoberflächen in extrakorporalen Kreislaufsystemen hervorgerufen. Aufgrund dieser Kontaktaktivierung bilden die dabei beteiligten Gerinnungsfaktoren Faktor XII (Hagemann-Faktor), Faktor XI (Rosenthal-Faktor), Präkallikrein (PKK, Fletcher-Faktor) und das hochmolekulare Kininogen (HMWK, Fitzgerald-Faktor) das so genannte Kontaktphasensystem.

Zu Beginn dieses Systems erfolgt die Autoaktivierung des F XII über die Bindung an negativ geladene Strukturen der unphysiologischen Oberfläche und dessen darauf folgende Umwandlung in die Serinproteasen α - und β -F XIIa, die eine Aktivierung von F XI sowie die Bildung von Kallikrein (KK) aus PKK bewirkt. KK wiederum ist in der Lage, erneut den Hagemann-Faktor zu aktivieren und initiiert auf diese Weise eine Verstärkerschleife und somit eine Art positive Rückkoppelung. Des Weiteren besitzt KK die Fähigkeit, Bradykinin

aus HMWK abzuspalten, das zur Erhöhung der Gefäßpermeabilität, Kontraktion der glatten Muskulatur, Senkung des Blutdrucks sowie Aktivierung von neutrophilen Granulozyten führt. Außerdem kann Bradykinin den Gewebsplasminogenaktivator (tPA) aus Endothelzellen freisetzen.

Letztendlich führt der aktivierte F XII (α -F XIIa) über die Faktoren XI, IX und VIII ebenfalls zur Aktivierung des F X.

(23; 31; 58; 103; 110)

Der über den extrinsischen oder intrinsischen Weg aktivierte F X bewirkt die Bildung der so genannten Prothrombinase, einem Prothrombin-Komplex bestehend aus F Va, PF 3, Calcium und Phospholipiden, der über die proteolytische Spaltung von Prothrombin (F II) die Thrombinbildung initiiert. Thrombin (F IIa) wiederum führt über die Spaltung von Fibrinogen zu einer Aneinanderlagerung von Fibrinmonomeren, deren Umwandlung in ein stabiles Fibringerinnsel erst über den von Thrombin aktivierten F XIIa zustande kommt.

(46; 58; 103)

Eine unkontrollierte Koagulation des Blutes wird von verschiedenen Gerinnungsinhibitoren unterbunden. Dabei muss das Antithrombin III (= Heparin-Kofaktor I, s. Kap. 3.3) als Inaktivator der Faktoren XIIa, XIa, IXa, Xa sowie von Thrombin und KK als bedeutendster Regulator der Blutgerinnung angesehen werden. Weitere Inhibitoren sind das durch Thrombin aktivierte Protein C mit Protein S als Kofaktor sowie der Heparin-Kofaktor II, α_2 -Makroglobulin, α_1 -Antitrypsin und der C1-Inhibitor. (55; 58)

2. Fibrinolyse

Das oben beschriebene Gerinnungssystem steht zum Schutz vor Blutungen, Thrombosen oder Gefäßschäden mit dem fibrinolytischen System, das dem Abbau der im Verlauf der Blutgerinnung entstandenen Fibrinpolymere dient, im Gleichgewicht. Bedeutendster Parameter der Fibrinolyse ist das aus dem in der Leber gebildeten einkettigen Glykoprotein Plasminogen entstandene Plasmin,

da es zur Spaltung von Fibrin, Fibrinogen sowie der Faktoren V und VII befähigt ist und somit nicht nur dem Abbau des Koagels dient, sondern zudem über die Inaktivierung der Gerinnungsfaktoren V und VII die Fibrinneubildung verhindert. Aktiviert werden kann das Plasminogen sowohl über den intrinsischen als auch extrinsischen Weg, wobei dem exogenen System, das die Fibrinolyse über den Gewebe- und urinären Plasminogenaktivator (t-PA und u-PA) initiiert, hier eine relevantere Rolle zugeordnet wird.

Um ein Übergewicht von einem der Systeme zu verhindern, bedarf es ebenfalls der Kontrolle der Fibrinolyse durch bestimmte Regulatorproteine. Aufgrund seiner hohen Spezifität und zudem hohen Plasmakonzentration spielt das α_2 -Antiplasmin als Plasmininhibitor eine bedeutende Rolle. Als weiterer, jedoch schwächerer Inhibitor des Plasmins ist das α_2 -Makroglobulin anzusehen. Die Plasmininaktivierung erfolgt in beiden Fällen durch Komplexbildung. Ebenfalls über die Bildung eines Komplexes wird die Initiation der Fibrinolyse durch den in Thrombozyten, Monozyten, Megakaryozyten, Endothelzellen und der Plazenta gebildete Plasminogenaktivatorinhibitor (PAI) verhindert, der die Plasminogenaktivatoren t-PA und u-PA inhibiert. (6; 58; 69; 110)

3. Gerinnungsparameter

3.1 Thrombozyten

Im Blut eines Erwachsenen kommen etwa 150.000-350.000 Thrombozyten/ μ l vor, die aufgrund ihrer scheibchenförmigen Gestalt auch Blutplättchen genannt werden.

Thrombozyten sind kernlose, im Knochenmark durch Abschnürung aus Megakaryozyten entstandene Zellen von 1-4 μ m Durchmesser und 0,5-0,75 μ m Dicke und besitzen eine durchschnittliche Überlebensdauer von ca. 5-11 Tagen. Aus einer Knochenmarksriesenzelle werden ungefähr 1000 Thrombozyten gebildet, von denen $\frac{1}{3}$ in der Milz gespeichert werden, die bei

Bedarf mobilisiert werden können. Pro Tag werden etwa 35×10^9 Zellen/l Blut umgesetzt und anschließend in Lunge, Leber und Milz abgebaut. (42; 101; 103)

Das Zytoplasma der Blutplättchen weist drei verschiedene Arten von Granula auf: α -Granula, elektronendichte Granula und Lysosomen.

Die elektronendichten Granula enthalten ATP, ADP, GTP, GDP, Serotonin und Calcium. In den α -Granula befinden sich zum einen Plasmaproteine wie Fibrinogen, Fibronectin, Kallikrein, Thrombospondin, die Faktoren V und VIII, α_2 -Antiplasmin und Albumin. Zum anderen enthalten sie die plättchenspezifischen Proteine Plättchenfaktor 4 (= PF4), von-Willebrand-Faktor (= vWF), β -Thromboglobulin (= β -TG) und den platelet derived growth factor (= PDGF). Ebenso in den α -Granula vorhanden ist das während der Thrombozytenaktivierung auf der Oberfläche exponierte Glykoprotein P-Selectin (= CD62P), das die Bildung von Leukozyten-Thrombozyten-Aggregaten ermöglicht, was wiederum thromboembolische Komplikationen nach sich ziehen kann. (35; 57; 68)

Die Freisetzung dieser Granulainhalte erfolgt ausschließlich aus aktivierten Plättchen über ein die Granula mit der Zelloberfläche verbindendes offenes kanalikuläres System. Diese Freisetzungsreaktion geschieht innerhalb von 20-120 Sekunden, wobei die Lysosomen im Gegensatz zu den übrigen, sich vollständig entleerenden Granula nur etwa 30-55 % der in ihnen enthaltenen sauren Hydrolasen ausschütten. (6; 35; 58; 101)

Ausserdem setzen stimulierte Thrombozyten die sekundären Plättchenaktivatoren Thromboxan A_2 und PAF (= platelet activating factor) frei. Diesen Vorgang bezeichnet man als sog. positive feedback loops. Neben der plättchenstimulierenden Funktion besitzt der PAF zudem eine chemotaktische und phagozytoseaktivierende Wirkung auf neutrophile Granulozyten und Makrophagen und fungiert somit als Entzündungsmediator. (5; 6; 35)

Die Aktivierung der sonst im Ruhezustand im Blut zirkulierenden Thrombozyten erfolgt durch Thrombin, ADP, freigelegte subendotheliale Strukturen wie Kollagen infolge einer Gefäßwandverletzung sowie durch den Kontakt mit Fremdoberflächen.

Die so aktivierten Blutplättchen wandeln sich daraufhin in kugelige Zellen mit Pseudopodien um, die an ihrer Oberfläche die membranständigen Rezeptoren GP Ib und GP IIb/IIIa, ein calciumabhängiges Heterodimer, exponieren. Erst durch diese Rezeptoren wird die Adhäsion der Thrombozyten an der verletzten Gefäßwand sowie die Aggregation untereinander ermöglicht. (6; 73; 101; 110) Dabei kommt dem in Endothelzellen und Megakaryozyten gebildete vWF eine bedeutende Rolle zu, da dieser über die Bindung an die oben genannten Rezeptoren zur Brückenbildung zwischen den Plättchen und den subendothelialen Strukturen führt, indem er sich über Calcium-Ionen an das Kollagen heftet. Die Plasmakonzentration des vWF beträgt 10 µg/ml. Weiter ermöglicht die Thrombozytenaktivierung sowie die oben beschriebene Formänderung die Bindung von ca. 45.000 Fibrinogenmolekülen/Zelle an den GP IIb/IIIa-Rezeptor, was letztendlich in der Bildung eines primären Plättchenaggregats endet, das aufgrund der Kontraktion des Zytoskeletts der Thrombozyten und der Thrombin-vermittelten Polymerisation des Fibrinogens zu Fibrin in ein stabiles Gerinnsel umgewandelt wird.(5; 26; 58; 82; 114) Diese Gerinnselbildung bildet zusammen mit der initialen Vasokonstriktion nach einer Gefäßverletzung die sogenannte primäre Hämostase, deren Messung über die Blutungszeit (Normwert: 2-4 Minuten) erfolgt. (6) Die Plättchenaktivierung wird von dem Ausmaß der Plasmakonzentration der plättchenspezifischen Proteine PF4 und β -TG reflektiert. Diese freigesetzten Proteine bilden somit die Marker der Thrombozytenaktivierung. (1) Das in den Endothelzellen aus Arachidonsäure gebildete Prostacyclin PGI₂ (= Prostaglandinderivat) gilt als der wichtigste Inhibitor der Thrombozyten, indem es vor allem die Aggregation der Plättchen hemmt. Als weitere ebenfalls in den Endothelzellen gebildete Inhibitoren sind das Heparin sowie Stickstoffmonoxid zu nennen. (6; 58)

3.2 β -Thromboglobulin

Der sogenannte Platelet-Release-Faktor β -Thromboglobulin (β -TG) ist ein plättchenspezifisches Protein, das 10% des gesamten Inhaltes der in den

Thrombozyten enthaltenen α -Granula ausmacht und die Fähigkeit besitzt, die Prostacyclinsynthese der Endothelzellen zu hemmen, wodurch eine vermehrte Aggregation der Plättchen gefördert wird.

β -TG besteht aus vier identischen Untereinheiten, besitzt ein Molekulargewicht von 36.000 D und wird nach einer Halbwertszeit von 100 Minuten über die Nieren ausgeschieden. (5; 44; 47; 70; 77; 80; 92)

Werden Thrombozyten durch Stimuli wie ADP, atherosklerotische Plaques, Immunkomplexe, Kollagen, Thrombin oder auch Fremdoberflächen aktiviert, erfolgt nach der Degranulation über ein die Granula mit der Plättchenoberfläche verbindendes offenes kanalikuläres System die Freisetzung von β -TG ins Plasma. (47; 58; 92)

β -TG gilt daher als ein bedeutender Marker der Thrombozytenaktivierung und reflektiert das Ausmaß derselben. (16; 80)

Erhöhte Konzentrationen von β -TG im Plasma werden vor allem im Rahmen von Diabetes mellitus, akutem Myokardinfarkt, künstlichen Herzklappen, KHK, pAVK und Lungenembolien diagnostiziert. (44; 70) Ebenfalls sind erhöhte Plasmawerte von β -TG bei abnehmender glomerulärer Filtrationsrate zu verzeichnen.

Der Referenzwert für die Plasmakonzentration beträgt dabei ca. 35 ng/ml. (70)

3.3 Thrombin-Antithrombin-III-Komplex (TAT)

Antithrombin III ist ein in der Leber und den Endothelzellen der Blutgefäße gebildetes einkettiges Glykoprotein, das aus 432 Aminosäuren und 3 Disulfidbrücken besteht und ein Molekulargewicht von 58.000 D besitzt.

Mit einer Halbwertszeit von 2,8 Tagen und einer Plasmakonzentration von 0,15 g/l stellt das Antithrombin III den bedeutendsten im Plasma vorhandenen Serinproteinaseinhibitor dar.

Antithrombin III inaktiviert hauptsächlich Thrombin und Faktor Xa und in geringerem Maße auch die Faktoren IXa, XIa, XIIa sowie Kallikrein, Plasmin, Trypsin und Chymotrypsin, indem es durch die feste Bindung mit dem Serin im

aktiven Zentrum der Proteasen einen irreversiblen Komplex mit denselben bildet. (5; 7; 91; 97)

Bei der Neutralisierung des in freier Form praktisch nicht im Plasma vorkommenden Thrombins entsteht der sehr stabile TAT-III-Komplex im Verhältnis 1:1 mit einer Halbwertszeit von 10-15 Minuten. Im Normalfall beträgt die Plasmakonzentration dieses Komplexes weniger als 5 µg/l. (5; 46; 98)

In Anwesenheit von Heparin erfolgt eine enorme Beschleunigung dieser Komplexbildung, beruhend auf der durch die Bindung des Heparins an das Antithrombin III verursachten allosterischen Veränderung des Inhibitors und die somit ermöglichte raschere Komplexierung des Thrombins. (85; 91)

Die Erfassung einer intravasalen Thrombinbildung und somit der Nachweis eines ablaufenden Gerinnungsprozesses lässt sich anhand der TAT-Plasmakonzentration ermitteln. Demnach lassen erhöhte TAT-Werte auf eine Hyperkoagulabilität mit der möglichen Folge von thromboembolischen Komplikationen schließen.

Aufgrund dieser Tatsachen wird der TAT-III-Komplex als indirektes Maß für die Bildung von Thrombin angesehen und reflektiert somit das Ausmaß einer Gerinnungsaktivierung. (5; 98)

3.4 Hämolyse

Nach einer Halbwertszeit von ca. 120 Tagen kommt es zum Abbau der gealterten Erythrozyten im RES von Leber, Milz und Knochenmark. Das dabei freigesetzte Hämoglobin wird im Plasma an Haptoglobin gebunden, in der Leber zu Bilirubin abgebaut und anschließend über die Galle ausgeschieden. (46)

Ein Erythrozyt enthält ungefähr 28-34 pg des roten Blutfarbstoffs Hämoglobin, das aufgrund seiner Fähigkeit, Sauerstoff reversibel zu binden eine bedeutende Rolle im Atemgastransport übernimmt.

Hämoglobin besitzt ein Molekulargewicht von 64.500 D und besteht aus 4 Peptidketten sowie 4 Hämgruppen. Das zur Gruppe der Porphyrine gehörende Häm setzt sich wiederum aus 4 Porphyrinringen zusammen, die an ein zweiwertiges

Eisenatom gebunden sind. Beim Menschen können vier verschiedene Peptidketten unterschieden werden (α , β , γ , δ). Zum größten Teil (zu 97,5 %) jedoch besteht das humane Hämoglobin aus 2 α - und 2 β -Ketten (HbA1).

(46; 103)

Eine erhöhte Konzentration an freiem Hämoglobin im Blut lässt auf einen unter anderem durch physikalische oder chemische Noxen ausgelösten gesteigerten Erythrozytenabbau schließen. Aufgrund dieser Tatsache gilt die Plasmakonzentration von freiem Hämoglobin im Blut als Indikator für das Ausmaß einer Hämolyse im Rahmen von kardiopulmonalem Bypass, Arzneimittel- oder Schwermetallintoxikationen sowie Zustand nach Herzklappenersatz. (90)

Der Normwert für die Konzentration des gesamten Hämoglobins im Blut beträgt 140-155 g/l. (87) Für freies Hämoglobin gilt ein Normwert von <40 mg/100 ml Plasma.

Ab einer Konzentration von >20 mg freiem Hämoglobin/l Plasma spricht man von einer intravasalen Hämolyse. (90)

4. Das Komplementsystem

Die unspezifische humorale Immunabwehr des Körpers wird vom so genannten Komplementsystem, einem Multienzymsystem bestehend aus 20 Plasmaproteinen mit den 9 Hauptkomponenten C1-9 gebildet, das der Beseitigung von Pathogenen dient, jedoch auch die Induktion von Entzündungsreaktionen bewirkt. Die in der Leber, im Gastrointestinaltrakt und von Phagozyten am Ort einer Inflammation synthetisierten Komplementkomponenten sind im Blut mit einer Konzentration von 3-4 g/l vertreten und werden in einer kaskadenartigen Reaktion aktiviert.

(46; 59; 89; 103)

Eine Aktivierung des Komplementsystems kann über drei verschiedene Wege (klassischer Weg, Lectin-Weg und alternativer Weg) erfolgen und endet immer in der Formation des terminalen Lysekomplexes C5b-9, der nicht nur die Lyse

der Zielzelle herbeiführt, sondern auch die Aktivierung von Thrombozyten sowie die Expression von Endothelzellrezeptoren mit der Folge der Leukozytenadhäsion hervorruft. (38; 37)

➤ Klassischer Weg:

Die Aktivierung über den klassischen Weg erfolgt über direkte Bindung von C1 an das Pathogen, proteolytische Enzyme oder über Antigen/Antikörper-Komplexe komplementbindender Immunglobuline (IgM, IgG). Zudem können die nach der Gabe von Protaminsulfat, z.B. nach kardiopulmonalem Bypass, gebildeten Heparin-Protamin-Komplexe den klassischen Weg aktivieren.

Die aus einem Molekül C1q und je zwei Molekülen C1r und C1s bestehende Komplementkomponente C1 bindet mit dem C1q-Fragment an das Pathogen oder Immunglobulin und bewirkt über die aktivierten C1r- und C1s-Moleküle die Spaltung von C2 und C4. Der im weiteren Verlauf entstehende C4b2a-Komplex stellt eine zur Spaltung von C3 befähigte Konvertase dar. Erhöhte C4a-Konzentrationen lassen demnach auf eine über den klassischen Weg erfolgte Aktivierung des Komplementsystems schließen.

(10; 29; 37; 38; 89)

➤ Lectin-Weg:

Die Einleitung dieses Weges erfolgt über ein Mannose-bindendes Protein, das an Mannose-haltige Kohlenhydrate von Mikroorganismen bindet. Da dieses Protein eine strukturelle Ähnlichkeit mit der C1q-Komponente besitzt, führt der Lectin-Weg ebenfalls wie der klassische Weg zu einer Aktivierung der Komponenten C1s und C1r.

(38; 89)

➤ Alternativer Weg:

Hier bewirken bakterielle Endotoxine, künstliche Oberflächen oder Immunkomplexe die direkte Aktivierung der C3-Komponente.

Das aktivierte C3 bildet als C3b mit dem Plasmafaktor B einen Komplex, der durch den Faktor D aktiviert (C3bBb) und von Properdin stabilisiert wird. Dieser Komplex ist wiederum zur

Spaltung von C3 in der Lage, wodurch sich ein positives Feedback ergibt. (37; 60; 76; 89)

Neben den oben beschriebenen Möglichkeiten der Komplementaktivierung, kann das System auch durch eine regionale Ischämie oder die Blut-Luft-Grenzfläche während der Oxygenation im extrakorporalen Kreislauf stimuliert werden. (10; 29; 51; 62)

Das auf allen Wegen gebildete C3b lagert sich an die pathogenen Substanzen und Mikroorganismen an (Opsonisierung) und begünstigt somit deren Phagozytose durch neutrophile und eosinophile Granulozyten und Makrophagen. Des Weiteren führt C3b zur Formation einer C5-Konvertase, die über die C5-Spaltung letztlich die Initiation des terminalen Lysekomplexes herbeiführt. (77; 38; 89; 110)

Bei der Aktivierung des Komplementsystems entstehen zudem die Anaphylatoxine C3a und C5a, die eine Vasokonstriktion der Blutgefäße, Kontraktion der glatten Muskulatur, Erhöhung der Gefäßpermeabilität, Freisetzung von Histamin und Interleukin-1 sowie die Aktivierung von Thrombozyten und Leukozyten bewirken. Die C5a-Komponente ist vor allem für die Stimulation der Neutrophilen und die damit einhergehende Adhäsionsreaktion der Zellen am Gefäßendothel und Freisetzung von freien Sauerstoffradikalen und lysosomalen Enzymen verantwortlich. (10; 20; 37; 53; 60; 99)

Reguliert wird das Komplementsystem vom C1-Inaktivator und Faktor I mit seinen Kofaktoren CR1 und DAF, die eine übermäßige Aktivierung dieser Immunabwehr verhindern und so die Zelllyse limitieren. (76; 89)

5. Inflammatorische Marker

5.1 SC5b-9

Bei der Aktivierung des Komplementsystems erfolgt eine Kaskade von Reaktionen, die letztlich zur Bildung des so genannten Membranangriffskomplexes oder terminalen Lysekomplexes führen, der aus den Komplementkomponenten C5b, C6, C7, C8 und C9 zusammengesetzt ist.

Das im Laufe der Komplementkaskade gebildete C5b bildet mit je einem Molekül C6, C7 und C8 einen Komplex im Verhältnis 1:1:1:1, wobei die Bindung der Faktoren C7 und C8 eine Konformationsänderung derselben bewirkt. Die durch diese Veränderung exponierten hydrophoben Gruppen ermöglichen dem Komplex das Eindringen in die Lipiddoppelschicht der Zellmembran.

Aufgrund der Bindung von C8 wird außerdem die Polymerisation von 10-16 Molekülen C9 in eine hohlzylinderförmige Struktur initiiert. Dieser Hohlzylinder inseriert mit seinem hydrophoben Anteil in die Zellmembran und bildet mit den hydrophilen Anteilen einen transmembranalen Kanal von etwa 10 nm Durchmesser.

Dieses Eindringen des Komplexes in die Lipiddoppelschicht bewirkt eine gravierende Störung der selektiven Permeabilitätseigenschaften der Zellmembran und führt letztendlich über die Veränderung der intrazellulären Kalziumkonzentration sowie des Wasser- und Elektrolythaushaltes zu einer osmotischen Lyse der Zielzelle. (9; 38; 59; 89; 94)

Des Weiteren besitzt der Membranangriffskomplex die Fähigkeit, über die Freisetzung von freien Sauerstoffradikalen, Prostaglandinen, Leukotrienen und Zytokinen eine Reihe von Entzündungsreaktionen zu induzieren. (51)

Die Konzentration des C5b-9-Komplexes entspricht der Anzahl des gebildeten Anaphylatoxins C5a und reflektiert somit das Ausmaß der Komplementaktivierung. (65)

Um einer Zerstörung von Zellen infolge einer übermäßigen Komplementaktivierung vorzubeugen, wird das Komplementsystem von den Regulatorproteinen S-Protein (Vitronectin), HRF (homologous restriction factor)

und dem 18 kD Protein CD59 kontrolliert, die gezielt auf den terminalen Lysekomplex wirken. (89)

So bildet das S-Protein zunächst mit C5b-7 den hydrophilen SC5b-7-Komplex, der nicht mehr zur Insertion in die Zellmembran fähig ist. Der anschließend entstehende SC5b-9-Komplex besitzt zudem aufgrund der durch das S-Protein verhinderten Polymerisation der C9-Moleküle keine lytische Wirkung mehr, da die Formation des transmembranalen Tunnels ausbleibt. (76)

5.2 Leukozyten

Leukozyten lassen sich nach morphologischen und funktionellen Gesichtspunkten in **Granulozyten (50-70 %)**, **Lymphozyten (25-40 %)** und **Monozyten (4-8 %)** unterteilen und dienen aufgrund ihrer amöboiden Beweglichkeit sowie der Fähigkeit zur Phagozytose der Abwehr und Beseitigung von Krankheitserregern, Fremdpartikeln und Zelltrümmern. Die weißen Blutkörperchen besitzen eine recht kurze Zirkulationszeit von 7 Stunden, da sie die Gefäßwände durch reversible interendotheliale Lücken überwinden und somit in das Gewebe auswandern können (Diapedese). Dabei werden die Leukozyten chemotaktisch durch z.B. Interleukin-8, C5a oder PAF an den Ort einer Entzündung gelockt.

Normalerweise befinden sich im Blut eines Erwachsenen 4000-10.000 Leukozyten/ μ l. Bei akuten Entzündungen steigt die Zellzahl über 10.000/ μ l und es besteht eine Leukozytose. Sinkt dagegen die Anzahl der Leukozyten unter 4000/ μ l spricht man von einer Leukopenie, die durch vermehrte Auswanderung der Zellen ins Gewebe, gesteigerten Zelluntergang oder abnehmende Zellproduktion zustande kommen kann. (28; 48; 77; 88; 103)

Die polymorphkernigen **Granulozyten** können aufgrund der Anfärbbarkeit ihrer Granula unterteilt werden in neutrophile (>90 %), eosinophile (2-4 %) und basophile (0,5-1 %) Granulozyten und bilden zusammen mit den **Monozyten** das unspezifische zelluläre Abwehrsystem des Blutes.

Eosinophile Granulozyten befinden sich vor allem in der Haut, Lunge und im Gastrointestinaltrakt und enthalten in ihren Granula Hydrolasen, Peroxidasen sowie basische Proteine. Bei allergischen Reaktionen, Autoimmunkrankheiten oder Wurminfektionen ist mit dem Auftreten einer Eosinophilie zu rechnen.

Die Granula der **basophilen Granulozyten** enthalten Heparin und Histamin. Bei allergischen Reaktionen kommt es durch die Bindung von IgE-Antikörpern an die Rezeptoren auf der Oberfläche der Basophilen zur Histaminausschüttung mit der Folge von Gefäßdilatation, Hautrötung sowie Ödem- und Quaddelbildung. (43; 103)

Die vor allem in Lunge, Leber, Mundhöhle, Milz und Gastrointestinaltrakt vorhandenen **neutrophilen Granulozyten** besitzen eine Halbwertszeit von 6 Stunden und halten sich ungefähr 1-4 Tage im Gewebe auf. Nachdem die im Knochenmark gebildeten Zellen ins Blut freigesetzt worden sind, bildet ca. die Hälfte der Neutrophilen einen nicht zirkulierenden marginalen Randpool durch Haftung an der Endothelwand von Gefäßen vor allem in Lunge und Milz, der unter Anstrengung oder erhöhtem Adrenalin Spiegel rasch mobilisiert werden kann. Eine erhöhte Konzentration von neutrophilen Granulozyten im Blut kann demnach entweder aus einer gesteigerten Freisetzung von Zellen aus dem Knochenmark oder aber aus einer Verschiebung des Gleichgewichts zwischen marginalem und zirkulierendem Zellpool resultieren. Vor allem zu Beginn von akuten Infektionen ist ein Anstieg der Neutrophilenzahl im Blut festzustellen.

Die Aktivierung der Leukozyten erfolgt durch Faktoren wie C3a, C5a, PAF (Platelet activating factor), Faktor XIIa, Kallikrein, Leukotrien B4 sowie durch direkten Kontakt der Zellen mit Fremdoberflächen. Dabei kommt dem Komplementfaktor C5a eine bedeutende Rolle zu, da er aufgrund der Induktion von Chemotaxis, Aggregation und Margination der Neutrophilen zur Bindung der Granulozyten an das Gefäßendothel führt. (10; 37; 43; 53; 88; 95; 99; 103)

Die aktivierten neutrophilen Granulozyten setzen daraufhin ihre Granulainhalte sowie freie Sauerstoffradikale (respiratorischer Burst) frei. (28; 68)

Die Bindung dieser Zellen an das Gefäßendothel, die sogenannte Adhäsionsreaktion, erfolgt durch spezifische Adhäsionsmoleküle auf den Endothelzellen (E-Selectin [CD62E], P-Selectin [CD62P]) und Leukozyten

(CD11a,b,c/CD18, L-Selectin [CD62L]) und ist Voraussetzung für die nachfolgende transendotheliale Migration der Zellen ins Gewebe. Die relativ schwache Bindung an die Selectine ermöglicht den Zellen eine rollende Bewegung entlang dem Endothel in Richtung der Entzündung. Die auf der Oberfläche der aktivierten Granulozyten vermehrt exprimierten CD11b/CD18-Rezeptoren führen zu einer festen Bindung an interzelluläre Adhäsionsmoleküle ICAM-1 der Endothelzellen. (3; 51; 57; 68)

Die ebenfalls durch ihre hohe Phagozytosekapazität ausgezeichneten **Monozyten** wandern nach 2-3 Tagen Zirkulationszeit im Blut in das Gewebe aus und wandeln sich zu Makrophagen um, deren Besonderheit in der erhöhten Anzahl an Mitochondrien sowie lysosomalen Enzymen besteht. Monozyten und Makrophagen bilden zusammen das so genannte retikuloendotheliale System (= RES oder mononukleäres Phagozytensystem).

