

Aus der Klinik für Anästhesiologie, Intensivmedizin und Notfallmedizin  
Evangelisches Klinikum Niederrhein gGmbH  
Chefarzt: Prof. Dr. med. R. Scherer

**Validierung einer neuen Messmethode zur nephelometrischen  
Heparin-Konzentrationsmessung bei extrakorporaler  
Zirkulation**

*Dissertation*

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

**vorgelegt von**

**Deniz Özcan**

**2018**

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

Dekan: Prof. Dr. Nikolaj Klöcker  
Referent: Prof. Dr. Ralf Scherer  
Korreferent: Priv.-Doz. Dr. Stephan Sixt

Tag der mündlichen Prüfung: 23.01.2018

# I.

## Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>V</b>
<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1. Pharmakologie der gerinnungsaktiven Substanzen</b>	<b>2</b>
1.1 Heparin	2
1.2 Protamin	3
1.3 Messung der Heparinkonzentration	4
<b>2. Fragestellung</b>	<b>6</b>
<b>3. Material und Methodik</b>	<b>8</b>
3.1 Studienablauf	8
3.2 Ein- und Ausschlusskriterien	8
3.3 Studienprotokoll und Probengewinnung	9
3.4 Messungen der Heparinkonzentration und Heparinaktivität	11
3.4.1 Streulichtspektroskopie LiSA	11
3.4.2 Anti-Xa-Aktivität	14
3.4.3 Thrombelastometrie	15
3.4.4 Activated Clotting Time (ACT)	18
3.4.5 Quickwert	19
3.4.6 Aktivierte Partielle Thromboplastinzeit (aPTT)	19
3.4.7 Fibrinogen	20
3.4.8 Thrombozytenzahl	20
3.5 Statistische Methoden	20
<b>4. Ergebnisse</b>	<b>22</b>
4.1 Patientenkollektiv	22
4.2 Art der durchgeführten Operationen	23
4.3 Heparin- und Protamingaben	24
4.4 Postoperative Daten	25
	III

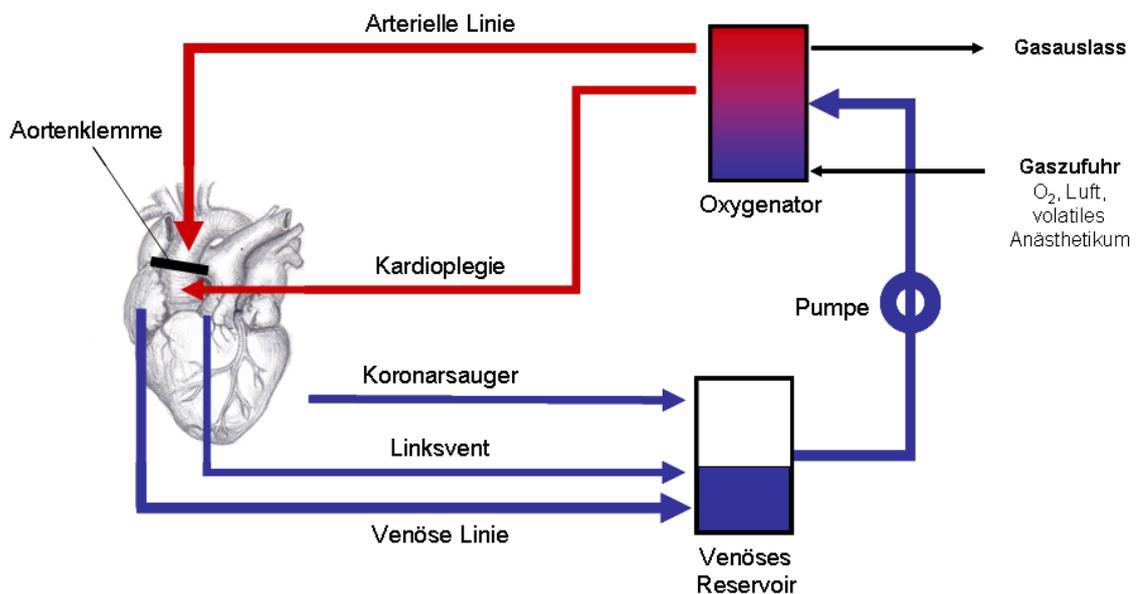
<b>4.5 Messungen der Heparinkonzentration und Heparinaktivität</b>	<b>26</b>
<b>4.6 Korrelationen zwischen den Messungen der Heparinkonzentration und Heparinaktivität</b>	<b>30</b>
<b>5. Diskussion</b>	<b>32</b>
<b>5.1 Validität der LiSA-Messungen</b>	<b>32</b>
<b>5.2 Heparin/Protamin-Dosierung</b>	<b>38</b>
<b>5.3 Blutungskomplikationen</b>	<b>39</b>
<b>6. Zusammenfassung</b>	<b>41</b>
<b>7. Verzeichnis</b>	<b>43</b>
<b>7.1 Abbildungsverzeichnis</b>	<b>43</b>
<b>7.2 Tabellenverzeichnis</b>	<b>43</b>
<b>8. Literaturverzeichnis</b>	<b>45</b>
<b>9. Anhang</b>	<b>52</b>
<b>9.1 Patienteninformation</b>	<b>52</b>
<b>9.2 Einwilligungserklärung</b>	<b>54</b>
<b>Danksagung</b>	<b>55</b>

## **Abkürzungsverzeichnis**

ACT	Activated clotting time
AT	Antithrombin
BMI	Body Mass Index
CFT	Clotting formation time
CT	Clotting time
EKZ	Extrakorporale Zirkulation
Fib	Fibrinogen
Hb	Hämoglobin
Hkt	Hämatokrit
Hep-Tem	In-Tem Testansatz mit Zugabe von Heparinase
HLM	Herzlungenmaschine
INR	International Standardized Ratio (Quick-Wert)
In-Tem	Monitoring der Gerinnselformung nach Kontaktaktivierung (intrinsischer Weg)
LiSA	Light Scattering Assay – Heparin
MCF	maximum clot firmness
PTT	partielle Thromboplastin Zeit
Thr	Thrombozyten

## Einleitung

In Deutschland werden jährlich fast 100.000 herzchirurgische Eingriffe durchgeführt (Deutscher Herzbericht 2014). Ohne die Entwicklung der Herz-Lungen Maschine (HLM), die eine extrakorporale Oxygenierung und Decarboxylierung des Blutes erlaubt (Abb.1), wären Operationen am nicht schlagenden Herzen unmöglich. Von den ersten theoretischen Überlegungen zur extrakorporalen Zirkulation (EKZ) (Le Gallois; 1812) über die praktische Umsetzung 1828 durch James Kay bis zum ersten erfolgreichen Einsatz einer HLM am Menschen durch John H. Gibbon 1953 vergingen mehr als 100 Jahre.



**Abb. 1: Schematischer und vereinfachter Aufbau einer pumpengetriebenen Herzlungenmaschine**

Die Aktivierung des Gerinnungs- und Fibrinolyse systems und proinflammatorischer Mediatoren durch den Kontakt des Blutes mit Fremdoberflächen der HLM stellt den Anwender auch heute noch vor klinische Probleme (Boisclair MD et al. 1993; Burmann JF et al. 1994). Da noch immer keine völlig biokompatiblen Oberflächen zur Verfügung stehen, muss zur Vermeidung von Gerinnselbildungen, wie schon in den 50er Jahren, eine temporäre systemische Antikoagulation erfolgen. Die Antithrombin (AT) -vermittelte Inhibierung insbesondere der Faktoren IIa (Thrombin) und Xa durch Heparin stellt hierbei seit fast 70 Jahren den Standard dar (Cohn LH.; 2003).

# 1. Pharmakologie der gerinnungsaktiven Substanzen

## 1.1 Heparin

Heparine sind Glycosaminoglycane, die aus abwechselnden Folgen von D-Glucosamin und einer Uronsäure (D-Glucuronsäure oder L-Iduronsäure) bestehen (Jorpes E.;1936). Die hierbei entstehenden Ketten haben eine molare Masse zwischen 4.000 und 40.000 Dalton, meistens jedoch um 15.000 Dalton (Hirsh J et al.;2001, Johnson EA et al.; 1976). Sie gehören aufgrund ihrer kurzen Halbwertszeit und der kurzfristigen Antagonisierbarkeit mit Protamin zu den heute am häufigsten perioperativ eingesetzten Antikoaganzien. Heparine sind tierische Extrakte und werden aus der Schweinedarm-Mucosa bzw. Rinderlunge gewonnen (Karst NA et al.;2003).

Die biologische Aktivität des Heparins beruht auf der Fähigkeit, die Inhibitoraktivität des AT gegenüber den an der Blutgerinnung beteiligten Proteasen, besonders F X<sub>a</sub> (Stewart-Prower-Faktor) und F II<sub>a</sub> (Thrombin), zu beschleunigen. Sobald Heparin an AT bindet, kommt es zu einer Konformationsänderung des AT und zur vollständigen Freilegung des aktiven Zentrums (Lindahl U et. al.;1979, Rosenberg et al.;1979). Abhängig von der Heparinkonzentration kann die Aktivität des AT bis zu zweitausendfach erhöht werden (Olson ST et al.;1992). Für eine Thrombinhemmung muss Heparin auch an Thrombin binden. Hierfür sind jedoch Heparinmoleküle mit einer Länge von mindestens 16 - 20 Monosaccharideinheiten erforderlich. Für die Hemmung des Faktors X<sub>a</sub> reicht dagegen die Pentasaccharidsequenz eines niedermolekularen Heparins aus (Hellstern P ;2007, Lindahl U et al.; 1984).

Nach intravenöser Injektion kommt es aufgrund einer Bindung an Endothelzellen, Makrophagen und Plasmaproteine (Hirsh J, Warkentin TE;2001, Barzu T, et al;1985, Young E et al.;1992) zu einer initialen Elimination von ca. 40 % eines unfraktionierten Heparins (Halbwertszeit 5 - 15 Min.). Diese schnelle Elimination wird gefolgt von einer langsameren renalen Elimination mit einer Halbwertszeit von 60 - 90 Minuten (Dawes J, Papper DS;1979). Erst wenn alle o.g. Bindungsstellen besetzt sind, wird die Dosis-Wirkungs- Beziehung linear (de Swart CA et al.;1982).

Die vielfältigen Bindungen des Heparins, insbesondere an Akut-Phase-Proteine, die durch eine Vielzahl von Krankheitsentitäten oder durch Kontakt mit Fremdoberflächen in ihrer Konzentration erhöht sein können, erlauben keine verlässliche Vorhersage der patientenindividuellen Pharmakokinetik (Barzu T, et al. ;1985).

Für die Durchführung einer extrakorporalen Zirkulation bei herzchirurgischen Operationen werden Heparindosen von 300-500 I.E /kg Kg appliziert (Cohen JA;1984).

## **1.2 Protamin**

Die Entdeckung des aus stark basischen Peptiden bestehenden Protamins aus Köpfen von Lachsspermatozoen gelang bereits 1874 dem Biochemiker Johann Friedrich Miescher (Feulgen R;1927). Die ersten Studien zur Erforschung der antagonistischen Eigenschaft von Protamin gegenüber Heparin wurden jedoch erst in den 1930er Jahren durchgeführt (Chargaff E, Olsen KB;1938; Jaques LB:1973)

Protamin ist ein alkalisches Protein, dessen Molekulargewicht zwischen 4.000 bis 10.000 Dalton variiert (Ballhorn R;2007). Ursächlich für die Alkalität ist der hauptsächliche Aufbau aus der basischen Aminosäure Arginin, weiterhin auch aus Lysin und Histidin.

Klinisch Einzug fand das Protamin in zwei Bereiche der Pharmakotherapie. Zum einen wird es in den 1936 von Hagedorn (Hagedorn HC et al; 1984) entwickelten Verzögerungsinsulinen (Neutrales-Protamin-Hagedorn Insulin NPH) verwendet, um die Freisetzung von Insulin zeitlich zu verschieben und damit die Wirkung zu verlängern (Lacey A;1952). Zum anderen ist Protamin als Protaminsulfat oder Protaminhydrochlorid bei der Antagonisierung von Heparin im Gerinnungsmanagement z.B. großer gefäß- und herzchirurgischer Eingriffe bisher unverzichtbar. Durch elektrostatische Wechselwirkung kann Protamin das Heparin aus seiner Bindung mit AT lösen und einen stabilen Komplex ohne antikoagulatorische Wirkung bilden (Coggin MH et al.;2012)

Nach klinischer Erfahrung kann 1 mg Protamin ca. 100 IE Heparin antagonisieren (Becker RC;2006). Da jedoch die Halbwertszeit des Protamins mit 8-30 Minuten deutlich kürzer ist als die des Heparins mit 90-120 Minuten, kann es notwendig werden, Protamin-Repetitionsdosen zu injizieren, um einen Heparin-Rebound zu verhindern. Die Ursachen eines Heparin-Rebounds werden kontrovers diskutiert, liegen aber sicher auch im vielfältigen Bindungsverhalten des Heparins (Teoh KH et al;2004). Dies macht bei Eingriffen mit systemischer Antikoagulation ein systematisches peri- und postoperatives Antikoagulationsmanagement notwendig.

Im klinischen Alltag zeigt sich, dass Protamin nicht nur einen positiven prokoagulatorischen Effekt in Bezug auf das Heparin hat, sondern bei Dosis-Überschreitung auch antikoagulatorische Wirkungen haben kann (Griffin et al;2001). Die Ursachen der antiko-

agulatorischen Wirkung waren lange Zeit unklar. Zum einen wirkt hochdosiertes Protamin insbesondere gebunden an Heparin antithrombozytär, wichtiger scheint jedoch die von Fionnuala Ni Ainle 2009 gezeigte Hemmung von Faktor V und konsekutiver Reduktion der Thrombingenerierung zu sein. Insgesamt ist die therapeutische Breite der rein heparinneutralisierenden prokoagulatorischen Wirkung des Protamins klein. Unabhängig von der antikoagulatorischen „Neben“-Wirkung des Protamins, kann die Substanz multiple für den Operationsverlauf relevante Nebenwirkungen induzieren. Hierbei sind insbesondere Wirkungen auf das Bronchialsystem und die Kreislaufdepression zu nennen, die auf einen negativ inotropen und vasodilatatorischen Effekt zurückgehen (Kien ND;1992). Gelegentlich sind diese Nebenwirkungen schwer von einer anaphylaktoiden Reaktion zu unterscheiden. Die Inzidenz ist hierbei jedoch mit deutlich unter 1% eher gering (Nybo M, Madsen JS;2008). All die soeben erwähnten Wirkungen bzw. Nebenwirkungen machen eine präzise Dosierung des Protamins unabdingbar (Byun Y et al. 2000, Ni Ainle F et al. 2009).

### **1.3 Messung der Heparinkonzentration**

Heute ist es klinischer Standard, eine therapeutische Dosis des Heparins anhand von Labortests zu kontrollieren und zu steuern. In der Klinik hat sich die Messung der aktivierten partiellen Thromboplastinzeit (aPTT) durchgesetzt. Die Analyse wird nach Inkubation mit Phospholipiden im Citratplasma durchgeführt. Intraoperativ, z.B. bei Patienten mit herzchirurgischer Operation unter Einsatz einer Herz-Lungen-Maschine, wird die im Labor vorgenommene aPTT-Messung durch patientennahe und zeitsparende point-of-care-Methoden wie die activated clotting time (ACT) ersetzt. Hier wird Vollblut mit einem Oberflächenaktivator (z.B. Kaolin) inkubiert und je nach Messsystem die Bildung von Fibrin bzw. die thrombinkatalysierte Umsetzung eines zugegebenen Pseudosubstrates gemessen (Bull MH;1975, Cohen JA;1984). Die Heparindosierung und die Dosierung des Antagonisten Protamin erfolgen dabei empirisch auf der Basis des Körpergewichts des Patienten und werden durch wiederholte Messungen der ACT individuell angepasst.

Andere Testmethoden wie die rotationsthrombelastometrische Messung der intrinsischen plasmatischen Gerinnung (INTEM) fanden bisher zur Steuerung einer therapeutischen Antikoagulation keinen relevanten Einzug in den klinischen Alltag. Sie werden in Kombination mit z.B. heparinasehaltigen Testansätzen eher zur Differenzierung kom-

plexer Gerinnungsstörungen auch nach kardiopulmonalem Bypass eingesetzt (Weber CF et al., 2012)

Am Institut für Biophysik der Universität Frankfurt wurde durch die Arbeitsgruppe von Prof. Mäntele eine neue Methode zur direkten Heparinkonzentrationsbestimmung entwickelt und 2007 vorgestellt. Diese Methode nutzt die Lichtstreuung der sich im mit Protamin versetzten Patientenblut aus Heparin-Protamin-Komplexen bildenden Nanopartikel. Dabei korreliert die Streulichtintensität in Vorwärtsrichtung ( $45^\circ$ ) mit der Anzahl der Heparin-Protamin-Komplexe. Die Methode wird im weiteren Verlauf als LiSA (Light Scattering Assay) bezeichnet.

## 2. Fragestellung

Trotz der etablierten zur Verfügung stehenden Testmethoden und der Antagonisierbarkeit des Heparins kommt es beim therapeutischen Einsatz wie z.B. bei der extrakorporalen Zirkulation im Rahmen einer Bypass Operation immer noch in 20 % der Fälle zu Blutungskomplikationen (Skubas et al. 2001, Spiess et al. 1999). Die Ursachen hierfür sind zahlreich und betreffen sowohl das plasmatische Gerinnungssystem als auch die zellulären Bestandteile (Holloway et al. 1988, Weerasinghe et al. 1998). Nach Beendigung einer extrakorporalen Zirkulation steht deshalb die schnelle hämostaseologische Abklärung der Einflüsse von Dilution, Verbrauch und Funktionsstörung der Gerinnungsfaktoren und Thrombozyten sowie der prä- und intraoperativ eingesetzten Antikoagulanzen im Vordergrund.

