

Aus der Poliklinik für Zahnärztliche Chirurgie und Aufnahme
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Universitätsprofessor Dr. Jürgen Becker

**In vitro Testung der Thrombozytenaggregation an
zahnärztlich verwendeten kollagenen Hämostyptika**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Carolin Adrienne Kotthaus

2009

Als Inauguraldissertation gedruckt mit
Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf
Dekan

Referent: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Becker
Korreferent: Univ.-Prof. Dr. med. Rüdiger E. Scharf

Gewidmet meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Hämostase.....	2
1.1.1	Primäre Hämostase	2
1.1.2	Sekundäre Hämostase.....	6
1.2	Hämorrhagische Diathesen	8
1.2.1	Thrombozytäre Gerinnungsstörungen.....	8
1.2.2	Plasmatische Gerinnungsstörungen	9
1.2.3	Vaskuläre Gerinnungsstörungen.....	10
1.2.4	Therapeutische Antikoagulation	11
1.3	Gestörte Hämostase und zahnärztliche Behandlung.....	11
1.3.1	Maßnahmen zur Blutungsprophylaxe.....	13
1.3.2	Lokale Hämostyptika.....	14
1.4	Problemstellung und Ziel der Arbeit.....	20
2	Material und Methoden.....	22
2.1	Verwendete Materialien	22
2.1.1	Getestete Materialien	22
2.1.2	Gebrauchslösungen und Chemikalien	26
2.1.3	Geräteliste.....	26
2.2	Versuchsaufbau.....	27
2.2.1	Thrombozytenadhäsion.....	27
2.2.1.1	Aufbau der Kammer	27
2.2.1.2	Blutvorbereitung durch Immunfluoreszenzmarkierung und Hemmung der plasmatischen Gerinnung	30
2.2.1.3	Prinzip CLSM	30
2.2.1.4	Datenerhebung.....	31
2.2.1.5	Statistische Datenanalyse	33
2.2.2	pH-Wert-Bestimmung.....	35
2.2.2.1	pH-Wert-Bestimmung der Versuchsschwämme.....	36
2.2.2.2	Testung der Pufferfunktion des Serums	36
2.2.3	Rasterelektronenmikroskopische Untersuchung	36
2.2.3.1	Prinzip REM	36
2.2.3.2	Präparation der Untersuchungsobjekte	37

3	Ergebnisse	38
3.1	Thrombozytenadhäsion	38
3.1.1	Physikalische Stabilität der Schwämme während der Versuche	41
3.2	pH-Wert-Bestimmung	41
3.2.1	pH-Wert-Bestimmung der Versuchsschwämme.....	41
3.2.2	Testung der Pufferfunktion des Serums	41
3.3	Ergebnisse der rasterelektronenmikroskopischen Auswertung	43
4	Diskussion	44
5	Schlussfolgerung.....	57
6	Literaturverzeichnis	58
7	Tabellen- und Abbildungsverzeichnis.....	64
8	Zusammenfassung.....	65
9	Danksagung	66
10	Lebenslauf.....	68

1 Einleitung

Bei Routineeingriffen wie einfachen Zahnextraktionen können Störungen der Blutgerinnung, die zuvor häufig ohne eindeutige klinische Symptome verlaufen, zu gefürchteten Blutungskomplikationen führen. Diese sogenannten hämorrhagischen Diathesen sind von erheblicher Bedeutung für Patient und Behandler, vor allem bei operativen Maßnahmen (Esser 1992). Sie können auf Veränderungen der Thrombozytenfunktion, des Fibrinolysesystems, der Blutgefäße oder der plasmatischen Gerinnung beruhen und haben häufig eine multifaktorielle Genese (Esser 1992; Calatzis et al. 2003). Zudem ist infolge der allgemein gestiegenen Lebenserwartung und der damit verbundenen Zunahme kardiovaskulärer Erkrankungen ein Anstieg medikamentös gerinnungsgehemmter Patienten zu verzeichnen (Schmelzeisen 2002; Alberio 2003; Scheer et al. 2006). Der Zahnarzt wird daher im Praxisalltag immer öfter mit oral antikoagulierten Patienten konfrontiert (Schmelzeisen 2002). Bezüglich der stetigen Zunahme der Anzahl der Risikopatienten erfährt die Therapieplanung einen besonderen Stellenwert und ist bei zahnärztlich-chirurgischen Eingriffen sowohl menschlich als auch medizinisch eine große Herausforderung für den behandelnden Zahnarzt (Scheer et al. 2006).

Um den Patienten als Risikopatienten zu erkennen und eine wirkungsvolle prophylaktische Therapie einleiten zu können, ist eine gezielte ärztliche Anamnese entscheidend (Esser 1992). So können auf einfachem Wege Risiken für den Patienten, aber auch für den behandelnden Zahnarzt minimiert werden. Hierfür bieten sich verständliche, standardisierte Fragebögen an. Diese werden dem Patienten ausgehändigt, so dass der Patient bereits im Vorfeld eindeutige Angaben machen kann, auf die der Zahnarzt in der weiteren Anamneseerhebung genauer eingeht. Zusätzlich sollte bei betroffenen Patienten eine begleitende Information erfolgen (Grötz 2003). Die Fragebögen beinhalten zumeist Fragen zu internistischen Vorerkrankungen, zur aktuellen Medikamenteneinnahme, zum gesamten Herz- und Kreislaufsystem und auch zu eventuellen Familienerkrankungen. Die anamnestische Abklärung ist zudem essentiell für diejenigen Patienten, die mit einem akuten Nachblutungsereignis in der Praxis vorstellig werden.

1.1 Hämostase

Als Hämostase bezeichnet man die regelhaft ablaufende Blutgerinnung. Zur Identifizierung und Behandlung des gerinnungsgehemmten Patienten in der zahnärztlichen Praxis sind Grundkenntnisse der Hämostase notwendig, um vor einem operativen Eingriff das Vorliegen einer hämorrhagischen Diathese rechtzeitig zu erkennen. Zudem dient es der Verhütung bzw. bei manifester Blutung der differentialdiagnostischen Entscheidungsfindung und der gezielten Therapie (Esser 1992; Rogerson 1995).

1.1.1 Primäre Hämostase

Als primäre Hämostase bezeichnet man die Vorgänge, die zur Bildung eines initialen Plättchenpfropfes an der Verletzungsstelle führen. In erster Linie ist die primäre Hämostase eine Funktion der Gefäßwand und der Thrombozyten. Das Endothel trennt Gefäßinhalt vom subendothelial gelegenen Gewebe. Endothelverletzungen, traumatisch oder durch krankhafte Prozesse bedingt, führen zur Freilegung von subendothelialen Strukturen (z. B. kollagenen Fasern). Neural und humoral (z. B. Thromboxan A_2 und Serotonin aus Thrombozyten) vermittelt kommt es so zu einer lokalen Vasokonstriktion (sog. Reparaturischämie) (Rogerson 1995) und zur Thrombozytenadhäsion durch Anhaften des thrombozytären von-Willebrandt-Faktors (vWF) an die subendothelialen Strukturen der Gefäßwand.

Der erste Schritt der primären Hämostase ist somit die Adhäsion von noch ruhenden Blutplättchen an die verletzte Gefäßwand. Er wird als primäre Adhäsion bezeichnet. Diese bewirkt eine Formveränderung, Spreizung und Aktivierung der Plättchen. Es kommt zur Sekretion von Granulainhaltsstoffen und Aggregatbildung. Die sekundäre Adhäsion beschreibt die Anlagerung von bereits aktivierten Thrombozyten an Strukturen des Subendothels (Gawaz 1999a).

Der Adhäsionsvorgang wird durch thrombozytäre Membranglykoproteinrezeptoren gesteuert. Zu diesen Plättchenrezeptoren gehören GPIa-IIa, GPIb-V-IX und GPIIb-IIIa. Zudem wird auch die Zugehörigkeit von GPIc-IIa, GPIc'-IIa und GpIV zu den Plättchenrezeptoren diskutiert (Scharf 1999).

Die Glykoproteinrezeptoren weisen eine hohe Affinität für Struktur- und Adhäsionsproteine der extrazellulären Matrix auf. Die am häufigsten vorkommenden Strukturproteine in der arteriellen Gefäßwand sind Kollagen Typ I und III. Des Weiteren sind

Kollagentypen wie IV, V, VI und VIII, wenn auch in deutlich geringerer Menge, vorzufinden. Die Kollagenzusammensetzung der Gefäßwand unterliegt jedoch mit steigendem Alter sowie bei arteriosklerotischen Erkrankungen einem Wandel, bei dem es zur Zunahme des Typ-I-Kollagens kommt.

Die wichtigsten Vertreter nicht-kollagener Adhäsionsproteine der extrazellulären Matrix sind Fibronectin und Laminin. Daneben findet sich Thrombospondin (vorwiegend in proliferativem Gewebe), Vitronectin, Fibrinogen und von-Willebrandt-Faktor. Ein Großteil des vom Endothel gebildeten vWFs wird in das Plasma abgegeben, nur ein Teil bleibt an den Kollagenfibrillen des Subendothels haften (Gawaz 1999a).

Bei der Plättchenadhäsion an die Gefäßwand lassen sich folgende Stadien unterscheiden: Kontaktphase, Stabilisierung, Aktivierung und Ausbreitung („spreading“) mit Übergang zur Aggregation. Diese sind schematisch in Abb. 1 a-d zusammengefasst. Anlagerung, Anhaftung und Verankerung von Plättchen an die Gefäßwand können durch verschiedene Rezeptor-Liganden-Interaktionen zustande kommen (Scharf 1999).

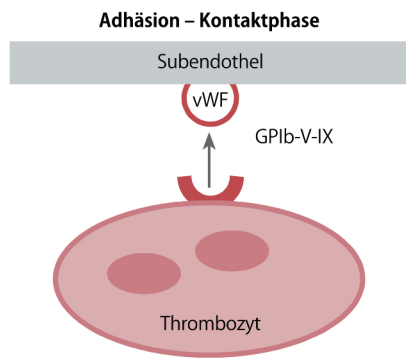


Abb. 1a

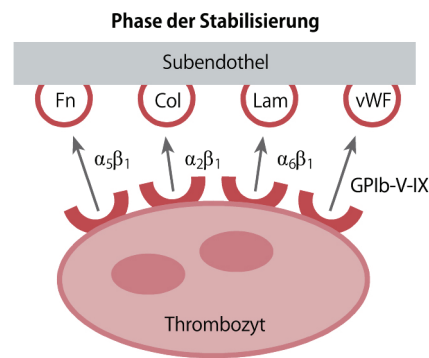


Abb. 1b

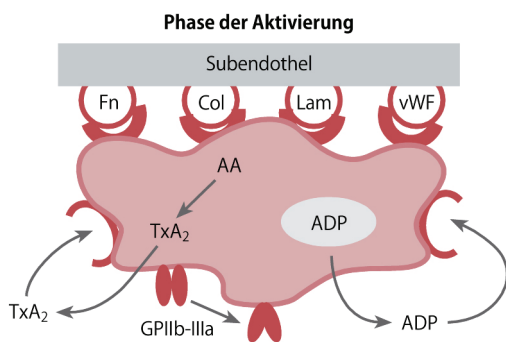


Abb. 1c

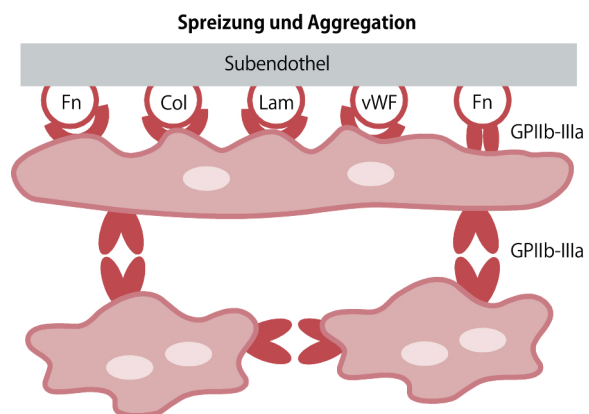


Abb. 1d

Abb. 1 a-d: Stadien der Plättchenadhäsion (Gawaz 1999a)

1a) Adhäsion – Kontaktphase: vWF = von-Willebrand-Faktor; GPIb-V-IX = vWF-Rezeptor. 1b) Phase der Stabilisierung: Fn = Fibronectin; Col = Kollagen; Lam = Laminin; $\alpha_5\beta_1$ = Fibronectinrezeptor; $\alpha_2\beta_1$ = Kollagenrezeptor; $\alpha_6\beta_1$ = Lamininrezeptor; GPIb-V-IX = vWF-Rezeptor. 1c) Phase der Aktivierung: TxA₂ = Thromboxan A₂; AA = Arachidonsäure; ADP = Adenosindiphosphat; GPIIb-IIIa = Fibrinogenrezeptor. 1d) Spreizung und Aggregation.

Den ersten Schritt der Plättchenadhäsion stellt die Kontaktphase dar (Abb. 1a). Je nach hämorrhheologischer Situation bilden sich unterschiedliche Rezeptor-Liganden-Interaktionen aus. Ist die Strömungsgeschwindigkeit des Blutes und dementsprechend die Schubspannung im Bereich der Gefäßläsion niedrig (z. B. große Venen), adhären die Plättchen mittels des membranständigen GPIa-IIa-Komplexes direkt mit den freigelegten Kollagenstrukturen des Subendothels. In Gefäßbereichen mit Scherraten über 1000 sec^{-1} (z. B. Arteriolen, Kapillaren, stenosierte Arterien) erfolgt die Haftung der Plättchen an das Subendothel über den GPIb-V-IX und den vWF

(Scharf 1999). Der auf der Thrombozytenoberfläche exprimierte GPIb-V-IX-Komplex reagiert hierbei mit subendothelialen vWF, welcher durch Bindung an Kollagen (oder andere subendotheliale Adhäsivproteine) eine Konformationsänderung erfährt. Hierdurch entsteht eine hochaffine Bindung zwischen GPIb α , einer Untereinheit des GPIb-V-IX-Komplexes, mit dem vWF. Diese kann auch hohen Schubspannungen standhalten (Scharf 1999).

Auf die Kontaktphase erfolgt im weiteren Verlauf die Phase der Stabilisierung der Plättchenadhäsion. Sie wird über membranständige Adhäsionsrezeptoren aus der Familie der Integrine (Kollagen-, Fibronektin-, und Lamininrezeptor) gewährleistet (Abb. 1b).

Die Bindung des thrombozytären Kollagenrezeptors an Kollagen bewirkt die Aktivierung der Thrombozyten. Dies zeigt sich in einer Formveränderung der Plättchen („shape change“). Es kommt zur Ausbildung von Pseudopodien (Phase der Aktivierung, Abb. 1c). Der adhärente und aktivierte Thrombozyt sezerniert aggregationsfördernde Stoffwechselprodukte aus seinen Granula (z. B. ADP und Serotonin). Sie wirken positiv verstärkend auf den Thrombozyten selbst und stimulierend auf noch ruhende Thrombozyten aus der Zirkulation („Plättchenrekrutierung“). Die Stimulation der noch ruhenden Plättchen führt zur Aggregation mit bereits adhärenen Plättchen. Neben den Granulainhaltsstoffen wird auch Thromboxan A₂ (TxA₂) ausgeschüttet. TxA₂ verstärkt die Aktivierung der Plättchen durch Bindung an Thromboxanrezeptoren. Die vasokonstriktorische Wirkung des TxA₂ fördert die Thrombusbildung (Gawaz 1999a).

Der letzte Schritt der Adhäsion wird als Spreizung bezeichnet. Diese beschreibt die vollständige Ausbreitung des Thrombozyten über dem Subendothel. Die Endothelschädigung wird gegenüber dem Blutstrom abgedichtet. Bei diesem Schritt spielt das Glykoprotein IIb-IIIa eine wichtige Rolle (Abb. 1d) (Gawaz 1999a).

Aggregation

Während sich bei der Adhäsion die Plättchen an das Subendothel anlagern und aktiviert werden, bezeichnet die Aggregation den Vorgang der Verbindung der Thrombozyten untereinander (Gawaz 1999a).

Der Übergang von der Plättchenadhäsion zur Plättchenaggregation wird hierbei möglicherweise über Thrombin beeinflusst. Es wird diskutiert, ob Thrombin die

Expression der Glykoproteine IIb-IIIa und Ib-V-IX reguliert. Die Aggregation erfolgt ausschließlich über den GPIIb-IIIa-Rezeptor. Charakteristisch für den GPIIb-IIIa-Komplex ist, dass er auf der Oberfläche zirkulierender Thrombozyten in großer Anzahl, mit 50.000 bis 80.000 Kopien, vorkommt. Dies ermöglicht bei Gefäßverletzungen eine schnelle und effektive Vernetzung der Thrombozyten untereinander (Scharf 1999).

GPIIb-IIIa hat verschiedene Liganden (Fibrinogen, vWF, Fibronectin, Vitronectin), weist jedoch bei Plättchen im Ruhezustand nur eine geringe Affinität vor allem für lösliches Fibrinogen auf. Erst nach einer Konformationsänderung, induziert z. B. durch ADP, Adrenalin oder Thrombin, wird er in eine aktive Form höherer Affinität umgewandelt. Auf diesem Wege wird eine Plättchenaggregation der zirkulierenden, ruhenden Thrombozyten verhindert. Durch die Aktivierung von GPIIb-IIIa und die Bindung von Fibrinogen oder vWF werden weitere Signalkaskaden in Gang gesetzt. Unter Beteiligung von Ca^{2+} nehmen Fibrinogen und vWF ihre Funktion als Konnektoren der Plättchen ein und lassen die Plättchen aggregieren (Scharf 1999). Zusätzlich können Plättchen mit aktivierten GPIIb-IIIa-Rezeptoren nichtstimulierte Plättchen über Fibrinogenmoleküle binden (Scharf 1999).

Bei der Plättchenaggregation sind wiederum die verschiedenen Strömungsbedingungen zu berücksichtigen. Bei hohen Scherkräften steht weniger die Interaktion zwischen GPIIb-IIIa und Fibrinogen als vielmehr die Bindung zwischen GPIIb-IIIa und dem vWF im Vordergrund. Der vWF zeichnet sich durch seine hohe Bindungsaffinität gegenüber Plättchen und Gefäßwänden aus. Auf diese Weise entsteht ein stabiles Brückenwerk, das den hohen Scherkräften standhalten kann (Scharf 1999).

1.1.2 Sekundäre Hämostase

Die sekundäre Hämostase dient der Stabilisierung des primären Plättchenaggregates. Die primäre und die sekundäre Hämostase laufen hierbei stets gleichzeitig ab, da durch eine Gefäßwandläsion sowohl die Plättchenadhäsion als auch das plasmatische Gerinnungssystem aktiviert wird.

Endziel der plasmatischen Gerinnung ist die limitierte Proteolyse von Fibrinogen in Fibrinmonomere durch die Anwesenheit von Thrombin. Die Fibrinmonomere polymerisieren zu einem Fibrinnetz, welches den Plättchenpfropf bzw. Thrombus stabilisiert. Thrombin entsteht aus Prothrombin auf der Oberfläche stimulierter Plättchen und

Endothelzellen über die zwei Pfade der Gerinnungskaskade, dem intrinsischen und extrinsischen Weg.

Die Komponenten des intrinsischen Systems befinden sich im Blutplasma und umfassen die Gerinnungsfaktoren XII, XI, IX, VIII, high molecular weight kininogen (HMWK) und Präkallikrein (Gawaz 1999b). Die sogenannten Kontaktfaktoren (Faktor XII, Präkallikrein, Kallikrein, HMWK) werden durch Kontakt mit Fremdoberflächen aktiviert. Dies setzt den intrinsischen Mechanismus in Gang. Er führt zur Bildung des endogenen Tenase-Komplexes (IXa-VIIIa-Ca²⁺-Phospholipid), der protolytisch Faktor X aktiviert (Gawaz 1999b).

Zur Einleitung der plasmatischen Gerinnung über den extrinsischen Weg ist die Bindung von Faktor VII an Gewebethromboplastin, den sogenannten „tissue factor“, notwendig. Der „tissue factor“ ist ein integrales Membranprotein u. a. der Gefäßwandzellen, sein Vorkommen ist aber auch auf zirkulierenden Blutzellen nachgewiesen. Der extrinsische Weg mündet ebenso wie der intrinsische in die Aktivierung des Faktor X über einen Tenasekomplex (Gawaz 1999b). Beide Tenasekomplexe (endogen und exogen) entstehen in unmittelbarer räumlicher Nähe auf der Plättchenoberfläche, was optimale Voraussetzungen für die Bildung von Thrombin schafft.

