

Aus der Klinik für Anästhesiologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

(Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. B. Pannen)

**Small-Volume-Resuscitation - Einfluss kolloidaler und hypertoner
Lösungen auf die Blutgerinnung und Thrombozytenfunktion ex vivo**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

vorgelegt von
Stephanie Maschler

2011

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

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

Referent: apl. Prof. Dr. med. Peter Kienbaum

Korreferent: Prof. Dr. med. Sascha Flohe

INHALTSVERZEICHNIS	SEITE
1. Einleitung	4
2. Material und Methoden	7
2.1. Material	7
2.1.1. Blutproben	7
2.1.2. Simulierter Blutverlust und Volumentherapie	7
2.2. Methoden	8
2.2.1. Untersuchung der Blutgerinnungsbildung (ROTEM®-Analyse)	8
2.2.2. Untersuchung der Thrombozytenfunktion (Multiplate®-Analyse)	10
2.2.3. Morphologische Untersuchungen	12
2.2.4. Studienprotokoll	12
2.3. Statistik	13
3. Ergebnisse	14
3.1. Einfluss der Verdünnungen auf die Blutgerinnungsbildung (ROTEM®-Analysen)	14
3.1.1. Aktivierung mit Thromboplastin (ExTEM)	14
3.1.2. Cytochalasin D Vorbehandlung und Aktivierung mit Thromboplastin (FibTEM)	15
3.2. Einfluss der Verdünnungen auf die Thrombozytenaggregation (Multiplate®-Analysen)	16
3.3. Elektronenmikroskopische Untersuchungen	18
4. Diskussion	19
5. Zusammenfassung	25
6. Verwendete Abkürzungen	26
7. Literaturverzeichnis	27
8. Anhang	32
9. Lebenslauf	35
10. Danksagung	37

1. EINLEITUNG

Ein grundlegendes Behandlungskonzept polytraumatisierter Patienten ist die Aufrechterhaltung ausreichender Kreislaufverhältnisse sowohl während der Primärversorgung des Notfallpatienten als auch während der intraoperativen und sich anschließender intensivmedizinischen Weiterbehandlung (S1-Leitlinie Polytrauma der Deutschen Gesellschaft für Unfallchirurgie, 2002).

Ein hämorrhagischer Schock führt zu Störungen der Makro- und Mikrozirkulation, die nach Wiedereröffnung der Strombahn nicht perfundierter Gefäßabschnitte mit einem Reperfusionssyndrom assoziiert sind. Dabei werden Sauerstoffradikale freigesetzt sowie das Komplement-Kallikrein-Kinin-System, die Gerinnung und Fibrinolyse aktiviert. Darüber hinaus spielt die Freisetzung von Zytokinen (z.B. TNF- α , Interleukine) für die Ausbildung multipler Organfunktionsstörungen eine große Rolle. Eine frühzeitige Kreislaufstabilisierung und damit Verbesserung der Mikrozirkulation ist in dieser Situation „outcome“-relevant (Spinella PC, Holcomb JB: 2009).

Zur Therapie des hämorrhagischen Schocks werden zunächst am Unfallort mitunter große Volumina kristalliner und synthetischer kolloidaler Lösungen bis zu dem Zeitpunkt infundiert, zu dem Blut und Plasmaderivate in der Regel im primär versorgenden Krankenhaus verfügbar sind. Dabei ist keineswegs wissenschaftlich geklärt, ob prähospital eher kristalline oder kolloidale Lösungen infundiert werden sollten (Bunn F et al.: 2004). Kristalline Lösungen haben den Nachteil einer nur unzureichenden hämodynamischen Stabilisierung und müssen in großen Mengen gegeben werden. Dadurch werden interstitielle Ödembildung und eine weitere Verschlechterung des pulmonalen Gasaustausches gefördert. Aus diesem Grund erachten viele Notärzte die Gabe kolloidaler Lösungen für die initiale Behandlung des hämorrhagischen Schocks für vorteilhaft. Demgegenüber sollten mögliche Risiken durch anaphylaktische Reaktionen, Beeinflussung der Blutgerinnung und/oder Thrombozytenfunktion sowie Speicherung bzw. Akkumulation abgewogen werden.

In den letzten Jahren wurde alternativ die Gabe vergleichsweise geringer Volumina hypertoner (hyperosmolarer) Lösungen zur Behandlung des hämorrhagischen Schocks in Notfallsituationen

etabliert (Wade CE et al: 1997). Da häufig bereits nach intravenöser Gabe geringere Volumina (ca. 4 ml/kg Körpergewicht) eine hämodynamischen Stabilisierung erreicht werden kann, ist der Begriff „small-volume-resuscitation“ eingeführt worden (Kramer GC et al: 1986, Messmer K, Kreimeier U: 1989). Da hypertone Kochsalzlösungen nur kurze Zeit hämodynamisch wirksam sind, werden sie mit Kolloiden zur Verlängerung der Wirkdauer kombiniert. Eine am häufigsten untersuchte hypertone Lösung zur Therapie des Volumenmangelschocks ist die Kombination einer hypertonen Kochsalzlösung (NaCl 72 g/l) mit Hydroxyethylstärke (60 g/l, Molekulargewicht 200 kDa, Substitutionsgrad 0.5; HyperHAES®, Fresenius-Kabi, Bad Homburg).

In einer österreichischen Studie über den Zeitraum 1991–2000 sind 56.000 Einheiten hypertoner Kochsalzlösung bei 18.000 bis 37.000 polytraumatisierten Patienten bei hämorrhagischem Schock zur Kreislaufstabilisierung verabreicht worden (Schimetta et al: 2002). Unerwünschte kardiovaskuläre und neurologische Arzneimittelwirkungen sind bei etwa 5 pro 100.000 verabreichten Einheiten beschrieben worden.

Während die Auswirkungen kolloidaler Volumenersatzmittel auf die Gerinnung bereits experimentell und klinisch untersucht worden sind, ist der Einfluss hypertoner hyperosmolar Lösungen auf Blutgerinnung und Thrombozytenfunktion bisher unzureichend untersucht (Treib J et al.: 1996; de Jonge E, Levi M: 2001, Haas T et al.: 2008). Bei gerinnungsgesunden Patienten führt die intraoperative Gabe hypertoner hyperosmolarer Lösung in Vergleich zur alleinigen Gabe von Hydroxyethylstärke zu einer signifikant verlängerten Gerinnselfestigkeit sowie zu einer reduzierten Gerinnselfestigkeit (Innerhofer P et al.: 2002). In diesem Zusammenhang stellen sich die Fragen, welche Komponente der hypertonen hyperosmolaren Lösung für die beobachteten Gerinnungsstörungen verantwortlich ist und ab welchem Blutverlust diese Veränderungen auftreten.

Für eine erste orientierende Untersuchung sind möglichst standardisierte Rahmenbedingungen von großer Bedeutung, so dass eine klinische Untersuchung an polytraumatisierten Patienten auf Grund der präklinischen polypragmatischen Vorbehandlung zunächst für die Untersuchung eines Mechanismus

nicht geeignet erscheint. Daher betrachtet die vorliegende Untersuchung die Beeinträchtigung von Blutgerinnung und Thrombozytenfunktion durch simulierte Blutverlustes ex vivo. Außerdem werden die Effekte einer hypertonen kolloidalen Lösung und deren einzelner Komponenten auf ausgewählte Variablen der Blutgerinnung und Thrombozytenfunktion quantifiziert.

2. MATERIAL UND METHODEN

Nach Billigung des Studienprotokolls durch die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf (Studiennummer 2953, Bescheid vom 22. August 2007) wurden die vorliegenden Untersuchungen unter Beachtung der Helsinki Deklarationen an der Klinik für Anästhesiologie, Universitätsklinikum der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf, durchgeführt.

2.1. Material

2.1.1. Blutproben

Zehn gesunde freiwillige Probanden nahmen nach Aufklärung und schriftlichem Einverständnis an der Studie teil. Keiner der Probanden nahm in den letzten 14 Tagen vor der Untersuchung Medikamente ein. Venöses Blut wurde aus einer nicht gestauten, oberflächlichen Vene im Bereich der Ellenbeuge unter sterilen Bedingungen mit einer kommerziell verfügbaren Nadel (Innendurchmesser 0.9 mm) entnommen und in kommerziell verfügbare Röhrchen mit Zitrat oder Heparin als Antikoagulanzen (Vacutainer®, Beckon Dickenson, Heidelberg) überführt.