Ziel dieser Studie ist die Validierung der nephelometrischen LiSA-Methode zur Bestimmung der Heparinkonzentration durch den Messwertvergleich mit der derzeit standardmäßig eingesetzten anti-Xa-Aktivitäts-Bestimmung, die die Aktivität des Heparin-Antithrombin-Komplexes gegenüber dem Faktor Xa misst und im Wege einer Eichkurve die Heparinkonzentration in E/mL angibt. Dabei stellt sich die Frage, inwieweit die anhand der gefundenen Messwerte der Lichtstreuung durch den Protamin-Heparin-Komplex einerseits und der anti-Xa-Aktivität andererseits berechneten Heparinkonzentrationen miteinander korrelieren. Die Vergleichsmessungen sollen insbesondere zeigen, ob in der klinischen Situation eines herzchirurgischen Eingriffs mit Abgang von der Herz-Lungen-Maschine eine noch bestehende Restheparinkonzentration nach Antagonisierung mit Protamin von den beiden Methoden gleich gemessen wird. Zusätzlich soll auch in der Phase der vollständigen Heparinisierung während der extrakorporalen Zirkulation ein Messwertvergleich mit der derzeit zur Point-of-care-Steuerung einer Heparinisierung eingesetzten Activated Clotting Time (ACT) und mit den thrombelastometrisch möglichen Untersuchungen zur Bestimmung der Heparinkonzentration (Gerinnselbildung nach intrinsischer Aktivierung und in Anwesenheit einer Heparinase) erfolgen.

Die diffuse Blutung kurz nach Beendigung der extrakorporalen Zirkulation ist eine multifaktoriell bedingte wichtige hämostaseologische Komplikation herzchirurgischer Eingriffe, die schnell beherrscht werden soll (Grottke O et al.; 2015). Die schnelle und

exakte Antagonisierung der intraoperativen hochdosierten Heparinisierung und die Vermeidung einer durch zu hohe Protamindosen bedingten Blutungsneigung spielen dabei eine große Rolle (Levy JH et al.;2012, Koster A et al.;2014). Dies hat sogar zu Überlegungen geführt, am Ende der EKZ das Heparin in einem extrakorporalen „Protamin-Bioreaktor“ mittels immobilisiertem Protamin zu eliminieren (Yang VC; 1991), was sich allerdings klinisch nicht durchgesetzt hat.

Wenn die LiSA-Messwerte vor und nach der Injektion des Heparins und nach Antagonisierung mit Protamin eine gute Übereinstimmung mit den etablierten Verfahren aufweisen, könnte künftig das gute point-of-care-Potenzial dieser Methode im Operationssaal genutzt und dadurch möglicherweise das Risiko peri- und postoperativer Blutungen oder Thrombosen verringert werden.

### **3. Material und Methodik**

#### **3.1 Studienablauf**

Für diese Studie lag ein positives Votum der Ethikkommission der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf vom 01.03.2012 vor (Studennummer 3792).

#### **Aufklärung und Einwilligung der Patienten**

Die erwachsenen Patienten, bei denen elektive herzchirurgische Operationen mit Einsatz der Herz-Lungen-Maschine vorgenommen wurden, wurden präoperativ im Arztgespräch und schriftlich mittels eines Informations- und Aufklärungsbogens (siehe Anhang) über den Zweck der Studie und die studienbedingten zusätzlichen Blutentnahmen aufgeklärt und willigten schriftlich ein. Sie konnten jederzeit und ohne Begründung die Teilnahme an der Studie widerrufen. Es wurden allgemeine patienten- und eingriffsbezogene Daten (Körpergewicht, Größe, Geschlecht, Alter; Operationsdauer, Bypassdauer, Transfusionen) sowie die Ergebnisse der allgemeinen und heparinspezifischen Gerinnungsanalytik erhoben (Quickwert, aPTT, Fibrinogenkonzentration, Calciumkonzentration, Thrombozytenzahl, anti-X<sub>a</sub>-Aktivität, Rotations-thrombelastometrie Intem<sup>®</sup> und Heptem<sup>®</sup>, ACT).

#### **3.2 Ein- und Ausschlusskriterien**

Einschlusskriterien: In die Untersuchung wurden erwachsene Patienten eingeschlossen, die sich am Evangelischen Klinikum Niederrhein gGmbH einem elektiven herzchirurgischen Eingriff unter Verwendung der Herz-Lungen-Maschine unterziehen mussten. Die präoperative Vorbereitung der Patienten musste die Möglichkeit zur hinreichenden Information über den Zweck und den Umfang der vorgesehenen zusätzlichen Blutabnahmen und eine wirksame Einwilligung erlauben.

Ausschlusskriterien: Ausschlusskriterien waren ein Patientenalter < 18 Jahre, eine fehlende persönliche Einwilligungsfähigkeit, eine vorbestehende klinische Blutungsneigung oder klinische Zeichen einer Blutgerinnungsstörung (Hämatome, Petechien) und die intraoperative Transfusion von mehr als fünf Erythrozytenkonzentraten vor Protamingabe.

### 3.3 Studienprotokoll und Probengewinnung

Die in die Studie eingeschlossenen 102 Patienten erhielten eine Prämedikation mit oral verabreichten Benzodiazepinen nach Maßgabe des zuständigen Anästhesisten. Im OP-Vorraum wurde ein anonymisiertes intraoperatives Studienprotokoll zur Dokumentation von Datum, Alter, Geschlecht, Größe und Gewicht, Art der Operation, Heparin- und Protamingaben sowie Gaben von Blutprodukten bis zu 24 Stunden postoperativ begonnen. Den Patienten wurde eine periphere Venenverweilkanüle (Vasofix Safety, Braun Melsungen, Größe 2.2 mm Innendurchmesser) angelegt und zur zusätzlichen Sedierung Midazolam (Dormicum®) 1 – 5 mg i.v. injiziert.

Dann erfolgte in Lokalanästhesie mit Mepivacain 1% (Scandicain®) 0,5 – 1 mL s.c. die Anlage eines intraarteriellen Katheters (Arterial Cannula FloSwitch® Grip-Lok, BD, Franklin Lakes, USA) bevorzugt in die linke A. radialis zur kontinuierlichen Blutdruckmessung und Blutgasanalytik. Anschließend wurde die Narkoseeinleitung mit Fentanyl (Jansen Cilag, Neuß) 0,3-0,5 mg, Propofol (Propofol-Lipuro® 1%, Braun Melsungen) 1 – 2 mg/kgKG und Pancuronium (Pancuronium®, Inresa, Freiburg) 0,1 mg/kgKG i.v. durchgeführt. Die Aufrechterhaltung der Narkose erfolgte auch während der Herz-Lungen-Maschine mit dem volatilen Anästhetikum Sevofluran (Sevorane®, Abbott GmbH KG, Wiesbaden) und repetitiven Gaben von Fentanyl nach klinischer Symptomatik, insbesondere jedoch vor Sternotomie und Maschinenabgang.

Nach der Narkoseeinleitung wurde ein 3-lumiger zentraler Venenkatheter (ZVK; ARROW, Blue Flex Tip) in die V. jugularis interna (links oder rechts) gelegt. Im Falle eines schlechten peripheren Venenstatus wurde zusätzlich eine Schleuse (Arrow flex, 6 Fr., Arrow international) in die V. jugularis interna eingebracht.

Nach dem Transport des Patienten in den Operationssaal und Anschluss an das Beatmungsgerät (Leon plus, Heinen + Löwenstein GmbH & Co. KG, Bad Ems) erfolgte die erste Blutentnahme (**M1**) aus dem arteriellen Zugang (Abb. 2).

Zu jedem Messpunkt wurden die folgenden Werte erhoben: ACT, LiSA, anti-Xa-Aktivität und Rotem-Analytik (Pentapharm) mit EXTEM, INTEM, FIBTEM und HEPTEM.

Im Operationsverlauf wurden den Patienten nach der Präparation der Bypassgefäße bzw. nach Perikarderöffnung 300 I.E. Heparin (Heparin Natrium 25000, Ratiopharm GmbH, Ulm) / kgKG i.v. verabreicht (Gravlee G;1992). Der Messpunkt **M2** erfolgte 5

Minuten nach Gabe des Heparins. Als Ziel-ACT wurde ein Wert von > 400 Sekunden angestrebt; lag der Wert darunter, wurden repetitive Heparindosen von 5.000 – 10.000 IE verabreicht.

Das Vorfüllvolumen der Herzlungenmaschine (Priming) betrug 1.700 mL bestehend aus 1.000 mL Ringer Lactat, B. Braun, Melsungen), 500 mL HES 6%, (Voluven® Fresenius Medical), und 200 mL Mannitol 15% (Fresenius Medical, Hof a. d. Saale). Zusätzlich wurden der Lösung 2.400 E Heparin (Heparin Natrium 25000, Ratiopharm GmbH, Ulm) zugesetzt.

Während der extrakorporalen Zirkulation (EKZ) wurden ein nicht-pulsatiler Blutfluss von 2,6 - 3 L/min/m<sup>2</sup> und ein mittlerer arterieller Blutdruck von 50 mmHg angestrebt.

Nach dem Abgang von der Herz-Lungen-Maschine und ausreichender Blutstillung wurde vor der Antagonisierung des Heparins mit Protamin die nächste Blutabnahme (M3) vorgenommen. Die Protamindosis betrug 1.000 E Protamin pro 1.000 E Heparin der initialen Dosis, ohne Berücksichtigung repetitiver Dosen.

5 Minuten nach der Protamingabe erfolgte die letzte Blutabnahme (M4).

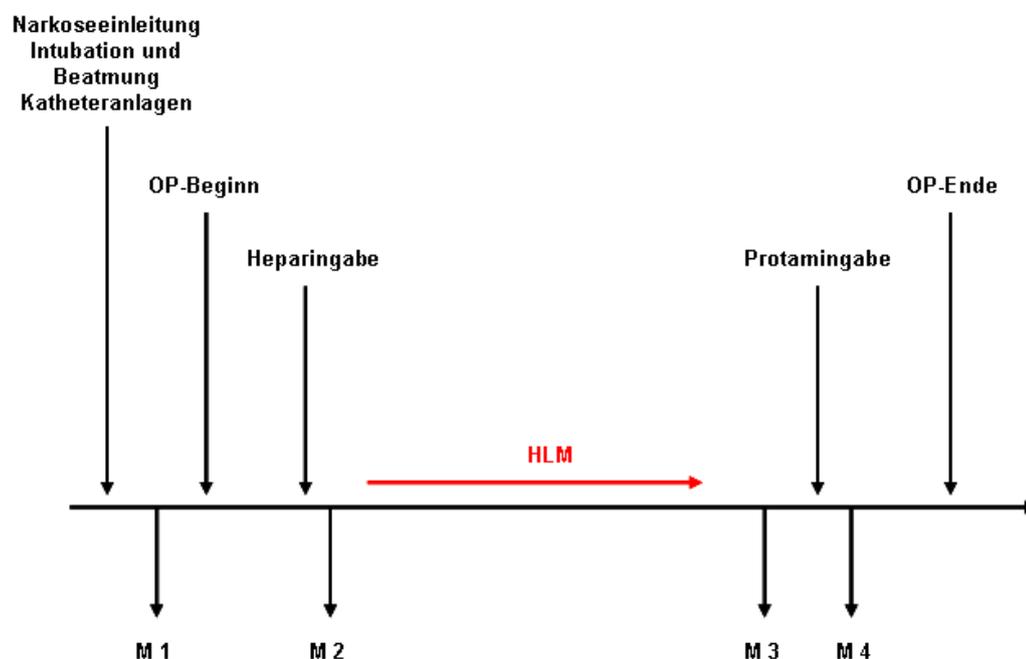


Abb. 2: Zeitliche Zuordnung der Zeitpunkte der Blutabnahmen (M1 bis M4) zum operativen Verlauf und zu den Medikamentengaben (HLM: Zeitdauer des Einsatzes der Herz-Lungen-Maschine).

Die jeweils für die Studie gewonnen Blutproben (3 x 5 mL Citratblut, Sarstedt Mono-vette) wurden mit einem Zahlencode anonymisiert und umgehend und ohne Zwischenlagerung in das 50 m entfernte Laboratorium transportiert und dort umgehend bearbeitet. Die für die Streulichtmikroskopie bestimmten Proben wurden in 2 mL Eppendorf Küvetten umgefüllt und bei 1800 rpm für 10 Minuten in der Zentrifuge der Firma Heraeus zentrifugiert. Das Plasma wurde abpipettiert und in Glasküvetten der Firma Schott AG gegeben. Das Plasma aller Proben wurde ausschließlich mit Protaminsulfat der Firma Leo Pharma (1400 IE/mL) behandelt.

Die Ergebnisse der Laboruntersuchungen wurden ausgedruckt und dem anonymisierten Studienprotokoll zugeordnet. Nach dem Messzeitpunkt M4 konnten weitere kalkulierte Protamindosen verabreicht werden, wenn heparinhaltiges Patientenblut aus der Herz-Lungen-Maschine retransfundierte wurde.

### **3.4 Messungen der Heparinkonzentration und Heparinaktivität**

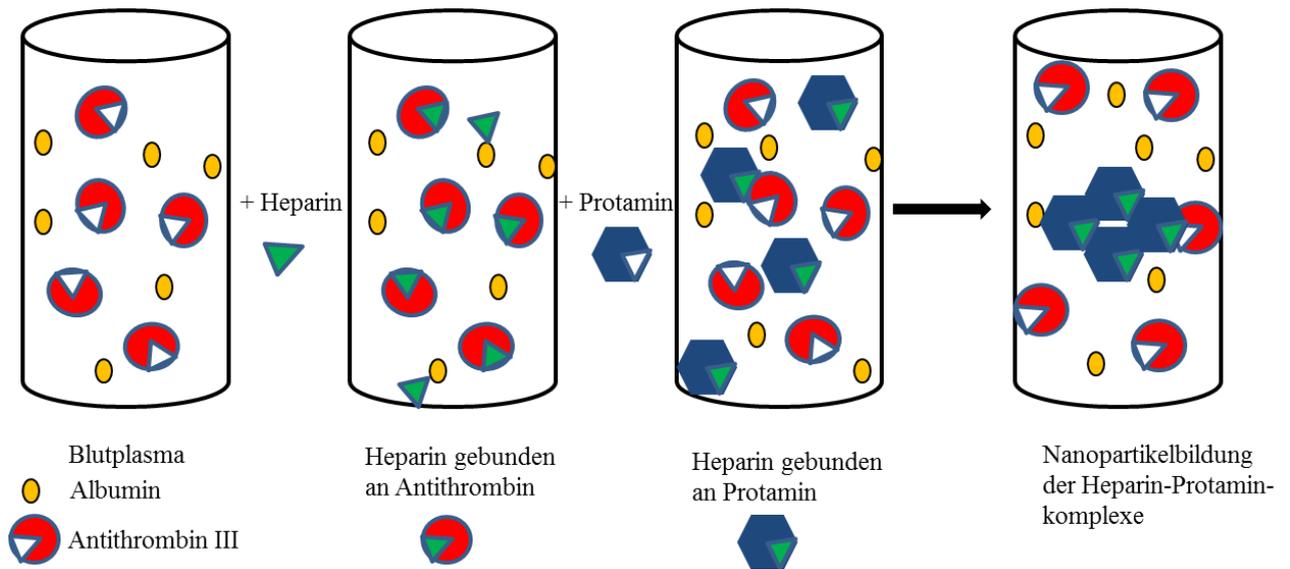
#### **3.4.1 Streulichtspektroskopie LiSA**

Die hier beschriebene Messmethode wurde am Institut für Biophysik der Universität Frankfurt zur direkten Messung der Heparinkonzentration entwickelt (Maurer J et al.; 2011). Sie nutzt die Tatsache, dass es beim Durchgang von Licht durch ein Medium oder eine Partikellösung zu einer Wechselwirkung mit der Materie kommt, wodurch sich die Ausbreitungsrichtung und/oder auch die Wellenlänge des Lichts ändern kann. Diese Wechselwirkungen können unter dem Begriff „Streuung“ zusammengefasst werden.

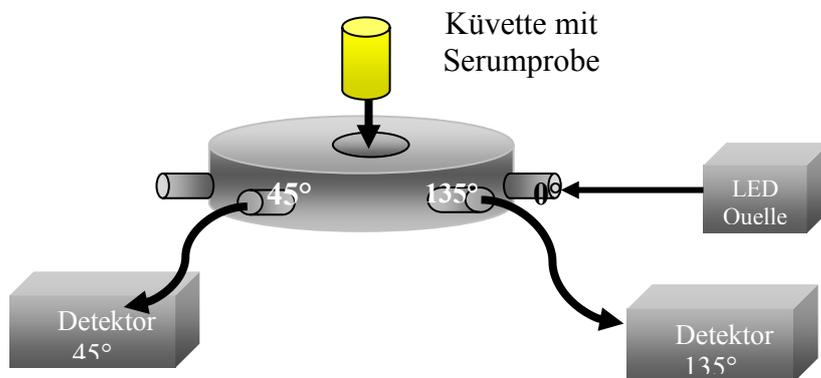
Die entwickelte Messvorrichtung nutzt die Komplexbildung von Heparin und Protamin. Die Lichtstreuung der hierbei entstehenden Nanopartikel lässt sich zur quantitativen Bestimmung der Heparinkonzentration nutzen (Abb. 3).

Für die Messung der Lichtstreuung der o.g. Nanopartikel wird paralleles Licht mit einer Wellenlänge von 580 - 680 nm, das von einer gekühlten LED ausgesendet wird, durch die mit Plasma gefüllte Glasküvette (Fiolax, Schott AG, Mainz) gesendet. Die Wellenlänge wurde aufgrund des Absorptionsmaximums des die Messung störenden Hämoglobins (400–540 nm) gewählt, da mit einer noch ausreichenden Streuintensität der Heparin-Protamin-Nanopartikel und geringer Hämoglobin-Absorption zu rechnen ist (Maurer J et al.;2011). Als Detektoren dienen zwei Photodioden in einem Winkel von

45° (Vorwärtsrichtung) und 135° (Rückwärtsrichtung), die die Intensität des von der Suspension gestreuten Lichts detektieren (Abb. 4).



**Abb. 3: Prinzip der LiSA Messung.** Dargestellt sind die Komplexbildung des im Patientenblut vorhandenen Heparins mit Antithrombin, des Heparins mit Protamin und die Bildung der Heparin-Protamin-Nanopartikel (nach Maurer J et al. 2011, mit freundlicher Genehmigung)



**Abb. 4 :Aufbau der photometrischen LiSA Apparatur.** Zwei Streulichtdetektoren messen die Zunahme der Heparin-Protamin-Nanopartikel-bedingten Lichtstreuung über die Zeit.