Die gemeinsame Endstrecke der Gerinnungskaskade nach Aktivierung des Faktor X ist eine Kette proteolytischer Spaltungen. Faktor X bildet den Prothrombinasekomplex (Xa-Va-Ca²⁺-Phospholipid). Dieser spaltet Thrombin aus Prothrombin ab. Thrombin wiederum spaltet Fibrinogen zu Fibrin. Neben der Fibrinogenspaltung besitzt Thrombin zusätzlich die Fähigkeit, weitere noch zirkulierende Blutplättchen zu rekrutieren (siehe 1.1.1). Dieser Mechanismus trägt zum Anwachsen des Thrombus bei. Die dafür nötige hohe Thrombinkonzentration wird durch positive Feedbackmechanismen innerhalb der Gerinnungskaskade sichergestellt.

Im Organismus gibt es neben dem System der plasmatischen Gerinnung auch ein System der Fibrinolyse, welches verschiedene Inhibitoren (Antithrombin III, Protein C und S) beinhaltet. Diese hemmen unterschiedliche Komponenten der sekundären Hämostase. So wird eine physiologische Balance zwischen Koagulation und Antikoagulation hergestellt (Gawaz 1999b).

1.2 Hämorrhagische Diathesen

Hämorrhagische Diathesen umfassen Störungen des Hämostasesystems, die zu einer verminderten Gerinnbarkeit des Blutes führen.

Die Ursachen für diese Blutgerinnungsstörungen können in drei Hauptgruppen eingeteilt werden. Man unterscheidet zwischen Erkrankungen und Fehlbildungen der thrombozytären Blutungsmechanismen, der plasmatischen Hämostasefaktoren (Koagulopathien) und der Gefäßwand (Vasopathien). Des Weiteren sind iatrogen herbeigeführte Diathesen zu erwähnen, welche der Therapie und Prophylaxe verschiedener allgemeinmedizinischer Erkrankungen dienen (Esser 1992).

1.2.1 Thrombozytäre Gerinnungsstörungen

Blutungen können aus einer erniedrigten Thrombozytenkonzentration (Thrombozytopenie) oder aus einer defekten Thrombozytenfunktion (Thrombozytopathie) resultieren. Häufigste Ursache erworbener Plättchenfunktionsstörungen sind Medikamente (z. B. Aspirin).

Thrombozytopenie

Die normale Thrombozytenzahl bewegt sich zwischen 150000 bis 400000/ μ l. Sinkt sie unter 150000/ μ l, spricht man von einer Thrombozytopenie. Klinisches Charakteristikum sind petechiale (punktförmige) Blutungen. Zwischen Thrombozytenzahl und Schweregrad der Ausprägung besteht keine feste Korrelation. Die Blutungsneigung wird nicht nur von der Thrombozytenzahl, sondern auch von deren Funktion, dem Alter des Patienten und von der Grundkrankheit bestimmt.

Thrombozytopenien sind die häufigsten Ursachen einer hämorrhagischen Diathese. Man unterscheidet zwischen erworbenen und angeborenen Formen, wobei letztere sehr selten sind. Hierzu gehören z. B. das Wiskott-Aldrich-Syndrom und das Fanco-ni-Syndrom. Thrombozytopenien entstehen durch verminderte Bildung, vermehrten Abbau oder durch Verteilungsstörungen der Thrombozyten.

Beispielhaft sei hier der beschleunigte Thrombozytenabbau durch Antigen-Antikörper-Reaktionen erwähnt. Hierbei reagieren Autoantikörper mit Antigenen auf der Plättchenoberfläche. Dies löst einen gesteigerten Verbrauch von Thrombozyten aus. Ursächlich für die Entstehung derartiger Autoantikörper können z. B. eine Transplantatabstoßung, Nahrungsmittelallergien, virale Infektionen oder Medikamente (z. B.

Sulfonamide, Chinidin, Digitoxin, Analgetika, Heparin, einige Tuberkulostatika) sein. Der Morbus Werlhof bezeichnet eine immunologische Thrombozytopenie, bei der sich IgG-Antikörper gegen Plättchen bilden. Unter den idiopathischen Thrombozytopenien des Erwachsenen stellt er eine Ausschlussdiagnose dar (Rupprecht et al. 2002).

Thrombozytopathien

Thrombozytopathien sind Thrombozytenfunktionsstörungen. Es lassen sich angeborene (kongenitale) von erworbenen Thrombozytopathien unterscheiden:

Kongenitale Thrombozytopathien beruhen auf Defekten der thrombozytären Zellmembran (Glanzmann-Naegli-Thrombasthenie, Bernard-Soulier-Syndrom) und/oder des Zellstoffwechsels und der Zellorganellen (Gray-Platelet-Syndrom).

Erworbene Thrombozytopathien treten bei verschiedenen Grunderkrankungen wie Lebererkrankungen, Urämie, Paraproteinämie, schwere Dysproteinämien, Vitamin-C-Mangel und myeloproliferativen Erkrankungen auf. Auch verschiedene Medikamente können die Thrombozytenfunktion hemmen, z. B. ASS, nicht-steroidale Antiphlogistika, Penicillin, Cephalosporine und Antihistaminika.

Diagnostische Hinweise auf das Vorliegen einer Thrombozytopathie liefern eine verlängerte Blutungszeit und pathologisch ausfallende Thrombozytenaggregationstests, meist ohne den Nachweis einer Thrombozythopenie.

Thrombozytopathien führen während/nach zahnärztlichen Eingriffen fast nur im Zusammenhang mit vorliegender Thrombozytopenie oder Koagulopathie sowie bei Einnahme von ASS und bei größeren Verletzungen zur Blutung (Lechner 2000).

1.2.2 Plasmatische Gerinnungsstörungen

Genetische und erworbene, quantitative und qualitative Störungen der plasmatischen Gerinnung werden unter dem Begriff Koagulopathien zusammengefasst. Darunter fallen Mangelzustände und Dysfunktionen der Gerinnungsfaktoren, der Fibrinolysekomponenten und der Gerinnungs- und Fibrinolyseinhibitoren.

Typische Beispiele für Koagulopathien sind die Hämophilie A (Faktor-VIII-Mangel), die Hämophilie B (Faktor-IX-Mangel) und das von-Willebrand-Jürgens-Syndrom (vWJS). Die Hämophilien A und B gehören zu den angeborenen Störungen der sekundären Hämostase. Da sie x-chromosomal-rezessiv vererbt werden, sind fast

ausschließlich Männer betroffen. Das klinische Bild korreliert mit dem Ausmaß der Erkrankung; bei der schweren Form kommt es zu ausgedehnten Hämorrhagien, Weichteil- und Organblutungen. Leichte Formen fallen meist erst durch übermäßige Nachblutungen nach operativen Eingriffen oder Verletzungen auf.

Das vWJS wird autosomal-dominant vererbt. Das Krankheitsbild ist vielgestaltig und beruht auf dem Fehlen von vWF oder der verminderten Bildung funktionsfähiger Faktor-VIII-Komplexe, da der vWF im peripheren Blut die Transportfunktion für den Faktor VIII übernimmt. Zudem ist er wie unter 1.1.1 angesprochen auch an der Thrombozytenaggregation beteiligt. So können Patienten mit vWJS sowohl Symptome einer Thrombozytopathie als auch einer plasmatischen Gerinnungsstörung entwickeln.

Beispiele für erworbene Koagulopathien sind medikamentös induzierte Gerinnungsstörungen (z. B. bei Überdosierung einer oralen Antikoagulationstherapie mit Vitamin K-Antagonisten (z. B. Marcumar)) (Lechner 2000).

1.2.3 Vaskuläre Gerinnungsstörungen

Vaskuläre hämorrhagische Diathesen haben in umschriebenen lokalen oder generalisierten, meist entzündlichen Gefäßwandveränderungen ihren Ursprung. Dabei sind Blutungszeit, Thrombozytenzahl und Komponenten der plasmatischen Gerinnung nicht auffällig verändert.

Auch hier sind die angeborenen Störungen (z. B. Morbus Osler, Ehlers-Danlos-Syndrom) von den erworbenen Störungen (z. B. Purpura Schoenlein-Henoch, Purpura senilis, Skorbut, kortisonbedingte Gefäßschäden) abzugrenzen.

Bei Morbus Osler treten durch einen Gendefekt Teleangiektasien auf. Sie manifestieren sich bei dem Großteil der Patienten als Epistaxis (Nasenbluten). Weitere Symptome sind Gastrointestinal- und Urogenitalblutungen.

Die Purpura senilis betrifft vor allem alte Personen mit atrophischer Haut und Patienten mit langdauernder Steroidtherapie. Typisch sind scharf begrenzte Hautblutungen im Bereich der Unterarme und Hände nach Mikrotraumen (Lechner 2000). Vaskuläre Gerinnungsstörungen haben in der zahnärztlichen Praxis nur eine geringe Relevanz.

1.2.4 Therapeutische Antikoagulation

Der Stellenwert der medikamentös induzierten Gerinnungsstörungen in der zahnärztlichen Praxis nimmt aufgrund des Anstiegs kardiovaskulär erkrankter Patienten immer mehr zu (Schmelzeisen 2002; Scheer et al. 2006). Der bewusste Eingriff in das Gerinnungssystem soll die Gefahr von Thromboembolien und Gefäßverschlüssen reduzieren.

Die ambulante Thromboseprophylaxe wird im Regelfall mit Thrombozythenaggregationshemmern (z. B. ASS, Clopidogrel), niedermolekularem Heparin oder mit Cumarinen (Vit.-K-Antagonisten) durchgeführt. Vitamin-K-Antagonisten hemmen die Synthese der Faktoren II, VII, IX und X und der Proteine C und S. ASS, Clopidogrel und Cumarine können oral als Tabletten eingenommen werden. Im klinisch-stationären oder intensivmedizinischen Bereich kommen auch hochmolekulares Heparin, Hirudin und Fibrinolytika (z. B. Strepto-/ Urokinase) zum Einsatz, die parenteral verabreicht werden (Rupprecht et al. 2002).

1.3 Gestörte Hämostase und zahnärztliche Behandlung

Blutungsereignisse bei oder nach zahnärztlichen Eingriffen treten in der Mehrzahl der Fälle aufgrund lokaler Ursachen, wie zum Beispiel großflächigen Weichteilpräparationen, der Verletzung eines größeren Gefäßes oder als reaktive Hyperämie nach Lokalanästhesie mit Vasokonstriktor auf. Sie stellen für Patienten mit normalem Gerinnungsstatus nur ein geringes Risiko dar. Patienten mit gestörter Hämostase können jedoch hochgradig gefährdet sein, wenn das Problem nicht präoperativ erkannt wird (Esser 1992).

Bei Patienten, die unter einer angeborenen oder erworbenen Störung der Blutgerinnung leiden, kann anders als beim Patienten mit normalem Gerinnungsstatus schon eine einfache Zahnextraktion zu hämodynamisch relevanten Blutungen führen. Chirurgische Eingriffe, die den Kieferknochen verletzen (z. B. Wurzelspitzenresektionen, Osteoplastiken, Osteotomien, Implantationen und Kieferkammaugmentationen) bergen ein zusätzliches Risiko durch die stärkere Gewebstraumatisierung.

Die erhöhte Blutungsneigung mit häufig schwer stillbaren Blutungen nach zahnärztlichen Eingriffen ist eines der Leitsymptome einer hämorrhagischen Diathese. Eine harmlos erscheinende Nachblutung kann sich dabei zu einer lebensbedrohlichen

Situation entwickeln, die unter Umständen zu haftungsrechtlichen, im Einzelfall sogar zu strafrechtlichen Konsequenzen führen kann (Mondorf 1998).

Man unterscheidet vom Zeitpunkt des chirurgischen Eingriffes ausgehend zwischen zwei Nachblutungsereignissen. Die frühzeitige Nachblutung tritt zwischen vier und sechs Stunden nach erfolgter Operation ein. Sie ist meist mit Verlust der vaso-konstriktorischen Wirkung des Lokalanästhetikums bei gleichzeitig bestehender Weichgewebsschädigung und/oder einer gestörten Gerinnungsphysiologie vergesellschaftet. Die späte Nachblutung setzt meist zwischen dem dritten und sechsten postoperativem Tag ein. Sie tritt als Folge enzymatischer Umbauprozesse oder durch Entzündung im Wundgebiet auf. Verantwortlich für Nachblutungen sind hierbei häufig auch mechanische Einflüsse in der Mundhöhle, bedingt durch die Nahrungsverarbeitung oder das Zungenspiel des Patienten. Zudem besitzt der Speichel an sich fibrinolytische Eigenschaften (Johnson und Leary 1988).

Alle chirurgischen Maßnahmen gehen mit der Absicht der Reduktion der Blutungs- und Nachblutungsgefahr einher. Bei jedem Eingriff ist dabei auch die einhergehende Verletzung der Weichgewebe zu berücksichtigen; daher kommt vor allem dem schonenden Umgang mit dem Gewebe die allergrößte Bedeutung zu.

Die chirurgische Intervention bei Risikopatienten gehört ausnahmslos in die Hand des Geübten. Mögliche Komplikationen, die sich bei dem Eingriff ergeben könnten, müssen berücksichtigt und gegebenenfalls kontrolliert und beherrscht werden können. Treten Komplikationen oder Nachblutungen ein, sollte sowohl die Gerinnung als auch die Blutung kontrollierbar sein oder sich eine Fachklinik zur Therapieübernahme in erreichbarer Nähe befinden (Schmelzeisen 2002).

Auf keinen Fall sollte eine medikamentöse Antikoagulation sowie die Standardmedikation des Patienten vor der Durchführung zahnärztlich-chirurgischer Eingriffe durch den behandelnden Zahnarzt ohne Rücksprache mit dem zuständigen Arzt geändert oder abgesetzt werden. Bei Patienten unter Antikoagulationstherapie sind Blutungen, die z. B. nach Zahnextraktion auftreten können, nur in Ausnahmefällen vital bedrohlich. Dem entgegen stehen potentielle thromboembolische Komplikationen, welchen die Patienten bei Absetzen ihrer gerinnungshemmenden Medikation ausgesetzt sind (Wahl 2000; Schmelzeisen 2002). Es konnte aufgezeigt werden, dass Patienten unter Antikoagulationstherapie nach zahnärztlich-chirurgischen Maßnahmen eine signifikant höhere Mortalität aufgrund von Thromboembolien und kardiovaskulären

Ereignissen durch Änderung der Medikation zeigen als durch nicht beherrschbare Nachblutungen (Wahl 2000). Zudem existieren Hinweise, dass gerade im zahnärztlich-chirurgischen Bereich insbesondere bei Zahnextraktionen eine adäquate Blutstillung auch bei antikoagulierten Patienten allein durch die Anwendung lokaler Hämostyptika möglich ist (Devani et al. 1998; Blinder et al. 1999). Dies stellt die Notwendigkeit einer Umstellung von internistisch notwendigen Antikoagulationstherapien in Frage (Devani et al. 1998).

1.3.1 Maßnahmen zur Blutungsprophylaxe

Eine effektive Blutungsprophylaxe ist die Grundlage für die Reduktion von Blutungsvorfällen. Insbesondere bei Risikopatienten ist auf eine schonende Behandlung der Gewebe und Gefäße und eine sorgfältige Wundversorgung zu achten (Wahl 2000). Ein geeigneter, dichter Wundverschluss verringert die Gefahr von Nachblutungen. Zur Adaptation der Wundränder mit resorbierbarem Nahtmaterial ist die Matratzennaht oder die horizontale Rückstichnaht durch Aufstellung der Wundränder der einfachen Naht vorzuziehen (Stajcic et al. 1989). Soweit die Anwendung einer adaptierenden Wundnaht möglich ist, führt sie zu besseren Ergebnissen als eine vollständige plastische Deckung. So konnten verschiedene Untersuchungen nach ausgedehnten Schleimhautmobilisationen zur plastischen Deckung vermehrt Nachblutungen und Hämatome nachweisen (Hirsh und Fuster 1994; Gerhards und Wagner 1997; Bublitz et al. 2000).

Der Behandler sollte bemüht sein, möglichst kleine Wunden zu setzen, um die Traumatisierung der Gewebe und Gefäße minimal zu halten. In Abhängigkeit des zu erwartenden Blutungsrisikos stehen verschiedene Methoden der Blutstillung zur Verfügung.

Die einfachste Therapie zur Beherrschung lokaler, parenchymatöser Blutungen ist die Drucktamponade. Dabei presst der Patient einen Aufbisstupfer mit der Gegenbe-zahnung oder dem zahnlosen Gegenkiefer einen gewissen Zeitraum (15 bis 30 Minuten) auf die blutende Stelle (Rupprecht et al. 2002). Durch die lokale Kompression kommen alle parenchymatösen Blutungen durch die Kontraktion der Gefäßstümpfe und die physiologische Blutgerinnung zum Stillstand (Möbes 2002).

Zusätzlich sollten insbesondere bei Risikopatienten präoperativ Verbandsplatten (Tiefziehschienen, Tiefziehfolien) oder ggf. Immediatprothesen hergestellt werden.

Sie unterstützen die Wundkompression. Des Weiteren verhindern sie mechanische Reizungen durch Wangenweichteile oder Zunge und halten den Speichel von der Wunde fern, dessen fibrinolytische Eigenschaft ebenfalls das Auftreten von Nachblutungen unterstützt (Johnson und Leary 1988). Verbandsplatten oder Immediatersätze können durch Radieren der zu extrahierenden Zähne am Gipsmodell sehr einfach nach präoperativer Abformung der Gebissituation hergestellt werden. Sie werden für die Dauer von ca. 1 Woche dauerhaft im Mund belassen (Möbes 2002; Rupprecht et al. 2002).

Ist ein stark blutendes Gefäß lokalisierbar, so muss die Blutung durch Ligatur oder Elektrokoagulation unterbunden werden. Die Elektrokoagulation ist auch in schwer zugänglichen Gebieten gerade bei der intraoralen Blutstillung einfach anzuwenden (Johnson und Leary 1988). Die Umstechung oder Unterbindung/Gefäßligatur mit resorbierbaren Nähten empfiehlt sich, wenn stärkere, spritzende Blutungen intraoperativ auftreten. Beide Verfahren sind jedoch in der zahnärztlichen Praxis nicht die Regel und eher kieferchirurgischen Kliniken vorbehalten.

Blutungen im Knochen können durch spongiöse Verbolzung oder durch Einbringen von Knochenwachs (steriles Bienenwachs) zum Stillstand gebracht werden. Knochenwachs ist das historisch älteste Material zur Kontrolle einer Knochenblutung. Es wirkt rein mechanisch über den Verschluss der Knochenkanälchen und hat selbst keine hämostyptische Wirkung. Allerdings wird es nur schlecht resorbiert und verursacht in seltenen Fällen überschießende Fremdkörperreaktionen. Knochenwachs sollte daher nur sparsam verwendet werden (Rupprecht et al. 2002).

1.3.2 Lokale Hämostyptika

Neben den bereits beschriebenen Methoden der Blutstillung hat sich in der Medizin seit Jahren die Anwendung lokaler, resorbierbarer Hämostyptika als wirksam erwiesen. Auch bei zahnärztlich-chirurgischen Eingriffen, die oft eine kombinierte Knochen-Weichteilwunde mit kapillärer Blutung zur Folge haben, werden Hämostyptika erfolgreich zur Unterstützung der Hämostase eingesetzt. Als Materialien finden oxidierte Zellulose, Gelatine (hydrolysiertes Kollagen), reines und mit Gerinnungsfaktoren beschichtetes Kollagen Verwendung (Tab. 1) (Hausmann et al. 1974; Micheletti et al. 1992; Sevor und Meffert 1992; Berchtenbreiter et al. 1997; Blinder et al. 1999; Halfpenny et al. 2001; Scheer et al. 2004).

Tab. 1: Übersicht über verschiedene klinisch verfügbare Hämostyptika

Inhaltstoffe	Handelsname	Hersteller
Kollagene	Hemocol [®]	Medical Biomaterial Products GmbH
	Kollagen-resorb [®]	Resorba Wundversorgung GmbH & Co. KG
	TissuFleece E	Baxter Bioscience
	TissuCone E	Baxter Bioscience
oxidiert regenerierte Zellulose	Tabotamp [®]	Johnson & Johnson Wound Management, Ethicon GmbH
Gelatine	Gelastypt [®]	Aventis Pharma Deutschland GmbH
Gelatinepuder	Spongostan [®]	Johnson & Johnson Wound Management, Ethicon GmbH
Polyglactin 910, Polydioxanon	Ethisorb [®]	Ethicon GmbH
Fibrinkleber	Tissucol [®]	Baxter Bioscience
	Berioplast P [®]	Nycomed Pharma GmbH
gewebekleberbeschichtetes Kollagenvlies	TachoSil [®]	Nycomed Pharma GmbH
Antifibrinolytika	Ugurol [®]	Bayer

Daneben wird über die Applikation von Biopolymeren (wie Polydioxanon (PDS) und sein Kopolymer Polyglactin 910 (Vicryl)) zur Blutstillung berichtet (Merten et al. 1997; Merten et al. 2004). Andere Autoren beschreiben die topische Wirksamkeit von Tranexamsäure zur lokalen antifibrinolytischen Therapie (Vinckier und Vermeylen 1985; Waly 1995; Bublitz et al. 2000). Auch eine Applikation von Fibrinkleber kann das Nachblutungsrisiko vermindern (Zöller und Herrmann 1992; Suwannuraks et al. 1999) (Tab. 1).

