

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

**Hämokompatibilität einer neuartigen bioaktiven  
Oxygenatoroberfläche im HLM-Modell**

INAUGURAL – DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Zahnheilkunde

der

MEDIZINISCHEN FAKULTÄT

der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen

vorgelegt von

Mathias Freitag

aus Meißen

2006

Dekan: Professor Dr. C. D. Claussen

1. Berichterstatter: Professor Dr. Dr. h. c. G. Ziemer

2. Berichterstatter: Professor Dr. J. Geis-Gerstorfer

---

*„Wissenschaft fängt eigentlich erst da an, interessant zu werden,  
wo sie aufhört.“*

*Justus von Liebig*

*Widmung*

*Meiner Frau Mama und meinem Herrn Papa*

*in Liebe und Dankbarkeit gewidmet*

# Inhaltsverzeichnis

<b>I.</b>	<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
<b>II.</b>	<b>HAUPTTEIL.....</b>	<b>4</b>
1.	DAS POSTPERFUSIONSSYNDROM .....	4
1.1.	<i>Das systemische Entzündungsreaktionssyndrom.....</i>	4
1.2.	<i>Das akute Lungenversagen.....</i>	5
1.3.	<i>Das Multiorgan-Dysfunktions-Syndrom .....</i>	6
2.	DIE HEPARINBESCHICHTUNG.....	7
2.1.	<i>Wirkungsweise der Heparinbeschichtung .....</i>	7
2.2.	<i>Oberflächenvergütung mit der Hepaface Technik.....</i>	11
3.	PHYSIOLOGIE DES GERINNUNGS- UND FIBRINOLYSESYSTEMS .....	12
3.1.	<i>Blutstillung.....</i>	12
3.2.	<i>Aktivatoren und Hemmstoffe der Blutgerinnung .....</i>	13
3.3.	<i>Kontaktphasensystem (Faktor XII-Kallikrein-Kinin-System).....</i>	16
3.4.	<i>Aktivatoren und Inhibitoren der Fibrinolyse.....</i>	17
3.5.	<i>Endothel und Gefäßwand .....</i>	18
4.	DAS KOMPLEMENTSYSTEM .....	19
4.1.	<i>Akute Phase Proteine.....</i>	21
<b>III.</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>23</b>
1.	MATERIALIEN .....	23
1.1.	<i>Blutkonserven .....</i>	23
1.2.	<i>Blutzusätze .....</i>	23
1.3.	<i>Herz-Lungen-Maschine .....</i>	24
1.3.1.	<i>Oxygenatoren.....</i>	24
1.3.2.	<i>Temperiereinrichtung .....</i>	25
1.3.3.	<i>Rollerpumpe .....</i>	25
1.4.	<i>Laborgeräte und Labormaterialien .....</i>	25
1.4.1.	<i>Laborgeräte .....</i>	25
1.4.2.	<i>Labormaterialien.....</i>	26
2.	METHODEN .....	29

2.1.	<i>Versuchsaufbau</i> .....	29
2.2.	<i>Versuchsdurchführung</i> .....	29
2.3.	<i>Probengewinnung und Vorbereitung</i> .....	31
2.3.1.	Probenvorbereitung.....	31
2.3.2.	Probenverarbeitung und Probenaufbewahrung.....	31
2.4.	<i>Entnahme von Biomaterial für die Rasterelektronenmikroskopie</i> .....	32
2.5.	<i>Fixierung und Entwässerung von Biomaterial für die Rasterelektronenmikroskopie</i> .....	33
2.6.	<i>Bestimmung der Adhäsionsproteine</i> .....	33
2.7.	<i>Elution der Adsorptionsproteine für Elektrophorese</i> .....	34
2.8.	<i>Aufkonzentrierung des Eluats</i> .....	34
2.9.	<i>Die SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese</i> .....	34
2.9.1.	Vorteile der SDS-Elektrophorese .....	35
2.9.2.	Die Probenvorbereitung.....	35
2.9.3.	Die Durchführung Elektrophorese.....	36
2.10.	<i>Das Western-Blotting</i> .....	37
2.10.1.	Die Durchführung des Western-Blotting.....	38
2.10.2.	Antikörper.....	39
3.	LABORMETHODEN .....	41
3.1.	<i>Das Hämatologie-System Sysmex® K-1000</i> .....	41
3.2.	<i>Heparin</i> .....	41
3.3.	<i>PMN-Elastase</i> .....	42
3.4.	<i>TAT</i> .....	42
3.5.	<i>β-Thromboglobulin</i> .....	43
3.6.	<i>SC5b-9 Komplex</i> .....	43
3.7.	<i>freies Hämoglobin im Serum</i> .....	44
3.8.	<i>F -XII</i> .....	44
4.	MATHEMATISCHE UND STATISTISCHE METHODEN .....	45
<b>IV.</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>46</b>
1.	LÖSLICHE AKTIVIERUNGSMARKER .....	46
1.1.	<i>Hämolyse</i> .....	46
1.2.	<i>PMN-Elastase</i> .....	47
1.3.	<i>Leukozyten</i> .....	48
1.4.	<i>SC5b-9</i> .....	49

1.5.	<i>F XII</i> .....	50
1.6.	<i>Heparin</i> .....	51
1.7.	<i>Thrombozyten</i> .....	52
1.8.	<i>β-Thromboglobulin</i> .....	53
1.9.	<i>TAT</i> .....	54
2.	ADSORPTIONSPROTEINE .....	55
2.1.	<i>HMWK</i> .....	55
2.2.	<i>C-3</i> .....	56
2.3.	<i>CD 41</i> .....	57
2.4.	<i>Fibrinogen</i> .....	58
2.5.	<i>AT III</i> .....	59
2.6.	<i>C-1 Esterase-Inhibitor</i> .....	60
2.7.	<i>HSP 70</i> .....	61
 <b>V. DISKUSSION</b> .....		<b>62</b>
1.	UNTERSUCHUNG DER LÖSLICHEN AKTIVIERUNGSMARKER.....	62
1.1.	<i>Hämolyse</i> .....	62
1.2.	<i>Leukozyten und PMN-Elastase</i> .....	63
1.3.	<i>Thrombozyten, β-Thromboglobulin</i> .....	64
1.4.	<i>TAT</i> .....	67
1.5.	<i>F XII</i> .....	68
1.6.	<i>Heparin</i> .....	69
1.7.	<i>SC5b-9</i> .....	69
2.	UNTERSUCHUNG VON ADSORPTIONSPROTEINEN .....	70
2.1.	<i>HMWK</i> .....	71
2.2.	<i>C1-INH</i> .....	72
2.3.	<i>C3 Komplement</i> .....	74
2.4.	<i>CD 41 und Fibrinogen</i> .....	75
2.5.	<i>AT III</i> .....	76
2.6.	<i>HSP 70</i> .....	77
3.	REM-AUFNAHMEN .....	78
 <b>VI. ZUSAMMENFASSUNG</b> .....		<b>79</b>

<b>VII. LITERATUR .....</b>	<b>83</b>
<b>VIII. ANHANG .....</b>	<b>90</b>
1. EINZELWERTE DER TESTREIHEN UND ENTSPRECHENDE MITTELWERTE .....	90
2. AUFTEILUNG DER TESTREIHEN IN REM- UND ELEKTROPHORETISCHE UNTERSUCHUNG.....	91
3. P-WERTE DER EINFAKTORIELLEN VARIANZANALYSE.....	92
4. RELATIVE DOMINANZ UND MARKANZ DER HAUPTBANDE IM BLOT, MOLEKULARMASSEN (kDa) DER SICHTBAREN UND BERICHTETEN BANDEN FÜR WESTERNBLOT VON SDS-ELUATEN BESCHICHTETER UND UNBESCHICHTETER OXYGENATOREN .....	93
5. REM-AUFNAHMEN .....	94

# Abbildungsverzeichnis

<b>Nr.</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Seiten</b>
1.	ZENTRALE STELLUNG DES KONTAKTPHASENSYSTEMS UND DIE VON IHM AKTIVIERBAREN KASKADENSYSTEME .....	9
2.	WIRKUNGEN VON OBERFLÄCHENGEBUNDENEN HEPARIN.....	9
3.	OBERFLÄCHENVERGÜTUNG MIT DER HEPAFACE TECHNIK .....	10
4.	SCHEMA BLUTGERINNUNG .....	14
5.	SCHEMA F-XII-KALLIKREIN-KININ-SYSTEM .....	17
6.	KOMPLEMENTAUSWIRKUNGEN .....	20
7.	MECHANISMUS KOMPLEMENTAKTIVIERUNG .....	21
8.	CAPIOX SX 18 .....	24
9.	SCHEMA DES IN VITRO-CPB-MODELLS .....	29
10.	REAKTIONSGLEICHUNG REDOXREAKTION .....	38
11.	MOLEKULARE MECHANISMEN DER THROMBOZYTENADHÄSION UND AGGREGATION.....	75
12.	REM AUFNAHMEN VON HEPARIN-BESCHICHTETEN (HC) UND UNBESCHICHTETEN (NC) OXYGENATORFASERN.....	94

## Graphikverzeichnis

<b>Nr.</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Seiten</b>
1.	HÄMOLYSE .....	46
2.	PMN-ELASTASE .....	47
3.	LEUKOZYTEN.....	48
4.	SC-5B-9.....	49
5.	F XII.....	50
6.	HEPARIN .....	51
7.	THROMBOZYTEN.....	52
8.	B-TG.....	53
9.	TAT.....	54
10.	HMWK .....	55
11.	C-3 .....	56
12.	CD 41 .....	57
13.	FIBRINOGEN.....	58
14.	AT III .....	59
15.	C-1-INH.....	60
16.	HSP 70 .....	61

## Tabellenverzeichnis

Nr.	Bezeichnung	Seiten
1.	SCHEMA AZP, PROBEN, PARAMETER .....	30
2.	MOLEKULAR WEIGHT SANDARD, HIGH RANGE .....	36
3.	EINZELWERTE DER TESTREIHEN UND ENTSPRECHENDE MITTELWERTE .....	90
4.	AUFTEILUNG DER TESTREIHEN IN REM- UND ELEKTROPHORETISCHE UNTERSUCHUNG.....	91
5.	P-WERTE DER EINFAKTORIELLEN VARIANZANALYSE.....	92
6.	RELATIVE DOMINANZ UND MARKANZ DER HAUPTBANDE IM BLOT, MOLEKULARMASSEN (kDa) DER SICHTBAREN UND BERICHTETEN BANDEN FÜR WESTERNBLOT VON SDS-ELUATEN BESCHICHTETER UND UNBESCHICHTETER OXYGENATOREN .....	93

## I. Einleitung

Der Begriff Biokompatibilität ist in den letzten Jahren immer häufiger zur Beurteilung der Güte von Biomaterialien herangezogen worden. So werden beispielsweise die Verträglichkeit von künstlichen Herzklappen, koronaren Endoprothesen oder kompletten extrakorporalen Kreislaufsystemen mit ihren unterschiedlichsten Komponenten mehr oder weniger als biokompatibel beschrieben und eingestuft. Die Biokompatibilität eines Materials wird sowohl durch seine Eigenschaften als auch die Art und die Dauer seines Einsatzes bestimmt. Ein biokompatibler Werkstoff darf einerseits den Organismus nicht schädigen, andererseits darf der Werkstoff nicht durch Einwirkung des biologischen Milieus geschädigt werden. Zur allgemeinen Verträglichkeit zählt, dass ein Biowerkstoff z.B. nicht toxisch, allergisch, entzündlich oder karzinogen wirken darf (11).

Im Sinne der extrakorporalen Zirkulation (EKZ) kann man Biokompatibilität, als Fähigkeit eines im extrakorporalen System eingesetzten Materials bezeichnen, welches in der Anwendungszeit keinen schädigenden Einfluss auf das biologische System ausübt (62). Allgemein erkennt der Organismus Biomaterialien als „fremd“ und löst spezielle Schutz und Abwehrmechanismen aus. Bei Werkstoffen mit Blutkontakt, wie in der EKZ, spielt die Blutverträglichkeit eine der Hauptrollen. Hier beinhaltet Blutverträglichkeit mehr als Antithrombogenität (11). An einigen Zahlen lässt sich die aktuelle Bedeutung der EKZ deutlich machen. [Seit 1990 hat sich die Anzahl der jährlich durchgeführten Herzoperationen mehr als verdoppelt. 2001 wurden in Deutschland an derzeit 81 bestehenden Herzzentren 96593 Herzoperationen mit Hilfe der EKZ durchgeführt. Die Sterblichkeit bei Operationen am offenen Herzen lag bei 4,2 % (20).]

Bekanntlich kommt das gesamte Blut des Patienten bei kardiopulmonalen Bypassoperationen (CPB) unter Einsatz der Herz-Lungen-Maschine (HLM) über einen Zeitraum von teilweise mehreren Stunden mit ca. 3-4 m<sup>2</sup> Fremdoberflächen in Berührung, wobei 2-3 m<sup>2</sup> auf den Oxygenator fallen (11). Blut-Material-Interaktionen führen im Allgemeinen zur Aktivierung der humoralen und zellulären Abwehrmechanismen und setzen verschiedene Kaskadensysteme in Gang. Dies bedeutet ein Risiko von intra- und postoperativen klinischen Komplikationen. Der

Kontakt zwischen dem Blut und den verschiedenen künstlichen Oberflächen des extrakorporalen Systems führt sehr oft zu einer systemischen Entzündungsreaktion, dem sog. Postperfusionssyndrom (PPS), welches bis hin zum „systemic inflammatory response syndrome“ (SIRS), akuten Lungenversagen (ARDS), Sepsis und Multiorganversagen (MOF) eskalieren kann (53). Verschiedene Ursachen können hierfür verantwortlich gemacht werden. Mechanische und chemotaktische Aktivierungen und Membranschädigungen der korpuskulären Blutbestandteile, Dysfunktion der zellulären Immunregulation, Aktivierung der durch verschiedene Feedback-Mechanismen miteinander verknüpften Kaskadenreaktionen der Kontaktphase, der intrinsischen und thrombozytären Gerinnung, der Fibrinolyse, des Komplementsystems, sowie deren zell- und gewebeschädigenden Freisetzungprodukte wie Endotoxine, freie Radikale, Zytokine, polymorphkernige neutrophile Granulozyten-Elastase (PMN-Elastase), Kollagenase, terminaler Lysekomplex (TCC) (55).

Die Hämokompatibilität unphysiologischer Fremdoberflächen hängt entscheidend davon ab, inwieweit der am natürlichen Endothel permanent im Wechselspiel befindende Prozess der Aktivierung und Inhibition von humoralen und zellulären Mediatoren stimuliert werden kann (58).

Angesichts dieser Komplikationen wird schon seit vielen Jahren an der Verbesserung von extrakorporalen Kreislaufsystemen gearbeitet. Zur Erzielung hämokompatibler Oberflächen haben sich zwei Verfahren etabliert: einerseits die Entwicklung blutverträglicher Werkstoffe und andererseits die Oberflächenmodifikationen bekannter Werkstoffe durch besondere Beschichtung, wie beispielsweise mit Hirudin, Prostaglandin und Heparin (53). Die Beschichtung von Oberflächen mit bioaktiven Molekülen führt zur aktiven Unterstützung der regulatorisch wirkenden physiologischen Kontrollmechanismen, die dadurch eine unkontrollierte Aktivierung von Abwehrreaktionen reduzieren (53; 54). Die Vorteile der Heparinbeschichtung bestehen in der geringeren Adsorption von prokoagulatorischen und proinflammatorischen sowie der selektiven Adsorption von antikoagulatorischen und antiinflammatorischen Plasmaproteinen, die einerseits zur schnellen Bildung einer blutfreundlichen Sekundärmembran auf der Oberfläche führen und andererseits eine weitere Denaturierung und Aktivierung der adsorbierten Proteine verhindert (58).

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit Untersuchungen zur Hämokompatibilität

unbeschichteter und heparin-beschichteter Oxygenatoren gleicher Bauweise. Für eine Dauer von neunzig Minuten werden die Oxygenatoren der Blutzirkulation in einem in vitro-HLM-Modell unterzogen. Es werden vergleichende Untersuchungen beider Oxygenatoren in Bezug auf das Adsorptions- und Aktivierungsverhalten von Plasmaproteinen an Fremdoberflächen und die daraus resultierenden Zellaktivierungen durchgeführt. Es erfolgt die qualitative Bestimmung von 7 nachfolgend genannten Adsorptionsproteinen mittels Western-Blotting, da diese Technik sowohl die Detektion aktiver Proteinfragmente als auch die Messung denaturierter Proteine ermöglicht. (Fibrinogen, Antithrombin III (AT III), hochmolekulares Kininogen (HMWK), CD 41, C1-Esterase-Inhibitor (C-1INH), C-3 Komplement (C-3) und Hitzeschockprotein 70 (Hsp 70))

Zur weiteren Beurteilung der Oberflächenadhäsion wurden ergänzend von den Oxygenatoren beider Gruppen nach dem Versuch Mikrofasern entnommen um REM (Rasterelektronenmikroskop) -Untersuchungen durchzuführen.

Als richtungsweisende Parameter sind Leukozyten, Thrombozyten, Hämolyse, freies Hämoglobin (freies-Hb), PMN-Elastase,  $\beta$ -Thromboglobulin ( $\beta$ -TG), Faktor XII (F XII), Heparin, SC5b-9 und Thrombin-Antithrombin-III-Komplex (TAT-Komplex) bestimmt worden, um die Wirkungen auf das Gerinnungssystem, Komplementsystem, FXII-Kallikrein-Kinin-System, die Fibrinolyse und die Blutzellen zu untersuchen.

## **II. Hauptteil**

### **1. Das Postperfusionssyndrom (PPS)**

Trotz der Fortschritte in den technischen Aspekten der medizinischen Wissenschaften, insbesondere im Bereich der Herzchirurgie, sind immer noch Komplikationen im Hinblick auf den kardiopulmonalen Bypass (CPB) zu befürchten, die eine Genesung des Patienten wegen vieler klinischer Organschäden hinauszögern. Die systemische Entzündungsreaktion nach extrakorporalen Kreisläufen wurde PPS genannt. Allgemein wird sie definiert als ein Zustand, der charakterisiert ist durch Lungen- und Nierendysfunktion, Blutungsneigung, neurologische Veränderungen und Fieber, ohne infektiöse Ursache. Die Multiple Organdysfunktion (MOD) beim PPS ist im Allgemeinen eine vorübergehende Erscheinung, kann aber in seltenen Fällen eine längere Atem- und Nierenunterstützung oder Bluttransfusion erforderlich machen (8).

#### **1.1. Das systemische Entzündungsreaktionssyndrom**

Extrakorporale Therapieverfahren für Niere, Herz und Lunge können Entzündungsreaktionen in qualitativ und quantitativ unterschiedlichem Maße hervorrufen. Die durch den kardiopulmonalen Bypass ausgelöste systemische und myokardiale Entzündungsreaktion trägt wesentlich zur Myokarddepression sowie zur Morbidität und Letalität nach Herzoperationen bei. Die diesen Inflammationsprozessen zugrunde liegenden Mechanismen sind bekannt. Die Komplementkaskade, die Aktivierung von Blutzellen, die Freisetzung von Zytokinen und die Induktion der Stickstoffsynthese haben daran Anteil. Ein Teil der Entzündungsreaktion spielt sich im Herzen selbst ab. Welcher Stellenwert dabei den einzelnen Komponenten zukommt, ist allerdings noch keineswegs geklärt (40).

Die sog. systemische Entzündungsreaktion ist ein komplexer, nicht einheitlicher klinischer Prozess, der von pathophysiologischen Veränderungen bestimmt wird. Von einem pathophysiologischen Standpunkt aus reflektiert dieses Syndrom einen hyperdynamen Kreislaufzustand, einschließlich einer erhöhten Herzleistung, bei gleichzeitigem Vorliegen eines reduzierten systemischen Gefäßwiderstandes (8).

Scoresysteme und Zytokinbestimmungen (Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF), lösliche TNF-

Rezeptoren) erlauben die frühzeitige Erfassung einer eskalierenden Entzündungsreaktion, von welcher 2-10% aller Patienten betroffen sind. Bei Patienten nach elektiven herzchirurgischen Eingriffen mit CPB kann die intra- und postoperative Aktivierung der neutrophilen Granulozyten, Monozyten, Makrophagen als Folge des CPB und der Operationstraumata anhand des Anstiegs der PMN-Elastase im Blut verfolgt werden. Therapieversuche zur Dämpfung dieser systemischen und myokardialen Entzündungsreaktion konzentrieren sich auf die Komplementblockade, die Heparinbeschichtung von Membranmaterialien, die Leukozyten-Depletion und -Funktionsabschwächung, die Toxin-/Mediatorelimination mittels Hämofiltration, die Gabe von Antiproteasen, Antioxidantien, Radikalfängern sowie von Immunglobulinen (40).

## **1.2. Das akute Lungenversagen**

ARDS ist definiert durch eine akute schwere Gasaustauschstörung mit radiologisch nachweisbaren bilateralen diffusen Infiltraten und einer verminderten Lungencompliance. Pathophysiologisch beruht das Syndrom auf einer entzündungsbedingten Störung der endothelialen-epithelialen Struktur der Alveole mit Ausbildung eines interstitiellen und alveolären Ödems. Als Folge entwickelt sich eine alveoläre Instabilität mit diffuser Mikroatelektasenbildung. Patienten mit weniger schwerer Hypoxämie haben eine akute Lungenschädigung (ALI), während Patienten mit schwerer Hypoxämie das Vollbild eines ARDS aufweisen (39).

Aggregation von Leukozyten (Sticking) in den Lungenkapillaren und die Freisetzung von Proteasen mit breiter Substratspezifität werden heute noch als die wesentlichen Faktoren für die Auslösung und Entwicklung eines akuten und progressiven Lungenversagens angesehen. Proteolytische Enzyme aus Granulozyten gelten als wesentliche Mediatoren bei der Entwicklung des schock- und sepsisbedingten Organversagens, insbesondere des ARDS (42).

Die Beteiligung von Makrophagen, Neutrophilen, Prostaglandinen, Leukotrienen, Komplementfaktoren, Lymphokinen und Bakterientoxinen kann nicht von der Hand gewiesen werden. Viele dieser Faktoren werden während des Einsatzes der HLM freigesetzt oder aktiviert. Ätiologisch lassen sich eine Vielzahl von Ursachen für ARDS finden. (Lungenkontusion, Hämolyse, Pankreatitis, hypovolämischer Schock und Massentransfusion) (9).

Von allen Ursachen ist das septische Krankheitsbild mit ca. 40% der häufigste Auslöser eines ARDS. Auch wenn die Mortalität nach neueren Daten geringer ist als noch vor 10-15 Jahren, muss weiterhin von einer Sterblichkeit von etwa 40% ausgegangen werden. Patienten sterben jedoch meist an den Folgen der Sepsis und des Multiorganversagens und nicht in erster Linie an der respiratorischen Insuffizienz (39).

In Deutschland werden derzeit jährlich 65000 Operationen mit der HLM durchgeführt. Die Letalität dieser Eingriffe wird mit 3% angegeben. Wesentliche Todesursachen sind dabei nicht nur die kardialen Grunderkrankungen, sondern auch das Multiorgan-Dysfunktions-Syndrom (MODS) (40).

### **1.3. Das Multiorgan-Dysfunktions-Syndrom (MOD)**

Eine primäre Organdysfunktion tritt als Folge einer unmittelbaren Schädigung eines Organsystems (z.B. Trauma, Infektion oder Grunderkrankung) auf und geht nicht mit einer ausgeprägten systemischen inflammatorischen Reaktion des gesamten Organismus einher. Im Gegensatz dazu ist die sekundäre Organdysfunktion die Folge einer solchen systemischen inflammatorischen Abwehrreaktion auf einen auslösenden Stimulus, ohne dass das funktionseingeschränkte Organ von diesem Stimulus betroffen sein muss (45). Auf die rezeptorgesteuerte Aktivierung komplexer intrazellulärer Signaltransduktionskaskaden durch unterschiedliche infektiöse (z.B. Endotoxin) und nicht infektiöse (z.B. traumatische Gewebsschäden) Stimuli reagieren Makrophagen und andere immunokompetente Zellen des Organismus mit der Freisetzung verschiedener Zytokine. Diese können wie TNF- $\alpha$  und IL-1 eine proinflammatorische oder wie IL-10 eine antiinflammatorische Wirkung besitzen und weisen einen hohen Grad gegenseitiger Feedback-Mechanismen auf. Neben ihren inflammatorischen Effekten besitzen Zytokine wie TNF- $\alpha$ , IL-1 und IL-6 auch die Eigenschaft zu einer systemischen Aktivierung der Gerinnungskaskade und Hemmung der Fibrinolyse. Die Folge ist eine Schädigung des vaskulären Endothels mit Störungen der Mikrozirkulation und Perfusion und dem Risiko eines daraus resultierenden MOF. Auch die überschießende Bildung vasodilatatorischer Mediatoren (NO) und die vermutete begleitende Freisetzung kardiodepressiver Mediatoren (IL-1) können zu Hypotension führen. Diese geht einher mit Störung der Makro- und Mikrozirkulation, mit einer Umverteilung des Blutvolumens und einer daraus resultierenden hypoxischen

Gewebsschädigung verschiedener Organsysteme durch verminderte Perfusion und Sauerstoffversorgung. Weiterhin können Nekrose und Apoptose an der Organschädigung teilhaben und somit zum MOF beitragen (1; 32).

Organschäden können auch durch multiple Embolien hervorgerufen werden, die während der Operation und durch den Kreislauf an sich auftreten. Hinzu müssen metabolische Veränderungen einschließlich Störungen im Säure-Basen- und Elektrolytgleichgewicht und die Hypothermie als Ursachen für die MOD in Betracht gezogen werden (8).

## **2. Die Heparinbeschichtung**

Geschichtlicher Rückblick:

Bereits 1963 berichteten Gott et al. von einer Heparinbeschichtung an mit kolloidalem Graphit vorbehandelten Kunststoffen. In den folgenden Jahren wurde konsequent an einer verbesserten ionischen Beschichtungstechnik über die Bindung des negativ geladenen Heparinmoleküls an positiv geladene, festphasengebundene Ammoniumionen gearbeitet (54). In den frühen 1980er Jahren hat Professor Olle Larm die biologisch aktive Carmeda-Oberfläche (CBAS) erfunden (10). Sie stellt heutzutage eine etablierte Heparinbeschichtung mit langjährigem klinischen Einsatz dar. Es handelt sich dabei um eine kovalente Bindung, welche durch die Technik der Endpunktbefestigung die aktiven Sequenzen des Heparinmoleküls nicht beeinträchtigt und somit eine äußerst bioaktive Oberflächenstruktur bewirkt. Als in der zweiten Hälfte der 80er Jahre die ersten heparin-beschichteten Oxygenatoren verfügbar waren, wurden diese auf Biokompatibilität in in-vitro-Systemen, Tiermodellen und später in Patientenstudien untersucht (54).

### **2.1. Wirkungsweise der Heparinbeschichtung**

Heparin weist im Zusammenhang mit seiner Interaktion zwischen Plasmaproteinen und Gewebskomponenten mehrere biologische Aktivitäten auf. Befindet sich das Heparin direkt an der Fremdoberfläche, modifiziert es den normalen Ablauf der Plasmaproteinadsorption im kritischen Augenblick, wenn das Blut mit der Oberfläche in Kontakt kommt. Folglich reduziert es die Aktivierung der geformten Blutbestandteile. Heparin ist ein katalytischer Kofaktor, der die Hemmung mehrerer Serinproteasen des

Koagulationssystems durch AT III deutlich beschleunigt. Abgesehen vom F IIa (Thrombin) hemmt Heparin zu dem die Faktoren IXa, Xa, XIa,  $\alpha$ - und  $\beta$ -XIIa, und Plasmakallikrein. Durch die katalytische Wirkung von Heparin kann das Heparinmolekül zusätzlich auf den Faktor ATIII wirken. Aufgrund dieser Wechselwirkungen reduziert an die Oberfläche angelagertes Heparin potentiell die Aktivierung des humoralen Systems und der Blutzellen auf der Fremdoberfläche, einschließlich der Thrombozyten, Leukozyten, Gerinnungsproteine, Fibrinolyse, Kinin und Komplement (31).

Die anfänglich von vielen Autoren vertretene Hypothese, dass die reduzierte Thrombogenität der heparin-beschichteten Oberflächen über die katalytische Wirkung auf AT III und dadurch verstärkter Thrombinkomplexierung ausgelöst wird, kann nach neueren Kenntnissen nicht mehr aufrechterhalten werden. Die Vorteile der Heparinbeschichtung bestehen vielmehr in der geringeren bzw. selektiven Adhäsion von Plasmaproteinen, welche einerseits zu einer schnellen Bildung einer blutfreundlichen Sekundärmembran auf der Oberfläche führen und andererseits eine weitere Denaturierung und somit Aktivierung der adhären Proteine verhindern. Mehrere Arbeitsgruppen, insbesondere jene von Vroman und Brash konnten beweisen, dass die Adhäsion von Plasmaproteinen wie F XII, Fibrinogen, Vitronectin, HMWK, etc. an den Fremdoberflächen ein wesentliches Kriterium für die Thrombogenität derselben darstellt.

Festphasengebundenes Fibrinogen führt zu einer starken Aktivierung der Thrombozyten, anschließender Adhäsion, Aggregation und in fortgeschrittenem Zustand zu Thrombosierungsprozessen. Vermutlich tragen die Adsorptionseigenschaften einer Fremdoberfläche entscheidend dazu bei, ob dem daran vorbeiströmenden Blut aktivierende oder inhibierende Stimuli präsentiert werden. Didisheim und Watson (Didisheim 1989) stellten die Hypothese auf, dass die Thrombogenität von künstlichen Oberflächen hauptsächlich davon abhängt, inwieweit der sich am natürlichen Endothel permanent im Wechselspiel befindliche Prozeß der Aktivierung und Inhibierung der Thrombozytenadhäsion und -aggregation stimuliert werden kann. Diese Gleichgewichtsreaktion unterliegt sowohl plasmatischer als auch zellulären Autoregulations- und Rückkoppelungsmechanismen. Sobald Blut mit negativ geladenen Oberflächen in Kontakt kommt, zerfällt F XII, der inaktiv mit Präkallikrein

und HMWK komplexiert vorliegt, in seine Fragmente  $\alpha$  und  $\beta$ -F XIIa, welche wiederum zu einer Aktivierung des gesamten Kontaktaktivierungssystems führen.  $\beta$ -F XIIa wandelt das Zymogen Präkallikrein in seine aktive Form Kallikrein um, welches vasodilatorisch wirkendes Bradykinin von HMWK abspaltet. Außerdem besitzt Kallikrein über Plasminogenaktivierung profibrinolytische Potenz und stimuliert zudem neutrophile Granulozyten zu chemotaktischer Aktivität (54).