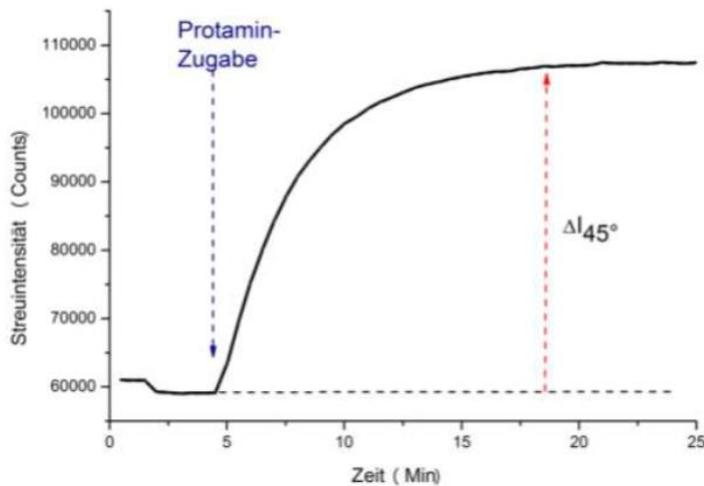
Dieser Messmethode liegt die Rayleigh-Gans-Debye Näherung (Karlsson A et al., 2013) zugrunde, welche die Lichtstreuung durch Partikel beschreibt, die deutlich kleiner sind als die Wellenlänge des verwendeten Lichts. Danach erlaubt die Messung der Streuintensität in Vorwärtsrichtung ( $I_{45^\circ}$ ) die Bestimmung der Partikelanzahl.

Bei zusätzlicher Messung der Intensität der Rückstreuung ( $I_{135^\circ}$ ) und der Bildung des Quotienten aus  $I_{45^\circ}/I_{135^\circ}$  können zusätzlich Informationen zu Größe (nm) und

Bildungskinetik der Partikel gewonnen werden. Dieses Verfahren wird als Dissymmetriemethode bezeichnet (Häse C, 2007).

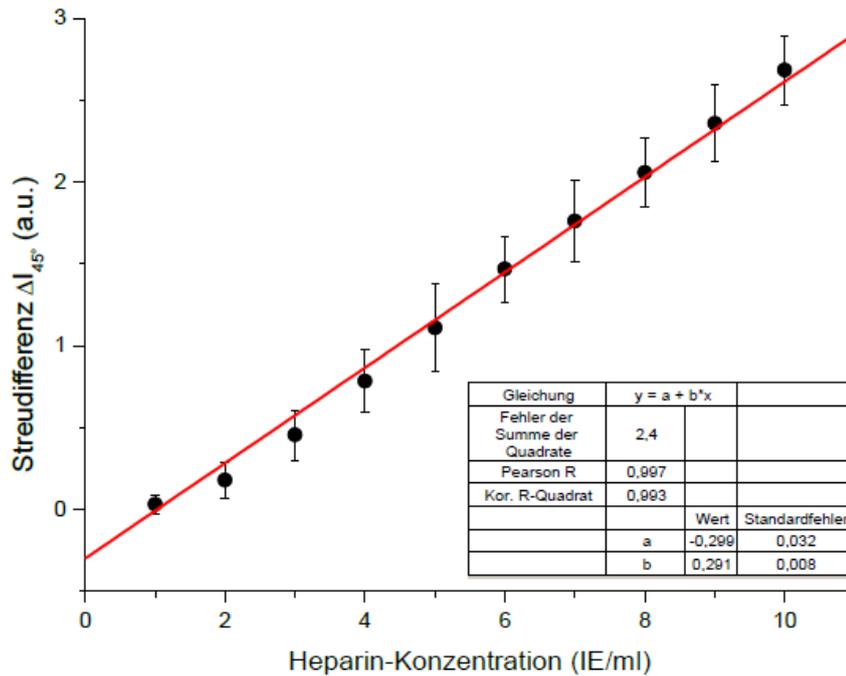
Die weitergeleiteten Signale der Photodioden sind abhängig von der einfallenden Lichtintensität und werden getrennt voneinander in den Mikrophoneingang eines Laptops geleitet, wo sie über eine Software (Gesiarz V, 2010) ausgewertet und in einem Diagramm dargestellt werden (Schmidt W, 2000).

Die am Mikrophoneingang durch die Signale erzeugte Spannung ist dabei proportional zur Intensität der Lichtstreuung und wird als Kinetik der Partikelbildung in Abhängigkeit von der Zeit aufgenommen (siehe Abb. 5). Hierbei stellt sich in der Zeit von 0 bis 5 Minuten eine durch Triglyceride und Cholesterin verursachte Grundstreuung dar. Die dann auftretende starke Zunahme der Streuintensität ist das Ergebnis der Protaminzugabe. Die Differenz zwischen dem Grundstreuwert und dem maximalen Streuwert in der Reaktionssättigung wurde als Maß für die Heparinkonzentration verwendet.



**Abb. 5: Reaktionsverlauf der Partikelbildung in Abhängigkeit von der Zeit in heparinisiertem Blutplasma nach Zugabe von Protamin**

In Vorversuchen im Rahmen der Doktorarbeit von Stefanie Haselbach wurden aus den Lichtstreuwerten die Heparin-Plasmakonzentrationen mit Hilfe der folgenden Kalibrierkurve ermittelt (Abb. 6). In die Kalibrierung gingen Messdaten aus 7 Probandenproben ein. Dokumentiert wurde die Differenz der Grundstreuung von der Lichtstreuung in Reaktionssättigung.



**Abb.6: Kalibrierkurve**

Die Heparinplasmakonzentration wurde in I.E./mL wurde an Anhand der Kalibrierung nach der Formel

$$\text{Heparin - Plasmakonzentration} \left( \frac{\text{I.E.}}{\text{ml}} \right) = \frac{\text{Streulichtintensität} \cdot 0,299}{0,291}$$

berechnet.

### 3.4.2 Anti-Xa-Aktivität

Die Messung der anti-Xa-Aktivität erfolgte aus Citratplasma mittels Mikrotiterplatten-Methode (COAMATIC<sup>®</sup> Heparin) nach Kalibration anhand von Standardkurven für unfraktioniertes und niedermolekulares Heparin. Die Menge des Heparins wurde anhand der anti-Xa-Aktivität des im Plasma gebildeten AT-Heparin-Komplexes bestimmt.

Probengewinnung: Bei der Blutabnahme müssen die Monovetten (Sarstedt S-Monovette 3 mL) bis zur Markierung gefüllt werden; hierdurch entsteht ein Verhältnis von 9:1 von Blut und Trinatriumcitrat. Danach erfolgte innerhalb von 30 Minuten die Zentrifugation bei 2000 x g für 20 Minuten bei 20-25°C.

Messprinzip: Faktor Xa (Lyophilisierter Faktor Xa vom Rind, Trispuffer, EDTA, NaCl, Dextransulfat und Rinder Serumalbumin) wurde im Überschuss zu einer Mischung von unverdünntem Plasma und dem chromogenen Substrat S-2732 (Suc-Ile-Glu(-pip)-Gly-

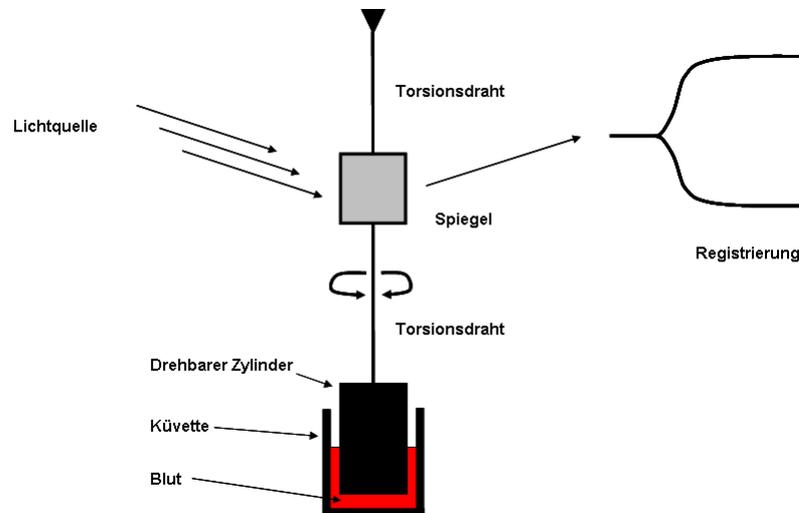
Arg-pNA-HCl; lyophilisiert, mit Detergens) gegeben. Bei der Bildung des Komplexes aus Heparin und Antithrombin (AT) finden gleichzeitig zwei kompetitive Reaktionen statt. Zum einen wird Faktor Xa durch den AT-Heparin-Komplex inhibiert, zum anderen spaltet Faktor Xa vom chromogen Substrat S-2732 das p-Nitroanilin (pNA) ab. Die nach Kalibration mit Standardproben mit einem Spektrophotometer bei 405 nm gemessene pNA Freisetzung ist umgekehrt proportional zur Heparinaktivität in der Plasmaprobe. Um den Einfluss von Heparinantagonisten wie z.B. Plättchenfaktor 4 (PF4) zu minimieren, enthielt das Reaktionsgemisch Dextransulfat. Die Messungen wurden automatisiert (BCS Gerinnungsautomat, Fa. Siemens, Eschborn) durchgeführt. Die Heparinkonzentration wurde als Heparinaktivität (IU/mL) angegeben.

### **3.4.3 Thrombelastometrie**

Die ursprüngliche Thrombelastographie nach HARTERT erlaubte schon 1948 die Beurteilung des Hämostasesystems vom Beginn der Gerinnungsbildung über die Fibrinbildung einschließlich der Interaktion mit den Thrombozyten bis zur Stabilisierung und ggf. dessen Lyse (Abb. 7).

Auch bei dem in dieser Untersuchung verwendeten Rotem<sup>®</sup>-System ist die Küvette fest in einem Heizblock, der die Probe auf 37°C erwärmt, verankert. Es rotiert der in die Probe eintauchende und durch eine elastische Feder angetriebene Plastikstempel um 4,75° um die eigene Längsachse. Der bewegte Stempel bewegt wird durch ein Kugellager stabilisiert. Hierdurch werden vibrationsbedingte Artefakte weitgehend ausgeschlossen und der Einsatz des Gerätes als point of care Methode möglich. Setzt die Gerinnung nach Zugabe des jeweiligen Aktivators ein, bilden sich auch hier Gerinnselfäden zwischen der Wand der Küvette und dem Stempel aus. Diese hemmen je nach Gerinnselfestigkeit die Rotation des Stempels. Dieser zunehmende Widerstand wird elektronisch erfasst und als Kurve entsprechend der klassischen Thrombelastographie ausgegeben und vermessen. Der Graph ist aus historischen Gründen seit Hartert doppelseitig (Spannagl, 2002). Das hier verwendete Gerät ist das ROTEG<sup>®</sup>-05-Messgerät (Pentapharm, München). Es verfügt über 4 separate Kanäle für die simultane Messung von verschiedenen Tests. Die Auswertung, Darstellung und Speicherung der Daten erfolgt durch ein angeschlossenes Notebook, welches Bestandteil des Systems ist (Latitude-D-505; Fa. Dell, Software Vers. 2.98). Das Messgerät verfügte zudem über eine Systempipette (Biohit eLine, Pentapharm, München) mit automatischem

Pipettierprogramm; hierbei werden entsprechend des Testansatzes die Einzelschritte am Laptop angezeigt und mit der Pipette ausgeführt.



**Abb. 7: Aufbau einer photometrischen Lichtstreu-Apparatur** Das Prinzip beruht heute auf einem sich alternierend um  $4,45^\circ$  um die Längsachse drehenden Torsionsdraht mit Stift, der sich in einer mit Nativblut gefüllten Küvette (Cup) befindet (nach Rick 1977).

Zu jedem Abnahmezeitpunkt wurden den Patienten jeweils drei Citrat-Röhrchen mit 5 mL Vollblut abgenommen und innerhalb von 60 Minuten weiterverarbeitet. Citratblut ist für ROTEM<sup>®</sup>-Analysen mindestens 6 Stunden stabil (Lang et al. 2005).

### Testansätze

Die thrombelastometrischen Testansätze wurden ausschließlich mittels standardisierten ROTEM<sup>®</sup>-Reagenzien (Pentapharm, München) durchgeführt und vor jedem Versuch auf Haltbarkeit und Öffnungsdatum überprüft. Zunächst wurden die Reagenzien ca. 15 Minuten vor Messung aus dem Kühlschrank entnommen, um diese auf Raumtemperatur zu erwärmen. Die Küvettenhalterungen wurden auf die obenliegende Wärmeplatte gestellt, um alle Messungen immer bei  $37^\circ\text{C}$  durchführen zu können. Je nach gewähltem Testansatz wurde nun entsprechend den Anweisungen des Pipettierprogramms die jeweilige Küvette mit  $300\ \mu\text{l}$  Citratblut und den benötigten Testreagenzien (Tab.1) gefüllt und vermischt. Nach Abschluss des letzten Pipettierschrittes wurde der Cup mit dem Küvettenhalter über die Drehachse geschoben und die Messung automatisch gestartet.

**Tab. 1:** Testverfahren der Thrombelastographie und Rotem-Reagenzien

**star-TEM<sup>®</sup>**

0,2 mol/L CaCl<sub>2</sub> in HEPES Puffer pH 7,4, 0,1% Na-Azid (NaN<sub>3</sub>) zur Rekalzifizierung des Citratbluts

**in-TEM<sup>®</sup>**

Partielles Thromboplastin-Phospholipid (aus Kaninchenhirn) zur milden Aktivierung des intrinsischen Gerinnungssystems, Ellagsäure-Puffer und Konservierungsmittel

**fib-TEM<sup>®</sup>**

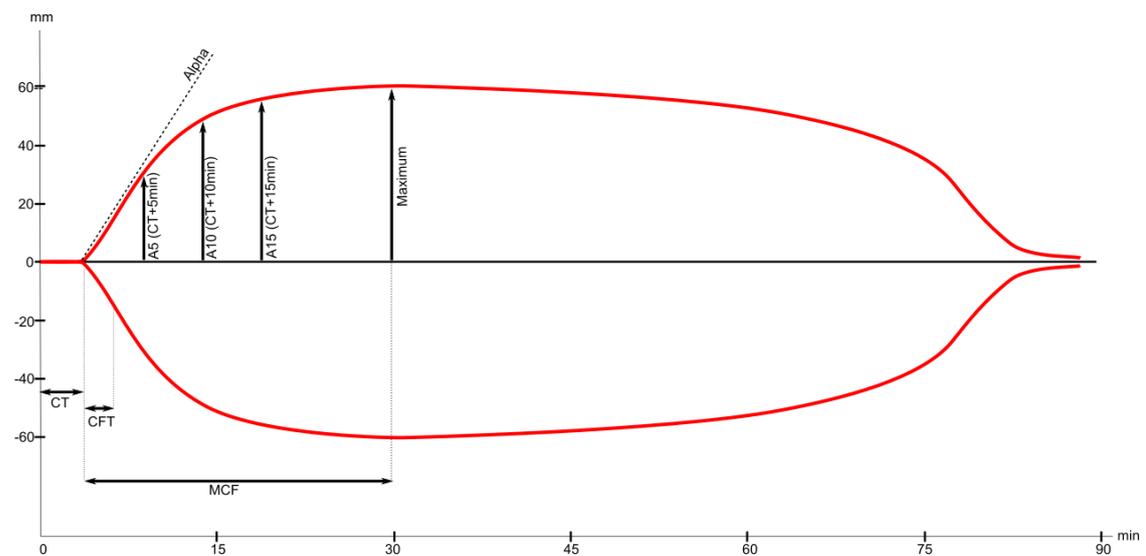
Cytochalasin D / DMSO Lösung zur Inhibierung der Thrombozyten und zur isolierten Beurteilung des Fibrinogengehalts und der Qualität der Fibrin-Polymerisation in Citratblut im Vergleich mit ex-tem<sup>®</sup>, 0.2 mol/L CaCl<sub>2</sub> in HEPES Puffer pH 7.4

**hep-Tem<sup>®</sup>**

modifiziertes in-TEM<sup>®</sup> mit Heparinase zum Abbau des Heparins, Konservierungsmittel und Puffer, Calcium-Ionen, im Vergleich mit in-tem<sup>®</sup>

**Messgrößen**

Die aus dem Thrombelastogramm abgeleiteten Messgrößen zeigt Abbildung 8.



**Abb. 8:** Vermessung und Auswertung der Thrombelastographie (A2b2 commons; zur freien Verwendung gekennzeichnet)

Clotting Time (CT): Die *Clotting Time* beschreibt die Zeitspanne zwischen der Gerinnungsaktivierung nach Rekalzifizierung, Hinzugabe des entsprechenden Aktivators und dem Beginn der Gerinnungsbildung, d.h. der Zeit in welcher der rotierende Stempel keinerlei Abbremsung bzw. Widerstand erfährt. Der Wert wird in Sekunden (s)

angegeben. Faktoren, die CT beeinflussen, sind die Thrombinbildung die konsekutive Gerinnselpolymerisation.

Clot Formation Time (CFT): Die nach der *Clotting time* folgende *Clot Formation Time* ist die Zeitspanne zwischen Beginn der Gerinnungsinitiierung mit abbremmen des Stempels und Erreichen einer Amplitude von 20 mm. Die CFT wird in ebenfalls in Sekunden [s] angegeben und ist ein Maß für die Geschwindigkeit für die Gerinnselbildung. Sie beschreibt die Gerinnselbildung, die durch einen „*thrombin burst*“ erfolgt (Wolberg AS, Campbell RA;2008). Die CFT hängt auch von der Konzentration der Gerinnungsfaktoren und –inhibitoren sowie von der Fibrinogenkonzentration ab (Innerhofer et al. 2004).

Maximum Clot Firmness (MCF): Die größte Amplitude des Thrombelastogramms entspricht der Maximum Clot Firmness und ist das Maß für die maximalen Gerinnselhaftigkeit. Vor Beginn der CFT beträgt sie 0 mm. Sie ist abhängig von der Fibrinpolymerisation, vom F XIII und der Thrombozytenaktivität (Schlimp CJ et al;2013).

Die Referenzintervalle für die Messgrößen können der Tabelle 2 entnommen werden.

