DER EINFLUSS VON LIPIDINFUSIONEN ZUR PARENTERALEN ERNÄHRUNG AUF HÄMOSTASE UND THROMBOZYTENFUNKTION

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Anja Forster, geb. Maier
aus Nürnberg

Gießen 2006

Aus dem Medizinischen Zentrum für Chirurgie, Anaesthesiologie und Urologie
Abteilung Anaesthesiologie und Operative Intensivmedizin
Leiter: Prof. Dr. med. G. Hempelmann
Des Klinikums der Justus-Liebig-Universität Gießen

Gutachter: PD Dr. G. Dietrich

Gutachter: Frau Prof. Dr. Roeb

Tag der Disputation: 06.09.2006

INHALTSVERZEICHNIS ..... SEITE

1 EINLEITUNG 1

1.1 AUFBAU UND METABOLISMUS VON LIPIDEMULSIONEN 1

1.2 NEBENWIRKUNGEN VON LIPIDEMULSIONEN 6

1.3 EINFLUSS VON LIPIDEN AUF BLUTGERINNUNG UND THROMBOZYTENFUNKTION 7

1.4 INTENSIVMEDIZINISCHE ASPEKTE DER ERNÄHRUNGSTHERAPIE 11

1.5 INDIKATIONEN FÜR DEN EINSATZ VON LIPIDEMULSIONEN 13

1.6 ZIEL DER ARBEIT 15

2 MATERIAL UND METHODEN 17

2.1 DESIGN DER KLINISCHEN STUDIE 17

2.2 DESIGN DER IN-VITRO-MESSUNGEN 24

2.3 GERÄTE UND MESSPRINZIPIEN 26

2.3.1 Vollblutaggregometrie 26

2.3.2 Optische Messung 30

2.3.3 Thrombelastographie 32

2.3.4 In-vitro-Blutungstest 36

2.3.5 Spontane Thrombozytenaggregation 39

2.3.6 Aktivierung der plasmatischen Gerinnung 45

2.3.7 Thrombozytenaktivierungsmarker 49

2.3.8 Triglyceride im Serum 52

2.3.9 Laborhilfsgeräte 52

2.3.9.1 Zentrifugen 53

2.3.9.2 Zählkammer und Mikroskop 54

2.3.10 Laborhilfsmittel 54

2.3.10.1 Hilfsmittel und Chemikalien 54

2.3.10.2 Lipidlösungen 55

2.4 ZUR AUSWERTUNG VORGESEHENE MERKMALE 57

2.5 STATISTISCHE AUSWERTUNG 59

2.5.1 Datenanalyse der Klinischen Studie 59

2.5.2 Datenanalyse der In-Vitro Untersuchung 59
2.5.3 Berechnung der Statistik 60

3 ERGEBNISSE 61

3.1 VOLLBLUTAGGREGOMETRIE 61
3.1.1 Klinische Studie 61
3.1.2 In-vitro-Untersuchung 63
3.2 OPTISCHE MESSUNG DER PLÄTTCHENAGGREGATION 66
3.2.1 Klinische Studie 66
3.2.2 In-vitro Untersuchung 68
3.3 THROMBELASTOGRAPHIE 70
3.3.1 Klinische Studie 70
3.3.2 In-vitro Untersuchung 73
3.4 IN-VITRO-BLUTUNGSTEST 75
3.4.1 Klinische Studie 75
3.4.2 In-vitro Untersuchung 77
3.5 THROMBOZYTENAGGREGATE IM VOLLBLUT 79
3.5.1 Klinische Studie 80
3.5.2 In-vitro Untersuchung 81
3.6 PLASMATISCHE GERINNUNG 83
3.6.1 Klinische Studie 83
3.6.2 In-vitro Untersuchung 87
3.7 THROMBOZYTENAKTIVIERUNGSMARKER 90
3.8 TRIGLYCERIDE IM SERUM 90
3.9 BLUTBILD 91
3.9.1 Klinische Studie 91
3.9.2 In-vitro Untersuchung 94

4 DISKUSSION 95

4.1 KLINISCHE RELEVANZ DER UNTERSUCHTEN FRAGESTELLUNG 95
4.2 ZIEL UND STUDIENDESIGN DER VORLIEGENDEN ARBEIT 96

4.3 METHODENDISKUSSION 96
4.4 WESENTLICHE ERGEBNISSE UND DISKUSSION DIESER ERGEBNISSE 102
4.5 GEGENÜBERSTELLUNG DER ERGEBNISSE ZUR LITERATUR 114
4.6 INTERPRETATION IM HINBLICK AUF DIE BEDEUTUNG FÜR DIE PATIENTEN/ ANTIKOAGULATIONSREGIME/ RISIKOPATIENTEN 117

5 ZUSAMMENFASSUNG 119

6 ANHANG 121

6.1 ERGEBNISTABELLEN 121
6.2 ABBILDUNGSVERZEICHNIS 128
6.3 TABELLENVERZEICHNIS 130
6.4 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS 131

7 LITERATURVERZEICHNIS 133

1 Einleitung

Lipidinfusionen werden im Rahmen der parenteralen Ernährung eingesetzt. Sie dienen als Energieträger zur Kaloriensubstitution und als Quelle essentieller Fettsäuren. Außerdem erfüllen Lipidinfusionen wichtige Funktionen als Membranbausteine und als Modulatoren biochemischer Prozesse. Besonders wichtig sind sie auch für die funktionelle Entwicklung des zentralen Nervensystems, was beim Einsatz bei Kindern und Säuglingen von Bedeutung ist. Einige langkettige mehrfach ungesättigte Fettsäuren dienen als Vorläufer für bioaktive Lipidmediatoren, einschließlich Prostaglandine, Thromboxane und Leukotriene. Diese Lipidmediatoren sind wichtige Regulatoren zahlreicher Zellfunktionen wie Thrombozytenaggregation, Entzündungsreaktionen und Immunfunktionen[1]. Lipide zur parenteralen Ernährung werden hauptsächlich aus Sojabohnenöl gewonnen und unter Verwendung von Ei- oder Sojaphosphatidemulgatoren als Emulsion appliziert. Im Handel befinden sich in Deutschland verschiedene Fettemulsionen, die sich bezüglich der Herstellungsmethoden und Zusammensetzung je nach Hersteller hinsichtlich der Fettkonzentration, der Kettenlänge der Triglyceride, der Zusammensetzung des Emulgators und der zur Herstellung der Blutisotonie zugesetzten Elektrolyte unterscheiden.

1.1 Aufbau und Metabolismus von Lipidemulsionen

Lipidlösungen zur parenteralen Ernährung sind in ihrem Aufbau alle ähnlich strukturiert. Sie bestehen zum großen Teil aus Triglyceriden in Form von Sojabohnenöl und Phospholipiden, welche als Emulgatoren dienen und zusammen mit Glycerol zur Stabilisierung der Emulsionen notwendig sind. Natriumoleat bzw. Natriumhydroxid sind zusätzlich in geringen Anteilen enthalten. Tabelle 6 zeigt die physikalischen und chemischen Eigenschaften der gängigsten und für unsere Studien eingesetzten Lipidemulsionen auf. Sie sind so zusammengesetzt, dass sie den endogenen Chylomikronen im Aufbau und Metabolismus möglichst ähnlich sind[2].
Die Transportform exogener Fette sind sogenannte Liposomen, die aus einem Triglyceridkern und einer Phospholipidhülle bestehen. Im Gegensatz zu den endogenen Chylomikronen besitzen sie jedoch Apoproteine in der Hülle und kein Cholesterin in der Matrix. Der Phospholipidgehalt ist bei den im Handel befindlichen Emulsionen sehr unterschiedlich und liegt gene-

rell höher als der Phospholipidgehalt der Chylomikronen. Zusätzlich kann die Zusammensetzung der Phospholipide in den verschiedenen Emulsionen sehr variieren und sich ebenfalls von dem der Chylomikronen unterscheiden. Die Triglyceridkomponente der Fettemulsionen differiert hinsichtlich der endogenen Zusammensetzung, so enthalten Fettemulsionen z.B. mehr essentielle Fettsäuren.

Es gibt zwei Arten von Fettpartikeln in Fettemulsionen, die man mittels Ultrazentrifugation trennen kann (siehe Abbildung 1)[3]:

- Große triglyceridreiche Partikel mit einer Größe von ca. 250-500 nm, in denen praktisch die gesamten Triglyceride enthalten sind. Diese Triglyceride sind umgeben von einer monomolekularen Schicht aus Phospholipiden. In die Phospholipidschicht sind einige wenige freie Cholesterol- und Phytosterolmoleküle eingebaut. Die Fettsäuren und Sterolseitenketten sind nach innen zum apolaren lipophilen Kern des Partikels gerichtet, während der polare hydrophile Teil der Phospholipide nach außen zur wässrigen Umgebung hin orientiert ist. Diese Partikel, die sogenannten künstlichen Chylomikronen, werden als Gegenstück zu den endogenen Chylomikronen angesehen und praktisch genauso wie diese metabolisiert[4].
- Kleinere phosphoplipidreiche Partikel, Liposomen genannt, mit einer Größe von 80-100 nm, welche den restlichen Teil der Phospholipide, sowie einen sehr geringen Anteil an Triglyceriden und anderen Lipiden enthalten. Diese Partikel stellen eine Art Stabilisator dar, welcher einen wichtigen Beitrag zur Stabilität der Emulsion leistet. Je höher der Fettgehalt der Emulsionen, desto geringer wird die Menge an diesen phospholipidreichen Partikeln.

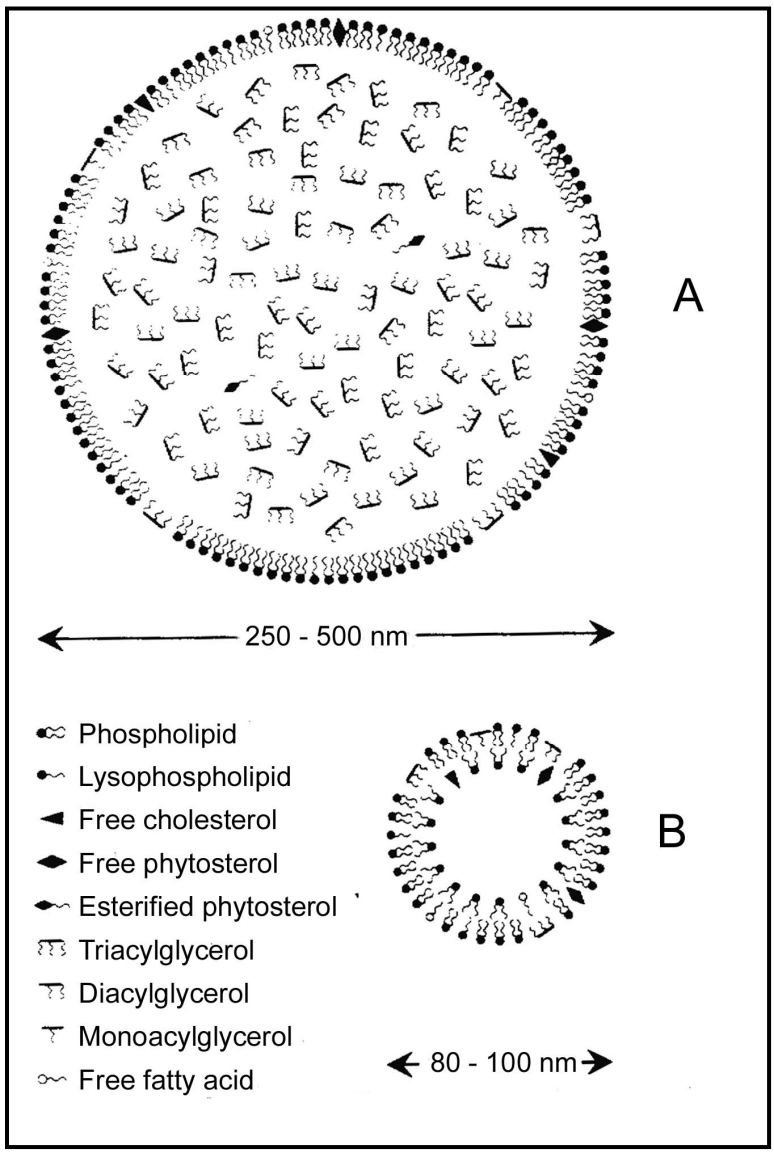

Abbildung 1 Schematische Darstellung der zwei Fettpartikelarten in Fettemulsionen[3]
A: Triglyceridreiches Partikel (= künstliche Chylomikronen)
B: Phospholipidreiches Partikel (= Liposom)

Bei fast allen handelsüblichen Lipidemulsionen gibt es mindestens zwei verschiedene Konzentrationen, 10 % und 20 %. Bei beiden Konzentrationen ist der Absolutgehalt an Phospholipiden gleich, d.h. die Phospholipid-Triglycerid-Ratio (abgekürzt PL-TG-Ratio) beträgt bei der 10 %igen Emulsion 0,12 und bei der 20 %igen Emulsion 0,06. Eine höhere Konzentration an Phospholipiden kann sowohl die physiochemischen als auch die metabolischen Eigenschaften der Emulsion beeinflussen. So wurde gezeigt, dass die mittlere Partikelgröße umso niedri-

ger ist, je höher die PL-TG-Ratio der Emulsion ist[5]. Größere Partikel können jedoch leichter hydrolisiert werden, so dass z.B. die Plasmaclearance von Triglyceriden bei Emulsionen mit höheren Mengen an kleinen Partikeln wesentlich länger dauert[6]. Phospholipidreiche Partikel interagieren außerdem mit dem Metabolismus endogener Lipoproteine[7], besonders bei Kindern[8]. Eine neuere Studie von Chanson et al[9] zeigt, dass sich die physikalischen Eigenschaften der zwei Partikel in den Lipidemulsionen ändern, wenn sie mit Lipoproteinen inkubiert werden. Auch verursacht die Triglyceridzusammensetzung in den Lipidemulsionen physikalische Veränderungen bei den Partikeln, jedoch ohne LDL und HDL zu beeinflussen.

30 %ige Fettemulsionen in der parenteralen Ernährung von Intensivpatienten sind in einer Studie mit guten Ergebnissen getestet worden[10].

Die qualitative Zusammensetzung von Fettemulsionen beeinflusst hauptsächlich die pharmakodynamischen Effekte, während für das pharmakokinetische Verhalten das Triglycerid-Emulgator-Verhältnis, die Konzentration und die Partikelgröße eine wesentliche Rolle spielen. Die Halbwertszeit der Fettemulsionen im Plasma beträgt zwischen 8 und 20 Minuten[11]. Sie ist abhängig von verschiedenen Faktoren wie der Infusionsrate, der aktuellen Stoffwechselrate und den individuellen Unterschieden der Patienten. Der Aufbau der enthaltenen Triglyceride beeinflusst die Plasmaclearance. So werden Emulsionen mit 50 %igem Anteil an mittelkettigen Triglyceriden (MCT) schneller abgebaut als solche mit ausschließlich langkettigen Triglyceriden (LCT)[12]. Mittelkettige Triglyceride haben in den letzten Jahren in zahlreichen Studien einige Vorzüge gegenüber langkettigen Triglyceriden gezeigt. Sie werden meist als 1:1-Gemisch mit langkettigen Triglyceriden angeboten, können schneller verstoffwechselt werden, und bieten andere metabolische Eigenschaften[2, 13, 14]. Sie sind effizientere Energielieferanten, belasten weniger den hepatischen Metabolismus und haben weniger Einfluss auf das Immunsystem und die RES-Funktion[15]. Besonders bei Sepsis und "systemic inflammatory response syndrome" sind sie geeignet wegen ihres geringeren Anteils an n-6 Fettsäuren, welche möglicherweise Präkursoren von immunsuppressiven Prostaglandinen sind. Septische Patienten, welche zusätzlich zu LCT`s auch MCT`s erhalten, erreichen schneller ihren normalen Ernährungszustand wieder[16]. In einer neueren Studie wurde gezeigt, dass MCT/LCT-Gemische in Phospholipiden einen dem natürlichen Fettsäureprofil ähnlicheren Zustand produzieren als die alleinige Gabe von LCT-Emulsionen[17].

Der Phospholipidgehalt beeinflusst die Triglyceridclearance ebenfalls. Besonders bei Emulsionen mit hohem Anteil an Phospholipiden (10%ige Lösungen) sind die Plasmalevel an Triglyceriden erhöht[18].

Die überschüssigen Phospholipide haben eine hohe Affinität zu endogenem freiem Cholesterin, woraus neue Lipoproteine entstehen, welche Lipoprotein X (LpX) genannt werden. Diese Lipoproteine verbleiben eine gewisse Zeit im Plasma und können dort nachgewiesen werden. Da sie Apolipoproteine binden können treten sie auch in Konkurrenz mit endogenen Lipoproteinen. Die Konkurrenz von LpX mit den nativen Lipoproteinen um die periphere Cholesterinaufnahme über Apo-B bzw. E-Rezeptoren beeinträchtigt die Cholesterinhomöostase und ist letztendlich auch für die verzögerte Triglyceridclearance der 10 %igen Fettemulsion verantwortlich. Der genaue Abbau dieser Lipoproteine ist noch unbekannt. Es ist jedoch wichtig mit den Lipidemulsionen so wenig Phospholipide wie möglich zu infundieren, um die beschriebenen Probleme bei der Metabolisierung der exogenen Phospholipide zu vermeiden[19].

Die gängigen Lipidemulsionen enthalten meistens Sojabohnenöl, welches aus unterschiedlichen Anteilen verschiedener Fettsäuren besteht. Linolsäure und α-Linolensäure machen ca. 60 % des Anteils an essentiellen Fettsäuren aus. Die genaue Fettsäurenzusammensetzung ist Abbildung 2 zu entnehmen.

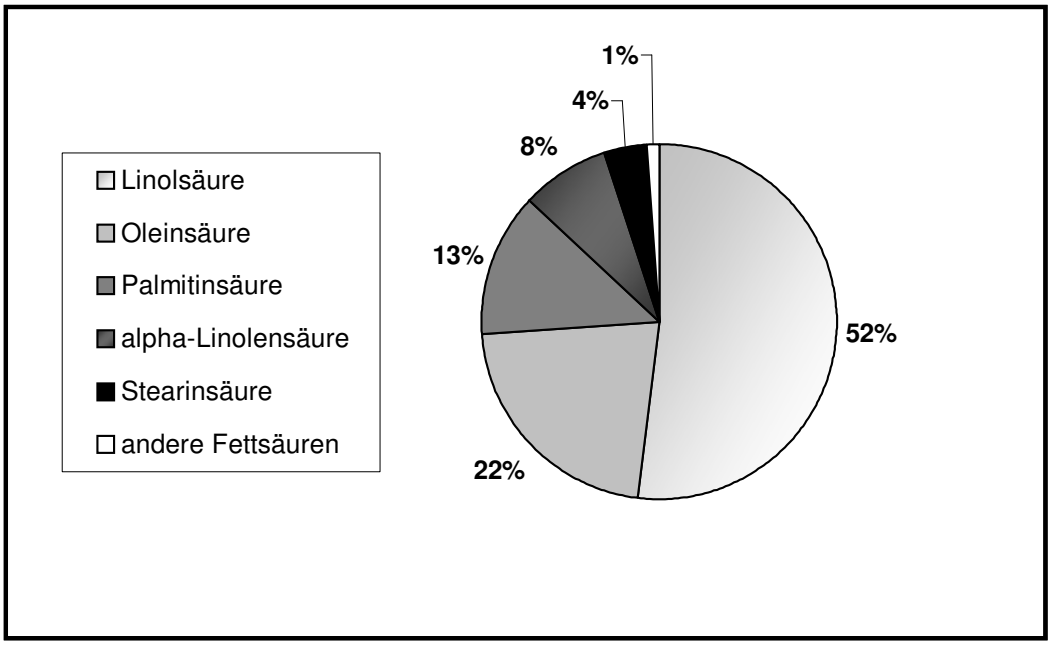

Abbildung 2 Fettsäurenzusammensetzung der Triglyceride im Sojabohnenöl

Es ist offensichtlich, dass Fettemulsionen den Lipidstoffwechsel beeinflussen, was besonders bei Langzeiternährung berücksichtigt werden muss. Hyperlipidämien in Verbindung mit Hyperaggregabilität stellen einen erheblichen Risikofaktor für Atherosklerose und Myokardinfarkt beim Menschen dar[20]. Deshalb ist es von großer Bedeutung, genauere Erkenntnisse über die Wirkungen und Nebenwirkungen von Lipidinfusionen, insbesondere im Hinblick auf Hämostase und Thrombozytenfunktion, zu gewinnen.

1.2 Nebenwirkungen von Lipidemulsionen

Zunächst sind hier die sog. Frühreaktionen zu erwähnen, welche von allen Herstellern dieser Lipidemulsionen angegeben werden. Diese können bereits kurze Zeit nach Applikation der Lipidemulsion auftreten. Sie sind in der Regel von kurzer Dauer und lassen sich meist durch Absetzen der Fettinfusion verbessern. Zu den Frühreaktionen gehören Schüttelfrost, Kopfschmerzen, Übelkeit, Anstieg der Körpertemperatur, Kältegefühl, Hitzegefühl, Zyanose, Atemnot, Rücken-, Knochen-, Brust-, oder Lendenschmerzen, Priapismus, allergische Reaktionen[21], Thrombozytopenie, verstärkte Blutgerinnungsneigung, beschleunigte Atmung, Blutdruckveränderungen, Retikulozytose sowie Reizung an der Eintrittsstelle peripherer Venenkatheter.

Die für diese Arbeit interessanteren Wirkungen bzw. Nebenwirkungen lassen sich dagegen eher auf die längerfristigen Effekte der Lipidemulsionen zurückführen, d.h. sie treten erst bei länger andauernder parenteraler Ernährung auf. In diesem Zusammenhang wurden Hyperlipidämien, Funktionsstörungen des retikuloendothelialen Systems (RES[22]), Fettembolien[23, 24] Cholestasen[25, 26, 27, 28] Thrombosen[29] und das sog. "Fat overloading syndrome" beschrieben. Letzteres kann mit verschiedenen Symptomen wie Lebervergrößerung (mit und ohne Ikterus), pathologischer Leberfunktion, Milzvergrößerung, Anämie, Leukozytopenie, Thrombozytopenie, Blutungsneigung, Blutungen, Veränderung oder Verminderung der Blutgerinnungsfaktoren und folglich Verlängerung der Gerinnungszeiten (Blutungszeit, Gerinnungszeit, Prothrombinzeit, u.a.) einhergehen.

1.3 Einfluss von Lipiden auf Blutgerinnung und Thrombozytenfunktion

Bislang ist wenig bekannt über die Wirkung von Lipiden auf die Blutgerinnung, insbesondere auf die Thrombozytenfunktion. Es gibt einige Arbeiten, welche weiter unten beschrieben werden, die Teilaspekte der Lipidwirkung auf einzelne Gerinnungsparameter untersuchen. Dabei bleiben jedoch viele Aspekte unbeachtet, und die Ergebnisse sind z.T. sehr unterschiedlich. Trotzdem sollen die wesentlichen Resultate dieser Arbeiten im Folgenden kurz zusammengefasst werden.

Von Phospholipiden, die als Lösungsvermittler (Emulgatoren) eingesetzt werden, ist bekannt, dass sie als spezielle Thromboplastine an einer Aktivierung der Gerinnung mitwirken können[30]. Tavlor et al fanden an verschiedenen Modellen mit Versuchstieren heraus, dass Phospholipidvesikel einen lokalen thrombotischen Prozess so verstärken können, dass sich eine disseminierte intravasale Gerinnung oder eine tiefe Beinvenenthrombose bilden kann. Insbesondere dann, wenn zusätzlich Entzündungsmediatoren oder Tumornekrosefaktoren mitwirken[31]. Bis 1990 waren Präparate dieser Substanzgruppe zur intravenösen Anwendung im Handel (Fibraccel®, Clauden®), die bei Thrombozytopenien oder Thrombozytopathien die Hämostase verbessern sollten. Heute werden sie nur noch als lokales Hämostyptikum eingesetzt. Eine Thrombozytenaktivierung durch Phospholipide wurde von Loughrey[32] auch schon bei Ratten festgestellt.

Bei postoperativen Patienten zeigte sich, dass Lipidemulsionen mit einer höheren PL-TG-Ratio (PL-TG-Ratio von 0,12 gegenüber 0,06) zu einem signifikanten Anstieg der Phospholipide und des freien Cholesterins im Plasma führen[33]. Carpentier[34] hat in einer seiner Arbeiten die Erythrozytenmembran als mögliche Quelle dieses Cholesterinanstiegs identifiziert, da exogene Phospholipide freies Cholesterin aus Zellmembranen aufnehmen können[35]. Goulet et al[36] konnten bei intravenöser Applikation von Lipidemulsionen eine Verminderung der Plättchenüberlebenszeiten bei Kindern nachweisen. Diese Tatsache lässt vermuten, dass die parenterale Gabe von Fettemulsionen zu einer Aktivierung der thrombozytären Hämostase führt. Altomare[37] führte die erhöhte Thromboserate unter parenteraler Ernährung auf eine Reduktion des Plasmaspiegels von tissue plasminogen activator (TPA), bedingt durch die Lipidinfusionen, zurück. Campbell[38] berichtete über einen Fall eines "Fat Overloading Syndrome" mit schwerer Thrombozytopathie. Eine Studie bei Kindern mit parenteraler Langzeiternährung[39] -

es wurden unter anderem verschiedene Gerinnungsparameter getestet - zeigte einen Anstieg von Prothrombinzeit (TZ) und partieller Thromboplastinzeit (PTT). Mit Erhöhung der Lipiddosis kam es zu einer Normalisierung dieser beiden Parameter. Bei akut kranken Kindern zeigte sich eine verminderte Fetttoleranz mit erhöhten Triglyceridwerten, TZ- und PTT-Werten. Die Autoren empfahlen, bei akut erkrankten Patienten die Lipiddosis zu reduzieren und besonders die genannten Laborwerte streng zu überwachen, um ein Fat Overloading Syndrome zu vermeiden.

Mit den üblichen plasmatischen Gerinnungsuntersuchungen, einschließlich Blutungszeit und Messung der induzierten Aggregation, konnten Way et al[40] hingegen bei einer kleinen Patientenzahl keine Veränderungen nachweisen. Auch Porta et al[41] fanden bei Intensivpatienten, die im Rahmen der parenteralen Ernährung Lipidinfusionen erhielten, keine Veränderung der Plättchenaggregation, obwohl die Aktivierungsmarker β-TG und PF-4 erhöht waren. Diese sind in der α-Granula von Thrombozyten gespeichert, und werden durch Plättchenaktivierung freigesetzt. Wakefield et al[42, 43] untersuchten die Effekte von einzelnen Komponenten der parenteralen Ernährung auf die Induktion und Modulation der prokoagulatorischen Aktivität von menschlichen Monozyten. Diese Aktivität gibt als Cofaktor Anstoß zur extrinsischen Gerinnungskaskade. Sie stellten eine Abnahme der Freisetzung dieser Aktivität durch Lipidemulsionen fest, welche durch die Triglyceridfraktion, nicht jedoch durch die Phospholipidfraktion der Emulsionen verursacht wurde. Ebenso zeigte ihre zweite Arbeit eine Abnahme dieser prokoagulatorischen Aktivität in kultivierten Endothelzellen vom Schwein.

In zwei Arbeiten wurde belegt, dass bei Patienten mit familiärer Hypercholesterinämie ein erhöhter Cholesterinspiegel im Blut zu einer Plättchenhyperaktivität führen kann[44, 45]. Andere Autoren vermuteten aber, dass eher die durch Hypercholesterinämie bedingte Arteriosklerose, und nicht der erhöhte Cholesteringehalt per se, die Ursache der erhöhten Plättchenaktivität ist[46]. Sinzinger et al[47] versuchten bei Patienten mit Hypercholesterinämie und koronarer Herzkrankheit (KHK) den Cholesterinspiegel mittels LDL-Apherese zu senken und beobachteten dabei die Plättchenaggregation. Sie fanden heraus, dass es nach längerer Behandlung durch LDL-Apherese in vivo zu einer Verminderung der Plättchenaggregation und zu einer Verlängerung der Plättchenüberlebenszeit kam. Damit wurde aber nicht belegt, dass die beschriebenen Veränderungen, auf die durch die LDL-Apherese bedingte Änderung der Blutlipidzu-

sammensetzung zurückzuführen sind. Die vorgelegten Daten, so die Schlussfolgerung des Autors, könnten nicht die Frage beantworten, ob ein erhöhter Blutfettspiegel alleine für das hämostatische Ungleichgewicht verantwortlich sei, oder ob arteriosklerotische Läsionen nicht ebenso eine Rolle spielten.

Eine Arbeit von Bröijersen[48] konnte im Unterschied dazu keine Veränderungen der Plättchenaggregation nach LDL-Apherese-Therapie belegen. Auch die PF4- und β-Thromboglobulinspiegel zeigten hier keinen Anstieg.

In spezifischeren Untersuchungen, die direkt den Einfluss von Lipidinfusionen auf die Hämostaseeigenschaften des Blutes prüften, fanden Jarnvig et al[49] bei vier Freiwilligen nach einer Infusion von 250 ml 10%iger Intralipidinfusion® keine signifikante Veränderung der Plättchenfunktion. Sie wiesen jedoch eine Ausschüttung von β-TG, PF-4 und Serotonin (5-HT) nach, was zeigt, dass die Plättchen ihre Speichergranula entleert hatten. Inwieweit diese Freisetzungsprodukte die Hämostase beeinflussen können, ist noch unklar. Die Autoren vermuten, dass sie eventuell einen lokalen Einfluss auf die Blutgerinnung ausüben könnten, und PF-4 eventuell Heparin neutralisiert.

In einer späteren Arbeit von Wang et al[50] vermutete man, dass der fehlende Einfluss auf die Plättchenaggregation auf ein zu geringes Volumen der Lipidinfusion zurückzuführen sei. So testete diese Arbeitsgruppe zehn gesunde Personen nach vierstündiger intravenöser Gabe von Lipovenös® 10 %, welches, abgesehen von einem Cholesteringehalt von 0,1g/l gegenüber 0,05g/l in Intralipid®, hinsichtlich der Lipidzusammensetzung weitgehend identisch mit Intralipid® ist. Untersucht wurden der Lipidgehalt der Plasmalipoproteine und der Blutzellen, sowie der Effekt auf die Plättchenaggregation. Die Untersuchungen ergaben eine signifikant verminderte Thrombozytenaggregation post infusionem, sowie eine Erhöhung der Konzentration von Triglyceriden, Phospholipiden und Cholesterin im Plasma.

Hinweise auf eine Verminderung der Plättchenaggregation nach Lipidinfusionen lieferten bereits Voruntersuchungen von Aviram[51] und Hayek[52].

Dies lässt vermuten, dass Kurzinfusionen von Lipidemulsionen einen hemmenden Effekt auf Hämostaseeigenschaften des Blutes ausüben. Die in-vivo-Untersuchungen von Wang, Aviram und Hayek wurden durch eine Arbeit von Li Zouh et al[53] aus dem Jahre 1996 bestätigt, in der

gezeigt wurde, dass Intralipid® in vitro bei Rattenblutplättchen eine dosisabhängige Hemmung der Aggregation bewirkt.

Zusammenfassend belegen die bislang widersprüchlichen Forschungsergebnisse, dass es sehr schwierig ist eine klare Aussage über die Wirkung der parenteralen Ernährung auf die Hämostaseeigenschaften des Blutes zu treffen. Oft wurden nur sehr kurzfristige Effekte getestet, eine umfassende Untersuchung der Hämostase einschließlich der Thrombozytenfunktion wurde bislang noch nicht vorgelegt. Zumeist wurden nur einzelne Gerinnungsparameter betrachtet. Die widersprüchlichen Forschungsergebnisse hängen vermutlich zu einem großen Teil auch damit zusammen, dass die Untersuchungsmethoden, die Größe und Art der Studienpopulation, die Infusionsbedingungen sowie zahlreiche andere Faktoren sehr heterogen waren.

Bei den hier vorgelegten Untersuchungen, die zwei Studienteile umfassen, wurden identische Laboruntersuchungen verwendet - eine wesentliche Voraussetzung für eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse.

Es wurde auch darauf geachtet, dass nicht nur ein Teil der Hämostase getestet wurde, sondern dass sowohl die plasmatische Gerinnung als auch die Thrombozytenfunktion so umfassend wie möglich untersucht wurden. Dabei wurde insbesondere der Lipideinfluss auf das Verhalten der Thrombozyten beobachtet.

Besonders wichtig war es dabei, den tatsächlichen Ist-Zustand der Thrombozyten zu evaluieren, denn das Funktionspotenzial beziehungsweise die Gerinnungsfähigkeit der Thrombozyten hängt davon ab, in welchem Aktivierungszustand sie sich gerade befinden. Demnach gibt es sozusagen "schlechte" Thrombozyten, die bereits aktiviert sind, und bei normal Gesunden Thrombozyten mit niedrigem Aktivitätszustand, die bestes Funktionspotenzial aufweisen.

Es gibt verschiedene Testverfahren, mit denen die Thrombozytenaktivierung gemessen werden kann. So hat die in dieser Arbeit angewendete Impedanzaggregometrie[54] eine hohe Sensitivität gegenüber Plättchendysfunktionen und ist ein empfindliches Verfahren zur Messung der Spontanaggregation. Als neueres Testverfahren kam der In-vitro-Blutungstest, der inzwischen halbautomatisch durchgeführt wird (Platelet Function Analyzer, PFA-100, Dade-Behring) in der hier vorliegenden Arbeit erstmals zur Anwendung. Daneben wurde die Thrombozytenfunktion mit weiteren zusätzlichen Analyseverfahren untersucht. Diese werden im Methodikteil ausführlich beschrieben.

1.4 Intensivmedizinische Aspekte der Ernährungstherapie

Intensivpflichtige Patienten sind verschiedenen Problemen und Risiken ausgesetzt. Zu den wichtigsten gehört die Sepsis und das systemische Inflammationssyndrom (systemic inflammatory response syndrome, SIRS).

Sepsis ist definiert als eine akute inflammatorische Wirtsantwort infektiöser Ätiologie, die dadurch charakterisiert ist, dass es dem Wirt nicht gelingt, die Entzündungsantwort mit ihren destruktiven Teilkomponenten lokal zu begrenzen.

Dabei sollen zumindest zwei der folgenden Definitionskriterien erfüllt sein:

Fieber über 38° Celsius, Hypothermie unter 36° Celsius, Leukozytose über 12 000/µl; Leukopenie unter 4000/µl, 10 % unreife neutrophile Granulozyten im Differentialblutbild, Tachykardie (über 90/min), Tachypnoe (über 20 Atemzüge/min), oder CO_2-Partialdruck unter 4,3 kPa.

Als systemisches Inflammationssyndrom (systemic inflammatory response syndrome, SIRS) wird die gleiche Wirtsreaktion bei nichtinfektiöser Ätiologie definiert. Diese kann sich auch im Rahmen von Grundkrankheiten entwickeln, so auch bei Polytraumen mit ausgedehnten Gewebsnekrosen, Autoimmunerkrankungen, oder hämorrhagisch-nekrotisierender Pankreatitis.

Auswirkungen der inflammatorischen Wirtsantwort auf das kardiozirkulatorische System sind verschiedenartig. Unter anderem kommt es zu einer Störung der Mikrozirkulation durch Reduktion der auf die Endothelzellen antikoagulatorisch wirkenden Oberflächenmoleküle. Es kommt zu einer vermehrten Expression von Gewebefaktor, wodurch die Endothelzellen in der Sepsis zu einer prokoagulatorisch wirkenden Oberfläche werden, die die Entstehung einer Verbrauchskoagulopathie fördert[55].

Eine Ernährungsbehandlung bei Patienten basiert hauptsächlich darauf, dass eine Mangel-oder Fehlernährung eng mit einer erhöhten Morbidität und Mortalität verbunden ist.

Bei schwerkranken Patienten kommt es aufgrund der neuroendokrinen und metabolischen Reaktion auf Trauma und Sepsis innerhalb weniger Tage zu metabolischen Mangelzuständen.

Ziel der Ernährungstherapie ist es, den Ernährungszustand aufrechtzuerhalten oder zumindest eine Verschlechterung zu verzögern. Eine Ernährungstherapie wird bei Intensivpatienten häu-

fig sowohl enteral als auch parenteral durchgeführt. Dabei sollte der enteralen Zufuhr der Vorzug gegeben werden, wenn dies die Verdauungsfunktion des Patienten zulässt, da dies viele Vorteile beinhaltet.

So sind Dünn- und Dickdarm in ihrer Funktionstüchtigkeit auf das Vorhandensein intraluminaler Nährstoffe angewiesen, da diese den wichtigsten physiologischen Stimulus für die Integrität und Funktion der Darmschleimhaut bilden. Nahrungskarenz führt zu einer Mukosaatrophie, da der physiologische Stimulus zur Ausschüttung von Enzymen und Hormonen sowie die physiologische Ernährung der Mukosa über das Lumen entfallen. Zudem sind die Nutzung der enteralen Resorptionschranke und Leberpassage, die Abpufferung der Magensäure und die einfache Handhabung ebenfalls von Vorteil.

Die wichtigste Indikation für die parenterale Ernährung ist ein gestörter Funktionszustand des Gastrointestinaltraktes, hierbei kann diese Ernährungsform lebensrettend sein[56]. Insbesondere ist bei folgenden Indikationen die vollständige parenterale Ernährung nötig: Vollständige Darmobstruktion, akute gastrointestinale Blutung, Ileus, intestinale Fisteln, schwere Diarrhoe, schwere akute Pankreatitis, Initialphase bei Kurzdarmsyndrom, ausgeprägte hämodynamische Instabilität.

Es gibt jedoch auch zahlreich Nachteile, die eine strenge Indikationsstellung zur TPN fordern. So entsteht durch die parenterale Ernährung leichter eine Dysfunktion der intestinalen Barriere. Diese Barriere ist zum Schutz gegen Mikroorganismen und Toxine zuständig. Eine Studie aus China[57] zeigt den Vergleich zwischen enteraler und parenteraler Ernährung in Bezug auf die Barrierenfunktion des Darms. Es wurde die intestinale Permeabilität von 40 Patienten gemessen. Hierbei wurden die Patienten nach chirurgischem Trauma in zwei Gruppen aufgeteilt. Eine Gruppe wurde parenteral, die andere Gruppe enteral ernährt. Es wurde ein nichtinvasiver Lactulose/Mannitol-Tests eingesetzt, welcher die Integrität der Mucosa des Magen-Darm-Trakts widerspiegelt. Bei beiden Ernährungsformen zeigte sich postoperativ ein Verlust der Mucosaintegrität, bei den Patienten mit enteraler Ernährung kehrte jedoch schneller wieder der Normalzustand zurück.

Eine multizentrische klinische Studie[58] an über 300 Patienten, welche postoperativ enterale und parenterale Ernährung bei Patienten mit gastrointestinalen Tumoren verglich, demonst-

rierte, dass die frühe enterale Ernährung signifikant die Komplikationsrate und den postoperativen Aufenthalt senkt. TPN wurde jedoch bei den Patienten insgesamt besser toleriert als EN. Kurz darauf wurde von Pacelli et al[59] jedoch eine prospektive randomisierte Studie mit 241 Patienten veröffentlicht, die bei postoperativen Patienten die beiden Ernährungsformen hinsichtlich verschiedener Komplikationen und Mortalität verglich. Er konnte kein erhöhtes Risiko für postoperative Komplikationen bei TPN vorweisen.
Griffiths postulierte 2005[60], dass TPN weiterhin wichtiger Bestandteil der intensivmedizinischen Behandlung sein sollte, besonders bei Intoleranz für gastrointestinale Ernährung oder bei gastrointestinaler Fehlfunktion.

1.5 Indikationen für den Einsatz von Lipidemulsionen

Lipidemulsionen sind in der parenteralen Ernährung von großer Bedeutung, insbesondere ist eine moderne Intensivmedizin ohne sie nicht mehr vorstellbar. Daher ist es sinnvoll weitere Erkenntnisse über die Wirkungen derartiger Emulsionen auf die Hämostaseeigenschaften des Blutes zu gewinnen.
Lipidemulsionen enthalten essentielle Nahrungsbestandteile, die der Intensivpatient unbedingt benötigt. Dazu gehören vor allem die Fettsäuren Linolsäure und α-Linolensäure, also Bestandteile, die der Organismus nicht selbst synthetisieren kann.
Besonders wichtig sind Fettemulsionen in der postoperativen Phase im Hinblick auf den Postaggressionsstoffwechsel. Hier würden schon nach wenigen Tagen bei lipidfreier Ernährung Defizite auftreten, die durch Mangel an essentiellen Fettsäuren entstehen (Linolsäure und α-Linolensäure)[61]. Gerade bei polytraumatisierten Patienten fällt der Linolsäurespiegel im Blut sehr schnell ab und sinkt weiter, da eine reine Kohlenhydrat-Aminosäurelösung die Lipolyse hemmt. Der Tagesbedarf an Linol- und α -Linolensäure beim gesunden Menschen beträgt etwa 10 bzw. 1,2 Gramm pro Tag. Im Postaggressionsstoffwechsel kann der Linolsäurebedarf jedoch bis auf 50 Gramm pro Tag ansteigen. Im Hinblick auf die posttraumatische Immundysregulation nach chirurgischen Eingriffen testete man in einer neueren Studie[62] auch den Einsatz von Lipidemulsionen, welche einen Anteil an Omega-3-Fettsäuren enthielten. Es zeigte sich, dass man mit einem Zusatz von solchen Fettsäuren zur Lipidernährung eine hyperinflammatorische Situation verhindern kann, da diese Fettsäuren als metabolische Produkte

Leukotriene produzieren, welche weniger biologisch aktiv sind als die Leukotriene, die von Omega-6-Fettsäuren abstammen.