2.1.2. Simulierter Blutverlust und Volumentherapie

Die abgenommenen Blutproben wurden für den Untersucher verblindet in jeweils vier Therapiegruppen unterteilt. Unterschieden wurden die folgenden Gruppen:

1. (HH): hypertone Kochsalzlösung mit Hydroxyethylstärke (HyperHaes®, Fresenius Kabi, Bad Homburg),
2. (HT): 7.5 % hypertone Kochsalzlösung,
3. (HES): 6% Hydroxyethylstärke (HAES-steril 6%®, Fresenius Kabi, Bad Homburg, mittleres Molekulargewicht 200.000 DA, molare Substitution 0,43-0,55) und
4. (ISO): isotonische Kochsalzlösung als Kontrollgruppe.

2.2. Methoden

2.2.1. Untersuchung der Blutgerinnelbildung (ROTEM®-Analyse)

Das Messverfahren der Thrombelastographie wurde 1948 erstmalig von Hartert beschrieben (Hartert H: 1948). Dieses Verfahren erlaubt die Beurteilung des Hämostasesystems als ganzheitlichen dynamischen Prozess, der neben Gerinnungszeiten auch die mechanische und zeitliche Stabilität des Gerinnsels erfasst. Im Gegensatz zur klassischen Rotationsthrombelastographie wird bei der Thrombelastometrie (ROTEM®) nicht der Cup, sondern der Pin bewegt, der durch ein Präzisionskugellager stabilisiert wird (Abbildung 1.; Franz RC: 2008; Calatzis A et al.: 2000).

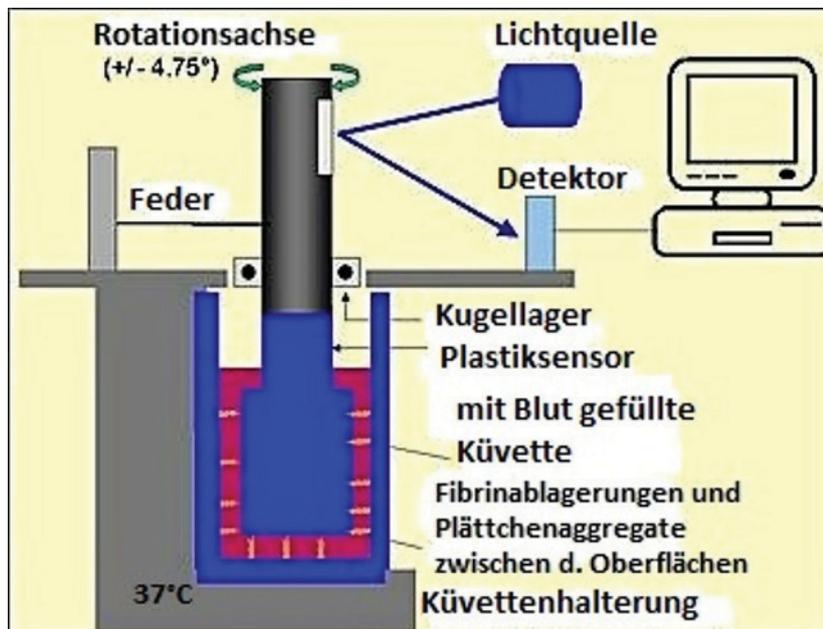


Abbildung 1: Schematische Darstellung des ROTEM®-Messaufbaus.

Hierdurch werden erschütterungsbedingte Artefakte minimiert, was auch einen mobilen Einsatz des Gerätes erlaubt. Das ROTEM®-System verfügt über vier unabhängige Messkanäle, so dass zeitgleich vier verschiedene Tests durchgeführt werden können. Diese Tests erfolgen im Citratblut und werden durch Rekalzifizierung und Zugabe unterschiedlicher Aktivatoren gestartet. Zur Aktivierung des

extrinsischen Gerinnungssystems wird im EXTEM®-Test der Gewebefaktor Thromboplastin, der aus Kanninchenhirn hergestellt wird, verwendet. Darüber hinaus ist ein Heparininhibitor enthalten, der Heparineffekte eliminiert.

Im Gegensatz zu konventionellen Gerinnungstests erfasst die ROTEM®-Analyse nicht nur Gerinnungszeiten (CT: coagulation time in [s]), sondern auch die Dynamik der Gerinnselbildung (CFT: clot formation time in [s]), die mechanische Gerinnselstabilität (Amplitude nach 5, 10 oder 15 min in [mm]), die maximale Gerinnselstabilität (MCF: maximum clot firmness in [mm]) sowie die Stabilität über die Zeit (CLI: clot lysis index in [%]; Abbildung 2.).

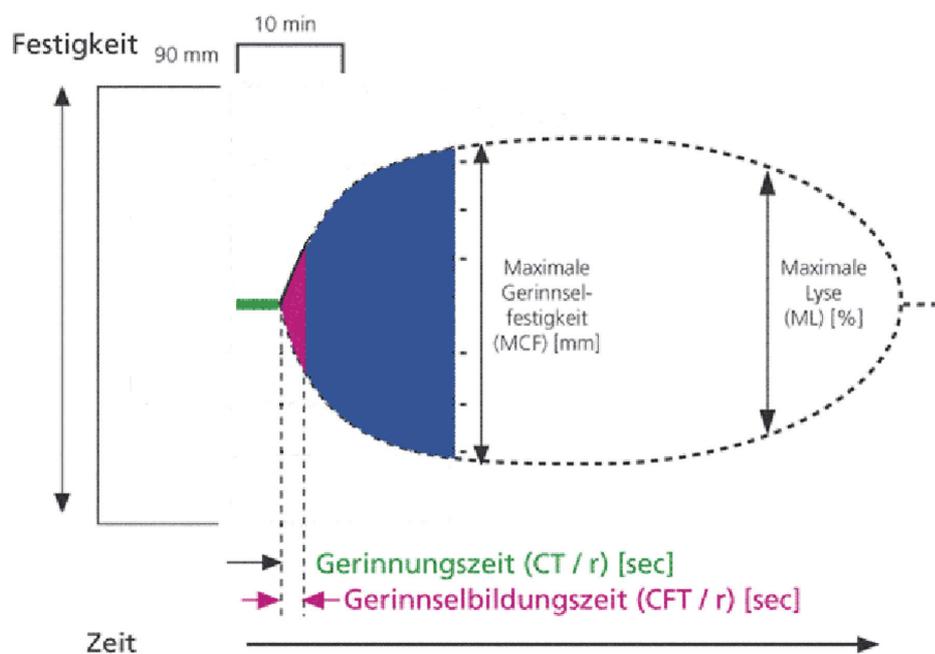


Abbildung 2: Schematische Darstellung eines in der ROTEM-Analyse gemessenen Thrombelastogramms.

Durch die Verwendung aktivierter Tests können die Ergebnisse bereits 10-15 min nach Beginn der Aktivierung interpretiert werden. Die Gerinnselfestigkeit erreicht ihr Maximum in der Regel nach 20-30 min. Zur Evaluation einer späten Hyperfibrinolyse sollte die Messung über 60 min fortgesetzt werden. Zur Differenzierung zwischen thrombozytärer und plasmatischer Gerinnungstörung wird zunächst die Thrombozytenfunktion durch Zugabe von Cytochalasin D blockiert und danach durch Aktivierung mit Thromboplastin die Fibrinpolymerisation bestimmt (FibTEM).

Die ROTEM®-Analyse erlaubt die Erfassung einer Hyperfibrinolyse, eines Fibrinogenmangels, von Fibrinpolymerisationsstörungen, eines ausgeprägten Mangels an enzymatischen Gerinnungsfaktoren, von Heparineffekten, einer Thrombozytopenie sowie von schweren Thrombozytopathien.

Die Untersuchungen werden limitiert durch eine fehlende Sensitivität für ein Von-Willebrand-Syndrom und Effekte von Thrombozytenaggregationshemmern (z.B. Acetylsalicylsäure, Clopidogrel), da diese Effekte durch die massive Thrombingeneration durchbrochen werden.

Ferner führen GP-IIb/IIIa-Rezeptorantagonisten oder eine milde Thrombasthenie Glanzmann nicht grundsätzlich zu einer verminderten Gerinnselfestigkeit in der ROTEM®-Analyse.

Da die Gerinnungszeit im EXTEM nur schlecht mit dem Quick-Wert bzw. der INR (international normalized ratio) korreliert, eignet sich diese Analyse nicht zur Überwachung einer Therapie mit oralen Antikoagulanzen (Görlinger K et al.: 2008).