**Tab. 2: Referenzintervalle für die thrombelastographischen Messwerte der Rotem® Analyse**

CT=clotting time, CFT=clot formation time, MCF=maximum clot firmness, ML=maximum lysis

a: verkürzte CT im HEPTM gegenüber INTEM deutet auf Heparineffekt

b: MCF < 9 mm im FIBTEM deutet auf Hypofibrinogenämie oder Polymerisationsstörung hin, bei MCF > 25 mm Hyperfibrinogenämie

[Health Policy Advisory Committee on Technology, State of Queensland; 2012]

<b>Parameter</b>	<b>CT (s)</b>	<b>CFT (s)</b>	<b>MCF (mm)</b>	<b>ML (% MCF)</b>
INTEM	100 - 240	30 - 110	50 - 72	< 15
EXTEM	40 - 80	34 - 160	50 - 72	< 15
HEPTM <sup>a</sup>	100 - 240	30 - 110	50 - 72	-
FIBTEM <sup>b</sup>	-	-	9 - 25	-

#### 3.4.4 Activated Clotting Time (ACT)

Die Messmethode der ACT wurde erstmalig 1966 von Hattersley beschrieben (Hattersley PG;1966). Es wurde das Hemochron Jr. Signature Whole Blood Microcoagulation System mit ITC-Testküvetten als point-of-care-Gerinnungstest eingesetzt. Frisches Vollblut wird einem Aktivator (Celite®; Silizium, Kaolin und Phospholipide) hinzugefügt, und anschließend wird die Zeit bis zur Gerinnselbildung

bei 37 °C ±1,0 °C gemessen (Hemocho<sup>®</sup>,2004). Nach dem Vermischen mit dem Reagenz wird die Probe in dem Testkanal mit einer vorgegebenen Geschwindigkeit hin- und her bewegt und auf Gerinnelbildung überwacht. Wenn das Blut gerinnt, wird der Fluss der Blutprobe innerhalb des Testkanals behindert, wodurch die Flussgeschwindigkeit zwischen den optischen Detektoren reduziert wird. Dieser Test weist bei Heparinkonzentrationen zwischen 1,0 und 6,0 Heparin-Einheiten/mL Blut Linearität auf. Referenzwert < 120 Sekunden. Zielwert bei der Anwendung der Herz-Lungen-Maschine > 400 Sekunden.

### **3.4.5 Quickwert**

Für die Bestimmung der Thromboplastinzeit (TPZ, Quickwert) im Citratplasma wurde das Reagenz Dade<sup>®</sup> Innovin<sup>®</sup> (Lyophilisat aus rekombinantem humanem Gewebefaktor und synthetischen Phospholipiden (Thromboplastin), Calciumionen, einer heparinneutralisierenden Verbindung, Puffer und Rinderserumalbumin als Stabilisator). Das Reagenz wird in *E. coli* aus rekombinantem humanem Gewebefaktor und synthetischen Phospholipiden hergestellt, die keinerlei andere Gerinnungsfaktoren, wie z. B. Prothrombin, F VII oder F X enthalten. Das Reagenz induziert die Gerinnelbildung über den exogenen Aktivierungsweg. Dade<sup>®</sup> Innovin<sup>®</sup> ist gegenüber therapeutischen Heparinkonzentrationen unempfindlich. Durch Inkubation von Plasma mit der optimalen Menge an Thromboplastin und Calcium wird der Gerinnungsvorgang ausgelöst, die Zeit bis zur Bildung des Fibringerinnsels wird gemessen. Referenzwerte 9,9 bis 11,8 Sekunden (70 – 100%).

### **3.4.6 Aktivierte Partielle Thromboplastinzeit (aPTT)**

Als Reagenz zur Bestimmung der aPTT in Citratplasma wurde Pathromtin<sup>®</sup> SL (Siliciumdioxid-Partikel 1,2 g/L, pflanzliche Phospholipide 0,25 g/L, Natriumchlorid, HEPES, pH 7,6; Konservierungsmittel: Natriumazid < 1 g/L) als schneller Suchtest für Gerinnungsstörungen im endogenen System mit Erfassung der Faktoren VIII und IX sowie der Kontaktfaktoren eingesetzt. Die Inkubation des Plasmas mit Phospholipiden und einem Oberflächenaktivator führt zur Aktivierung von Faktoren des endogenen Gerinnungssystems. Durch Zugabe einer Calciumchlorid-Lösung wird der Gerinnungsvorgang ausgelöst. Gemessen wird die Zeit bis zur Bildung eines Fibringerinnsels. In ein auf +37 °C vorgewärmtes Teströhrchen werden Citratplasma 100 µL und Pathromtin SL Reagenz 100 µL pipettiert. Nach 2 Minuten Inkubation werden 100 µL Calciumchlorid-Lösung 0,025 mol/L bei 37 °C zugegeben. Referenzwerte 30 – 36 Sekunden.

### **3.4.7 Fibrinogen**

Zur Messung der Fibrinogenkonzentration wurde das Dade<sup>®</sup> Thrombin Reagenz (REF B 4233-25, 10 x 1 mL, lyophilisiertes Rinderthrombinpräparat ca. 100 IU/mL mit Stabilisatoren und Puffern) zur Verwendung für die quantitative Bestimmung von Fibrinogen im Plasma eingesetzt. Thrombin wandelt lösliches Fibrinogen in Fibrin um. Die Gerinnungszeit verdünnten Plasmas ist dabei umgekehrt proportional zur Fibrinogenkonzentration des Plasmas (Methode nach Clauss). Die auf diese Weise erzielte Gerinnungszeit wird dann mit der eines standardisierten Fibrinogenpräparates verglichen. Es wurde ein automatisches Gerinnungsmessgerät verwendet (Siemens Healthcare Diagnostics). Referenzwert 1,8 - 3,5 g/L.

### **3.4.8 Thrombozytenzahl**

Es wurde der XE-2100 Cell Counter (Sysmex Europe GmbH, Norderstedt) zur Durchflusszytometrie nach dem Widerstandsmessprinzip mit hydrodynamischer Fokussierung eingesetzt. Der Messbereich des Geräts beträgt 0 – 5.000 Thrombozyten / nL, die untere Nachweisgrenze 5,0. Die Richtigkeit wird mit  $\pm 5,0 \%$  oder  $\pm 10,0 \times 10^3/\mu\text{L}$  angegeben. Die Messungen erfolgten aus Citratblut (Saerstedt Monovette). Referenzbereich 150.000 – 450.000/ $\mu\text{L}$ .

### **3.5 Statistische Methoden**

Die statistischen Auswertungen wurden mit SPSS für Windows, Version 22.0 (SPSS Inc., U.S.A.) durchgeführt. Die Darstellung der metrischen Variablen erfolgte als Mittelwert und Median, während die Streumaße als Standardabweichungen und Standardfehler sowie Quartile angegeben wurden. Die kategorisierten bzw. nominalen Daten wurden als absolute und relative Häufigkeit angegeben.

Die metrischen Variablen wurden mittels des Kolmogorow-Smirnow-Tests hinsichtlich ihrer Normalverteilung überprüft. Die getesteten Variablen wiesen ganz überwiegend keine Normalverteilung auf ( $p < 0,05$ ). Bei den Vergleichen der Stichproben wurden durchgehend nichtparametrische Tests für nicht normalverteilte Stichproben herangezogen.

Zwei verbundene, nicht normalverteilte Stichproben wurden mittels Wilcoxon-Tests hinsichtlich signifikanter Unterschiede überprüft, während mehr als zwei verbundene, nicht normalverteilte Stichproben mittels des Friedman-Tests verglichen wurden.

Der Korrelation zwischen zwei Variablen wurde durch den Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman-Rho berechnet. Dabei wurde der Korrelationskoeffizient nach folgender Einteilung bewertet:

$r < 0,2$	sehr geringe Korrelation
$r = 0,2 - 0,5$	geringe Korrelation
$r = 0,5 - 0,7$	mittlere Korrelation
$r = 0,7 - 0,9$	hohe Korrelation
$r = > 0,9$	sehr hohe Korrelation

Bei allen durchgeführten Tests erfolgte eine zweiseitige Signifikanzüberprüfung, wobei ein p-Wert  $< 0,05$  bzw.  $< 0,01$  als statistisch signifikant galt. Die Korrelation der Variablen wurde mittels SPSS in Streudiagrammen dargestellt.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Patientenkollektiv

Allgemeine Patientendaten

Die Charakteristika des Patientenkollektives (n = 102) mit 32 Patientinnen und 70 Patienten sind der folgenden Tabelle zu entnehmen.

**Tab. 3: Präoperative Charakteristika des Patientenkollektives (BMI body mass index) und operative Zeiten**

	<i>MW ± SD</i>	<i>n</i>	<i>Min</i>	<i>Max</i>
Alter (Jahre)	70 ± 10	102	31	86
Gewicht (kg)	79 ± 14	102	54	120
Größe (cm)	169 ± 9	102	148	186
BMI (kg/qm)	27,5 ± 3,9	102	21	39
Hb (g/L)	13,6 ± 1,6	102	8,6	16,5
Hkt (%)	40 ± 4	102	26	50
Schnitt-Naht-Zeit (Min)	168 ± 40	102	95	317
Totaler Bypass (Min)	80 ± 26	102	40	171
Aortenklemmzeit (Min)	44 ± 18	87	15	96

Gerinnungs-Ausgangsmesswerte

Die folgende Tabelle 4 zeigt die präoperativen globalen Gerinnungsmesswerte.

**Tab. 4 : Präoperative globale Gerinnungsmesswerte**

	<i>MW ± SD</i>	<i>n</i>	<i>Min</i>	<i>Max</i>
Quickwert (%)	105 ± 17	102	24	120
INR	1,03 ± 0,22	102	0,87	2,57
PTT (Sek)	32,6 ± 9,5	102	24	101
Fibrinogen (g/L)	3,9 ± 1,0	100	2,0	6,3
Thrombozytenzahl ( $\mu\text{L}^{-1}$ )	241.500 ± 69.000	102	101.000	413.000

Von den 102 Patientinnen und Patienten zeigten n = 8 präoperativ trotz eines unauffälligen anamnestischen und klinischen Befunds pathologische Werte bei der Kontrolle der globalen Gerinnungswerte (Tab.5). Diese Werte und die Bestimmungen der Heparin-

konzentration bzw. Heparinaktivität zum Zeitpunkt M1 vor intraoperativer Heparinabgabe sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt.

**Tab. 5 : Auffällige präoperative globale Gerinnungsmesswerte** von 8 Patienten und Messungen der Heparinkonzentration bzw. –aktivität vor intraoperativer Heparinabgabe (M1).

<i>Pat.</i>	<i>Quick</i>	<i>PTT</i>	<i>Fib</i>	<i>Thr</i>	<i>LiSA</i>	<i>antiX<sub>a</sub></i>	<i>ACT</i>	$\Delta$ <i>CT intem-heptem</i>
	%	Sek	g/L	$\mu\text{L}^{-1}$	E/mL	E/mL	Sek	Sek
2	<b>30</b>	<b>38,4</b>	5,25	400.000	0	<b>0,2</b>	<b>141</b>	3
9	<b>52</b>	<b>60,1</b>	2,54	217.000	0	0	<b>147</b>	1
25	106	<b>68,8</b>	2,95	228.000	0	0	116	3
50	<b>40</b>	<b>49,7</b>	2,33	166.000	0	0	<b>174</b>	-15
81	88	<b>44,1</b>	3,41	235.000	0	<b>0,1</b>	108	<b>12</b>
82	<b>24</b>	<b>39,6</b>	4,32	188.000	0	0	<b>168</b>	<b>23</b>
98	92	<b>50,2</b>	5,54	<b>138.000</b>	<b>2,4</b>	0	119	<b>244</b>
100	91	<b>101,4</b>	3,65	215.000	0	<b>0,2</b>	<b>121</b>	<b>58</b>

Bei der Interpretation der Daten der Tab. 5 ist zu bedenken, dass die Messungen der globalen Gerinnungswerte meistens am Tag vor der Operation und die heparinassoziierten Messungen erst am OP-Tag, also nicht zum selben Zeitpunkt, erfolgten. Weitere 4 Patienten zeigten minimale PTT-Verlängerungen (Werte zwischen 36 und 38 Sekunden), die nicht weiter berücksichtigt wurden.

#### 4.2 Art der durchgeführten Operationen

In der Tabelle 6 sind die bei den Patienten vorgenommenen Operationen aufgeführt.

**Tab. 6: Art der durchgeführten Operationen (n = 102)**

<i>Eingriff</i>	<i>n</i>
Aortokoronarer Bypass	54
Aortenklappenersatz	16
Aortokoronarer Bypass + Aortenklappenersatz	14
Mitralklappenrekonstruktion	4
Aortokoronarer Bypass + Mitralklappenrekonstruktion	3
Mitralklappenersatz	3
Mitral- und Trikuspidalklappenrekonstruktion	2
Aorta ascendens – Ersatz	2
Sonstige	4

### 4.3 Heparin- und Protamingaben

Die initiale Heparin-Dosis war für alle erwachsenen Patienten identisch mit 300 IE / kg KG. Einschließlich der Nachdosierungen ergibt sich einschließlich der im Priming enthaltenen Heparin-Dosis eine durchschnittliche insgesamt applizierte Heparin-Dosis von  $518 \pm 154$  IE /kg KG am Ende des Eingriffs. Protamin wurde gemäß Protokoll zur initialen Antagonisierung, zur Antagonisierung von Heparin im retransfundierten Blut aus der Herz-Lungen-Maschine und zum Erreichen einer ACT < 120 Sekunden gegeben.

Insgesamt wurde eine durchschnittliche Protamingesamtdosis von  $571 \pm 404$  IE/kgKg gegeben.

Die folgende Tabelle zeigt die bei den Patienten applizierten Heparin- und Protamin-Dosen.

**Tab. 7: Applizierte Heparin- und Protamindosen (E) auf 100 E gerundet.** \* ACT-gesteuert. \*\* bei Retransfusion von heparinhaltigem Eigenblut aus der Herz-Lungen-Maschine. Angaben nur für  $n > 1$ .

	<i>MW ± SD</i>	<i>n</i>	<i>Min</i>	<i>Max</i>
Heparin Initialdosis	$23.900 \pm 4.100$	102	17.000	36.600
Heparin 1. Nachdosis*	$8.600 \pm 2.300$	39	5.000	10.000
Heparin 2. Nachdosis*	$5.800 \pm 1.800$	13	5.000	10.000
Protamin Initialdosis	$35.500 \pm 6.000$	102	20.000	52.000
Protamin 1. Nachdosis**	$9.000 \pm 2.000$	62	5.000	15.000
Protamin 2. Nachdosis*	$9.000 \pm 2.000$	5	5.000	10.000

#### 4.4 Postoperative Daten

Die folgende Tabelle zeigt die zum OP-Ende nach der ersten Protamingabe gemessenen globalen Gerinnungswerte.

**Tab. 8 : Postoperative globale Gerinnungsmesswerte**

	<i>MW ± SD</i>	<i>n</i>	<i>Min</i>	<i>Max</i>
Quickwert (%)	83 ± 17	102	25	120
INR	1,15 ± 0,21	102	0,93	2,49
PTT (Sek)	49,0 ± 46,5	101	28	491
Fibrinogen (g/L)	3,3 ± 1,0	99	1,0	5,6
Thrombozytenzahl ( $\mu\text{L}^{-1}$ )	153.500 ± 52.000	102	43.000	283.000

Die Tabelle 9 zeigt die intraoperativen Transfusionen, die Messwerte für Hb und Hkt am Ende der Operation und den Blutverlust sowie die Gabe von Blutprodukten in den 24 Stunden nach der Operation.

**Tab.9 : Intraoperative Transfusionen, Hb und Hkt am OP-Ende, Drainageverluste und Transfusionen innerhalb der ersten 24 Std. postoperativ**

	<i>MW ± SD</i>	<i>n</i>	<i>Min</i>	<i>Max</i>
Erythrozytenkonzentrate intraoperativ (n)	0,72 ± 1,12	102	0	5
Hb (g/L)	10,1 ± 1,2	102	7,4	13,7
Hkt (%)	29 ± 4	102	22	43
Drainageverluste (mL)	1.341 ± 690	87	270	4.500
Erythrozytenkonzentrate postoperativ (n)	1,8 ± 2,4	102	0	11
Thrombozytenkonzentrate postoperativ (n)	0,2 ± 0,7	102	0	4

Auf Grund von operativen Blutungskomplikationen wurden bei 8 Patienten notfallmäßige Revisions-Operationen notwendig. Von diesen 8 Patienten zeigte nur einer einen kombinierten pathologischen Messwert in der anti-Xa und LiSA Messung. Ein weiterer Patient zeigte bei M4 eine pathologisch hohe LiSA Messung. Ein neunter Patient mit einem Drainageblutverlust > 2000 mL zeigte zum Zeitpunkt M4 in beiden Messwerten keine pathologische Veränderung.

#### 4.5 Messungen der Heparinkonzentration und Heparinaktivität

Die Tabellen 10, 11 und 12 geben die Messwerte für LiSA, anti-Xa-Aktivität und die ACT wieder. Die Tabelle 13, 14 und 15 geben die Messwerte für die thrombelastographischen Messungen der CT, CFT und MCF jeweils im in-Tem<sup>®</sup>, hep-Tem<sup>®</sup> sowie der Differenz (in-Tem<sup>®</sup> - hep-Tem<sup>®</sup> für CT und CFT bzw. hep-Tem<sup>®</sup> - in-Tem<sup>®</sup> für MCF) wieder.

**Tab. 10: LiSA (E/mL) zu den 4 Messzeitpunkten** (M1 nach Anästhesieeinleitung vor OP-Beginn, M2 nach Heparin-gabe vor HLM, M3 nach HLM vor Protamingabe, M4 nach Protamingabe). \* p<0,05; \*\* p<0,01; <sup>n.s.</sup> nicht signifikant gegenüber M1.

		<i>M1</i>	<i>M2</i>	<i>M3</i>	<i>M4</i>
<b>Median</b>		<b>0,00</b>	<b>4,78**</b>	<b>3,52**</b>	<b>1,13**</b>
Standardfehler		0,03	0,13	0,09	0,05
Perzentile	25	0,00	3,63	2,97	0,99
	75	0,00	5,59	4,06	1,30
n		102	102	100	102

**Tab. 11: anti-Xa-Aktivität (E/mL) zu den 4 Messzeitpunkten** (M1 nach Anästhesieeinleitung vor OP-Beginn, M2 nach Heparin-gabe vor HLM, M3 nach HLM vor Protamingabe, M4 nach Protamingabe). \* p<0,05; \*\* p<0,01; <sup>n.s.</sup> nicht signifikant gegenüber M1.