### **Kontaktphase (Faktor XII-Kallikrein)**



**Intrinsische Gerinnung**



**Fibrinolyse**



**Komplement**

Abb.1: Zentrale Stellung des Kontaktphasensystems und die von ihm aktivierbaren Kaskadensysteme (53)

Wenn oberflächenvergütete Materialien in der Lage sind, die Kontaktphasenaktivierung zu minimieren, so werden auch die davon ausgelösten weiteren Kaskadenreaktionen reduziert. Beziehungen zwischen den Initialphasen der klassischen Komplementaktivierung (C1) und dem Kontaktphasensystem sowie dem Schlüsselenzym der Fibrinolyse (Plasmin) sind sowohl in-vitro als auch in-vivo beschrieben worden. Eine Plasminaktivierung kann sowohl über endothelialen t-PA Release als auch über die Kallikrein-aktivierte Urokinase stattfinden. Das generierte Plasmin kann den ersten Faktor der Komplementkaskade (C1) direkt oder über die Freisetzung des F XII-Spaltproduktes  $\beta$ -Faktor XIIa aktivieren. Beim Einsatz von heparin-beschichteten EKZ-Systemen sind dadurch u.a. die geringere Komplementaktivierung und die damit reduzierbaren inflammatorischen Postbypass-Syndrome zu erklären. Letztlich sind aber die exakten Wirkungsmechanismen, die sich bei Kontakt von Blut mit heparin-beschichteten Oberflächen abspielen, noch nicht endgültig geklärt (53; 54).

Nach heutigem Kenntnisstand bewirken Oxygenationssysteme, deren Oberflächen mit Heparin vergütet sind, eine Reduzierung folgender Kaskadenreaktionen bzw.

Symptome:

Kontaktphasenaktivierung

Komplementsystem

Granulozytenschädigung, Inflammation und pulmonale Komplikationen

Thrombozytenaktivierung

Hämostasestörungen und Blutverlust

Neuronale Schädigung und zerebrale Komplikationen

Sauerstoffradikalbildung

Die Vorteile der Heparinbeschichtung bestehen in der geringeren Adsorption von prokoagulatorischen und proinflammatorischen Plasmaproteinen sowie der selektiven Adsorption von antikoagulatorischen und antiinflammatorischen Plasmaproteinen, welche einerseits zu einer schnellen Bildung einer blutfreundlichen Sekundärmembran auf der Oberfläche führen und andererseits eine weitere Denaturierung und Aktivierung der adsorbierten Proteine verhindern (54).

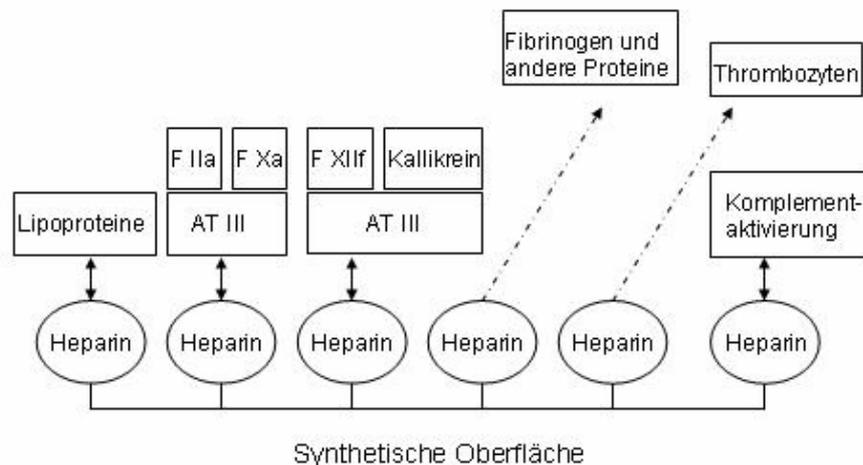


Abb. 2: Wirkungen von oberflächengebundenem Heparin (15)

Insgesamt kann anhand zahlreicher Studien zur Biokompatibilität von heparinbeschichteten extrakorporalen Kreisläufen eindeutig von einer verringerten Aktivierung der zellulären und humoralen Aktivierungsmechanismen ausgegangen werden. Die o.g.

Vorteile, insbesondere die verminderte Komplementaktivierung führen zur Verringerung des durch die EKZ hervorgerufenen PPS und den damit verbundenen Folgeerscheinungen (SIRS, ARDS, MOF). Weitere, vor allem klinische Studien, berichten nicht nur von weniger postoperativen Blutungen, Lungen- und zerebralen Komplikationen sondern auch von weniger Oxygenatorversagen und ja sogar von kürzeren Krankenhausaufenthalten für die Patienten (59); (15).

Insbesondere stellt die Verminderung einer durch die EKZ hervorgerufenen inflammatorischen Reaktion mit z.T. bleibenden Organdysfunktionen ein wichtiges Anwendungsgebiet für heparin-beschichtete Systeme dar (53).

## 2.2. Oberflächenvergütung mit der Hepaface Technik

Bei der Beschichtungsmethode Hepaface der Firma TERUMO CO., Tokio, Japan, wird die Materialoberfläche zuerst mit Ozongas behandelt. Im Anschluss wird ein Polyethylenimin (PEI) aufgelagert, welches Aminoradikale besitzt. Die Umwandlung von Heparinsulfonaminoradikalen in Aminoradikale wird mit schwefelhaltiger Säure durchgeführt. Schließlich werden zwei Aminoradikale kovalent von Glutaraldehyd gebunden(48).

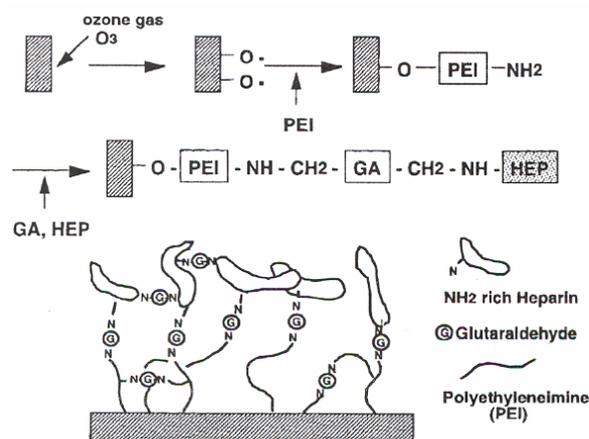


Abb. 3: Oberflächenvergütung mit Hepaface Technik (48)

Heparin ist ein Polysaccharid, wasserlöslich und hydrophil. Wenn es unbeweglich an der Oberfläche fixiert ist, bleibt die Oberfläche hydrophil und wird leichter benetzbar. Wenn heparin-beschichtete Oberflächen wässriger physiologischer Umgebung

ausgesetzt werden, bewegen sich die stark hydratisierten Heparinmoleküle schnell und erreichen ein großes Ausdehnungsvolumen auf der Oberfläche um die Protein und Zelladsorption zu senken. Eine heparin-beschichtete Oberfläche hat die Fähigkeit der Protein und Zellablagerung zu widerstehen, eine Fähigkeit die nur hydrophile Oberflächen besitzen (15).

### **3. Physiologie des Gerinnungs- und Fibrinolyse systems**

#### **3.1. Blutstillung**

Gefäßwand, Blutplättchen und zahlreiche Plasmaproteine (koagulatorische und fibrinolytische Proenzyme, deren Aktivatoren und physiologische Inhibitoren) wirken bei der Hämostase funktionell so zusammen, dass einerseits bei Verletzungen das Gefäß prompt abgedichtet und somit übermäßiger Blutverlust verhindert wird und andererseits überschießende intravasale Gerinnungsvorgänge verhindert werden, damit die Fließfähigkeit des Blutes im verletzten Gefäß so weit wie möglich gewährleistet bleibt. Die Blutstillung wird in die primäre, sofortige Blutstillungsphase, die Fibrinbildungsphase (Gerinnung, sekundäre oder Phase der dauerhaften Blutstillung) und in die anschließende Wundheilungsphase unterteilt. Nach einer Verletzung der Gefäßwand kommt es zur Gefäßkontraktion. Plättchen adhäreren an subendothelialen Kollagenfasern und alterierten Endothelstrukturen, aggregieren miteinander und bilden einen hämostatischen Pfropf (primäre, sofortige Blutstillungsphase). Aus aktivierten Plättchen werden Inhaltsstoffe freigesetzt. Diese wirken vasokonstriktorisch (z.B. Serotonin, Thromboxan  $A_2$ ), beschleunigen die Plättchenaggregation (z.B. ADP), fördern die Thrombinbildung (Bereitstellung von Phospholipiden) oder hemmen die Fibrinolyse (PAI-1). Das gebildete Fibrin verfestigt den hämostatischen Pfropf (Fibrinbildungsphase). Einer überschießenden Gerinnungsbildung wirken hohe Konzentrationen von körpereigenen Hemmstoffen entgegen. Freigesetzte Wachstumsfaktoren, z.B. aus Leukozyten, Plättchen und Endothelzellen, sind für die Reparaturvorgänge an der verletzten Gefäßwand verantwortlich (Wundheilungsphase). Das fibrinolytische System gewährleistet, dass Fibrin wieder aufgelöst wird, sobald es für die Wundheilung nicht mehr benötigt wird (12).

### 3.2. Aktivatoren und Hemmstoffe der Blutgerinnung

Die Aktivierung des Gerinnungsprozesses ist normalerweise auf die verletzte Gefäßwand bzw. das verletzte Endothel begrenzt. Das Schlüsselenzym bei der Blutgerinnung d.h. der Umwandlung von löslichem Fibrinogen in unlösliches Fibrin, ist Thrombin, eine Serinprotease. Die Bildung des Thrombins kann über den extrinsischen oder den intrinsischen Aktivierungsweg erfolgen. Die Aktivierung der Gerinnungsfaktoren erfolgt durch limitierte Proteolyse, der Ablauf der plasmatischen Gerinnung ist daher kaskadenartig. Die Gerinnungsfaktoren wirken erst optimal, wenn sie in einem Komplex mit Kofaktoren, Substrat, Phospholipiden und  $\text{Ca}^{2+}$  zusammenwirken. Die Gerinnungsfaktoren binden  $\text{Ca}^{2+}$  und können sich dadurch an negativ geladene Membranphospholipide anlagern. Eine negativ geladene Oberfläche stellt auch aktivierte Plättchen zur Verfügung.

Die Aktivierung der Gerinnung wird in vivo bei erheblichen Verletzungen des Gewebes hauptsächlich über den extrinsischen Weg eingeleitet. Nach Verletzung der Gefäßwand exprimieren Endothelzellen Gewebefaktor (TF). Bei entzündlichen Vorgängen setzen Interleukine oder  $\text{TNF-}\alpha$  TF aus Monocyten und Endothelzellen frei. Bei bakteriellen Entzündungen kann auch Endotoxin die Expression von TF herbeiführen. Sobald TF verfügbar ist, wird F VII oder F VIIa gebunden und F X zu F Xa aktiviert. Der Komplex F VIIa/TF aktiviert nicht nur F X, sondern auch F IX zu F IXa. Damit ist die Verknüpfung zwischen extrinsischer und intrinsischer Aktivierung gegeben.

Die intrinsische Aktivierung der Gerinnung kommt über die Kontaktaktivierung von F XII zustande. F XIIa bewirkt einerseits die Umwandlung von Präkallikrein in Kallikrein und damit die Bildung von Kininen und andererseits die Aktivierung von F XI. Beide Prozesse werden durch hochmolekulare Kininogene verstärkt. Im nächsten Schritt aktiviert F XIa bei Anwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$  F IX zu F IXa. Der Komplex von F IXa,  $\text{Ca}^{2+}$ , Phospholipid und F VIIIa aktiviert F X, wobei F VIIIa keine enzymatische Aktivität aufweist, jedoch die Aktivierung zu F Xa erheblich beschleunigt.

Auf der gemeinsamen Endstrecke des extrinsischen und intrinsischen Weges bildet sich der Prothrombinasekomplex aus F Xa, F Va, Phospholipid und  $\text{Ca}^{2+}$ , an dem die Aktivierung von Prothrombin zu Thrombin abläuft. Thrombin weist neben seinem katalytischen Zentrum eine Heparinbindungsstelle und eine sog. „anion-binding exosite“ auf. Die „anion-binding exosite“ ist essentiell für die Bindung an Fibrinogen

und Thrombomodulin sowie am N- Terminus des Thrombinrezeptors. Thrombin spaltet schließlich vom Fibrinogen die Fibrinopeptide A und B ab. Die dadurch entstandenen Fibrinmonomere aggregieren zu Polymeren. Thrombin aktiviert neben F V und F VIII („Rückkopplungsmechanismus“) auch F XIII zu F XIIIa. F XIIIa stabilisiert dieses Polymergerüst über kovalente Bindungen, baut  $\alpha_2$ - Antiplasmin ein und schützt somit dieses Gerinnsel vor Plasmin. Außerdem aktiviert Thrombin Blutplättchen, was zu ihrer Aggregation und zur Sekretion von Inhaltsstoffen führt, und Endothelzellen.

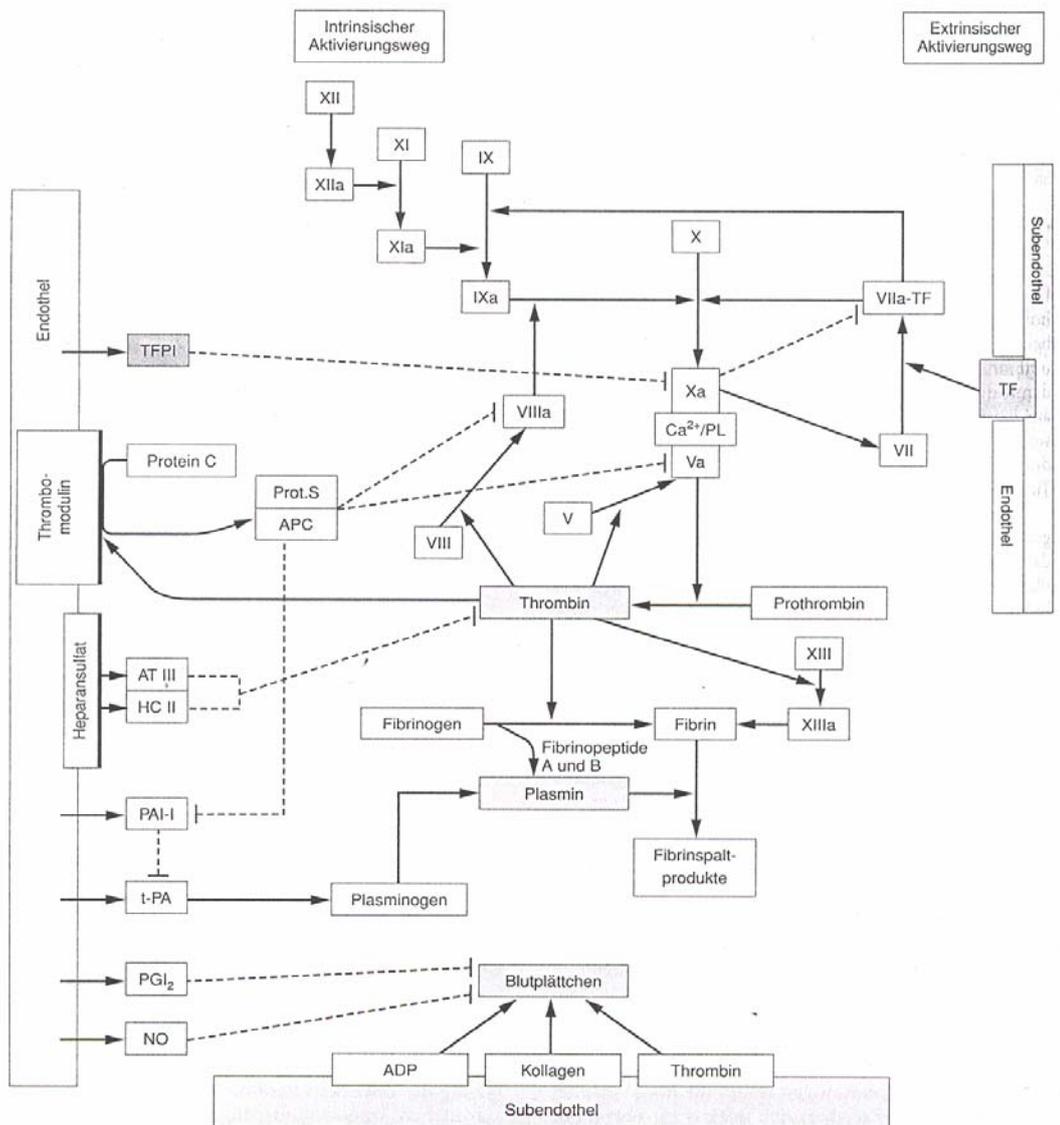


Abb. 4: Schema Blutgerinnung (12)

Im Blut stehen den proteolytischen Enzymen des plasmatischen Gerinnungssystems physiologische, unterschiedlich wirkende, spezifische Hemmstoffe (Inhibitoren) gegenüber.

AT III gehört zum Inhibitortyp der Serpine (Serinproteaseinhibitoren). Es bildet mit Proteasen inaktive äquimolare Komplexe. Die Affinität von AT III ist besonders hoch gegenüber Thrombin und F Xa, während IXa, F XIa, XIIa und Kallikrein schwächer gehemmt werden. AT III wird in der Leber gebildet. Neben angeborenen Mangelzuständen gibt es Krankheiten, die den AT III Spiegel vermindern und dadurch eine Thromboseneigung verstärken.

Ein weiteres Serpin ist der Heparin- Kofaktor II, der überwiegend Thrombin hemmt und dessen physiologische Bedeutung noch nicht vollständig geklärt ist. Zu den physiologischen Inhibitoren der Gerinnung zählt auch der in den Endothelzellen gebildete tissue factor pathway inhibitor (TFPI), ein Proteaseninhibitor vom Kunitz-Typ. Im Plasma liegt TFPI an Lipoproteine gebunden und in freier Form (nur 5%) vor. TFPI bindet zunächst an F Xa und neutralisiert dessen katalytische Aktivität. Der F Xa/TFPI-Komplex hemmt anschließend den F VIIa/TF-Komplex. Eine erhöhte TFPI-Konzentration wird nach Heparin-gabe gemessen. Inzwischen steht auch rekombinanter TFPI zur Verfügung, dessen antithrombotische Wirkung im Tierexperiment nachgewiesen wurde.

Thrombomodulin wird an der Oberfläche von Endothelzellen exprimiert. Es bindet Thrombin mit hoher Affinität im molaren Verhältnis von 1:1. Dadurch wird die Substratspezifität des Thrombins verändert. Der Thrombin-Thrombomodulin-Komplex ist nicht mehr in der Lage Fibrinogen zu spalten und Plättchen zu aktivieren, aktiviert aber Protein C (aktiviertes Protein C=APC, eine Serinprotease). Dabei spaltet Thrombin ein Peptid vom N-Terminus der schweren Kette des Protein C ab. Die antikoagulatorische Wirkung von APC beruht darauf, dass es im Komplex mit Protein S (Kofaktor) und in Gegenwart von  $\text{Ca}^{2+}$  und einer Phospholipidmatrix F Va und F VIIIa inaktiviert (12).

### 3.3. Kontaktphasensystem (Faktor XII-Kallikrein-Kinin-System)

Die Kontaktphase der Blutgerinnung ist ein kompliziertes Zusammenspiel einer ganzen Reihe von Plasmaproteinen. An der initialen Phase der Kontaktphasenaktivierung sind vier Faktoren beteiligt; die Proenzyme F XII, F XI, Praekallikrein (PKK) und als Kofaktor HMWK. Diese Proteine zirkulieren in inaktiver Form im Plasma und haben bei Verletzungen die physiologische Funktion, bedingt durch Kontakt mit subendothelialelem Gewebe, sich zu aktivierten Enzymen umzuwandeln bzw. aktive Peptide freizusetzen und die verschiedenen Regulationskaskaden in Gang zu setzen.

Das an negativ geladene Oberflächen bindende Proenzym F XII wird durch sofortige Autoaktivierung in die aktiven Serinproteasen  $\alpha$ - und  $\beta$ -F XIIa umgewandelt. Das doppelkettige Enzym  $\alpha$ -F XIIa besteht aus einer schweren Kette mit einem Molekulargewicht von 52.000 Dalton und einer über Disulfidbrücken verbundenen leichten Kette mit 28.000 Dalton. Durch proteolytische Spaltung entsteht das Fragment  $\beta$ -F XIIa, das im Gegensatz zu  $\alpha$ -F XIIa nicht an negativ geladene Oberflächen bindet. Sowohl  $\alpha$ - als auch  $\beta$ -F XIIa wandeln PKK zu Kallikrein um, während  $\alpha$ -F XIIa zusätzlich F XI aktivieren kann. Die zwei F-XII-Fragmente sind zudem noch über ihre aktivatorische Potenz auf F XII, Plasminogen und C-1 mit den anderen hämostaseologischen Systemen verknüpft. Da Kallikrein wiederum  $\alpha$ - und  $\beta$ -F XIIa aktivieren kann (positives Feedback), kommt es zu einer explosionsartigen Aktivierung von F XII. Kallikrein ist zudem in der Lage, von HMWK das Nonapeptid Bradykinin abzuspalten, welches die Gefäßpermeabilität erhöht, Blutdruckabfall bewirkt, glatte Muskelzellen kontrahiert, Neutrophile zu Chemotaxis, PMN-Elastase und Superoxidproduktion anregt und aus dem Endothelium Gewebe-Plasminogen Aktivator (t-PA) freisetzt. Die beschriebenen Aktivatoren des Kontaktphasensystems werden durch mehrere Serinproteaseninhibitoren reguliert. Die wichtigsten sind  $\alpha_2$ -Makroglobulin, C 1-INH,  $\alpha_1$ -Antitrypsin,  $\alpha_2$ -Antiplasmin,  $\beta_2$ -Glykoprotein und Plasminogen-Aktivator-Inhibitor (PAI). C 1-INH ist der mächtigste Inhibitor der Kontaktphase. Er vermag sowohl 90% des  $\alpha$ - und  $\beta$ - F XIIa sowie 80% des freien Kallikreins durch Komplexbildung zu inaktivieren (55).

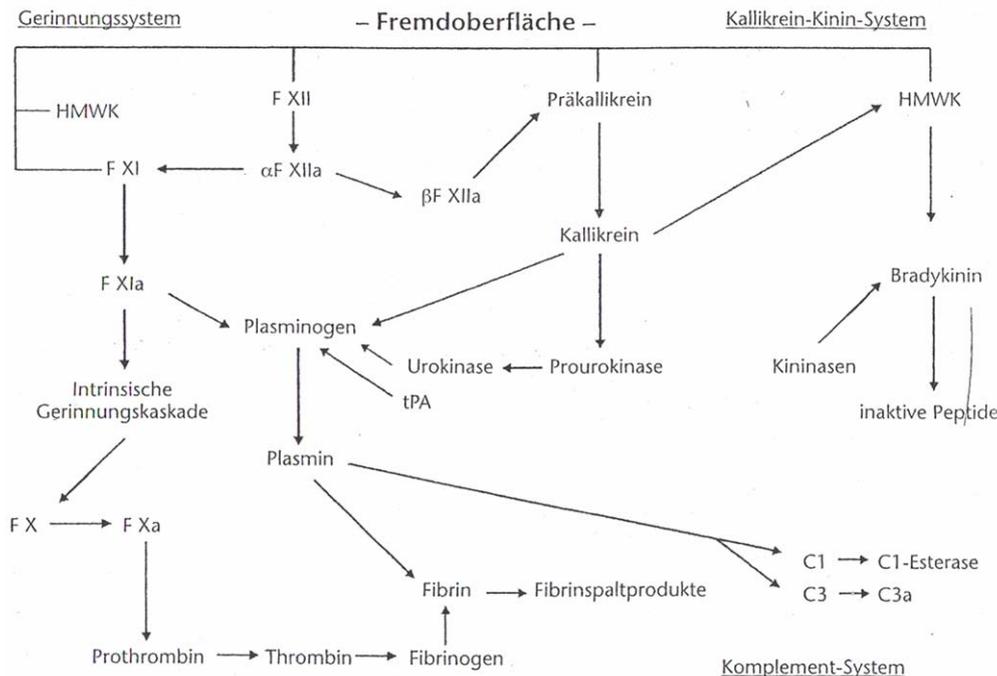


Abb. 5: Schema F-XII-Kallikrein-Kinin-System (55)

### 3.4. Aktivatoren und Inhibitoren der Fibrinolyse

Der Organismus verfügt über ein physiologisches fibrinolytisches System, das die Aufgabe hat, einerseits das bei der Blutstillung gebildete Fibrin wieder aufzulösen und andererseits intravasale Fibrinablagerungen und damit Thrombenbildung zu verhindern. Darüber hinaus ist das fibrinolytische System bei Wachstums- und Gewebeumbauprozessen (z.B. Wundheilung), bei Entzündungen sowie bei Invasion und Metastasierung von Tumoren beteiligt.

Bei der Fibrinolyse handelt es sich um enzymatisch gesteuerte spezifische proteolytische Reaktionen, die das unlösliche Fibrin in lösliche Fibrinspaltprodukte überführen bzw. Fibrinogen zu hoch und niedermolekularen Fibrinogenspaltprodukten abbauen. Der zentrale Schritt der Fibrinolyse ist die Aktivierung von Plasminogen zu dem proteolytischen Enzym Plasmin (12). Für die Plasminogenaktivierung existieren ähnlich wie beim Gerinnungssystem ein extrinsischer und intrinsischer Weg. Die intrinsische Plasminogenaktivierung kann über  $\alpha$ - und  $\beta$ -F XIIa, F XIa und Kallikrein erfolgen. Es konnte außerdem nachgewiesen werden, dass Kallikrein,  $\alpha$ - und  $\beta$ -F XIIa aus Prourokinase den Plasminogenaktivator Urokinase freisetzen können. Die

wichtigsten extrinsischen Fibrinolyseaktivatoren sind der Geweb plasminogenaktivator (t-PA) und der urinä re Plasminogenaktivator (u-PA=Urokinase) (55).

Die Umwandlung des im Plasma zirkulierenden Plasminogens (ca. 200 µg/ml) in Plasmin erfolgt durch die Aktivatoren u-PA und t-PA. Beide weisen eine hohe Spezifität für Plasminogen auf. Sie spalten ein Peptid vom N-terminalen Ende des nativen Plasminogens ab. Plasminogen weist eine hohe Affinität zum Fibrin auf und reichert sich selektiv im Thrombus an. Somit kann Plasmin nach seiner Aktivierung unmittelbar auf das Substrat Fibrin einwirken. Nach der Spaltung von Fibrin wird Plasmin freigesetzt und danach schnell und irreversibel durch  $\alpha_2$ -Antiplasmin inaktiviert. Plasmin hat zwar eine hohe Spezifität für Fibrin, es spaltet aber auch andere Plasmaproteine wie Fibrinogen, F V und F VIII. Die Endprodukte der plasminkatalysierten Fibrino(geno)lyse sind Spaltprodukte aus Fibrin oder Fibrinogen. Höhermolekulare Fibrinogenspaltprodukte behindern die Fibrinpolymerisation. Als Marker einer abgelaufenen Gerinnung und nachfolgender plasminkatalysierter Fibrinolyse werden Bruchstücke aus quervernetztem Fibrin, die sog. D-Dimere, genutzt. Plasma, Blutzellen und Gewebe enthalten eine Reihe von physiologischen Hemmstoffen des Plasmins und der Plasminogenaktivatoren. Der primäre Plasmininhibitor ist  $\alpha_2$ -Antiplasmin, ein Serpin, das eine hohe Affinität zu den Lysinbindungsstellen im Plasmin aufweist. Es bildet mit freiem Plasmin sehr schnell einen irreversiblen Plasmininhibitor-Komplex, der mit einer Halbwertszeit von 0,5 Tagen aus dem Blut eliminiert wird. Weitere Plasmininhibitoren sind  $\alpha_2$ -Makroglobulin, C1-Inhibitor und  $\alpha_1$ -Antitrypsin.

Der wichtigste Inhibitor für t-PA und u-PA ist PAI-1. Er wird in Endothelzellen gebildet und von dort durch Thrombin, Endotoxin oder Zytokine freigesetzt. PAI-1 ist ein wichtiges akute Phase Protein, das bei koronarer Herzkrankheit, nach Operationen, bei Entzündungen und Infektionen vermehrt im Blut zirkuliert (12).

### **3.5. Endothel und Gefäßwand**

Eine entscheidende Rolle beim Ablauf von Gerinnungs-, Fibrinolyse- und Entzündungsprozessen spielt das Endothel. Das intakte Endothel bildet eine Barriere zwischen zirkulierendem Blut und Gewebe. Endothelzellen sind in der Lage, zahlreiche vasoaktive und hämostatisch wirksame Substanzen zu synthetisieren. Funktionell intakte Endothelzellen gewährleisten eine athrombogene Oberfläche, da sie

Heparansulfat bilden und Prostacyclin, EDRF und t-PA auf spezifische Reize hin freisetzen. Thrombomodulin der Endothelzellen bindet Thrombin, dieser Komplex bildet dann APC. Dysfunktionen oder Zerstörungen des Endothels bei Entzündungen oder arteriosklerotischen Wandveränderungen führen zur Ausbildung von prothrombogenen (prokoagulatorischen) Eigenschaften des Endothel, z.B. Synthese oder Expression von TF. Da im geschädigten Endothel weniger Thrombomodulin zur Verfügung steht, wird das gebildete Thrombin an spezifische Rezeptoren z.B. der glatten Muskulatur, gebunden und kann dort vasokonstriktorisch und mitogen wirken. Endothelzellen modulieren auch die Fibrinolyse. Sie sezernieren Plasminaktivatoren und Inhibitoren (PAI-1). Thrombin vermindert die Sekretion von Plasminogenaktivatoren, steigert aber die PAI-1 Sekretion (12).

