

Entwicklung und Validierung
eines Testsystems zur Evaluierung der
gerinnungsaktivierenden Potenz
von Bauchtüchern

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnheilkunde

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Nathan, Tanja Olga

2015

Dekan:

Professor Dr. I.B. Autenrieth

1. Berichterstatter:

Professor Dr. H.P. Wendel

2. Berichterstatter:

Professor Dr. G. Bruchelt

**Meinen Eltern
&
Meiner Schwester**

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	I
1. Einleitung.....	1
1.1 Einführung.....	1
1.2 Bauchtücher.....	2
1.3 Maßnahmen zur Minimierung des interoperativen Blutverlusts.....	3
1.4 Bauchtücher in der Herzchirurgie.....	5
1.5 Heparin.....	8
1.6 Hämostase.....	10
1.6.1 Das Gefäßsystem.....	10
1.6.2 Primäre Hämostase.....	11
1.6.3 Sekundäre Hämostase.....	12
1.7 Gerinnungsparameter.....	17
1.7.1 International Normalized Ratio (Quickwert) und aPTT.....	17
1.7.2 Activated clotting time.....	18
1.8 Das Fibrinolysesystem.....	20
1.9 Ziel der Arbeit.....	22
2. Material und Methoden.....	24
2.1 Material.....	24
2.1.1 Chemikalien.....	24
2.1.2 Labormaterialien und Geräte.....	24
2.1.3 Bauchtücher.....	25
2.1.4 Blutproben.....	26
2.2 Methoden.....	28
2.2.1 Vorbereitung.....	28
2.2.2 Versuchsdurchführung.....	29
2.2.3 Gerinnungsmessung mit dem ACT- Gerät: Hemochron Jr. II.....	31
2.2.4 Rasterelektronenmikroskopie.....	32
3. Ergebnisse.....	33
3.1 Basisdaten.....	33
3.2 Auswertung der Daten.....	34
3.2.1 Auswertung der Activated Clotting Time.....	36

3.2.2 Auswertung der Reaktion der Probanden auf die verschiedenen Bauchtuchchargen.....	37
3.3 Auswertung der verschiedenen Bauchtuchchargen	39
3.4 Aussagekraft der Ergebnisse und Schlussfolgerung	45
4. Diskussion	50
4.1 Notwendigkeit eines etablierten Thrombogenitätstestsystems für Bauchtücher ..	50
4.2 Prinzip des Testverfahrens	52
4.3 Zusammenhang zwischen der ACT und Blutgerinnung	54
4.4 Einfluss der Testbedingungen auf die Testergebnisse.....	56
4.4.1 Heparinkonzentration.....	56
4.4.2 ACT	57
4.4.3 Temperatur	60
4.4.4 Einfluss der Blutabnahmetechnik	62
4.5 Mögliche Auswirkungen der verwendeten Farbstoffe.....	66
4.5.1 Polydiallylamine	67
4.6 Ausblick.....	69
5. Zusammenfassung	72
6. Erklärung zum Eigenanteil	74
7. Abbildungsverzeichnis.....	75
8. Tabellenverzeichnis	76
9. Literaturverzeichnis.....	77
10. Danksagung	89

Abkürzungsverzeichnis

Abb. = Abbildung

ACT = Activated clotting time

aPTT = aktivierte partielle Thromboplastinzeit

ASS = Acetylsalizysäure

AT = Antithrombin

BT = Bauchtuch

bzw. = beziehungsweise

ca. = zirka

Ca²⁺ = Calcium

CPB = Cardiopulmonary bypass

Dr. = Doktor

EKZ = extrakorporale Zirkulation

ELISA = Enzyme Linked Immunosorbent Assay

GA = Glutaraldehyd

GmbH = Gesellschaft mit beschränkter Haftung

GP = Glykoprotein

HLM = Herz-Lungen-Maschine

IE = Internationale Einheiten

IU = international units

INR = International Normalized Ratio

Jr. = Junior

LOT Nr. = Chargennummer

LR = low range

NaCl = Natrium Chlorid

OP = Operation

p.A. = pro analysi

PAF = Plättchen aktivierender Faktor

PBS = Phosphat gepufferte Salzlösung

PDAA = Polydiallylamine

PF = Plättchen aktivierender Faktor

Prof. = Professor

PTT = Partial Thromboplastin Time

REM = Rasterelektronenmikroskopie

s = Sekunde

TF = Tissue factor

tPA = Gewebespezifischer Plasminogen Aktivator

TXA2 = Thromboxan A2

vWF = von Willebrand Faktor

z.B. = zum Beispiel

1. Einleitung

1.1 Einführung

In der vorliegenden Doktorarbeit wurden die Eigenschaften von unterschiedlichen Bauchtüchern, die derzeit bei Operationen zum Einsatz kommen untersucht. Seit Jahrhunderten werden in der Chirurgie textile Materialien eingesetzt, um bei Operationen Blut und Sekrete aufzusaugen. Besonders häufig wurden solche Tücher bei Operationen im abdominalen Bereich verwendet. So ist der Begriff Bauchtuch entstanden, der bis heute Gültigkeit hat (Köhnlein 2003).

Die Relevanz dieser Arbeit ergab sich nach der Rückrufaktion grüner Bauchtücher im Einsatzbereich der Herzchirurgie durch das Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte im Jahre 2012. Diese schwerwiegende Maßnahme wurde erforderlich, nachdem während einer Operation unerwünschte Blutgerinnsel aufgetreten waren, die auf eine überschießende blutgerinnungsfördernde Eigenschaft der verwendeten Bauchtücher zurückgeführt wurden.

1.2 Bauchtücher

Bauchtücher sind Medizinprodukte der Klasse IIa. Sie werden normalerweise ohne jegliche Bedenken bei sämtlichen Operationen in Krankenhäusern weltweit eingesetzt. Wie jedes Medizinprodukt unterliegen Bauchtücher den Medizinprodukterichtlinien.

Lohmann und Rauscher, einem der weltführenden Hersteller der Branche zufolge, eignen sich diese Operations-Verbandstoffe für drei Indikationen:

1. Nach vorhergehender Sterilisation für den Einsatz im OP-Bereich
2. Zum Fassen und Zurückhalten von Organen und Körpergeweben
3. Zur Blutstillung und zum Aufsaugen von Körperflüssigkeiten bei operativen Eingriffen (Lohmann&Rauscher 2013)

Die Tücher aus Verbandmull finden intraoperativ Anwendung und kommen im Operationsgebiet direkt in Kontakt mit den Organen und dem Blut des Patienten.

Bauchtücher können klassifiziert werden hinsichtlich ihrer Farbe, der Anzahl an Lagen, ihres Baumwollgehalts, der Anzahl an Fäden sowie hinsichtlich der Frage, ob sie vorgewaschen sind oder nicht, ob sie steril oder unsteril sind und ob ein Röntgenkontrastchip eingearbeitet wurde.

Im Allgemeinen werden chirurgische Bauchtücher aus Baumwolle hergestellt. Dieses Naturprodukt hat die gewünschte Eigenschaft, sich blutgerinnungsfördernd zu verhalten. Prinzipiell wird diese leicht gerinnungsaktivierende Komponente erwünscht und als unbedenklich erachtet. Wichtig ist dabei jedoch die Unterscheidung des Anwendungsgebietes der Bauchtücher.

1.3 Maßnahmen zur Minimierung des interoperativen Blutverlusts

Bei nahezu jedem chirurgischen Eingriff werden aktuell Materialien aus Baumwolle, z.B. in Form von Tüchern oder Tupfern angewendet. Die Anwendung von Bauchtüchern wird im Allgemeinen insbesondere hinsichtlich des Einflusses auf die Blutgerinnung für den Patienten als unbedenklich erachtet. Eine Ausnahme bilden kardio-thorakale Operationen mit Einsatz der Herz-Lungen-Maschine (Lohmann&Rauscher 2013).

Wenn bei einer Operation, wie es bei Operationen in der Herz-Thorax-Chirurgie häufig der Fall ist, mit einem größeren Blutverlust gerechnet wird, besteht die Möglichkeit, einen *CellSaver* anzuwenden. Dieser führt - nach einer Aufbereitung - dem Patienten einen Teil des verlorenen Blutes wieder zu, sodass häufig auf den Einsatz von allogenem Fremdblut verzichtet werden kann (Niranjan 2006, Wang 2009, Carless 2010, Vonk 2013).

Aktuelle Studien zeigen, wie essentiell es ist, den Bedarf an Bluttransfusionen vor allem perioperativ so gering wie möglich zu halten. Zahlreiche Studien haben eine Assoziation zwischen intraoperativen Bluttransfusionen und postoperativen Komplikationen nachweisen können (Straten 2009, Cholette 2012, Ternström 2014). Deshalb werden immer häufiger Maßnahmen bereits während einer Operation ergriffen um den Bedarf an Bluttransfusionen zu minimieren (Rogers 2009).

Da die Erfahrung gezeigt hat, dass das Blut unter anderem aufgrund der extravasalen Blutgerinnung bei Kontakt mit Fremdmaterial, durch Fibrinolysevorgänge und durch verschiedene Inflammationsmediatoren stark aktiviert wird, muss vor der Retransfusion eine automatisierte Aufbereitung durch den sogenannten *CellSaver* stattfinden. Von dieser Aktivierung sind vor allem die Thrombozyten betroffen (Weerasinghe 1998). Hierfür wird das intraoperativ verlorene Blut des Patienten im

Operationsgebiet mittels eines sterilen Saugers aufgesaugt, aufbereitet und schließlich dem Patienten wieder zugeführt wird.

Die Besonderheit dieser Autotransfusion mittels *CellSaver* besteht darin, dass das aufgesaugte Blut außerhalb des Operationsgebietes „gewaschen“ und filtriert wird. Im Einzelnen bedeutet dies, dass es vom Plasma, von Gerinnungsfaktoren, Zellfragmenten, ungebundenem Hämoglobin und Geweberesten gereinigt wird (König 2012). Anschließend werden ausschließlich die autologen Erythrozyten dem Körper des Patienten wieder zugeführt. Der Vorteil dieses Vorgehens besteht darin, dass auf allogenes Blut teilweise oder sogar gänzlich verzichtet werden kann, da die Erythrozyten, wiederverwertet werden können (Hirner 2008, Almeida and Leitao 2013).

Ein weiterer nicht zu vernachlässigender Vorteil dieser Methode liegt in der bedenkenlosen Anwendung der Bauchtücher. Falls es aufgrund des Fremdmaterials zu einer unerwünschten überschießenden Blutgerinnung kommen sollte, besteht keine Gefahr einer thromboembolischen Komplikation für den Patienten, da nur aufbereitete Erythrozyten ohne Gerinnungsfaktoren zurückgeschleust werden. So kann eine postoperative Komplikation durch einen iatrogen entstandenen Thrombus bei der Retransfusion des Patientenbluts vollständig ausgeschlossen werden.

1.4 Bauchtücher in der Herzchirurgie

Dem Sonderfall Herzchirurgie muss jedoch besondere Aufmerksamkeit geschenkt werden.

Die Herzchirurgie ist erst durch das Prinzip der extrakorporalen Zirkulation (EKZ) möglich geworden. Nahezu alle Operationen am Herzen erfordern den Einsatz der Herz-Lungen-Maschine (HLM) (Henne-Bruns 2007, Schmid 2011). Mithilfe dieser kann am eröffneten und stillgelegten Herzen operiert werden. Wie der Name schon sagt, ersetzt jene die Funktionen des Herzens und der Lungen (Mayer 1998, Ziemer 2010). So hält sie, durch eine Pumpe angetrieben, den Blutstrom aufrecht. Außerdem reichert sie das Blut mit Sauerstoff an und befreit es von überflüssigem Kohlenstoff (Bartlett 1978, Siewert 2007).

Jedoch muss beachtet werden, dass das Gerinnungssystem durch das Passieren des Blutes der fremden Oberflächen wie z.B. die der Schläuche und des Oxgenators stark aktiviert wird (Dietrich 1993). Deshalb ist eine wichtige Voraussetzung für die EKZ an der HLM eine gerinnungshemmende Medikation, deren Wirkung ohne Verzögerung eintritt (Gosciniak 1977). Ohne diese wäre ein Zusammenbruch des extrakorporalen Kreislaufs möglich. Außerdem wäre die Gefahr einer thromboembolischen Komplikation durch die Verschleppung gelöster Koagel sehr hoch.

Unter einer Thrombose versteht man den Pathomechanismus der kompletten oder teilweisen Blockade eines blutführenden Gefäßes durch ein Gerinnsel. Eine Embolie dagegen bezeichnet das Ablösen von Thrombusteilen mit konsekutiver Verschleppung in andere Abschnitte des blutführenden Systems (Kemkes-Matthes 1998).

Daher werden Patienten, die sich einer Operation am Herzen unterziehen müssen, perioperativ intravenös hochdosiert heparinisiert mit zirka drei IU hochmolekularem Heparin/ml Patientenblut (bis zu vier IU Heparin/ml

Blutvolumen) (Wendel 2007). Dadurch wird die *activated clotting time* (ACT) > 450 Sekunden gehalten. Aufgrund der hohen Antikoagulation wird angenommen, dass das hämostatische System des Patienten inaktiviert ist. Daraus ergibt sich die Situation, dass in den meisten Kliniken Herzoperationen mit direkter Retransfusion des Patientenbluts ohne den Einsatz des *CellSavers* stattfinden. Das heißt konkret, dass das gesamte aufgesaugte Blut des Operationsgebiets dem Patienten wieder zugeführt wird, ohne einer Auslese der potenziell problematischen Gerinnungsfaktoren und allen anderen Bestandteilen des Blutes außer den Erythrozyten.

In Anbetracht dieser Tatsache kann es bei Einsatz „fehlerhafter“ Bauchtücher zu schwerwiegenden Problemen in der Herzchirurgie kommen. Sollte es zu einer überschießenden blutgerinnenden Aktivität ausgelöst durch die Bauchtücher kommen, so kann dies in der Herzchirurgie durch die maschinelle Autotransfusion ohne den Einsatz eines *CellSavers* zu thromboembolischen Komplikationen führen.

Auf die Besonderheit dieses Operationstyps wird nun näher eingegangen.

Das Blut, welches sich im Thorax sammelt, tritt mit den sich dort befindlichen Bauchtüchern in Kontakt. Das überschüssige Blut, welches die Sicht am Operationsort behindert, wird mittels eines sterilen Saugers aufgesaugt und in die Herz-Lungen-Maschine weitergeleitet. Dort wird das Blut zunächst im Kardiotomiereservoir gesammelt und bei Bedarf extrakorporal oxygeniert und mittels Autotransfusion wieder dem Kreislauf des Patienten zugeführt. Wenn sich nun an der Kontaktfläche zwischen dem Textil des Bauchtuches und dem Blut des Patienten ein Thrombus gebildet haben sollte, könnte dieser (aufgrund der Autotransfusion) nach der extrakorporalen Zirkulation in der Herz-Lungen-Maschine, zurück in den menschlichen Blutkreislauf gelangen und dort bestünde ein erhebliches Risiko auf eine thromboembolische Komplikation, mit möglicherweise schwerwiegenden Folgen.

Das Kardiotomiereservoir ist zwar auch mit einer Sicherheitsreserve bestehend aus einem Filter und einem Entschäumer zur Eliminierung von möglichen Koageln ausgestattet. Nichtsdestotrotz besteht dennoch die potenzielle Gefahr einer thromboembolischen Komplikation im Falle einer direkten Retransfusion und dem gleichzeitigen Einsatz von zu stark gerinnungsfördernden („fehlerhaften“) Bauchtüchern.

1.5 Heparin

Das Antikoagulans der Wahl bei operativen Eingriffen am Herzen mit extrakorporaler Oxygenierung, zum Beispiel beim Einsatz der Herz-Lungen-Maschine, ist Heparin. Es wird dem Patienten prä- und perioperativ parenteral hochdosiert verabreicht. Systematisch gehört es zu den direkten Antikoagulanzen. Das heißt, es ist ein Wirkungsinhibitor und hemmt die Wirkung von Gerinnungsenzymen. Eine weitere Indikation zur Heparin-gabe, ist aufgrund seiner unmittelbaren Wirkung nach Applikation, die Prophylaxe von thromboembolischen Komplikationen.

Exogen zugeführtes Heparin wird meist aus Schweinedarmmukosa gewonnen. Aus Rinderlungen gewonnenes Heparin wird seit dem Bekanntwerden von boviner spongiformer Enzephalopathie (BSE) so gut wie nicht mehr eingesetzt (Levieux 2001, Rivera 2002). Endogenes Heparin wird aus basophilen Granulozyten und Mastzellen freigesetzt.

Chemisch betrachtet handelt es sich bei Heparin um ein negativ geladenes sulfatiertes Glucosaminoglycan. Es besitzt die Fähigkeit der hochaffinen Bindung an Lysinbindungsstellen des Antithrombin III.

Heparin bildet mit Antithrombin III einen Komplex und steigert durch eine Konformitätsänderung die Affinität von AT III zu Thrombin um den Faktor 1000 (Behrends 2010, Barthels 2012). Durch die Ausbildung des Heparin-AT III-Thrombin-Komplexes wird die AT III-vermittelte Inaktivierung von Thrombin beschleunigt. Außerdem ist dieser Komplex in der Lage, die Wirkung von Plasmin und den Gerinnungsfaktoren IXa, Xa, XIa und XIIa zu hemmen (Lang 2007).

Jedoch muss man immer berücksichtigen, dass die Heparinempfindlichkeit eines jeden Menschen variabel ist. In der Literatur findet man Werte von einer Variabilität bis um das Zwölfwache (InternationalTechnidyneCorporation 2005, KellerMedical 2013).

Die Nebenwirkungen des Heparins je nach Dosis und interindividueller Pharmakokinetik sind nicht zu vernachlässigen und können dramatische Folgen für den Patienten nach sich ziehen. Einerseits möchte man eine Thrombose – verursacht durch eine zu geringe Dosierung – verhindern, andererseits sollten Blutungen aufgrund der erniedrigten blutgerinnungsaktivierenden Eigenschaften vermieden werden. Genau deshalb muss die Dosierung dieses Antikoagulans individuell exakt vorgenommen werden.

Postoperativ ist es essentiell die, durch das Heparin eingeschränkte Gerinnungsfähigkeit des Blutes wiederherzustellen. Nur so können iatrogen verursachte postoperative Blutungen größtenteils verhindert werden.

Zur Antagonisierung von Heparin nach dem Beenden des Eingriffs und der extrakorporalen Zirkulation ist das aus Fischsperma gewonnene Antidot Protamin indiziert (Newman 2006).

1.6 Hämostase

Der Begriff Hämostase kommt aus dem Altgriechischen und setzt sich aus zwei Teilen zusammen: zum einen aus „*haíma*“, dem Blut und zum anderen aus „*stasis*“, der Stillung bzw. dem Stillstand (Duden 2014). Im Deutschen wird Hämostase oft fälschlicherweise mit „Blutgerinnung“ übersetzt, korrekt ist aber die Übersetzung mit „Blutstillung“. Rein physiologisch betrachtet ist die Blutgerinnung nur ein Teil des komplexen Mechanismus der Blutstillung, der viele induktive Vorgänge umfasst. Dazu gehören ganz allgemein betrachtet drei große Systeme (Lutze 2004):

1. das Gefäßsystem
2. das Gerinnungssystem
3. das Fibrinolysesystem

Einerseits soll die Hämostase sicherstellen, dass der Blutverlust bei der Verletzung eines Gefäßes möglichst gering gehalten wird. Andererseits muss der Prozess der Hämostase fortlaufend geprüft werden, um ein übermäßiges Einsetzen und einen möglichen konsekutiven Stillstand der Zirkulation des Blutflusses in den blutführenden Gefäßen zu verhindern (Lang 2007).

1.6.1 Das Gefäßsystem

Unter dem Gefäßsystem des menschlichen Körpers versteht man die Gesamtheit aller arteriellen, venösen und kapillaren Blutgefäße. Es besitzt drei wesentliche Eigenschaften, die zur Hämostase beitragen. Hämostase wird gefördert erstens, durch den anatomischen Aufbau des Gefäßsystems, zweitens durch die gezielte Regulation der Blutströmung durch Konstriktion und drittens durch die in der Gefäßwand gebildeten Substanzen (Lutze 2004).

Im Falle einer Verletzung des Gefäßsystems wird versucht, die Blutzufuhr ins beschädigte Gebiet zu drosseln und so den Blutverlust so gering wie möglich zu

halten. So kommt es innerhalb weniger Sekunden zu einer reflektorischen Konstriktion des beschädigten Abschnitts und der Nachbargefäße.

Verletzte Kapillaren besitzen die Eigenheit, aufgrund ihres geringen Durchmessers und der fehlenden muskulären Anteile zu kollabieren.

Der Beitrag des Gefäßsystems zur Blutstillung ist nur gering und ausschließlich initial von Bedeutung und bietet vor allem unmittelbar nach der Verletzung Schutz vor massiven Blutverlusten.

1.6.2 Primäre Hämostase

Die zwei Ziele der primären Hämostase sind die Vasokonstriktion und die Bildung eines weißen Thrombus. Daran beteiligt sind allen voran das Gefäßsystem mit den dazugehörigen Endothelzellen sowie die Thrombozyten. Diese Vorgänge laufen innerhalb weniger Minuten ab.

