

Aus der Klinik für Anästhesiologie
der Heinrich Heine Universität Düsseldorf
Direktor: Prof. Dr. med. B. Pannen

Argatroban zur alternativen Antikoagulation von
maschinellen Autotransfusionssystemen

Dissertation

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

vorgelegt von

Carsten Brau

2016

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

gez. Univ. Prof. Dr. med. Joachim Windolf

Dekan

Erstgutachter: PD Dr. med. Martin Beiderlinden

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Klaus Grabitz

Meiner Puck und meiner Nele – Danke, dass ihr immer da seit.

Meinen Eltern – die immer an mich geglaubt haben.

Meinen Lehrern - die nie aufgegeben haben.

Meinen Kollegen und Kolleginnen – für die Begleitung auf meinem Weg.

Danke Martin – für alles!

Zusammenfassung

Die Verwendung von maschinellen Autotransfusionssystemen (MAT-Systemen) in der klinischen Routine führt zu signifikant geringerem, perioperativem Verbrauch von allogenen Fremdblut. In vorausgegangenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass im Transfusionsblut geringe Restmengen des Standardantikoagulanzes Heparin vorhanden sein können. Klinische Relevanz bekommt dieser Umstand, wenn MAT-Systeme bei Patienten mit vorhandener Heparin induzierter Thrombozytopenie (HIT) eingesetzt werden. Bisher liegen keine Studien zur Verwendung von Argatroban als alternatives Antikoagulanzen für MAT-Systeme vor.

Daher sollte in der vorliegenden ex-vivo Studie die Effektivität der Antikoagulation mit Argatroban untersucht werden. Abgesaugtes Wundblut wurde mit 3 unterschiedlichen Argatroban Dosierungen ($5 \mu\text{g ml}^{-1}$, $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ und $250 \mu\text{g ml}^{-1}$) oder der Standard Heparin Dosierung 25 U ml^{-1} antikoaguliert. Das aufbereitete Transfusionsblut wurde auf Restkonzentrationen der verwendeten Antikoagulanzen in Abhängigkeit von zwei unterschiedlichen Waschzyklen analysiert.

Bis auf die niedrigste Argatrobankonzentration ($5 \mu\text{g ml}^{-1}$, in 3 von 8 Systemen wurden Gerinnsel im Sammelreservoir gefunden) konnte eine ausreichende MAT-System-Antikoagulation mit Argatroban erreicht werden. Mittels *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) konnte Argatroban im Transfusionsblut nachgewiesen werden. Das *High-Quality*-Waschprogramm reduzierte um 89-95% und das Notfallwaschprogramm um 60-90% die initiale Argatrobankonzentration. Heparinaktivität, indirekt über die Anti-Xa-Aktivität gemessen, konnte in 20% der Proben nachgewiesen werden.

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Waschvorgänge Heparin nicht sicher eliminieren und daher eine Heparin-Antikoagulation bei Patienten mit HIT-Antikörpern unterbleiben sollte. Alternativ kann Argatroban verwendet werden. Dabei wies in dieser Versuchsreihe eine Argatrobankonzentration von $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ im Hinblick auf die Effektivität der Systemantikoagulation und der klinisch nicht relevanten Argatrobankonzentrationen im Transfusionsblut das günstigste Verhältnis auf im Vergleich zu den beiden anderen Konzentrationen. Weitere Dosisfindungsstudien sind notwendig, um die optimale Argatroban-Konzentration zur Verwendung in MAT-Systemen zu finden.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
aPTT	aktivierte partielle Thromboplastinzeit
bzw.	beziehungsweise
C.A.T.S	<i>Continuous-Auto-Tranfusions-System</i>
Dr.	Doktor
ECMO	Extra corporeal Membran Oxygenation
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
et. al.	et alia, und andere
Fc	<i>Fragment, easily crystallizable</i>
Hb	Hämoglobin
HIT	Heparin induzierte Thrombozytopenie
Hkt	Hämatokrit
IgG	Immunglobuline der Klasse G
LMWH	Low molecular weight heparin
MAT	Maschinelle Autotransfusion
med.	<i>medicinae</i>
mg	Milligramm
ml	Milliliter
MTA	Medizinisch Technische Assistentin
NaCl	Natrium Chlorid
PBM	Patient Blood Management
PF4	<i>Platelet factor 4</i>
Prof.	Professor
rer. nat.	<i>rerum naturalium</i>
TRALI	transfusionsassoziierte Lungenerkrankung
U	<i>Units</i>
UFH	unfraktionierte Heparine
µl	Mikroliter
Waschpr.	Waschprogramm

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	1
1.1 Maschinelle Autotransfusionssysteme	2
1.2 Heparin induzierte Thrombozytopenie (HIT)	4
1.2.1 Pathogenese der HIT II	5
1.2.2 Risiko unter UFH eine HIT zu erwerben	7
2. ZIELE DER ARBEIT	8
3. MATERIAL UND METHODEN	10
3.1 Studienart und Votum der Ethikkommission	10
3.2 Studienteilnehmer	10
3.3 Randomisierung:	11
3.4 Aufteilung der Studienteilnehmer in die Versuchsgruppen	11
3.4.1 Studiengruppe 1 (ARG50)	12
3.4.2 Studiengruppe 2 (ARG250)	12
3.4.3 Studiengruppe 3 (ARG5)	12
3.4.4 Studiengruppe 4 (HEP)	12
3.5 Versuchsdurchführung	13
3.5.1 MAT- System	13
3.5.2 Versuchsaufbau	13
3.5.3 Aufbereitung des Wundbluts im MAT-System	14
3.6 Proben	17
3.6.1 Patientenprobe	17
3.6.2 Proben aus dem MAT-System	17
3.7 Probenbestimmung	18
3.7.1 Bestimmung der Argatrobankonzentration im Serum	19
3.7.2 Bestimmung der Heparinkonzentration im Serum	19
3.8 Größe der Studiengruppen und Statistik	20

4. ERGEBNISSE:	21
4.1 Biometrische Daten	21
4.2 Heparin Clearance	23
4.3 Argatroban Clearance	24
5. DISKUSSION	29
6. SCHLUSSFOLGERUNGEN	34
7. LITERATURVERZEICHNIS	35

1. Einleitung

Mit der Weiterentwicklung medizinischer Therapiekonzepte und der zu erwartenden demographischen Entwicklung in den nächsten Jahrzehnten, ist von einem deutlichen Anstieg des Transfusionsbedarfes auszugehen. Gleichzeitig ändert sich das Blutspendeverhalten in der Bevölkerung, so dass erwartet wird, dass die Zahl der zur Verfügung stehenden Blutkonserven deutlich zurück gehen wird [Drackley et al 2012; Greinacher et al 2010; Greinacher et al 2007].

Nach dem deutschen Transfusionsgesetz ist die Indikationsstellung sowie die Verabreichung von Blutkomponenten ärztliche Tätigkeit. Hierbei muss die Indikation zur Fremdbluttransfusion hinsichtlich der Beeinträchtigung des Immunsystems, des damit verbundenen Infektionsrisikos und der oben erwähnten Knappheit an Blutkomponenten geprüft werden [Seitz & Heiden 2010]. Nach den Paragraphen 12, 14 und 18 des Transfusionsgesetzes sind die Krankenhäuser, bzw. die anwendenden Abteilungen verpflichtet, eine Analyse des Transfusionsbedarfes durchzuführen und Alternativen zur Fremdblutgabe zu evaluieren und anzuwenden.

Die Bedeutung einer multidisziplinären, multimodalen und individualisierten Strategie zur Vermeidung, bzw. Reduktion von perioperativer Fremdblutgabe ist kürzlich durch die Resolution 63.12 der Weltgesundheitsversammlung unterstrichen worden. Die strategische Nutzung der zur Verfügung stehenden Einzelmaßnahmen wurde unter dem Begriff „Patient Blood Management“ (PBM) zusammengefasst. Alle Mitgliedsstaaten der WHO beabsichtigen die Einführung des PBM [Shander et al 2012].

Als klinisch etablierte Maßnahmen zur Einsparung von Fremdblutkomponenten stehen die präoperative Eigenblutspende, die Durchführung einer normovolämen Hämodilution, die Gabe von Erythropoietin und Blutersatzstoffen sowie die maschinelle Autotransfusion (MAT) von intra- und unmittelbar postoperativ gesammeltem Wundblut zur Verfügung [Gombotz 2012; Kleinert et al 2010].

1.1 Maschinelle Autotransfusionssysteme

Mit der Einführung der ersten MAT-Systeme in die klinische Routine zum Ende der 1960er Jahre steht ein technisches Verfahren zur Verfügung, das es erlaubt, intra- und bis zu 6 Stunden postoperativ anfallendes Wund- und Drainageblut zu sammeln und aufzubereiten [Klebanoff 1971]. Durch technische Weiterentwicklung der MAT-Systeme konnten Komplikationen der MAT (Hämolyse, Luftembolie, Koagulopathie, Verunreinigung des Re-Transfusionsblutes mit Medikamenten, Waschlösungen und Bakterien, sowie inkomplett gewaschenes Re-Transfusionsblut angereichert mit aktivierten Leukozyten, Zytokinen und anderen Mikroaggregaten) vermindert werden [Fong et al 2007]. Bei den MAT-Systemen stehen zwei unterschiedliche Aufbereitungssysteme zur Verfügung. Zum einen ist dies die diskontinuierliche aufbereitende Latham-Glocke (z.B. DIDECO-Electa[®] (Sorin Group, Mailand, Italien), Cell-Saver5[®] (Haemonetics, Braintree, USA) und zum anderen die kontinuierliche aufbereitende Zentrifugenkammer (z.B. C.A.T.S.[®], Fresenius SE & Co. KGaA, Bad Homburg, Deutschland). Das Grundprinzip dieser Systeme ist jedoch gleich. Im Rahmen des *Cell-Saver* Prozesses wird zwischen drei Phasen (Sammeln, Waschen und Retransfusion) unterschieden. Zunächst einmal wird das Blut im Operationsfeld gesammelt und mit einer doppelläufigen Absaugeinheit aufgenommen. Ein Lumen des Schlauches saugt das anfallende Blut auf, während das zweite Lumen ein Antikoagulum zur Vermeidung von Clotbildung im MAT-System zufügt. Das abgesaugte Blut passiert einen Filter und wird in einem Reservoir gesammelt. Die Separation der Blutkomponenten erfolgt dann über Zentrifugation. Die so gewonnenen roten Blutkörperchen werden anschließend gewaschen und über eine semi-permeable Membran gefiltert. Somit werden Medikamente, freies Hämoglobin, Thrombozyten und Leukozyten eliminiert. [Waters 2013]

Im Aufbereitungsprozess werden mehr als 90% der humoralen Bestandteile und 50-70% der korpuskulären, nicht erythrozytären Bestandteile und Zelltrümmer entfernt [Serrick et al 2003]. In vergleichenden Studien konnte gezeigt werden, dass die Überlebensrate von MAT aufbereiteten Erythrozyten und der Gehalt von 2-3-Diphosphoglycerat und Adenosintriphosphat im autologen Re-

Transfusionsblut höher ist als in allogenen Erythrozytenkonzentraten. Auch konnte gezeigt werden, dass die typische bikonkave Form der Erythrozyten nach dem MAT-Prozess erhalten bleibt [Colwell et al 2002], wohingegen die Erythrozyten im 14 Tage alten allogenen Spenderblut deutliche Verformungen (Stechapfelform) aufwiesen mit negativen Folgen auf die Rheologie [Hovav et al 1999].

Die Vorteile der autologen Transfusion im Vergleich zur Fremdblutgabe sind umfassend. Der wichtigste Vorteil der MAT-Systeme ist das Einsparen von Fremdblut, denn mit Fremdblutgabe erhöht sich die Tumorrezidiv- [Dresner et al 2000; Taniguchi & Okura 2003; Szakmany et al 2006], und postoperative Infektionsrate [Duffy & Neal 1996; Innerhofer et al 2005; Davis et al 2003; Vamvakas 2002], die akute transfusionsassoziierte Lungenerkrankung (TRALI) [Brander et al 2005], das Risiko eines postoperativen Myokardinfarkts [Spiess et al 1998] mit Auftreten von postoperativem Low Output Syndrom [Surgenor et al 2006]. Ferner ist in verschiedenen Patientenkollektiven eine erhöhte Mortalität [Karkouti et al 2004; Koch et al 2006] beschrieben. Zum anderen sind mit Fremdblutgabe infektiöse Risiken, wie z.B. die Übertragung von HIV, Hepatitis B, Hepatitis C, bakterielle Kontamination mit Sepsis verbunden [Seitz 2010]. Zusätzlich erhöht die wiederholte Gabe von allogenen Blut das Risiko des Auftretens von irregulären Antikörpern, was für spätere erneute Transfusionen die Bereitstellung passender Blutkonserven erschwert.