#### **4. Das Komplementsystem**

Das Komplementsystem ist ein sehr komplexes, aus etwa 20 sich zum Teil durch Spaltung von Peptidbindungen gegenseitig aktivierenden Glykoproteinen bestehendes Enzymsystem, deren Hauptkomponenten als C-1 bis C-9 bezeichnet werden. Die Spaltprodukte von diesen werden mit den Zusätzen „a“ und „b“ versehen. Das Komplementsystem kann über eine kaskadenartige Reaktion auf zwei verschiedenen Wegen aktiviert werden (49).

Einerseits erfolgt die Aktivierung durch Antigen-Antikörper Komplexe (als „klassischer“ Weg bezeichnet) und andererseits durch Oberflächenstrukturen von Bakterien, Viren, Pilzen oder Protozoen (als „alternativer“ Weg bezeichnet) (34).

Beide Wege münden in der Aktivierung von C3, aus dem die Produkte C3a und C3b entstehen. Der weitere Ablauf ist bei beiden Aktivierungswegen gleich und endet in einem Komplex aus C5b, C6, C7, C8 und C9, der als Membranangriffskomplex (MAC), terminaler Lysekomplex (TCC) oder lytischer Komplex bezeichnet wird (49). Die biologischen Leistungen des Komplementsystems bestehen in der Erregerabwehr und der Entzündungsvermittlung. Die Erregerabwehr beruht auf einer Virusneutralisierung, Opsonierung und Zytolyse (Bakteriolyse und Virolyse), wobei man unter Opsonierung eine Förderung der Phagozytose durch das Einwirken verschiedener Substanzen (Opsonine) versteht. Granulozyten, Monozyten und Makrophagen besitzen spezifische

Rezeptoren für diese Opsonine. Zytolyse wird dadurch gesteigert, dass die Komplement Komponenten C5-C9 transmembranäre Poren bilden. Dem osmotischen Gradient folgend, strömt Flüssigkeit in die Zelle ein, so dass diese schließlich platzt (2).

Die Wirkungen der verschiedenen Komplementfaktoren reichen von Auswirkungen auf die Gefäßpermeabilität, d.h. direkte Einwirkung auf das Gefäß durch Aktivierung durch Mastzellen, PMN und Monozyten, über Chemotaxis und Aktivierung von Endzündungszellen, Opsonisierung von Bakterien, bis hin zur Bildung des Terminalsegment (C5b-C9) mit anschließender Lyse der Bakterien und damit Einleitung der Phagozytose (27).

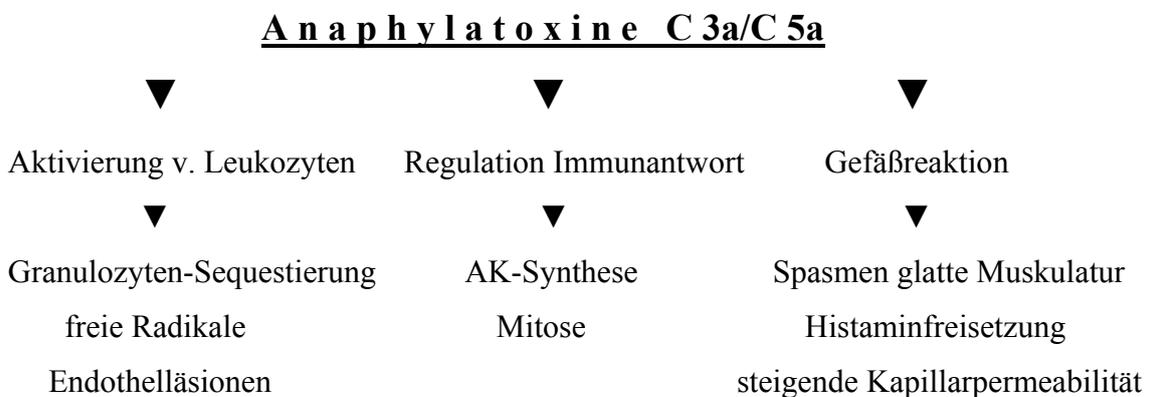


Abb. 6: Komplementauswirkungen (55)

Der Aktivierung des Komplementsystems kommt wegen ihrer direkten Funktion und ihrer Auswirkungen auf andere Systeme eine zentrale Bedeutung zu. Während der EKZ kann eine direkte Umwandlung von C3 in seine aktive Form C3a erfolgen. Das aktivierte C3b lagert sich direkt an Fremdmaterial an und führt zur weiteren Aktivierung anderer Komplementfaktoren, die schließlich im C5b-9-Komplex mit einer hohen vasoaktiven und immunologischen Potenz resultieren. Kallikrein wandelt das C5 in seine aktive Form C5a um. Die Attraktion von C5a und C3b an neutrophilen Zellrezeptoren ist ein im Entzündungsgeschehen als Antwort auf den extrakorporalen Kreislauf wichtiger Prozess. Er führt einerseits zur Degranulation der Granulozyten, welches dem Freisetzen von destruierenden Entzündungssystemen gleichkommt, andererseits kann es bei massivem Auftreten von C5a zur Downregulation der Oberflächenrezeptoren an Neutrophilen kommen und damit zur Einschränkung auf

Infektionserreger reagieren zu können (7). Die Anaphylatoxine C3a und C5a sind starke Entzündungsmediatoren. Sie führen zu Kontraktion der glatten Muskulatur, erhöhen die Gefäßpermeabilität und rekrutieren PMN und Monozyten an Gefäßwände, was die Voraussetzung für die Einwanderung in das Endzündungsgebiet darstellt (38).

C3a und C5a vermögen zudem die Gefäßpermeabilität durch Histaminfreisetzung aus basophilen Granulozyten bzw. Mastzellen zu erhöhen, was der Überempfindlichkeit vom Soforttyp ähnelt (34); (2). C3a setzt ferner Serotonin aus Thrombozyten frei (34).

Weiterhin bewirkt C5a eine zum Infektionsort gerichtete Migration (Chemotaxis) neutrophiler Granulozyten, die lysosomale Enzyme und Arachidonsäurederivate sezernieren.

Als klinische Manifestation erscheinen Pyrexie, Vasodilatation, Permeabilitätssteigerung, Kreislaufstörungen, Ödembildung und Organbeschädigungen (7); (34).

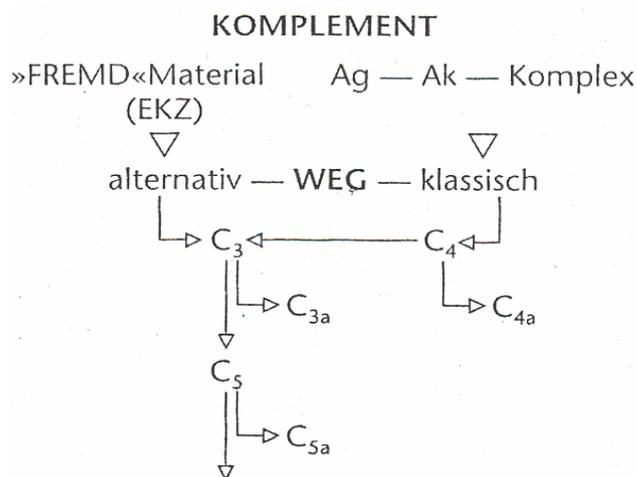


Abb. 7: Mechanismus Komplementaktivierung (55)

#### 4.1. Akute Phase Proteine

Gewebsschädigungen führen zu einer vermehrten Bildung von Akute-Phase-Proteinen (Anti-Endzündungsproteinen). Diese bauen Lipide zerstörter Zellen ab (z.B. C-reaktives Peptid) oder wirken als Proteinase-Inhibitoren ( $\alpha_1$ -Antitrypsin). Letztere verhindern eine überschießende und damit lebensbedrohliche Aktivierung des Komplement-, Kallikrein-, Kinin-, Gerinnungs-, und Fibrinolyse-system durch Proteasen der

Granulozyten. Zu den Akute-Phase-Proteinen werden neben den erwähnten Komponenten des Komplementsystems C-3 und C-5 auch die Transportproteine Haptoglobin und Ceruloplasmin aber auch Fibrinogen und Plasminogen gerechnet (6); (34).

### **III. Material und Methoden**

#### **1. Materialien**

##### **1.1. Blutkonserven**

Für die Versuche wurden 10 heparinisierte Vollblutkonserven von der Abteilung für Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Tübingen verwendet. Eine ASS-Medikation der Spender bestand nicht. Alter, Geschlecht und Blutgruppe der Spender blieben unberücksichtigt. Diese Konserven hatten ein mittleres Füllvolumen von 512,4 ml Blut, welches unverzüglich in den Versuchsaufbau eingebracht wurde. Als Konservenbeutel wurden die Leerbeutel vom Typ Compoflex der Firma FRESENIUS HEMO CARE GmbH, Bad Homburg v.d.H., D., benutzt. (s.Tabelle 3)

##### **1.2. Blutzusätze**

Die Primärfüllung umfasste 300 ml und enthielt die folgenden Lösungen:

78,3 ml 5% Glucoselösung, 206 ml Ringer-Lactat-Lösung, 15,7 ml Natriumhydrogencarbonat

Verwendung fand die 5%-ige Glucoselösung (kolloidale Lsg.) der Firma DELTA PHARMA GmbH, Pfullingen, D.. Als Säurepuffer diente das Natriumhydrogencarbonat in Form eines 8,4%-igen Infusionslösungskonzentrats der Firma B. BRAUN MELSUNGEN AG, Melsungen, D.. Zusätzlich wurde die Ringer-Lactat-Lösung (kristalloide Lsg.) der Firma FRESENIUS AG, Bad Homburg, D., benutzt.

Die Heparinisierung der Blutkonserven erfolgte mit Liquemin® N 25000 [Heparin-Natrium aus Schweinedarm-Mukosa] der Firma HOFFMANN-LA-ROCHE AG, Grenzach-Wyhlen, Schweiz. In jeden Blutentnahmebeutel sind 2000 U Liquemin (25000 IU/5ml) in 35 ml 0,9 % NaCl-Lösung zugegeben worden. Das Antikoagulans wurde in einer Konzentration von 3 IE/ml Maschinenfüllvolumen (MFV), welches sich wie folgt errechnet, verwendet.

[MFV = Summe aus dem Blutkonservenvolumen und dem Primärvolumen abzüglich des Volumens der ersten Blutprobe.] (Heparinberechnung s.Tabelle 3)

### 1.3. Herz-Lungen-Maschine

#### 1.3.1. Oxygenatoren

Die Studie wurde mit 10 Membranoxygenatoren der Firma TERUMO-CORPORATION, Tokyo, Japan durchgeführt.

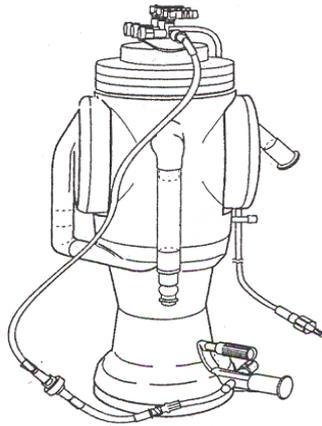


Abb. 8: CAPIOX SX 18 (46)

Es wurden jeweils 5 Oxygenatoren der folgenden Baureihen untersucht.

CAPIOX SX 18, (un-coated ; NC) und CAPIOX SX18H (heparin-coated ; HC)

Beim CAPIOX SX 18 handelt es sich um einen Membranoxygenator mit mikroporösen Hohlfasern aus Polypropylen (Hohlfaseroxygenator), der als extrakorporales Perfusionssystem verwendet wird, in dem das Blut außerhalb der Fasern und das Gasgemisch durch die Fasern fließen. Er besteht aus einem Modul für den Gasaustausch mit einem integrierten Wärmetauscher.

Der CAPIOX SX 18H besitzt die gleiche Bauweise wie CAPIOX SX18, aber die mit Blut in Kontakt kommende Oberfläche ist mit Heparin beschichtet (46).

### **1.3.2. Temperiereinrichtung**

Um das zirkulierende Blut auf einer konstanten Temperatur von 28°C (Hypothermie) zu halten wurde eine Temperiereinrichtung (HAAKE Typ:N3) mit Wasserreservoir und Wasserpumpe (HAAKE Typ: K 200) der Firma HAAKE, Berlin, D., verwendet.

### **1.3.3. Rollerpumpe**

Für die Aufrechterhaltung der Blutzirkulation (3l/min) sorgte die Rollerpumpe der Firma STÖCKERT, München, D..

### **1.3.4. Oxygenierung**

Während des Versuchs wurde konstant (1l/min) 77% N<sub>2</sub>, 20% O<sub>2</sub> und 3% CO<sub>2</sub> zugeführt.

## **1.4. Laborgeräte und Labormaterialien**

### **1.4.1. Laborgeräte**

- Zellcounter Sysmex K-1000, der Firma Sysmex GmbH, Norderstedt, D.,
- Zentrifuge „Varifuge RF Inert“, der Firma HERAEUS CHRIST GmbH, Osterode, D.,
- Zentrifuge „Cryofuge 8000“, der Firma HERAEUS CHRIST GmbH, Osterode, D.,
- CAPIOX SX 18, (un-coated), TERUMO CORPORATION, Tokyo, Japan,
- CAPIOX SX18H (heparin-coated), TERUMO CORPORATION, Tokyo, Japan,
- Temperiereinrichtung (HAAKE Typ:N3) mit Wasserreservoir und Wasserpumpe (HAAKE Typ: K 200) der Firma HAAKE, Berlin, D.,
- Rollerpumpe der Firma STÖCKERT, München, D.,
- Thermoblock Unitek HB 130, SEL Laboratory Products, GB.,
- Mini-Protean® II Elektrophoresezelle BIO-RAD Laboratories, Hercules, California, USA.,
- Trans-Blot® S-D Semi-Dry-Elektrophoretic Transfer Cell, der Firma BIO-RAD Laboratories, Hercules, California, USA.,

#### **1.4.2. Labormaterialien**

- S-Monovetten®, der Firma SARSTEDT, Nürnberg, D.,
- S-Monovetten® 2,7 ml KE (Kalium-EDTA), (1,6 mg EDTA/ml Blut),
- S-Monovetten® 3 ml 9NC, (0,3 ml Citratlösung), (0,106 mol/l  $C_6H_5Na_3O_7 \times 2H_2O$ ),
- S-Monovetten® 10 ml NC, (1,0 ml Citratlösung), (0,106 mol/l  $C_6H_5Na_3O_7 \times 2H_2O$ ),
- S-Monovetten® 4,5 ml, (neutral),
- S-Monovetten® 9 ml, (neutral),
- Multiadapter für o.g. S-Monovetten® der Firma SARSTEDT, Nürnberg, D.,
- Einmal-Injektions-Kanülen, Dünnwand, (0,90×40 mm), der Firma B. BRAUN MELSUNGEN AG, Melsungen, D.,
- Einmal-Injektions-Kanülen Mikrolance®, 3 24GA1, (0,55×25), der Firma BECTON DICKINSON, Rep. of Ireland,
- die Venenpunktionsbestecke Butterfly®-14 und Butterfly®-16, der Firma ABBOTT, Sligo, Rep. of Ireland,
- das Transfusionsbesteck Sangopur® 40 µm, der Firma B. BRAUN MELSUNGEN AG, Melsungen, D., für die Übertragung des Blutes aus der Konserve in das Reservoir der Versuchsanordnung,
- Leerbeutel vom Typ Compoflex der FRESENIUS HEMO CARE GmbH, Bad Homburg v.d.H., D.,
- Centriprep YM-10 Röhrchen, der MILLIPORE CORPORATION, USA.,
- Kolbenhubpipetten, der Firma EPPENDORF, Hamburg, D.,
- Nitrozellulosemembran (7 x 8,4 mm), der Firma BIO-RAD Laboratories, Hercules, California, USA.,
- Filterpapier (Whatman) (7 x 8,4 mm), der Firma BIO-RAD Laboratories, Hercules, California, USA.,

#### ***Lösungen für HLM***

- 5%-ige Glucoselösung (kolloidale Lsg.) der Firma DELTA PHARMA GmbH, Pfullingen, D.,
- 8,4%-iges Natriumhydrogencarbonat Infusionslösungskonzentrat der Firma B. BRAUN MELSUNGEN AG, Melsungen, D.,
- Ringer-Lactat-Lsg. (kristalloide Lsg.) der Firma FRESENIUS AG, Bad Homburg, D.,

-Liquemin® N 25000 der Firma HOFFMANN-LA-ROCHE AG, Grenzach-Wyhlen, Schweiz,

### ***Lösungen für Elektrophorese***

-SDS-PAGE Molekular Weight Standard, High Range, der Firma BIO-RAD Laboratories, Hercules, California, USA.,

-Gelpuffer (pH 8,8)

[Tris 0,15 M, SDS 0,4 % (w/v), NaN<sub>3</sub> 0,01 % (w/v)]

-Probenpuffer (reduzierend)

[Gelpuffer 2,5 %, SDS 2,0 % (w/v), Dithiothreitol 0,5 % (w/v), Bromphenolblau 0,01 % (w/v), Glycerin (87 %-ig) 20 %]

-Anoden- und Kathodenpuffer

[Tris 0,25 M, Glycin 1,92 M, SDS 1% (w/v), NaN<sub>3</sub> 0,01% (w/v)]

-SDS-Trenngel 8% nach PAGE

[Acrylamid / Bisacrylamid ; 30 % / 0,8 % (w/v)]

-SDS-Sammelgel 4% nach PAGE

[Acrylamid / Bisacrylamid ; 30 % / 0,8 % (w/v)]

### ***Lösungen für Western-Blotting***

-TBS

[0,020 M Tris-HCl, 0,5 M NaCl, pH=7,5]

-Transfer-Puffer

[Tris 0,025 M, Glycin 0,192 M, SDS 1 % (w/v), Methanol 20 %]

-0,1 % Fast Green in 1% Essigsäure

-Trockenmilch [Non-fat-skimmed-milk 3%]

-Substratlösung (BCIP/NBT)

## ***Chemikalien***

Ethanol	Fa. MERCK, Darmstadt, D.
Amoniumperoxidsulfat	Fa. MERCK, Darmstadt, D.
BCIP/NBT	Fa. SIGMA, St. Louis, USA.
Bromphenolblau	Fa. SIGMA, St. Louis, USA.
1,4-Dithiothretol	Fa. MERCK Darmstadt, D.
Essigsäure 100%	Fa. MERCK Darmstadt, D.
Fast Green FCF	Fa. MERCK, Darmstadt, D.
Glutaraldehyd 50% in Wasser	SERVA GmbH, Heidelberg, D.
Glycerin	Fa. MERCK Darmstadt, D.
Glycin	Fa. MERCK, Darmstadt, .
H <sub>2</sub> O bidest	FRESENIUS, GmbH, Bad Homburg, D.
Lithiumdodecylphosphat	Fa. MERCK Darmstadt, D.
Methanol	Fa. MERCK Darmstadt, D.
NaCl	Fa. MERCK Darmstadt, D.
NaN <sub>3</sub>	Fa. MERCK Darmstadt, D.
Non-fat skimmed milk	Fa. BIO MOL GmbH, Hamburg, D.
PAA=30% Acrylamidlösung mit 0,8%	Fa. ROTH, Karlsruhe, D.
Bisacrylamid i. Verh. 37,5:1	
physiolog. Kochsalzlösung, (0,9 %)	Fa. MERCK Darmstadt, D.
SDS, (Sodiumdodecylsulfat)	Fa. SIGMA, St. Louis, USA.
TEMED,N',N',N',N',- Tetramethyl- ethylendiamine	Fa. SIGMA, St. Louis, USA.
Titriplex III p.A.	Fa. MERK, Darmstadt, D.
Tris, (Trishydroxymethylaminomethan)	Fa. SIGMA St. Louis, USA.
Tween 20, (Polyoxyethylensorbitan- monolaurat)	Fa. MERK, Darmstadt, D.

## 2. Methoden

### 2.1. Versuchsaufbau

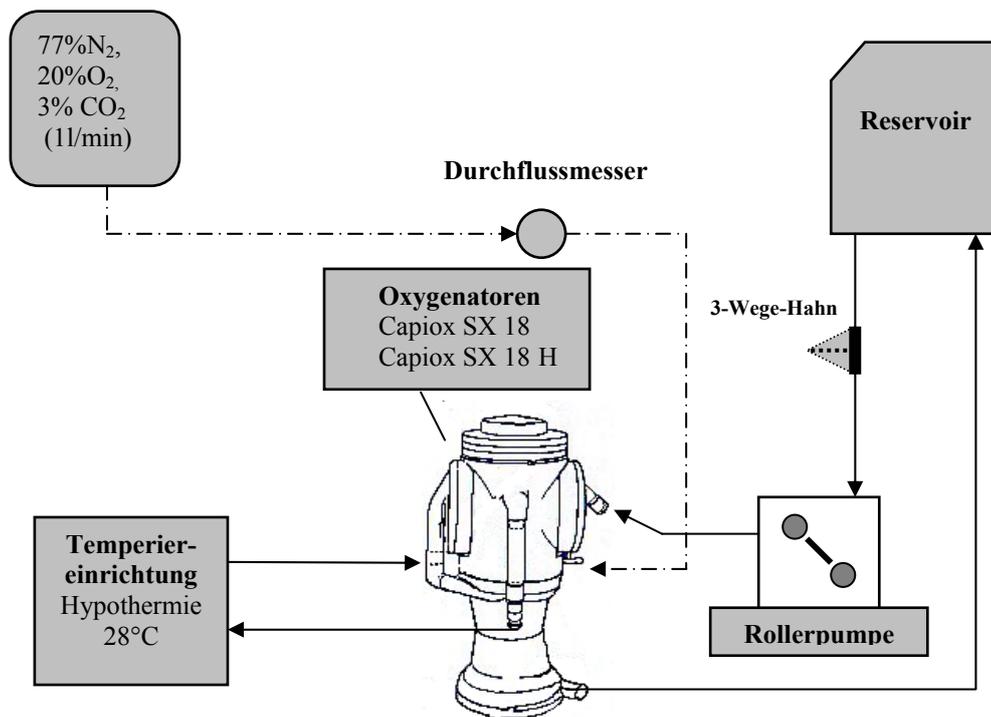


Abb. 9: Schema des in vitro-CPB-Modells

### 2.2. Versuchsdurchführung

Vor der Blutspende erfolgte die Zugabe von 2000 IE Liquimin® /35 ml NaCl (0,9%) in die Leerbeutel für die Blutkonserven vom Typ Compoflex. Nach dem Aufbau der Versuchsanordnung wurde mit der Primärfüllung begonnen. Zeitgleich erfolgte die Wägung der Blutkonserve mit anschließender Volumenberechnung des für das Maschinenfüllvolumen nötigen Restheparins. Aus diesem Konservenbeutel wurde die erste Blutprobe entnommen. (Abnahmezeitpunkt 1 = AZP 1 genannt)

Direkt im Anschluss ist die zuvor berechnete Ergänzungsmenge an Liquemin® der Konserve beigemischt worden. Mit Hilfe des Transfusionsbesteckes konnte das Blut in das Reservoir und Schlauchsystem des Versuchsaufbaus eingebracht werden.

Nach diesem Arbeitsschritt wurde die Rollerpumpe eingeschaltet, das Schlauch- und Oxygenatorsystem entlüftet und ein Blutfluss von 3 l/min eingestellt. Ab diesem Zeitpunkt wurde das heparinisierte Frischblut zusammen mit den konstanten Blutzusätzen im o.g. HLM-in-vitro-Modell einer 90-minütigen Rezirkulation unterzogen. Vor jeder weiteren Abnahme (ab AZP 2 bis 8) sind 2 ml Blut entnommen und anschließend verworfen worden, da Teile des Blutes im 3-Wege-Hahn nicht vollständig an der Zirkulation beteiligt waren. Nach dem folgenden Schema sind zu den festgelegten Zeitpunkten Blutproben entnommen worden:

- bei AZP 1 erfolgte die Abnahme direkt aus der Konserve (vor Hämodilution),
- bei AZP 2 erfolgte die Abnahme 1 min nach Beginn der Zirkulation,
- bei AZP 3 erfolgte die Abnahme 5 min nach Beginn der Zirkulation,
- bei AZP 4 erfolgte die Abnahme 10 min nach Beginn der Zirkulation,
- bei AZP 5 erfolgte die Abnahme 20 min nach Beginn der Zirkulation,
- bei AZP 6 erfolgte die Abnahme 30 min nach Beginn der Zirkulation,
- bei AZP 7 erfolgte die Abnahme 60 min nach Beginn der Zirkulation,
- bei AZP 8 erfolgte die Abnahme 90 min nach Beginn der Zirkulation,

AZP	1	2	3	4	5	6	7	8	Bestimmung folg. Parameter
<b>Proben</b>									
<i>3ml-Citratmonovette</i> <b>a</b>		x				x	x	x	Heparinkonzentration,
<i>10ml-Citratmonovette</i> <b>b</b>	x		x		x	x	x	x	PMN-Elast., TAT, fr.-Hb, F-XII
<i>Kalium-EDTA-Monovette</i> <b>c</b>	x	x	x	x	x	x	x	x	Blutzellen, TCC,
<i>CTAD-Monovette</i> <b>d</b>	x	x	x	x	x	x	x	x	$\beta$ -Thromboglobulin,
<i>Bradykinin-Monovette</i> <b>e</b>	x	x	x	x			x	x	Bradykinin,

Tabelle 1: Schema AZP, Proben, Parameter

## 2.3. Probengewinnung und Vorbereitung

### 2.3.1. Probenvorbereitung

Zur Probengewinnung wurden verschiedene S-Monovetten® benutzt. Im Rahmen der Probenvorbereitung konnten einige schon gebrauchsfertig genutzt werden. Die neutralen S-Monovetten® sind mit speziellen Medien versehen worden.

**Proben a.)** dienen der Heparinkonzentrationsbestimmung und wurden mit **3 ml Citratmonovetten** (gebrauchsfertig) entnommen,

**Proben b.)** dienen im Rahmen der Plasmafaktorenbestimmung (PMN-Elastase, TAT, freies Hb, Faktor XII,) und wurden mittels **10 ml Citratmonovetten** (gebrauchsfertig) entnommen,

**Proben c.)** dienen der Blutzellenbestimmung, die mit Hilfe des Zellcounters SYSMEX K-1000 bestimmt wurden und anschließend der SC5b-9 (TCC) Bestimmung. Verwendet wurden **2,7 ml Kalium EDTA-Monovetten**. (gebrauchsfertig),

**Proben d.)** dienen der quantitativen Bestimmung des  $\beta$ -Thromboglobulins. Es sind 4,5 ml neutrale Monovetten mit 450  $\mu$ l C.T.A.D.- Medium aus einem C.T.A.D.-Vacutainer Firma BOEHRINGER MANNHEIM, Mannheim, D., Best.Nr.1004999 verwendet worden. bezeichnet als (**CTAD-Monovette**),

**Proben e.)** dienen der Bradykinin-Bestimmung. Es wurden 4.5 ml neutrale Monovetten mit 450  $\mu$ l des folgenden Inhibitorcocktails versetzt: [Aprotinin 10000 KIU/ml, 0,8 mg/ml SBTI, 4 mg/ml Polybrene, 10 mg/ml 1,10-Phenanthrolin, 20 mg/ml EDTA] bezeichnet als (**Bradykinin-Monovette**).

### 2.3.2. Probenverarbeitung und Probenaufbewahrung

Die Proben wurden nach den u.g. Anweisungen verarbeitet:

#### Zu Proben a)

- nach der Blutentnahme ins Eisbad stellen,
- zentrifugieren bei 4° C, 2000 g, 20 min

**Zu Proben b):**

- nach der Blutentnahme bis Zentrifugation bei Raumtemperatur stehen lassen,
- zentrifugieren bei RT (ca. 20°C), 2000 g, 20 min

**Zu Proben c):**

- nach der Blutentnahme wurden sofort die Blutzellenwerte durch den Zellcounter bestimmt,
- die Proben der AZP 2, 4 sind zu verwerfen,
- die restlichen Proben ins Eisbad stellen,
- zentrifugieren bei 4°C, 2000 g, 20 min

**Zu Proben d):**

- nach der Blutentnahme sofort (bis über den Flüssigkeitsspiegel) ins Eisbad stellen, die Proben sollten mind. 15 min bis max. 60 min im Eis gekühlt werden,
- zentrifugieren bei 4°C, 2000 g, 30 min,
- aus dem mittleren Teil der flüssigen Phase vorsichtig abpipettieren,

**Zu Proben e):**

- nach der Blutentnahme sofort ins Eisbad stellen,
- zentrifugieren bei 4°C, 2000 g, 30 min,
- zu 800 µl Plasma 3ml kalten Äthanol pipettieren,
- 15 Minuten ins Eisbad stellen und anschließend noch einmal zentrifugieren s.o.,

Nach dem Abzentrifugieren ist das aliquotierte Plasma aller Proben außer Nr. e) sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Aufarbeitung im Gefrierschrank bei mind. -20°C aufbewahrt worden.

**2.4. Entnahme von Biomaterial für die Rasterelektronenmikroskopie**

Nach Beendigung der 90-minütigen Rezirkulation erfolgte bei den Oxygenatoren der Versuchsserien 1, 3, 4, 9, 15 zusätzlich eine Entnahme von Mikrofasern zur Rasterelektronenmikroskopie (REM).

## **2.5. Fixierung und Entwässerung von Biomaterial für die Rasterelektronenmikroskopie**

Nach der 90-minütigen Rezirkulation erfolgte das Durchspülen des Oxygenator- und Schlauchsystems mit 10 Liter physiologischer Kochsalzlösung (0,9 %). Anschließend wurde der Oxygenator in der Mitte horizontal durchgesägt, um einige seiner Mikrofasern zu entnehmen.