Die Voraussetzung für das Einsetzen der primären Hämostase ist eine Verletzung der Endothelwand. Das durch die Verletzung freiliegende subendotheliale Kollagen führt zunächst zu einer Anlagerung der Thrombozyten an die Gefäßwand unter anderem vermittelt durch den von – Willebrand-Faktor (vWF), der von dem verletzten Endothel freigesetzt wird (Huppelsberg 2009). Der vWF fungiert als Bindeglied zwischen Endothelzelle und Thrombozyt. Er bindet einerseits an das freiliegende Kollagen des Endothels und andererseits an GPIIb/IX,V auf der Thrombozytenoberfläche. Außerdem bindet das Kollagen ohne den vWF auch direkt an GP Ia/IIa und GP VI der Thrombozyten an.

Durch die Veränderung des sonst intakten Endothels werden die Thrombozyten, die normalerweise in inaktiver Form im Blut vorhanden sind, aktiviert. Diese Aktivierung mit gleichzeitiger Formänderung beinhaltet eine Entleerung ihrer Granula, die Ausbildung von Pseudopodien sowie die Ausbildung von GP IIb/IIIa und die Freisetzung von Thromboxan A₂ (TXA₂)

(Behrends 2010). TXA₂ führt zu einer Vasokonstriktion des Gefäßes, die für wenige Sekunden zu einer Verlangsamung des Blutstromes sorgt. Außerdem induziert TXA₂ die Thrombozytenaggregation (Fang 2014).

Die bis zu dem Zeitpunkt noch reversible Thrombozytenaggregation wird verstärkt durch den Plättchenaktivierenden Faktor (PAF), den die Leukozyten ausschütten. Die Thrombozyten selber tragen durch die Freisetzung des Plättchenfaktors 3 zur Aktivierung der plasmatischen Gerinnung und des GP IIb/IIIa-Rezeptors bei. Die Aktivierung des GPIIb/IIIa Rezeptors wiederum führt zur Bindung des freien Fibrinogens und zur Entstehung von Fibrinbrücken zwischen benachbarten Thrombozyten. Das aus dem alpha-Granula stammende Thrombospondin führt zu einer irreversiblen Vernetzung der Thrombozyten.

All diese Vorgänge führen dazu, dass es zur Ausbildung eines noch instabilen weißen Thrombus – weiß, da keine Erythrozyten enthalten sind – kommt. Damit ist die primäre Hämostase abgeschlossen.

1.6.3 Sekundäre Hämostase

Im Anschluss an die primäre Hämostase folgt die sekundäre Hämostase (siehe **Abbildung 1**). Dabei wird, innerhalb einiger Minuten ein stabiler Wundverschluss durch die Ausbildung eines Fibrinnetzes aus Fibrinogen und die Einlagerung von Blutzellen ins Fibrinnetz gebildet. Es entsteht ein roter Thrombus; rot, da es zur Einlagerung von Erythrozyten, den roten Blutkörperchen, ins Fibrinnetz kommt.

Damit die Wunde stabil abgedichtet werden kann, muss die Gerinnungskaskade aktiviert werden. Diese kann in drei Phasen unterteilt werden: Erstens, der Aktivierungsphase, bei der es zur Thrombinbildung kommt; zweitens, der Koagulationsphase, in der es zur Bildung des Fibrinnetzes ausgehend von Fibrinogen kommt und drittens der

Retraktionsphase, bei der es zur Kontraktion des Fibrinnetzes kommt (Behrends 2010).

Hauptverantwortlich für einen reibungslosen Ablauf der Gerinnungskaskade sind die Gerinnungsfaktoren (siehe **Tabelle 1**). Insgesamt sind es elf Plasmaproteine, die in der Leber produziert werden und als Zymogene (inaktive Vorstufen) zunächst im Blut zirkulieren. Mittels limitierter Proteolyse werden sie bei Bedarf aktiviert. Die Faktoren II,VII,IX,X werden Vitamin K abhängig gebildet.

Tabelle 1: Gerinnungsfaktoren (Silbernagl 2007)

Faktor Nr.	Name
I	Fibrinogen
II	Prothrombin
III	Gewebethromboplastin
IV	Ionisiertes Ca ²⁺
V	Akzeleratorglobulin
VII	Proconvertin
VIII	Antihämophiles Globulin A
IX	Antihämophiles Globulin B (Christmas-Faktor)
X	Stuart-Prower-Faktor
XI	Plasma-Thromboplastin-Antecedent (PTA)
XII	Hageman-Faktor
XIII	Fibrinstabilisierender Faktor (FSF)
-	Präkallikrein (PKK; Fletcher-Faktor)
-	Hochmolekulares Kininogen (HMK; Fitzgerald-Faktor)

Es gibt zwei Methoden, mittels derer die Kaskade gestartet werden kann, zum einen die intrinsische und zum andere die extrinsische Aktivierung (Gawaz 2001). Der intrinsische Weg, der auch als endogener Weg bezeichnet wird, beginnt mittels einer Verletzung innerhalb der Gefäßwand. Der extrinsische Weg, der auch als exogener Weg bezeichnet wird, wird durch eine Verletzung des Gefäßes und des Gewebes aktiviert.

In den allermeisten Fällen finden beide Wege zur Polymerisierung des Fibrins gleichzeitig statt, da bei einer Verletzung meist sowohl das Gefäß als auch das umgebende Gewebe betroffen sind.

Damit es zur Aktivierung des relativ schnellen exogenen Systems kommt, muss Faktor VII zu VIIa aktiviert werden. Dies geschieht durch Kollagenkontakt und der Freisetzung des Faktor III (Thrombinkinase) sowie des *Tissue factor* (TF), ausgelöst durch die Gewebsverletzung. Faktor VIIa bildet zusammen mit Phospholipiden und Ca²⁺ einen Komplex, welcher den Faktor X aktiviert.

Faktor X ist die Schnittstelle der gemeinsamen Endstrecke des intrinsischen und extrinsischen Aktivierungssystems.

Die langsamere endogene Aktivierung wird ausgelöst durch Kontakt mit negativ geladenen Oberflächen wie Kollagen oder Elastin. Dadurch wird der Faktor XII aktiviert und es kommt zur beschleunigenden positiven Rückkopplung, damit die Kaskade schneller abläuft und die Blutung schneller gestoppt werden kann. Die positive Rückkopplung wird dadurch ausgelöst, dass Faktor XIIa Präkallikrein zu Kallikrein aktiviert, welches seinerseits die Aktivierung des Faktors XII beschleunigt. Anschließend folgt die schrittweise aufeinanderfolgende Aktivierung der Faktoren XI zu XIa, IX zu IXa und VIII zu VIIIa. Die Aktivierung des Faktor X zu Xa wird durch einen multifaktoriellen Komplex aus Ca^{2+} , PF3, Phospholipiden und den Faktoren VIIIa und IXa ausgelöst.

Zu Beginn der gemeinsamen Endstrecke der sekundären Hämostase steht ein Komplex bestehend aus Faktor Xa, Va, Ca^{2+} , PF3 und Phospholipiden – der sogenannte Prothrombinaktivator Komplex. Genau dieser ist in der Lage, Prothrombin (Faktor II) zu Thrombin zu aktivieren (Faktor IIa). Es ist das Thrombin, welches daraufhin Fibrinogen (Faktor I) in Fibrinmonomere spaltet und den Faktor XIII aktiviert. Die Fibrinmonomere besitzen freie Bindungsstellen, wodurch es im nächsten Schritt zur spontanen Polymerisation von Fibrinsträngen kommt. Das zunächst entstehende Fibrinpolymer ist noch instabil und unterliegt der Fibrinolyse. Erst durch den Einfluss von Faktor XIIIa und Ca^{2+} wird das Polymer stabilisiert und es folgt die Ausbildung kovalenter Bindungen zwischen Lysin und Glutamin. Des Weiteren verfangen sich Blutzellen im dichten Fibrinnetz des stabilen Polymers, wodurch ein roter Thrombus entsteht.

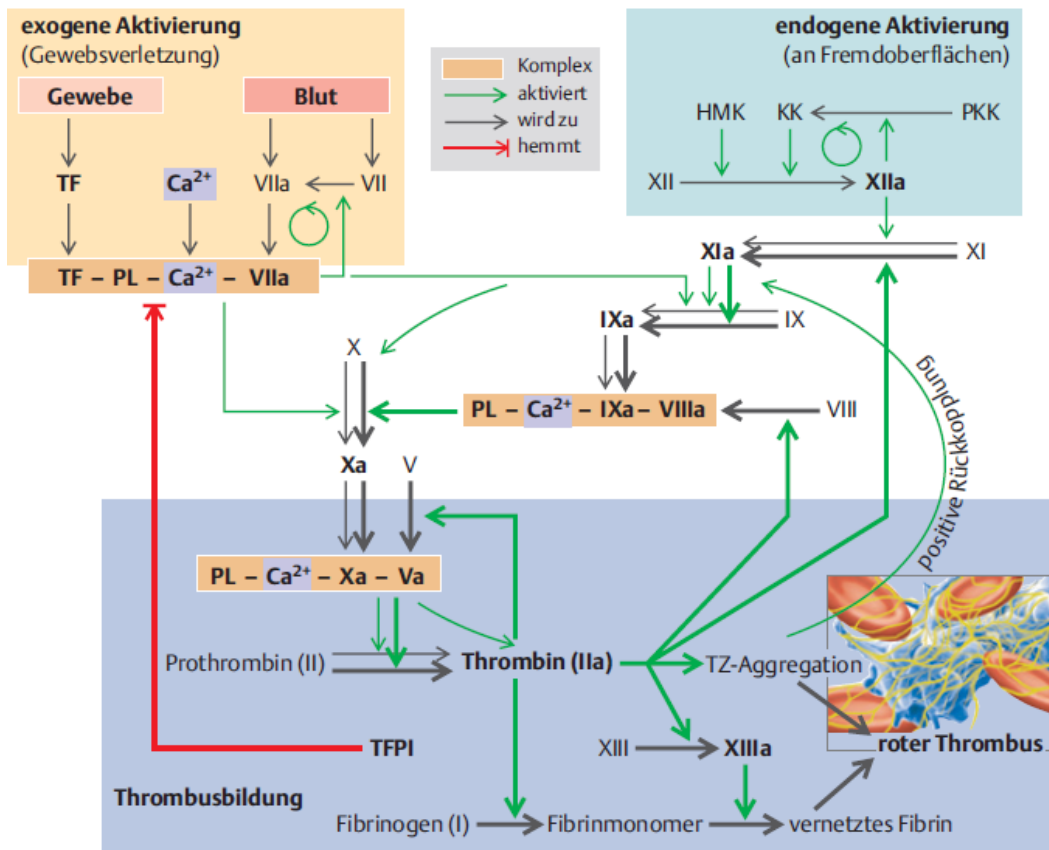


Abbildung 1: Endogene und exogene Aktivierung der Gerinnungskaskade (Silbernagl 2007)

TF= tissue factor = Gewebsthrombokinase; Ca^{2+} = Calcium; PL= Phospholipide; TFPI= tissue factor pathway inhibitor; KK=Kallikrein; PKK= Plasmakallikrein; TZ= Thrombozyten; HMK= hochmolekulares Kininogen= Fitzgerald-Faktor

1.7 Gerinnungsparameter

1.7.1 International Normalized Ratio (Quickwert) und aPTT

Zur Diagnostik der Gerinnungsfunktion, möglicher Gerinnungsstörungen oder zur Überprüfung der Wirkung von Antikoagulanzen gibt es zahlreiche zu erhebende Parameter. Zu den wichtigsten Globaltests zählen die Erhebung des INR-Werts (Quickwert) und der aPTT-Zeit.

Beim Erheben des Quickwerts wird die Funktion des extrinsischen Gerinnungssystems überprüft und in Prozent angegeben. Je niedriger der Quickwert ist, desto schlechter ist die Blutgerinnungsfunktion. Als Normwert wird ein Quickwert zwischen 70 und 125% betrachtet (Huppelsberg 2009). Chemisch gesehen, wird für dessen Bestimmung Citratblut mit Thromboplastin und Calcium inkubiert und der Vorgang der Hämostase ausgelöst. Die Zeit, die bis zur vollständigen Blutgerinnung benötigt wird, wird bestimmt und mit Verdünnungsreihen normaler Plasmen verglichen.

Aufgrund hoher Variabilität der bestimmten Quickwerte je nach untersuchendem Labor wurde der Quickwert durch den *International Normalized Ratio (INR)* ersetzt, um eine bessere Vergleichbarkeit und Zuverlässigkeit zu gewährleisten. Dieser INR, ist ein errechneter Wert, der mithilfe des von der Weltgesundheitsorganisation WHO festgelegten *International Sensitivity Index (ISI)* errechnet wird. Ein Norm-INR-Wert beträgt 1 und entspricht einem Quickwert von 100% (Klinke 2005).

Bei der Bestimmung der aktivierten partiellen Thromboplastinzeit (aPTT) wird das intrinsische Gerinnungssystem getestet. Chemisch betrachtet werden hierfür zur Blutprobe Plättchenfaktor 3 und Calciumionen beigefügt und dann wird die Zeit bis zur Gerinnung gemessen. Der Normwert beträgt hier zwischen 25 und 38 sec (Huppelsberg 2009).

Der signifikante Unterschied zwischen diesen beiden Gerinnungsparametern und der *Activated Clotting Time* (ACT), die im nächsten Abschnitt erläutert werden wird, ist, dass beim INR (Quickwert) und der aPTT Blutplasma verwendet wird, bei der Bestimmung der ACT dagegen Vollblut verwendet.

1.7.2 Activated clotting time

Die erstmals von Hattersley beschriebene „*activated coagulation time*“ wird heute als „*activated clotting time*“ (ACT) bezeichnet (Hattersley 1966). Genau genommen ist die Messung der ACT eine Modifikation der Lee White Methode (Lee 1913, Esposito 1983).

Schon vor 40 Jahren beschrieben Hill et al. die von Hattersley gewonnenen Erkenntnisse zur Überprüfung der Heparininfusion während eines verlängerten extrakorporalen Bypasses (Hill 1974). Obwohl es einige ältere kritische Stellungnahmen bezüglich der Messung der ACT zur Kontrolle der Heparinkonzentration gibt, gilt die ACT heute als ein standardisiertes, verlässliches System, um das Ausmaß der Antikoagulation während einer Herzoperation festzustellen (Doty 1979, Culliford 1981, Martindale 1996, Raymond 2003, Rodriguez 2008).

Der Vorteil des ACT-Tests liegt darin, dass frisches humanes Vollblut ohne Aufbereitung oder Zentrifugation verwendet wird. Deshalb ist der Test ideal, um routinemäßig am Patientenbett durchgeführt zu werden. Das Prinzip ist recht einfach: das Blut tritt in Kontakt mit dem Oberflächenaktivator (dies ist je nach Gerät unterschiedlich, jedoch meist Kieselerde oder Kaolin) und gerinnt. Die benötigte Zeit bis zur Gerinnung wird gemessen (InternationalTechnidyneCorporation 2005).

Erste klinische Anwendung fand die ACT Mitte der 1970er Jahre zur Überwachung und Regulierung der Heparinabgabe während CPB (Bowers 1994). Die Messung ist eine Überprüfung des intrinsischen Gerinnungssystems und

stellt eine Alternative zur Messung der partiellen Thromboplastinzeit (PTT) dar, mittels derer ebenfalls eine Heparintherapie überwacht werden kann. Bull et al. haben in ihren Untersuchungen herausgefunden, dass bei hohen Heparinkonzentrationen die Bestimmung der PTT unzuverlässig ist (Bull 1975). Hier wäre die Bestimmung der ACT von Vorteil.

Ein weiterer Vorteil der ACT ist, dass sie im Vergleich zur aPTT, weniger komplex und konsequenterweise schneller bestimmt werden kann. Denn die ACT funktioniert mit Vollblut, wohingegen die aPTT-Messung ein Zentrifugieren des Blutes benötigt, um das benötigte Plasma zu gewinnen.

Liegt der ACT-Wert über dem Normbereich, kann dies zwei Ursachen haben. Zum einen könnten pharmakokinetische Ursachen zugrunde liegen (wie eine Heparinzugabe) zum anderen könnten kongenitale oder erworbene Gerinnungsstörungen der Grund sein. Das ACT-Messgerät ist nicht fähig, dies zu differenzieren (Kriesmer 1993).

Auf die Thematik der ACT wird im Material und Methodenteil näher eingegangen (siehe Kapitel 2.2.3 Gerinnungsmessung mit dem ACT- Gerät: Hemochron Jr. II).

1.8 Das Fibrinolysesystem

Nach geraumer Zeit muss der gebildete Thrombus wieder aufgelöst werden und das Fibrin zu Fibrinogen abgebaut werden, da es ohne diese Vorgänge zu einer Stenose des Gefäßsystems kommen könnte. Hierfür zuständig ist das Fibrinolysesystem (siehe **Abbildung 2**). Weitere Aufgaben dieses Systems sind es, die Gerinnungsfähigkeit zu senken sowie die durch Blutgerinnsel verschlossenen Blutgefäße durchgängig zu machen (Behrends 2010).

Zu Beginn der Fibrinolyse steht das im Blutplasma vorhandene Plasminogen, die inaktive Vorstufe des Aktivators Plasmin. Plasmin wird durch Geweb plasminogenaktivator (tPA), Kallikrein, Urokinase und Streptokinase aktiviert. Diese Serinprotease spielt die essentielle Rolle bei der Fibrinolyse. Sie spaltet Fibrin in lösliche Spaltprodukte, welche wiederum Faktor IIa (Thrombin) hemmen, wodurch die Fibrinpolymerisierung gehemmt wird, was die Auflösung des Thrombus zur Folge hat. Außerdem spaltet Plasmin Fibrinogen, Prothrombin, und die Gerinnungsfaktoren V, VIII, IX, XI und XII, wodurch die sekundäre Hämostase gehemmt wird.

Der Thrombus wird so aufgelöst und die Fibrinspaltprodukte (Fragmente X, A, B, C) werden im Blut gehäuft gefunden. Dies kann mittels ELISA-Tests nachgewiesen werden.

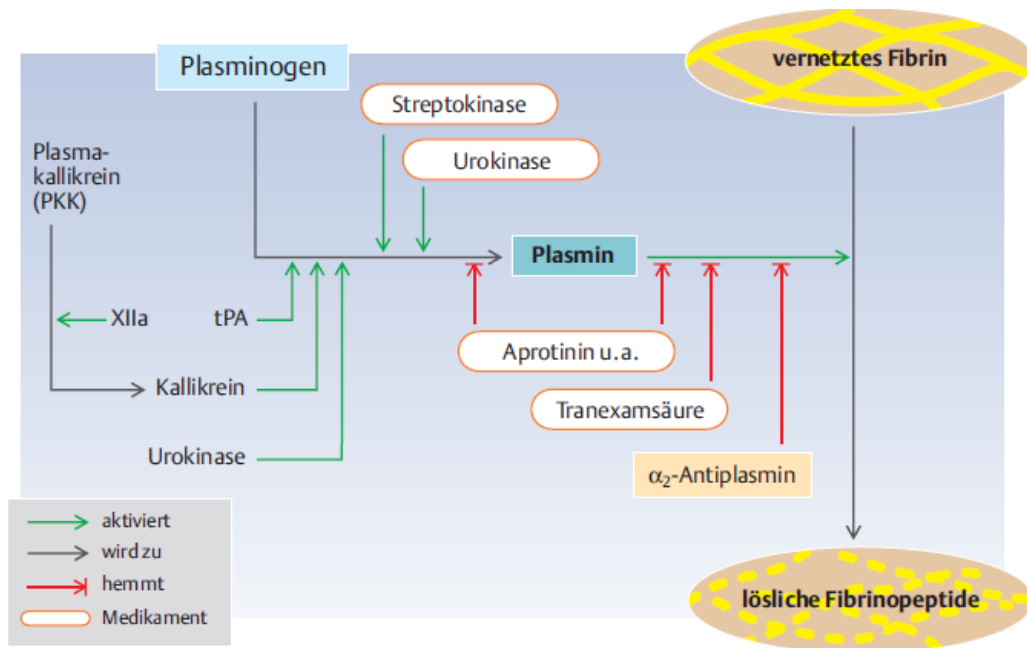


Abbildung 2: Fibrinolyse (Silbernagl 2007)

tPA= tissue-type plasminogen activator = Gewebsspezifischer Plasminogen Aktivator

1.9 Ziel der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war die Validierung eines Testsystems zur Evaluierung der blutgerinnungsaktivierenden Potenz von Bauchtüchern, die im chirurgischen Bereich seit Jahren verwendet werden. Das Thrombogenitätstestsystem wurde so konzipiert und validiert, dass mit seiner Hilfe Bauchtücher mit unerwünschter prokoagulatorischer Potenz von vornherein sicher ermittelt werden können.

Die Validierung des hierfür entwickelten Thrombogenitätstestsystems soll dazu dienen, in Zukunft das Risiko thromboembolischer Komplikationen während eines chirurgischen Eingriffs am Herzen eines hochdosiert heparinisierten Patienten, der unter Einsatz der Herz-Lungen-Maschine und ohne Verwendung eines *CellSavers* operiert wird, von vornherein minimal zu halten und im Idealfall vollständig auszuschalten.

Die Notwendigkeit eines Testsystems zur präklinischen Evaluierung der gerinnungsaktivierenden Potenz von Bauchtüchern ergab sich, nach dem im Jahr 2000 Gerinnungsprobleme bei kardiochirurgischen Eingriffen mit extrakorporaler Zirkulation an der Herz-Lungen-Maschine aufgetreten waren, die durch grüne Bauchtücher (Produktionsort: Volksrepublik China) verursacht worden waren. Die Probleme schienen soweit behoben, bis im Jahre 2012 eine Rückrufaktion grüner Bauchtücher durch das Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte erfolgte.