In verschiedenen Studien, Reviews und Metaanalysen konnte durch die Anwendung MAT-Systemen eine deutliche Reduktion von Fremdblutgaben in vielen operativen Disziplinen gezeigt werden [Carless et al 2010; Geoghegan et al 2009; Fong et al 2007; Wang et al 2009; Murphy et al 2005; Marković et al 2009]. Einen Anstieg einer transfusionsassoziierten Komplikationsrate im Rahmen einer der autologen Transfusion konnte dagegen nicht nachgewiesen werden [Domen 1998; Carless et al 2010].

Die MAT ist indiziert bei Eingriffen mit einem zu erwarteten Blutverlust von über 1000 ml oder einem kalkulierten Blutverlust von über 20% des angenommenen Patienten Blutvolumens, bei Patienten mit bestehender Anämie, vorhandenen multiplen Antikörpern oder seltenen Blutgruppen, sowie bei Patienten, die eine allogene Transfusion ablehnen (z.B. Zeugen Jehovas) [Esper 2011].

Als Kontraindikationen der MAT gelten Operationen in infizierten Wundgebieten (z.B. Revisionseingriffe bei infizierten Gefäß- und Gelenkprothesen), die potentielle fäkale Kontamination infolge einer Eröffnung des Darmes in der Visceralchirurgie, und tumorchirurgische Eingriffe, da durch die Retransfusion von Tumorzellen eine potentielle Metastasierung nicht ausgeschlossen ist [Hansen et al 1999; Hansen et al 2002; Esper 2011].

Bei der Vielzahl der Vorteile von MAT im Vergleich zur allogenen Transfusion muss beachtet werden, dass es bei der Auto-Transfusion großer Volumina zu einer Koagulopathie kommen kann, da beim Waschvorgang alle Thrombozyten und Gerinnungsfaktoren mit eliminiert werden [Serrick et al 2003].

Ein weiteres Problem stellt auch die Verwendung von unfraktioniertem Heparin (UFH) zur Antikoagulation dieser Systeme dar, denn je nach Aufbereitung konnte UFH, z.T. in therapeutisch relevanten Dosierungen, im zur Transfusion aufbereitetem Blut nachgewiesen werden. [Vorweg et al 1998; Serrick et al 2003; Umlas 1981a; Kling et al 1988; Paravicini et al 1983] .

1.2 Heparin induzierte Thrombozytopenie (HIT)

Die HIT ist ein klinisch-pathologisches Syndrom, welches sich typischer Weise zwischen dem 5. und 14. Tag nach Beginn einer Heparintherapie [Warkentin & Greinacher 2004] ,mit der Symptom-Trias Thrombozytopenie, bzw. Thrombozytenabfall um > 50% und/oder einem thrombembolischen Ereignis unter Heparintherapie, manifestiert. Ursächlich führt die Bildung von Antikörpern (IgG) gegen Komplexe aus Plättchenfaktor 4 und Heparin zu einer Agglutination und Aktivierung von Thrombozyten. In Gegenwart dieser Antikörper kann sich die Manifestation einer HIT auch unmittelbar einstellen. [Lubenow et al 2002; Warkentin & Kelton 1996] .

In der laborchemischen Diagnostik kann klassischer Weise 5 – 10 Tage nach Heparinabgabe [Warkentin & Greinacher 2004; Warkentin & Kelton 2001; Warkentin et al 2003; Lubenow et al 2002] ein Thrombozytenabfall mit Thrombozytenzahlen von <150.000/ μ l [Warkentin et al 1995] bzw. 100.000/ μ l

[Lubenow et al 2002; Martel et al 2005] und/ oder einem Abfall von mehr als 50% des Ausgangswertes [Warkentin et al 2003] nachgewiesen werden.

Bei der Therapie mit unfraktioniertem Heparin (UFH) ist sowohl die Bildung von Heparin Antikörpern als auch die Ausbildung des klinischen Bildes einer HIT II häufiger, als bei einer Therapie mit niedermolekularem Heparin (LMWH) [Warkentin et al 1995; Warkentin et al 2000]. Nach Blutungskomplikationen ist die HIT II die wichtigste Komplikation bei der Therapie mit UFH [Warkentin & Kelton 1996]. Bei 0,2 – 5% der mit UFH behandelten Patienten tritt eine HIT II auf [Martel et al 2005; Girolami et al 2003; Warkentin et al 1995; Akca et al 2002; Warkentin et al 2006]. Martel et. al. konnten in einer Metaanalyse zeigen, dass abhängig vom Patientenkollektiv die durchschnittliche Inzidenz einer HIT II bei der Therapie mit UFH bei ca. 2,6% liegt [Martel et al 2005].

1.2.1 Pathogenese der HIT II

Der Entstehung der HIT II liegt eine Autoimmunreaktion zugrunde [Akca et al 2002; Warkentin et al 1998; Reilly 2003]. Bei der Therapie mit Heparin (als Dauer- und Einzelgabe), sowie als Beschichtung auf Kathetern [Nand et al 1997; Kadidal et al 1999] kann die Gabe eine Heparin-induzierte Bildung von pathogenen Antikörpern der Immunglobulinklasse G und M triggern (HIT Antikörper). Die so gebildeten Antikörper erkennen multimolekulare Komplexe aus Heparin und Plättchenfaktor 4 (PF4) an der Oberfläche von Thrombozyten und führen zur Thrombozytenaktivierung in vivo, sowie zur assoziierten Thrombinbildung [Visentin et al 1994; Rauova et al 2006]. Sowohl Endothelzellen als auch Monozyten können von den HIT Antikörpern aktiviert werden.

Das Hauptantigen stellt der Immunkomplex aus Heparin und PF4 dar. PF4 entstammt den alpha-Granula der Thrombozyten und ist ein kleines, positiv geladenes Molekül. Bei Aktivierung der Thrombozyten wird PF4 in das zirkulierende Blut abgegeben und ein Teil bindet an die Oberfläche der Thrombozyten. Aufgrund entgegengesetzter Ladung binden Heparin und Glykosaminoglykane an PF4, diese Interaktion zwischen Heparin und PF4 ist abhängig vom Molekular-

gewicht des Heparins, was eine Ursache für die stärkere Immunogenität von UFH sein könnte [Greinacher et al 1995]. Durch die Bindung von Heparin und PF4 ändert sich die Konfiguration und es entstehen immunogene Neopeptide, gegen die sich in der Folge Antikörper bilden. Die so entstandenen Antikörper binden sich an die durch Heparin-induzierte Konfigurationsänderung entstandenen Neopeptide [Horsewood et al 1996; Newman, & Chong 2000; Suh et al 1998]. Die gegen den Heparin-PF4-Komplex gerichteten Antikörper sind meist Immunglobuline der Klasse G (IgG), seltener der Klassen M oder A [Suh et al 1998]. Binden IgG-Antikörper mit Ihrem Fab-Teil an den PF4 dieser Komplexe an der Thrombozytenoberfläche, entstehen Immunkomplexe aus IgG Antikörper und Heparin-PF4-Komplexen [Newman & Chong 2000; Kelton et al 1994]. Die so entstandenen Immunkomplexe können sich wiederum mit dem Fc-Anteil des IgG-Antikörpers an spezifische Fc-Rezeptoren der Thrombozytenoberfläche binden [Kelton et al 1994] und durch diese Interaktion zu einer intravaskulären Thrombozytenaggregation und –aktivierung führen. Aus den so aktivierten Thrombozyten wird vermehrt PF4 ausgeschüttet, was den Kreislauf der HIT aufrecht erhält. Die entstandenen Thrombozytenaggregate werden durch das retikuloendotheliale System abgebaut, was die typische Thrombozytopenie zur Folge hat [Dager et al 2007].

Die Thrombozytenaktivierung führt zusätzlich zur Freisetzung von prothrombotischen thrombozytären Mikropartikeln, welche die Gerinnung, insbesondere die Thrombinbildung, fördern. Dieser Umstand stellt den entscheidenden plasmatischen Faktor für den prokoagulatorischen Zustand der HIT II dar.

Abhängig vom verwendeten Nachweisverfahren können HIT II Antikörper im Mittel 50 – 85 Tage nachgewiesen werden [Warkentin & Kelton 1996]. Bei einigen Patienten jedoch können HIT Antikörper noch mehrere Monate nachgewiesen werden. Erfolgt eine erneute Heparintherapie bei Patienten mit hohem Antikörpertiter, kann dies eine abrupt einsetzende Thrombozytopenie und/oder Thrombembolie bewirken [Lubenow et al 2002].

1.2.2 Risiko unter UFH eine HIT zu erwerben

Das Risiko von Patienten, im Rahmen einer Heparintherapie eine HIT II zu entwickeln, scheint statistisch gesehen, gering. Verschiedene Studien konnten zeigen, dass nur bei 0,2 – 2,7% der mit Heparin vorbehandelten Patienten das klinische Bild einer HIT II imponiert [Busche et al 2011; Trehel-Tursis et al 2012; Selleng et al 2007; Verma et al 2003] – dies muss jedoch in Relation zur Häufigkeit des klinischen Einsatzes betrachtet werden. Heparin wird als Standardantikoagulanz z.B. zur Thrombozytopenieprophylaxe, zur Behandlung von thromboembolischen Erkrankungen, Antikoagulation zur Vermeidung von Clotbildung in Herz-Lungen-Maschine, Hämodialysemaschinen und Extracorporaler Membranoxygenierung (ECMO) und perioperativer Thromboseprophylaxe eingesetzt. Nimmt man an, dass in einem Krankenhaus 15.000 Patienten im Rahmen des stationären Aufenthaltes als Thromboseprophylaxe Heparin erhalten, können, statistisch betrachtet, 30 – 405 Patienten pro Jahr eine HIT II erleiden. Das Vorliegen einer postoperativen Thrombozytopenie ist sicher ein multifaktorielles Geschehen, Trehel-Tursis et. al. konnten bei kardiochirurgischen Patienten, bei denen aufgrund eines Thrombozytenabfalls oder einer persistierenden Thrombozytopenie eine HIT vermutet wurde, diese auch in 28% der Fälle nachweisen. [Trehel-Tursis et al 2012]. Bei der Therapie mit UFH, verglichen mit LMWH, ist das Risiko eine HIT II auszubilden 5 – 10 Mal höher [Busche et al 2011; Lubenow et al 2002]. Somit sollte einem für die HIT typischen Bild, also dem typischen Auftreten einer Thrombozytopenie 5 – 10 Tage nach Beginn einer Heparintherapie, der Schwere der Thrombozytopenie (kleiner 50% des Ausgangswertes) und dem Vorliegen von Thrombosen oder anderer HIT-Komplikationen, diese als Differentialdiagnose in Betracht gezogen werden, ebenso, wenn andere Gründe für eine Thrombozytopenie fehlen [Warkentin & Greinacher 2004].

2. Ziele der Arbeit

Mit der perioperativen Cell Saver Anwendung steht für Patienten ein sicheres und langjährig erprobtes System zur Verfügung, mit dessen Hilfe es möglich ist, Blut, welches im Rahmen von operativen Eingriffen aus dem Wundbereich austritt, zu sammeln, aufzubereiten und im weiteren Verlauf dem Patienten wieder zu retransfundieren. Im günstigsten Fall kann durch den Einsatz eines solchen Systems auf die Transfusion von Fremdblutprodukten verzichtet werden.

Bei dem Betrieb von Autotransfusionssystemen muss das aus dem OP Gebiet gewonnene Blut antikoaguliert werden, damit es im weiteren Aufbereitungsprozess nicht zu Gerinnselbildung über Kontaktaktivierung im Sammelsystem kommt.

Routinemäßig wird dem Sammelsystem eine fixe Konzentration von unfraktioniertem Heparin (UFH) zugefügt, mit der das Blut im Sammelsystem ungerinnbar gemacht wird.

Das zugesetzte Heparin kann im anschließenden Waschvorgang durch Zentrifugation zum größten Teil entfernt werden, so dass keine gerinnungsbeeinflussenden Konzentrationen von Heparin mehr im aufbereiteten, zur Retransfusion zur Verfügung stehenden Blut nachweisbar sind.

Da bei Patienten mit positiven Antikörperstatus gegen PF4 selbst geringste Mengen an Heparin ausreichen, um die oben beschriebenen Komplikationen (Thrombozytenabfall mit thrombembolischer Komplikation) auszulösen, besteht bei diesen Patienten Unsicherheit bezüglich des Einsatzes von Heparin im Rahmen der MAT Anwendung.

Über das Absaugsystem sowie über Spuren von nicht ausgewaschenem Heparin im Retransfusionsblut könnten bei betroffenen Patienten die oben beschriebenen Komplikationen ausgelöst werden.