Einer der Vorteile der Lipidlösungen als Energieträger besteht darin, dass sie im Gegensatz zu Glucoselösungen in höheren Konzentrationen ohne zentralvenösen Zugang zu applizieren sind, also problemlos und schnell auch in periphere Venen infundiert werden können, ohne diese zu schädigen. Der Grund dafür ist ihre niedrige Osmolarität. Es wurde sogar ein präventiver Effekt der parenteralen Ernährung im Hinblick auf die Entstehung einer Thrombophlebitis festgestellt[63]. So entstanden bei postoperativen Patienten bei Gabe von Aminosäure-Glucose-Infusionen als Komplikation durch die Thrombophlebitis häufiger Armödeme, als bei Zusatz von 10 %igen Lipidinfusionen.

Lipidlösungen werden auch bei Patienten eingesetzt, deren Gerinnungssystem sich in einem sehr labilen Zustand befindet. Dies ist ein weiterer wichtiger Grund die Wirkung von Lipidemulsionen auf die Hämostase dieser Patientengruppe sehr sorgfältig zu überprüfen. Die Gefahr einer Thrombose oder Lungenembolie aber auch einer Blutung ist stets gegeben, so dass ein vernünftiger und gut abgewogener Umgang mit allen verabreichten Infusionen, Medikamenten und anderen Therapeutika sehr wichtig ist.

Die parenterale Ernährung des Patienten dient der Bereitstellung von Energie und soll gleichzeitig verhindern, dass körpereigene Proteine abgebaut werden. Im Rahmen der Intensivtherapie ist sie meist Teil einer Gesamttherapie der schwerkranken Patienten. Im Einzelfall kann die parenterale Ernährung aber auch eine primäre Therapie darstellen, z.B. bei M. Crohn, Kurzdarmsyndrom oder gastrointestinalen Fisteln. Sie sollte die metabolischen Veränderungen im Stoffwechselgeschehen der verschiedenen Krankheitsbilder in günstiger Weise beeinflussen.

Patienten, welche parenteral ernährt werden müssen, sind meist intensivpflichtige, kritisch kranke Menschen, die vielen Risiken ausgesetzt sind. Führt man sich die Indikationen der parenteralen Ernährung vor Augen, wird klar, dass eventuelle Komplikationen durch die Infusionen den Patienten zusätzlich gefährden könnten.

Große Operationen und schwere Traumen bedingen fast immer eine eingeschränkte Funktion des Gastrointestinaltrakts. Durch eine in dieser Situation häufig unumgängliche analgetische oder analgosedierende Therapie wird zusätzlich die Motilität des Magen-Darm-Traktes ge-

hemmt. Zusätzlich besteht die Gefahr des akuten Nierenversagens, und es können nicht selten ein septisches Syndrom oder letztendlich ein akutes Lungenversagen hinzukommen. Daher ist hier fast immer eine parenterale Ernährung notwendig, muss jedoch vorsichtig eingesetzt werden, da es durch die eingeschränkte Fettutilisation bei diesen Komplikationen schnell zum Ansteigen der Triglyzeridspiegel kommen kann. Gleichzeitig ist bei diesen Patienten oft auch die Hämostase gestört, was viele Ursachen haben kann, wie etwa Operationstraumen, Transfusionen, extrakorporale Zirkulation, Medikamenteneinflüsse, Immobilisation und die damit in der Regel verbundene Stresssituation. Es muss daher vermieden werden noch zusätzlich eine weitere Gerinnungsaktivierung durch Lipidlösungen hervorzurufen.
Weitere wichtige Indikationen für die Applikation einer parenteralen Ernährung sind entzündliche Erkrankungen des Gastrointestinaltrakts, wie akute Colitis ulcerosa, Morbus Crohn, toxisches Megakolon oder deren septische Komplikationen. Durch die oft langen Krankheitsverläufe dieser Erkrankungen sind die Patienten meist untergewichtig und leiden unter diversen Mangelzuständen.
Diskutiert man den Nutzen der parenteralen Ernährung mit Lipidemulsionen muss berücksichtigt werden, dass die parenterale Ernährung selbst zu Komplikationen führen kann, wie z.B. Thrombosen (meist durch die Katheterspitze), Infektionen, Störungen im Wasser- und Elektrolythaushalt, Hypertriglyceridämie, Hyperglykämie oder Gallensteinbildung.

1.6 Ziel der Arbeit

Ziel der Arbeit war es zu klären, inwieweit die parenterale Applikation von Fettemulsionen einen Einfluss auf die Blutgerinnung, insbesondere auf die Thrombozytenfunktion, ausübt.
Zu diesem Zweck wurden zwei Untersuchungen durchgeführt.

- In einer In-vitro-Untersuchung sollte zunächst überprüft werden, ob eine Inkubation von Probandenblut mit Fettemulsion eine Auswirkung auf die plasmatische Gerinnung und die Thrombozytenfunktion hat. Da verschiedene Fettemulsionen im Handel sind, die sich in Ausgangsstoffen und Zusammensetzung unterscheiden, wurden vier verschiedene Präparate untersucht.

- Weiterhin sollte geprüft werden, ob es hinsichtlich der untersuchten Parameter Präparateunterschiede gibt. Die unterschiedlichen Zusammensetzungen der Fettsäuren wie auch des Emulgators lässt dies vermuten.
- In der anschließenden klinischen Untersuchung bei parenteral ernährten Intensivpatienten sollte nun überprüft werden, ob tatsächlich eine Aktivierung oder eine Funktionsstörung der Hämostase, insbesondere der Thrombozyten, zu beobachten ist, und ob in-vitro gemessene Veränderungen gegebenenfalls am Patienten zu verifizieren sind.

In der hier vorgelegten Arbeit werden die Ergebnisse der klinischen Untersuchung vorgestellt.

Ist die parenterale Ernährung mit Lipidinfusionen indiziert, kann sie auch im Rahmen einer klinischen Studie Patienten nicht vorenthalten werden. Die HELSINKI-Deklaration fordert eine optimale Therapie für alle Studienteilnehmer[64]. Die Gabe eines Placebos erscheint in diesem Zusammenhang äußerst problematisch. Deshalb verwendeten wir auch nach Beratung in der Ethikkommission kein randomisiertes Studiendesign, sondern führten nur eine prospektive Verlaufsbeobachtung durch.

2 Material und Methoden

2.1 Design der klinischen Studie

Es wurden von 24 intensivtherapiepflichtigen Patienten, die ab dem ersten postoperativen Tag parenteral ernährt werden sollten, Blutproben entnommen. Diese Patienten wurden im Rahmen einer prospektiven, nicht randomisierten, Placebo-kontrollierten einfachblinden Studie untersucht. Demographische Charakteristika der Patienten sind in Tabelle 1 dargestellt. Einschluss-, Ausschluss- und Abbruchkriterien sind in Tabelle 2 definiert, der Ablauf der Studie ist in Abbildung 3 skizziert. Alle Patienten erhielten nicht gewichtsadaptiert 425 g Glukose und 100 g Aminosäuren pro Tag. Die Infusion von Vollelektrolytlösung erfolgte bis zum Ausgleich der Flüssigkeitsbilanz. Die Entscheidung ob die Patienten einen Fettanteil in der parenteralen Ernährung benötigten, wurde individuell in Abhängigkeit vom operativen Eingriff, der geplanten Dauer der parenteralen Ernährung und dem Ernährungszustand des Patienten getroffen. Der für diese Entscheidung verantwortliche Arzt war nicht an der Durchführung dieser Studie beteiligt. Die Patienten wurden in eine Studiengruppe (n=12) und eine Kontrollgruppe (n=12) aufgeteilt. Die Patienten der Studiengruppe wurden postoperativ mit Lipidlösung (Intralipid® 20%) parenteral ernährt. Intralipid® wurde als Präparat ausgewählt, da es klinisch bei den Intensivpatienten bereits angewendet wurde. Es wurden die Zahl n=12 pro Gruppe gewählt, da sie eine hinreichende statistische Analyse ermöglicht und die Fragestellung nicht auf den Nachweis minimaler Effekte sondern klinisch relevante Effekte zielte.

Tabelle 1 Demographische Charakteristika der Patienten der In-vivo-Studie

Patienten	Lipidgruppe	Kontrollgruppe
Geschlecht (männlich/weiblich)	9/3	10/2
Alter (Mittelwert)	62	59
Postoperativer Tag des Messbeginns (Mittelwert)	2,75	2,5

Abdominale Blutung nach Polytrauma	7	9
Carcinom Colon	2	2
Carcinom Niere	2	0
Carcinom Blase	1	0

Als Magenschutz wurde ausschließlich ein H_2-Rezeptorenblocker (Ranitidin) intravenös, bzw. oral verabreicht.

Alle Patienten erhielten im Rahmen der parenteralen Ernährung regelmäßig Vitaminsubstitution.

Bei Sedierungen wurde ein Benzidiazepin (Midazolam) verwendet.

Indikation für die parenterale Ernährung: keine normale Ernährung aufgrund der Morbidität möglich.

Tabelle 2 Einschluss-, Ausschluss- und Abbruchkriterien für die Teilnahme an der klinischen Studie

Einschlusskriterien	Ausschlusskriterien	Abbruchkriterien
• Intensivtherapie nach abdominalchirurgischem Eingriff • Parenterale Ernährung über mindestens 3 Tage vorgesehen • Alter über 18 Jahre	• Gerinnungsstörung • Störung der hepatischen Syntheseleistung • Generalisierte AVK • Vorangegangener Myokardinfarkt • Insulinpflichtiger Diabetes mellitus • Fettstoffwechselstörung • Mangel- oder Unterernährung • Therapie mit gerinnungsaktiven Arzneimitteln ("low-dose" Heparin bis 10 IE/kgKG/h erlaubt) • Hämofiltration • Sedierung mit Propofol	• Triglyzeridspiegel im Serum >500 mg/l • Verlegung auf Allgemeinstation • Fortfall der Indikation zur parenteralen Ernährung

Studiengruppe (12 Patienten):

- Erste Blutentnahme vor der 1. Applikation einer Lipidinfusion **(t1)**
- Gabe von 250 ml Intralipid® 20 % über ein Zeitintervall von 18 Stunden
- 6-stündige Lipidkarenz
- Zweite Blutentnahme nach der 6-stündigen Lipidkarenz, 24 Stunden nach t1 **(t2)**
- Gabe von 500 ml Intralipid® 20 % über ein Zeitintervall von 18 Stunden

- 6-stündige Lipidkarenz
- Dritte Blutentnahme nach der 6-stündigen Lipidkarenz, 48 Stunden nach t1 **(t3)**

Kontrollgruppe (12 Patienten):

- Erste Blutentnahme **(t1)**
- Gabe von 250 ml Ringer-Lösung
- Zweite Blutentnahme 24 Stunden nach t1 **(t2)**
- Gabe von 500 ml Ringer-Lösung
- Dritte Blutabnahme 48 Stunden nach t1 **(t 3)**

Die 6-stündige Lipidkarenz wurde eingehalten, um eine exzessive Hyperlipidämie in den Blutproben zu vermeiden, und um ausschließlich mittellange Effekte zu untersuchen.
Die statistische Auswertung wird unter 2.5.1 näher erläutert.

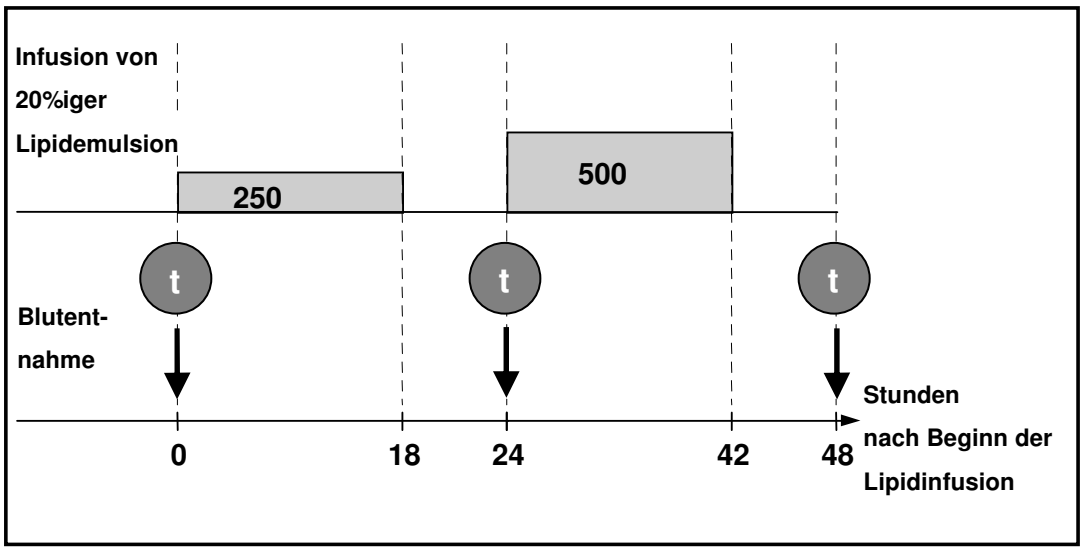

Abbildung 3 Fließschema zur Klinischen Studie

Blutentnahme und Verarbeitung der Proben:

Die Blutabnahmen erfolgten unter standardisierten Bedingungen, die in Tabelle 4 zusammengestellt sind. Die Zusammensetzung und der Anteil der Antikoagulanzienlösungen und Stabilisatoren bei den verschiedenen Untersuchungsmethoden sind Tabelle 3 zu entnehmen. Die

Blutentnahmegefäße mit den Antikoagulanzien und Stabilisatoren wurden direkt vor der Blutentnahme vorbereitet: Dabei wurden 10 ml-Blutentnahmeröhrchen mit je 750 µl Glucose 5% und 750 µl Natriumcitrat gefüllt. Außerdem wurden Probengefäße mit je 2 ml EDTA-Puffer und Probengefäße mit 2 ml EDTA-Puffer mit 2 % Glutaraldehyd sowie ein Eiswasserbad bereitgestellt.

Tabelle 3 Antikoagulantien und Stabilisatoren für Blutproben

Nr.	**Untersuchungsmethode**	**Antikoagulanzien und Stabilisatoren**	**Verhältnis (V:V[1])**	**Zentrifugationsbedingungen**			**Zielkomponente**
				[g]	[min]	[°C]	
1	**Vollblutaggregometrie nach Flower/Cardinal** **Thrombelastographie** **Blutungstest (PFA)**	Trinatriumcitrat 20 g/l eingestellt mit HCl auf pH=7,4 (Haemonetics, München); Glukose 25 g/l	3:20	—	—	—	Vollblut
2	**Turbidometrische Aggregometrie nach Born**	Trinatriumcitrat 20 g/l eingestellt mit HCl auf pH=7,4 (Haemonetics, München); Glukose 25 g/l	3:20	250 3000	15 10	22 22	Plättchenreiches **Plasma** Plättchenarmes **Plasma**
3	**Nachweis von irreversiblen Aggregaten (Mikroskop)** **Blutbild (Photometer, Counter)**	EDTA 4 g/l; Na_2HPO_4 0,1 g/l; NaH_2PO_4 0,1 g/l; NaCl 7,2 g/l	4:5	—	—	—	Desaggregiertes **Vollblut**

[1]) Volumenanteil des Stabilisators im Verhältnis zum Gesamtvolumen

4	**Nachweis von Aggregaten (Counter)**	Glutaraldehyd 5 g/l; EDTA 4 g/l; Na_2HPO_4 0,1 g/l; NaH_2PO_4 0,1 g/l; NaCl 7,2 g/l	4:5	—	—	—	Fixiertes **Vollblut**
5	**Aktivierungs-marker (ß-Thromboglo-bulin)** **plasmatische Gerinnung** **(in vivo)**	CTAD: Trinatrium-citrat 1,673 mg Theophyllin 15 mmol/l Adenosin 3,7 mmol/l Dipyridamol 0,198 mmol/l[i, ii]	1:10	4000 12000	15 5	4 22	**Plasma** (doppelt zentrifugiert)
6	**Plasmatische Gerinnung** **(in-vitro)**	Trinatriumcitrat 20 g/l eingestellt mit HCl auf pH=7,4 (Haemonetics, Mün-chen); Glukose 25 g/l	1:10	4000 12000	15 5	4 22	**Plasma** (doppelt zentrifugiert)
7	**Triglyzeride**	—	—	3000	10	22	**Serum**

Folgende Blutproben wurden bei den Patienten entnommen:

- 5 ml Blut als Verwurf, damit das entnommene Blut nicht durch andere Substanzen ver-dünnt wird.
- 1 ml Blut in einer 1 ml-Insulinspritze: Je 0,5 ml wurden sofort auf die beiden bereitgestell-ten EDTA-Puffer (einer mit und einer ohne Glutaraldehyd) aufgeteilt und sofort gemischt.
- 4,5 ml Blut in einer Spritze, welches sofort in ein auf Eis gestelltes CTAD-Röhrchen gege-ben wurde (siehe auch Tabelle 3).
- 10 ml Blut (Abnahme mit Glucose-Citrat-Röhrchen):
  - 3 ml wurden gesondert in ein auf Eis bereit gestelltes leeres Probengefäß gegeben.
  - 7ml sind für die Messungen, welche anschließend wie unten beschrieben durchgeführt wurden, bei Raumtemperatur gelagert.

Die gewonnenen Blutproben wurden folgendermaßen verarbeitet (siehe auch Tabelle 3)**:**

- Die Blutproben mit EDTA-Puffer wurden für die Counter-Messung und für die mikroskopische Zählung der Aggregate verwendet.
- Das CTAD-Röhrchen wurde in der Kühlzentrifuge bei +4°C, 4000 x g, 15 Minuten zentrifugiert. Das hierraus gewonnene Plasma wurde in einem zweiten Zentrifugationsschritt in einem Eppendorfgefäß in der HERAEUS-Zentrifuge bei Raumtemperatur, 12.000 x g, fünf Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde das dekantierte Plasma bei -80°C eingefroren.
- Das 3-ml-Probengefäß auf Eis (aus dem Glucose-Citrat-Röhrchen) wurde ebenfalls in der Kühlzentrifuge bei +4°C, 4000 x g, 15 Minuten zentrifugiert, das Plasma entnommen und bei -80°C eingefroren.
- Das restliche Blut (ca. 7 ml) aus dem Glucose-Citrat-Röhrchen wurde für folgende Messungen sofort eingesetzt: Impedanzaggregometrie, TEG, PFA, optische Messung (mit Herstellung von PRP und PPP).

Tabelle 4 Standardisierte Blutentnahme

Studienpopulation	**Entnahmestelle**	**Kanüle**	**Schlauchverbindung, Dreiwegehahn**
Probanden	Armvene	18 G Stahlkanüle	
Patienten	Zentralvenös	Zentraler Venenkatheter, 7F-3-Lumen 250x1 mm (Fa. Braun Melsungen)	Dreiwegehahn
Patienten	Arteria radialis	2 mm Teflonkanüle (Vasocan, Fa. Braun Melsungen)	Zuleitung druckstabil 1x1500 mm, Dreiwegehahn

2.2 Design der In-vitro-Messungen

Als Studienpopulation dienten zwölf gesunde Personen, die mindestens eine Woche keine gerinnungshemmenden Medikamente eingenommen hatten. Die Blutabnahmen erfolgten standardisiert wie in Tabelle 4 beschrieben. Bei der peripher venösen Blutentnahme wurde die Venenpunktion unter einem Staudruck von 40 mm Hg ausgeführt, der mit einer Blutdruckmanschette und geeichtem Manometer kontrolliert wurde. Zur Blutentnahme wurde die Stauung entfernt und die ersten 5 ml Blut nicht für die Gerinnungsuntersuchungen verwendet, um eine Aktivierung durch die Endothelläsion auszuschließen. Die Zusammensetzung und der Anteil der Antikoagulanzlösungen und Stabilisatoren sind Tabelle 3 zu entnehmen.
Das Blut wurde in sechs Glucose-Citrat-Röhrchen aufgezogen (10-ml-Röhrchen mit je 750µl Glucose und 750µl Citrat) und nach einer zehnminütigen Ruhezeit, um eventuell aktivierte Thrombozyten wieder zu normalisieren, gleichmäßig auf neun Probengefäße verteilt. Zu diesen wurden dann die vier zu untersuchenden Lipidpräparate gegeben. Die Lipidlösungen wurden dabei unmittelbar vor der Blutentnahme mit 0,9 %iger NaCl–Lösung so verdünnt, dass alle vier Lipidlösungen jeweils in zwei unterschiedlichen Konzentrationen in den Blutproben vorlagen, einmal 5 g/l und einmal 0,5 g/l. Das neunte Röhrchen wurde mit gleicher Menge 0,9% iger NaCl-Lösung versetzt und diente als Kontrolle.

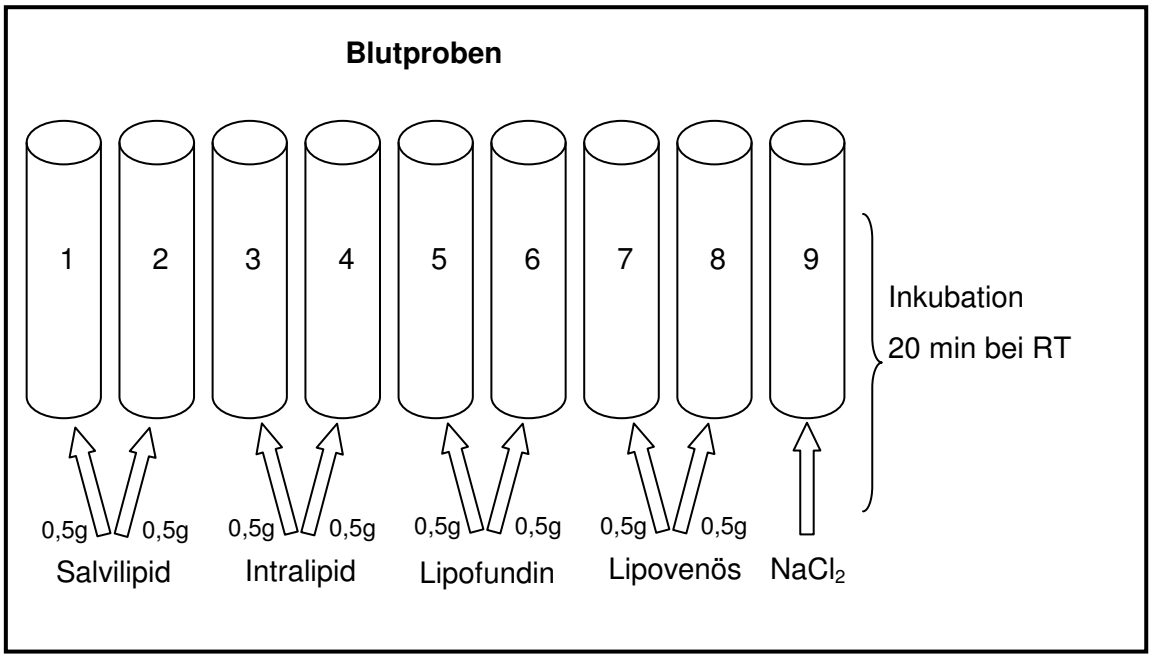

Abbildung 4 Schema des Versuchsansatzes für Lipidinfusionen

Für die Vollblutaggregometrie, den In-vitro-Blutungstest und die Thrombelastographie wurde aus messtechnischen Gründen gesondert ein Glucose-Citrat-Gefäß entnommen, da jeder Messansatz erst unmittelbar vor der Messung mit den Lipiden inkubiert werden sollte. Zusätzlich wurde ein EDTA-Röhrchen zur Messung des Blutbildes abgenommen. Anschließend wurde das Blut, wie in Tabelle 3 beschrieben, frisch verarbeitet. Bei der in-vitro-Untersuchung wurde im Gegensatz zur Klinischen Studie jedoch keine Aktivierungsmarker gemessen. Das Plasma für die Messung der plasmatischen Gerinnung ist aus dem Glucose-Citrat-Röhrchen entnommen worden. Das weitere Vorgehen ist im Zusammenhang mit der Beschreibung der für die einzelnen Untersuchungen verwendeten Messgeräte angegeben, was in Kapitel 2.3 beschrieben wird. Bei allen Messungen wurde die Reihenfolge der zu messenden Lipide variiert, um systematische Fehler auszuschließen.

2.3 Geräte und Messprinzipien

2.3.1 Vollblutaggregometrie

In der vorliegenden Arbeit wurde das Gerät CHRONO-LOG-VOLLBLUTAGGREGO-METER, Model 706/707, Firma CHRONO-LOG CORPORATION eingesetzt (Bezug über die Firma NOBIS, Endingen, Deutschland). Das verwendete Kollagen wurde von der Firma CHRONO-PAR geliefert.

Messprinzip:

Die Impedanzmethode beruht auf dem Prinzip der Änderung eines elektrischen Widerstandes zwischen zwei Metallstiften einer Elektrode. Die Elektrode besteht aus zwei parallel angeordneten halbkreisförmigen Platinbügeln (Abbildung 5, A). Die Bügel werden in die Citratblutprobe eingetaucht, die mittels eines Magnetrührers (Abbildung 5, B) bewegt wird. Eine Spannung von 0,1 Volt wird angelegt. Die Elektrode misst nun den elektrischen Widerstand bzw. die Impedanz nach Cardinal und Flower[65].

Messung der Spontanaggregation:

Nach dem Eintauchen der Elektroden in die Blutprobe setzen sich einige Plättchen an die Elektroden und lösen sich auch wieder, was in einem ständigen Kreislauf geschieht und zu einem steady state führt. Die Methode ist sehr temperaturempfindlich. Ist der steady state erreicht beginnt die Messung der Spontanaggregation.

Die Spontanaggregation wird als Tangens des Steigungswinkels α des folgenden linearen Kurvenabschnittes aufgezeichnet und berechnet. Die Dimension ist folglich Ω/h.

Messung der induzierten Aggregation:

Durch Zugabe von Kollagen wird die Thrombozytenaggregation induziert[66, 67]. Kollagen Typ I liegt in fibrillärer Form vor. An den Fibrillen findet eine Thrombozytenadhäsion und Aggregation statt. Kollagenfibrillen allein lagern sich nicht an den Platinelektroden ab, jedoch die Thrombozytenaggregate. Nun setzen sich die stimulierten Plättchen als Aggregate an die Metallstifte der Elektrode und der elektrische Widerstand steigt. Die Widerstandsänderung wird in einer Aggregationskurve aufgezeichnet.

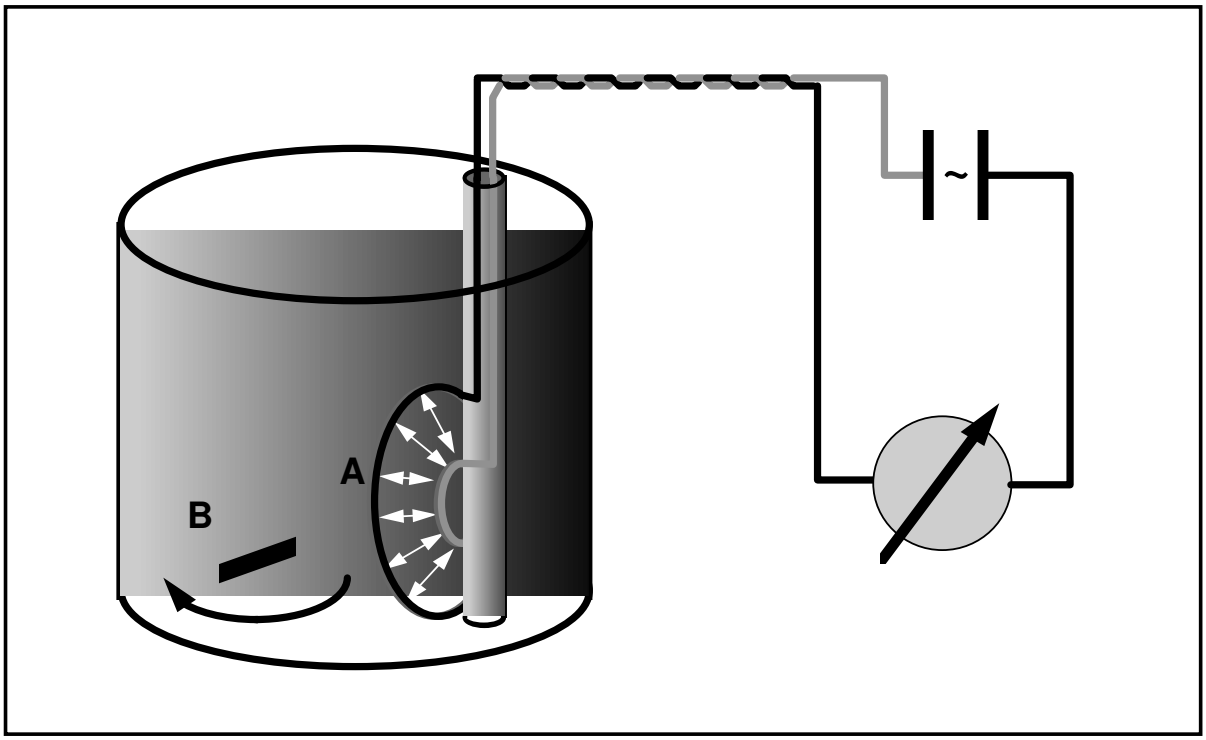

Abbildung 5 Aufbau des Impedanzaggregometers
Über den von einer Wechselstromquelle erzeugten Strom wird mittels einer Elektrode A, die aus zwei Platinbügeln besteht, der Widerstand (Impedanz) in einer Citratblutprobe gemessen, die von einem Magnetrührer (B) bewegt wird. Eine Thrombozytenaggregation an der Elektrode bewirkt einen Impedanzanstieg.

Durchführung der Messung:

Die Blutprobe wird in die im Heizblock vorgewärmte Küvette gefüllt und auf 37°C aufgewärmt. Durch Erwärmen der Blutprobe kommt es zunächst zu einem passageren Abfall der Impedanz. (Temperaturartefakt, siehe Abbildung 6). Ist dieser erreicht, erkennbar an einer stabilen geradlinigen Grundlinie, wird die Nulllinie mittels der Taste "ZERO" festgelegt (bei unseren Messungen nahmen wir die Markierung 0 auf dem Schreiberpapier), was einem elektrischen Widerstand von 0 Ohm entspricht. Anschließend wird die Messung mittels eines internen Prüfwiderstands von 20 Ohm kalibriert. Dies erfolgt mit den Tasten "CALIBRATE" (Kalibrierung) und "GAIN" (Verstärkung), so dass die Schreiberspanne von 8 cm 20 Ohm entspricht. Um bei den Messungen ausreichend Platz für die Ausschläge zu haben, wurde die Grundlinie bei Messbeginn auf die Markierung 50 gesetzt. Nun wird die spontane Thrombozytenaggregation aufgezeichnet. Die Spontanaggregation wird als Doppelbestimmung durch-

geführt. Abbildung 6 beschreibt die Auswertung anhand einer Originalregistrierung. Anschließend wird nochmals die Nulllinie und die Kalibrierung eingestellt und Kollagen zugegeben. Nun wird die induzierte Aggregation anhand der Aggregationskurve gemessen und aufgezeichnet.

Vor der Durchführung der eigentlichen Messungen wurden die Elektroden des Aggregometers durch Testläufe so angeglichen, dass sie möglichst gleiche Grundlinien aufzeigten. Damit wurden systematische Fehler durch unterschiedliche Elektrodenempfindlichkeit während der Messungen weitestgehend vermieden.

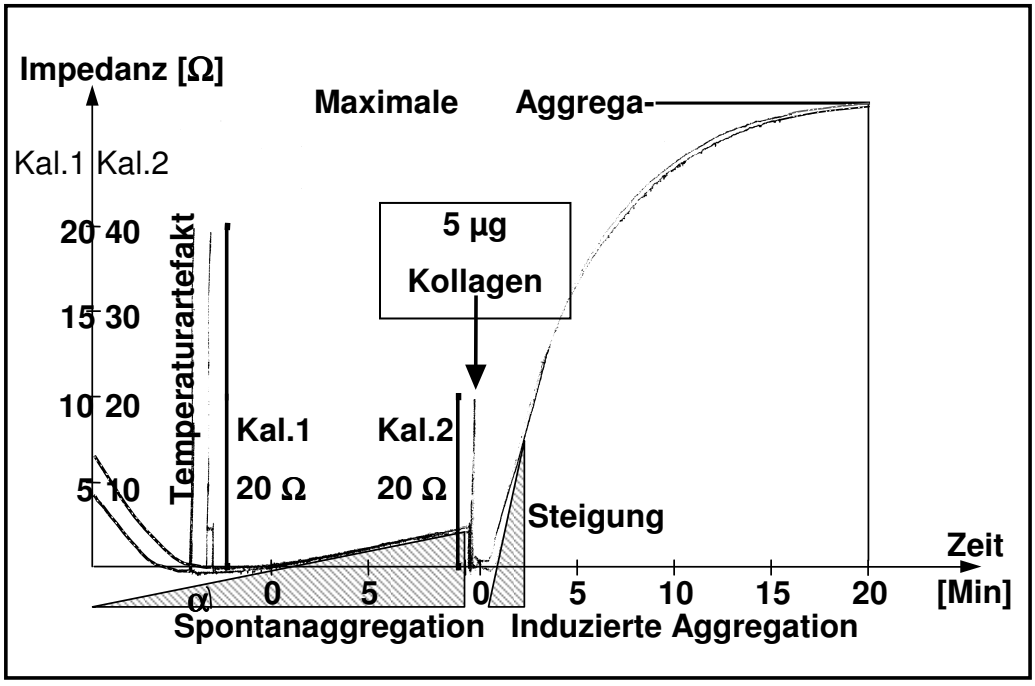

Abbildung 6 Originalregistrierung einer Doppelbestimmung der spontanen Thrombozytenaggregation und der kollageninduzierten Thrombozytenaggregation mittels Impedanzaggregometrie. Kal.=Kalibration

Auswertung der Messung:

- Maximale Widerstandsänderung nach 20 min = Spontanaggregation (Ohm/20 min)
  ⇨ Kollagenzugabe
- Steigung pro Minute = maximale Geschwindigkeit der induzierten Aggregation (Ohm/min)
- Maximaler Widerstand (Impedanz) = maximale Aggregation (Ohm)

Durchführung der Messung für die Blutproben der Probanden:

Für die Vollblutaggregometrie wurde das Blut direkt nach der Blutentnahme, ohne vorherige Inkubation mit Lipiden, verwendet. Es wurde pro Ansatz 600 µl Blut und 300 µl physiologische Kochsalzlösung in eine Plastikküvette gegeben, mit einem Magnetrührer mit 1000 Umdrehungen pro Minute versetzt und zehn Minuten bei 37° C vorgewärmt. Die Lipidlösungen wurden am Ende der Aufwärmzeit und der Schreibereinstellung zugegeben. Die Konzentrationen in den zu messenden Proben betrugen in der Messprobe 5 g/l und 0,5 g/l. Die Spontanaggregation wurde 20 Minuten lang aufgezeichnet. Anschließend wurden nochmals die Nulllinie und die Kalibrierung eingestellt, und 5 µl Kollagen (1 mg/ml) mit einer Mikropipette zugegeben, so dass bei einem Probenvolumen von 900 µl eine Endkonzentration von 5,56 µg/ml erreicht wurde. Zwei Minuten nach Erreichen des Ausgangswertes wurde die Impedanz bestimmt und als Steigung ("Slope") berechnet (Dimension Ω/min). Als maximale Impedanz wurde der nach 20 Minuten erreichte Höchstwert bezeichnet (siehe Abbildung 6).

Durchführung der Messung für die Blutproben der Patienten:

Bei den Patientenproben wurde das frisch abgenommene Blut unverzüglich nach 10-minütigem Vorwärmen im Messplatz mit Magnetrührer (ebenfalls 1000 Umdrehungen pro Minute) gemessen, pro Ansatz ebenfalls 600 µl Blut und 300 µl physiologische Kochsalzlösung. Nach Abwarten des Temperaturartefaktes wurde 20 Minuten die Spontanaggregation

beobachtet und anschließend erneut kalibriert und die Nulllinie eingestellt. Nach Zugabe von 5 µl Kollagen (1 mg/ml) erfolgte die Aufzeichnung der Kurve.
Nach jeder Messung folgte eine schonende Reinigung der Elektroden mit Deproteinisierungslösung, Leitungswasser und Aqua dest..

2.3.2 Optische Messung

Für diese Messung wurde ebenfalls das Gerät CHRONO-LOG-VOLLBLUTAGGREGOMETER, Model 706/707, Firma CHRONO-LOG CORPORATION (s.o.) verwendet.
Die optische Messung der Thrombozytenaggregation wurde 1962 von Born[68] eingeführt und ist seitdem das wichtigste Verfahren zur Prüfung der Thrombozytenfunktion.
Für die optische Messung wurde plättchenreiches Plasma (platetelet rich plasma = PRP) und plättchenarmes Plasma (platelet poor plasma = PPP) verwendet. Die Herstellung der Plasmen ist in Tabelle 3 und Kapitel 2.3.9.1 beschrieben.

Messprinzip:
Für die Messung der Thrombozytenaggregation mit der optischen Methode diente das Spektrometer, welches im Gerät integriert ist und das mittels Infrarotlicht turbidometrisch eine Trübungsabnahme in Relation zum Referenzwert (100%) misst. Das PRP und das dazugehörige PPP wurden in je eine Glasküvette (450 µl) gegeben und in die vorgesehenen Messplätze gesetzt, welche auf 37° C vorgeheizt waren, und dort zehn Minuten vorgewärmt. Damit im PRP die Thrombozyten in Kontakt treten können, wurde diese Küvette mit einem Magnetrührer versehen, der bei 1000 Umdrehungen pro Minute die Plättchen in Bewegung hält. Das PPP lässt 100% Infrarotlicht durch und dient als Referenzwert, die Transmission des PRP hingegen beträgt 0%. Transmissionsänderungen im PRP entstehen durch Thrombozytenaggregate, da diese eine geringere optische Streuung verursachen als einzelne Plättchen. Die Abnahme der Streuung ist zum Anteil aggregierter Plättchen proportional. Mit dem Schalterknopf "SET BASELINES" wird der Schreiberstift auf die PPP-Grundlinie bei 10% gesetzt. Beim Lösen des Schalters wandert der Schreiberstift automatisch auf den 90%-Wert der Skala und zeichnet die PRP-Grundlinie auf.

Falls die Differenz der Transmissionen zwischen PRP und PPP zu gering ist, fährt der Schreiber ständig zwischen beiden Grundlinien hin und her, und eine Messung ist nicht möglich.
Dies war bei den optischen Messungen der Plasmen der Fall, welche 5 g/l Lipidlösung enthielten, so dass nur die Plasmen mit der niedrigen Lipidkonzentration (0,5 g/l) gemessen werden konnten.
Als Stimulus für die Aggregation diente wiederum Kollagen, welches nach dem Vorwärmen dem PRP zugegeben wird. Durch das Kollagen ändert sich die Form der Thrombozyten, sie werden etwas größer, so dass die Lichtdurchlässigkeit des PRP abnimmt. Dies führt zu einem negativen Ausschlag der Messkurve. Anschließend formen die Plättchen irreversible Aggregate durch Entleerung der Speichergranula und die Lichtdurchlässigkeit der Probe erhöht sich, was zu einer positiven Kurve Richtung PPP führt. Die Abnahme der Lichtstreuung ist proportional zum Anteil aggregierter Plättchen. Es wird so lange gemessen und die Kurve aufgezeichnet bis der maximale Ausschlag erreicht ist (ca. 15 min) (siehe Abbildung 7).