Die Aufgabe der **Lymphozyten** besteht in der spezifischen Immunabwehr des Blutes. Dabei lassen sich diese Zellen in B- und T-Lymphozyten unterteilen. Während die im Knochenmark gebildeten B-Lymphozyten nur 15 % dieser Zellform ausmachen und für die humorale Immunreaktion verantwortlich sind, stellen 70-80 % der Lymphozyten die im Thymus gebildeten sogenannten T-Zellen (CD4-Helfer- und CD8-Killer-Zellen) dar, die die spezifische zelluläre Abwehr des Körpers übernehmen. (37; 43; 103)

5.3 PMN-Elastase

Die PMN-Elastase ist eine aus drei Isoenzymen bestehende Serinprotease, die in hoher Konzentration in den azurophilen Granula der polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten enthalten ist. Dieses proteolytische Enzym weist bei geringer Substratspezifität ein Aktivitätsoptimum bei neutralen pH-Werten (pH 7,5-8,5) auf und besitzt ein Molekulargewicht von 33.-36.000 D.

(10; 14; 60; 63; 79)

Elastase ist zur Spaltung von Fibrinogen, Fibronectin, Kollagen, Elastin, Proteoglykanen, Plasminogen und Immunglobulinen in der Lage und verfügt daher über ein ausgeprägtes Destruktionspotential. Zudem besitzt dieses

Enzym die Fähigkeit, Gerinnungsproteasen zu verändern sowie ihre Hauptantagonisten zu inaktivieren und kann über die Bildung der anaphylaktisch und chemotaktisch wirksamen Komplementkomponenten C3a und C5a die Aktivierung des Komplementsystems herbeiführen.

(10; 33; 55; 60; 63; 75; 96)

PMN-Elastase ist zudem zur Abspaltung von Nukleotiden aus Endothelzellen fähig, was wiederum zur Synthese des Vasodilators PGI₂ führt. (95)

Die physiologische Bedeutung der PMN-Elastase sowie anderer in den Granula enthaltenen lysosomalen Enzymen besteht im intrazellulären Abbau von phagozytiertem Material in den sogenannten Phagolysosomen. Werden Granulozyten durch nicht zu phagozytierende besonders große Partikel oder artifizielle Membranen (z.B. im Verlauf eines kardiopulmonalen Bypasses) aktiviert oder erfolgt eine ausgeprägte Stimulation der Granulozyten, kommt es im Rahmen der sogenannten frustranen Phagozytose zu einer Freisetzung der lysosomalen Enzyme, darunter auch der PMN-Elastase, in den Extrazellulärraum. Dies wiederum führt zu einem Abbau wichtiger struktureller Komponenten des Interstitiums wie z.B. der Basalmembran von Gefäßen, der Lamina elastica von Arterienwänden, von Strukturproteinen des Lungengewebes sowie Kollagen. (14; 60; 76)

Den bedeutendsten, in hoher Konzentration im Plasma vorhandenen Inhibitor der PMN-Elastase stellt das α_1 -Antitrypsin dar. Dieser hoch polymorphe Serinproteaseninhibitor besitzt die Fähigkeit, die Elastase unter physiologischen Bedingungen innerhalb von Millisekunden nahezu irreversibel fest durch Komplexbildung zu binden und somit zu inaktivieren. Die Konzentration der im Komplex gebundenen Elastase gilt demnach als Kenngröße für die Granulozytenaktivierung. Der Normwert dieses Enzym-Inhibitor-Komplexes liegt bei etwa 22 $\mu\text{g/l}$ Plasma.

Nach einer Halbwertszeit von ca. einer Stunde wird der Elastase- α_1 -PI-Komplex dann über die Blutbahn dem RES speziell in der Leber zugeführt.

Ein weiterer zirkulierender Elastaseinhibitor ist das α_2 -Makroglobulin, das jedoch eine niedrigere Plasmakonzentration als α_1 -Antitrypsin sowie eine

geringere Affinität besitzt, da die Anzahl an Elastasebindenden Gruppen bei α_1 -Antitrypsin ca. 10mal höher ist als bei α_2 -Makroglobulin.

Bei Individuen mit vorliegendem Mangel an α_1 -Antitrypsin besteht aufgrund einer unzureichend kontrollierten Elastase-Aktivität ein erhöhtes Risiko für Gewebsschädigungen vor allem in der Lunge. So besteht beispielsweise durch die Degradierung des Elastins in der Lunge die Gefahr der Entstehung eines Emphysems. (2; 10; 11; 41; 60; 64; 91)

6. Das Endothel

Das Endothel stellt einen einschichtigen Zellverband dar, der die Gefäßwände auskleidet und somit das Gefäßlumen vom interstitiellen Raum trennt. Aufgrund der einschichtigen zelligen Auskleidung sowie der hohen Stoffwechselaktivität der einzelnen Zellen, besitzen die Wände der Blutgefäße eine selektive Permeabilität, die den Stoffaustausch zwischen Blut und umliegendem Gewebe ermöglicht. (25)

Die intakte Gefäßwand besitzt bestimmte physikalische und biologische Eigenschaften, die die Fluidität des Blutes und somit Thromboseresistenz gewährleisten. Um dies aufrecht zu erhalten befinden sich die am Endothel ablaufenden Prozesse der Aktivierung und Inhibition von humoralen und zellulären Mechanismen des Blutes stets im Gleichgewicht. Die Endothelzellen sind folglich zur Synthese von Substanzen in der Lage, die sowohl inhibierend, als auch fördernd auf Hämostase, Fibrinolyse und den Gefäßtonus einwirken können.

Die negativ geladene Oberfläche des Endothels führt aufgrund der gleichsinnigen elektrischen Ladung der Thrombozytenmembran und der damit einhergehenden Coulomb-Abstoßungskräfte zu einer Athrombogenität der Gefäßwand. Aber auch das in den Endothelzellen gebildete Heparansulfat und die Expression des Rezeptors Thrombomodulin, der zur Inaktivierung von Thrombin sowie Aktivierung von Protein C befähigt ist, bewirken eine thrombophobe Oberfläche.

Eine prokoagulatorische Wirkung des Endothels kann wiederum über die Bildung von vWF, F V, F XII-Aktivator, Gewebefaktor und dem PAF erzielt werden.

Die Weite des Gefäßlumens wird über die Synthese des Vasokonstriktors Endothelin-1 und die Vasodilatoren Prostacyclin (=PGI₂) und Stickstoffmonoxid (= endothelium-derived-relaxing factor = EDRF) reguliert.

Die Beeinflussung der Fibrinolyse erfolgt über die von den Endothelzellen gebildeten, die Fibrinolyse fördernden Substanzen wie t-PA und u-PA und die Freisetzung des antifibrinolytisch wirkenden PAI-1. (5; 17; 37; 58; 66; 94; 108)

Zudem besitzen die Zellen des Endothels die Fähigkeit, bestimmte Adhäsionsmoleküle und Rezeptoren auf ihrer Oberfläche zu exprimieren, die eine Anheftung und somit die Diapedese von Leukozyten (s. Kap. 5.2) ermöglichen und dem Endothel daher auch im Rahmen von Entzündungsreaktionen eine wichtige Rolle zugeordnet werden kann. (25; 60)

Bei chirurgischen Eingriffen unter kardiopulmonalem Bypass besteht das Risiko einer Verletzung der Gefäßwände, was eine Aktivierung der Endothelzellen und der am Endothel ablaufenden Prozesse zur Folge haben und somit das Wechselspiel zwischen Hämostase und Fibrinolyse aus dem Gleichgewicht gebracht werden kann. Darüber hinaus wird durch eine Läsion des Endothels ebenfalls die Leukozytenadhäsion und demnach die inflammatorische Reaktion beeinflusst. (37)

7. Biokompatibilität künstlicher Oberflächen

Unter dem Einsatz der Herz-Lungen-Maschine kommt es durch den Kontakt des Blutes mit der ca. 3 m² (108) großen artifiziellen Oberfläche zur Stimulierung von Koagulation, Fibrinolyse, Komplementsystem, Thrombozyten und Leukozyten. Das Ausmaß der Aktivierung dieser Blutkomponenten wird über die Bio- bzw. Hämkompatibilität der eingesetzten Materialien bestimmt. Biokompatibilität beschreibt somit die Verträglichkeit von Werkstoffen mit dem körpereigenen Gewebe und reflektiert demnach die Toleranz des menschlichen

Organismus gegenüber den künstlichen Materialien. Eine Fremdoberfläche wird dann als 100 % biokompatibel bezeichnet, wenn die Interaktion zwischen Blut und Oberfläche weder zu einer Aktivierung der oben beschriebenen Prozesse und zellulären Komponenten des Blutes, noch zu einer Freisetzung toxischer Stoffe aus dem verwendeten Material führt. Erhöhte Konzentrationen an bioaktiven Substanzen im Blut reflektieren somit eine unzureichende Biokompatibilität des eingesetzten Werkstoffes, der eine pathophysiologische Antwort des menschlichen Körpers hervorruft.

Die unzureichende Hämokompatibilität kann jedoch nicht als alleinige Ursache für die Beeinträchtigung der Körperfunktionen infolge des kardiopulmonalen Bypasses angesehen werden. Ebenso können weitere Faktoren wie Hämodilution, Hypothermie, Hämodynamik und auch der chirurgische Eingriff selbst schwerwiegende Folgen nach sich ziehen.

Eine Aktivierung von sowohl Blutgerinnung als auch inflammatorischem System während der extrakorporalen Zirkulation kann postoperativ zum so genannten Post-Perfusions-Syndrom führen, das mit Fieber nicht-infektiöser Ursache, renaler und pulmonaler Dysfunktion sowie neurologischen Veränderungen einhergeht und zu erheblichen Komplikationen bis hin zur systemischen Entzündungsreaktion (SIRS), zum akuten Lungenversagen (ARDS) oder Multiorganversagen (MOF) führen kann.

(37; 39; 40; 93; 106; 107; 108; 109; 112)

Da vor allem Fibrinogen sehr rasch die künstliche Oberfläche benetzt, hängt die Hämokompatibilität eines Biomaterials vor allem von der Adhäsion und Aggregation der Blutplättchen ab, da diese hauptsächlich durch den Fibrinogen-Rezeptor GP IIb-IIIa an die Fremdoberfläche gebunden werden. Als weitere Kriterien für die Thrombogenität der verwendeten Materialien gilt die Adsorption weiterer Plasmaproteine, wie hochmolekulares Kininogen (HMWK), Vitronektin oder F XII. (27; 84; 100; 108)

Die Bildung dieses so genannten Monolayers auf der künstlichen Oberfläche erfolgt innerhalb einer Sekunde nach Kontakt des Blutes mit dem Biomaterial. Dabei hängt die Anzahl der einzelnen adsorbierten Proteine zum einen von der jeweiligen Plasmakonzentration und zum anderen von den physikalischen und

chemischen Eigenschaften des verwendeten Materials ab. Zudem unterliegen die irreversibel gebundenen, immobilen Proteine einer Konformationsänderung, was zur Expression verschiedener Oberflächenrezeptoren führt und somit weitere Reaktionen in Gang gesetzt werden können. (17; 18)

Um die durch den Kontakt von Blut und Fremdoberfläche verursachte Aktivierung der oben genannten verschiedenen Blutkomponenten zu vermeiden, besteht neben der pharmakologischen Inhibition einzelner Schlüsselenzyme der Kaskadenreaktionen die Möglichkeit, die Hämostase der eingesetzten Materialien über die Vergütung der Oberflächen zu optimieren. Dabei können **bioaktive und biopassive Beschichtungstechniken** angewandt werden, deren Zielsetzung jeweils in der Verbesserung der Materialeigenschaften und somit der Biokompatibilität besteht. (27; 37; 108; 109)

Bei der biologisch aktiven Oberflächenbeschichtung werden Substanzen wie Heparin (Jostra Bioline), Hirudin, Phosphorylcholin, NO-Donatoren und Wachstumsfaktoren eingesetzt, die die antithrombotische Wirkung des Endothels imitieren und somit aktiv die Stimulierung der oben genannten Prozesse inhibieren sollen. (109)

Die biopassive Beschichtung von Oberflächen versucht durch die Verwendung von in Bezug auf das Blut annähernd passiven Materialien wie Silikone, lösliche Polymerkunststoffe, Hydrogele oder self assembling surfaces, eine inaktive, athrombogene Materialoberfläche zu erzielen und somit das natürliche Endothel nachzuahmen. (37; 109)

8. JOSTRA* Safeline

Die Safeline-Beschichtung stellt eine biopassive Vergütungsmethode dar. Es handelt sich hierbei um die Beschichtung der im extrakorporalen Kreislaufsystem verwendeten Materialien mit Polypeptiden, die über elektrostatische und van-der-Waal's-Kräfte physikalisch stabil an die artifizielle Oberfläche gebunden werden. Auf diese Weise soll durch den Einsatz dieses

synthetischen Proteins eine Hydrophilisierung der Fremdoberfläche herbeigeführt und somit ein natürliches Quasiendothel geschaffen werden.

Die Safeline-Beschichtung führt bei Kontakt mit dem Blut zu einer beschleunigten Benetzung und so zur Formation einer biologisch passiven Oberfläche, die eine weitere Adhäsion von Plasmaproteinen verhindert.

(109; 113)

* Das medizintechnische Unternehmen **JOSTRA AG** (Hirrlingen / Hechingen / Baden-Württemberg) wurde mittlerweile von der **MAQUET GmbH & Co. KG** (Rastatt / Baden-Württemberg) übernommen. Die **JOSTRA AG** war bisher führender Hersteller von Herz-Lungen-Maschinen sowie den dazugehörigen chirurgischen Verbrauchsmaterialien und wird nun mit der Übernahme durch Kernprodukte zur Operation von Herzpatienten wie OP-Leuchten und –Tische erweitert.

9. Fragestellung und Ziele der Arbeit

Mit Hilfe eines in vitro HLM-Modells wurde in der vorliegenden Studie die Hämokompatibilität von Membranoxygenatoren mit biopassiver Oberflächenbeschichtung (Safeline) getestet und beurteilt.

Dazu wurden verschiedene Oxygenatoren der Safeline-Serie (je 5) 120 Minuten lang der extrakorporalen Zirkulation unterzogen und zu immer gleich bleibenden Abnahmezeitpunkten die Konzentrationen bestimmter Gerinnungsparameter (Thrombozyten, β -Thromboglobulin, TAT, freies Hämoglobin) sowie Marker des inflammatorischen Systems (PMN-Elastase, SC5b-9, Leukozyten) gemessen. Eine Reihe von unbeschichteten Oxygenatoren diente dabei als Kontrollgruppe. Zusätzlich wurde eine Gruppe von Safeline Oxygenatoren vor Versuchsbeginn mit einer heparinisierten Lösung vorgespült, um eine durch diese Modifizierung mögliche Optimierung der Oberflächeneigenschaften zu untersuchen.

Anhand der ausgewerteten Ergebnisse konnte das Ausmaß der Aktivierung dieser Blutkomponenten und somit eine Beurteilung der Biokompatibilität der eingesetzten Oxygenatoren erfolgen.

II. MATERIAL UND METHODEN

1. Versuchsdurchführung

In der vorliegenden Studie erfolgte in einem kurzgeschlossenen in-vitro-HLM-Modell die 120minütige Rezirkulation von ca. 500 ml Frischblut sowie Blutzusätzen.

Insgesamt zirkulierten nach dem Erreichen der gewünschten Pumpenumdrehungszahl 3 l Blut/min durch das Oxygenatorsystem.

Bei stets gleich bleibender Versuchsanordnung kamen folgende QUADROX Hohlfasermembranoxygenatoren der Firma JOSTRA zum Einsatz:

<i>Versuchsreihe I</i>	:	QUADROX non-coated
<i>Versuchsreihe II</i>	:	QUADROX Safeline treated
<i>Versuchsreihe III</i>	:	QUADROX Safeline Y
<i>Versuchsreihe IV</i>	:	QUADROX Safeline USA

Die Oxygenatoren der II. Versuchsreihe wurden vor Beginn des Versuchs für eine Stunde bei einer Fließrate von 1 l/min mit 600 ml temperierter (28°C) Vorspüllösung* gespült, wobei die Hälfte der Oxygenatoren zusätzlich mit der Vorspüllösung zugesetztem Heparin kontaktiert wurde. Nach der einstündigen Rezirkulation wurde diese Lösung wieder aus dem Oxygenatorsystem abgelassen.

* Die **Vorspüllösung** setzte sich wie folgt zusammen:

- 156,6 ml Glucose (Glucosteril®5% , Fresenius Kabi, Bad Homburg, D)
- 31,4 ml NaHCO₃ (Natriumhydrogencarbonat8,4%, Braun Melsungen, D)
- 412 ml Ringer-Lactat-Lösung (Fresenius, Bad Homburg, D)
bzw.

- 411 ml Ringer-Lactat-Lösung und zusätzlich 1 ml Liquemin® N 25.000 (Hoffmann-LaRoche AG, D)

Bei allen Versuchsreihen wurde vor Versuchsbeginn 300 ml **Priming** zur Hämodilution in das System gefüllt. Zur Anwendung kam dabei immer eine isotone, isoionische Vollelektrolytlösung, die folgende Inhaltsstoffe enthält:

- 78,3 ml Glucose: Glucosteril®5% der Firma Fresenius Kabi, Bad Homburg, D mit Glucose-Monohydrat als Wirkstoff → zur Aufrechterhaltung des Erythrozytenstoffwechsels

- 15,7 ml NaHCO₃: Natriumhydrogencarbonat 8,4%, Infusionslösungskonzentrat B. Braun Melsungen, D → zur Aufrechterhaltung des physiologischen pH-Wertes des Blutes, da NaHCO₃ ein schwach basischer Puffer ist

- 206 ml Ringer-Lactat: Ringer-Lactat-Lösung, Fresenius, Bad Homburg, D → zur Hämodilution;

1 l dieser Lösung enthält:

NaCl	6,00 g
Natriumlactat-Lsg.	6,34 g
KCl	0,40 g
CaCl ₂ H ₂ O	0,27 g
pH-Wert	5-7

Durch die Anwendung von blutfreien physiologischen Flüssigkeiten im extrakorporalen Kreislaufsystem soll zum einen eine verminderte Viskosität des Blutes und verbesserte Organperfusion erreicht werden, zum anderen werden im so verdünnten Blut die Gerinnungsvorgänge weniger stark aktiviert, aber auch die Sauerstofftransportkapazität vermindert. Dabei sollte jedoch beachtet werden, dass ein Hämatokrit von mindestens 20-30 % aufrechterhalten wird, da

das Priming-Volumen den Hämatokrit um ca. $\frac{2}{3}$ des präoperativen Wertes reduziert. (32; 105)

Die in diesem Versuch verwendeten, aus der Blutbank bezogenen Blutkonserven enthielten 2000 U Liquemin® 25.000/5 ml (Fa. Hoffmann-LaRoche AG, D) in 35 ml physiologischer NaCl, d.h. 400 µl Liquemin® in 35 ml isotonischer Kochsalzlösung (9,0 g NaCl/l; Fresenius Kabi Deutschland GmbH) um das Blut ungerinnbar zu machen. Noch vor der ersten Probeentnahme wurden diese Konserven zur Berechnung der noch hinzuzugebenden Heparinmenge (Restheparin) gewogen, um unter Berücksichtigung des Beutelgewichts das Blutgewicht x g zu ermitteln:

- Blutgewicht ÷ Blutdichte 1,07 = Blutvolumen [ml]

- Maschinenfüllvolumen = Blutvolumen [ml]
 - 17,2 ml (= 1.Probeentnahme aus der Konserve)
 - + 300 ml Priming

- benötigte Gesamtheparineinheiten = Heparineinheiten/ml
x Maschinenfüllvolumen

- Heparinkonzentration = 5000 U/ml
 - daraus lässt sich die noch hinzuzugebende Heparinmenge berechnen und durch Verdünnung von Liquemin® mit isotonischer Kochsalzlösung herstellen
 - von der oben beschriebenen Verdünnung wurden 1 ml der Blutkonserve hinzugefügt

Bei der Vorbereitung des Blutentnahmebeutels sowie zur vollständigen Heparinisierung der Konserve wurde das hochmolekulare Heparin Liquemin® N 25.000 der Firma Hoffmann-LaRoche AG, D verwendet. In 5 ml dieser

wässrigen Injektionslösung sind 25.000 I.E. Heparin aus der Schweinedarm-Mucosa enthalten.

Nachdem die erste Probe aus der Blutkonserve entnommen wurde, erfolgte zur vollständigen Heparinisierung (3 IU/ml) des Maschinenfüllvolumens die Zugabe des errechneten Restheparins.

Anschließend wurde das heparinisierte Blut mit Hilfe des Transfusionsbestecks Sangopur® 40 µm der Firma Braun, Melsungen, D in den als Reservoir dienenden Transfusionsbeutel (800 ml) der Firma JOSTRA, D gefüllt und das HLM-Modell nach Entlüftung des Systems sowie Verschließen des Zugangs mit Arterienklemmen gestartet.

Die weiteren Proben wurden wie folgt entnommen:

2. *Abnahmezeitpunkt:* nach **1 min** Rezirkulation
3. *Abnahmezeitpunkt:* nach **5 min** Rezirkulation
4. *Abnahmezeitpunkt:* nach **10 min** Rezirkulation
5. *Abnahmezeitpunkt:* nach **20 min** Rezirkulation
6. *Abnahmezeitpunkt:* nach **30 min** Rezirkulation
7. *Abnahmezeitpunkt:* nach **60 min** Rezirkulation
8. *Abnahmezeitpunkt:* nach **120 min** Rezirkulation

Zudem wurden aufgrund der ungenügenden Durchmischung des Blutes an der Entnahmestelle vor jedem Abnahmezeitpunkt ca. 2 ml Blut verworfen.

Die Entnahme der Proben erfolgte immer in der gleichen Reihenfolge mit S-Monovetten der Firma Sarstedt, Nümbrecht, D:

- a) **4,5 ml CTAD-Monovette** für die Bestimmung von β -Thromboglobulin:
In eine 4,5 ml Neutralmonovette wurden 450 µl CTAD-Medium aus einem CTAD-Vacutainer (Roche Diagnostics, Mannheim, D) überpipettiert.
Nach der Blutabnahme wurde die Monovette bis zur Zentrifugation für mindestens 15 min, aber höchstens eine Stunde in ein Eisbad gestellt.

- b) **2,7 ml EDTA-Monovette** für die Zählung von Leukozyten und Thrombozyten, sowie die Bestimmung von SC5b-9:

Diese Monovette enthält 1,6 mg EDTA/ml Blut. Die Zählung der Leukozyten und Thrombozyten im EDTA-Blut erfolgte direkt nach der Probeentnahme mit dem Sysmex K-1000, Hämatologie-System. Anschließend wurde die EDTA-Monovette bis zur Zentrifugation in ein Eisbad gestellt.

- c) **10 ml Citratmonovette** zur Bestimmung von TAT, PMN-Elastase und freiem Hämoglobin:

Diese Monovette enthält 1 ml Citrat (0,106 mol/l) und wurde nach der Probeentnahme bis zur Zentrifugation bei Raumtemperatur stehengelassen.

Während die CTAD- und EDTA-Monovetten für 30 min bei 4°C und 2000 g zentrifugiert wurden, erfolgte die Zentrifugation der Citratmonovetten für 20 min bei Raumtemperatur (20°C) und 2000 g.

Folgende Zentrifugen kamen dabei zur Anwendung:

- Varifuge RF, Heraeus Instruments, H.Holding Stuttgart, D
- Heraeus Cryofuge800, D

Zur weiteren Verarbeitung der Proben wurde das Plasma in Safe-Lock-Reaktionsgefäße der Firma Eppendorf abpipettiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -20°C bis zur Aufarbeitung aufbewahrt.

2. Herz-Lungen-Maschine

Mit Hilfe eines kurzgeschlossenen in-vitro-HLM-Modells wurde die Hämokompatibilität folgender QUADROX Oxygenatoren der Firma JOSTRA, D untersucht:

- **QUADROX Safeline treated**, mit Polypeptiden beschichtet (Beschichtungsbedingungen: niedrige HA-Konzentration, höherer pH-Wert);
- **QUADROX Safeline Y**, mit einer erhöhten Konzentration an Polypeptiden beschichtet;
- **QUADROX Safeline USA**, mit Polypeptiden beschichtet (Beschichtungsbedingungen: hohe HA-Konzentration, niedriger pH-Wert);
- **QUADROX non-coated** (ohne Beschichtung)

Bei den QUADROX Oxygenatoren handelt es sich um Hohlfasermembranoxygenatoren bestehend aus zwei Membranpaketen. Während in beiden Kammern über mikroporöse Oxygenationsfasern die Oxygenation sowie CO₂-Elimination des Blutes stattfindet, verfügt die erste Kammer zusätzlich über einen integrierten Wärmetauscher, der dazu dient, das einströmende Blut auf eine Temperatur von 28°C zu bringen. Unterstützt wurde die Wärmeregulation in diesem Versuch von einem externen Hypothermieregler bestehend aus einem Thermostat (Haake N3, D) und einem Wasserbad (Haake K200, D).

An ihrer Spitze verfügen diese Oxygenatoren außerdem über eine Entlüftungsmembran zur Elimination von Luft aus dem System.

Der für die Oxygenation notwendige Gasfluss betrug 1 l/min.

Die Simulation der extrakorporalen Zirkulation erfolgte in dieser Studie mit Hilfe eines kurzgeschlossenen in-vitro-HLM-Modells, in dem die Oxygenatoren über ein Schlauchsystem mit einem als Reservoir dienenden Transfusionsbeutel der Firma JOSTRA (Vol. 800 ml) verbunden wurden. Um während des Versuches einen nicht-pulsatilen, kontinuierlichen Blutstrom zu gewährleisten wurde eine Rollerpumpe (Stöckert Instr. München, D, Typ 10-40-00) eingesetzt, deren

Okklusion mittels Schraubklemmen genau eingestellt wurde, um den gewünschten arteriellen Blutdruck von 60 mmHg während der gesamten Zirkulationszeit aufrechtzuerhalten.

Das verbindende Schlauchsystem bestand aus PVC-Schläuchen 3/8" x 3/32" der Firma JOSTRA/Raumedics, wobei die Länge des Schlauches vom arteriellen Ausgang des Oxygenators zum Transfusionsbeutel 40 cm und die des Schlauches vom Transfusionsbeutel zum venösen Eingang des Oxygenators 140 cm betrug.

Diese Schläuche wurden über Konnektoren der Firma JOSTRA (1/2" x 3/8") mit dem Transfusionsbeutel verbunden und ein am Konnektor angeschlossener 3-Wege-Hahn (Discofix® der Firma Braun, Melsungen, D) diente über einen aufgesetzten Multi-Adapter (Firma Sarstedt, Nümbrecht, D) der Probeentnahme. Mit einem ebensolchen Multi-Adapter wurde der seitliche Ausgang des anderen Konnektors verschlossen.

Um die Biokompatibilität der Oxygenatoren zu beurteilen, erfolgte die Untersuchung des Blutes auf folgende koagulatorische und inflammatorische Parameter:

- *Thrombozyten*
- *β-Thromboglobulin*
- *Thrombin-Antithrombin-III-Komplex (TAT)*
- *Hämolyse*
- *Leukozyten*
- *PMN-Elastase*
- *SC5b-9*

3. Testmethoden

3.1 Leukozyten und Thrombozyten

Die Zählung der Leukozyten und Thrombozyten wurde mit dem Hämatologie-System Sysmex® K-1000 der DIGITANA AG, Hamburg, D durchgeführt.

Systemaufbau:

Der Sysmex K-1000 setzt sich aus einem hydraulischen, elektrischen und pneumatischen System zusammen.

Während das hydraulische System für das Ansaugen, Pipettieren, Verdünnen, Mischen und Lysieren verantwortlich ist, dient die elektrische Einheit der Analyse und Berechnung der zuvor vom hydraulischen System gemessenen Signale sowie der anschließenden Kontrolle der Ergebnisse.

Die für die Steuerung der Ventile und den Ablauf der Probenmessung im hydraulischen System erforderliche Erzeugung von konstantem Druck und Vakuum wird vom pneumatischen System übernommen.