Es stellt sich daher die Frage, ob nicht bei diesen Patienten auf das die HIT II auslösende Agens (Heparin) verzichtet und stattdessen der zur Therapie der HIT II zugelassene direkte Thrombininhibitor Argatroban verwendet werden sollte.

Mit Argatroban steht ein Medikament zur Verfügung, welches seit 2005 die Zulassung zur antithrombotischen Therapie bei HIT und HIT-Verdacht besitzt.

Bei der Substanz handelt es sich um ein synthetisch hergestelltes Argininderivat, welches als reversibler Thrombininhibitor agiert und in der klinischen Praxis als intravenöse Lösung kontinuierlich via Perfusor appliziert wird.

Es liegen aktuell jedoch keine Untersuchungen zum Auswaschverhalten dieser Substanz im MAT Einsatz vor.

Ziel dieser ex vivo Arbeit soll daher sein, zum einen die Konzentration von Argatroban in der Cell Saver Spüllösung zu ermitteln, die eine ausreichende Antikoagulation des gesammelten Blutes sicher stellt, zum anderen soll untersucht werden, ob unterschiedliche Argatrobankonzentrationen durch die vorgegebenen Waschprogramme des Cell Saver eliminiert werden können.

In verschiedenen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass das Standardantikoagulum Heparin nicht vollständig durch den MAT Aufbereitungsprozess ausgewaschen werden konnte. In der vorliegenden Arbeit soll in der Kontrollgruppe das Auswaschverhalten von unfraktioniertem Heparin untersucht werden.

Im Rahmen dieser Arbeit soll geklärt werden, ob Argatroban und in welcher Konzentration eine sichere Alternative zu Heparin als Antikoagulation in Cell Saver Systemen darstellt. Klinische Relevanz hätte dies bei Patienten mit gesicherter HIT II, bei denen Cell Saver Systeme zum Einsatz kommen sollen.

3. Material und Methoden

3.1 Studienart und Votum der Ethikkommission

Es handelt sich um eine randomisierte, monozentrische, ex vivo Studie der Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin des Marienhospitals Osnabrück mit offenem Studiendesign. Die Studie wurde von der zuständigen Ethikkommission der Medizinischen Hochschule Hannover unter der Nummer 897 am 23.12.2010 genehmigt.

3.2 Studienteilnehmer

Bei den Studienteilnehmern handelt es sich um erwachsene Patienten (> 18 Jahre), die sich einer elektiven Operation bei malignen Tumoren unterziehen mussten und bei denen aus diesem Grund eine MAT als kontraindiziert angesehen wird.

Die Studienteilnehmer wurden im Rahmen der anästhesiologischen Vorbereitungen aufgeklärt und haben schriftlich der Studie zugestimmt. Patienten, die parallel an einer anderen Studie teilnahmen, bzw. in den vergangenen 30 Tagen an einer Studie teilgenommen hatten, sowie schwangere Patientinnen wurden nicht in die Studie eingeschlossen.

3.3 Randomisierung:

Für die Randomisierung wurden zunächst 20 Briefumschläge mit den vorgesehenen Untersuchungsgruppen beschickt, gemischt und anschließend von 1-20 nummeriert. Nach Einschluss eines Patienten wurde dem Studienteilnehmer die Umschlag mit der kleinsten Zahl zugeordnet. Nach „Verbrauch“ der ersten 20 Umschläge wurde ermittelt, bei welchen Konzentrationen erneut eine Versuchsdurchführung notwendig war, diese Proben wurden erneut verblindet und in geschlossenen Briefumschlägen gemischt und erneut fortlaufend nummeriert.

3.4 Aufteilung der Studienteilnehmer in die Versuchsgruppen

Vergleichbar dem üblichen Vorgehen, bei dem unfraktioniertes Heparin (25000 U/ 1000 ml NaCl) als Antikoagulanzen verwendet wird, soll in dieser Studie der Cell Saver Spüllösung eine festgelegte Argatrobankonzentration zugegeben werden.

Jeder Gruppe von jeweils 5 Patienten wurde eine vorgegebene Argatroban-Konzentration in der Spüllösung randomisiert zugesetzt. Entsprechend der Fragestellung der Studie wird mit 3 unterschiedlichen Argatroban Konzentrationen ($5 \mu\text{g ml}^{-1}$, $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ und $250 \mu\text{g ml}^{-1}$) in der Spüllösung sowie mit 2 unterschiedlichen Waschprogrammen pro Patient gearbeitet.

3.4.1 Studiengruppe 1 (ARG50)

In der ersten Studiengruppe betrug die Antikoagulanzkonzentration 50 mg Argatroban/1000 ml NaCl (= 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$). Diese Konzentration entspricht laut Angaben des Herstellers einer Äquivalenzdosis von 25000 IE Heparin/1000 ml NaCl.

3.4.2 Studiengruppe 2 (ARG250)

In der zweiten Studiengruppe wurde als Antikoagulanz eine Konzentration von 250 mg/1000 ml (= 250 $\mu\text{g ml}^{-1}$) NaCl verwendet.

3.4.3 Studiengruppe 3 (ARG5)

In der dritten Studiengruppe war eine Konzentration von 5 mg Argatroban/1000 ml NaCl (= 5 $\mu\text{g ml}^{-1}$) vorgesehen.

3.4.4 Studiengruppe 4 (HEP)

In der Kontrollgruppe wurde die vom Hersteller empfohlene Standardkonzentration von 25000 IE Heparin/1000 ml NaCl verwendet.

3.5 Versuchsdurchführung

3.5.1 MAT- System

Im Rahmen der Studie kommt das *Continuous-Auto-Tranfusions-System* (C.A.T.S.[®] Cell Saver System, Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg, Deutschland) zum Einsatz.

Das C.A.T.S. System ist ein kontinuierlich arbeitendes MAT-System, welches vergleichbar mit den kontinuierlichen Systemen zur Hämaphrese, nach dem Prinzip einer Durchflusszentrifuge arbeitet.

3.5.2 Versuchsaufbau

Das MAT-System besteht aus dem doppelläufigen Absaugschlauch, dem Blutsammelreservoir, den Pumpenschläuchen, der Waschzentrifugenkammer und dem Re-Transfusionsbeutel (Abb.1).

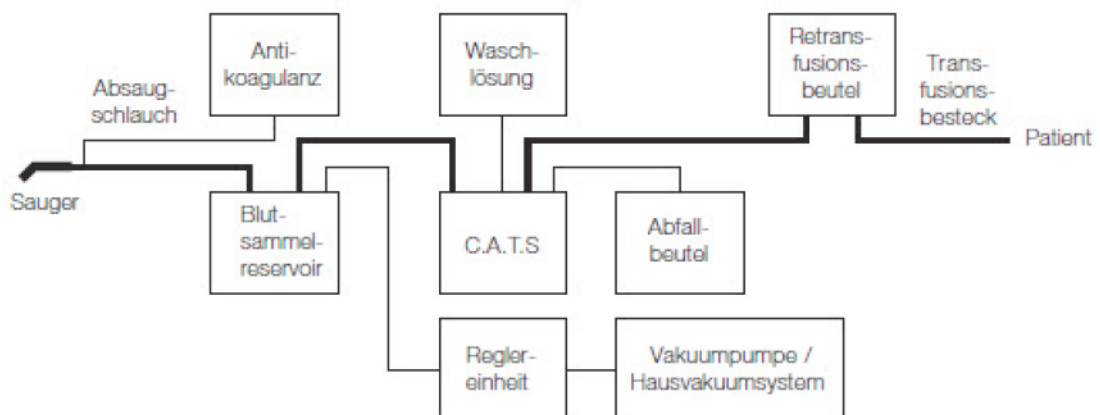


Abb. 1: schematischer Aufbau des C.A.T.S.[®] MAT-Systems

Zunächst werden 1000 ml NaCl 0,9% eine der Antikoagulantien in der entsprechenden Dosis zugefügt.

Das Reservoir wurde mit 100 ml der Antikoagulanzlösung gefüllt, hierbei wird durch wiederholtes Schütteln des Reservoirs darauf geachtet, dass die Kontaktflächen und insbesondere der 40 μ -Reservoirfilter vollständig mit der Antikoagulanzlösung in Kontakt kommt.

Während der Blutsammelphase wird dem MAT-System kontinuierlich 100 ml/h NaCl/Antikoagulanzlösung zugeführt. Das anschließend aus dem OP Feld abgesaugte Wundblut wird über die kontinuierliche Zufuhr der Antikoagulanzlösung ungerinnbar gemacht und bis zur Aufbereitung durch das MAT-System im Reservoir gesammelt. Die Sammelphase wurde entweder zum Ende der Operation oder bei vollständig gefülltem Reservoir (Kapazität 2200 ml) beendet, für die Durchführung des Versuches mit zwei unterschiedlichen Waschverfahren werden mindestens 600 ml Wundblut benötigt. Nach Beenden der Sammelphase wurde die Gesamtmenge des Reservoirs und die verbliebende Menge der NaCl/Antikoagulan-Lösung registriert und das MAT-System für die Aufbereitung aufgerüstet.

3.5.3 Aufbereitung des Wundbluts im MAT-System

Die Aufbereitung des Patientenbluts erfolgt innerhalb einer mit dem übrigen Schlauchsystem verbundenen rotierenden Waschkammer. Das Patientenblut wird aus dem Reservoir mit der Blutpumpe in die Waschkammer gefördert. Dort wird es kontinuierlich in drei aufeinanderfolgenden Verfahrensschritten aufbereitet und als gewaschenes Erythrozytenkonzentrat von der Konzentratpumpe in den Retransfusionsbeutel überführt (Abb.2).

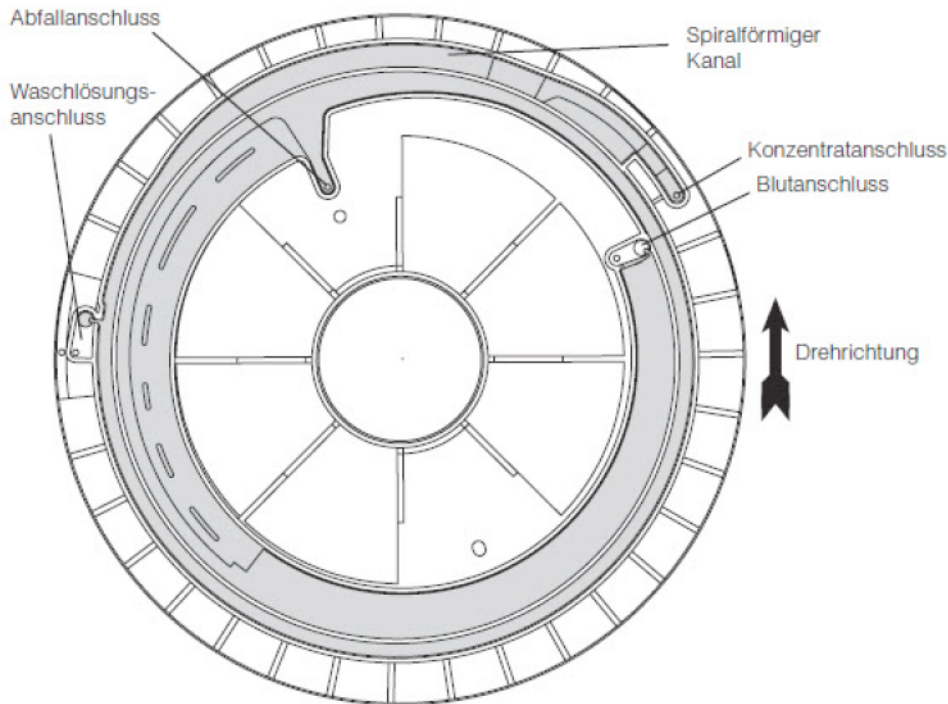


Abb. 2: C.A.T.S.® Waschkammer in der Aufsicht

Vom Blutanschluss bis zum Waschlösungsanschluss verläuft die erste Separationsstufe. In diesem Bereich wird das Blut auf einen Hämatokrit von ca. 80% aufkonzentriert. Der größte Teil von Blutplasma, Zelltrümmern, Leukozyten, Thrombozyten, Antikoagulant, alle sonstigen flüssigen Bestandteile sowie nicht emulgiertes Fett werden dabei abgetrennt. Aufgrund der Neigung des Kanals fließen die Blutzellen in einer dünnen Schicht am äußeren Kanalrand. Die flüssigen Bestandteile sowie das nicht emulgierte Fett fließen innen im Kanal zum Abfallanschluss. Im Bereich des Waschlösungsanschlusses liegt die Waschstufe. Die konzentrierten Erythrozyten werden von unten mit Waschlösung durchströmt und dabei resuspendiert. Zwischen Waschlösungsanschluss und Konzentratanschluss liegt die zweite Separationsstufe, in der die verbrauchte Waschlösung entfernt und ein Hämatokrit von >50 % eingestellt wird. Am Konzentratanschluss läuft das gewaschene Konzentrat in einen kleinen „See“. Der Füllstand dieses Sees wird von außen mit der Kamera des Konzentratsensors überwacht und durch die Konzentratpumpe auf eine konstante Höhe eingeregelt. Zu Beginn der Aufbereitung muss dieser „See“ (ca. 30 – 50 ml) erst angefüllt werden, bevor kontinuierlich Konzentrat aus der Waschkammer entnom-

men werden kann. Am Ende der Aufbereitung kann der größte Teil dieses Volumens in der Programmphase Leeren wieder aus der Kammer entnommen werden (Abb. 2).