2.2.2. Untersuchung der Thrombozytenfunktion (Multiplate®-Analyse)

Die von Cardinal und Flower entwickelte Impedanzaggregometrie wird seit etwa 30 Jahren zur Untersuchung der Thrombozytenfunktion im Vollblut eingesetzt. Die Multiplate®-Analyse wird in einer Einmalküvette mit einem Doppelsensor und einem Polytetrafluorethylen-beschichteten Magnetrührer durchgeführt. Kommt es auf den silberbeschichteten Sensordrähten zur Thrombozytenadhäsion- und aggregation, erhöht dies die Impedanz zwischen den Drähten.

Die Veränderung der Impedanz wird kontinuierlich registriert und in willkürlichen „aggregation units“ [AU] angegeben.

Im Rahmen der Analyse können die Aggregation [AU], die „Velocity“ [AU/min] und die Fläche unter der Aggregationskurve (AUC: Area under the curve [AU x min]) quantifiziert werden. Dabei hat die AUC die höchste diagnostische Aussagekraft (Calatzis A et al.: 2004; Görlinger K et al.: 2008; Abbildung 3.).

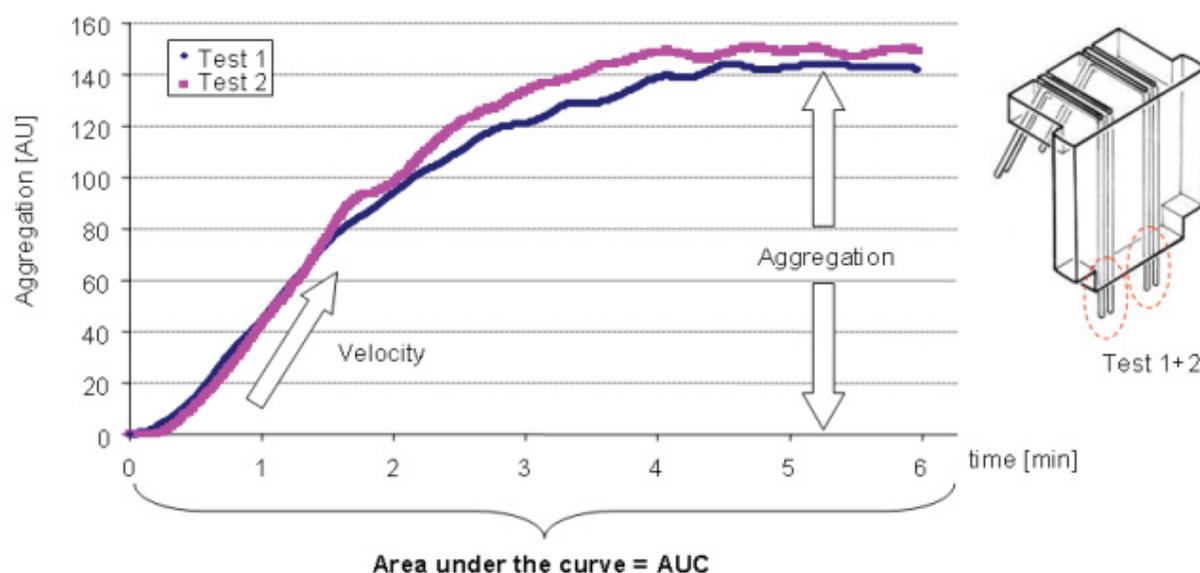


Abbildung 3: Schematische Darstellung Multiplate®-Analyse mit Markierung der planimetrisch bestimmten Fläche unter der Kurve (AUC).

Als Probenmaterial wird bei der Multiplate®-Analyse antikoaguliertes Vollblut verwendet. Hierdurch entfallen zeitaufwendige Probenvorbereitungen (z.B. Zentrifugieren, Einstellen der Probe auf eine bestimmte Thrombozytenzahl), wie es für die Born-Aggregometrie erforderlich ist. Als Antikoagulantien können Heparin und Hirudin verwendet werden.

Da Thrombin der potenteste Thrombozytenaktivator ist, haben wir im Rahmen dieser Studie „thrombin receptor-activating peptide 6“ (TRAP-Test) zur Thrombozytenaktivierung verwandt. Hierdurch werden die thrombozytären Thrombinrezeptoren PAR1 und PAR4 stimuliert (Calatzis A et al.: 2004).

Die Ergebnisse der Multiplate®-Analyse korrelieren signifikant mit der Thrombozytenzahl und spiegeln die Interaktion von Thrombozyten mit Leukozyten und Erythrozyten wider. In Hinblick auf ein Von-Willebrand-Syndrom existieren nur wenige Daten zur Sensitivität (Favarolo EJ et al.: 1999; Görlinger K et al.: 2008).

2.2.3. Morphologische Untersuchungen

Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen (Jeol 35 CF SEM, Vergrößerung 1:2.000 und 1:5.400) zur Darstellung der morphologischen Veränderungen wurden am Institut für Anatomie, Medizinische Fakultät der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf durchgeführt und von Herrn Dr. Klaus Zanger zur Verfügung gestellt.

2.2.4. Studienprotokoll

Die Blutproben wurden unmittelbar nach Blutentnahme im Verhältnis jeweils entsprechend der Therapiegruppe (HH, HT, HES und ISO) 1:20, 1:10, 1:5 und 1:2,5 gemischt, um eine Blutverdünnung von 5, 10, 20 und 40 Prozent zu simulieren.

Danach wurden die Gerinnungszeit (CT) und die maximale Gerinnselfestigkeit (MCF) im ExTEM und FibTEM sowie die Thrombozytenaggregation in jeder Blutprobe (Multiplate®) in randomisierter Reihenfolge bestimmt.

2.3. Statistik

Dargestellt sind Median, die Abstände zwischen den Quartilen („*interquartile ranges*“), sowie Maximum und Minimum. Statistische Vergleiche wurden mit Hilfe eines Friedman-Tests über die Verdünnungen und zwischen den Gruppen durchgeführt.

Vergleiche der einzelnen Mediane erfolgten durch einen Wilcoxon-Test (SPSS für Windows, Version 13.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Ein p-Wert kleiner 0.01 wurde für statistisch signifikant angesehen.

Die graphische Darstellung der Ergebnisse wurde mit Hilfe des Programms GraphPad Prism (Version 4.02, GraphPad Software Inc., San Diego CA, USA) erzeugt.

3. ERGEBNISSE

3.1 Einfluss der Verdünnungen auf die Blutgerinnselbildung (ROTEM®-Analysen)

3.1.1. Aktivierung mit Thromboplastin (ExTEM)

Nach extrinsischer Aktivierung (ExTEM) war die maximale Gerinneselfestigkeit (MCF) in allen Verdünnungsgruppen dosisabhängig und statistisch signifikant reduziert. HH und HT wurden dosisabhängig im Vergleich zum Ausgangswert (57,3 mm) auf $1,7 \text{ mm} \pm 3,3$ (HH) und $6,6 \pm 6,6$ (HT) mm gehemmt. Im Gegensatz dazu wurde die MCF durch Verdünnung mit ISO und HES selbst bei starker Verdünnung von 1:2,5 nur geringfügig eingeschränkt (Abbildung 4).

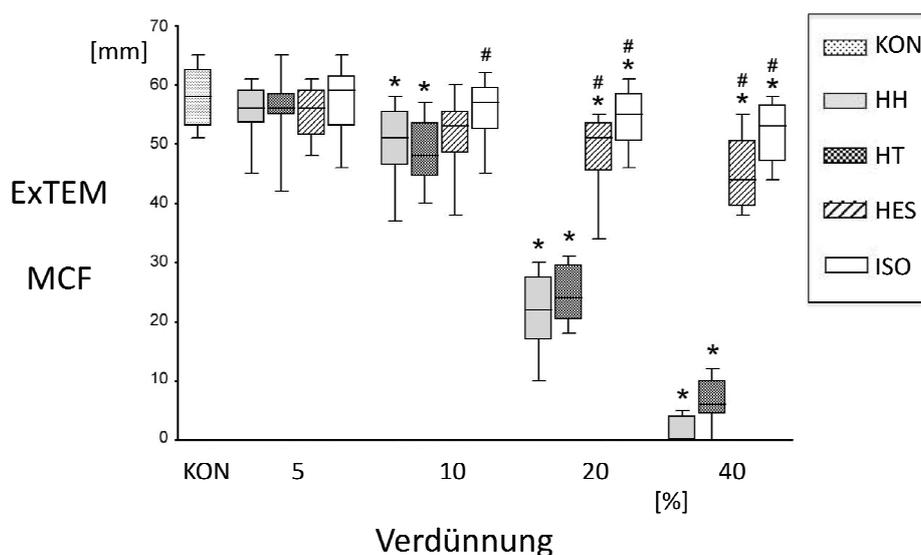


Abbildung 4.: Maximale Gerinneselfestigkeit im ExTEM dargestellt in [mm] mit ansteigender Verdünnung der Vollblutproben, * $p < 0.01$ vs. KON, # $p < 0.01$ vs. HH bei identischer Verdünnung

Die Gerinnungszeiten (CT) waren bei Verdünnung mit HH, HT und HES in der stärksten Verdünnungsstufe von 70,9 s \pm 86 auf über 350 s \pm 650 signifikant verlängert. Diese Verlängerung der CT war wiederum bei HH und HT signifikant ausgeprägter als bei HES. Die alleinige Verdünnung mit ISO führte lediglich zu einer geringfügigen Einschränkung der Gerinnungszeiten (Abbildung 5).