		<i>M1</i>	<i>M2</i>	<i>M3</i>	<i>M4</i>
<b>Median</b>		<b>0,00</b>	<b>&gt; 2,28**</b>	<b>&gt; 2,28**</b>	<b>0,46**</b>
Standardfehler		0,01	-	-	0,04
Perzentile	25	0,00	> 2,28	> 2,28	0,34
	75	0,02	> 2,28	> 2,28	0,68
n		102	102	102	102

**Tab. 12: ACT (Sek) zu den 4 Messzeitpunkten** (M1 nach Anästhesieeinleitung vor OP-Beginn, M2 nach Heparin-gabe vor HLM, M3 nach HLM vor Protamingabe, M4 nach Protamingabe). \* p<0,05; \*\* p<0,01; <sup>n.s.</sup> nicht signifikant gegenüber M1.

		<i>M1</i>	<i>M2</i>	<i>M3</i>	<i>M4</i>
<b>Median</b>		<b>115</b>	<b>455**</b>	<b>460**</b>	<b>120*</b>
Standardfehler		1,6	8,8	8,2	2,8
Perzentile	25	106	417	434	112
	75	127	495	500	129
n		102	102	102	102

Ergebnisse der in-Tem<sup>®</sup> - Messungen

**Tab. 13: CT in-Tem<sup>®</sup> (Sek) zu den 4 Messzeitpunkten** (M1 nach Anästhesieeinleitung vor OP-Beginn, M2 nach Heparin-gabe vor HLM, M3 nach HLM vor Protamingabe, M4 nach Protamin-gabe). \* p<0,05; \*\* p<0,01; <sup>n.s.</sup> nicht signifikant gegenüber M1.

		<i>M1</i>	<i>M2</i>	<i>M3</i>	<i>M4</i>
<b>Median</b>		<b>182</b>	<b>n.m.</b>	<b>n.m.</b>	<b>260**</b>
Standardfehler		6	-	-	18
Perzentile	25	169	-	-	226
	75	204	-	-	301
n		102	-	-	102

**Tab. 14: CFT in-Tem<sup>®</sup> (Sek) zu den 4 Messzeitpunkten** (M1 nach Anästhesieeinleitung vor OP-Beginn, M2 nach Heparin-gabe vor HLM, M3 nach HLM vor Protamingabe, M4 nach Protamin-gabe). \* p<0,05; \*\* p<0,01; <sup>n.s.</sup> nicht signifikant gegenüber M1.

		<i>M1</i>	<i>M2</i>	<i>M3</i>	<i>M4</i>
<b>Median</b>		<b>66</b>	<b>n.m.</b>	<b>n.m.</b>	<b>130**</b>
Standardfehler		2	-	-	8
Perzentile	25	55	-	-	98
	75	80	-	-	173
n		102	-	-	102

**Tab. 15: MCF in-Tem<sup>®</sup> (mm) zu den 4 Messzeitpunkten** (M1 nach Anästhesieeinleitung vor OP-Beginn, M2 nach Heparin-gabe vor HLM, M3 nach HLM vor Protamingabe, M4 nach Protamin-gabe). \* p<0,05; \*\* p<0,01; <sup>n.s.</sup> nicht signifikant gegenüber M1.

		<i>M1</i>	<i>M2</i>	<i>M3</i>	<i>M4</i>
<b>Median</b>		<b>62</b>	<b>0**</b>	<b>0**</b>	<b>53**</b>
Standardfehler		0,6	0,1	0,5	2,8
Perzentile	25	59	0	0	47
	75	65	0	0	56
n		102	102	101	102

Ergebnisse der hep-Tem<sup>®</sup> - Messungen

**Tab. 16: CT hep-Tem<sup>®</sup> (Sek) zu den 4 Messzeitpunkten** (M1 nach Anästhesieeinleitung vor OP-Beginn, M2 nach Heparin-gabe vor HLM, M3 nach HLM vor Protamingabe, M4 nach Protamingabe). \* p<0,05; \*\* p<0,01; <sup>n.s.</sup> nicht signifikant gegenüber M1.

		<i>M1</i>	<i>M2</i>	<i>M3</i>	<i>M4</i>
<b>Median</b>		<b>186</b>	<b>227**</b>	<b>212**</b>	<b>257**</b>
Standardfehler		3	3	3	20
Perzentile	25	165	209	196	217
	75	205	248	233	309
n		102	102	100	102

**Tab. 17: CFT hep-Tem<sup>®</sup> (Sek) zu den 4 Messzeitpunkten** (M1 nach Anästhesieeinleitung vor OP-Beginn, M2 nach Heparin-gabe vor HLM, M3 nach HLM vor Protamingabe, M4 nach Protamingabe). \* p<0,05; \*\* p<0,01; <sup>n.s.</sup> nicht signifikant gegenüber M1.

		<i>M1</i>	<i>M2</i>	<i>M3</i>	<i>M4</i>
<b>Median</b>		<b>69</b>	<b>72**</b>	<b>98**</b>	<b>131**</b>
Standardfehler		2	3	5	7
Perzentile	25	55	60	78	101
	75	83	85	126	172
n		102	102	100	102

**Tab. 18: MCF hep-Tem<sup>®</sup> (mm) zu den 4 Messzeitpunkten** (M1 nach Anästhesieeinleitung vor OP-Beginn, M2 nach Heparin-gabe vor HLM, M3 nach HLM vor Protamingabe, M4 nach Protamingabe). \* p<0,05; \*\* p<0,01; <sup>n.s.</sup> nicht signifikant gegenüber M1.

		<i>M1</i>	<i>M2</i>	<i>M3</i>	<i>M4</i>
<b>Median</b>		62	62 <sup>n.s.</sup>	55**	52**
Standardfehler		0,6	0,7	0,8	2,8
Perzentile	25	58	58	49	46
	75	66	66	60	55
n		102	102	100	102

Differenzen *in-Tem*<sup>®</sup> - *hep-Tem*<sup>®</sup> (CT und CFT) bzw. *hep-Tem*<sup>®</sup> - *in-Tem*<sup>®</sup> (MCF)

**Tab. 19 : CT (*in-Tem*<sup>®</sup> - *hep-Tem*<sup>®</sup>) (Sek) zu den 4 Messzeitpunkten** (M1 nach Anästhesieeinleitung vor OP-Beginn, M2 nach Heparin-gabe vor HLM, M3 nach HLM vor Protamingabe, M4 nach Protamingabe). \* p<0,05; \*\* p<0,01; <sup>n.s.</sup> nicht signifikant gegen M1.

		<i>M1</i>	<i>M2</i>	<i>M3</i>	<i>M4</i>
<b>Median</b>		<b>1</b>	-	-	<b>7</b> <sup>n.s.</sup>
Standardfehler		5	-	-	14
Perzentile	25	-7	-	-	-6
	75	12	-	-	23
n		102	-	-	102

**Tab. 20 : CFT (*in-Tem*<sup>®</sup> - *hep-Tem*<sup>®</sup>) (Sek) zu den 4 Messzeitpunkten** (M1 nach Anästhesieeinleitung vor OP-Beginn, M2 nach Heparin-gabe vor HLM, M3 nach HLM vor Protamingabe, M4 nach Protamingabe). \* p<0,05; \*\* p<0,01; <sup>n.s.</sup> nicht signifikant gegen M1.

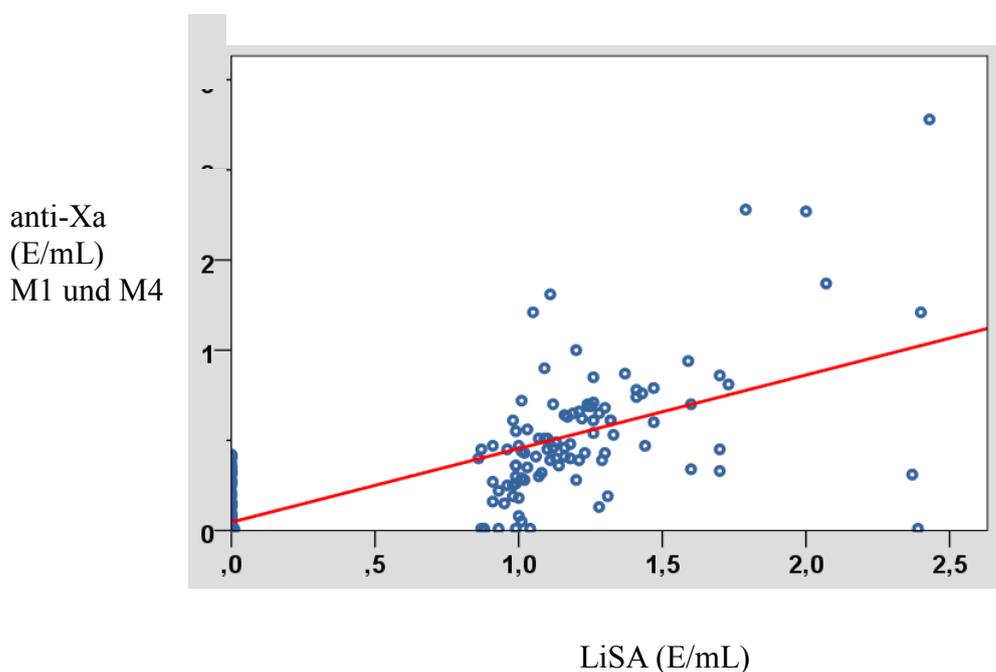
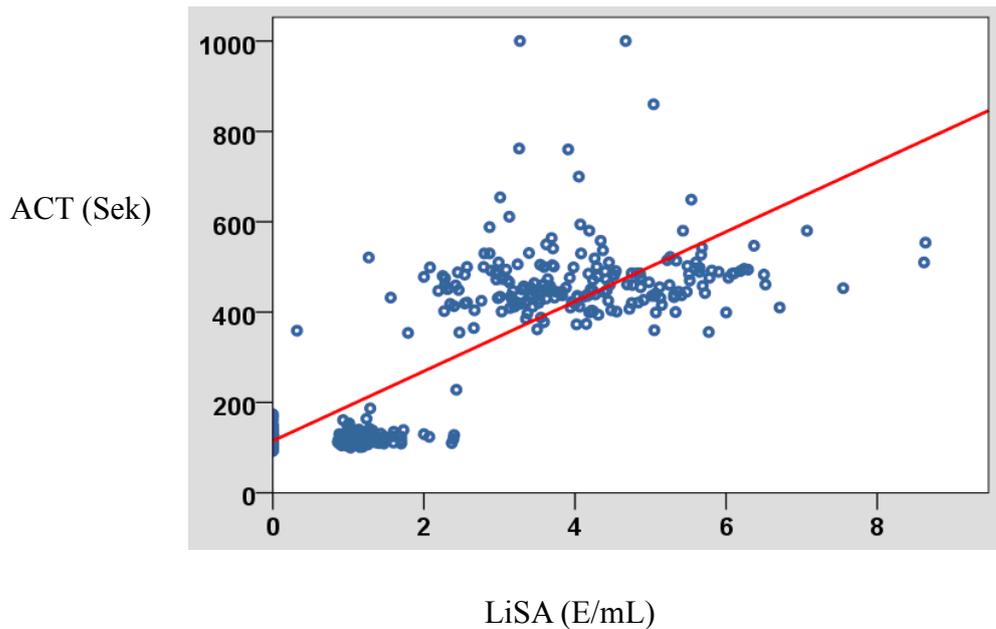
		<i>M1</i>	<i>M2</i>	<i>M3</i>	<i>M4</i>
<b>Median</b>		<b>-2</b>	-	-	<b>-1</b> <sup>n.s.</sup>
Standardfehler		2	-	-	7
Perzentile	25	-6	-	-	-12
	75	2	-	-	8
n		102	-	-	102

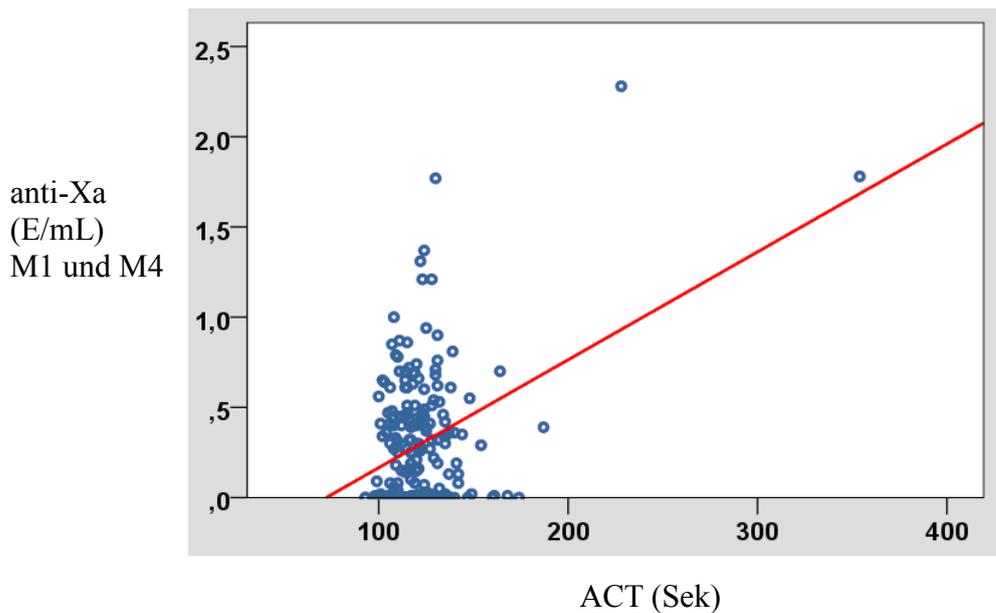
**Tab. 21 : MCF (*hep-Tem*<sup>®</sup> - *in-Tem*<sup>®</sup>) (mm) zu den 4 Messzeitpunkten** (M1 nach Anästhesieeinleitung vor OP-Beginn, M2 nach Heparin-gabe vor HLM, M3 nach HLM vor Protamingabe, M4 nach Protamingabe). \* p<0,05; \*\* p<0,01; <sup>n.s.</sup> nicht signifikant gegen M1.

		<i>M1</i>	<i>M2</i>	<i>M3</i>	<i>M4</i>
<b>Median</b>		0	62**	54**	-1 <sup>n.s.</sup>
Standardfehler		0,4	0,7	1,1	0,5
Perzentile	25	-2	58	48	-2
	75	1,00	66	59	1,00
n		102	-	-	102

#### 4.6 Korrelationen zwischen den Messungen der Heparinkonzentration und Heparinaktivität

Die folgenden Abbildungen (Abb. 9) zeigen die Abhängigkeit der Messwerte für die ACT (M1 bis M4) und die anti-Xa-Aktivität (nur M1 und M4) von den LiSA-Messwerten sowie die Abhängigkeit der anti-Xa-Aktivität von der ACT (nur M1 und M4).





**Abb. 9:** Abhängigkeit der Messwerte für die ACT (oben) und die anti-Xa-Aktivität (nur M1 und M4; Mitte) von den LiSA-Messwerten sowie die Abhängigkeit der anti-Xa-Aktivität von der ACT (nur M1 und M4; unten). Regressionsgeraden in rot.

Der Kolmogorow-Smirnow-Test ergab, dass die Werte nicht normalverteilt waren ( $p < 0,01$ ). Im Folgenden sind die Rangkorrelationskoeffizienten dargestellt.

**Tab. 22 :** Rangkorrelationskoeffizienten  $r_s$  nach Spearman-Rho, Signifikanzniveau  $p$  (2-seitig) und Anzahl der Datenpaare  $N$

		$r_s$	$p$	$N$
LiSA / ACT (M1 bis M4)		<b>0,80</b>	$< 0,01$	406
LiSA / anti-Xa (nur M1 und M4)		<b>0,80</b>	$< 0,01$	204
ACT / anti-Xa (nur M1 und M4)		<b>0,23</b>	$< 0,01$	204
Thrombelastometrische Verfahren				
		<i>CT in-hep</i>	<i>CFT in-hep</i>	<i>MCF hep-in</i>
LiSA	$r_s$	<b>0,04</b>	<b>0,11</b>	<b>0,10</b>
	$p$	n.s.	n.s.	n.s.
	$N$	204	204	406
ACT	$r_s$	<b>-0,07</b>	<b>0,55</b>	<b>0,39</b>
	$p$	n.s.	$< 0,01$	$< 0,01$
	$N$	204	204	408
anti-Xa	$r_s$	<b>0,20</b>	<b>0,24</b>	<b>0,16</b>
	$p$	$< 0,05$	$< 0,05$	n.s.
	$N$	204	204	408

## 5. Diskussion

### 5.1 Validität der LiSA-Messungen

Bei der in dieser Untersuchung erfolgten Validierung der LiSA-Messung zeigte sich, dass die im beschriebenen Patientenkollektiv mittels LiSA gemessenen Heparinkonzentrationen im unteren Konzentrationsbereich  $< 2$  E/mL (zu den Messpunkten M1 und M4) mit einem  $r_s = 0,8$  hoch mit den derzeit als Standard geltenden Messungen der anti-Xa-Aktivität korrelieren (Tab.22). Die beiden anderen in dieser Studie verwendeten Messmethoden, die den Heparineffekt auf die Gerinnungszeiten und die Gerinnselfestigkeit messen (CT, CFT und MCF in der Thrombelastometrie; ACT), zeigen untereinander mit einem  $r_s$  zwischen 0,4 und 0,6 eine nur mittlere aber ebenfalls signifikante Korrelation. Dagegen ist die Korrelation zwischen LiSA und ACT mit einem  $r_s = 0,23$  lediglich gering, aber ebenfalls signifikant (Tab.22).

Die hier untersuchten Patienten erhielten zur Ermöglichung der extrakorporalen Zirkulation initial durchschnittlich  $23.900 \pm 4100$  I.E Heparin i.v. (Tab. 7) und waren für den kardiopulmonalen Bypass zu den Messzeitpunkten M2 und M3 voll heparinisiert, d.h. nach üblicher Testweise lag die ACT bei  $>400$  sec. Die LiSA-Messwerte zeigten zu diesen Zeitpunkten Heparinkonzentrationen von 4,7 bzw. 3,5 E/mL (Tab. 10), während die anti-Xa-Aktivitäten oberhalb des Messbereichs  $> 2,28$  E/mL lagen (Tab 11). Daraus ergab sich, dass eine Korrelation von LiSA und ACT mit den Messwerten der anti-Xa-Messung nur für die Messpunkte M1 und M4 vorgenommen werden konnte. Die ACT-Werte während der Vollheparinisierung lagen bei etwa 470 Sekunden (Tab.12).