Die Fixierung und Entwässerung der Mikrofasern wurde nach folgender Anleitung durchgeführt:

- Präparate, die mit Blut in Kontakt gekommen sind, müssen mit physiologischer Kochsalzlösung (0,9 %) gespült werden,
- zurechtschneiden der Präparate (max. 1 cm),
- Präparate in 2% Glutaraldehyd (GA)-PBS geben, Fixierungsdauer ca. 60 min, dabei mindestens einmal das Fixierungsgemisch erneuern,
- für 10 Minuten in PBS ohne Ca, Mg,
- in aufsteigende Alkoholreihe für je 10 min, ( 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 96%, absoluter Ethanol p.A.)
- Lagerung der Präparate bis zur Critical Point Trocknung in absolutem Ethanol.

Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden mittels dem Rasterelektronenmikroskop LEO 1450 VP der ELEKTRONENMIKROSKOP GmbH, Oberkochen, D., durchgeführt.

## **2.6. Bestimmung der Adhäsionsproteine**

Um die Adhäsion von Plasmaproteinen an den mit Blut in Kontakt kommenden Oberflächen nachzuweisen, wurden die Oxygenatoren der Versuchsserien 6, 7, 10, 12, 13 nach einem speziellen Verfahren s. Kap. 2.7 eluiert. Nach dem Aufkonzentrieren des Eluats, wurden die Proben elektrophoretisch getrennt (Gel-Elektrophorese) und folgende Proteine durch Proteinblotting mit Immundetektion (Western-Blotting) nachgewiesen:

Fibrinogen, ATIII, HMWK, CD 41 Thrombozytenrezeptor für Fibrinogen GP IIb/IIIa, C-1-Esterase Inhibitor, C-3 Komplement, HSP 70.

## **2.7. Elution der Adsorptionsproteine für Elektrophorese**

Die Elution wurde nach folgender Anleitung durchgeführt:

- durchspülen des Oxygenator- und Schlauchsystems mit 10 Liter physiologischer Kochsalzlösung, ( 0,9 % )
- durchspülen des Oxygenator- und Schlauchsystems mit 3 Liter 20 mmol/l EDTA in PBS, ( pH = 7,4)
- für 10 Minuten im geschlossenen System mit 500 ml 1 % Lithiumdodecylphosphat in PBS (pH = 7,4) eluieren, (Geschwindigkeit 3 l/min)
- sammeln des Eluats in einem Kunststoffbecher

## **2.8. Aufkonzentrierung des Eluats**

Konzentration des Eluats wurde nach folgender Anleitung durchgeführt:

- 10 Centriprep YM-10 Röhrchen, der MILLIPORE CORPORATION, USA., werden mit jeweils genau 10 ml Eluat gefüllt,
- anschließend 1 Stunde zentrifugieren, (20° C, Beschleunigung 5000xg),
- verteilen des konzentrierten Eluats auf zwei neue Centriprep YM-10 Röhrchen,
- nochmals zentrifugieren s.o. bis ein Endvolumen von etwa 1000µl erreicht ist, ggf. letzten Schritt wiederholen,
- Endvolumen in 10 Eppendorfgefäße a 100 µl aliquotieren.

Im Anschluss sind diese Proben sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Aufarbeitung im Gefrierschrank bei mind. -20°C aufbewahrt worden.

## **2.9. Die SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese**

SDS ist ein anionisches Detergens und überdeckt die Eigenladungen von Proteinen so effektiv, dass Micellen mit konstanter negativer Masseneinheit entstehen. Bei der Probenvorbereitung werden die Proben mit einem Überschuss an SDS auf 95° C erhitzt, und so die Tertiär- und Sekundärstrukturen durch Aufspalten der Wasserstoffbrücken und durch Streckung der Moleküle aufgelöst. Schwefelbrücken zwischen Cysteinen werden durch die Zugabe einer reduzierenden Thiolverbindung, z.B. Dithiothreitol, aufgespalten. Die mit SDS beladenen, gestreckten Aminosäureketten bilden Ellipsoide. Die Länge der Ellipsoide ist proportional zu den jeweiligen Molekulargewichten der Proteine. Wegen der hohen Auflösung, die mit der diskontinuierlichen Elektrophorese

erreicht werden kann, wird standardgemäß für Proteintrennungen ein von U.K. Laemmli eingeführtes SDS-haltiges, diskontinuierliches Tris-HCl/Tris-Glycin-Puffersystem eingesetzt. Bei der Elektrophorese im Polyacrylamidgel mit 0,1% SDS erhält man über bestimmte Bereiche eine lineare Beziehung zwischen dem Logarithmus der Molekulargewichte und den Wanderungstrecken der SDS-Polypeptid-Micellen. Mit Hilfe von Standards lassen sich die Molekulargewichte der Proteine ermitteln (28).

### **2.9.1. Vorteile der SDS-Elektrophorese**

Mit SDS gehen auch sehr hydrophobe und denaturierte Proteine in Lösung. Proteinaggregationen werden verhindert, weil die Oberflächen negativ geladen sind. Man erreicht schnelle Trennungen, weil die SDS-Micellen hohe Ladungen tragen. Alle Proteine wandern in eine Richtung. Die Trennung erfolgt nach dem Molekulargewicht. Man erhält eine Bande für ein Protein, da Ladungsheterogenitäten nicht angezeigt werden (28).

### **2.9.2. Die Probenvorbereitung**

#### ***Proben des Eluats***

Die in Kapitel 2.6. gewonnenen Proben sind in verschiedenen Verhältnissen (Bsp. 1:5, 1:10, 1:20, 1:50) mit reduzierenden Probenpuffer verdünnt worden. (Verdünnungen bei jedem Western-Blot separat angegeben)

Anschließend sind diese 5 Minuten bei 95° C im Thermoblock Unitek HB 130, SEL Laboratory Products, GB. erhitzt worden. Durch die Zugabe von reduzierenden Thiolverbindungen werden Schwefelbrücken zwischen Cysteinen gespalten. Die gleichzeitige Erwärmung (SDS im Überschuss) auf 95° C bewirkt die Auflösung der Tertiär- und Sekundärstrukturen. Somit liegen SDS-beladene, gestreckte Aminosäureketten vor (28).

#### ***Proben HMW-Standard (zur Molekulargewichtsermittlung)***

Als Standard ist der SDS-PAGE Molecular Weight Standard, High Range, der Firma BIO-RAD Laboratories, Hercules, California, USA., verwendet worden.

## Protein Molecular Weights (daltons)

Protein	Molecular Weight	High Range	Low Range	Broad Range
Myosin	200,000	X		X
β-galactosidase	116,250	X		X
Phosphorylase b	97,400	X	X	X
Serum albumin	66,200	X	X	X
Ovalbumin	45,000	X	X	X
Carbonic anhydrase	31,000		X	X
Trypsin inhibitor	21,500		X	X
Lysozyme	14,400		X	X
Aprotinin	6,500			X

Tabelle 2: Molekular Weight Standard, High Range

Im Anschluss wurden diese Proben sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Weiterverarbeitung im Gefrierschrank bei mind. -20°C aufbewahrt.

### 2.9.3. Die Durchführung Elektrophorese

Die Elektrophorese ist mit der Mini-Protean® II Elektrophoresezelle und nach der Bedienungsanweisung der Firma BIO-RAD Laboratories, Hercules, California, USA durchgeführt worden.

Vor der Elektrophorese sind ein 8 % Trenngel und ein 4% Sammelgel hergestellt worden. Die Abmessungen der Gele betragen 8 x 7 cm.

-Trenngel 8% nach Page (1mm);

[7,2 ml H<sub>2</sub>O, 3,8 ml Gelpuffer, 4,0 ml PAA (30 % bei 23-25°C), 50µl TEMED, 50µl APS (10 %)]

- Sammelgel 4% nach Page (1mm);

[9,2 ml H<sub>2</sub>O, 3,8 ml Gelpuffer, 2 ml PAA (30 % bei 23-25°C), 50µl TEMED, 125µl APS (10 %)]

Initiator der Kopolymerisation von Acrylamid und Bisacrylamid sind TEMED (Tetramethylethylendiamin) und Amoniumpersulfat (APS). Die Verwendung sog. Spacer (Polyvinylchlorid) ermöglicht die Beeinflussung der Dicke des Gels. Es wurden Spacer der Stärke 1mm verwendet. Durch das Einbringen von Kämmen (Teflon) im Bereich des Sammelgels sind sog. Taschen (Anzahl 10) für die Applikation der zu untersuchenden Proben geschaffen worden. Das Trenngel erreicht innerhalb von 15-20

Minuten, das Sammelgel innerhalb von 8-10 Minuten nach Zugabe der o.g. Initiatoren den Gelzustand. Das Gel hat anschließend mindestens für die Dauer von zwei Stunden zu polymerisieren um eine maximale Reproduzierbarkeit der Porengröße des Gels sicherstellen zu können. Nach Herstellung des Trenngels 8% und Sammelgels 4% wurden pro Tasche (im Sammelgel gelegen) 30 µl der Proben (siehe Kapitel 2.7.2), oder als Vergleichswert (1 Tasche pro Gel) 25 µl des HMW-Standard appliziert. In den ersten 10 Minuten der Elektrophorese ist eine Spannung von 70 Volt angelegt und anschließend auf 200 Volt erhöht worden. Die Gesamtlaufzeit betrug 40 Minuten.

### **2.10. Das Western-Blotting**

Die Bezeichnung Western-Blotting geht auf den Namen des Erfinders der Blotting-Technik namens Southern zurück, der die Methode 1971 für die Auftrennung von DNA-Fragmenten und nachfolgender Hybridisierung als Southern-Blotting eingeführt hat. In Anlehnung an seinen Namen wurde das Proteinblotting mit Immundetektion Western-Blotting genannt (30).

Die nach der Elektrophorese im Gel aufgetrennten Proteine werden über Elektrotransfer auf einen Träger (Nitrozellulose) übertragen und für die nachfolgende Immundetektion immobilisiert. Im Anschluss wird ein Anti-Immunglobulin gegen den Primärantikörper eingesetzt, der mit einem Amplifikator markiert ist. Dieser Sekundärantikörper, der aus einer anderen Tierspezies gewonnen wird, bindet an alle Primärantikörper. Als Amplifikator ist ein optisches enzymatisches Detektionssystem benutzt worden. Es basiert auf der Umwandlung von Farbsubstraten, gekoppelt mit der Änderung der Adsorptionswellenlänge. Die wichtigsten Substrate für gefärbte Präzipitate sind Mischungen aus 5-Brom-4chlor-indolydylphosphat (BCIP) und Nitroblau-Tetrazoliumsalz (NBT), die nach Phosphatabspaltung (alkalische Phosphatase) in einer gekoppelten Redoxreaktion zu tief blauviolett gefärbten Präzipitaten Indigo/Diazoniumsalz führen (29; 30).

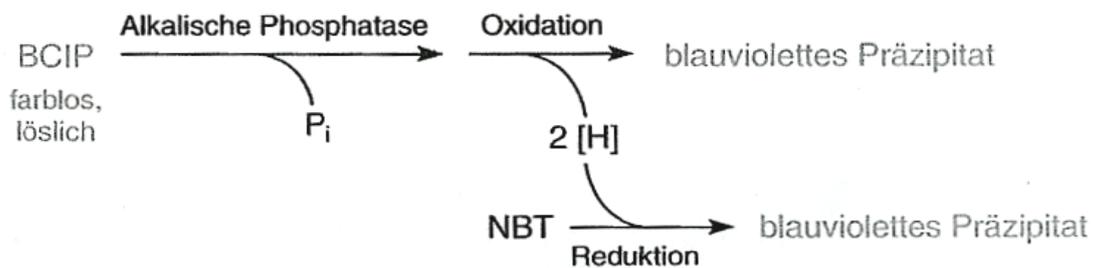


Abb. 10: Reaktionsgleichung Redoxreaktion

### 2.10.1. Die Durchführung des Western-Blotting

Das Gel, die Filterpapiere und die Nitrozellulosemembran (NZM mit Porengröße  $0,45\mu\text{m}$ ) sind im Transferpuffer für 15 Minuten inkubiert worden. Dann erfolgte der sog. Sandwich-Aufbau. Die erste und unterste Schicht besteht aus Filterpapier (Whatman), die zweite Schicht aus einer NZM, die dritte Schicht aus dem Gel und die oberste Schicht wieder aus Filterpapier (Whatman). Verwendung fand die Trans-Blot® S-D Semi-Dry-Elektrophoretic Transfer Cell, der Firma BIO-RAD Laboratories, Hercules, California, USA. Die Laufzeit des Blots betrug 30 Minuten bei einer Spannung von 15 Volt.

Um die HMW-Standards sichtbar zu machen wurden die Blots mit Fast Green (0,1% Fast Green in 1% Essigsäure) für 5 min eingefärbt, danach mit horizontalen Bleistiftlinien gekennzeichnet, mit  $\text{H}_2\text{O}$  bidest. mehrmals gespült und anschließend mit 0,2 M NaOH wieder entfärbt worden.

Im Anschluss folgte die Blockierung mit 3% Trockenmilch (2 Stunden bei RT), eine Waschung in TTBS und drei Waschungen in TBS.

Jeder Blot wurde in 20 ml TBS gewaschen, mit AK 1 (Primärantikörper) bestückt und für 2 Stunden bei RT inkubiert. Es folgten 5 Waschungen in TBS (je 2min). Danach wurde jeder Blot in 20 ml TBS eingebracht und mit AK 2 (Sekundärantikörper inkl. Marker) bestückt und für 2 Stunden bei RT inkubiert. Es folgten 5 Waschungen in TBS (je 2min).

Anschließend wurde jeder Blot in Substratlösung aus BCIP/NBT (präzipitierend) bei RT im Dunkeln inkubiert. Nach ausreichender Färbung ist die Reaktion durch mehrmaliges Waschen mit  $\text{H}_2\text{O}$  bidest. gestoppt worden. Anschließend erfolgten die Trocknung, das Einscannen und die dunkle Lagerung der Blots.

## 2.10.2. Antikörper

### Primär Antikörper

Goat	Anti-Human-Fibrinogen
Goat	Anti-Human-C-3-Komplement
Goat	Anti-Human-C-1-Esterase-Inhibitor
Mouse	Anti-Human-CD 41
Rabbit	Anti-Human-AT III
Mouse	Anti-HSP 70
Goat	Anti-Human HMWK

### Sekundär Antikörper

Donkey	Anti-Sheep-IgG-AP
Donkey	Anti-Sheep-IgG-AP
Donkey	Anti-Sheep-IgG-AP
Goat	Anti-Mouse-IgG-AP
Goat	Anti-Rabbit-IgG-AP
Goat	Anti-Mouse-IgG-AP
Donkey	Anti-Sheep-IgG-AP

### Primär-Antikörper

Goat-	Anti-Human-Fibrinogen	Fa. SIGMA, St.Louis, USA.
Goat-	Anti-Human-C-3-Komplement	Fa. ICN-BIOMEDICALS, Irvine, Cal.,USA.
Goat-	Anti-Human-C-1-Esterase-Inhib.	Fa. SIGMA, St Louis, USA.
Mouse-	Anti-Human-CD 41	Fa. BECKMANN-COULTER / IMMUNOTECH, Krefeld, D.
Rabbit-	Anti-Human-AT III	Fa. SIGMA, St.Louis, USA.
Mouse-	Anti-HSP 70	Fa. DIANOVA GMBH, Hamburg, D.
Goat-	Anti-Human HMWK	Fa. ICN-BIOMEDICALS, Irvine, Cal.,USA.

### Sekundär-Antikörper

Goat-	Anti-Mouse-IgG-AP	Fa. BECKMANN-COULTER / IMMUNOTECH, Krefeld, D.
Donkey-	Anti-Sheep-IgG-AP	Fa. SIGMA, St.Louis, USA.
Goat-	Anti-Rabbit-IgG-AP	Fa. SIGMA, St.Louis, USA

## Molekulargewichte der Primär-Antikörper

Spezies	Primär AK	Verdünnung	intaktes Protein red. SDS-PAGE	
			Banden (kDa)	Banden (kDa)
Goat-	Anti-Human-C-3-Kompl.	1/1000	185	110/75
Goat-	Anti-Human-C-1-Est.-Inh.	1/1000	150	150
Mouse-	Anti-Human-CD 41	1/1000	136,5	114/22,5
Rabbit-	Anti-Human-AT III	1/1000	150	49-58
Mouse-	Anti-HSP 70	1/3333	70	70
Goat-	Anti-Human HMWK	1/1000	120	120
Goat-	Anti-Human-Fibrinogen	1/1000	340 (dimer), UE 67/58/47	67/58/47

### 3. Labormethoden

#### 3.1. Das Hämatologie-System Sysmex® K-1000

Die Werte folgender Parameter wurden mit dem Hämatologie-System Sysmex® K-1000, der Sysmex GmbH, Norderstedt, D., ermittelt.

- Leukozyten (WBC), nach dem Widerstandsmessprinzip
  - Thrombozyten (PLT), nach dem Widerstandsmessprinzip
  - Hämoglobin (HGB), nach der Cyanmethämoglobinmethode
  - Hämatokrit (HCT), nach dem Prinzip der kumulativen Pulshöhensummierung
- Als Probevolumen waren 0,1 ml EDTA- Vollblut nötig.

#### 3.2. Heparin

Zur Bestimmung von Heparin im Plasma wurde Coatest®-Heparin der Firma CHROMOGENIX-INSTRUMENTATION LABORATORY SPA, Mailand, Italien, verwendet und gemäß der Bedienungsanleitung verfahren.

##### Testprinzip:

1. Heparin + AT (Überschuss) -----> [Heparin · AT]
2. [Heparin · AT] + FXa (Überschuss) -----> [Heparin · AT· FXa] + FXa (Rest)
3. S-2222 -----<sup>FXa</sup>-----> Peptid + pNA

Heparin wird als Komplex mit dem in der Probe vorhandenen Antithrombin bestimmt. Die Bildung dieses Komplexes ist abhängig von der Verfügbarkeit einer ausreichenden Menge an Antithrombin (AT), weswegen dem Testplasma gereinigtes AT zugefügt wird. Der im Überschuss zugegebene FXa wird proportional zum vorhandenen [Heparin · AT] Komplex neutralisiert. Der restliche FXa spaltet vom chromogenen Substrat S-2222 die chromophore Gruppe pNA ab. Die bei 405 nm gemessene pNA Freisetzung ist umgekehrt proportional zum Heparin Gehalt der Probe.

### **3.3. PMN-Elastase**

Die Bestimmung der PMN-Elastase erfolgte mittels dem heterogenen Enzymimmunoassay (2 h Version) der Firma MERCK, Darmstadt, D. gemäß der Gebrauchsanleitung.

#### Testprinzip:

Der heterogene Enzymimmunoassay dient der spezifischen Bestimmung der PMN-Elastase aus polymorphnucleären Leukozyten im Komplex mit PMN Elastase- $\alpha_1$  Proteinaseinhibitor (PI). Im ersten Inkubationsschritt wird der in der Probe enthaltene PMN Elastase- $\alpha_1$  PI- Komplex mit seinem PMN Elastase-Teil durch an die Röhrchenwand gekoppelte Antikörper gebunden. Bei der zweiten Inkubation werden mit alkalischer Phosphatase (AP) markierte Antikörper zugesetzt, die mit dem  $\alpha_1$  PI-Teil des Komplexes reagieren. Nach dem Auswaschen der überschüssigen AP-markierten Antikörper wird die enzymatische Aktivität der über Immunkomplexe gebundenen AP photometrisch bestimmt. Die Menge an gebildetem Farbstoff ist der Konzentration an PMN Elastase- $\alpha_1$ -PI direkt proportional.

### **3.4. TAT**

Die Bestimmung von Human-Thrombin / Antithrombin III-Komplex wurde mit dem Enzymimmunoassay Enzygnost<sup>®</sup> TAT micro der DADE BEHRING GmbH, Marburg, D. gemäß der Gebrauchsanleitung durchgeführt.

#### Testprinzip:

Enzygnost TAT micro ist ein Enzymimmunoassay nach dem Sandwich-Prinzip zur in vitro-Bestimmung des Human-Thrombin/Antithrombin-III-Komplexes (TAT). Während der ersten Inkubation bindet sich das in der Probe vorhandene TAT an die Antikörper gegen Thrombin, die an der Oberfläche der Mikrotitrationsplatte fixiert sind. Nach Auswaschen werden in einer 2. Reaktion Peroxidase-konjugierte Antikörper gegen Human-AT III an die freien AT III-Determinanten gebunden. Die überschüssigen Enzym-konjugierten Antikörper werden ausgewaschen. Anschließend wird die gebundene Enzymaktivität bestimmt. Die enzymatische Umsetzung von Wasserstoffperoxid und Chromogen wird durch Zusatz von verdünnter Schwefelsäure

unterbrochen. Die der Konzentration von TAT proportionale Farbtintensität wird photometrisch bestimmt.

### **3.5. $\beta$ -Thromboglobulin**

Die quantitative Bestimmung von  $\beta$ -Thromboglobulin erfolgte mittels dem Asserachrom<sup>®</sup>  $\beta$ -TG Test der Firma BOEHRINGER, Mannheim, D. Es wurde gemäß der Gebrauchsanleitung verfahren.

#### Testprinzip:

##### Sandwich-Assay

Bei der 1. Immunreaktion bindet der auf den Mikrotitrationsstreifen fixierte Antikörper gegen  $\beta$ -Thromboglobulin das  $\beta$ -TG der Probe.  $\beta$ -TG besitzt mehrere antigene Determinanten. Daher werden in der anschließenden 2. Immunreaktion mit POD-markierten  $\beta$ -TG Antikörpern Sandwich-Komplexe gebildet. Die Menge der Sandwich-Komplexe stellt ein Maß für den  $\beta$ -TG-Gehalt der Probe dar. Im nachfolgenden Waschschrift wird das nicht gebundene POD-Konjugat entfernt. Nach Zusatz von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und Chromogen (o-Phenylendiamin) wird die gebundene POD-Aktivität photometrisch bestimmt.

### **3.6. SC5b-9 Komplex**

Die Bestimmung des SC5b-9 Komplexes wurde mit dem ELISA-Kit SC5b-9 Komplex der INNOGENTICS GMBH, Heiden, D. Es wurde gemäß der Gebrauchsanleitung verfahren.

#### Testprinzip:

##### Sandwich-Technik

Im ersten Schritt reagieren SC5b-9 Komplexe aus der Probe mit dem monoklonalen Anti-human SC5b-9 Antikörper, der in der Mikrotiterplatte beschichtet ist und bilden gebundene Komplexe. Anschließend werden nicht gebundene Komponenten ausgewaschen. Im dritten Schritt reagieren SC5b-9 spezifische Antikörper aus dem Peroxidase-beladenen Konjugat mit den an die Mikrotiterplatte gebundenen Komplexen. Im Anschluss werden nicht gebundene Komponenten ausgewaschen. Im 5. Schritt erfolgt die Zugabe von Substrat. Es kommt zur enzymatischen Spaltung unter

Bildung eines Farbwechsels. Durch die Stopplösung wird die Reaktion beendet. Die Farbintensität wird photometrisch bestimmt.

### **3.7. freies Hämoglobin im Serum**

Die Bestimmung des freien Hämoglobin im Serum erfolgte mittels MPR 3 Hämoglobin-Test der Firma BOEHRINGER, Mannheim, D.. Es wurde gemäß der Gebrauchsanleitung verfahren.

#### Testprinzip:

Serum-Hämoglobin wird als Hämoglobin-Cyanid gemessen. Die Messung erfolgt bei einem Adsorptionsmaximum von 546 nm, die Messung des Leerwertes bei 691 nm.

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

### **3.8. F -XII**

Für die Bestimmung des F XII wurde der Elisa F XII-EIA 12-0003R1 der Firma AFFINITY BIOLOGICALS, Hamilton, Kanada, verwendet.

#### Testprinzip:

F XII kann im Plasma durch einen Sandwich-Immunoassay gemessen werden. Während der ersten Inkubation bindet sich der in der Probe vorhandene F XII an die Antikörper gegen F XII, die an der Oberfläche der Mikrotiterplatte fixiert sind. Nach Auswaschen der ungebundenen Proteine reagieren in einer 2. Reaktion Peroxidase-konjugierte Antikörper gegen Human-F XII mit den gebundenen Komplexen an der Mikrotiterplatte. Die überschüssigen Enzym-konjugierten Antikörper werden ausgewaschen. Nach der Zugabe von Substrat wird die gebundene Enzymaktivität photometrisch bestimmt.

Die Farbintensität wurde bei einer Wellenlänge von 490 nm gemessen.

#### 4. Mathematische und statistische Methoden

Die Berechnung des Verdünnungsfaktors F diente dem Vergleich der Abnahmen 2-8 zur Abnahme 1 (Ausgangswert).

$$F = \frac{\text{Maschinenfüllvolumen}}{\text{Blutkonserve in ml}}$$

Die anschließende statistische Auswertung erfolgte mit der Software Exel, Microsoft, USA. und Slide & Write, ADVANCED GRAPHICS SOFTWARE INC, Carlsbad, USA. Die Berechnung erfolgte mit den arithmetischen Mittelwerten (x) und den Standardabweichungen (s) für jeden AZP. Die Ausgangswerte des Blutes aus den Konserven sind entsprechend als 100 % gesetzt worden. Alle weiteren Abnahmen (AZP 2-8) wurden zu diesem Ausgangswert in Relation gesetzt und durch Balkengraphiken dargestellt.

Die Mittelwerte und Standardabweichungen beider Gruppen wurden zu den einzelnen AZP mittels der einfaktoriellen Varianzanalyse verglichen.

Falls kein Signifikanzniveau angegeben ist, ist ein Unterschied dann als signifikant anzusehen, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit  $p < 0,05$  beträgt.

## IV. Ergebnisse

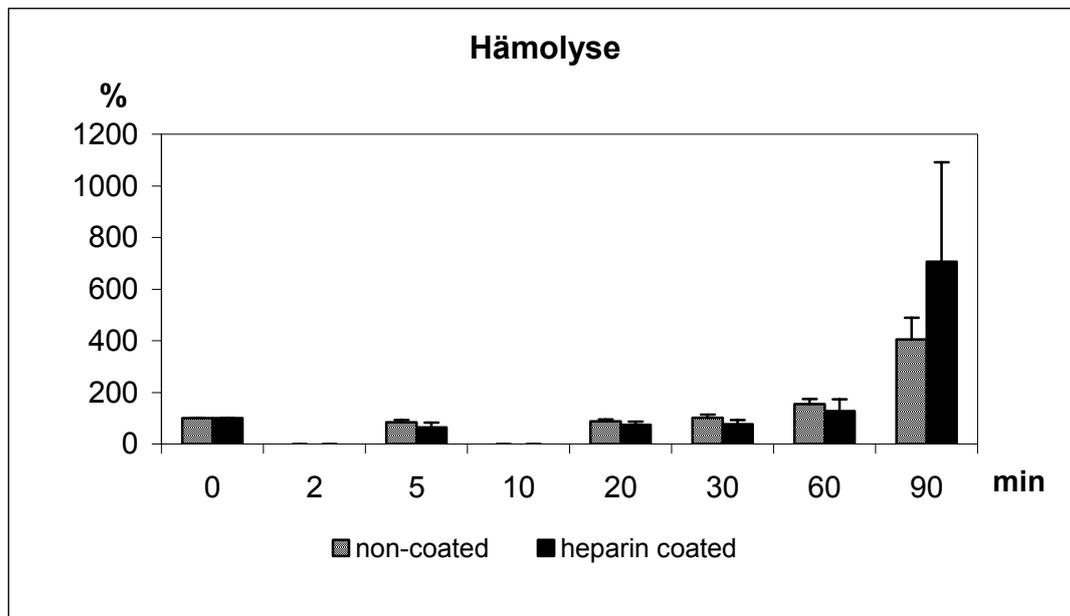
### 1. Lösliche Aktivierungsmarker

#### 1.1. Hämolyse

Die Normwerte im humanen Plasma liegen beim Erwachsenen zwischen 12-18 g/dl (47).

Die Ausgangswerte des Hb's sind bei der NC-Gruppe 26,7 g/dl und bei der HC-Gruppe 29,1 g/dl. Ab der 30. Minute und vor allem ab der 60. Minute ist ein Anstieg in beiden Gruppen deutlich sichtbar. Im Vergleich zu den Ausgangswerten sind in der 60. Minute um 50% höhere Werte bei der NC-Gruppe und um 28% höhere Werte bei der HC-Gruppe gemessen worden. Als Endwerte sind in der NC-Gruppe 108,9 g/dl (4-fache des Ausgangswertes) und in der HC-Gruppe 171,2 g/dl (5,9-fache des Ausgangswertes) gemessen worden.

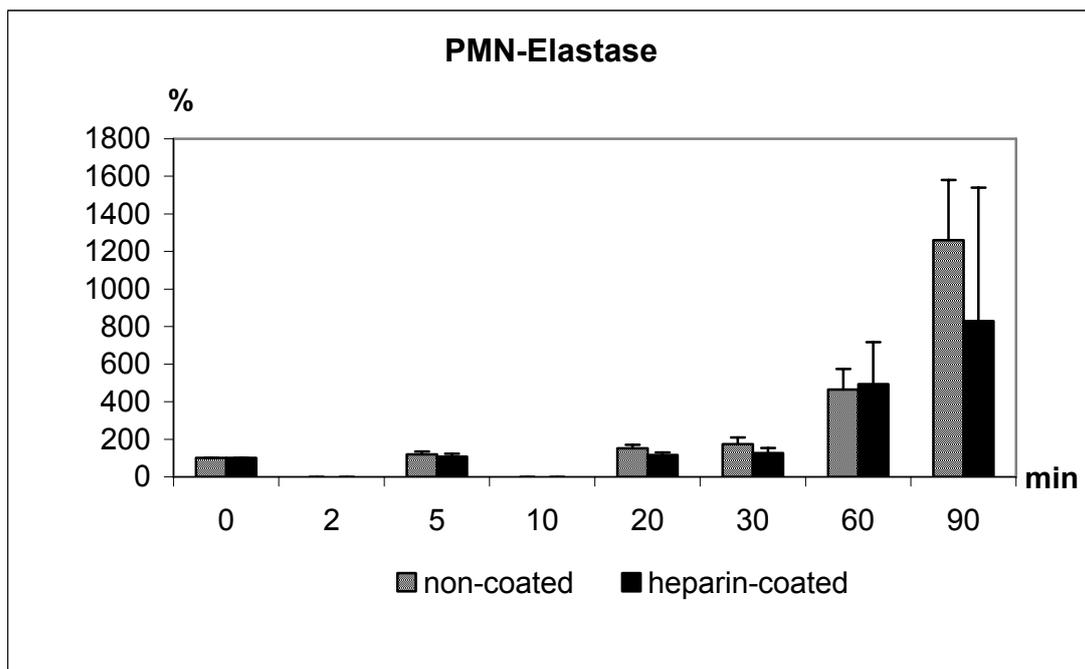
Der statistische Vergleich ergibt keinen signifikanten Unterschied.