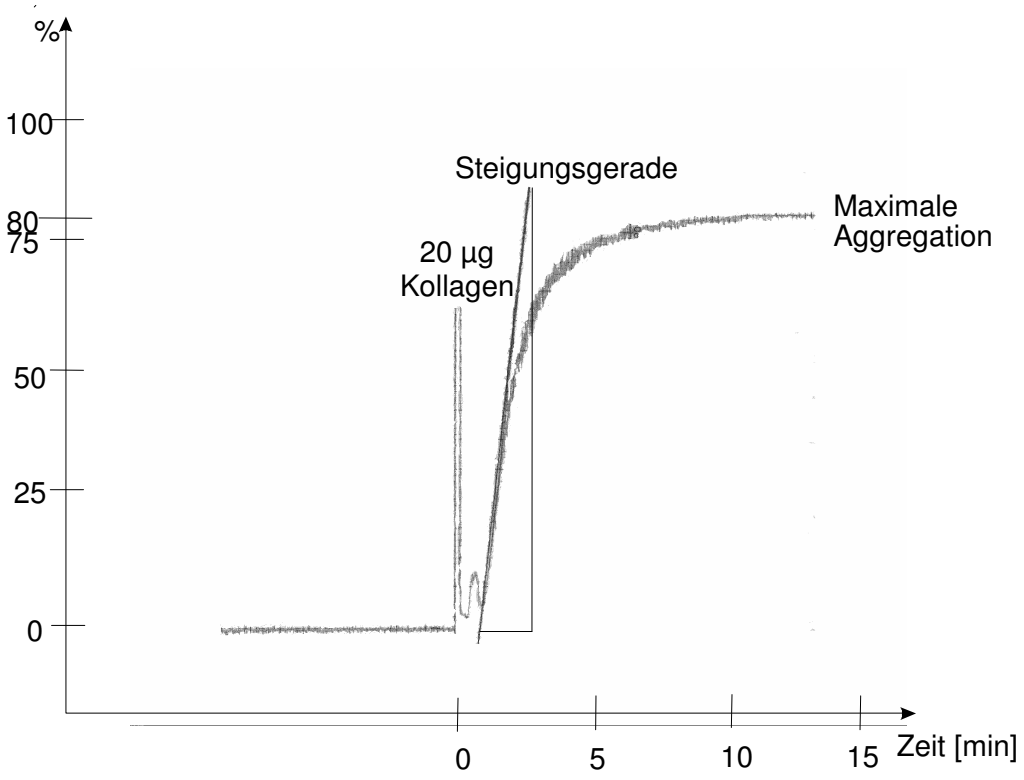

Abbildung 7 Originalregistrierung einer optischen Aggregationskurve, Erläuterungen siehe Text

Die Aggregationskurve wird durch folgende Parameter charakterisiert:

- Maximale Änderung der Lichttransmission = maximale Aggregation (%)
- Maximale Geschwindigkeit der Aggregation, turbidometrische Anstiegssteilheit = Steigung pro Minute (%/ min)

Durchführung der Messung:

In-vitro-Untersuchung

Nach 20-minütiger Lipidinkubation und anschließender Zentrifugation (siehe Tabelle 3, Nr. 2) wurde das plättchenreiche Plasma PRP abpipettiert und mit dem verbliebenen Sediment und einer weiteren Zentrifugation das plättchenarme Plasma PPP hergestellt. Je 450 µl der zusammengehörigen Plasmen wurden in Glasküvetten gegeben, das PRP mit einem Magnetrührer versetzt, und zehn Minuten bei 37 °C vorgewärmt. Nach Schreibereinstellung erfolgte die Zugabe von 5 µl Kollagen (1 mg/ml) mit einer Mikropipette und anschließend die Aufzeichnung der Aggregationskurve.

Klinische Studie

Das Blut wurde direkt nach Entnahme zentrifugiert, um das PRP und PPP herzustellen. Der Ablauf entsprach der In-vitro-Untersuchung.

2.3.3 Thrombelastographie

Für die Thrombelastographie (TEG) wurde der Thrombelastograph D der Firma Hellige, Freiburg verwendet.

Die Thrombelastographie ist ein globaler Gerinnungstest, der neben der Thrombozytenfunktion auch plasmatische Gerinnung und Fibrinolyse erfasst und von Hartert[69] eingeführt wurde. Die Weiterentwicklungen dieses Verfahrens (Resonanzthrombographie[70] beziehungsweise Orbitometrie[71]) wiesen zwar eine höhere Spezifität bezüglich der Thrombozytenfunktion auf, konnten sich dennoch nicht durchsetzen. Neben der Blutungszeit ist die TEG das in der klini-

schen Anwendung am weitesten verbreitete Testverfahren zur Bestimmung der Thrombozytenfunktion. Es wird insbesondere im Rahmen herzchirurgischer Eingriffe eingesetzt[72, 73, 74].

Messprinzip:

Der Thrombelastograph registriert den Blutgerinnungsverlauf einschließlich der Fibrinolyse, indem zu Citratblut Calciumchlorid ($CaCl_2$) zugegeben wird. Dadurch wird die Gerinnung ausgelöst. Eine zylindrische Spezialküvette wird in eine Drehpendelbewegung versetzt, mit einer Periodendauer von zehn Sekunden einschließlich zweier Ruhephasen von je einer Sekunde an jedem Bewegungsendpunkt (zur Vermeidung von Viskositätsfehlern). In einer Messsäule befindet sich ein Torsionsdraht, an dem der Messstift angebracht ist, der in die Küvette gesenkt wird. Durch die bei einsetzender Gerinnung sich bildenden Fibrinfäden zwischen Küvettenwand und Stift wird bei fortschreitender Gerinnung die Drehbewegung der Küvette auf den Stift übertragen, wobei mit zunehmender Festigkeit des Gerinnsels die Drehung des Stifts sich immer mehr der Küvettendrehung anpasst. Eine Öldämpfung unterdrückt weitgehend ungewollte Schwingungen des Stifts.

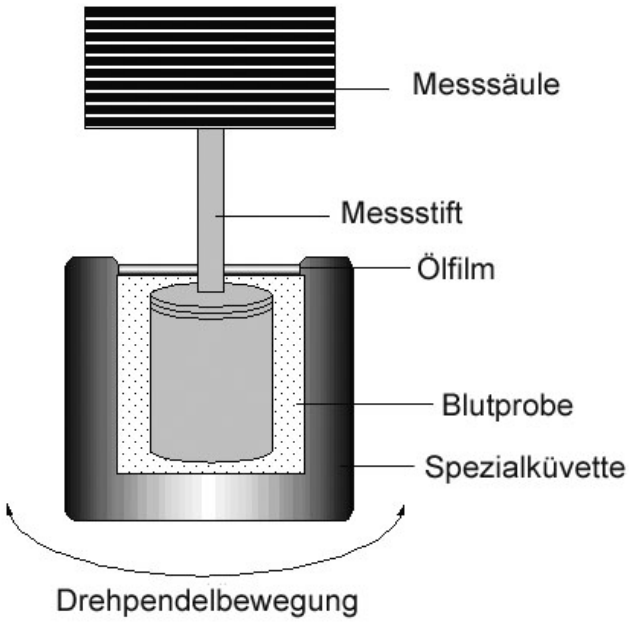

Abbildung 8 Schematische Darstellung des Thrombelastographen

Die Drehbewegung des Stifts wird von einem mechanisch-elektrischen Messumformer in ein elektrisches Signal umgewandelt und anschließend soweit verstärkt, dass ein elektromechanisches Schreibwerk ausgesteuert werden kann.
Der Thermoschreiber registriert das Thrombelastogramm. Die Papiergeschwindigkeit beträgt 2 mm/min. Die elektrische Nulllinie der beiden Schreibwerke wird mit der Taste „POSITION“ eingestellt. Die Taste „MARKIERUNG“ wird bei Zugabe von $CaCl_2$ zum Vollblut gedrückt, dadurch wird der Beginn der Reaktionszeit (r) festgelegt.

Durchführung der Messungen:

Klinische Studie

300 µl Patientenblut wurden direkt nach der Blutabnahme (im Citrat-Glucose-Puffer) in die Küvetten gegeben und fünf Minuten auf 37°C vorgewärmt. Anschließend wird die Messung mit 60 µl vorgewärmter $CaCl_2$-Lösung (100 mmol/l) gestartet. Durch mehrmaliges Heben und Senken des Metallstifts wurde sorgfältig gemischt, der Metallstift gesenkt, mit einem Ölfilm überzogen, und die Aufzeichnung (für ca. 45 Minuten) begonnen.

In-vitro-Untersuchung

Probandenblut wurde nach der Blutabnahme mit einer entsprechenden Lipidmenge bis zu einer Konzentration von 0,5 g/l bzw. 5 g/l 20 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend in den Küvetten fünf Minuten vorgewärmt, die Messung wurde mit 60 µl einer vorgewärmten $CaCl_2$-Lösung gestartet. Der Rest der Messung erfolgte analog der in-vitro-Studie. Alle Messungen wurden als Doppelbestimmung ausgeführt.

Folgende Parameter dienten zur Auswertung:

- Reaktionszeit "**r**" (min): Von Beginn der Rekalzifizierung bis eine Amplitude von 1 mm erreicht ist.
- Kontraktionszeit "**k**" (min): Ab einer Amplitude von 1 mm bis zu einer Höhe von 20 mm
- Maximale Amplitude "**MA**" (mm): Die maximale Höhe der Amplitude.
- Elastizitätsmodul $\mathbf{m_\varepsilon}$ berechnet mit der maximalen Amplitude: $m_\varepsilon = 100*MA/(100-MA)$.

Ein Beispiel der Registrierung und Auswertung ist in Abbildung 9 dargestellt.

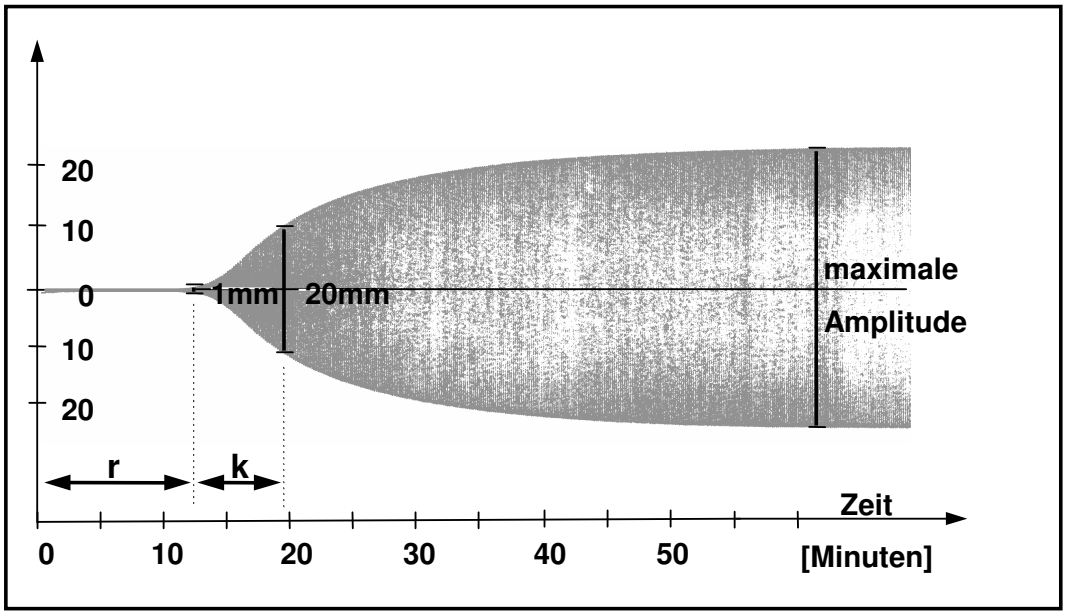

Abbildung 9 Originalregistrierung eines Thrombelastogramms. Erläuterungen im Text.

2.3.4 In-vitro-Blutungstest

Es wurde das Analysengerät für Thrombozytenfunktionstests PFA®-100 (Platelet Function Analyzer) der Firma DADE Diagnostika GmbH, Unterschleißheim, Deutschland verwendet. Die notwendigen Reagenzien stammten ebenfalls von der Firma DADE. Der hier verwendete In-vitro-Blutungstest[75] steht seit 1997 zur Verfügung. Er ist eine Fortentwicklung des Thrombostat 4000 (VDG, Seeon)[76], der von Kratzer und Born[77] entwickelt wurde und misst die primäre thrombozytäre Hämostase durch Simulation einer mikrovaskulären Verletzung. Der In-vitro-Blutungstest hat sich vor allem als Screening-Untersuchung auf Thrombozytopathie und von-Willebrand-Syndrome bewährt[78].

Messprinzip:

Das Gerät dient zur Erkennung von Thrombozytenfunktionsstörungen. Es besteht aus einem Analysengerät und einer Messzelle, in denen der Prozess der Thrombozytenadhäsion und Thrombozytenaggregation, der nach einer Gefäßverletzung einsetzt, in vitro simuliert wird. Es ermöglicht die Beurteilung der Thrombozytenfunktion in einer kleinen, antikoagulierten Vollblutprobe nach dem Prinzip von Kratzer und Born.

Die Messzelle (siehe Abbildung 10) besteht aus mehreren integrierten Bauteilen, unter anderem aus einer Stahlkapillare, einem Probenreservoir aus Polypropylen und einer biologisch aktiven Membran mit einer zentralen Stahlkapillare (Durchmesser 200 µm, Länge 30 mm). Durch Anlegen eines konstanten Unterdrucks von -40 mbar wird die antikoagulierte Vollblutprobe unter standardisierten geometrischen und rheologischen Bedingungen aus dem Probenreservoir durch die Kapillare und die Öffnung aspiriert. Die Kapillare gewährleistet eine konstante hämodynamische Umgebung und reguliert die Durchflussbedingungen in der Messzelle. Durch die Apertur wird der verletzte Teil eines Blutgefäßes simuliert. Die mit Kollagen und einem Agonisten (Epinephrin) beschichtete Membran ist mit Start-Lösung (physiologische Kochsalzlösung) durchtränkt, welche zu Beginn des Tests automatisch zugesetzt wird. Wie beim in-vivo-Mechanismus setzt die Thrombozytenadhäsion ein. An der Apertur kommt es zur Aggregation, wodurch der Blutfluss immer mehr verringert wird, bis er schließlich ganz zum Stillstand kommt. Das Gerät bestimmt die Zeit vom Beginn des Tests bis zum vollständigen Membranverschluss. Diese Zeit wird als Okklusionszeit (OT) angegeben und ist ein In-

dikator für die Thrombozytenfunktion der analysierten Vollblutprobe. Sie ist die wichtigste Größe dieses Tests. Daneben werden der initiale Blutfluss bei Beginn der Messung und das angesaugte Blutungsvolumen aufgezeichnet.

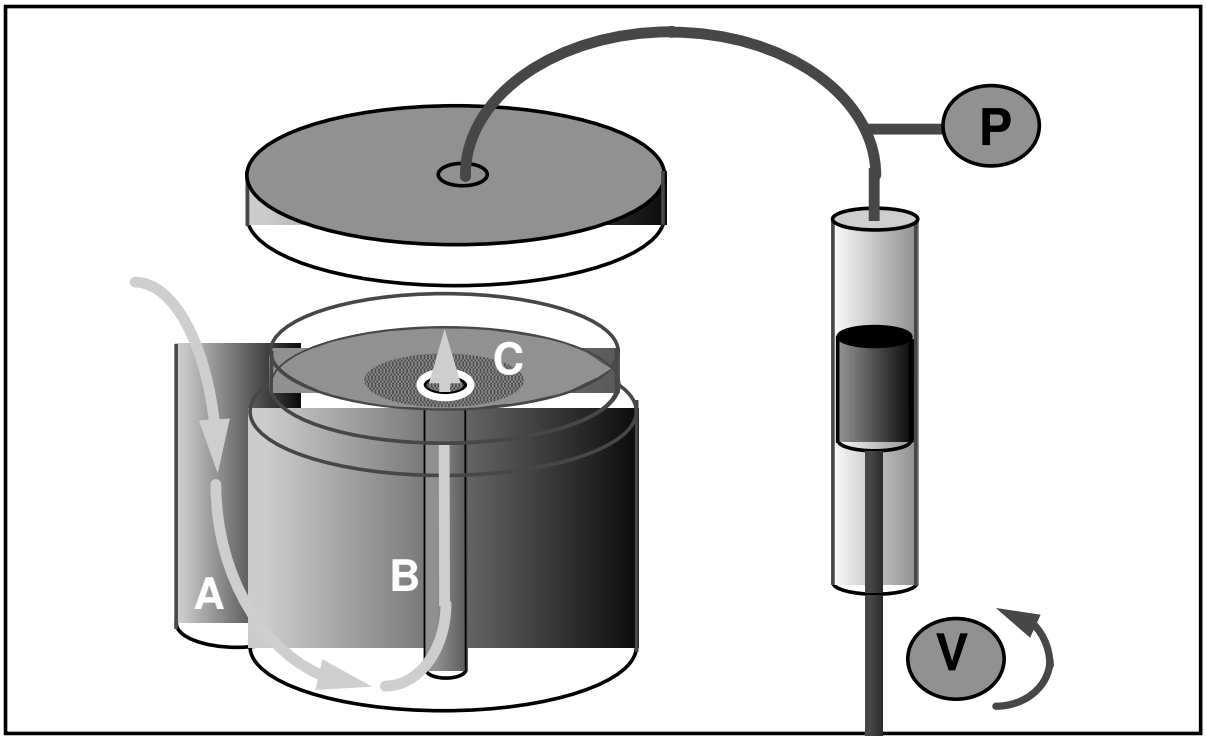

Abbildung 10 Funktionsprinzip des In-vitro-Blutungstests. Citratblut wird in ein Reservoir (A) gegeben. Anschließend wird die Blutprobe mit konstantem Unterdruck (erzeugt durch ein Manometer P) durch eine Stahlkapillare (B) zu einer Kollagen-beschichteten Nitrozellulose-Membran (C) gesaugt. Die zentrale Öffnung der Membran wird durch Thrombozytenaggregation und -adhäsion verschlossen. Hierdurch nimmt der Blutfluss ab (Pumpe mit Volumenmessung V). Bei völligem Verschluss der Öffnung wird der Test beendet. Dieser Zeitpunkt wird als ”Okklusionszeit” registriert.

Messzelle und Reagenzien:

- Messzelle Kollagen/Epinephrin(DADE, Miami, USA): enthält ein Polypropylenreservoir, eine Stahlkapillare und eine mit 2µg Typ 1-Kollagen (vom Pferd), und 10 µg Epinephrin-Bitartrat beschichtete Membran
- Start-Lösung: enthält physiologische Kochsalzlösung 0,9 % (DADE , Miami, USA)

Durchführung der Messung:

Klinische Studie

Die Patientenproben wurden direkt nach der Blutabnahme gemessen. Dazu wurden 800 µl Citratblut in eine Messzelle gegeben, fünf Minuten bei 37° C in der Messposition vorgewärmt, und anschließend die Messung gestartet.

In-vitro-Untersuchung

Die Blutproben der Probanden wurden 20 Minuten mit dem entsprechenden Lipid bei RT inkubiert, anschließend in die Messzellen gegeben, ebenfalls fünf Minuten vorgewärmt und die Messung gestartet.

Folgende Parameter dienten zur Auswertung:

- Okklusionszeit (OT)
- Initialer Blutfluss (IF)
- Blutvolumen (BV)

Ein Beispiel für eine Aufzeichnung und Auswertung des In-vitro-Blutungstests ist in Abbildung 11 dargestellt.

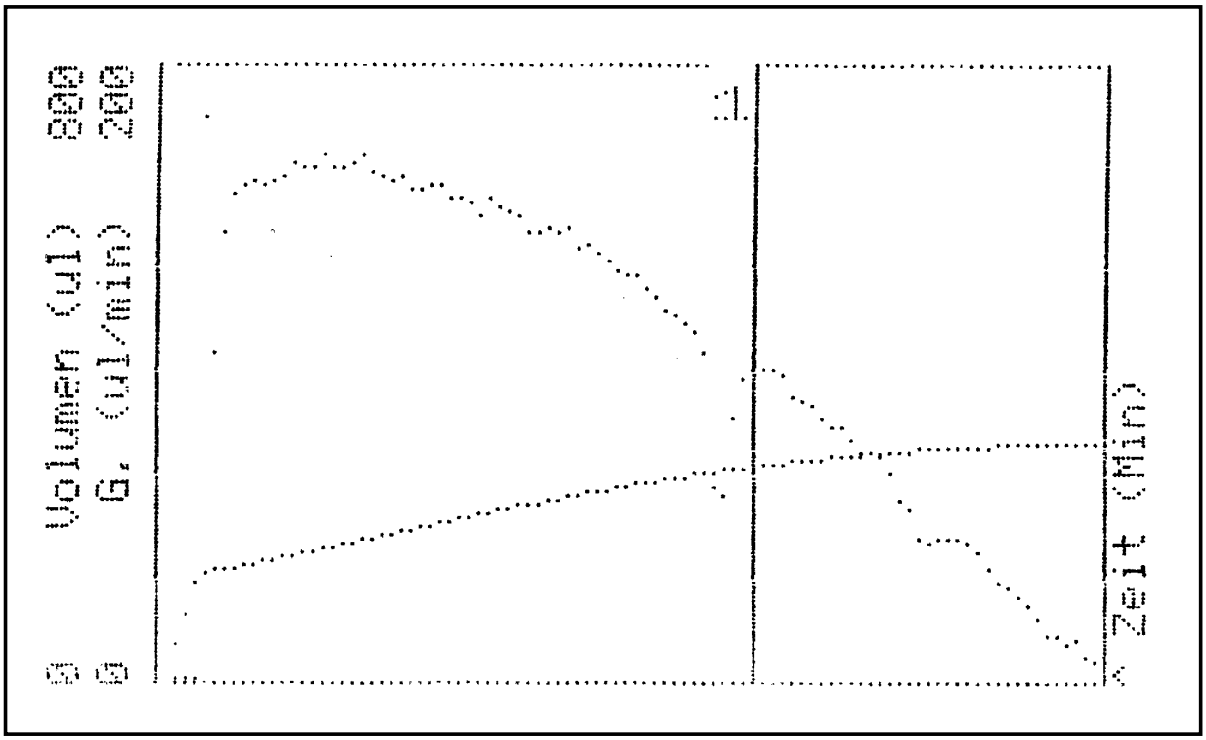

Abbildung 11 Originalregistrierung eines In-vitro-Blutungstests. Abfallende Kurve: Blutfluss G; ansteigende Kurve: Volumen. Sinkt der Blutfluss auf Null, ist die Verschlusszeit erreicht. Das Volumen zu diesem Zeitpunkt bezeichnet man als das Blutungsvolumen. Zu beachten ist die Inzisur in der Flusskurve, die bei nahezu allen Blutproben vor Ablauf einer Minute auftritt.

2.3.5 Spontane Thrombozytenaggregation

Die spontane Thrombozytenaggregation wurde sowohl mit der im Kapitel 2.3.1 beschriebene Impedanzmethode, als auch mit der Messung der reversiblen und irreversiblen Aggregate getestet.

In der Blutbahn des Menschen existiert ein Fließgleichgewicht zwischen Aggregation und Desaggregation der Thrombozyten. Unter physiologischen Bedingungen ist nur ein geringer Teil der Blutplättchen aggregiert, wobei diese Aggregation in der Regel reversibel ist.

Die Thrombozytenaggregation ist ein aktiver Prozess und läuft in mehreren Schritten ab, wobei alle Abläufe mit Ausnahme des letzten Schritts reversibel sind. Zuerst findet eine Formveränderung der Thrombozyten statt, danach eine Pseudopodenbildung und schließlich eine Anlagerung und Verschmelzung. Intrazelluläres Kalzium wird für diese Schritte benötigt.

Eine Erhöhung der Zahl reversibel aggregierter Thrombozyten zeigt eine diskrete Aktivierung an, welche noch keine Auswirkungen auf den Organismus haben muss. Eine Erhöhung der Zahl irreversibel aggregierter Thrombozyten spricht für einen klinisch relevanten Aktivitätszustand.

Nachweis reversibler Thrombozytenaggregate im zirkulierenden Blut

Zur Messung der reversiblen Thrombozytenaggregate wurde wir das Gerät „Celltrak® 11“ der Firma Nova, Frankfurt, verwendet. Die reversiblen Thrombozytenaggregate wurden dabei nach einer Modifikation der Methode von Wu und Hoak [79] quantitativ erfasst.

Messprinzip:

EDTA (Ethylen-Diamin-Tetra-Acetat) geht mit Calzium eine Chelatbindung ein, dies führt zur Desaggregation reversibel aggregierter Thrombozyten. Somit werden alle Thrombozyten im Counter gezählt.

Versetzt man die Blutproben zusätzlich zu EDTA mit Glutaraldehyd, werden alle reversiblen Aggregate fixiert. Aufgrund der Größe der Aggregate werden diese vom Counter nicht mitgezählt. Die Differenz der Thrombozytenzahlen unter EDTA und EDTA mit Glutaraldehyd entspricht somit der Anzahl reversibel aggregierter Thrombozyten.

Messprinzip des elektronischen Counters:

Für die Zählung und Größenbestimmung der Blutzellen diente die Konduktivitätsmethode. Die Blutzellen wurden durch die Verdünnungen in einer isotonischen, leitfähigen Lösung suspendiert.

Ein definiertes Volumen dieser Suspension wird durch eine Messapertur von 80 µm, die sich zwischen zwei Elektroden befindet, gesogen. Wenn elektrischer Strom durch die Lösung geleitet wird, kann eine konstante Leitfähigkeit gemessen werden, solange bis eine elektrisch schlechter leitende Zelle diese Aperatur durchquert. Hier entsteht eine kurzfristige Erhöhung des elektrischen Widerstands, der als Impuls elektronisch gezählt wird. Die Anzahl der Impulse ist proportional zu der Zellzahl im Blut und die Größe der Impulse ist proportional zum Zellvolumen.

Der verwendete Counter enthält zwei Messporen, die unabhängig voneinander arbeiten. Die Zellsuspension wird durch die Messapertur hindurchgesogen, wobei sich vor und hinter der Messapertur eine Elektrode befindet. Die durch die Zellen entstehen elektrische Impulse werden verstärkt und zu einem Analog-Digital-Wandler geleitet. Dort werden die Impulse der RBC (=red blood cell) Probe, die größer als die durch den Schwellenwert (threshold) (in Femtoliter) festgelegte Grenze sind, als Erythrozyten definiert. Die Impulse, die sich innerhalb des Thrombozyten-Schwellenwertes (PLT threshold, PLT = Platelet) (in Femtoliter) befinden, werden als Thrombozyten definiert, die Impulse der WBC Probe, die ebenfalls oberhalb des festgelegten Schellenwertes liegen, als Leukozyten. Die RBC und WBC Informationen werden zum Celltrak Computer gesandt. Dort finden eine Gültigkeitsklärung und eine Zufallskorrektur, wie unten näher erläutert, statt. Die PLT-Informationen, die zunächst eine Roh-Zählung darstellen, werden zum Computer gesandt, und dort durch einen Kalibrationsfaktor in eine endgültige Form gerechnet. Anschließend werden die Daten freigegeben und zu Anzeige (display) und Drucker gesandt.

Gültigkeitsklärung: Damit keine eventuell falschen Daten, verursacht durch eine zu geringe Zählung oder eine gestörte Messapertur, ausgegeben werden, werden die Daten zunächst geprüft und dann markiert und/oder unterdrückt. Auch bei anderen Störungen, z.B. von Hydraulik oder Elektroniksystem, werden die Daten unterdrückt.

Zufallskorrektur: Wenn die Zellen nicht einzeln, sondern in Zellhaufen vorliegen, werden sie als ein Impuls gezählt. Die Anzahl dieser Haufen ist erfahrungsgemäß konstant, weswegen eine mathematische Korrektur der gezählten Impulse durchgeführt wird, um die Anzahl der tatsächlich vorhandenen Zellen möglichst genau berechnen zu können.

Mit dem elektronischen Counter (Celltrak) wurden zusätzlich Blutbildparameter gemessen (siehe Tabelle **7** 6).

Durchführung der Messung:

Direkt nach der Blutentnahme (Klinische Studie) bzw. nach 20-minütiger Inkubation (in-vitro-Studie) wurden die Blutproben wie folgt abgefüllt:

a) EDTA-Blut (Routine-Röhrchen) zur Blutbildbestimmung.

b) 0,5 ml Blut mit EDTA-Puffer (Tabelle 3): zur Messung der irreversiblen Aggregate. Aus dieser Lösung (1:5-Verdünnung) wurden je 0,5 ml in ein THROMBO-PLUS-Röhrchen, der Firma SARSTEDT, Nürnbrecht, gegeben, aus welchem dann nach gründlicher Mischung die Zählkammer beschickt wurde.
c) 0,5 ml Blut mit EDTA-Puffer und Glutaraldehyd (Tabelle 3): zur Messung der reversiblen und irreversiblen Aggregate am elektronischen Counter.

Nach 60 Minuten Ruhezeit wurden die Blutproben für die Messung am Counter folgendermaßen vorbereitet:

zu a)

Nach automatischem Aspirieren von 320 µl Probe aus dem EDTA-Röhrchen wurde die Probe während des Transports durch ein sich drehendes Ventil (rotary valve) über zwei spezielle Kanäle in zwei festgelegte Volumina aufgeteilt. Der eine Kanal ist der RBC (red blood cell) Kanal, welcher 1,6 µl Probe enthält, die anschließend mit 12,0 ml der D-Lösung (acidfreie isotonische Lösung zur Verdünnung der Blutproben)verdünnt und in eine Verdünnungskammer (RBC/PLT dilution chamber) gegeben wurde. Die Probe ist nun 1:7500 verdünnt und wird in dieser Verdünnung zur Bestimmung der Erythrozyten und Thrombozyten verwendet. Der andere Kanal ist der WBC (white blood cells) Kanal. Er enthält 40 µl Probe, die anschließend mit 9,96 ml L-Lösung (Lyse-Reagenz zum Auflösen der Erythrozytenmembran) verdünnt und in eine weitere Verdünnungskammer (WBC/Hb dilution chamber) gegeben wurde. Diese Verdünnung (1:250) wurde zur Bestimmung der Leukozyten und des Hämoglobin verwendet.

Aus den beiden Verdünnungen dieser Probe wurden somit Erythrozytenzahl, Leukozytenzahl, Hämoglobinkonzentration, Hämatokrit, Thrombozytenzahl, mittleres Erythrozytenvolumen und mittleres Thombozytenvolumen bestimmt.

zu b) und c)

Aus der 1:5 verdünnten Blutprobe wurden 200 µl in ein Probengefäß (Fa. Nova, Frankfurt am Main) pipettiert und mit der PREDIL-Taste und der Verdünnungstaste (dispense) des Geräts 10 ml der D-Lösung dazugegeben (Verdünnung 1:250). Mit dieser ersten Verdünnung bestimmte man nach Zugabe von zwei Tropfen Lyse-Reagenz (Lysing/Hemoglobin Reagent, Fa.

NOVA, Frankfurt am Main) die Leukozyten und das Hämoglobin, indem die Verdünnung manuell in die Verdünnungskammern (WBC/Hb dilution chamber) gegeben wurde. Die zweite Verdünnung erfolgte mit Hilfe der Verdünnungsfunktion (1:30) (aspir/dispense) des Geräts. Durch die Vorverdünnung (1:5) entspricht dies einer Verdünnung von 1:7500. Diese zweite Verdünnung wurde anschließend in die anderen Verdünnungskammern (RBC/PLT dilution chamber) gegeben um die Erythrozyten und die Thrombozyten zu bestimmen. Diese manuelle Verdünnung wurde wegen der durch die Fixierlösung vorverdünnten Proben erforderlich.

Bestimmung der Thrombozytenaggregate:

Es wurde die Thrombozytenzahl, sowie das mittlere Plättchenvolumen (MPV) bestimmt. Das Fenster für das Thombozytenvolumen wurde zwischen 2 und 20 fl gewählt.

Die Berechnung des Anteils reversibler Aggregate erfolgte nach:

Gleichung 1 Berechnung des prozentualen Anteils reversibel aggregierter Thrombozyten

$$A_r = 100\ \% - 100\ \% * T_E * E_G / E_E * T_G$$

A_r	Reversibel aggregierte Thrombozyten
T_E	Thrombozyten in EDTA-Blut
T_G	Thrombozyten in Glutaraldehyd-fixierten Blut
E_E	Erythrozyten in EDTA-Blut
E_G	Erythrozyten in Glutaraldehyd-fixierten Blut

Die zur Auswertung vorgesehenen Parameter zeigt Tabelle 7.

Nachweis irreversibler Thrombozytenaggregate im zirkulierenden Vollblut:

In dieser Arbeit wurde eine Fortentwicklung des Objektträgertests von Velaskar und Chitre [80] verwendet.

Messprinzip:

Irreversibel aggregierte Thrombozyten, welche infolge von Aktivierung durch Desintegration und Verschmelzung der Thrombozytenmembran in-vivo entstanden sind, werden im EDTA-Puffer nicht desaggregiert, sondern bleiben bestehen. Sie können mittels einer geeichten Zählkammer im Phasenkontrastmikroskop quantitativ erfasst werden.

Durchführung der Messung:

Unmittelbar nach der Blutentnahme bzw. 20-minütiger Inkubation wurde die Blutprobe im Verhältnis 1:5 mit EDTA-haltiger, isotoner Lösung verdünnt und über mindestens 30 Minuten auf einem Kippbänkchen bewegt, um eine maximale Desaggregation der Plättchen herbeizuführen. Anschließend wurden 0,5 ml aus der EDTA-Blutprobe mit einer $HgCl_2$-Lösung (Thrombo plus® der Firma SARSTEDT, Nürnbrecht) versetzt, um die Erythrozyten selektiv zu hämolysieren. Die Integrität der Thrombozyten bleibt dabei erhalten. Mit der daraus resultierenden Lösung wurde dann nach gründlicher Mischung eine hinsichtlich des Volumens geeichte Neubauer-Zählkammer beschickt. Mit dem Phasenkontrastmikroskop der Firma Leica, Wetzlar, wurden 0,2 µl der Probe im Rahmen einer Doppelbestimmung ausgezählt.

Es wurden Thrombozytenaggregate ausgezählt, welche aus je zwei, drei, vier oder fünf Thrombozyten bestanden. Es wurden jeweils zwei äußere Quadranten (Eckquadrate) ausgezählt, für jede Probe wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt (siehe Abbildung 12).

Das Volumen eines Eckquadrates der Neubauer-Zählkammer beträgt 0,1 µl.

1		1
2		2

Abbildung 12 Ausgezählte Quadranten der Zählkammer

Die mit 1 gekennzeichneten Quadranten wurden für die erste Bestimmung einer Probe ausgezählt.

Die mit 2 gekennzeichneten Quadranten wurden für die zweite Bestimmung einer Probe ausgezählt.

Hieraus konnte das Verhältnis von irreversibel aggregierten Thrombozyten zur Anzahl nicht irreversibel aggregierter Thrombozyten gemäß Gleichung 2 errechnet werden.

Gleichung 2 Berechnung des prozentualen Anteils irreversibler Aggregate

$$A_i = 100\% * \sum_{j=1}^{n} (A_j \times j) / T_E$$

A_i irreversibel aggregierte Thrombozyten

A_j Konzentration der Aggregate, die j Thrombozyten enthalten

T_E Konzentration der Thrombozyten in EDTA-Blut

2.3.6 Aktivierung der plasmatischen Gerinnung

Um umfassende Aussagen über die Hämostase machen zu können, wurden Screeningtests zur Detektion von Aktivatoren der plasmatischen Gerinnung durchgeführt.

Es wurden folgende Messungen durchgeführt:

- Thromboplastinzeit (TPZ)
- Aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT)
- Nicht-aktivierte partielle Thromboplastinzeit (naPTT)
- Oberflächenaktivierte Rekalzifizierungszeit (aRCT)
- Rekalzifizierungszeit (RCT)

Thromboplastinzeit und aktivierte partielle Thromboplastinzeit stellen dabei die Referenzmethoden dar. Nicht aktivierte PTT, oberflächenaktivierte Rekalzifizierungszeit und Rekalzifizierungszeit sind Varianten, die durch Auslassen von Komponenten der Testreagenzien die Existenz eben dieses Aktivierungsprinzips in der zu untersuchenden Plasmaprobe nachweisen.

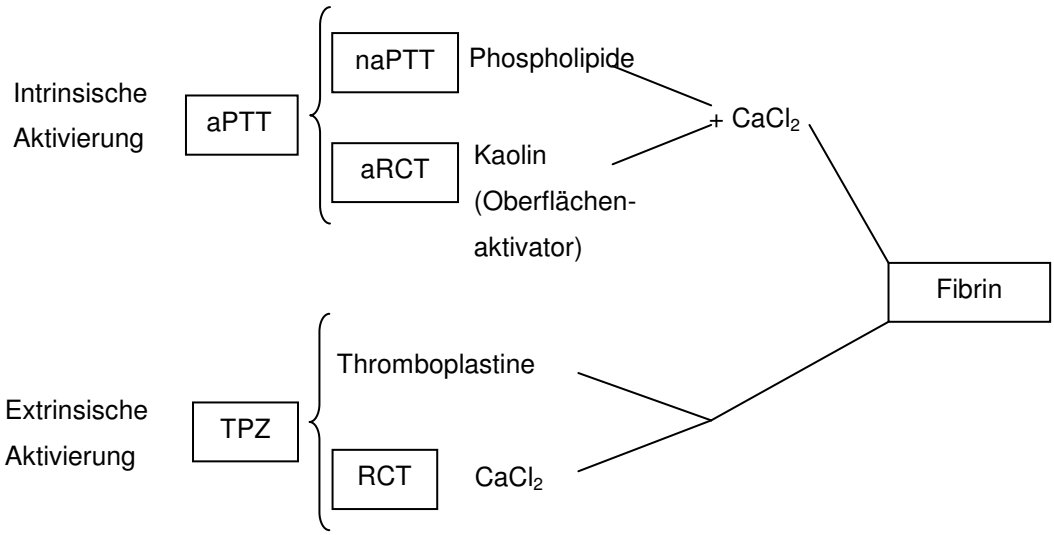

Abbildung 13 Schema zur Thromboplastinzeit (TPZ) und aktivierter Thromboplastinzeit (aPTT) sowie deren Varianten: Rekalzifizierungszeit (RCT), aktivierte Rekalzifizierungszeit (aRCT) und nicht-aktivierte partielle Thromboplastinzeit (naPTT) zum Nachweis der plasmatischen Gerinnungsaktivierung.

Für die Gerinnungsbestimmungen wurde das KOAGULOMETER KC 10 der Firma AMELUNG (Lemgo, Deutschland) verwendet.

Messprinzip:

Das Koagulometer arbeitet nach der Kugelmethode. In ein schräg gelagertes Röhrchen, das sich um seine eigene Längsachse dreht, wird eine Stahlkugel gegeben. Durch ihre Schwerkraft wird die Kugel exakt an einer vorgegebenen Stelle gehalten, vor der sich ein magnetischer Sensor befindet. Beim Einsetzen der Gerinnung wird die Kugel vom Gerinnsel fixiert und mit in die Drehung des Röhrchens genommen. Dadurch wird sie aus dem Registrierbereich entfernt. Der Sensor registriert die Veränderung und der Zeitzähler der Messstelle wird gestoppt. Anschließend werden alle Daten an den dazugehörigen Rechner CR 10 übermittelt und dort protokolliert, ausgewertet und gedruckt.

Für alle Messungen wurden folgende Reagenzien der Firma BOEHRINGER MANNHEIM verwendet: Neoplastin®Plus, PTT-Reagenz®, $CaCl_2$ 0,025 mol/l.

Vorbereitung der Plasmaproben:

Die Herstellung des Plasmas wird im Kapitel Zentrifugen (2.3.9.1) genau beschrieben, und ist in der Übersicht in Tabelle 3 beschrieben. Es wurden Plasmen verwendet, die aus der obersten Schicht der zentrifugierten Probengefäße entnommen wurden, da diese am wenigsten zelluläre Bestandteile aufweisen und deshalb für die Messungen am besten geeignet sind. Die eingefrorenen Blutplasmen wurden kurz vor den Messungen schnell aufgetaut bis sie 37° C erreicht hatten.

Thromboplastinzeit (TPZ):

Die Thromboplastinzeit überprüft die Aktivierbarkeit und Funktion der Gerinnungsfaktoren V, VII, X, Prothrombin und Fibrinogen.

Durch gleichzeitige Zugabe von unmittelbaren Aktivatoren des Gerinnungsfaktors VII, sogenannten Thromboplastinen, und Calziumchlorid wird die extrinsische Gerinnungskaskade aktiviert und so die Fibrinbildung ausgelöst.

Durchführung der Messung:

200 µl Neoplastin® Plus-Reagenz (Kaninchenhirn-Thromboplastin mit Calcium-Ionen), welches kurz zuvor gemäß Anleitung gebrauchsfertig hergestellt worden war, wurde zu 100 µl Plasma (180 s bei 37° C vorgewärmt) hinzugefügt. Anschließend wurde die Zeit bis zum Gerinnungseintritt gemessen.

Aktivierte partielle Thromboplastinzeit:

Die aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT) überprüft die Aktivierbarkeit und Funktion der Gerinnungsfaktoren XII, XI, IX, VIII, V, X, Prothrombin und Fibrinogen.

Die Aktivierung des Faktors XII verläuft unabhängig von Calzium. Sie wurde zunächst vollständig mittels eines Gemisches aus Oberflächenaktivatoren und Phospholipiden, sogenannten partiellen Thromboplastinen, ausgelöst. Im Anschluss daran wurde durch Calziumchlorid Faktor XI und damit die intrinsische Gerinnungskaskade aktiviert, als deren Endstufe Fibrin entsteht.