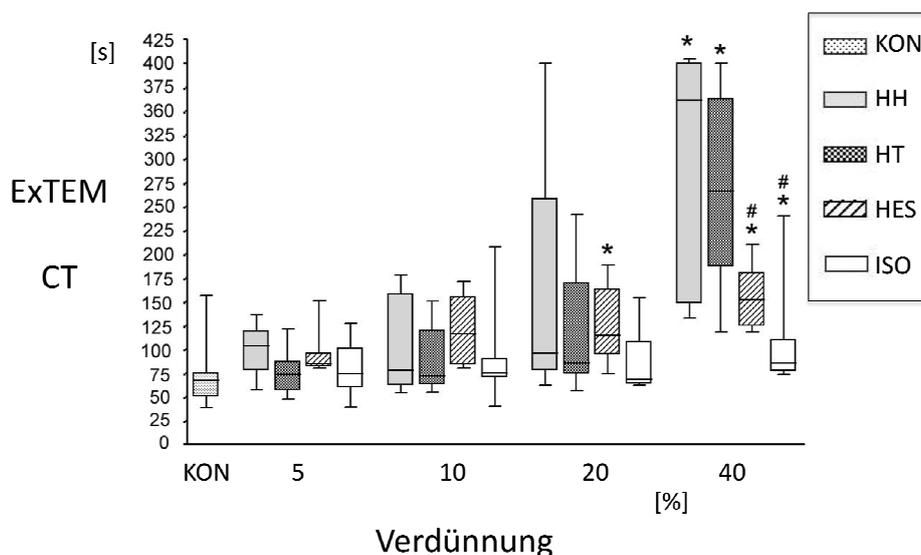


Abbildung 5.: Gerinnungszeiten im ExTEM dargestellt in [s] mit ansteigender Verdünnung der Vollblutproben, * $p < 0.01$ vs. KON, # $p < 0.01$ vs. HH bei identischer Verdünnung

3.1.2. Vorbehandlung mit Cytochalasin D und Aktivierung mit Thromboplastin (FibTEM)

Die Fibrinpolymerisation war in allen Gruppen durch Verdünnung dosisabhängig und statistisch signifikant eingeschränkt. Dabei war die MCF bei Verdünnung mit HH von 12,3 mm \pm 4,3 auf 3,4 \pm 3,4 und bei Verdünnung mit HES auf 3,3 mm \pm 3,3 am ausgeprägtesten gehemmt, während die alleinige Verdünnung mit ISO lediglich zu einer geringfügigen Einschränkung der maximalen Gerinnselfestigkeit führte (Abbildung 6)

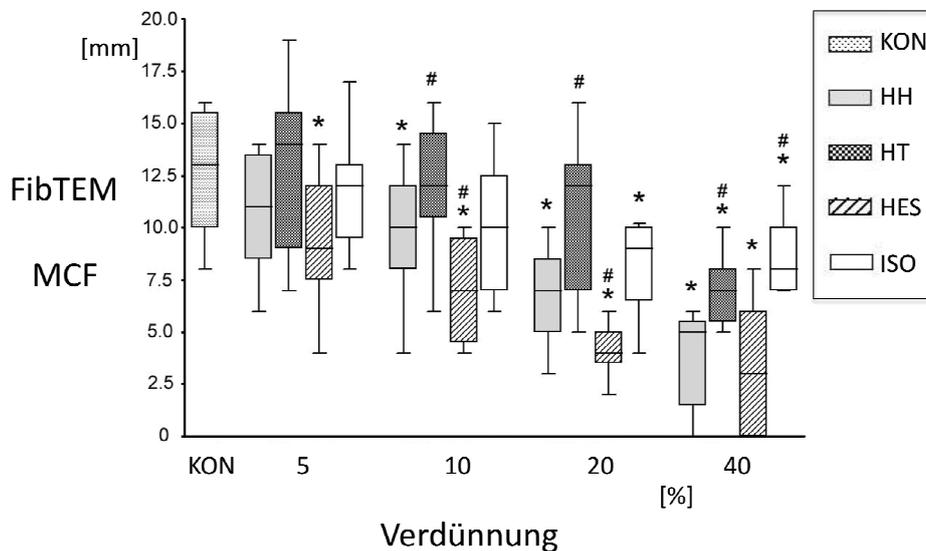


Abbildung 6.: Maximale Gerinnselfestigkeit im FibTEM dargestellt in [mm] mit ansteigender Verdünnung der Vollblutproben, * $p < 0.01$ vs. KON, # $p < 0.01$ vs. HH bei identischer Verdünnung

3.2. Einfluss der Verdünnungen auf die Thrombozytenaggregation (Multiplate®-Analysen)

Die Thrombozytenaggregation war in allen Gruppen durch Verdünnung dosisabhängig und statistisch signifikant eingeschränkt. Dabei wurde durch HH und HT bereits bei einer Verdünnung von 20 Prozent die Thrombozytenaggregation fast vollständig blockiert. Im Gegensatz dazu hemmten sowohl HES als auch ISO die Thrombozytenaggregation lediglich um etwa 50 Prozent (Abbildung 7).

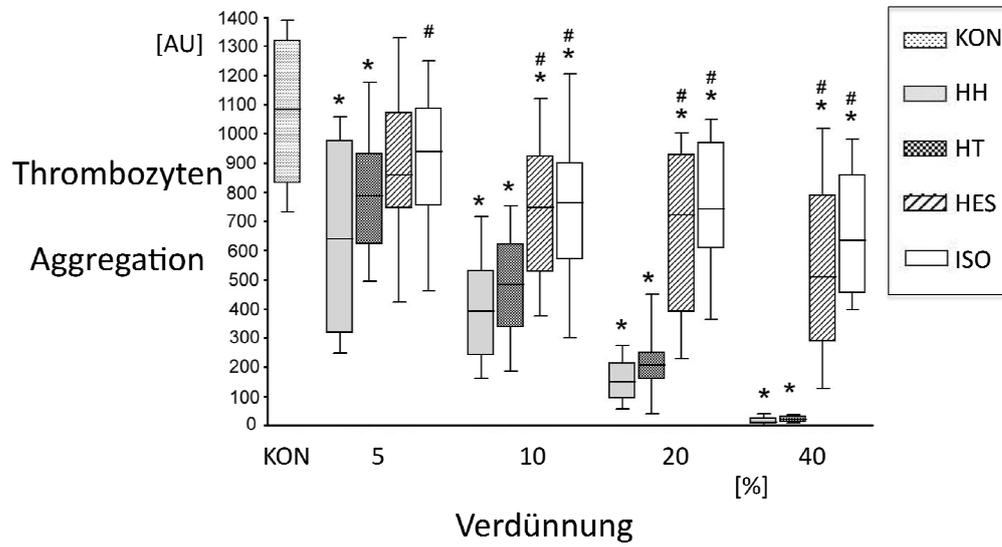


Abbildung 7.: Thrombozytenaggregation nach TRAP-Aktivierung im Multiplate®-Analyser mit ansteigender Verdünnung der Vollblutproben, * $p < 0.01$ vs. KON, # $p < 0.01$ vs. HH bei identischer Verdünnung

3.3. Elektronenmikroskopische Untersuchungen

Die Thrombozyten in den mit HyperHaes verdünnten Blutproben wiesen in den mikroskopischen Untersuchungen deutliche Deformierungen auf und bildeten verschieden große Aggregate

(s.Abb. 8 B, D).