Prinzip der Zellzählung:

Aufgrund der unterschiedlichen elektrischen Leitfähigkeit von Blut und Verdünnungslösung kann die Zählung von Leukozyten und Thrombozyten nach dem elektrischen Widerstandsprinzip erfolgen:

Ein Teil der verdünnten Probe wird durch eine Messöffnung gesaugt, durch die ein konstanter Gleichstrom fließt. Tritt eine Blutzelle durch diese Öffnung wird von ihr eine ihrem Volumen entsprechende Menge an Verdünnungslösung verdrängt. Die so erzeugte Widerstandsänderung ist proportional der daraufhin eintretenden Spannungsänderung. (Nach dem Ohm'schen Gesetz gilt: $U = R \times I$; da hier I konstant ist gilt: $U \sim R$.) Somit ist das Zellvolumen der Widerstandsänderung und damit auch der Spannungsänderung proportional.

Nach Verstärkung dieser Spannungsänderung erfolgt die Übertragung derselben zur Beseitigung von Störpulsen an einen Diskriminatorkreis.

Reagenzien:

- Verdünnungsmittel (Diluent): Sysmex CELLPACK (PK30L), eine isotone Kochsalzlösung zur Verdünnung der Vollblutproben
- Lysemittel für die Leukozytenmessung: Stromatolyser-3WP, bewirkt eine vollständige Lyse der Erythrozyten

a) Leukozytenzählung:

Verdünnung der Vollblutprobe: 1:250
Probenvolumen: 0,012 µl
Diluent-Volumen: 1,988 ml
Lysemittel: 1 ml

Für die Zählung werden 0,4 ml Suspension durch eine Kapillare von 100 µm Durchmesser gesaugt.

Unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors wird die Konzentration der Leukozyten in $n \times 10^3/\mu\text{l}$ angegeben.

b) Thrombozytenzählung:

Endverdünnung der Vollblutprobe: 1:25.000
1. Verdünnung: 1:500
Probenvolumen: 0,004 ml
Diluent-Volumen: 1,996 ml
2. Verdünnung: 1:50
1. Verdünnung Probenvolumen: 0,040 ml
Diluent-Volumen: 1,960 ml

Für die Zählung werden 0,25 ml Suspension durch eine Kapillare von 75 µm Durchmesser gesaugt.

Unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors wird die Konzentration der Thrombozyten in $n \times 10^3/\mu\text{l}$ angegeben.

3.2 β-Thromboglobulin

Zur Bestimmung des β-Thromboglobulins (β-TG) wurden Reagenzien und die Laborvorschrift ASSERACHROM® β-TG der Firma Diagnostica Stago, Asnières, Frankreich verwendet.

Testprinzip:

Dieser enzymimmunologische in-vitro Test dient der quantitativen Bestimmung von β-TG nach dem Prinzip der Sandwich-Technik.

Bei der ersten Immunreaktion bindet das β-TG der Probe an auf der Oberfläche der Mikrotitrationsplatte fixierte spezifische Antikörper gegen β-TG. Da β-TG mehrere antigene Determinanten besitzt, werden in der zweiten Immunreaktion mit POD-markierten β-TG-Antikörpern Sandwich-Komplexe gebildet, indem diese an die freien Bindungsstellen des β-TG binden.

Somit stellt die Menge der Sandwich-Komplexe ein Maß für den β-TG-Gehalt der Probe dar.

Im anschließenden Waschvorgang erfolgt die Entfernung des überschüssigen POD-Konjugats und nach Zusatz von Harnstoffperoxid und Chromogen (o-Phenylendiamin) und Abstoppen der Farbreaktion die photometrische Bestimmung der gebundenen POD-Aktivität.

Reagenzien:

- Mikrotitrationsstreifen, beschichtet mit Anti-β-TG
- Antikörper-POD-Konjugat (Anti-β-TG-Peroxidase)

- Lsg.2: Antikörper-POD-Konjugat (lyophilisiert) + 8 ml Lsg.4
- Substrat: o-Phenylendiamin (6 Tabl. à 2 mg)
Peroxid: Harnstoffperoxid (6 Tabl. à 5 mg)
- Lsg.3: Substratlösung: je 2 Tabletten in 8 ml Aqua dest. lösen
- Lsg.4: Puffer-Konzentrat bestehend aus Albumin, Tween 20 und Phosphat-Puffer; 1:10 mit Aqua dest. verdünnt
 - Lsg.5: Waschlösung-Konzentrat bestehend aus NaCl und Tween 20; 1:20 mit Aqua dest. verdünnt
 - Lsg.6: β -TG-Standard (für die Eichkurve, lyophilisiert) in 2 ml Lsg.4 lösen
 - Lsg.7: β -TG-Kontrolle (lyophilisiert) in 2 ml Lsg.4 lösen

Testdurchführung:

Zu Beginn wird das Probenplasma mit Lsg.4 verdünnt.

Anschließend werden 200 μ l der verdünnten Probe, β -TG-Standard, Kontrolle oder Lsg.4 (= Leerwert) in die Vertiefungen der Mikrotitrationsstreifen pipettiert. Nach einstündiger Inkubation bei 15-25°C erfolgt das Waschen der Mikrotiterplatte und die anschließende Zugabe von je 200 μ l Lsg.2. Nach einer weiteren Inkubationszeit von einer Stunde sowie einem erneuten Waschschrift wird Lsg.3 zugegeben und für genau 3 min inkubiert. Die Substratreaktion wird dann mit Salzsäure 1 mol/l abgestoppt. Die Extinktionen werden bei 492 nm am ELISA-Reader (Fa. Dynatech, Denkendorf, D) abgelesen und die Konzentrationen anhand der doppelt-logarithmischen Standardkurve ermittelt.

3.3 TAT (Thrombin-Antithrombin III-Komplex)

Die Bestimmung von TAT erfolgte mit Reagenzien und Laborvorschrift Enzygnost® TAT micro der Firma Dade Behring, Marburg, D.

Testprinzip:

Zur Bestimmung des Human-Thrombin-Antithrombin III-Komplexes wurde ein Enzymimmunoassay nach dem Prinzip der Sandwich-Technik angewendet. Im ersten Inkubationsschritt bindet das TAT der Probe an die mit Antikörpern gegen Thrombin beschichtete Oberfläche der Mikrotitrationsplatte. Die zweite Inkubation beinhaltet die Bindung von POD-konjugierten Antikörpern gegen Human-AT III an die freien AT III-Determinanten. Nach dem Auswaschen der überschüssigen Enzym-konjugierten Antikörper erfolgt die Bestimmung der gebundenen Enzymaktivität. Die enzymatische Umsetzung von H₂O₂ und Chromogen wird durch Zugabe von verdünnter Schwefelsäure gestoppt und die der Konzentration von TAT proportionale Farbintensität photometrisch bestimmt.

Reagenzien:

- Enzygnost TAT micro: Mit Kaninchen-Antikörpern gegen Human-Thrombin beschichtete Mikrotitrationsplatten
- Lsg.1: Konjugat-Lösung:
enthält 200 µl Anti-Human-ATIII/POD-Konjugat und 11 ml Konjugat-Puffer;
Anti-Human-ATIII/POD-Konjugat:
Anti-Human-ATIII, Peroxidase-konjugiert, vom Kaninchen;
Konjugat-Puffer:
Enthält TRIS-Pufferlösung (50 mmol/l) und Serumalbumin vom Rind;
- Lsg.2: TAT-Standard-Plasmen S1 bis S4 (human):
Konzentrationsbereich 2 bis 60 µg/l;
- Lsg.3: TAT-Kontrollplasma (human)
- Lsg.4: Proben-Puffer (TAT):
Enthält TRIS-Pufferlösung (100 mmol/l), Tween (10 ml/l) und EDTA (37 g/l);
- Lsg.5: Waschlösung POD:

Tween-haltige (18 g/l) Phosphat-Pufferlösung (90 mmol/l);

- Lsg.6: Puffer/Substrat POD:

Wasserstoffperoxid (0,3 g/l) in Citrat-Pufferlösung;

- Lsg.7: Chromogen POD:

o-Phenylendiamin-dihydrochlorid

- Lsg.8: Stopplösung POD:

0,5 N Schwefelsäure

Testdurchführung:

In jede Vertiefung wird 50 µl Probenpuffer und anschließend 50 µl Standard, Kontrolle oder Probe pipettiert. Es folgt dann eine 15minütige Inkubation der Probe bei 37 °C und ein Waschvorgang. Nach Zugabe von je 100 µl Konjugat-Lösung wird die Mikrotitrationsplatte erneut für 15 min bei 37°C inkubiert und gewaschen. Anschließend wird in jede Vertiefung 100 µl Chromogen-Puffer/Substrat-Lösung zupipettiert und bei 20-25°C für 30 min lichtgeschützt inkubiert. Nach Zugabe von je 100 µl Stopplösung werden die Extinktionen bei einer Meßwellenlänge von 492 nm am ELISA-Reader (MR7000, Fa. Dynatech, Denkendorf, D) abgelesen und die Probenkonzentrationen direkt anhand der mitgeführten Standardkurve berechnet und in µg/l angegeben.

3.4 Hämolyse (freies Hämoglobin)

Das in der Blutprobe enthaltene freie Hämoglobin wurde mit Hilfe des MP3 Hämoglobin-Farbttests der Firma Roche Diagnostics, Mannheim, D bestimmt.

Testprinzip:

Das Serum-Hämoglobin wird mit Cyanid und Ferricyanid versetzt und als Hämoglobin-Cyanid gemessen:



Die Messung erfolgt bei einem Absorptionsmaximum von 546 nm sowie bei 691 nm als Leerwert.

Reagenzien:

- Lsg.1: Kalium-Hexacyanoferrat-III
- Lsg.2: Kalium-Cyanid

Vorbereitung der Reaktionslösung:

25 ml der Lsg.1 werden auf 1000 ml mit Aqua dest. aufgefüllt und 2 ml der Lsg.2 zupipettiert.

Testdurchführung:

0,25 ml Serum werden zunächst mit 1 ml Reaktionslösung vermischt und für 3 min stehengelassen. Anschließend erfolgt die Messung der Extinktionen gegen die Reaktionslösung bei Wellenlängen von 546 nm und 691 nm.

Der Hämoglobin-Gehalt in 100 ml Serum berechnet sich folgendermaßen:

$$(E_{546} - E_{691}) \times 746 = \text{mg Hb}/100 \text{ ml Serum}$$

3.5 PMN-Elastase

Für den Nachweis der PMN-Elastase kamen Reagenzien und die Laborvorschrift MERCK Immunoassay, Darmstadt, D zur Anwendung.

Testprinzip:

Dieser heterogene Enzymimmunoassay dient der spezifischen Bestimmung der PMN-Elastase aus polymorphnukleären Leukozyten im Komplex mit dem PMN-Elastase- α_1 -Proteinaseinhibitor (PI).

Im ersten Inkubationsschritt bindet der PMN-Elastase- α_1 -PI-Komplex der Probe mit dem PMN-Elastase-Teil an die mit Antikörpern beschichtete Röhrchenwand.

Beim zweiten Inkubationsschritt erfolgt die Zugabe von mit alkalischer Phosphatase (AP) markierten Antikörpern, die an den freien α_1 -PI-Teil des Komplexes binden. Im nachfolgenden Waschvorgang werden die überschüssigen Antikörper ausgewaschen und die enzymatische Aktivität der gebundenen AP-markierten Antikörper photometrisch bestimmt. Dabei ist die Menge an gebildetem Farbstoff der PMN-Elastase- α_1 -PI-Konzentration direkt proportional.

Reagenzien:

- Lsg.1-4: Kalibratoren 1-4
enthält gelatinehaltigen TRIS-Puffer 20 μ mol und einen PMN-Elastase- α_1 -PI-Komplex;
- Lsg.5: Kontrollplasma
enthält Plasma (Schaf) versetzt mit einem PMN-Elastase- α_1 -PI-Komplex;
- Lsg.6: Probenverdünnungsmedium
enthält Phosphatpuffer pH 7,5 20 mmol/l;
- Lsg.7: Waschlösung:
enthält H₂O und Detergenz;
- Lsg.8: Substratlösung:
enthält 1 Tablette AP-Substrat in 10 ml AP-Puffer gelöst
AP-Substrat:
enthält 20 μ mol 4-Nitrophenylphosphat pro Tablette
AP-Puffer:
Diethanolamin pH 9,81 mol/l, MgCl₂ 0,5 mmol/l
- Lsg.9: Stopplösung:
NaOH 2 mol/l
- Lsg.10: AK-beschichtete Röhrchen
Anti-PMN-Elastase-(human)-Antikörper vom Schaf
- Lsg.11: AK-Enzym-Konjugat
Anti- α_1 -PI-(human)-Antikörper vom Kaninchen gekoppelt mit AP
- Lsg.12: AK-Enzym-Konjugat-Puffer 25 ml

Enthält TRIS pH 7,5 (0,25 mmol) und MgCl₂ 0,05 mmol für die Herstellung der AK-Enzym-Lsg.

Testdurchführung:

Vorbereitend werden 50 µl des Proben- sowie des Kontrollplasmas mit je 2500 µl Verdünnungsmedium verdünnt.

Zunächst erfolgt die Zugabe von je 1000 µl der Waschlösung (Lsg.7) in die Röhrchen, die nach 5-20minütiger Inkubation bei 20-25°C wieder abgesaugt wird. Anschließend werden je 500 µl Kalibratoren, Kontrollplasma und Probenplasma zupipettiert und für 60 min bei 20-25°C inkubiert. Nach einem weiteren Waschvorgang werden die Röhrchen mit je 500 µl Lsg.12 versetzt, eine halbe Stunde bei 20-25°C inkubiert und erneut gewaschen. Dann wird jeweils 500 µl Substratlösung zugegeben, für 30 min lichtgeschützt bei 20-25°C inkubiert und die Reaktion anschließend mit 100 µl Stopplösung (Lsg.9) abgestoppt.

Die Messung der Extinktionen erfolgt bei einer Meßwellenlänge von 405 nm. Die Konzentrationen der Proben können dann anhand der mitgeführten Kalibrationskurve ermittelt werden (µg/l)

3.6 SC5b-9 (TCC = Terminal Complement Complex)

Die Bestimmung der SC5b-9-Komplexe wurde mit dem Enzymimmunoassay SC5b-9 Komplex der Firma Quidel®, San Diego, USA durchgeführt.

Testprinzip:

Das SC5b-9 der Probe bildet im ersten Inkubationsschritt mit auf der Oberfläche der Mikrotiterplatte fixierten monoklonalen Anti-human SC5b-9 Antikörpern Komplexe. Bei der zweiten Inkubation findet eine Reaktion zwischen Meerrettich-Peroxidase konjugierten Antikörpern, die spezifisch zu den SC5b-9 Antigenen sind und den Komplexen aus SC5b-9 und den SC5b-9-Antikörpern

statt. Nach einem Waschvorgang zur Entfernung der ungebundenen Komponenten wird Substrat zupipettiert, das mit dem gebundenen Peroxidase-Konjugat reagiert. Die durch enzymatische Aktivität entstandene Farbintensität der Probe ist der Konzentration an SC5b-9 in der Probe proportional und wird photometrisch bestimmt.

Reagenzien:

- mit monoklonalen Anti-human SC5b-9 Antikörpern (Maus) beschichtete Mikrotiterstreifen
- Waschpufferkonzentrat 20xKonzentrat:
enthält PhosphatPuffer PBS, 0,05 % TWEEN und 0,01 % Thimerosal
- Standards A, B, C:
enthält SC5b-9 in humanem Serum und 0,01 % Thimerosal
- Hoch positive Kontrolle:
enthält SC5b-9 in humanem Plasma und 0,01 % Thimerosal
- Schwach positive Kontrolle:
enthält SC5b-9 in humanem Plasma und 0,01 % Thimerosal
- Probenverdünnungspuffer:
enthält PBS, 0,05 % Tween 20 und 0,01 % Thimerosal
- Konjugat:
enthält Anti-human SC5b-9 von der Ziege, Peroxidase-konjugiert, PBS und 0,01 % Thimerosal
- Substrat Verdünnungspuffer:
enthält 0,1 M Citrat Puffer mit 0,05 % H₂O₂
- Substrat Konzentrat:
enthält 0,75 % 2-2'-Azino-di-(3-Ethylbenzthiazol schweflige Säure) Diammonium Salz; kurz vor dem Gebrauch werden 50 µl Konzentrat in 1 ml Verdünnungspuffer gelöst.
- Stopplösung: 0,25 M Oxalsäure

Testdurchführung:

Je 100 µl der mit Probenverdünnungspuffer verdünnten Proben, Kontrollen und Standards werden in die dafür vorgesehenen Vertiefungen pipettiert und die abgedeckte Platte bei Raumtemperatur für eine Stunde inkubiert. Nach 5maligem Waschen mit je 300 µl Waschpuffer-Gebrauchslösung wird je 50 µl SC5b-9-Konjugat in die Vertiefungen gegeben, erneut bei Raumtemperatur für eine Stunde inkubiert und der Waschvorgang wiederholt. Anschließend folgt die Zugabe von je 100 µl der angesetzten Substratlösung sowie eine 30minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Die enzymatische Reaktion wird mit je 50 µl Stopplösung abgestoppt und die optische Dichte bei einer Meßwellenlänge von 405 nm gegen den Leerwert gemessen. Die Konzentrationen werden dann anhand der Kalibrationskurve in ng/ml ermittelt.

4. Statistische Auswertung der Ergebnisse

4.1 Hämatokrit-Korrektur

Die Hämatokrit-Korrektur ermöglicht den statistischen Vergleich der Parameterwerte der einzelnen Gruppen.

Um die durch Hämodilution verursachte Verdünnung des Blutes und die somit veränderte Plasmakonzentration der Untersuchungsparameter auszugleichen, erfolgte die Multiplikation der zu den verschiedenen Abnahmezeiten gemessenen Werte jeweils mit dem sogenannten Korrekturfaktor F, der HLM-abhängig ermittelt und wie folgt berechnet wurde:

$$F = \frac{\text{Gesamtvolumen (=Maschinenfüllvolumen)}}{\text{Probenvolumen (=Konservenvolumen)}}$$

4.2 Statistischer Vergleich

Aus den Hämatokrit-korrigierten Werten wurde für alle Parameter zu den verschiedenen Abnahmezeitpunkten jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung (sd) berechnet. Die Werte der ersten Abnahme wurden zur besseren Vergleichbarkeit mit 100 % gleichgesetzt und die im weiteren Verlauf des Versuchs ermittelten Werte als Prozentänderung bezüglich dieses Ausgangswertes im Diagramm dargestellt.

Für den statistischen Vergleich der einzelnen Gruppen wurde die einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) des Programms Excel 2000 angewendet.

Zur Abschätzung der statistischen Signifikanz gilt bei einer angenommenen Irrtumswahrscheinlichkeit von $p = 0,05$:

$p > 0,05$: kein statistisch signifikanter Unterschied

$p < 0,05$: statistisch **signifikanter** Unterschied

$p < 0,01$: statistisch **hoch signifikanter** Unterschied

III. ERGEBNISSE

1. Thrombozyten

1.1 Vergleich der Safeline-Oxygenatoren mit den unbeschichteten Oxygenatoren:

Bei dem Vergleich der unbeschichteten mit den Safeline-Oxygenatoren ließ sich zwischen ein- und 5minütiger Rezirkulation ein statistisch signifikanter Unterschied feststellen. In der unbeschichteten Gruppe zeigte sich initial ein deutlich stärkerer Abfall der Thrombozytenkonzentration von $220 \pm 35 \times 10^3/\mu\text{l}$ auf $18 \pm 11 \times 10^3/\mu\text{l}$, was 8 % des Anfangswertes entspricht. Bei den Safeline-Oxygenatoren waren nach 5 Minuten noch 28,1 % der anfänglichen Plättchenkonzentration vorhanden. Nach 20 Minuten erreichte der Thrombozytenwert in der polypeptidbeschichteten Gruppe den minimalen Wert von $23 \pm 8 \times 10^3/\mu\text{l}$, was 7,9 % der Ausgangskonzentration entspricht und auf eine massive Reduktion der Plättchenzahlen hinweist. Der Minimalwert in der unbeschichteten Gruppe betrug 4,8 % der Ausgangskonzentration. Zum Abnahmezeitpunkt nach halbstündiger Rezirkulation konnte in beiden Gruppen ein Anstieg der Thrombozytenwerte verzeichnet werden.

AZP [min]	n	non-coated [x10³/μl]		Safeline [x10³/μl]		p
		Mittelwert	sd	Mittelwert	sd	
0	5	220	35	291	67	0,0968113
1	5	67	33	198	52	0,0028247
5	5	18	11	81	29	0,0037176
10	5	11	12	29	15	0,1083515
20	5	17	10	23	8	0,3501187
30	5	15	14	35	12	0,0640505
60	5	43	29	74	15	0,0990360
120	5	95	29	128	21	0,1006636

Tab 1.1 Thrombozyten: Vergleich Safeline – non-coated

1.2 Vergleich der Safeline Y-Oxygenatoren mit den unbeschichteten Oxygenatoren:

Bei dem statistischen Vergleich der unbeschichteten und Safeline Y-Oxygenatoren wurde schon nach einer Minute Versuchslaufzeit ein statistisch hoch signifikanter Unterschied ermittelt, der erst nach zweistündiger Rezirkulation nicht mehr nachgewiesen werden konnte. Nach einer Stunde waren in der Safeline Y-Gruppe noch 85,3 % des Ausgangswertes zu verzeichnen, während bei den unbeschichteten Oxygenatoren schon nach einer Minute Rezirkulation noch 31,9 % der anfänglichen Thrombozytenkonzentration vorhanden waren. Nach halbstündiger Rezirkulation wurden in der unbeschichteten Gruppe nur noch $15 \pm 14 \times 10^3/\mu\text{l}$ Thrombozyten gezählt. Am Ende des Versuchs, nach 120 Minuten, zeigte sich bei der beschichteten Gruppe ein deutlicher Abfall der Plättchenkonzentration von $206 \pm 50 \times 10^3/\mu\text{l}$ auf $173 \pm 67 \times 10^3/\mu\text{l}$, was 71,1 % der Anfangskonzentration entspricht. Im Gegensatz dazu konnte in der unbeschichteten Gruppe nach einer Stunde ein Anstieg der Thrombozytenkonzentration von 6,9 % auf 20,5 % festgestellt werden, die nach 120 Minuten sogar wieder 45,5 % betrug.

AZP [min]	n	non-coated [x10 ³ /μl]		Safeline Y [x10 ³ /μl]		p
		Mittelwert	sd	Mittelwert	sd	
0	5	220	35	242	65	0,5598412
1	5	67	33	212	56	0,0020930
5	5	18	11	213	57	0,0001425
10	5	11	12	199	47	5,363E-05
20	5	17	10	200	50	9,767E-05
30	5	15	14	208	54	0,0001287
60	5	43	29	206	50	0,0005190
120	5	95	29	173	67	0,0633301

Tab 1.2 Thrombozyten: Vergleich Safeline Y – non-coated

1.3 Vergleich der Safeline-Oxygenatoren mit den Safeline Y-Oxygenatoren:

Der Vergleich der Safeline- mit den Safeline Y-Oxygenatoren ergab ab einer Zirkulationszeit von 5 Minuten bis zur Versuchslaufzeit von einer Stunde einen statistisch hoch signifikanten Unterschied, der auf einem deutlich stärkeren Abfall der Thrombozytenkonzentration in der Safeline-Gruppe beruhte. Während der Minimalwert in der Safeline Y-Gruppe bei $199 \pm 47 \times 10^3/\mu\text{l}$ (= 83 %) lag, betrug die minimale Thrombozytenkonzentration in der Safeline Gruppe nur noch $23 \pm 8 \times 10^3/\mu\text{l}$, was 7,9 % der Ausgangskonzentration entspricht. Erst nach zwei Stunden konnte in beiden Gruppen eine ähnlich hohe Plättchenkonzentration festgestellt werden (Safeline: $128 \pm 21 \times 10^3/\mu\text{l}$; Safeline Y: $173 \pm 67 \times 10^3/\mu\text{l}$).

AZP [min]	n	Safeline [x10³/μl]		Safeline Y [x10³/μl]		p
		Mittelwert	sd	Mittelwert	sd	
0	5	291	67	242	65	0,32749137
1	5	198	52	212	56	0,72773803
5	5	81	29	213	57	0,00328348
10	5	29	15	199	47	0,00011791
20	5	23	8	200	50	0,00011774
30	5	35	12	208	54	0,00025618
60	5	74	15	206	50	0,00100565
120	5	128	21	173	67	0,23292931

Tab 1.3 Thrombozyten: Vergleich Safeline – Safeline Y

1.4 Vergleich der Safeline-Oxygenatoren mit den Safeline USA-Oxygenatoren:

Bei dem Vergleich der Safeline- und Safeline USA-Oxygenatoren konnte anhand der Varianzanalyse kein statistisch signifikanter Unterschied verzeichnet werden. Bis zu einer Zirkulationszeit von einer halben Stunde zeigte sich in beiden Gruppen ein massiver Abfall der

Thrombozytenkonzentration, in der Safeline-Gruppe von $291 \pm 67 \times 10^3/\mu\text{l}$ auf $35 \pm 12 \times 10^3/\mu\text{l}$ (= 12,1 % des Anfangswertes) und in der Safeline USA Gruppe von $233 \pm 24 \times 10^3/\mu\text{l}$ auf $20 \pm 12 \times 10^3/\mu\text{l}$ (= 8,6 % der Ausgangskonzentration). Nach einstündiger Rezirkulation stieg die Plättchenzahl in beiden Gruppen wieder an und erreichte am Ende des Versuches bei den Safeline-Oxygenatoren 47 % und bei den Safeline USA-Oxygenatoren 41 % der Anfangskonzentration.

AZP [min]	n	Safeline [$\times 10^3/\mu\text{l}$]		Safeline USA [$\times 10^3/\mu\text{l}$]		p
		Mittelwert	sd	Mittelwert	sd	
0	5	291	67	233	24	0,1396134
1	5	198	52	136	44	0,1053914
5	5	81	29	43	26	0,0907401
10	5	29	15	20	15	0,4582378
20	5	23	8	17	11	0,4218415
30	5	35	12	20	12	0,1144740
60	5	74	15	49	22	0,1019536
120	5	128	21	93	26	0,0698711

Tab 1.4 Thrombozyten: Vergleich Safeline – Safeline USA

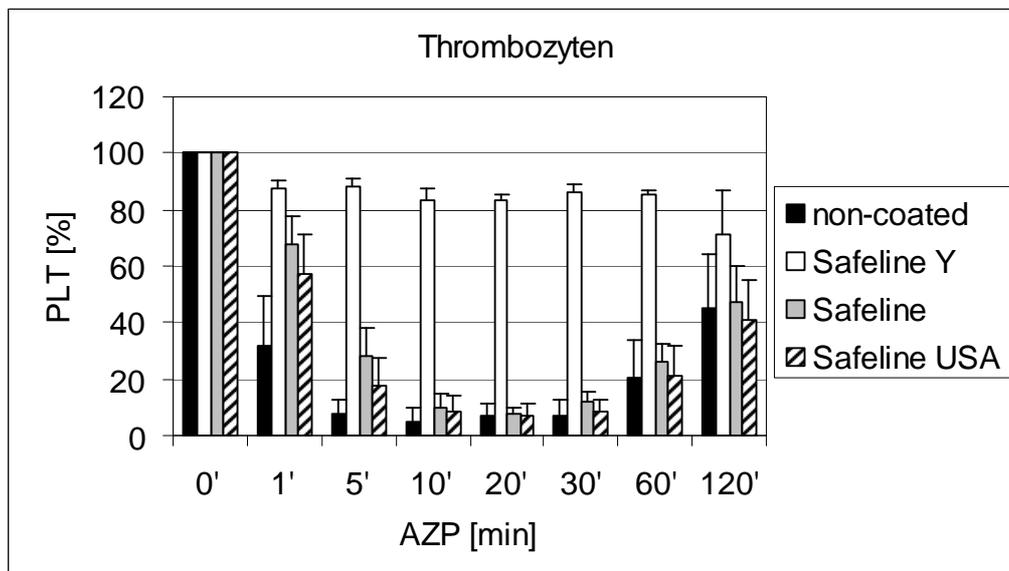


Abb. 1 Verlauf der Thrombozytenkonzentration während zweistündiger Rezirkulation

1.5 Vergleich der Safeline-Oxygenatoren mit den heparinisierten Safeline-Oxygenatoren:

Statistisch gesehen konnten bei dem Vergleich der Safeline-Oxygenatoren bis zu einer Zirkulationszeit von 30 Minuten signifikante und hoch signifikante Unterschiede festgestellt werden. In beiden Gruppen wurde ein massiver Konzentrationsabfall der Thrombozyten beobachtet, der bei den mit heparinisierten Vorspüllösung vorgespülten Oxygenatoren deutlicher war als in der Safeline-Gruppe. Während die Plättchenkonzentration in der heparinisierten Gruppe von einem Ausgangswert von $194 \pm 46 \times 10^3/\mu\text{l}$ nach 10minütiger Rezirkulation auf eine Konzentration von $6 \pm 8 \times 10^3/\mu\text{l}$ abfiel (= 2,853 % des Anfangswertes), konnte in der Safeline-Gruppe nach 20 Minuten ein minimaler Wert von $23 \pm 8 \times 10^3/\mu\text{l}$ (= 7,867 % der Ausgangskonzentration) gemessen werden. Nach einer Stunde stieg die Thrombozytenkonzentration in der mit Heparin vorgespülten Safeline-Gruppe wieder auf einen Wert von $82 \pm 23 \times 10^3/\mu\text{l}$ an und unterschied sich damit nicht mehr signifikant von der Plättchenkonzentration in der Safeline-Gruppe ($74 \pm 15 \times 10^3/\mu\text{l}$).