Graphik 1: Hämolyse

## 1.2. PMN-Elastase

Bei beiden Gruppen ist eine Konzentrationserhöhung über den gesamten Versuchszeitraum zu beobachten. In der NC-Gruppe ist bis zur 30. Minute ein Anstieg um 74% und in der HC-Gruppe ein Anstieg um 26% des Ausgangswertes zu erkennen. Zwischen 30. und 60. Minute ist bei beiden Gruppen ein sprunghafter Anstieg (2-fache) zu verzeichnen. Im prozentualen Vergleich ist in der HC-Gruppe nach 90 Minuten ein um 1/3 geringer Wert an PMN-Elastase als in der NC-Gruppe zu beobachten. Obwohl deutliche Unterschiede zwischen den beiden Gruppen sichtbar sind, kann kein statistisch relevanter Unterschied ermittelt werden.



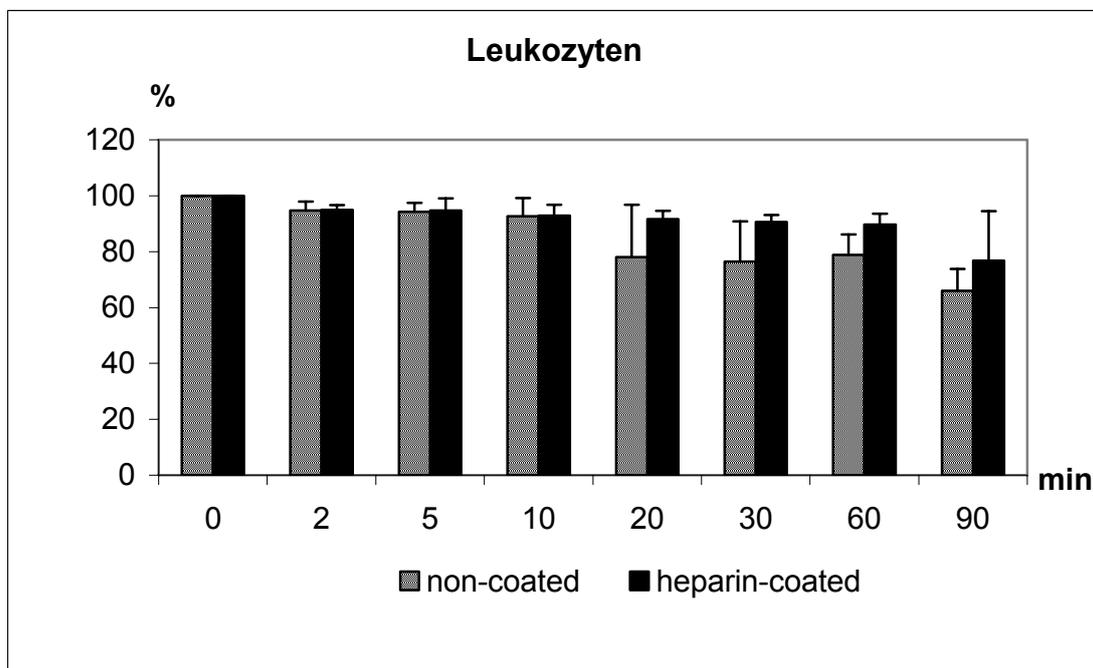
Graphik 2: PMN-Elastase

### 1.3. Leukozyten

Die Zahl der weißen Blutzellen beträgt normalerweise 4800-10000 pro  $\mu\text{l}$  Blut (52).

Zu Beginn liegen in der NC-Gruppe die Leukozytenanzahlen bei 4980/ $\mu\text{l}$  und bei der HC-Gruppe bei 6420/ $\mu\text{l}$ . Nach 20 Minuten ist in der NC-Gruppe ein Abfall von 22% und nach 90 Minuten ein Abfall von 44% im Vergleich zum Ausgangswert zu verzeichnen. In der HC-Gruppe ist bis zur 20. Minute ein Abfall von 8% und bis zur 90. Minute ein Abfall von 23% im Vergleich zum Ausgangswert sichtbar. Die Werte für die HC-Gruppe sind stets höher als die der NC-Gruppe, wobei sich die Werte ab der 20. Minute um mindestens 10% unterscheiden. Die Endwerte der NC-Gruppe liegen bei 3300/ $\mu\text{l}$  und bei der HC-Gruppe bei 5040/ $\mu\text{l}$ .

Obwohl sich eine deutliche Differenz zwischen beiden Gruppen zeigt, kann im statistischen Vergleich kein signifikanter Unterschied ermittelt werden.

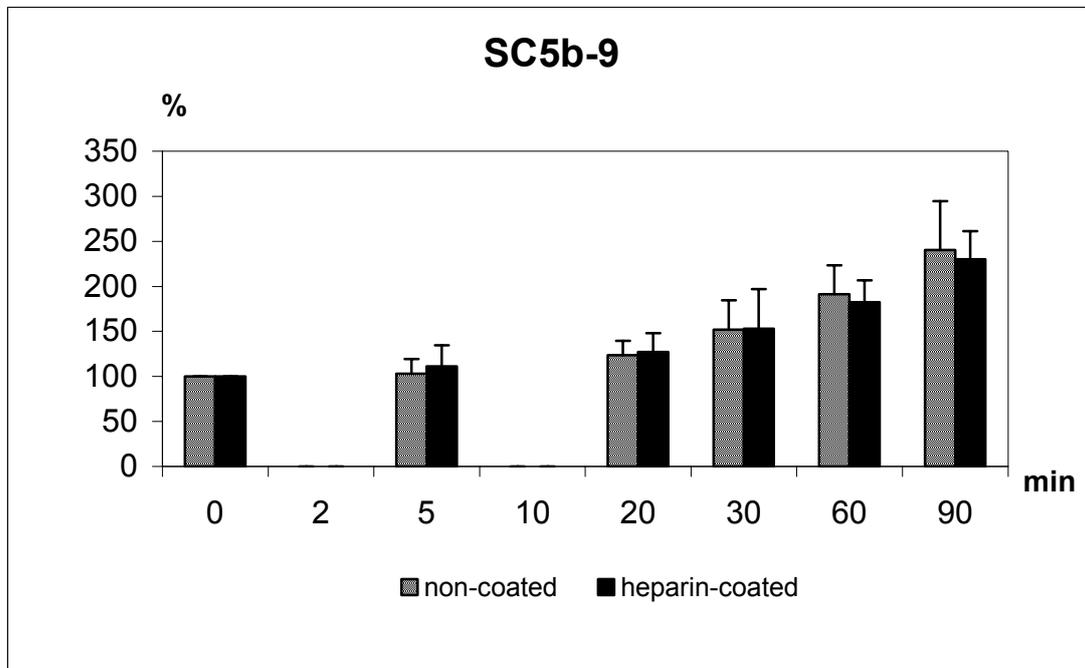


Graphik 3: Leukozyten

#### 1.4. SC5b-9

In beiden Gruppen ist eine Konzentrationserhöhung über den gesamten Versuchszeitraum zu beobachten. Nach 20 Minuten ist eine Erhöhung um 24% bei der NC-Gruppe bzw. um 27% in der HC-Gruppe gegenüber ihren Ausgangswerten zu erkennen. Die Werte nach 90 Minuten belaufen sich bei der NC-Gruppe auf das 2,4-fache und bei der HC-Gruppe auf das 2,3-fache des Ausgangswertes.

Der statistische Vergleich ergibt keinen signifikanten Unterschied.

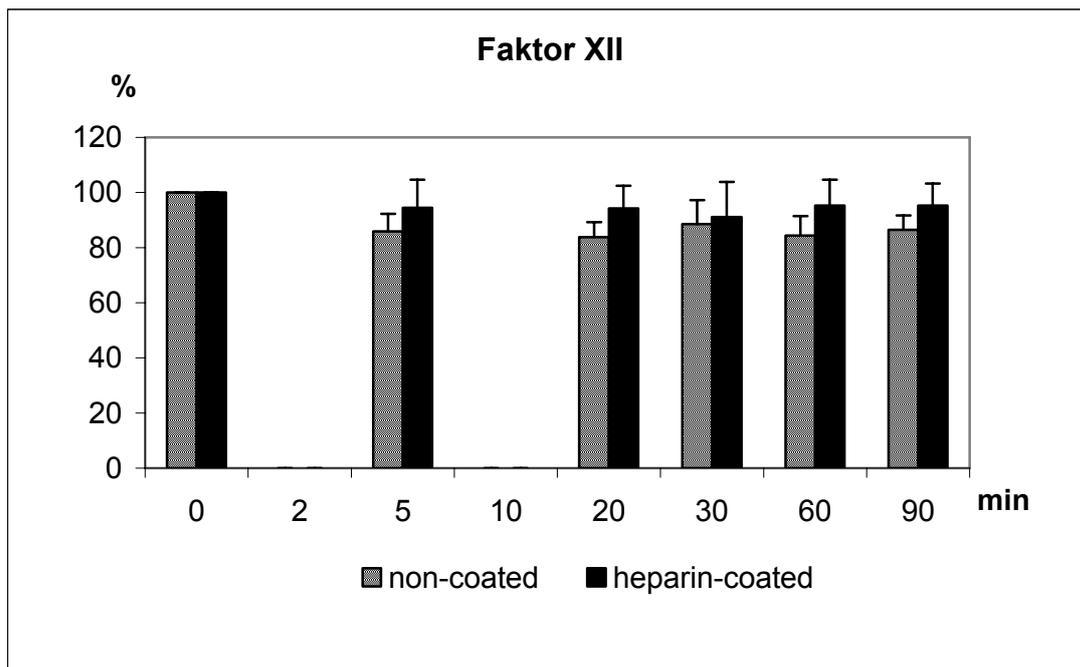


Graphik 4: SC5b-9

## 1.5. F XII

Die Werte der NC-Gruppe sinken bis zur 5. Minute um 14% und bei der HC-Gruppe um 5% im Vergleich zu ihren Ausgangswerten. Die NC-Gruppe erreicht den niedrigsten Wert bereits nach 20 Minuten und die HC-Gruppe erst nach 30 Minuten. Anschließend steigen sowohl die Werte der HC-Gruppe als auch die der NC-Gruppe um 4% an. Jedoch fallen anschließend die Werte der NC-Gruppe wieder um 4% ab. Die Werte der HC-Gruppe liegen stets höher als diejenigen der NC-Gruppe.

Im statistischen Vergleich kann kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen festgestellt werden, obwohl deutliche Unterschiede zwischen beiden Gruppen sichtbar sind.

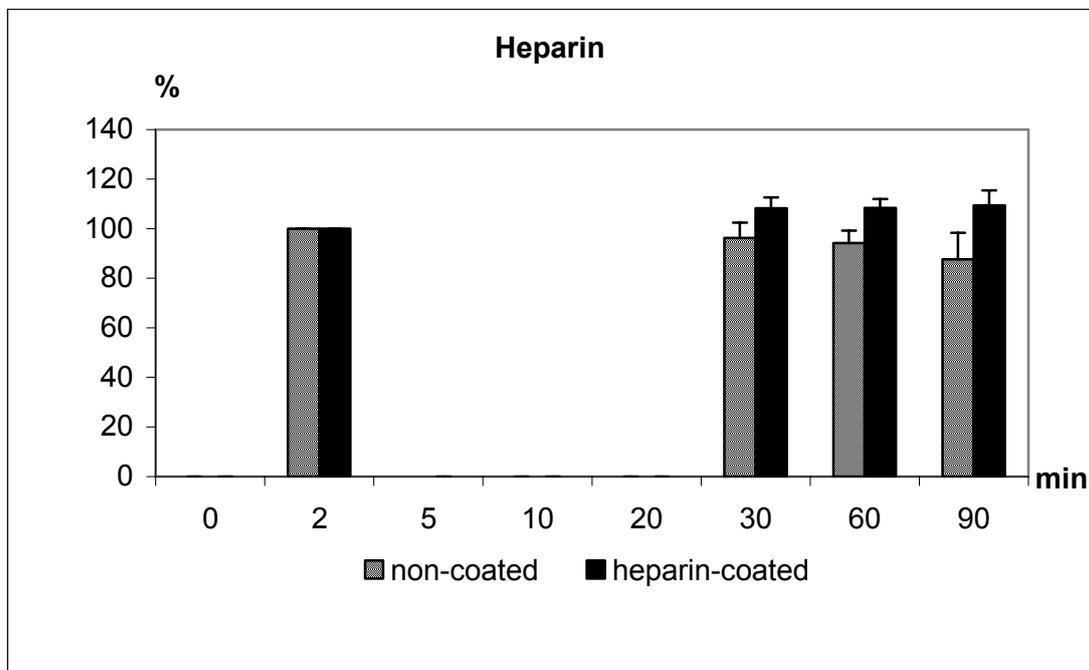


Graphik 5: F XII

## 1.6. Heparin

Bei der NC-Gruppe ist ein kontinuierlicher Abfall der Werte über den gesamten Versuchszeitraum zu beobachten. Er beläuft sich nach 90 Minuten auf 12 % im Vergleich zum Ausgangswert. Dagegen ist in der HC-Gruppe ein kontinuierlicher Anstieg der Werte zu verzeichnen. Er beläuft sich auf 9% nach 90 Minuten.

Obwohl sich eine deutliche Differenz zwischen beiden Gruppen zeigt, kann im statistischen Vergleich kein signifikanter Unterschied ermittelt werden.



Graphik 6: Heparin

## 1.7. Thrombozyten

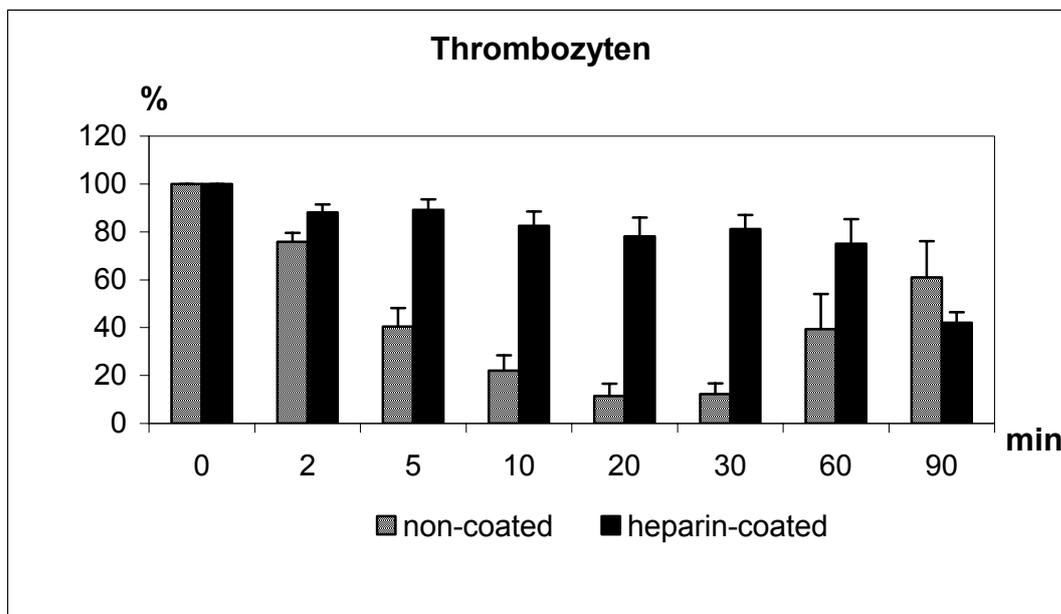
Die Normwerte beim Erwachsenen liegen zwischen 150000-300000 Blutplättchen/ $\mu\text{l}$  Blut (52).

Die NC-Gruppe zeigt schon kurz nach Beginn der Zirkulation einen deutlichen Abfall der Thrombozyten. Der Ausgangswert beträgt  $240 \times 10^3$  Thrombozyten/ $\mu\text{l}$  Blut. Nach 5 Minuten haben sich die Thrombozyten um 59% verringert und bis zur 20. Minute fallen sie weiter auf 11% des Ausgangswertes. Nach der 20. Minute und bis zum Ende des Versuchs ist ein Anstieg auf 61 % des Ausgangswertes zu verzeichnen.

Die Thrombozyten der HC-Gruppe fallen vom Ausgangswert  $243 \times 10^3/\mu\text{l}$  Blut kontinuierlich bis zur 60. Minute ab und erst danach ist ein sprunghafter Abfall um 33% auf den Endwert von  $197 \times 10^3/\mu\text{l}$  zu verzeichnen.

Im statistischen Vergleich ist ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen festzustellen. (für AZP 3,4,6 und AZP 7 [ $p < 0,01$ ])

Beim Einsatz von heparin-beschichteten Oxygenatoren ist ein deutlich geringerer Abfall der Thrombozytenzahlen vor allem bis zur 60. Minute festzuhalten.



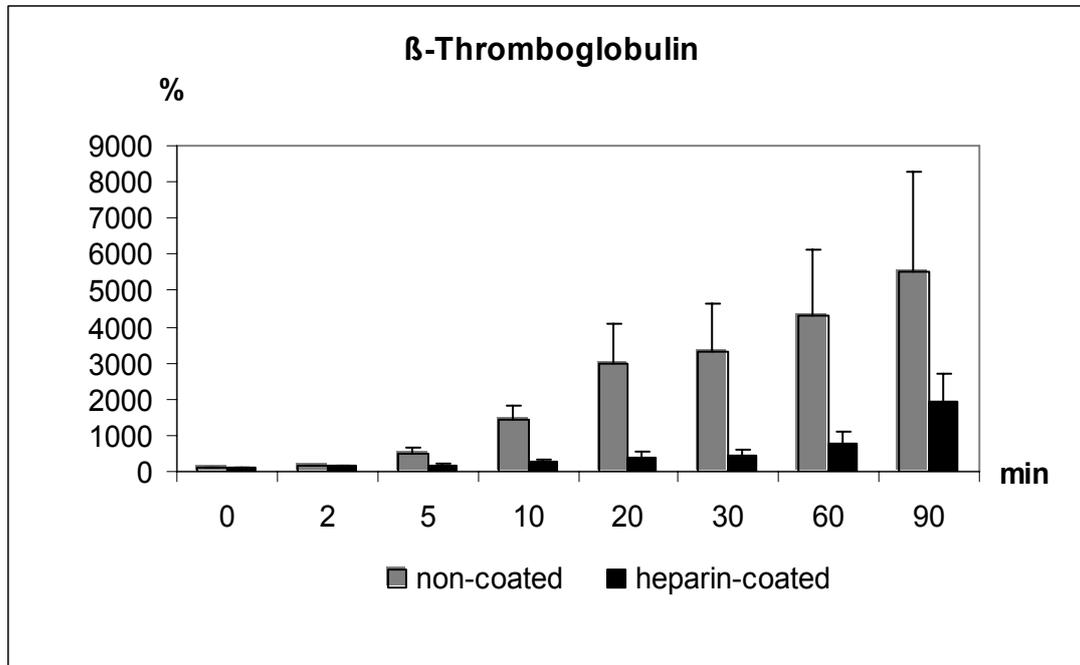
Graphik 7: Thrombozyten

## 1.8. $\beta$ -Thromboglobulin

Die Werte der NC-Gruppe steigen vom Ausgangswert 129,1 IU/ml um das 44-fache auf 5697,9 IU/ml bzw. die Werte der HC-Gruppe vom Ausgangswert 128,194 IU/ml um das 15-fache auf 1934,9 IU/ml, im Vergleich zu ihren Ausgangskonzentrationen. In beiden Gruppen ist eine Konzentrationserhöhung über den gesamten Versuchszeitraum zu beobachten. Die Werte der NC-Gruppe liegen vor allem ab der 5. Minute deutlich über denen der HC-Gruppe. Besonders auffällig ist der plötzliche Anstieg der Werte beider Gruppen zwischen 2. und 5. Minute. So steigen die Konzentrationen der zweiten Minute bei der NC-Gruppe um das 3,6-fache und in der HC-Gruppe um 26%.

Der statistische Vergleich beider Gruppen ergibt einen signifikanten Unterschied. (für AZP 3-8 [ $p < 0,01$ ])

Bei der Verwendung von heparin-beschichteten Oxygenatoren wird deutlich weniger  $\beta$ -Thromboglobulin freigesetzt als unter Verwendung von unbeschichteten Oxygenatoren.



Graphik 8:  $\beta$ -Thromboglobulin

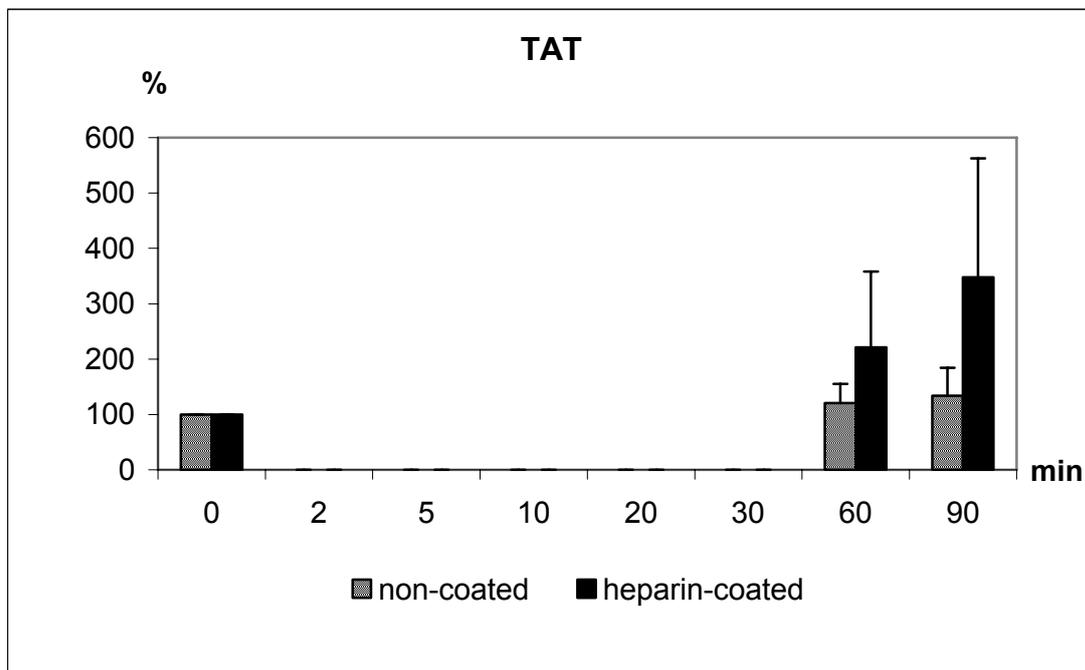
## 1.9. TAT

Der Referenzbereich der normalen Plasmakonzentration liegt zwischen 1 und 4,1  $\mu\text{g/l}$ .

Die TAT-Werte steigen von 4,3  $\mu\text{g/l}$  in der NC-Gruppe bzw. 5,5  $\mu\text{g/l}$  in der HC-Gruppe auf Maximalwerte nach 90 Minuten von 5,5  $\mu\text{g/l}$  in der NC-Gruppe und 24,4  $\mu\text{g/l}$  in der HC-Gruppe. Somit ist ein Anstieg in der NC-Gruppe um 34 % und in der HC-Gruppe um das 4,4-fache zu verzeichnen. Nach 90 Minuten sind die Werte der HC-Gruppe im Vergleich zur NC-Gruppe um das 2,6-fache erhöht.

Der statistische Vergleich beider Gruppen ergibt einen signifikanten Unterschied. (für AZP 7 [ $p < 0,05$ ] und für AZP 8 [ $p < 0,01$ ])

Bei der Verwendung von heparin-beschichteten Oxygenatoren wird deutlich mehr TAT gebildet als unter Verwendung von unbeschichteten Oxygenatoren.

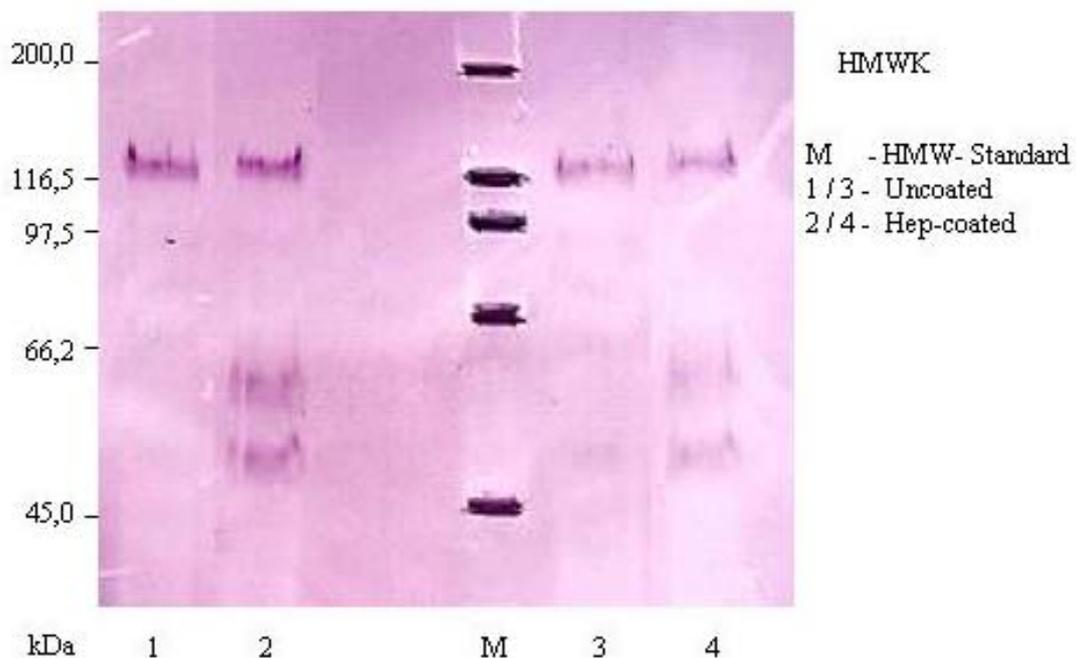


Graphik 9: TAT

## 2. Adsorptionsproteine

### 2.1. HMWK

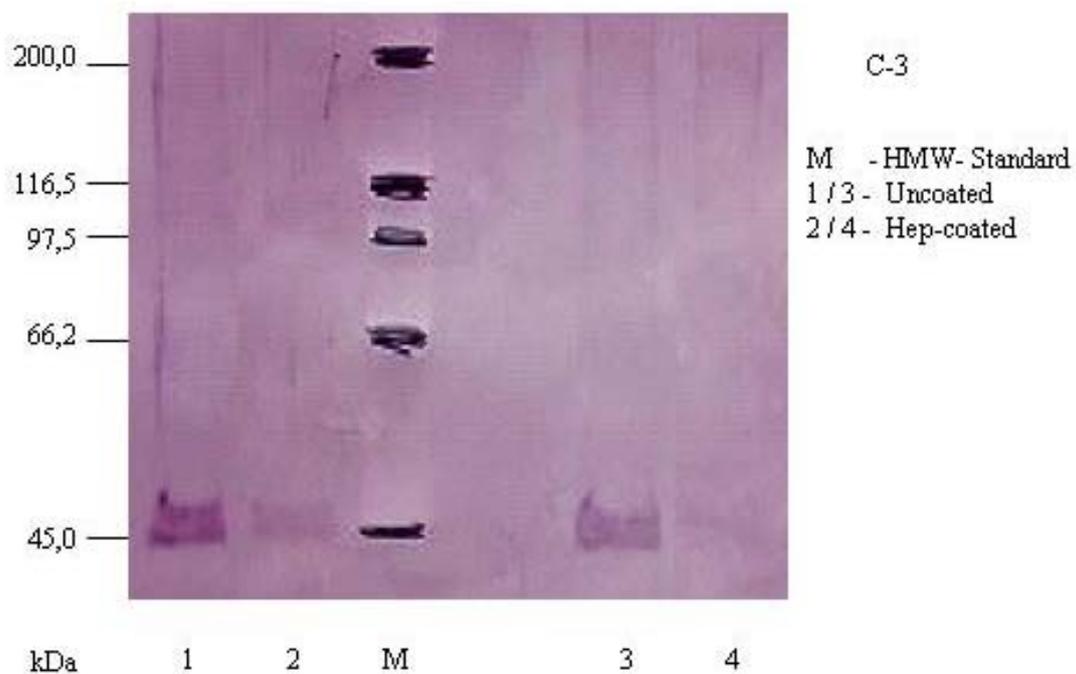
Bei der HC-Gruppe und bei der NC-Gruppe ist zwischen 115 und 125 kDa eine große, dunkle, immunreaktive Bande zu erkennen, welche dem intakten Molekül (120 kDa) entspricht. Bei der HC-Gruppe sind zusätzlich zwei weitere Banden, welche breiter aber geringer intensiv imponieren, zu erkennen. Eine Bande ist zwischen 65 und 57 kDa und eine zweite zwischen 48 und 55 kDa gelegen.