Es muss dabei besonders hervorgehoben werden, dass die Kardiochirurgie in Anbetracht prokoagulatorisch wirkender Bauchtücher eine Ausnahme darstellt. Die Brisanz der Problematik wird dadurch signifikant verstärkt, dass bei kardiochirurgischen Eingriffen – anders als in anderen chirurgischen Bereichen – aufgrund der hochdosierten Heparinisierung von zirka drei IU HMW-Heparin/ml Patientenblut und einem entsprechenden ACT- Wert > 450 s das aufgesaugte Blut meist ohne eine Aufbereitung im *CellSaver* wieder in toto, also mitsamt aller Gerinnungsproteine retransfundiert wird.

Anhand von 100 Blutspendern, fünf verschiedenen Bauchtuchchargen und einem standardisierten Testverfahren sollte herausgefunden werden, ob man zuverlässig präoperativ anhand eines Testsystems potentiell risikobehaftete Bauchtücher – das heißt solche, die verstärkt prokoagulatorische Eigenschaften besitzen – ausfindig machen kann, bevor sie perioperativ möglicherweise zu thromboembolischen Komplikationen führen und ein Gefährdungspotenzial für den Patienten darstellen. Dabei ist vorstellbar, dass entweder die Hersteller selbst oder aber beauftragte spezialisierte Labore eine solche gezielte Testung vornehmen.

Im Rahmen der Evaluierung wurden die verschiedenen Bauchtücher mit Spenderblut bei Körpertemperatur für 30 min auf der Schüttelplatte – zur schonenden Durchmischung – inkubiert und anschließend mikro- sowie makroskopisch auf Koagelbildung untersucht. Außerdem erfolgte eine Messung der *Acitvated Clotting Time* als Gerinnungskontrolle.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

- NaCl 0,9: Isotonische Kochsalzlösung, Fresenius Kabi Deutschland GmbH (Bad Homburg v.d.H., Deutschland)
- Heparin-Natrium-25000-ratiopharm, 25000 I.E., ratiopharm GmbH (Ulm, Deutschland)

2.1.2 Labormaterialien und Geräte

- Blutabnahmemonovetten: S-Monovetten 9 ml ohne Präparierung, Sarstedt AG&Co (Nümbrecht, Deutschland)
- Safety-Multifly®-Set pyrogenfrei 20 G, Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
- Sterile Polypropylenröhrchen: 14 ml Polypropylene Round-Bottom Tube, BD-Falcon (Franklin Lakes, New Jersey, USA)
- Polypropylenmessbecher und Schraubdeckel, Sarstedt AG &Co. (Nümbrecht, Deutschland)
- Schüttler: Polymax 1040, Heidolph Instruments GmbH&Co. KG (Schwabach, Deutschland)

- ACT-Gerät: Hemochron Jr. II, ITC International Technidyne Corporation (New Jersey, USA)
- ACT-Küvetten LR: ITC International Technidyne Corporation (New Jersey, USA)
- Mikroskop: Novex Zoom Stereo RZ-Range, Euromex Mikroskope BV (Arnhem, Niederlande)
- Digitalkamera: Coolpix 4500, 4x optischer Zoom, Nikon (Tokio, Japan)
- Rasterelektronenmikroskop: Evo LS 10, Carl Zeiss AG (Jena, Deutschland)

2.1.3 Bauchtücher

- Kitpack Toptex lite RK, Bauchauch, 40x40cm, 6-lagig, grün, LOT 14128682, haltbar bis 2013-11, Lohmann&Rauscher International GmbH (Rengsdorf, Deutschland)
- Setpack Toptex lite RK, Bauchtuch RK, 40x40cm, 4-lagig, weiß, LOT 22128001, haltbar bis 2017-04, Lohmann&Rauscher International GmbH (Rengsdorf, Deutschland)
- Setpack Toptex lite RK, Bauchtuch RK, 40x40cm, 4-lagig, grün, LOT 22528002, haltbar bis 2017-05, Lohmann&Rauscher International GmbH (Rengsdorf, Deutschland)

- Setpack Toptex lite RK, Bauchtuch RK, 40x40cm , 4-lagig, blau, LOT 30918015, haltbar bis 2018-01, Lohmann&Rauscher International GmbH (Rengsdorf, Deutschland)
- Setpack Toptex lite RK, Bauchtuch RK + PDAA, 40x40cm, 6-lagig, grün, LOT 21458000, haltbar bis 2017-03, Lohmann&Rauscher International GmbH (Rengsdorf, Deutschland)

2.1.4 Blutproben

- Ein Votum der Ethik-Kommission lag zu Beginn der Arbeit vor.
Pr. Nr. 270/2010 B01
- Es wurden anonymisierte Proben unbehandelten Vollblutes freiwilliger Spender verwendet, die in den letzten zehn Tagen keine blutgerinnungshemmende Medikation wie z.B. Marcumar, Clopidogrel, Xarelto, ASS oder Ähnliches eingenommen hatten (siehe **Tabelle 2**).
- Von den Probanden wurde Alter, eingenommene Medikation und eventueller Tabakkonsum in Form eines Fragebogens erhoben (siehe **Abbildung 3**). Als definitives Ausschlusskriterium galt die Einnahme blutgerinnungshemmender Präparate wie z.B. Marcumar®, Clopidogrel, ASS und Xarelto®. Bei Probandinnen wurde die Einnahme oraler Kontrazeptiva angefragt; dabei war dies kein Ausschlusskriterium zur Teilnahme an der Studie.

Datenerhebung der Probanden

Name, Vorname:

Geboren am:

Adresse:

Einnahme von Acetylsalicylsäure oder ähnlichen gerinnungshemmenden
Medikamenten (z.B. Aspirin®, Clopidogrel®, Marcumar®) → Ausschlusskriterium!:

Ja Nein

Rauchen Sie? Ja Nein

Einnahme von Antiphlogistika (Entzündungshemmern) wie Diclofenac® oder ähnlichen
Medikamenten:

Ja Nein

Einnahme von oralen Kontrazeptiva („Pille“):

Ja Nein

Welche Medikamente nehmen Sie ein?

Art	Häufigkeit	Seit wann?
-----	------------	------------

- 1.
- 2.
- 3.

©Tanja Nathan

Abbildung 3: Datenerhebungsbogen der Probanden

Tabelle 2: Übersicht über das Probandengut

Durchschnittsalter	27 Jahre
Ältester Proband	60 Jahre
Jüngster Proband	19 Jahre
Geschlecht	♂:♀ = 47:53
Raucher/innen	8

2.2 Methoden

2.2.1 Vorbereitung

Zuerst wurden die Monovetten ohne Präparierung mit Heparin beschickt. Dazu wurde das Heparin mit der gewünschten Einheit von 1,5 IE/ ml Blutvolumen hergestellt. Dazu wurden 49,850 µl NaCl mit 150 µl Heparin 25000 gemischt. Von der hergestellten Lösung wurde jeweils 900 µl in die Neutralmonovette pipettiert. Die Monovetten wurden im Kühlschrank bei 4 °C gelagert und eine halbe Stunde vor der Blutabnahme aus dem Kühlschrank genommen und auf Raumtemperatur gebracht.

Die fünf verschiedenen zu untersuchenden Bauchtücher, die von der Firma Lohmann&Rauscher zugeschickt wurden, wurden in 1x4 cm große Rechtecke zurechtgeschnitten und in die sterilen, mit einem wasserfesten Filzstift nummerierten 14ml *Polypropylene Round-Bottom Tube BD Falcons* gegeben. Die Nummerierung der *Falcons* geschah folgendermaßen: Jede(r) Proband(in) erhielt in fortlaufender Nummerierung eine Nummer zwischen 1 und 100. Außerdem wurden die fünf verschiedenen Bauchtücher mit den immer gleichen Zahlen 1 bis 5 codiert.

Für jeden Probanden wurden insgesamt sechs *Falcons* vorbereitet. Fünf *Falcons* enthielten je eine Probe der zu untersuchenden Medizinprodukte. Zur Kontrolle des allgemeinen Blutgerinnungsverhaltens des Probanden wurde für jeden Probanden noch ein leeres Polypropylenröhrchen eingerechnet. So ergab sich zum Beispiel für Proband fünf folgende *Falcons*: 5/1, 5/2, 5/3, 5/4, 5/5, 5/6, wobei die ersten fünf mit Proben der Bauchtücher versehen waren; das letzte diente der Leerkontrolle.

2.2.2 Versuchsdurchführung

Nachdem die Probanden versichert und dokumentiert hatten, dass sie nicht gegen die Ausschlusskriterien verstießen, und nachdem sie über eventuelle Risiken bei der Blutabnahme aufgeklärt worden waren, wurde ihnen durch ein steriles Einmalsystem (*Butterfly*) 54 ml Blut mit den vorbereiteten, mit Heparin (1,5 IE/ml Blutvolumen) beschickten Monovetten aus einer Armvene entnommen. Die mit Heparin beschickten Monovetten wurden bis 30 Minuten vor der Blutabnahme in Kühlschrank bei 4°C gelagert.

Die Blutabnahme wurde auf einem Blutabnahmestuhl in einem speziell dafür ausgestatteten Raum im Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie Labor der Universitätsklinik Tübingen vorgenommen (siehe **Abbildung 4**).



Abbildung 4: Blutabnahme mit 9ml Monovetten

Nach dem Wechseln jeder Monovette wurden diese 3x invertiert, um sicherzustellen, dass das Blut mit dem dazu pipettierten Heparin homogen vermischt wurde.

Das abgenommene Blut, je 9 ml in sechs Monovetten, wurde anschließend in einem sterilen Polypropylenmessbecher gepoolt.

Hiervon wurden sofort jeweils 9 ml Blut in die sechs vorbereiteten sterilen Polypropylenröhrchen (fünf mit Probe, eine ohne) pipettiert.

Anschließend wurden diese für 30 Minuten auf dem Schüttler bei 37°C (Normothermie) und 20 rpm inkubiert (siehe **Abbildung 5**). Es ist hervorzuheben, dass der Schüttler mit sanften Dreh- / Schüttelbewegungen einen leichten Blutfluss, so wie es im menschlichen Körper passiert, simuliert, sodass die Versuchsbedingungen möglichst der Realität entsprechen. Der Vorteil des Schüttlers gegenüber eines statischen Modells ohne die Schüttelbewegung liegt darin, dass die verschiedenen Bestandteile des Bluts nicht auf die zu prüfenden Materialien absinken, wodurch der Versuchsvorgang beeinträchtigt werden könnte oder sich eventuell falsch negative Ergebnisse ergeben könnten.



Abbildung 5: Inkubation der Proben auf dem Schüttler

Nach der 30-minütigen Inkubation der Bauchtücher mit dem Vollblut-Heparin-Gemisch, wurden die Medizinprodukte mit einer sterilen Pinzette aus den Polypropylenröhrchen entnommen und drei Mal vorsichtig durch sterile NaCl-Lösung gezogen.

Danach wurde die Probe auf einen zuvor beschrifteten sterilen Schraubdeckel platziert und makroskopisch auf Koagelbildung untersucht. Ebenso wurde eine fotomikroskopische Dokumentation vorgenommen.

Die Leerprobe ohne zu untersuchendes Medizinprodukt, wurde auf einer Unterlage vorsichtig entleert und auf makroskopisch sichtbare Koagelbildung kontrolliert.

2.2.3 Gerinnungsmessung mit dem ACT- Gerät: Hemochron Jr. II

Anhand der Gerinnungsmessung mit dem Hemochron Junior II kann bei heparinisiertem Vollblut schnell und unkompliziert der Zustand des Patienten überprüft werden. Ein weiterer Vorteil dieses Messverfahrens liegt in der einfachen Wiederholbarkeit. Dies ist vor allem intraoperativ sehr praktisch, da mit wenigen Tropfen frischen Blutes innerhalb kürzester Zeit der aktuelle Zustand der Antikoagulation des Patienten getestet werden kann (InternationalTechnidyneCorporation 2005).

In vorhergehenden Studien wurde schon gezeigt, dass die Messung der ACT ein geeigneter Parameter zur Überwachung der Heparinkonzentration im Blut ist (Levin 2014). Mithilfe des Gerinnungsaktivators Celite® wird in einer entnommenen Blutprobe vollautomatisch bei einer Temperatur von 37°C – der menschlichen Körpertemperatur entsprechend – die Zeit gemessen, bis sich aus dem Blut-Celite®-Gemisch ein Blutgerinnsel gebildet hat. Der Messbereich liegt zwischen 0 und 400 Sekunden und ist interindividuell sowie von der Heparinmenge abhängig.

Während des Untersuchungszeitraums wurde das ACT-Gerät mit einer vom Hersteller mitgeschickten Probe geeicht. Ebenso wurden der digitale Zeitmesser und die Temperatur jeden Tag auf Exaktheit geprüft. Nur so kann die Verlässlichkeit des ACT-Geräts sichergestellt werden.

Aus dem gepoolten Vollblut des Polypropylenmessbechers wurden zwei Tropfen Blut entnommen. Diese wurden auf eine speziell für das ACT-Gerät entwickelte Küvette pipettiert, die 30 Minuten zuvor aus dem Kühlschrank genommen worden war. Dann wurde das Gerät gestartet.

Nachdem alle Ergebnisse dokumentiert worden waren, wurde das gesamte Probenmaterial fachgemäß entsorgt.

2.2.4 Rasterelektronenmikroskopie

In dieser Arbeit wurden Bilder der fünf Bauchtuchchargen sowohl vor als auch nach der Inkubation mit heparinisiertem humanen Vollblut mit dem Rasterelektronenmikroskop der Universität Tübingen angefertigt. Es handelt sich um folgendes Modell: Evo LS 10 (Carl Zeiss AG, Jena, Germany). Für die Aufnahmen mit Blutinkubation wurde ein Proband gesucht, der weder rauchte noch Medikamente zu sich nahm und selbstverständlich nicht gegen die restlichen Ausschlusskriterien verstieß. Es wurden für jene Aufnahmen die standardisierten 60 ml Blut aus einer Armvene entnommen und die Inkubation wie üblich für 30 Minuten bei 37°C auf dem Schüttler vorgenommen. Für die Fixierung wurden die Präparate zunächst dreimal durch physiologische NaCl-Lösung (PBS) gezogen. Daraufhin wurden sie zurecht geschnitten in maximal 1 cm² große Proben. Anschließend erfolgte die Fixierung der Proben in 2% Glutaraldehyd (GA)-PBS für 60 Minuten bei Raumtemperatur. Das Glutaraldehyd wurde wie folgt gemischt: zu 10 ml 25% GA wurden 115 ml PBS gegeben. Es folgte das Spülen der Proben in PBS ohne Ca²⁺ und Mg für 10 Minuten. Im Anschluss daran wurde eine aufsteigende Alkoholreihe hergestellt mit 40%,50%,60%,70%,80%,90% und 100% Ethanol p.A., worin die Proben jeweils 10 Minuten gelagert wurden um ihnen das Wasser zu entziehen. Schließlich wurden die Präparate in frischem Ethanol absolut bei 4°C bis zur *Critical Point* Trocknung gelagert und mit Gold Palladium bedampft. Daraufhin erfolgten die Aufnahmen mit dem Rasterelektronenmikroskop. Man wählte für die Aufnahmen der Bauchtücher Vergrößerungen von 1000x und 2500x. Bilder siehe Abbildungen 12 und 13.

3. Ergebnisse

3.1 Basisdaten

Es handelt sich um eine prospektive Studie des Untersuchungszeitraums von April bis Dezember 2013 am Forschungslabor der Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie der Universitätsklinik Tübingen.

Für die Studie wurden 100 freiwillige Blutspender gesucht. Diese Zahl wurde statistisch in einer Fallzahlplanung mittels der modifizierten mid-p Methode errechnet (Fosgate 2005). Durch die Ergebnisse zahlreicher Vorversuche geleitet, wurde für diesen konkreten Fall das Ziel gesetzt ein Testsystem zu entwickeln, welches eine Sensitivität von mindestens 97,5% sowie eine Spezifität von mindestens 95% hat.

Die 100 Probanden setzten sich folgendermaßen zusammen: Es waren 47 Männer und 53 Frauen an der Studie als Probanden/innen beteiligt.

Das Durchschnittsalter betrug 27 Jahre. Der jüngste Proband war zum Zeitpunkt der Studie 19 Jahre alt; der älteste 60 Jahre.

Die Anzahl an Rauchern unter den Probanden betrug acht.

3.2 Auswertung der Daten

Nach der Blutabnahme bei allen Probanden im Forschungslabor der Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie, Tübingen wurden alle Daten makroskopisch und fotomikroskopisch dokumentiert. Danach begann die Auswertung und die statistische Analyse. Die Statistik wurde mit professioneller Unterstützung der Firma Sebastian Hoffmann consulting + services vorgenommen.

Zunächst wurde für jeden Probanden eine Akte angelegt. Diese beinhaltete jeweils die Einverständniserklärungen, den Befragungsbogen, elf Fotografien und einen ACT-Wert. Die elf Fotos setzten sich folgendermaßen zusammen: jedes der fünf Bauchtücher wurde nach Inkubation einmal makroskopisch und einmal mikroskopisch fotografiert. Außerdem wurde die Spur des langsam ausgeleerten Blutes der Leerprobe, die zur Kontrolle des Gerinnungsverhaltens des Probanden diente, fotografisch festgehalten (siehe **Abbildung 6**).



Abbildung 6: Ansicht einer Kontrollprobe nach Inkubation

Im Anschluss erfolgte die Auswertung der Fotografien. Die dichotomisierte Auswertung der Bilder wurde von drei unabhängigen Personen durchgeführt, wovon eine Person die Auswertung blind vornahm, was bedeutet, dass die Nummern der Probanden und der Bauchtücher entfernt worden waren und lediglich das Bild des inkubierten Bauchtuchs sichtbar war.

Die Entscheidung für die dichotomisierte Auswertung wurde aufgrund ihrer geringen Komplexität getroffen. „Ja“ bedeutet, dass sich auf dem Bauchtuch ein

Blutgerinnsel gebildet hatte und es damit als kritisch eingestuft werden muss (siehe **Abbildung 8**). „Nein“ bedeutet, dass makroskopisch und mikroskopisch kein Blutgerinnsel sichtbar ist und damit das Bauchtuch nicht als kritisch zu betrachten ist (siehe **Abbildung 7**).



Abbildung 7: Repräsentatives Beispiel eines Bauchtuchs, das keine Blutgerinnung induziert („Nein“)

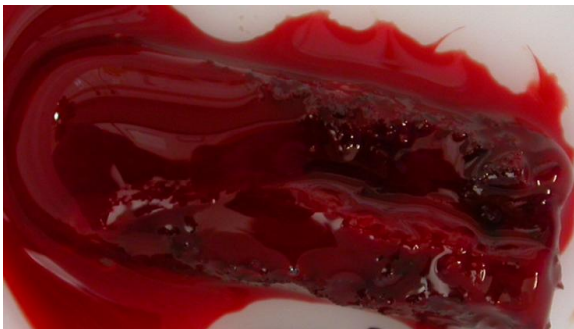


Abbildung 8: Repräsentatives Beispiel eines Bauchtuchs, das eine Blutgerinnung induziert („Ja“)

3.2.1 Auswertung der Activated Clotting Time

Da der vom Hemochrom Junior LR gelieferte, ACT-Wert eine verlässliche Kontrolle bezüglich des blutgerinnenden Verhaltens der Probanden war, wird zunächst mit der Auswertung der erhobenen ACT-Werte begonnen.

Der durchschnittliche ACT-Wert aller Probanden liegt bei 314 Sekunden.

Wenn man die ACT-Werte aller 100 Probanden in ein Histogramm zusammenstellt, erhält man folgendes Schaubild (siehe **Abbildung 9**):

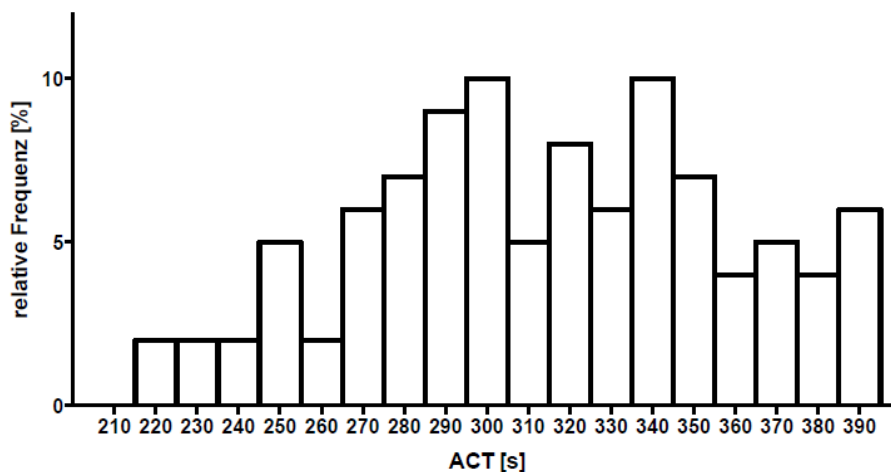


Abbildung 9: Histogramm der ACT-Werte aller Blutspender

Die Abszisse zeigt die ACT-Werte in Sekunden. Die Ordinate zeigt die relative Frequenz in Prozent (Hoffmann 2013).