Durchführung der Messung:

100 µl Plasmaprobe wurde mit 100 µl Gemisch aus dem partiellen Thromboplastin Kephalin (Phospholipid aus Kaninchenhirn) und dem Oberflächenaktivator Kaolin (PTT-Reagenz®) versetzt und 180 s bei 37° C inkubiert. Dadurch wird eine Aktivierung der Faktoren XII und XI ausgelöst. Durch die nachfolgende Zugabe von 200 µl $CaCl_2$-Lösung (Ca^{++}- Ionen) wurde die weitere Aktivierung des endogenen (intrinsischen) Gerinnungssystems bis zur Fibrinbildung in Gang gesetzt. Gemessen wurde die Zeit von der Zugabe von $CaCl_2$ bis zur Bildung eines Fibringerinnsels.

Nicht-aktivierte partielle Thromboplastinzeit (naPTT) (ohne Kaolin):

Die naPTT prüft eine Plasmaprobe auf vorangegangene Oberflächenaktivierung[81,82,83,84]. Hierzu wird die aPTT ohne den Oberflächenaktivator Kaolin angesetzt.

100 µl Plasmaprobe wurde mit 100 µl Kephalin (Flasche 2 aus dem PTT-Reagenz®), welches statt mit Kaolin mit Owren`s Puffer aufgelöst worden war, 180 s bei 37° C inkubiert. Anschließend wurde mit 200 µl $CaCl_2$ -Lösung die Gerinnung gestartet und die Zeit bis zum Auftreten des Gerinnsels gemessen. Die naPTT wurde auf die PTT bezogen. Als Darstellung im Ergebnisteil wurde der Prozentsatz der Überschreitung der aPTT gewählt. Die Berechnung erfolgte nach folgender Gleichung:

$$\text{naPTT [\%]} = 100\ \% * \text{naPTT [s]} / \text{aPTT [s]} - 100\ \%$$

Oberflächenaktivierte Rekalzifizierungszeit (aRCT) (ohne Phospholipide):

Die oberflächenaktivierte Rekalzifizierungszeit (aRCT) überprüft eine Plasmaprobe auf gerinnungsaktive Phospholipide. Die aPTT wird ohne die Phospholipidlösung (Kephalin) angesetzt.

Dazu wurden 100 µl Plasmaprobe mit 100 µl Kaolin (Flasche 2 aus dem PTT-Reagenz®) versetzt und 180 s bei 37° C inkubiert. Mit der Zugabe von 200 µl $CaCl_2$ -Lösung wurde die Gerinnung gestartet, und die Zeit bis zum Auftreten des Gerinnsels gemessen. Für die aRCT wurde die aPTT als Bezugsgröße gewählt. Im Ergebnisteil wurde als Resultat dieser Messung

der Prozentsatz der Überschreitung der aPTT angegeben, der nach folgender Gleichung berechnet wurde.

$$aRCT\ [\%] = 100\ \% * aRCT\ [s] / aPTT\ [s] - 100\ \%$$

Rekalzifizierungszeit (RCT)

Die Rekalzifizierungszeit überprüft eine Plasmaprobe auf thromboplastische Aktivität. Zur Plasmaprobe wird $CaCl_2$ -Lösung gegeben, so dass durch vorangegangene Aktivierung von Gerinnungsfaktoren, insbesondere Faktor VII, die Gerinnungskaskade ausgelöst wird, was in diesem Fall durch Lipidinfusionen geschehen sein mag.

Dazu wurden 100 µl Plasmaprobe 300 s bei 37° C inkubiert, anschließend mit 200 µl eines vorgewärmten 1:1-Gemisches aus einer 0,9 %-igen NaCl–Lösung und einer $CaCl_2$-Lösung (0,025 mol/l) versetzt, und die Zeit gestartet. Für die RCT wurde die TPZ als Bezugsgröße gewählt. Als Resultat dieser Messung wurde im Ergebnisteil das Verhältnis zur TPZ verwendet, das gemäß folgender Gleichung berechnet wurde:

$$RCT\ [1] = RCT\ [s] / TPZ\ [s]$$

2.3.7 Thrombozytenaktivierungsmarker

β-Thromboglobulin (β-TG) ist ein thrombozytenspezifisches Protein, welches in den α-Granula der Plättchen gespeichert ist. Bei Aktivierung entleeren sich diese Speichergranula in das Plasma, wo β-TG eine geschätzte Halbwertszeit von 100 Minuten hat. Die Elimination erfolgt über die Niere, was eine normale Nierenfunktion voraussetzt.

Für die Messung des Thrombozytenaktivierungsmarkers β-Thromboglobulin wurde der enzymimmunologische In-vitro-Test ASSERACHROM® β-TG der Firma Boehringer Mannheim, benutzt. Das Lesegerät zur photometrischen Auswertung der Mikrotiterplatten stammte von der Firma Behring, Marburg.

Messprinzip:

Das für die Messung benötigte plättchenarme Plasma wurde in CTAD-Probengefäßen abgenommen, welche neben dem Antikoagulanz Citrat (0,11 Molar) die Inhibitoren der Thrombozytenaktivierung Theophillin, Adenosin und Dipyridamol enthielten. Theophillin und Dipyridamol hemmen die cAMP-Phosphodiesterase, Adenosin stimuliert die Membran-Adenylatcyclase. Dadurch wird die cAMP-Konzentration in den Thrombozyten erhöht, was ihre Aktivierbarkeit deutlich herabsetzt, so dass bei der Probenaufbereitung keine Freisetzung von β-TG auftritt. An der Wand sind im Überschuss β-Thromboglobulin-spezifische Antikörper F(ab´)$_2$-Fragmente fixiert. Das im Plasma frei vorhandene β-TG reagiert in einer ersten Immunreaktion bei Probenzugabe mit diesen wandfixierten Antikörpern. Anschließend werden die nicht antikörper-gebundenen Plasmabestandteile und Störfaktoren ausgewaschen (siehe Abbildung 14).

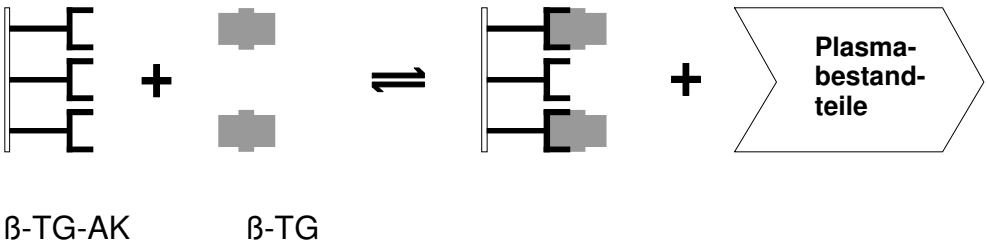

Abbildung 14 Erste Immunreaktion

Da das β-TG mehrere antigene Determinanten besitzt, werden Peroxidase-markierte β-TG-Antikörper im Überschuss zugesetzt. Diese bilden in einer zweiten Immunreaktion Sandwich-Komplexe mit β-TG. Dadurch ist das Antigen beidseitig von Antikörpern umgeben.

Je mehr β-TG in der Plasmaprobe enthalten ist, umso mehr peroxidasemarkierte Antikörper werden gebunden. Im nachfolgenden Waschschritt wird das nicht gebundene Peroxidase-Konjugat entfernt (siehe Abbildung 15).

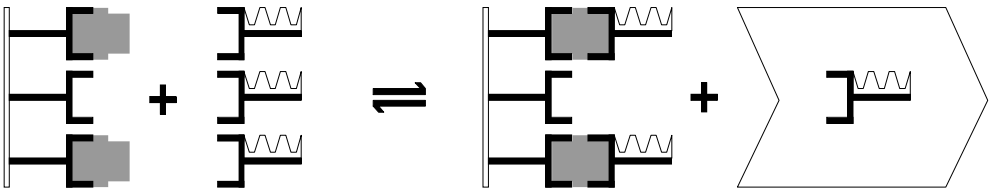

Abbildung 15 Zweite Immunreaktion

In der Indikatorreaktion wird die an der Röhrchenwand gebundene Enzymaktivität durch Zusatz von Substrat (o-Phenylendiamin [O.P.D.], H_2O_2) über eine Farbreaktion photometrisch bei 492 nm bestimmt. Aufgrund der Proportionalität von gebundener Enzymaktivität und Antigenkonzentration steigen die gemessenen Extinktionen mit steigender β-TG-Konzentration in der Probe an (siehe
Abbildung **16**).

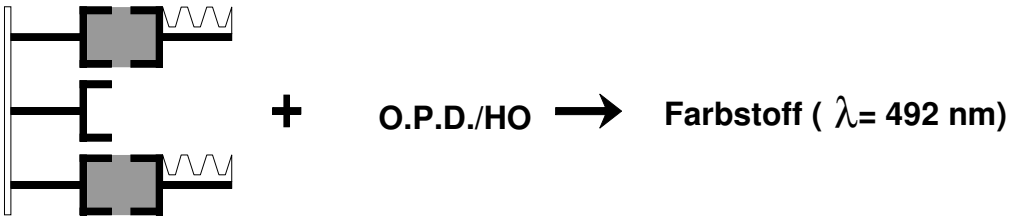

Abbildung 16 Indikatorreaktion

Abbildung 17 Legende

Die Auswertung wird mit Hilfe einer Verdünnungsreihe aus β-TG-Standard und einer Bezugskurve erstellt.

Durchführung der Messung:

Die Proben in den CTAD-Gefäßen wurden im Eiswasserbad sofort nach der Blutabnahme gekühlt und in der Kühlzentrifuge (siehe 2.3.9.1) wie in Tabelle 3 beschrieben zentrifugiert und weiterverarbeitet. Nach der zweiten Zentrifugation wurde das plättchenarme Plasma sofort bei -80°C eingefroren. Es wurde unmittelbar vor der Messung 15 Minuten bei 37°C aufgetaut, und anschließend im Verhältnis 1:10 mit Pufferlösung (bestehend aus Albumin, Tween® 20, Phosphatpuffer, Asserachrom® β-TG, Boehringer, Mannheim) verdünnt. Dann wurden 200 µl dieser Verdünnung in die beschichtete Mikrotiterplatte gegeben. Nach Inkubation von einer Stunde bei Raumtemperatur und einem Waschvorgang (Waschlösung bestehend aus NaCl und Tween®20) wurden 200 µl des Immunkonjugats hinzugegeben. Nach einer weiteren einstündigen Inkubation und Waschen wurde die Farbreaktion mit 200 µl Wasserstoffperoxyd/ o-Phenylendiamin als Substrat ausgelöst. Die Reaktion wurde nach exakt drei Minuten gestoppt. Die Extinktion wurde bei 492 nm bestimmt.

2.3.8 Triglyceride im Serum

Bei der Klinischen Studie wurden als weiterer Laborparameter die Triglyceride bestimmt.
Für die Bestimmung wurden Testreagenzien der Firma Boehringer Mannheim verwendet. Die Messung wurde am automatischen photometrischen Messgerät vorgenommen.

Messprinzip:

Durch enzymatische Spaltung der Triglyceride entstehen freie Fettsäuren und Glycerin. Diese können photometrisch bestimmt werden, was hier nach dem Standardverfahren der deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie durchgeführt wurde.

Blutbild

Die Bestimmung des Blutbildes ist unter 2.3.5 beschrieben.

2.3.9 Laborhilfsgeräte

2.3.9.1 Zentrifugen

Kühlzentrifuge, DAMON/IEC DIVISION; NUNC, Needham Heights, USA

Diese Zentrifuge diente zur Herstellung des Blutplasmas für die plasmatischen Gerinnungsmessungen und für die Messung von β-Thromboglobulin.

Nach der Inkubation mit den Lipiden, bzw. direkt nach Blutentnahme bei der Klinischen Studie, wurden die Blutproben zwei Minuten auf Eis gekühlt und anschließend in dieser Zentrifuge 15 Minuten bei 3000 x g und 4° C zentrifugiert.

Für die Proben zur Gerinnungsmessung wurde der Überstand in vier verschiedenen Portionen aufgeteilt, wobei immer zuerst das Plasma von oben abpipettiert wurde. Die oberste Schicht (700 µl) wurde nochmals in der Tischzentrifuge (siehe unten) abzentrifugiert. Die zweite und dritte Schicht enthielten je 250 µl Plasma, die vierte Schicht das restliche Plasma (0 - 200 µl). Alle Plasmen wurden anschließend bei -80° C eingefroren.

Zentrifuge Rotixa KS

Zur Herstellung von PRP und PPP für die optische Messung wurde diese Zentrifuge verwendet. Das Patientenblut wurde direkt nach der Blutabnahme, die Blutproben der Probanden nach der Inkubation mit den Lipiden zentrifugiert.

PRP wurde mit 250 x g über 15 Minuten bei 22°C hergestellt. Zur Herstellung des als Referenz benötigten PPP wurde das Sediment erneut mit 3000 x g (10 Minuten, 22°C) zentrifugiert.

Tischzentrifuge BIOFUGE PICO, HERAEUS, OSTERODE

Diese Zentrifuge diente zur Herstellung von Plasma für die thrombozytären Aktivierungsmarker (siehe Tabelle 3). Der oberste Teil des Überstands der Plasmen, die mit der Kühlzentrifuge (siehe oben) hergestellt worden waren, wurde hier ein zweites Mal bei 13.000 x g über drei Minuten zentrifugiert, in ein frisches Gefäß abpipettiert und bei -80° C eingefroren.

2.3.9.2 Zählkammer und Mikroskop

Zur Messung der irreversiblen Thrombozytenaggregate dienten eine Neubauer-Zählkammer sowie ein Phasenkontrastmikroskop mit 400-facher Vergrößerung. Die Berechnung der Thrombozytenaggregate wird in Kapitel 2.3.5 beschrieben.

2.3.10 Laborhilfsmittel

2.3.10.1 Hilfsmittel und Chemikalien

Für die Durchführung der Untersuchungen wurden folgende Hilfsmittel und Chemikalien verwendet:

Tabelle 5 Verwendete Laborhilfsmittel und Chemikalien

Puffer/Lösung/Reagenz	Zusammensetzung/ Konzentration	Hersteller	Verwendung
Kollagen	1mg native Kollagen Typ I-Fasern (Pferd)/ml isotonischer Glucoselösung, pH 2,7	Chronolog, Havertown, USA	Induktion der Plättchenaggregation in Vollblut und PRP
Kalziumchlorid-Lösung	0,025 mol/l $CaCl_2$	Boehring, Mannheim	Aktivator für Tests der plasmatischen Gerinnung
Deproteinisierungslösung	Na-Hypochlorid 3%	NOVA, Waltham, USA	Reinigung der Chronolog®-Elektroden; Reinigung Celltrak®
Lyse-Reagenz		NOVA, Waltham, USA	Lysieren der Erythrozytenmembranen zur Hb-Bestimmung im Counter (Celltrak®)

Immersionsöl	Paraffinöl DAB 6	Hellige, Freiburg.	Überschichten des Testansatzes im TEG; Phasenkontrast-mikroskopie
Glucose 5%-Lösung	5 g wasserfreie Glucose/100 ml	Braun, Melsungen	Stabilisator für Vollblut
Citrat	40 g Natrium-Citrat Haemonetics ad 1000ml	Haemonetics, München	Antikoagulanz für Vollblut

Zum Abwiegen der Chemikalien wurde die Laborwaage Typ 1712 der Firma Sartorius, Göttingen verwendet.
Zum Pipettieren wurden Eppendorf®-Pipetten (Eppendorf, Hamburg) benutzt.
Für kleine Volumina (5-20 µl) diente die Mikropipette von Chronolog, Haverton, USA.

2.3.10.2 Lipidlösungen

Alle verwendeten Lipidlösungen wurden unmittelbar nach dem Öffnen verarbeitet. Die Konzentration in den Blutproben entspricht der Konzentration, die bei parenteraler Ernährung beim Patienten erreicht wird, d.h. ungefähr 5 g/l entspricht. Zusätzlich wurde eine zehnfach verdünnte Konzentration (0,5 g/l) verwendet, um eine weitere Konzentration zu erfassen.
Zusammensetzung und Hersteller der vier im Rahmen dieser Studie verwendeten Lipidlösungen sind in Tabelle 6 zusammengefasst. Als Negativkontrolle inkubierten wir je eine Blutprobe mit physiologischer Kochsalzlösung zu identischen Bedingungen.

Tabelle 6 Im Rahmen der Studie verwendete Lipidlösungen

Nr.	**Handelsname und Hersteller**	**Zusammensetzung 1000 ml enthalten (ad Wasser für Injektionszwecke)**					**pH-Wert**	**Osmolarität**	**Energie-Wert**
		Sojabohnenöl	Glycerol	Phospholipide aus Ei, (3-sn-Phosphatidylcholin)	Davon Phosphatidylcholin	Sonstiges		mosmol/l	kJ/l
1	**Intralipid 20%** Pharmacia GmbH, Erlangen	200g	22g	12g	100%	Natriumhydroxid	8,0	270	8400
2	**Lipovenös 20%** Fresenius AG, Bad Homburg	200g	25g	12g	73-80%	Natriumhydroxid, Natriumoleat	6,5 - 8,7	273	8400
3	**Lipofundin MCT 20%** B. Braun AG, Melsungen	100g	25g	12g	>68%	mittelkettige Triglyceride 100g, Natriumoleat	6,5-8,5	380	7990
4	**Salvilipid 20** Clintec Salvia GmbH& Co.OHG Homburg/ Saar	200g	25g	12g	60%	Natriumoleat 0,3g, Natriumhydroxid	7-9		8400

2.4 Zur Auswertung vorgesehene Merkmale

Alle Parameter, welche zur Auswertung vorgesehen sind, sind in Tabelle 6 zusammengefasst.

Tabelle 7 Zur Auswertung vorgesehene Merkmale

Merkmale	Messung von	Einheit	Abkürzung	Messgerät
Spontanaggregation nach Cardinal und Flowers im Vollblut	Spontanaggregation	Ohm/h	SA	Chronolog
	Kollagen-induzierte Aggregation im Vollblut	Ohm	KV	
	Maximale Steigung	Ohm/h	SV	
Plättchenaggregation Optische Messung im PRP nach Born	Kollageninduzierte Aggregation im PRP	%	KP	Chronolog
	Maximale Steigung	%/min	SP	
Thrombelastographie	Reaktionszeit	Min	r	Thrombelastograph
	Kontraktionszeit	Min	k	
	Maximale Amplitude	Mm	a	
In-vitro-Blutungstest	Initialer Blutfluss		IF	PFA
	Blutungsvolumen		BV	
	Okklusionszeit		OT	
Zirkulierende Thrombozytenaggregate nach Wu und Hoak	Zirkulierende Aggregate	1/µl	ZA	Elektronischer Counter, Mikroskop
	Reversible Aggregate	1/µl	RA	
	Kleine irreversible Aggregate	2 Plättchen	KA	
	Mittlere irreversible Aggregate	3 Plättchen	MA	

	Große irreversible Aggregate	4 Plättchen	GA	
	Sehr große irreversible Aggregate	5 Plättchen	GGA	
Plasmatische Gerinnung	Thromboplastinzeit (Quick)	S	TPZ	Kugelkoagulometer
	Aktivierte partielle PTT	S	aPTT	
	Nicht-aktivierte partielle PTT	S	naPTT	
	Oberflächenaktivierte Rekalzifizierungszeit	S	aRCT	
	Rekalzifizierungszeit	S	RCT	
Aktivierungsmarker	β-Thromboglobulin		β-TG	Photometer
Blutbild	Leukozytenzahl	1000/µl	WBC	Elektron. Counter
	Erythrozytenzahl	1000/µl	RBC	
	Hämoglobin	g/dl	Hb	
	Mittleres korpuskuläres Volumen	fl	MCV	
	Thrombozyten	1000/µl	PLT	
	Mittleres Plättchenvolumen	fl	MPV	
Blutfette	Triglyceride	mg %		Photometer

2.5 Statistische Auswertung

2.5.1 Datenanalyse der Klinischen Studie

Ziel

Es sollte geklärt werden, inwieweit die parenterale Applikation von Fettemulsionen einen Einfluss auf die Blutgerinnung, insbesondere die Thrombozytenaktivität ausübt.

Datenanalyse

Unterschiede hinsichtlich des Messzeitpunktes oder der Gruppenzugehörigkeit wurden mit der zweifaktoriellen Varianzanalyse mit Messwertwiederholung auf dem Faktor "Zeit" geprüft. Das heißt, Daten werden von n Patienten zu m Messzeitpunkten gewonnen. Während die Messwerte unterschiedlicher Patienten *unabhängig* sind, sind die Messwerte eines Patienten zu unterschiedlichen Zeitpunkten als *abhängig* zu betrachten.

Die Überprüfung der Übereinstimmung der biometrischen Daten (Körpergewicht, Größe, Alter, Geschlecht), die vom Zeitpunkt unabhängig sind zwischen beiden Gruppen, erfolgte mit dem t-Test für unverbundene Stichproben beziehungsweise dem Chi-Quadrat-Test für die Geschlechtsverteilung. Das Signifikanzniveau wurde auf eine Irrtumswahrscheinlichkeit von p=0,05 festgesetzt.

2.5.2 Datenanalyse der In-Vitro Untersuchung

Ziel

Das Ziel der In-vitro Untersuchung war es zunächst, den unmittelbaren Einfluss der vier unterschiedlichen Infusionslösungen (sieheTabelle 6) auf die Thrombozytenaktivität zu überprüfen. Weiterhin sollte untersucht werden, inwieweit es diesbezügliche Unterschiede zwischen den Präparaten gibt.

Datenauswertung

Die Abhängigkeit der Messgrößen vom gewählten Präparat wurde jeweils getrennt für die Lipidkonzentration von 5 g/l und 0,5 g/l überprüft. Dabei kamen der Friedmann-Test, im Falle

der Signifikanz post hoc der Miller-Test zur Anwendung. Das bedeutet, dass der Friedmann-Test aussagt, dass es Unterschiede zwischen den Messzeitpunkten gibt, jedoch nicht zwischen welchen. Der post-hoc-Test wird nur angewendet, wenn der Friedmann-Test Signifikanz ergibt. Unter verschiedenen möglichen Tests wurde hier der Miller-Test verwendet.

2.5.3 Berechnung der Statistik

Die Daten wurden mittels Microsoft-Excel®, Fa Microsoft, erfasst. Die Berechnung der statistischen Größen nahmen wir mit dem Programm SPSS, Fa. SPSS, vor.

3 Ergebnisse

In den beiden Ergebnistabellen **Tabelle 8** und **Tabelle 9**, welche im Anhang zu finden sind, sind die Werte für sämtliche Messungen der beiden Studienteile zusammengefasst.

3.1 Vollblutaggregometrie

Am Vollblutaggregometer wurden die Spontanaggregation, die maximale Aggregation und die maximale Steigung gemessen.

- Die Spontanaggregation spiegelt das Verhalten der Plättchen nach Ablauf der Aufwärmphase (10 min bei 37°C) wieder.
- Die maximale Steigung gibt die Geschwindigkeit der Plättchenaggregation nach Zugabe von Kollagen an.
- Die maximale Aggregation zeigt, ob es nach Zugabe von Kollagen zu einer normalen Plättchenaggregation kommt. Die Spontanaggregation ist in Relation zur maximal möglichen zu sehen.

3.1.1 Klinische Studie

Alle Patientenproben hatten eine leichte Tendenz zur Spontanaggregation, welche sich zwischen den Werten 0,1 Ohm/h und 3,6 Ohm/h abspielte.
Alle drei Messungen ergaben hinsichtlich des Messzeitpunkts keine statistisch signifikanten Unterschiede (siehe Abbildung 18, Abbildung 19, Abbildung 20). Auch zwischen Studien- und Kontrollgruppe wurden keine signifikanten Unterschiede gemessen.

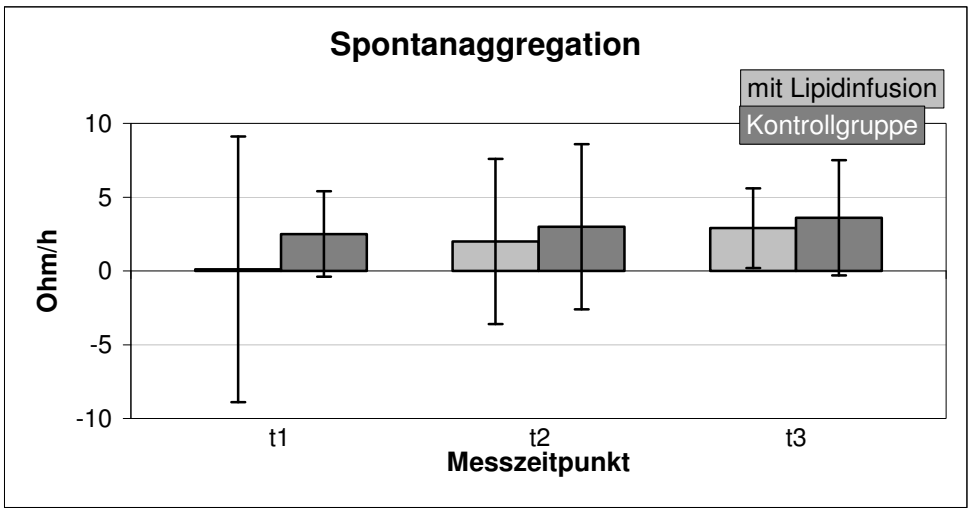

Abbildung 18 Vollblutaggregometrie in der Klinischen Studie, Spontanaggregation . Dargestellt sind, wie in den folgenden Abbildungen, Mittelwerte x (dicke graue Säulen) und Standardabweichungen x±s (vertikale schwarze Linien in den Säulen). Statistisch signifikante Unterschiede zeigten sich nicht.

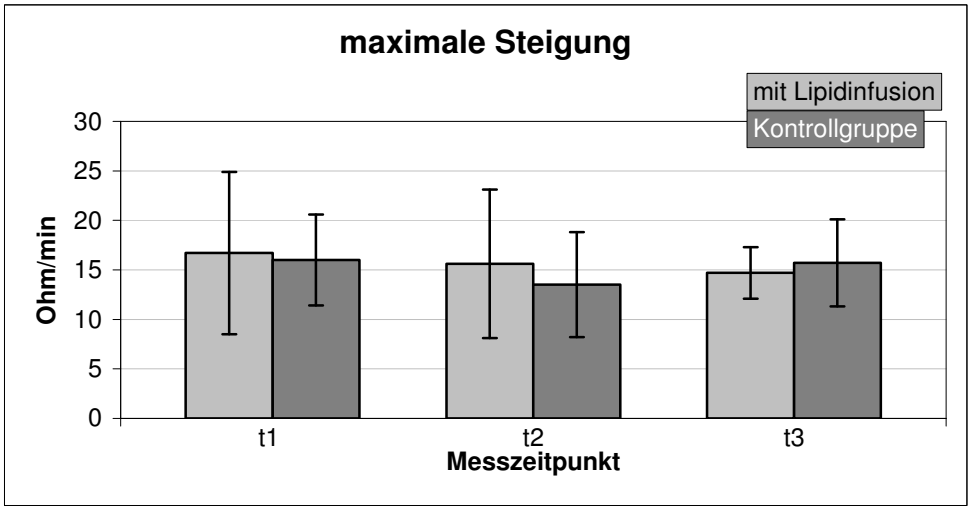

Abbildung 19 Vollblutaggregometrie in der Klinischen Studie, maximale Steigung. Dargestellt sind Mittelwerte x und Standardabweichungen x±s. Statistisch signifikante Unterschiede waren nicht zu messen.

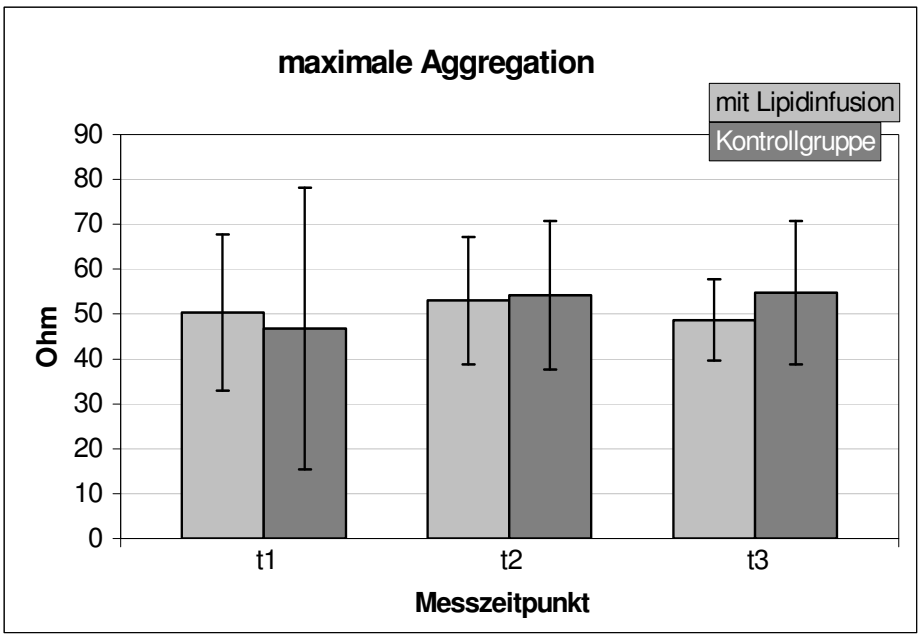

Abbildung 20 Vollblutaggregometrie in der Klinischen Studie, maximale Aggregation. Dargestellt sind Mittelwerte x und Standardabweichungen x±s. Es waren keine statistisch signifikanten Unterschiede festzustellen.

3.1.2 In-vitro-Untersuchung

Spontanaggregation (siehe Abbildung 21)

Bei fast allen Messproben ergab sich eher eine Neigung zur Desaggregation als zur Aggregation. Auch die Kontrollblutprobe zeigte eine Desaggregation von -0,6 Ohm/h. Nur in der höher konzentrierten Lipofundin®-Messprobe war eine Aggregation von 1,3 Ohm/h zu beobachten. Die Werte der Desaggregation lagen zwischen -1,5 Ohm/h bei der höher konzentrierten Lipovenös®-Lösung und -0,2 Ohm/h bei der höher konzentrierten Intralipid®-Lösung. Die niedrig konzentrierte Salvilipid®-Lösung zeigte weder Aggregations-, noch Desaggregationsverhalten.

Nur die höher konzentrierte Lipovenös®-Lösung und die höher konzentrierte Lipofundin®-Lösung unterschieden sich signifikant ($p<0,05$).

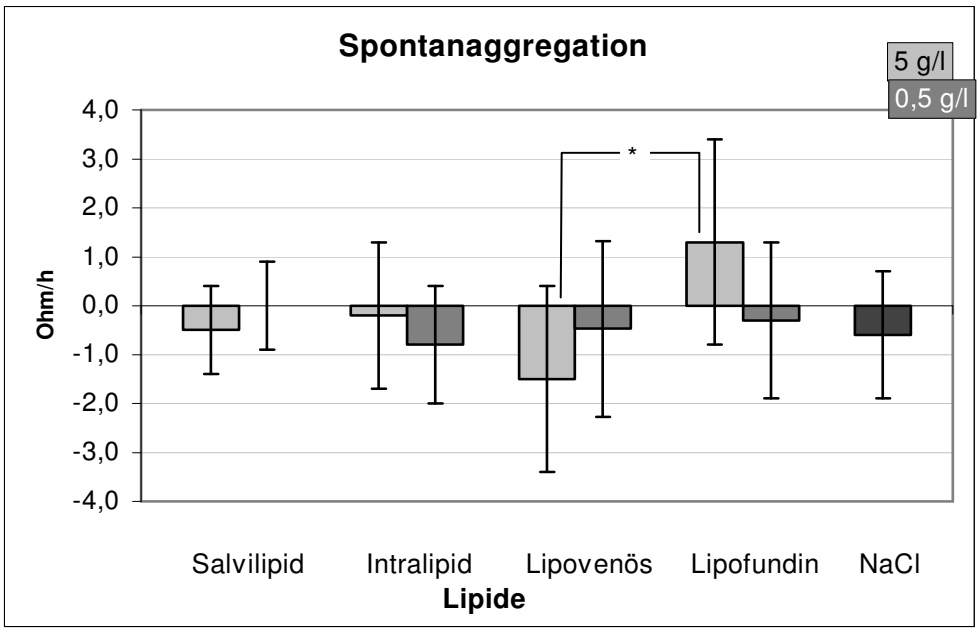

Abbildung 21 Vollblutaggregometrie in der In-vitro Untersuchung, Spontanaggregation. Dargestellt sind Mittelwerte x und Standardabweichungen x±s. * p<0,05 zwischen Lipovenös und Lipofundin in höherer Konzentration.

Maximale Steigung (siehe Abbildung 22)

Hier lagen die Werte zwischen 19,7 Ohm/min und 23,1 Ohm/min. Auffällig war, dass die maximale Steigung bei allen vier Präparaten in der niedrigeren Konzentration gleich oder kleiner war, als bei der entsprechenden höheren Konzentration, in keinem Fall aber darüber (s. Abbildung 22)

Die beobachteten Unterschiede zwischen den Lösungen waren statistisch nicht signifikant.

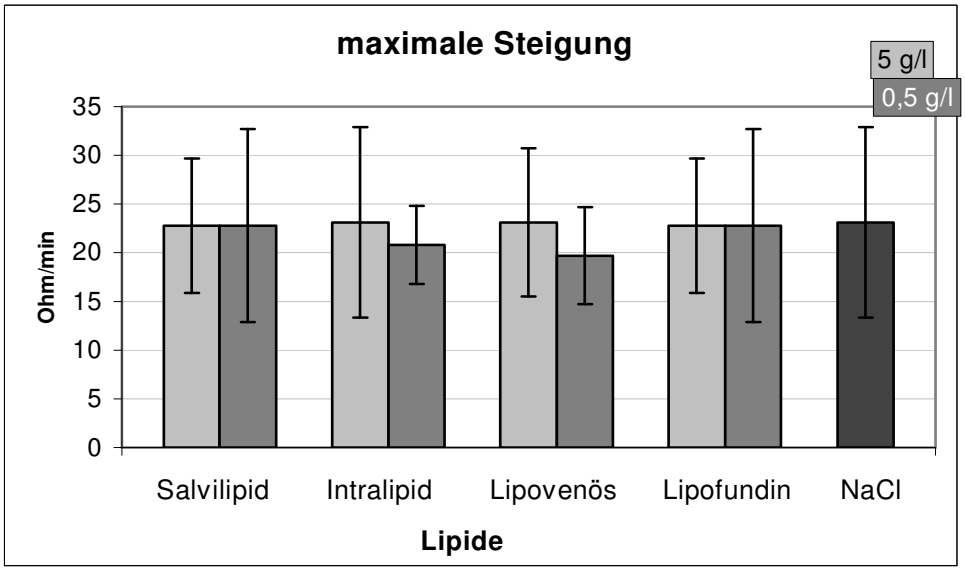

Abbildung 22 Vollblutaggregometrie in der In-vitro Untersuchung, maximale Steigung. Dargestellt sind Mittelwerte x und Standardabweichungen x±s. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Lipidlösungen waren nicht festzustellen.

Maximale Aggregation (siehe Abbildung 23)

Die Messwerte der Lipide lagen zwischen 50,5 Ohm bei den niedrig konzentrierten Lipofundin®- und Salvilipid®-Lösungen und 58,4 Ohm bei der höher konzentrierten Lipovenös®-Lösung. Die Kontrolle lag mit einem Wert von 51,3 Ohm im mittleren Bereich. Es wurden keine signifikanten Unterschiede gefunden, sowohl zwischen den unterschiedlichen Konzentrationen der einzelnen Präparate als auch zwischen den verschiedenen Präparaten.

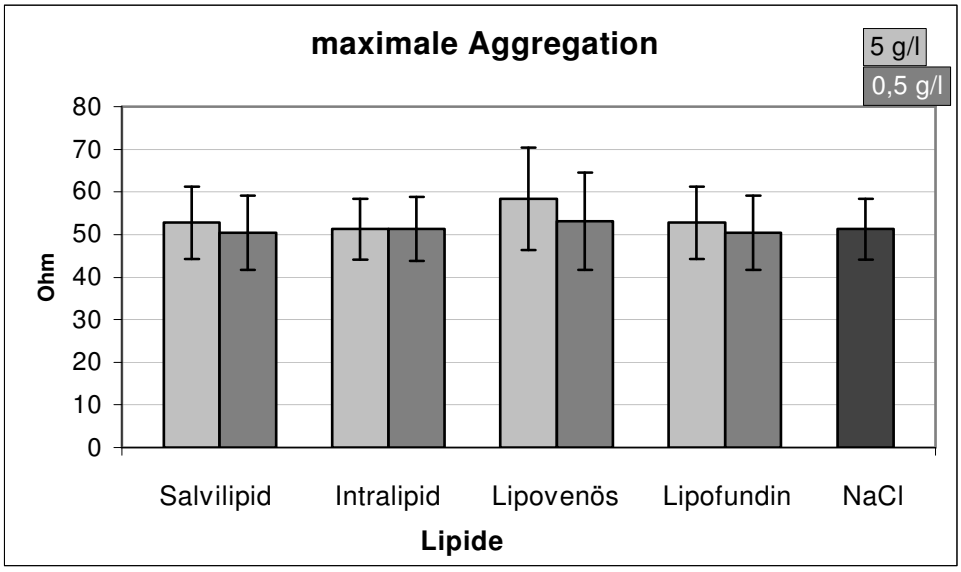

Abbildung 23 Vollblutaggregometrie in der In-vitro Untersuchung, maximale Aggregation. Dargestellt sind Mittelwerte x und Standardabweichungen x±s. Es ergaben sich statistisch keine signifikanten Unterschiede zwischen den Lipidlösungen.

3.2 Optische Messung der Plättchenaggregation

Die optische Messung beinhaltete die Messparameter maximale Steigung und maximale Aggregation. Die maximale Steigung gibt die Geschwindigkeit der Plättchenaggregation nach Zugabe von Kollagen an. Die maximale Aggregation ist ein Maß für die Trübungsangleichung zwischen den beiden Probenplasmen und dem dazugehörenden plättchenarmen Kontrollplasma. Bei einer Aggregation von 100% würden beide Plasmen dieselbe Transmission aufweisen, d.h. es wären so viele Plättchen im plättchenreichen Plasma aggregiert, dass die Plättchenkonzentration der von plättchenarmem Plasma entsprechen würde.

3.2.1 Klinische Studie

Maximale Steigung (siehe Abbildung 24)

Die maximale Steigung der turbidometrischen Messung erwies sich bei der Patientengruppe mit Lipidinfusion nach 24 Stunden als signifikant vermindert ($p<0,01$).

Gegenüber der Kontrollgruppe konnte zum Zeitpunkt t2 eine statistisch signifikante Verminderung der maximalen Steigung nachgewiesen werden ($p<0,05$).

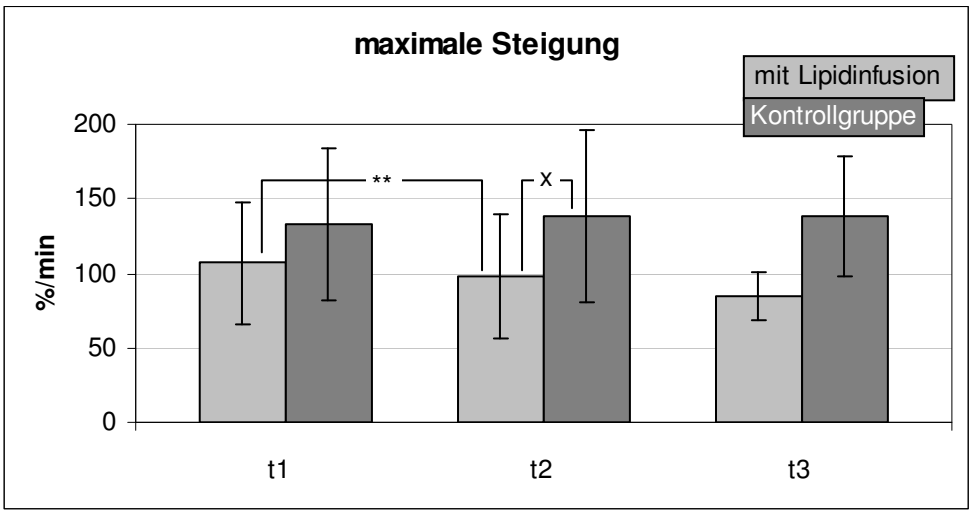

Abbildung 24 Turbidometrisch bestimmte Thrombozytenaggregation in der Klinischen Studie, maximale Steigung. Dargestellt sind Mittelwerte x und Standardabweichungen x±s. ** $p<0,01$ zwischen Zeitpunkt t1 und t2 bei Patienten mit Lipiden. ^{X} $p<0,05$ zum Zeitpunkt t2 zwischen Patienten mit und ohne Lipiden.

Maximale Aggregation (siehe Abbildung 25)

Die optische bzw. turbidometrische Messung der maximalen Thrombozytenaggregation zeigte, dass sich die Messzeitpunkte t1 und t2 signifikant unterschieden. So war die maximale Aggregation bei der Patientengruppe mit Lipidinfusion bereits nach 24 Stunden deutlich vermindert ($p<0,001$). Ein weiterer signifikanter Unterschied zeigte sich im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Lipidinfusion, bei der zum Messzeitpunkt t2, also nach 24 Stunden, die Maximalaggregation statistisch signifikant höher war als in der Studiengruppe ($p<0,05$).