Im Weiteren wird auf die Anwendung und Wirkungsweise von Antifibrinolytika, Fibrinkleber, oxidiertes Zellulose sowie reinem und mit Gerinnungsfaktoren beschichtetem Kollagen näher eingegangen.

Antifibrinolytika

Treten bei Patienten mit hämorrhagischen Diathesen nach operativen Eingriffen in der Mundhöhle Blutungen auf, ist neben funktionellen Faktoren die fibrinolytische Aktivität des Speichels bei der Therapieplanung zu beachten. Die lokale Fibrinolyse kann die Blutgerinnung erschweren und die Erfolgswahrscheinlichkeit einer Blutungstherapie kompromittieren (Sindet-Pedersen 1991). Hier eignen sich Antifibrinolytika wie Tranexamsäure (Ugurol[®]) (Ramstrom et al. 1993). Tranexamsäure hemmt als Pseudosubstrat die Überführung von Plasminogen zu Plasmin durch den Gewebelasminogenaktivator (t-PA). Damit wird eine vorzeitige Fibrinolyse verhindert (Sindet-Pedersen et al. 1989). Der topische Einsatz dieses Antifibrinolytikums findet seine Begründung zudem in der nachgewiesenen lokalen Anreicherung in den oralen Geweben (Sindet-Pedersen 1987).

Tranexamsäure findet in Form von Aufbisstupfern oder Mundspülungen Verwendung. Zudem wird es in Gelform angeboten, so dass es einfach und sehr konzentriert auch direkt auf Wundränder oder unter Tiefziehschienen appliziert werden kann (Buch et al. 2004).

Fibrinklebung

Entwickelt wurde Fibrinkleber ursprünglich zur Gewebeklebung (Fixierung von Hauttransplantaten und Lappenplastiken) und schließlich auch zur Blutstillung (Spängler 1976). Später wurde er auch für die zahnärztliche Chirurgie klinisch anwendbar (Wepner et al. 1982).

Fibrinkleber wird als Zweikomponentenkleber (Thrombin und Fibrinogen) in Form von Fertigspritzen angeboten (z. B. Tissucol[®]). In der Zahnmedizin wird die Applikation z. B. in Extraktionsalveolen zudem durch die Bereithaltung spezieller Kanülen erleichtert. Das Prinzip der Fibrinklebung entspricht dem letzten Schritt der sekundären Hämostase. Nach Applikation auf die Wundfläche wird Fibrinogen durch Thrombin zu monomerem Fibrin umgesetzt. Die Polymerisation der Fibrinmonomere verschließt die blutende Wunde. Die Anwendung nach Zahnextraktionen bei Patienten unter Antikoagulationstherapie zeigte gute Erfolge hinsichtlich der Blutstillung und Verringerung der Nachblutungsrate (Martinowitz et al. 1990; Suwannuraks et al. 1999; Halfpenny et al. 2001).

Oxidierter regenerierter Zellulose

Bei kapillären, venösen und kleinen arteriellen Blutungen existiert auch die Möglichkeit der Anwendung von oxidierter regenerierter Zellulose (z. B. Tabotamp®).

Nach Applikation auf die Wundfläche (z. B. in eine Extraktionsalveole) füllt sich das Zellulosevlies mit Blut. Nach Sättigung quillt es zu einer bräunlichen bis schwarzen geleeartigen Masse auf und fördert so die Gerinnelbildung und die Stabilisierung des sich bildenden Blutkoagels (Gebrauchsinformation des Herstellers von Tabotamp (Johnson & Johnson), Stand Juni 2005). Für diesen Effekt ist die Polyanhydroglucuronsäure verantwortlich, die bei der Zelluloseoxidation entsteht (Köhnlein und Mergard 1972; Heinrich 1990). Zur Prävention postoperativer Blutungen nach zahnärztlich-chirurgischen Eingriffen stellte sich die Applikation von oxidierter Zellulose auch bei Patienten unter therapeutischer Antikoagulation als geeignet heraus (Ghahremani et al. 1992; Halfpenny et al. 2001).

Kollagene

Kollagene Hämostyptika sind in Form von Vliesen (z. B. TissuFleece E), Kegeln (z. B. TissuCone E) und Schwämmen (z. B. Kollagen-resorb®, Hemocol®) erhältlich. Sie werden auf die weitgehend gereinigte Wundfläche aufgebracht und leicht ange-drückt. Bei Risikopatienten kann die Versorgung von Extraktionswunden durch das Einbringen von Kollagenen zusätzlich unterstützt werden (Joos und Krekeler 1978; Berchtenbreiter et al. 1997).

Die starke hämostyptische Wirkung nativer Kollagenfibrillen ist schon lange bekannt und spielt in vivo bei der Hämostase eine außerordentlich wichtige Rolle. Der Wirkmechanismus kollagener Hämostyptika scheint daher offensichtlich: Neben Laminin- und Fibronectinrezeptoren existieren auf der Thrombozytenmembran eine hohe Anzahl von Kollagenrezeptoren (Nievalstein et al. 1988; Hindriks et al. 1992; Farndale et al. 2003). Wie bereits erwähnt, werden diese in vivo durch den Kontakt mit subendothelial gelegenen Kollagenfibrillen aktiviert. Hierbei sind Glykoprotein IV und VI neben Glykoprotein Ia-IIa wesentlich an der Plättchenadhäsion beteiligt (Farndale et al. 2003; Jackson et al. 2003). Kollagene Hämostyptika sollen diesen Mechanismus aktivieren und die Blutgerinnung über die Aktivierung der Kollagenrezeptoren unterstützen.



Abb. 2a



Abb. 2b

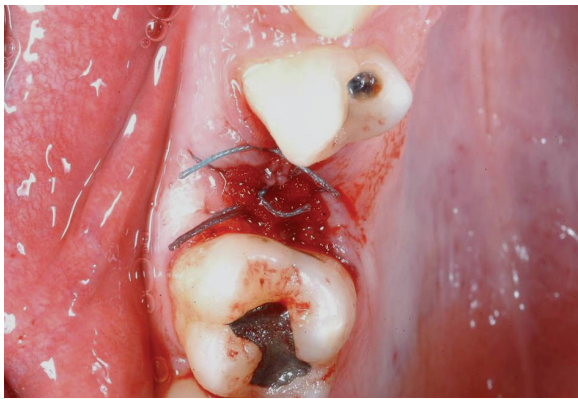


Abb. 2c



Abb. 2d

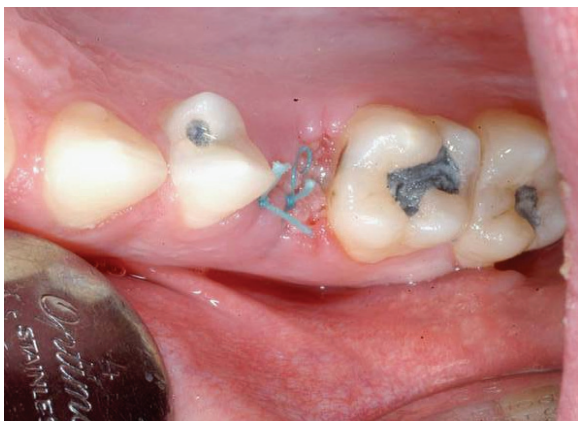


Abb. 2e



Abb. 2f

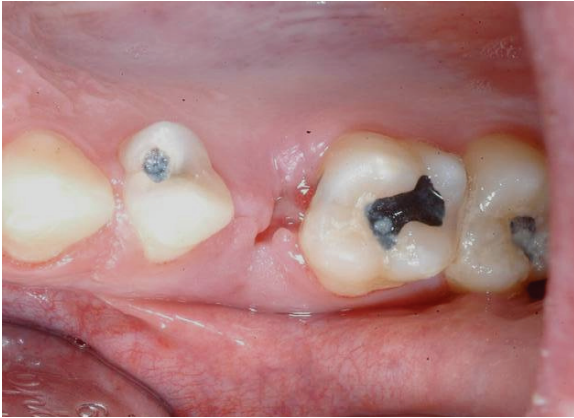


Abb. 2g



Abb. 2h

Abb. 2 a-h: Versorgung einer frischen Extraktionsalveole bei einem gerinnungskompromittierten Patienten

In Abb. 2 a-h ist ein Patientenfall dargestellt, bei dem auf eine Umstellung der therapeutischen Antikoagulation verzichtet wurde und stattdessen ein Kollagenschwamm zur hämostyptischen Anwendung kam. Der aufgrund massiver Karies konservativ nicht zu erhaltende Zahn 15 (Abb. 2a) wird extrahiert (Abb. 2b), woraufhin ein Kollagenschwamm in die Wunde eingelegt und mittels nicht resorbierbarer Naht (Polyester 3/0) vernäht wird (Abb. 2c, d).

Nach einer Woche Heilungsperiode ohne Blutungskomplikationen stellt sich der Patient zur Nahtentfernung vor (Abb. 2e). Nach Entfernung der Nähte zeigt sich eine in Wundheilung befindliche Alveole, weitestgehend aufgefüllt mit Granulationsgewebe (Abb. 2f). Bei einer weiteren Kontrolle nach 7 Tagen ist die Wunde bereits weiter verheilt (Abb. 2g). Die Abschlussuntersuchung 3 Wochen post extraktionem zeigt eine fast vollständig verheilte Extraktionsalveole (Abb. 2h); die Extraktionswunde wird im weiteren Verlauf noch mit keratinisierter Gingiva überzogen.

Gewebekleberbeschichtete Kollagene

Als Kombination aus Kollagenvlies und Fibrinkleber gibt es auf dem Markt gewebeleberbeschichtete Kollagenvliese (z. B. TachoSil®). Die Kollagenmatrix ist mit humanem Fibrinogen und Thrombin beschichtet. Durch den Kontakt mit der blutenden Wundfläche lösen sich die Gerinnungsfaktoren der Beschichtung ab und wie bei der Fibrinklebung wird der letzte Schritt der Gerinnungskaskade eingeleitet. Es entsteht

eine Verbindung zwischen dem Kollagenträger und der Wundoberfläche. Eine mäßige Kompression von drei bis fünf Minuten unterstützt den Klebevorgang (Gebrauchsinformation des Herstellers von TachoSil® (Nycomed Pharma GmbH), Stand Februar 2006). Kollagenvliesgebundener Fibrinkleber erwies sich gerade bei diffusen Blutungen aus kombinierten Knochen-Weichteilwunden als eine suffiziente lokalhämostyptische Maßnahme bei blutungsgefährdeten Patienten (Scheer et al. 2004).

1.4 Problemstellung und Ziel der Arbeit

Die Verwendung von Kollagenen zur blutstillenden Versorgung frischer Wunden wurde bereits vielfach untersucht. Sie haben sich als sinnvolles Werkzeug zur Blutungsprophylaxe und -therapie erwiesen.

Das Problem der im Handel erhältlichen nativen Kollagenvliese und -schwämme ist in der Zahnmedizin jedoch ihre eingeschränkte Dimensionsstabilität. Kollagenschwämme und -vliese sind sehr weich, verlieren nach Kontakt mit Flüssigkeit (wie auch Blut) ihre ursprüngliche Form und bekommen eine eher gelartige Konsistenz. Dies ist in der Abdominal- und Thoraxchirurgie für die Abdeckung größerer Wundflächen solider Gewebe (z. B. bei Leber-, Lungenteilresektionen) sehr wünschenswert und sinnvoll. In der Zahnmedizin geht hierdurch jedoch die Möglichkeit einer materialunterstützten Druckkompression verloren, welche die Blutgerinnung weiter begünstigen würde. So untersuchten Dehen und Mitarbeiter den Heilungsverlauf nach operativer Weisheitszahnentfernung mit und ohne Einlage eines Kollagenvlieslyophilisats. Hierbei konnte eine erhöhte Komplikationsrate in der Kollagenvlies-Gruppe festgestellt werden. Die Autoren führten dies auf die nicht ausreichend stabile Kollagenmatrix zurück (Dehen et al. 1989).

Wie in anderen Studien nachgewiesen werden konnte, führt eine chemische Quervernetzung von Kollagenfibrillen zu einer Stabilisierung des Kollagengerüsts und geht mit einem verzögerten Abbau der Matrix nach Implantation einher (Rothamel et al. 2005). Dieses Verfahren könnte einen sinnvollen Ansatz zur Stabilisierung kollagener Hämostyptika darstellen und einen positiven Effekt auf die klinische Anwendung von Kollagenen haben.

Ziel dieser Untersuchung ist es, die Thrombozytenaggregation an zwei kommerziell erhältlichen sowie einem experimentell quervernetzten kollagenen Schwamm in vitro mithilfe einer eigens hierfür entwickelten Blutdurchflusskammer zu testen. Hierbei ist

neben allgemeinen Thrombozytenreaktionen vor allem von Interesse, ob die Aufbereitung von tierischem nativem Kollagen und/oder eine weitergehende Matrixstabilisierung durch chemische Quervernetzung der Kollagenfibrillen eine Aktivierung des Kollagenrezeptors beeinträchtigt und somit die thrombogenen Eigenschaften des Kollagens negativ beeinflusst.

2 Material und Methoden

Aufgeteilt ist diese Studie in drei Abschnitte. Im ersten Teil wurde die Thrombozytenadhäsion und -aggregation an zwei im Handel erhältlichen und einem neu entwickelten Kollagenschwamm in einer Blutdurchflusskammer mithilfe konfokaler Laserscanmikroskopie getestet. Im zweiten Teil erfolgte eine pH-Wert-Bestimmung der untersuchten Kollagenschwämme, um einen gegebenenfalls vorliegenden Bezug zwischen ihrem pH-Wert und den erfassten Adhäsionsphänomenen herzustellen. Im dritten Teil wurde die Oberfläche der untersuchten Materialien rasterelektronenmikroskopisch erfasst, um dem Aspekt einer morphologisch bedingten Anlagerung von Thrombozyten an den im ersten Teil untersuchten Oberflächen nachzugehen.

2.1 Verwendete Materialien

2.1.1 Getestete Materialien

Die Thrombozytenaggregation wurde an zwei kommerziell im Handel erhältlichen Kollagenvliesen

(1) Kollagen-resorb[®] (RE), Resorba Wundversorgung GmbH & Co. KG, Nürnberg;

(2) Hemocol[®] (HE), Medical Biomaterial Products GmbH, Neustadt-Glewe

und einem neu entwickelten experimentellen Kollagenschwamm

(3) Geistlich (ES), Geistlich Pharma AG, Wolhusen, Schweiz

untersucht (Tab. 2).

Gemäß den Herstellerangaben enthält RE (Abb. 3a) pro 1 cm² 2,8 mg native Kollagenfibrillen equinen Ursprungs ohne weitere Bestandteile (Gebrauchsinformation des Herstellers, Stand Januar 2002).

HE (Abb. 3b) besteht aus reinem, nativen Kollagen porcinen Ursprungs, welches aus Schweinekorium hergestellt wird (Gebrauchsinformation des Herstellers, Stand September 1999).

ES (Abb. 3c) besteht aus porcinem Kollagen Typ I und III. Es wurde eigens für diese Untersuchung von der Firma Geistlich Biomaterials, Wolhusen, Schweiz entwickelt und wird während des Herstellungsprozesses durch eine spezielle chemische Quervernetzung sekundär stabilisiert. Der Quervernetzungsmechanismus unterliegt einem Geheimhaltungsvertrag und kann daher hier nicht weiter beschrieben werden. In gleicher Weise quervernetzte Kollagenmembranen zeigten nach Implantation in Ratten einen vernetzungsgradabhängigen, deutlich verzögerten Abbau der Matrix im Vergleich zu nicht quervernetztem Kollagen (Rothamel et al. 2005).

Als Positivkontrolle (PK) diente Collagen S (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim), eine wässrige Lösung (3mg/ml, pH 3,0) mit einem Kollagengehalt von >98% (Kollagen Typ I: >95%, Kollagen Typ III: <5%, bovinen Ursprungs) (Gebrauchsinformation des Herstellers, Stand August 1999). Als Negativkontrolle (NK) fand Rinderserumalbumin (bovine serum albumin (BSA), Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) Verwendung (Tab. 2).



Abb. 3a: Kollagen-resorb® (RE), Resorba Wundversorgung GmbH & Co. KG, Nürnberg

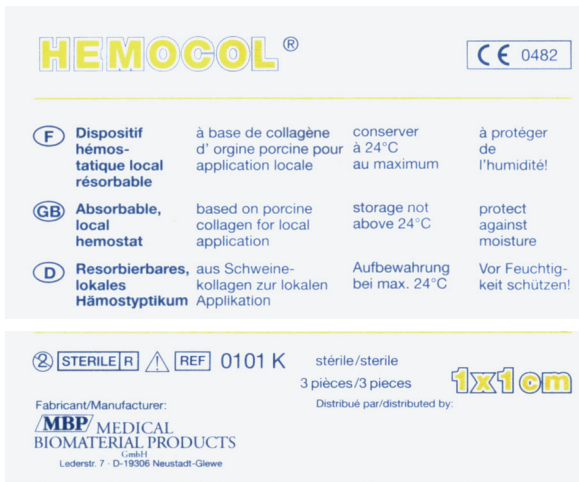


Abb. 3b: Hemocol® (HE), Medical Biomaterial Products GmbH, Neustadt-Glewe

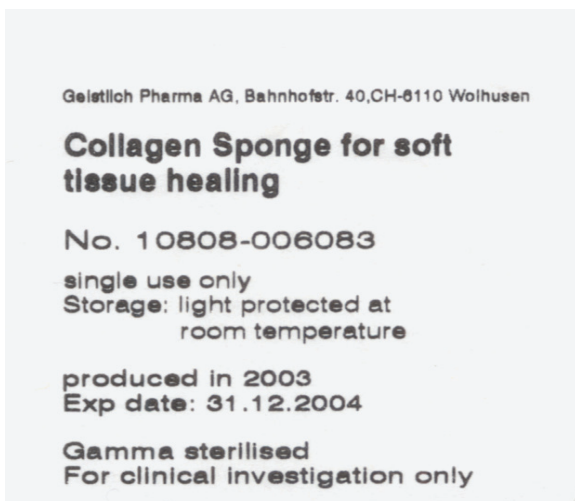


Abb. 3c: Geistlich (ES), Geistlich Pharma AG, Wolhusen, Schweiz

Tab. 2: Übersicht der getesteten Materialien

Produktname	Hersteller	Ursprungsgewebe	Quervernetzung
Kollagen-resorb [®] (RE)	Resorba Wundversorgung GmbH & Co. KG, Nürnberg	natives Kollagen equinen Ursprungs, 2,8 mg native Kollagenfibrillen pro 1 cm ²	nein
Hemocol [®] (HE)	Medical Biomaterial Products GmbH, Neustadt-Glewe	reines natives Kollagen porcinen Ursprungs (aus Schweinekorium)	nein
experimenteller Kollagenschwamm Geistlich (ES)	Geistlich Pharma AG, Wolhusen, Schweiz	Typ-I- und Typ-III-Kollagen porcinen Ursprungs	ja
Collagen S Positivkontrolle (PK)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim	bovinen Ursprungs (aus Kälberhaut) Kollagengehalt >98% Kollagen Typ I >95% Kollagen Typ III <5%	nein
Rinderserumalbumin (BSA) Negativkontrolle (NK)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim	bovinen Ursprungs (aus Rinderserum)	nein

2.1.2 Gebrauchslösungen und Chemikalien

- H-D-Phe-Pro-Arg-chloromethylketone Trifluoroacetate salt (PPACK), Bachem Biochemica GmbH, Heidelberg
- Quinacrine Dihydrochloride (Mepacrin), Fa. Sigma, Taufkirchen
- Silicone Vacuum Grease, Beckman Coulter, Krefeld
- Agarose-Gel, Sea Kem[®] LE Agarose, Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
- NaCl 0,9%, B. Braun Melsungen AG, Melsungen

2.1.3 Geräteliste

- Inkubator, Heraeus CO₂-Auto-Zero, Heraeus Kulzer GmbH & Co. KG, Hanau
- Einmalskalpelle steril, Gebrüder Martin, Tuttlingen
- Objektträger, 76 x 26 mm: 1 mm, Engelbrecht, Edermünde
- Vakuumpumpe, Laboport[®] KNF, Neuberger GmbH, Freiburg
- Perfusor[®] Secura, B. Braun, Melsungen
- Perfusor[®] Spritze 50ml, B. Braun, Melsungen
- Rolling Mixer, Sysmex RM-810, Sysmex Digitana AG, Horgen, Schweiz
- CLSM 510, Argonlaser, Carl Zeiss AG, Oberkochen
- Mikroskop, Axiovert 100M, Carl Zeiss AG, Oberkochen
- REM Zeiss DSM 950, Carl Zeiss AG, Jena
- Deckgläser 24 x 50 mm: 0,13 - 0,17 mm, Engelbrecht, Edermünde
- Mörser und Pistill
- Zentrifuge, Universal 30 RF, Andreas Hettich GmbH & Co KG, Tuttlingen
- pH-Meter, HI 9025, Hanna Instruments GmbH, Kehl am Rhein
- Becherglas, QGT, Bad Harzburg
- Blutdurchflusskammer (s. Kapitel 2.2.1.1)
- Silikonschläuche, Innendurchmesser 1 mm

2.2 Versuchsaufbau

2.2.1 Thrombozytenadhäsion

2.2.1.1 Aufbau der Kammer

Bei der verwendeten Blutdurchflusskammer (Abb. 4 a-c) handelt es sich um eine Entwicklung der Poliklinik für Zahnärztliche Chirurgie und Aufnahme der Westdeutschen Kieferklinik Düsseldorf in Verbindung mit dem Institut für Hämostaseologie und Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Düsseldorf.