AZP [min]	n	Safeline [$\times 10^3/\mu\text{l}$]		Safeline + Hep [$\times 10^3/\mu\text{l}$]		p
		Mittelwert	sd	Mittelwert	sd	
0	5	291	67	194	46	0,0441536
1	5	198	52	116	40	0,0369291
5	5	81	29	18	8	0,0029731
10	5	29	15	6	8	0,0280462
20	5	23	8	6	5	0,0057705
30	5	35	12	16	10	0,0396443
60	5	74	15	82	23	0,5730689
120	5	128	21	143	26	0,3867271

Tab 1.5 Thrombozyten: Vergleich Safeline – Safeline + Hep

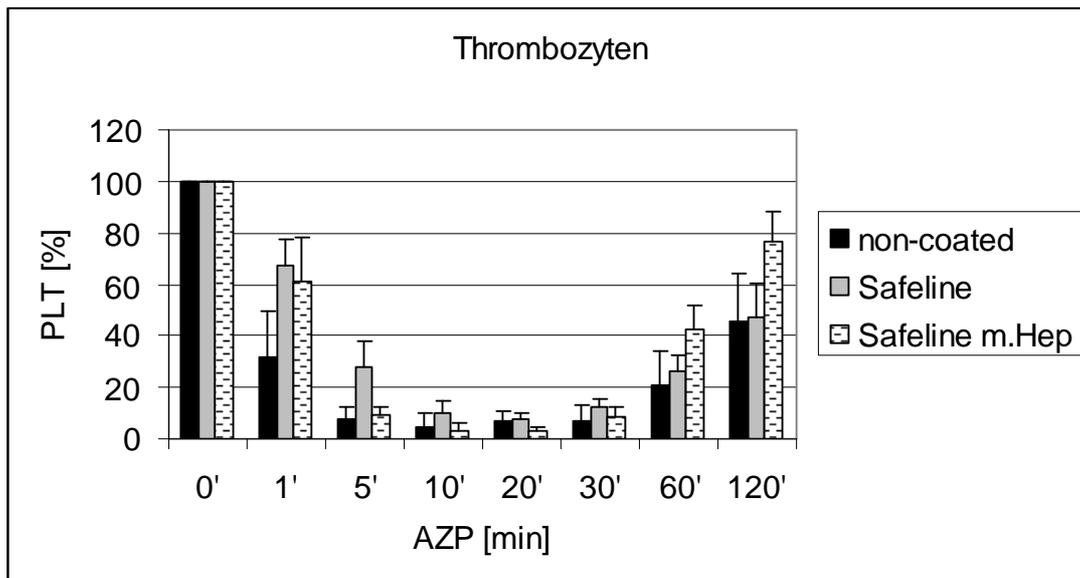


Abb. 2 Verlauf der Thrombozytenkonzentration während zweistündiger Rezirkulation

2. β -Thromboglobulin

2.1 Vergleich der Safeline-Oxygenatoren mit den unbeschichteten Oxygenatoren:

Bei dem Vergleich der unbeschichteten mit den polypeptidbeschichteten Oxygenatoren konnte nur zum dritten Abnahmezeitpunkt ein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt werden. Nach 5minütiger Rezirkulation wurde in der unbeschichteten Gruppe ein Konzentrationsanstieg von β -TG von $132,27 \pm 62,55$ IU/ml auf $1462,84 \pm 671,11$ IU/ml gemessen, was 1383,1 % des Ausgangswertes entspricht. In der Safeline-Gruppe hingegen betrug der β -TG-Wert zu diesem Zeitpunkt nur 623,5 % der Anfangskonzentration. Im weiteren Verlauf jedoch zeigte sich in beiden Gruppen ein vergleichbar starker Anstieg der β -TG-Konzentration. Nach 120 Minuten betrug der Wert in der Safeline-Gruppe $5396,84 \pm 293,77$ IU/ml und entsprach somit ungefähr dem maximalen Wert von $5159,58 \pm 1127,87$ IU/ml (bei Versuchsende) in der unbeschichteten Gruppe.

AZP [min]	n	non-coated [IU/ml]		Safeline [IU/ml]		p
		Mittelwert	sd	Mittelwert	sd	
0	5	132,27	62,55	119,15	58,49	0,7671521
1	5	405,78	383,31	103,22	30,63	0,1542076
5	5	1462,84	671,11	646,57	175,81	0,0464493
10	5	1971,33	624,37	1682,83	297,00	0,4281936
20	5	3405,27	1586,76	3182,78	343,68	0,7909614
30	5	3711,51	1550,83	3307,18	343,32	0,6244177
60	5	4232,97	1575,97	3691,18	363,08	0,5217221
120	5	5159,58	1127,87	5396,84	293,77	0,6945819

Tab 2.1 β -TG: Vergleich Safeline – non-coated

2.2 Vergleich der Safeline Y-Oxygenatoren mit den unbeschichteten Oxygenatoren:

Im Vergleich zur Gruppe der unbeschichteten Oxygenatoren zeigte sich bei den Safeline Y-Oxygenatoren ein deutlich geringerer Anstieg der β -TG-Konzentration. Schon nach 5 Minuten war hier ein statistisch hoch signifikanter Unterschied zu verzeichnen, der bis zum Ende der Versuchslaufzeit von zwei Stunden bestehen blieb. Während nach 5minütiger Rezirkulation bei der Safeline Y-Gruppe eine β -TG-Konzentration von $103,94 \pm 48,56$ IU/ml entsprechend 148 % gemessen wurde, konnte bei den unbeschichteten Oxygenatoren bereits ein Wert von $1462,84 \pm 671,11$ IU/ml (1383,1 %) festgestellt werden. Innerhalb der beschichteten Gruppe zeigte sich erst nach zweistündiger Versuchslaufzeit ein deutlicher Anstieg der β -TG-Konzentration von 623,1 % auf 2020,9 % ($1358,54 \pm 658,77$ IU/ml), die jedoch immer noch bedeutend geringer war, als in der Gruppe der unbeschichteten Oxygenatoren ($5159,58 \pm 1127,87$ IU/ml).

AZP [min]	n	non-coated [IU/ml]		Safeline Y [IU/ml]		p
		Mittelwert	sd	Mittelwert	sd	
0	5	132,27	62,55	74,90	38,01	0,1555797
1	5	405,78	383,31	81,33	34,43	0,1302646
5	5	1462,84	671,11	103,94	48,56	0,0037400
10	5	1971,33	624,37	193,95	132,04	0,0005283
20	5	3405,27	1586,76	296,80	206,11	0,0046394
30	5	3711,51	1550,83	342,28	231,60	0,0026249
60	5	4232,97	1575,97	439,11	271,79	0,0014553
120	5	5159,58	1127,87	1358,54	658,77	0,0003960

Tab 2.2 β -TG: Vergleich Safeline Y – non-coated

2.3 Vergleich der Safeline-Oxygenatoren mit den Safeline Y-Oxygenatoren:

Der Vergleich der Safeline- mit den Safeline Y-Oxygenatoren ergab schon nach 5minütiger Zirkulationszeit aufgrund des massiven Konzentrationsanstiegs von β -TG in der Safeline-Gruppe einen statistisch hoch signifikanten Unterschied, der bis zum Ende der Versuchslaufzeit anhielt. Nach 5 Minuten konnte in der Safeline-Gruppe eine β -TG Konzentration von $646,57 \pm 175,81$ IU/ml gemessen werden, was 623,5 % des Anfangswertes entspricht. Zur selben Zeit betrug die β -TG-Konzentration in der Safeline Y-Gruppe erst $103,94 \pm 48,56$ IU/ml (= 147,9 %). Innerhalb von zwei Stunden erreichte der β -TG-Wert in der Gruppe der Safeline Y-Oxygenatoren einen maximalen Wert von $1358,54 \pm 658,77$ IU/ml, während in der Safeline-Gruppe mit $5396,84 \pm 293,77$ IU/ml eine bedeutend höhere β -TG-Konzentration festgestellt werden konnte.

AZP [min]	n	Safeline		Safeline Y		p
		[IU/ml]		[IU/ml]		
		Mittelwert	sd	Mittelwert	sd	
0	5	119,15	58,49	74,90	38,01	0,24017187
1	5	103,22	30,63	81,33	34,43	0,37004192
5	5	646,57	175,81	103,94	48,56	0,00034197
10	5	1682,83	297,00	193,95	132,04	1,6255E-05
20	5	3182,78	343,68	296,80	206,11	5,2774E-07
30	5	3307,18	343,32	342,28	231,60	5,5231E-07
60	5	3691,18	363,08	439,11	271,79	5,4567E-07
120	5	5396,84	293,77	1358,54	658,77	3,6273E-06

Tab 2.3 β -TG: Vergleich Safeline – Safeline Y

2.4 Vergleich der Safeline-Oxygenatoren mit den Safeline USA-Oxygenatoren:

Der Vergleich der Safeline USA-Gruppe mit den Safeline-Oxygenatoren ergab jeweils nach einer Minute sowie nach einer halben Stunde einen statistisch signifikanten Unterschied. In beiden Gruppen konnte während der gesamten Versuchszeit ein massiver Anstieg der β -TG-Konzentration nachgewiesen werden, nach einminütiger Rezirkulation betrug die β -TG-Konzentration in der Safeline USA-Gruppe mit $237,93 \pm 82,69$ IU/ml jedoch bedeutend mehr als in der Safeline-Gruppe ($103,22 \pm 30,63$ IU/ml). Nach 30 Minuten wurde in der Safeline USA-Gruppe ein Wert von $4755,97 \pm 1179,32$ IU/ml gemessen, entsprechend 5019,3 % der Ausgangskonzentration, während die β -TG-Konzentration bei den Safeline-Oxygenatoren erst $3307,18 \pm 343,32$ IU/ml (= 3452 % des Anfangswertes) betrug.

AZP [min]	n	Safeline [IU/ml]		Safeline USA [IU/ml]		p
		Mittelwert	sd	Mittelwert	sd	
0	5	119,15	58,49	100,62	29,72	0,5877321
1	5	103,22	30,63	237,93	82,69	0,0156939
5	5	646,57	175,81	1095,15	421,76	0,0852086
10	5	1682,83	297,00	2099,87	461,51	0,1670567
20	5	3182,78	343,68	4219,87	1026,79	0,0917327
30	5	3307,18	343,32	4755,97	1179,32	0,0460257
60	5	3691,18	363,08	5133,83	1279,96	0,0619502
120	5	5396,84	293,77	5688,59	1059,03	0,6098935

Tab 2.4 β -TG: Vergleich Safeline – Safeline USA

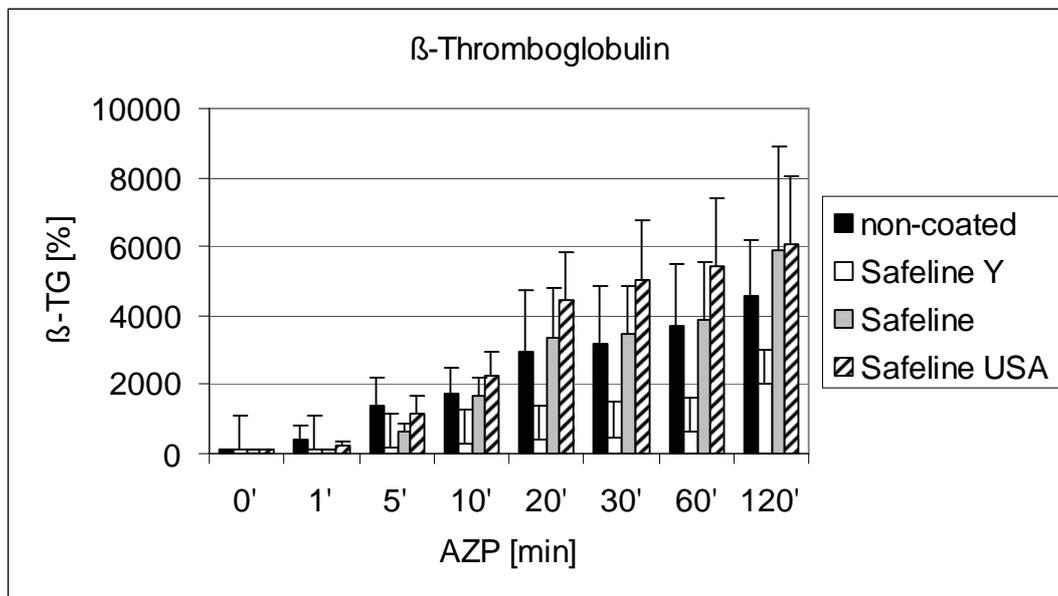


Abb. 3 Verlauf der β -Thromboglobulinkonzentration während zweistündiger Rezirkulation

2.5 Vergleich der Safeline-Oxygenatoren mit den heparinisierten Safeline-Oxygenatoren:

Der Vergleich der beiden Safeline-Gruppen ergab während der gesamten Versuchslaufzeit keine statistisch signifikanten Unterschiede. Die β -TG-Konzentration stieg jeweils drastisch an, in der Safeline-Gruppe von $119 \pm$

58,49 IU/ml auf einen Wert von 5396,84 ± 293,77 IU/ml (= 5917,1 % der Ausgangskonzentration), in der heparinisierten Safeline-Gruppe betrug der Maximalwert bei einer Anfangskonzentration von 145,7 ± 97,45 IU/ml nach zweistündiger Rezirkulation 4824,4 %.

AZP [min]	n	Safeline [IU/ml]		Safeline + Hep [IU/ml]		p
		Mittelwert	sd	Mittelwert	sd	
0	5	119,15	58,49	145,7	97,45	0,652840993
1	5	103,22	30,63	141,09	44,91	0,200995938
5	5	646,57	175,81	867,34	294,84	0,234333881
10	5	1682,83	297,00	1912,52	507,88	0,457395476
20	5	3182,78	343,68	3362,74	638,67	0,633050505
30	5	3307,18	343,32	3544,01	470,31	0,439494238
60	5	3691,18	363,08	4211,07	580,56	0,167376476
120	5	5396,84	293,77	4889,57	609,52	0,172153628

Tab 2.5 β -TG: Vergleich Safeline – Safeline mit Heparin

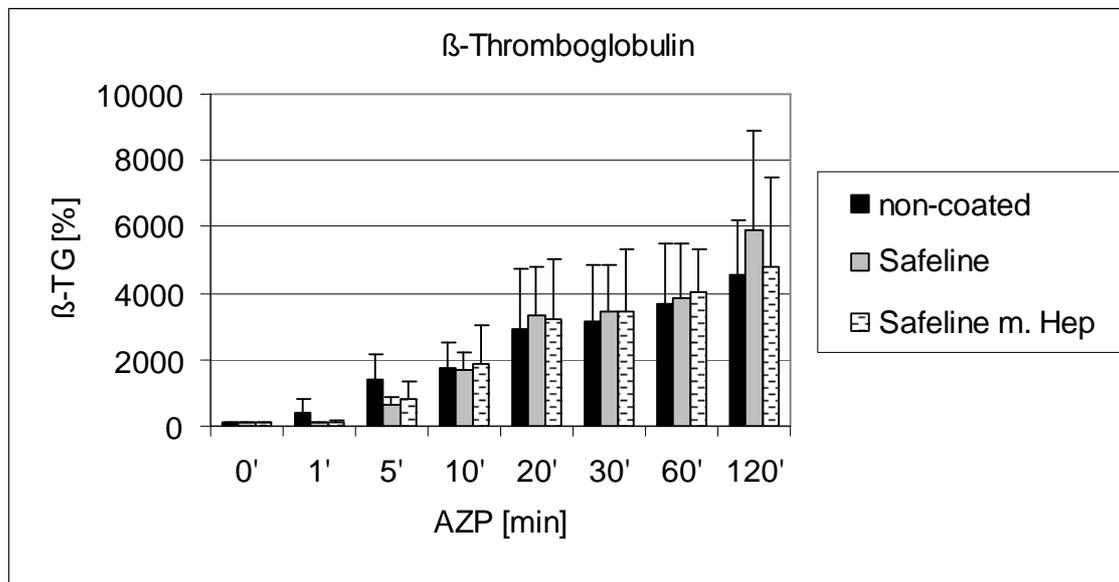


Abb. 4 Verlauf der β -Thromboglobulinkonzentration während zweistündiger Rezirkulation

3. TAT

3.1 Vergleich der Safeline-Oxygenatoren mit den unbeschichteten Oxygenatoren:

Der Vergleich der unbeschichteten Gruppe mit den Safeline-Oxygenatoren ergab anhand der Varianzanalyse keinen statistisch signifikanten Unterschied. In beiden Gruppen konnte nach 5minütiger Rezirkulation zunächst ein Abfall der TAT-Konzentration festgestellt werden (non-coated auf 94,6 %, Safeline auf 92,1 % des Ausgangswertes). Nach einer halben Stunde stieg der TAT-Wert jedoch wieder an und erreichte in der unbeschichteten Gruppe einen Maximalwert von $12,62 \pm 5,8 \mu\text{g/l}$ (122,6 %), in der Safeline-Gruppe mit $6,514 \pm 1,174 \mu\text{g/l}$ 129,5 % der Anfangskonzentration.

AZP [min]	n	non-coated [$\mu\text{g/l}$]		Safeline [$\mu\text{g/l}$]		p
		Mittelwert	sd	Mittelwert	sd	
0	5	10,762	6,006	5,118	0,914	0,1002219
1	5	10,952	6,513	5,271	0,676	0,1209135
5	5	10,068	5,855	4,503	0,811	0,0964727
10	5	9,730	5,385	5,220	0,746	0,1356219
20	5	9,120	4,948	5,112	1,243	0,1547870
30	5	9,681	5,830	5,478	0,695	0,1900153
60	5	10,330	5,971	6,349	1,358	0,2297410
120	5	12,620	5,799	6,514	1,174	0,0728756

Tab 3.1 TAT: Vergleich Safeline – non-coated

3.2 Vergleich der Safeline Y-Oxygenatoren mit den unbeschichteten Oxygenatoren:

Der Vergleich der Safeline Y- mit der unbeschichteten Gruppe zeigte in Bezug auf die TAT-Konzentration keine statistisch signifikanten Unterschiede. Nach anfänglichem Anstieg der TAT-Werte (non-coated: von $10,762 \pm 6,006 \mu\text{g/l}$ auf $10,952 \pm 6,513 \mu\text{g/l}$; Safeline Y: von $6,159 \pm 1,297 \mu\text{g/l}$ auf $6,516 \pm 1,946 \mu\text{g/l}$)

konnte bei der unbeschichteten Gruppe nach 5 Minuten ($10,068 \pm 5,855 \mu\text{g/l}$) und in der beschichteten Gruppe nach 20 Minuten ($6,106 \pm 1,179 \mu\text{g/l}$) ein leichter Konzentrationsabfall verzeichnet werden. Am Ende der Versuchslaufzeit konnte in beiden Gruppen ein erneuter Anstieg auf einen Wert über die Anfangskonzentration festgestellt werden, der in der unbeschichteten Gruppe mit 122,6 % etwas höher lag als in der Gruppe der beschichteten Oxygenatoren (102,3 %).

AZP [min]	n	non-coated [$\mu\text{g/l}$]		Safeline Y [$\mu\text{g/l}$]		p
		Mittelwert	sd	Mittelwert	sd	
0	5	10,762	6,006	6,159	1,297	0,1724578
1	5	10,952	6,513	5,855	1,294	0,1632339
5	5	10,068	5,855	6,234	1,397	0,2384864
10	5	9,730	5,385	6,516	1,946	0,2941855
20	5	9,120	4,948	6,106	1,179	0,2700098
30	5	9,681	5,830	5,684	1,326	0,2178920
60	5	10,330	5,971	5,676	0,927	0,1620862
120	5	12,620	5,799	6,181	0,856	0,0592602

Tab 3.2 TAT: Vergleich Safeline Y – non-coated

3.3 Vergleich der Safeline-Oxygenatoren mit den Safeline Y-Oxygenatoren:

Bei dem Vergleich der Safeline mit den Safeline Y-Oxygenatoren konnte kein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt werden. Während die TAT Konzentration in der Safeline-Gruppe bei einem Anfangswert von $5,118 \pm 0,914 \mu\text{g/l}$ nach zweistündiger Rezirkulation $6,514 \pm 1,174 \mu\text{g/l}$ betrug, konnte zur selben Zeit in der Safeline Y-Gruppe bei einer Ausgangskonzentration von $6,159 \pm 1,297 \mu\text{g/l}$ ein Wert von $6,181 \pm 0,856 \mu\text{g/l}$ gemessen werden. Somit fand auch innerhalb der zwei Gruppen keine nennenswerte Konzentrationsänderung des TAT-Wertes statt.

AZP [min]	n	Safeline [µg/l]		Safeline Y [µg/l]		p
		Mittelwert	sd	Mittelwert	sd	
0	5	5,118	0,914	6,159	1,297	0,22575571
1	5	5,271	0,676	5,855	1,294	0,44729124
5	5	4,503	0,811	6,234	1,397	0,06446809
10	5	5,220	0,746	6,516	1,946	0,24862591
20	5	5,112	1,243	6,106	1,179	0,27936916
30	5	5,478	0,695	5,684	1,326	0,78990353
60	5	6,349	1,358	5,676	0,927	0,43711306
120	5	6,514	1,174	6,181	0,856	0,65897113

Tab 3.3 TAT: Vergleich Safeline – Safeline Y

3.4 Vergleich der Safeline-Oxygenatoren mit den Safeline USA-Oxygenatoren:

Der statistische Vergleich der Gruppe mit den Safeline-Oxygenatoren und der Safeline USA-Gruppe ergab während des gesamten Versuches keinen signifikanten Unterschied. Es konnte jedoch nach einer Zirkulationszeit von zwei Stunden in der Safeline USA-Gruppe ein deutlich höherer Anstieg des TAT-Wertes als in der Safeline-Gruppe festgestellt werden. Nach dieser Zeit betrug die TAT-Konzentration bei den Safeline USA-Oxygenatoren $29,45 \pm 21,982 \mu\text{g/l}$ entsprechend 532,1 % des Anfangswertes, in der Safeline-Gruppe dagegen nur $6,514 \pm 1,174 \mu\text{g/l}$ (= 129,5 % der Ausgangskonzentration).

AZP [min]	n	Safeline		Safeline USA		p
		Mittelwert	sd	Mittelwert	sd	
0	5	5,118	0,914	5,537	1,142	0,5826731
1	5	5,271	0,676	4,809	0,579	0,3291690
5	5	4,503	0,811	4,790	1,038	0,6749949
10	5	5,220	0,746	5,140	0,605	0,8718313
20	5	5,112	1,243	6,205	1,665	0,3235496
30	5	5,478	0,695	6,510	0,814	0,0899068
60	5	6,349	1,358	8,869	2,683	0,1322734
120	5	6,514	1,174	29,450	21,982	0,0706904

Tab 3.4 TAT: Vergleich Safeline – Safeline USA

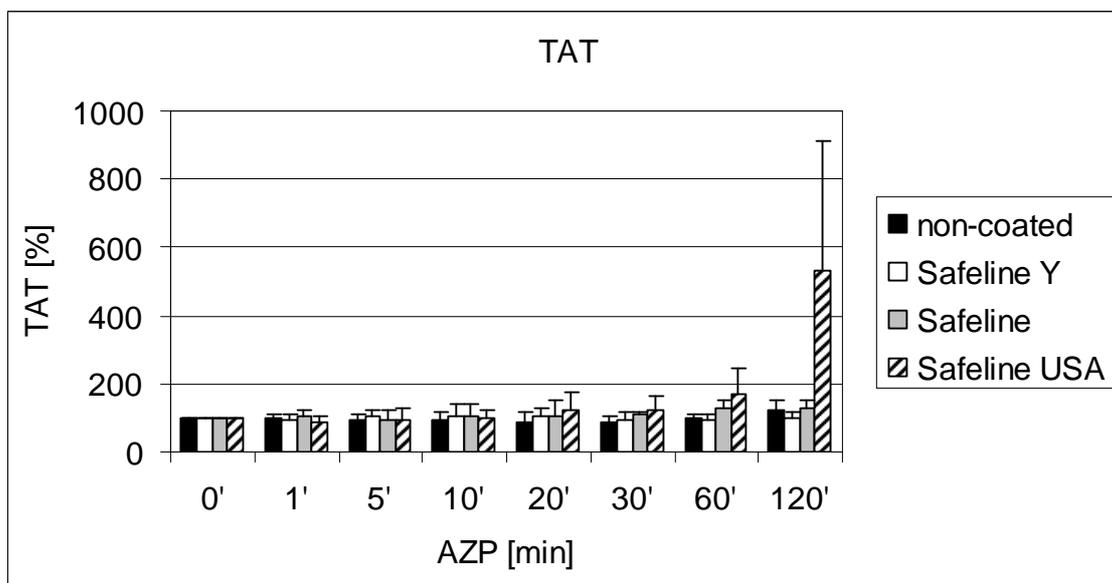


Abb. 5 Verlauf der TAT-Konzentration während zweistündiger Rezirkulation

3.5 Vergleich der Safeline-Oxygenatoren mit den heparinisierten Safeline-Oxygenatoren:

Der Vergleich dieser beiden Oxygenatoren ergab zu den ersten zwei Abnahmezeitpunkten einen statistisch signifikanten Unterschied, der auf einer geringeren Ausgangskonzentration des TAT in der Safeline-Gruppe beruhte. Während in dieser Gruppe der TAT-Wert von $5,118 \pm 0,914 \mu\text{g/l}$ auf $5,271 \pm$

0,676 µg/l (= 105,7 %) anstieg, erreichte die TAT-Konzentration in der mit Heparin vorgespülten Gruppe bei einem Ausgangswert von 7,613 ± 1,652 µg/l nach einer Minute einen Wert von 8,005 ± 1,935 µg/l (= 106,4 %).

AZP [min]	n	Safeline [µg/l]		Safeline + Hep [µg/l]		p
		Mittelwert	sd	Mittelwert	sd	
0	5	5,118	0,914	7,613	1,652	0,0295831
1	5	5,271	0,676	8,005	1,935	0,0284625
5	5	4,503	0,811	6,778	2,106	0,0785277
10	5	5,220	0,746	7,448	2,505	0,1266700
20	5	5,112	1,243	7,429	2,075	0,0916071
30	5	5,478	0,695	7,671	2,165	0,0898553
60	5	6,349	1,358	7,842	2,311	0,2975138
120	5	6,514	1,174	7,644	2,239	0,3971195

Tab 3.5 TAT: Vergleich Safeline – Safeline mit Heparin

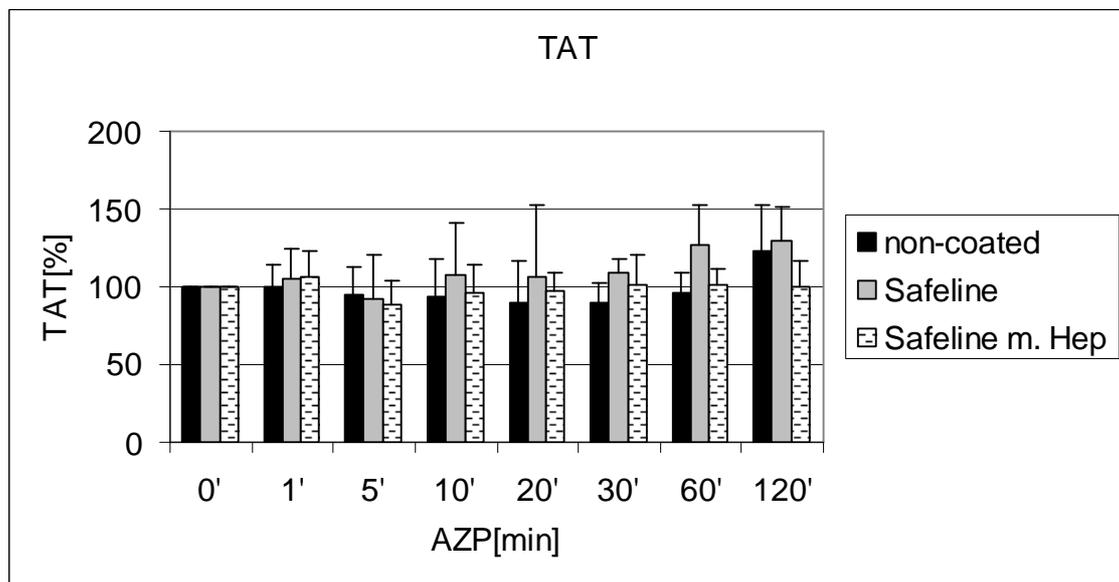


Abb. 6 Verlauf der TAT-Konzentration während zweistündiger Rezirkulation

4. Hämolysse (freies Hämoglobin)

4.1 Vergleich der Safeline-Oxygenatoren mit den unbeschichteten Oxygenatoren:

Statistisch gesehen zeigte sich bei dem Vergleich der unbeschichteten mit der Safeline-Gruppe kein signifikanter Unterschied. In beiden Gruppen konnte nach initialem Konzentrationsabfall bis zu einer Zirkulationszeit von einer Stunde ein mäßig starker Anstieg des Hämoglobinwertes festgestellt werden. Nach 60 Minuten betrug die Hämoglobinkonzentration in der unbeschichteten Gruppe $31,17 \pm 30,31$ mg/dl, entsprechend 104,7 % des Ausgangswertes, in der beschichteten Gruppe wurde zur selben Zeit ein Wert von $60,97 \pm 54,94$ mg/dl gemessen, was 78,4 % der Anfangskonzentration entspricht. Nach zweistündiger Rezirkulation zeigte sich in beiden Gruppen ein deutlicher Konzentrationsanstieg (non-coated: 355,4 %, Safeline: 602,2 %).