Pro Patient wird das Sammelblut mit je 2 unterschiedlichen Waschprogrammen, dem *Emergency*-Waschprogramm und dem *High-Quality*-Waschprogramm aufgereinigt.

Hinter den verschiedenen Waschprogrammen verbergen sich unterschiedliche Volumenverhältnisse von Sammelblut zu Waschlösung:

- *Emergency*-Waschprogramm (Sammelblut:Waschlösung = 1:1)
- *High-Quality-Wash* (Sammelblut:Waschlösung = 1:7)

Die gesammelte Blutlösung bestehend aus Patientenblut und Spüllösung, wird fraktioniert den zwei Waschprogrammen zugeführt, was pro Waschvorgang jeweils eine neue Waschkammer erforderlich macht. Mit diesem Vorgehen wird sichergestellt, dass bei jedem der 3 Waschprogramme exakt das gleiche Verhältnis von Spüllösung zu Sammelblut vorliegt

3.6 Proben

3.6.1 Patientenprobe

Vor Beginn der Sammelphase wird jedem Patienten aus einem liegenden Zugang einmalig eine EDTA Blutprobe zur Bestimmung Hb, Hkt und Thrombozytenzahl und zwei Citratblutproben zur Bestimmung von Quick, aPTT und entnommen.

3.6.2 Proben aus dem MAT-System

Nach Abschluss der Sammelphase und vor Beginn der Aufbereitung wird mit einer sterilen Blasenspritze aus dem Reservoirausgang ca. 30 ml Blut entnommen, mittels einem Adapter und einer Kanüle wird nun eine Citrat-Monovette zur Bestimmung der Argatroban Konzentration (respektive der Heparinkonzentration in der Heparin Kontrollgruppe) und eine EDTA-Monovette zur Bestimmung von Hb, Hkt und Thrombozyten befüllt.

Nach Beginn des Aufpumpens des Blutkonzentrats in den Re-Transfusionsbeutel wird der Waschvorgang abgebrochen und mittels der Waschphase „Leeren“ wird die Waschkammer geleert. Es werden jeweils zwei Citratblutproben (*Citrate Monovettes*, C 772 G, 4 ml Kabe Labortechnik, Nürnberg-Elsenroth, Germany) zur Bestimmung der Argatrobankonzentration (respektive der Heparinkonzentration in der Heparin Kontrollgruppe) und zwei EDTA Blutproben (EDTA Monovetten, E 772 G, 3,5 ml, Kabe Labortechnik, Nürnberg-Elsenroth, Deutschland), zur Bestimmung von Hb und Hkt nach den jeweiligen Waschprogrammen im aufbereiteten Retransfusionsblut gewonnen (Abb. 3). Die Proben wurden nach der Abnahme unverzüglich dem Zentrallabor zugeführt.

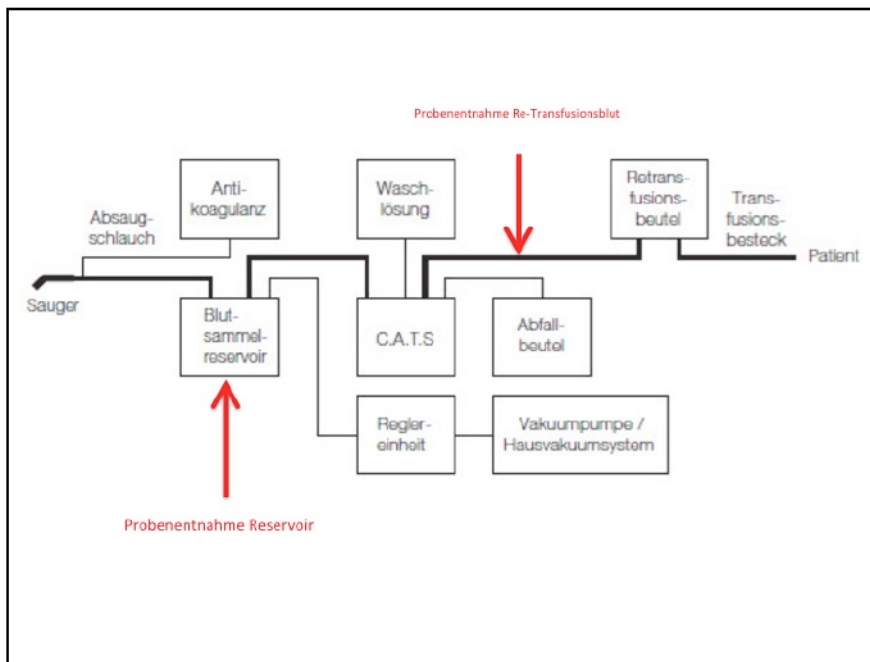


Abb. 3: Positionen der Probengewinnung im MAT-System

3.7 Probenbestimmung

Um eine umgehende Verarbeitung der Blutproben zu gewährleisten, wurde direkt nach Probenversand in das Zentrallabor ein in die Studienprotokolle eingewiesene MTA verständigt, welche dann die Probenverarbeitung durchführte. Hkt, Hb, Thrombozyten, Quick und aPTT wurden direkt nach Ankunft vom Zentrallabor des Marienhospitals Osnabrück (Leitung Dr. M. Wehmeyer) durch das Laborsystem Sysmex XN-2000 (Sysmex Deutschland, Norderstedt, Deutschland) bestimmt. Die Citratproben zur Bestimmung Antikagulan-konzentration wurden umgehend zentrifugiert (10 Minuten bei 4000 Umdrehungen/Minute, 1,86g), das Plasma pipettiert und bei -80°C bis zum Probenversand eingefroren.

3.7.1 Bestimmung der Argatrobankonzentration im Serum

Zur Bestimmung der Argatrobankonzentration wurden die bei -80°C gefrorenen Proben trockeneisgekühlt per Expressversand an ein auf die Argatrobanbestimmung spezialisiertes Labor (*Analytical Clinical Concepts GmbH*, Leidersbach, Deutschland) verschickt. Die Bestimmung der Argatroban Konzentration im Serum erfolgte, wie durch Rhea et. al. beschrieben, per Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie Kopplung [Rhea et al 2012]

3.7.2 Bestimmung der Heparinkonzentration im Serum

Heparin ist eine körpereigene Substanz, welche zusammen mit Histamin in Mastzellen vorliegt. Gewebe mit hoher Heparinkonzentration sind Leber, Lunge und Darm. Das klinisch verwendete Heparin stammt im Wesentlichen aus Schweinedarm. Heparin ist ein kettenartig aufgebautes, sehr komplexes Glucosaminoglycan mit einem Molekulargewicht, das zwischen 4000 und 40000 Dalton variiert. Zur Bestimmung der Heparinkonzentration stehen aufgrund dieser heterogenen Eigenschaften nur indirekte Nachweismethoden zur Verfügung. Zur Bestimmung der Anti-Xa-Aktivität wurden die tiefgefrorenen Proben an die Gerinnungspraxis Mannheim (Leitung Prof. Dr. C. E. Dempfle) verschickt und dort bestimmt.

3.8 Größe der Studiengruppen und Statistik

Für die in dieser Studie vorliegende Fragestellung lagen bei Studienbeginn keine Daten oder vorläufigen Ergebnisse anderer Studien vor, daher wurde keine formale Fallzahlschätzung vorgenommen. Zielsetzung war es, in jeder Studiengruppe jeweils fünf Patienten zu untersuchen. Sollte, z.B. aufgrund nicht ausreichendem Probenmaterial oder Gerinnselbildung und damit Verstopfen des MAT-Systems die Untersuchung im Einzelfall nicht durchgeführt werden können, wurden Studienteilnehmer solange nachrekrutiert, bis die vorgesehene Anzahl von fünf Patienten je Studiengruppe erreicht wurde.

Die Daten werden als Median und Bereich oder als Mittelwert und Standardabweichung dargestellt.

4. Ergebnisse:

4.1 Biometrische Daten

Insgesamt sind in die Studie 42 Patientinnen und Patienten mit malignen Grunderkrankungen eingeschlossen worden und haben nach Aufklärung der Teilnahme zugestimmt. Im Verlauf der Studie zeigte sich, dass bei 19 Studienteilnehmern die Menge des gesammelten Wundblutes (Durchschnittliche Menge Wundblut 489 ml, durchschnittliche Menge Antikoagulanzlösung 350 ml) nicht für die Aufbereitung nach Studienprotokoll ausreichen und somit aus der Betrachtung ausgeschlossen werden mussten. Blut von drei Patienten aus der Untersuchungsgruppe ARG5 ($5\mu\text{g ml}^{-1}$) konnte, trotz kalkuliert ausreichendem Wundblut von über 600 ml, aufgrund von Gerinnselbildung im Reservoirfilter, nicht durch das MAT-System aufbereitet werden. Letztlich mussten 22 Patienten nachrekrutiert werden.

Als Ergebnis konnten wir Blut von 20 Patienten (Alter 67 ± 11 Jahre, 12 männlich, 8 weiblich) durch das MAT-System aufbereiten und den Analysen zuführen.

Bei allen Patienten wurden große, tumorchirurgische Eingriffe durchgeführt, bei denen die routinemäßige Verwendung von MAT-Systemen kontraindiziert war: Ösophagusresektion (n=5), Duodenopankreatektomie (n=7), Leber-Resektion (n=3), Magenresektion (n=1), radikale Hysterektomie (n=1), Rektumamputation (n=1), Nephrektomie (n=1) und Osteosynthese einer pathologischen Femurfraktur (n=1).