Im Übrigen zeigten die durchschnittlich 70-jährigen 102 Patienten ein deutliches Übergewicht (Tab 3). Bei den acht Patienten (Tab. 5) mit einem oder zwei präoperativ pathologischen globalen Gerinnungsmesswerten konnten keine gleichsinnigen Einflüsse auf die später direkt intraoperativ nach Narkoseeinleitung vorgenommenen Ausgangsmessungen der ACT, LiSA oder anti-Xa-Aktivität festgestellt werden, so dass es sich möglicherweise um Artefakte oder um Phänomene handelt, die die weiteren Messungen nicht beeinflussten. Wie die intraoperativen Transfusionsraten (Tab. 9) und postoperativen globalen Gerinnungsmesswerte (Tab. 8) nahelegen, kam es intraoperativ nicht zu bedeutsamen Volumenschwankungen oder über Dilutions- und Herz-Lungen-Maschinen-induzierte Effekte hinausgehenden Gerinnungsstörungen. Von den acht

Patienten mit präoperativ außerhalb des Referenzbereichs liegenden globalen Gerinnungsmesswerten hatten vier kombiniert eine Erniedrigung des Quickwertes, eine verlängerte PTT und eine verlängerte ACT, was einen Dilutionseffekt nahelegt. Ob es sich bei vier Patienten mit präoperativ nachweisbarer Heparinkonzentration (LiSA oder anti-Xa-Aktivität) um die Effekte einer vorangegangenen Heparin-gabe handelte, konnte nicht nachvollzogen werden. Alle acht Patienten hatten eine verlängerte PTT. Da die PTT-Verlängerung häufig und für sich allein wenig sensitiv ist (Li et al. 2015), wurden diese Patienten nicht von der Untersuchung ausgeschlossen.

Der auffällig niedrige Korrelationskoeffizient (Tab. 22) von 0,23 zwischen ACT und anti-Xa-Aktivität könnte auch daraus resultieren, dass wegen der Überschreitung der oberen Messgrenze der anti-Xa-Aktivität während der Vollheparinisierung nur der niedrige Heparin-Konzentrationsbereich erfasst werden konnte (M1 und M4 mit  $n = 204$ ). Möglicherweise findet sich in diesem schmalen Heparin-Konzentrationsbereich tatsächlich eine niedrigere Korrelation zwischen der ACT und der anti-Xa-Aktivität, die sich bei Vorliegen der Datenpaare auch im hohen Konzentrationsbereich den Werten der Korrelation zwischen LiSA und ACT ( $r_s = 0,80$  mit  $n = 406$ ) hätte annähern können.

Deshalb wird zum Vergleich noch einmal die Korrelation zwischen den LiSA- und den ACT-Wertsträngen nur zu den Zeitpunkten M1 und M4 ( $n = 204$ ) betrachtet, um zu prüfen, ob sich in diesem niedrigen Heparinkonzentrationsbereich ebenfalls ein niedrigerer Korrelationskoeffizient findet. Dabei ergibt sich tatsächlich mit einem  $r_s = 0,35$  ( $p < 0,01$ ) eine zwar im Vergleich zur Korrelation ACT – anti-Xa bessere, aber nur geringe signifikante Korrelation zwischen LiSA und ACT. Insgesamt korrelieren im niedrigen Heparinkonzentrationsbereich nur die beiden Messverfahren LiSA und anti-Xa im hohen Maße.

Während LiSA und anti-Xa-Aktivität die Heparinkonzentration nach der initialen Antagonisierung mittels Protamin zum Zeitpunkt M4 mit 1,1 bzw. 0,5 E/mL noch hoch signifikant erhöht finden, ist die ACT nur um 5 Sekunden verlängert, wenn auch bei  $> 100$  Datenpaaren immer noch signifikant. Die thrombelastometrischen Differenzmesswerte (Vergleich in-Tem<sup>®</sup> und hep-Tem<sup>®</sup>) für CT, CFT und MCF (Tab. 19-21) können dagegen die noch bestehende niedrigdosierte Heparinisierung am OP-Ende nicht erfassen. Allerdings sind CT (Tab.13) und CFT (Tab. 14) zum Zeitpunkt M4 hoch signifikant länger und die MCF (Tab. 15) kleiner als zum Zeitpunkt M1 und zeigen

damit die heparinunabhängig durch Dilution, Verlust, Verbrauch und die Herz-Lungen-Maschine regelhaft induzierte intraoperative statische Gerinnungsstörung an.

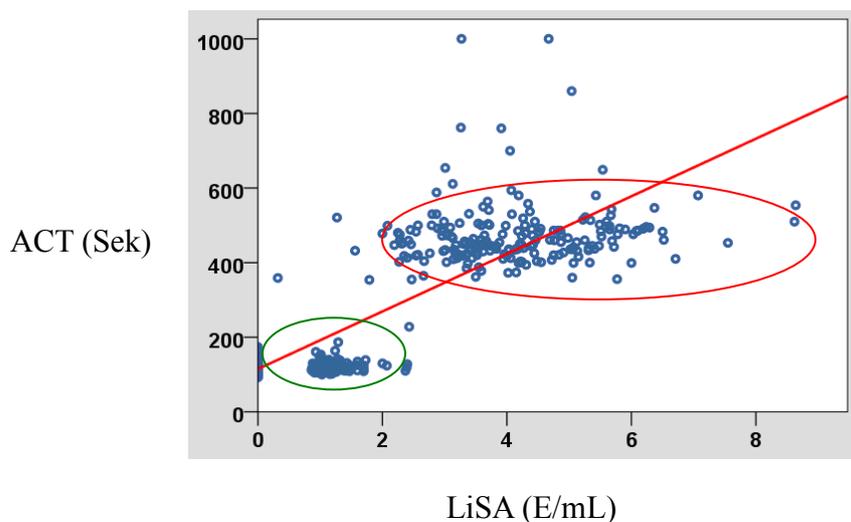
Zusammengefasst ergibt sich, dass die beiden Verfahren der Heparinkonzentrationsmessungen LiSA und anti-Xa auch im niedrigen Heparinkonzentrationsbereich  $< 2$  E/mL hoch miteinander korrelieren, jedoch nur gering mit den koagulometrischen Verfahren der ACT und Thrombelastometrie. Dagegen korrelieren die beiden koagulometrischen Verfahren besser – wenn auch nur teilweise und mittelstark – untereinander als mit den Heparinkonzentrationsmessungen. Eine Erklärung dafür ergibt sich daraus, dass gleiche Heparinkonzentrationen im Blut bei verschiedenen Patienten nicht zwangsläufig die gleichen Effekte auf in vitro messbare koagulometrische Gerinnungszeiten haben müssen.

Diese Ergebnisse stimmen gut mit den Ergebnissen früherer Studien z.B. in der Kinderherzchirurgie überein, die ebenfalls nur sehr schwache Korrelationen zwischen ACT Messungen und der anti Xa Aktivität während der EKZ feststellten (Guzetta NA;2010).

Außerdem sind die Messungen der CT, CFT und MCF im in-Tem<sup>®</sup> (heparinabhängig) und hep-Tem<sup>®</sup> (heparinunabhängig) wesentlich durch die operationsinduzierten Gerinnungsveränderungen beeinflusst, die von den LiSA- und anti-Xa-Messungen nicht erfasst werden. So ergaben sich im hep-Tem<sup>®</sup> kontinuierlich fortschreitend hochsignifikante Verlängerungen der CT (+70 Sek) (Tab.16) und CFT (+60 Sek) (Tab.17) und eine Abnahme der MCF (-10 mm) (Tab.18) im Laufe der Operation als Ausdruck der kombinierten perioperativen Gerinnungsstörung durch z.B. Dilution, Verbrauch und Thrombozytenzahl-Abnahme sowie thrombozytäre Funktionseinschränkung. Dies bestätigt auch der Vergleich der präoperativen (Tab. 4) mit den postoperativ gemessenen globalen Gerinnungswerten (Tab.8), die gleichförmig eine postoperative Verminderung des plasmatischen Gerinnungspotenzials und der Thrombozytenzahl zeigen.

Das Streudiagramm der LiSA und ACT-Messwerte (Abb.9+10) lässt eine Besonderheit der ACT im hier untersuchten Patientenkollektiv erkennen. Die Datenpaare legen nahe, dass die ACT im Bereich einer niedrigen bis mittleren LiSA-Heparinkonzentration von 0 – 2 E/mL eher unempfindlich zwischen bei 120 – 150 Sekunden liegt (grüne Einkreisung) und erst ab einem Schwellenwert von 2 E/mL mit einer deutlichen

Verlängerung reagiert. Oberhalb von 2 bis 8 E/mL streut die ACT ebenfalls eher unempfindlich um einen Wert von etwa 450 Sekunden (rote Einkreisung). Die ACT ist demnach gut dazu geeignet, das Erreichen einer mittels LiSA gemessenen Heparinkonzentration von  $> 2$  E/mL anzuzeigen, kann jedoch im Konzentrationsbereich darunter und darüber nur wenig differenzieren (siehe Abb. 10).

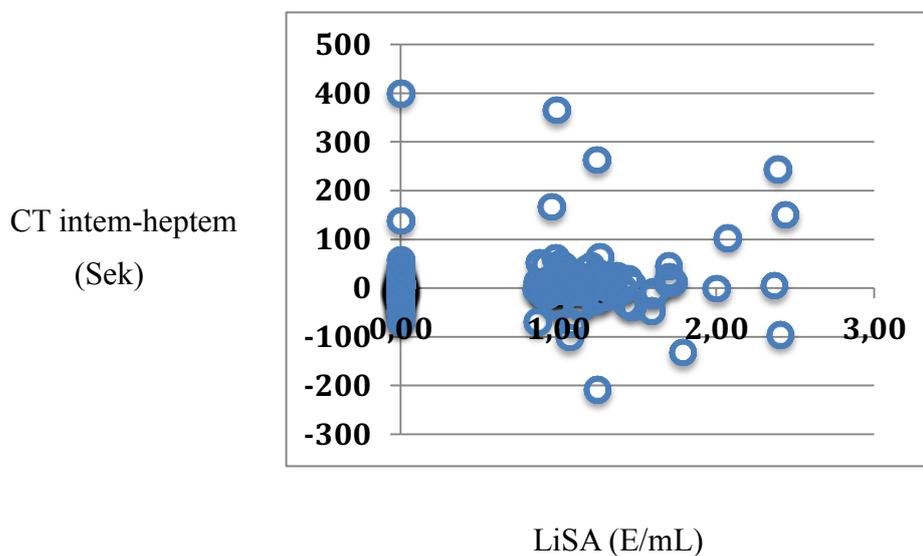


**Abb. 10: ACT und LiSA – Messwerte (n = 406) vor, während und nach extrakorporaler Zirkulation. Trennschärfe der ACT bei ca. 2 E/mL Heparin.**

Gerade bei der Klärung der klinischen Frage, ob eine nach Abgang von der Herz-Lungen-Maschine und nach empirischer Antagonisierung der Heparinwirkung mit Protamin weiter bestehende diffuse Blutung noch heparininduziert sein kann, kommt aber mit Blick auf die erforderlichen Therapiemaßnahmen wie der Protamin-Nachdosierung besondere Bedeutung zu. Immerhin wurde auch bei den Patienten dieser Studie 62 mal (ca. 60%) (Tab. 7) zumindest eine weitere Protamindosis gegeben. In diesem wichtigen niedrigen Heparin-Konzentrationsbereich ist die Differenzierungsfähigkeit der LiSA-Messung der ACT überlegen und der der anti-Xa-Aktivitätsbestimmung, mit der sie hoch korreliert, ebenbürtig. Dabei liegt die mittels LiSA gemessene Heparinkonzentration nach der ersten Protamingabe (M4) im Median bei 1,13 E/mL (Tab.10), die Messung der anti-Xa-Aktivität ergibt einen Wert von 0,46 E/mL (Tab. 11).

Die Tatsache, dass Protamin-Heparin Titrationsverfahren wie LiSA oder ähnliche Verfahren wie z.B. der Hepcon® höhere Heparinkonzentration messen als die anti-Xa-basierten Verfahren, erklärt sich möglicherweise daraus, dass die heute kommerziell verfügbaren Heparinpräparate auch niedermolekulare Heparinfraktionen enthalten, die zwar einen Komplex mit Protamin bilden können, aber mangels der Fähigkeit, an Antithrombin zu binden, keine klinisch-biologische Aktivität gegenüber dem Faktor Xa haben (Hellstern P;2007).

Die anderen koagulometrischen Testverfahren der Thrombelastometrie können mit der Erfassung der Heparineffekte auf die CT, CFT oder MCF keinen signifikanten Beitrag zur Abschätzung der Heparinkonzentration im niedrigen Bereich leisten. Die Korrelationen mit den LiSA- und anti-Xa-Messwerten sind für die klinische Praxis zu schwach. Exemplarisch ist im Folgenden (Abb. 11) das Streudiagramm der LiSA-Messwerte und der CT-Differenz intem-heptem zu den Zeitpunkten M1 und M4 dargestellt. Zwischen den Messwerten war keine Korrelation feststellbar ( $r_s = 0,04$ ).



**Abb. 11: CT intem-heptem und LiSA-Messwerte (nur M1 und M4, n = 204,  $r_s = 0,04$ ) vor und nach extrakorporaler Zirkulation.**

Dieser Befund ist in guter Übereinstimmung mit anderen aktuellen Untersuchungen zum Einsatz der thrombelastometrischen Verfahren zur Detektion der Restheparinkonzentration nach EKZ, in denen ebenfalls nur schwache Korrelationen mit z.B. der

ACT oder der anti-Xa Aktivität gefunden worden (Willems A;2016, Mittermayer M;2009). Trotzdem wurden in einer der Studien von 58 Blutproben, die in der anti-Xa-Messung kein Restheparin enthielten, 56 durch die CT-InTem : CT-HepTem ratio korrekt identifiziert (Mittermayer M;2009).

In der hier vorliegenden Studie zeigten 103 Blutproben in der LiSA Messung keine Restheparinkonzentration. Von diesen zeigten jedoch 41 eine kürzere CT im Heptem als im Intem, so dass sich die heparinabhängigen thrombelastometrischen Messwerte nicht für die Steuerung der Antagonisierung des Heparins mit Protamin anbieten.

#### Point-of-Care Einsatz der LiSA-Messung

Die LiSA-Messapparatur erwies sich in dieser Studie als einfach zu bedienendes System, das sich als point-of-care Methode für eine patientennahe Heparinkonzentrationsmessungen eignet. Der geringe Platzbedarf des Gerätes inklusive Zentrifuge (60 x 50 cm) erlaubt sowohl eine Positionierung direkt im Operationssaal, als auch im Zentrallabor.

Bei der Messung der ACT im Rahmen der Nutzung einer Herzlungenmaschine ist das Messintervall entsprechend der hohen Heparinkonzentration lang. Ein solcher Zeitverzug ergibt sich bei der Verwendung der LiSA Konzentrationsmessung nicht.

Die in Bezug zur Kalibrationskurve ermittelten Ergebnisse lagen nach 11 bis 15 Minuten vor. Eine weitere Beschleunigung des Prozesses wäre durch eine kürzere Zentrifugationszeit möglich. Hier müsste untersucht werden, inwieweit kürzere Zentrifugationszeiten die Messergebnisse beeinflussen. In Zukunft wird eine schnelle Plasmaseparation über Filter möglich sein (Kim B, Choi S; 2016), so dass eine Prozesszeit von der Abnahme des Blutes bis zum Vorliegen des Ergebnisses von 3-5 Minuten realistisch erscheint.

Das Heparin/Protamin-Management ist ein empirisches Verfahren, welches durch patientenindividuelle Faktoren wie z.B. Heparin-Clearance und Antithrombinaktivität keine standardmäßig sichere Formelrechnung zulässt. Die häufigen Heparin-Nachdosierungen und die noch häufigeren Protamin-Nachdosierungen geben hierfür einen Anhalt. Viele der Protamin-Nachdosierungen erfolgten bei einer ACT, die bereits unter 120 Sekunden im Normbereich lag. Sie wurden jedoch aufgrund des subjektiven Eindrucks des Operateurs und Anästhesisten einer weiterhin diffusen Blutungskomponente nach klinischem Ermessen durchgeführt. Insofern kann eine schnelle point-

of-care Objektivierung der aktuellen Heparinkonzentration, die die Rotations-thrombelastometrie in dieser Studie nachgewiesen nicht leisten kann, möglicherweise künftige Studienergebnisse positiv beeinflussen.

Bei den hier untersuchten Operationen mit einer HLM Zeit von > 60 Minuten (Tab. 3) war gelegentlich ein leicht bis mittelgradig hämolytisches Plasma nach Zentrifugation zu beobachten. Ursächlich hierfür ist wahrscheinlich der mechanische Stress, dem die Erythrozyten während der HLM ausgesetzt werden (Vercaemst L, 2008). Um beurteilen zu können, inwieweit dies die Ergebnisse beeinflusst, sind weitere Untersuchungen notwendig. Bei früheren Studien zur Plasmaseparation (Elsenbruch S, 2004) zeigte sich gehäuft ein hyperlipämisches Plasma, welches eine signifikante Erhöhung der Grundstreuung bedingen würde. Da die Patienten in der hier vorliegenden Studie jedoch eine mindestens 9 stündige Nahrungskarenz bis zur ersten Blutentnahme eingehalten hatten, trat dieses Phänomen nicht auf. Sollte die LiSA-Messmethode jedoch in anderen klinischen Situationen verwendet werden, ist dies zu berücksichtigen.