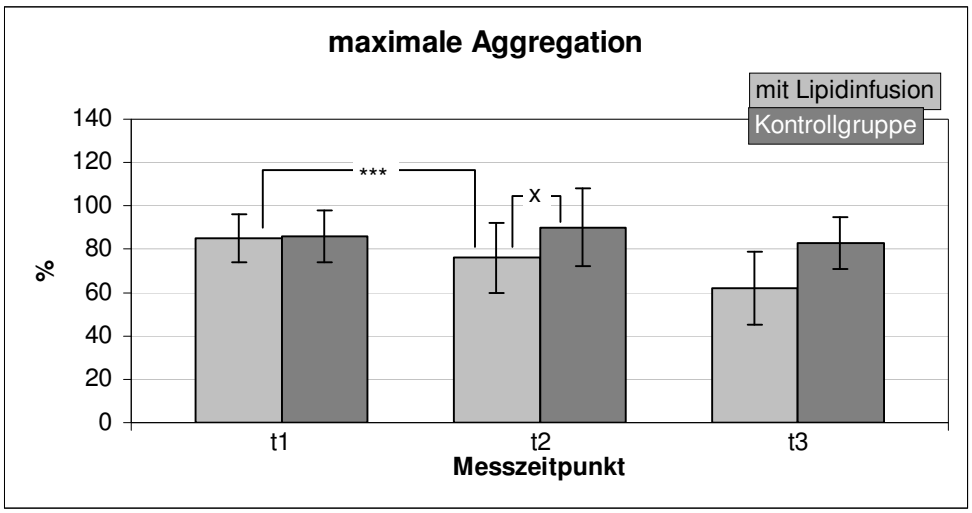

Abbildung 25 Turbidometrie in der Klinischen Studie, maximale Aggregation. Dargestellt sind Mittelwerte x und Standardabweichungen x±s. *** $p<0,001$ zwischen Zeitpunkt t1 und t2 bei Patienten mit Lipidinfusion. ^{X} $p<0,05$ zum Zeitpunkt t2 zwischen Patienten mit und ohne Lipiden.

3.2.2 In-vitro Untersuchung

Da die höher konzentrierten Lipide sowohl im plättchenreichen als auch im plättchenarmen Plasma eine zu hohe Trübung verursachten, war eine korrekte Messung des Transmissionsunterschieds zwischen den Plasmen nicht möglich. Daher konnten nur die Blutproben turbidometrisch gemessen werden, welche die niedrig konzentrierten Lipidlösungen enthielten.

Maximale Steigung (siehe Abbildung 26)

Der höchste Wert lag bei 142 %/min für die Salvilipid®-Lösung, der niedrigste Wert (73 %/min) wurde bei der Intralipid®-Lösung gemessen. Die beiden Präparate unterschieden sich signifikant ($p<0,001$).

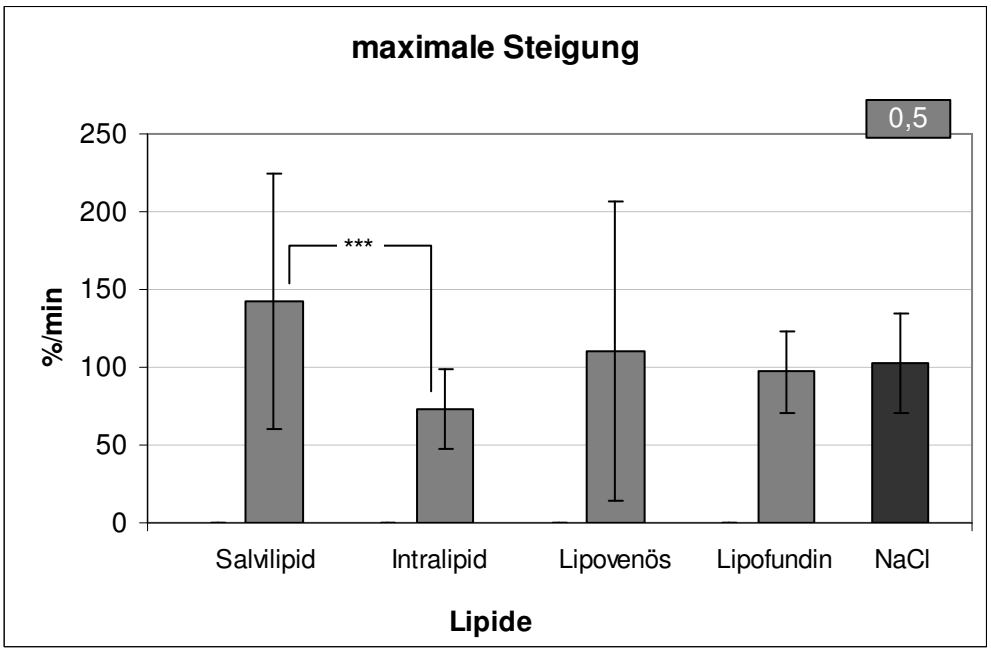

Abbildung 26 Turbidometrie in der In-vitro Untersuchung, maximale Steigung. Dargestellt sind Mittelwerte x und Standardabweichungen x±s. ***p<0,001 zwischen den mit Salvilipid® inkubierten Proben und den mit Intralipid® inkubierten Proben.

Maximale Aggregation (siehe Abbildung 27)

Hier hatten die mit Salvilipid® inkubierten Blutproben mit 85 % den höchsten, die mit Intralipid® inkubierten Blutproben mit 60 % den niedrigsten Wert. Die Kontrolle mit physiologischer Kochsalzlösung lag bei 80 %. Intralipid® und Lipovenös® wiesen gegenüber Salvilipid® eine signifikant verminderte Maximalaggregation auf (p<0,001). Im Vergleich zur Kontrolle war die Maximalaggregation der mit Intralipid® inkubierten Proben ebenfalls signifikant vermindert (p<0,001).

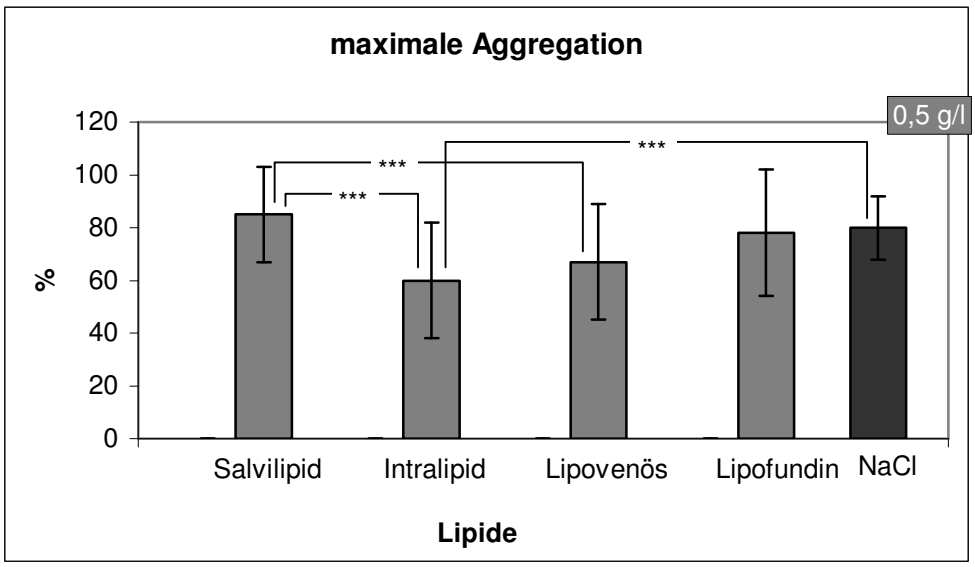

Abbildung 27 Turbidometrie in der In-vitro Untersuchung, maximale Aggregation. Dargestellt sind Mittelwerte x und Standardabweichungen x±s. ***p<0,001 zwischen den mit Salvilipid® und den mit Intralipid ® bzw. mit Lipovenös® inkubierten Proben, sowie zwischen den mit Intralipid® inkubierten Proben und 0,9%iger Kochsalzlösung.

3.3 Thrombelastographie

3.3.1 Klinische Studie

Die Thrombelastographie umfasste drei Messparameter, die Reaktionszeit (r-Zeit), die Fibrinbildungszeit (k-Zeit) und die maximale Amplitude. Alle Parameter wurden in Form von Doppelbestimmungen erfasst.

Die r-Zeit beginnt mit der Zugabe von $CaCl_2$ und endet mit der ersten Bewegung des Metallstiftes ab einer Amplitudenhöhe von 1 Millimeter. Sie dauert in der Regel zwischen sieben und 15 Minuten.

Die k-Zeit gibt den Zeitraum vom ersten Bewegungsbeginn des Kolbens bis zu einer Amplitudenhöhe von 2 cm an und wird als Fibrinbildungszeit bezeichnet. Die Normalwerte für diese Zeit liegen zwischen 2,5 und fünf Minuten.

Die maximale Amplitude ist der höchste Ausschlag der Metallstifte und wird in Millimeter gemessen. Aus ihr wird das Elastizitätsmodul m_ε berechnet.

Reaktionszeit (siehe Abbildung 28)

Es konnte bei der Reaktionszeit der Kontrollgruppe ohne Lipidinfusion nach 24 Stunden eine signifikante Verlangsamung gezeigt werden ($p<0,001$).

Abbildung 28 Thrombelastographie in der Klinischen Studie, r-Zeit. Dargestellt sind Mittelwerte x und Standardabweichungen x±s. ***$p<0,001$ zwischen Zeitpunkt t1 und t2 der Lipidgruppe.

k-Zeit, maximale Amplitude (siehe Abbildung 29 und Abbildung 30)

Die k-Zeit und die maximale Amplitude ließen keine Auffälligkeiten im Verlauf der Messungen deutlich werden. Auch zwischen der Gruppe mit Lipidinfusion und der Kontrollgruppe gab es keine signifikanten Unterschiede.

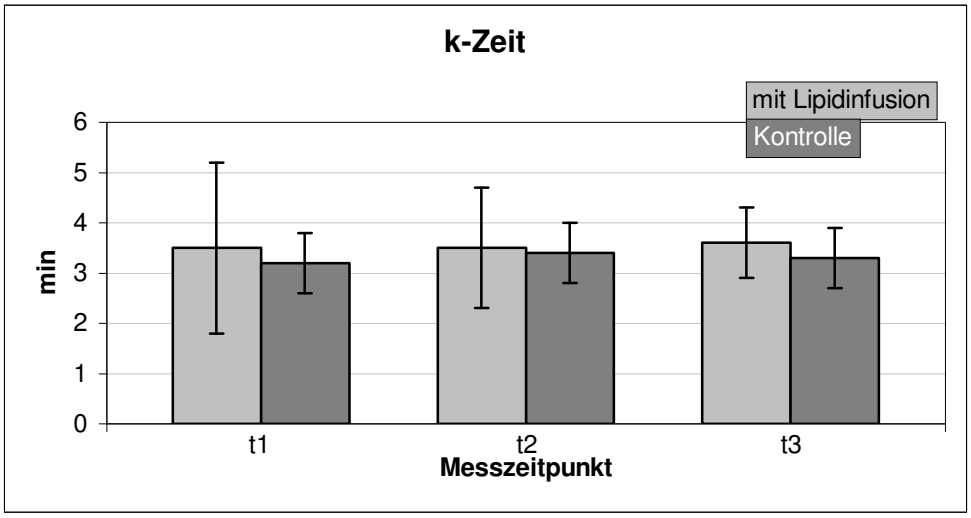

Abbildung 29 Thrombelastographie in der Klinischen Studie, k-Zeit. Dargestellt sind Mittelwerte x und Standardabweichungen x±s. Es gab keine statistisch signifikanten Unterschiede.

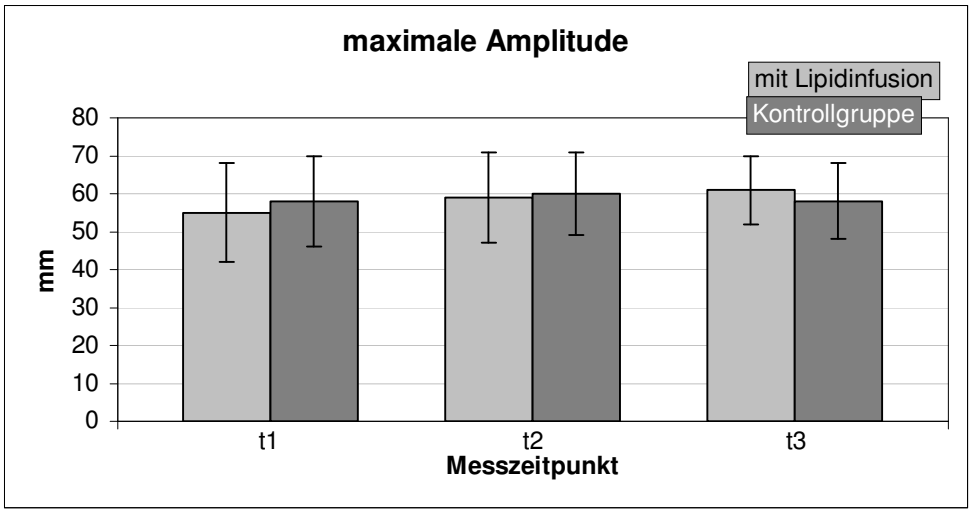

Abbildung 30 Thrombelastographie in der Patientenstudie, maximale Amplitude. Dargestellt sind Mittelwerte x und Standardabweichungen x±s. Statistisch signifikante Unterschiede waren nicht festzustellen.

3.3.2 In-vitro Untersuchung

r-Zeit (siehe Abbildung 31)

Die r-Zeit lag bei allen Proben zwischen 7,6 und 8,6 Minuten, die Kontrolle (physiologische Kochsalzlösung) lag ebenfalls bei 7,6 Minuten. Die Unterschiede, die in Abhängigkeit von dem zur Inkubation verwendeten Lipidpräparat beobachtet wurden, waren ebenso wenig statistisch signifikant wie die Unterschiede zwischen den beiden unterschiedlichen Lipidkonzentrationen.

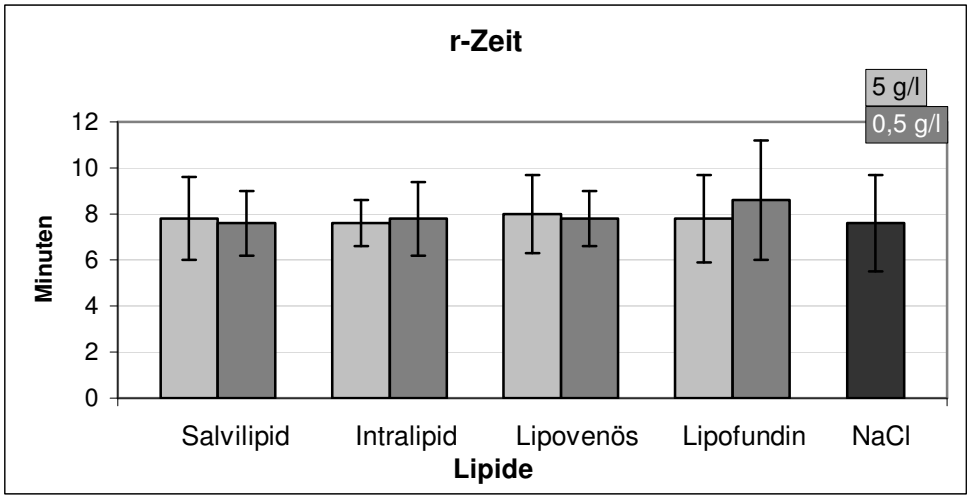

Abbildung 31 Thrombelastographie in der in-vitro Untersuchung, r-Zeit. Dargestellt sind Mittelwerte x und Standardabweichungen x±s. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Lipidlösungen gab es nicht.

k-Zeit (siehe Abbildung 32)

Die k-Zeit aller Proben in beiden Verdünnungen sowie die Kontrolle mit physiologischer Kochsalzlösung lagen im Normalbereich (zwischen 3,4 und 4,3 Minuten). Es waren keine statistischen Unterschiede in Abhängigkeit von dem zur Inkubation verwendeten Lipidpräparat bzw. der Lipidkonzentration nachzuweisen.

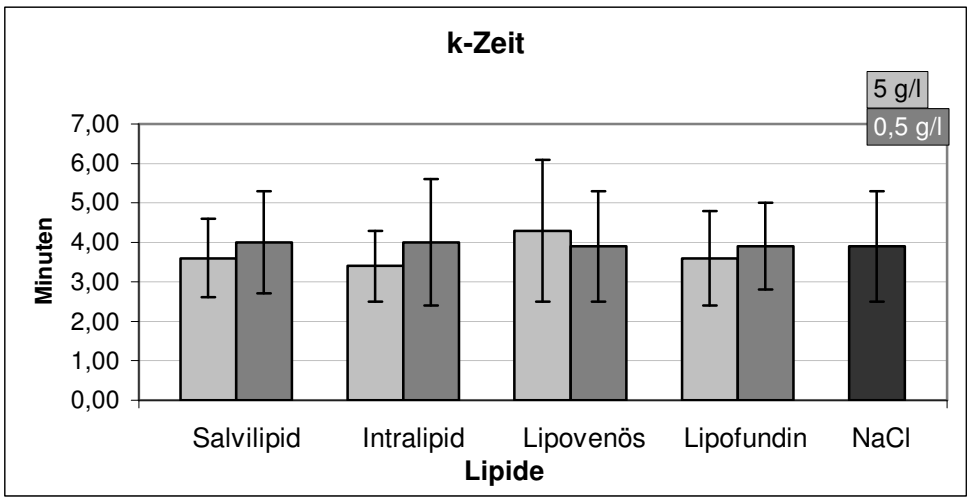

Abbildung 32 Thrombelastographie in der In-vitro Untersuchung, k-Zeit. Dargestellt sind Mittelwerte x und Standardabweichungen x±s. Es waren statistisch keine signifikanten Unterschiede zwischen den Lipidlösungen zu messen.

Maximale Amplitude, Elastizitätsmodul (siehe Abbildung 33)

Die mit den verschiedenen Lipidpräparaten inkubierten Blutproben (bei beiden verwendeten Konzentrationen) zeigten keine statistisch signifikanten Unterschiede in der maximalen Amplitude.

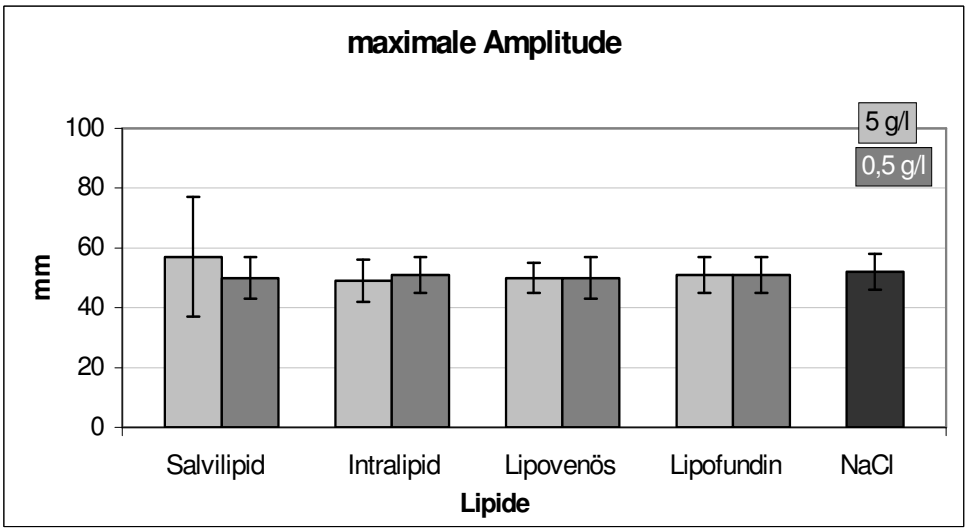

Abbildung 33 Thrombelastographie in der In-vitro Untersuchung, maximale Amplitude. Dargestellt sind Mittelwerte x und Standardabweichungen x±s. Es ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Lipidlösungen.

Das Elastizitätsmodul wurde für alle Proben berechnet, nach oben genannter Formel.
Dabei ergaben sich folgende Werte:

Salvilipid	(5g/l):	132,6
	(0,5 g/l):	100,0
Intralipid	(5g/l):	96,1
	(0,5 g/l):	104,1
Lipovenös	(5g/l):	100,0
	(0,5 g/l):	100,0
Lipofundin	(5g/l):	104,1
	(0,5 g/l):	104,1
NaCl	(0,9%):	108,3

Bis auf den ersten Salvilipid®-Wert lagen alle Werte im Normalbereich (90-120).

3.4 In-vitro-Blutungstest

Der In-vitro-Blutungstest (PFA®) erlaubt Rückschlüsse auf die Thrombozytenfunktion und umfasst die Parameter Verschlusszeit, initialer Blutfluss und Blutungsvolumen.
Der Referenzbereich für die Verschlusszeit bei normaler Thrombozytenfunktion liegt zwischen 96 und 170 Sekunden.
Der initiale Blutfluss ist die Menge an Blutprobe die in einer bestimmten Zeiteinheit durch die Messzelle gezogen wird. Er wird in Mikroliter pro Minute angegeben und sollte bei allen Messungen ungefähr im gleichen Bereich liegen.
Das Blutungsvolumen gibt das Blutvolumen, welches die Membran passiert, in Mikroliter an.

3.4.1 Klinische Studie

Hinsichtlich des Messzeitpunkts ließen sich bei allen Parametern keine signifikanten Unterschiede feststellen. Auch die Unterschiede zwischen der Patientengruppe mit Lipidinfusion und der Kontrollgruppe waren nicht signifikant. Abbildung 34, Abbildung 35 und Abbildung 36 zeigen die Ergebnisse für die Verschlusszeit, das Blutungsvolumen und den initialen Blutfluss in der Klinischen Studie.

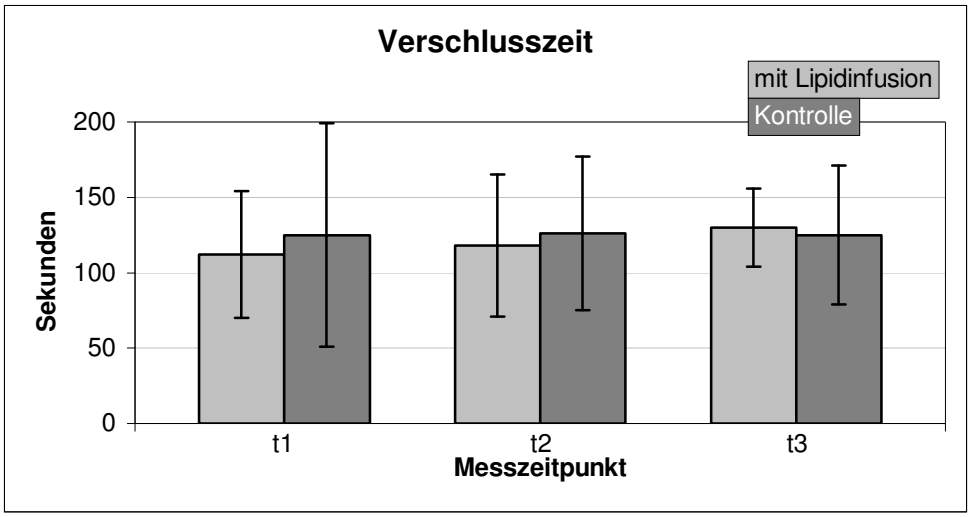

Abbildung 34 In-vitro-Blutungstest in der Klinischen Studie: Verschlusszeit. Dargestellt sind Mittelwerte x und Standardabweichungen x±s. Statistisch signifikante Unterschiede waren nicht festzustellen.

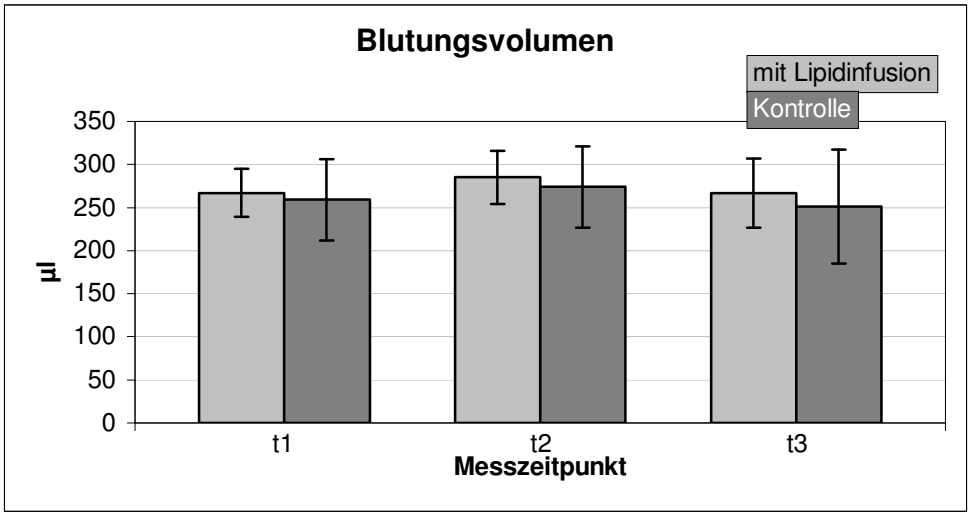

Abbildung 35 In-vitro-Blutungstest in der Klinischen Studie: Blutungsvolumen. Dargestellt sind Mittelwerte x und Standardabweichungen x±s. Es waren keine statistisch signifikanten Unterschiede zu messen.

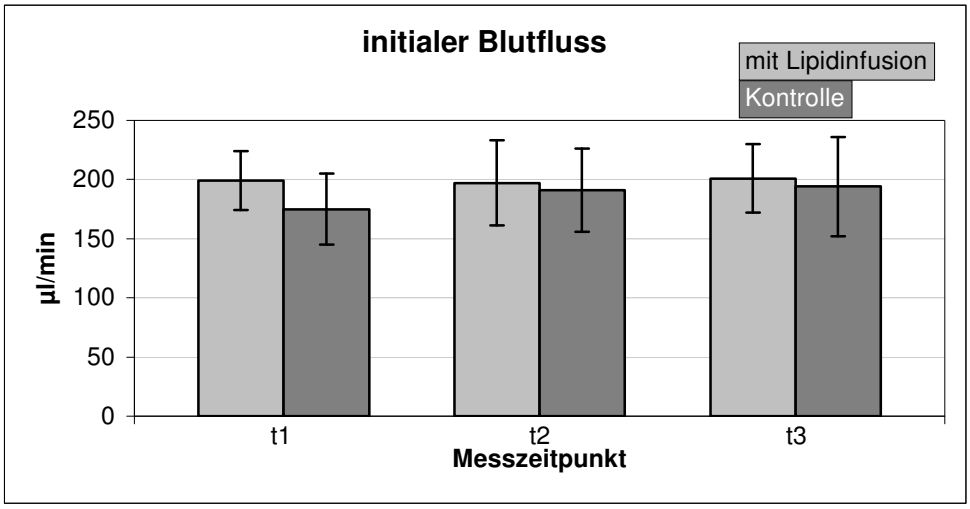

Abbildung 36 In-vitro-Blutungstest in der Klinischen Studie: initialer Blutfluss. Dargestellt sind Mittelwerte x und Standardabweichungen x±s. Es wurden keine statistisch signifikanten Unterschiede festgestellt.

3.4.2 In-vitro Untersuchung

Verschlusszeit (siehe Abbildung 37)

Die Ergebnisse lagen bei allen Blutproben im Normalbereich. Der niedrigste Wert betrug 105 Sekunden für die mit der niedrig konzentrierten Salvilipid® -Lösung inkubierten Blutproben, der höchste Wert von 144 Sekunden wurde für die Blutproben gemessen, die mit der höher konzentrierten Lipofundin-Lösung inkubiert worden waren. Die Kontrolle mit physiologischer Kochsalzlösung lag bei 124 Sekunden. Statistische Unterschiede ließen sich nicht zeigen.

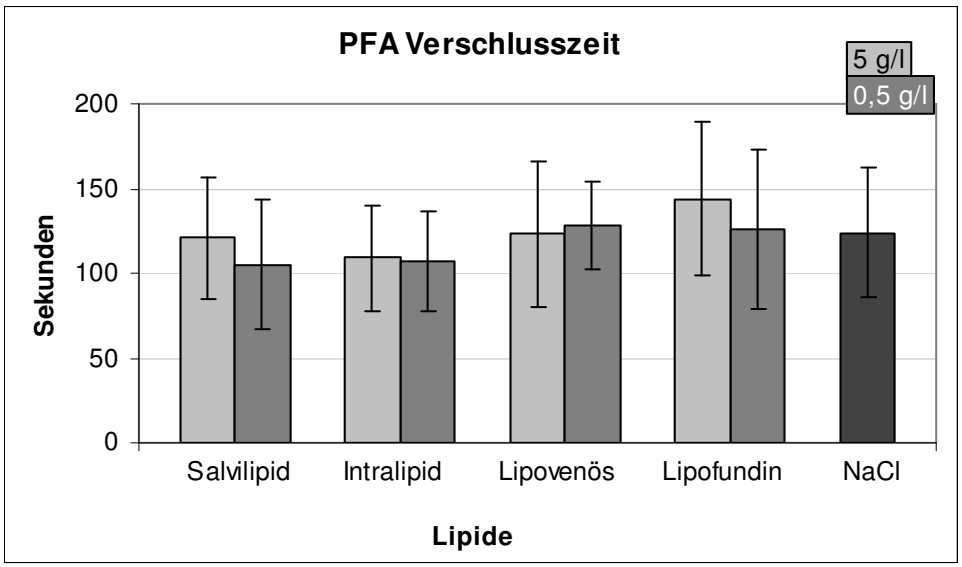

Abbildung 37 In-vitro-Blutungstest in der In-vitro Untersuchung, Verschlusszeit. Dargestellt sind Mittelwerte x und Standardabweichungen x±s. Es ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Lipidlösungen.

Blutungsvolumen (siehe Abbildung 38)

Die Werte lagen zwischen 329 µl und 405 µl. Die Kontrolle hatte den Wert 394 µl. Es konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

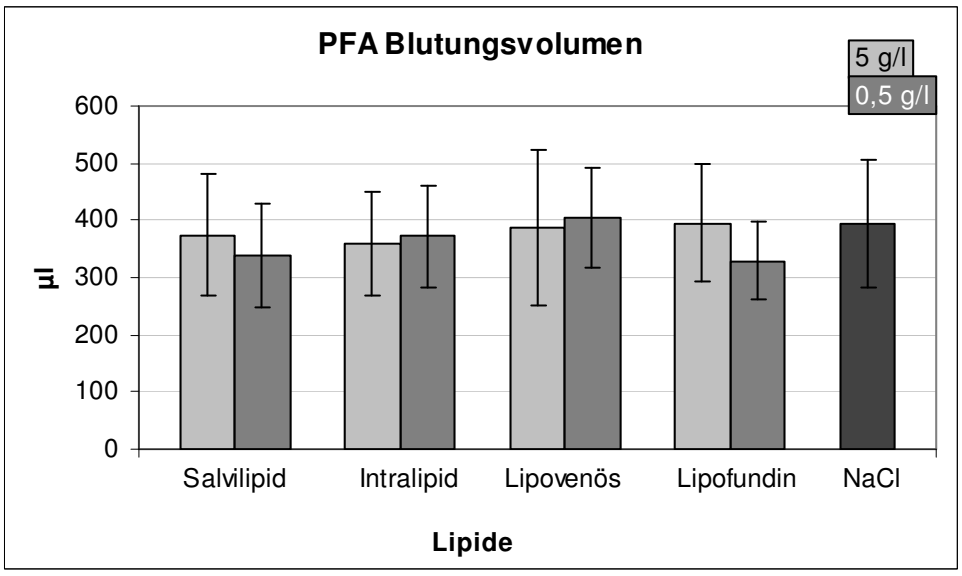

Abbildung 38 In-vitro-Blutungstest in der In-vitro Untersuchung, Blutungsvolumen. Dargestellt sind Mittelwerte x und Standardabweichungen x±s. Es wurden keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Lipidlösungen festgestellt.

Initialer Blutfluss (siehe Abbildung 39)

Die Ergebnisse reichten von 210 µl/min bis 239 µl/min, wobei die Kontrolle mit physiologischer Kochsalzlösung den höchsten Wert erreichte. Es ließen sich keine statistisch signifikanten Unterschiede feststellen.

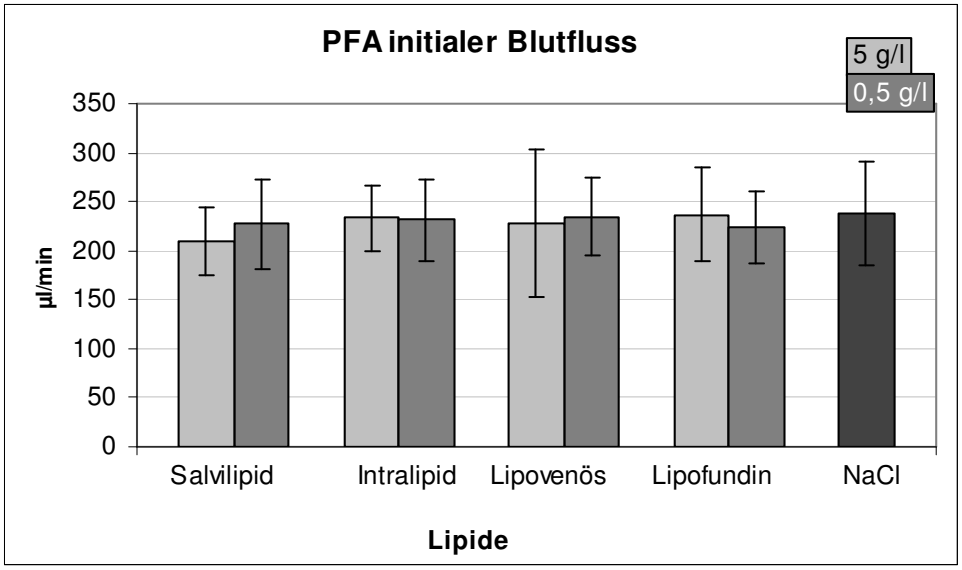

Abbildung 39 In-vitro-Blutungstest in der In-vitro Untersuchung: Initialer Blutfluss. Dargestellt sind Mittelwerte x und Standardabweichungen x±s. Zwischen den Lipidlösungen ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede.

3.5 Thrombozytenaggregate im Vollblut

Als weitere Messung zur Erkennung einer Spontanaggregation diente die Zählung der reversiblen und irreversiblen Thrombozytenaggregate im Vollblut. Sowohl die reversiblen als auch die irreversiblen Aggregate wurden durch Zugabe des Fixierungsmittels Glutaraldehyd unmittelbar nach Blutentnahme beziehungsweise nach Inkubation mit Lipidlösung fixiert und anschließend gezählt. Bei den Proben ohne Fixierungsmittel lösten sich die reversiblen Aggregate wieder und wurden nicht mitgezählt, wohingegen die irreversiblen Aggregate bestehen blieben. Zum Teil konnte man während des Mikroskopierens beobachten, wie sich die Thrombozyten voneinander trennten. Auch konnte man hin und wieder Thrombozyten an Erythrozyten angelagert sehen, oder auch Erythrozyten inmitten eines Thrombozytenaggregats. Die Anzahl der Aggregate wurden in Prozent der gesamten Thrombozytenzahl angegeben.

3.5.1 Klinische Studie

Reversible und irreversible Aggregate (siehe Abbildung 40, Abbildung 41)

Zwischen den Messzeitpunkten t1 und t2 kam es bei der Kontrollgruppe zu einer statistisch signifikanten Zunahme der reversiblen Thrombozytenaggregate ($p<0,01$). In der Gruppe mit Lipidinfusion war ein signifikanter Anstieg dagegen erst zwischen t2 und t3 zu beobachten ($p<0,05$).

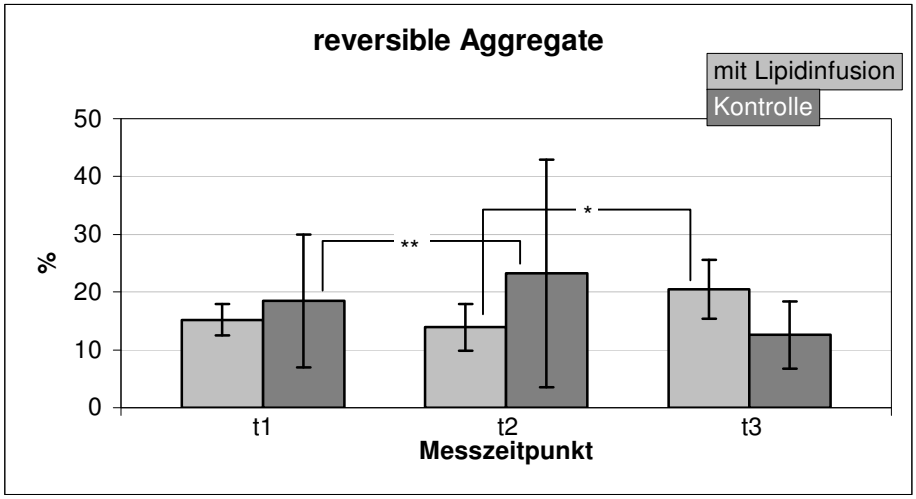

Abbildung 40 Thrombozytenaggregate in der Klinischen Studie, reversible Aggregate. Dargestellt sind Mittelwerte x und Standardabweichungen x±s. (* $p< 0,05$, ** $p< 0,01$). Eine signifikante Erhöhung der reversiblen Aggregate gab es zwischen t1 und t2 bei der Kontrollgruppe; ebenfalls bei der Lipidgruppe zwischen t2 und t3.

Die irreversiblen Aggregate zeigten keine statistisch signifikanten Veränderungen.

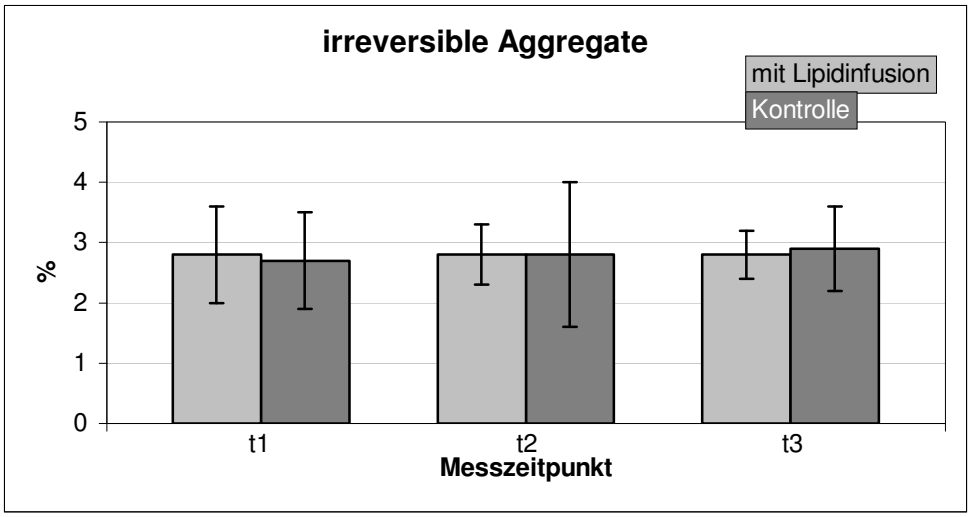

Abbildung 41 Thrombozytenaggregate in der Klinischen Studie, irreversible Aggregate. Dargestellt sind Mittelwerte x und Standardabweichungen x±s. Es gab sowohl zwischen den Messzeitpunkten als auch zwischen den Gruppen statistisch keine signifikanten Unterschiede.

3.5.2 In-vitro Untersuchung

Reversible Aggregate (siehe Abbildung 42)

Der niedrigste Wert an reversiblen Aggregaten wurde mit15, 1 % für die mit niedrig konzentrierter Intralipid®-Lösung inkubierten Blutproben ermittelt. Den höchsten Wert hatten mit 27,8 % die mit niedrig konzentrierter Lipofundin®-Lösung inkubierten Proben. Die Kontrolle mit physiologischer Kochsalzlösung hatte den Wert 15,2 %.

Ein statistisch signifikanter Unterschied wurde lediglich zwischen den mit höher konzentrierter Salvilipid®-Lösung inkubierten Proben und der Kontrolle gefunden ($p<0,05$).