AZP [min]	n	non-coated [mg/dl]		Safeline [mg/dl]		p
		Mittelwert	sd	Mittelwert	sd	
0	5	26,11	7,83	106,83	128,64	0,2481295
1	5	15,79	7,17	55,72	56,38	0,1976067
5	5	17,39	7,16	55,26	55,56	0,2133607
10	5	17,85	7,03	56,72	56,83	0,2115997
20	5	18,31	6,93	57,16	57,64	0,2176110
30	5	21,07	11,10	57,41	57,47	0,2493905
60	5	31,17	30,31	60,97	54,94	0,3700042
120	5	101,85	121,14	238,63	106,92	0,1288918

Tab 4.1 Hämolysse: Vergleich Safeline – non-coated

4.2 Vergleich der Safeline Y-Oxygenatoren mit den unbeschichteten Oxygenatoren:

Der statistische Vergleich der unbeschichteten mit den Safeline Y-Oxygenatoren ergab keinen signifikanten Unterschied. Nach anfänglichem

Konzentrationsabfall in beiden Gruppen (non-coated: von $26,11 \pm 7,83$ mg/dl auf $15,79 \pm 7,17$ mg/dl; Safeline Y: von $18,352 \pm 3,612$ mg/dl auf $12,491 \pm 4,321$ mg/dl) stieg die Konzentration des freien Hämoglobins im Blut nach zwei Stunden in der unbeschichteten Gruppe auf 355,4 % an, während in der Safeline Y-Gruppe nach derselben Zeit ein geringerer Anstieg auf 277,7 % festgestellt werden konnte.

AZP [min]	n	non-coated [mg/dl]		Safeline Y [mg/dl]		p
		Mittelwert	sd	Mittelwert	sd	
0	5	26,11	7,83	18,352	3,612	0,1095084
1	5	15,79	7,17	12,491	4,321	0,4535538
5	5	17,39	7,16	12,486	5,475	0,3085018
10	5	17,85	7,03	15,441	7,437	0,6504885
20	5	18,31	6,93	16,121	8,430	0,6989072
30	5	21,07	11,10	15,891	8,630	0,4827285
60	5	31,17	30,31	16,581	8,161	0,3797251
120	5	101,85	121,14	48,302	30,709	0,4163991

Tab 4.2 Hämolyse: Vergleich Safeline Y – non-coated

4.3 Vergleich der Safeline-Oxygenatoren mit den Safeline Y-Oxygenatoren:

Sowohl in der Safeline- als auch in der Safeline Y-Gruppe bestand bis zu einer Zirkulationszeit von einer Stunde kein statistisch signifikanter Unterschied. In beiden Gruppen sank die Hämoglobinkonzentration nach einer Minute zunächst ab, stieg jedoch nach 10minütiger Rezirkulation wieder an. Nach zwei Stunden wurde in der Safeline Gruppe bei einem Ausgangswert von $106,83 \pm 128,64$ mg/dl ein massiver Konzentrationsanstieg auf $238,63 \pm 106,92$ mg/dl festgestellt (= 602,2 %), während die Hämoglobinkonzentration in der Safeline Y-Gruppe in derselben Zeit von $18,352 \pm 3,612$ mg/dl auf $48,302 \pm 30,709$ mg/dl anstieg, was 277,7 % des Anfangswertes entspricht.

AZP [min]	n	Safeline [mg/dl]		Safeline Y [mg/dl]		p
		Mittelwert	sd	Mittelwert	sd	
0	5	106,83	128,64	18,352	3,612	0,20848570
1	5	55,72	56,38	12,491	4,321	0,16480817
5	5	55,26	55,56	12,486	5,475	0,16400715
10	5	56,72	56,83	15,441	7,437	0,18768537
20	5	57,16	57,64	16,121	8,430	0,21012059
30	5	57,41	57,47	15,891	8,630	0,19084039
60	5	60,97	54,94	16,581	8,161	0,14857781
120	5	238,63	106,92	48,302	30,709	0,00906298

Tab 4.3 Hämolyse: Vergleich Safeline – Safeline Y

4.4 Vergleich der Safeline-Oxygenatoren mit den Safeline USA-Oxygenatoren:

Der Vergleich der Safeline- mit den Safeline USA-Oxygenatoren ergab während der Versuchslaufzeit von einer Stunde keinen statistisch signifikanten Unterschied. In der Safeline USA-Gruppe stieg jedoch die Hämoglobinkonzentration von $25,81 \pm 10,62$ mg/dl nach zwei Stunden auf $40,6 \pm 35,34$ mg/dl (= 532,1 %). In der Safeline-Gruppe konnte nach derselben Zeit ein Konzentrationsanstieg von $106,83 \pm 128,64$ mg/dl auf $238,63 \pm 106,92$ mg/dl (= 602,2 %) gemessen werden. Somit konnte nach zweistündiger Rezirkulation ein statistisch hoch signifikanter Unterschied festgestellt werden.

AZP [min]	n	Safeline [mg/dl]		SafelineUSA [mg/dl]		p
		Mittelwert	sd	Mittelwert	sd	
0	5	106,83	128,64	25,81	10,62	0,2471943
1	5	55,72	56,38	16,74	8,14	0,2083043
5	5	55,26	55,56	16,72	6,33	0,2053947
10	5	56,72	56,83	17,40	6,46	0,2064345
20	5	57,16	57,64	20,63	10,00	0,2470892
30	5	57,41	57,47	20,18	10,10	0,2376358
60	5	60,97	54,94	20,63	9,84	0,1862563
120	5	238,63	106,92	40,60	35,34	0,0078784

Tab 4.4 Hämolyse: Vergleich Safeline – Safeline USA

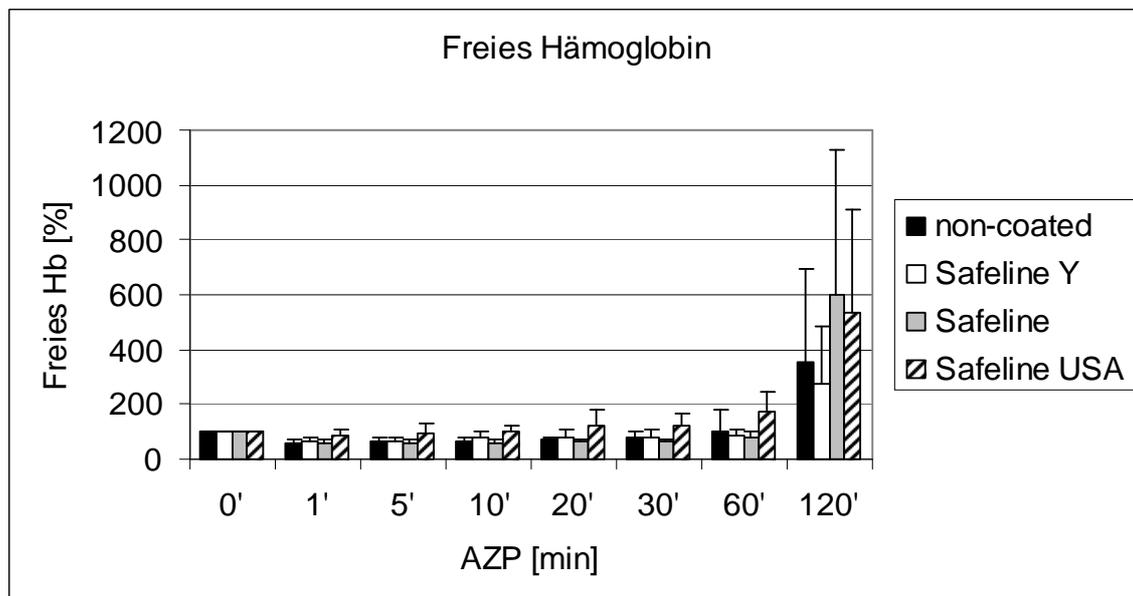


Abb. 7 Verlauf der Hämoglobinkonzentration während zweistündiger Rezirkulation

4.5 Vergleich der Safeline-Oxygenatoren mit den heparinisierten Safeline-Oxygenatoren:

Nach einem initialen Konzentrationsabfall des freien Hämoglobins in der Safeline- Gruppe von $106,38 \pm 128,64$ mg/dl auf $55,72 \pm 56,38$ mg/dl, in der heparinisierten Safeline-Gruppe von $22,08 \pm 3,61$ mg/dl auf $13,89 \pm 2,26$ mg/dl,

konnte in beiden Gruppen erst nach zweistündiger Rezirkulation wieder ein deutlicher Anstieg der Hämoglobinkonzentration festgestellt werden. Während zu dieser Zeit in der Safeline-Gruppe ein Wert von $238,63 \pm 106,92$ mg/dl gemessen wurde, betrug der maximale Wert in der mit Heparin vorgespülten Oxygenatoren $193,6 \pm 61$ mg/dl. Zu keiner Zeit konnte zwischen diesen beiden Gruppen ein statistisch signifikanter Unterschied verzeichnet werden.

AZP [min]	n	Safeline [mg/dl]		Safeline + Hep [mg/dl]		p
		Mittelwert	sd	Mittelwert	sd	
0	5	106,38	128,64	22,08	3,61	0,2265345
1	5	55,72	56,38	13,89	2,26	0,1764327
5	5	55,26	55,56	13,89	2,26	0,1750655
10	5	56,72	56,83	13,63	2,18	0,1681710
20	5	57,16	57,64	13,63	2,18	0,1697298
30	5	57,41	57,47	13,63	2,18	0,1663645
60	5	60,97	54,94	16,47	3,16	0,1444476
120	5	238,63	106,92	193,60	60,10	0,4837418

Tab 4.5 Hämolyse: Vergleich Safeline – Safeline mit Heparin

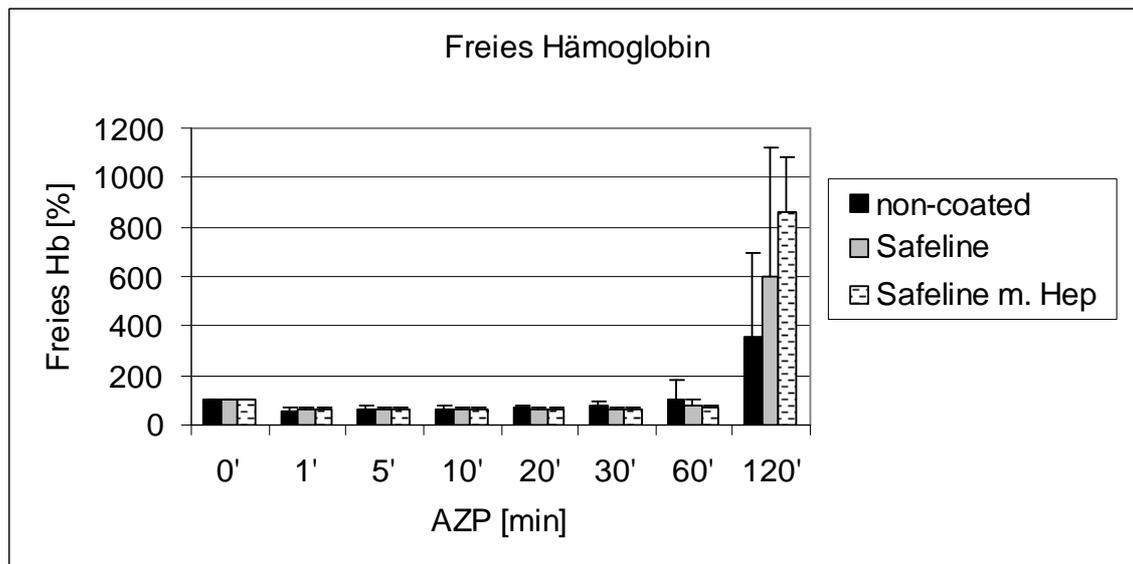


Abb. 8 Verlauf der Hämoglobinkonzentration während zweistündiger Rezirkulation

5. SC5b-9

5.1 Vergleich der Safeline-Oxygenatoren mit den unbeschichteten Oxygenatoren:

Bereits nach einer Zirkulationszeit von 5 Minuten zeigte sich im Vergleich der polypeptidbeschichteten mit den unbeschichteten Oxygenatoren ein statistisch signifikanter Unterschied aufgrund des deutlich stärkeren Anstiegs der TCC-Konzentration in der unbeschichteten Gruppe von $226,76 \pm 56,08$ ng/ml auf $539,58 \pm 204,32$ ng/ml (266,6 % des Ausgangswertes). Zum Abnahmezeitpunkt nach einer Stunde konnte erneut ein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt werden, der bis zum Ende des Versuches bestehen blieb. Während der maximale SC5b-9-Wert in der Safeline-Gruppe $900,91 \pm 292,17$ ng/ml bzw. 478,4 % der Anfangskonzentration betrug, wurde zur selben Zeit in der unbeschichteten Gruppe mit $2209,53 \pm 915,17$ ng/ml (1066,8 % des Anfangswertes) ein bedeutend höherer Wert gemessen.

AZP [min]	n	non-coated ng/ml		Safeline ng/ml		p
		Mittelwert	sd	Mittelwert	sd	
0	5	226,76	56,08	199,71	41,33	0,4597176
1	5	312,99	72,01	225,05	59,71	0,0968790
5	5	539,58	204,32	227,76	107,79	0,0270909
10	5	918,51	578,27	252,73	112,02	0,0536661
20	5	1173,31	827,75	353,50	184,93	0,0892840
30	5	1480,52	1053,76	457,39	218,98	0,0937853
60	5	1745,54	904,71	616,06	224,58	0,0416326
120	5	2209,53	915,17	900,91	292,17	0,0260716

Tab 5.1 SC5b-9: Vergleich Safeline – non-coated

5.2 Vergleich der Safeline Y-Oxygenatoren mit den unbeschichteten Oxygenatoren:

Der statistische Vergleich der unbeschichteten mit der Safeline Y-Gruppe ergab zunächst nach 5minütiger Rezirkulation einen hoch signifikanten Unterschied. Nach dieser Zeit stieg die TCC-Konzentration bei den unbeschichteten Oxygenatoren auf 266,6 % des Ausgangswertes an, während bei den Safeline Y-Oxygenatoren zu diesem Zeitpunkt nur ein Konzentrationsanstieg auf 84,5 % des Anfangswertes zu bestimmen war. Ein statistisch signifikanter Unterschied konnte dann nach 10 Minuten festgestellt werden, der nach einstündiger Rezirkulation immer noch nachzuweisen war. Nach einer Stunde konnten in der Gruppe der unbeschichteten Oxygenatoren bereits $1745,5 \pm 904,71 \mu\text{g SC5b-9/l}$ (679 %) gezählt werden, wohingegen in der Safeline Y-Gruppe die SC5b-9-Konzentration nur $418,8 \pm 158,2 \mu\text{g/l}$ (187,2 %) betrug. Im Zuge der zweistündigen Rezirkulation ergab sich aufgrund des massiven Anstiegs der SC5b-9-Konzentration bei der unbeschichteten Gruppe auf $2209,5 \pm 915,2 \mu\text{g/l}$ erneut ein statistisch hoch signifikanter Unterschied zwischen den beiden Oxygenatoren.

AZP [min]	n	non-coated ng/ml		Safeline Y ng/ml		p
		Mittelwert	sd	Mittelwert	sd	
0	5	226,76	56,08	232,79	46,25	0,8723038
1	5	312,99	72,01	226,61	86,15	0,1624513
5	5	539,58	204,32	189,81	35,72	0,0097489
10	5	918,51	578,27	199,30	50,65	0,0382313
20	5	1173,31	827,75	213,03	61,08	0,0493849
30	5	1480,52	1053,76	258,54	74,21	0,0494135
60	5	1745,54	904,71	418,79	158,20	0,0202252
120	5	2209,53	915,17	599,29	178,97	0,0086491

Tab 5.2 SC5b-9: Vergleich Safeline Y – non-coated

5.3 Vergleich der Safeline-Oxygenatoren mit den Safeline Y-Oxygenatoren:

Während des gesamten Versuches konnte zwischen der Safeline und der Safeline Y-Gruppe kein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt werden. In beiden Gruppen stieg die SC5b-9-Konzentration stetig an. In der Safeline-Gruppe konnte schon nach 20 Minuten Rezirkulation ein deutlicher Konzentrationsanstieg von $199,71 \pm 41,33$ ng/ml auf $353,5 \pm 184,93$ ng/ml verzeichnet werden, in der Safeline Y-Gruppe hingegen stieg die TCC Konzentration erst nach einer Stunde von $232,79 \pm 46,25$ auf $418,79 \pm 158,2$ ng/ml bedeutend an. Nach zwei Stunden betrug die SC5b-9-Konzentration in der Safeline-Gruppe 478,4 % und in der Safeline Y-Gruppe 266,9 % des Ausgangswertes.

AZP [min]	n	Safeline ng/ml		Safeline Y ng/ml		p
		Mittelwert	sd	Mittelwert	sd	
0	5	199,71	41,33	232,79	46,25	0,31724542
1	5	225,05	59,71	226,61	86,15	0,97701378
5	5	227,76	107,79	189,81	35,72	0,52270565
10	5	252,73	112,02	199,30	50,65	0,41007556
20	5	353,50	184,93	213,03	61,08	0,18712063
30	5	457,39	218,98	258,54	74,21	0,12373693
60	5	616,06	224,58	418,79	158,20	0,18885033
120	5	900,91	292,17	599,29	178,97	0,11633112

Tab 5.3 SC5b-9: Vergleich Safeline – Safeline Y

5.4 Vergleich der Safeline-Oxygenatoren mit den Safeline USA-Oxygenatoren:

Während der gesamten Versuchslaufzeit konnte bei dem Vergleich der Safeline- mit den Safeline USA-Oxygenatoren kein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt werden. In beiden Gruppen stieg die SC5b-9-Konzentration kontinuierlich an. Somit konnte nach zweistündiger Rezirkulation

in der Safeline-Gruppe ein Anstieg auf 478,4 % des Anfangswertes und in der Safeline USA-Gruppe von 573,8 % der Ausgangskonzentration gemessen werden.

AZP [min]	n	Safeline ng/ml		Safeline USA ng/ml		p
		Mittelwert	sd	Mittelwert	sd	
0	5	199,71	41,33	223,58	51,82	0,4918813
1	5	225,05	59,71	234,53	70,15	0,8420731
5	5	227,76	107,79	241,49	56,17	0,8268803
10	5	252,73	112,02	247,37	35,73	0,9295964
20	5	353,50	184,93	356,94	123,99	0,9760915
30	5	457,39	218,98	493,57	227,12	0,8243274
60	5	616,06	224,58	701,93	310,76	0,6660847
120	5	900,91	292,17	1254,71	422,40	0,2055965

Tab 5.4 SC5b-9: Vergleich Safeline – Safeline USA

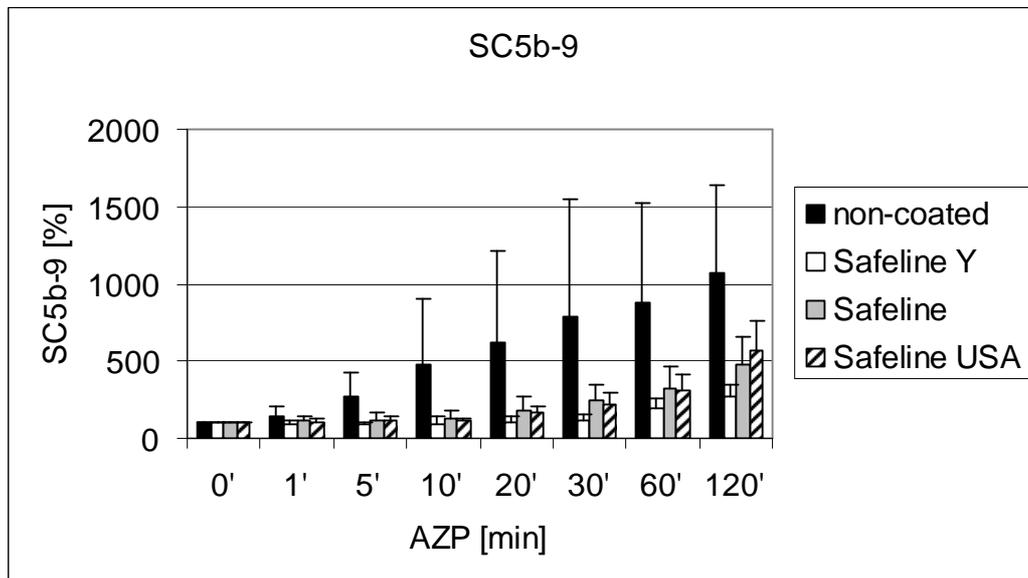


Abb. 9 Verlauf der SC5b-9-Konzentration während zweistündiger Rezirkulation

5.5 Vergleich der Safeline-Oxygenatoren mit den heparinisierten Safeline-Oxygenatoren:

Obwohl in der mit der heparinisierten Lösung vorgespülten Safeline-Gruppe ein geringerer Konzentrationsanstieg des SC5b-9 als in der Safeline-Gruppe festgestellt werden konnte, zeigte der statistische Vergleich der beiden Gruppen keinen signifikanten Unterschied. Nach zweistündiger Rezirkulation betrug die SC5b-9-Konzentration in der Safeline-Gruppe $900,91 \pm 292,17$ ng/ml, in der Gruppe der heparinisierten Oxygenatoren wurde zur selben Zeit ein TCC-Wert von $694,52 \pm 94,03$ ng/ml gemessen.

AZP [min]	n	Safeline ng/ml		Safeline + Hep ng/ml		p
		Mittelwert	sd	Mittelwert	sd	
0	5	199,71	41,33	200,93	64,44	0,9752332
1	5	225,05	59,71	230,37	50,91	0,8954942
5	5	227,70	107,79	234,00	68,09	0,9244771
10	5	252,73	112,02	226,18	50,03	0,6766248
20	5	353,50	184,93	272,20	56,13	0,3025299
30	5	457,39	218,98	331,08	67,83	0,3025299
60	5	616,06	224,58	475,70	58,81	0,2611118
120	5	900,91	292,17	694,52	94,03	0,2155409

Tab 5.5 SC5b-9: Vergleich Safeline – Safeline mit Heparin

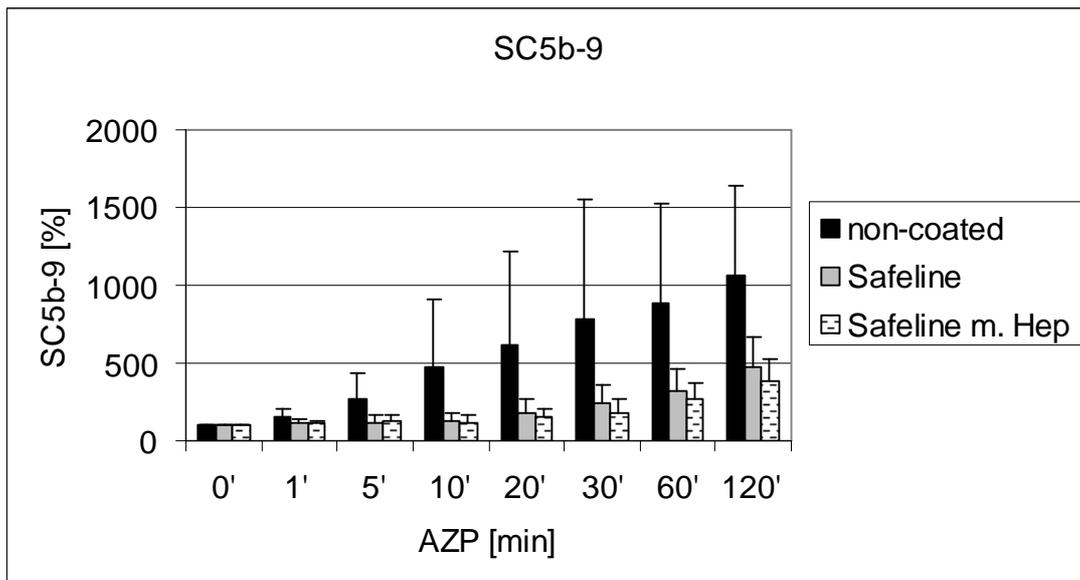


Abb. 10 Verlauf der SC5b9-Konzentration während zweistündiger Rezirkulation

6. Leukozyten

6.1 Vergleich der Safeline-Oxygenatoren mit den unbeschichteten Oxygenatoren:

Der Vergleich der Safeline-Oxygenatoren mit der unbeschichteten Gruppe ergab nach 20minütiger Rezirkulation einen statistisch signifikanten Unterschied, der nach einer halben Stunde als hoch signifikant bezeichnet werden konnte und bis zu einer Versuchslaufzeit von einer Stunde bestehen blieb. Während in der Gruppe der unbeschichteten Oxygenatoren die Leukozytenkonzentration von anfänglich $4,9 \pm 0,7 \times 10^3/\mu\text{l}$ nach einer Stunde auf $2,2 \pm 0,4 \times 10^3$ Leukozyten/ μl abfiel, was 44,4 % des Anfangswertes entspricht, konnte bei den Safeline-Oxygenatoren ein deutlich geringerer Abfall des Leukozytenwertes von $5,4 \pm 0,8 \times 10^3/\mu\text{l}$ auf $3,7 \pm 0,6 \times 10^3/\mu\text{l}$ (entspricht 68,2 % der Anfangskonzentration) verzeichnet werden. Am Ende des Versuchs konnte jedoch in beiden Gruppen ein vergleichbarer Leukozytenabfall gemessen werden (non-coated: 39,7 %; Safeline: 37,3 %).

AZP [min]	n	non-coated x10³/µl		Safeline x10³/µl		p
		Mittelwert	sd	Mittelwert	sd	
0	5	4,9	0,7	5,4	0,8	0,3142511
1	5	4,4	0,6	5,1	0,9	0,2253811
5	5	3,8	0,9	5,0	0,8	0,0824153
10	5	3,2	1,2	4,8	0,8	0,0528261
20	5	2,6	0,9	4,4	0,7	0,0167803
30	5	2,4	0,8	4,1	0,7	0,0099330
60	5	2,2	0,4	3,7	0,6	0,0040528
120	5	1,9	0,5	2,0	0,2	0,8889472

Tab 6.1 Leukozyten: Vergleich Safeline – non-coated

6.2 Vergleich der Safeline Y-Oxygenatoren mit den unbeschichteten Oxygenatoren:

Der statistische Vergleich dieser beiden Gruppen ergab nach 20minütiger Rezirkulation einen hoch signifikanten Unterschied, der bis zuletzt (nach einer Rezirkulation von zwei Stunden) bestehen blieb.

Während die Leukozytenkonzentration in der Gruppe der unbeschichteten Oxygenatoren bei einem Ausgangswert von $4,9 \pm 0,7 \times 10^3/\mu\text{l}$ auf einen Wert von $1,9 \pm 0,5 \times 10^3/\mu\text{l}$ abfiel, was 39,7 % der Anfangskonzentration entspricht, war in der Safeline Y-Gruppe ein deutlich geringerer Konzentrationsabfall zu verzeichnen. Hier befanden sich nach 120 Minuten noch $3,8 \pm 1 \times 10^3/\mu\text{l}$ Leukozyten im zirkulierenden Blut (Ausgangskonzentration $5,2 \pm 1 \times 10^3/\mu\text{l}$). Die Leukozytenkonzentration fiel in dieser Gruppe somit nur auf 72,6 % des Ausgangswertes ab.