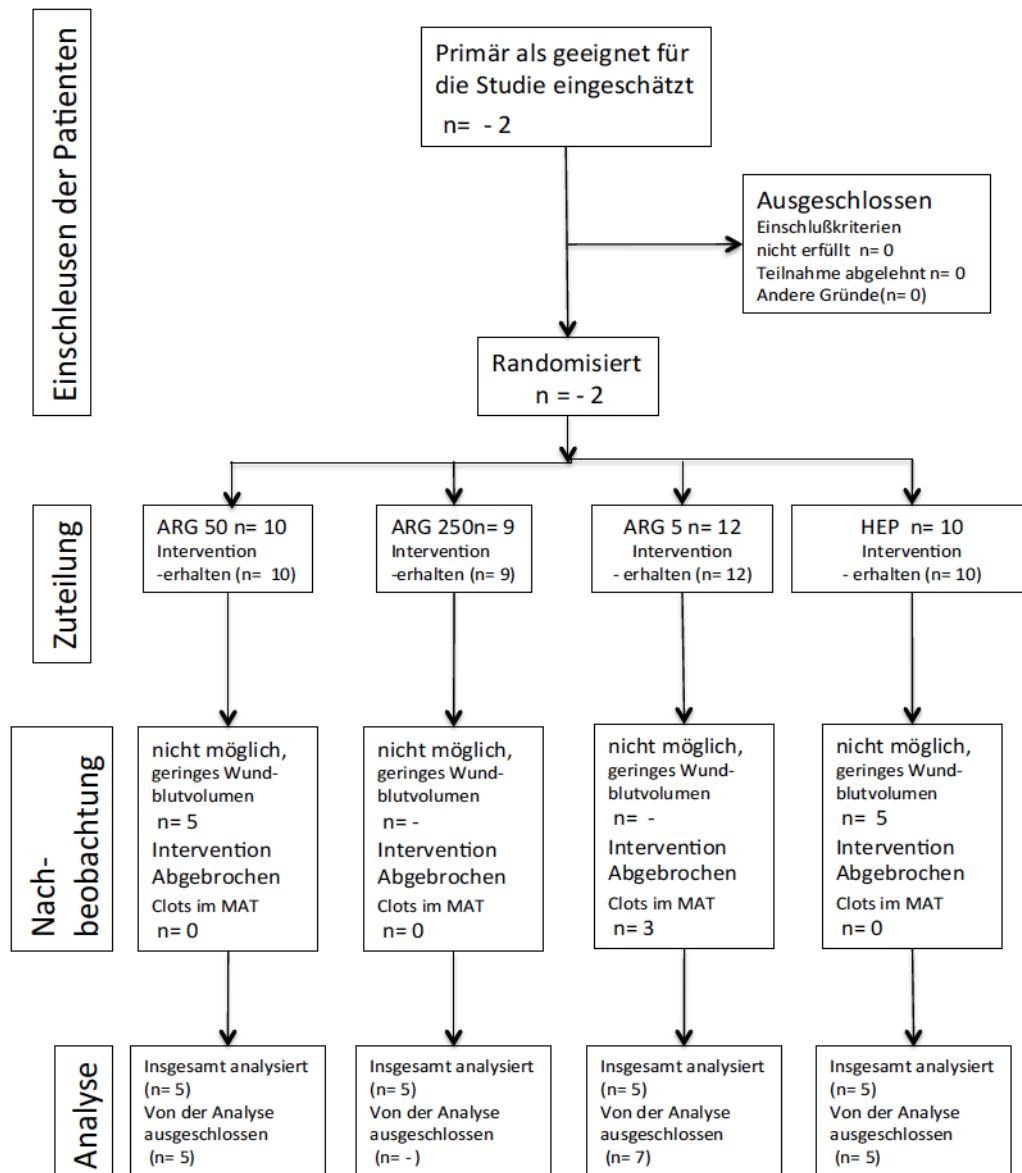


Abbildung 4: CONSORT Flussdiagramm

4.2 Heparin Clearance

Die Studienlösung von 25.000 Einheiten Heparin/ 1.000 ml NaCL-Lösung ergab eine Konzentration von $1,7 \pm 1,4$ Einheiten/ml (min. 0,4, max. 3,78 Einheiten/ml) im Reservoir des MAT-Systems. Nach der Aufbereitung des gesammelten Blutes mit dem Emergency-Waschprogramm lag in vier Fällen die Heparinkonzentration im Re-Transfusionsblut unterhalb der Nachweisgrenze von 0,1 Einheiten/ml und in einem Fall mit 0,14 Einheiten/ml über der Nachweisgrenze. Nach Aufbereitung des Wundblutes mit dem *High-Quality*-Waschprogramm lag ebenfalls in vier Fällen die Heparinkonzentration unterhalb der Nachweisgrenze und in einem Fall konnten 0,27 Einheiten/ml Anti Xa Aktivität nachgewiesen werden. Beide Erythrozytenkonzentrate, bei denen Rest Heparin nachgewiesen werden konnte stammen nicht vom selben Patienten, somit konnte in 20% der gewonnene Proben Restheparinaktivität nachgewiesen werden.

4.3 Argatroban Clearance

Die Argatroban Konzentrationen im Reservoir waren niedriger als in der verwendeten Studienlösung, erhöhten sich jedoch linear mit zunehmender Argatroban Konzentration in der Studienlösung (Abb. 5).

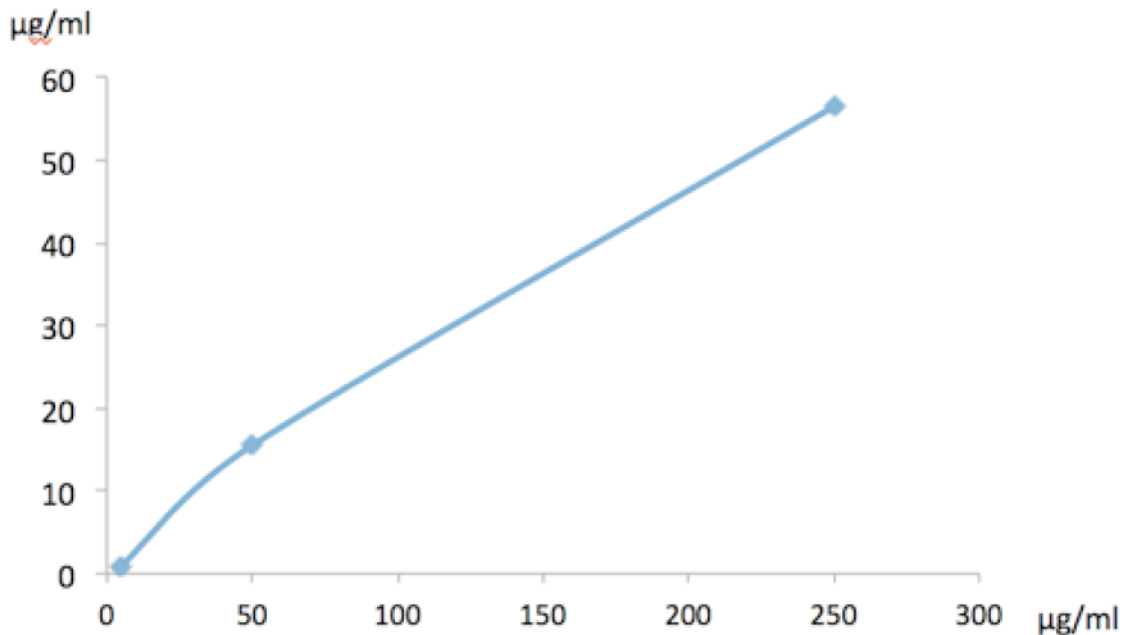


Abb. 5 Argatroban Konzentration (µg/ml) im Reservoir des MAT-Systems.

Zu beobachten war, dass in drei von acht Fällen (38%) in der Untersuchungsgruppe ARG5 (Argatrobankonzentration von $5 \mu\text{g ml}^{-1}$ Spüllösung) aufgrund von Blutgerinnselbildung im MAT-System das gewonnene Blut nicht aufbereitet werden konnte.

In allen verbleibenden Proben konnte das Blut erfolgreich mit den beiden Waschprogrammen durch das MAT-System aufbereitet werden, und beide Waschverfahren führten zu vergleichbaren Hämatokritwerten in den Erythrozytenkonzentraten: $63 \pm 24\%$ (51-74%) nach dem *Emergency*-Waschprogramm und $65,2 \pm 23\%$ (50,9 – 75,1%) nach dem *High-Quality*-Waschprogramm.

Wie in den Abbildungen 6, 7 und 8 gezeigt werden kann, wurde eine Rest-Argatroban Konzentration in allen Erythrozytenkonzentraten nachgewiesen. Die Aufbereitung mittels *Emergency*-Waschprogramm in der Gruppe ARG250 (250µg/ml Argatroban) ergab mit $23 \pm 13 \mu\text{g/ml}$ die höchste Argatroban Konzentration im Re-Transfusionsblut. Die Aufbereitung mit dem *High-Quality*-

Waschprogramm führte zu niedrigeren Argatroban Konzentrationen im Erythrozytenkonzentrat als nach der Anwendung des *Emergency*-Waschprogramms. In beiden Waschprogrammen war die Argatroban *Clearence* am höchsten in der Gruppe ARG50 verglichen mit den Gruppen ARG5 und ARG250 (Abb. 9). Das *Emergency*-Waschverfahren reduzierte die Argatroban Konzentration auf 10-40% und das *High-Quality*-Waschverfahren auf 5-11% der initialen Konzentration im Reservoir des MAT- Systems.

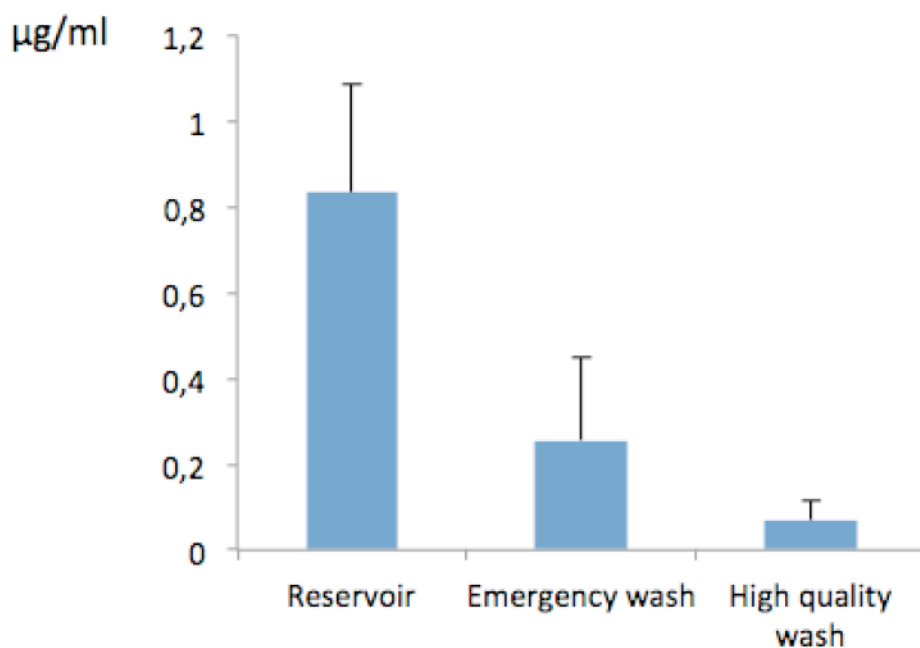


Abb. 6: Argatroban Konzentration im Reservoir und im Erythrozytenkonzentrat nach Aufbereitung im *Emergency*- und *High-Quality*- Waschprogramm in der Untersuchungsgruppe ARG5

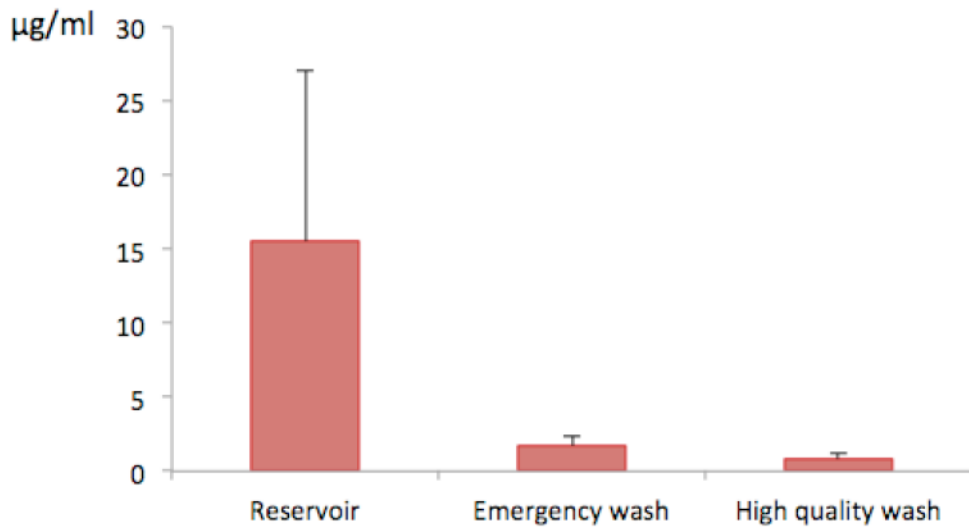


Abb. 7: Argatroban Konzentration im Reservoir und im Erythrozytenkonzentrat nach Aufbereitung im *Emergency*- und *High-Quality*- Waschprogramm in der Untersuchungsgruppe ARG50.

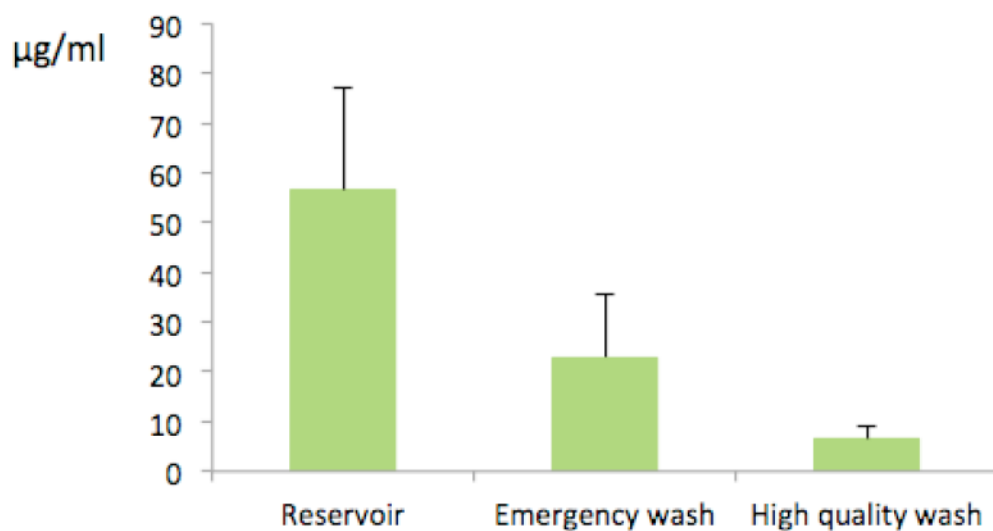


Abb. 8: Argatroban Konzentration im Reservoir und im Erythrozytenkonzentrat nach Aufbereitung im *Emergency*- und *High-Quality*- Waschprogramm in der Untersuchungsgruppe ARG 250.