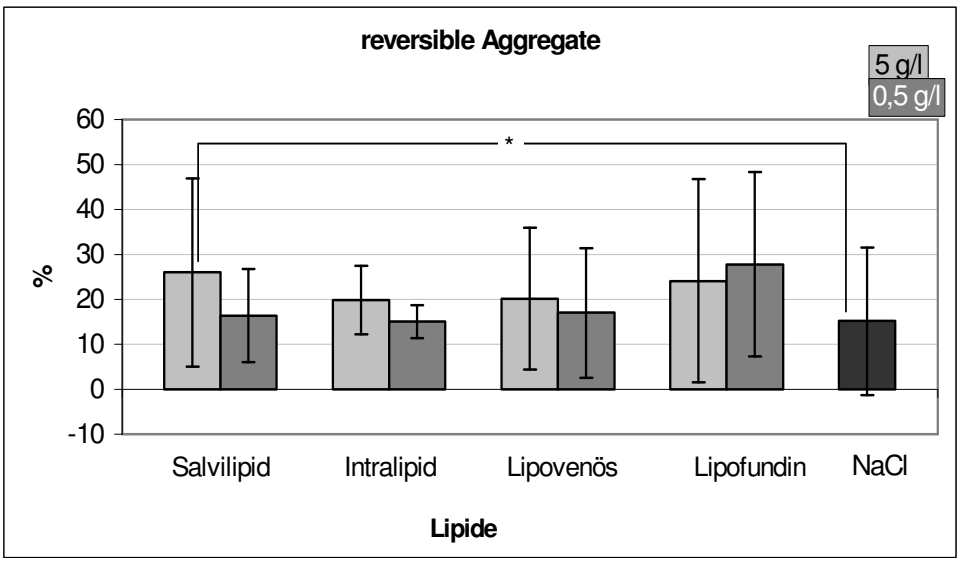

Abbildung 42 Thrombozytenaggregate in der In-vitro Untersuchung, reversible Aggregate. Dargestellt sind Mittelwerte x und Standardabweichungen x±s. (* p< 0,05). Ein statistisch signifikanter Unterschied bestand zwischen Salvilipid (5g/l) und der Kontrolle mit physiologischer Kochsalzlösung, welche weniger reversible Aggregate aufwies.

Irreversible Aggregate (siehe Abbildung 43)

Bei den irreversiblen Aggregaten lagen die Werte insgesamt erheblich niedriger als bei den reversiblen Aggregaten, da sich die meisten Aggregate nach einer bestimmten Zeit wieder lösen.

Die Werte schwankten zwischen 1,7 % für die mit der niedrig konzentrierten Salvilipid®-Lösung inkubierten Proben und 2,6 % für die mit der höher konzentrierten Lipofundin®-Lösung inkubierten Proben. Die Kontrolle hatte den Wert 2,1 %. Es wurden keine statistisch signifikanten Unterschiede beobachtet.

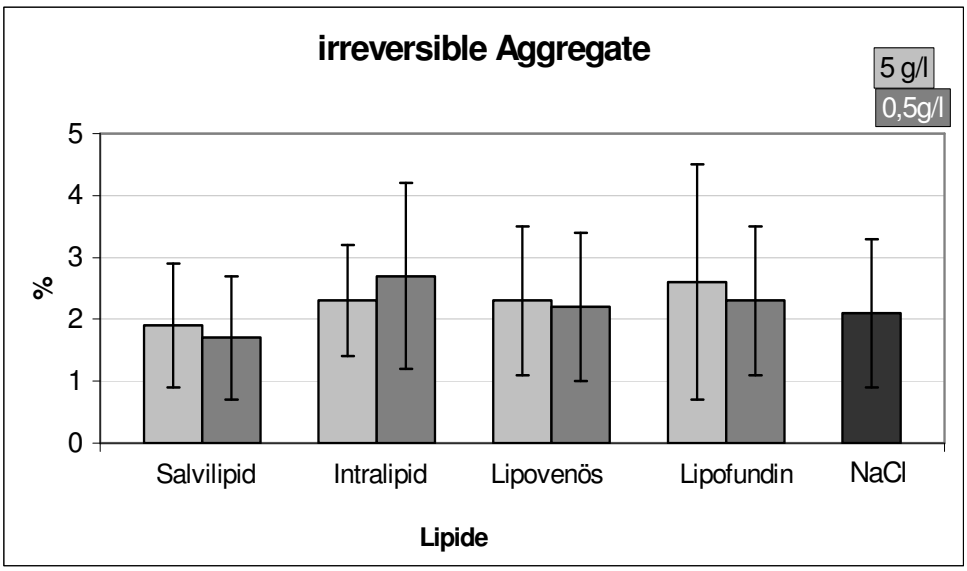

Abbildung 43 Thrombozytenaggregation in der In-vitro Untersuchung, irreversible Aggregate. Dargestellt sind Mittelwerte x und Standardabweichungen x±s. Es wurden keine Unterschiede zwischen den Lipiden und der Kontrolle gefunden.

3.6 Plasmatische Gerinnung

Die Messungen der plasmatischen Gerinnung beinhalteten insgesamt fünf Verfahren, welche in Abbildung 13 anschaulich dargestellt sind.

Die Thromboplastinzeit (TPZ) und aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT) dienten als Referenzmethoden. Als Varianten wurden die nicht aktivierte partielle Thromboplastinzeit (naPTT), die oberflächenaktivierte Rekalzifizierungszeit (aRCT) und die Rekalzifizierungszeit (RCT) eingesetzt.

3.6.1 Klinische Studie

Aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT) (siehe Abbildung 44)

Hier wurden die Gerinnungsfaktoren XII, XI, VIII, V, X, Prothrombin und Fibrinogen auf ihre Aktivierbarkeit und Funktion überprüft.

Es wurden keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen Patienten mit und ohne Lipidinfusionen gefunden. Ebenso gab es auch keine Unterschiede zwischen den Messzeitpunkten.

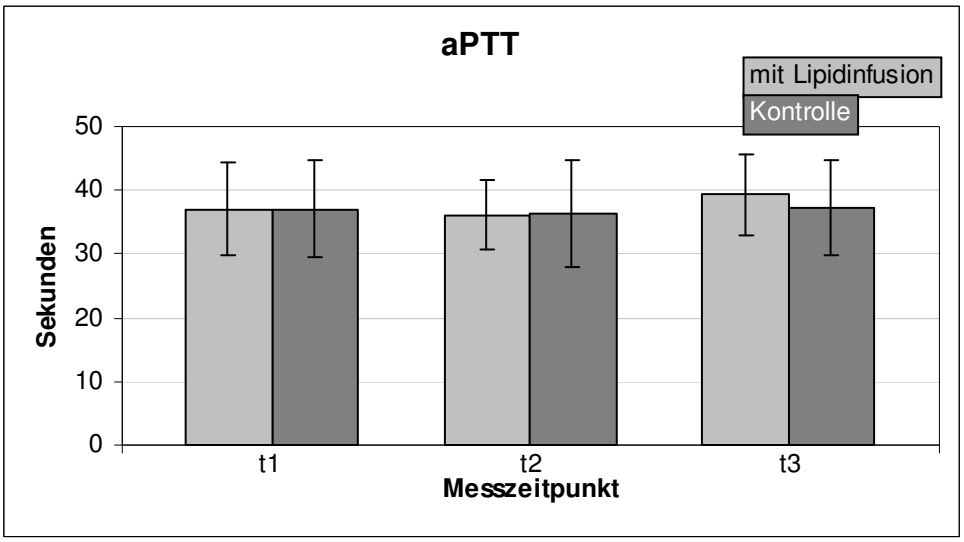

Abbildung 44 Aktivierte PTT in der Klinischen Studie. Dargestellt sind Mittelwerte x und Standardabweichungen x±s. Es gab sowohl zwischen den Messzeitpunkten als auch zwischen den Gruppen keine statistisch signifikanten Unterschiede.

Thromboplastinzeit (TPZ) (siehe Abbildung 45)

Bei diesem Test wurden die Gerinnungsfaktoren V, VII, X, Prothrombin und Fibrinogen auf ihre Aktivierbarkeit und Funktion überprüft. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen und zwischen den Messzeitpunkten konnten nicht gefunden werden.

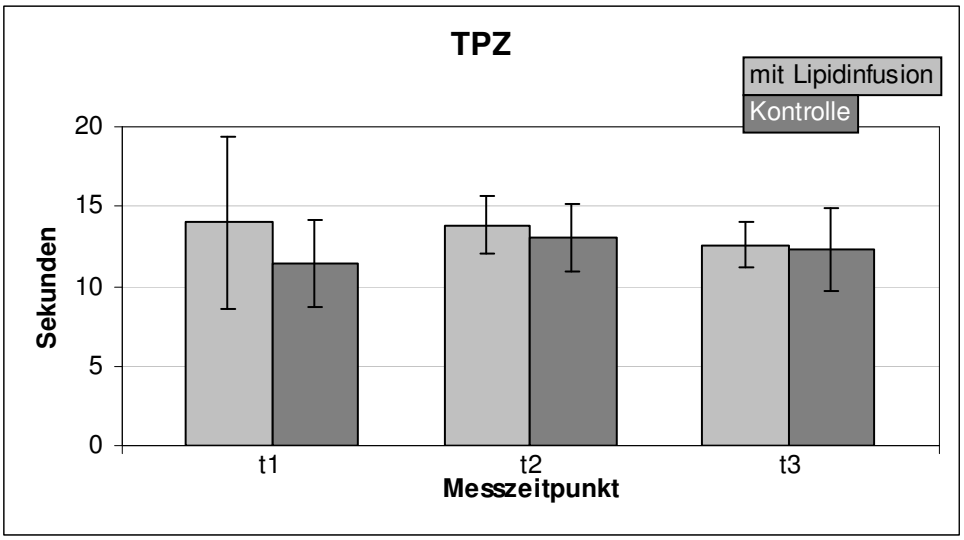

Abbildung 45 TPZ in der Klinischen Studie. Dargestellt sind Mittelwerte x und Standardabweichungen x±s. Es gab sowohl zwischen den Messzeitpunkten als auch zwischen den Gruppen keine statistisch signifikanten Unterschiede.

Rekalzifizierungszeit (RCT) (siehe Abbildung 46)

Bei diesem Test wird die thromoplastische Aktivität einer Plasmaprobe überprüft.

Die Blutproben der Patienten mit und ohne Lipidinfusionen zeigten zu keinem Zeitpunkt statistisch signifikante Änderungen der thromboplastischen Aktivität.

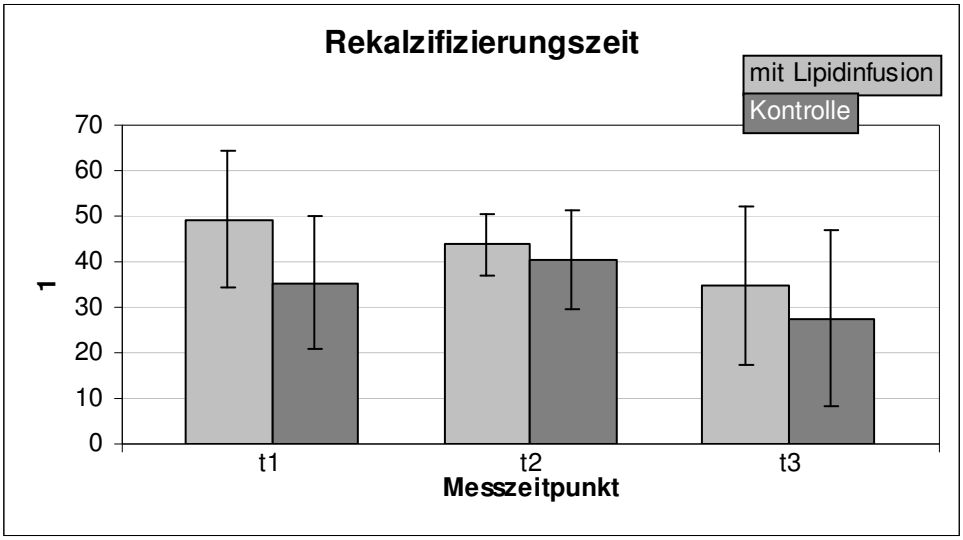

Abbildung 46 Rekalzifizierungszeit in der Klinischen Studie. Dargestellt sind Mittelwerte x und Standardabweichungen x±s. Es gab sowohl zwischen den Messzeitpunkten als auch zwischen den Gruppen keine statistisch signifikanten Unterschiede.

Nicht aktivierte partielle Thromboplastinzeit (naPTT) (siehe Abbildung 47)

Bei diesem Test wird die Plasmaprobe auf eine vorangegangene Oberflächenaktivierung überprüft. Es zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Patienten mit und ohne Lipidinfusion, und auch zwischen den Messzeitpunkten gab es keine Unterschiede.

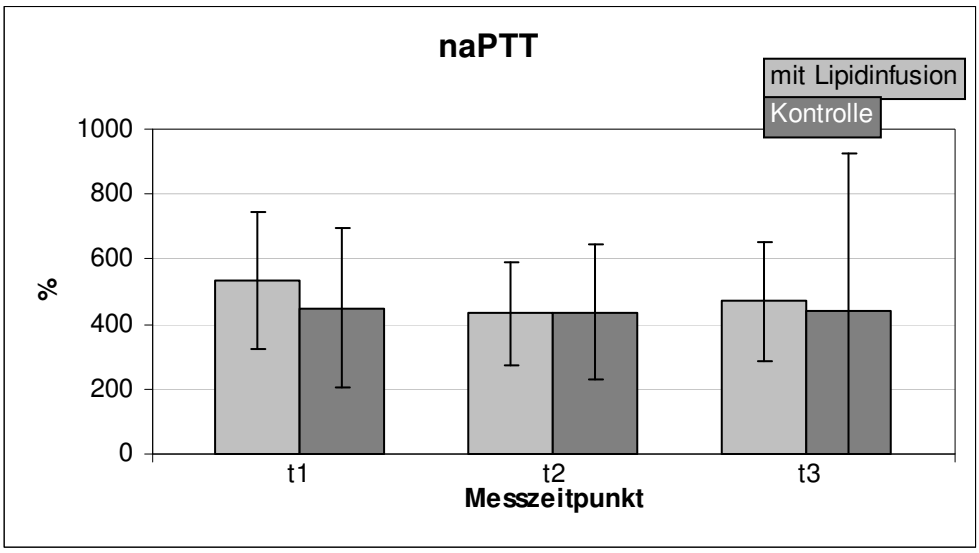

Abbildung 47 Nicht-aktivierte PTT in der Klinischen Studie. Dargestellt sind Mittelwerte x und Standardabweichungen x±s. Es gab sowohl zwischen den Messzeitpunkten als auch zwischen den Gruppen keine statistisch signifikanten Unterschiede.

Aktivierte Rekalzifizierungszeit (aRCT) (siehe Abbildung 48)

Dieser Test überprüft eine Plasmaprobe auf gerinnungsaktive Phospholipide.

Es wurden keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen Patienten mit und ohne Lipidinfusion gefunden. Die Messzeitpunkte zeigten ebenfalls keine Unterschiede.

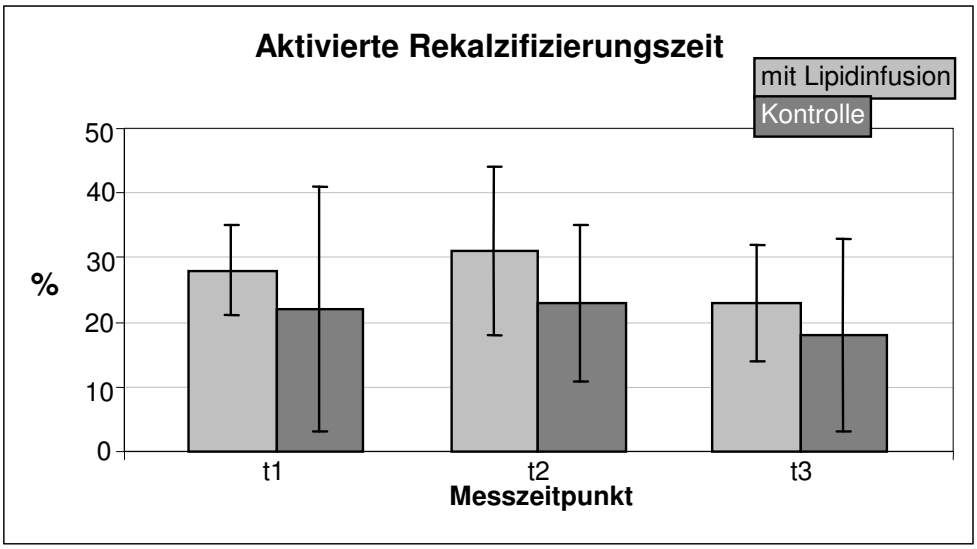

Abbildung 48 Aktivierte Rekalzifizierungszeit in der Klinischen Studie. Dargestellt sind Mittelwerte x und Standardabweichungen x±s. Es gab sowohl zwischen den Messzeitpunkten als auch zwischen den Gruppen keine statistisch signifikanten Unterschiede.

3.6.2 In-vitro Untersuchung

Die fünf verschiedenen Messverfahren der plasmatischen Gerinnung ergaben bei der in-vitro-Untersuchung bei keinem der Tests statistisch signifikante Auffälligkeiten.

Aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT) (siehe Abbildung 49)

Die gemessenen Werte für die aPTT lagen zwischen 30,8 und 34,4 Sekunden. Zwischen den Lipidlösungen gab es keine signifikanten Unterschiede.

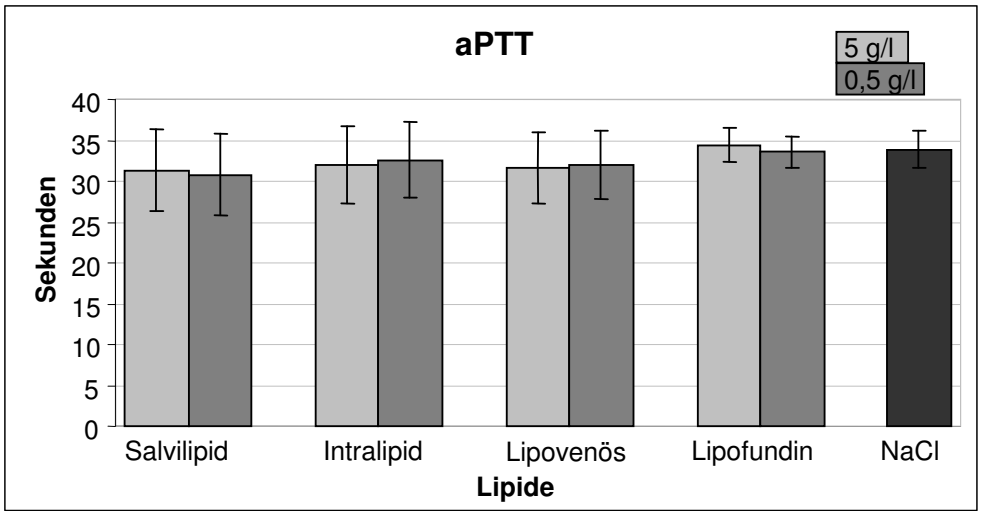

Abbildung 49 Aktivierte partielle Thromboplastinzeit in der In-vitro Untersuchung. Dargestellt sind Mittelwerte x und Standardabweichungen x±s. Es ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Lipidlösungen.

Thromboplastinzeit (TPZ) (siehe Abbildung 50)

Die TPZ, welche die Gerinnungsfaktoren V, VII, X, Prothrombin und Fibrinogen beinhaltet, zeigte zwischen den einzelnen Lipidlösungen keine statistisch signifikanten Auffälligkeiten.

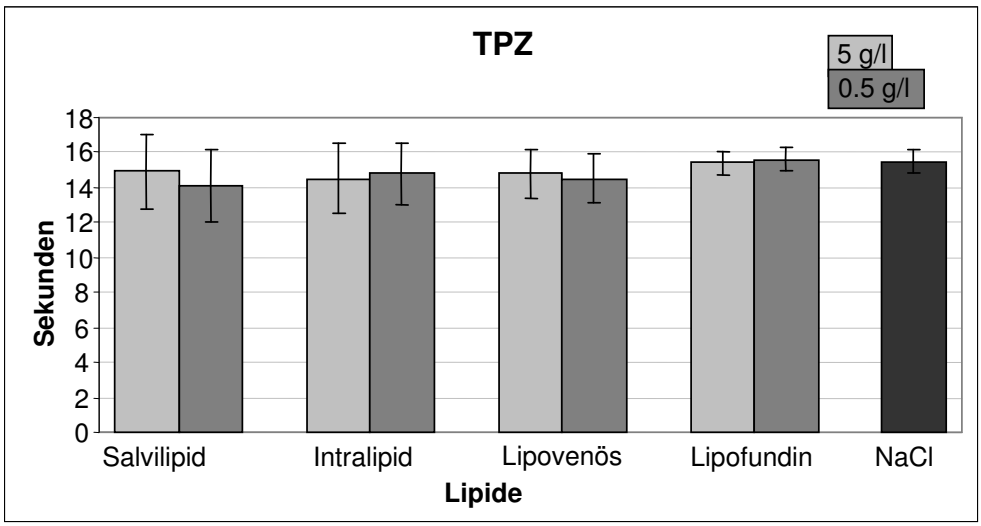

Abbildung 50 Thromboplastinzeit in der In-vitro Untersuchung. Dargestellt sind Mittelwerte x und Standardabweichungen x±s. Es ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Lipidlösungen.

Rekalzifizierungszeit (RCT) (siehe Abbildung 51)

Zwischen den Lipidlösungen gab es keine statistisch signifikanten Unterschiede der thromboplastischen Aktivität.

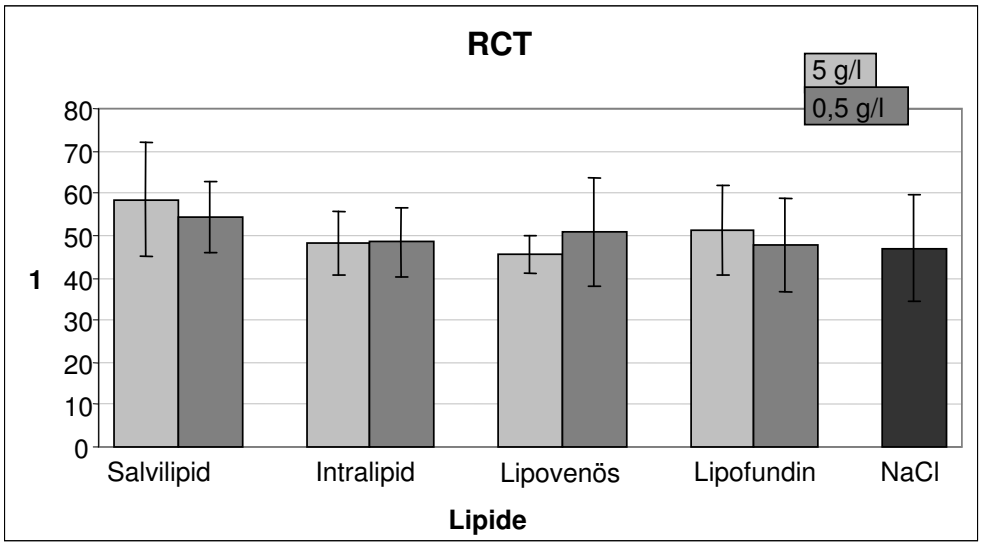

Abbildung 51 Rekalzifizierungszeit RCT in der In-vitro Untersuchung. Dargestellt sind Mittelwerte x und Standardabweichungen x±s. Es ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Lipidlösungen.

Nicht aktivierte partielle Thromboplastinzeit (naPTT) (siehe Abbildung 52)

Eine vorangegangene Oberflächenaktivierung konnte bei keiner der Lipidlösungen festgestellt werden.

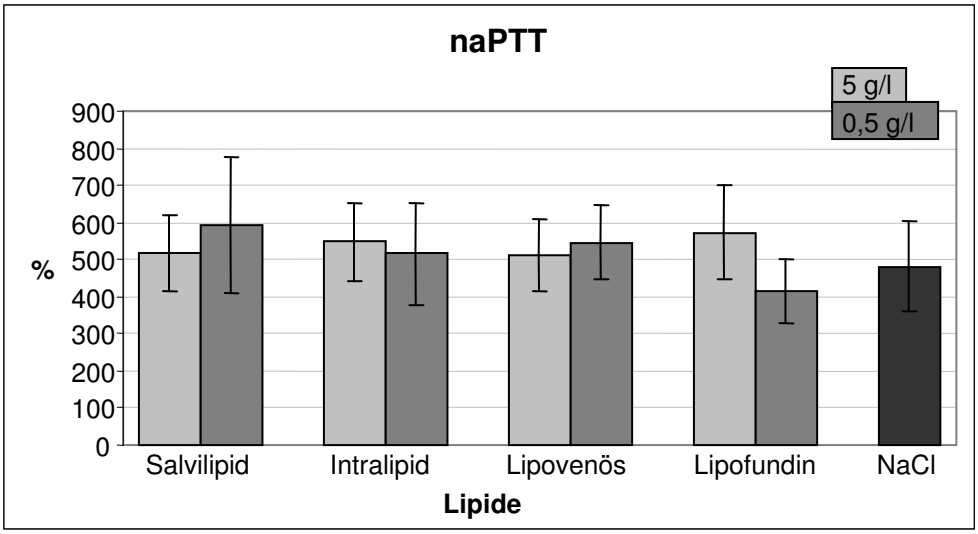

Abbildung 52 Nicht aktivierte PTT in der In-vitro Untersuchung. Dargestellt sind Mittelwerte x und Standardabweichungen x±s. Es ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Lipidlösungen.

Aktivierte Rekalzifizierungszeit (aRCT) (siehe Abbildung 53)

Bei allen Lipidlösungen konnte bezüglich des Vorhandenseins gerinnungsaktiver Phospholipide kein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt werden.

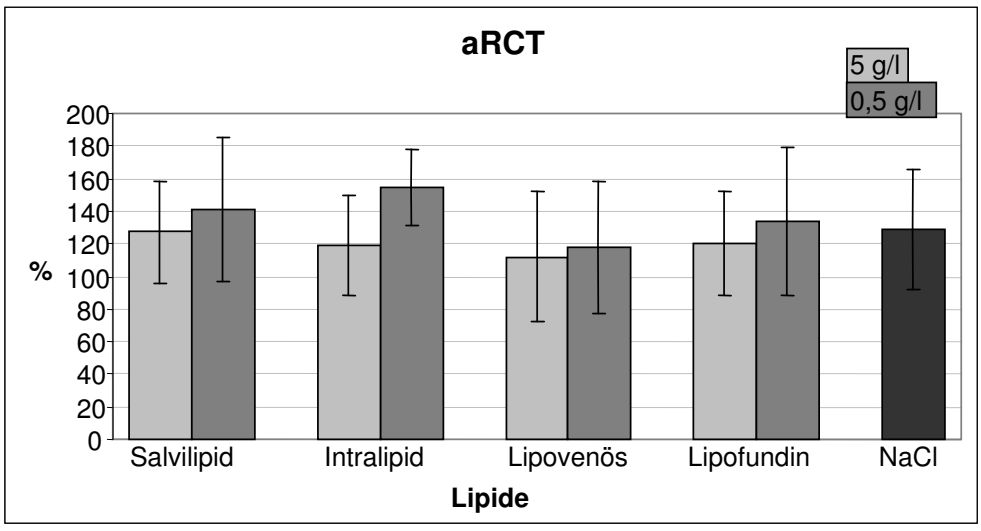

Abbildung 53 Aktivierte Rekalzifizierungszeit RCT in der In-vitro Untersuchung. Darge-

stellt sind Mittelwerte x und Standardabweichungen x±s. Es ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Lipidlösungen.

3.7 Thrombozytenaktivierungsmarker

Die Messung von **β-Thromboglobulin** als Thrombozytenaktivierungsmarker wurde nur bei der Klinischen Studie durchgeführt. Die gemessenen Werte bewegten sich zwischen 39,9 IU/ml und 54,1 IU/ml. Es gab weder statistische Unterschiede zwischen der Lipidgruppe und der Kontrollgruppe, noch statistische Unterschiede hinsichtlich des Messzeitpunkts.

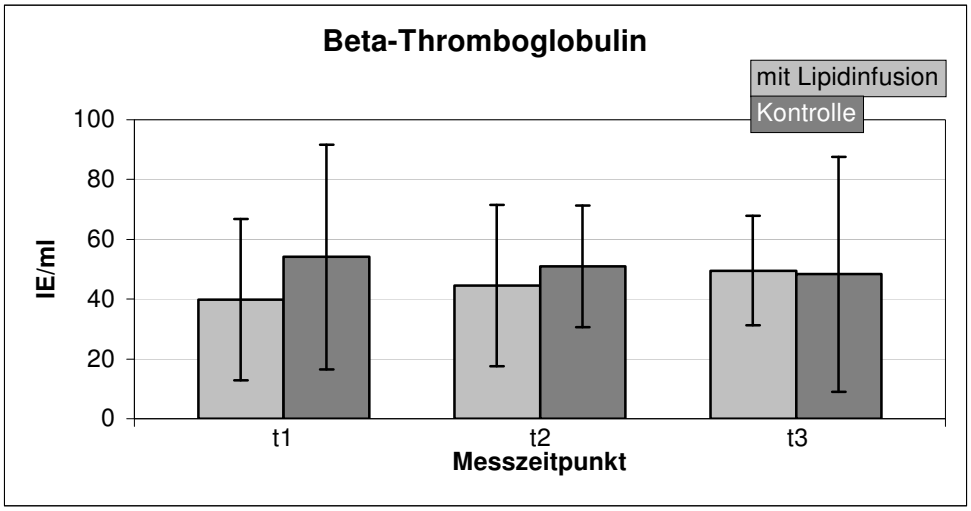

Abbildung 54 β-Thromboglobulin in der Klinischen Studie. Dargestellt sind Mittelwerte x und Standardabweichungen x±s. Es wurden weder bei der Lipidgruppe noch bei der Kontrollgruppe gesteigerte β-Thromboglobulinwerte gefunden.

3.8 Triglyceride im Serum

Die **Triglyceride** im Patientenserum stiegen bei den Patienten mit Lipidinfusion 24 Stunden nach der ersten Lipidgabe signifikant an, mit $p<0,05$.

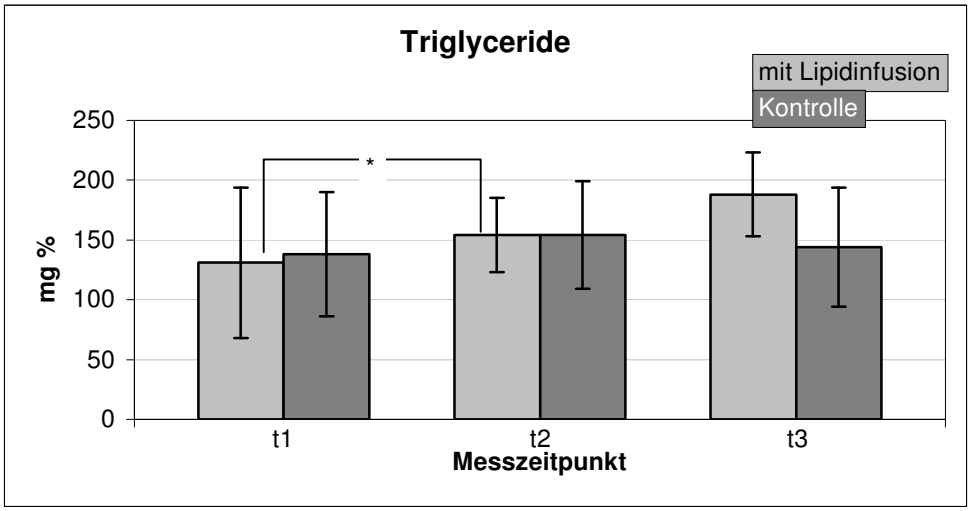

Abbildung 55 Triglyceride in der Klinischen Studie. Dargestellt sind Mittelwerte x und Standardabweichungen x±s.(*p<0,05). Zwischen Zeitpunkt t1 und Zeitpunkt t2 sind die Triglyceride im Serum der Lipidpatienten signifikant angestiegen.

3.9 Blutbild

3.9.1 Klinische Studie

Im Blut wurden verschiedene Parameter gemessen.

Die **Thrombozyten** (Abbildung 56) und das **mittlere Thrombozytenvolumen** (Abbildung 57) zeigten im Verlauf der Messungen und im Gruppenvergleich keine signifikanten Unterschiede. Die **Erythrozyten** (Abbildung 58), das **Hämoglobin** und das **mittlere korpuskuläre Volumen** (Abbildung 59) verhielten sich ebenfalls unauffällig. Nur die **Leukozyten** (Abbildung 60) nahmen in der Patientengruppe mit Lipidinfusion nach 48 Stunden signifikant ab (p<0,05). In der Kontrollgruppe ohne Lipidinfusion reduzierten sie sich ebenfalls, jedoch schon nach 24 Stunden (p<0,05).

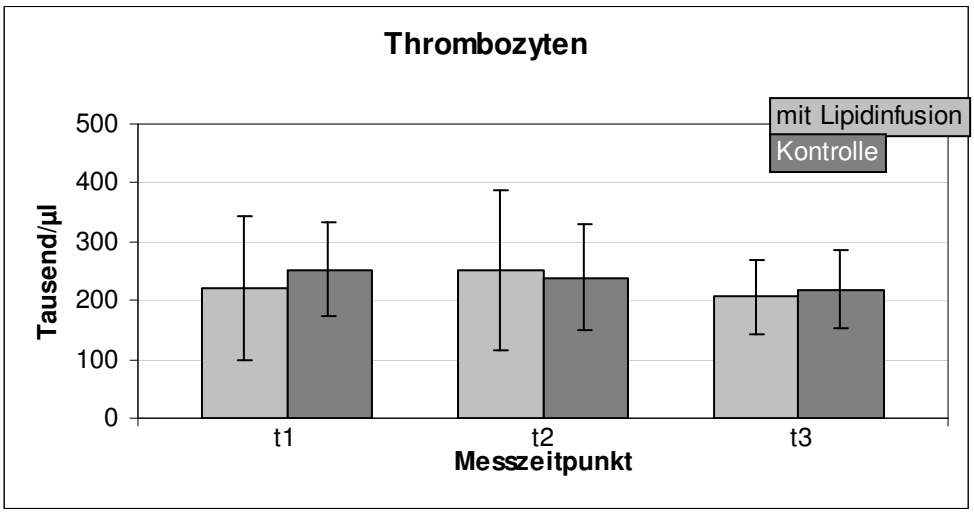

Abbildung 56 Thrombozytenzahl in der Klinischen Studie. Dargestellt sind Mittelwerte x und Standardabweichungen x±s.

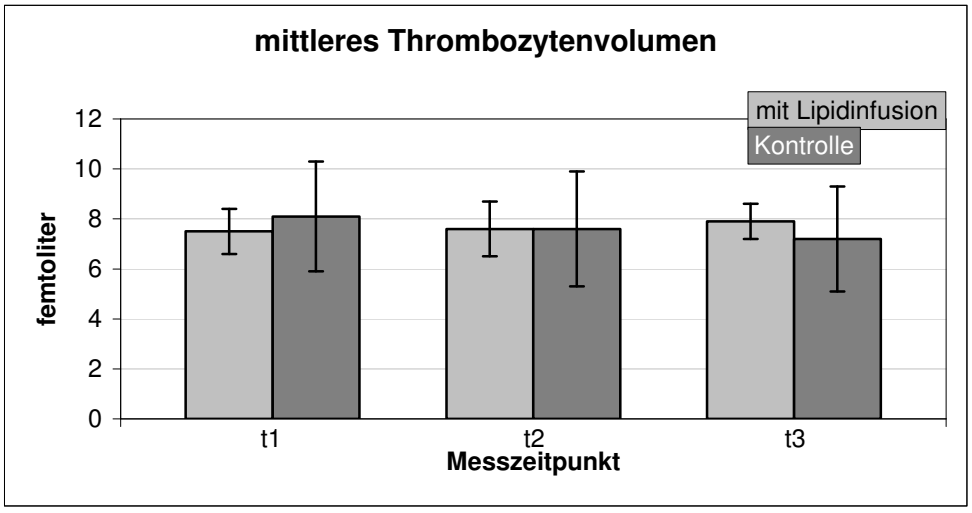

Abbildung 57 Mittleres Thrombozytenvolumen in der Klinischen Studie. Dargestellt sind Mittelwerte x und Standardabweichungen x±s.

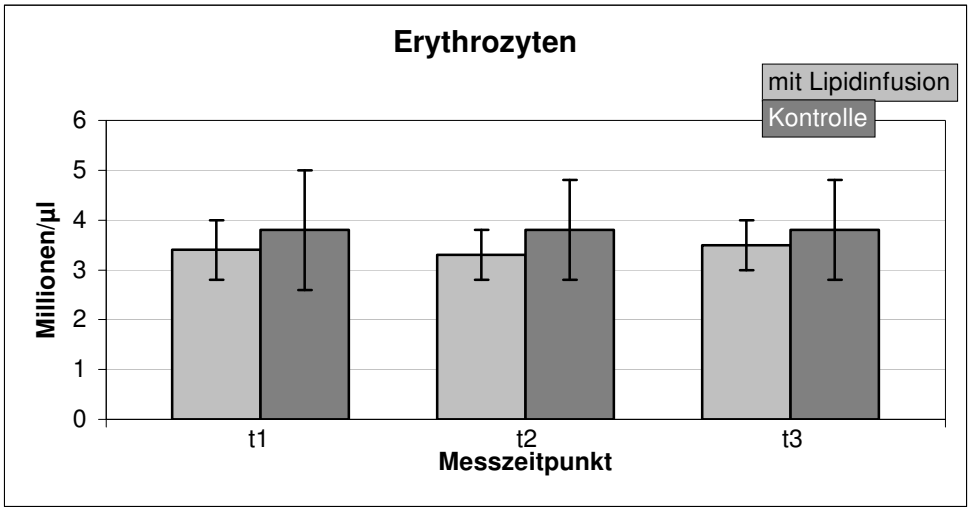

Abbildung 58 Erythrozytenzahl in der Patientenstudie. Dargestellt sind Mittelwerte x und Standardabweichungen x±s.

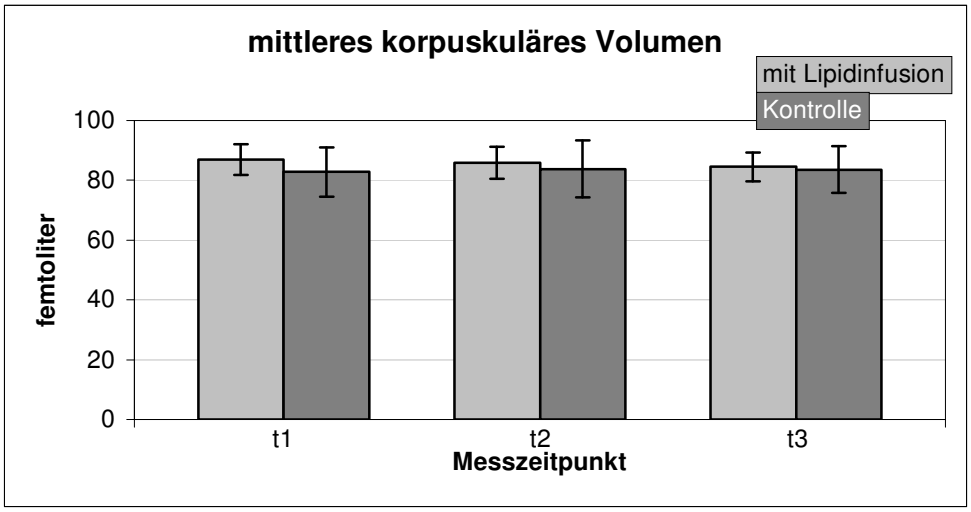

Abbildung 59 Mittleres korpuskuläres Volumen in der Patiententudie. Dargestellt sind Mittelwerte x und Standardabweichungen x±s.

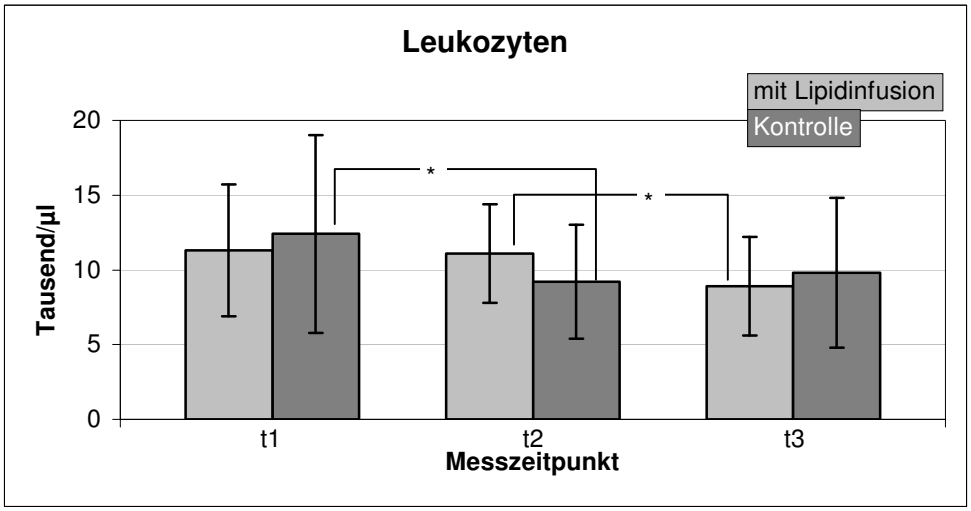

Abbildung 60 Leukozytenzahl in der Patientenstudie. Dargestellt sind Mittelwerte x und Standardabweichungen x±s.(*p<0,05). Bei den Patienten mit Lipidinfusion gab es zwischen t2 und t3 eine statistisch signifikante Abnahme der Leukozytenzahl. Bei der Kontrollgruppe ohne Lipidinfusion war ebenfalls eine signifikante Abnahme der Leukozytenzahl festzustellen, allerdings zwischen t1 und t2.