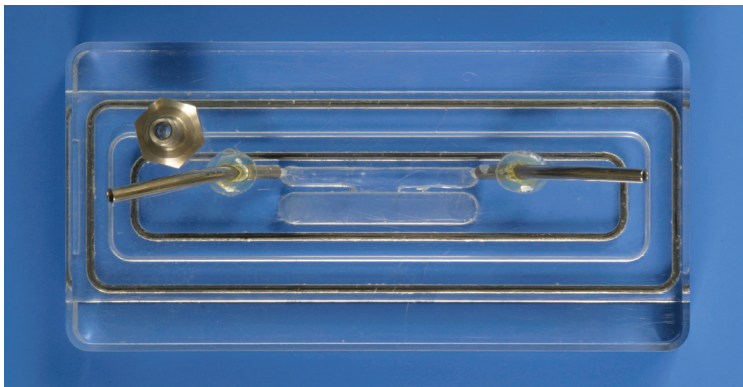


Abb. 4a: Blutdurchflusskammer, Ansicht von oben

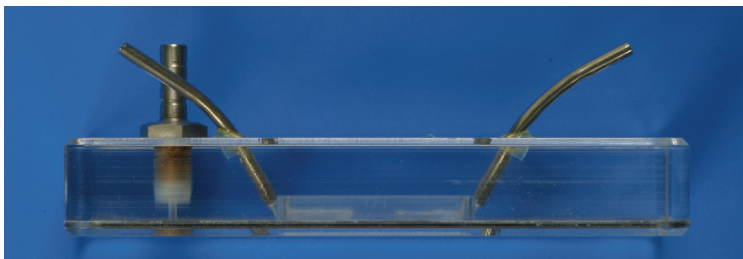


Abb. 4b: Blutdurchflusskammer, Ansicht von vorne



Abb. 4c: Blutdurchflusskammer, Ansicht von unten

Die Konstruktion der Blutdurchflusskammer erlaubt die Beurteilung von Thrombozytenadhäsions- und Aggregationsvorgängen an Oberflächen und wird in unserem Fall zur Testung von Schwämmen verwendet. Sie enthält ein 4 x 5 x 25 mm großes Behältnis zur Aufnahme des Prüfkörpers. Dieser steht durch ein 10 mm² großes Fenster mit dem eingefrästen Strömungskanal in Verbindung (Abb. 5a).

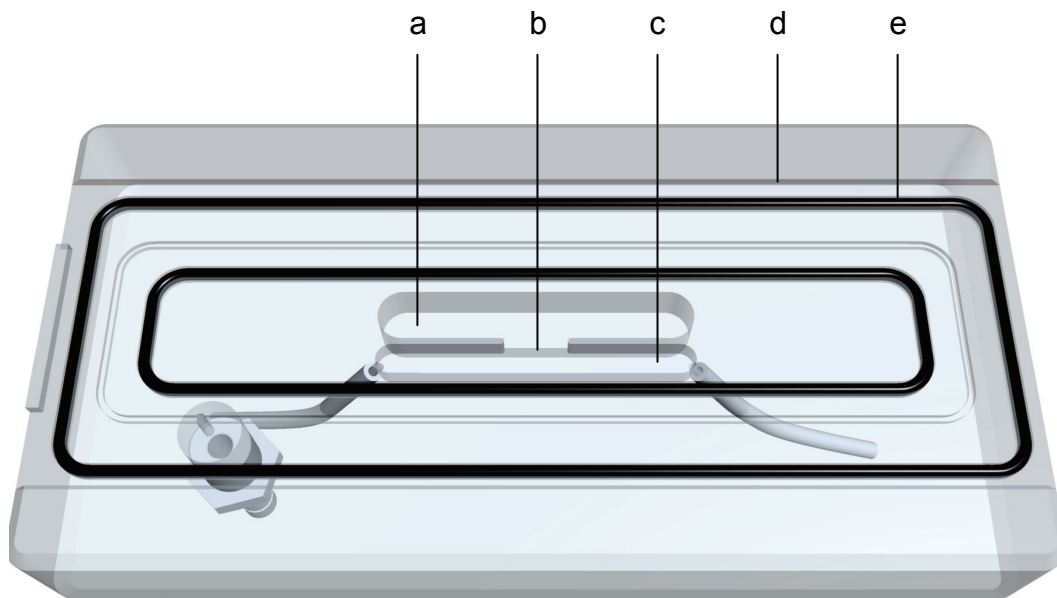


Abb. 5a: Rückseite der Blutdurchflusskammer mit Behältnis zur Aufnahme des Prüfkörpers (a), Verbindungsfenster (b), Strömungskanal (c), Führungsstegen (d) und Dichtungsringen (e)

Blutzufluss und Blutabfluss erfolgen an den jeweiligen Enden des Strömungskanals durch fest in die Strömungskammer integrierte Metallröhrchen (Abb. 5b). Die Kammer weist auf der Vorderseite einen Anschluss auf, der während der Versuche über einen Schlauch an eine Vakuumpumpe (Laboport[®] KNF, Neuberger GmbH, Freiburg) angeschlossen ist (Abb. 5b).

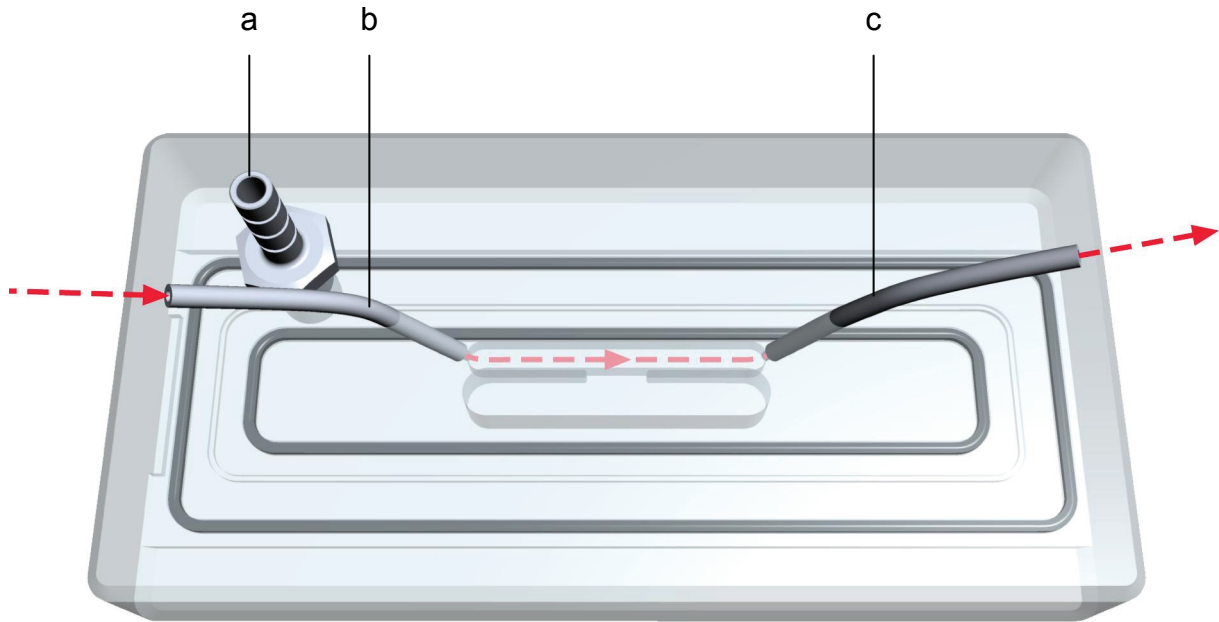


Abb. 5b: Vorderseite der Blutdurchflusskammer mit Vakuumschluss (a), Metallröhrchen für Blutzufuhr (b) und Blutabfluss (c)

Auf der Rückseite der Kammer befinden sich zwei Führungsstege, zwischen die ein Objektträger (76 x 26 mm: 1 mm, Fa. Engelbrecht) eingeschoben werden kann. Zum luftdichten Verschluss wird ein Vakuum zwischen der Kammer und dem Objektträger erzeugt. Als Dichtung zwischen den aufeinander liegenden Flächen sind in die Rückfläche der Kammer zwei Gummiringe eingelassen (Abb. 5a), die vor Versuchsdurchführung zur besseren Abdichtung mit Silicone Vacuum Grease beschichtet werden.

Die Blutzufuhr erfolgt über eine 50 ml Perfusor[®]-Spritze, die über einen Silikon-schlauch mit einem Innendurchmesser von 1 mm mit dem Zufluss der Kammer verbunden wird. Die benötigte Strömungsgeschwindigkeit wird hierfür in ml/min über einen handelsüblichen Perfusor[®] eingestellt. Am Abfluss der Kammer wird das Blut über einen ableitenden Silikon-schlauch in einem Becherglas aufgefangen und verworfen.

2.2.1.2 Blutvorbereitung durch Immunfluoreszenzmarkierung und Hemmung der plasmatischen Gerinnung

Alle Blutproben stammten von einem gesunden Spender mit normalen Gerinnungsparametern unter regelmäßiger laborchemischer Kontrolle der Blutwerte über die gesamte Studiendauer. Die Markierung der im verwendeten Vollblut enthaltenen Thrombozyten erfolgte durch Anfärbung mit 10 μM Mepacrin (Fa. Sigma, Taufkirchen, Absorptionsmaxima bei Wellenlängen von 350 nm und 420 nm). Mepacrin reichert sich in der alpha-Granula der Plättchen an. Es hat in der verwendeten Konzentration keinen Einfluss auf die Thrombozytenfunktion (Dise et al. 1982) und beeinträchtigt somit auch nicht die Thrombozytenadhäsion (Savage et al. 1996). Die plasmatische Gerinnung wurde durch 40 μM PPACK gehemmt. PPACK inhibiert die Thrombinaktivierung (Savage et al. 1999). Sowohl Mepacrin als auch PPACK wurden unmittelbar vor Beginn der Blutabnahme in die dafür vorgesehene Spritze gegeben. Nach 60-minütiger Inkubation auf einem Rolling-Mixer wurde das Blut durch den Silikonschlauch der Blutkammer zugeleitet.

2.2.1.3 Prinzip CLSM

Zur Beobachtung der markierten Thrombozyten diente ein konfokales Laserscannmikroskop (CLSM, Zeiss LSM 510, Carl Zeiss, Oberkochen).

Konfokale Laserscannmikroskope verfügen im Gegensatz zu Durch- und Auflichtmikroskopen über die Möglichkeit, dreidimensionale Strukturen auch in der z- Achse mit hoher Auflösung zu vermessen. Das zu untersuchende Material wird hierfür immunfluoreszent markiert und mit einem Laserstrahl zur Emission angeregt. Zeitgleich wird das vom Präparat zurückkommende Fluoreszenzsignal schichtabhängig mit einem Objektiv gesammelt und über eine Lochblende auf das Detektionssystem, einen Photomultiplier (PMT), fokussiert (Gebrauchsinformation Zeiss, LSM 510).

2.2.1.4 Datenerhebung

Zur Durchführung unseres Experimentes wurde die Durchflussskammer auf dem Fein-fokussiertisch des Mikroskops (Axiovert 100M) fixiert, ein 10er Objektiv ausgewählt und die Einstellung der Focusebene unter Durchlicht-Einstellung des Mikroskops vorgenommen. Die Lochblende und die Verstärkung des Photomultipliers wurden in Voruntersuchungen für die einzelnen Proben individuell bestimmt (Tab. 3). Hierdurch wurde eine Beeinflussung der Messwerte durch die unterschiedliche Eigenfluoreszenz der Materialien minimiert.

Tab. 3: Lochblende und Verstärkung des Photomultipliers (PMT) der einzelnen Messungen

	Resorba (RE)	Hemocol (HE)	Geistlich (ES)	Positivkontr. (PK)	Negativkontr. (NK)
Lochblende	1000	1000	1000	1000	1000
Verstärkung des PMT	800	800	750	800	800

Im Rahmen der Voruntersuchungen stellte sich außerdem heraus, dass sich der Schwammbereich, welcher sich bis zu 250 µm unter dem Deckglas befindet, für die durchzuführenden Experimente am besten eignet. Bei tiefer gelegenen Schichten zeigten sich nur sehr schwache Fluoreszenzsignale bedingt durch die Schichtdicke des Blutstroms. Dementsprechend erfolgte die Datenerhebung bis zu einer Tiefe von 250 µm.

Für die Versuche wurden HE, ES und RE unter Zuhilfenahme eines Skalpells dem Schwammbehältnis angepasst. Die Schwammsegmente (4 x 5 x 18 mm) wurden in die Strömungskammer eingebracht und an der dem Blut zugewandten Seite auf einer Fläche von 10 mm² der Blutströmung ausgesetzt (Abb. 6).

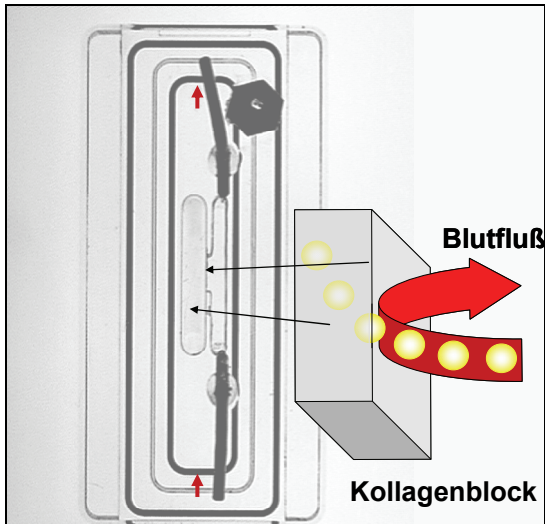


Abb. 6: Prinzipdarstellung Blutexposition: Das antikoagulierte Blut wird tangential an der Schwammoberfläche vorbeigeleitet, so dass die enthaltenen Thrombozyten mit der Kollagenoberfläche in Kontakt treten können.

Die Schwämme wurden so platziert, dass die gefällte Seite zum Strömungskanal zeigte. Auf der Makroaufnahme (Abb. 7) lässt sich die gefällte Seite erkennen. Es zeigt sich bereits hier ein Unterschied hinsichtlich der Oberflächenstruktur.



Abb. 7: Makrostruktur der drei Schwämme im Vergleich: Geistlich, Hemocol®, Kollagen-resorb® (v.l.n.r.). Die hier dargestellten Proben sind 9 x 9 x 3 mm groß. Die gefällte Seite weist nach oben.

Das Schwammbehältnis und der Teil der Schwämme, der nicht mit dem Strömungskanal in Kontakt stand, wurde mit Agarosegel (Sea Kem® LE Agarose, Cambrex) gegen die Kammerumgebung abgedichtet. Hierdurch wurde u. a. die für die

Untersuchung unbedingt notwendige Ortsstabilität der zu untersuchenden Oberfläche gewährleistet.

Die für die Kontrollgruppen mit Hilfe eines Diamantaufsatzes auf 4 x 10 mm zurechtgeschnittenen Deckgläser wurden mit jeweils 10 µl wässriger Lösung der Positivkontrolle Collagen S (3 mg/ml) und der Negativkontrolle BSA (40%-ige Stammlösung) beschichtet und für die Dauer von 60 Minuten im Inkubator bei 37 °C luftgetrocknet. Als Platzhalter diente auch hier ein hinter die Glasplatte auf der blutabgewandten Seite eingefülltes Agarose-Gel.

Das zur Markierung der Thrombozyten verwendete Mepacrin wurde durch Stimulation mit einem Argon-Laser (Wellenlänge 458 nm) zur Lichtemission angeregt. Die Transmission betrug für alle Aufnahmen 100%. Um eine alveoläre Sickerblutung zu simulieren, wurde die Strömungsgeschwindigkeit für alle Versuche auf 40 ml/h festgesetzt. Die Aufnahmen wurden mit einer Datentiefe von 12 bit erstellt. Alle Versuche fanden im zehnfachen Ansatz (N=10) statt.

Zur Auswertung der Adhäsions- bzw. Aggregationsvorgänge erfolgte die Messung der Fluoreszenzzunahme auf der Probenoberfläche über die Zeit (0, 60, 120, 180 s). Für jeden Zeitpunkt wurde ein Bildstapel aufgenommen, bestehend aus 10 - 20 direkt hintereinander aufgenommenen Frames (digitale Bilder). Die Schichtdicke betrug jeweils 10 µm. Die erste Messung diente der Erfassung der Materialeigenfluoreszenz (erster Bildstapel). Die Aufnahme des zweiten Bildstapels erfolgte nach 60 s Blutkontakt. Diese Vorlaufzeit diente dazu, die gewünschte Strömungsgeschwindigkeit zu erreichen und unerwünschte Luftblasen im Strömungskanal zu beseitigen. In einem Abstand von 60 s zur jeweils vorherigen Bildsequenz erfolgte dann die Aufnahme des dritten und vierten Bildstapels.

2.2.1.5 Statistische Datenanalyse

Zur statistischen Auswertung wurden die Bildsequenzen mittels des Bildverarbeitungsprogramms des LSM 510 (Release 2.8 Service Pack 1) und ImageJ (Version 1.30v, Wayne Rasband am Massachusetts Institute of Technology (MIT), W. Rasband: ImageJ-Webseite: <http://rsb.info.nih.gov/ij>) verrechnet.

Die Datenauswertung wurde für jeden Versuch in folgender Reihenfolge durchgeführt:

Zunächst erfolgte die Bildverarbeitung mittels der Software des LSM 510. Es wurde ein scharf fokussierter Bildausschnitt ausgewählt, der sowohl einen Teil des Testkörpers als auch den unmittelbar angrenzenden Blutfluss zeigte. Dieser Ausschnitt blieb für die Berechnung aller weiteren Bildstapel konstant. Jeder Bildstapel wurde dann zu einem Frame verrechnet, so dass für jeden Zeitpunkt (0, 60, 120, 180 s) ein Gesamtbild resultierte.

Die Bilder wurden in ImageJ importiert und mittels der logischen Und-Verknüpfung sowie digitaler Bildsubtraktion grafisch verrechnet. Die Und-Funktion berechnet die grafische Schnittmenge zweier Bilder. Auf dem resultierenden Bild werden nur diejenigen Inhalte dargestellt, die auf beiden Bildern an gleicher Stelle vorhanden sind. In unserem Fall wurden hierdurch die statischen Bildelemente beibehalten (Materialeigenfluoreszenz sowie angelagerte Thrombozyten) und die bewegten Anteile (noch im Blutstrom befindliche, nicht adhärenente Thrombozyten) entfernt. Die digitale Bildsubtraktion hingegen berechnet die Unterschiede zweier Bilder. Auf dem resultierenden Bild werden diejenigen Bildanteile angezeigt, in denen sich die beiden Bilder unterscheiden (entsprechend dem neu hinzugekommenen Thrombusanteil).