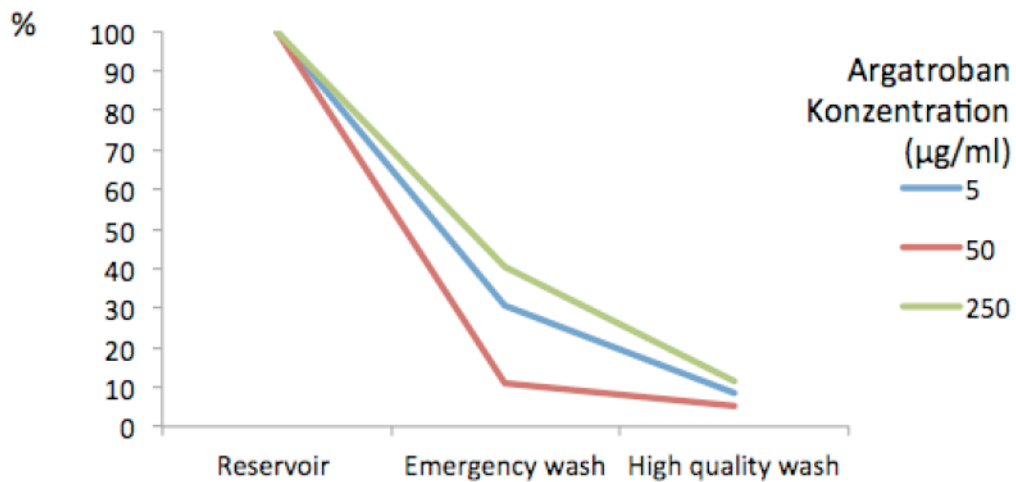


Abb. 9 Vergleich der relativen Argatroban Clearance nach Aubereitung durch Emergency- und High-Quality-Waschprogramm , Argatrobran Konzentration im Reservoir wurde =100% gesetzt.

50 mg Argatroban	Patient	Reservoir	Emergency- Waschpr.	HQ-Waschpr.	Einheit
Patient 1	< 2,5	2976,1	1061,2	463,0	ng/ml
Patient 2	< 2,5	20199,5	822,6	954,0	ng/ml
Patient 3	< 2,5	16816,9	2151,7	4417,3	ng/ml
Patient 4	< 2,5	5853,4	2263,8	1369,6	ng/ml
Patient 5	< 2,5	31633,1	2178,9	794,2	ng/ml
Mittelwert	< 2,5	15495,8	1695,6	1599,6	ng/ml
Standardabweichung	0	11554,2	694,5	1608,6	ng/ml
Min.	<2,5	2976,1	822,6	463,0	ng/ml
Max	< 2,5	31633,1	2263,8	4417,3	ng/ml

Tabelle 1: Argatrobrankonzentrationen in Untersuchungsgruppe ARG50.

250 mg Argatroban	Patient	Reservoir	Emergency- Waschpr.	HQ- Waschpr.	Einheit
Patient 1	< 2,5	54339,2	10127,1	9915,6	ng/ml
Patient 2	< 2,5	90537,6	14288,8	6809,8	ng/ml
Patient 3	< 2,5	41237,1	20136,3	3291,0	ng/ml
Patient 4	< 2,5	38480,4	27950,5	4300,9	ng/ml
Patient 5	< 2,5	57692,4	42339,2	8335,9	ng/ml
Mittelwert	< 2,5	56457,3	22968,4	6530,6	ng/ml
Standardabweichung	0,0	20750,3	12730,9	2750,5	ng/ml
Min.	< 2,5	38480,4	10127,1	3291,0	ng/ml
Max.	< 2,5	90537,6	42339,2	9915,6	ng/ml

Tabelle 2: Argatrobankonzentrationen in Untersuchungsgruppe ARG250.

5 mg Argatroban	Patient	Reservoir	Emergency- waschpr.	HQ- Waschpr.	Einheit
Patient 1	2,5	745,4	73,3	54,2	ng/ml
Patient 2	2,5	1191,9	219,4	43,9	ng/ml
Patient 3	2,5	497,2	496,5	123,7	ng/ml
Patient 4	2,5	877,8	406,8	20,4	ng/ml
Patient 5	2,5	855,2	81,5	105,4	ng/ml
Mittelwert	< 2,5	833,5	255,5	69,5	ng/ml
Standardabweichung	0,0	250,9	190,9	43,4	ng/ml
Min.	< 2,5	497,2	73,3	20,4	ng/ml
Max.	< 2,5	1191,9	496,5	123,7	ng/ml

Tabelle 3: Argatrobankonzentrationen in Untersuchungsgruppe ARG5

Heparin 25.000 U	Patient	Reservoir	Emergency- Waschpr.	HQ- Waschpr.	Einheiten
Patient 1	< 0,1	1,90	< 0,1	0,27	U/ml
Patient 2	< 0,1	0,40	< 0,1	< 0,1	U/ml
Patient 3	< 0,1	1,98	0,14	< 0,1	U/ml
Patient 4	< 0,1	0,40	< 0,1	< 0,1	U/ml
Patient 5	< 0,1	3,78	< 0,1	< 0,1	U/ml
Mittelwert	< 0,1	1,69	0,14	0,27	U/ml
Standardabweichung	0	1,40	0,06	0,12	U/ml
Min.	< 0,1	0,40	0,14	< 0,1	U/ml
Max.	< 0,1	3,78	0,14	0,27	U/ml

Tabelle 4: Anti Xa Konzentration in der Kontrollgruppe HEP

5. Diskussion

In dieser Ex-vivo-Studie wurde die routinemäßige Anwendung eines Maschinellen-Autotransfusionssystems (MAT-System) bei einem Patientenkollektiv imitiert, bei dem aufgrund einer Re-transfusion des behandelten Blutes kontraindiziert war.

MAT-Systeme finden in der klinischen Routine dann Anwendung, wenn aufgrund des operativen Eingriffs mit einem höheren Blutumsatz gerechnet werden muss und die Transfusion autologen Bluts wahrscheinlich ist [Ashworth & Klein 2010]. Der Einsatz solcher Systeme kann die Transfusion von allogenen Fremdblut deutlich reduzieren und in Einzelfällen sogar ganz verhindern [Waters 2013]. Insbesondere bei Patienten mit vermuteter oder nachgewiesener HIT, welche sich einem solchen operativen Eingriff unterziehen müssen darf der Nutzen von blutsparenden Maßnahmen im Sinne eines PBM nicht außer Acht gelassen werden [Waters 2013; Spahn 2010].

In verschiedenen Arbeiten konnte eine Rest-Heparinaktivität im autologen Re-Transfusionsblut nachgewiesen werden [Umlas & O'Neill 1981b; Paravicini et al 1983; Vorweg et al 1998] [Marx et al 2001], leider liegen hier keine aktuellen Studienergebnisse vor.

Die Ergebnisse dieser Studie liefern wichtige Informationen über die Verwendung von Heparin und Argatroban zur Antikoagulation in MAT-Systemen bei Patienten mit HIT:

Erstens: Obwohl Heparin aus der Mehrzahl der Proben vollständig ausgewaschen wurde ist bei 20% unserer Probanden eine Restheparinaktivität nachweisbar. Wie oben bereits erwähnt, zeigen Vorstudien, dass Heparin nicht vollkommen durch die Aufbereitung im MAT-System ausgewaschen und eliminiert wird. Daher sollte Heparin als Antikoagulation in MAT-Systemen bei Patienten mit vermuteter oder nachgewiesener HIT nicht verwendet werden, da nicht ausgeschlossen werden kann, dass kleine Restmengen von Heparin mit dem Re-Transfusionsblut infundiert werden. Da es sich bei der HIT II um ein allergi-

sches Geschehen mit Bildung von Antikörpern gegen den PF4-Heparin-Komplex handelt [Warkentin et al 1998; Warkentin & Greinacher 2004], erscheint es folgerichtig, bei entsprechend disponierten Patienten jede Art der Heparinexposition zu vermeiden. Die Transfusion von „Heparin-kontaminiertem“ Blut kann das Risiko einer thromb-embolischen Komplikation in diesem Patientenkollektiv erhöhen [Trehel-Tursis et al 2012].

Bei der Interpretation der Ergebnisse muss berücksichtigt werden, dass, trotz intensiver Recherche, für die Analyse der Heparinkonzentrationen, kein Labor mit einer direkten Heparinnachweismethode zur Verfügung gestanden hat und auf eine indirekte Detektion von Heparin durch die Bestimmung der anti-Xa- und/oder anti-IIa-Aktivität zurückgegriffen werden musste. Bei diesem indirekten Verfahren sind Spuren von Heparin unter einer Nachweisgrenze von 0,1 U/ml nicht erfassbar. Daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass in dieser Studie sehr geringe Heparinrestmengen in den Proben nicht erfasst wurden. Daher erscheint es folgerichtig, auf die Verwendung von Heparin zur Antikoagulation im MAT-System bei Patienten mit vermuteter und/oder nachgewiesener HIT abzusehen. Es können keine Aussagen dazu gemacht werden, ob diese Empfehlung nur für Patienten mit unterstellter oder bewiesener HIT Erkrankung gelten sollte oder auch für Patienten in Betracht kommt bei denen eine HIT Erkrankung zuvor diagnostiziert wurde und bei denen jedoch zum Operations- bzw. Transfusionszeitpunkt keine HIT-Antikörper mehr nachzuweisen sind.

Zweitens handelt es sich bei dieser Studie um die erste Studie, welche die Anwendung von Argatroban zur Antikoagulation in MAT-Systemen und dessen Auswaschverhalten in verschiedenen Waschprogrammen untersucht hat. Die Ergebnisse zeigen die qualitativen Unterschiede in der Aufbereitung von gewonnenem Wundblut mit zwei unterschiedlichen Waschprogrammen, dem *Emergency*-Waschprogramm und dem *High-Quality*-Waschprogramm. Das *Emergency*-Waschprogramm wird zur Aufbereitung großer Blut-Volumina eingesetzt, die z.B. in Notfallsituationen anfallen. In Notfallsituationen werden große Volumina von anfallendem Wundblut in kurzer Zeit im MAT-Reservoir gesammelt und sofort und schnell verarbeitet, damit dem hypovolämen Patienten autologes Blut zügig transfundiert werden kann. Damit die Aufbereitung schnell funktioniert und somit das Retransfusionsblut im Notfall zügig zur Verfügung

gestellt werden kann, wird das Wundblut mit 7-fach geringerem Waschlösungsvolumen aufbereitet als mit dem Vergleichsprogramm *High-Quality-Wash*. Die Ergebnisse unserer Studie zeigen, dass mit dem höherwertigeren Aufbereitungsverfahren die Argatroban Clearance deutlich effektiver war.

Argatroban hat mit 527g/mol ein geringes Molekulargewicht. Für kleine und lösliche Moleküle kann dieses effektive Auswaschen eine deutliche Reduktion von Wirkstoffkonzentrationen in einzelnen Patienten bedeuten. Um die Bedeutung dieses Aspekts näher zu beurteilen sollten weitere Studien die Bedeutung dieses Aspekts untersuchen. Dadurch, dass bei Konzeption dieser Studie keine Informationen bzgl. der Verwendung von Argatroban in MAT-Systemen zur Verfügung standen, musste bezüglich der Dosierung von Argatroban ein pragmatischer Ansatz gewählt werden. Es wurden drei verschiedenen Konzentrationen von Argatroban für die Studiengruppen kalkuliert. In der ersten Studiengruppe wurde eine Konzentration von $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ verwendet, da die gerinnungshemmende Wirksamkeit dieser Dosierung einer der von 25.000 IE unfraktioniertem Heparin entspricht. Als weitere Dosierungen wurden die zehnfach geringere und die fünffach höhere Konzentration eingesetzt, in der Hoffnung die möglichen Grenzen des unteren und oberen Dosisbereiches identifizieren zu können. Obwohl das Blut von 5 Patienten aus der Untersuchungsgruppe ARG5 aufbereitet und analysiert werden konnte, musste aufgrund von Gerinnselbildung im MAT-Reservoir bei drei Patienten die Aufbereitung gestoppt werden und das Blut konnte nicht aufbereitet werden. Daher lässt sich schließen, dass eine Konzentration von $5 \mu\text{g ml}^{-1}$ zu niedrig ist um eine ausreichende Antikoagulation des abgesaugten Wundblutes im MAT-System zu gewährleisten. Verglichen hiermit zeigten die anderen 2 Konzentrationen von 50 und $250 \mu\text{g ml}^{-1}$ eine ausreichende Antikoagulation im MAT-System und in diesen Gruppen konnten keine Versuchsabbrüche aufgrund von Blutgerinnselbildung im MAT-System beobachtet werden.