3.9.2 In-vitro Untersuchung

Bei den Probanden der In-vitro Untersuchung wurde zusätzlich ein EDTA-Probengefäß zur Messung der Blutbild-Werte abgenommen.

Es wurden folgende Blutwerte gemessen: Hämoglobin, Erythrozyten, Leukozyten, Hämatokrit, mittleres Plättchenvolumen. Alle Werte lagen im Normbereich. Mittelwerte und Standardabweichung sind in Tabelle 10 im Anhang aufgelistet.

4 Diskussion

4.1 Klinische Relevanz der untersuchten Fragestellung

Bei vielen hospitalisierten Patienten besteht ein höheres Thromboembolierisiko. Ursachen hierfür sind vor allem die Immobilisation, evtl. vorhergehende Operationen und andere Einflussfaktoren, wie Grunderkrankung, Vorschädigung, Alter, aber auch spezielle intensivmedizinische Probleme wie Sepsis und SIRS. Auch arterielle Verschlüsse wie Myokardinfarkt, peripher arterieller Verschluss und zerebrale Ischämien sind bei diesen Patienten, besonders bei Vorschädigung, ein nicht unerhebliches Risiko. Meist ist eine Aktivierung des Gerinnungssystems die Ursache dieser Komplikationen. Deshalb ist es wichtig, dass man durch eine geeignete Therapie entweder eine geringere Gerinnungsaktivierung erzeugt, oder, wenn es eine Gerinnungsaktivierung gibt, entsprechend auf diese reagiert. Dies muss durch eine geeignete Antikoagulation geschehen.

Die parenterale Ernährung setzt sich aus Glucose, Aminosäuren, Lipiden, Vitaminen und Spurenelementen zusammen, die individuell angepasst werden. Lipide sind dabei Energieträger. Laut Herstellerangaben haben Lipidemulsionen keine direkten Nebenwirkungen auf das Gerinnungssystem. Nur bei längerer Anwendung sind in extrem seltenen Fällen (1 von 1 Millionen Infusionen) Verminderungen der Thrombozytenzahlen bei Kindern beobachtet worden. Nur im Rahmen eines Überladungssyndroms kann es nach Herstellerinformation neben anderen Symtomen zu einer Thrombozytopenie, Blutungsneigung und Blutungen, sowie zu einer Veränderung bzw. Verminderung der Blutgerinnungsfaktoren (Blutungszeit, Gerinnungszeit, Prothrombinzeit) kommen. In der Literatur hingegen sind, wie in der Einleitung ausführlich erläutert, einige Nebenwirkungen auf das Gerinnungssystem beschrieben, die zum Teil auf die in den Lipidemulsionen als Emulgator enthaltenen Phospholipide zurückgeführt wurden.

Die Beantwortung der Frage, ob Lipidlösungen das Gerinnungssystem beeinflussen bzw. zu einer Gerinnungsaktivierung führen, war Gegenstand dieser Arbeit.

4.2 Ziel und Studiendesign der vorliegenden Arbeit

Ziel der Arbeit war es zu klären, ob die parenterale Applikation von Fettemulsionen einen Einfluss auf die Blutgerinnung, insbesondere auf die Thrombozytenfunktion, ausübt. Zu diesem Zweck wurden in dieser Arbeit zwei Studien durchgeführt.

- Die in-vitro-Studie überprüfte, ob eine Inkubation von Probandenblut mit Fettemulsionen eine Auswirkung auf die plasmatische Gerinnung und die Thrombozytenfunktion hat. Weiterhin sollte geprüft werden, ob es präparatespezifische Unterschiede gibt. Da die gebräuchlichen Fettemulsionen sich in Zusammensetzung und Herstellungsmethoden unterscheiden, wurden vier verschiedene handelsübliche Emulsionen untersucht. Auch der Einfluss der Konzentration der Fettemulsionen sollte geprüft werden. Deshalb wurden alle Untersuchungen jeweils mit zwei unterschiedlichen Lipidkonzentrationen (5 g/l und 0,5 g/l) durchgeführt.
- In der anschließenden klinischen Untersuchung bei parenteral ernährten Intensivpatienten sollte nun überprüft werden, ob tatsächlich eine Aktivierung oder eine Funktionsstörung der Hämostase, insbesondere der Thrombozyten, zu beobachten ist, und ob in-vitro gemessene Veränderungen gegebenenfalls am Patienten zu verifizieren sind.

Die Laboruntersuchungen sollten Hämostase und Thrombozytenfunktion der Blut-Lipid-Proben auf verschiedenen Ebenen des Gerinnungsablaufs erfassen, um so eine umfassende und ausreichende Interpretation der Ergebnisse zu ermöglichen.
Alle Methoden wurden für beide Studien gleich verwendet. Bei den meisten Laboruntersuchungen wurden Doppelbestimmungen durchgeführt.

4.3 Methodendiskussion

Die in dieser Arbeit verwendeten Analysemethoden hatten zum Ziel die Hämostase, insbesondere die Thrombozytenfunktion, so umfassend wie möglich zu untersuchen.
Vor allem wurden die spontane Thrombozytenaggregation, die induzierte Thrombozytenaggregation im Vollblut und die induzierte Thrombozytenaggregation im plättchenreichen Plasma mit verschiedenen Methoden gemessen. Zusätzlich wurden die Aktivierung der plas-

matischen Gerinnung und der Thrombozytenaktivierungsmarker β-Thromboglobulin erfasst. Bestimmungen von Blutbild und Triglyceriden ergänzten die Messungen.

Die **spontane Thrombozytenaggregation** spiegelt den Aktivitätszustand der Plättchen wieder. Im Organismus befinden sich die Thrombozyten in einem Gleichgewicht, d.h. sie können aggregieren und desaggregieren.

Die spontane Thrombozytenaggregation wurde mit drei verschiedenen Methoden erfasst:

Die Bestimmung der reversiblen Aggregate erfolgte mit dem Cell-Counter, die der irreversiblen Aggregate mittels mikroskopischer Zählung, für die Quantifizierung der Spontanaggregation wurde die Vollblutaggregometrie verwendet.

Mit der Bestimmung der reversiblen und irreversiblen Aggregate war es möglich den morphologischen Zustand der Thrombozytenaggregation im Blutstrom zum Zeitpunkt der Blutentnahme zu erfassen. Zusätzlich konnte mit der Vollblutaggregometrie die Thrombozytenaggregation funktionell bestimmt werden. Eine Verfälschung der Ergebnisse dieser drei Untersuchungen wäre im Prinzip durch inkorrekte Entnahme, Transport und Lagerung der Proben möglich. So zeigte z.B. die Arbeitsgruppe um Saniabadi[85], dass durch Blutfluss und Qualität der Venenpunktion die Aggregatbildung beeinflusst wurde. Eine Untersuchung von Mani et al zeigte bei der Wahl des Abnahmesystems – Butterfly versus Nadel – keinen Einfluss auf die Plättchenfunktion[86]. Um eine solche Verfälschung zu vermeiden wurde die Blutentnahme, wie in Kapitel 2.1 beschrieben, nach einem standardisierten Schema durchgeführt. Alle Proben wurden gleich behandelt, mit dem Ziel einer möglichst hohen Messgenauigkeit. Die Reihenfolge der Messungen der verschiedenen Lipidproben in der in-vitro-Studie wurde ständig verändert um systematische Fehler zu vermeiden.

Das Zeitintervall zwischen Probenentnahme und Messung, die bei der in-vivo-Studie durch den Probentransport, bei der in-vitro-Studie durch die 20-minütige Inkubation bedingt war, könnte zu einem Aktivitätsverlust der Thrombozyten geführt haben. Dies war lediglich für die Bestimmung der Spontanaggregation mit der Vollblutaggregometrie von Bedeutung. Die Abkühlung der Blutproben während des erwähnten Zeitintervalls stellte ein weiteres Problem dar. Je kühler die Proben zu Beginn der Messung waren, desto länger war die Phase des Temperaturartefaktes. Während dieser Zeit konnten Aggregationsvorgänge nicht quantitativ erfasst werden, obwohl sie das Messergebnis beeinflussten.

Für die Lagerung und Stabilisierung der Proben wurde ein Glukose-Citrat-Gemisch eingesetzt. Citrat verursacht im Vergleich zu EDTA und unfraktioniertem Heparin am wenigsten eine Plättchenaggregation[87]. Jedoch kann eine verminderte Aggregabilität durch den citratbedingten Kalziumentzug nicht ausgeschlossen werden.

Die Messung der reversiblen Aggregate mittels Countermethode wurde bereits in zahlreichen Studien evaluiert, wobei sowohl in bewegtem[88, 89, 90] als auch unbewegtem Blut[91] gemessen wurde. In dieser Arbeit wurde der mittels Glutaraldehyd fixierte Ausgangswert der Thrombozytenaggregate mit einer mittels EDTA desaggregierten Blutprobe verglichen. Das mittlere Pättchenvolumen gab dabei zusätzliche Information, da bei einer Spontanaggregation in-vivo zunächst die großen, jüngeren Plättchen verbraucht wurden[92].

Bei der Messung der irreversiblen Aggregate wurde die Methode von Velaskar abgewandelt. Auf Ausstrich, Fixierung und Färbung wurde verzichtet, stattdessen wurde eine Zählkammer zur exakten Quantifizierung der Thrombozyten verwendet. Dadurch verringerte sich die Zahl der Artefakte und zufällig zusammenliegende Thrombozyten konnten von echten Thrombozytenaggregaten unterschieden werden. Die beschriebene Modifikation hatte außerdem den Vorteil, dass die Plättchen durch EDTA lediglich deaktiviert aber noch vital waren, was die Validität dieser Methode erhöhte.

Die Vollblutaggregometrie vervollständigte die Messungen zur Bestimmung der Spontanaggregation. Besonders zur Registrierung von Einflüssen in-vitro war sie geeignet, da sie kontinuierlich angewendet werden konnte. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Methoden der Aggregometrie ermöglichten eine reproduzierbare Beurteilung des Funktionszustands der Thrombozyten.

Als weitere Thrombozytenaggregationsuntersuchungen dienten die Thrombelastographie, der In-vitro-Blutungstest und die induzierte Aggregation mit der Vollblutaggregometrie. Alle drei Methoden messen die **induzierte Thrombozytenaggregation** im Vollblut.

Die Thrombelastographie ist als globaler Gerinnungstest besonders gut für die Untersuchung der plasmatische Gerinnung geeignet, sowie für die Eigenschaft der Plättchen, Thromben zu retrahieren. Zusätzlich können Aussagen über die Beeinflussung der Fibrinolyse gemacht werden.

Der In-vitro-Blutungstest hat eine herausragende Stellung unter den Plättchenfunktionstests, da er die primäre Hämostase simuliert. Es handelt sich hier um eine Scherkraft-induzierte Aggregation, die durch den hohen Fluss durch eine dünne Kapillare erzielt wird. Durch Kollagen erfolgt lediglich eine Verstärkung der Reaktion. Die Untersuchung der primär hämostatische Funktion der Plättchen mit dem In-vitro-Blutungstest hat vor allem bei diffusen Blutungen aus großen Wundflächen Bedeutung, wohingegen die Ergebnisse der Thrombelastographie eher im Zusammenhang mit postoperativen Nachblutungen (die durch mangelnde Festigkeit der Blutgerinnsel bedingt sind) eine Rolle spielen, so dass sich diese beiden Methoden in ihrer Aussage gut ergänzen.

Die Vollblutaggregometrie, bei der im Vollblut eine Thrombozytenaggregation induziert wird, ist schon lange ein etabliertes Messverfahren. Im Gegensatz zur Untersuchung der Plättchenaggregation im plättchenreichen Plasma können Erythrozyten und Leukozyten die Ergebnisse beeinflussen. So fand die Arbeitsgruppe um Abbate[93] eine Korrelation zwischen Leukozytengehalt und kollageninduzierter Plättchenaggregation. Müller et al[94] untersuchten systematisch den Einfluss von Erythrozyten-, Leukozyten- und Thrombozytenzahlen auf die Ergebnisse des Tests und fanden in unterschiedlichen Maße eine Erhöhung des Impedanzanstiegs. Die genannten zellulären Blutbestandteile können zwar zu einem Verlust an Spezifität führen, bilden dafür jedoch besser die Verhältnisse in-vivo ab, da sie ebenfalls an der Hämostase in-vivo beteiligt sind.

Die induzierte Plättchenaggregation im plättchenreichen Plasma ist das am weitesten verbreitete und präziseste Verfahren zur Funktionsanalyse der Plättchen. Dieser Test ist besonders zur Bestimmung des thrombozytären Gerinnungspotenzials geeignet. Plättchenfunktionstest können im klinischen Alltag, insbesondere bei Intensivpatienten, eine wichtige Rolle spielen. So wird gefordert, dass sie einen Weg in klinische Laborstandards finden[95]. Problematisch war bei diesem Test die Untersuchung des Probandenserums mit der höheren Lipidkonzentration. Hier wurde die Trübung bei einigen Proben der in-vitro-Studie so stark, dass der Signalabstand vom Leerwert zu gering und eine Messung unmöglich wurde. Diese lipidbedingte Trübung war in der niedrigeren Konzentration nicht problematisch, kann jedoch als mögliche Verfälschungsquelle der Ergebnisse nicht ausgeschlossen werden. Eine weitere mögliche Fehlerquelle sind Veränderungen der Thrombozyten als Folge der Zentrifugation aus der Blut-

komponentenpräparation[96]. In einer neueren Untersuchung[97] hat eine Arbeitsgruppe die impedanzaggregometrische Plättchenaggregation im Vollblut mit der optischen Messung im PRP verglichen. Es zeigten sich einige Vorteile der Impedanzmethode gegenüber der optischen Methode. Das Milieu ist physiologischer, es geht schneller, die Sensitivität ist höher, und sie erfordert keine Zentrifugation.

Die Testverfahren zur Aufdeckung einer **Aktivierung der plasmatischen Gerinnung** vervollständigten die Untersuchungen.
Als spezifischer Marker einer Thrombozytenaktivierung diente β-Thromboglobulin. β-Thromboglobulin ist eines der Proteine, die von den Plättchen aktiv sezerniert werden. Das Testverfahren zur Bestimmung dieses Markers ist zwar sehr sensitiv, aber auch störanfällig. Besonders Probenentnahme und Probenstabilisierung spielen hier eine wichtige Rolle.
Zur Untersuchung systemischer Ungleichgewichte der **plasmatischen Gerinnung** wurden einfache Testsysteme verwendet. Mit Hilfe dieser Testsysteme kann nahezu die gesamte Gerinnungskaskade erfasst werden, allerdings geben sie keine genauen Hinweise auf Ursache der Gerinnungsaktivierung oder den genauen Anteil des Aktivierungsvorgangs. Insgesamt fünf verschiedene Verfahren (TPZ, aPTT, naPTT, aRCT, RCT) wurden angewendet, um zumindest gewisse Rückschlüsse auf die Ursache der Gerinnungsaktivierung zu ermöglichen.

Diskussion In-vitro Untersuchung und Klinische Studie

Diese Arbeit umfasste zwei Studien, die mit gleichen Messmethoden durchgeführt wurden.
Zunächst wurde die In-vitro-Studie durchgeführt, anschließend die Klinische Studie.
Der wesentliche Unterschied der Klinischen Studie zur In-vitro Untersuchung besteht darin, dass in-vivo zusätzliche Einflussgrößen auf die Thrombozyten einwirken.
Das Endothel fehlt, welches schon allein durch seine sehr große Oberfläche ein wichtiger Einflussfaktor sein kann. Auch andere feste Blutbestandteile, welche für die meisten Untersuchungen abzentrifugiert wurden (außer Vollblutaggregometrie, Thrombelastographie und In-vitro-Blutungstest), könnten Einfluss nehmen. Auch Schwankungen bei den Konzentrationen der Lipide durch metabolisch bedingte individuelle Unterschiede im Blut der Patienten könnten möglich sein.

Es entstanden jedoch auch unbeeinflussbare studienbedingte Störfaktoren, welche nachfolgend erläutert werden.
Die Thrombozyten sind bei der in-vivo-Messung den Lipidemulsionen wesentlich länger ausgesetzt als bei den in-vitro-Messungen. Daraus folgt, dass eventuelle längerfristige Veränderungen der Hämostase bei der in-vitro-Messung nicht mitgefasst werden können.
Auch die Inhomogenität des Patientengutes bei der klinischen Patientenstudie stellt einen möglichen Störfaktor da, weil sich die Patienten hinsichtlich Grunderkrankung und Ausgangssituation des Patienten, Operationen und Narkosedauer bei Operationen eventuell auch in Bezug auf nicht zu erkennende Faktoren unterscheiden. Bei der in-vitro-Studie wurden alle Messungen unter gleichen Bedingungen durchgeführt. Anzahl und Ausmaß möglicher Störfaktoren sind durch die Einheitlichkeit der Probanden wesentlich geringer, wodurch die Proben von vornherein wesentlich homogener sind. Die exakte Inkubationsdauer mit Lipiden und die genaue Lipidkonzentration in der Blutprobe, sowie die sofortige Probenverarbeitung sind weitere Vorteile der in-vitro-Messung.
Nachteilig kann sich jedoch auswirken, dass die Lipidzugabe erst nach der Blutentnahme erfolgt ist. Zusätzlich ist zu beachten, dass hier gesunde Probanden getestet wurden, die parenterale Ernährung mit Lipiden jedoch meist bei kranken Personen eingesetzt wird. Trotz der sofortigen Probenverarbeitung ist es außerdem dennoch möglich, dass wie bei den in-vivo-Messungen individuelle pH-Wert-Schwankungen und eine begrenzte Sauerstoffversorgung der Thrombozyten ein zusätzlicher Störfaktor sein könnten.

Bei der Klinischen Studie dauerte die Probenverarbeitung einige Minuten länger, was durch die etwas längere Inkubationsdauer der Thrombozyten mit den Lipiden Veränderungen nach sich ziehen könnte.
Zur Antikoagulation wurde bei allen Blutproben Citrat verwendet, welches den Blutproben Kalzium entzieht. Dieser citratbedingte Calziumentzug kann die Thrombozyten beeinflussen.
Die Methoden sind jedoch auf den definierten Calciumentzug eingestellt.

Für die Klinische Studie ist noch zu erwähnen, dass die Fallzahl n=12 nicht sehr hoch ist. Größere n-Zahlen waren aufgrund des Aufwands der Messmethoden in diesem Rahmen nicht

durchzuführen. Die Zahl reicht aufgrund der umfangreichen Messverfahren jedoch aus, um klinisch relevanten Veränderungen der Gerinnung nachzuweisen. Dabei reicht es aus, Gruppendifferenzen zu erfassen, die über den zeitlichen und (erheblichen) intraindividuellen Schwankungen der Messgrößen liegen. In diesem Zusammenhang ist der Fehler zweiter Art weniger bedeutsam.

4.4 Wesentliche Ergebnisse und Diskussion dieser Ergebnisse

Interpretation der Ergebnisse für die Thrombozytenaggregation

Die Thrombozytenaggregation wurde als Spontanaggregation und induzierte Aggregation gemessen. Es kamen dabei verschiedene Messmethoden zur Anwendung welche in Kapitel 2.3 beschrieben wurden.

Klinische Studie

Die Messung der Spontanaggregation und der induzierten Aggregation mit der **Vollblutaggregometrie** (siehe Abbildung 18, Abbildung 19, Abbildung 20) ergab zu keinem Messzeitpunkt signifikante Veränderungen. Ebenso gab es zwischen Patienten- und Kontrollgruppe keine signifikanten Unterschiede. Bei allen Blutproben war eine leichte Neigung zur Aggregation zu erkennen (Werte zwischen 0,1 und 3,6 Ohm/h), welche statistisch nicht signifikant war. Eine leichte Aggregationstendenz wurde auch in einer Untersuchung von Hansen und Brockbank[98] beobachtet, dort aber abkühlungsbedingt. Die außergewöhnlich starke Streuung, welche zum Zeitpunkt t1 auffällt, könnten Ausreisser sein, da diese Messphase äußerst empfindlich auf äußere Faktoren wie geringgradige Temperaturschwankungen etc. reagierte.

Die Messung der induzierten Aggregation mit der **optischen Methode** zeigte eine Verlangsamung bzw. eine Verminderung der **kollageninduzierten Thrombozytenaggregation** (siehe Abbildung 24, Abbildung 25)**.**

Die Thrombozyten der Patientengruppe reagierten bei der Messung der maximalen Steigung nach 24 Stunden Lipidinfusionsgabe (t2) viel langsamer als die der Kontrollgruppe ($p<0,01$). Sie waren zum Zeitpunkt t2 auch langsamer in ihrem Aggregationverhalten als vor der Lipidinfusion (t1) ($p<0,01$). Die Messung der maximalen Aggregation zeigte die gleichen Ergeb-

nisse. Zum Zeitpunkt t2 war die maximale Aggregation niedriger als zum Zeitpunkt t1 ($p<0,001$).

Ein lipidbedingtes herabgesetztes Aggregationsverhalten wurde zwar schon gefunden[50, 51, 52, 53], jedoch meist mit anderen Messparametern. Eine Studie[99] an 44 Patienten zeigte bei postoperativen Patienten mit Lipidinfusionen ein herabgesetztes Aggregationsverhalten der Thrombozyten. Hierbei wurde die Resonanzthrombographie als Methode eingesetzt, welche die Thrombozyten im Vollblut testet. Unsere Vollblutmessungen zeigten keine wesentlichen Veränderungen im Aggregationsverhalten bei den Patienten. Diese unterschiedlichen Ergebnisse könnten mit dem Zeitpunkt der Messungen zusammenhängen. Wir begannen mit den Messungen im Mittel zwei bis drei Tage postoperativ, wohingegen bei dieser Studie die meisten Veränderungen am ersten postoperativen Tag auftraten, und die präoperativen Messwerte am dritten postoperativen Tag wieder erreicht wurden.

Das herabgesetzte Aggregationsverhalten in der optischen Messung mit PRP wurde möglicherweise ebenfalls durch das oben diskutierte veränderte Milieu der Thrombozyten bei der optischen Messung bedingt. Darauf deutet hin, dass bei der induzierten Aggregation in der Vollblutaggregometrie keine signifikanten Auffälligkeiten gefunden wurden. Möglicherweise ist die Trübung des Plasmas durch die Lipide ebenfalls eine Erklärung für diese Messergebnisse im optischen System. Aufgrund dieser Studie ist jedoch keine Aussage über einen eventuell vorhandenen Einfluss möglich.

Ziel von Thrombozytenaggregationsuntersuchungen in vitro ist es natürlich, das Milieu, in dem sich die Thrombozyten in-vivo befinden, so gut wie möglich zu reproduzieren. Dazu ist Vollblut sehr gut geeignet, was eine neuere Untersuchung[97] ebenfalls zeigt, da die Umgebung der Thrombozyten weitgehend physiologisch ist, auch wenn natürlich der Einfluss des Endothels nicht untersucht werden kann. Nachteil ist jedoch, dass andere Blut- oder Plasmakomponenten sowohl Einfluss auf das Aggregationsverhalten als auch auf die Messung selber nehmen können. Dies gilt zum Teil auch für plättchenreiches Plasma, denn auch hier ist das Plasma ein möglicher Einflussfaktor. Würde man gewaschene Plättchen verwenden, suspendiert in einem geeigneten Puffer, könnten eventuell Ergebnisse erzielt werden, die sehr spezifisch für Thrombozyten wären. Je mehr die Thrombozyten jedoch vorbehandelt werden, desto

leichter werden sie natürlich auch aktiviert. Es ist also nicht leicht diese Gratwanderung zwischen Aktivierung und Spezifität zu begehen.
Die Beobachtung einer Verzögerung der Thrombozytenaggregation durch die Anwesenheit von Lipidinfusionen hatten schon 1973 Hovig und Grottum et al[100, 101] gemacht. Sie zeigten, dass einige Plättchen Lipidpartikel auf- und zum Teil auch eingelagert hatten. Zusätzlich stellten sie eine verminderte elektrophoretische Mobilität bei Plättchen und Erythrozyten fest, was durch eine Interaktion mit den Lipidpartikeln erklärt werden könnte. Diese, so vermuteten die Autoren, könnte die Plättchenfunktion beeinflussen und zu einer verminderten Plättchenadhäsion führen. Dies würde die vorliegenden Ergebnisse ebenfalls bestätigen. Eine Erklärung dafür wäre eventuell die Veränderung der Elektrizitätskonstante des Plasmas, und damit eine physikalische Abstoßung der Thrombozyten. Es wäre auch eine Einlagerung der Lipide in die Zellmembranen der Thrombozyten denkbar, die eine Herabsetzung der Aktivität bewirken könnte.

Im Gegensatz dazu konnte bei der Zählung der **reversiblen Aggregate** bei Lipid- und Kontrollgruppe (siehe Abbildung 40) eine signifikante Zunahme der Aggregate festgestellt werden: in der mit Lipiden behandelten Patientengruppe nach 48 Stunden ($p<0,01$) und bei der Kontrollgruppe schon nach 24 Stunden ($p<0,05$). Dies kann verschieden interpretiert werden. Einerseits kann es bedeuten, dass bei Intensivpatienten generell eine gesteigerte Bereitschaft der Thrombozyten zur Aggregation vorliegen kann, deshalb reagieren auch beide Gruppen. Die verspätete Reaktion der Lipidgruppe kann zudem bedeuten, dass durch Lipide eine Verzögerung dieser verstärkten Aggregationsbereitschaft vorliegen könnte. Ebenso kann diese Verzögerung nicht unbedingt als Beweis für eine nicht stattfindende verstärkte Aggregationsbereitschaft dienen. Denn es wäre auch möglich es als verspätet einsetzende verstärkte Aggregationsbereitschaft zu sehen, welche durch die Tatsache, dass Intensivpatienten sowieso schon reagieren, verschleiert werden würde. Dies sind jedoch alles sehr vage Intepretationen, die sicherlich noch weiterer Untersuchungen bedürften.

In einer neueren Untersuchung fanden Tornvall et al[102] heraus, dass LDL-Partikel eine gesteigerte ADP-induzierte Aggregation im Vollblut, jedoch nicht im plättchenreichen Plasma ver-

ursachen. Die Autoren vermuteten, dass diese Aggregation im Vollblut indirekt, also nicht über das LDL selbst, sondern über Interaktionen mit anderen festen Blutbestandteilen entstanden ist.

Auch eine lipidbedingte Veränderung im Thromboxanstoffwechsel käme als Ursache einer Aggregationsverzögerung in Frage. Bei unseren klinischen Untersuchungen gab es im Vollblut jedoch keine Veränderung, nur im PRP eben diese verspätete Reaktion. Die Lipidtrübung des PRP kann, wie in der Methodendiskussion bereits erwähnt, auch die mögliche Ursache einer Aggregationsverzögerung sein.

Der Anteil **irreversibler Aggregate** (siehe Abbildung 41) zeigte bei keiner Gruppe und zu keinem Messzeitpunkt wesentliche Veränderungen, und lag zwischen 2,7 % und 2,9 %.

In-vitro Untersuchung

Die Messung der Spontanaggregation und der induzierten Aggregation mit den vier Lipidlösungen zeigte vor allem im PRP einige Auffälligkeiten.

Bei der Messung der Spontanaggregation mit der **Vollblutaggregometrie** (siehe Abbildung 21) neigten die Thrombozyten bei fast allen Ansätzen dazu leicht zu desaggregieren, mit Werten zwischen 0 und -1,5 Ohm/h. Nur die mit Lipofundin® in höherer Konzentration (5 g/l) inkubierte Blutprobe zeigte eine Spontanaggregation von 1,3 Ohm/h. Diese war signifikant erhöht im Vergleich zu der mit Lipovenös® in höherer Konzentration (5 g/l) inkubierten Blutprobe (-1,5 Ohm/h, $p<0,05$). Nach Zugabe von Kollagen wurden jedoch bei keiner Lipidlösung Auffälligkeiten beobachtet (siehe Abbildung 22 und Abbildung 23).

Im PRP fanden wir bei der Messung der induzierten Aggregation bei Salvilipid® ein verstärktes Aggregationsverhalten gegenüber Lipovenös® und Intralipid®, welche erniedrigte Werte aufwiesen. Gegenüber der NaCl-Kontrolle waren die Werte für Intralipid® ebenfalls erniedrigt, für Lipovenös® nicht.

Die Messung der **reversiblen Aggregate** (siehe Abbildung 42) ergab einen statistisch signifikant erhöhten Anteil bei der mit Salvilipid®-Lösung in höherer Konzentration inkubierten Blutproben gegenüber der Kontrolle mit physiologischer Kochsalzlösung. Die Salvilipid®-Lösung hatte einen Anteil von 26 % an reversiblen Aggregaten, die Kontrolle lag bei 15,2 %. Die Werte der anderen drei Lipidlösungen lagen im Bereich der Kontrollblutprobe.

Die Messung der irreversiblen Aggregate ergab bei keiner Lipidlösung auffällige Werte.

Insgesamt kann man bei den Messungen für die Spontanaggregation und für die induzierte Aggregation die meisten Auffälligkeiten bei Salvilipid® festestellen, welches bei einer Messung gegenüber der Kontrolle und zweimal gegenüber anderen Lipidlösungen ein verstärktes Aggregationsverhalten gezeigt hat.
Als zweites Präparat stellte sich Lipofundin® bei einer Messung verstärkt gegen ein anderes Präparat dar, jedoch nicht gegenüber der Kontrolle.
Demgegenüber zeigten Intralipid® und Lipovenös® ein- bzw. zweimal ein erniedrigtes Aggregationsverhalten gegenüber einem anderen Präparat und der Kontrolle.
Die Messergebnisse für die Spontanaggregation und induzierten Aggregation können ein Hinweis darauf sein, dass bei Gabe von Lipofundin® und Salvilipid® eine erhöhte Aggregationsbereitschaft vorhanden ist.
Salvilipid® hat im Vergleich zu den anderen Präparaten den niedrigsten Anteil an Phosphatidylcholin. Von Phosphatidylcholin wäre jedoch eine Aktivierung der Hämostase zu erwarten (siehe auch Kapitel 1.3). Dieser Effekt war hier jedoch nicht nachzuweisen. Da es sonst keine Unterschiede in der Zusammensetzung der Salvilipid®-Lösung zu den anderen Lipidlösungen gibt, käme noch die unterschiedlichen Hersteller und die damit verbundene evtl. etwas unterschiedliche Herstellungsweise als Erklärungsmöglichkeit in Frage. Inwieweit diese herstellungsbedingten Unterschiede in der Zusammensetzung der Fette dafür ursächlich sind bleibt unklar.
Lipofundin® unterscheidet sich von allen anderen Lösungen im zusätzlichen Anteil an mittelkettigen Triglyceriden (MCT). Diese mittelkettigen Triglyceride machen etwa 50 % des in den Lipidlösungen enthaltenen Sojabohnenöls aus. Demnach wäre es möglich, dass diese von den anderen Lipidlösungen differierende Zusammensetzung einen fördernden Effekt auf die Plättchenaggregation ausüben könnte. Es gibt in der Literatur wenige Untersuchungen welche speziell MCT-haltige Lipidlösungen betrachten, insbesondere im Hinblick auf Thrombozytenverhalten. Eine Arbeitsgruppe von Martinez hat zwei Lipidlösungen verglichen, wovon eine nur LCT enthielt und die andere LCT und MCT (1:1). Es wurden jedoch nur Parameter des plasmatischen Gerinnungssystems getestet, welche keine Unterschiede zeigten.

Ob bei Lipofundin® jedoch diese eine Messung der gesteigerten Spontanaggregation, welche gegen ein anderes Präparat erhöht war, nicht jedoch gegenüber der Kontrolle, einen hohen Aussagewert hat, bleibt fraglich. Denn sowohl die induzierte Aggregation im Vollblut und im PRP, als auch die reversiblen und irreversiblen Aggregate wiesen keine weiteren Auffälligkeiten auf. Deshalb könnte man diese erhöhte Spontanaggregation unter Umständen auch als Grundaktivierung interpretieren.

Für die Salvilipidlösung, welche im Vollblut unauffällige Werte aufzeigte, jedoch im PRP eine gesteigerte induzierte Aggregation gegenüber zwei anderen Lösungen aufwies, sind die Hinweise auf eine erhöhte Aggregationsbereitschaft der Thrombozyten deutlicher. Zudem waren auch die reversiblen Aggregate gegenüber der Kontrolle erhöht. In wieweit diese Messungen jedoch einen Hinweis über ein bestehendes Thromboserisiko geben können, bedürfte noch weiteren Untersuchungen. Die Messung der **irreversiblen Aggregate** (siehe Abbildung 43), welche bei keiner Lipidlösung auffällig war, könnte ein Hinweis dafür sein, dass eine Thrombozytenaktivierung hier beendet sein könnte, d.h. die Thrombozyten sich letztendlich wieder getrennt haben, was bei der mikroskopischen Auszählung zum Teil auch direkt beobachtet werden konnte.

Die wenigen ausgezählten Aggregate (zwischen 1,7 % und 2,6 %, wobei keine signifikanten Unterschiede zwischen den Lipidlösungen oder zur Kontrolle festzustellen waren), lagen wie auch in der in-vitro-Studie dabei in kleinen Thrombozytenanhäufungen vor. Meist waren nur zwei bis sechs Plättchen beteiligt, was ungefähr einer Partikelgröße von maximal 40 fl entspricht. Derartige Aggregate sind aufgrund ihrer geringen Größe durchaus in der Lage Kapillaren zu passieren, da sie kaum größer als ein normaler Erythrozyt sind. Thromboembolische Komplikationen können aufgrund dieser Tatsache weitgehend ausgeschlossen werden. Inwiefern das Vorhandensein einiger Aggregate dieser Größenordnung, angesichts der Tatsache, dass die ausgezählten Volumina sehr klein waren (0,1 µl), Hinweise darauf geben kann, dass im Gesamtorganismus auch große Aggregate vorhanden sind, bleibt zu überprüfen.

Mit unseren Messungen der Spontanaggregation und der induzierten Aggregation werden sehr feine Veränderungen beobachtet, welche eine Tendenz aufzeigen können. Es wurden noch andere Untersuchungen in dieser Arbeit durchgeführt, welche uns weitere Hinweise geben konnten, und im Anschluss besprochen werden.

Beim **Betrachten der Ergebnisse** der Spontanaggregation für beide Studien, dass heißt sowohl bei Patienten mit und ohne Lipidlösung als auch bei gesunden Probanden mit Lipiden, fällt auf, dass eine gewisse Grundaktivierung der Thrombozyten vorhanden zu sein scheint. Die Spontanaggregation mit der Vollblutaggregometrie und die Bestimmung der reversiblen Aggregate demonstrierten diese Aktivierung, die als physiologisch betrachtet werden muss.
Die Messungen der Spontanaggregation deuten darauf hin, dass Thrombozyten, was bekannt ist, sehr empfindlich auf Außeneinflüsse reagieren. Bereits geringste Umgebungsveränderungen scheinen eine erhöhte Aggregationsbereitschaft, oft reversibel, zur Folge zu haben. Die Desaggregation der Thrombozyten bei der Vollblutaggregometrie in der in-vitro-Studie vermag dieses Phänomen zu verdeutlichen. Die Thrombozyten lagern sich zu Beginn, noch vor der eigentlichen Messung, an die Elektroden an, weil es sich einerseits um eine unphysiologische Oberfläche handelt, und weil sie andererseits durch die Blutentnahme oder Pipettieren aktiviert sein können. Da es jedoch nur zu einer kurzfristigen Gerinnungsaktivierung kommt, werden sie durch die Strömung, die vom Magnetrührer ausgeht, wieder weggerissen und es findet eine kurzfristige Desaggregation statt.

Bedeutung der spontanen Thrombozytenaggregation

Die Aussagefähigkeit der spontanen Thrombozytenaggregation wurde bei einigen Studien, die sich mit unterschiedlichen thromboembolischen Komplikationen befassten, als sehr hoch eingestuft.
So wurde in der HAPARG-Studie 1999[103] gezeigt, dass eine gesteigerte spontane Thrombozytenaggregation Anzeichen für einen im Gang befindlichen aktiven atherosklerotischen Prozess sein kann. Bei dieser prospektiven Studie wurden knapp 3000 gesunde Personen über vier bis sechs Jahre beobachtet, um herauszufinden, ob die spontane Thrombozytenaggregation und andere hämostatische Parameter unabhängige Risikofaktoren für Gefäßverschlüsse sind. Die Studie belegte die Vermutung, dass eine gesteigerte Thrombozytenspontanaggregation möglicherweise ein unabhängiger Risikofaktor sein kann. Ähnliche Ergebnisse hatte eine andere Studie von Ault et al[104]. In dieser Studie wurde nachgewiesen, dass bei Patienten nach einem akuten Koronarsyndrom die Plättchenaggregation gesteigert ist und auch über längere Zeit erhöht bleibt. In der Absicht einen messbaren Indikator bei peripherer arterieller Verschlusskrankheit zu finden, versuchte eine Münchner Arbeitsgruppe[105] zu klären, ob bei Patienten mit

pAVK im Vergleich zu Gesunden eine gesteigerte Plättchenaktivierung vorhanden ist. Es bestätigte sich die Vermutung, dass die Spontanaggregation bei diesen Patienten gesteigert ist, wohingegen die induzierte Aggregation keine Unterschiede zwischen Patienten- und Kontrollgruppe zeigte.

Bei unseren Messungen zeigte sich insgesamt einmal eine gesteigerte Spontanaggregation, und zwar bei der in-vitro-Untersuchung mit Lipofundin® 5 g/l. Eine Verstärkung der induzierten Aggregation lässt sich bei unseren Untersuchungen ebenfalls nicht nachweisen. Da es sich bei der Untersuchung um gesunde junge Probanden handelte, deshalb eine Spontanaggragation durch krankheitsbedingte Einflüsse sehr unwahrscheinlich ist, kann man vermuten, dass durch diese Lipidlöung eine Spontanaggregation ausgelöst wurde. Dies sollte man eventuell beim Einsatz dieser Lipidlösung bei Patienten mit pAVK besonders beachten, damit man nicht durch den synergistischen Effekt das Risiko eines thromboembolischen Verschlusses erhöht. Eventuell könnte man sich in weitereführenden Untersuchungen intensiver mit diesem Zusammenhang beschäftigen.

Gesteigerte Plättchenaggregation wurde schon in früheren Untersuchungen[44, 45] mit Hypercholesterinämie in Verbindung gebracht, und auch Zusammenhänge mit Ischämien und koronarer Instabilität sind seit langer Zeit bekannt[106, 107].

Nicht nur bei atherosklerotischen Prozessen, auch bei anderen Krankheitsbildern sind gesteigerte Plättchenaggregationen festgestellt worden. Bei Patienten mit pulmonaler Hypertension ist sowohl eine Erhöhung der Spontanaggregation als auch der induzierten Aggregation mit plättchenaktivierenden Faktor (PAF)[108] gemessen worden, die dem Schweregrad der Krankheit proportional war. Auch bei der chronischen Glomerulonephritis mit nephrotischen Syndrom ist gezeigt worden, dass die spontane Thrombozytenaggregation bei der Mehrheit der Patienten erhöht ist[109]. Die Autoren gingen hier von einem multifaktoriellen Pathomechanismus aus, welcher mit Hypoalbuminämie, Dyslipidämie und Veränderung der Konzentration von Gerinnungsfaktoren einhergeht.

Die Krankheitsbilder Präeklampsie, thrombotisch-thrombozytopenische Purpura und das hämolytisch-urämische Syndrom sind ebenfalls in Zusammenhang mit einer spontanen Thrombozytenaggregation gebracht worden[110]. Die Autoren vermuteten, dass ein "plasma platelet aggregating factor" dafür verantwortlich sein könnte.

Einen sinnvollen Einsatz der Messung der Spontanaggregation könnte, wie neuere Studien[111] zeigen, bei speziellen Fragestellungen sehr hilfreich sein. So macht besonders in der Frühschwangerschaft die Spontanaggregation mit der kollageninduzierten Vollblutaggregometrie gute Aussagen über die Entwicklung einer Präeklampsie. Besonders im Zusammenhang mit Hämatokrit und Thrombozytenzahl kann dies diagnostisch sehr hilfreich sein.

Auch bei verschiedenen Hautfunktionsstörungen mit Beteiligung von Immunkomplexen, wie z.B. multiple Hautinfarkte, wird die Rolle der spontanen Plättchenaggregation diskutiert[112], die eventuell durch diese Immunkomplexe aktiviert wird. Armstrong et al[113] testeten verschiedene Einflussfaktoren, welche zu einer Steigerung der spontanen und der Streptokinase-induzierten Thrombozytenaggregation führen. Dabei fanden sie heraus, dass ADP bei beiden Aggrega-tionsformen eine Rolle spielt, und dass Erythrozyten die Hauptquelle von ADP sind. Serotonin, Katecholamine und PAF spielen nach diesen Ergebnissen für keine der beiden Aggregationsformen eine Rolle. Diese Untersuchung lässt vermuten, dass die roten Blutzellen, wie schon oben beschrieben, eine besonders große Bedeutung für die spontane Thrombozytenaggregation haben.