Wie man dem Histogramm entnehmen kann, liegen alle Probanden im Messbereich zwischen 0 und 400 Sekunden. Somit sind keinerlei Auffälligkeiten bezüglich des Blutgerinnungsverhaltens der Probanden zu erkennen.

3.2.2 Auswertung der Reaktion der Probanden auf die verschiedenen Bauchtuchchargen

Bezüglich des blutgerinnenden Verhaltens der Probanden auf die verschiedenen Bauchtücher konnten große Unterschiede festgestellt werden.

Es konnte eine breite Diversität beobachtet werden, die auch die beiden folgenden Extreme beinhaltete: Das eine Extrem war, dass das Blut eines Probanden (Proband Nr.20) auf keines der Bauchtücher reagierte (siehe **Abbildung 10**). Das andere Extrem war, dass das Blut eines anderen Probanden (Nr.73) auf alle fünf zu untersuchenden Probematerialien positiv reagierte und sich Blutgerinnsel an den Kontaktflächen zwischen Bauchtuch und Blut bildete (siehe **Abbildung 11**). Neben diesen ausgeprägten Reaktionen gab es eine Vielzahl von unterschiedlichen Reaktionen, nämlich Probanden, deren Blut auf eines, auf zwei, auf drei oder auf vier Bauchtücher positiv reagierte, das heißt dass deren Blut in Kontakt mit den entsprechenden Bauchtüchern Blutgerinnsel bildeten.



Abbildung 10: Repräsentative Bilder der Bauchtücher des Probanden Nr. 20, welcher auf keines der Bauchtücher positiv im Sinne eines Blutgerinnsels reagierte



Abbildung 11: Repräsentative Bilder der Bauchtücher des Probanden Nr. 73, welcher auf alle Bauchtücher positiv im Sinne eines Blutgerinnsels reagierte

In der folgenden Zusammenstellung wird sichtbar, wie viele Probanden auf wie viele Bauchtücher positiv reagierten, das heißt bei wie vielen Probematerialien sich Blutgerinnsel bildeten (siehe **Tabelle 3**).

Tabelle 3: Anzahl an positiven Reaktionen für die jeweilige Anzahl an Bauchtüchern

Anzahl an positiven Reaktionen für folgende Anzahl an Bauchtüchern	Anzahl an Probanden
0	01
1	21
2	53
3	24
4	00
5	01

Wie man dem Schaubild entnehmen kann, reagierte die Mehrheit – über die Hälfte- (53%) der Spender auf 2 Bauchtücher positiv. Wenn man hier weiter nachforscht, wird schnell deutlich, dass es sich hierbei wiederum um eine Polarisierung von 94% (50 von 53 Fälle) auf die Bauchtücher Nr. 1 und 5 handelt.

3.3 Auswertung der verschiedenen Bauchtuchchargen

Vor Beginn der Untersuchung bestand die Vermutung, dass lediglich das Bauchtuch Nummer 1 eine zu stark gerinnungsaktivierende Potenz besitzt. Die vier weiteren, ebenfalls von Lohmann und Rauscher zur Verfügung gestellten Tücher wurden ursprünglich als Negativprobe eingeplant und eingesetzt.

Schon nach den ersten Probanden wurde jedoch schnell deutlich, dass die vier vermeintlich nicht zu stark hämolytisch wirkenden Bauchtücher ebenfalls ein teilweise zu stark ausgeprägtes Gerinnungsverhalten aufweisen und damit anfällig für eine überschießende Blutgerinnung mit anschließender Blutgerinnselformung sind.

Nachdem die Hälfte aller Probanden zur Blutentnahme gekommen waren und 50 % der Tests durchgeführt worden waren, stellte sich schon deutlich heraus, dass neben dem kritischen Bauchtuch Nummer 1 vor allem die Bauchtücher Nummer 3 und 5 eine ebenfalls zu stark hämolytische Wirkung besitzen.

Nach Rücksprache mit der Firma Lohmann und Rauscher wurden die Tests weitergeführt.

Nach dem oben beschriebenen *In-vitro*-Testverfahren Testverfahren, wurden die Bauchtücher nach entsprechender Inkubationszeit auf ein vorhandenes Blutgerinnselformung untersucht und ausgewertet. Die Auswertung erfolgte anhand der oben beschriebenen dichotomisierten Einteilung, mit „ja“ oder „nein“.

Nachdem alle Blutabnahmen erfolgt waren und alle Daten ausgewertet worden waren, kam man zu folgenden Ergebnissen:

1. Bauchtuch 1 induzierte wie erwartet in 97% der Fälle ein Blutgerinnselformung
2. Bauchtuch 2 induzierte wie erwartet in nur 2% der Fälle ein Blutgerinnselformung
3. Bauchtuch 3 induzierte wider Erwarten in 25% der Fälle ein Blutgerinnselformung
4. Bauchtuch 4 induzierte wie erwartet in nur 4% der Fälle ein Blutgerinnselformung
5. Bauchtuch 5 induzierte wider Erwarten in 76% der Fälle ein Blutgerinnselformung

Abbildung 12 und 13 zeigt die Rasterelektronenmikroskop-Aufnahmen der Bauchtücher vor und nach der Inkubation mit frischem humanem Vollblut eines gesunden Spenders, der keinerlei Medikation zu sich nimmt, kein Tabakkonsument ist und selbstverständlich auch nicht gegen die sonst geltenden Ausschlusskriterien verstößt (siehe **Abbildungen 12 und 13**).

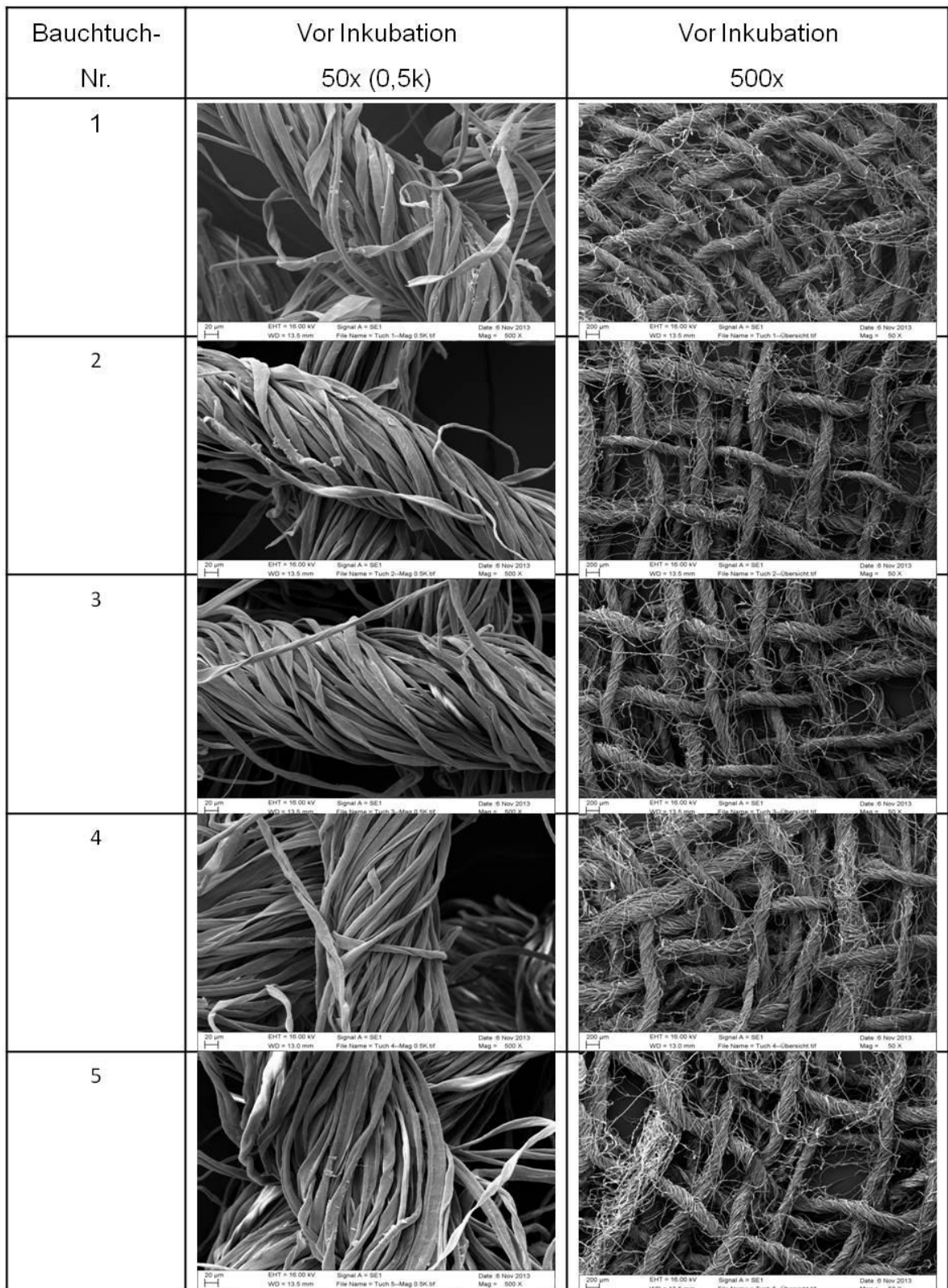


Abbildung 12: Zusammenstellung der REM-Aufnahmen der Bauchtücher vor der Inkubation mit Vollblut für 30 min bei 37°C

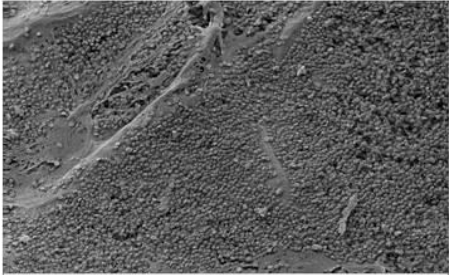
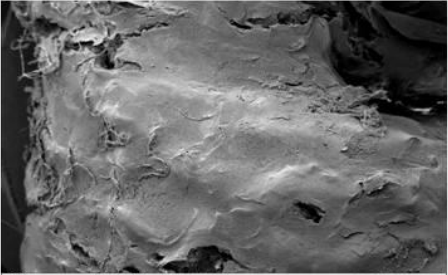

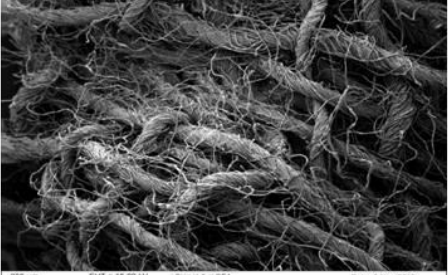

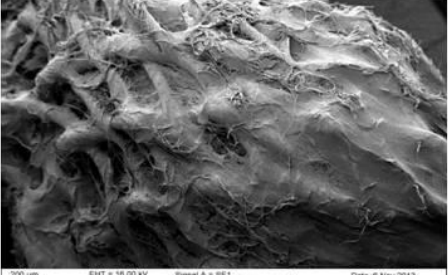

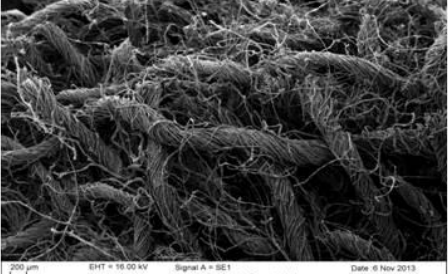
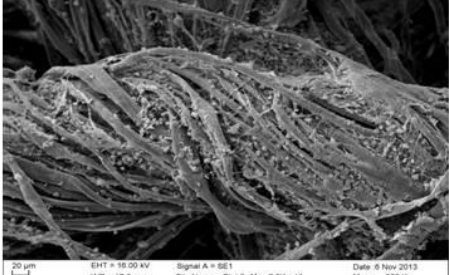
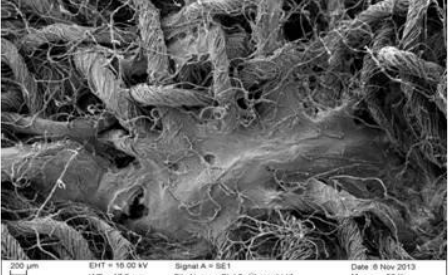
Bauchtuch- Nr.	Nach Inkubation 0,5k	Nach Inkubation Übersicht
1	 <p>20 µm EHT = 10.00 kV Signal A = SE1 Date: 0 Nov 2013 WD = 12.0 mm File Name = Blut 1--Mag 0.5k.tif Mag = 500 X</p>	 <p>200 µm EHT = 10.00 kV Signal A = SE1 Date: 0 Nov 2013 WD = 12.0 mm File Name = Blut 1--Übersicht.tif Mag = 50 X</p>
2	 <p>20 µm EHT = 10.00 kV Signal A = SE1 Date: 0 Nov 2013 WD = 14.0 mm File Name = Blut 2--Mag 0.5k.tif Mag = 500 X</p>	 <p>200 µm EHT = 10.00 kV Signal A = SE1 Date: 0 Nov 2013 WD = 14.0 mm File Name = Blut 2--Übersicht.tif Mag = 50 X</p>
3	 <p>20 µm EHT = 10.00 kV Signal A = SE1 Date: 0 Nov 2013 WD = 14.6 mm File Name = Blut 3--Mag 0.5k.tif Mag = 500 X</p>	 <p>200 µm EHT = 10.00 kV Signal A = SE1 Date: 0 Nov 2013 WD = 14.6 mm File Name = Blut 3--Übersicht.tif Mag = 50 X</p>
4	 <p>20 µm EHT = 10.00 kV Signal A = SE1 Date: 0 Nov 2013 WD = 14.5 mm File Name = Blut 4--Mag 0.5k.tif Mag = 500 X</p>	 <p>200 µm EHT = 10.00 kV Signal A = SE1 Date: 0 Nov 2013 WD = 14.5 mm File Name = Blut 4--Übersicht.tif Mag = 50 X</p>
5	 <p>20 µm EHT = 10.00 kV Signal A = SE1 Date: 0 Nov 2013 WD = 17.0 mm File Name = Blut 5--Mag 0.5k.tif Mag = 500 X</p>	 <p>200 µm EHT = 10.00 kV Signal A = SE1 Date: 0 Nov 2013 WD = 17.0 mm File Name = Blut 5--Übersicht.tif Mag = 50 X</p>

Abbildung 13: Zusammenstellung der REM-Aufnahmen der Bauchtücher nach der Inkubation mit Vollblut für 30 min bei 37°C

Wie man den REM-Bildern sehr anschaulich entnehmen kann, weisen die Bauchtücher Nummer 1, 3 und 5, im Vergleich zu den Bauchtüchern Nummer 2 und 4, deutlich verstärkte prokoagulatorische Eigenschaften auf. Dies kann man anhand des gebildeten Fibrinnetzwerks auf der Oberfläche der Tücher erkennen. Es ist eine immense Anlagerung von Thrombozyten und Erythrozyten zu erkennen. Das Einlagern der roten Blutkörperchen spricht für eine erfolgreich stattgefunden sekundäre Hämostase. Im Vergleich dazu, sieht man auf den beiden unauffälligen Bauchtüchern 2 und 4 kaum eine Ansammlung korpuskulärer Blutbestandteile.

Aus nachfolgender Zusammenstellung kann für jedes der fünf Bauchtücher entnommen werden, in wie vielen der 100 Fällen es zu einer *Clot*-Bildung kam, das heißt die Reaktion positiv ausfiel und daher mit „ja“ dokumentiert wurde (siehe **Tabelle 4**).

Der Vollständigkeit halber wurden in der Tabelle auch die Negativreaktionen aufgeführt.

Tabelle 4: Übersicht über das Verhalten der zu untersuchenden Bauchtücher

Bauchtuch Nummer	„Positiv“	„Negativ“
1	97	3
2	2	98
3	25	75
4	4	96
5	76	24

Es zeigt sich also, dass Bauchtuch 1 mit 97% positiver Reaktionen nahezu die in der Fallzahlplanung errechneten 97,5% erreichten. Wenn man nun die mid-p-Methode anwendet und man das 5% Niveau betrachtet, ergibt sich als einseitige untere Konfidenzintervalsgrenze 93% (Agresti 2005, Fosgate 2005). Daraus kann man schließen, dass Bauchtuch 1 mit einer Wahrscheinlichkeit von mindestens 95% in 93% der Fälle mit einem Blutgerinnsel reagieren wird. Für Bauchtuch 5 sind das 68,4% der Fälle und für Bauchtuch 3 sind es anders als erwartet 18,5%.

Für die Bauchtücher 2 und 4 bestätigten sich die Berechnungen der Fallzahlplanung. Da sie tatsächlich als Negativkontrollen dienten, kann man äquivalent dazu die obere Konfidenzintervalsgrenzen berechnen. Das ist die Zahl, mit der man voraussagen kann, wie viele Spender maximal mit einer Wahrscheinlichkeit von 95% positiv auf die Tücher reagieren werden. Diese betragen für Bauchtuch 2 5,6% und für Bauchtuch 4 8,4%. Folglich kann man sagen, dass mit 95% Wahrscheinlichkeit nicht mehr als 5,6% (Bauchtuch 2) bzw. 8,4% (Bauchtuch 4) aller Spender positiv auf die beiden genannten Tücher reagieren werden.

3.4 Aussagekraft der Ergebnisse und Schlussfolgerung

In Anbetracht der schwerwiegenden Folgen eines fehlerhaften Bauchtuches in der Herzchirurgie muss das etablierte Testsystem eine hohe Spezifität aufweisen. Das heißt, es muss in der Lage sein, jenes Bauchtuch zuverlässig herauszufiltern, welches auch nur einen einzigen Blutspender positiv reagieren lässt, das heißt positiv im Sinne eines Blutgerinnsels.

So sind bei der Auswertung der in dieser Studie erhobenen Daten verschiedene Interpretationsansätze möglich.

Generell sind zwei variable Faktoren von Bedeutung: einerseits die Anzahl der zu testenden Probanden; andererseits die zu erwartende Anzahl der positiv getesteten Probanden.

So kann man zum Beispiel die Wahrscheinlichkeit, dass mindestens ein Proband positiv auf das zu untersuchende Bauchtuch reagiert, in einem Schaubild darstellen. Dies geschieht in Abhängigkeit davon, wie viele Probanden getestet werden und diese Anzahl wurde hier zwischen fünf und zwölf gewählt. Die Abszisse definiert den erwarteten Anteil der Spender in Prozent, die positiv auf das Bauchtuch reagieren werden. So kann von der Ordinate die Wahrscheinlichkeit in Prozent abgelesen werden, mit welcher mindestens ein Proband positiv auf das Bauchtuch reagieren wird - je nach Anzahl der getesteten Probanden. Alle acht Kurven steigen zunächst nahezu linear an und konvergieren dann gegen 100% (siehe **Abbildung 14**).

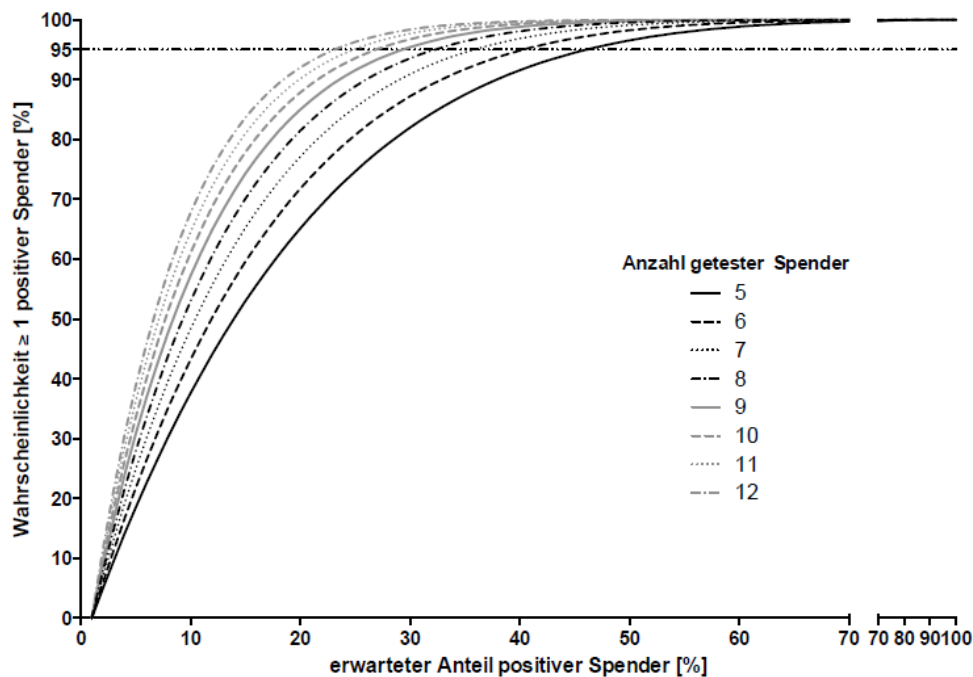


Abbildung 14: Wahrscheinlichkeit einer positiven Reaktion in Abhängigkeit des erwarteten Anteils positiver Spender und der Anzahl getesteter Spender

Die Abszisse zeigt den erwarteten Anteil positiver Spender in Prozent. Die Ordinate zeigt die Wahrscheinlichkeit in Prozent, dass mindestens ein Proband positiv auf das Bauchtuch reagieren wird. (Hoffmann 2013)

Beispielhaft kann dies anhand einiger in der Studie untersuchten Bauchtücher demonstriert werden.

Für Bauchtuch 1 liegt der erwartete Anteil positiver Spender bei 97%. Folglich ist die Wahrscheinlichkeit, dass mindestens ein Proband positiv (also mit einem Blutgerinnsel) auf das Versuchsobjekt reagiert, bei fünf getesteten Spendern über 99%.