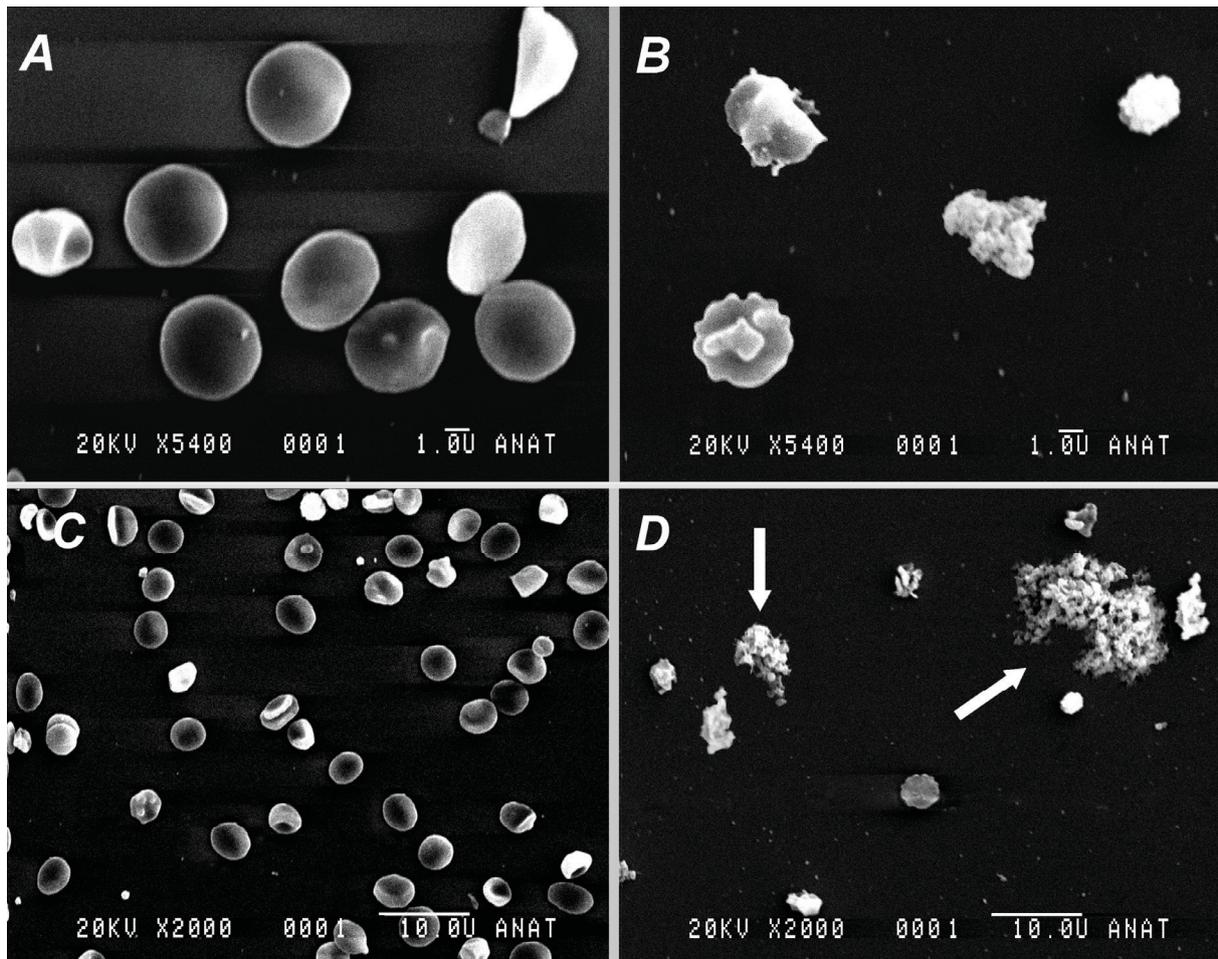


Abbildung 8. A-D: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen nativer Thrombozyten (A+C) sowie Thrombozyten nach Behandlung mit HH bei einer Verdünnung von 40% (B+D). Die Vergrößerung wurde 2000-fach (C+D) sowie 5.400-fach (A+B) gewählt. Auffällig sind sowohl einzelne deformierte Thrombozyten im Sinne einer Dehydrierung (B) sowie große Thrombozytenaggregate (D, Markierung durch Pfeile).

4. DISKUSSION

Hypertone hyperosmolare Lösungen („*small volume resuscitation*“) schränken Blutgerinnung und Thrombozytenfunktion in vitro dosisabhängig massiv ein. Diese Wirkungen lassen sich nicht durch alleinige Verdünnung von Gerinnungsfaktoren und Thrombozyten im Vollblut erklären. Unsere Ergebnisse zeigen vielmehr, dass bei Gabe einer hypertonen hyperosmolaren Lösung in vitro die hypertone Kochsalzlösung für die eingeschränkte Thrombozytenfunktion verantwortlich ist. Als zu Grunde liegenden Mechanismus vermuten wir eine Dehydrierung und Aggregation der Thrombozyten, die gleichzeitig mit der gemessenen Funktionseinschränkung auftritt.

Beschreibung der erhobenen Befunde

Die systematische Untersuchung von Blutgerinnung und Thrombozytenfunktion ist bei polytraumatisierten Patienten logistisch aufwendig und auf Grund eines häufig sehr inhomogenen Patientenkollektives schwierig zu interpretieren. Insbesondere werden wichtige Schritte der Blutstillung und Gerinnung nicht durch globale Funktionstests (z.B. Quick-Wert, partielle Thromboplastinzeit) oder durch Thrombozytenzählung angemessen dargestellt. Daher haben wir Point-of-care Methoden mit einem Ansatz im Vollblut gewählt, um die physiologischen Gegebenheiten bei akuter Blutung möglichst vergleichbar zu simulieren (Görlinger K et al: 2008). Durch ROTEM- und Multiplate-Analysen haben wir die Wirkung einer hypertonen hyperosmolaren Lösung dosisabhängig quantifiziert und die beobachteten Wirkungen der einzelnen Komponenten, d.h. der hypertonen Kochsalzlösung bzw. der Hydroxyethylstärke, einer alleinigen Verdünnung mit isotonischer Kochsalzlösung gegenübergestellt.

Hypertone hyperosmolare Lösungen führen zu einer massiven Einschränkung der globalen Blutgerinnung, dargestellt als Reduktion der MCF in der ExTEM-Analyse bereits bei einer Verdünnung von 1:20. Dabei wird der Haupteffekt wahrscheinlich durch eine vollständige Blockade der im Multiplate nachgewiesenen Thrombozytenfunktion vermittelt. Die Einschränkung auf die Fibrinpolymerisation ist demgegenüber nur in geringerem Ausmaß objektivierbar. Von Bedeutung ist in diesem

Zusammenhang, dass die alleinige Verdünnung von Gerinnungsfaktoren und Thrombozyten die Einschränkungen der Blutgerinnung und Thrombozytenfunktion nicht hinreichend erklärt.

Da hypertone hyperosmolare Lösungen aus den Komponenten einer hypertonen Kochsalzlösung und Stärke besteht, stellt sich die Frage, welche Komponente nun für die beobachtete Einschränkung der Blutgerinnung und Hemmung der Thrombozytenfunktion verantwortlich ist. Zur Klärung dieser Frage wurden daher Versuche mit hypertoner Kochsalzlösung (HT) bzw. Hydroxyethylstärke (HES) durchgeführt. Dabei fanden wir heraus, dass die Einschränkung der Thrombozytenfunktion im Wesentlichen der hypertonen Kochsalzkomponente zuzuschreiben ist. Demgegenüber wird bei Ausschluss der Thrombozytenfunktion lediglich ein geringer Effekt auf die Fibrinpolymerisation beobachtet, der hauptsächlich durch Hydroxyethylstärke vermittelt wird. Somit beeinträchtigen hypertone hyperosmolare Lösungen in erster Linie die Thrombozytenfunktion (HT) und erst nachgeordnet die Fibrinpolymerisation (HES). Demgegenüber wird die Gerinnungszeit, die im hauptsächlich durch die Konzentration der Gerinnungsfaktoren bedingt ist, nur in geringerem Ausmaß verlängert.