AZP [min]	n	non-coated x10³/µl		Safeline Y x10³/µl		p
		Mittelwert	sd	Mittelwert	sd	
0	5	4,9	0,7	5,2	1,0	0,5529933
1	5	4,4	0,6	4,8	0,9	0,4354777
5	5	3,8	0,9	4,8	0,9	0,1596340
10	5	3,2	1,2	4,8	0,9	0,0650283
20	5	2,6	0,9	4,7	0,8	0,0097165
30	5	2,4	0,8	4,7	0,8	0,0035361
60	5	2,2	0,4	4,6	0,8	0,0009941
120	5	1,9	0,5	3,8	1,0	0,0084770

Tab 6.2 Leukozyten: Vergleich Safeline Y – non-coated

6.3 Vergleich der Safeline-Oxygenatoren mit den Safeline Y-Oxygenatoren:

Der Vergleich der polypeptidbeschichteten mit den Safeline Y-Oxygenatoren ergab erst nach zweistündiger Rezirkulation einen Konzentrationsunterschied, der statistisch gesehen als hoch signifikant zu bezeichnen war. Bis zu einer Zirkulationszeit von einer Stunde konnte in beiden Gruppen ein Konzentrationsabfall der Leukozyten festgestellt werden (Safeline von $5,4 \pm 0,8$ auf $3,7 \pm 0,6 \times 10^3/\mu\text{l}$; Safeline Y von $5,2 \pm 1$ auf $4,6 \pm 0,8 \times 10^3/\mu\text{l}$). Nach 120 Minuten waren jedoch in der Safeline-Gruppe nur noch 37,3 % der Ausgangskonzentration vorhanden, während in der Safeline Y-Gruppe noch 72,6 % des Anfangswertes festgestellt werden konnten.

AZP [min]	n	Safeline x10³/µl		Safeline Y x10³/µl		p
		Mittelwert	sd	Mittelwert	sd	
0	5	5,4	0,8	5,2	1,0	0,75661816
1	5	5,1	0,9	4,8	0,9	0,69590633
5	5	5,0	0,8	4,8	0,9	0,76721465
10	5	4,8	0,8	4,8	0,9	0,97523620
20	5	4,4	0,7	4,7	0,8	0,59081736
30	5	4,1	0,7	4,7	0,8	0,27614105
60	5	3,7	0,6	4,6	0,8	0,13511673
120	5	2,0	0,2	3,8	1,0	0,00544058

Tab 6.3 Leukozyten: Vergleich Safeline – Safeline Y

6.4 Vergleich der Safeline-Oxygenatoren mit den Safeline USA-Oxygenatoren:

Der Vergleich der Safeline-Oxygenatoren mit der Safeline USA-Gruppe ergab keinen statistisch signifikanten Unterschied. Im Verlauf der Rezirkulation konnte in beiden Gruppen ein Konzentrationsabfall ähnlichen Ausmaßes festgestellt werden. Bei einem Ausgangswert von $5,4 \pm 0,8 \times 10^3/\mu\text{l}$ betrug die Leukozytenkonzentration in der Safeline-Gruppe nach einer Zirkulationszeit von zwei Stunden $2,0 \pm 0,2 \times 10^3/\mu\text{l}$. In der Safeline USA-Gruppe konnte nach derselben Zeit der minimale Wert von $3,3 \pm 1,3 \times 10^3/\mu\text{l}$ gemessen werden. Bei den Safeline-Oxygenatoren entsprach die Anzahl der Leukozyten zu diesem Zeitpunkt somit 37,3 % des Anfangswertes, bei den Safeline USA-Oxygenatoren dagegen noch 59,2 %.

AZP [min]	n	Safeline x10 ³ /µl		Safeline USA x10 ³ /µl		p
		Mittelwert	sd	Mittelwert	sd	
0	5	5,4	0,8	5,4	1,0	0,9261054
1	5	5,1	0,9	5,4	1,1	0,6843183
5	5	5,0	0,8	4,9	1,1	0,9325387
10	5	4,8	0,8	4,0	1,6	0,3479999
20	5	4,4	0,7	3,4	1,5	0,2601676
30	5	4,1	0,7	3,4	1,3	0,3618578
60	5	3,7	0,6	3,5	1,1	0,7881030
120	5	2,0	0,2	3,3	1,3	0,0918910

Tab 6.4 Leukozyten: Vergleich Safeline – Safeline USA

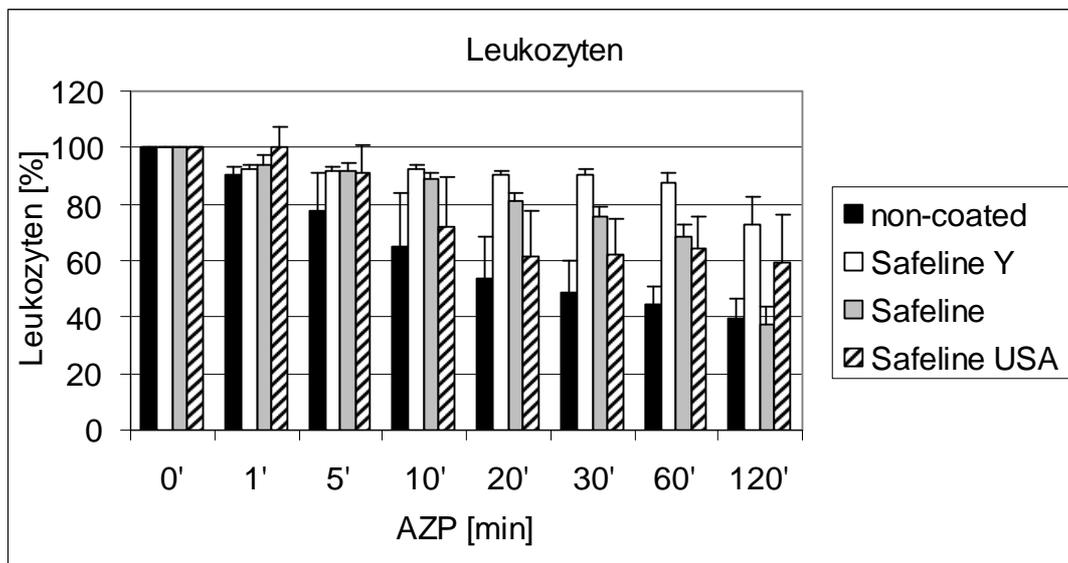


Abb. 11 Verlauf der Leukozytenkonzentration während zweistündiger Rezirkulation

6.5 Vergleich der Safeline-Oxygenatoren mit den heparinisierten Safeline-Oxygenatoren:

Im Vergleich zur Gruppe der Safeline-Oxygenatoren fiel die Leukozytenkonzentration in der heparinisierten Safeline-Gruppe deutlich schneller ab, wodurch statistisch gesehen nach 10minütiger Rezirkulation ein signifikanter Unterschied festgestellt werden konnte, der bis zu einer

Zirkulationszeit von einer Stunde bestehen blieb und zu den Abnahmezeiten nach 20 und 30 Minuten als hoch signifikant bezeichnet werden konnte.

Während die Anzahl der weißen Blutkörperchen in der heparinisierten Gruppe nach 20 Minuten auf einen Wert von $2,8 \pm 0,5 \times 10^3/\mu\text{l}$ abfiel (= 55,4 % des Anfangswertes), betrug die Leukozytenkonzentration in der Safeline-Gruppe zu dieser Zeit noch 81 % des Ausgangswertes. Nach zwei Stunden sank jedoch auch in dieser Gruppe die Leukozytenkonzentration auf einen Wert von $2,0 \pm 0,2 \times 10^3/\mu\text{l}$ ab, der mit dem zur selben Zeit in der heparinisierten Safeline-Gruppe gemessenen Wert von $1,8 \pm 0,4 \times 10^3/\mu\text{l}$ vergleichbar war.

APZ [min]	n	Safeline		Safeline m.Hep		p
		Mittelwert	sd	Mittelwert	sd	
0	5	5,4	0,8	5,1	0,5	0,5428052
1	5	5,1	0,9	5,0	0,5	0,7938969
5	5	5,0	0,8	4,7	0,3	0,4600090
10	5	4,8	0,8	3,5	0,4	0,0238134
20	5	4,4	0,7	2,8	0,5	0,0080397
30	5	4,1	0,7	2,8	0,4	0,0086964
60	5	3,7	0,6	2,8	0,3	0,0286951
120	5	2,0	0,2	1,8	0,4	0,4895271

Tab 6.5 Leukozyten: Vergleich Safeline – Safeline mit Heparin

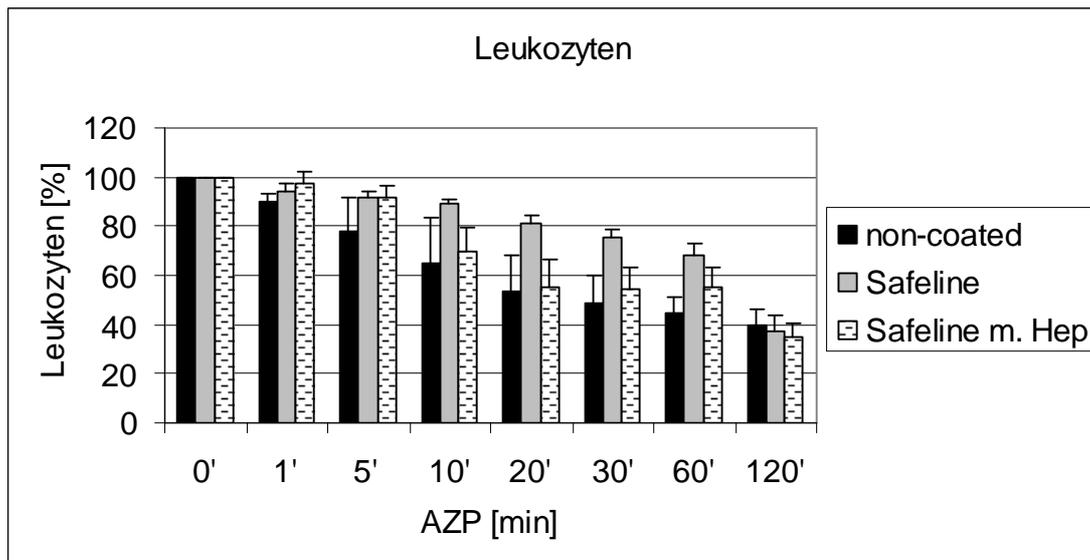


Abb.12 Verlauf der Leukozytenkonzentration während zweistündiger Rezirkulation

7. PMN-Elastase

7.1 Vergleich der Safeline-Oxygenatoren mit den unbeschichteten Oxygenatoren:

Zwischen der unbeschichteten und der Safeline-Gruppe zeigte sich nach 10minütiger Rezirkulation ein statistisch signifikanter Unterschied, der zum Abnahmezeitpunkt nach einer Stunde nicht mehr festgestellt werden konnte. Nach der Versuchslaufzeit von 10 Minuten stieg die PMN-Elastase-Konzentration in der unbeschichteten Gruppe von $58,57 \pm 21,07 \mu\text{g/l}$ auf $136,81 \pm 58,35 \mu\text{g/l}$, entsprechend 228,4 % des Ausgangswertes an, in der Safeline-Gruppe dagegen erreichte der PMN-Elastase-Wert nach derselben Zeit nur 118,1 % der Anfangskonzentration. Zum Abnahmezeitpunkt nach zwei Stunden konnte jedoch bei den polypeptidbeschichteten Oxygenatoren ein Anstieg der PMN-Elastase-Konzentration auf $1149,09 \pm 334,38 \mu\text{g/l}$ und somit ein Überschreiten des gemessenen Maximalwertes von $798,58 \pm 383,2 \mu\text{g/l}$ in der unbeschichteten Gruppe verzeichnet werden.

AZP [min]	n	non-coated [µg/l]		Safeline [µg/l]		p
		Mittelwert	sd	Mittelwert	sd	
0	5	58,57	21,07	54,15	6,08	0,6975160
1	5	69,41	23,79	58,14	5,22	0,3814568
5	5	101,03	36,48	63,41	11,95	0,0856726
10	5	136,81	58,35	63,83	13,52	0,0407558
20	5	236,78	103,39	69,26	12,74	0,0123100
30	5	292,71	167,46	74,85	14,39	0,0319990
60	5	423,51	256,34	260,90	75,56	0,2582973
120	5	798,58	383,20	1149,09	334,38	0,2053911

Tab 7.1 PMN-Elastase: Vergleich Safeline – non-coated

7.2 Vergleich der Safeline Y-Oxygenatoren mit den unbeschichteten Oxygenatoren:

Im Vergleich zur Safeline Y-Gruppe konnte in der Gruppe der unbeschichteten Oxygenatoren ein deutlich stärkerer Anstieg der PMN-Elastase-Konzentration festgestellt werden. Diese erhöhten PMN-Elastase-Werte führten im statistischen Vergleich zu einem signifikanten Unterschied zwischen der beschichteten und der unbeschichteten Gruppe, der ab einer Versuchslaufzeit von 10 Minuten bestand und bis hin zur einstündigen Rezirkulation nachgewiesen werden konnte. In der unbeschichteten Gruppe stieg der PMN-Elastase-Wert nach einer Stunde auf einen Wert von $423,5 \pm 256,3 \mu\text{g/l}$, was 844,5 % des Ausgangswertes entspricht. Bei den Safeline Y-Oxygenatoren hingegen wurde nach einstündiger Rezirkulation eine Elastasekonzentration von $109,9 \pm 40,34 \mu\text{g/l}$ entsprechend 202,8 % des Anfangswertes gemessen. In beiden Gruppen konnte nach 120 Minuten ein massiver Konzentrationsanstieg der PMN-Elastase verzeichnet werden.

AZP [min]	n	non-coated [µg/l]		Safeline Y [µg/l]		p
		Mittelwert	sd	Mittelwert	sd	
0	5	58,57	21,07	56,74	18,24	0,8990752
1	5	69,41	23,79	52,32	18,67	0,2910754
5	5	101,03	36,48	56,77	18,17	0,0616569
10	5	136,81	58,35	65,10	15,68	0,0449887
20	5	236,78	103,39	59,93	20,98	0,0100421
30	5	292,71	167,46	62,95	19,39	0,0260156
60	5	423,51	256,34	109,88	40,34	0,0420284
120	5	798,58	383,20	476,22	276,68	0,2096873

Tab 7.2 PMN-Elastase: Vergleich Safeline Y – non-coated

7.3 Vergleich der Safeline-Oxygenatoren mit den Safeline Y-Oxygenatoren:

Sowohl in der Safeline- als auch in der Safeline Y-Gruppe konnte bis zu einer Versuchslaufzeit von einer halben Stunde ein moderater Anstieg der PMN-Elastase-Konzentration festgestellt werden. Zwischen den beiden Gruppen bestand in dieser Zeit statistisch gesehen kein signifikanter Unterschied. Erst nach einstündiger Rezirkulation konnte dieser aufgrund des bedeutend stärkeren Konzentrationsanstiegs von PMN-Elastase in der Safeline-Gruppe auf $260,9 \pm 75,56 \mu\text{g/l}$ (= 498 % des Anfangswertes) als hoch signifikant bezeichnet werden. Nach zwei Stunden stieg auch der PMN-Elastase-Wert in der Safeline Y-Gruppe stärker an, so dass zwischen den beiden Gruppen nur noch ein statistisch signifikanter Unterschied bestand. Der Maximalwert in der Safeline-Gruppe betrug dabei $1149,09 \pm 334,38 \mu\text{g/l}$, der in der Safeline Y-Gruppe dagegen $476,22 \pm 276,68 \mu\text{g/l}$.

AZP [min]	n	Safeline [µg/l]		Safeline Y [µg/l]		p
		Mittelwert	sd	Mittelwert	sd	
0	5	54,15	6,08	56,74	18,24	0,79414018
1	5	58,14	5,22	52,32	18,67	0,56529786
5	5	63,41	11,95	56,77	18,17	0,55865975
10	5	63,83	13,52	65,10	15,68	0,90507326
20	5	69,26	12,74	59,93	20,98	0,35315620
30	5	74,85	14,39	62,95	19,39	0,35315620
60	5	260,90	75,56	109,88	40,34	0,00777550
120	5	1149,09	334,38	476,22	276,68	0,01464894

Tab 7.3 PMN-Elastase: Vergleich Safeline – Safeline Y

7.4 Vergleich der Safeline-Oxygenatoren mit den Safeline USA-Oxygenatoren:

Der Vergleich der Safeline- mit den Safeline USA-Oxygenatoren ergab erst nach zwei Stunden Zirkulationszeit einen statistisch hoch signifikanten Unterschied, der auf dem im Vergleich zur Safeline USA-Gruppe massiven Konzentrationsanstieg der PMN-Elastase in der Safeline-Gruppe beruhte. Während die Elastase-Konzentration in beiden Gruppe innerhalb der ersten Stunde der Rezirkulation zunächst stetig anstieg (Safeline von $54,15 \pm 6,08 \mu\text{g/l}$ auf $260,9 \pm 75,56 \mu\text{g/l}$; Safeline USA von $51,1 \pm 20,57 \mu\text{g/l}$ auf $183,01 \pm 72,69 \mu\text{g/l}$), konnte in der Safeline-Gruppe nach zwei Stunden ein erheblich stärkerer Anstieg des Elastase-Wertes als in der Safeline USA-Gruppe festgestellt werden. Zu diesem Zeitpunkt erreichte die PMN-Elastase-Konzentration in der Safeline-Gruppe 2207,5 % des Anfangswertes, in der Safeline USA-Gruppe dagegen nur 823,2 % der Anfangskonzentration.

AZP [min]	n	Safeline		Safeline USA		p
		Mittelwert	sd	Mittelwert	sd	
0	5	54,15	6,08	51,10	20,57	0,7836230
1	5	58,14	5,22	44,51	17,29	0,1698394
5	5	63,41	11,95	50,37	14,01	0,1943773
10	5	63,83	13,52	84,47	48,05	0,4320984
20	5	69,26	12,74	98,92	48,83	0,2735946
30	5	74,85	14,39	121,72	55,36	0,1398624
60	5	260,90	75,56	183,01	72,69	0,1756831
120	5	1149,09	334,38	396,37	268,54	0,0079577

Tab 7.4 PMN-Elastase: Vergleich Safeline – Safeline USA

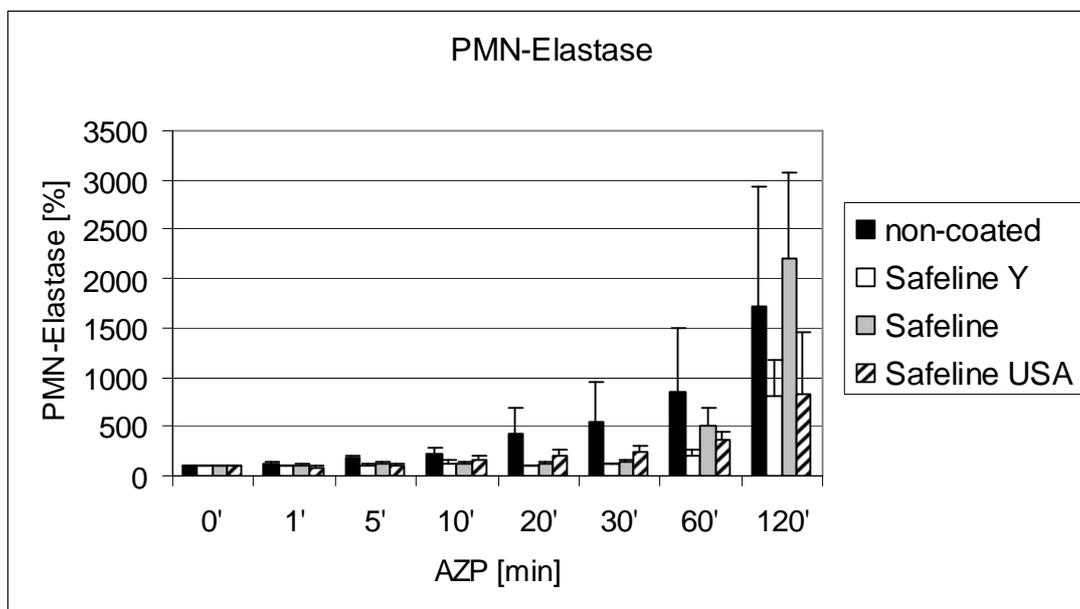


Abb. 13 Verlauf der PMN-Elastase-Konzentration während zweistündiger Rezirkulation

7.5 Vergleich der Safeline-Oxygenatoren mit den heparinisierten Safeline-Oxygenatoren:

Bei dem Vergleich dieser zwei Gruppen konnte kein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt werden. In beiden Gruppen konnte jedoch ein deutlicher Anstieg der Elastase-Konzentration beobachtet werden. Bei den

Safeline-Oxygenatoren wurde ein Maximalwert von $1149,09 \pm 334,38 \mu\text{g/l}$ (= 2207,5 % des Anfangswertes), bei den modifizierten Safeline-Oxygenatoren ein maximaler Wert von $1341,3 \pm 442,75 \mu\text{g/l}$, was 1791 % der Ausgangskonzentration entspricht.

AZP [min]	n	Safeline [$\mu\text{g/l}$]		Safeline +Hep [$\mu\text{g/l}$]		p
		Mittelwert	sd	Mittelwert	sd	
0	5	54,15	6,08	73,17	12,76	0,0274464
1	5	58,14	5,22	65,98	7,22	0,1165543
5	5	63,41	11,95	81,42	22,59	0,1963126
10	5	63,83	13,52	113,37	62,82	0,1616307
20	5	69,26	12,74	148,02	92,37	0,1296203
30	5	74,85	14,39	175,43	105,49	0,0955235
60	5	260,90	75,56	280,56	154,78	0,8251318
120	5	1149,09	334,38	1341,30	442,75	0,5080128

Tab 7.5 PMN-Elastase: Vergleich Safeline – Safeline mit Heparin

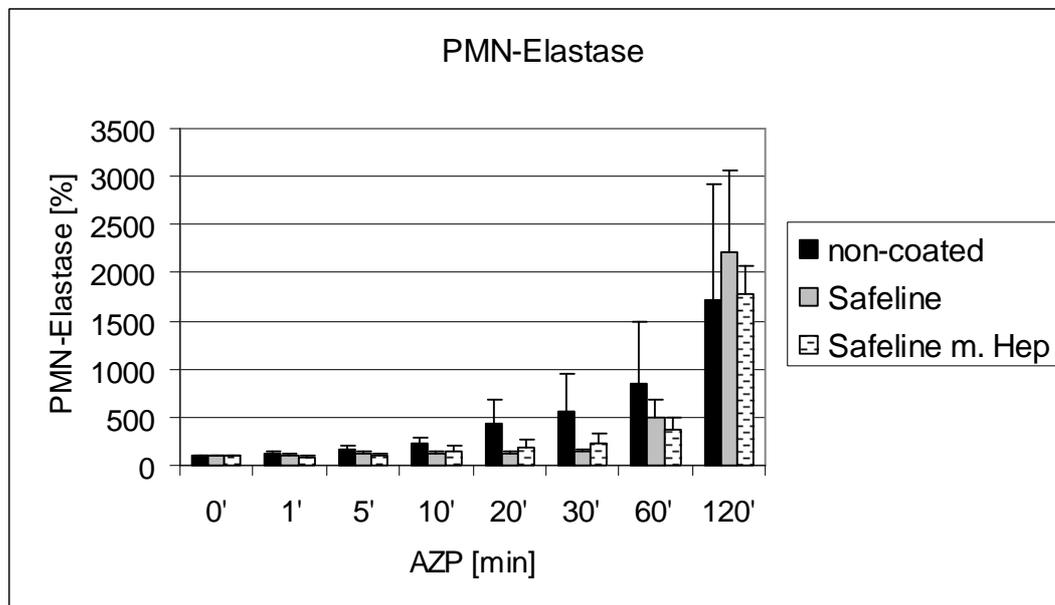


Abb. 14 Verlauf der PMN-Elastasekonzentration während zweistündiger Rezirkulation

AZP = Abnahmezeitpunkt; sd = Standardabweichung

IV. DISKUSSION

1. Thrombozyten

Die extrakorporale Zirkulation beeinflusst die Blutplättchen aufgrund von verschiedenen Faktoren. Zu den Hauptaktivatoren gehören der Kontakt des Blutes mit der artifiziellen Oberfläche, physikalische Faktoren wie die während der Operation bestehende Hypothermie sowie auf die Thrombozyten einwirkende Scherkräfte, das zur Antikoagulation perioperativ verabreichte Heparin, das chirurgische Trauma, die Bildung von Thrombin und die Aktivierung des Komplementsystems. (17; 68; 101; 111)

Die aktivierten Thrombozyten verändern ihre Gestalt und exprimieren unter anderem den GP IIb/IIIa-Rezeptor auf ihrer Oberfläche. Über diese Rezeptoren binden die Thrombozyten an das an der Fremdoberfläche adsorbierte Fibrinogen. Die Anzahl der adsorbierten Blutplättchen ist somit der Anzahl des adsorbierten Fibrinogens proportional. Das Ausmaß der Plättchenadhäsion an der künstlichen Oberfläche hängt jedoch auch von den chemischen und physikalischen Eigenschaften des verwendeten Biomaterials ab. So adhären zum Beispiel an einer glatten Oberfläche bedeutend weniger Thrombozyten als an einem Material mit rauer Oberflächenbeschaffenheit.

Über den GPIIb/IIIa-Rezeptor bildet das Plasmafibrinogen ausserdem Brücken zwischen den einzelnen Blutplättchen und führt somit zur Bildung von zirkulierenden Thrombozytenaggregaten. Des Weiteren bilden die aktivierten Thrombozyten über bestimmte Adhäsionsmoleküle Konjugate mit Erythrozyten und Leukozyten. (17; 45; 61; 108)

Zudem adhären aktivierte Blutplättchen an die Zellen des Gefäßendothels und vermitteln so die Bindung von Leukozyten und die folgende Migration der Zellen in das Gewebe.

Die bei der Thrombozytenaktivierung freigesetzten Granulainhalte bewirken zum Teil eine weitere Zellstimulierung. (101)

Der infolge des kardiopulmonalen Bypasses reduzierte zirkulierende Thrombozyten-Pool lässt sich demnach zurückführen auf die Adhäsion der

Zellen an der Fremdoberfläche, die Bildung von Aggregaten sowohl untereinander als auch mit anderen Blutzellen, die Destruktion von Zellen sowie auf die durch das Priming verursachte Hämodilution. (17)

Aufgrund der Veränderung von Plättchenzahl und -funktion kann es während und nach der extrakorporalen Zirkulation zu schwerwiegenden Komplikationen kommen, zu denen vor allem Thromboembolien, aber auch eine postoperativ verlängerte Blutungszeit und Entzündungsreaktionen gezählt werden. (101)

Die Bestimmung der Thrombozytenzahl kann aufgrund der oben genannten Tatsachen der Beurteilung der Thrombogenität des im extrakorporalen Kreislaufverfahren eingesetzten Materials dienen und stellt somit einen bedeutenden Parameter zur Beurteilung der Biokompatibilität dar.

In der Gruppe der unbeschichteten Oxygenatoren konnte schon nach einer Minute ein massiver Abfall der Thrombozytenkonzentration ($67 \pm 33 \times 10^3/\mu\text{l}$) beobachtet werden, der im Vergleich zur Safeline-Gruppe ($198 \pm 52 \times 10^3/\mu\text{l}$) als signifikant bezeichnet werden konnte und auch nach 5minütiger Rezirkulation noch beobachtet werden konnte. Nach 10 Minuten jedoch fiel auch in dieser Gruppe die Konzentration der Blutplättchen drastisch ab.

Eine sehr geringe Abnahme der Thrombozytenzahl wurde dagegen bei den Safeline Y-Oxygenatoren gemessen. Aufgrund dieser Tatsache ergaben sich sowohl im Vergleich mit den unbeschichteten, als auch mit den Safeline-Oxygenatoren hoch signifikante Unterschiede, die bis zur Versuchslaufzeit von einer Stunde bestehen blieben (Safeline Y: $206 \pm 50 \times 10^3/\mu\text{l}$; Safeline: $74 \pm 15 \times 10^3/\mu\text{l}$).