In unserem Fall wurde die grafische Schnittmenge der Bilder der Zeitpunkte 60 s und 120 s (Abb. 8a, statische Fluoreszenz zum Zeitpunkt 60 s) sowie 120 s und 180 s (Abb. 8b, statische Fluoreszenz zum Zeitpunkt 120 s) berechnet. Auf diese Weise wurden die nicht-adhärenenten Thrombozyten der Bilder nach 60 s und 120 s eliminiert. Das Bild zum Zeitpunkt 0 s stellt ausschließlich die Eigenfluoreszenz des Schwammes dar und wurde mittels digitaler Bildsubtraktion von den jeweiligen Schnittmengen abgezogen, um die reine Zunahme der Fluoreszenz zu zeigen und somit sich anlagernde und damit ortsständige Thrombozyten zu erfassen.

Die beiden resultierenden Bilder entsprechen demnach den Fluoreszenzzunahmen zu den Zeitpunkten 60 s sowie 120 s. Durch digitale Subtraktion der Schnittmengenbilder wurde dann die Zunahme der adhärenenten Anteile ersichtlich, welche dem Anteil neu abgelagerter Thrombozyten im Zeitraum 60 s – 120 s entspricht (Abb. 8c). Zuletzt wurde der geschwärzte Anteil des Subtraktionsbildes (Abb. 8c) bezogen auf die Gesamtfläche metrisch vermessen und in numerische Werte umgerechnet. Der

Quotient - entsprechend der „Fluoreszenzzunahme pro Fläche über die Zeit“ - wurde statistisch analysiert.

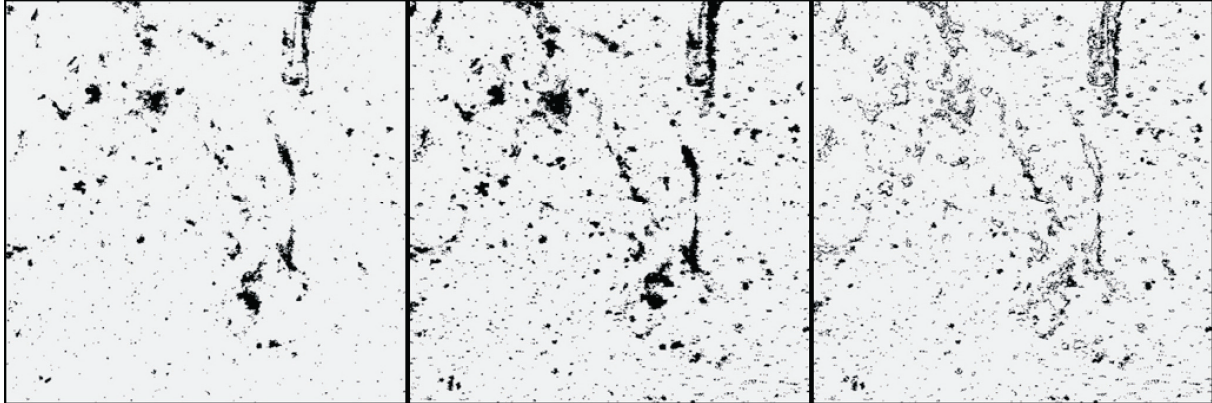


Abb. 8a

Abb. 8b

Abb. 8c

Abb. 8 a-c: Zunahme der Fluoreszenzeinheiten auf der Schwammoberfläche. Die Erfassung sich anlagernder und damit ortsständiger Thrombozyten ergibt sich durch digitale Bearbeitung der Aufnahmen. 8a) Schnittmenge von 60s und 120s. 8b) Schnittmenge von 120s und 180s. 8c) Differenz der Schnittmengen: Fluoreszenzzunahme nach 60s.

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Statistikprogramm SPSS (SPSS 11.0, SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA). Nach Überprüfung der Normalverteilung mittels Kolmogorov-Smirnov Anpassungstest kam eine testungskorrigierte Varianzanalyse (ANOVA mit Bonferroni-Korrektur) zur Anwendung. Das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0,05$ festgelegt.

2.2.2 pH-Wert-Bestimmung

Um einen möglichen Bezug zwischen den pH-Werten der Schwämme und den erfassten Adhäsionsphänomenen herzustellen, erfolgte eine pH-Wert-Bestimmung der untersuchten Kollagenschwämme nach Inkubation mit NaCl und Humanserum.

2.2.2.1 pH-Wert-Bestimmung der Versuchsschwämme

Zur Überprüfung einer eventuell vorliegenden Schwammeigenacidität wurden im dreifachen Ansatz jeweils 50 mg einer jeden Probe (RE, HE, ES) mit flüssigem Stickstoff gehärtet und anschließend mit Hilfe von Mörser und Pistill zerkleinert. Die Proben wurden in 2,5 ml isotonischer Kochsalzlösung für drei, dreißig und sechzig Minuten inkubiert und anschließend der pH-Wert mittels pH-Meter (Hanna HI 9025) bestimmt. Als Kontrolle diente isotonische Kochsalzlösung ohne Schwammexposition.

2.2.2.2 Testung der Pufferfunktion des Serums

In einem weiteren Ansatz wurden jeweils 50 mg einer jeden Probe (RE, HE, ES) mittels flüssigem Stickstoff gehärtet und anschließend mit Hilfe von Mörser und Pistill zerkleinert. Zur Gewinnung des Serums (PPP, plättchenarmes Plasma) wurde das Versuchsblut des gleichen Spenders der CLSM-Untersuchungen für 15 min bei 3900 rpm zentrifugiert (Zentrifuge, Hettich Universal 30 RF). Im dreifachen Ansatz wurden die Proben nach drei, dreißig und sechzig-minütiger Inkubation mit 2,5 ml Humanserum mittels pH-Meter auf Überschreiten der Pufferkapazität überprüft. Als Kontrolle diente Humanserum des gleichen Spenders ohne Schwammexposition.

2.2.3 Rasterelektronenmikroskopische Untersuchung

Zur Beurteilung der Oberflächenmorphologie wurden alle Schwämme sowie die Positivkontrolle im Rasterelektronenmikroskop (REM Zeiss DSM 950) betrachtet. Eine Darstellung der Thrombozyten auf der Schwammoberfläche nach Versuchsdurchführung war nicht möglich, da die Schwämme RE und HE durch den Kontakt mit Flüssigkeiten (und so auch nach dem Kontakt mit für die Probentrocknung notwendigem Aceton) ihre Stabilität und somit auch ihre Oberflächenbeschaffenheit verlieren.

2.2.3.1 Prinzip REM

Im Hochvakuum werden freie Elektronen durch Glühemission erzeugt, beschleunigt und in einem Kondensator zu einem Elektronenstrahl gebündelt. Das REM tastet die Objektoberfläche mit dem feinen Elektronenstrahl zeilenweise ab. Wegen des

geringen Öffnungswinkels des Elektronenstrahls bekommen die Bilder eine große Tiefenschärfe. Die auftreffenden Elektronen bewirken die Emission von Sekundärelektronen aus der Probenoberfläche oder werden von der Objektoberfläche gestreut. Die auf den Detektor treffenden Elektronen werden durch ein elektrisches Feld beschleunigt und im Photomultiplier zu einem sehr plastischen Bild verrechnet (Pschyrembel 2002).

2.2.3.2 Präparation der Untersuchungsobjekte

Die rasterelektronenmikroskopische Beurteilung der Oberflächenmorphologie erfolgte mit dem REM Zeiss DSM 950 unter der Vergrößerungsstufe 100.

Die Schwämme wurden zurechtgeschnitten und auf jeweils einem Objektträger aufgebracht. Die Positivkontrolle Collagen S wurde zuvor auf einem Objektträger ausgefällt. Anschließend wurden die Proben mit Gold in einer Schichtdicke von 30 nm besputtert und unter Vakuum im REM betrachtet.

3 Ergebnisse

3.1 Thrombozytenadhäsion

Die untersuchten Kollagenschwämme Kollagen-resorb[®], Hemocol[®] und der experimentelle Schwamm Geistlich ließen in den Flusskammerversuchen eine vergleichbare Fluoreszenzzunahme pro mm² Probenoberfläche erkennen (RE 74±101; HE 81±32; ES 85±75 Fluoreszenzeinheiten pro 10⁵ µm²), die sich nicht signifikant von der Positivkontrolle (PK 95±16) unterschied (p>0,05, ANOVA; Abb. 9, Tab. 4). Die Negativkontrolle zeigte keine Zunahme der Fluoreszenzeinheiten (NK 0±2) und war dementsprechend signifikant unterschiedlich zu allen anderen Gruppen (p<0,05, ANOVA; Tab. 5).

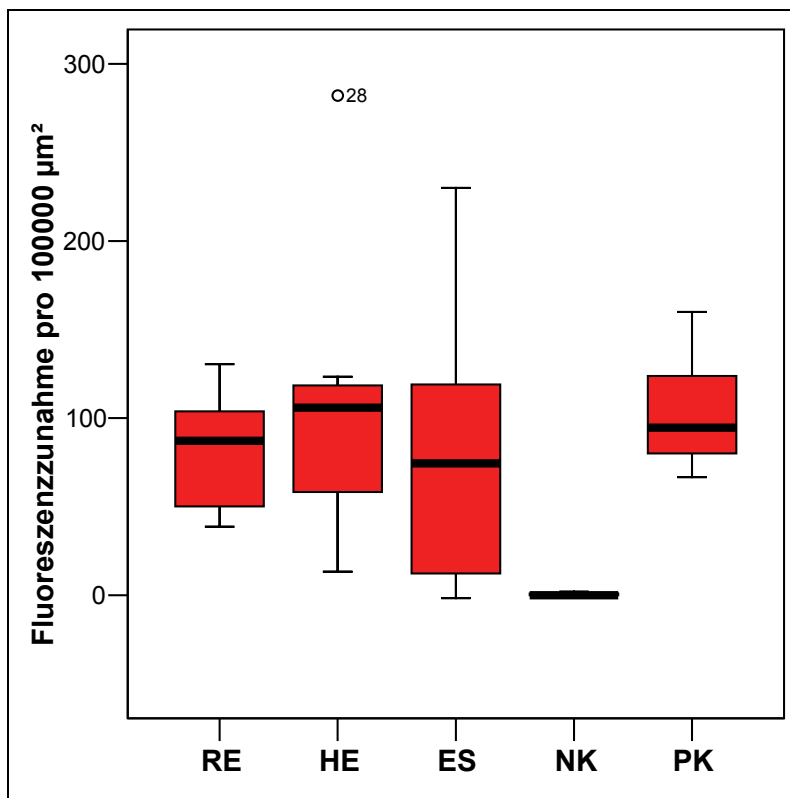


Abb. 9: Boxplots der Fluoreszenzzunahme pro Fläche nach 60 s Blutströmung; Darstellung der Mediane und 25%-Quartile. Ordinate: Fluoreszenzzunahme pro Fläche (100000 µm²), Abszisse: Probenbezeichnung.

Tab. 4: Deskriptive Statistik der Fluoreszenzzunahme pro $10^5 \mu\text{m}^2$

	N	Minimum	Maximum	Mittelwert	Standard- abweichung
RE	10	72,71	130,48	74,46	101,47
HE	10	13,31	283,13	81,15	32,19
ES	10	2,75	229,97	85,37	75,49
NK	10	-1,00	2,31	0,21	1,57
PK	10	73,80	152,62	95,12	15,78

Tab.5: Induktive Statistik: ONEWAY ANOVA mit Bonferroni-Korrektur

Abhängige Variable: Fluoreszenzzunahme pro 100000 μm^2 ,

Signifikanzen in **Fett**druck

Präpa- rat (I)	Präpa- rat (J)	Mittlere Differenz (I-J)	Standard- fehler	Signifi- kanz	95%-Konfidenzintervall	
					Unter- grenze	Ober- grenze
RE	HE	1,04179	27,61926	1,000	-81,2717	83,3553
	ES	3,26094	26,38613	1,000	-75,3774	81,8993
	NK	115,14513(*)	34,09395	,017	13,5352	216,7551
	PK	-50,13981	34,09395	1,000	-151,7498	51,4701
HE	RE	-1,04179	27,61926	1,000	-83,3553	81,2717
	ES	2,21915	27,06571	1,000	-78,4446	82,8829
	NK	114,10334(*)	34,62257	,021	10,9179	217,2887
	PK	-51,18160	34,62257	1,000	-154,3670	52,0038
ES	RE	-3,26094	26,38613	1,000	-81,8993	75,3774
	HE	-2,21915	27,06571	1,000	-82,8829	78,4446
	NK	111,88419(*)	33,64709	,020	11,6060	212,1624
	PK	-53,40075	33,64709	1,000	-153,6789	46,8774
NK	RE	-115,14513(*)	34,09395	,017	-216,7551	-13,5352
	HE	-114,10334(*)	34,62257	,021	-217,2887	-10,9179
	ES	-111,88419(*)	33,64709	,020	-212,1624	-11,6060
	PK	-165,28494(*)	39,97870	,002	-284,4332	-46,1367
PK	RE	50,13981	34,09395	1,000	-51,4701	151,7498
	HE	51,18160	34,62257	1,000	-52,0038	154,3670
	ES	53,40075	33,64709	1,000	-46,8774	153,6789
	NK	165,28494(*)	39,97870	,002	46,1367	284,4332

* Die mittlere Differenz ist auf der Stufe .05 signifikant.

3.1.1 Physikalische Stabilität der Schwämme während der Versuche

Bei allen Schwämmen waren starke intraindividuelle Schwankungen zu beobachten. Bei HE zeigte sich, dass er bei Aufnahme von Flüssigkeit in sich zusammenfällt. Er wies keine Formstabilität auf. Auch RE zeigte unmittelbar nach Blutkontakt keine Formstabilität. Er unterlag nach Kontakt mit Blut einer deutlichen Schrumpfung. Nur der quervernetzte Kollagenschwamm Geistlich verhielt sich wie ein tatsächlicher Schwamm. Nach Kontakt mit Blut aus dem Strömungskanal sog er sich mit Blut voll und blieb über den gesamten Untersuchungszeitraum formstabil.

3.2 pH-Wert-Bestimmung

3.2.1 pH-Wert-Bestimmung der Versuchsschwämme

Bei der Bestimmung der pH-Werte ließ sich eine deutliche Azidität bei allen verwendeten Materialien nachweisen. So zeigten die mit isotonischer Kochsalzlösung inkubierten Proben nach drei Minuten folgende mittlere pH-Werte: HE 3,21, ES 3,61 und RE 5,82. Die Kontrolle wies einen mittleren pH-Wert von 6,41 auf. Bei HE und ES war nach Inkubation mit NaCl über die Zeit ein Abfall des pH-Wertes zu vermerken (Tab. 6).

3.2.2 Testung der Pufferfunktion des Serums

Die mit Humanserum inkubierten Proben zeigten nach drei Minuten mittlere pH-Werte von 7,21 bei HE, 7,26 bei ES und 7,73 bei RE. Die Kontrolle wies einen pH-Wert von 7,71 auf. Bei RE, HE und ES war nach Inkubation mit Humanserum über die Zeit eine Zunahme des pH-Wertes zu vermerken (Tab. 6).

Tab. 6: Mittlere pH-Werte nach Inkubation mit isotonischer Kochsalzlösung und Humanserum.

	Zeit (min)	RE	HE	ES	Kontrolle
pH NaCl	3	5,82	3,21	3,61	6,41
	30	5,88	3,06	3,46	6,33
	60	5,87	3,08	3,43	6,42
pH Serum	3	7,73	7,21	7,26	7,71
	30	7,79	7,33	7,42	7,72
	60	7,82	7,40	7,64	7,81

3.3 Ergebnisse der rasterelektronenmikroskopischen Auswertung

Die Betrachtung der Oberflächen im Rasterelektronenmikroskop zeigte ein fein strukturiertes dreidimensionales Netzwerk bei allen Schwämmen, welches vor allem bei RE und ES sehr offenporig erschien. Das Kollagen der Positivkontrolle war weitestgehend zweidimensional-kristallin auf der Glasoberfläche ausgefällt. Die Schwämme zeigten eine deutlich größere Oberfläche als das ausgefällte Kollagen der PK (Abb. 10 a-d).

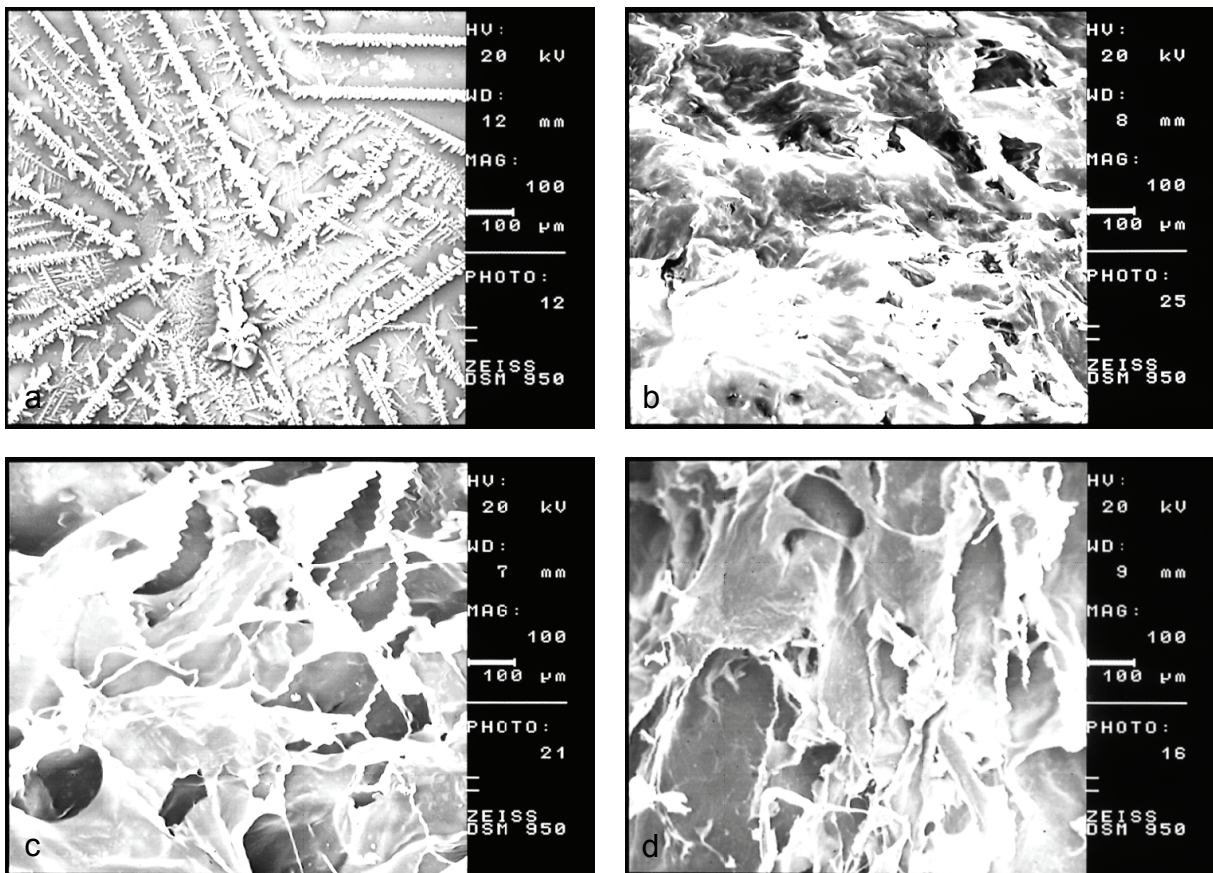


Abb. 10 a-d: Rasterelektronenmikroskopische Beurteilung der Probenoberfläche. Das Kollagen der Positivkontrolle (a) ist zweidimensional-kristallin auf der Glasoberfläche ausgefällt, während HE (b), RE (c) und ES (d) eine ihrer Schwammmorphologie entsprechende mikrostrukturierte, dreidimensionale Oberfläche mit deutlichen Hohlräumen zeigen. Vergr.100:1

4 Diskussion

In einer aktuellen Stellungnahme der DGZMK über zahnärztlich-chirurgische Eingriffe bei Patienten unter Antikoagulantientherapie wird darauf hingewiesen, dass die Verwendung von lokal anwendbaren Hämostyptika gegenüber einer Umstellung von allgemeinmedizinisch notwendigen Antikoagulantientherapien der Vorzug gegeben werden sollte (Schmelzeisen 2002). In Anlehnung daran beschäftigen wir uns in unserer Klinik seit einiger Zeit mit der Entwicklung neuer, dimensionsstabiler Kollagene, die unter anderem für die Stabilisierung eines Blutkoagulums nach einer Extraktion verwendet werden sollen.