Für das wider Erwarten häufig positiv reagierende Bauchtuch 3, mit einem Anteil positiver Probanden von 25%, beträgt die Wahrscheinlichkeit, dass mindestens ein Proband positiv reagiert, bei zehn getesteten Probanden 95%.

Generell kann man sagen, dass für einen erwarteten Anteil positiver Probanden von 45% die Wahrscheinlichkeit, dass mindestens einer von fünf Probanden positiv auf das zu testende Bauchtuch reagieren wird, 95% beträgt. Statistisch betrachtet entspricht dies einem Fehler 1. Art von 5%.

Jedoch kann man dieses Diagramm auch aus einer anderen Perspektive betrachten. So ist es auch möglich, der Abbildung 15 die Wahrscheinlichkeit falsch positiver Ergebnisse zu entnehmen. Dies ist vor allem dann von Interesse, wenn die getesteten Bauchtücher einen niedrigen erwarteten Anteil positiver Spender haben, wie die Bauchtücher 2 und 4 aus der Studie, die tatsächlich als Negativkontrolle dienten und nur in 2 bzw. 4% der Fälle positiv reagierten (siehe **Abbildung 15**).

Setzt man exemplarisch eine Grenze für zulässige Bauchtücher bei einem erwarteten Anteil positiver Probanden von 5%, dann würde dies in dieser Studie bedeuten, dass lediglich die Tücher Nummer 2 und 4 valide wären. Am Schaubild kann man nun ablesen, zu wie viel Prozent ein eigentlich zulässiges Bauchtuch inkorrekterweise als falsch positiv getestet werden würde und damit wiederum als unzulässig gelten würde. Bei fünf untersuchten Probanden wäre die Wahrscheinlichkeit eines falschen Ergebnisses schon knapp ein Viertel, genauer gesagt 23%. Bei zwölf getesteten Probanden wäre es schon fast die Hälfte, genauer gesagt 46%.

Wie oben thematisiert, ist es problematisch, das Diagramm so zu gestalten, dass jegliche Interpretation frei von falschen Ergebnissen ist. Die Schwierigkeit liegt darin, ein Mittelmaß zu finden um einerseits kritische Bauchtücher ausfindig zu machen aber andererseits unkritische Bauchtücher nicht fälschlicherweise als kritisch zu definieren.

So gilt es für die Etablierung des Thrombogenitätstestsystems die Schwerpunkte individuell zu setzen, um an die Informationen zu gelangen, die man erheben möchte. Wie mehrfach demonstriert, gibt es große Differenzen je nach Anzahl der getesteten Probanden (zwischen fünf und zwölf in diesem Fall). Ebenso ist es von großer Bedeutung, wie das Schaubild, je nachdem welche Information gesucht wird, interpretiert wird.

Konsequenterweise stellt sich bei vorliegender Komplexität und Variabilität die Frage, ob es wahrhaftig Sinn macht einen Grenzwert in Abhängigkeit des

erwarteten Anteils positiver Probanden zu definieren, ab dem das Bauchtuch als kritisch eingestuft wird.

Diese Schwierigkeit lässt sich anhand von Bauchtuch 3 sehr gut darstellen.

Bauchtuch 3 war jenes, welches als Negativprobe eingesetzt werden sollte, aber wider Erwarten in 25% der Fälle zu positiven Ergebnissen führte, weil es im *In-vitro*-Test zur Bildung eines Blutgerinnsels führte.

Schlussfolgernd kann man sagen, dass man, um ein Tuch mit einer Wahrscheinlichkeit von 95% als kritisch herauszufiltern zu können, elf Probanden in den Test involvieren muss. Bei lediglich zehn Probanden läge die exakte Wahrscheinlichkeit schon unter 95%.

Setzt man das Augenmerk jedoch auf die Anzahl der benötigten Probanden, kann man dasselbe Schaubild in Abhängigkeit des erwarteten Anteils positiver Spender (in Prozent) erstellen. Die Abszisse ist identisch wie in Abbildung 14.

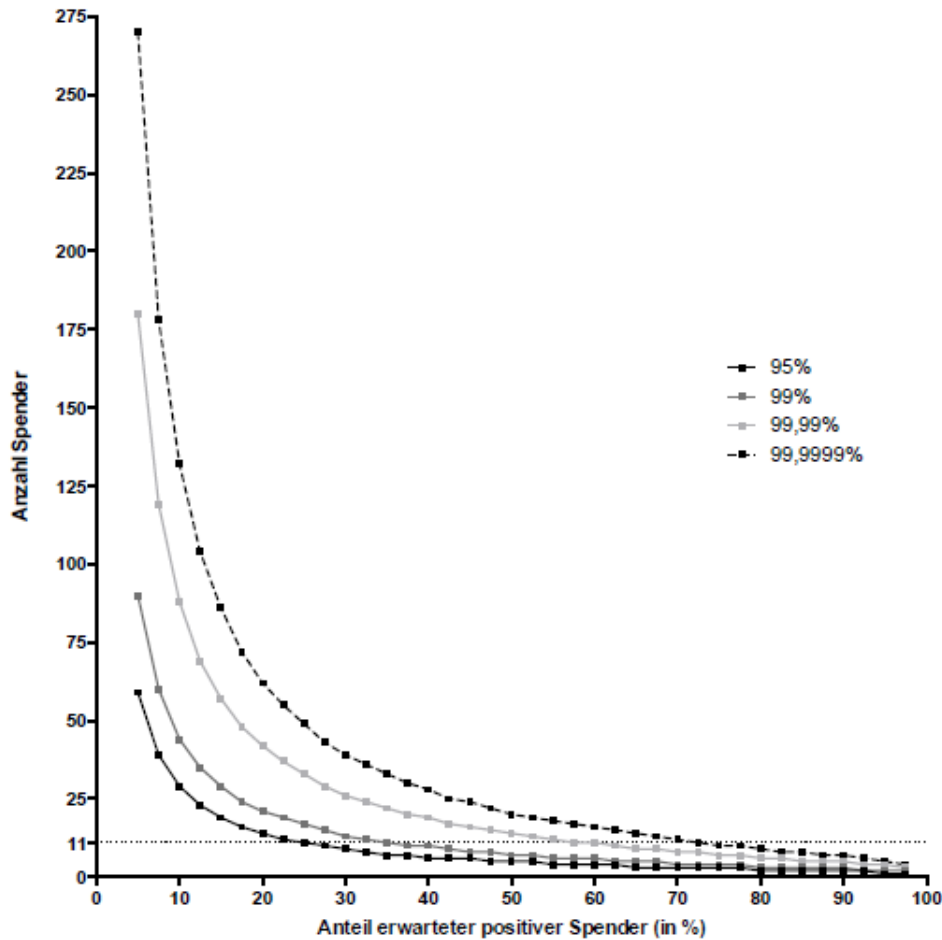


Abbildung 15: Anzahl benötigter Probanden in Abhängigkeit des Anteils erwarteter „positiver“ Probanden ein Bauchtuch als kritisch zu erkennen

Die Abbildung zeigt die Anzahl benötigter Probanden in Abhängigkeit des Anteils der erwarteten „positiven“ Probanden ein Bauchtuch mit einer Wahrscheinlichkeit von 95%, 99%, 99,99% und 99,9999% als kritisch zu erkennen. Die Abszisse zeigt den Anteil erwarteter positiver Probanden in Prozent. Die Ordinate zeigt die Anzahl an Blutspendern. Die horizontal gepunktete Linie liegt bei 11 Spendern (Hoffmann 2013).

Der initial lineare Verlauf aus Abbildung 14 ist hier nicht zu sehen. Es besteht kein linearer Zusammenhang zwischen der Anzahl der Probanden und einem kleiner werdenden erwarteten Anteil positiver Reaktionen der Probanden auf das zu testende Bauchtuch. Wenn man sich das Ziel setzt, ein Bauchtuch mit einer Wahrscheinlichkeit von 95% zu finden, welches bei 20% aller Probanden positiv reagiert, dann werden 17 Probanden benötigt. Logischerweise erhöht sich die Probandenzahl, wenn man die Wahrscheinlichkeit auf 99%, 99,99% und 99,9999% erhöht. Versucht man beispielsweise ein Bauchtuch, auf welches 30% aller Probanden reagieren, mit 99,9999% zu finden, sind mindestens 40 Probanden nötig.

4. Diskussion

4.1 Notwendigkeit eines etablierten Thrombogenitätstestsystems für Bauchtücher

Erstmals im Jahre 2000 erschien im Arzneitelegramm ein kurzer Bericht über Gerinnungsprobleme bei kardiochirurgischen Eingriffen mit extrakorporaler Zirkulation an der Herz-Lungen-Maschine. Diese Probleme waren in Kliniken in Bremen und Dresden aufgetreten, in denen grüne Bauchtücher aus der Volksrepublik China verwendet worden waren. Es wurde geraten, auf solche Bauchtücher zu verzichten (Leitz 2000).

Bereits im Jahre 2001 veröffentlichten Leitz et al. eine Untersuchung mit folgendem Titel: „Gerinnungsprobleme an der Herz-Lungen-Maschine durch grüne Bauchtücher“. Sie berichteten von sechs Fällen bei denen Gerinnungsprobleme während kardiochirurgischer Eingriffe unter Einsatz der HLM aufgetreten waren. In allen sechs Fällen waren grüne, mit physiologischer Kochsalzlösung angefeuchtete Bauchtücher als Herzunterlage verwendet worden, um die zu operierenden Stellen besser zu exponieren. In drei der Fälle traten Gerinnsel im Hartschalenreservoir auf. Zweimal konnten Gerinnsel zusätzlich auch im venösen Beutel gefunden werden. Im gravierendsten der sechs Fälle konnte ein Ausgussthrombus beobachtet werden, der zur Verstopfung des Oxygenatoreingangs führte. In der Folge schaltete sich in diesem Fall die arterielle Pumpe ab (Leitz 2001).

Mittels klinischen Ausschlussverfahrens konnte sicher festgestellt werden, dass die Ursache der Probleme bei den grünen Bauchtüchern lag. Denn erst durch das vollständige Verbannen der grünen Textilien aus dem Operationssaal ließen sich die Gerinnungsprobleme an der HLM beheben. Ein Wechseln des Heparins, sowie eine Erhöhung der Konzentration desselbigen führte zu keiner Besserung. Genauso wenig erfolgreich war das Starten der EKZ erst bei einer ACT von 450 s statt bei 400 s. Um für Exaktheit zu sorgen, wurden neue ACT-Geräte angeschafft.

Bis zum Jahre 2012 schienen die Probleme behoben zu sein, bis das Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte eine Rückrufaktion grüner Bauchtücher, die für Gerinnungsprobleme an der Herz-Lungen-Maschine bei kardiochirurgischen Eingriffen gesorgt hatten, veranlasste.

Die Notwendigkeit der Validierung eines Testsystems zur Evaluierung der gerinnungsaktivierenden Potenz von Bauchtüchern ergab sich aufgrund dieser Vorkommnisse.

In allen anderen chirurgischen Sparten außerhalb der Kardiochirurgie können prokoagulatorisch agierende Bauchtücher bedenkenlos eingesetzt werden. Im Bereich der Herzchirurgie jedoch müssen thromboembolische Komplikationen von vornherein ausdrücklich ausgeschlossen werden können. Denn an den Patienten, die perioperativ mit zirka 3 IU hochmolekularem Heparin/ml Patientenblut heparinisiert werden und eine ACT >450 s haben, wird mit direkter Retransfusion des eigenen Blutes ohne den Einsatz des *CellSavers* und somit ohne das Ausfiltern der Gerinnungsfaktoren operiert.

In der Herzchirurgie kann es somit beim Einsatz „fehlerhafter“ Bauchtücher, das heißt solcher, die eine überschießende blutgerinnende Aktivität induzieren, zu schwerwiegenden lebensbedrohlichen thromboembolischen Komplikationen kommen, da ein „Waschen und Filtrieren“ des Blutes vor der Retransfusion mittels *CellSaver* aufgrund der hochdosierten intravenösen Heparinisierung der Patienten nicht erfolgt.

Das speziell hierfür konzipierte Testsystem, welches im Forschungslabor der Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie der Universitätsklinik Tübingen anhand der Ergebnisse zahlreicher Vorversuche entwickelt wurde, ermöglicht ein schnelles, einfaches und zuverlässiges Verfahren, Bauchtücher mit einer erhöhten gerinnungsaktiverenden Potenz präoperativ ausfindig zu machen. Seine Spezifität wurde anhand von 100 Probanden und mehreren verschiedenen Bauchtuchchargen bestätigt.

4.2 Prinzip des Testverfahrens

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde im Forschungslabor der Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie des Universitätsklinikum Tübingen ein Testsystem entwickelt, anhand dessen die Hämatokompatibilität verschiedener Bauchtuchchargen untersucht werden kann. Nach einigen Vorversuchen konnte ein zuverlässiges, leicht zu reproduzierendes und relativ zeitsparendes System entwickelt werden, bei dem Proben der verschiedenen Bauchtuchchargen mit heparinisiertem humanem Vollblut für 30 min bei 37°C inkubiert werden.

Wie bei allen *In-vitro*-Testsystemen fehlen die physiologischen Einflussgrößen von Seiten der Patienten. Unser Probandenpool setzte sich hauptsächlich aus jungen, gesunden freiwilligen Blutspendern zusammen (Durchschnittsalter: 27 Jahre), die speziell nach bestimmten obengenannten Kriterien (siehe Kapitel 2.1.4 Blutproben) ausgesucht wurden.

Außerdem waren die Probanden weder heparinisiert (dies geschah durch Befüllen der Abnahmemonovetten mit Heparin) noch an eine Herz-Lungen-Maschine angeschlossen.

Die physiologische Fließbewegung des Blutes im arteriellen und venösen Gefäßssystem des menschlichen Körpers wurde durch dezente Hin- und Herbewegungen des Schüttlers imitiert. Ein statisches Modell ohne diese simulierenden Parameter, könnte die Ergebnisse verfälschen, da mit einer Sedimentation der korpuskulären Bestandteile des Blutes gerechnet werden müsste.

Manche Autoren beschreiben eine Verkürzung der ACT ausgelöst durch chirurgischen Stress (Larsen 2012). Dies kann im Testsystem nicht simuliert werden, da die Probanden zum Zeitpunkt der Blutabnahme entspannt auf einem Blutabnahmestuhl saßen. Dies kann somit auch nicht in den Ergebnissen berücksichtigt werden.

Da die Methodik des *In-vitro*-Testsystems von der intraoperativen Situation abweicht, bleibt immer ein geringes, nicht auszuschließendes Restrisiko für den

Einsatz der Bauchtücher in der Kardiochirurgie. Jedoch eignet sich das System hervorragend für eine präklinische Testung der Bauchtücher. Dadurch sollten alle kritischen Tücher präoperativ detektiert werden und keinerlei Anwendung in der Kardiochirurgie finden, um mögliche thromboembolische Komplikationen auszuschließen.

4.3 Zusammenhang zwischen der ACT und Blutgerinnung

Was anhand des ACT- Wertes nicht sichtbar wurde, ist eine genetisch bedingte Blutgerinnungsstörung, wie dies zum Beispiel bei Proband 74 der Fall ist. Folgender Proband hat eine genetisch nachgewiesene Faktor 4 Störung, was weiter jedoch nicht auffällig ist und sich nicht in der ACT-Zeit widerspiegelt.

Interessanterweise kann man feststellen, dass diejenigen Probanden, die häufiger positiv auf die verschiedenen Bauchtuchchargen reagierten, tendenziell dazu neigten, einen niedrigeren ACT-Wert zu haben. So hatten 17 von 24 Probanden, die auf drei Bauchtücher positiv reagierten, einen ACT-Wert < 320 Sekunden.

Wenn man jedoch die Spendergruppen, die verschieden häufig positive Reaktionen auf die Tücher hatten, und ihre jeweiligen ACT-Werte miteinander vergleicht, kann kein signifikanter Unterschied ausfindig gemacht werden.

Dies kann an folgender Varianzanalyse mit multiplen Vergleich nach Tukey (Graph Pad Prism 6.01) deutlich sichtbar gemacht werden (siehe **Abbildung 16**).

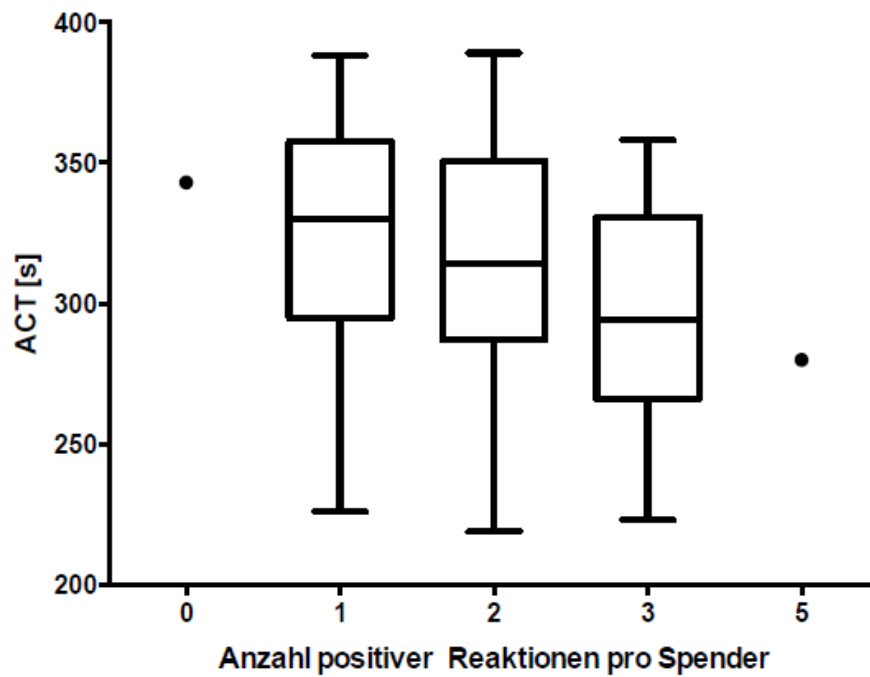


Abbildung 16: Tukeys „Box&Whisker“-Diagramme der ACT (in s) in Abhängigkeit der Anzahl positiver Reaktionen der Spender

[Varianzanalyse mit multiplern Vergleich nach Tukey (GraphPad Prism 6.01).] Die Abszisse zeigt die Anzahl positiver Reaktionen pro Spender. Die Ordinate zeigt die ACT-Werte in Sekunden (Hoffmann 2013).

4.4 Einfluss der Testbedingungen auf die Testergebnisse

4.4.1 Heparinkonzentration

Eine Antikoagulation des Blutes bei kardiochirurgischen Eingriffen mit extrakorporaler Zirkulation ist von dringender Notwendigkeit, um eine unerwünschte Aktivierung des Gerinnungssystems durch den Fremdkörperkontakt der Thrombozyten mit den Oberflächen der HLM zu verhindern. Würde man auf die pharmakologische Manipulation verzichten, wäre eine Verstopfung der Herz-Lungen-Maschine durch das gerinnende Blut des Patienten eine ziemlich sichere Folge.

In der Literatur findet man verschiedene Werte der verwendeten Heparinkonzentration in der Kardiochirurgie mit dem Einsatz der Herz-Lungen-Maschine. Meist beträgt diese zwischen drei und fünf IU/ml Vollblut und einem entsprechenden ACT-Wert > 450 Sekunden. Ausnahmen wie die von Dowling et al. beschrieben, bei denen ohne systemischer Antikoagulation operiert wird, sind eine Rarität und nur in Extremfällen indiziert (Dowling, Brown et al. 1993).

Eine zu hohe Antikoagulation kann aufgrund der beeinträchtigten Thrombozytenfunktion das postoperative Risiko einer Komplikation erhöhen. Im schlimmsten Fall kann es zu Hirnblutungen kommen. Ein Zusammenhang zwischen der Heparinkonzentration im Blut während der EKZ an der HLM und den postoperativen Blutverlusten konnte nachgewiesen werden. Diese Komplikationen sollten möglichst vermieden werden (Gravlee 1990).

Die im Test verwendete Heparinkonzentration von 1,5 IU/ml Vollblut entspricht lediglich der Hälfte derer, die in der praktizierten Herzchirurgie verwendet wird. Anomalitäten bezüglich der Gerinnungsaktivierung von Bauchtüchern können, durch die bewusst erniedrigte Heparinkonzentration im Vergleich zur operativen Situation, eindeutig detektiert werden. Außerdem können so falsch positive Ergebnisse durch eine gewünschte produktspezifische Gerinnungsaktivierung, die jedoch nicht zu ausgeprägt ausfallen soll, ausgeschlossen werden.

So kann mit Sicherheit davon ausgegangen werden, dass der Test aussagekräftig ist und dass auf die Ergebnisse des *In-vitro*-Modells Verlass ist. Denn wenn die Bauchtücher schon bei 1,5IU/ml Vollblut prokoagulatorische Eigenschaften aufweisen, dann sind diese Tücher bei klinischen Bedingungen von drei bis fünf IU/ml Vollblut auf jeden Fall nicht für den klinischen Alltag geeignet.

Als das Testverfahren konzipiert wurde, wurde mit der Variablen „Heparinkonzentration“ experimentiert. So hat man festgestellt, dass bei sonst exakt gleichen Testbedingungen (30 min auf dem Schüttler etc.) schon bei 2 IU/ml Heparin der Test nicht sensitiv genug ist. In nahezu allen Fällen konnte keinerlei verstärkte Gerinnungsaktivierung festgestellt werden.