Diese Resultate führen zu dem Schluss, dass die Oberfläche der unbeschichteten sowie der Safeline-Oxygenatoren stark thrombogene Eigenschaften besitzen und somit eine Adhäsion der Thrombozyten bewirken, was wiederum zu einem Abfall der Plättchenkonzentration führt. Die Safeline Y-Oxygenatoren hingegen weisen deutlich günstigere Oberflächeneigenschaften auf, da aufgrund des nur leichten Thrombozytenabfalls eine sehr geringe Plättchenadhäsion anzunehmen ist und so das Risiko für thromboembolische Komplikationen reduziert wird.

Da die Plättchenkonzentration nach ungefähr der Hälfte der Zeit in allen Gruppen wieder zunahm, kann davon ausgegangen werden, dass der initiale Thrombozytensturz zum größten Teil auf der Adhäsion der Blutplättchen an der artifiziellen Oberfläche des extrakorporalen Kreislaufsystems beruht und nur in kleinem Ausmaß durch eine Destruktion der Thrombozyten zustande kommt. In der Gruppe der Safeline USA-Oxygenatoren sowie bei den mit Heparin vorgespülten Oxygenatoren konnte ebenfalls eine massive Reduktion der Thrombozytenzahl beobachtet werden. Somit kann eine Verminderung der Oberflächenthrombogenität durch diese Oberflächenbeschichtungen ausgeschlossen werden.

2. β -Thromboglobulin

Das in den α -Granula von Thrombozyten enthaltene plättchenspezifische Protein β -Thromboglobulin wird bei der Stimulierung der Zellen in das Blutplasma freigesetzt und gilt demnach als bedeutender Marker der Plättchenaktivierung.

Während der extrakorporalen Zirkulation können sowohl biomaterialabhängige als auch –unabhängige Faktoren zu einer Aktivierung von Thrombozyten mit der Folge der Degranulation führen. Dazu gehören Stimuli wie der Kontakt des Blutes mit der Fremdoberfläche, die Blut-Luft-Grenzfläche sowie die Freisetzung von ADP und die Bildung von Thrombin. Aber auch die während dem chirurgischen Eingriff bestehende Hypothermie, die Destruktion der Zellen durch chirurgische Manipulation und die auf die Zellmembran einwirkenden Scherkräfte sind Faktoren, die eine Freisetzung von β -Thromboglobulin bewirken können.

Erhöhte Plasmalevel von β -Thromboglobulin infolge des Einsatzes einer Herz-Lungen-Maschine reflektieren somit das Ausmaß der Thrombozytenaktivierung und geben Aufschluss über die Thrombogenität der eingesetzten Materialien. (12; 47; 80; 92)

Bezüglich der β -Thromboglobulin-Konzentration zeigten die Oberflächeneigenschaften der Safeline Y-Oxygenatoren einen deutlich günstigeren Einfluss auf die Blutplättchen. Im Vergleich zu den unbeschichteten Oxygenatoren ergab sich analog dem initialen Thrombozytensturz schon nach 5minütiger Rezirkulation ein hoch signifikant geringerer Anstieg der β -Thromboglobulin-Werte (non-coated: $1462,84 \pm 671,11$ IU/ml; Safeline: $646,57 \pm 175,81$ IU/ml; Safeline Y: $103,94 \pm 48,56$ IU/ml). Dieser Konzentrationsunterschied blieb bis zum Ende des Versuches bestehen. Dagegen konnte die Safeline-Beschichtung im Vergleich zur unbeschichteten Gruppe nur initial (nach 5 Minuten $646,57 \pm 175,81$ IU/ml) einen signifikanten Unterschied aufweisen, der auf einem langsameren Anstieg des β -Thromboglobulin-Wertes in der Safeline-Gruppe beruhte.

Anhand der Bestimmung der β -Thromboglobulin-Konzentration konnte des Weiteren eine günstigere Beschaffenheit der Safeline Y-Oberfläche gegenüber der Safeline-Beschichtung nachgewiesen werden. Nach 5 Minuten zeigte der Vergleich dieser beiden Gruppen eine weitaus geringere Aktivierung der Thrombozyten und somit einen deutlich weniger starken β -Thromboglobulinanstieg in der Safeline Y-Gruppe. Dieser statistisch hoch signifikante Konzentrationsunterschied konnte bis zum Ende der Rezirkulation beobachtet werden.

In der Gruppe der Safeline USA-Oxygenatoren konnten im Vergleich zu den Safeline-Oxygenatoren höhere β -Thromboglobulin-Werte gemessen werden (signifikanter Unterschied nach einer und 30 Minuten), so dass diese Beschichtung gegenüber der Safeline-Oberflächenvergütung keine Vorteile aufweist. Auch die vorgespülten Safeline-Oxygenatoren wiesen keine bedeutende Verbesserung der Oberflächeneigenschaften bezüglich der Freisetzung von β -Thromboglobulin auf.

3. TAT

Während dem Einsatz der Herz-Lungen-Maschine kommt es durch den Kontakt des Blutes mit der artifiziellen Oberfläche und der damit einhergehenden Aktivierung des intrinsischen Gerinnungsweges zu einer ausgeprägten Thrombinbildung. Die Initiation der Thrombinbildung im Zuge der extrakorporalen Zirkulation über das Kontaktsystem beruht auf der Adsorption spezifischer Plasmaproteine wie Faktor XII, HMWK und PKK an der Fremdoberfläche. (45; 102)

Das durch Faktor Xa aus Prothrombin freigesetzte Thrombin stellt ein zentrales Enzym der Blutgerinnung dar, da es zur Fibrinbildung sowie zur Aktivierung von sowohl Thrombozyten als auch des fibrinolytischen Systems befähigt ist.

(67; 98)

Im Plasma kommt Thrombin ausschließlich im Komplex mit Antithrombin III gebunden und somit in inaktiver Form vor. Das in der Leber und den Endothelzellen gebildete Antithrombin III bildet somit den wichtigsten physiologischen Serinproteaseninhibitor. Die Formation dieses sehr stabilen TAT-Komplexes wird in Anwesenheit von Heparin enorm beschleunigt.

(7; 67; 71)

Über die Bestimmung des TAT-Komplexes lässt sich somit das Ausmaß der intravasalen Thrombinbildung bzw. Gerinnungsaktivierung beurteilen. Erhöhte TAT-Werte geben demnach Aufschluss über eine Hyperkoagulabilität, die mit dem Risiko einer thromboembolischen Komplikation verbunden sein kann.

(67; 71; 98)

Der Vergleich der polypeptidbeschichteten Oxygenatoren ergab zu keiner Zeit einen statistisch signifikanten Unterschied bezüglich der TAT-Konzentration. Es ist demnach anzunehmen, dass die verschiedenen Safeline-Beschichtungen in etwa gleichem Ausmaß die Gerinnung und somit Thrombinbildung initiieren, was eine Gegenregulation im Sinne der Bildung von TAT-Komplexen erforderlich macht. Des Weiteren konnte durch die Beschichtung der Oberfläche mit Polypeptiden im Vergleich zu den Oxygenatoren mit

unbeschichteter Oberfläche keine signifikante Verbesserung in Bezug auf die TAT-Konzentration erzielt werden.

4. Hämolyse (freies Hämoglobin)

Im Laufe des kardiopulmonalen Bypasses kann es zur Destruktion von Erythrozyten mit der Folge der Freisetzung von Hämoglobin ins Plasma kommen. Als Ursache hierfür sind vor allem die während der extrakorporalen Zirkulation auf die Zellmembran einwirkenden Scherkräfte anzusehen. Dieser schädigende Einfluss auf die roten Blutkörperchen wird vor allem durch die bei der Operation eingesetzten und zu Turbulenzen des strömenden Blutes führenden Blutpumpen, Bubble-Oxygenatoren, Kardiotomiesauger aber auch Konnektorstellen verursacht.

Zudem kann der im Zuge der Komplementaktivierung gebildete terminale Lysekomplex über die Zerstörung der Zellen eine Freisetzung der Zellinhalte bewirken. Neben der Hämoglobinfreisetzung kommt es bei der Zerstörung der roten Blutkörperchen auch zu einer Freisetzung von ADP, das aufgrund seiner plättchenaktivierenden Wirkung die Blutgerinnung beeinflusst und so das Risiko des Auftretens von Thromboembolien erhöht. (8; 37; 39)

Das im Blut frei zirkulierende Hämoglobin wird normalerweise an das Plasmaprotein Haptoglobin gebunden (Hb:Hp-Komplex). Überschreitet die Hämoglobinfreisetzung jedoch die Bindungskapazität des Haptoglobins (> 120 mg/dl), erfolgt die Ausscheidung des Hämoglobins über die Niere mit der möglichen Folge einer Hämoglobinurie. Zudem katalysiert das im Plasma frei zirkulierende Hämoglobin die Produktion von freien Radikalen und kann somit einen oxidativen Gewebeschaden herbeiführen. (8; 72)

Demnach gilt die Hämolyse als Gradmesser für die Traumatisierung von Erythrozyten während dem Einsatz der Herz-Lungen-Maschine. Da es jedoch infolge des kardiopulmonalen Bypasses selten zu einer Überschreitung der Bindungskapazität des Haptoglobins kommt, könnte man in Betracht ziehen, die Schädigungen von Erythrozyten anhand der Schwellungs- und

Schrumpfungszustände der Zellen oder der Freisetzung anderer Zellinhalte, wie der Laktatdehydrogenase oder ADP zu beurteilen. (8)

Bei allen Oxygenatorgruppen konnte erst nach zweistündiger Rezirkulation eine nennenswerte Schädigung der roten Blutkörperchen beobachtet werden. Nach dieser Zeit ergab sich sowohl bei dem Vergleich der Safeline-Gruppe mit den Safeline Y- als auch mit den Safeline USA-Oxygenatoren ein statistisch signifikanter Unterschied. Ausschlaggebend hierfür war in beiden Fällen der deutlich stärkere Anstieg der Hämoglobinkonzentration in der Safeline-Gruppe (Safeline: $238,63 \pm 106,92$ mg/dl; Safeline USA: $40,6 \pm 35,4$ mg/dl; Safeline Y: $48,302 \pm 30,709$ mg/dl).

Somit kann von einer ausgeprägteren Erythrozytenschädigung durch die Safeline-Oxygenatoren beruhend auf ungünstigeren Oberflächeneigenschaften dieser Beschichtung ausgegangen werden. Verfahrensbedingte Ursachen für diese Konzentrationsunterschiede können aufgrund der immer gleichen Versuchsanordnung in allen Gruppen ausgeschlossen werden.

Die Modifizierung der Safeline-Beschichtung durch die heparinisierte Vorspüllösung konnte keine hervorzuhebende Änderung im Sinne eines geringeren Hämoglobinanstiegs erzielen (Safeline + Hep: $193,6 \pm 60,1$ mg/dl).

5. SC5b-9

Die Aktivierung des Komplementsystems während dem Einsatz der Herz-Lungen-Maschine erfolgt hauptsächlich über den alternativen Weg. Zu den wichtigsten Faktoren, die die Komplementkaskade initiieren, gehören der Kontakt des Blutes mit der Fremdoberfläche, die Blut-Luft-Grenzfläche während der Oxygenation sowie die Freisetzung von Endotoxinen. Eine Komplementaktivierung über den klassischen Weg erfolgt fast ausschließlich postoperativ aufgrund der Gabe von Protaminsulfat zur Neutralisierung des perioperativ verabreichten Heparins. (10; 21; 24; 29; 56; 68)

Die im Zuge der Komplementkaskade gebildeten Anaphylatoxine C3a und C5a aktivieren Thrombozyten, Monozyten und neutrophile Granulozyten. C5a induziert zudem die Expression von CD 11b und CD 18 (Integrine) auf den Neutrophilen. Die Komplementaktivierung endet in der Bildung des terminalen Lysekomplexes C5b-9 (TCC), der über die Bindung an die Zellmembran und die Bildung eines transmembranalen Tunnels zur Lyse der Zielzelle führt. Dadurch kommt es während dem kardiopulmonalen Bypass zu einer Destruktion von Erythrozyten mit der Folge der Hämolyse sowie zur Zerstörung und somit Degranulation von Blutplättchen und Leukozyten.

C5a und C5b-9 bewirken ausserdem die Expression von Adhäsionsmolekülen auf Thrombozyten und Endothelzellen und fördern so die Migration der Leukozyten ins Gewebe, was wiederum erhebliche Komplikationen mit sich bringen kann. (13; 24; 51)

Der im Plasma zirkulierende C5b-9-Komplex wird durch das ebenfalls frei zirkulierende S-Protein inaktiviert. Die Bestimmung des SC5b-9-Komplexes reflektiert das Ausmaß der Komplementaktivierung während der extrakorporalen Zirkulation und gibt demnach Auskunft über die Biokompatibilität der eingesetzten Materialien. (13; 24; 56)

Infolge der Aktivierung des Komplementsystems kommt es zu einer Reihe von sekundären Entzündungseffekten, die sich postoperativ in Komplikationen wie myokardialer Dysfunktion, erhöhter Wasseransammlung in der Lunge, Hämolyse oder Multiorganversagen äußern können. (51; 56; 86; 93)

Die Beurteilung der Aktivierung des inflammatorischen Systems, gemessen anhand des im Laufe der Komplementkaskade entstehenden terminalen Lysekomplexes (SC5b-9), zeigte eine deutliche Überlegenheit der polypeptidbeschichteten Oxygenatoren gegenüber der unbeschichteten Gruppe.

Während der Vergleich der unbeschichteten (Maximalwert: $2209,53 \pm 915,17$ ng/ml) mit den Safeline-Oxygenatoren (Maximalwert: $900,91 \pm 292,17$ ng/ml) jeweils nach 5, 60 und 120 Minuten einen signifikanten Unterschied ergab, konnten bei dem Vergleich mit den Safeline Y-Oxygenatoren (Maximalwert:

599,29 ± 178,97 ng/ml) nach 5 Minuten bis zum Ende des Versuchs signifikante und zum Teil sogar hoch signifikante Unterschiede festgestellt werden.

Demnach lässt sich festhalten, dass sowohl die Safeline- als auch die Safeline Y-Beschichtung in Bezug auf die Aktivierung des Komplementsystems günstigere Oberflächeneigenschaften besitzen als die unbeschichtete Oxygenatoroberfläche.

Bei dem Vergleich der Safeline USA-Oxygenatoren (Maximalwert: 1254,71 ± 422,4 ng/ml) mit den Safeline- Oxygenatoren konnte kein nennenswerter Unterschied festgestellt werden, in beiden Gruppen stieg der SC5b-9-Wert in etwa gleichem Maße an.

Die Spülung der Safeline-Oxygenatoren mit der heparinisierten Lösung vor Versuchsbeginn führte zu einem geringeren Anstieg der SC5b-9-Konzentration, der statistisch gesehen jedoch nicht als signifikant zu verzeichnen war (Maximalwert: 694,52 ± 94,03 ng/ml).

6. Leukozyten

Während dem kardiopulmonalen Bypass kommt es aufgrund von Hämodilution, der Adhäsion von weißen Blutkörperchen am Endothel sowie der Sequestration der Zellen in der Lungenstrombahn (= sog. sticking der Leukozyten) zu einem deutlichen Abfall der Leukozytenkonzentration. (10; 79)

Die Aktivierung der Leukozyten aufgrund des Einsatzes der Herz-Lungen-Maschine wird als bedeutender Faktor bei der Entstehung der systemischen inflammatorischen Reaktion (SIRS) angesehen.

Vor allem die Anreicherung von Neutrophilen in der Lunge und deren Freisetzung von Proteasen mit der Folge der Zerstörung des Lungenparenchyms kann schwerwiegende Folgen bis hin zur Ausbildung des ARDS nach sich ziehen. (2; 53; 54; 79)

Im Laufe der Rezirkulation werden infolge des Kontaktes von Blut und Fremdoberfläche drei Hauptgruppen von Adhäsionsmolekülen (Integrine, Selectine und Immunglobuline) auf den Oberflächen von Leukozyten,

Thrombozyten und Endothelzellen exponiert, die zu einer Interaktion dieser Zellen untereinander führen. So bilden die Leukozyten zum einen mit den Blutplättchen Aggregate, zum anderen können sie an der Oberfläche des Gefäßendothels adhären und von dort in das Gewebe übertreten.

(3; 4; 78)

Zudem wird die Migration der Leukozyten durch die aktivierenden und chemotaktischen Eigenschaften der im Verlauf der extrakorporalen Zirkulation gebildeten Komplementfaktoren C3a und C5a gefördert. (99)

Im Vergleich zur unbeschichteten Gruppe zeigten die Safeline-Oxygenatoren einen geringeren Abfall der Leukozytenkonzentration, der zwischen 20 und 60 Minuten als statistisch signifikant zu bezeichnen war. Der Vergleich der unbeschichteten Oxygenatoren mit den Safeline Y-Oxygenatoren zeigte eine noch deutlichere Überlegenheit der polypeptidbeschichteten Oberfläche in Bezug auf die Margination und Aggregation der Leukozyten. Hier wies der Leukozytenabfall nach 20minütiger Rezirkulation bis zum Ende des Versuches eine hohe Signifikanz auf (Leukozytenkonzentration nach 20 Minuten: non-coated: $2,6 \pm 0,9 \times 10^3/\mu\text{l}$; Safeline: $4,4 \pm 0,7 \times 10^3/\mu\text{l}$; Safeline Y: $4,7 \pm 0,8 \times 10^3/\mu\text{l}$).

Die Safeline Y-Beschichtung konnte auch im Vergleich zu den Safeline-Oxygenatoren aufgrund des geringeren Abfalls der Leukozytenkonzentration günstigere Oberflächeneigenschaften aufweisen (hoch signifikanter Unterschied nach 120 Minuten: Safeline: $2,0 \pm 0,2 \times 10^3/\mu\text{l}$; Safeline Y: $3,8 \pm 1,0 \times 10^3/\mu\text{l}$).

Der Vergleich der Safeline- mit den Safeline USA-Oxygenatoren ergab zu keiner Zeit einen nennenswerten Konzentrationsunterschied der Leukozyten und führt demnach zu der Annahme, dass diese Beschichtungen in etwa gleiche Oberflächeneigenschaften aufweisen.

Die durch die heparinisierte Vorspüllösung modifizierte Safeline-Oberfläche zeigte keine verbesserte Hämokompatibilität in Bezug auf die Leukozyten, sondern schuf vielmehr eine ungünstigere Oberflächenbeschaffenheit, da in dieser Gruppe ein signifikant stärkerer Abfall der Leukozytenkonzentration zu beobachten war (nach 20minütiger Rezirkulation: $2,8 \pm 0,5 \times 10^3/\mu\text{l}$).

7. PMN-Elastase

Die Aktivierung von Leukozyten während dem kardiopulmonalen Bypass erfolgt zum einen durch den direkten Kontakt der Zellen mit der artifiziellen Oberfläche des extrakorporalen Kreislaufsystems, zum anderen werden die weißen Blutkörperchen durch das bei der Initiation des Kontaktphasensystems entstehende Kallikrein, durch die Aktivierung des Komplementsystems und den Plättchen aktivierenden Faktor (=PAF) stimuliert. (2; 3; 37)

Aktiviert neutrophile Granulozyten reagieren mit der Freisetzung von PMN-Elastase und anderen proteolytischen Enzymen aus ihren Granula. Zudem bewirkt der im Zuge der Komplementaktivierung gebildete C5b-9-Komplex eine Destruktion der Zellen und somit ebenfalls eine Degranulation. Nach Jansen et al. beruhen 55 % des Elastaseanstiegs während der extrakorporalen Zirkulation auf einer Erhöhung der C5b-9-Konzentration. (3; 17; 34; 39)

Die Elastase ist ein Enzym mit geringer Substratspezifität und zum Abbau struktureller Komponenten des Interstitiums wie Kollagen, Elastin, Basalmembranen und Proteoglykane befähigt. Dies kann zu schwerwiegenden Komplikationen während und nach dem kardiopulmonalen Bypass führen.

Vor allem die Lungendysfunktion wird mit der Aktivierung von Leukozyten in Verbindung gebracht, da es aufgrund der Sequestration von Neutrophilen in der Lungenstrombahn und der Elastasefreisetzung zu erheblichen Gewebeschäden kommen kann. (2; 10; 34; 54)

Zudem kann die PMN-Elastase Gerinnungsfaktoren verändern sowie deren Antagonisten inaktivieren, wodurch das Risiko von postoperativen Nachblutungen erheblich erhöht wird. (10; 96)

Aufgrund dieser Tatsachen können über die Bestimmung der PMN-Elastase-Konzentration Rückschlüsse über das Ausmaß der Leukozytenaktivierung während dem Einsatz der Herz-Lungen-Maschine gezogen werden. (34; 54)

In der Gruppe der Safeline- ($63,83 \pm 13,52 \mu\text{g/l}$) sowie der Safeline Y-Oxygenatoren ($65,1 \pm 15,68 \mu\text{g/l}$) zeigte sich im Vergleich zu den unbeschichteten Oxygenatoren ($136,81 \pm 58,35 \mu\text{g/l}$) schon nach 10minütiger Rezirkulationszeit ein signifikant geringerer Anstieg der PMN-Elastase-

Konzentration. Dieser Konzentrationsunterschied hielt in der Safeline-Gruppe bis zum 6. Abnahmezeitpunkt, in der Safeline Y-Gruppe sogar bis zum 7. Abnahmezeitpunkt an. Der direkte Vergleich der Safeline- mit den Safeline Y-Oxygenatoren ergab nach einer Stunde Versuchslaufzeit aufgrund der deutlich ausgeprägteren Leukozytenaktivierung in der Safeline-Gruppe (Safeline: $260,9 \pm 75,56 \mu\text{g/l}$; Safeline Y: $109,88 \pm 40,43 \mu\text{g/l}$) einen statistisch hoch signifikanten Unterschied, der nach zwei Stunden noch als signifikant zu bezeichnen war. Auch im Vergleich zu den Safeline USA-Oxygenatoren (hoch signifikanter Unterschied nach zweistündiger Rezirkulation: $396,37 \pm 268,54 \mu\text{g/l}$) stieg die PMN-Elastase-Konzentration in der Safeline-Gruppe am Ende des Versuches stärker an.

Durch die Vorspülung der Safeline-Oxygenatoren mit einer heparinisierten Lösung konnte anhand der PMN-Elastase-Konzentration kein signifikanter Unterschied und somit keine verbesserte Biokompatibilität der Oberfläche festgestellt werden.

Aufgrund dieser Tatsachen können den polypeptidbeschichteten Oxygenatoren zunächst günstigere Oberflächeneigenschaften im Sinne einer deutlich geringeren Aktivierung von Leukozyten zugesprochen werden. Unter den verschiedenen Safeline-Oxygenatoren ist die Safeline Y-Beschichtung hervorzuheben, da diese vor allem gegen Versuchsende eine bessere Hämokompatibilität aufweist, als das bei den Safeline-Oxygenatoren der Fall ist und demnach eine weniger ausgeprägte Freisetzung von PMN-Elastase aus den neutrophilen Granulozyten hervorruft.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Die Interaktion des Blutes mit der ca. 3 m² großen, nichtendothelialen artifiziellen Oberfläche im extrakorporalen Kreislaufsystem beeinflusst sowohl die Koagulation als auch das inflammatorische System.

Die Aktivierung dieser zellulären und humoralen Blutkomponenten infolge des Einsatzes der Herz-Lungen-Maschine (HLM) kann eine Reihe von Komplikationen, darunter Nachblutungen, Thromboembolien und systemische Entzündungsreaktionen nach sich ziehen.

Aufgrund dieser Tatsachen kommt dem Versuch, durch verschiedene Methoden eine Materialoberfläche zu schaffen, die das natürliche Gefäßendothel mit seinen Eigenschaften zu imitieren versucht und so eine Minimierung der oben genannten Risiken herbeiführt, eine besondere Bedeutung zu.

In der vorliegenden Studie wurde die Hämokompatibilität von biopassiven Oberflächenbeschichtungen untersucht:

Zur Simulation des kardiopulmonalen Bypasses zirkulierten 500 ml Blut und Blutzusätze für 120 Minuten in einem in-vitro-HLM-Modell. Dabei wurden zu immer gleich bleibenden Abnahmezeitpunkten Blutproben entnommen, die auf folgende Gerinnungsparameter sowie inflammatorische Marker getestet wurden:

- Thrombozyten
- β -Thromboglobulin
- Thrombin-Antithrombin-III-Komplex (TAT)
- Hämolyse (freies Hämoglobin)
- Leukozyten
- PMN-Elastase
- terminaler Lysekomplex SC5b-9

Bei den eingesetzten Oxygenatoren handelte es sich um QUADROX Hohlfasermembranoxygenatoren der Firma JOSTRA/MAQUET, deren Polypeptidbeschichtungen sich in der Konzentration der Polypeptide (Safeline, Safeline Y), im Beschichtungsvorgang (Safeline USA) sowie in der Vorbehandlung (Safeline mit heparinisierter Lösung vorgespült) unterschieden. Als Kontrollgruppe dienten dabei unbeschichtete Oxygenatoren derselben Bauart.

Anhand der Resultate ließ sich zunächst feststellen, dass die Vorspülung der Oxygenatoren mit einer heparinhaltigen Lösung keine Optimierung der Oberflächenbeschaffenheit herbeiführt und somit durch diese Maßnahme keine verbesserte Biokompatibilität erzielt werden kann.

Ebenso konnten durch die veränderten Beschichtungsbedingungen (Safeline USA: hohe HA-Konzentration, niedriger pH-Wert; Safeline: niedrige HA-Konzentration, hoher pH-Wert) keine günstigeren Materialeigenschaften geschaffen werden.

Die weitere Ergebnisauswertung demonstrierte jedoch eine deutliche Überlegenheit der Safeline-Beschichtung gegenüber den unbeschichteten Oxygenatoren. Demnach konnte gezeigt werden, dass die Beschichtung der Oxygenatoroberfläche mit Polypeptiden bedeutende Vorteile im Sinne einer verbesserten Biokompatibilität mit sich bringt. Ersichtlich wurde dies vor allem anhand des geringeren Leukozytenabfalls sowie weniger starken Anstiegs der PMN-Elastase-Konzentration in der Safeline-Gruppe.

In Bezug auf die meisten Untersuchungsparameter erwies sich die SafelineY-Beschichtung im Vergleich zur Safeline-Gruppe sowie unbeschichteten Gruppe als vorteilhafter. Diese Oxygenatoren zeigten einen besonders günstigen Einfluss auf die Thrombozyten, der sich nicht nur in einer geringer ausgeprägten Thrombozytenreduktion, sondern auch in einer verminderten Plättchenaktivierung und somit weniger starken Freisetzung von β -Thromboglobulin zeigte.