Graphik 10: Immunoblot HMWK

## 2.2. C-3

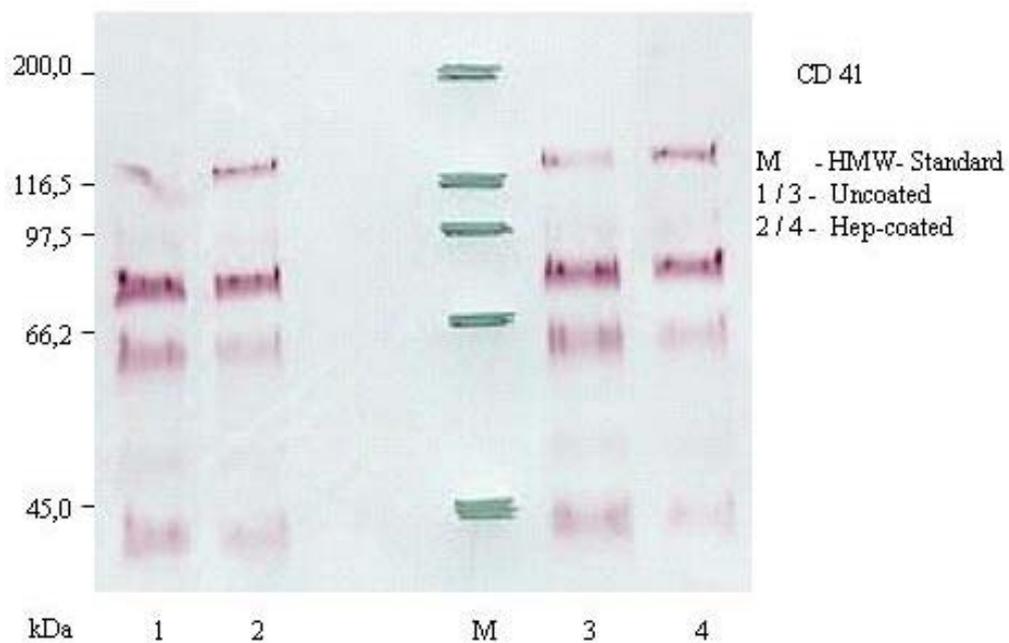
Das intakte C-3 Molekül hat ein MG von 185 kDa und besteht aus einer leichten Kette (75 kDa) und schweren Kette (110 kDa). Sowohl im Bereich der schweren als auch der leichten Kette sind keine immunreaktiven Banden auf dem Blot zu erkennen. Bei der NC-Gruppe ist im Bereich 45-50 kDa eine breite, dunkle Bande sichtbar. Bei der HC-Gruppe ist im Bereich 45-50 kDa eine Bande zu erkennen, die aber deutlich heller, schmaler und geringer intensiv ist. Bei der Verwendung von heparin-beschichteten Oberflächen wird weniger C-3 adsorbiert als bei unbeschichteten Oberflächen.



Graphik 11: Immunoblot C-3 Komplement

### 2.3. CD 41

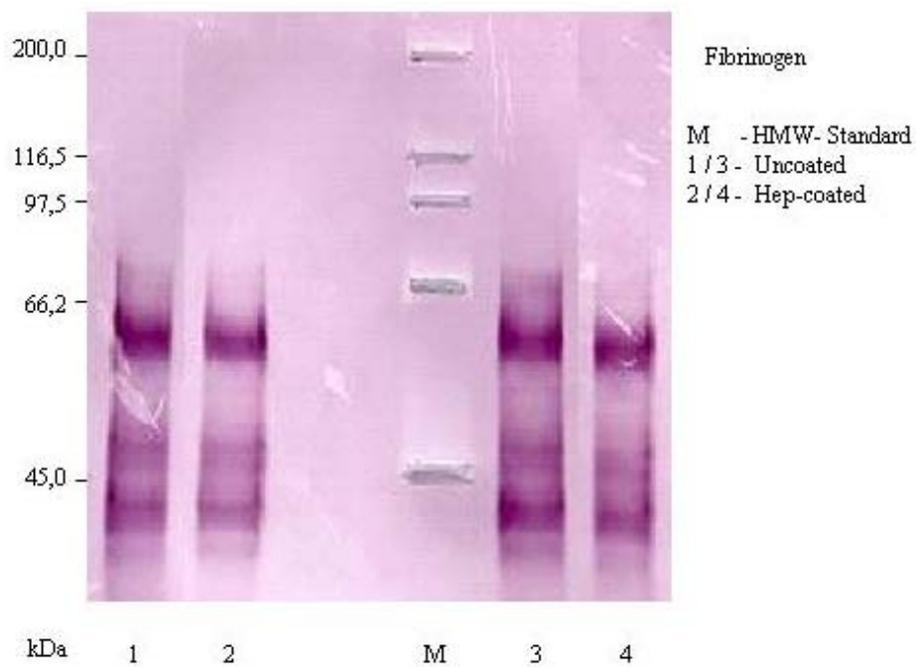
Das intakte Molekül CD 41 hat ein MG von 136,5 kDa. Es wird nach SDS-Elektrophorese im Immunoblot im Bereich von 114 und 22,5 kDa wiedergegeben. Bei beiden Gruppen sind immunoreaktive Banden im Bereich von 115-130, 70-80, 55-60 und 20-40 kDa zu erkennen. Vor allem im Bereich von 55-60 und 20-40 kDa sind die Banden der HC-Gruppe heller, schmaler und von geringerer Intensität. Es bestehen keine nennenswerten Unterschiede zwischen beiden Gruppen.



Graphik 12: Immunoblot CD 41

## 2.4. Fibrinogen

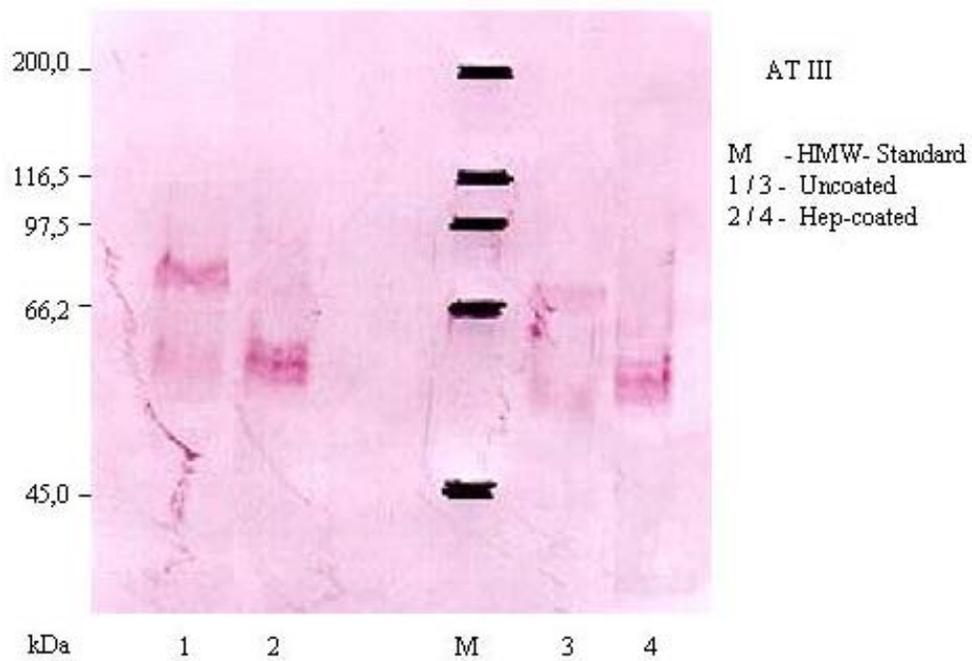
Das intakte Molekül Fibrinogen hat ein MG von 340 kDa und besteht aus den UE 67/58/47 kDa. Bei beiden Gruppen sind im Bereich 60-65, 45-50 und 25-40 kDa breite und dunkle immunoreaktive Banden zu erkennen. Es bestehen keine nennenswerten Unterschiede zwischen beiden Gruppen.



Graphik 13: Immunoblot Fibrinogen

## 2.5. AT III

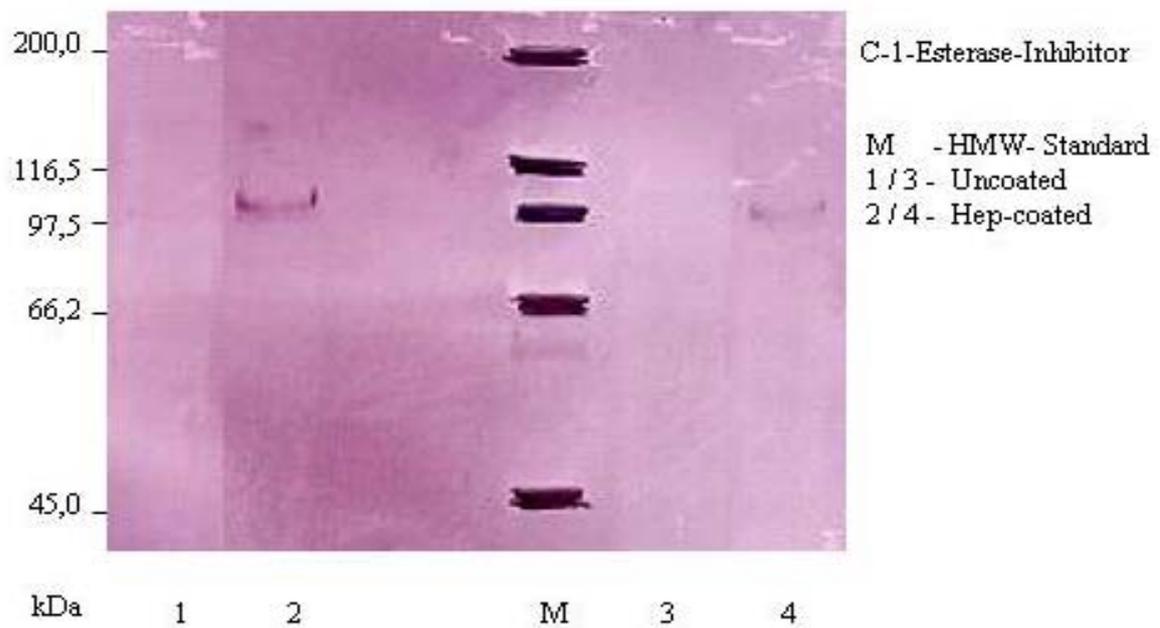
Das intakte Molekül hat ein MG von 49-58 kDa. Bei der HC-Gruppe ist zwischen 55 und 60 kDa und bei der NC-Gruppe ist zwischen 70 und 80 kDa eine große, dunkle, immunoreaktive Bande zu erkennen. Bei heparin-beschichteten Oberflächen wird mehr AT III adsorbiert als bei unbeschichteten.



Graphik 14: Immunoblot AT III

## 2.6. C-1 Esterase-Inhibitor

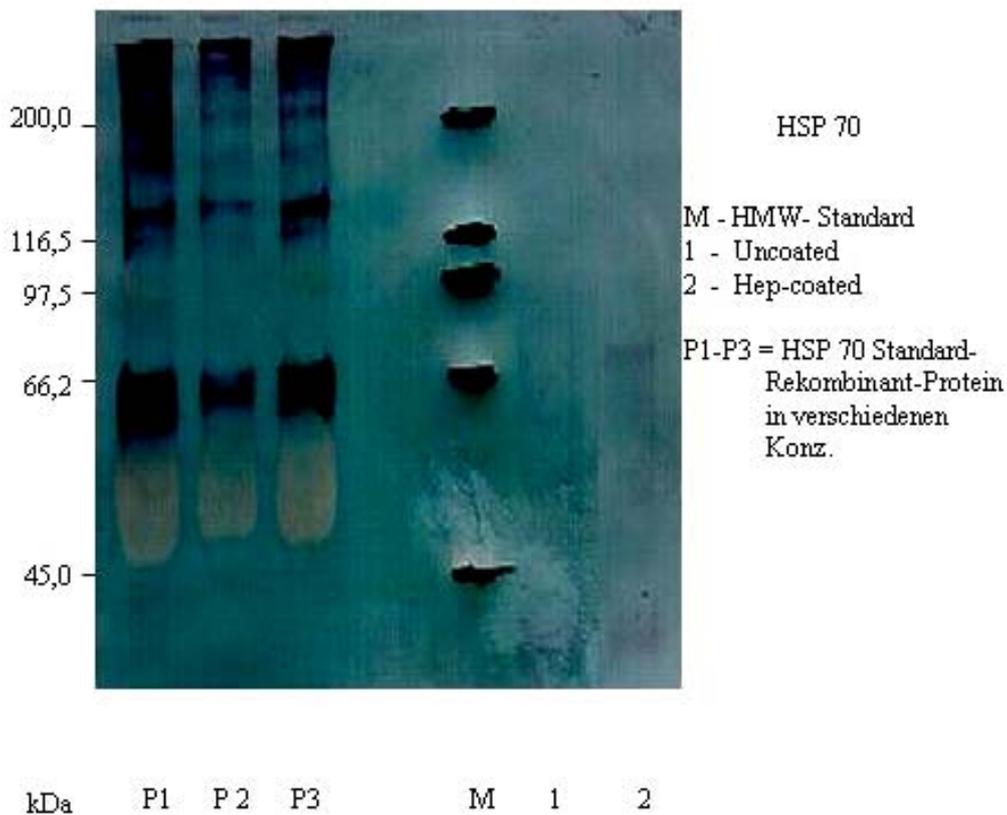
Das intakte Molekül hat ein MG von 105 kDa. Bei der HC-Gruppe ist zwischen 100 und 110 kDa eine dunkle, immunoreaktive Bande zu erkennen. In der NC-Gruppe sind keine Banden zu erkennen. Bei heparin-beschichteten Oberflächen wird mehr C-1 Esterase-Inhibitor adsorbiert als bei unbeschichteten Oberflächen.



Graphik: 15: Immunoblot C1-Esterase-Inhibitor

## 2.7. HSP 70

Das intakte Molekül hat ein MG von 70 kDa. Bei beiden Gruppen ist jeweils zwischen 15 und 20 kDa eine dunkle, immunreaktive Bande zu erkennen. Die Bande der NC-Gruppe imponiert deutlicher und intensiver. Zusätzlich ist bei der HC-Gruppe eine schwache dünne Bande zwischen 65 und 75 kDa zu erkennen. Bei heparinbeschichteten Oberflächen wird mehr Hsp 70 adsorbiert als bei unbeschichteten Oberflächen.



Graphik 16: Immunoblot HSP 70

## **V. Diskussion**

Die Hämokompatibilität einer Fremdoberfläche wird entscheidend vom selektiven Adsorptionsverhalten bzw. Aktivierungsgrad der Plasmaproteine, sowie vom Ausmaß der Zellaktivierungen beeinflusst.

Unter Berücksichtigung des engmaschigen Ineinandergreifens und dem komplexen Zusammenspiel von Blutgerinnung, Fibrinolyse und Komplementsystem kann anhand richtungsweisender Parameter und unter Anwendung von etablierten immunologischen Methoden eine Aussage zur Hämokompatibilität getroffen werden (50).

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der vergleichenden Untersuchung zwischen unbeschichteten und heparin-beschichteten Oberflächen von Oxygenatoren gleicher Bauweise im in-vitro-HLM-Modell. Im Rahmen dieser Arbeit wird das Adsorptions- und Aktivierungsverhalten von Plasmaproteinen an Fremdoberflächen und die daraus resultierenden Zellaktivierungen untersucht.

### **1. Untersuchung der löslichen Aktivierungsmarker**

#### **1.1. Hämolyse**

Blutschädigung in Form von Hämolyse kann in die werkstoffinduzierte und die strömungsbedingte Hämolyse unterschieden werden, letztere tritt insbesondere während der Durchströmung extrakorporaler Systeme auf (11).

Durch Schädigung der Erythrozyten im extrakorporalen Kreislauf kommt es zur Hämolyse und freiem Hämoglobin im Plasma.

Augenfällig wird die Blutzellbeschädigung durch den Anstieg der Hämoglobinkonzentration im Plasma. Obwohl die Hämolyse einen verhältnismäßig unsensiblen Index darstellt, wird von dieser als Gradmesser, für die Traumatisierung durch einen extrakorporalen Kreislauf, traditionell Gebrauch gemacht. Messung und Interpretation der Hämoglobinkonzentration müssen methodische Grundlagen berücksichtigen. Normalerweise bindet das im Plasma vorhandene Haptoglobin das freie Hämoglobin. Wenn die Freisetzung von Hämoglobin, aber die Bindungskapazität des Haptoglobins überschreitet, zirkuliert freies Hämoglobin im Plasma (7).

Die Werte beider Gruppen unterscheiden sich nur geringfügig. Der statistische Vergleich ergibt keinen signifikanten Unterschied.

## **1.2. Leukozyten und PMN-Elastase**

Die Leukozytenzahlen fallen in beiden Gruppen kontinuierlich ab. Bei der Anwendung von heparin-beschichteten Oxygenatoren konnte vor allem ab der 20. Minute ein geringerer Abfall der Leukozytenzahlen festgestellt werden.

Mit der Leukopenie kommt es zu einer Reihe von Veränderungen bei der zellulären Funktion der Granulozyten während der EKZ. Aggregation und Neigung zur Adhärenz nehmen zu. Der oxidative Stoffwechsel ist gesteigert, es kommt zur Freisetzung von Proteasen, insbesondere zur Freisetzung der humanen Leukozyten-elastase (49). Der Abfall der Leukozytenzahlen beider Gruppen lässt sich durch Granulozytenadhäsion an den Fremdoberflächen und Granulozytenaggregation erklären (26).

Ebenso gilt es als erwiesen, dass mechanische Alterationen der HLM-Maschine und die unterschiedlichen synthetischen Oberflächen durch Zellzerstörung zur Elastasefreisetzung beitragen (3). Da sich aber bei beiden Gruppen die Hämolysewerte nicht signifikant unterscheiden, also auch kein schützender Effekt der mit Heparin vergüteten Oberfläche bezüglich der korpuskulären Blutbestandteile erkennbar ist, kann mechanische Schädigung der Granulozyten nicht der Grund für die unterschiedlichen Werte sein.

Der Leukozytenabfall erfolgt in beiden Gruppen in unterschiedlichem Maße. Komplementaktivierung (C3a, C5a) und der direkte Kontakt der Zellen mit unphysiologischen Oberflächen bedingen eine Aktivierung von peripheren Leukozyten. Beispielsweise aktiviert C5a PMN, welches zur Freisetzung von lysosomalen Enzymen und radikalen Sauerstoffverbindungen führt (19; 49). Insbesondere kommt es zur Freisetzung von Proteasen, wie beispielsweise der PMN-Elastase.

Die Folgen einer gesteigerten Freisetzung von PMN-Elastase in das Blutplasma sind vielfältig, da PMN-Elastase ein breites Wirkungsspektrum besitzt. Zu den Substraten, die es zu spalten vermag, zählen die C3- und C5- Komplementfaktoren, daneben Immunglobuline, Elastin, Kollagen und Proteoglykane, aber auch eine Reihe von Gerinnungsfaktoren, besonders Fibrinogen sowie deren Inhibitoren. Unter die letztere Gruppe fallen beispielsweise das Antithrombin III und Plasminogen (37). Ihre Plasmakonzentration gilt als repräsentative Aussage über das aus PMN freigesetzte

Potential lysosomaler Enzyme und stellt einen empfindlichen Parameter für akute Schädigung und Entzündungsreaktion dar (14). Proteolytische Enzyme aus Granulozyten gelten als wesentlicher Mediator bei der Entwicklung des schock- und sepsis-bedingten Organversagens, insbesondere des ARDS (42).

Die Ergebnisse der vorliegenden Versuche zeigen sowohl bei beschichteten als auch bei unbeschichteten Oxygenatoren ansteigende PMN-Elastasefreisetzung, wobei sich der Grad des Anstiegs nicht nur bis einschließlich der 30. Minute sondern auch im Zeitraum nach 60 Minuten unterscheidet. Die PMN-Elastasewerte zeigen, dass geringere Stimulation und Aktivierung der Leukozyten in der HC-Gruppe stattgefunden hat. Nicht nur die höheren Leukozytenzahlen sondern auch die geringere PMN-Elastasefreisetzung können ein Hinweis auf eine bessere Hämokompatibilität der heparin-beschichteten Oxygenatoren geben.

Im statistischen Vergleich beider Versuchsgruppen ergab die Untersuchung der Leukozyten, PMN-Elastase und Hämolyse keinen signifikanten Unterschied.

In der Regel wird die Leukozytose und Leukopenie im Differentialblutbild von den Neutrophilen beherrscht. Um noch genauer den Zusammenhang zwischen PMN-Elastase und polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten darstellen zu können, bietet sich zusätzlich zur Leukozytenbestimmung die spezifische Bestimmung der PMN an. Die Reduktion der PMN stellte weniger der Schwerpunkt dieser Untersuchung, sondern eher die Stimulation und Aktivierung der PMN.

### **1.3. Thrombozyten und $\beta$ -Thromboglobulin**

Bei der NC-Gruppe ist, sowohl der drastische Abfall innerhalb der ersten 5 Minuten um mehr als 50%, als auch der plötzliche Anstieg von der 30. bis 90. Minute auffällig. Dagegen sind in der HC-Gruppe deutlich höhere Thrombozytenzahlen bis zur 60. Minute zu verzeichnen, denen im weiteren Verlauf eine deutliche Abnahme der Thrombozytenzahlen folgt.

Im statistischen Vergleich ist für die AZP 3,4,6 und 7 ein hochsignifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen festzustellen. [ $p < 0,01$ ] Ein Abfall der Thrombozytenzahlen findet praktisch nach jeder EKZ statt, doch ist es eher selten, dass kritische Werte unter

50000/ $\mu$ l erreicht werden (49). Als Grund für eine Thrombozytopenie (Plättchenzahl < 150000/ $\mu$ l) können Zerstörung der zellulären Blutbestandteile durch mechanische Schädigung, Aggregation untereinander und im Besonderen die Adhärenz der Plättchen an synthetischen Oberflächen in Betracht kommen (33).

Als Ursache für den unterschiedlichen Abfall der Thrombozytenwerte beider Gruppen kann die Zerstörung der Thrombozyten durch die Rahmenbedingungen des HLM-Modells aufgrund der vergleichenden Untersuchung weitgehend ausgeschlossen werden. Da sich bei beiden Gruppen die Hämolysewerte nicht signifikant unterscheiden, also auch kein schützender Effekt der mit Heparin vergüteten Oberfläche bezüglich der korpuskulären Blutbestandteile erkennbar ist, kann mechanische Schädigung der Thrombozyten nicht der Grund für die unterschiedlichen Werte sein.

Eine Heparin-induzierte-Thrombozytopenie sowie eine Aggregation der Thrombozyten untereinander (Aktivierung durch Plättchenagonisten Thrombin) sollte nicht außer Acht gelassen werden (5).

In hohen Konzentrationen begünstigt Heparin die Aggregation der Blutplättchen (12). Durch die Bildung von AT-III-Heparin-Komplexen kann die Heparin-induzierte Plättchenaggregation aber verhindert werden. Wandständiges Heparin soll aber nur  $\frac{1}{4}$  der Affinität von „Plasma-Heparin“ besitzen (36).

Abhängig von der Stärke des Stimulus sezernieren die aktivierten Plättchen Inhaltsstoffe ihrer Granula. Beispielsweise wird  $\beta$ -Thromboglobulin bei der Thrombozytenaggregation aus den  $\alpha$ -Granula freigesetzt (12); (27).

Die Freisetzung von  $\beta$ -Thromboglobulin, als plättchenspezifisches Protein, stellt einen wichtigen Parameter der Thrombozytenaktivierung dar.

Ein Abfall der Thrombozyten, der in Korrelation mit den steigenden  $\beta$ -Thromboglobulinwerten steht, ist hauptsächlich auf die Stimulation und Aktivierung mit nachfolgender Aggregation untereinander oder Adhäsion der Thrombozyten an Fremdoberflächen zurückzuführen. Wobei die Adhäsion an Fremdoberflächen wahrscheinlicher scheint (5; 57). Für die Verminderung der aktivierten Plättchen scheint neben dem vWF, der für die Adhärenz der Thrombozyten an endothelialen Strukturen

zuständig ist, Fibrinogen der wichtigste Kofaktor, sowohl für die Adhärenz der Thrombozyten an synthetische Oberflächen als auch für die Aggregation der Plättchen untereinander zu sein (5).

Einige Forschergruppen, Vroman und Brush, konnten beweisen, dass Plasmaproteine auf künstlichen Oberflächen wie F XII, Fibrinogen, Vitronektin, HMWK und andere ein Kriterium für Thrombogenität darstellen. Festphasen-gebundenes-Fibrinogen führt zu einer starken Adhäsion der Thrombozyten durch ihre jeweiligen GP Rezeptoren, gefolgt durch Aggregation und der Freisetzung von prokoagulatorischen Inhalts, wie PF 4 (59). Bei den Untersuchungen der adsorbierten Plasmaproteine zeigten heparin-beschichtete und unbeschichtete Oberflächen bezüglich Fibrinogen keinen Unterschied. Die Adsorption von Fibrinogen an Fremdoberflächen stellt vermutlich nicht das entscheidende Kriterium für Thrombogenität dar, vielmehr spielen Überlagerungseffekte anderer Plasmaproteine eine wesentlich bedeutendere Rolle (58). Durch die selektive Anlagerung bestimmter Plasmaproteine an die Oberfläche des Biomaterials kann die weitere Aktivierung der Blutzellen sowie der Kontaktphasensysteme eingeleitet bzw. reduziert werden. Überwiegend positive Eigenschaften können der Adsorption von C1-INH, HMWK und AT III zugeschrieben werden. Im Gegensatz dazu, ist die Adsorption von CD 41, C-3 und Fibrinogen mit schlechter Hämokompatibilität der Fremdoberfläche verbunden (50) .

In der HC-Gruppe konnte stärkere Adsorption von HMWK und C 1-INH nachgewiesen werden. Umgekehrt verhielt sich die Adsorption des Komplementfaktors C 3; hier konnte an unbeschichteten Oberflächen mehr detektiert werden.

Ein Anstieg der Thrombozytenzahlen ist möglicherweise durch Auflösung von Thrombozytenaggregaten zu erklären. Weiterhin besteht die Möglichkeit dass, die an künstliche Oberflächen oder die an sie adhärennten Plasmaproteine gebundenen Thrombozyten, freigesetzt werden (5).

## Resumee

Bei sich kaum unterscheidenden Hämolysewerten, konnten deutlich erhöhte Plättchenzahlen und geringere Freisetzung von  $\beta$ -Thromboglobulin bei der Verwendung von heparin-beschichteten Oxygenatoren festgestellt werden.

Es konnte kein schützender Effekt der mit Heparin vergüteten Oberfläche bezüglich mechanischer Schädigung der Thrombozyten beobachtet werden. Die Ergebnisse zeigen weiterhin, dass eine geringere Thrombozyten-adhäsion und -aggregation beim beschichteten Oxygenator stattgefunden hat. Die Thrombozytenfunktion war während CPB bei heparin-beschichteten Oxygenatoren deutlich verbessert.

### 1.4. TAT

AT III gilt als der wichtigste Inhibitor der Blutgerinnung. Seine Hemmwirkung beruht primär auf der Komplexwirkung mit Heparin, in dessen Anwesenheit die Geschwindigkeit der Inhibierung erheblich gesteigert wird. Der Komplex hemmt konzentrationsabhängig die Serinproteasen des Gerinnungssystems, insbesondere Thrombin und F Xa, aber auch andere Proteasen wie  $\alpha$ - und  $\beta$ -F XIIa sowie Plasmakallikrein (37).

Bei der Hemmung der Thrombinwirkung, welche in einem äquimolaren 1:1 Komplex geschieht, wird Heparin sowohl an AT III als auch an Thrombin gebunden. Dabei kommt es zu einer heparinvermittelten allosterischen Annäherung beider Reaktionspartner, was einem förderlichen Einfluss auf das Reaktionsgeschehen gleichkommt. Nach der Knüpfung einer kovalenten Bindung zwischen AT III und seinem Substrat, kommt es zu einer Konformationsänderung im AT III-Molekül, wodurch eine Ablösung von Heparin möglich wird, welches danach wieder für eine erneute Katalyse zur Verfügung steht. Somit ist dieser antikoagulatorische Effekt von der Heparin- und der AT III-Konzentration abhängig.

Kontakt des Blutes mit künstlichen Oberflächen bedingt die Aktivierung des intrinsischen Gerinnungsweges via F XII, F XI und F Xa, welcher die Prothrombinumwandlung moduliert. Das generierte Thrombin wird durch den Komplex mit AT III inaktiviert. Deshalb ist TAT ein guter Parameter für die Thrombingeneration (56).

Einige Forschergruppen konnten zeigen, dass die Thrombozytenadhäsion mit der Verfügbarkeit von an oberflächengebundenen Fibrinogen korreliert, sich aber HC- und

NC-Oberflächen nicht in der Protein- (bezüglich Fibrinogen) und Thrombozyten-adhäsion unterscheiden.

Eine verringerte Thrombinbildung bei HC-Oberflächen kann nur durch die heparinabhängige Inhibierung der thrombinvermittelten Positiv-Feedback-Mechanismen erklärt werden. (z.B. Plättchen-aktivierung und -generierung von kritischen Kofaktor Va und V IIIa) So scheint die heparin-beschichtete Oberfläche ihre antithrombogene Eigenschaft durch die Neutralisierung von lokal gebildeten Thrombin zu beeinflussen, aber nicht durch Reduzierung der fibrinogenabhängigen Thrombozytenadhäsion (21).

Im Laufe der Versuchsdurchführung ist bei beiden Gruppen eine Zunahme der TAT-Komplexe zu erkennen, wobei in der HC-Gruppe ein deutlich erhöhter Zuwachs im Vergleich zur NC-Gruppe zu verzeichnen ist. Der statistische Vergleich beider Gruppen ergibt einen signifikanten Unterschied für AZP 7 [ $p < 0,05$ ] und einen hochsignifikanten für AZP 8 [ $p < 0,01$ ].

Eine Zunahme der gebildeten TAT-Komplexe deutet auf eine Zunahme der Gerinnungskaskade mit vermehrter Bildung von Thrombin hin.

Der Anstieg der TAT-Konzentration macht eine entsprechende Thrombinbildung deutlich, der eine Aktivierung von Thrombozyten und F XII, F IX, F XI und F X vorausgegangen sein muss (16).

Die gemessenen erhöhten Werte deuten auf einen verstärkten Ablauf der Gerinnungskaskade mit vermehrter Bildung von Thrombin hin.

Bei der Verwendung von heparin-beschichteten Oxygenatoren wird deutlich mehr TAT gebildet als unter Verwendung von unbeschichteten Oxygenatoren.

Die deutlichen TAT-Konzentrationsanstiege in der HC-Gruppe passen allgemein nicht zu den in Kap. V.1.3. festgestellten und durch mehrere Parameter untermauerten Ergebnissen. Möglicherweise reagiert dieser Komplex oder der dazugehörige Test am sensibelsten auf äußere Einflüsse (37).