In Anbetracht der Tatsache, dass kardiochirurgische Eingriffe unter hypothermen Bedingungen stattfinden, muss in diesem Zusammenhang die Pharmakokinetik von Heparin unter nicht-normothermen Bedingungen betrachtet werden. In der Literatur wird dieses Thema schon länger diskutiert. Larsen schreibt sehr allgemein, dass die Halbwertszeit von Heparin durch erniedrigte Temperaturen verlängert wird (Larsen 2012). Malviya berichtet, dass eine direkte Proportionalität zwischen der Heparin clearance und der Temperatur besteht (Malviya 1997).

4.4.2 ACT

Die Messung der ACT bringt einige Vorteile mit sich, die die Messung der aPTT zum Beispiel nicht erfüllen kann. So benötigt man für die Bestimmung der aPTT ein Labor, geschultes Personal und außerdem kann es nicht am Patientenbett gemessen werden, wie die ACT (Maadani 2008). Außerdem sind aufgrund des hochdosierten Heparins die aPTT-Werte häufig außerhalb des Messbereichs (Marmur 2002).

Obwohl seit Jahrzehnten weltweit Herzchirurgie mit Heparin als Antikoagulanz für CPB praktiziert wird, wurde eine genau definierte Ziel-ACT-Zeit, die eine gesicherte Antikoagulation bestätigt, noch nicht allgemein festgelegt. Die Problematik liegt unter anderem an den großen interindividuellen Variationen zwischen der Heparindosierung und der gemessenen ACT-Zeit (Soleimannejad 2014). Meist wird eine ACT-Zeit zwischen 400 und 480 Sekunden angestrebt (Lobato 2010). Klein und Agarwal beschrieben in ihrem Artikel, dass es wenig prospektive Studien gibt, die eine Hilfestellung in Bezug auf die Reaktion auf gewisse ACT-Werte leisten (Klein 1996).

Es gab schon zahlreiche Ansätze, eine Korrelation zwischen der Heparindosierung und der ACT bzw. der aPTT zu finden und diese zu vergleichen. Congdon et al. stellten fest, dass es zwischen der ACT-Kurve und der Heparindosis eine lineare Korrelation gibt (Congdon 1973).

Anhand von zahlreichen Untersuchungen hat man feststellen können, dass die ACT eine Gerinnungszeit zur Verfügung stellt, die je nach Messgerät und Verfahren sehr interindividuelle Ergebnisse liefert. Die Ergebnisse verschiedener Messgeräte sind nicht geeignet für einen direkten Vergleich (Uden 1991, Bowers 1994). Dies muss beim Testsystem berücksichtigt werden. Ein Wechseln des ACT-Geräts würde die Messung und die Aussagekraft des Testsystems verfälschen. Des Weiteren muss die Exaktheit der ACT-Werte gewährleistet werden. Diesbezüglich wurde das Gerät in unserem Forschungslabor vor jedem Gebrauch geprüft.

In unserem Testsystem fungierte die ACT außerdem als Bestätigung dafür, dass keiner der Probanden sieben Tage vor der Blutabnahme ein blutgerinnungshemmendes Medikament zu sich genommen hat womit sie/er gegen die Ausschlusskriterien verstoßen hätte. Denn wäre dies der Fall gewesen, wäre der Proband durch eine erhöhte ACT-Zeit aufgefallen und man hätte ihn von der Teilnahme an der Studie ausschließen müssen.

Die im Test verwendete Kontrolle des Gerinnungsverhaltens der Probanden mittels der Bestimmung der ACT muss dennoch kritisch betrachtet und deren

Verlässlichkeit perioperativ möglicherweise in Frage gestellt werden. Denn die Ergebnisse von Despotis et al. zeigen, dass während der extrakorporalen Zirkulation nur ein schwacher oder eventuell gar kein Zusammenhang zwischen der gemessenen ACT und der Heparinkonzentration besteht. Ein Erklärungsversuch sieht er in der erniedrigten Temperatur und dem geringeren Hämatokrit (Despotis 1994). Dasselbe Phänomen beschreibt auch Malviya, nämlich dass die Beziehung zwischen dem ACT-Wert und der Heparinaktivität während des Zustands der Hypothermie nicht einsehbar ist (Malviya 1997). Cohen dagegen beschreibt einen Zusammenhang zwischen der ACT und der Heparinmenge und sieht darin eine zuverlässige Kontrollmethode während CPB, allerdings unter der Bedingung, dass der ACT-Wert <500 Sekunden ist (Cohen 1984). Allgemein muss man konstatieren, dass die ACT die Gerinnungsaktivität des Vollblutes misst und nicht, wie häufig fälschlicherweise gedacht, die Heparinkonzentration im Blut.

Einen besonderen, wenn auch seltenen Problemfall stellen Patienten mit Heparinallergie dar. Wenn diese Patienten der Herzchirurgie an der Herz-Lungen-Maschine behandelt werden und Heparin gegeben wird, kann dies zu schwerwiegenden Komplikationen führen. Eine der schwerwiegendsten potentiellen Komplikationen bei Heparinmenge ist die heparininduzierte Thrombozytopenie (HIT). Diese gibt es in zwei verschiedenen Typen: HIT Typ I und HIT Typ II. Sie wird hauptsächlich durch die Antikörperbildung gegen an Plättchenfaktor 4 gebundenes Heparin verursacht. Vor allem bei HIT Typ II kann es zu einer gravierenden Thromboembolieeigung kommen. In solchen Ausnahmen wird Heparin meist durch systemisch gegebenes Lepirudin substituiert (Boinot 2003). Problematisch ist aber dann die perioperative Überwachung des antikoagulierten Zustands des Patienten. Diese wird durch Lepirudin erschwert. Lepirudin hat die Eigenheit, dass der antikoagulierte Zustand des Patienten nicht zuverlässig durch die ACT kontrolliert werden kann. Es gibt keinen direkten Zusammenhang zwischen Lepirudin-Plasma-Werten und ACT-Zeiten. Das Ersatzmittel führt zu einer Verzögerung, die dazu führt, dass die ACT-Werte nicht zuverlässig wiedergegeben werden können im Vergleich zum antikoagulierten Effekt. Eine mangelnde Kontrolle des Zustandes

des Patienten kann vor allem bei Lepirudin katastrophale Folgen mit sich bringen, da das therapeutische Fenster dieses Medikaments sehr schmal ist. So kann eine Unterdosierung zu einem Gerinnen des Blutes in der HLM führen. Eine Überdosierung dagegen kann potentiell zu gravierendem Bluten mit enormen Blutverlusten führen. Balthazar et al. empfehlen in solchen Fällen als Ersatz zur ACT-Messung die Messung der verdünnten Thrombinzeit (*diluted thrombin time*) (Balthazar 2014). Eine Weiterentwicklung des Testsystems für Patienten mit einer Heparinallergie wäre in Zukunft daher in Betracht zu ziehen.

4.4.3 Temperatur

Das bewusste therapeutische Herabsenken der Körpertemperatur auf unter 37°C wird als Hypothermie bezeichnet. Laut Polderman et al. stellt dieser Therapieansatz bei erfahrenen Behandlern eine sichere und hocheffiziente Operationsmethode dar. Es können verschiedene Formen unterschieden werden. So gibt es eine milde (34-35,9°C), eine moderate (32-33,9°C), eine moderat-tiefe (30-31,9°C) und eine tiefe Hypothermie (<30°C) (Polderman 2009).

Hypothermie gilt schon lange als neuroprotektive Maßnahme und wirkt durch ein Herunterfahren zahlreicher Mechanismen im menschlichen Körper. Der Sauerstoffverbrauch der einzelnen Zellen wird reduziert. Die Vermutung liegt nahe, dass durch den reduzierten Gewebestoffwechsel der Zellschutz während der Minderperfusion erhöht ist. Ziel ist es, Nekrosen zu verhindern und die Ansammlung toxischer Metabolismen gering zu halten (Lanier 1995).

Pro Grad Celsius, um den die Körpertemperatur reduziert wird, wird der Metabolismus um fünf bis acht Prozent herabgesetzt (Rosomoff 1954). Physikalisch betrachtet wird nach der van't Hoff'schen Regel die Metabolisierungsrate um ca. 7 %/K gesenkt (Schwarz 2008).

Laborit war einer der ersten, der diesen Therapieansatz beschrieben hat (Laborit 1951). Zunächst ging man davon aus, dass das bewusste Herabsenken der Körperkerntemperatur auf unter 37°C ausschließlich den Zellstoffwechsel des Gehirns reduziert.

Heute weiß man, dass die Hypothermie zahlreiche protektive Effekte auf den menschlichen Organismus vereint. Unter anderem soll sie einen anti-schämischen und positiv inotropen Effekt auf das Herz haben (Palmer 2014).

Aus postoperativer Sicht birgt die Hypothermie jedoch signifikant nachteilige Effekte. Es wird vermutet, dass das therapeutische Senken der Körperkerntemperatur in Zusammenhang mit Nachblutungen unter anderem aufgrund der verminderten Thrombozytenaggregation, einer Beeinträchtigung der Gerinnungskaskade und einer vermuteten generalisierten Koagulopathie steht (Rohrer 1992, Boldt 1996, Paparella 2004).

Kardochirurgische Eingriffe werden häufig unter hypothermischen Bedingungen durchgeführt (Campos 2008, Su 2010). Man hat unter anderem herausgefunden, dass Hypothermie Kardiomyozyten während oxidativen Stresses vor Apoptose, DNA -Schaden und mitochondrialer Dysfunktion schützt (Schmitt 2011).

Hier liegt ein Unterschied zwischen den Testbedingungen und realen Operationsbedingungen. Im *In-vitro*-Test im Forschungslabor der Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie der Universitätsklinik Tübingen wurden die Versuche sowie die Bestimmung der ACT bei Körpertemperatur (Normothermie) durchgeführt.

So entsteht der Verdacht, dass perioperativ bei Temperaturen unter 37°C veränderte Ergebnisse bezüglich des koagulatorischen Verhaltens der Bauchtücher sowie veränderte ACT-Werte auftreten könnten.

Außerdem führt ein Herabsenken der Körperkerntemperatur zu einer Verlangsamung des Stoffwechsels. Folglich ist die Metabolisierungsrate von Medikamenten verzögert, was sich wiederum in einer verlängerten Wirkdauer

auswirkt. Des Weiteren ist mit einer langsameren Erholung aus der Vollnarkose zu rechnen (Popp 2005).

Es ist zu hinterfragen, wie sich das Gerinnungssystem bei Hypothermie während EKZ verhält. Whelihan et al. untersuchten verschiedene Parameter der Hämostase bei 37°C, 32°C und 27°C und haben heraus gefunden, dass bewusst induzierte hypothermische Bedingungen die Menge an produziertem Thrombin sowie die Gerinnelbildung direkt beeinflussen. Hiermit ergaben ihre Untersuchungen, dass die Blutgerinnelbildung bei 37°C am schnellsten und bei 27°C am langsamsten war. Die generelle Stabilität des Gerinnsels bleibe ihren Ergebnissen zufolge intakt (Whelihan 2014).

Martini hat im Tierversuch herausgefunden, dass Hypothermie die Fibrinogensynthese vor allem initial verringert, die Thrombingenerierung initial verzögert und die Zeit bis zur Gerinnelbildung sowie die Geschwindigkeit, mit der sich ein Gerinnel bildet, verlängert ist. Den Ergebnissen zufolge ist die Stärke des Gerinnsels ebenfalls (wie bei Whelihan) unverändert (Martini 2007, Martini 2009). Daraus kann man schließen, dass, wenn ein Bauchtuch durch den *In-vitro*-Test nicht negativ auffällt und es nicht anfällig für prokoagulatorisches Verhalten ist, es mit Sicherheit nicht bei hypothermischen Bedingungen während einer Operation verstärkt gerinnungsaktivierendes Verhalten zeigen wird.

4.4.4 Einfluss der Blutabnahmetechnik

Wie im Ergebnisteil dieser Arbeit gezeigt, gibt es große Unterschiede hinsichtlich der Frage, wie die Probanden auf die verschiedenen Bauchtücher reagieren. Wieso diese Variabilität so weitspannig ist, kann nicht definiert werden. Äußere Einflüsse, die möglicherweise vom Untersucher hätten ausgehen können, können bei diesem standardisierten Testverfahren nicht festgestellt werden.

Eine mögliche Ursache, für diese Variabilität, hätte zum Beispiel die Blutabnahmetechnik sein können. Da diese jedoch von immer demselben Untersucher auf dieselbe Art durchgeführt wurde, ist diese Risikoquelle auszuschließen.

Zahlreiche Untersuchungen beschäftigen sich damit, wie die Art und Weise der Blutabnahmetechnik die Ergebnisse bestimmter Laborparameter und die Blutgerinnung beeinflusst.

In den letzten Jahrzehnten wurden zahlreiche Versuche gestartet, die analytische Qualität und die Standardisierung der Koagulationstests zu verbessern (Kagawa 1999). Mögliche Fehlerquellen bei der Gewinnung der benötigten Proben werden an dieser Stelle analysiert.

Zunächst wurde die ausgesuchte Stelle zur Blutentnahme desinfiziert. Dabei wurde darauf geachtet, dass, bevor die Vene punktiert wurde, das Desinfektionsmittel vollständig an der Luft getrocknet war. Nur so kann sicher gestellt werden, dass die entnommene Probe nicht kontaminiert ist. Eine potentielle Kontamination der Blutprobe mit dem Alkohol des Desinfektionsmittels kann theoretisch zur Hämolyse führen (Burns 2002, Magee 2005). Diese wiederum hätte die Ergebnisse verfälschen können. Außerdem verhindert dieses Vorgehen ein brennendes Gefühl beim Probanden.

Ein weiterer entscheidender Faktor bei der Blutabnahme ist die Stauzeit. Lippi et al. zufolge kann die Stauzeit eine nicht zu unterschätzende Quelle für die Variabilität der Ergebnisse sein (Lippi 2006).

Serdar et al. zeigten in ihrer Studie, dass eine Stauzeit geringer als 60 Sekunden einen vernachlässigbaren Einfluss auf nahezu alle Laborparameter hat (Serdar 2008). In dieser Studie wurde besonders darauf geachtet, und so betrug die Stauzeit am Oberarm eines jeden Probanden weniger als eine Minute. Außerdem wurde der Stauschlauch nach erfolgreicher Punktion der Vene sofort wieder gelöst. So konnten Stauungsartefakte verhindert werden.

Durch unnötig langes Stauen einer Vene kann es zu einer Gerinnungsaktivierung während der Blutabnahme kommen (Dörner 2013).

Des Weiteren wurden die mit Blut gefüllten Monovetten nach dem Wechseln drei Mal vorsichtig invertiert, um eine ausreichende Durchmischung des Heparins mit dem Vollblut zu gewährleisten. Übermäßiges Schütteln oder Vermischen der Proben soll vermieden werden, um die Integrität des Blutes zu wahren (Lippi 2006). Adcock et. al. stellen ebenfalls anheim, unverhältnismäßiges Schütteln, aufgrund einer potentiellen Hämolyse und/oder einer Thrombozytenaggregation und Aktivierung, was zu verfälschten Ergebnissen führen kann, zu unterlassen (Adcock 2008).

Es gibt mehrere Studien, die sich damit auseinandersetzen, ob es bei Blutabnahmen, die nur für Gerinnungsanalysen verwendet werden, sinnvoll ist, die erste Monovette vor der eigentlichen Blutabnahme ohne Zusätze zu entnehmen und zu verwerfen. Dies hat den Hintergrund, eine potentielle Kontamination der Proben durch Gewebsthromboplastin, welches durch die traumatische Punktion der Vene entstanden sein könnte, auszuschließen. Der Hintergrund dieser Überlegung ist es, eine mögliche iatrogen ausgelöste Aktivierung der Gerinnungskaskade auszuschließen.

Das Institut für Klinik- und Laborstandards (*Clinical and Laboratory Standards Institute CLSI*) hat diese Überlegung korrigiert und herausgefunden, dass Gewebsthromboplastin die Ergebnisse nicht beeinflusst, auch wenn die erste Monovette in die Proben miteinbezogen wird. Auch wenn man die erste mit der zweiten Monovette direkt bezüglich ihrer Werte in der routinemäßigen Gerinnungsanalyse wie der PTT vergleicht, kann keine zwingende Notwendigkeit für diese Maßnahme gefunden werden (Yawn 1996, Adcock 1997, Gottfried 1997). Ob dies bei der Messung der ACT ebenso gilt, wurde noch nicht bestätigt. Sicherheitshalber kann bei Anwendung des *butterfly* Systems für anschließende Gerinnungstestung die erste Monovette verworfen werden (Adcock 2008). In dieser Studie wurde auf das Verwerfen der ersten Monovette verzichtet.

Ein weiterer Parameter, der Einfluss auf die Testergebnisse hat, ist der Außendurchmesser der verwendeten Kanüle bei der Blutabnahme. Dieser wird bekanntermaßen in Gauge (G) angegeben. Je höher der Gaugewert, desto kleiner ist der Durchmesser der Kanüle. Zur Punktion einer Vene sind Kanülen mit einem Durchmesser zwischen 19 und 25 G indiziert. Voruntersuchungen des Forschungslabors der Universitätsklinik für Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie haben die verschiedenen Kanülen erprobt, um die passende für diese Studie zu finden. Man entschied sich für 21 G was nach EN ISO 9626 0,8 mm Außendurchmesser entspricht.

Lippi et al. fanden heraus, dass sich die PTT von Blutproben, die mit Kanülen mit einem Durchmesser von 23 G entnommen wurden, nicht signifikant anders verhielten als bei Kanülen mit 21 G (Lippi 2006). Adcock et. al. sind der Meinung, dass Kanülen mit einem Durchmesser kleiner als 25 G zu einer potentiellen Hämolyse führen (Adcock 2008). Dies würde die Testergebnisse in unserem Fall verfälschen und sind daher nicht indiziert.

Wichtiger als der Durchmesser der Kanüle scheint laut Lippi et al. die Vorgehensweise, also wie das Blut in die Monovette aufgezogen wird. Dies sollte möglichst vorsichtig geschehen, um unnötige Scherkräfte auf die Blutzellen und daraus resultierende Hämolyse, vor allem der Erythrozyten (Wilcox 1981, Sharp 1998), sowie eine Aktivierung der Thrombozyten und des Gerinnungssystems zu vermeiden (Miyazaki 1996, Spijker 2003).

Auf diese potentiellen Fehlerquellen bei der Blutentnahme sollte unbedingt geachtet werden, da diese Einfluss auf die Resultate der Koagulationstestung der einzelnen Chargen hat. Nur so können falsche, durch den ausführenden Untersucher verursachte Aussagen verhindert werden.

4.5 Mögliche Auswirkungen der verwendeten Farbstoffe

Ursprünglich wurden Bauchtücher aus gebleichter, gewobener Baumwolle angefertigt. Das Bleichen führte jedoch zu dem nachteiligen Effekt, dass die Bauchtücher eine grell weiße Farbe annahmen. Das grelle Licht der eingesetzten Operationslampen im Operationssaal verstärkte dieses unangenehme visuelle Empfinden bei den Chirurgen und beeinträchtigte die Operateure während ihrer praktischen Tätigkeit.

Ren et al. untersuchten das Phänomen des Blendens der weißen Bauchtücher sowie die Herstellung und Vor- bzw. Nachteile der bunten Bauchtücher (Ren 2012).

Zunächst stellten sie fest, dass das Färben der Bauchtücher zusätzliche Arbeitsschritte in der Herstellung benötigt und den Nachteil nach sich zieht, dass die Absorptionskraft der Tücher negativ beeinträchtigt wird.

Des Weiteren bemerkten sie, dass viele Hersteller ihre Tücher extern färben lassen. Dort werden die Medizinprodukte häufig in denselben Vorrichtungen entfettet, gewaschen, gebleicht und gefärbt, die auch für Kleidungsstücke, Stoffe und andere Textilien gebraucht werden. Durch das Mischen der Textilien mit den Bauchtüchern kann es sehr leicht zu unüberschaubaren, häufig verminderten hygienischen Standards kommen.

Außerdem haben sie festgestellt, dass der Bleichvorgang, vor allem bei Verwendung chlorbasierter Bleichmittel, aufgrund der mechanischen Beanspruchung der Baumwolle, zu vermehrter Fusselbildung führt. Dies mindert die Qualität der Medizinprodukte um ein Vielfaches und erhöht das Risiko einer Komplikation bei der Anwendung am Patienten. Fussel sind häufig der Grund einer Infektion und sollten bei Medizinprodukten im Idealfall nicht vorhanden sein. Im schlimmsten Fall können Fussel zu lebensbedrohlichen Komplikationen führen, wenn sie iatrogen in eine Körperöffnung eingeführt werden.

Von den fünf in der Studie getesteten Bauchtüchern waren drei grün (Bauchtücher 1,3 und 5), eins blau (Bauchtuch 4) und eins weiß (Bauchtuch 2). Interessanterweise waren die drei Bauchtücher, die am häufigsten ein Blutgerinnsel auf ihrer Oberfläche bildeten, grün: Bauchtuch 1: 97%, Bauchtuch 5: 76% und Bauchtuch 3: 25%. So stellt sich die Frage, ob es einen Zusammenhang gibt zwischen den verwendeten Farbstoffen und dem Färbeprozess der grünen Tücher und ihrem verstärkt gerinnungsaktivierendem Verhalten.