Abschließend kann festgehalten werden, dass die Beschichtung von Oxygenatoroberflächen mit Polypeptiden deutliche Vorteile bezüglich der Hämokompatibilität mit sich bringt und somit zu einer Verminderung der postoperativen Risiken und Komplikationen beiträgt und demnach eine Verkürzung der Rehabilitationsphase des Patienten zu erwarten ist.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

1. Abrams, C. S.; Ellison, N.; Budzynski, A. Z. and Shattil, S. J.: Direct detection of activated platelets and platelet-derived microparticles in humans. *Blood* 75 (1):128-138, 1990.
2. Ascione, R.; Lloyd, C. T.; Underwood, M. J.; Lotto, A. A.; Pitsis, A. A. and Angelini, G. D.: Inflammatory response after coronary revascularization with or without cardiopulmonary bypass. *Ann.Thorac.Surg.* 69 (4):1198-1204, 2000.
3. Asimakopoulos, G. and Taylor, K. M.: Effects of cardiopulmonary bypass on leukocyte and endothelial adhesion molecules. *Ann.Thorac.Surg.* 66 (6):2135-2144, 1998.
4. Asimakopoulos, G.; Lidington, E. A.; Mason, J.; Haskard, D. O.; Taylor, K. M. and Landis, R. C.: Effect of aprotinin on endothelial cell activation. *J.Thorac.Cardiovasc.Surg.* 122 (1):123-128, 2001.
5. Barthels, M. and Poliwoda, H.: *Gerinnungsanalysen - Schnellorientierung, Befundinterpretation, klinische Konsequenzen*, Stuttgart, New York:Georg Thieme Verlag, 1998.
6. Bauer, C.: Blut: Ein flüssiges Organsystem. In: *Lehrbuch der Physiologie*, edited by R. Klinke and S. Silbernagl, Stuttgart, New York:Georg Thieme Verlag, 1996, p. 185-212.
7. Beresford, C. H. and Owen, M. C.: Antithrombin III. *Int.J.Biochem.* 22 (2):121-128, 1990.
8. Birnbaum, D.: Pathophysiologie der EKZ. In: *Handbuch der Kardiotechnik*, edited by G. Lauterbach, München, Jena:Urban & Fischer Verlag, 2002, p. 157-178.
9. Bitter-Suermann, D. and Hadding, U.: Komplementsystem. In: *Immunologie*, edited by D. Gemsa, J. R. Kalden, and K. Resch, Stuttgart, New York:Georg Thieme Verlag, 1991, p. 63-78.
10. Butler, J.; Rocker, G. M. and Westaby, S.: Inflammatory response to cardiopulmonary bypass. *Ann.Thorac.Surg.* 55 (2):552-559, 1993.
11. Campbell, E. J.; Campbell, M. A.; Boukedes, S. S. and Owen, C. A.: Quantum proteolysis by neutrophils: implications for pulmonary emphysema in alpha 1-antitrypsin deficiency. *J.Clin.Invest* 104 (3):337-344, 1999.
12. Defraigne, J. O.; Pincemail, J.; Dekoster, G.; Larbuisson, R.; Dujardin, M.; Blaffart, F.; David, J. L. and Limet, R.: SMA circuits reduce platelet

- consumption and platelet factor release during cardiac surgery. *Ann.Thorac.Surg.* 70 (6):2075-2081, 2000.
13. Deppisch, R.; Schmitt, V.; Bommer, J.; Hansch, G. M.; Ritz, E. and Rauterberg, E. W.: Fluid phase generation of terminal complement complex as a novel index of bioincompatibility. *Kidney Int.* 37 (2):696-706, 1990.
 14. Dewald, B.; Rindler-Ludwig, R.; Bretz, U. and Baggiolini, M.: Subcellular localization and heterogeneity of neutral proteases in neutrophilic polymorphonuclear leukocytes. *J.Exp.Med.* 141 (4):709-723, 1975.
 15. Dixon, B.; Santamaria, J. and Campbell, D.: Coagulation activation and organ dysfunction following cardiac surgery. *Chest* 128 (1):229-236, 2005.
 16. Doyle, D. J.; Chesterman, C. N.; Cade, J. F.; McGready, J. R.; Rennie, G. C. and Morgan, F. J.: Plasma concentrations of platelet-specific proteins correlated with platelet survival. *Blood* 55 (1):82-84, 1980.
 17. Colman, R. W. and Edmunds, L. H. Jr.: Extracorporeal Circulation: Thrombosis and Bleeding. In: *Cardiac Surgery in the Adult*, edited by Edmunds LH Jr Cohn LH, New York: McGraw-Hill: 2003,
 18. Edmunds, L. H.: Cardiopulmonary bypass after 50 years. *N.Engl.J.Med.* 351 (16):1603-1606, 2004.
 19. Edmunds, L. H. Jr.: Advances in the heart-lung machine after John and Mary Gibbon. *Ann.Thorac.Surg.* 76 (6):S2220-S2223, 2003.
 20. Fitch, J. C.; Rollins, S.; Matis, L.; Alford, B.; Aranki, S.; Collard, C. D.; Dewar, M.; Elefteriades, J.; Hines, R.; Kopf, G.; Kraker, P.; Li, L.; O'Hara, R.; Rinder, C.; Rinder, H.; Shaw, R.; Smith, B.; Stahl, G. and Shernan S. K.: Pharmacology and biological efficacy of a recombinant, humanized, single-chain antibody C5 complement inhibitor in patients undergoing coronary artery bypass graft surgery with cardiopulmonary bypass. *Circulation* 100 (25):2499-2506, 1999.
 21. Fosse, E.; Moen, O.; Johnson, E.; Semb, G.; Brockmeier, V.; Mollnes, T. E.; Fagerhol, M. K. and Venge P.: Reduced complement and granulocyte activation with heparin-coated cardiopulmonary bypass. *Ann.Thorac.Surg.* 58 (2):472-477, 1994.
 22. Fraser, J. G.: Retrospective on Dr Gibbon and his heart-lung machine. *Ann.Thorac.Surg.* 76 (6):S2197-S2198, 2003.
 23. Fuhrer, G.; Gallimore, M. J.; Heller, W. and Hoffmeister, H. E.: FXII. *Blut* 61 (5):258-266, 1990.

24. Fung, M.; Loubser, P. G.; Undar, A.; Mueller, M.; Sun, C.; Sun, W. N.; Vaughn, W. K. and Fraser, C. D. Jr.: Inhibition of complement, neutrophil, and platelet activation by an anti-factor D monoclonal antibody in simulated cardiopulmonary bypass circuits. *J.Thorac.Cardiovasc.Surg.* 122 (1):113-122, 2001.
25. Gaetgens, P.: Das Kreislaufsystem. In: *Lehrbuch der Physiologie*, edited by R. Klinke and S. Silbernagl, Stuttgart, New York:Georg Thieme Verlag, 1996, p. 141-184.
26. George, J. N.; Nurden, A. T. and Phillips, D. R.: Molecular defects in interactions of platelets with the vessel wall. *N.Engl.J.Med.* 311 (17):1084-1098, 1984.
27. Gravlee, G. P.: Heparin-coated cardiopulmonary bypass circuits. *J.Cardiothorac.Vasc.Anesth.* 8 (2):213-222, 1994.
28. Grimminger, F.; Walmrath, H. D.; Seeger, W. and Lasch, H.-G.: Granulozyten-Endothel-Interaktion - Mechanismen der Abwehr und Autoaggression. *Hämostaseologie* 14:7-15, 1994.
29. Gu, Y. J.; Mariani, M. A.; Boonstra, P. W.; Grandjean, J. G. and van Oeveren, W.: Complement activation in coronary artery bypass grafting patients without cardiopulmonary bypass: the role of tissue injury by surgical incision. *Chest* 116 (4):892-898, 1999.
30. Heimburger, N.: Entzündungsreaktionen und Hämostase. *Hämostaseologie* 14:1-6, 1994.
31. Heinrich, D.; Eckhardt, T.; Höge, R. and Müller-Berghaus, G.: Blutungskomplikationen während und nach dem Einsatz der Herz-Lungen-Maschine - Pathophysiologie, Diagnostik, Prävention und Therapie. *Hämostaseologie* 5:54-64, 1985.
32. Hessel, E. A. II and Edmunds, L. H. Jr.: Extracorporeal Circulation: Perfusion Systems. In: *Cardiac Surgery in the adult*, edited by Cohn LH and Edmunds LH Jr., New York: McGrawHill: 2003,
33. Higuchi, D. A.; Wun, T. C.; Likert, K. M. and Broze, G. J. Jr.: The effect of leukocyte elastase on tissue factor pathway inhibitor. *Blood* 79 (7):1712-1719, 1992.
34. Hind, C. R.; Griffin, J. F.; Pack, S.; Latchman, Y. E.; Drake, H. F.; Jones, H. M.; Brostoff, J.; Dormandy, T. L. and Treasures T.: Effect of cardiopulmonary bypass on circulating concentrations of leucocyte elastase and free radical activity. *Cardiovasc.Res.* 22 (1):37-41, 1988.
35. Holmsen, H.: Platelet metabolism and activation. *Semin.Hematol.* 22 (3):219-240, 1985.

36. Hombach, V.: *Kardiologie Band 3 - Kardiovaskuläre Chirurgie*, Stuttgart, New York:F.K. Schattauer Verlagsgesellschaft mbH, 1990.
37. Hsu, L. C.: Biocompatibility in cardiopulmonary bypass. *J.Cardiothorac.Vasc.Anesth.* 11 (3):376-382, 1997.
38. Janeway, C. A.; Travers, P.; Walport, M. and Shlomchik, M. J.: *Immunobiology - The immune system in health and disease*, New York:Garland Publishing, Taylor&Francis Group, 2001.
39. Jansen, P. G.; Velthuis, H. te; Huybregts, R. A.; Paulus, R.; Bulder, E. R.; van der Spoel, H. I.; Bezemer, P. D.; Slaats, E. H.; Eijnsman, L. and Wildevuur C. R.: Reduced complement activation and improved postoperative performance after cardiopulmonary bypass with heparin-coated circuits. *J.Thorac.Cardiovasc.Surg.* 110 (3):829-834, 1995.
40. Janvier, G.; Baquey, C.; Roth, C.; Benillan, N.; Belisle, S. and Hardy, J. F.: Extracorporeal circulation, hemocompatibility, and biomaterials. *Ann.Thorac.Surg.* 62 (6):1926-1934, 1996.
41. Jochum, M.; Fritz, H.; Nast-Kolb, D. and Inthorn, D.: Granulozyten-Elastase als prognostischer Parameter. *Dt.Ärztebl.* 87 (19):B1106-B1110, 1990.
42. Kanzow, G.: Blut. In: *Pathophysiologie/Pathobiochemie*, edited by F. Krück, München, Wien, Baltimore:Urban&Schwarzenberg, 1994, p. 611-642.
43. Kayser, W.: Bildung, Aufbau, Funktion und Kinetik hämatopoetischer Zellen. In: *Transfusionsmedizin*, edited by C. Mueller-Eckhardt, Berlin, Heidelberg:Springer-Verlag, 1988, p. 21-46.
44. Kerry, P. J. and Curtis, A. D.: Standardization of beta-thromboglobulin (beta-TG) and platelet factor 4 (PF4): a collaborative study to establish international standards for beta-TG and PF4. *Thromb.Haemost.* 53 (1):51-55, 1985.
45. Keuren, J. F.; Wielders, S. J.; Willems, G. M.; Morra, M. and Lindhout, T.: Fibrinogen adsorption, platelet adhesion and thrombin generation at heparinized surfaces exposed to flowing blood. *Thromb.Haemost.* 87 (4):742-747, 2002.
46. Kreutzig, T.: *Biochemie: Kurzlehrbuch zum Gegenstandskatalog 1*, Lübeck, Stuttgart, Jena, Ulm:Gustav Fischer Verlag, 1997.
47. Kurihara, Y.; Nakayama, H. and Nakagawa, S.: Plasma beta-thromboglobulin and platelet factor 4 in renal insufficiency. *Thromb.Res.* 18 (3-4):557-560, 1980.

48. Lang, F.: *Pathophysiologie, Pathobiochemie*, Stuttgart:Ferdinand Enke Verlag, 1990.
49. Lappegard, K. T.; Fung, M.; Bergseth, G.; Riesenfeld, J.; Lambris, J. D.; Videm, V. and Mollnes, T. E.: Effect of complement inhibition and heparin coating on artificial surface-induced leukocyte and platelet activation. *Ann.Thorac.Surg.* 77 (3):932-941, 2004.
50. Lauterbach, G.: Herz-Lungen-Maschine. In: *Handbuch der Kardiotchnik*, edited by G. Lauterbach, München, Jena:Urban & Fischer, 2002, p. 181-184.
51. Lazar, H. L.; Bao, Y.; Gaudiani, J.; Rivers, S. and Marsh, H.: Total complement inhibition: an effective strategy to limit ischemic injury during coronary revascularization on cardiopulmonary bypass. *Circulation* 100 (13):1438-1442, 1999.
52. Lechner, K.: Hämmorrhagische Diathesen. In: *Die Innere Medizin*, edited by W. Gerok, C. Huber, T. Meinertz, and H. Zeidler, Stuttgart, New York:Schattauer Verlagsgesellschaft mbH, 2000, p. 173-196.
53. Levy, J. H. and Tanaka, K. A.: Inflammatory response to cardiopulmonary bypass. *Ann.Thorac.Surg.* 75 (2):S715-S720, 2003.
54. Mair, P.; Mair, J.; Seibt, I.; Furtwaengler, W.; Balogh, D. and Puschendorf, B.: Plasma elastase concentrations and pulmonary function after cardiopulmonary bypass. *J.Thorac.Cardiovasc.Surg.* 108 (1):184-185, 1994.
55. Mammen, E. F.: Blutung und Thrombose. *Med.Welt* 42:612-617, 1991.
56. Mollnes, T. E.: Complement and biocompatibility. *Vox Sang.* 74 Suppl 2:303-307, 1998.
57. Morse, D. S.; Adams, D. and Magnani, B.: Platelet and neutrophil activation during cardiac surgical procedures: impact of cardiopulmonary bypass. *Ann.Thorac.Surg.* 65 (3):691-695, 1998.
58. Müller-Berghaus, G.: Physiologie der Blutgerinnung und Fibrinolyse. In: *Transfusionsmedizin*, edited by C. Mueller-Eckhardt, Berlin, Heidelberg:Springer-Verlag, 1988, p. 53-78.
59. Neppert, J.: Immunologische Grundlagen. In: *Transfusionsmedizin*, edited by C. Mueller-Eckhardt, Berlin, Heidelberg:Springer-Verlag, 1988, p. 79-96.
60. Neumann, S. and Lang, H.: Entzündung. In: *Lehrbuch der klinischen Chemie und Pathobiochemie*, edited by H. Greiling and A. M. Gressner, Stuttgart, New York:F.K. Schattauer Verlagsgesellschaft mbH, 1995, p. 1257-1305.

61. Niimi, Y.; Ichinose, F.; Ishiguro, Y.; Terui, K.; Uezono, S.; Morita, S. and Yamane, S.: The effects of heparin coating of oxygenator fibers on platelet adhesion and protein adsorption. *Anesth.Analg.* 89 (3):573-579, 1999.
62. Nilsson, B.; Larsson, R.; Hong, J.; Elgue, G.; Ekdahl, K. N.; Sahu, A. and Lambris J. D.: Compstatin inhibits complement and cellular activation in whole blood in two models of extracorporeal circulation. *Blood* 92 (5):1661-1667, 1998.
63. Ohlsson, K. and Olsson, I.: The neutral proteases of human granulocytes. Isolation and partial characterization of granulocyte elastases. *Eur.J.Biochem.* 42 (2):519-527, 1974.
64. Ohlsson, K. and Olsson, I.: Neutral proteases of human granulocytes. III. Interaction between human granulocyte elastase and plasma protease inhibitors. *Scand.J.Clin.Lab Invest* 34 (4):349-355, 1974.
65. Olsson, C.; Siegbahn, A.; Henze, A.; Nilsson, B.; Venge, P.; Joachimsson, P. O. and Thelin, S.: Heparin-coated cardiopulmonary bypass circuits reduce circulating complement factors and interleukin-6 in paediatric heart surgery. *Scand.Cardiovasc.J.* 34 (1):33-40, 2000.
66. Ostermann, H.: Thrombosen und Embolien des arteriellen und venösen Systems. In: *Die Innere Medizin*, edited by W. Gerok, C. Huber, T. Meinertz, and H. Zeidler, Stuttgart, New York:Schattauer Verlagsgesellschaft mbH, 2000, p. 447-466.
67. Ovrum, E.; Brosstad, F.; Holen, E. Am; Tangen, G. and Abdelnoor, M.: Effects on coagulation and fibrinolysis with reduced versus full systemic heparinization and heparin-coated cardiopulmonary bypass. *Circulation* 92 (9):2579-2584, 1995.
68. Paparella, D.; Yau, T. M. and Young, E.: Cardiopulmonary bypass induced inflammation: pathophysiology and treatment. An update. *Eur.J.Cardiothorac.Surg.* 21 (2):232-244, 2002.
69. Paques, E. P. and Heimbürger, N.: Das fibrinolytische System. *Hämostaseologie* 6:139-147, 1986.
70. Patscheke, H. and Ruf, A.: Marker einer in-vivo-Thrombozytenaktivierung. In: *Labor und Diagnose*, edited by L. Thomas, Frankfurt/Main:TH-Books Verlagsgesellschaft mbH, 1998, p. 612-613.
71. Pelzer, H.; Schwarz, A. and Heimbürger, N.: Determination of human thrombin-antithrombin III complex in plasma with an enzyme-linked immunosorbent assay. *Thromb.Haemost.* 59 (1):101-106, 1988.
72. Philippidis, P.; Mason, J. C.; Evans, B. J.; Nadra, I.; Taylor, K. M.; Haskard, D. O. and Landis, R. C.: Hemoglobin scavenger receptor

- CD163 mediates interleukin-10 release and heme oxygenase-1 synthesis: antiinflammatory monocyte-macrophage responses in vitro, in resolving skin blisters in vivo, and after cardiopulmonary bypass surgery. *Circ.Res.* 94 (1):119-126, 2004.
73. Phillips, D. R.; Charo, I. F.; Parise, L. V. and Fitzgerald, L. A.: The platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa complex. *Blood* 71 (4):831-843, 1988.
 74. Picardo, S. and Goracci, M.: Blut und seine Bestandteile. In: *Extrakorporale Zirkulation in Theorie und Praxis*, edited by R. J. Tschaut, Lengerich, Berlin, Düsseldorf, Leipzig, Scottsdale (USA), Wien, Zagreb:Pabst Science Publishers, 1999, p. 49-72.
 75. Plow, E. F.: Leukocyte elastase release during blood coagulation. A potential mechanism for activation of the alternative fibrinolytic pathway. *J.Clin.Invest* 69 (3):564-572, 1982.
 76. Preissner, K. T. and Müller-Berghaus, G.: Molekulare Wechselwirkungen zwischen Komplement-, Gerinnungs- und Fibrinolyse-System. *Hämostaseologie* 6:67-81, 1986.
 77. Pschyrembel, W. and Dornblüth, O.: *Pschyrembel - Klinisches Wörterbuch*, Berlin, New York:Walter de Gruyter, 2002.
 78. Rinder, C. S.; Bonan, J. L.; Rinder, H. M.; Mathew, J.; Hines, R. and Smith, B. R.: Cardiopulmonary bypass induces leukocyte-platelet adhesion. *Blood* 79 (5):1201-1205, 1992.
 79. Rommelsheim, K.; Schlebusch, H.; Orellano, L.; Schwidetzky, F. and Klehr U.: [PMN elastase in extracorporeal circulation procedures]. *Anasth.Intensivther.Notfallmed.* 22 (1):3-7, 1987.
 80. Sagedal, S.; Hartmann, A.; Sundstrom, K.; Bjornsen, S. and Brosstad F.: Anticoagulation intensity sufficient for haemodialysis does not prevent activation of coagulation and platelets. *Nephrol.Dial.Transplant.* 16 (5):987-993, 2001.
 81. Seeburger, J.; Hoffmann, J.; Wendel, H. P.; Ziemer, G. and Aebert H.: Gene expression changes in leukocytes during cardiopulmonary bypass are dependent on circuit coating. *Circulation* 112 (9 Suppl):I224-I228, 2005.
 82. Shattil, S. J.; Hoxie, J. A.; Cunningham, M. and Brass L. F.: Changes in the platelet membrane glycoprotein IIb.IIIa complex during platelet activation. *J.Biol.Chem.* 260 (20):11107-11114, 1985.
 83. Stammers, A. H.: Historical aspects of cardiopulmonary bypass: from antiquity to acceptance. *J.Cardiothorac.Vasc.Anesth.* 11 (3):266-274, 1997.

84. Straub, A.; Azevedo, R.; Beierlein, W.; Wendel, H. P.; Dietz, K. and Ziemer, G.: Glycoprotein IIb/IIIa inhibition reduces prothrombotic events under conditions of deep hypothermic circulatory arrest. *Thromb.Haemost.* 94 (1):115-122, 2005.
85. Tanaka, K.; Takao, M.; Yada, I.; Yuasa, H.; Kusagawa, M. and Deguchi, K.: Alterations in coagulation and fibrinolysis associated with cardiopulmonary bypass during open heart surgery. *J.Cardiothorac.Anesth.* 3 (2):181-188, 1989.
86. teVelthuis, H.; Jansen, P. G.; Hack, C. E.; Eijnsman, L. and Wildevuur, C. R.: Specific complement inhibition with heparin-coated extracorporeal circuits. *Ann.Thorac.Surg.* 61 (4):1153-1157, 1996.
87. Thews, G.: Atemgastransport und Säure-Basen-Status des Blutes. In: *Physiologie des Menschen*, edited by R. F. Schmidt, G. Thews, and F. Lang, Berlin, Heidelberg, New York:Springer-Verlag, 2006, p. 604-623.
88. Thomas, L.: Leukozyten. In: *Labor und Diagnose*, edited by L. Thomas, Frankfurt/Main:TH-Books Verlagsgesellschaft mbH, 1998, p. 516-521.
89. Thomas, L.: Komplement-System. In: *Labor und Diagnose*, edited by L. Thomas, Frankfurt/Main:TH-Books Verlagsgesellschaft, 1998, p. 812-823.
90. Thomas, L.: Hämoglobine. In: *Labor und Diagnose*, edited by L. Thomas, Frankfurt/Main:TH-Books Verlagsgesellschaft, 1998, p. 487-491.
91. Travis, J. and Salvesen, G. S.: Human plasma proteinase inhibitors. *Annu.Rev.Biochem.* 52:655-709, 1983.
92. van Hulsteijn, H.; Bertina, R. and Briet, E.: A one-year follow-up study of plasma fibrinopeptide A and beta-thromboglobulin after deep vein thrombosis and pulmonary embolism. *Thromb.Res.* 27 (2):225-229, 1982.
93. Videm, V.; Mollnes, T. E.; Garred, P. and Svennevig, J. L.: Biocompatibility of extracorporeal circulation. In vitro comparison of heparin-coated and uncoated oxygenator circuits. *J.Thorac.Cardiovasc.Surg.* 101 (4):654-660, 1991.
94. Vogt, S.; Troitzsch, D.; Kasseckert, S.; Moosdorf, R. and Wendel, H. P.: Interaktionen des Blutes mit den künstlichen Oberflächen im extrakorporalen Kreislauf. In: *Extrakorporale Zirkulation in Theorie und Praxis*, edited by R. J. Tschaut, Lengerich, Berlin, Düsseldorf, Leipzig, Riga, Scottsdale (USA), Wien, Zagreb:Pabst Science Publishers, 1999, p. 700-714.
95. Wachtfogel, Y. T.; Pixley, R. A.; Kucich, U.; Abrams, W.; Weinbaum, G.; Schapira, M. and Colman, R. W.: Purified plasma factor XIIa aggregates

- human neutrophils and causes degranulation. *Blood* 67 (6):1731-1737, 1986.
96. Wachtfogel, Y. T.; Kucich, U.; Greenplate, J.; Gluszko, P.; Abrams, W.; Weinbaum, G.; Wenger, R. K.; Rucinski, B.; Niewiarowski, S.; Edmunds, L. H. Jr.: Human neutrophil degranulation during extracorporeal circulation. *Blood* 69 (1):324-330, 1987.
 97. Wagner, C.: Antithrombin (AT). In: *Labor und Diagnose*, edited by L. Thomas, Frankfurt/Main:TH-Books Verlagsgesellschaft mbH, 1998, p. 630-632.
 98. Wagner, C. and Dati, F.: Aktivierungsmarker: Thrombin-Antithrombin-Komplex (TAT), Prothrombinfragment 1+2 (F1+2). In: *Labor und Diagnose*, edited by L. Thomas, Frankfurt/Main:TH-Books Verlagsgesellschaft, 1998, p. 633-635.
 99. Wan, S.; LeClerc, J. L. and Vincent, J. L.: Inflammatory response to cardiopulmonary bypass: mechanisms involved and possible therapeutic strategies. *Chest* 112 (3):676-692, 1997.
 100. Weber, N.; Wendel, H. P. and Kohn, J.: Formation of viscoelastic protein layers on polymeric surfaces relevant to platelet adhesion. *J.Biomed.Mater.Res.A* 72 (4):420-427, 2005.
 101. Weerasinghe, A. and Taylor, K. M.: The platelet in cardiopulmonary bypass. *Ann.Thorac.Surg.* 66 (6):2145-2152, 1998.
 102. Weerwind, P. W.; Lindhout, T.; Caberg, N. E. and De Jong, D. S.: Thrombin generation during cardiopulmonary bypass: the possible role of retransfusion of blood aspirated from the surgical field. *Thromb.J.* 1 (1):3, 2003.
 103. Weiss, C. and Jelkmann, W.: Funktionen des Blutes. In: *Physiologie des Menschen*, edited by R. F. Schmidt, G. Thews, and F. Lang, Berlin, Heidelberg, New York:Springer-Verlag, 2000, p. 411-447.
 104. Weitkemper, H.-H.; Troitzsch, D. and Körfer, R.: Elemente und Funktionsprinzip einer Herz-Lungen-Maschine. In: *Extrakorporale Zirkulation in Theorie und Praxis*, edited by R. J. Tschaut, Lengerich, Berlin, Düsseldorf, Leipzig, Riga, Scottsdale (USA), Wien, Zagreb:Pabst Science Publishers, 1999, p. 271-287.
 105. Weitkemper, H.-H.; Troitzsch, D. and Körfer, R.: Priming von extrakorporalen Kreislaufsystemen. In: *Extrakorporale Zirkulation in Theorie und Praxis*, edited by R. J. Tschaut, Lengerich, Berlin, Düsseldorf, Leipzig, Riga, Scottsdale (USA), Wien, Zagreb:Pabst Science Publishers, 1999, p. 342-347.

106. Wendel, H. P. and Ziemer, G.: Coating-techniques to improve the hemocompatibility of artificial devices used for extracorporeal circulation. *Eur.J.Cardiothorac.Surg.* 16 (3):342-350, 1999.
107. Wendel, H. P.: Heparinbeschichtete Systeme. In: *Extrakorporale Zirkulation in Theorie und Praxis*, edited by R. J. Tschaut, Lengerich, Berlin, Düsseldorf, Leipzig, Riga Scottsdale(USA), Wien, Zagreb:Pabst Science Publishers, 1999, p. 675-692.
108. Wendel, H. P.; Weber, N. and Ziemer, G.: [Comparative studies of the adsorption behavior of plasma proteins to heparin-coated surfaces]. *Biomed.Tech.(Berl)* 45 (10):282-287, 2000.
109. Wendel, H. P.: Beschichtungstechniken für Werkstoffe der EKZ-Systeme. In: *Handbuch der Kardiotechnik*, edited by G. Lauterbach, München, Jena:Urban & Fischer Verlag, 2002, p. 106-124.
110. Wendel, H. P.: Hämostase. In: *Handbuch der Kardiotechnik*, edited by G. Lauterbach, München, Jena:Urban & Fischer Verlag, 2002, p. 92-105.
111. Wenger, R. K.; Lukasiewicz, H.; Mikuta, B. S.; Niewiarowski, S. and Edmunds, L. H. Jr.: Loss of platelet fibrinogen receptors during clinical cardiopulmonary bypass. *J.Thorac.Cardiovasc.Surg.* 97 (2):235-239, 1989.
112. Westaby, S.: Organ dysfunction after cardiopulmonary bypass. A systemic inflammatory reaction initiated by the extracorporeal circuit. *Intensive Care Med.* 13 (2):89-95, 1987.
113. Wimmer-Greinecker, G.; Matheis, G.; Martens, S.; Oremek, G.; Abdel-Rahman, U. and Moritz, A.: Synthetic protein treated versus heparin coated cardiopulmonary bypass surfaces: similar clinical results and minor biochemical differences. *Eur.J.Cardiothorac.Surg.* 16 (2):211-217, 1999.
114. Zilla, P.; Fasol, R.; Groscurth, P.; Klepetko, W.; Reichenspurner, H. and Wolner, E.: Blood platelets in cardiopulmonary bypass operations. Recovery occurs after initial stimulation, rather than continual activation. *J.Thorac.Cardiovasc.Surg.* 97 (3):379-388, 1989.

DANKSAGUNG

Zunächst danke ich Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. G. Ziemer für die Überlassung des Themas der vorliegenden Studie sowie für die Bereitstellung der Arbeitsmaterialien des klinischen Forschungslabors.

Einen besonderen Dank möchte ich Herrn Dr. rer. nat. H.-P. Wendel für die wissenschaftliche Betreuung und die stets freundliche Beratung in Bezug auf die Fertigstellung der Arbeit aussprechen.

Des Weiteren bedanke ich mich herzlich bei allen Mitarbeitern des Forschungslabors der Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie Tübingen und insbesondere bei Frau Doris Armbruster für die ständige Hilfsbereitschaft und die angenehme Arbeitsatmosphäre.

CURRICULUM VITAE

Persönliche Daten

Name: Philipp David Futter
Geburtsdatum: geboren am 03.07.1977 in Tübingen
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig
Eltern: Dr. jur. Werner Futter, Rechtsanwalt mit Gemahlin
Gabriele Futter, Lehrerin
Geschwister: Jörg Futter, Rechtsanwalt

Schulbildung

1983-1987 Grundschule Auchterschule in RT – Degerschlacht;
1987-1996 Friedrich-List-Gymnasium Reutlingen,
Abitur am 21.06.1996 am FLG Reutlingen;

Wehrdienst

OKT.1996 – AUG.1997 Fallschirmjägerbatallion 261 /
Luftlandesanitätskompanie 260 Lebach im Saarland;

Hochschulbildung

SEP. 1998 – JUNI 2004 Studium der Zahnheilkunde an der Eberhard Karls
Universität Tübingen;
Abschluss mit Staatsexamen am 01.06.2004 in
Tübingen;
Erteilung der Approbation als Zahnarzt am
17.06.2004