Der Effekt der Hydroxyethylstärke auf die Fibrinpolymerisation ist in der Literatur bereits gut bekannt (Nielsen VG: 2005a+b; Fries D et al.: 2006a+b; Brinkman AC et al.: 2010) und wird auch in der vorliegenden Untersuchung bestätigt. Als Mechanismus wird die Verdünnung von Fibrinogen (Fries D et al.: 2002) und eine geringere Faktor XIII-vermittelte Fibrinvernetzung zu Gerinnselstabilisierung angenommen (Nielsen VG: 2005a+b), deren molekularer Mechanismus bisher nicht geklärt ist.

Mit Hilfe elektronenmikroskopischer Untersuchung beschreiben wir erstmalig, dass Thrombozyten nach Behandlung mit hypertoner hyperosmolarer Lösung ex vivo im Vergleich zu Kontrollbedingungen dehydriert sind und größere Aggregate bilden. Die gefundenen Thrombozytenaggregate sind vermutlich mit einer Thrombozytenfunktionseinschränkung assoziiert. Darüber hinaus wäre es zumindest denkbar, dass diese Aggregate kleinere Kapillaren verschließen könnten. Ob hierdurch im Schock beschriebenen

Mikrozirkulationsstörungen verstärkt würden, müsste in weiterführenden Untersuchungen geklärt werden.

Simulierter Blutverlust und Erklärung des Studienprotokolls

Bei Erwachsenen beträgt das normale Blutvolumen etwa 70-80 ml kg⁻¹ Körpergewicht. Bei einer empfohlenen Dosierung hypertoner hyperosmolarer Lösungen im hämorrhagischen Schock von 4 ml kg⁻¹ Körpergewicht (siehe Fachinformation HyperHAES von Fresenius Kabi, ROTE LISTE online) würde ohne stattgehabten Blutverlust eine Verdünnung des rechnerischen Blutvolumens von etwa 1:20 erreicht werden. In der akuten Blutungssituation ist das zirkulierende Blutvolumen jedoch deutlich geringer, so dass sich das Verhältnis von vorhandenem Blutvolumen zur Standarddosis der zu infundierenden hypertonen hyperosmolaren Lösung weiter zugunsten der Letztgenannten verändert. Somit ist der Verdünnungseffekt in dieser Situation als größer anzunehmen. Aufgrund dieser Überlegungen haben wir für unser Studienprotokoll eine minimale Verdünnung von 1:20 angenommen und darüber hinaus höhere Verdünnungen von bis zu 1:2,5 durchgeführt. Dadurch werden die in der akuten Blutungssituation anzutreffende Konzentrationen an Volumenersatzmitteln ex vivo erreicht. Ferner erlauben die höheren Verdünnungen die Wirkung einer anzunehmenden relativen Überdosierung bei massiver Hämorrhagie zu quantifizieren.

Klinische Bedeutung der erhobenen Befunde

In tierexperimentellen Untersuchungen führte die Gabe hypertoner Kochsalzlösungen bei akuter unkontrollierter Blutung, herbeigeführt durch standardisierte Amputation des Schwanzes bei Ratten, zu einer Erhöhung des Blutverlustes (Gross D et al. 1989; Krausz MM et al.: 1992). Allerdings wurden keine Untersuchungen mit hyperosmolaren Lösungen durchgeführt. Demgegenüber war unter Gabe von hypertoner hyperosmolarer Lösung bei standardisierter Leberverletzung in einem Schweinmodell der Blutverlust geringer ausgeprägt als bei alleiniger Infusion kolloidaler Lösungen (Haas T et al.: 2008). Jedoch wurden in dieser Studie vergleichbar mit der Situation im Schockraum oder Operationssaal

aufbereitete Erythrozyten retransfundiert, so dass der gerinnungshemmende Effekt auch durch die Retransfusion beeinflusst hätte werden können. Darüber hinaus war auch die Dosis verabreichter Kolloide unverhältnismäßig hoch (im Verhältnis 1:1 zum Blutverlust), sodass die Verdünnung von Gerinnungsfaktoren maßgeblich zur eingeschränkten Blutgerinnung hätte beitragen können.

Verschiedene klinische Untersuchungen haben die Bedeutung einer Behandlung mit hypertonen hyperosmolaren Lösungen bei Blutverlusten unterschiedlicher Ursache untersucht. Dabei wurden günstige Effekte beim Thoraxtrauma (Wade CE et al.: 2003), schweren Schädel-Hirn-Trauma (Hartl R et al.: 1997, Horn P et al.: 1999), bei herzchirurgischen Eingriffen (Boldt J et al.: 1993, Boldt J et al.: 1994; Palmgren I et al.: 1998; Sirieix D et al.: 1999) und bei gefäßchirurgischen Operationen (Christ F et al.: 1997; Ragaller M et al.: 2000; Shackford SR et al.: 1983) gesehen. Demgegenüber zeigten Metaanalysen mit Einschluss von 956 Patienten keine oder nur geringfügige Effekte auf das Überleben durch Gabe hypertoner hyperosmolarer Lösungen in Vergleich zur alleinigen Applikation hypertoner Lösungen (Bunn F et al.: 2004; Perel P, Roberts I: 2007; Wade et al.: 1997).

Zusammenfassend liegen bei Anwendung hypertoner hyperosmolarer Lösungen im hämorrhagischen Schock zum Teil widersprüchliche Daten in Hinblick auf „outcome“ und Überleben vor. In diesem Zusammenhang könnten günstige Kreislaufeffekte nach Applikation hypertoner hyperosmolarer Lösungen mit dem von uns beschriebenen Effekten auf die Thrombozytenfunktion und damit Blutstillung/-gerinnung konkurrieren. Insbesondere wird durch die Gabe einer hypertonen Kochsalzlösung ein gewisser Volumeneffekt erreicht, jedoch auch die Thrombozytenfunktion massiv gehemmt. Hierdurch könnten Blutungen verstärkt und damit im hämorrhagischen Schock ein „circulus vitiosus“ aus Blutung, Schock, Volumengabe, Kreislaufstabilisierung und Verstärkung der Blutung der Hemmung der Thrombozytenfunktion aufrecht erhalten werden. Thrombozytenaggregate könnten darüber hinaus Mikrozirkulationsstörungen verstärken und einem irreversiblen Multiorganversagen Vorschub leisten. Die Bedeutung günstiger Kreislaufeffekte und einer Blutungsverstärkung mögen

variabel und im Einzelfall nicht gut voneinander zu differenzieren sein. Hierdurch erscheinen heterogene Ergebnisse in unterschiedlichen Tiermodellen und Untersuchungen beim Menschen zumindest plausibel.

Einschränkungen des Studienmodells

Bei der Behandlung akuter Blutungen handelt es sich um einen dynamischen Prozess. Dabei interagieren Blutung, Blutvolumensubstitution und Flüssigkeitsverschiebungen von extra- nach intravasal entlang eines hypertonen Gradienten. Bei der vorgestellten Untersuchung handelt es sich lediglich um eine simulierte Momentaufnahme einer akuten Blutungssituation und deren in vitro Behandlung mit unterschiedlichen künstlichen Volumenersatzmitteln. Dieser Einschränkung wird durch Auswahl unterschiedlich starke Verdünnungen partiell Rechnung getragen. Demgegenüber können in dem gewählten Modell sekundäre Effekte im Sinne von Flüssigkeits- oder Teilchen (Natriumchlorid, Kolloide)-Umverteilungen gerade im Zeitverlauf nicht berücksichtigt werden.

Ferner ist bekannt, dass Hypothermie und Azidose bei polytraumatisierten Patienten zu einer weiteren Beeinträchtigung der Blutgerinnung und Thrombozytenfunktion führen. Da unsere Untersuchungen bei Normothermie und ohne Kontrolle des pH-Wertes im in vitro Ansatz durchgeführt wurden, können wir zu dem Einfluss insbesondere einer durch die Volumenersatzmittel induzierten Acidose im gewählten Modell keine Aussage treffen.