Die für die primäre Hämostase wichtigen Eigenschaften des perivaskulären Kollagens versucht man seit Jahren auf kommerziell hergestellte Kollagenpräparate (z. B. Vliese, Schwämme), die als Hämostyptika Verwendung finden, zu übertragen. Von besonderem klinischem Interesse ist, ob die experimentell und klinisch beobachtbare blutstillende Wirkung der kollagenen Hämostyptika auf die bekannte, spezifische thrombozytenaktivierende Wirkung des fibrillären nativen Kollagens zurückzuführen ist. Aus diesem Grunde wurde in Zusammenarbeit mit dem Institut für Hämostaseologie eine Blutkammer entwickelt, in der *in vitro* adhärierende Thrombozyten an Oberflächen untersucht werden können.

In der vorliegenden Studie wurde die Thrombozytenadhäsion an zwei im Handel erhältlichen (Kollagen-resorb[®] [RE], Kollagen equinen Ursprungs; Hemocol[®] [HE], Kollagen porcinen Ursprungs) und einem neu entwickelten Kollagenschwamm (experimenteller Schwamm Geistlich [ES], quervernetztes Typ-I- und Typ-III-Kollagen porcinen Ursprungs) mithilfe konfokaler Laserscanmikroskopie in einer Blutdurchflusskammer erfasst. Als Positivkontrolle diente eine mit Collagen S und als Negativkontrolle eine mit Rinderserumalbumin (BSA) beschichtete Glasplatte. Die Oberflächenmorphologie der Kollagenschwämme und der Positivkontrolle wurde rasterelektronenmikroskopisch untersucht. Des Weiteren erfolgte eine pH-Wert-Bestimmung definierter Schwammengen nach 3-, 30- und 60-minütiger Inkubation mit isotonischer Kochsalzlösung und Humanserum.

Bei der Betrachtung der vorliegenden Ergebnisse fällt zunächst die Acidität der verwendeten Materialien vor allem im Fall von HE und ES bei Inkubation mit isotonischer Kochsalzlösung auf. Die RE-Proben zeigten nach dreiminütiger Inkubation

einen mittleren pH-Wert von 5,82 und somit deutlich weniger Beeinflussung des pH-Wertes als HE (3,21) und ES (3,61). Der gemessene pH-Wert der RE-Proben blieb zudem über den gesamten Untersuchungszeitraum annähernd konstant (nach 30 min 5,88, nach 60 min 5,87). Bei HE und ES stellte sich im Gegensatz hierzu ein im Verlauf weiter abfallender pH-Wert bis auf 3,08 (HE) bzw. 3,43 (ES) heraus, was eine Freisetzung weiterer Hydroxylionen über die Zeit indiziert. Da die Schwämme nach Einbringen in den Organismus jedoch nicht mit isotonischer Kochsalzlösung, sondern mit Blutserum und korpuskulären Blutbestandteilen in Kontakt treten, wurde zudem die Interaktion mit humanem Blutserum untersucht. Die Inkubation mit 2,5 ml Humanserum offenbarte, dass die Pufferkapazität des verwendeten Serumvolumens zumindest für RE annähernd ausreichend war, entstehende Hydroxylionen zu neutralisieren. Bei allen drei gemessenen Zeitpunkten wurden ähnliche Ergebnisse (nach 3 min 7,73, nach 30 min 7,79 und nach 60 min 7,82) wie bei der Serumkontrolle (7,71 nach 3 min, 7,72 nach 30 min und 7,81 nach 60 min) erzielt. Im Falle von HE und ES reichte die Pufferkapazität des Serums nicht aus, den pH-Wert konstant zu halten. Nach drei Minuten wurden Werte (HE 7,21; ES 7,26) deutlich unterhalb des pH-Wertes der Kontrolllösung (7,71) gemessen. Die Beobachtung, dass der gemessene pH-Wert auch bei diesen Proben im zeitlichen Verlauf anstieg (HE: 7,33 nach 30 min, 7,40 nach 60 min; ES: 7,42 nach 30 min, 7,64 nach 60 min), kann vor allem in der auch bei der Kontrolle zu beobachtenden zunehmenden Basizität des Blutserums durch Verflüchtigung des enthaltenen CO₂ begründet liegen.

Betrachtet man die Ergebnisse der Flusskammerversuche, so zeigt sich, dass die untersuchten Kollagenschwämme Kollagen-resorb[®], Hemocol[®] und der experimentelle Schwamm eine vergleichbare Fluoreszenzzunahme pro mm² Probenoberfläche aufweisen. Diese war zudem nicht signifikant unterschiedlich zur Positivkontrolle ($p > 0,05$, ANOVA). Die untersuchten Schwämme scheinen demnach eine ähnliche Potenz zur Thrombozytenanlagerung zu besitzen, die auch derjenigen von nativem Kollagen (Positivkontrolle) vergleichbar ist. Im Hinblick auf die nicht signifikant stärkere Thrombozytenanlagerung an die Positivkontrolle im Vergleich zu den Schwämmen ist jedoch auch der Oberflächenstruktur der verwendeten Materialien Beachtung zu schenken. In der Rasterelektronenmikroskopie zeigten die Schwämme eine poröse, dreidimensionale Oberflächenmorphologie (Abb. 10 b-d). Die Kontrolle ist hingegen zweidimensional-kristallin auf der Glasoberfläche ausgefällt (Abb. 10a). Erwartungs-

gemäß müssten sich bei den verwendeten Testmaterialien daher allein aufgrund ihrer größeren Oberfläche eine deutlich höhere Anzahl von Thrombozyten pro Zeiteinheit anlagern können. Dies war jedoch nicht zu beobachten. Denkbar wäre auch eine rein morphologisch bedingte Anlagerung von einzelnen Thrombozyten in die Hohlraumoberflächen der Schwämme, jedoch ohne kollagenspezifischen Effekt. Die Positivkontrolle als zweidimensionale Oberfläche war hingegen nicht imstande, Thrombozyten in ihre Struktur einzubinden. Die Fluoreszenzzunahme kann somit in diesem Fall aufgrund der im Blutfluss auftretenden Scherkräfte nur auf einer Thrombozytenadhäsion unter Einbeziehung des Kollagenrezeptors basieren, wie sie auch bereits in anderen Studien bei Verwendung von nativen Kollagenreagenzien beobachtet wurde (Ruggeri et al. 1999; Savage et al. 1999). In diesem Fall wäre der Anstieg der Fluoreszenzwerte der Positivkontrolle nur bedingt mit der Fluoreszenzzunahme der Testgruppen vergleichbar.

Bei der Durchführung der Flusskammerversuche konnte des Weiteren ein Unterschied hinsichtlich der physikalischen Stabilität der verwendeten Materialien festgestellt werden. HE und RE veränderten unmittelbar nach Blutkontakt ihre Konsistenz und unterlagen einer deutlichen Schrumpfung. Im Gegensatz dazu zeigte das quervernetzte Kollagen von ES schwammähnliche Eigenschaften und blieb über den gesamten Untersuchungszeitraum formstabil. Auf das Problem der eingeschränkten Dimensionsstabilität bei im Handel erhältlichen kollagenen Hämostyptika wiesen auch Dehnen und Mitarbeiter hin. Sie untersuchten in einer klinischen Vergleichsstudie den postoperativen Heilungsverlauf nach operativer Weisheitszahnentfernung mit und ohne Einlage eines Kollagenvlieslyophilisats. Die Autoren führten die zu beobachtende erhöhte Komplikationsrate bei den mit Kollagenvlies versorgten Osteotomiehöhlen auf die mangelhafte Eigenstabilität der Kollagenmatrix zurück (Dehen et al. 1989). Rothamel et al. (2005) konnten in einer tierexperimentellen Studie nachweisen, dass eine chemische Quervernetzung von Kollagenfibrillen zu einer Stabilisierung des Kollagengerüsts führt und mit einem verzögerten Abbau der Matrix nach Implantation einhergeht (Rothamel et al. 2005). Insofern könnte dieses Verfahren auch einen positiven Einfluss auf die klinische Anwendung von Kollagenen als lokale Hämostyptika haben.

Die vorliegende Studie ist die erste Studie, welche die Thrombozytenaggregation an zahnärztlich verwendeten kollagenen Hämostyptika in einem Flusskammerversuch

mit Hilfe der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie untersucht. Dies erschwert den Vergleich zu anderen Studien. Bisherige in vitro Studien untersuchten jedoch den Einfluss kollagener Hämostyptika auf die Thrombozyten mit Hilfe der turbidimetrischen Aggregometrie. Hierbei handelt es sich um ein auch klinisch angewendetes in vitro Verfahren zur Kontrolle der Plättchenfunktion durch Bestimmung der Plättchenaggregation.

Benner et al. (2003) testeten in einer turbidimetrischen Aggregationsstudie vier unterschiedliche in der dentoalveolären Chirurgie verwendete Materialien in ihrer Wirkung auf Thrombozyten. Native Kollagenmembranen (Bio-Gide[®]), β -Tricalciumphosphat (Cerasorb[®]), ein xenogenes Knochenersatzmaterial (Bio-Oss[®]) und ein aus Meeresalgen gewonnenes Knochenersatzmaterial (Algipore[®]) wurden zerkleinert und in plättchenarmem Plasma (PPP) suspendiert. Nach Zugabe in plättchenreiches Plasma (PRP) wurde die Thrombozytenaggregation über die Zeit mithilfe der Lichttransmissionsmessung im Aggregometer erfasst. Das Aggregometer misst dabei photometrisch die Intensität eines durch das PRP gesandten Lichtstrahls. Da PRP trübe ist, wird mit zunehmender Aggregation der Plättchen das Plasma klarer, die Transmission nimmt zu. Bei den Versuchen zeigte sich, dass keines der getesteten Materialien in der Lage war, einen erkennbaren Effekt auf die Lichtdurchlässigkeit des PRP und somit auf die Thrombozyten in vitro auszuüben. Der registrierte Verlauf der Lichttransmission von PRP nahm nach Zugabe der unterschiedlichen Suspensionen nicht ab. Erst die im weiteren Verlauf erfolgte Zugabe von Adenosin-Diphosphat (ADP; Endkonzentration: 2×10^{-5} M/l) als potenten Aktivator bewirkte bei allen Proben eine sofortige sichtbare Aggregation der Thrombozyten. Dies beweist, dass dieselben Plättchen zumindest nicht negativ beeinflusst und somit weiterhin aggregabel waren. Die Autoren schlossen aus den Ergebnissen, dass weder β -TCP noch deproteinisierte Rinderspongiosa oder phykogene Granula in der Lage sind, direkt über eine Thrombozytenaktivierung eine Aggregation zu initiieren (Benner et al. 2003). Die Tatsache, dass auch bei der Bio-Gide[®]-Membran als Vertreter nativen Kollagenmaterials keine Aggregation beobachtet wurde, stellt die Möglichkeit einer Aktivierung von Thrombozyten durch aufbereitetes tierisches Kollagen in Frage. Auch die Bio-Gide[®]-Membran stellt ein natives Kollagenmaterial dar, welches demnach eigentlich in der Lage sein müsste, eine Aggregation von Thrombozyten zu initiieren. Die Ergebnisse entsprechen der auch in unserer Studie nicht beobachtbaren

deutlichen Anhebung der Fluoreszenzwerte bei deutlich vergrößerter, mikrostrukturierter Oberfläche der Schwämme im Vergleich zur Positivkontrolle.

Solheim et al. (1991) berichten von ähnlichen Ergebnissen. Sie untersuchten den Einfluss von fünf unterschiedlichen lokalen Hämostyptika (Knochenwachs, oxidierte Zellulose, Gelatineschwamm, Polyorthoester, Kollagenvlies) auf die Thrombozyten mithilfe eines Aggregometers. Keines der verwendeten Materialien war alleine in der Lage, eine Thrombozytenaggregation herbeizuführen. Bei dem bovinen Kollagenpolymer (Collastyp[®]) zeigte sich ebenfalls erst nach Zugabe geringer Mengen der Aktivatoren ADP oder Adrenalin eine Aggregation von Thrombozyten (Solheim et al. 1991).

Weitere Untersuchungen über die *in vitro* Wirkung der Kollagenvliese auf Thrombozyten machten in ähnlicher Weise auch Katthagen und Hellstern (1984). Sie testeten Kollagenvliese der Firmen Pentapharm und Braun-Melsungen. Die Kollagenvliese wurden für die Aggregationsversuche mit Ringer-Lactatlösung inkubiert und so in Lösung gebracht. Als Kontrolle diente ein Kollagenreagenz der Firma Hormon-Chemie, welches routinemäßig in der Hämostaseologie zur Untersuchung der Thrombozytenfunktion verwendet wird. In einer zweiten Versuchsreihe wurde mit ungelöstem Kollagenvlies gearbeitet, um auszuschließen, dass durch den Lösungsprozess die gerinnungsfördernde Wirkung des Kollagenvlieses verändert wird. Nach Inkubation und Rühren (1000 U/min) von PRP (50 ml) für 5 Minuten in Kontakt mit ungelöstem Kollagenvlies (20 mg) wurde ermittelt, ob es zu einem Abfall der Thrombozytenzahl infolge einer Thrombozytenadhäsion durch das Kollagenvlies kam. Die Ergebnisse zeigten, dass im Gegensatz zur Positivkontrolle durch keines der untersuchten Kollagenvliese eine Thrombozytenaggregation initiiert werden konnte. Auch der Kontakt von PRP mit ungelöstem Kollagenvlies, wie in der zweiten Versuchsreihe durchgeführt, führte zu keinem Thrombozytenabfall als Zeichen einer abgelaufenen Thrombozytenadhäsion an das Material. Katthagen und Hellstern kamen aufgrund ihrer Versuchsergebnisse zu dem Schluss, dass bei dem Herstellungsprozess der Kollagenvliese die strukturellen Voraussetzungen für die Aktivierung der Hämostase im Unterschied zum nativen Kollagenreagenz verloren gehen (Katthagen und Hellstern 1984).

Stemberger et al. (1978) testeten ebenfalls u. a. mit einer Suspension des Kollagenvlieses Pentapharm[®] die Thrombozytenaggregation in PRP. Sie erhielten nur einen

minimalen Effekt im Vergleich zur Kontrolllösung (Standard-Kollagenpräparat Horm[®]), einem nativen Kollagenreagenz (Stemberger et al. 1978).

Im Widerspruch zu den vorangegangenen Studien wiesen Joos und Ochs (1979) in ihrer Studie auf einen kollageninduzierten, thrombozytenaktivierenden Effekt der Lösung des Kollagenvlieses Pentapharm[®] hin. Bei ihren Versuchen wurden 35 µl Kollagenlösung der Firma Pentapharm einer unbekanntem Menge PRP zugesetzt und die Aggregation mit Hilfe der turbidimetrischen Aggregometrie erfasst (Joos und Ochs 1979). Der Originalarbeit von Joos und Ochs ist jedoch nicht zu entnehmen, wie die getestete Kollagenlösung hergestellt wurde. Auch wurde die Konzentration, in welcher die Lösung eingesetzt wurde, nicht angegeben. Katthagen und Hellstern gingen aufgrund ihrer zu Joos und Ochs widersprüchlichen Ergebnisse bei gleicher Versuchsdurchführung davon aus, dass in der Untersuchung von Joos und Ochs nicht mit einer aus dem Kollagenvlies selbst hergestellten Lösung, sondern ggf. mit einer Lösung, die während der Produktion der Schwämme anfällt, gearbeitet wurde (Katthagen und Hellstern 1984).

In einer weiteren Studie, die sich mit der Wirkung von Kollagenschwämmen auf die Hämostase beschäftigt, untersuchten die Autoren anhand verschiedener in vitro Tests, inwieweit bei der Herstellung eines kommerziellen Kollagenschwammes (Firma Pentapharm, porcines Kollagen) die hämostatische Eigenschaft des Kollagens verloren geht (Dehen et al. 1990). Hierzu wurden verschiedene Parameter bestimmt: 1. Bestimmung der Rekalzifizierungszeit nach Howell (Howell 1935); 2. Einfluss des Kollagenpräparates auf die partielle Thromboplastinzeit; 3. Thrombozytenaggregationstest nach Marx und Schulte (Marx und Schulte 1972). Die Ergebnisse zeigten eine sowohl verlängerte Rekalzifizierungszeit und partielle Thromboplastinzeit (1. + 2.), als auch eine fehlende Thrombozytenaggregation an den Kollagenfasern des Kollagenschwammes Pentapharm[®] (3). Es wurde also weder eine Aktivierung des endogenen Systems noch der primären Hämostase beobachtet. Die Autoren folgerten, dass die hämostatische Wirkung der Kollagenschwämme, die von vielen Autoren bei in vivo Studien beobachtet wird, nicht von den Kollagenmolekülen selber ausgehen kann. Die fehlende Thrombozytenaggregation im Gegensatz zur Positivkontrolle (Standard-Kollagenpräparat Horm[®]) spiegelt die Ergebnisse von Stemberger et al., Katthagen und Hellstern wider und steht konträr zur Beobachtung von Joos und Ochs (Dehen et al. 1990).

Dehen et al. gingen wie Katthagen und Hellstern davon aus, dass die Kollagenpräparate bei ihrer Herstellung und hier vor allem bei den Vorgängen zur Verminderung der Antigenität und der Sterilisation ihre native Form verlieren (Katthagen und Hellstern 1984; Dehen und Niederdelmann 1989; Dehen et al. 1990). Dies könnte auch eine mögliche Erklärung für die in Anlehnung an die Oberfläche relativ geringe Thrombozytenanlagerung an den von uns verwendeten Schwämmen sein.

Es ist zu allen turbidimetrischen Studien anzumerken, dass das in vitro Modell der turbidimetrischen Aggregation bei Weitem nicht den Bedingungen in vivo entspricht. So fehlen u. a. Faktoren wie Gefäßwand, Blutströmung und die daraus resultierenden Scherkräfte, die ebenfalls einen entscheidenden Einfluss auf die Blutgerinnung haben. Auch bei der in dieser Studie verwendeten Flusskammer handelt es sich um ein Modell, welches nicht alle Parameter der Gerinnungsphysiologie vollständig erfassen kann. Jedoch erweitert es die bisherigen Testungsverfahren um die Möglichkeit, Anlagerungsprozesse von Thrombozyten selektiv an Oberflächen zeitabhängig nachzuweisen. Zudem könnten durch die Verwendung unterschiedlicher Flussraten auch die auftretenden Scherkräfte innerhalb dieses „künstlichen Blutgefäßes“ verändert und in ihrer Bedeutung weiter untersucht werden.

Ein anderer Aspekt ist die bereits beschriebene Acidität der in der vorliegenden Studie verwendeten Materialien. So zeigte bereits im Jahre 1978 die Arbeitsgruppe um Green, dass Veränderungen des pH-Wertes in vitro die zelluläre und plasmatische Blutgerinnung massiv beeinträchtigen. Im Vergleich zu nicht gesäuerten Proben zeigte sich schon bei einem pH-Wert von 6,4 eine mehr als 50%ige Reduktion der Thrombozytenaggregation. Unterhalb eines pH-Wertes von 5,4 war die zelluläre Blutgerinnung vollständig ausgeschaltet. Sogar bereits vorhandene Thromben lösten sich nach Absenken des pH-Wertes auf (Green et al. 1978). In einer weiteren Studie, die gastrointestinale Blutungskomplikationen untersuchte, verursachte eine Anhebung des sauren pH-Wertes auf neutrale bzw. leicht basische Werte eine deutlich verbesserte Thrombozytenaggregation sowie eine Serotonin- und Kalziumausschüttung aus den Thrombozyten (Chaimoff et al. 1978). Wenngleich in unserer Studie die beobachtete Acidität der Schwämme durch das verwendete Plasmavolumen annähernd ausgeglichen wurde, ist eine Hemmung der Thrombozytenadhäsion und -aggregation durch mikromilieubedingte pH-Wert-Verschiebungen unmittelbar an der

Schwammoberfläche nicht sicher auszuschließen. Im Fall der zur Konservierung sauer gehaltenen Positivkontrolle (Collagen S, pH 3), bei der die beobachtete Fluoreszenzzunahme nur auf einer Thrombozytenadhäsion unter Einbeziehung des Kollagenrezeptors basieren kann, scheint der pH-Wert eher eine untergeordnete Rolle zu spielen. Dies könnte in der nativen Struktur bzw. den strukturellen Voraussetzungen des Kollagenreagenzes begründet liegen, ebenso wie in der im Vergleich zu den Schwämmen sehr geringen Schichtdicke.

Im Gegensatz zu den vorliegenden *in vitro* Ergebnissen berichten zahlreiche Autoren über die guten blutstillenden Eigenschaften lokal eingesetzter kollagener Hämostyptika, die sie in verschiedenen tierexperimentellen Studien (Köhnlein und Mergard 1972; Silverstein und Chvapil 1981; Zoucas et al. 1984) und klinischen Studien (Joos und Krekeler 1978; Riege und Köhnlein 1978; Silverstein und Chvapil 1981; Stein et al. 1985; Heinrich 1990) nachweisen konnten.