Nicht überrascht hat die Tatsache, dass in der Gruppe mit der höchsten Argatrobankonzentration (ARG250) in beiden Waschprogrammen auch die höchsten Konzentrationen von Argatroban im Retransfusionsblut zu finden war. Im *Emergency*-Waschprogramm werden in dieser Gruppe im Mittel $22 \mu\text{g/ml}$ Argatroban in den Patienten transfundiert. In Situationen, in denen große Mengen an aufbereitetem Wundblut retransfundiert werden müssen, kann dies be-

deuten, dass die Dosierung von $250 \mu\text{g ml}^{-1}$ Argatroban im Retransfusionsblut das Potential hat, eine überschießende Antikoagulation zu provozieren, eine Blutungssituation zu unterstützen und zu verlängern. Selbst bei im *High-Quality*-Waschprogramm aufbereitetem Retransfusionsblut verbleiben $6,5 \mu\text{g/ml}$ Argatroban im Retransfusionblut, auch diese Konzentration könnte unter Umständen das Potential haben, akute Blutungen zu unterstützen, bzw. aufrecht zu erhalten. Daher kann die Anwendung von $250 \mu\text{g ml}^{-1}$ Argatroban aus diesen Gründen nicht empfohlen werden.

Die Verwendung von $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ Argatroban zur Antikoagulation in MAT-Systemen zeigte signifikant niedrigere Konzentrationen von Argatroban im Retransfusionsblut. Obwohl die Argatroban Dosierung nur fünffach niedriger dosiert war konnte im Retransfusionsblut nur ein Zehntel der Konzentration gefunden werden. Die Infusion von 1000 ml Retransfusionsvolumens unter der Verwendung von $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ im MAT-System würde theoretisch zu einem Argatroban „Bolus“ von $0,7\text{-}1,7\mu\text{g}$ führen. Verglichen mit der Dosierung von $2\mu\text{g/kg}$ Körpergewicht pro Minute Argatroban um eine Argatroban induzierte Antikoagulation zu erreichen, würde ein solcher Bolus durch die Autotransfusion erwartungsgemäß nicht zu einer klinisch relevanten Beeinflussung der Gerinnungshemmung führen können. In einer klinischen Blutungssituation würden sich ärztliche Kollegen und Kolleginnen sicher schwer damit tun, einem blutenden Patienten jegliche Dosis eines Antikoagulanzes, welches akute Blutungssituationen unterhalten und/oder fördern könnte, zu infundieren. Die mag in dieser Form aber auch für Heparin gelten, nur hier ist der Nachweis schwieriger zu führen, da die indirekte Messung eine wesentlich ungenauere Nachweismethode als direkte Nachweismethoden darstellt. Daher können aufgrund des Fehlens eines direkten Nachweisverfahrens für Heparin auch bei den nicht positiven Ergebnissen gewisse Restheparinwirkungen und/oder Konzentrationen nicht ausgeschlossen werden. Daher kann mit den Ergebnissen aus dieser Studie empfohlen werden, weitere Studien zu Dosisfindung von Heparin zur Anwendung in MAT - Systemen durchzuführen.

Die vorliegende Arbeit war nicht als Dosisfindungsstudie konzipiert, daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass mit Argatrobandosierungen von unter $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ nicht auch eine auszureichende Antikoagulation in MAT-Systemen er-

reichen kann, hiermit könnte sicher auch die Menge an Argatroban, welche mit dem Transfusionsblut wieder in den Patienten gegeben wird, deutlich reduziert werden. Weiterhin ist die vorliegende Arbeit eine ex-vivo Studie. Obwohl beim Studien Design besonders darauf geachtet wurde, die Bedingungen des klinischen Alltags zu berücksichtigen, kann über die klinischen Auswirkungen der Re-Transfusion der hier beschriebenen Argatroban Konzentrationen in stark blutenden Notfallpatienten nur spekuliert werden, für die Routineanwendung mit Heparin liegen hier bereits Hinweise über Transfusionsmengen assoziierte Blutungsstörungen aufgrund von Antikoagulanzwirkung vor [Rollins et al 2011]. Darüberhinaus ist aus ethischen Gründen Blut von Patienten mit malignen Erkrankungen verwendet worden. Diese Versuchsgruppe ist gewählt worden, um anderen Patientinnen und Patienten das MAT-Verfahren nicht vorenthalten zu müssen und möglichst vielen Patienten im Untersuchungszeitraum regulär das MAT-Verfahren zur Verfügung zu stellen. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass die vorliegenden malignen Grunderkrankungen Auswirkungen auf das Gerinnungssystem der Patienten und damit auch Einfluss auf die Ergebnisse dieser Studien gehabt haben.

6. Schlussfolgerungen

Bei Patientinnen und Patienten mit vermuteter oder nachgewiesener HIT sollte Heparin als Antikoagulant in MAT-Systemen nicht angewendet werden, da im Transfusionsblut Restkonzentrationen von Heparin nachweisbar waren. Argatroban kann als alternatives Antikoagulant in MAT-Systemen eine Gerinnungsbildung verhindern, hierbei ist eine Konzentration von $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ effektiver als eine Konzentration von $5 \mu\text{g ml}^{-1}$. In dieser Studie konnte erstmalig gezeigt werden, dass Argatroban als Antikoagulant im C.A.T.S.[®] MAT-System als eine verlässliche Alternative zum bisher verwendeten Heparin angewendet werden kann. $250 \mu\text{g ml}^{-1}$ Argatroban wies nach Aufbereitung durch die Waschzyklen relevante Argatrobankonzentrationen auf, die bei Re-Transfusionen zu euklinisch relevanten Antikoagulation führen könnten und sind daher als ungeeignet zu bewerten. Weitere Studien sollten die fehlende Information über die klinischen Folgen der Re-Transfusion von maschinell aufbereiteten Erythrozytenkonzentraten mit Rest-Argatroban Konzentrationen und über alternative, ggf. niedrigere Dosierungen liefern.

7. Literaturverzeichnis

1. Akca, S., Haji-Michael, P., de Mendonça, A., Suter, P., Levi, M. & Vincent, J.L., **2002**, Time course of platelet counts in critically ill patients, *Critical care medicine*, 30(4), pp. 753-6.
2. Ashworth, A. & Klein, A.A., 2010, Cell salvage as part of a blood conservation strategy in anaesthesia, *British journal of anaesthesia*, 105(4), pp. 401-16.
3. Brander, L., Reil, A., Bux, J., Taleghani, B.M., Regli, B. & Takala, J., **2005**, Severe transfusion-related acute lung injury, *Anesthesia and analgesia*, 101(2), pp. 499-501, table of contents.
4. Busche, M.N., Herold, C., Krämer, R., Knobloch, K., Vogt, P.M. & Rennekampff, H.O., **2011**, Evaluation of prophylactic anticoagulation, deep venous thrombosis, and heparin-induced thrombocytopenia in 21 burn centers in Germany, Austria, and Switzerland, *Annals of plastic surgery*, 67(1), pp. 17-24.
5. Carless, P.A., Henry, D.A., Moxey, A.J., O'Connell, D., Brown, T. & Fergusson, D.A., **2010**, Cell salvage for minimising perioperative allogeneic blood transfusion, *Cochrane database of systematic reviews (Online)*(3), p. CD001888.
6. Colwell, C.W., Beutler, E., West, C., Hardwick, M.E. & Morris, B.A., **2002**, Erythrocyte viability in blood salvaged during total joint arthroplasty with cement, *The Journal of bone and joint surgery. American volume*, 84-A(1), pp. 23-5.
7. Dager, W.E., Dougherty, J.A., Nguyen, P.H., Militello, M.A. & Smythe, M.A., **2007**, Heparin-induced thrombocytopenia: treatment options and special considerations, *Pharmacotherapy*, 27(4), pp. 564-87.
8. Davis, M., Sofer, M., Gomez-Marin, O., Bruck, D. & Soloway, M.S., **2003**, The use of cell salvage during radical retropubic prostatectomy: does it influence cancer recurrence? *BJU international*, 91(6), pp. 474-6.
9. Domen, R.E., **1998**, Adverse reactions associated with autologous blood transfusion: evaluation and incidence at a large academic hospital, *Transfusion*, 38(3), pp. 296-300.

10. Drackley, A., Newbold, K.B., Paez, A. & Heddle, N., **2012**, Forecasting Ontario's blood supply and demand, *Transfusion*, 52(2), pp. 366-74.
11. Dresner, S.M., Lamb, P.J., Shenfine, J., Hayes, N. & Griffin, S.M., **2000**, Prognostic significance of peri-operative blood transfusion following radical resection for oesophageal carcinoma, *European journal of surgical oncology : the journal of the European Society of Surgical Oncology and the British Association of Surgical Oncology*, 26(5), pp. 492-7.
12. Duffy, G. & Neal, K.R., **1996**, Differences in post-operative infection rates between patients receiving autologous and allogeneic blood transfusion: a meta-analysis of published randomized and nonrandomized studies, *Transfusion medicine (Oxford, England)*, 6(4), pp. 325-8.
13. Esper, S.A. & Waters, J.H., **2011**, Intra-operative cell salvage: a fresh look at the indications and contraindications, *Blood transfusion = Trasfusione del sangue*, 9(2), pp. 139-47.
14. Fong, J., Gurewitsch, E.D., Kang, H.J., Kump, L. & Mack, P.F., **2007**, An analysis of transfusion practice and the role of intraoperative red blood cell salvage during cesarean delivery, *Anesthesia and analgesia*, 104(3), pp. 666-72.
15. Geoghegan, J., Daniels, J.P., Moore, P.A., Thompson, P.J., Khan, K.S. & Gülmezoglu, A.M., **2009**, Cell salvage at caesarean section: the need for an evidence-based approach, *BJOG : an international journal of obstetrics and gynaecology*, 116(6), pp. 743-7.
16. Girolami, B., Prandoni, P., Stefani, P.M., Tanduo, C., Sabbion, P., Eichler, P., Ramon, R., Baggio, G., Fabris, F. & Girolami, A., **2003**, The incidence of heparin-induced thrombocytopenia in hospitalized medical patients treated with subcutaneous unfractionated heparin: a prospective cohort study, *Blood*, 101(8), pp. 2955-9.
17. Gombotz, H., **2012**, Patient Blood Management: A Patient-Orientated Approach to Blood Replacement with the Goal of Reducing Anemia, Blood Loss and the Need for Blood Transfusion in Elective Surgery, *Transfusion medicine and hemotherapy : offizielles Organ der Deutschen Gesellschaft für Transfusionsmedizin und Immunhamatologie*, 39(2), pp. 67-72.

18. Greinacher, A., Alban, S., Dummel, V., Franz, G. & Mueller-Eckhardt, C., **1995**, Characterization of the structural requirements for a carbohydrate based anticoagulant with a reduced risk of inducing the immunological type of heparin-associated thrombocytopenia, *Thrombosis and haemostasis*, 74(3), pp. 886-92.
19. Greinacher, A., Fendrich, K. & Hoffmann, W., **2010**, Demographic Changes: The Impact for Safe Blood Supply, *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, 37(3), pp. 141-8.
20. Greinacher, A., Fendrich, K., Alpen, U. & Hoffmann, W., **2007**, Impact of demographic changes on the blood supply: Mecklenburg-West Pomerania as a model region for Europe, *Transfusion*, 47(3), pp. 395-401.
21. Hansen, E., Bechmann, V. & Altmeyen, J., **2002**, Intraoperative blood salvage in cancer surgery: safe and effective? *Transfusion and apheresis science : official journal of the World Apheresis Association : official journal of the European Society for Haemapheresis*, 27(2), pp. 153-7.
22. Hansen, E., Knuechel, R., Altmeyen, J. & Taeger, K., **1999**, Blood irradiation for intraoperative autotransfusion in cancer surgery: demonstration of efficient elimination of contaminating tumor cells, *Transfusion*, 39(6), pp. 608-15.
23. Horsewood, P., Warkentin, T.E., Hayward, C.P. & Kelton, J.G., **1996**, The epitope specificity of heparin-induced thrombocytopenia, *British journal of haematology*, 95(1), pp. 161-7.
24. Hovav, T., Yedgar, S., Manny, N. & Barshtein, G., **1999**, Alteration of red cell aggregability and shape during blood storage, *Transfusion*, 39(3), pp. 277-81.
25. Innerhofer, P., Klingler, A., Klimmer, C., Fries, D. & Nussbaumer, W., **2005**, Risk for postoperative infection after transfusion of white blood cell-filtered allogeneic or autologous blood components in orthopedic patients undergoing primary arthroplasty, *Transfusion*, 45(1), pp. 103-10.
26. Kadidal, V.V., Mayo, D.J. & Horne, M.K., **1999**, Heparin-induced thrombocytopenia (HIT) due to heparin flushes: a report of three cases, *Journal of internal medicine*, 246(3), pp. 325-9.
27. Karkouti, K., Wijeyesundera, D.N., Yau, T.M., Beattie, W.S., Abdelnaem, E., McCluskey, S.A., Ghannam, M., Yeo, E., Djajani, G. & Karski, J.,