Zusammenfassung der Diskussion

Small volume resuscitation durch Gabe hypertoner hyperosmolarer Lösungen schränkt Blutgerinnung und Thrombozytenfunktion in vitro dosisabhängig massiv ein. Diese Wirkung führen wir insbesondere auf die hypertone Kochsalzkomponente zurück, die möglicherweise auf Grund einer Dehydrierung und Aggregation der Thrombozyten deren Funktion beeinträchtigt. Somit könnten günstige Kreislaufeffekte in der Notfallsituation der akuten Blutung durch weitere Einschränkung der Blutgerinnung und dadurch verstärkte Blutverluste vermindert werden. Es handelt sich also bei der Gabe hypertoner

hyperonkotischer Lösungen in der Regel um den Versuch des präklinischen Ausgleichs massiver Blutverluste mit dem primären Ziel einer Kreislaufstabilisierung. Da in diesem Szenario die Kreislaufstabilisierung priorisiert wird, müssen mögliche nachteilige Effekte auf die Blutungssituation durch künstliche Volumenersatzmittel billigend in Kauf genommen werden. Unsere Daten stützen damit auch die Forderung einer möglichst frühzeitigen Verabreichung von Blutprodukten im massiven hämorrhagischen Schock, um diesen „circulus vitiosus“ zu durchbrechen.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Fragestellung: Der hämorrhagischen Schock wird initial häufig durch „small-volume-resuscitation“ behandelt. Dabei werden 4 ml kg⁻¹ Körpergewicht (KG) eines hypertonen-hyperonkotischen Kombinationspräparats (HH - HyperHAES®, Fresenius Kabi, Deutschland), bestehend aus Natriumchloridlösung (7,2 %, HT) und Hydroxyethylstärke (6 %, HES) intravenös verabreicht. Während die kreislaufstabilisierende Wirkung dieses Medikaments hinreichend untersucht worden ist, sind komplikationsträchtige Einflüsse auf die Blutgerinnung bislang spekulativ. Wir testeten die Hypothese, dass Vollblutgerinnung sowie Thrombozytenfunktion während eines simulierten Blutverlustes und Therapie mit HH beeinträchtigt werden und identifizierten die für die beobachteten Effekte verantwortliche Komponente.

Methodik: Nach Genehmigung der Studie durch die Ethikkommission des Universitätsklinikums Düsseldorf, Aufklärung und schriftlichem Einverständnis wurden bei 10 gesunden Probanden jeweils 28 ml Blut entnommen. Bei einem angenommenen Blutvolumen von 80 ml kg⁻¹ Körpergewicht und Gabe einer Standarddosis HH von 4 ml kg⁻¹ Körpergewicht, wurde Vollblut kurzfristig im Verhältnis 80:4 entsprechend 20:1 verdünnt. Durch Verdünnung von Vollblut mit HH in den Verhältnissen von 10:1, 5:1 und 2,5:1 wurden Blutverluste von 50, 75 und 88 Prozent mit HH-Substitution ex vivo simuliert. Darüber hinaus wurden analog Verdünnungsreihen mit den Einzelkomponenten HES, HT sowie isotonischer Kochsalzlösung (ISO) als Kontrolle erstellt. Die Vollblutgerinnung wurde mittels Rotationsthrombelastometrie (ROTEM, Pentapharm, Deutschland) nach extrinscher Aktivierung (EXTEM) und nach Blockade der Thrombozytenfunktion (FibTEM) unter Quantifizierung der maximalen Clotfestigkeit (MCF) analysiert. Die Thrombozytenfunktion wurde mittels Impedanzaggregometrie (Multiplate, Dynabyte, Deutschland) nach Stimulation durch Thrombin-aktivierendes-Peptid-6 (TRAP-Test) untersucht und als Fläche unter der Kurve (AUC) dargestellt.

Statistik: Dargestellt sind Median, *interquartile ranges* sowie Maximum und Minimum. Statistische Vergleiche wurden mit Hilfe eines Friedman-Tests über die Verdünnungen und zwischen den Gruppen durchgeführt. Vergleiche der einzelnen Mediane erfolgten durch einen Wilcoxon-Test, $p < 0,01$.

Ergebnisse: HH hemmt dosisabhängig die Gerinnung, dargestellt als MCF (-97%, $p < 0.0001$), sowie die stimulierte Thrombozytenaggregation (AUC -98.6%, $p < 0.0001$). Diese Effekte können im Wesentlichen auf die HT-Komponente zurückgeführt werden, da eine Verdünnung mit HES lediglich geringfügige Effekte auf die Fibrinpolymerisierung aufweist, die letztendlich durch die Hämodilution (ISO) per se begründet sein könnten.

Interpretation: Blutgerinnung und insbesondere Thrombozytenfunktion werden durch hypertone hyperonkotischer Lösung bereits bei einem simulierten Blutverlust von 50 Prozent beeinträchtigt. Wir führen diesen Effekt auf den hypertonen Kochsalzanteil zurück und spekulieren, dass eine akute Dehydrierung der Thrombozyten verantwortlich sein könnte. Ob die beschriebenen iatrogenen Gerinnungsstörungen möglicherweise passager und von untergeordneter klinischer Relevanz bei der initialen Behandlung des hämorrhagischen Schocks sind, muss in zukünftigen klinischen Studien geprüft werden.

6. VERWENDETE ABKÜRZUNGEN

AU	<i>arbitray units</i> =Einheiten
AUC	<i>area und the curve</i> = Fläche unter der Kurve
CT	<i>clotting time</i> = Gerinnselformungszeit
ExTEM	Rotationsthrombelastometrischer Test mit extrinischer Aktivierung der Gerinnung
FibTEM	Rotationsthrombelastometrischer Test mit extrinischer Aktivierung der Gerinnung und Zusatz von Cytochalasin D
HES	Hydroxyethylstärke (6 %, MW 200 kDA, 0,43-0,55)
HH	hypertone hyperonkotische Lösung
HT	hypertone (7,2 %) Natriumchloridlösung
ISO	isotonische (0,9 %) Natriumchloridlösung
MCF	<i>maximum clot firmness</i> = Maximale Gerinnselfestigkeit
ROTEM®	Rotationsthrombelastometrie

7. LITERATURVERZEICHNIS

1. Boldt J, Hammermann H, Hempelmann G. Colloidal hypertonic solutions in cardiac surgery. Zentralbl Chir. 1993; 118: 250-256
2. Boldt J, Knothe C, Zickmann B, Hammermann H, Stertmann WA, Hempelmann G. Volume loading with hypertonic saline solution: endocrinologic and circulatory responses. J Cardiothorac Vasc Anesth. 1994; 8: 317-323
3. Brinkmann AC, Romijin JW, van Barneveld LJ, Greuters S, Verhoek D, Vonk AB, Boer C: Profound effects of cardiopulmonary bypass priming solutions on the fibrin part of clot formation: an ex vivo evaluation using rotation thrombelastometry. J Cardiothorac Vasc Anesth. 2010; 24: 422-426
4. Bunn F, Roberts I, Tasker R, Apka E: Hypertonic versus near isotonic crystalloid for fluid resuscitation in critically ill patients. Cochrane Database Syst Rev 2004; CD002045
5. Calatzis A, Haas S, Goedje O, Calatzis AI, Hipp R, Walenga JM: Thrombelastographic coagulation monitoring during cardiovascular surgery with the ROTEG coagulation analyzer. In: Pifarée R (Ed): Management of bleeding in cardiovascular surgery. Philadelphia: Hanley&Belfus, S 215-226, 2000
6. Calatzis A, Witwer B, Krueger B: A new approach to platelet function analysis in whole blood – the Multiplate analyzer. Platelets 2004; 15: 479-517

7. Christ F, Niklas M, Kreimeier U, Lauterjung L, Peter K, Messmer K. Hyperosmotic-hyperoncotic solutions during abdominal aortic aneurysm (AAA) resection. *Acta Anaesthesiol Scand* 1997; 41: 62-70
8. De Jonge E, Levi M: Effects of different plasma substitutes on blood coagulation: a comparative review. *Crit Care Med* 2001; 29: 1261-1267
9. Favarolo EJ, Facey D, Henniker A: Use of a novel function analyzer (PFA-100) with high sensitivity to disturbances in von Willebrand factor to screen for von Willebrand's disease and other disorders. *Am J Hematol* 1999; 62: 165-174
10. Franz RC: ROTEM analysis: a significant advance in the field of rotational thrombelastography. *S Afr J Surg* 2009; 47: 2-6
11. Fries D, Innerhofer P, Klingler A, Berresheim U, Mittermayer M, Calatzis A, Schobersberger W: The effect of the combined administration of colloids and lactated ringer's solution on the coagulation system: an in vitro study using thrombelastograph coagulation analysis (ROTEG). *Anesth Analg* 2002, 94: 1280-1287
12. Fries D, Haas T, Klingler A, Streif W, Klima G, Martini J, Wagner-Berger H, Innerhofer P: Efficacy of fibrinogen and prothrombin complex concentrate used to reverse dilutional coagulopathy – a porcine model. *Br J Anaesth* 2006; 97: 460-467
13. Fries D, Innerhofer P, Reif C, Streif W, Klingler A, Schobersberger W, Velik-Salchner C, Friesenecker B: The effect of fibrinogen substitution on reversal of dilutional coagulopathy: an in vitro model. *Anesth Analg* 2006; 102: 347-351