Köhnlein und Mergard (1972) untersuchten den Einfluss von vier lokal anwendbaren Hämostyptika (Clauden-Puder, Kollagen-Pulver, oxidiert regenerierte Zellulose (Tabotamp) und ein Thrombinpräparat (Topostasin)) auf Blutungszeit und Blutverlust bei experimentell gesetzten Leberparenchymwunden an gesunden und an gerinnungsgestörten Ratten. Die kollagene Matrix zeigte hinsichtlich der hämostyptischen Eigenschaften die besten Resultate.

Zoucas et al. (1984) kamen in ihrer Studie zu ähnlichen Ergebnissen. Sie verglichen im Tiermodell die blutstillende Wirkung von Gelatineschwämmen, oxidiert regenerierter Zellulose, Kollagenvlies und mikrokristallinem Kollagen bei experimentell gesetzten Leberwunden an gesunden Ratten. In der Kontrollgruppe erfolgte die Wundversorgung mit chirurgischer Gaze. Für die Kollagenpräparate konnte im Vergleich zu Zellulose und Gelatineschwämmen ein besserer hämostyptischer Effekt nachgewiesen werden. Dieser zeigte sich auch in der zweiten Versuchsreihe, wo die Anwendung der Kollagenpräparate an Tieren mit Hämostasestörungen erfolgte.

Heinrich (1990) untersuchte in einer prospektiven, klinischen Studie die Anwendung von Kollagenvlies zur Blutstillung in Leistennähten nach Implantation von Bifurkationsprothesen. Bei insgesamt 80 behandelten Patienten wurde die rechte Leistennaht mit Kollagenvlies und einer Redon-Drainage, die linke Leistennaht allein mit einer Redon-Drainage gesichert. Auf der experimentellen Seite kam es zu einem

mittleren Blutverlust von 15 ± 5 ml, die Kontrollseite zeigte einen mittleren Blutverlust von 23 ± 7 ml. Signifikante Unterschiede hinsichtlich der Infektionsrate ließen sich nicht feststellen. Der Autor kam zu dem Schluss, dass kollagene Hämostyptika zwar eine chirurgisch exakte Blutstillung nicht ersetzen können, aber dennoch ein wirksames Hilfsmittel zur beschleunigten lokalen Hämostase gerade bei diffusen kleinsten Blutungsquellen darstellen.

Eine Reihe von Studien beschäftigte sich zusätzlich mit der Frage der Blutstillung nach oralchirurgischen Eingriffen bei Patienten unter antikoagulatorischer Therapie. Früher war eine Umstellung auf Heparin der besseren Steuerbarkeit wegen allgemein üblich. Neuere Studien lassen darauf schließen, dass bei zahnärztlich-chirurgischen Eingriffen zugunsten einer fortgeführten Antikoagulationstherapie auf eine Heparinsubstitution verzichtet werden kann (Wahl 1998; Blinder et al. 1999; Wahl 2000; Evans et al. 2002; Merten et al. 2004).

Bei Anwendung einer lokalen Wundversorgung mit einem Hämostyptikum wird über sehr geringe Nachblutungsraten trotz Beibehaltung der oralen Antikoagulation berichtet (Mohr et al. 1986; Martinowitz et al. 1990; Ghahremani et al. 1992; Hoffmann et al. 1992; Schulz 1992; Berchtenbreiter et al. 1997; Feller et al. 1997; Rahn und Ghahremani 1997; Scheer et al. 2004). Weitere Studien, die das Nachblutungsverhalten von zahnärztlich-chirurgischen Maßnahmen unter beibehaltener Phenprocoumontherapie und Heparinsubstitution verglichen, kamen zu dem Schluss, dass unter fortgesetzter Phenprocoumontherapie nicht mit einer erhöhten Inzidenz von Nachblutungen zu rechnen ist (Gerhards und Wagner 1997; Scheer et al. 2004). Nach aktuelleren Untersuchungen scheint dies auch für die Behandlung mit niedrig dosierter Acetylsalicylsäure zuzutreffen (Hemelik et al. 2006).

Einige Autoren kamen dabei zu dem Schluss, dass bei Patienten unter oraler Antikoagulation die Verwendung von Kollagenen zur Wundversorgung z. B. von Extraktionsalveolen deutliche Vorteile bringt (Joos und Krekeler 1978; Joos und Rixecker 1986; Berchtenbreiter et al. 1997).

Berchtenbreiter et al. (1997) verglichen in einer prospektiv randomisierten Studie drei Behandlungsmethoden zur lokalen Blutstillung bei Zahnextraktionen miteinander (Naht und Aufbisstupfer, Naht und Kollagenvlies, Naht und Fibrinkleber). Bei insgesamt 66 Patienten mit Marcumarmedikation (Quickwert im therapeutischen Bereich)

wurden unter Beibehaltung der Antikoagulationstherapie bei einem mittleren Quickwert von 23,8% (INR 2,8) 110 Zähne extrahiert. Nach Anzahl der extrahierten Zähne erfolgte eine Aufteilung der Patienten in zwei Gruppen (Gruppe 1: Entfernung von bis zu drei Zahnwurzeleinheiten, Gruppe 2: Entfernung von bis zu sechs Zahnwurzeleinheiten). Postoperativ traten vier Wundheilungsstörungen auf, die unter Lokalpflege abheilten, und vier Nachblutungen, die mit lokalen blutstillenden Maßnahmen beherrscht werden konnten. Thromboembolische Komplikationen traten nicht auf. Die Autoren kamen zu dem Ergebnis, dass sich die Anwendung von Kollagenvlies und Naht im Vergleich der verschiedenen Therapieverfahren als geeignet erweist. Nachblutungen bei den mit Kollagenvlies versorgten Patienten traten nicht auf. In vielen Fällen genügte zur Wundversorgung auch allein Naht und Aufbisstopfer.

Joos und Krekeler (1978) berichteten von ähnlichen Ergebnissen bei der Anwendung kollagener Hämostyptika. Bei 20 Patienten wurden unter Beibehaltung der Antikoagulationstherapie bei einem Quickwert zwischen 10 und 20% insgesamt 28 oralchirurgische Eingriffe durchgeführt, darunter 12 Einzelzahn- und 5 Serienextraktionen (3-5 Zähne). Die Wundversorgung erfolgte mit einem Kollagenvlies und anschließendem primärem Nahtverschluss. In allen Fällen kam es zu einer sofortigen Hämostase; es wurden keine Nachblutungen beobachtet. Die Autoren führten dies auf die hämostyptischen Eigenschaften von Kollagenen zurück.

Auf der anderen Seite gibt es jedoch auch klinische Studien, die bei der alleinigen Wundversorgung mit Kollagenvlies als Hämostyptikum bei Patienten mit gestörter Hämostase keine überzeugenden Ergebnisse erzielen konnten (Hoffmann et al. 1992; Schulz 1992; Bublitz et al. 2000).

Bublitz et al. (2000) wiesen darauf hin, dass gerade bei Patienten unter oraler Antikoagulationstherapie eine lokale Applikation und ein anschließendes postoperatives Mundspülregime mit Tranexamsäurelösung (Nachblutungsrate 6,25%) einer Wundversorgung mit Kollagenen (19,35%) deutlich überlegen war. Die Autoren verglichen die hämostyptische Wirksamkeit von Kollagenvlies mit der von Tranexamsäure bezüglich der Versorgung von Extraktionsalveolen bei Patienten unter Marcumardauerantikoagulation. Als Vergleichsgruppe diente ein drittes Patientenkollektiv, bei welchem unter kontrollierter Reduktion der Marcumarmedikation die Extraktionsalveolen plastisch gedeckt worden waren. Nachblutungen traten in letzterer Gruppe bei 39,74% auf, was gegenüber der mit Tranexamsäure behandelten und unverändert

oral antikoagulierten Gruppe signifikant erhöht war. Hierzu ist anzumerken, dass die Wundversorgung mit einer plastischen Deckung ein deutlich höheres Weichgewebs-trauma beinhaltet. Im Gegensatz zu der rein adaptierenden Wundnaht wird erheblich mehr Gewebe verletzt, da der für die Deckung erforderliche Lappen zunächst präpa-riert und mobilisiert werden muss. Dies könnte zu der höheren Komplikationsrate in letzterer Gruppe beigetragen haben. Auch von anderen Autoren wird nach ausge-dehnten Schleimhautmobilisationen zur plastischen Deckung vermehrt über Nach-blutungen berichtet (Hirsh und Fuster 1994; Gerhards und Wagner 1997). Gerade bei Risikopatienten ist daher auf eine schonende Behandlung der Gewebe und Ge-fäße und eine sorgfältige Wundversorgung zu achten.

Die zahnärztlich-chirurgische Behandlung von Patienten unter antikoagulatorischer Therapie hat sich in den letzten Jahrzehnten im Hinblick auf eine Beibehaltung der allgemeintherapeutisch notwendigen Antikoagulation, die das Risiko thromboemboli-scher Komplikationen minimiert, grundlegend geändert. Studien konnten zeigen, dass eine temporäre Umstellung auf Heparin oder auch eine gezielte Abweichung vom Antikoagulationsregime riskant sind (Weibert 1992).

Auch in der aktuellen Stellungnahme der Deutschen Gesellschaft für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde über zahnärztlich-chirurgische Eingriffe bei Patienten unter Anti-koagulantientherapie wird auf die Gefahr einer Unterbrechung der Antikoagulation bei zahnärztlich-chirurgischen Eingriffen hingewiesen (Schmelzeisen 2002). Die Stel-lungnahme beruht auf einer zusammenfassenden Analyse retrospektiver Daten, die eine signifikant höhere Mortalität durch Thromboembolien und kardiovaskuläre Er-eignisse nach Veränderungen einer allgemeintherapeutisch notwendigen Antikoa-gulation als durch nicht beherrschbare Nachblutungen aufzeigen konnte (Wahl 2000). Bei über 2400 dentoalveolären Eingriffen an mehr als 950 Patienten unter Fortführung der oralen Antikoagulation traten nur bei zwölf Patienten (< 1,3%) Nach-blutungen auf, die mit lokalen Maßnahmen alleine nicht zu beherrschen waren. Bei neun dieser zwölf Patienten ergaben die Laborkontrollen allerdings einen INR ober-halb des empfohlenen Bereiches. Nur bei drei dieser Patienten (< 0,31%) traten trotz eines INR im therapeutischen Bereich weiterreichende, allerdings beherrschbare Blu-tungen auf. Demgegenüber kam es bei fünf (0,95%) von 526 Patienten (575 Eingriffe), bei denen die Antikoagulationstherapie für zahnärztlich-chirurgische

Maßnahmen unterbrochen worden war, zu thromboembolischen Komplikationen, von denen vier Patienten an den Komplikationen verstarben. Wahl schlussfolgerte hieraus, dass insbesondere angesichts möglicher thromboembolischer Komplikationen die Antikoagulationstherapie bei zahnärztlich-chirurgischen Eingriffen nicht unterbrochen werden sollte.

Unbedingte Voraussetzung für die Beibehaltung der oralen Antikoagulation bei oral-chirurgischen Eingriffen sind jedoch die Kenntnis des aktuellen präoperativen INR-Wertes und die sorgfältige Anwendung von geeigneten lokalhämostyptischen Maßnahmen (Ramstrom et al. 1993; Souto et al. 1996; Devani et al. 1998; Bublitz et al. 2000; Wahl 2000).

Im Vergleich zu der durchgeführten in vitro Untersuchung ist zu beachten, dass bei in vivo Studien stets mehrere Parameter der Wirksamkeit von hämostyptischen Materialien erfasst werden. Unspezifisch physikalische Faktoren wie die Druckerhöhung durch Tamponade unterstützen gerade im periläsionalen Weichgewebe den Verschluss traumatisierter Gefäße. So werden durch das Aufbeißen auf einen Tupfer, aber auch durch das Applizieren eines physikalisch stabilen Materials in die Wundhöhle und eine anschließende speicheldichte Naht gerade initiale Blutgerinnungsvorgänge unterstützt und lokale, parenchymatöse Blutungen beherrscht. In der verwendeten Blutkammer waren lokale Druckverhältnisse jedoch ohne Bedeutung, da der Blutstrom tangential an der Schwammoberfläche vorbeigeführt wurde. Auch die sekundäre Hämostase, die zur Stabilisierung des primären Plättchenaggregates dient, spielt neben der alleinigen Thrombozytenadhäsion und -aggregation eine erhebliche Rolle. Die plasmatische Gerinnung wurde jedoch unter den von uns angewendeten in vitro Bedingungen durch Zugabe von PPACK als Thrombininhibitor vollständig ausgeschaltet und konnte somit nicht zu einer Thrombusbildung beitragen.

Dehen sowie Katthagen und Hellstern folgerten aufgrund ihrer in vitro Ergebnisse, dass die in tierexperimentellen und klinischen Studien zu beobachtende hämostyptische Wirkung der von ihnen untersuchten Kollagenvliese vermutlich nicht auf die molekulare Struktur des Hämostyptikums und damit auf einen kollagenspezifischen Effekt zurückzuführen ist. Viel eher scheint eine rein mechanische bzw. osmotische Beeinflussung der korpuskulären Blutbestandteile eine prokoagulatorische Rolle zu spielen (Katthagen und Hellstern 1984; Dehen et al. 1990). So könnte die Blutstillung

durch die Applikation lokaler Hämostyptika dahingehend unterstützt werden, dass die sich bildenden Plättchenthromben und Fibringerinnsel am Ort der Blutungsquelle verbleiben und nicht abgeschwemmt werden können. Zudem könnte die Kontaktaktivierung der plasmatischen Gerinnung an Fremdoberflächen erleichtert werden, was ebenfalls eine schnelle und auch dauerhafte Blutgerinnung unterstützt.

5 Schlussfolgerung

Die vorgestellte Flusskammer erlaubt eine in vivo nahe Untersuchung der Thrombozytenaggregation an unterschiedlichen Materialien. Die in dieser Studie untersuchten Kollagenschwämme zeigten keine Unterschiede hinsichtlich der Anlagerung von Thrombozyten. Einschränkend muss jedoch angemerkt werden, dass aufgrund der mikroporösen Struktur der Schwämme strukturell bedingte Thrombozytenadhäsionsphänomene nicht sicher ausgeschlossen werden konnten. Möglich wäre eine rein morphologisch bedingte Anlagerung von einzelnen Thrombozyten in die Hohlräume der Schwämme, jedoch ohne Beteiligung des Kollagenrezeptors. Alle getesteten Materialien wiesen eine deutliche Acidität auf, die sich im Fall von RE durch die Pufferkapazität von Blutserum annähernd ausgleichen ließ. Sie könnte jedoch klinisch einen negativen Einfluss auf die Anlagerung und Aktivierung von Thrombozyten haben. Eine Stabilisierung von Kollagen durch chemische Quervernetzung stellt offenbar keinen Nachteil hinsichtlich der Thrombozytenanlagerung dar. Sie bewirkt jedoch eine deutlich verbesserte Formstabilität, was einen positiven Effekt auf die klinische Anwendung z. B. nach Zahnextraktionen haben könnte.

6 Literaturverzeichnis

Alberio L. (2003). Die orale Antikoagulation mit Vitamin K-Antagonisten. *Ther Umsch* 60(1): 5-9.

Benner K.U., Bauer F., Heuckmann K.-H., Haas S. (2003). Plättchenreiches Plasma (PRP) in der Oralchirurgie - Funktion der Blutplättchen: Ihre Kontrolle und Beeinflussung. *ZMK* 19(7-8): 470-480.

Berchtenbreiter U., Vees-Höflsauer B., Kreuzsch T., Zimmermann C.E. (1997). Aktuelles Konzept zur zahnärztlich-chirurgischen Behandlung von Patienten mit Marcumartherapie. *Dtsch Zahnärztl Z* 52(1): 50-52.

Blinder D., Manor Y., Martinowitz U., Taicher S., Hashomer T. (1999). Dental extractions in patients maintained on continued oral anticoagulant: comparison of local hemostatic modalities. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 88(2): 137-140.

Bublitz R., Sommer S., Weingart D., Bäuerle K., Both A. (2000). Hämostyptische Wundversorgung bei Marcumarpatienten. Kollagenvlies vs. Tranexamsäure. *Mund Kiefer Gesichtschir* 4(4): 240-244.

Buch R.S.R., Kleis W.K.G., Reichert T.E. (2004). Störungen der Hämostase und deren Bedeutung für die zahnärztliche Praxis. *Hessisches Zahnärzte Magazin* (7): 14-19.

Calatzis A., Heesen M., Spannagl M. (2003). Patientennahe Sofortdiagnostik von Hämostaseveränderungen in der Anästhesie und Intensivmedizin. *Anaesthesist* 52(3): 229-237.

Chaimoff C., Creter D., Djaldetti M. (1978). The effect of pH on platelet and coagulation factor activities. *Am J Surg* 136(2): 257-9.

Dehen M., Niederdellmann H. (1989). Kritische Beurteilung der Blutstillung durch Kollagenschwämme. *Dtsch Z Mund Kiefer Gesichtschir* 13: 305-307.

Dehen M., Niederdellmann H., Lachner J. (1989). Zur Einlagerung von Kollagenvlies in offene Knochendefekte. *Dtsch Zahnärztl Z* 44(4): 240-243.

Dehen M., Niederdellmann H., Lachner J. (1990). Zur Beurteilung der hämostyptischen Eigenschaft eines Kollagenpräparates. *Dtsch Zahnärztl Z* 45(7): 400-402.

Devani P., Lavery K.M., Howell C.J. (1998). Dental extractions in patients on warfarin: is alteration of anticoagulant regime necessary? *Br J Oral Maxillofac Surg* 36(2): 107-11.

Dise C.A., Burch J.W., Goodman D.B. (1982). Direct interaction of mepacrine with erythrocyte and platelet membrane phospholipid. *J Biol Chem* 257(9): 4701-4704.

- Esser E. (1992). Der internistische Risikopatient in der zahnärztlichen Praxis. Dtsch Zahnärztl Z 47(1): 11-17.
- Evans I.L., Sayers M.S., Gibbons A.J., Price G., Snooks H., Sugar A.W. (2002). Can warfarin be continued during dental extraction? Results of a randomized controlled trial. Br J Oral Maxillofac Surg 40(3): 248-252.
- Farndale R.W., Siljander P.R., Onley D.J., Sundaresan P., Knight C.G., Barnes M.J. (2003). Collagen-platelet interactions: recognition and signalling. Biochem Soc Symp (70): 81-94.
- Feller K.-U., Hlawitschka M., Schimming R., Eckelt U. (1997). Therapiekonzept für Patienten unter Langzeitantikoagulantientherapie mit Phenprocoumon (eine retrospektive Studie). Dtsch Zahnärztl Z 52(1): 67-69.
- Gawaz M.: Thrombozyten und primäre Hämostase. In: Gawaz M. (Hrsg.): Das Blutplättchen. Physiologie, Pathophysiologie, Membranrezeptoren, antithrombozytäre Wirkstoffe und antithrombozytäre Therapie bei koronarer Herzerkrankung, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 4-24, (1999a).
- Gawaz M.: Thrombozyten und sekundäre Hämostase. In: Gawaz M. (Hrsg.): Das Blutplättchen. Physiologie, Pathophysiologie, Membranrezeptoren, antithrombozytäre Wirkstoffe und antithrombozytäre Therapie bei koronarer Herzerkrankung, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 25-29, (1999b).
- Gerhards F., Wagner W. (1997). Zum Blutungsrisiko nach zahnärztlich-chirurgischen Eingriffen unter fortgeführter Marcumarisierung. Dtsch Zahnärztl Z 52(1): 53-56.
- Ghahremani M., Rahn R., Krzywanek H.J. (1992). Zahnärztlich-chirurgische Eingriffe unter Marcumar-Therapie mit Quickwert 15-25%. Dtsch Zahnärztl Z 47(4): 240-241.
- Green F.W. Jr., Kaplan M.M., Curtis L.E., Levine P.H. (1978). Effect of acid and pepsin on blood coagulation and platelet aggregation. A possible contributor prolonged gastroduodenal mucosal hemorrhage. Gastroenterology 74(1): 38-43.
- Grötz K.A. (2003). Nachblutung nach Zahnentfernung; Patienteninformationen der DGZMK. <http://www.dgzmk.de>.
- Halfpenny W., Fraser J.S., Adlam D.M. (2001). Comparison of 2 hemostatic agents for the prevention of postextraction hemorrhage in patients on anticoagulants. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 92(3): 257-259.
- Hausmann P., Mergard U.E., Köhnlein H.E. (1974). Zur Wirkung verschiedener Hämostyptika. Tierexperimentelle Untersuchungen. Fortschr Med 92(13): 579-580.
- Heinrich P. (1990). Stellenwert lokaler Hämostyptika. Medicamentum 90: 3-4.
- Hemelik M., Wahl G., Kessler B. (2006). Zahnextraktionen unter Medikation mit Acetylsalicylsäure (ASS). Mund Kiefer Gesichtschir 10(1): 3-6.