Was als eigentliche Ursache für die gesteigerte gerinnungsaktivierende Reaktion der grünen Bauchtücher verantwortlich ist, kann nicht eindeutig geklärt werden. Leitz et al. vermuten eine Neutralisierung der Heparinwirkung durch Chromsalze (Leitz 2001).

4.5.1 Polydiallylamine

Viele Bauchtücher werden mit dem Fixiermittel Polydiallylamine behandelt. Das formaldehydfreie Fixiermittel Polydiallylamine (PDAA) setzt sich aus den folgenden Monomeren zusammen: Epichlorhydrin (ECH) und Diethylentriamin (DETA). Vor dem letzten Waschen der Tücher werden diese mit den beiden Monomeren in Kontakt gebracht.

Problematisch könnte die Anwendung des Epichlorhydrin (ECH) sein. Wie Eyrisch (Eyrisch 1998) herausfand, wird ECH häufig als Vernetzerkomponente für Polyamine benutzt, da es leicht verfügbar und sehr preiswert ist und eine hohe Effizienz aufweist. Zudem verfügt es über die vorteilhaften chemischen Eigenschaften eines niedrigen Molekulargewichts und eines hydrophilen Verhaltens, was zu erhöhter Quellbarkeit des Polyamins mit Wasser führt (Huval 2000). Aufgrund der hohen Toxizität sollte die Anwendung jedoch möglichst eingestellt werden (Eyrisch 1998).

Weitere Indikationen von PDAA sind die Papierherstellung, Haarfärbeprodukte (Sokol 1980) sowie die Behandlung von Hypercholesterinämie (Fawell 1992, Huval 2000)

In der Papierindustrie liegt seine Indikation in der Entwässerung bei der Herstellung von Papier oder Kartonagen. Zudem dient er in kationisierter Form als Retentionsmittel und/oder Fixiermittel (Eyrich 1998). Eine weitere Anwendung von PDAA ist die Behandlung von Hypercholesterinämie (>200-220 mg/dl Serum). Außerdem gibt es Therapieansätze zur Herstellung eines Medikaments zur Unterstützung gallensäurebindender Substanzen (Huval 2000).

Interessanterweise stellte sich im Rahmen der *In-vitro*-Testung der Bauchtuchchargen am hiesigen Forschungslabor heraus, dass es vornehmlich die grünen Bauchtücher waren, die mit dem Fixiermittel PDAA behandelt worden waren, die vermehrt prokoagulatorische Eigenschaften aufwiesen und zur Gerinnelbildung nach Inkubation mit Blut führten. Somit lag der Verdacht nahe, dass dies die Ursache für die Probleme an der Herz-Lungen-Maschine war. Anhand einer beauftragten Studie des Herstellers konnte jedoch sichergestellt werden, dass PDAA alleine keine prokoagulatorischen Eigenschaften besitzt.

Nichtsdestotrotz liegt die Vermutung nahe, dass die Bearbeitung der Bauchtücher, die aus vielen Zwischenschritten besteht, kausal eine multifaktorielle Risikoquelle ist. Es könnten die Reaktionen der Bleich-, Färbe- und Fixiermittel miteinander sein, die unvorhergesehen Einfluss auf die Hämatokompatibilität der Bauchtücher hat und so die Thrombogenität negativ beeinflussen.

4.6 Ausblick

Es gibt schon zahlreiche Unternehmen und Labore, die Medizinprodukte auf ihre Biokompatibilität prüfen. Produkte, die in Kontakt mit Blut treten, müssen speziell auf ihre Hämatokompatibilität untersucht werden. Einerseits muss eine mögliche Hämolyse des Bluts ausgeschlossen werden, andererseits muss das Ausmaß der Thrombogenität der Materialien untersucht werden.

Koagulationstests bestimmen den Einfluss des zu prüfenden Produkts auf die Koagulationszeit des humanen Bluts. Dabei wird sowohl das von MacFarlane formulierte intrinsische System als auch das von Lüscher formulierte extrinsische System der Gerinnungskaskade untersucht (MacFarlane 1964, Lüscher 1966).

Didisheim und Watson vermuten, dass die Thrombogenität von artifiziellen Oberflächen davon abhängt, inwiefern die physiologische Thrombozyteninhibierung bzw. Aktivierung, so wie sie am Endothel der Gefäße stattfindet, simuliert werden kann (Didisheim 1989).

Zahlreiche Forschungsgruppen konnten einen Zusammenhang zwischen der Adhäsion der Plasmaproteine an einer künstlichen Oberfläche und der Thrombogenität feststellen (Preissner 1986, Fuhrer 1990, Bidstrup 1993). Wendel et al. fanden heraus, dass das Fibrinogen, welches an den Oberflächen adsorbiert wird, zu einer massiven Aktivierung der Thrombozyten führt, was konsekutiv zu einer Adhäsion, Aggregation und in weiter vorangeschrittener Phase zu einer thromboembolischen Komplikation führen kann (Wendel 2001).

Um die Thrombogenität eines Produkts zu analysieren, werden verschiedene Testmethoden angewandt. Laut ISO 10993-4, welche eine strukturierte Auswahl an Testmethoden bietet, um eine individualisierte Analyse der Kompatibilität des Produkts zu ermöglichen, sollen Tests in den folgenden vier Kategorien durchgeführt werden: die Koagulation, die Thrombozyten, die Hämatologie und das Komplementsystem (Buchanan 1998). Dies soll die Sicherheit der Patienten sicherstellen.

Obwohl die extrakorporale Zirkulation in der Kardiochirurgie eine routinemäßig eingesetzte Maßnahme ist, ist sie nicht völlig unbedenklich. Denn durch sie werden häufig Hämostasestörungen ausgelöst (Dietrich 1993).

Es ist von großer Wichtigkeit, diese Tests mit größter Sorgfalt durchzuführen, um potentielle Risiken für die Patienten auszuschließen. Nur so können, wie Sadel in seinem Artikel schrieb, Gerinnungsprobleme an der Herz-Lungen-Maschine bei gleichzeitig richtig dosierter Heparinkonzentration eine Seltenheit bleiben (Sadel 1995). Auch Riess ist der Meinung, dass thromboembolische Komplikationen im Vergleich zu Blutungsproblemen in der Kardiochirurgie eigentlich das geringere Problem darstellen (Riess 2001).

Vor allem Unternehmen, die ihre Produkte im Ausland herstellen oder bearbeiten lassen, sollten mit größter Sorgfalt vorgehen und die präklinische Testung der Toxikologie nicht vernachlässigen.

Denn wie die oben genannte Rückrufaktion der grünen Bauchtücher zeigt, muss es Lücken im Testsystem der Firmen geben. Denn sonst wäre diese unerwünschte Reaktion an der Herz-Lungen-Maschine perioperativ nicht aufgetreten.

Außerdem wird bezüglich der Materialien der Bauchtücher geforscht. Es gibt schon Ansätze, diese nicht mehr aus Baumwolle herzustellen, sondern aus Polyurethan. Bei dessen Herstellung wird vollkommen auf toxische Mittel wie Formalin verzichtet und die intraoperative Anwendung gilt als sicher. Shimamoto veröffentlichte 2011 eine Analyse mit dem Ziel, die Ergebnisse einer Studie, welche das Verhalten von Baumwolltüchern und Polyurethantüchern vergleicht, zusammenzufassen. Diese ergab, dass der Einsatz von Polyurethan das Fassen von Flüssigkeiten wie Blut sogar verbessert (Shimamoto 2011).

Jedoch muss man diese Entwicklung kritisch betrachten. Wie Wendel et. al. schon warnten, bestehen zahlreiche Medizinprodukte, die in der extrakorporalen Zirkulation Anwendung finden, aus synthetischen Materialien und haben somit sehr gute physikalische Eigenschaften. Dennoch stammen sie

ursprünglich aus dem industriellen Gebrauch und haben den Nachteil der Inkompatibilität gegenüber Blut und Gewebe (Wendel 1999). Das Aufeinandertreffen synthetischer und biologischer Strukturen während einem chirurgischen Prozedere war schon immer mit Schwierigkeiten belastet und wird es auch weiterhin bleiben (Spaet 1987).

Des Weiteren werden hämorrhagische oder thrombophile Diathesen oft bei nur geringer Ausprägung des Defekts unter chirurgischen Stresssituation mit konsekutiver ausgeprägter Belastung des hämostyptischen Systems, wie kardiochirurgische Eingriffe es darstellen, auffällig (Trobisch 1993). Daher bleibt ein gewisses, nicht auszuschließendes Restrisiko bei kardiochirurgischen Eingriffen auch in Zukunft bestehen.

Zudem muss die Hypothese der „intelligenten Materialien“, wie sie Wendel 2007 postulierte, erforscht werden. Er beschreibt Materialien, die mit nahezu physiologischen Oberflächen hergestellt werden und zudem noch situationsbedingt interindividuell mit der kontrollierten Abgabe von geeigneten Pharmaka reagieren können. Dadurch erhofft er sich, dass diese Materialien die dynamischen Prozesse der Endothelzellen, die das Gefäß auskleiden, imitieren (Wendel 2007).

5. Zusammenfassung

Erstmals im Jahre 2000 erschien ein kurzer Bericht über mögliche Gerinnungsprobleme bei herzchirurgischen Eingriffen mit extrakorporaler Zirkulation an der Herz-Lungen-Maschine verursacht durch grüne Bauchtücher, die in der Volksrepublik China hergestellt wurden. Zwölf Jahre später kam es durch das Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte (BfArM) zu einer Rückrufaktion grüner Bauchtücher, die Gerinnungsprobleme bei kardiochirurgischen Eingriffen ausgelöst hatten. So entstand die Notwendigkeit eines Testsystems zur präklinischen Evaluierung der gerinnungsaktivierenden Potenz von Bauchtüchern.

Unter allen chirurgischen Abteilungen stellt die Herzchirurgie in Anbetracht hyperkoagulatorisch wirkender Bauchtücher eine Ausnahme dar. Die Besonderheit resultiert daraus, dass die Patienten perioperativ mit zirka drei IU hochmolekularem Heparin/ml Patientenblut heparinisiert werden (ACT >450 Sekunden) und sie bei direkter Retransfusion des eigenen Blutes ohne den Einsatz des *CellSavers* operiert werden. So kann eine überschießende blutgerinnende Aktivität fehlerhafter Bauchtücher zu thromboembolischen Komplikationen führen, da ein „Waschen und Filtrieren“ des Blutes vor der Retransfusion mittels *CellSaver* aufgrund der hochdosierten intravenösen Heparinisierung der Patienten nicht erfolgt.

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung und Validierung eines *In-vitro*-Testsystems zur Evaluierung der blutgerinnungsaktivierenden Potenz von Bauchtüchern, die im chirurgischen Bereich seit Jahren verwendet werden, mithilfe dessen Bauchtücher mit unerwünschter hyperkoagulatorischer Potenz von vornherein sicher ermittelt werden können.

Das Hauptaugenmerk wurde auf ein einfaches, leicht reproduzierbares und verlässliches Vorgehen gelegt, welches routinemäßig präklinisch angewandt werden kann. Anhand des Prüfverfahrens wurde statistisch ermittelt, wie viele Blutspender benötigt werden, um ein Bauchtuch mit hyperkoagulatorischen Eigenschaften zu entdecken.

Bei der Testung wurden die Proben der verschiedenen Bauchtuchchargen mit heparinisierendem humanem Vollblut für 30 Minuten bei 37°C auf einer Schüttelplatte inkubiert und daraufhin mikro- sowie makroskopisch auf Blutgerinnsel untersucht und anhand eines dichotomisierten Auswertungssystems ausgewertet.

Das Ziel der prospektiven Studie wurde erreicht. Nach Auswertung der Ergebnisse dieser Studie kann davon ausgegangen werden, dass mit dem neu entwickelten Testsystem statistisch abgesichert elf Spender benötigt werden, um ein Bauchtuch, welches bei 25% der Spender durch prokoagulatorisches Verhalten auffällt, mit einer Wahrscheinlichkeit von mindestens 95% zu detektieren.

Schlussfolgernd kann man sagen, dass es sich um ein sicheres Verfahren handelt, anhand dessen potentiell risikobehaftete hyperkoagulatorisch agierende Bauchtücher präklinisch ermittelt werden können. Damit leistet es einen wichtigen Beitrag, das durch Bauchtücher hervorgerufene Risiko thromboembolischer Komplikationen während kardiochirurgischer Eingriffe unter Einsatz der Herz-Lungen-Maschine in Zukunft zu minimieren.

6. Erklärung zum Eigenanteil

Die vorliegende Arbeit entstand durch meine Tätigkeit als Doktorandin im Forschungslabor der Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie des Universitätsklinikums Tübingen, das von Prof. Dr. rer. nat. H.P. Wendel geleitet wird. Die Betreuung der Promotion wurde von Herrn Prof. Dr. H.P. Wendel übernommen.

Das Studiendesign wurde von Herrn Prof. Dr. H.P. Wendel entworfen und von mir weiterentwickelt. Die Fallzahlplanung sowie die statistische Auswertung erfolgte mit professioneller Unterstützung von Herrn Dr. Sebastian Hoffmann. Die Patientenakquirierung (n=100) sowie alle durchgeführten Versuche, deren Dokumentation und die Datenauswertung habe ich selbst durchgeführt. Prof. Dr. rer. nat. Wendel und Dr. rer. nat. Stefanie Krajewski nahmen an der geblindeten Auswertung teil.

Die vorliegende Dissertation wurde von mir selbst verfasst und von Herrn Prof. H.P. Wendel sowie von Fr. Dr. Stefanie Krajewski Korrektur gelesen.

Die Ergebnisse der Arbeit werden in Teilen in folgender Publikation veröffentlicht werden:

Krajewski, S. , Nathan, T. , Neumann, B. , Hoffmann, S. , Abel, M. , Koggel A. , Schlensak C. , Wendel H.P. *Simple clotting test to detect procoagulant abdominal swabs*. Journal of Materials Science: Materials in Medicine (2015, in press)

7. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Endogene und exogene Aktivierung der Gerinnungskaskade.....	16
Abbildung 2: Fibrinolyse	21
Abbildung 3: Datenerhebungsbogen der Probanden	27
Abbildung 4: Blutabnahme mit 9 ml Monovetten	29
Abbildung 5: Inkubation der Proben auf dem Schüttler	30
Abbildung 6: Ansicht einer ausgeleerten Leerprobe nach Inkubation.....	34
Abbildung 7: Beispiel eines Bauchtuchs, das keine Blutgerinnung induziert....	35
Abbildung 8: Beispiel eines Bauchtuchs, das eine Blutgerinnung induziert.....	35
Abbildung 9: Histogramm der ACT-Werte aller Blutspender	36
Abbildung 10: Bilder der Bauchtücher des Probanden Nr. 20	37
Abbildung 11: Bilder der Bauchtücher des Probanden Nr. 73	37
Abbildung 12: REM-Aufnahmen der Bauchtücher vor der Inkubation	41
Abbildung 13: REM-Aufnahmen der Bauchtücher nach der Inkubation	42
Abbildung 14: Wahrscheinlichkeit einer positiven Reaktion in Abhängigkeit des erwarteten Anteils positiver Spender und der Anzahl getesteter Spender.....	46
Abbildung 15: Anzahl benötigter Probanden in Abhängigkeit des Anteils erwarteter „positiver“ Probanden ein Bauchtuch als kritisch zu erkennen	49
Abbildung 16: Diagramme der ACT in Abhängigkeit der Anzahl positiver Reaktionen der Spender.....	55

8. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Gerinnungsfaktoren	14
Tabelle 2: Übersicht über das Probandengut	27
Tabelle 3: Anzahl positiver Reaktionen für die jeweilige Anzahl Bauchtücher..	38
Tabelle 4: Verhalten der zu untersuchenden Bauchtücher	43

9. Literaturverzeichnis

Adcock , D., Kressin , DC. , Marlar , RA. (1997). "Are discard tubes necessary in coagulation studies?" Lab Med. **28**: 530-533.

Adcock, D. M., Hoefner, D.M. , Kottke-Marchant, K. , Marlar, R.A. , Szamosi D.I, Warunek,D.J. (2008). "Collection, Transport, and Processing of Blood Specimens for Testing Plasma-Based Coagulation Assays and Molecular Hemostasis Assays; Approved Guideline- Fifth Edition; CLSI document H21-A5." Clinical and Laboratory Standards Institute,Wayne, Pennsylvania, USA **28**(5): 1-48.

Agresti, A., Gottard, A. (2005). "Comment: Randomized Confidence Intervals and the Mid-P Approach." Statist. Science **20**(4): 367-371.

Almeida, R. M. and L. Leitao (2013). "The use of cell saver system in cardiac surgery with cardiopulmonary bypass." Rev Bras Cir Cardiovasc **28**(1): 76-82.

Balthazar, S., Watremez, C. , Vigneault, L. , Eeckhoudt, S. , Pirson, F. , Hermans, C. (2014). "Management of anticoagulation during cardiopulmonary bypass in a patient with allergy to heparin and heparin-like compounds: a case-report." Blood Coagul Fibrinolysis: 1-4.

Barthels, M. (2012). "Das Gerinnungskompndium." Georg Thieme Verlag 2. vollständig überar. und erw. Aufl.: 902.

Bartlett, R. H., Gazzaniga, A. B. (1978). "Extracorporeal circulation for cardiopulmonary failure." Curr Probl Surg **15**(5): 1-96.

Behrends, J. C., Bischofberger, Josef , Deutzmann, Rainer , Ehmke, Heimo , Frings, Stephan et al. (2010). "Duale Reihe Physiologie." Georg Thieme Verlag Stuttgart: 164-188.

Bidstrup, B., Harrison, J. , Royston, D. , Taylor, KM , Treasure, T. (1993). "Aprotinin therapy in cardiac operations: A report on use in 41 cardiac centers in the United Kingdom." Ann. Thorac. Surg. **55**: 971-976.

Boinot, C., Lanquetot, H. , Macchi, L. , Charriere, J. M. , Menu, P. (2003). "[Lepirudin during cardiopulmonary bypass in a patient with heparin-induced thrombocytopenia]." Ann Fr Anesth Reanim **22**(7): 635-638.

Boldt, J., Knothe, C. , Welters, I. , Dapper, F. L. , Hempelmann, G. (1996). "Normothermic versus hypothermic cardiopulmonary bypass: do changes in coagulation differ?" Ann Thorac Surg **62**(1): 130-135.

Bowers, J., Ferguson, J. J., 3rd (1994). "The use of activated clotting times to monitor heparin therapy during and after interventional procedures." Clin Cardiol **17**(7): 357-361.

Buchanan, M., Upman P.J. , Wallin, R.F. (1998). "A Practical Guide to ISO 10993-4: Hemocompatibility." Medical Device & Diagnostic Industry
<http://www.mddionline.com/article/practical-guide-iso-10993-4-hemocompatibility>.

Bull, B. S., Korpman, R. A. , Huse, W. M. , Briggs, B. D. (1975). "Heparin therapy during extracorporeal circulation. I. Problems inherent in existing heparin protocols." J Thorac Cardiovasc Surg **69**(5): 674-684.

Burns, E., Yoshikawa, N (2002). "Hemolysis in serum samples drawn by emergency department personnel versus laboratory phlebotomists." Lab Med **33**: 378–380.

Campos, J. M., Paniagua, P. (2008). "Hypothermia during cardiac surgery." Best Pract Res Clin Anaesthesiol **22**(4): 695-709.

Carless, P. A., Henry, D. A. , Moxey, A. J. , O'Connell, D. , Brown, T. , Fergusson, D. A. (2010). "Cell salvage for minimising perioperative allogeneic blood transfusion." Cochrane Database Syst Rev(4): Cd001888.

Cholette, J. M., Henrichs, K. F. , Alfieris, G. M. , Powers, K. S. , Phipps, R. , Spinelli, S. L. , Swartz, M. , Gensini, F. , Daugherty, L. E. , Nazarian, E. , Rubenstein, J. S. , Sweeney, D. , Eaton, M. , Lerner, N. B. , Blumberg, N. (2012). "Washing red blood cells and platelets transfused in cardiac surgery reduces postoperative inflammation and number of transfusions: results of a prospective, randomized, controlled clinical trial." Pediatr Crit Care Med **13**(3): 290-299.

Cohen, J. A. (1984). "Activated coagulation time method for control of heparin is reliable during cardiopulmonary bypass." Anesthesiology **60**(2): 121-124.

Congdon, J. E., Kardinal, C. G. , Wallin, J. D. (1973). "Monitoring heparin therapy in hemodialysis. A report on the activated whole blood coagulation time tests." JAMA **226**(13): 1529-1533.

Culliford, A. T., Gitel, S. N. , Starr, N. , Thomas, S. T. , Baumann, F. G. , Wessler, S. , Spencer, F. C. (1981). "Lack of correlation between activated clotting time and plasma heparin during cardiopulmonary bypass." Ann Surg **193**(1): 105-111.

Despotis, G. J., Summerfield, A. L. , Joist, J. H. , Goodnough, L. T. , Santoro, S. A. , Spitznagel, E. , Cox, J. L. , Lappas, D. G. (1994). "Comparison of activated coagulation time and whole blood heparin measurements with laboratory plasma anti-Xa heparin concentration in patients having cardiac operations." J Thorac Cardiovasc Surg **108**(6): 1076-1082.

Didisheim, D., Watson, J. (1989). "Thromboembolic complications of cardiovascular devices and artificial surfaces." In: Clinical thrombosis. Kwaan, H.; Samama, M.Y.; Edtrs. CRC, Boca Raton: 275-296.