14. Görlinger K, Jambor C, Dirkmann D, Dusse F, Hanke A, Adamzik M, Hartmann M, Philipp S, Weber AA, Rahe-Meyer N: Platelet function analysis with point-of-care methods. *Herz* 2008; 26: S20-29
15. Gross D, Landau EH, Klin B, Krausz MM: Quantitative measurement of bleeding following hypertonic saline therapy in *uncontrolled hemorrhagic shock*. *J Trauma* 1989; 29: 79-83
16. Haas T, Fries D, Holz C, Innerhofer P, Streif W, Klingler A, Hanke A, Velik-Salchner C: Less impairment of hemostasis and reduced blood loss in pigs after resuscitation from hemorrhagic shock using the small-volume concept with hypertonic saline/hydroxyethyl starch as compared to administration of 4% gelatin or 6% hydroxyethyl starch solution. *Anesth Analg* 2008; 106: 1078-86
17. Hartl R, Ghajar J, Hochleuthner H, Mauritz W. Hypertonic/hyperoncotic saline reliably reduces ICP in severely head-injured patients with intracranial hypertension. *Acta Neurochir* 1997; 70: 126-129 (Suppl.)
18. Hartert H: Blutgerinnungsstudien mit der Thrombelastographie, einem neuen Untersuchungsverfahren. *Klin Woch* 1948; 26: 577-583
19. Horn P, Munch E, Vajkoczy P et al. Hypertonic saline solution for control of elevated intracranial pressure in patients with exhausted response to mannitol and barbiturates. *Neurol Res* 1999; 21: 758-764

20. Innerhofer P, Fries D, Margreiter J, Klingler A, Kühnbacher G, Wachge B, Oswald E, Salner E, Frischut B, Schobersberger W: The effects of perioperatively administered colloids and crystalloids on primary platelet-mediated hemostasis and clot formation. *Anesth Analg* 2002; 95: 858-865
21. Kramer GC, Perron PR, Lindsey DC, et al. Small-volume resuscitation with hypertonic saline dextran solution. *Surgery* 1986; 100: 239-247
22. Krausz MM, Landau EH, Klin B, Gross D: Hypertonic saline treatment of uncontrolled hemorrhagic shock at different periods from bleeding. *Arch Surg* 1992; 127: 93-96
23. Messmer K, Kreimeier U. Microcirculatory therapy in shock. *Resuscitation* 1989, 18 Suppl. S 51-61
24. Nielsen VG: Colloids decrease clot propagation and strength: role of factor XIII-fibrin polymer and thrombin-fibrinogen interactions. *Acta Anaesthesiol Scand* 2005a; 49: 1163-1171
25. Nielsen VG: Effects of PentaLyte and Voluven hemodilution on plasma coagulation kinetics in the rabbit: role of thrombin-fibrinogen and factor XIII-fibrin polymer interactions. *Acta Anaesthesiol Scand* 2005b; 49: 1263-1271
26. Palmgren I, Hultman J, Houltz E. Perioperative transoesophageal echocardiography with low-dose dobutamine stress for evaluation of myocardial viability: a feasible approach? *Acta Anaesthesiol Scand*. 1998; 42: 162-166
27. Perel P, Roberts I. Colloids versus crystalloids for fluid resuscitation in critically ill patients. *Cochrane Database Syst Rev* 2007;C

28. Ragaller M, Muller M, Bleyl JU et al. Hemodynamic effects of hypertonic hydroxyethyl starch 6% solution and isotonic hydroxyethyl starch 6% solution after declamping during abdominal aortic aneurysm repair. *Shock* 2000; 13: 367-373
29. Schimetta W, Schochl H, Kroll W, et al. Safety of hypertonic hyperoncotic solutions- a survey from Austria. *Wien Klin Wochenschr.* 2002; 114: 89-95
30. Shackford SR, Sise MJ, Fridlund PH et al. Hypertonic sodium lactate versus lactated ringer's solution for intravenous fluid therapy in operations on the abdominal aorta. *Surgery* 1983; 94: 41-51
31. Sirieix D, Hongnat JM, Delayance S et al. Comparison of the acute hemodynamic effects of hypertonic or colloid infusions immediately after mitral valve repair. *Crit Care Med* 1999;27:2159-2165
32. Spinella PC, Holcomb JB: Resuscitation and transfusion principles for traumatic hemorrhagic shock. *Blood Rev* 2009; 23: 231-240
33. Treib JK Haas A, Pindur G Grauer MT, Wenzel E, Schimrigk K: All medium starches are not the same: influence of the degree of hydroxyethyl substitution of hydroxyethyl starch on plasma volume, hemorheologic conditions and coagulation. *Transfusion* 1996; 36: 450-455
34. Wade CE, Kramer GC, Grady JJ, Fabian TC, Younes RN: Efficacy of hypertonic 7.5% saline and 6% dextrane-70 in treating trauma: a meta-analysis of controlled clinical studies. *Surgery* 1997; 122: 609-619

8. ANHANG

Dargestellt sind die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Rohdaten der ROTEM-Analyse (EXTEM: MCF, CT und FIBTEM: MCF) sowie die Flächenberechnung der Multiplate-Analysen (AUC) für die Verdünnungsreihen mit den unterschiedlichen kristallinen bzw. kolloidalen Lösungen.

Untersuchte Infusionslösungen:

HH:	HyperHAES
NaCl 7,2%:	hypertone Natriumchloridlösung
Haes:	HAES 6%,
NaCl 0,9%:	isotone Natriumchloridlösung

Hergestellte Verdünnungsreihen:

0% BL (blood loss)	entspricht 5% Verdünnung
50% BL (blood loss)	entspricht 10% Verdünnung
75% BL (blood loss)	entspricht 20% Verdünnung
87,5% (blood loss)	entspricht 40% Verdünnung

Statistische Auswertung:

MW:	Mittelwert
SD:	Standardabweichung
MIN:	Minimum
MAX:	Maximum
Median:	Median
25 Per:	25 Prozent Perzentile
75 Per:	75 Prozent Perzentile

9. LEBENSLAUF

Name	<u>Stephanie Sandra Maschler</u>
Geboren	am 06. April 1975 in Essen
Konfession	evangelisch
Familienstand	ledig
Kinder	Felix , geboren am 19. November 1997
Adresse	Otto-Hahn-Strasse 1 44869 Bochum E-mail: stm64@hotmail.de Telefon: (02327) 567 747 Mobil: (0172) 57 66 493
Schulbildung	
1981-1985	Grundschule im Haferfeld, Essen
1985-1994	Gymnasium an der Wolfskuhle, Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
Ausbildung	
1995-1998	Ausbildung zur staatlich examinierten Krankenschwester
Berufstätigkeit	
1998-2010	Tätigkeit als Krankenschwester in der Ruhrlandklinik, Essen

Studium

2003-2010	Studium der Humanmedizin an der Universität Duisburg-Essen
2005	Physikum
2008-2009	Praktisches Jahr an den Kliniken Essen-Mitte/Ev. Huysens-Stiftung Wahlfach Anästhesiologie (Prof. Dr. med. H. Groeben)
2010	Staatsexamen Humanmedizin
seit Juli 2010	Assistenzärztin in der Abteilung Anästhesiologie der Kliniken Essen-Mitte/Ev. Huysens-Stiftung, Essen

Bochum, 30. November 2010

10. DANKSAGUNG

Ich danke Herrn Professor Dr. med. Peter Kienbaum für die freundliche Überlassung des Themas, die hervorragende Betreuung bei der Anfertigung dieser Arbeit und die dabei entstandene Vermittlung wissenschaftlicher Visionen.

Herrn Dr. Alexander Hanke danke ich für die praktische Anleitung und seine Unterstützung bei den Messungen, die zur Umsetzung der Studie beigetragen haben.

Herrn Dr. Klaus Zanger danke ich für die rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen.

Weiter danke ich auch allen Probanden für ihr Mitwirken bei den Untersuchungen.

Meiner Familie bin ich dankbar für ihre Unterstützung und die Geduld sowohl während der Durchführung der Studie, als auch bei der Fertigstellung dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt dabei meinem Sohn Felix, der mir bei den kleinen und großen Problemen mit dem Computer immer helfend zur Seite stand.