Hindriks G., Ijsseldijk M.J., Sonnenberg A., Sixma J.J., de Groot P.G. (1992). Platelet adhesion to laminin: role of Ca²⁺ and Mg²⁺ ions, shear rate, and platelet membrane glycoproteins. *Blood* 79(4): 928-935.

Hirsh J., Fuster V. (1994). Guide to anticoagulant therapy. Part 2: Oral anticoagulants. American Heart Association. *Circulation* 89(3): 1469-1480.

Hoffmann A., Dammer R., Niederellmann H., Herrmann H. (1992). Antikoagulantien-therapie mit Marcumar. Ist bei kleinen oralchirurgischen Eingriffen eine Anhebung des Quickwertes gerechtfertigt? *Dtsch Zahnärztl Z* 47(4): 235-237.

Howell W.H. (1935). Theories of blood coagulation. *Physiol Rev* 15(3): 435-470.

Jackson S.P., Nesbitt W.S., Kulkarni S. (2003). Signaling events underlying thrombus formation. *J Thromb Haemost* 1(7): 1602-1612.

Johnson W.T., Leary J.M. (1988). Management of dental patients with bleeding disorders: review and update. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 66(3): 297-303.

Joos U., Krekeler G. (1978). Kollagenvlies als lokales Hämostyptikum bei gerinnungsgestörten Patienten. *ZWR* 87(17): 810-812.

Joos U., Ochs G. (1979). Einfluss von gelöstem heterologem Kollagen auf die Aggregation menschlicher Thrombozyten. *Dtsch Zahnärztl Z* 34(1): 35-37.

Joos U., Rixecker H. (1986). Zahnärztlich-chirurgische Eingriffe bei gerinnungsgestörten Patienten. *Dtsch Zahnärztl Z* 41(4): 426-427.

Katthagen B.-D., Hellstern P. (1984). In vitro-Untersuchungen über die Wirkung von gelöstem und ungelöstem heterologem Collagen-Vlies auf menschliche Thrombozyten. *Z Orthop Ihre Grenzgeb* 122(5): 677-681.

Köhnlein H.E., Mergard U. (1972). Experimentelle Testung lokaler Hämostyptica. *Chirurg* 43(8): 378-381.

Lechner K.: Hämorrhagische Diathesen. In: Gerok W., Huber C., Meinertz T., Zeidler H. (Hrsg.): *Die Innere Medizin*, Schattauer Verlag, Stuttgart, New York, 10: 173-193, (2000).

Martinowitz U., Mazar A.L., Taicher S., Varon D., Gitel S.N., Ramot B., Rakocz M. (1990). Dental extraction for patients on oral anticoagulant therapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 70(3): 274-277.

Marx R., Schulte F. (1972). Über einen klinischen Schnelltest zur Erfassung von hereditären und erworbenen Thrombopathien. "Kollagen-Zentrifugiertest". *Blut* 24(3): 137-141.

Merten H.-A., Becker H.J., Wiltfang J., Holweg A., Wieding J.U. (1997). Intraalveoläre Kunststofftamponade zur Hämostase bei blutungsgefährdeten Patienten. *Implantologie-J* (1): 14-19.

Merten H.-A., Mazurek M., Gruber R., Ludwig A. (2004). Postoperative Nachblutungsrate antikoagulierter Patienten nach oralchirurgischen Eingriffen. Ein Vergleich unterschiedlicher hämostyptischer Therapiemodalitäten. *Quintessenz* 55(2): 113-122.

Micheletti G., Onorato I., Micheletti L. (1992). Heterologous, lyophilized, non-denatured type-I collagen in dentistry. *Int J Tissue React* 14 Suppl: 39-42.

Möbes O.: Wundlehre. In: Reichart P. A., Hausamen J.-E., Becker J., Neukam F. W., Schliephake H., Schmelzeisen R. (Hrsg.): *Curriculum Zahnärztliche Chirurgie, Band I*, Quintessenz Verlags-GmbH, Berlin, 31-42, (2002).

Mohr P., Tetsch P., Pfannenstiel M. (1986). Die Problematik von zahnärztlich-chirurgischen Eingriffen unter Antikoagulantientherapie. Ergebnisse einer Auswertung von 100 Patienten. *Dtsch Zahnärztl Z* 41(4): 423-425.

Mondorf W. (1998). Vermeidung von Blutungskomplikationen in der zahnärztlichen Praxis. *Bayerisches Zahnärzteblatt* (5): 14-15.

Nivelstein P.F., D'Alessio P.A., Sixma J.J. (1988). Fibronectin in platelet adhesion to human collagen types I and III. Use of nonfibrillar and fibrillar collagen in flowing blood studies. *Arteriosclerosis* 8(2): 200-206.

Pschyrembel, *Klinisches Wörterbuch* (2002). Walter de Gruyter, Berlin, New York.

Rahn R., Ghahremani M. (1997). Zahnärztlich-chirurgische Eingriffe bei Patienten unter Antikoagulantien-Therapie. *Dtsch Zahnärztl Z* 52(1): 70-71.

Ramstrom G., Sindet-Pedersen S., Hall G., Blomback M., Alander U. (1993). Prevention of postsurgical bleeding in oral surgery using tranexamic acid without dose modification of oral anticoagulants. *J Oral Maxillofac Surg* 51(11): 1211-1216.

Riege W., Köhnlein H.E. (1978). Kollagen-Vlies. Eine neue Möglichkeit der Blutstillung in der Chirurgie. *Chirurg* 49(4): 246-247.

Rogerson K.C. (1995). Hemostasis for dental surgery. *Dent Clin North Am* 39(3): 649-662.

Rothamel D., Schwarz F., Sager M., Hertel M., Sculean A., Becker J. (2005). Biodegradation of differently cross-linked collagen membranes: an experimental study in the rat. *Clin Oral Implants Res* 16(3): 369-378.

Ruggeri Z.M., Dent J.A., Saldivar E. (1999). Contribution of distinct adhesive interactions to platelet aggregation in flowing blood. *Blood* 94(1): 172-178.

Rupprecht S., Neidhardt B., Neukam F.W.: Hämorrhagische Diathesen. In: Reichart P. A., Hausamen J.-E., Becker J., Neukam F. W., Schliephake H., Schmelzeisen R. (Hrsg.): *Curriculum Zahnärztliche Chirurgie, Band I*, Quintessenz Verlags-GmbH, Berlin, 523-565, (2002).

Savage B., Ginsberg M.H., Ruggeri Z.M. (1999). Influence of fibrillar collagen structure on the mechanisms of platelet thrombus formation under flow. *Blood* 94(8): 2704-2715.

Savage B., Saldivar E., Ruggeri Z.M. (1996). Initiation of platelet adhesion by arrest onto fibrinogen or translocation on von Willebrand factor. *Cell* 84(2): 289-297.

Scharf R.E.: Gefäßwand, Blutfluß, Hämostase. In: Scharf R. E. (Hrsg.): *Transfusionsmedizin, Hämotherapie, Hämostaseologie, Strukturen - Konzepte - Perspektiven*, 164-173, (1999).

Scheer M., Breuer K., Neugebauer J., Zöller J.E. (2006). Der besondere Patient in der Praxis. Trotz Gerinnungsstörung behandeln. *Zahnärztl Mitt* 96(21): 38-44.

Scheer M., Steveling H., Schweigert H.-G., Neugebauer J., Kübler A.C., Zöller J.E. (2004). Einsatz eines mit Thrombin und Fibrinogen beschichteten Kollagenvlieses (TachoComb) in der zahnärztlichen Chirurgie. *Dtsch Zahnärztl Z* 59(4): 220-226.

Schmelzeisen R. (2002). Stellungnahme der DGZMK: Zahnärztliche Chirurgie bei Patienten mit Antikoagulantientherapie. *Dtsch Zahnärztl Z* 57(3): 140-141.

Schulz S. (1992). Zum Blutungsrisiko nach Zahnextraktionen bei Patienten unter Dauermedikation von Antikoagulantien. *Dtsch Zahnärztl Z* 47(4): 238-239.

Sevor J.J., Meffert R. (1992). Placement of implants into fresh extraction sites using a resorbable collagen membrane: case reports. *Pract Periodontics Aesthet Dent* 4(3): 35-41.

Silverstein M.E., Chvapil M. (1981). Experimental and clinical experiences with collagen fleece as a hemostatic agent. *J Trauma* 21(5): 388-393.

Sindet-Pedersen S. (1987). Distribution of tranexamic acid to plasma and saliva after oral administration and mouth rinsing: a pharmacokinetic study. *J Clin Pharmacol* 27(12): 1005-1008.

Sindet-Pedersen S. (1991). Haemostasis in oral surgery--the possible pathogenetic implications of oral fibrinolysis on bleeding. Experimental and clinical studies of the haemostatic balance in the oral cavity, with particular reference to patients with acquired and congenital defects of the coagulation system. *Dan Med Bull* 38(6): 427-443.

Sindet-Pedersen S., Ramstrom G., Bernvil S., Blomback M. (1989). Hemostatic effect of tranexamic acid mouthwash in anticoagulant-treated patients undergoing oral surgery. *N Engl J Med* 320(13): 840-843.

Solheim E., Anfinsen O.G., Holmsen H., Sudmann E. (1991). Effect of local hemostatics on platelet aggregation. *Eur Surg Res* 23(1): 45-50.

Souto J.C., Oliver A., Zuazu-Jausoro I., Vives A., Fontcuberta J. (1996). Oral surgery in anticoagulated patients without reducing the dose of oral anticoagulant: a prospective randomized study. *J Oral Maxillofac Surg* 54(1): 27-32; discussion 323.

Spängler H.P. (1976). Gewebeklebung und lokale Blutstillung mit Fibrinogen, Thrombin und Blutgerinnungsfaktor XIII. (Experimentelle Untersuchungen und klinische Erfahrungen). *Wien Klin Wochenschr Suppl* 49: 3-18.

Stajcic Z., Baklaja R., Elezovic I., Rolovic Z. (1989). Primary wound closure in haemophiliacs undergoing dental extractions. *Int J Oral Maxillofac Surg* 18(1): 14-16.

Stein M.D., Salkin L.M., Freedman A.L., Glushko V. (1985). Collagen sponge as a topical hemostatic agent in mucogingival surgery. *J Periodontol* 56(1): 35-38.

Stemberger A., Fritsche H.-M., Primbs P., Blümel G. (1978). Fibrinogenkonzentrate und Kollagenschwämme zur Gewebeklebung. Charakterisierung von Klebung und Kleber. *Med Welt* 29(17): 720-724.

Suwannuraks M., Chuansumrit A., Sriudomporn N. (1999). The use of fibrin glue as an operative sealant in dental extraction in bleeding disorder patients. *Haemophilia* 5(2): 106-108.

Vinckier F., Vermylen J. (1985). Blood loss following dental extractions in anticoagulated rabbits: effects of tranexamic acid and socket packing. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 59(1): 2-5.

Wahl M.J. (1998). Dental surgery in anticoagulated patients. *Arch Intern Med* 158(15): 1610-1616.

Wahl M.J. (2000). Myths of dental surgery in patients receiving anticoagulant therapy. *J Am Dent Assoc* 131(1): 77-81.

Waly N.G. (1995). Local antifibrinolytic treatment with tranexamic acid in hemophilic children undergoing dental extractions. *Egypt Dent J* 41(1): 961-968.

Weibert R.T. (1992). Oral anticoagulant therapy in patients undergoing dental surgery. *Clin Pharm* 11(10): 857-864.

Wepner F., Fries R., Platz H. (1982). The use of the fibrin adhesion system for local hemostasis in oral surgery. *J Oral Maxillofac Surg* 40(9): 555-558.

Zöller J., Herrmann A. (1992). Behandlung von Patienten unter Antikoagulanzen-therapie mit Hilfe der Fibrinklebung. *Zahnärztl Prax* 43(10): 382-385.

Zoucas E., Göransson G., Bengmark S. (1984). Comparative evaluation of local hemostatic agents in experimental liver trauma: a study in the rat. *J Surg Res* 37(2): 145-150.

7 Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

Verzeichnis der Abbildungen

	<u>Seite</u>	
Abb. 1 a-d	Stadien der Plättchenadhäsion	4
Abb. 2 a-h	Versorgung einer frischen Extraktionsalveole bei einem gerinnungskompromittierten Patienten	18, 19
Abb. 3a	Kollagen-resorb [®] (RE), Resorba Wundversorgung GmbH & Co. KG, Nürnberg	24
Abb. 3b	Hemocol [®] (HE), Medical Biomaterial Products GmbH, Neustadt-Glewe	24
Abb. 3c	Geistlich (ES), Geistlich Pharma AG, Wolhusen, Schweiz	24
Abb. 4 a-c	Blutdurchflussskammer, Ansichten von oben, vorne und unten	27
Abb. 5 a	Rückseite der Blutdurchflussskammer	28
Abb. 5 b	Vorderseite der Blutdurchflussskammer	29
Abb. 6	Prinzipdarstellung Blutexposition	32
Abb. 7	Makrostruktur der drei Schwämme im Vergleich	32
Abb. 8 a-c	Zunahme der Fluoreszenzeinheiten auf der Schwammoberfläche	35
Abb. 9	Boxplots der Fluoreszenzzunahme pro Fläche nach 60 s Blutströmung	38
Abb. 10 a-d	Rasterelektronenmikroskopische Beurteilung der Probenoberfläche. Vergr.100:1	43

Verzeichnis der Tabellen

	<u>Seite</u>	
Tab. 1	Übersicht über verschiedene klinisch verfügbare Hämostyptika	15
Tab. 2	Übersicht der getesteten Materialien	25
Tab. 3	Lochblende und Verstärkung des Photomultipliers (PMT) der einzelnen Messungen	31
Tab. 4	Deskriptive Statistik der Fluoreszenzzunahme pro $10^5 \mu\text{m}^2$	39
Tab. 5	Induktive Statistik: ONEWAY ANOVA mit Bonferroni-Korrektur	40
Tab. 6	Mittlere pH-Werte nach Inkubation mit isotonischer Kochsalzlösung und Humanserum.	42

8 Zusammenfassung

Fragestellung: Ziel der vorliegenden Studie war es, die Fähigkeit zur Thrombozytenaggregation an verschiedenen Hämostyptika in einer neuartigen Blutdurchflusskammer zu untersuchen.

Material und Methoden: Zwei im Handel erhältliche (Kollagen-resorb[®] [RE], equines Kollagen, nativ; Hemocol[®] [HE], porcines Kollagen, nativ) sowie ein neu entwickelter Kollagenschwamm (experimenteller Schwamm Geistlich [ES], porcines Typ-I- und Typ-III-Kollagen, quervernetzt) wurden im zehnfachen Ansatz in einer Durchflusskammer einer 40 ml/h starken laminaren, antikoagulierten Blutströmung ausgesetzt und adhärierende Thrombozyten mithilfe konfokaler Laserscanmikroskopie erfasst. Als Positivkontrolle diente eine mit Collagen S und als Negativkontrolle eine mit Rinderserumalbumin (BSA) beschichtete Glasplatte. Die Messung der Fluoreszenzzunahme auf der Schwammoberfläche erfolgte über die Zeit (0, 60, 120, 180 s). Die Bildsequenzen wurden zur statistischen Auswertung mithilfe eines Bildverarbeitungsprogramms verrechnet. Des Weiteren erfolgte eine pH-Wert-Bestimmung definierter Schwammengen nach 3-, 30- und 60-minütiger Inkubation mit isotonischer Kochsalzlösung (NaCl) und Humanserum.

Ergebnisse: Alle untersuchten Schwämme zeigten eine vergleichbare Zunahme der Fluoreszenzeinheiten pro mm² Probenoberfläche, die sich nicht signifikant von der Positivkontrolle unterschied ($p > 0,05$, ANOVA). Bei der Bestimmung der pH-Werte ließ sich nach Inkubation mit NaCl eine deutliche Acidität bei allen verwendeten Materialien nachweisen. Bei den mit Humanserum inkubierten Proben zeigten HE und ES eine Überschreitung der Pufferkapazität.

Schlussfolgerung: Die vorgestellte Flusskammer erlaubt eine in vivo nahe Untersuchung der Thrombozytenaggregation an unterschiedliche Materialien. Die untersuchten Schwämme zeigten keine Unterschiede hinsichtlich der Anlagerung von Thrombozyten. Diese könnte jedoch auch rein morphologisch bedingt sein. Die beobachtete Acidität der Materialien könnte klinisch einen negativen Einfluss auf die Aktivierung von Thrombozyten haben. Eine chemische Quervernetzung von Kollagen stellt offenbar keinen Nachteil hinsichtlich der Thrombozytenanlagerung dar. Sie könnte klinisch einen positiven Effekt auf die Stabilisierung eines sich bildenden Blutkoagels haben.

9 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn **Prof. Dr. Jürgen Becker** für die freundliche Überlassung des Themas und seine sehr engagierte Unterstützung dieser Dissertation.

Bei Herrn **Prof. Dr. med. Rüdiger E. Scharf** bedanke ich mich herzlich für die Möglichkeit meine Experimente an seinem Institut durchführen zu dürfen, für die Bereitstellung des CLSM und der Materialien und für die äußerst hilfreiche Unterstützung bei dieser Arbeit.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn **Dr. Dr. Daniel Rothamel** und Herrn **Dr. Volker Stoldt**.

Daniel, vielen Dank für die Unterstützung bei der Rasterelektronenmikroskopie und der statistischen Auswertung der Daten, für die Bereitstellung der klinischen Bilder und insbesondere für die schnelle Korrektur dieser Arbeit. Des Weiteren danke ich Dir für Deine Freundschaft und Deine Unterstützung während meines Studiums und in der Zeit der Arbeit an dieser Dissertation.

Volker, Dir danke ich ganz besonders für Deine hervorragende Betreuung bei der Planung und Durchführung der Experimente, die vielen wertvollen Anregungen und Deine unermüdliche Hilfsbereitschaft über die gesamte Dauer der Arbeit.

Herrn **PD Dr. Frank Schwarz** danke ich für die motivierenden Worte und seine Hilfsbereitschaft vor allem in der letzten Phase der Anfertigung.

Mein Dank gilt ebenfalls Frau **Bianca Weingart-Maaßen** und Frau **Elisabeth Kirchhoff** für die zuverlässige Unterstützung bei Schwierigkeiten im Laboralltag und für ihr hilfreiches Entgegenkommen bei allen auftretenden Fragen.

Auch Frau **Dr. Monika Herten** danke ich für ihre stete Hilfsbereitschaft.

Allen meinen **Kollegen und Freunden** danke ich für jegliche Hilfe, sei es durch Gespräche, Tipps bei Computerfragen oder aufmunternde Worte. Sie haben zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Meiner Freundin **Ilka Röhr** danke ich für ihre beständige Unterstützung, Motivation und das Interesse an meiner Arbeit.

Meinem Mann **Guido Schröder** danke ich für seine Hilfe bei Formatierungs- und Layoutfragen und für seine Geduld und Hilfsbereitschaft vor allem in der Endphase meiner Arbeit.

Mein letzter und größter Dank gilt meinen Eltern **Sonia und Dr. Dr. Kurt Kotthaus**, die mir das Studium der Zahnmedizin ermöglicht haben und mich während des gesamten Weges unterstützt haben.

10 Lebenslauf

Vor- und Familienname: Carolin Adrienne Kotthaus
Geburtsdatum und -ort: geb. am 10.12.1976 in Kairo, Ägypten
Staatsangehörigkeit: deutsch

Eltern: Sonia Kotthaus, Dr. Dr. Kurt Kotthaus
Geschwister: Alexandra (geb. 1978), Catherine (geb. 1981),
Helena (geb. 1984) und Marieluise (geb. 1986)

1983 – 1987 städt. Gemeinschaftsgrundschule
an der Trooststraße, Mülheim an der Ruhr

1987 – 1996 staatl. anerk. Mädchengymnasium B.M.V.-Schule,
Essen, Abschluss: Abitur

Januar – August 1997 Praktikum im Laboratorium für Zahnersatz
Eckart Bohrmann, Oberhausen

Oktober 1997 – Juni 2004 Studium der Zahnmedizin,
Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf

Mai 2004 Posterpräsentation der Dissertation auf der
55. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft für
Kieferchirurgie, Bad Homburg

Juni 2004 Staatsexamen und Approbation als Zahnärztin

seit September 2004 Wissenschaftliche Mitarbeiterin des
Universitätsklinikums Düsseldorf,
Westdeutsche Kieferklinik,
Poliklinik für Zahnärztliche Prothetik