## **1.5. F XII**

Eine Kontaktphasenaktivierung zeigt sich primär in einer Reduktion der F XII-Aktivität. Dieser Faktor hat im komplizierten Zusammenspiel mit HMWK und Kallikrein eine Schlüsselposition, indem er nach der Bindung an negativ geladene Oberflächen über HMWK eine Konformationsänderung erfährt und dadurch besonders empfindlich für

die proteolytische Spaltung durch PKK wird. Eine vermehrte Aktivierung der Kontaktphase geht mit erhöhtem Verbrauch von F XII einher und macht sich somit durch eine vermindert F XII-Aktivität bemerkbar.

Der gegenüber der ersten Abnahme in beiden Gruppen zu beobachtende Abfall lässt sich auf die während der Befüllung der HLM mit dem Konservenblut auftretende Kontaktphasenaktivierung durch das Transfusion- und Schlauchsystem zurückführen (3).

Im weiteren Versuchszeitraum ist bei beiden Gruppen ein praktisch unveränderter F XII Aktivitätsspiegel festzustellen. Somit findet keine weitere und nennenswerte Kontaktphasenaktivierung statt. Im Vergleich beider Gruppen sind in der HC-Gruppe leicht erhöhte Werte zu erkennen. Dieser Unterschied ist nur geringfügig und nicht aussagekräftig. Auch die statistische Auswertung ergab keinen signifikanten Unterschied.

#### **1.6. Heparin**

Bei der NC-Gruppe ist ein kontinuierlicher Abfall der Werte über den gesamten Versuchszeitraum zu beobachten. Er beläuft sich nach 90 Minuten auf 12 % im Vergleich zum Ausgangswert.

Ein Abfall der Heparinaktivität ist vermutlich mit dem aus den zerstörten Thrombozyten freigesetzten PF 4 zu erklären. PF 4 ist als ein wichtiger Heparinaktivator anzusehen (3). Auch  $\beta$ -Thromboglobulin besitzt heparinantagonisierende Wirkung (16).

Dagegen ist in der HC-Gruppe ein kontinuierlicher Anstieg der Werte zu verzeichnen. Er beläuft sich auf 9% nach 90 Minuten. Der Anstieg der Heparinkonzentrationen kann mit dem sog. Auswaschprozess der Heparinbeschichtung interpretiert werden. Da nur geringe Mengen des wandständigen Heparins ausgewaschen werden, ist eher von einer minimalen systemischen Wirkung auszugehen.

#### **1.7. SC5b-9**

Die Formation des terminalen Lysekomplexes bewirkt die Bildung eines membranintegrierten Proteinkanals und führt schließlich zur Lyse der attackierten Zelle. Beziehungen zwischen den Initialphasen der klassischen Komplementaktivierung (C-1) und dem Kontaktphasensystem sowie der Schlüsselenzyme der Fibrinolyse (Plasmin) sind sowohl in vitro als in vivo oft beschrieben worden. Eine Plasminaktivierung kann

sowohl über den endothelialen t-PA-Release als auch über Kallikrein-aktivierte Urokinase stattfinden. Das generierte Plasmin kann den ersten Faktor der Komplementkaskade C1 direkt oder über die Freisetzung des F XII Spaltproduktes  $\beta$ -F XIIa aktivieren. Somit ist während der EKZ mit Komplementaktivierung zu rechnen. Auch die Aktivierung der Leukozyten führt zur Aktivierung des Gerinnungs- und Kontaktphasensystems, die ihrerseits wieder in positiver Rückkopplung das Komplementsystem aktivieren (55).

Der Terminale-Komplement-Komplex entsteht durch Zusammenlagerungen von C5 bis C9 als Konsequenz der Aktivierung des alternativen und klassischen Weges. Der MAC, der eine Form von TCC darstellt, ist ein stabiler Komplex und vermittelt die an die Komplementaktivierung gebundene irreversible Zielzellenzerstörung. Komplexe die in der Abwesenheit von Zielzellen gebildet werden, binden an das natürlich vorhandene Serumprotein S. S-Protein bindet an die entstehenden C5-9 Komplexe in der Phase der C5b-7 Ansammlung. Der SC5b-9 Komplex stellt die lösliche aber nicht lytische Form des TCC dar (23; 35). TCC ist ein löslicher Marker der Komplementaktivierung (58).

Über den Versuchszeitraum hinweg konnte kein Unterschied zwischen den beiden Gruppen festgestellt werden. Der statistische Vergleich ergibt keinen signifikanten Unterschied.

## **2. Untersuchung von Adsorptionsproteinen**

Die Untersuchung der Adsorptionsproteine erfolgte mittels Western-Blotting, welches die Detektion aktivierter und denaturierter Proteine ermöglicht. Das Ausmaß der Adsorption bestimmter Plasmaproteine an Fremdoberflächen stellt ein direktes Maß für die Hämokompatibilität dar (51). Weiterhin hat das Adsorptionsverhalten einiger Plasmaproteine besondere Auswirkung auf nachfolgende Zellaktivierungsmechanismen. An Materialien mit hydrophoben Eigenschaften lagern sich bekannterweise viele verschiedene Plasmaproteine an, welches mit erhöhter Adhäsion und Aktivierung von Blutzellen verbunden sein kann. Dagegen wird Materialien mit hydrophilen Eigenschaften, aufgrund ihrer Adsorption von Plasmaproteinen, eine verbesserte Biokompatibilität zugesprochen. Diese Einschätzungen wurden bezüglich Fibrinogen durch neuere Untersuchungen erweitert, die einer bestimmten Proteinkonformation des

adsorbierten Proteins einen stärkeren Einfluss auf Adhäsion und Aktivierung von Blutzellen zuschreiben, als der eigentlichen Konzentration des entsprechenden adsorbierten Proteins.

Untersuchungen zeigen, dass die adsorbierten Plasmaproteine ein überwiegend unterschiedliches Adsorptionsverhalten bezüglich heparin-beschichteter und unbeschichteter Oberflächen haben. Konzentrationen bestimmter adsorbierter Proteine an einer Oberfläche, stellen ein entscheidendes Kriterium für deren Biokompatibilität dar. Überwiegend positive Eigenschaften können der Adsorption von HMWK, C1-INH, und AT III zugeschrieben werden. Im Gegensatz dazu ist die Adsorption von Fibrinogen, CD 41 und C-3 mit einer schlechteren Hämokompatibilität der Fremdoberflächen verbunden (50).

## **2.1. HMWK**

Die Aktivierung der Kontaktphase führt zur Spaltung von HMWK (120 kDa) durch Kallikrein. Dabei entsteht einerseits Bradykinin und ein bradykininfreies Molekül, aus einer leichten Kette (56 kDa) und einer schweren Kette (65 kDa), welche über eine Disulfidbrücke verbunden sind. Die leichte Kette wird in einem weiteren Schritt zu einer Kette mit 45 kDa gespalten. Bei dieser Spaltung bleiben die koagulatorische Aktivität und die Fähigkeit an negativ geladene Oberflächen zu binden von HMWK erhalten. (auf der leichten 45 kDa Kette gelegen)

Nicht nur Kallikrein kann HMWK spalten sondern auch F XIa, wenn auch mit anderen Zwischen- und Endprodukten. So entstehen im Unterschied zum Kallikreinweg auf diese Weise zusätzlich eine schwere Kette (75 kDa) und verschiedene leichte Ketten (40, 35, 13 kDa). Die Kofaktoraktivität von HMWK geht bei der Spaltung in die verschiedenen leichten Ketten verloren (44). Weitere Analysen zur Spaltung von HMWK fanden als Spaltprodukte leichte Ketten von 49 und 62 kDa bei intakter Kofaktoraktivität. So vollzieht sich die Spaltung von HMWK durch F XIa nur sehr langsam und scheint kein Kontrollmechanismus zu sein (41).

Das BK-freie HMWK (HMWKa) ist ein bedeutendes Anti-adhäsionsprotein (4). Insbesondere kann an die Oberfläche gebundenes HMWK die Adhäsion von neutrophilen Granulozyten senken. HMWK und HMWKa haben die Domänen (D3, D5H) als Bindungsstelle für anionische Oberflächen und für neutrophile Granulozyten.

Wenn HMWK oder HMWKA an die Oberfläche gebunden sind, ist ihnen die Möglichkeit genommen an neutrophile Granulozyten zu binden. Oberflächen mit HMWK Beschichtung zeigten im Vergleich zu Glas oder Fibrinogenoberflächen deutlich reduzierte Zahl an adsorbierten Neutrophilen (60; 61).

Die Bindung von HMWK an PMN ist abhängig von der Aktivierung des PKK und der Ablagerung von Fibrinogen auf dieser Zelloberfläche. Fibrinogen und HMWK konkurrieren um das Leukozytenintegrin CD 11b/18. Weiterhin hemmt HMWK Thrombin an Plättchen zu binden oder sie zu aktivieren (22). Die Spaltung von HMWK führt zu einer leichten Kette und einer schweren Kette. Die leichte Kette hat zwei Domänen. D 6, welche P(KK) bindet und D5, welches zu negativ geladenen Oberflächen und Heparin binden kann.

Weiterhin wird vermutet, dass die Adsorption des Kontakphasenproteins entscheidend für die Passivierung einer Fremdoberfläche verantwortlich ist. HMWK werden also anti-adhäsive Eigenschaften zugesprochen (61),(50).

HMWK zeigt ein unterschiedliches Adsorptionsmuster auf heparin-beschichteten (3 Banden) bzw. nur (1 Bande) bei unbeschichteten Oberflächen. Die 120 kDa Bande ist bei beiden Gruppen ausgeprägt zu erkennen und entspricht dem intakten HMWK Molekül. Die beiden weiteren Banden der HC-Gruppe entsprechen dem gespaltenen bradykininfreien Molekül. Bei dieser Spaltung bleiben die koagulatorische Aktivität und die Fähigkeit an negativ geladene Oberflächen zu binden von HMWK erhalten. Das bradykininfreie HMWK-Molekül hat nicht nur Kofaktoraktivität sondern ist zusätzlich ein bedeutendes Anti-adhäsionsprotein. Die verstärkte Anlagerung von HMWK an die heparin-beschichteten Oxygenatoren, ist ein Zeichen für bessere Hämokompatibilität dieser Beschichtung.

## **2.2. C1-INH**

Ebenfalls von besonderem Interesse ist die erhöhte Konzentration des C1-INH an der heparin-beschichteten Oberfläche (HBS).

Heparin erhöht die Inhibitorfunktion von Faktor H und von C1-INH (24). Beispielsweise hemmt Heparin im klassischen Weg mittels verstärkenden Einfluss auf C1-INH C1r und C1s (15). Der Inhibitor blockt sowohl initial den klassischen Komplementaktivierungsweg, indem er C1r und C1s inaktiviert, als auch die

Kontaktphasenproteine  $\alpha$ -F XIIa sowie Kallikrein (2). Weiterhin hemmt C1-INH Plasmin, F XIa und im alternativen Weg das Zusammenspiel zwischen C3b und Faktor B (15).

C-1 INH ist ein 104 kDa Serumglykoprotein. C-1 ist im Blut hauptsächlich an C1-INH gebunden (dessen molare Konzentration siebenmal höher ist als diejenige von C-1). Diese Bindung verhindert die zur spontanen Aktivierung notwendigen Konformationsänderungen (2).

Neuere Untersuchungen an HBS zeigen, dass eine geringere Aktivierung des Komplementsystems stattfindet, als im Vergleich zu unbeschichteten Oberflächen. Dieses geht mit einer erhöhten Bindung von Faktor H an die Heparinoberfläche einher, welches auf eine Vermehrung der Komplementregulation an der Oberfläche durch Faktor H hinweist. Ähnlich wie Faktor H ist die Bindung von C1-INH an HBS erhöht. Durch die Bindung an Heparin erfährt C1-INH eine erhöhte Wirksamkeit. Die Oberflächenbindung von C1-INH an HBS, scheint die C1-INH Aktivität zu verbessern und erhöht die Inaktivierung des gebildeten C1(qrs) zu C1rs-C1INH Komplexen ohne signifikante Aktivierung des klassischen Weges. C1-INH ist ein ergänzender Faktor für die Inhibitorwirkung von AT III an HBS. Die Regulatorproteine AT III, F H und C1-INH binden an Heparin-Moleküle in derselben Art und Weise wie Salicylsäure, Glycosaminoglykane und Heparansulfat an das Endothel binden. Die erhöhte Bindung dieser Regulatorproteine an oberflächengebundenes Heparin ist der zugrunde liegende Mechanismus für eine reduzierte Aktivierung von Komplement- und Gerinnungssystem im Vergleich zu nicht beschichteten Oberflächen (24). Somit stellt an HBS gebundener C1-INH einen Kofaktor für bessere Biokompatibilität von Heparinbeschichtungen dar. Erhöhte Bindung von Komplementregulatoren an HBS führt zu einer geringeren Aktivierung des Komplement durch das Biomaterial, welches zu einer besseren Langzeitbiokompatibilität führt (24).

Die Analyse der oberflächengebundenen Plasmaproteinen ergibt deutlich erhöhte Bindung von C1-INH an die Heparinbeschichtung, welches ein Zeichen für bessere Biokompatibilität der Beschichtung darstellt.

### 2.3. C-3 Komplement

C-3 ist nicht nur eine lösliche Serumkomponente des klassischen Aktivierungswegs sondern auch eine zentrale Komponente des Alternativweges. Die Serumkonzentration von C-3 ist mit ungefähr 0,55-1,2 mg/ml höher als diejenigen aller übrigen Komponenten des Komplementsystems. Bei C-3 handelt es sich um ein 190 kDa schweres, heterodimeres Glykoprotein, das aus je einer durch Disulfidbrücken verbundenen  $\alpha$  und  $\beta$ - Polypeptidkette besteht. Die C-3 Konvertase entfernt ein 9 kDa-Fragment aus der  $\alpha$ -Kette (C3a) und es bleibt ein metastabiles C3b genanntes Molekül übrig (2).

Das intakte C-3 Molekül hat ein MG von 185 kDa und besteht aus einer leichten Kette (75 kDa) und schweren Kette (110 kDa). C 3 wird in das Anaphylaxin C3a (9 kDa) und in die aktivierte Form von C-3, das C3b gespalten. Dies ist das zentrale Ereignis der Komplementaktivierung (17; 25).

Sowohl im Bereich der schweren als auch der leichten Kette sind keine immunoreaktiven Banden auf den Blots zu erkennen. Dafür sind kräftige Banden im Bereich von 45-50 kDa, vor allem in der NC-Gruppe zu erkennen. Dies weist auf eine Aktivierung des Komplementsystems hin.

Es kann sich hier um die Fragmente C 3d (34 kDa) oder C 3dg (40 kDa) handeln (25; 51). Zusammenfassend kann jedoch gesagt werden, dass C-3 eine Schlüsselrolle in der weiteren Blutaktivierung spielt (51).

Besonders ist auf die Korrelation zwischen den adsorbierten Komponenten C 1-INH, C-3 und dem TCC Gehalt im Plasma zu verweisen. Unsere Versuche zeigen, dass in der HC-Gruppe weniger C-3-Fragmente an der Oberfläche adhäreren d.h. weniger Aktivierung des Komplementsystems aufgrund der geringeren Adhäsion von C-3-Proteinfragmenten stattgefunden hat. Diese „kontaktaktivierten“ C-3 Fragmente können zu einer direkten und indirekten Aktivierung des Komplementsystems führen. Die Konzentration des generierten SC5b-9 im Plasma ergab keinen Anhalt auf einen Unterschied zwischen beiden Gruppen bezüglich der Aktivierung des Komplementsystems.

## 2.4. CD 41 und Fibrinogen

Die Aggregation der Plättchen untereinander wird über die Bindung an Fibrinogen und  $\text{Ca}^{2+}$  an GP IIb/IIIa-Rezeptoren der Plättchenmembran vermittelt. In nicht aktivierten Plättchen ist der GP IIb/IIIa-Rezeptor nicht in der Lage, Fibrinogen oder andere Liganden (Vibronektin, Fibronectin, vWF) zu binden. Im Verlauf der Aktivierung der Plättchen findet, unabhängig von der Art des Agonisten, eine Konformationsänderung des GP IIb/IIIa-Rezeptors statt, so dass hochaffine Bindungsstellen für Fibrinogen exprimiert werden und damit die Bildung von stabilen Plättchenaggregaten erfolgen kann (12).

Der GP IIb/IIIa Komplex auf der Oberfläche der Thrombozyten ist ein Rezeptor, der unter Zuhilfenahme von Fibrinogen sowohl die Plättchenaggregation als auch die Bindung von Thrombozyten an künstliche Oberflächen vermittelt (13; 18).

Innerhalb von Sekunden nachdem Blut mit synthetischer Oberfläche Kontakt hat, werden Plasmaproteine adsorbiert. Diese adsorbierten Proteine kontrollieren die später erfolgende Thrombozytenadhäsion durch Interaktion mit zwei verschiedenen Plättchenadhäsionsrezeptoren GP IIb/IIIa und GP Ib. An die Oberfläche gebundenes Fibrinogen und vWF sind Proteine, die RGD-Sequenzen (Arginin-Glycin-Asparginsäure) beinhalten, die eine hohe Affinität für GP IIb/IIIa haben. Der Thrombozytenrezeptor GP Ib veranlasst Thrombozyten-adhäsion und -aktivierung durch Binden an die Oberfläche gebundenen vWF (36).

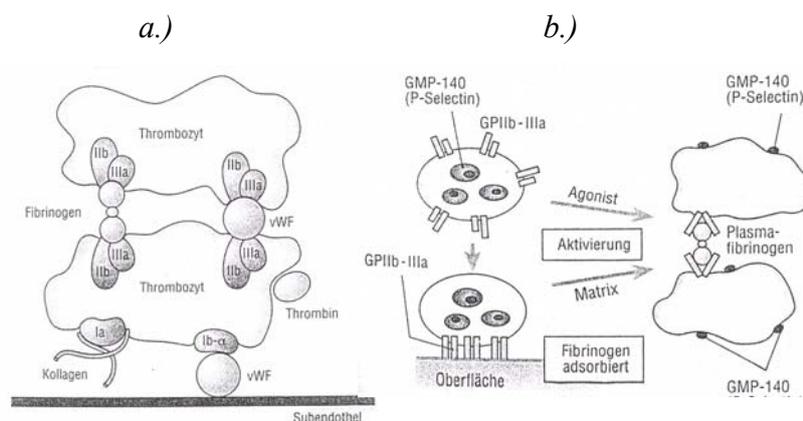


Abb. 12: Molekulare Mechanismen der Thrombozytenadhäsion und Aggregation (27)

*a) agonisteninduzierte Aktivierung des GP IIb/IIIa-Komplex und Bindung von löslichem Fibrinogen und vWF.*

*b) matrixinduzierte Aktivierung des GP IIb/IIIa-Komplex nach Thrombozytenadhäsion an adsorbiertes Fibrinogen mit nachfolgender Aggregation*

CD 41 kommt zellulär als Oberflächenmolekül auf den Thrombozyten vor. Seine Funktion ist die Aktivierung und Aggregation von Thrombozyten. Es ist der Rezeptor für Fibrinogen und Fibrinectin. Als Synonym wird die GP IIb-Komponente des GP IIb/IIIa-Komplexes verwendet, wobei für GP IIIa das Synonym CD 61 verwendet wird (2).

Die Adhäsion von Plasmaproteinen (vWF, Fibrinogen) an künstliche Oberflächen führt zu einer rezeptorvermittelten (GP IIb/IIIa) Adhäsion und Aktivierung von Thrombozyten, und als Folge zu Aggregation und im Weiteren zu thromboembolischen Prozessen. Das CD 41 Antigen (GP IIb) ist verbunden mit CD 61 (GP IIIa). Zusammen bilden sie den (GP IIb/IIIa) Komplex, der bekannt ist als der induzierende Rezeptor für diese Adsorptionsproteine (51).

Es ist allgemein bekannt dass hohe Konzentrationen an materialgebundenen Fibrinogen zur Aktivierung und Aggregation von Thrombozyten und schließlich Thrombosierungsprozessen führen. Neuere Untersuchungen zeigen insbesondere für Fibrinogen, dass einer bestimmten Proteinkonformation des adsorbierten Proteins ein stärkerer Einfluss auf Adhäsion und Aktivierung von Blutzellen zuschreiben ist, als der eigentlichen Konzentration des entsprechenden adsorbierten Proteins (50). Weitere Untersuchungen konnten an heparin-beschichteten Oberflächen geringere Adsorption von Thrombozyten nachweisen ohne nennenswerte Beeinflussung der adhären Plasmaproteine Fibrinogen und vWF zu finden (36).

In unseren Untersuchungen ergaben sich keine nennenswerten Unterschiede im Bezug auf Adhäsion von CD 41 und Fibrinogen an Oxygenatoroberflächen beider Gruppen.

## **2.5. AT III**

Im Blut stehen den proteolytischen Enzymen des plasmatischen Gerinnungssystems physiologisch unterschiedlich wirkende, spezifische Hemmstoffe gegenüber. Antithrombin III gehört zum Inhibitortyp der Serpine (Serinproteaseinhibitoren). Es

bildet mit Proteasen inaktive äquimolare Komplexe. Die Affinität von AT III ist besonders hoch gegenüber Thrombin und F IXa während F IXa, F XIa, F XIIa und Kallikrein schwächer gehemmt werden (12).

Die Bindung von AT III Molekülen an die oberflächengebundenen Heparinmoleküle ist essentiell für die Inhibierung der Kontaktaktivierung an dieser Oberfläche während der ECC. Von diesem Phänomen wird geglaubt, dass es die Bindung von AT III an Heparansulfat des Gefäßendothels nachahmt (24).

Endpunkt befestigtes Heparin führt zu einer Oberfläche, welche die Triggerung der Kontaktphasenaktivierung verhindert. Die Dichte der „Oberflächen“-Heparin-Moleküle, welche intakte AT III Bindungsstellen besitzen, ist ausschlaggebend für die Aktivierung der Kontaktphase. Eine geringe Dichte an Bindungsstellen, ist mit erhöhter Kontaktphasenaktivierung verbunden. In diesem Fall reduziert sich die Kapazität des wandständigen Heparins AT III zu binden, welches zu einer Minderung der Fähigkeit dieser Oberfläche führt die Kontaktaktivierung zu hindern. AT III ist ein kritischer Gerinnungsinhibitor für die Unterdrückung der Kontaktaktivierung von Endpunkt befestigten Heparin (43).

Es wird stark vermutet, dass u. a. die verstärkte Adhäsion von AT III an heparin-beschichteten Oberflächen, der zugrunde liegende Mechanismus für die reduzierte Aktivierung des Blutgerinnungssystems im Vergleich zu unbeschichteten Oberflächen ist.

In unseren Untersuchungen ergaben sich Unterschiede zwischen beiden Gruppen im Bezug auf Adhäsion von AT III an den Oxygenatoroberflächen.

Bei heparin-beschichteten Oberflächen konnte mehr adsorbiertes AT III als bei Unbeschichteten festgestellt werden. Dies lässt auf eine geringere Aktivierung des Gerinnungssystems schließen, welches durch verschiedene andere Parameter wie beispielsweise  $\beta$ -TG und höhere Thrombozytenzahlen bestätigt wird.

## **2.6. HSP 70**

Hitzeschockproteine (Hsp) werden generell als Stressproteine bezeichnet und sind höchst konservative Proteine, die unter anderem für ihre lebenserhaltenden Funktionen in Zellen bekannt sind. Humanzellen exprimieren Hsp 70 auch unter normalen physiologischen Bedingungen. Die Expression dieser Proteine lässt sich jedoch durch verschiedene Stressfaktoren stark induzieren. Stress auslösende Faktoren sind nicht nur

erhöhte Temperaturen (Hitzeschock), sondern auch beispielsweise Zelldifferenzierungsprozesse, Wachstumsfaktoren oder hormonelle Stimulation. Generell wird davon ausgegangen, dass Stressproteine als sog. „Chaperone“ fungieren, d. h. dass sie die richtige Faltung anderer Proteine und damit für deren biologische Funktion verantwortlich sind. Weiterhin ist bekannt, dass hohe Konzentrationen an Hsp 70 einen erhöhten Schutz der Zelle gegenüber nachfolgenden Stressbehandlungen darstellen. Von Hsp 70 wird vermutet, dass es als sensitiver Marker zur Bewertung von Fremdmaterialien dienen kann (50).

Die Ergebnisse der Westernblots ergaben eine leicht erhöhte Adhäsion von Hsp 70 an heparin-beschichteten Oberflächen.

Da die Forschungen bezüglich Hsp 70 noch am Anfang stehen und die Ergebnisse stark variieren, scheint es verfrüht eine abschließende Aussage zur Markerqualität zu formulieren. Vermutlich ist der erhöhten Adsorption von Hsp 70 an Fremdoberflächen eher eine positive Eigenschaft zuzuschreiben.

### **3. REM-Aufnahmen**

Auf Oberflächen beider Gruppen konnten minimale Ablagerungen im ähnlichen Umfang festgestellt werden. (Abb. 13) Über einen einzelnen Thrombozyten in der HC-Gruppe hinaus (Abb. 13), sind keine zellulären Ablagerungen bei beiden Gruppen gefunden worden. Aufgrund der minimalen Differenzen kann aus der REM-Untersuchung kein nennenswerter Unterschied zwischen beiden Gruppen aufgezeigt werden.

## **VI. Zusammenfassung**

Bekanntlich kommt das gesamte Blut des Patienten beim CPB unter Einsatz der HLM über einen Zeitraum von teilweise mehreren Stunden mit ca. 4-5 m<sup>2</sup> Fremdoberflächen in Berührung, wobei 2-3 m<sup>2</sup> auf den Oxygenator fallen (11). Blut-Material-Interaktionen führen im Allgemeinen zur Aktivierung der humoralen und zellulären Abwehrmechanismen und setzen verschiedene Kaskadensysteme in Gang. Dies bedeutet ein Risiko von intra- und postoperativen klinischen Komplikationen. Der Kontakt zwischen dem Blut und den verschiedenen künstlichen Oberflächen des extrakorporalen Systems führt sehr oft zu einer systemischen Entzündungsreaktion, dem PPS, welches bis hin zum SIRS, ARDS, Sepsis und Multiorganversagen eskalieren kann (53).

Verschiedene Ursachen können hierfür verantwortlich gemacht werden. Mechanische und chemotaktische Aktivierungen und Membranschädigungen der korpuskulären Blutbestandteile, Dysfunktion der zellulären Immunregulation, Aktivierung der durch verschiedene Feedback-Mechanismen miteinander verknüpften Kaskadenreaktionen der Kontaktphase, der intrinsischen und thrombozytären Gerinnung, der Fibrinolyse, des Komplementsystems, sowie deren zell- und gewebe-schädigenden Freisetzungserzeugnisse wie Endotoxine, freie Radikale, Zytokine, PMN-Elastase, Kollagenase, terminaler Lysekomplex. (55).

Angesichts dieser Komplikationen wird schon seit vielen Jahren an der Verbesserung von extrakorporalen Kreislaufsystemen gearbeitet. Zur Erzielung hämokompatibler Oberflächen haben sich zwei Verfahren etabliert. Einerseits die Entwicklung blutverträglicher Werkstoffe und andererseits die Oberflächenmodifikationen bekannter Werkstoffe durch besondere Beschichtung, wie beispielsweise mit Hirudin, Prostaglandin und Heparin (53).

Die Effekte der Heparinbeschichtung, insbesondere die materialspezifische Blutaktivierung, können mit Hilfe eines HLM-Modells nachgewiesen werden. Verbesserungen im Bereich der Biokompatibilität können durch Vergleich der Leistungen von beschichteten mit nicht beschichteten Systemen festgestellt werden.

In vitro-Studien können entscheidend zur Beurteilung der Hämokompatibilität einer Oberflächenbeschichtung beitragen. Insbesondere ermöglicht es die Effekte

materialspezifischer Eigenschaften auf die Blutaktivierung nachzuweisen auch ohne Patient und ohne Variablen der Operation (15). Hat sich die Beschichtung in den in vitro-Versuchen bewährt, erfolgen später Tiermodell- und Patientenstudien (54).

### In-vitro-Studie

In der vorliegenden Studie werden mit Hilfe eines HLM-Modells Oxygenatoren gleicher Bauweise aber mit unterschiedlicher Oberflächenbeschichtung bezüglich ihrer Blutaktivierung untersucht.

Im Rahmen einer 90-minütigen Rezirkulation werden die Effekte der Heparinbeschichtung auf die Blutaktivierung mittels löslicher Aktivierungsmarker, REM-Aufnahmen und adhärierter Plasmaproteine untersucht. Verwendet werden 5 unbeschichtete (Kontrolle) und 5 heparin-beschichtete Membranoxygenatoren der Firma TERUMO- CORPORATION, Tokyo, Japan.

Es werden vergleichende Untersuchungen beider Oxygenatoren in Bezug auf das Adsorptions- und Aktivierungsverhalten von Plasmaproteinen an Fremdoberflächen und die daraus resultierenden Zellaktivierungen durchgeführt. Es erfolgte die qualitative Bestimmung von 7 nachfolgend genannten Adsorptionsproteinen mittels der Methode des Western-Blotting, da diese Technik sowohl die Detektion aktiver Proteinfragmente als auch die Messung denaturierter Proteine ermöglicht. (Fibrinogen, AT III, HMWK, CD 41, C-1INH, C-3 Komplement und Hsp 70)

Als richtungweisende Parameter sind Leukozyten, Thrombozyten, Hämolyse, freies Hämoglobin, PMN-Elastase,  $\beta$ -Thromboglobulin, Faktor XII, Heparin, SC 5b-9 (TCC) und TAT-Komplex bestimmt worden um die Wirkungen auf das Gerinnungssystem, Komplementsystem, FXII-Kallikrein-Kinin-System, die Fibrinolyse und die Blutzellen zu untersuchen.

Bei sich kaum unterscheidenden Hämolysewerten, konnten deutlich erhöhte Plättchenzahlen und geringere Freisetzung von  $\beta$ -Thromboglobulin bei der Verwendung von heparin-beschichteten Oxygenatoren beobachtet werden.

Es konnte kein schützender Effekt der mit Heparin vergüteten Oberfläche bezüglich mechanischer Schädigung der Thrombozyten festgestellt werden. Die Ergebnisse zeigen weiterhin, dass eine geringere Thrombozyten-adhäsion und -aggregation beim beschichteten Oxygenator stattgefunden hat. Die Thrombozytenfunktion war während

CPB bei heparin-beschichteten Oxygenatoren deutlich verbessert. Der Anstieg der Heparinkonzentrationen im Plasma bei den beschichteten Oxygenatoren kann mit dem sog. Auswaschprozess der Heparinbeschichtung interpretiert werden. Da nur geringe Mengen des wandständigen Heparins ausgewaschen werden, ist eher von einer minimalen systemischen Wirkung auszugehen.