- 2004**, The independent association of massive blood loss with mortality in cardiac surgery, *Transfusion*, 44(10), pp. 1453-62.
28. Kelton, J.G., Smith, J.W., Warkentin, T.E., Hayward, C.P., Denomme, G.A. & Horsewood, P., **1994**, Immunoglobulin G from patients with heparin-induced thrombocytopenia binds to a complex of heparin and platelet factor 4, *Blood*, 83(11), pp. 3232-9.
29. Klebanoff, G., **1971**, Early clinical experience with a disposable unit for the intraoperative salvage and reinfusion of blood loss (intraoperative autotransfusion), *Plastic and Reconstructive Surgery*, 48(2), p. 202.
30. Kleinert, K., Theusinger, O.M., Nuernberg, J. & Werner, C.M., **2010**, Alternative procedures for reducing allogeneic blood transfusion in elective orthopedic surgery, *HSS journal : the musculoskeletal journal of Hospital for Special Surgery*, 6(2), pp. 190-8.
31. Kling, D., Börner, U., von Bormann, B. & Hempelmann, G., **1988**, [Heparin elimination and free hemoglobin following cell separation and washing of autologous blood with Cell Saver 4], *Anästhesie, Intensivtherapie, Notfallmedizin*, 23(2), pp. 88-90.
32. Koch, C.G., Li, L., Duncan, A.I., Mihaljevic, T., Cosgrove, D.M., Loop, F.D., Starr, N.J. & Blackstone, E.H., **2006**, Morbidity and mortality risk associated with red blood cell and blood-component transfusion in isolated coronary artery bypass grafting, *Critical care medicine*, 34(6), pp. 1608-16.
33. Lubenow, N., Kempf, R., Eichner, A., Eichler, P., Carlsson, L.E. & Greinacher, A., **2002**, Heparin-induced thrombocytopenia: temporal pattern of thrombocytopenia in relation to initial use or reexposure to heparin, *Chest*, 122(1), pp. 37-42.
34. Marković, M., Davidović, L., Savić, N., Sindjelić, R., Ille, T. & Dragas, M., **2009**, Intraoperative cell salvage versus allogeneic transfusion during abdominal aortic surgery: clinical and financial outcomes, *Vascular*, 17(2), pp. 83-92.
35. Martel, N., Lee, J. & Wells, P.S., **2005**, Risk for heparin-induced thrombocytopenia with unfractionated and low-molecular-weight heparin thromboprophylaxis: a meta-analysis, *Blood*, 106(8), pp. 2710-5.

36. Marx, A., von Lüpke, U., Tessmann, R. & Lindhoff-Last, E., **2001**, [Removal of lepirudin used as an anticoagulant in mechanical autotransfusion with Cell-Saver 5], *Anästhesiologie, Intensivmedizin, Notfallmedizin, Schmerztherapie : AINS*, 36(3), pp. 162-6.
37. Murphy, G.J., Rogers, C.S., Lansdowne, W.B., Channon, I., Alwair, H., Cohen, A., Caputo, M. & Angelini, G.D., **2005**, Safety, efficacy, and cost of intraoperative cell salvage and autotransfusion after off-pump coronary artery bypass surgery: a randomized trial, *The American journal of medicine*, 130(1), pp. 20-8.
38. Nand, S., Wong, W., Yuen, B., Yetter, A., Schmulbach, E. & Gross Fisher, S., **1997**, Heparin-induced thrombocytopenia with thrombosis: incidence, analysis of risk factors, and clinical outcomes in 108 consecutive patients treated at a single institution, *American journal of hematology*, 56(1), pp. 12-6.
39. Newman, P.M. & Chong, B.H., **2000**, Heparin-induced thrombocytopenia: new evidence for the dynamic binding of purified anti-PF4-heparin antibodies to platelets and the resultant platelet activation, *Blood*, 96(1), pp. 182-7.
40. Paravicini, D., Schmitz-Huebner, U. & Stinnesbeck, B., **1983**, [Heparin elimination in intraoperative autotransfusion with the haemonetics cell saver], *Infusionstherapie und klinische Ernährung*, 10(1), pp. 19-21.
41. Rauova, L., Zhai, L., Kowalska, M.A., Arepally, G.M., Cines, D.B. & Poncz, M., **2006**, Role of platelet surface PF4 antigenic complexes in heparin-induced thrombocytopenia pathogenesis: diagnostic and therapeutic implications, *Blood*, 107(6), pp. 2346-53.
42. Reilly, R.F., **2003**, The pathophysiology of immune-mediated heparin-induced thrombocytopenia, *Seminars in dialysis*, 16(1), pp. 54-60.
43. Rhea, J.M., Snyder, M.L., Winkler, A.M., Abou-Diwan, C., Fantz, C.R., Ritchie, J.C., Szlam, F., Tanaka, K.A. & Molinaro, R.J., **2012**, Development of a fast and simple liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the quantitation of argatroban in patient plasma samples, *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, 893-894, pp. 168-72.

44. Rollins, K.E., Trim, N., Luddington, R., Colah, S., Klein, A., Besser, M. & Nair, S.K., **2011**, Coagulopathy associated with massive cell salvage transfusion following aortic surgery, *Perfusion*.
45. Seitz, R. & Heiden, M., **2010**, Quality and Safety in Blood Supply in 2010, *Transfusion medicine and hemotherapy : offizielles Organ der Deutschen Gesellschaft fur Transfusionsmedizin und Immunhamatologie*, 37(3), pp. 112-7.
46. Selleng, K., Warkentin, T.E. & Greinacher, A., **2007**, Heparin-induced thrombocytopenia in intensive care patients, *Critical care medicine*, 35(4), pp. 1165-76.
47. Serrick, C.J., Scholz, M., Melo, A., Singh, O. & Noel, D., **2003**, Quality of red blood cells using autotransfusion devices: a comparative analysis, *The Journal of extra-corporeal technology*, 35(1), pp. 28-34.
48. Shander, A., Van Aken, H., Colomina, M.J., Gombotz, H., Hofmann, A., Krauspe, R., Lasocki, S., Richards, T., Slappendel, R. & Spahn, D.R., **2012**, Patient blood management in Europe, *British journal of anaesthesia*, 109(1), pp. 55-68.
49. Spahn, D.R., **2010**, Anemia and patient blood management in hip and knee surgery: a systematic review of the literature, *Anesthesiology*, 113(2), pp. 482-95.
50. Spiess, B.D., Ley, C., Body, S.C., Siegel, L.C., Stover, E.P., Maddi, R., D'Ambra, M., Jain, U., Liu, F., Herskowitz, A., Mangano, D.T. & Levin, J., **1998**, Hematocrit value on intensive care unit entry influences the frequency of Q-wave myocardial infarction after coronary artery bypass grafting. The Institutions of the Multicenter Study of Perioperative Ischemia (McSPI) Research Group, *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*, 116(3), pp. 460-7.
51. Suh, J.S., Aster, R.H. & Visentin, G.P., **1998**, Antibodies from patients with heparin-induced thrombocytopenia/thrombosis recognize different epitopes on heparin: platelet factor 4, *Blood*, 91(3), pp. 916-22.
52. Surgenor, S.D., DeFoe, G.R., Fillinger, M.P., Likosky, D.S., Groom, R.C., Clark, C., Helm, R.E., Kramer, R.S., Leavitt, B.J., Klemperer, J.D., Krumholz, C.F., Westbrook, B.M., Galatis, D.J., Frumiento, C., Ross, C.S., Olmstead, E.M. & O'Connor, G.T., **2006**, Intraoperative red blood cell

- transfusion during coronary artery bypass graft surgery increases the risk of postoperative low-output heart failure, *Circulation*, 114(1 Suppl), pp. 143-8.
53. Szakmany, T., Dodd, M., Dempsey, G.A., Lowe, D., Brown, J.S., Vaughan, E.D. & Rogers, S.N., **2006**, The influence of allogenic blood transfusion in patients having free-flap primary surgery for oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma, *British journal of cancer*, 94(5), pp. 647-53.
54. Taniguchi, Y. & Okura, M., **2003**, Prognostic significance of perioperative blood transfusion in oral cavity squamous cell carcinoma, *Head & neck*, 25(11), pp. 931-6.
55. Trehel-Tursis, V., Louvain-Quintard, V., Zarrouki, Y., Imbert, A., Doubine, S. & Stéphan, F., **2012**, Clinical and biologic features of patients suspected or confirmed to have heparin-induced thrombocytopenia in a cardiothoracic surgical ICU, *Chest*, 142(4), pp. 837-44.
56. Umlas, J. & O'Neill, T.P., **1981a**, Heparin removal in an autotransfusor device, *Transfusion*, 21(1), pp. 70-3.
57. Umlas, J. & O'Neill, T.P., **1981b**, Heparin removal in an autotransfusor device, *Transfusion*, 21(1), pp. 70-3.
58. Vamvakas, E.C., **2002**, Meta-analysis of randomized controlled trials comparing the risk of postoperative infection between recipients of allogeneic and autologous blood transfusion, *Vox sanguinis*, 83(4), pp. 339-46.
59. Verma, A.K., Levine, M., Shalansky, S.J., Carter, C.J. & Kelton, J.G., **2003**, Frequency of heparin-induced thrombocytopenia in critical care patients, *Pharmacotherapy*, 23(6), pp. 745-53.
60. Visentin, G.P., Ford, S.E., Scott, J.P. & Aster, R.H., **1994**, Antibodies from patients with heparin-induced thrombocytopenia/thrombosis are specific for platelet factor 4 complexed with heparin or bound to endothelial cells, *The Journal of clinical investigation*, 93(1), pp. 81-8.
61. Vorweg, M., Muckel, G., Knüttgen, D., Schindler, A. & Doehn, M., **1998**, [Heparin-induced coagulation disturbance from mechanical autotransfusion], *Der Anaesthetist*, 47(12), pp. 979-81.

62. Wang, G., Bainbridge, D., Martin, J. & Cheng, D., **2009**, The efficacy of an intraoperative cell saver during cardiac surgery: a meta-analysis of randomized trials, *Anesthesia and analgesia*, 109(2), pp. 320-30.
63. Warkentin, T.E. & Greinacher, A., **2004**, Heparin-induced thrombocytopenia: recognition, treatment, and prevention: the Seventh ACCP Conference on Antithrombotic and Thrombolytic Therapy, *Chest*, 126(3 Suppl), pp. 311S-37S.
64. Warkentin, T.E. & Kelton, J.G., **1996**, A 14-year study of heparin-induced thrombocytopenia, *The American journal of medicine*, 101(5), pp. 502-7.
65. Warkentin, T.E. & Kelton, J.G., **2001**, Temporal aspects of heparin-induced thrombocytopenia, *The New England journal of medicine*, 344(17), pp. 1286-92.
66. Warkentin, T.E., Chong, B.H. & Greinacher, A., **1998**, Heparin-induced thrombocytopenia: towards consensus, *Thrombosis and haemostasis*, 79(1), pp. 1-7.
67. Warkentin, T.E., Levine, M.N., Hirsh, J., Horsewood, P., Roberts, R.S., Gent, M. & Kelton, J.G., **1995**, Heparin-induced thrombocytopenia in patients treated with low-molecular-weight heparin or unfractionated heparin, *The New England journal of medicine*, 332(20), pp. 1330-5.
68. Warkentin, T.E., Roberts, R.S., Hirsh, J. & Kelton, J.G., **2003**, An improved definition of immune heparin-induced thrombocytopenia in postoperative orthopedic patients, *Archives of internal medicine*, 163(20), pp. 2518-24.
69. Warkentin, T.E., Sheppard, J.A., Horsewood, P., Simpson, P.J., Moore, J.C. & Kelton, J.G., **2000**, Impact of the patient population on the risk for heparin-induced thrombocytopenia, *Blood*, 96(5), pp. 1703-8.
70. Warkentin, T.E., Sheppard, J.A., Sigouin, C.S., Kohlmann, T., Eichler, P. & Greinacher, A., **2006**, Gender imbalance and risk factor interactions in heparin-induced thrombocytopenia, *Blood*, 108(9), pp. 2937-41.
71. Waters, J.H., **2013**, Intraoperative blood recovery, *ASAIO journal (American Society for Artificial Internal Organs : 1992)*, 59(1), pp. 11-7.

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen Medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.