## **5.2 Heparin/Protamin-Dosierung**

Die Patienten in dieser Studie erhielten vor Beginn der EKZ 300 IE Heparin /kgKG intravenös und zusätzlich 2.400 E Heparin zum Priming der EKZ. Als Zielwert wurde eine ACT von über 400 Sekunden angestrebt. Obwohl die angegebene Dosierung bewährter jahrzehntelanger Empirie entspringt, ist eine sichere Vorhersage der antikoagulatorischen Wirkung nicht möglich. So schwankte der primäre Effekt in dieser Studie erheblich mit ACT Werten zwischen 350 bis über 1.000 Sekunden (obere Messgrenze des verwendeten Gerätes). In etwa 42 % der Fälle war eine Nachdosierung des Heparins entweder sofort oder innerhalb der ersten 30 Minuten nach Beginn der EKZ nötig. Die empirische Gabe einer Repetitionsdosis von 5.000 – 10.000 IE Heparin i.v. erfolgte nach der klinischen Einschätzung des Anästhesisten. Diese seit langem bekannte patientenindividuelle Wirkung des Heparins macht eine sichere Handhabung schwierig (Levy JH;2010). Die in dieser Studie erhobenen klinischen Daten zeigen, dass auch nach der körperrgewichtsadaptierten Antagonisierung mit Protamin trotz ACT-Werten unter 120 Sekunden eine Heparinkonzentration von mehr als 1 IE/mL nachgewiesen werden konnte. Inwieweit durch eine zukünftige patientenindividuelle Optimierung der Protamin-Dosierung durch eine schnelle intraoperative Bestimmung

der Heparinkonzentration im Patientenblut, die auch schon kurz vor der ersten Antagonisierung durchgeführt werden kann, die Blutungsrate gesenkt werden kann, müssen künftige Untersuchungen zeigen.

### 5.3 Blutungskomplikationen

Trotz routinemäßiger postoperativer Bestimmung der globalen Gerinnungsparameter einschließlich der thrombelastographischen Verfahren und Thrombozytenfunktionstests und der therapeutischen Optimierung des Gerinnungspotenzials kommt es immer wieder zu revisionsbedürftigen peri- und postoperativen Blutungen. Im Mittel betragen die Drainageverluste der Patienten dieser Studie in den ersten 24 Stunden postoperativ etwa  $1.350\text{ml} \pm 700\text{ mL}$  (Tab. 9). Neun Patienten hatten einen Blutverlust von  $> 2\text{ L}$ . Insgesamt mussten acht Patienten rethorakotomiert werden, sieben dieser Patienten stammten aus der Gruppe mit  $> 2\text{ L}$  Blutverlust. Beide Patienten, die einen Aorta ascendens-Ersatz erhielten, gehörten ebenfalls in die Gruppe der Patienten, die revidiert werden mussten. Mit ursächlich hier ist sicherlich die deutlich höhere Komplexität des Eingriffs und dem höheren Nachblutungsrisiko. Bei allen Rethorakotomien ergab sich ein deutlich erhöhter Transfusionsbedarf von 4 - 10 Erythrozytenkonzentraten. Ein signifikanter Zusammenhang zwischen Blutung und Rethorakotomie einerseits und der mittels LiSA bestimmten Heparinkonzentration zum Zeitpunkt M4 fand sich nicht. Als ursächlich hierfür ist ein multifaktorielles Geschehen mit z.B. vorbestehender Antikoagulation und/oder Thrombozytenfunktionshemmung, intraoperativer Dilutions-, Verlust- und Verbrauchskoagulopathie, HLM-induzierter Thrombozytenfunktionsstörung und Hyperfibrinolyse und erfolgter Antikoagulation und Antagonisierung anzusehen. Die LiSA Methode zur Heparinkonzentrationsbestimmung stellt in der Differenzialdiagnose dieser Hämostasestörungen einen neuen zuverlässigen Parameter dar, der möglicherweise künftig zu einer Verbesserung der routinemäßigen Heparinantagonisierung mit Protamin und des therapeutischen Managements von Hämostasestörungen nach EKZ beitragen kann. Ob die LiSA Messmethode anderen point-of-care Verfahren, die ebenfalls bei herzchirurgischen Eingriffen eine gute Korrelation mit der ACT oder der anti-Xa-Aktivität aufweisen (z.B. Heptest POC-Hi), überlegen oder ebenbürtig ist, lässt sich derzeit nicht abschätzen (Hellstern P;2007). Jedenfalls scheint die point-of-care Messung der INR (Quickwert) für die

hämostaseologische Diagnostik während der EKZ aufgrund inakzeptabler Diskrepanzen zu den Standardverfahren nicht brauchbar zu sein (Meesters MI;2016). Auch die konsekutiven Messungen der Heparinkonzentration zur Etablierung einer dose-response Kurve, die die Kalkulation der nach EKZ benötigten Protamin Dosis ermöglichen soll (Raymond PD;2003), ist für den klinischen Einsatz umstritten (Azis KA;2016, Gilly G;2016).

Zur Vermeidung heparininduzierter Blutungskomplikationen am Ende der EKZ wurde in einer Studie versucht, die initiale Heparindosis durch Titration bis zu einer ACT Verlängerung  $\geq 300$  s zu reduzieren. Im Vergleich zu 100 Patienten, die 300 IE/kgKg erhielten, ergab sich dadurch retrospektiv eine niedrigere initiale Heparindosis von  $145 \pm$  IE/kgKg, die mit einer signifikanten Reduktion des postoperativen Blutverlustes und der allogenen Transfusionsrate, aber nicht mit einer höheren Inzidenz thromboembolischer Ereignisse verbunden war (Fromes Y;2011). Jedoch bleibt auch bei reduzierten Heparindosen der Einsatz von Messverfahren wie LiSA zur gezielten Antagonisierung von Restheparin notwendig.

## 6. Zusammenfassung

Eine sichere Vorhersage des Heparineffektes bei der systemischen Antikoagulation während der extrakorporalen Zirkulation im Rahmen eines herzchirurgischen Eingriffs ist aufgrund der Streuung der patientenindividuellen Dosis-Wirkungs-Beziehung nicht möglich. Mit der Messung der Lichtstreuung während der Bildung von aus Heparin und Protamin bestehenden Nanopartikeln (Light Scattering Assay, LiSA), bei der die Streuintensität proportional zur Heparinkonzentration verläuft, steht seit kurzem eine einfache und schnelle Heparinkonzentrations-Messung, die technisch als point-of-care Diagnostik einsetzbar wäre, zur Verfügung.

Zur Validierung der LiSA-Heparinkonzentrations-Messung wurden insgesamt 102 erwachsene Patienten während einer Herzoperation unter extrakorporaler Zirkulation mit systemischer Heparin-Antikoagulation untersucht und vor und nach Heparin- und Protamingaben Vergleichsmessungen der ACT, anti-Xa-Aktivität und thrombelastographischer Messgrößen (clotting time CT, clot formation time CFT, maximum clot firmness MCF nach intrinsischer und extrinsischer Aktivierung sowie unter Heparinase-zusatz als in-Tem und hep-Tem) durchgeführt.

Die LiSA-Messwerte und die der anti-Xa-Aktivität im niedrigen Konzentrationsbereich korrelierten hochsignifikant ( $r_s = 0,80$ ;  $p < 0,01$ ). Auch die Korrelation zwischen den LiSA-Messwerten und der ACT war über den gesamten Heparinkonzentrationsbereich hochsignifikant ( $r_s = 0,80$ ;  $p < 0,01$ ). Dagegen fand sich nur eine schwache Korrelation zwischen der anti-Xa-Aktivität und der ACT im niedrigen Heparinkonzentrations-reich ( $r_s = 0,23$ ;  $p < 0,01$ ), die sich möglicherweise durch eine nur geringe heparininduzierte Streuung der ACT innerhalb des niedrigen ( $< 2$  E/mL) und innerhalb des hohen ( $> 2$  E/mL) Konzentrationsbereichs des Heparins erklärt. Die thrombelastometrischen Messwerte (Differenzen zwischen den mit und ohne Heparinase nach intrinsischer Aktivierung gemessenen Werte) für die CT, CFT und MCF korrelieren nicht mit den LiSA-Werten. Geringe bis mittlere Korrelationen fanden sich bei ACT und anti-Xa-Aktivität. Die Heparinkonzentrationsmessung mittels LiSA und die anti-Xa-Aktivität sind im niedrigen Konzentrationsbereich  $< 2$  E/mL sensitiver als die üblicherweise klinisch eingesetzte ACT oder die CT im in-Tem oder hep-Tem. Während diese koagulometrischen Verfahren nach Antagonisierung mit Protamin bereits wieder Normalwerte anzeigen, detektieren LiSA und anti-Xa-Aktivität noch signifikant erhöhte Heparinkonzentrationen.

Einen signifikanten Zusammenhang zwischen den erhöhten LiSA Werten nach Abgang von der Herzlungenmaschine und einem erhöhten Drainageverlust in den ersten 24h postoperativ oder der Notwendigkeit einer Revisionsoperation konnte in dieser Studie nicht gezeigt werden. Nur zwei der acht operativ revidierten Patienten zeigten am Ende der Operation auffällige anti-Xa- oder LISA Messwerte, so dass von einer multifaktoriellen Genese dieser Blutungen auszugehen ist.

Die Messung der Heparinkonzentration mittels LiSA ist schnell und einfach möglich und korreliert bei herzchirurgischen Patienten vor und nach Heparin- bzw. Protamingabe hoch und signifikant mit der anti-Xa-Aktivität und der ACT. Dabei erkennt die LiSA-Methode auch geringe Heparinkonzentrationen nach Protamingabe ebenso gut wie die anti-Xa-Aktivität. Nach technischer Modifikation könnte die Methode automatisiert point-of-care eingesetzt werden und möglicherweise zu einer Verbesserung der heutigen empirisch basierten körperrgewichtbezogenen und ACT-

gesteuerten Heparin- und Protamindosierung beitragen. Ob dies auch zu einer effektiveren Therapie der nach herzchirurgischer Operation und extrakorporaler Zirkulation auftretenden Hämostasestörung führen kann, müssen künftige Studien zeigen.

## 7. Verzeichnis

### 7.1 Abbildungsverzeichnis

<b>Abb. 1:</b> Schematischer und vereinfachter Aufbau einer pumpengetriebenen Herzlungenmaschine.....	1
<b>Abb. 2:</b> Zeitliche Zuordnung der Zeitpunkte der Blutabnahmen (M1 bis M4) zum operativen Verlauf und zu den Medikamentengaben.....	10
<b>Abb. 3:</b> Prinzip der LiSA Messung .....	12
<b>Abb. 4 :</b> Aufbau der photometrischen LiSA Apparatur.....	12
<b>Abb. 5:</b> Reaktionsverlauf der Partikelbildung in Abhängigkeit von der Zeit in heparinisiertem Blutplasma nach Zugabe von Protamin .....	13
<b>Abb.6:</b> Kalibrierkurve .....	14
<b>Abb. 7:</b> Aufbau einer photometrischen Lichtstreu-Apparatur .....	16
<b>Abb. 8:</b> Vermessung und Auswertung der Thrombelastographie .....	17
<b>Abb. 9:</b> Abhängigkeit der Messwerte für die ACT (oben) und die anti-Xa-Aktivität (nur M1 und M4; Mitte) von den LISA-Messwerten sowie die Abhängigkeit der anti-Xa-Aktivität von der ACT (nur M1 und M4; unten). .....	31
<b>Abb. 10:</b> ACT und LiSA – Messwerte (n = 406) vor, während und nach extrakorporaler Zirkulation.. .....	35
<b>Abb. 11:</b> CT intem-heptem und LiSA–Messwerte (nur M1 und M4, n = 204, $r_s = 0,04$ ) vor und nach extrakorporaler Zirkulation.....	36

### 7.2 Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1</b> Testverfahren der Thrombelastographie.....	22
<b>Tabelle 2</b> Referenzintervalle für die thrombelastographischen Messwerte der Rotem <sup>®</sup> Analyse.....	23
<b>Tabelle 3</b> Präoperative Charakteristika des Patientenkollektives und operative Zeiten.	27
<b>Tabelle 4</b> Präoperative globale Gerinnungsmesswerte der Patienten.....	27

<b>Tabelle 5</b> Auffällige präoperative globale Gerinnungsmesswerte von 8 Patienten und Messungen der Heparinkonzentration bzw. –aktivität vor intraoperativer Heparin- gabe (M1).....	28
<b>Tabelle 6</b> Art der durchgeführten Operationen.....	28
<b>Tabelle 7</b> Applizierte Heparin- und Protamindosen (E) auf 100 E gerundet.....	29
<b>Tabelle 8</b> Postoperative globale Gerinnungsmesswerte der Patienten.....	30
<b>Tabelle 9</b> Intraoperative Transfusionen, Hb und Hkt am OP-Ende, Drainageverluste und Transfusionen innerhalb der ersten 24 Std. postoperativ.....	30
<b>Tabelle 10</b> LiSA (E/mL) zu den 4 Messzeitpunkten.....	31
<b>Tabelle 11</b> Anti-Xa-Aktivität (E/mL) zu den 4 Messzeitpunkten .....	31
<b>Tabelle 12</b> ACT (Sek) zu den 4 Messzeitpunkte.....	31
<b>Tabelle 13</b> CT in-Tem <sup>®</sup> (Sek) zu den 4 Messzeitpunkten .....	32
<b>Tabelle 14</b> CFT in-Tem <sup>®</sup> (Sek) zu den 4 Messzeitpunkten.....	32
<b>Tabelle 15</b> MCF in-Tem <sup>®</sup> (mm) zu den 4 Messzeitpunkten.....	33
<b>Tabelle 16</b> CT hep-Tem <sup>®</sup> (Sek) zu den 4 Messzeitpunkten .....	33
<b>Tabelle 17</b> CFT hep-Tem <sup>®</sup> (Sek) zu den 4 Messzeitpunkten.....	33
<b>Tabelle 18</b> MCF hep-Tem <sup>®</sup> (mm) zu den 4 Messzeitpunkten .....	34
<b>Tabelle 19</b> CT (in-Tem <sup>®</sup> - hep-Tem <sup>®</sup> ) (Sek) zu den 4 Messzeitpunkten .....	34
<b>Tabelle 20</b> CFT (in-Tem <sup>®</sup> - hep-Tem <sup>®</sup> ) (Sek) zu den 4 Messzeitpunkten.....	34
<b>Tabelle 21</b> MCF (hep-Tem <sup>®</sup> - in-Tem <sup>®</sup> ) (mm) zu den 4 Messzeitpunkten.....	35
<b>Tabelle 22</b> Rangkorrelationskoeffizienten $r_s$ nach Spearman-Rho.....	37

## 8. Literaturverzeichnis

**Aziz KA**, Masood O, Hoschtitzky JA, Ronald A. Does use of the Hepcon point-of-care coagulation monitor to optimise heparin and protamine dosage for cardiopulmonary bypass decrease bleeding and blood and blood product requirements in adult patients undergoing cardiac surgery? *Interact Cardiovasc Thorac Surg* 2006; 5: 469-482.

**Ballhorn R**: The protamin family of sperm nuclear proteins. *Genome Biol.* 2007;8(9):227

**Barzu T**, Molho P, Tobelem G, Petitou M, Caen J: Binding and endocytosis of heparin by human endothelial cells in culture. *Biochim Biophys Acta* 1985; 845: 196-203.

**Becker RC**. Approach to the patient with complicated myocardial infarction. In: Cannon CP, O'Gara PT (Hrg.) *Critical Pathways in Cardiovascular Medicine*. Lippincott, Wilkins and Williams, 2006, S. 152

**Boisclair MD**, Lane DA, Philippou H, Esnouf MP, Sheikh S, Hunt B, Smith KJ: Mechanisms of thrombin generation during surgery and cardiopulmonary bypass. *Blood* 1993; 82: 3350–3357

**Bull MH**, Huse WM, Bull BS. Evaluation of Tests Used to Monitor Heparin Therapy during Extracorporeal Circulation. *Anesthesiology* 1975; 43: 346-352

**Burman JF**, Chung HI, Lane DA, Philippou H, Adami A, Lincoln JC: Role of factor XII in thrombin generation and fibrinolysis during cardiopulmonary bypass. *Lancet* 1994; 344: 1192–1193

**Byun Y**, Chang LC, Lee LM et al.: Low molecular weight protamine: a potent but nontoxic antagonist to heparin/low molecular weight protamine. *ASAIO J.* 2000; 46: 435-439.

**Chargaff E**, Olson KB. Studies on the Chemistry of blood coagulation VI. Studies 001 the action of heparin and other anticoagulants. The influence of protamin on the anticoagulant effect in vivo. *JRIol. Chetn.* 1938;122:153

**Cohen JA**. Activated coagulation time method for control of heparin is reliable during cardiopulmonary bypass. *Anesthesiology* 1984; 60: 121-124

- Cohn LH.** Fifty years of open-heart surgery. *Circulation* 2003; 107: 2168–2170
- Coggin MH,** Brecher AS. The Modification of Xa-ATIII-Heparin Dynamics by Protamine Sulfate. *ISRN Cell Biology*, vol. 2012, Article ID 632867, 11 pages, 2012. doi:10.5402/2012/632867
- Dawes J,** Papper DS. Catabolism of low-dose heparin in man. *Thromb Res.* 1979; 14: 845-860.
- de Swart CA,** Nijmeyer B, Roelofs JM, Sixma JJ. Kinetics of intravenously administered heparin in normal humans. *Blood.* 1982 Dec;60(6):1251-8.
- Deutscher Herzbericht** Hrsg. Deutsche Herzstiftung 2014.
- Elsenbruch S,** Holmann G, Oezcan D, Lysson A, Janssen O, Goebel MU, Schedlowski M: Are there alterations of neuroendocrine and cellular immune responses to nutrients in women with irritable bowel syndrome? *Am J Gastroentrol* 2004; 99: 703-710
- Feulgen R** Handbuch der normalen und pathologischen Physiologie: 3 Band Verdauung und Verdauungsapparat. Springer 1927; S. 275
- Fionnuala Ni Ainle,** Roger J. S. Preston, P. Vincent Jenkins, Hendrik J. Nel, Jennifer A. Johnson, Owen P. Smith, Barry White, Padraic G. Fallon and James S. O'Donnell Protamine sulfate down-regulates thrombin generation by inhibiting factor V activation *Blood* 2009 114:1658-1665;
- Fromes Y,** Daghildjian K, Caumartin L, Fischer M, Rouquette I, Deleuze P, Bical OM. A comparison of low vs. conventional-dose heparin for minimal cardiopulmonary bypass in coronary artery bypass grafting surgery. *Anaesthesia* 2011; 66: 488-492
- Gibbon JH Jr** Application of a mechanical heart and lung apparatus to cardiac surgery. *Minnesota Med* 1954, 37: 171–185
- Gilly G,** Trusheim J. Con: The Hepcon HMS Should Not Be Used Instead of Traditional Activated Clotting Time to Dose Heparin and Protamine for Cardiac Surgery Requiring Cardiopulmonary Bypass. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 2016 Aug 26. doi: 10.1053/j.jvca.2016.08.029.
- Gesiarz Viktor.** Entwicklung einer Steuer- und Analysesoftware zur Bestimmung des Heparin Gehaltes im Blut mittels Lichtstreuungsmessung. Bachelorarbeit. Goethe Universität Frankfurt am Main, Institut für Biophysik. 2010

**Gravlee G**, Rogers AT, Dudas LM et al. Heparin management protocol for cardiopulmonary bypass: influences postoperative heparin rebound but not bleeding. *Anesthesiology* 1992; 76: 393-401

**Griffin MJ**, Rinder HM, Smith BR, u. a. The effects of heparin, protamine, and heparin/protamine reversal on platelet function under conditions of arterial shear stress. *Anesth Analg* 2001; 93: 20-27.