Im Laufe der Versuchsdurchführung ist bei beiden Gruppen eine Zunahme der TAT-Komplexe zu erkennen, wobei in der HC-Gruppe ein deutlich erhöhter Zuwachs im Vergleich zur NC-Gruppe zu verzeichnen ist. Eine Zunahme der gebildeten TAT-Komplexe deutet auf eine Zunahme der Gerinnungskaskade mit vermehrter Bildung von Thrombin hin. Diesem Anstieg muss eine Aktivierung von Thrombozyten, F XII, F IX, F XI und F X vorausgegangen sein (16).

Die deutlichen TAT-Konzentrationsanstiege in der HC-Gruppe passen allgemein nicht zu den o.g. und durch mehrere andere Parameter untermauerten Ergebnissen. Möglicherweise reagiert dieser Komplex oder der dazugehörige Test am sensibelsten auf äußere Einflüsse (37).

Untersuchungen zeigen, dass die adsorbierten Plasmaproteine ein überwiegend unterschiedliches Adsorptionsverhalten bezüglich heparin-beschichteter und unbeschichteter Oberflächen haben. Die Konzentrationen bestimmter adsorbierter Proteine an Oberflächen, stellen ein entscheidendes Kriterium für deren Biokompatibilität dar. Überwiegend positive Eigenschaften können der Adsorption von HMWK, C1-INH, und AT III zugeschrieben werden. Im Gegensatz dazu ist die Adsorption von Fibrinogen, CD 41 und C-3 mit einer schlechteren Hämokompatibilität der Fremdoberflächen verbunden (50).

Die verstärkte Anlagerung von HMWK und C1-INH an die heparin-beschichteten Oxygenatoren, sind ein deutliches Zeichen für bessere Hämokompatibilität dieser Beschichtung. Anhand der detektierten C-3 Fragmente bei den unbeschichteten Oxygenatoren kann eine verstärkte Komplementaktivierung vermutet werden. Jedoch lässt sich dies durch die Ergebnisse des löslichen Aktivierungsmarkers SC5b-9 nicht bestätigen. Bei heparin-beschichteten Oberflächen konnte mehr adsorbiertes AT III als bei Unbeschichteten festgestellt werden. Dies lässt auf eine geringere Aktivierung des

Gerinnungssysteme schließen, welches durch verschiedene andere Parameter wie beispielsweise  $\beta$ -TG und höhere Thrombozytenzahlen bestätigt wird. Es wird stark vermutet, dass u. a. die verstärkte Adhäsion von AT III an heparin-beschichteten Oberflächen, der zugrunde liegende Mechanismus für die reduzierte Aktivierung des Blutgerinnungssystems im Vergleich zu unbeschichteten Oberflächen ist.

#### Ausblick in die Zukunft

Die Ergebnisse dieser Untersuchung zeigen aber auch, dass sowohl immobilisiertes Heparin als auch zugesetztes Heparin nicht in der Lage sind eine Gerinnungsaktivierung vollständig zu verhindern.

Trotz der technischen Verbesserungen findet immer noch eine beträchtliche Aktivierung der Plasmaproteine und korpuskulären Blutbestandteile statt. Das Fernziel wäre die Schaffung von optimal biokompatiblen Oberflächen, die vom Blut nicht mehr als unphysiologisch erkannt werden können, und somit keine pathologische Aktivierung der humoralen und zellulären Abwehr- und Abstoßungsreaktionen stattfindet. Das vom Körper vorgegebene, technisch bisher noch lange nicht erreichte Optimum stellt nach wie vor das intakte Endothel dar (54).

## VII. Literatur

### References

1. "American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis," *Crit Care Med*, Vol. 20, No. 6, 1992, pp. 864-874.  
Ref ID: ANON1992
2. Abbas, A. K., Lichtman, A. H., and Pober, J. S., "Das Komplementsystem," *Immunologie*, edited by A. K. Abbas, A. K. Lichtman, and J. S. Pober Verlag Hans Huber, Göttingen, 1996, pp. 354-380.  
Ref ID: ABBAS1996
3. Adolph, C.. Einfluß von vergüteten Fremdoberflächen auf Kontakphasenaktivierung und Fibrinolyse im HLM-Modell. 51-77. 1997. Medizinische Fakultät Universität Tübingen.  
Ref Type: Thesis/Dissertation  
Ref ID: ADOLPH1997
4. Asakura, S., Hurley, R. W., Skorstengaard, K., Ohkubo, I., and Mosher, D. F., "Inhibition of cell adhesion by high molecular weight kininogen," *J.Cell Biol.*, Vol. 116, No. 2, 1992, pp. 465-476.  
Ref ID: ASAKURA1992
5. Ballhause, U.. Vergleichende Untersuchungen zum fibrinolytischen System in einem HLM-Modell unter Zusatz von Hirudin, Heparin und Aprotinin. 100-152. 1995. Medizinische Fakultät Universität Tübingen.  
Ref Type: Thesis/Dissertation  
Ref ID: BALLHAUSE1995
6. Bauer, Ch., "Blut," *Basiswissen Physiologie*, edited by F. Lang Springer-Verlag, Berlin, 2000, pp. 133-156.  
Ref ID: BAUER2000
7. Birnbaum, D., "Pathophysiologie der EKZ," *Handbuch der Kardiotechnik*, edited by G. Lauterbach Urban & Fischer, München, 2002, pp. 159-170.  
Ref ID: BIRNBAUM2002
8. Borghetti, V., "Postperfusionsyndrom," *Extrakorporale Zirkulation in Theorie und Praxis*, edited by R. J. Tschaut (Ed.) Pabst Science Publishers, Lengerich, 1999, pp. 467-489.  
Ref ID: BORGHETTI1999

9. Buchwald, D., "Extrakorporale Membranoxygenation bei Erwachsenen Patienten," *Extrakorporale Zirkulation in Theorie und Praxis*, edited by R. J. Tschaut (Ed.) Pabst Science Publishers, Lengerich, 1999, pp. 567-589.  
Ref ID: BUCHWALD1999
10. Cahalan, P. T. and Verhoeven, M., "Die Carmeda-Beschichtung," *Handbuch der Kardiotechnik*, edited by G. Lauterbach Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1996, pp. 93-99.  
Ref ID: CAHALAN1996
11. Glasmacher, B. and Sellin, L., "Werkstoffkunde," *Extrakorporale Zirkulation in Theorie und Praxis*, edited by R. J. Tschaut (Ed.) Pabst Science Publishers, Lengerich, 1999, pp. 251-263.  
Ref ID: GLASMACHER1999
12. Glusa, E. and Erfurt, G., "Pharmakologie der Hämostase," *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*, edited by W. Forth, D. Henschler, W. Rummel, U. Förstermann, and K. Starke Urban & Fischer Verlag, München, 2001, pp. 409-567.  
Ref ID: GLUSA2001
13. Gluszko, P., Rucinski, B., Musial, J., Wenger, R. K., Schmaier, A. H., Colman, R. W., Edmunds, L. H., Jr., and Niewiarowski, S., "Fibrinogen receptors in platelet adhesion to surfaces of extracorporeal circuit," *Am.J.Physiol*, Vol. 252, No. 3 Pt 2, 1987, pp. H615-H621.  
Ref ID: GLUSZKO1987
14. 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.*, Vol. 22, No. 1, 1988, pp. 37-41.  
Ref ID: HIND1988
15. Hsu, L. C., "Heparin-coated cardiopulmonary bypass circuits: current status," *Perfusion*, Vol. 16, No. 5, 2001, pp. 417-428.  
Ref ID: HSU2001
16. Jakubik, C. V.. Plasmatische Veränderungen des Gerinnungs- und Fibrinolyse-systems im HLM-Modell unter Zusatz von Aprotinin. 154-176. 1995. Medizinische Fakultät Universität Tübingen.  
Ref Type: Thesis/Dissertation  
Ref ID: JAKUBIK1995
17. Janatova, J., "Detection of disulphide bonds and localization of interchain linkages in the third (C3) and the fourth (C4) components of human complement," *Biochem.J.*, Vol. 233, No. 3, 1986, pp. 819-825.  
Ref ID: JANATOVA1986

18. Jen, C. J. and Lin, J. S., "Direct observation of platelet adhesion to fibrinogen- and fibrin-coated surfaces," *Am.J.Physiol*, Vol. 261, No. 5 Pt 2, 1991, pp. H1457-H1463.  
Ref ID: JEN1991
19. Kaever, V., "Antiphlogistika und Immuntherapeutika," *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*, edited by W. Forth and D. Henschler Urban-Fischer Verlag, München, 2001, pp. 393-427.  
Ref ID: KAEVER2001
20. Kalmar, P. and Irrgang, E., "Cardiac Surgery in Germany during 2001: A Report by the German Society for Thoracic and Cardiovascular Surgery," *Thorac.Cardiovasc.Surg.*, Vol. 50, No. 6, 2002, pp. 30-35.  
Ref ID: KALMAR2002
21. 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.*, Vol. 87, No. 4, 2002, pp. 742-747.  
Ref ID: KEUREN2002
22. Khan, M. M., Kunapuli, S. P., Lin, Y., Majluf-Cruz, A., Cadena, R. A., Cooper, S. L., and Colman, R. W., "Three noncontiguous peptides comprise binding sites on high-molecular-weight kininogen to neutrophils," *Am.J.Physiol*, Vol. 275, No. 1 Pt 2, 1998, pp. H145-H150.  
Ref ID: KHAN1998
23. Kolb, W. P., "The membran attack mechanism of complement," *J.Exp.Med*, Vol. 141, 1976, pp. 724.  
Ref ID: KOLB1976
24. Kopp, R., Mottaghy, K., and Kirschfink, M., "Mechanism of complement activation during extracorporeal blood-biomaterial interaction: effects of heparin coated and uncoated surfaces," *ASAIO J.*, Vol. 48, No. 6, 2002, pp. 598-605.  
Ref ID: KOPP2002
25. Lambris, J. D., Avila, D., Becherer, J. D., and Muller-Eberhard, H. J., "A discontinuous factor H binding site in the third component of complement as delineated by synthetic peptides," *J.Biol.Chem.*, Vol. 263, No. 24, 1988, pp. 12147-12150.  
Ref ID: LAMBRIS1988
26. Leipold, A., Ermittlung der Grenzkonzentration für HMW-Heparin im HLM-Modell unter Berücksichtigung des Einflusses auf die zellulären Bestandteile des Blutes. 102-115. 1990. Medizinische Fakultät der Universität Tübingen.  
Ref Type: Thesis/Dissertation  
Ref ID: LEIPOLD1990

27. Lexikon-Redaktion, *Roche Lexikon*, 4 ed., Urban & Schwarzenberg, München, 1999, pp. 933, 1655-1657.  
Ref ID: LEXIKONREDAKTIO1999
28. Lottspeich, F. and Zorbas, H., "Elektrophoretische Verfahren," *Bioanalytik*, edited by F. Lottspeich and H. Zorbas 1998, pp. 219-252.  
Ref ID: LOTTSPPEICH1998
29. Lottspeich, F. and Zorbas, H., "Hybridisierung und Nachweistechiken," *Bioanalytik*, edited by F. Lottspeich and H. Zorbas Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 1998, pp. 635-671.  
Ref ID: LOTTSPPEICH1998B
30. Lottspeich, F. and Zorbas, H., "Immunologische Techniken," *Bioanalytik*, edited by H. Zorbas and F. Lottspeich Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 1998, pp. 67-102.  
Ref ID: LOTTSPPEICH1998A
31. Marinius, J. L. M., "Duraflo-II-beschichtete extrakorporale Kreislaufsysteme," *Handbuch der Kardiotechnik*, edited by G. Lauterbach Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1996, pp. 80-92.  
Ref ID: MARINIUS1996
32. Marshall, J. C., "Inflammation, coagulopathy, and the pathogenesis of multiple organ dysfunction syndrome," *Crit Care Med*, Vol. 29, No. 7 Suppl, 2001, pp. S99-106.  
Ref ID: MARSHALL2001
33. Michaelson, A. D., "Pathomechanism of defective hemostasis during and after extracorporaal circulation: The role of platelets," *Blood use in cardiac surgery*, edited by N. H. R. Friedel and D. Royston Springer, New York, 1991, pp. 16-21.  
Ref ID: MICHAELSON1991
34. Mutschler, E., Geisslinger, G., Kroemer, H. K., and Schäfer-Körting, M., "Immunsystem und immunologisch wirksame Stoffe," *Mutschler Arzneimittelwirkungen*, edited by E. Mutschler Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, Stuttgart, 2001, pp. 909-937.  
Ref ID: MUTSCHLER2001
35. Müller-Eberhard, H. J., "The Membran Attack Complex," *Seminars in Immunopathologie* Springer-Verlag, 1984, pp. 93.  
Ref ID: MÜLLEREBERHARD1984
36. 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.*, Vol. 89, No. 3, 1999, pp. 573-579.  
Ref ID: NIIMI1999

37. Öckl, R.. Evaluierung einer Testmethode zur quantitativen Analyse der Thrombogenität von Biomaterialien. 106-141. 1997. Medizinische Fakultät der Universität Tübingen.  
Ref Type: Thesis/Dissertation  
Ref ID: ÖCKL1997
38. Petrides, P. E., "Immunsystem," *Biochemie und Pathobiochemie*, edited by P. E. Petrides and G. Löffler Springer-Verlag, Berlin, 1998, pp. 1057-1088.  
Ref ID: PETRIDES1998
39. Pfeifer, M. P. A., "Extrakorporale Lungenunterstützungsverfahren," *Handbuch der Kardiotechnik*, edited by G. Lauterbach Urban & Fischer, München, 2002, pp. 305-319.  
Ref ID: PFEIFER2002
40. Prondzinsky, R., Muller-Werdan, U., Pilz, G., Witthaut, R., Stabenow, I., Werdan, K., and Zerkowski, H. R., "[Systemic inflammatory reactions to extracorporeal therapy measures (II): Cardiopulmonary bypass]," *Wien.Klin.Wochenschr.*, Vol. 109, No. 10, 1997, pp. 346-353.  
Ref ID: PRONDZINSKY1997
41. Reddigari, S. and Kaplan, A. P., "Cleavage of human high-molecular weight kininogen by purified kallikreins and upon contact activation of plasma," *Blood*, Vol. 71, No. 5, 1988, pp. 1334-1340.  
Ref ID: REDDIGARI1988
42. Rommelsheim, K., Schlebusch, H., Orellano, L., Schwidetzky, F., and Klehr, U., "[PMN elastase in extracorporeal circulation procedures]," *Anasth.Intensivther.Notfallmed.*, Vol. 22, No. 1, 1987, pp. 3-7.  
Ref ID: ROMMELSHEIM1987
43. Sanchez, J., Elgue, G., Riesenfeld, J., and Olsson, P., "Inhibition of the plasma contact activation system of immobilized heparin: relation to surface density of functional antithrombin binding sites," *J.Biomed.Mater.Res.*, Vol. 37, No. 1, 1997, pp. 37-42.  
Ref ID: SANCHEZ1997
44. Scott, C. F., Silver, L. D., Purdon, A. D., and Colman, R. W., "Cleavage of human high molecular weight kininogen by factor XIa in vitro. Effect on structure and function," *J.Biol.Chem.*, Vol. 260, No. 19, 1985, pp. 10856-10863.  
Ref ID: SCOTT1985B
45. Sprung, C. L., Peduzzi, P. N., Shatney, C. H., Schein, R. M., Wilson, M. F., Sheagren, J. N., and Hinshaw, L. B., "Impact of encephalopathy on mortality in the sepsis syndrome. The Veterans Administration Systemic Sepsis Cooperative Study Group," *Crit Care Med*, Vol. 18, No. 8, 1990, pp. 801-806.  
Ref ID: SPRUNG1990

46. Terumo Corporation Tokyo, J.. Bedienungsanleitung Capiiox SX 18. 2000.  
Ref Type: Pamphlet  
Ref ID: TERUMOCORPORATI2000
47. Thews, G., "Atmung," *Physiologie des Menschen*, edited by R. F. Schmidt and G. Thews Springer-Verlag, Berlin, 1995, pp. 604-608.  
Ref ID: THEWS1995
48. Usui, A., Hiroura, M., and Kawamura, M., "Heparin coating extends the durability of oxygenators used for cardiopulmonary support," *Artif.Organs*, Vol. 23, No. 9, 1999, pp. 840-844.  
Ref ID: USUI1999
49. Vogt, S., Troitzsch, D., Kasseckert, S., Moosdorf, R., and Weitkemper, H. H., "Interaktionen des Blutes mit den künstlichen Oberflächen im extrakorporalen Kreislauf," *Extrakorporale Zirkulation in Theorie und Praxis*, edited by R. J. Tschaut (Ed.) Pabst Science Publishers, Lengerich, 1999, pp. 700-712.  
Ref ID: VOGT1999
50. Weber, N.. Untersuchungen zur Hämokompatibilität von Biomaterialien. 7. 2001. Fakultät der Biologie Universität Tübingen.  
Ref Type: Thesis/Dissertation  
Ref ID: WEBER2001
51. Weber, N., Wendel, H. P., and Ziemer, G., "Hemocompatibility of heparin-coated surfaces and the role of selective plasma protein adsorption," *Biomaterials*, Vol. 23, No. 2, 2002, pp. 429-439.  
Ref ID: WEBER2002
52. Weiss, CH., "Blut und Blutkreislauf," *Pysiologie des Menschen*, edited by G. F. Schmidt and G. Thews Springer Verlag, Berlin, 1995, pp. 411-426.  
Ref ID: WEISS1995
53. Wendel, H. P., "Heparinbeschichtete Systeme," *Extrakorporale Zirkulation in Theorie und Praxis*, edited by R. J. Tschaut (Ed.) Pabst Science Publishers, Lengerich, 1999, pp. 675-692.  
Ref ID: WENDEL1999
54. Wendel, H. P., "Beschichtungstechniken für Werkstoffe der EKZ-Systeme," *Handbuch der Kardiatechnik*, edited by G. Lauterbach Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 2002, pp. 106-124.  
Ref ID: WENDEL2002
55. Wendel, H. P., "Hämostase," *Handbuch der Kardiatechnik*, edited by G. Lauterbach Urban & Fischer Verlag, München, 2002, pp. 93-105.  
Ref ID: WENDEL2002A

56. Wendel, H. P., Hauser, N., Briquet, F., and Ziemer, G., "Hemocompatibility of medical connectors with biopassive or bioactive surface coatings," *J.Biomater.Appl.*, Vol. 17, No. 1, 2002, pp. 5-17.  
Ref ID: WENDEL2002B
  
57. Wendel, H. P., Philipp, A., Weber, N., Birnbaum, D. E., and Ziemer, G., "Oxygenator thrombosis: worst case after development of an abnormal pressure gradient--incidence and pathway," *Perfusion*, Vol. 16, No. 4, 2001, pp. 271-278.  
Ref ID: WENDEL2001
  
58. Wendel, H. P., Weber, N., and Ziemer, G., "[Comparative studies of the adsorption behavior of plasma proteins to heparin-coated surfaces]," *Biomed.Tech.(Berl)*, Vol. 45, No. 10, 2000, pp. 282-287.  
Ref ID: WENDEL2000A
  
59. Wendel, H. P. and Ziemer, G., "Coating-techniques to improve the hemocompatibility of artificial devices used for extracorporeal circulation," *Eur.J.Cardiothorac.Surg.*, Vol. 16, No. 3, 1999, pp. 342-350.  
Ref ID: WENDEL1999A
  
60. Yung, L. Y., Lim, F., Khan, M. M., Kunapuli, S. P., Rick, L., Colman, R. W., and Cooper, S. L., "Neutrophil adhesion on surfaces preadsorbed with high molecular weight kininogen under well-defined flow conditions," *Immunopharmacology*, Vol. 32, No. 1-3, 1996, pp. 19-23.  
Ref ID: YUNG1996
  
61. Yung, L. Y., Lim, F., Khan, M. M., Kunapuli, S. P., Rick, L., Colman, R. W., and Cooper, S. L., "High-molecular-weight kininogen preadsorbed to glass surface markedly reduces neutrophil adhesion," *Biomaterials*, Vol. 21, No. 4, 2000, pp. 405-414.  
Ref ID: YUNG2000
  
62. Zetkin, M. and Schaldach, H., *Lexikon der Medizin*, 16 ed., Ullstein Medical Verlagsgesellschaft mbH & Co., Wiesbaden, 1999, pp. 250.  
Ref ID: ZETKIN1999

## VIII. Anhang

### 1. Einzelwerte der Testreihen und entsprechende Mittelwerte

Testreihe	Oxygenator	Kurzbezeichnung	Blutgewicht (g)	Blutvolumen (ml)	Maschinen- füllvolumen (MFV) (ml)	Liquemin® (IE) d.h. 3 IE/ml MFV	Liquemin® (µl)
1	CX*SX18	un-coated	525,4	491	764,8	2294,4	458,9
3	CX*SX18H	heparin-coated	562,4	525,6	799,4	2398,2	479,6
4	CX*SX18	un-coated	528,5	493,9	767,7	2303,1	460,6
6	CX*SX18H	heparin-coated	571	533,6	807,4	2422,2	484,4
7	CX*SX18	un-coated	502,3	469,4	743,2	2229,6	445,9
9	CX*SX18H	heparin-coated	562,2	525,4	799,2	2397,6	479,5
10	CX*SX18	un-coated	561,3	524,6	798,4	2395,2	479
12	CX*SX18H	heparin-coated	552,6	516,4	790,2	2370,6	474,1
13	CX*SX18	un-coated	563,2	526,4	800,2	2400,6	480,1
15	CX*SX18H	heparin-coated	558,4	521,9	795,7	2387,1	477,4
<b>Mittelwerte</b>			<b>548,7</b>	<b>512,8</b>	<b>786,6</b>	<b>2359,9</b>	<b>472</b>

Tabelle 3: Einzelwerte der Testreihen und entsprechende Mittelwerte

## 2. Aufteilung der Testreihen in REM- und elektrophoretische Untersuchung

Testreihe	Bezeichnung Oxygenator	Kurzbezeichnung	REM Aufnahmen	Elution Elektrophorese Westernblot
1	CX*SX18	un-coated	X	
3	CX*SX18H	heparin-coated	X	
4	CX*SX18	un-coated	X	
6	CX*SX18H	heparin-coated		X
7	CX*SX18	un-coated		X
9	CX*SX18H	heparin-coated	X	
10	CX*SX18	un-coated		X
12	CX*SX18H	heparin-coated		X
13	CX*SX18	un-coated		X
15	CX*SX18H	heparin-coated	X	

Tabelle 4: Aufteilung der Testreihen in REM- und elektrophoretische Untersuchung

### 3. P-Werte der einfaktoriellen Varianzanalyse

	0'	2'	5'	10'	20'	30'	60'	90'
Heparin		0,635838883				0,303693811	0,208190642	0,099235446
Hämolyse	0,717263628		0,255021648		0,51327297	0,199679001	0,319279267	0,239196218
Thrombozyten	0,91134336	0,268128679	0,000636414	1,58605E-05	2,198393661	1,79969E-06	0,005384822	0,18984141
Leukozyten	0,270638747	0,267767151	0,267597741	0,287011173	0,181196959	0,159862009	0,174608742	0,214261741
Tromboglobulin	0,98408056	0,884840679	0,000389563	0,001882823	0,002297121	0,000838202	0,000100663	2,64748E-06
PMN-Elastase	0,196367603		0,376240076		0,987033554	0,627039516	0,336525373	0,998713224
TAT	0,391110398						0,033166262	0,0087334
SC-5b-9	0,809994235		0,936725938		0,807731181	0,654743514	0,645689616	0,757763611
F XII	0,11959817		0,125201669		0,082490662	0,256683373	0,092948783	0,097616916

p>=0,05 nicht signifikant

p<0,05 signifikant

p< 0,01 hoch signifikant

Tabelle 5: P-Werte der einfaktoriellen Varianzanalyse

**4. Relative Dominanz und Markanz der Hauptbande im Blot, Molekularmassen (kDa) der sichtbaren und berichteten Banden für Westernblot von SDS-Eluaten beschichteter und unbeschichteter Oxygenatoren**

Adhäsionsproteine	Vergleich dominanter und markanter Banden		sichtbare Banden im Blot		berichtete Banden (kDa)(50)	
	<i>NC-Gruppe</i>	<i>HC-Gruppe</i>	<i>NC-Gruppe</i>	<i>HC-Gruppe</i>	<i>intaktes Protein</i>	<i>red. SDS-PAGE</i>
<i>C-3-Komplement</i>	(++)	(±)	~50	~50	185	110/75
<i>C-1-Est.-Inhibitor</i>	(-)	(+)	n. nachweisbar	~105	105	105
<i>CD 41</i>	(+)	(+)	~120/75/60/30	~120/75/60/30	136,5	114/22,5
<i>AT III</i>	(±)	(+)	~80	~60	49-58	49-58
<i>HSP 70</i>	(++)	(+)	~20	~20/70	70	70
<i>HMWK</i>	(+)	(+)	~120	~120/60/50	120	120
<i>Fibrinogen</i>	(+)	(+)	~60/50/30	~60/50/30	340UE 67/58/47	67/58/47

Tabelle 6: Relative Dominanz und Markanz der Hauptbande im Blot, Molekularmassen (kDa) der sichtbaren und berichteten Banden (50) für Westernblot von SDS-Eluaten beschichteter und unbeschichteter Oxygenatoren.

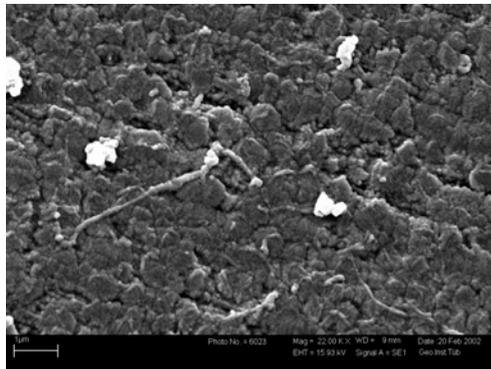
## 5. REM-Aufnahmen



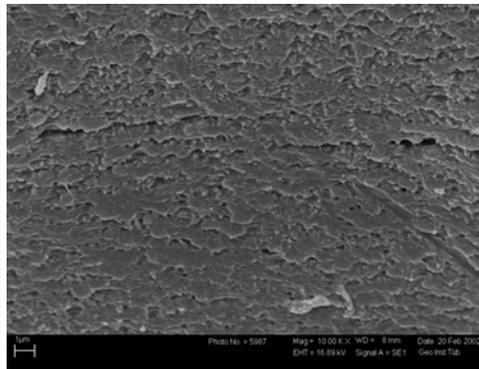
a.) NC- Gruppe 2µm



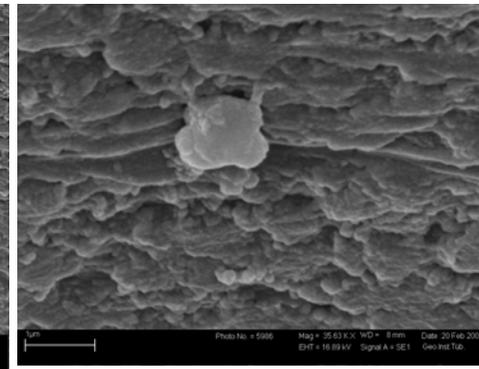
b.) HC- Gruppe 2µm



c.) NC-Gruppe 1µm



d.) HC-Gruppe 1µm



e.) HC- Gruppe 1µm

Abb. 13: REM Aufnahmen von heparin-beschichteten (HC) und unbeschichteten (NC) Oxygenatorfasern

## Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. G. Ziemer danke ich für die Überlassung des Themas, die freundliche und stets gewährte Unterstützung, die Korrektur und die Berichterstattung.

Besonders möchte ich mich bei Herrn Dr. rer. nat. H.P. Wendel für die intensive und freundliche Betreuung, sowie die geleistete Unterstützung bei dieser Arbeit bedanken.

Meinen besonderen Dank für die stets erfahrene Hilfsbereitschaft möchte ich Frau Doris Armbruster, Frau Michaela Braun, Frau Ingrid Schulz, Frau Anja Zimmermann, Herrn Bernd Neumann und Herrn Jan Hoffmann aussprechen.

Mein herzlicher Dank gilt weiterhin allen Mitarbeitern des Forschungslabors für Herz-Thorax- und Gefäßchirurgie der Universitätsklinik Tübingen, nicht nur für die tatkräftige Unterstützung, sondern auch für die freundliche und kollegiale Zusammenarbeit.

# **Curriculum Vitae**

## **persönliche Daten**

Name, Vorname: Freitag, Mathias

Geburtsdatum und Geburtsort: 19. August 1975 in Meissen

Familie: Freitag, Peter, Dipl. Ing. Maschinenbau (FH),  
Freitag, Renate, Dipl. Betriebswirt (FH),  
Zwillingsbruder Freitag, Hans-Peter, Zahnarzt

## **Schulbildung**

Abitur 1996 Nellenburg-Gymnasium Stockach  
Abiturfächer: Mathematik LK, Chemie LK

## **Wehrdienst**

Juli 1996 - 1998 Ausbildung zum Reserveoffizier  
der Gebirgsjägertruppe in Mittenwald

Mai 1998 Offizierprüfung an der Offizierschule des Heeres  
in Hannover

Juli 1999 Ernennung zum Leutnant der Reserve

Juli 2002 Ernennung zum Oberleutnant der Reserve

## **Studium**

WS 1998 Beginn mit dem Zahnmedizinstudium an der Eberhard-  
Karls Universität in Tübingen

Oktober 1999 naturwissenschaftliche Vorprüfung

Oktober 2001 zahnärztliche Vorprüfung

3. Dezember 2004 Staatsexamen Zahnmedizin und Approbation als  
Zahnarzt

seit April 2005 Wissenschaftlicher Mitarbeiter und Assistenz Zahnarzt  
in der Abteilung für Zahnerhaltung und Parodontologie  
der Universitätsklinik Freiburg

Mathias Freitag