Dietrich, G., Kretschmer, V. (1993). "Wann sind perioperative Thrombozytenkonzentrate indiziert? In: Perioperative Gerinnungsstörungen Diagnostik und Therapie Martin E. ; Fleischer F. ." Springer Medizin Verlag Berlin-Heidelberg-NewYork: 69-83.

Dietrich, W. (1993). "Kann durch Medikamente der operative Blutverlust reduziert werden? In: Perioperative Gerinnungsstörungen Diagnostik und Therapie, Martin E. und Fleischer F. ." Springer Medizin Verlag Berlin-Heidelberg-NewYork: 111-125.

Dörner, K. (2013). "Taschenlehrbuch Klinische Chemie und Hämatologie." Georg Thieme Verlag: 349-384.

Doty, D. B., Knott, H. W. , Hoyt, J. L. , Koepke, J. A. (1979). "Heparin dose for accurate anticoagulation in cardiac surgery." J Cardiovasc Surg (Torino) **20**(6): 597-604.

Dowling, R. D., et al. (1993). "Clinical cardiopulmonary bypass without systemic anticoagulation." Ann Thorac Surg **56**(5): 1176-1177; discussion 1177-1178.

Duden (2014). "<http://www.duden.de/rechtschreibung/Haemostase> Letzter Zugriff: 04.08.14."

Esposito, R. A., Culliford, A. T. , Colvin, S. B. , Thomas, S. J. , Lackner, H. , Spencer, F. C. (1983). "The role of the activated clotting time in heparin administration and neutralization for cardiopulmonary bypass." J Thorac Cardiovasc Surg **85**(2): 174-185.

Eyrisch, O. D. (1998). Weitgehend wasserunlösliche kationisierte Feststoffe sowie ihre Herstellung und Verwendung, Google Patents.

Fang, W., Wei, J. , Han, D. , Chen, X. , He, G. , Wu, Q. , Chu, S. , Li, Y. (2014). "MC-002 exhibits positive effects against platelets aggregation and endothelial dysfunction through thromboxane A2 inhibition." Thromb Res **133**(4): 610-615.

Fawell, P. D., Vernon, C. F. , Klauber, C. , Linge, H. G. (1992). A study of the extraction of gold by crosslinked polydiallylamine. Amsterdam, Pays-Bas, Elsevier.

Fosgate, G. T. (2005). "Modified exact sample size for a binomial proportion with special emphasis on diagnostic test parameter estimation." Statistics in Medicine **24**(18): 2857-2866.

Fuhrer, G., Gallimore, M. J. , Heller, W. , Hoffmeister, H. E. (1990). "FXII." Blut **61**(5): 258-266.

Gawaz, M. (2001). "Blood Platelets." Georg Thieme Verlag Stuttgart: 25-28.

Gosciniak, H.-T. (1977). "Probleme der Blutgerinnung bei Herzoperationen mit Hilfe der extrakorporalen Zirkulation." Medizinische Dissertationsschrift, Chirurgische Universitätsklinik Köln: 9.

Gottfried, E. L., Adachi, M. M. (1997). "Prothrombin time and activated partial thromboplastin time can be performed on the first tube." Am J Clin Pathol **107**(6): 681-683.

Gravlee, G. P., Haddon, W. S. , Rothberger, H. K. , Mills, S. A. , Rogers, A. T. , Bean, V. E. , Buss, D. H. , Prough, D. S. , Cordell, A. R. (1990). "Heparin dosing and monitoring for cardiopulmonary bypass. A comparison of techniques with measurement of subclinical plasma coagulation." J Thorac Cardiovasc Surg **99**(3): 518-527.

Hattersley, P. G. (1966). "Activated coagulation time of whole blood." JAMA **196**(5): 436-440.

Henne-Bruns, D., Dürig, Michael , Kremer, Bernd (2007). "Duale Reihe Chirurgie." Georg Thieme Verlag, Stuttgart **3. Auflage**: 994-1003.

Hill, J. D., Dontigny, L. , De Leval, M. , Mielke, C. H., Jr. (1974). "A simple method of heparin management during prolonged extracorporeal circulation." Ann Thorac Surg **17**(2): 129-134.

Hirner, A., Weise, K (2008). "Chirurgie." Thieme **2. überar. Aufl.**: 154-157.

Hoffmann, S. (2013). seh consulting+services, Paderborn.

Huppelsberg, J., Walter, Kerstin (2009). "Kurzlehrbuch Physiologie." Georg Thieme Verlag **3. Aufl.**: 17-40.

Huval, C. C., Holmes-Farley, S.R. , Petersen, J.S. , Dhal, P.K. (2000). Method for treating hypercholesterolemia with unsubstituted polydiallylamine polymers, Google Patents: 1-9.

InternationalTechnidyneCorporation (2005). "HEMOCHRON® Jr. Signature+ Whole Blood Microcoagulation System." Benutzerhandbuch HJ7042(7/05): 2-4.

Kagawa, K., Fukutake, K. (1999). "[Suggestions and propositions to resolve some issues for standardization of prothrombin time and activated partial thromboplastin time]." Rinsho Byori **47**(5): 431-437.

KellerMedical (2013). "Gerinnungsfunktion Hemochron.doc ISH 12.08.2013 " <http://www.keller-medical.de/media/archive1/produkte/signature-gerinnungsfunktion.pdf> letzter Zugriff: 02.04.14.

Kemkes-Matthes, B., Oehler, Gerd (1998). "Blutgerinnung und Thrombose." georg Thieme Verlag Stuttgart, New York **2. völlig neubear. Aufl.**: 69.

Klein, L. W., Agarwal, J. B. (1996). "When we "act" on ACT levels: activated clotting time measurements to guide heparin administration during and after interventional procedures." Cathet Cardiovasc Diagn **37**(2): 154-157.

Klinke, R., Pape, H-C , Silbernagl, St (2005). "Physiologie." Georg Thieme Verlag Stuttgart.

Köhnlein, J., Feltgen, M. , Werner, H.-P. (2003). "Bauchtücher - ein Relikt aus chirurgischer Tradition." Hygiene und Medizin **28**(4): 109-116.

Konig, G., Waters, J. H. (2012). "Washing and filtering of cell-salvaged blood - does it make autotransfusion safer?" Transfus Altern Transfus Med **12**(3-4): 78-87.

Kriesmer, P., Payne, N. R. , Tessmer, J. , Uden, D. L. (1993). "Activated clotting time tests with heparinase in the management of pediatric patients on cardiopulmonary bypass." Asaio j **39**(4): 942-945.

Laborit, H. (1951). "[Therapeutic generalized hypothermia]." Presse Med **59**(30): 606-608.

Lang, F., Lang, P. (2007). "Basiswissen Physiologie." Springer Medizin Verlag Heidelberg(2., vollständig neu bear. und aktualisierte Aufl.): 27-31.

Lanier, W. L. (1995). "Cerebral metabolic rate and hypothermia: their relationship with ischemic neurologic injury." J Neurosurg Anesthesiol **7**(3): 216-221.

Larsen, R. (2012). "Anästhesie und Intensivmedizin in Herz-, Thorax- und Gefäßchirurgie." Springer Medizin Verlag Heidelberg(8. Auflage): 71-104.

Lee, R., White, PD (1913). "A clinical study of the coagulation time of blood." Am J Med Sci **145**: 495-503.

Leitz, K. (2000). "Kardiochirurgie-Gerinnungsprobleme durch grüne Bauchtücher. ." Arznei-Telegramm **31:79**.

Leitz, K. H., Grothe, D. , Beisel-Eckert, B. (2001). "Gerinnungsprobleme an der Herz-Lungen-Maschine durch grüne Bauchtücher." Zeitschrift für Herz-, Thorax- und Gefäßchirurgie **15**(3): 89-93.

Levieux, A., Rivera, V. , Levieux, D. (2001). "A sensitive ELISA for the detection of bovine crude heparin in porcine heparin." J Immunoassay Immunochem **22**(4): 323-336.

Levin, A. I., Heine, Adriaan Martin , Coetzee, Johan Francois , Coetzee, André (2014). "Heparinase Thromboelastography Compared With Activated Coagulation Time for Protamine Titration After Cardiopulmonary Bypass." J Cardiothorac Vasc Anesth **28**(2): 224-229.

Lippi, G., Franchini, M. , Montagnana, M. , Salvagno, G. L. , Poli, G. , Guidi, G. C. (2006). "Quality and reliability of routine coagulation testing: can we trust that sample?" Blood Coagul Fibrinolysis **17**(7): 513-519.

Lippi, G., Salvagno, G. L. , Montagnana, M. , Poli, G. , Guidi, G. C. (2006). "Influence of the needle bore size on platelet count and routine coagulation testing." Blood Coagul Fibrinolysis **17**(7): 557-561.

Lobato, R. L., Despotis, G. J. , Levy, J. H. , Shore-Lesserson, L. J. , Carlson, M. O. , Bennett-Guerrero, E. (2010). "Anticoagulation management during cardiopulmonary bypass: a survey of 54 North American institutions." J Thorac Cardiovasc Surg **139**(6): 1665-1666.

Lohmann&Rauscher (2013). "<http://www.lohmann-rauscher.de/de/produkte/op-produkte/op-verbandstoffe-unsteril/toptex-lite-bauchtuecher-rk-unsteril.html> , letzter Zugriff: 23.09.2013."

Lüscher, E. (1966). "Pathogenesis and treatment of thrombotic diseases." In: Haemostasis and thrombosis. Koller,F.; Duckert,F.; Streuli,F.; Edtrs. Schattauer Verlag, Stuttgart, New York.

Lutze, G. (2004). "Wissenswertes zur Gerinnung." Roche Diagnostic GmbH, Mannheim: 17.

Maadani, M., Abdi, S , Zahedmehr, A. (2008). "Assessment of safety and efficacy of conventional heparin dose in percutaneous coronary interventions characterized by means of activated clotting time." Iranian Heart Journal(1): 18-21.

MacFarlane, R. G. (1964). "An enzyme cascade in the blood clotting mechanism and its function as a biochemical amplifier " Nature **202**: 498-499.

Magee, L. (2005). "Preanalytical variables in the chemistry laboratory." LabNotes **15** (1): 1-4.

Malviya, S. (1997). "Monitoring and management of anticoagulation in children requiring extracorporeal circulation." Semin Thromb Hemost **23**(6): 563-567.

Marmur, J. D. (2002). "Direct versus indirect thrombin inhibition in percutaneous coronary intervention." J Invasive Cardiol **14 Suppl B**: 8b-18b.

Martindale, S. J., Shayevitz, J. R. , D'Errico, C. (1996). "The activated coagulation time: suitability for monitoring heparin effect and neutralization during pediatric cardiac surgery." J Cardiothorac Vasc Anesth **10**(4): 458-463.

Martini, W. Z. (2007). "The effects of hypothermia on fibrinogen metabolism and coagulation function in swine." Metabolism **56**(2): 214-221.

Martini, W. Z. (2009). "Coagulopathy by hypothermia and acidosis: mechanisms of thrombin generation and fibrinogen availability." J Trauma **67**(1): 202-208; discussion 208-209.

Mayer, J. E. (1998). "Cardiopulmonary bypass." Pediatric cardiac intensive care (Chang, Anthony C.) , Williams&Wilkins, Baltimore, Maryland USA: 189.

Miyazaki, Y., Nomura, S. , Miyake, T. , Kagawa, H. , Kitada, C. , Taniguchi, H. , Komiyama, Y. , Fujimura, Y. , Ikeda, Y. , Fukuhara, S. (1996). "High shear stress can initiate both platelet aggregation and shedding of procoagulant containing microparticles." Blood **88**(9): 3456-3464.

Newman, J. S. (2006). "Of Lizards and Leeches." The Hospitalist **April 2006**.

Niranjan, G., Asimakopoulos, G. , Karagounis, A. , Cockerill, G. , Thompson, M., Chandrasekaran, V. (2006). "Effects of cell saver autologous blood transfusion on blood loss and homologous blood transfusion requirements in patients undergoing cardiac surgery on- versus off-cardiopulmonary bypass: a randomised trial." Eur J Cardiothorac Surg **30**(2): 271-277.

Palmer, P. J., Ameloot, K. , Hiltrop, N. , Timmermans, P. , Ferdinande, B. , Sinnaeve, P. (2014). "[Therapeutic hypothermia: effects beyond neuroprotection]." Ned Tijdschr Geneesk **158**(0): A7565.

Paparella, D., Brister, S. J. , Buchanan, M. R. (2004). "Coagulation disorders of cardiopulmonary bypass: a review." Intensive Care Med **30**(10): 1873-1881.

Polderman, K. H., Herold, I. (2009). "Therapeutic hypothermia and controlled normothermia in the intensive care unit: practical considerations, side effects, and cooling methods." Crit Care Med **37**(3): 1101-1120.

Popp, E., Sterz, F. , Bottiger, B. W. (2005). "[Therapeutic hypothermia after cardiac arrest]." Anaesthesist **54**(2): 96-106.

Preissner, K., Müller-Berghaus, G. (1986). "Molekulare Wechselwirkungen zwischen Komplement-, Gerinnungs- und Fibrinolyse-System. ." Haemostaseologie **6**: 67-81.

Raymond, P. D., Ray, M. J. , Callen, S. N. , Marsh, N. A. (2003). "Heparin monitoring during cardiac surgery. Part 1: Validation of whole-blood heparin concentration and activated clotting time." Perfusion **18**(5): 269-276.

Ren, X. Q., O'Brian, J. , Pistella, T. (2012). Medical towel and method for manufacturing, Google Patents: 1-20.

Riess, F.-C. (2001). "Gerinnungsprobleme in der Kardiochirurgie." Intensivmed, Steinkopff Verlag **38:1** 1/16-11/22

Rivera, V., Levieux, A. , Levieux, D. (2002). "Characterisation of Ag1, the major species-specific contaminant of bovine crude heparin, and its identification as an aprotinin/heparin complex." J Pharm Biomed Anal **29**(3): 443-458.

Rodriguez, E., Ferguson, B (2008). "Hemostatic Monitoring for Cardiothoracic Surgery Patients." Medscape Cardiology, Surgical Blood Management Expert Column: 1-4.

Rogers, M., Blumberg, N , Saint, S , Langa, K , Nallamotheu, B (2009). "Hospital variation in transfusion and infection after cardiac surgery: a cohort study." BMC medicine **7**: 37-46

Rohrer, M. J., Natale, A. M. (1992). "Effect of hypothermia on the coagulation cascade." Crit Care Med **20**(10): 1402-1405.

Rosomoff, H. L., Holaday, D. A. (1954). "Cerebral blood flow and cerebral oxygen consumption during hypothermia." Am J Physiol **179**(1): 85-88.

Sadel, S. (1995). Safety and Management of Perturbations During Cardiopulmonary Bypass. Cardiopulmonary Bypass. C. Mora, R. Guyton, D. Finlayson and R. Rigatti, Springer New York: 298-308.

Schmid, C., Philipp, Alois (2011). "Leitfaden Extrakorporale Zirkulation." Springer Medizin Verlag Heidelberg: 104.

Schmitt, K. R. L. (2011). "Hypothermie zur Organprotektion." Medizinische Habilitationsschrift, Charité – Universitätsmedizin Berlin: 35.

Schwarz, M. (2008). "Modellbasierte Operationsplanung und Überwachung hypothermer Patienten." Ingenieurs-Dissertationsschrift, Universität Karlsruhe: 9.

Serdar, M., Kenar, L , Haşim, A , Koçu, L , Türkmen, YH , Kurt, İ , Akman, Ş , Erbil MK (2008). "Tourniquet Application Time During Phlebotomy and The Influence on Clinical Chemistry Testing; Is It Negligible?" Turk J Biochem **33**(3): 85–88.

Sharp, M. K., Mohammad, S. F. (1998). "Scaling of hemolysis in needles and catheters." Ann Biomed Eng **26**(5): 788-797.

Shimamoto, T. (2011). "Polyurethane sheet: a potential substitute of surgical cotton gauze." J Cardiothorac Surg **6**: 26.

Siewert, J. R. (2007). "Basiswissen Chirurgie." Springer Medizin Verlag Heidelberg: 161-162.

Silbernagl, S., Despopoulos, Agamemnon (2007). "Taschenatlas Physiologie." Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart, New York **7. Aufl.**: 88-104.

Sokol, P. E., Tsai, H.C. (1980). Method for dyeing human hair with cationic polymeric dyes, Google Patents: 1-14.

Soleimannejad, M., Aslanabadi, N. , Sohrabi, B. , Shamshirgaran, M. , Separham, A. , Kazemi, B., Khayati Shal, E. , Madadi, R. , Shirzadi, H. , Azizi, H. , Ghaffari, S. (2014). "Activated clotting time level with weight based heparin dosing during percutaneous coronary intervention and its determinant factors." J Cardiovasc Thorac Res **6**(2): 97-100.

Spaet, T. H. (1987). "Blood in contact with artificial surfaces: Where have we been and where are we going? ." In: Blood in contact with natural and artificial surfaces. Leonard, E.F. ; Turitto, V.T. ; Vroman, L. . Annals of the New York academy of sciences, New York **516**: 1-4.

Spijker, H. T., Graaff, R. , Boonstra, P. W. , Busscher, H. J. , van Oeveren, W. (2003). "On the influence of flow conditions and wettability on blood material interactions." Biomaterials **24**(26): 4717-4727.

Straten, A. H. M. v., et al. (2009). "Transfusion of red blood cells: the impact on short-term and long-term survival after coronary artery bypass grafting, a ten-year follow up." Interact Cardiovasc Thorac Surg **10**: 37-42

Su, X. W., Undar, A. (2010). "Brain protection during pediatric cardiopulmonary bypass." Artif Organs **34**(4): E91-102.

Ternström, L., Hyllner, M. , Backlund, E. , Schersten, H. , Jeppsson, A. (2014). "A structured blood conservation programme reduces transfusions and costs in cardiac surgery." Interact Cardiovasc Thorac Surg: 1-7.

Trobisch, H. (1993). "Labormedizinische Strategien zur Erkennung einer intra- und postoperativen Hämostasestörung. In: Perioperative Gerinnungsstörungen Diagnostik und Therapie, Martin E. und Fleischer F. ." Springer Medizin Verlag Berlin-Heidelberg-NewYork: 85-100.

Uden, D. L., Seay, R. E. , Kriesmer, P. J. , Cipolle, R. J. , Payne, N. R. (1991). "The effect of heparin on three whole blood activated clotting tests and thrombin time." ASAIO Trans **37**(2): 88-91.

Vonk, A. B., Meesters, M. I. , Garnier, R. P. , Romijn, J. W. , van Barneveld, L. J. , Heymans, M. W. , Jansen, E. K. , Boer, C. (2013). "Intraoperative cell salvage is associated with reduced postoperative blood loss and transfusion requirements in cardiac surgery: a cohort study." Transfusion **53**(11): 2782-2789.

Wang, G., Bainbridge, D. , Martin, J. , Cheng, D. (2009). "The efficacy of an intraoperative cell saver during cardiac surgery: a meta-analysis of randomized trials." Anesth Analg **109**(2): 320-330.

Weerasinghe, A., Taylor, K. M. (1998). "The platelet in cardiopulmonary bypass." Ann Thorac Surg **66**(6): 2145-2152.

Wendel, H. P. (2007). "Untersuchungen zur Evaluierung und Optimierung der Biokompatibilität von Fremdoberflächen in der Herzchirurgie." Kumulative Habilitationsschrift, Eberhard Karls Universität zu Tübingen: 30.

Wendel, H. P., Philipp, A. , Weber, N. , Birnbaum, D. E. , Ziemer, G. (2001). "Oxygenator thrombosis: worst case after development of an abnormal pressure gradient--incidence and pathway." Perfusion **16**(4): 271-278.

Wendel, H. P., Weber, N. , Ziemer, G. (1999). "Increased adsorption of high molecular weight kininogen to heparin-coated artificial surfaces and correlation to hemocompatibility." Immunopharmacology **43**(2-3): 149-153.

Whelihan, M. F., Kiankhooy, Armin , Brummel-Ziedins, Kathleen E. (2014). "Thrombin generation and fibrin clot formation under hypothermic conditions: An in vitro evaluation of tissue factor initiated whole blood coagulation." J Crit Care **29**(1): 24-30.

Wilcox, G. J., Barnes, A. , Modanlou, H. (1981). "Does transfusion using a syringe infusion pump and small-gauge needle cause hemolysis?" Transfusion **21**(6): 750-751.

Yawn, B. P., Loge, C. , Dale, J. (1996). "Prothrombin time: one tube or two." Am J Clin Pathol **105**(6): 794-797.

Ziemer, G., Haverich, Axel (2010). "Herzchirurgie- Die Eingriffe am Herzen und an den herznahen Gefäßen." Springer Verlag **3. Auflage**: 84.

10. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. H.P. Wendel für die freundliche Überlassung des Themas und der einwandfreien Betreuung meiner Promotion.

Danke - an das Team des THG-Labors für die schnelle Eingliederung und danke an Steffi für die Unterstützung.

Danke - an die beste Schwester, die mich von Anfang bis Ende in allen Belangen und zu jeder Zeit unterstützt hat. Vielen Dank Frau Doktor!

Danke - an meine Eltern, die immer an mich glauben und ohne die diese Arbeit nie zustande gekommen wäre. Danke dafür!

Herzlichen Dank auch an Annette!

And last but not least – in memory of Oma, Opa and Dave: I know you would be proud!