**Grottke O**, Fries D, Nascimento B. Perioperatively acquired disorders of coagulation. *Curr Opin Anaesthesiol* 2015; 28: 113-122

**Guzzetta NA**, Monitz HG, Fernandez JD, Fazlollah TM, Knezevic A, Miller BE. Correlations between activated clotting time values and heparin concentration measurements in young infants undergoing cardiopulmonary bypass. *Anesth Analg* 2010; 111: 173-179

**Häse Cathleen**. Entwicklung von fluoreszenz- und streulichtphotometrischen Messmethoden für die quantitative Bestimmung von Heparin in Blut. Diplomarbeit. Goethe Universität Frankfurt am Main, Institut für Biophysik. 2007.

**Hagedorn HC**, Jensen BN, Krarup NB, Wodstrup I. Landmark article Jan 18, 1936: Protamine insulinate. By H.C. Hagedorn, B.N. Jensen, N.B. Krarup, and I. Wodstrup. *JAMA* 1984; 251: 389-392

**Haselbach S**, Maurer J, Vogel V, Harder S, Weber CF, Baykut D, Meininger D, Keller H, Moritz A, Mäntele W. A novel method for the direct determination of heparin concentration during cardiopulmonary bypass surgery. *Clin Chem Lab Med* 2013; 51: 2037-2043.

**Hattersley PG**. Activated coagulation time of whole blood. *JAMA* 1966; 196: 436-440.

**Hellstern P**, Bach J, Simon M, Saggau W. Heparin monitoring during cardiopulmonary bypass surgery using the one-step point-of-care whole blood anti-factor-Xa clotting assay heptest-POC-Hi. *J Extra Corpor Technol* 2007; 39: 81-86

**HEMOCHRON® Jr. Signature+** Whole Blood Microcoagulation System

**Hirsh J**. Heparin. *N Engl J Med* 1991; 324: 1565-1574

**Hirsh J**, Anand SS, Halperin JL, Fuster V; American Heart Association. AHA Scientific Statement: Guide to anticoagulant therapy: heparin: a statement for healthcare

professionals from the American Heart Association. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21: 9-33

**Hirsh J**, Warkentin TE, Shaughnessy SG, et al. Heparin and Low-Molecular-Weight Heparin Mechanisms of Action, Pharmacokinetics, Dosing, Monitoring, Efficacy, and Safety. *Chest* 2001; 119 (Suppl): 64S -94S.

**Holloway DS**, Summaria L, Sandesara J, Vagher JP, Alexander JC, Caprini JA: Decreased platelet number and function and increased fibrinolysis contribute to postoperative bleeding in cardiopulmonary bypass patients. *ThrombHaemost* 1988; 59: 62–67

**Innerhofer P**, Streif W, Kühbacher G, Fries D. Monitoring of Perioperative Dilutional Coagulopathy Using the ROTEM Analyzer: Basic Principles and Clinical Examples]. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther*. 2004 Dec;39(12):739-44.

**Jaques LB**. Protamine — antagonist to heparin. *Can Med Assoc J*. 1973; 108: 1291-1297.

**Johnson EA**, Mulloy B. The molecular-weight range of mucosal-heparin preparations. *Carbohydr Res*. 1976 Oct;51(1):119-27.

**Jorpes E**. The chemistry of heparin. *Biochem J*. 1935 Aug;29(8):1817-30.

**Karst NA**, Linhardt RJ. Recent Chemical and Enzymatic Approaches to the Synthesis of Glycosaminoglycan Oligosaccharides. *Curr Med Chem* 2003; 10: 1993-2031

**Karlsson A**, Yi T, Bengtsson PE. Absorption and scattering of light from ensembles of randomly oriented aggregates. *J Opt Soc Am A Opt Image Sci Vis* 2013; 30: 316-324

**Kay JP**. Physiological experiments and observations on the cessation of the contractility of the heart and muscles in the asphyxia of warm-blooded animals. *The Edinburgh Medical and Surgical Journal* 1828; 29: 37–66

**Kien ND**, Quam DD, Reitan JA, White DA. Mechanism of hypotension following rapid infusion of protamine sulfate in anesthetized dogs. *J Cardiothorac Vasc Anesth*. 1992 Apr;6(2):143-7.

**Kim B**, Choi S. Smart Pipette and Microfluid Pipette Tip for Blood Plasma Separation, *Small* 2016;12: 190-197

**Koster A**, Börgermann J, Gummert J, Rudloff M, Zittermann A, Schirmer U. Protamine overdose and its impact on coagulation, bleeding, and transfusions after cardiopulmonary bypass: results of a randomized double-blind controlled pilot study. *Clin Appl Thromb Hemost* 2014; 20: 290-295

**Lacey AH**. A comparison of preparation of NPH insulin, *JPET* June 1952 vol. 105 No 2, 196-202

**Le Gallois JJC**. Experiments on the principle of life, and particularly on the principle of the motions of the heart, and on the seat of this principle: including the report made to the first class of the Institute, upon the experiments relative to the motions of the heart. (Monographie) 1813. Übersetzt von N.C. und J.G. Nancrede, M. Thomas U.S. Library of Medicine; <http://resource.nlm.nih.gov/2561017R>

**Leo Pharma**, Fachinformation Protaminsulfat LEO Pharma 1400 Heparin-Antidot I.E/mL, Okt. 2014

**Levy JH**, Sniecinski RM. Prohemostatic treatment in cardiac surgery. *Semin Thromb Hemost* 2012; 38: 237-243

**Levy JH**, **Sniecinski RM**. Activated clotting times, heparin responses, and antithrombin: have we been wrong all these years? *Anaeth Analg* 2010; 111: 833-835

**Li R**, Swaelens C, Vandermijnsbrugge F, Cantinieaux B. Applying a direct aPTT ratio (PlatelinLS/ActinFS) permits to identify rapidly and reliably a bleeding-related factor deficiency or a lupus anticoagulant sequential to an isolated prolongation of aPTT in paediatric pre-operative screening. *Eur J Haematol*. 2015 Jul 14. doi: 10.1111/ejh.12634

**Lindahl U**, Backstrom G, Hook M, Thunberg L, Fransson LA, Linker A. Structure of the antithrombin-binding site of heparin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979; 76: 3198-3202

**Lindahl U**, Thunberg L, Backstrom G, Riesenfeld J, Nordling K, Bjork I. Extension and structural variability of the antithrombin-binding sequence in heparin. *J Biol Chem* 1984; 259: 12368-12376.

**Maurer J**, Haselbach S, Klein O, Baykut D, Vogel V, Mäntele W. Analysis of the complex formation of heparin with protamine by light scattering and analytical ultracentrifugation: implications for blood coagulation management. *J Am Chem Soc* 2011; 133: 1134-1140.

- Meesters MI**, Kuiper G, Vonk AB, Loer SA, Boer C. Validation of a point-of-care prothrombin time test after cardiopulmonary bypass in cardiac surgery. *Anaesthesia* 2016; 71: 1163-1168
- Mittermayr M**, Velik-Salchner C, Stalzer B, Margreiter J, Klingler A, Streif W, Fries D, Innerhofer P. Detection of protamine and heparin after termination of cardiopulmonary bypass by thrombelastometry (ROTEM): results of a pilot study. *Anesth Analg* 2009; 108: 743-750
- Ni Ainle F**, Preston RJS, Jenkins PV et al. Protamine sulfate down-regulates thrombin generation by inhibiting factor V activation. *Blood* 2009; 114: 1658-1665
- Nybo M**, Madsen JS. Serious anaphylactic reactions due to protamine sulfate: a systematic literature review. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2008 Aug;103(2):192-6
- Olson ST**, Björk I, Sheffer R et al. Role of the antithrombin-binding pentasaccharide in heparin acceleration of antithrombin-proteinase reactions. Resolution of the antithrombin conformational change contribution to heparin rate enhancement. *Journal of Biological Chemistry* 1992; 267: 12528 -12538
- Racanelli A**, Fareed J, Walenga JM, Coyne E. Biochemical and pharmacologic studies on the protamine interactions with heparin, its fractions and fragments. *Semin Thromb Hemost* 1985; 11: 176-189
- Rick W**. *Klinische Chemie und Mikroskopie*. Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York 1977, 5. Aufl., S. 112
- Rosenberg RD**, Lam L. Correlation between structure and function of heparin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1979; 76: 1218 –1222
- Seiler C**. Aufbau einer photometrischen Lichtstreu-Apparatur. Bachelor Arbeit. Goethe Institut Frankfurt am Main, Institut für Biophysik 2010.
- Schlimp CJ**, Solomon C, Hochleitner G, Zipperle J, Redl H, Schöchl H. Thromboelastometric maximum clot firmness in platelet-free plasma is influenced by the assay used. *Anesth Analg.* 2013 Jul;117(1):23-9.
- Schmidt W**. Photodetektoren. In: *Optische Spektroskopie: Eine Einführung*. Wiley-VCH Verlag, Weinheim, 2. Aufl. 2000,

- Skubas NJ**, Despotis GJ: Optimal management of bleeding complications after cardiac surgery. *Semin Cardiothorac Vasc Anesth* 2001; 5: 217–228
- Smul TM**, Hoffman J, Roewer N, Lazarus MG. Herz- und thorakale Gefäßchirurgie – Gefäßkanülierung bei HLM-Einsatz und hämodynamisches Monitoring. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther* 2014; 49: 60-68
- Spannagl M**, Calatzis A. Point-of-Care Analysis of the Hemostatic System. *Lab Med* 2002; 26: 68–76
- Spiess BD**. Maintenance of homeostasis in coagulation during cardiopulmonary bypass. *J Cardiothor Vasc Anesth* 1999; 13 (Suppl): 2–5
- Teoh KH**, Young E, Blackall MH et al. Can extra protamine eliminate heparin rebound following cardiopulmonary bypass surgery, *J Thorac Cardiovasc Surg* 2004; 128: 211-219.
- Vercaemst L**. Hemolysis in Cardiac Surgery Patients Undergoing Cardiopulmonary Bypass: A Review in Search of a Treatment Algorithm. *JECT* 2008; 40: 257-267
- Weber CF**, Görlinger K, Meininger D et al. Point-of-Care Testing. A Prospective, Randomized Clinical Trial of Efficacy in Coagulopathic Cardiac Surgery Patients. *Anesthesiology* 2012; 117: 531–547
- Weerasinghe A**, Taylor KM. The platelet in cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg* 1998; 66: 2145–2152
- Willems A**, Savan V, Faraoni D, De Ville A, Rozen L, Demulder A, Van der Linden P. Heparin reversal after cardiopulmonary bypass: are point-of-care coagulation tests interchangeable? *J Cardiothorac Vasc Anesth* 2016; 30: 1184-1189
- Wolberg AS**, Campbell RA. Thrombin generation, fibrin clot formation and hemostasis. *Transfus Apher Sci.* 2008 Feb;38(1):15-23.
- Yang VC**, Port FK, Kim JS, Teng CL, Till GO, Wakefield TW. The use of immobilized protamine in removing heparin and preventing protamine-induced complications during extracorporeal blood circulation. *Anesthesiology* 1991; 75: 288-297
- Young E**, Prins M, Levine MN, Hirsh J. Heparin binding to plasma proteins, an important mechanism for heparin resistance. *Thromb Haemost* 1992; 67: 639-643.

## **9. Anhang**

### **9.1 Patienteninformation**

## **Patienteninformation**

# **Validierung einer neuen Messmethode zur direkten Bestimmung des Heparinspiegels im Blut.**

## **Sehr geehrte Patientin, sehr geehrter Patient!**

### **Einleitung**

Während der Ihnen bevorstehenden Operation am Herzen werden Sie an eine Herz-Lungen-Maschine angeschlossen sein, die die Aufgabe Ihres Herzens und Ihrer Lunge in einem bestimmten Zeitabschnitt während der Operationszeit übernimmt. Für den Betrieb der Herz-Lungen-Maschine ist eine Hemmung der Blutgerinnung erforderlich. Zu diesem Zweck wird ein Medikament mit dem Namen „Heparin“ verwendet. Die Veränderungen der Aktivität Ihres Gerinnungssystems durch das Heparin werden während der Operation alle 30 Minuten kontrolliert.

Das aktuelle Messverfahren der Heparin-Wirkung beruht auf einer indirekten Messmethode, die die Blutgerinnung misst. In dieser Studie soll ein neues Messverfahren getestet werden, welches die direkte Heparin-Konzentration in Ihrem Blut erfasst.

### **Ziel der Studie**

Durch die Erhebung der Messdaten der Blutgerinnungsuntersuchungen sollen die herkömmlichen Messmethoden ACT (activated clotting time) und Hepcon® mit einer neuen Messmethode verglichen werden.

Durch den Vergleich der Messdaten sollen Informationen zur Prüfung und Verbesserung der neuen Messmethode gesammelt werden. Durch das neue Messverfahren sollen in Zukunft Risiken der Operation, wie Blutungen und Thrombosen weiter minimiert werden.

### **Ablauf**

Während der Operation werden routinemäßig (etwa alle 30 Minuten) Blutproben aus Ihrem zentralen Venenkatheter entnommen, um mit den herkömmlichen Messverfahren die Aktivität Ihres Gerinnungssystems zu bestimmen. Gleichzeitig werden pro Messung zusätzlich ca. 3 ml Blut als Probe für das neue Messverfahren verwendet. Außerhalb des Operationsfeldes wird Ihr Blut so aufbereitet, dass es für die neue Messmethode geeignet ist. Die ermittelten Daten aus der herkömmlichen und aus der neuen Messmethode werden so gespeichert, dass Sie anonym bleiben.

### **Nebenwirkungen / Risiken**

Für die Blutentnahme werden schon vorhandene Venenzugänge verwendet, die in der Operation bereits angelegt sind.

Es entstehen Ihnen keine Risiken und Nebenwirkungen, die mit der Blutentnahme für die Studie verbunden sind. Die zusätzlich entnommene Menge von weniger als 3 ml Blut pro Probe - maximal 50 ml Blut insgesamt pro Operation - wird keine Auswirkung auf Ihren Kreislauf haben und muss auch nicht durch Fremdblut ersetzt werden.

In dieser Studie handelt es sich lediglich um die Erfassung von Daten. Aufgrund der Messergebnisse werden keine therapeutischen Entscheidungen getroffen, so dass keine zusätzlichen Risiken für Sie entstehen.

## 9.2 Einwilligungserklärung

### Einwilligungserklärung

Zur Teilnahme an einer Studie mit dem Thema:

**Validierung einer neuen Meßmethode zur direkten Bestimmung des Heparinspiegels im Blut.**

Name: \_\_\_\_\_ Vorname: \_\_\_\_\_

Pat. Nr.: \_\_\_\_\_ Geb.datum: \_\_\_\_\_ Größe: \_\_\_\_\_ Gewicht: \_\_\_\_\_

1.) Ich habe die von Frau/ Herr Dr. \_\_\_\_\_ durchgeführte Aufklärung über die Art und Durchführung, sowie die möglichen Risiken der Untersuchung verstanden und hatte die Möglichkeit, Fragen zu stellen. Ferner hatte ich die Gelegenheit, die Patienteninformation durchzulesen und Fragen dazu zu stellen. Die von mir gestellten Fragen wurden beantwortet. Ich konnte mir genügend Zeit nehmen, bevor ich meine Entscheidung zur Teilnahme an dieser Studie getroffen habe.

2. Die Teilnahme an dieser Studie ist freiwillig. Ich kann ohne Angabe von Gründen und ohne Nachteile meine Einwilligung zurückziehen. Eine derartige Entscheidung hat keinen Einfluss auf die weitere medizinische Behandlung.

3. Eine Kopie dieser Einwilligung habe ich von dem die Untersuchung durchführenden Arzt erhalten. Eine schriftliche Patienteninformation wurde mir ausgehändigt.

**Ich bin mit der pseudonymisierten Aufzeichnung, der im Rahmen dieser Studie an mir erhobenen Krankheitsdaten und ihrer anonymisierten Verwendung, z.B. für Veröffentlichungen, einverstanden.**

Ich erkläre mich bereit, an der Studie teilzunehmen.

Eine Kopie der Patienteninformation, Einwilligungserklärung und Datenschutzerklärung habe ich erhalten. Das Original verbleibt beim Prüfarzt.

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

(Datum/Unterschrift des Probanden)

\_\_\_\_\_

(Datum/Unterschrift des aufklärenden Arztes)

## **Danksagung**

Mein erster und sicherlich größter Dank gilt meinem Doktorvater und Chefarzt Prof. Dr. R. U. Scherer für die über den gesamten Zeitraum unentwegte Unterstützung dieses Projektes und meiner Person. Für das mir entgegengebrachte Vertrauen kann ich mich nur bedanken.

Ganz großer Dank geht natürlich auch an Prof. Mäntele, Herrn Maurer und Frau Haselbach für die zur Verfügung Stellung des LiSA Prototyps und der Unterstützung im Projektverlauf.

Ebenso möchte ich mich bei Herrn Dr. Rieger bedanken, in dessen Labor ich mir einen Platz einrichten durfte und sicherlich gelegentlich den Ablauf gestört habe. Mein Dank gilt ebenfalls allen dort tätigen Medizinisch-technischen Angestellten, die bei allen Fragestellungen immer geduldig Zeit hatten.

Mein Dank gilt selbstverständlich auch allen beteiligten Mitarbeitern im Herzzentrum Duisburg, in dessen Operationssälen diese Untersuchung stattgefunden hat.

Als letztes danke ich meiner Frau Stefanie und meinen drei Kindern, dass sie trotz der Zeit, die ich häufig nicht mit Ihnen verbringen konnte, einen großen Rückhalt für mich darstellten.

## **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.

29.11.2016

Deniz Özcan

Unterschrift