Auch äußere Faktoren können die spontane Thrombozytenaggregation beeinflussen. So belegte eine Untersuchung[114], dass die Spontanaggregation bei Rauchern gesteigert ist. Die Autoren vermuteten, dass Langzeitrauchen die Sensitivität der Plättchen gegenüber Epinephrin oder ADP erhöht. Dies zeigt auch eine frühere Studie[115], bei der die spontane und induzierte Plättchenaggregation rauchender KHK-Patienten mit den zusätzlichen Risikofaktoren HDL-Erniedrigung und Triglyzeriderhöhung höher war als die der nichtrauchenden KHK-Patienten mit denselben Risikofaktoren. Mäßiger Alkoholkonsum (maximal 0,5 ml/kg) scheint dagegen einen inhibitorischen Effekt auf die Plättchenaggregation[116] zu haben, was bei gesunden Studienteilnehmern getestet wurde.

Ein enger Zusammenhang wurde von einer japanischen Arbeitsgruppe[117] zwischen spontaner Plättchenaggregation und diabetischen Komplikationen (Retinopathie, Neuropathie, Nephropathie) gefunden. Bei der ADP-induzierten Plättchenaggregation wurden dagegen keine signifikanten Unterschiede zwischen Patienten- und Kontrollgruppe gefunden. Dies lässt die Autoren vermuten, dass die spontane Aggregation sensitiver in Beziehung auf diabetische Komplikationen ist, als die induzierte Aggregation.

Eine neuere Studie[118] an Patienten mit traumatisch bedingten Rückenmarksverletzungen in der posttraumatischen Phase zeigte eine gesteigerte Plättchenaggregation gegenüber einer Kontrollgruppe. Die Autoren vermuteten freie Radikale als Ursache für diese Aktivierung, und betrachteten ihre Ergebnisse als bedeutsam für die häufig auftretenden verzögerten thromboembolischen Komplikationen dieser Patienten. Das Patientenkollektiv unserer klinischen Studie beinhaltet u.a. polytraumatisierte Patienten, postoperative Patienten, Karzinompatienten und multimorbide Patienten. Es könnte durchaus möglich sein, dass die freien Radikale, welche in der beschriebenen Studie vermutlich eine Gerinnungsaktivierung auslösten, bei unserem Patientenkollektiv auch eine Rolle spielten. Dies würde erklären, warum bei Patienten-und Kontrollgruppe die reversiblen Aggregate erhöht waren.
Die diskutierten Untersuchungen belegen, dass die Messung der spontanen Thrombozytenaggregation durchaus eine wichtige Rolle bei verschiedenen Erkrankungen spielen kann. Es wäre sicher von Vorteil die Messung der Spontanaggregation in klinische Laborstandards einzubinden, da es für viele Fragestellungen eine sehr sensitive Methode zur Beurteilung der Plättchenfunktion sein könnte, wie auch in einer neueren Untersuchung[95] gefordert.

Bei unserer in-vitro-Studie waren die Ergebnisse zur spontanen Thrombozytenaggregation mit den oben diskutierten Ausnahmen unauffällig. Im Vergleich In-vitro Untersuchung und Klinische Studie lag die spontane Thrombozytenaggregation bei beiden etwa auf dem gleichen Niveau zwischen 15-30%.
Bei der Klinischen Studie zeigten sowohl Patientengruppe wie auch Kontrollgruppe nach einiger Zeit eine erhöhte Spontanaggregation, die zwar reversibel war, aber in der Patientengruppe mit Lipidinfusion später eingetreten ist als in der Kontrollgruppe. Vermutlich spielen hier auch noch Einflussfaktoren eine Rolle welche nicht im Zusammenhang mit der Gabe von Lipidinfusionen stehen.
Wie oben bereits beschrieben, kommt es bei verschiedensten krankhaften Prozessen zur Induktion einer spontanen Thrombozytenaggregation. Die hier untersuchten Patienten waren allesamt intensivpflichtig und hatten unterschiedliche Erkrankungen. So könnte bereits das Vorliegen dieser Erkrankungen per se zu geringgradiger Thrombozytenaktivierung mit konsekutiv erhöhter Spontanaggregation geführt haben. Auch die Tatsache, dass eine physiologische

Grundaktivierung vorliegt, sollte bei der Interpretation der Ergebnisse nicht außer Acht gelassen werden.

Man darf auch nicht übersehen, dass das Milieu, in dem sich die Thrombozyten zum Zeitpunkt der Messung befanden, unphysiologisch war, und diese Tatsache die Plättchen beeinflussen konnte.

Im plättchenreichen Plasma fehlen Erythrozyten und Leukozyten. ADP aus Erythrozyten kann, wie bereits diskutiert, die Plättchenaggregation im Vollblut triggern[119]. Andere Arbeitsgruppen, welche den Einfluss von Substanzen aus dem Endothel auf Plättchen untersuchten, vermuteten, dass im Blut noch andere unbekannte Faktoren Einfluss auf die Plättchen nehmen könnten[120]. Aus dem Endothel kann EDRF (endothelium-derived relaxing factor) die Plättchenaggregation im vaskulären Lumen inhibieren[121]. Dass das Endothel eine wichtige Rolle für die Plättchenfunktion spielen kann, zeigt eine Studie von Suzuki et al[122]. In dieser Studie wurde überprüft, inwieweit verschiedene, durch Endothelzellen gebildete Substanzen (Prostaglandin I2, Natriumnitroprussid und Urokinase) zu einer Plättchendesaggregation führen. Die Ergebnisse zeigten, dass diese Substanzen oder deren Abkömmlinge aktivierte Plättchen inaktivieren können. Auch polymorphkernige neutrophile Granulozyten können mit Plättchen und Endothel interagieren[123], indem sie bestimmte Substanzen freisetzen, und so in das funktionelle Gleichgewicht zwischen Plättchen und Endothel einzugreifen. Es ist anhand der unterschiedlichen Ergebnisse deutlich zu sehen, dass, im Unterschied zu dem Milieu bei der optischen Messung, im Vollblut zusätzliche Faktoren auf die Thrombozyten einwirken können, und dass auch in-vivo weitere Faktoren hinzukommen können.

Bei der Ergebnisinterpretation ist auch zu berücksichtigen, dass durch die für die Herstellung von PRP benötigte Zentrifugation aktivierte und eventuell schon zusammengelagerte Thrombozyten abzentrifugiert wurden, da sie im Verbund gemäß der Svedberg-Gleichung schneller sedimentieren. Joseph et al[124] verglichen Kollagen-induzierte Plättchenaggregation und Sekretion (ATP-Freisetzung) in Vollblut und PRP. Sie stellten fest, dass die Sekretion von ATP gleich bleibt, die maximale Aggregation jedoch bei Plättchen im Vollblut größer ist als im PRP. Elektronenmikroskopisch zeigte sich, dass die Plättchaggregate auch Erythrozyten und Leukozyten enthielten, was bei unseren mikroskopischen Messungen ebenfalls auffiel. Dies

würde ebenfalls die verminderte Thrombozytenaggregation in PRP bei unseren Untersuchungen bestätigen.

Als Schlussfolgerung der Messungen der induzierten Aggregation kann man sagen, dass es bei beiden Studien einige Hinweise auf eine Verringerung der induzierten Thrombozytenaggregation durch Lipidinfusionen gibt. Allerdings war auch bei einer Lipidlösung eine gesteigerte Aggregationsbereitschaft der Thrombozyten zu messen.

Interpretation der Ergebnisse für die Untersuchungen Thrombelastographie, In-vitro-Blutungstest, Thrombozytenaktivierungsmarker, plasmatische Gerinnung, Triglyceride und Blutbild

Bis auf die Thrombelastographie ergaben die Untersuchungen keinen Hinweis auf eine Veränderung der Hämostase oder Beeinflussung der Thrombozyten.

Die Thrombelastographie ist ein globaler Gerinnungstest, der auch Aussagen zur Steigerung der Fibrinolyse machen kann. Mit den drei Messparametern maximale Amplitude, r-Zeit und k-Zeit wurde der Gerinnungsablauf erfasst.

Die **In-vitro Untersuchung** (siehe Abbildung 32, Abbildung 32, Abbildung 33) zeigte bei diesem Test keine signifikanten Veränderungen.

Die **Klinische Studie** (siehe Abbildung 28) zeigte jedoch bei der Kontrollgruppe ohne Lipidinfusionen nach 24 Stunden eine signifikant erhöhte r-Zeit gegenüber Zeitpunkt t0 (Beginn der Messungen).

Bei der mit der Thrombelastographie getesteten Erhöhung der r-Zeit bei der Kontrollgruppe der Klinischen Studie konnte keine Veränderung der Hämostase durch Lipidinfusionen bei diesen Messungen festgestellt werden. Eine mögliche Ursache für die Erhöhung der r-Zeit der Kontrollgruppe könnte in der postoperativen stressbedingten Gerinnungsaktivierung liegen, welche zum Zeitpunkt t0 vielleicht noch nicht vorhanden war.

Triglyceride und Blutbild

Die Triglyceridspiegel stiegen erwartungsgemäß[50, 51] in der Verumgruppe an. Interessant ist, dass sie sich denoch nicht von denen der Kochsalzgruppe unterscheiden.

Ebenso war bei der Klinischen Studie der Abfall der Leukozytenzahl bei beiden Gruppen auffällig. Bei der Gruppe mit Lipiden kam es nach 48 Stunden zum Absinken der Leukozyten, bei der Kontrollgruppe bereits nach 24 Stunden.
Bei der Kontrollgruppe gab es zum Zeitpunkt t1 (24 Stunden) auch andere Veränderungen. Der Anstieg der r-Zeit, der Anstieg der reversiblen Aggregate und die Erhöhung der maximalen Steigung und der maximalen Aggregation (Turbidometrie) fielen zeitlich mit der Erniedrigung der Leukozytenzahl zusammen. Warum bei der Kontrollgruppe nach 24 Stunden diese Veränderungen festzustellen waren, ist schwer zu erklären. Dies könnte ein weiterer Hinweis auf die postoperative stressbedingte Veränderung des hämostatischen Zusammenspiels bei diesen Patienten sein.
Eine genaue Erklärung ob dies zufallsbedingt ist oder ob es Zusammenhänge gibt, müsste durch weitere Untersuchungen gegeben werden.
Alle anderen Blutbildparameter waren bei beiden Studien unauffällig.

4.5 Gegenüberstellung der Ergebnisse zur Literatur

In der wissenschaftlichen Literatur finden sich nur wenige Arbeiten, mit teilweise sehr unterschiedlichen Ergebnissen, die sich mit der Beeinflussung des Thrombozytenverhaltens durch Lipidinfusionen beschäftigen.
Eine direkt plättchenbedingte Gerinnungsaktivierung wurde bisher nicht sehr häufig erwähnt. Unmittelbar mit den Auswirkungen einer Lipidinfusion auf die Thrombozyten beschäftigte sich eine Untersuchung von Goulet[36], bei der eine Verminderung der Plättchenüberlebenszeit bei Kindern post infusionem festgestellt wurde, die auf eine Aktivierung der Thrombozyten hinweisen könnte.
Eine erhöhte Thromboserate unter parenteraler Ernährung erklärte eine weitere Untersuchung[37] mit der Verminderung von TPA durch die Lipidinfusion, und auch ein Fall einer lipidbedingten schweren Thrombozytopathie infolge eines "fat overload syndrome" wurde beschrieben[38].
Phospholipide, welche in Lipidemulsionen enthalten sind, können an einer Aktivierung der Gerinnung mitwirken[30].

Eine gesteigerte prokoagulatorische Aktivität mononukleärer Zellen im peripheren Blut mit und ohne gleichzeitiger Gabe von Endotoxin (dadurch sollte eine akute Infektion simuliert werden) und Lipiden wurde sowohl im Tierversuch[125] als auch beim Menschen[126] festgestellt. In einer ähnlichen Untersuchung von van der Poll[127], bei der gesunde Probanden während intravenöser Gabe von Intralipid® 20% eine Bolusinjektion mit Endotoxin erhielten, wurde sowohl eine Aktivierung des Gerinnungssystems (erfasst über die Parameter Prothrombinfragment F1+2 und Thrombin-AntithrombinIII-Komplexe) wie auch des fibrinolytischen Systems beobachtet. Van der Poll schlussfolgerte, dass insbesondere bei Intensivpatienten mit Infektionen eine Substitution mit Lipidlösungen die Gefahr thrombotischer Komplikationen erhöhen könnte.

Aus den Ergebnissen dieser Arbeit lässt sich keine wesentliche Beeinflussung der Thrombozytenfunktion und der Hämostase feststellen. In der In-vitro-Studie mit Probanden gibt es zwar einen Präparateunterschied hinsichtlich einiger Untersuchungen, die vor allem die Thrombozyten testeten, dieser ist jedoch klinisch nicht relevant.

Bei der In-vivo-Studie ergaben sich geringe Veränderungen bei einigen Untersuchungen, welche jedoch keine klinische Relevanz haben.

Eine gesteigerte Thrombozytenaggregation bei einer Untersuchung wurde festgestellt (Messung der reversiblen Aggregate), jedoch sowohl bei der Patienten- als auch bei der Kontrollgruppe. Hierfür ist demzufolge nicht die Lipidinfusion ursächlich, sondern eher die Tatsache, dass durch intensivmedizinische Maßnahmen oder die Grunderkrankung selbst diese erhöhte Aggregationsbereitschaft induziert wird.

Dagegen zeigte sich eine verringerte induzierte Aggregation bei der Patientengruppe mit Lipidinfusion, und auch in der in-vitro-Studie konnten zwei Lipidlösungen mit verringerter induzierter Aggregation beobachtet werden. Diese Befunde weisen daher eher auf eine verminderte Thrombozytenaggregation hin.

Einige Hinweise auf eine lipidbedingte verminderte Thrombozytenaggregation wurden bereits beobachtet. Dies belegten die Ergebnisse verschiedener Arbeiten[40, 41], in denen allerdings die Thrombozytenaktivität nicht durch Messung der Spontanaggregation, sondern durch plasmatische Gerinnungsuntersuchungen sowie Gerinnungsparameter wie PF 4, β-TG, 6-keto-PGF1

und induzierte Aggregation untersucht wurde. In dieser Arbeit fielen die Messungen von β-TG sowie die plasmatischen Gerinnungsuntersuchungen jedoch unauffällig aus. Auch eine lipidbedingte Abnahme der prokoagulatorischen Aktivität von Monozyten und Endothel, für die Triglyceridfraktion der Lipide verantwortlich gemacht wurde, wurde beschrieben[42, 43]. Dies steht im Widerspruch zu den oben diskutierten Arbeiten. Eine Studie von Martinez et al[128] testete die Wirkung von zwei unterschiedlichen 20%-igen Lipidemulsionen auf das Gerinnungssystem. Eine der beiden Emulsionen enthielt nur langkettige Triglyceride (LCT), die andere Emulsion enthielt zu gleichen Teilen lang- und mittelkettige Triglyceride (LCT-MCT). Es wurden die Parameter aktivierte Cephalinzeit, Prothrombinzeit, prozentuale Prothrombinzeit, Thrombin- und Fibrinogenzeit getestet. Keine der beiden Lipidemulsionen führte in dieser Arbeit zu einer Aktivierung der Gerinnung.

Eine weitere Arbeitsgruppe testete den Einfluss mehrerer verschiedener Fettemulsionen auf die Gerinnung gesunder Probanden und fand eine verminderte Plättchenaggregation[129, 130]. Dies wurde mit dem physiochemischen Einfluss der in den Emulsionen enthaltenen Phospholipide auf die Zellmembranen sowie mit der Wirkung mehrfach ungesättigter Fettsäuren auf die Thromboxan- und Prostaglandinsynthese erklärt. Alle getesteten Lipidemulsionen enthielten ω-6-Fettsäuren[131]. Bei der durchgeführten in-vitro-Studie, ebenfalls mit gesunden Probanden, wurden ebenso verschiedene Fettemulsionen, jedoch ohne ω-6-Fettsäuren, getestet. Eine der vier Lösungen zeigte ein leicht verstärktes Aggregationsverhalten. Eine ähnliche Studie[132] testete den Einfluss einer Fischölemulsion auf die Fettsäurezusammensetzung des Plasmas, die Thrombozytenfunktion und die Thromboxansynthese bei Probanden. Die Fettsäurezusammensetzung des Plasmas änderte sich entsprechend der zugeführten Fettsäurezusammensetzung[133], was sich hier vor allem in einem erhöhten Gehalt an ω-3-Fettsäuren bei gleichzeitiger Verminderung der ω-6-Fettsäuren zeigte und normalisierte sich nach Beendigung der einstündigen Fettinfusion wieder. Die Plättchenaggregation, welche sowohl mit Kollagen als auch mit ADP induziert wurde, sank nach kurzer Zeit signifikant ab und normalisierte sich eine gewisse Zeit nach Beendigung der Infusion wieder. Die Autoren vermuteten, dass die verminderte Thrombozytenaggregation durch die Synthese von Thromboxan A3 aus Eicosapentaensäure und eventuell zusammen mit der allgemeinen Reduzierung der Synthese des Gesamtthromboxans zu erklären ist. Auch das veränderte Fettsäurenmuster könnte die vorüber-

gehende Inhibition der Plättchenaggregation nach Fischölinfusionen erklären. In einer 2002 von Heller et al[99] vorgelegten prospektiven Studie an 44 Patienten wurde der Einfluss von n-3 mehrfach ungesättigten Fettsäuren auf bestimmte Hämostaseeigenschaften des Blutes getestet. Da die in Fischöl enthaltenen n-3-Fettsäuren, insbesondere Eicosapentaensäure, antiinflammatorische Eigenschaften besitzen, werden sie bei kritisch kranken Patienten bevorzugt eingesetzt. Es sollte in dieser Studie geklärt werden, ob es die plasmatische Gerinnung und die Plättchenfunktion bei Patienten beeinflusst.

Die Patienten, welche alle einen abdominalchirurgischen elektiven Eingriff bekommen hatten, erhielten postoperativ, im Rahmen der parenteralen Ernährung, entweder Sojabohnenöl oder ein Gemisch aus Sojabohnen-und Fischöl. Es wurden präoperativ und postoperativ Parameter der plasmatischen Gerinnung (Quick, aPTT, Fibrinogen, AT III, F VIIa, FXIa, sowie die Plättchenfunktion mittels der Resonanzthrombographie gemessen.

Es zeigte sich eine erniedrigte Koagulationsaktivität nach dem Eingriff, welche sich bis zum sechsten postoperativen Tag normalisierte. Unterschiede zwischen den zwei verschiedenen Lipidmischungen wurden nicht gefunden.

Diese Studie weist sowohl plasmatisch als auch thrombozytär eine verminderte Koagulationsbereitschaft nach, was wir in unseren optischen Messungen bei zwei getesteten Fettemulsionen (Intralipid® und Lipovenös®) ebenfalls zeigen konnten.

Es sind jedoch auch die schon lange bekannten Vermutungen erneut geäußert worden, dass schon allein die Anwesenheit von Fettemulsionspartikel im Blut die Zellen physiochemisch voneinander isoliert und aus diesem Grund ihre Aggregabilität herabsetzen kann[134].

4.6 Interpretation im Hinblick auf die Bedeutung für die Patienten/ Antikoagulationsregime/ Risikopatienten

Hospitalisierte Patienten können aufgrund mehrerer Faktoren eine gesteigerte Gerinnungsbereitschaft aufweisen. In diesem Zusammenhang sind v.a. Ruhigstellung bzw. Bettlägerigkeit, Operationen, Grunderkrankungen und Vorerkrankungen sowie medikamentöse Einflüsse und sicherlich auch nicht zu messende Einflussfaktoren zu nennen.

Mögliche Folgeerscheinungen auf arterieller Seite sind vor allem Myokardinfarkt, zerebrale Ischämien oder peripherere arterielle Verschlüsse, auf der venösen Seite betrifft das vor allem Thrombosen und Thromboembolien.

Zudem sind, wie oben erwähnt, noch zahlreiche andere Krankheiten mit einer gesteigerten Gerinnungsbereitschaft bzw. gesteigerten Thrombozytenaggregation in Zusammenhang gebracht worden. Aus diesen Gründen ist es sowohl für die Betroffenen als auch für die ärztlichen Therapiemaßnahmen von großer Bedeutung, klare Aussagen über einen eventuellen Einfluss von Lipidemulsionen auf die Blutgerinnung und Thrombozytenfunktion treffen zu können.

Die parenterale Ernährung mit Fettemulsionen hat nach unseren Ergebnissen lediglich bei einer Lipidlösung nur minimale Auswirkungen auf die Gerinnung, die sich vor allem in einer Zunahme der reversiblen Aggregate bei der In-vitro-Studie zeigte. Zwei andere Lipidlösungen zeigten einen gegenteiligen Effekt bei der Messung der induzierten Aggregation mit der optischen Messung. In-vivo kam es zum Teil zu einer lipidbedingten Verzögerung der Aggregatbildung.

Es ließen sich keine auffälligen prokoagulatorischen Effekte nachweisen. Dieses Ergebnis ist von wesentlicher Bedeutung für die Überwachung und Therapie von Patienten, die im Rahmen der parenteralen Ernährung Lipidlösungen erhalten. Demnach sind bei diesen Patienten keine speziellen Maßnahmen erforderlich, und es ist auch nicht notwendig bei gefährdeten Patientengruppen mit parenteraler Ernährung zusätzliche Vorsichts- und Überwachungsmaßnahmen zu ergreifen, die über das sowieso übliche Maß hinausgehen. Bei der Applikation von Fettemulsionen zur totalen parenteralen Ernährung muss also keine Einschränkung hinsichtlich Patientengruppe mit erhöhtem Thromboembolierisiko vorgenommen werden.

5 Zusammenfassung

Lipidinfusionen werden in der parenteralen Ernährung als Energieträger eingesetzt. Über die Auswirkungen auf Hämostase und Thrombozytenfunktion ist bisher wenig bekannt. Besonders in der Intensivmedizin ist der Einfluss von Lipiden auf die Gerinnung von großer Bedeutung. Eine Aktivierung von Thrombozyten kann Myokardinfarkte oder zerebrale Durchblutungsstörungen auslösen. Eine Einschränkung der Aggregationsfähigkeit führt zu verstärkten postoperativen oder posttraumatischen Blutungen.

Wir untersuchten an Patienten und in-vitro den Einfluss von Lipidemulsionen auf folgende Parameter der Thrombozytenfunktion: Reversible und irreversible Thrombozytenaggregate, Spontanaggregation im Vollblut, induzierte Thrombozytenaggregation im Vollblut und im plättchenreichen Plasma, In-vitro-Blutungstest, Thrombelastographie, sowie β-Thromboglobulin. Weiterhin führten wir koagulometrische und hämatologische Untersuchungen durch.

In-vitro wurde die Anzahl reversibler Aggregate durch eine der vier untersuchten Lipidemulsionen gesteigert (Salvilipid 5 g/l). Die Untersuchung der Spontanaggregation mit der Vollblutaggregometrie zeigte für eine weitere Lipidemulsion eine verstärkte spontane Aggregationsbereitschaft (Lipofundin® 5 g/l). Wurde die Aggregation durch Kollagen induziert, beobachteten wir keine Unterschiede. Bei der turbidometrischen Messung in plättchenreichem Plasma löste Salvilipid® 5 g/l wiederum ein verstärktes Aggregationsverhalten aus. Dieses Präparat unterschied sich von den anderen drei Lipidlösungen durch den geringsten Anteil an Phosphatidylcholin.

In der klinischen Studie konnten wir postoperativ unabhängig vom Lipidzusatz in der parenteralen Ernährung einen Anstieg der reversiblen Aggregate feststellen. Bei der Impedanzaggregometrisch bestimmten Spontanaggregation sah man jedoch keine Veränderungen. Plättchenreiches Plasma zeigte eine verminderte Thrombozytenaggregation und thrombelastographisch zeigte sich eine verlängerte Reaktionszeit der Thrombozyten.

Die Zunahme der reversiblen Aggregate, die bei der klinischen Studie auffiel, muss als Teil der physiologischen postoperativen Stressantwort gewertet werden. Der Phosphatidylcholinanteil der Präparate aktiviert möglicherweise die Thrombozyten. Dabei ist jedoch zu bedenken, dass die beobachtete Aggregatbildung zum überwiegenden Teil reversibel war. Daher dürfte ihr kaum klinische Bedeutung zukommen.
Der Gehalt der Infusionslösungen an mittelkettigen Triglyceriden beim Präparat Lipofundin® schien für die Hämostase unbedeutend zu sein, da keine wesentlichen Unterschiede zu den anderen Präparaten zu erkennen waren.

Die vorliegende Arbeit konnte mit sensiblen Methoden nachweisen, dass durch Lipidemulsionen keine praxisrelevante Thrombozytenaktivierung hervorgerufen wird. Ebenso wenig schränken diese Arzneimittel die Aggregationsfähigkeit von Thrombozyten ein. Patienten unter parenteraler Ernährung sind durch Gabe von Lipidinfusionen weder durch Thromboembolien noch Blutungskomplikationen verstärkt gefährdet.
Somit ist es bei Patienten, die im Rahmen einer parenteralen Ernährung Lipidinfusionen erhalten, nicht notwendig, eine vermehrte Antikoagulation oder gar Thrombozytenaggregationshemmung zu erwägen.

6 Anhang

6.1 Ergebnistabellen

Tabelle 8 In-vitro-Studie mit Lipidinfusionen Salvilipid®, Intralipid®, Lipovenös® und Lipofundin®, sowie der Kontrolle mit NaCl 0,9%.

Angegeben sind Mittelwerte x und Standardabweichungen x±s. K: Konzentration der Lipide.

Es wurde eine einheitliche Auswertung mittels Friedmann-Test (siehe 2.5) durchgeführt.
Die signifikanten Unterschiede sind jeweils mit *gekennzeichnet und sind beim entsprechenden Wert hinzugefügt mit folgender Bedeutung:

* p<0,05

** p<0,01

*** p>0,001

gegenüber

1) Salvilipid® 2) Intralipid® 3) Lipovenös® 4) Lipofundin® 5) NaCl 0,9%

Nr	Parameter	Einheit	K	Lipide								Kontrolle	
			g/l	Salvilipid®		Intralipid®		Lipovenös®		Lipofundin®		NaCl 0,9%	
				x	s	x	s	x	s	x	s	x	s
	Impedanzmessung												
1	Spontan-aggregation	Ω/h	5	-0,5	0,9	-0,2	1,5	-1,5 *4	1,9	1,3 *3	2,1	-0,6	1,3
			0,5	0,0	0,9	-0,8	1,2	-0,3	1,8	-0,6	1,6		
2	Maximale Steigung	Ω/min	5	22,8	6,9	23,1	9,8	23,1	7,6	22,8	6,9	23,1	9,8
			0,5	22,8	9,9	20,8	4,0	19,7	5,0	22,8	9,9		

3	Maximale Aggrega-tion	Ω	5	52,8	8,5	51,3	7,1	58,4	12,0	52,8	8,5	51,3	7,1
			0,5	50,5	8,7	51,3	7,5	53,1	11,4	50,5	8,7		
	Turbidometrie												
4	Maximale Steigung	%/min	5	115,0 **[2]	35,0	73,0 **[1]	36,0	84,0	43,0	88,0	40,0	103,0	32,0
			0,5	142,0 ***[2]	82,0	73,0 ***[1]	26,0	110,0	96,0	97,0	26,0		
5	Maximale Aggrega-tion	%	5	80,0	31,0	80,0 **[3]	15,0	61,0 **[2,5]	12,0	70,0	19,0	80,0 **[3]	12,0
			0,5	85,0 ***[2,3]	18,0	60,0 ***[1,5]	22,0	67,0 ***[1]	22,0	78,0	24,0	***[2]	
	Thrombelastographie												
6	Maximale Amplitude	mm	5	57,0	20,0	49,0	7,0	50,0	5,0	51,0	6,0	52,0	6,0
			0,5	50,0	7,0	51,0	6,0	50,0	7,0	51,0	6,0		
7	r-Zeit	min	5	7,8	1,8	7,6	1,0	8,0	1,7	7,8	1,9	7,6	2,1
			0,5	7,6	1,4	7,8	1,6	7,8	1,2	8,6	2,6		
8	k-Zeit	min	5	3,6	1,0	3,4	0,9	4,3	1,8	3,6	1,2	3,9	1,4
			0,5	4,0	1,3	4,0	1,6	3,9	1,4	3,9	1,1		
	In-vitro Blutungstest												
9	Ver-schlusszeit	sec	5	121,0	36,0	109,0	31,0	123,0	43,0	144,0	45,0	124,0	38,0
			0,5	105,0	38,0	107,0	29,0	128,0	26,0	126,0	47,0		
10	Blutungs-volumen	µl	5	375,0	105,0	359,0	91,0	387,0	136,0	395,0	103,0	394,0	113,0
			0,5	339,0	91,0	372,0	90,0	405,0	87,0	329,0	68,0		

11	Initialer Blutfluss	µl/min	5	210,0	35,0	233,0	33,0	228,0	75,0	237,0	48,0	239,0	53,0
			0,5	227,0	45,0	231,0	42,0	235,0	39,0	224,0	37,0		
	Spontane Thrombozytenaggregation												
12	Reversible Aggregate	%	5	26,0 *5	20,9	19,8	7,6	20,1	15,8	24,1	22,6	15,2 *1	16,4
			0,5	16,4	10,4	15,1	3,7	17,0	14,4	27,8	20,5		
13	Irreversible Aggregate	%	5	1,9	1,0	2,3	0,9	2,3	1,2	2,6	1,9	2,1	1,2
			0,5	1,7	1,0	2,7	1,5	2,2	1,2	2,3	1,2		
	Plasmatische Gerinnung												
14	aPTT	sec	5	31,3	9,9	32,0	9,3	31,6	8,7	34,4	4,2	33,9	4,4
			0,5	30,8	10	32,6	9,1	32,0	8,4	33,6	3,8		
15	TPZ	sec	5	14,9	4,7	14,5	4,0	14,8	3,2	15,4	1,3	15,5	1,4
			0,5	14,1	4,2	14,8	3,6	14,5	2,8	15,6	1,4		
16	Rekalzifizierungszeit	1	5	871,6	476,2	697,8	286,2	677	251,8	789,7	296,4	728,7	388
			0,5	766,9	370,7	719,3	347,3	736	411	742,9	335,6		
17	Nichtaktivierte PTT	%	5	181,8	82,3	190,2	85,5	179,7	78,9	214,2	97,8	184,7	89,8
			0,5	203,2	127,7	180,8	99,0	189,9	82,2	163,2	68,9		
18	Aktivierte Rekalzifizierungszeit	%	5	66,7	27,5	64,4	26,3	62,6	29,8	69,9	24,4	72,7	30,5
			0,5	70,9	34,0	75,1	25,6	64,4	30,1	74,3	34,2		
	Blutbild												
19	Thrombozyten	10^3/µl	5	170,0	29,0	172,0	56,0	164,0	34,0	167,0	35,0	156,0	31,0
			0,5	177,0	30,0	158,0	34,0	168,0	38,0	162,0	30,0		

20	Mittleres Thrombo-zyten-volumen	fl	5	6,5	0,7	6,7	1,0	6,9	1,3	6,7	1,1	6,5	0,8
			0,5	6,4	0,8	6,6	0,8	6,9	1,4	6,7	1,2		
21	Erythro-zyten	10^6/µl	5	3,9	0,3	3,9	0,3	3,8	0,7	3,7	0,5	3,7	0,5
			0,5	3,7	0,5	3,8	0,4	3,7	0,5	3,7	0,4		
22	Mittleres korpus-kuläres Volumen	fl	5	89,5	3,1	89,2	3,2	89,8	3,8	89,1	3,0	89,9	3,6
			0,5	89,5	3,3	89,1	3,1	89,1	3,1	89,5	3,1		
23	Hämo-globin	G/dl	5	12,1	1,2	12,3	1,8	11,9	1,7	11,5	1,4	10,3	0,8
			0,5	10,7	1,3	11,1	0,9	11,1	0,9	10,8	1,1		
24	Leuko-zyten	10^3/µl	5	6,4	1,2	6,4	1,6	5,7	2,3	5,7	2,0	6,2	1,3
			0,5	6,5	3,5	6,0	1,3	8,1	8,0	7,0	3,8		

Tabelle 9 Klinische Studie. Sämtliche Parameter zur Gerinnungsaktivität der klinischen in-vivo-Studie mit Mittelwerten x und Standardabweichungen x±s.

Links Patienten mit Lipidinfusionen, rechts Patienten ohne Lipidinfusionen (Kontrollgruppe).

- Statistische Auswertung (siehe 2.5) zum Faktor "Messzeitpunkt" mit folgenden Symbolen:

* $p<0,05$

** $p<0,01$

*** $p>0,001$ gegenüber vorangegangenen Wert.

- Statistische Auswertung (siehe 2.5) zum Gruppenunterschied :

x $p<0,05$

Die Symbole stehen beim entsprechenden Wert.

			Mit Lipide (n=12)						Ohne Lipide (n =12)					
			0 h (t1)		24 h (t2)		48 h (t3)		0 h (t1)		24 h (t2)		48 h (t3)	
Nr	**Parameter**	**Einheit**	**x**	**s**	**x**	**s**	**x**	**s**	**x**	**s**	**x**	**s**	**x**	**s**
	Impedanzmessung													
1	Spontanaggregation	Ω/h	0,1	9,0	2,0	5,6	2,9	2,7	2,5	2,9	3,0	5,6	3,6	3,9
2	Maximale Steigung	Ω/min	16,7	8,2	15,6	7,5	14,7	2,6	16,0	4,6	13,5	5,3	15,7	4,4
3	Maximale Aggregation	Ω	50,4	17,4	53,0	14,2	48,7	9,1	46,8	31,4	54,2	16,6	54,8	16,0
	Turbidometrie													
4	Maximale Steigung	%/min	107	41	98 x**	41	85	16	133	51	138 x	58	138	40
5	Maximale Aggregation	%	85	11	76x ***	16	62	17	86	12	90 x	18	83	12
	Thrombelastographie													
6	Maximale Amplitude	mm	55	13	59	12	61	9	58	12	60	11	58	10
7	r-Zeit	min	9,6	2,2	10,1	1,9	12,2	1,2	10,1	1,9	10,9 ***	1,2	11,8	1,8
8	k-Zeit	min	3,5	1,7	3,5	1,2	3,6	0,7	3,2	0,6	3,4	0,6	3,3	0,6
	In-vitro-Blutungstest													
9	Verschlusszeit	sec	112	42	118	47	130	26	125	74	126	51	125	46

10	Blutungsvolumen	µl	267	28	285	31	267	40	259	47	274	47	251	66
11	Initialer Blutfluss	µl/min	199	25	197	36	201	29	175	30	191	35	194	42
	Aggregate													
12	Reversible Aggregate	%	15,2	2,7	13,9	4,0	20,5 *	5,1	18,5	11,5	23,2 **	19,7	12,6	5,8
13	Irreversible Aggregate	%	2,8	0,8	2,8	0,5	2,8	0,4	2,7	0,8	2,8	1,2	2,9	0,7
	Plasmatische Gerinnung													
14	APTT	sec	37,1	7,2	36,1	5,4	39,4	6,4	37,1	7,7	36,3	8,3	37,2	7,5
15	TPZ	sec	14,0	5,4	13,8	1,8	12,6	1,4	11,4	2,7	13,0	2,1	12,3	2,6
16	Rekalzifizierungszeit		49,3	15,0	43,7	6,8	34,8	17,5	35,4	14,5	40,4	10,9	27,6	19,4
17	Nicht-aktivierte PTT	%	535	213	433	158	469	186	448	245	437	210	441	486
18	Aktivierte Rekalzifizierungszeit	%	28	7	31	13	23	9	22	19	23	12	18	15
	Blutbild													
19	Thrombozyten	10^3/µl	221	123	252	136	207	63	253	81	239	90	219	66
20	Mittleres Thrombozytenvolumen	Fl	7,5	0,9	7,6	1,1	7,9	0,7	8,1	2,2	7,6	2,3	7,2	2,1
21	Erythrozyten	10^6/µl	3,4	0,6	3,3	0,5	3,5	0,5	3,8	1,2	3,8	1,0	3,8	1,0

22	Mittleres korpuskuläres Volumen	fl	86,9	5,1	85,9	5,4	84,5	4,8	82,8	8,2	83,8	9,5	83,6	7,8
23	Hämoglobin	g/dl	10,5	1,5	10,5	1,5	10,7	1,5	10,8	3,6	10,8	3,0	11,6	2,8
24	Leukozyten	10^3/ µl	11,3	4,4	11,1	3,3	8,9 *	3,3	12,4	6,6	9,2 *	3,8	9,8	5,0
25	Triglyceride	mg%	131	63	154 *	31	188	35	138	52	154	45	144	50
	Aktivierungsmarker													
26	β-Thrombo-globulin	IE/ml	39,9	27	44,5	27	49,5	18,3	54,1	37,6	51	20,3	48,3	39,2

Tabelle 10 Blutbild der Probanden der In-vitro Untersuchung, Mittelwerte x und Standardabweichung x±s

	Mittelwert x	**Standardabweichung x±s**
Hb [g/dl]	14,10	1,1
Erys [Mil.]	4,83	0,3
Hk [%]	43,45	3,8
Leukos [Thou]	7,46	1,9
Thrombos [Thou]	274,3	94,4
MPV [fl]	7,98	0,9

6.2 Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1 SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER ZWEI FETTPARTIKELARTEN IN FETTEMULSIONEN 3
ABBILDUNG 2 FETTSÄURENZUSAMMENSETZUNG DER TRIGLYCERIDE IM SOJABOHNENÖL 5
ABBILDUNG 3 FLIEßSCHEMA ZUR KLINISCHEN STUDIE 20
ABBILDUNG 4 SCHEMA DES VERSUCHSANSATZES FÜR LIPIDINFUSIONEN 25
ABBILDUNG 5 AUFBAU DES IMPEDANZAGGREGOMETERS IMPEDANZANSTIEG. 27
ABBILDUNG 6 ORIGINALREGISTRIERUNG DER SPONTANEN THROMBOZYTENAGGREGATION UND DER KOLLAGENINDUZIERTEN THROMBOZYTENAGGREGATION 28
ABBILDUNG 7 ORIGINALREGISTRIERUNG EINER OPTISCHEN AGGREGATIONSKURVE, ... 31
ABBILDUNG 8 SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES THROMBELASTOGRAPHEN 33
ABBILDUNG 9 ORIGINALREGISTRIERUNG EINES THROMBELASTOGRAMMS 35
ABBILDUNG 10 FUNKTIONSPRINZIP DES IN-VITRO-BLUTUNGSTESTS 37
ABBILDUNG 11 ORIGINALREGISTRIERUNG EINES IN-VITRO-BLUTUNGSTESTS 39
ABBILDUNG 12 AUSGEZÄHLTE QUADRANTEN DER ZÄHLKAMMER 44
ABBILDUNG 13 SCHEMA ZUR THROMBOPLASTINZEIT (TPZ) UND AKTIVIERTER THROMBOPLASTINZEIT (APTT) SOWIE DEREN VARIANTEN 46
ABBILDUNG 14 ERSTE IMMUNREAKTION 50
ABBILDUNG 15 ZWEITE IMMUNREAKTION 51
ABBILDUNG 16 INDIKATORREAKTION 51
ABBILDUNG 17 LEGENDE 51
ABBILDUNG 18 VOLLBLUTAGGREGOMETRIE IN DER KLINISCHEN STUDIE 62
ABBILDUNG 19 VOLLBLUTAGGREGOMETRIE IN DER KLINISCHEN STUDIE 62
ABBILDUNG 20 VOLLBLUTAGGREGOMETRIE IN DER KLINISCHEN STUDIE 63
ABBILDUNG 21 VOLLBLUTAGGREGOMETRIE IN DER IN-VITRO UNTERSUCHUNG 64
ABBILDUNG 22 VOLLBLUTAGGREGOMETRIE IN DER IN-VITRO UNTERSUCHUNG 65
ABBILDUNG 23 VOLLBLUTAGGREGOMETRIE IN DER IN-VITRO UNTERSUCHUNG 66
ABBILDUNG 24 TURBIDOMETRISCH BESTIMMTE THROMBOZYTENAGGREGATION IN DER KLINISCHEN STUDIE 67
ABBILDUNG 25 TURBIDOMETRIE IN DER KLINISCHEN STUDIE, MAXIMALE AGGREGATION 68
ABBILDUNG 26 TURBIDOMETRIE IN DER IN-VITRO UNTERSUCHUNG, MAXIMALE STEIGUNG 69
ABBILDUNG 27 TURBIDOMETRIE IN DER IN-VITRO UNTERSUCHUNG, MAXIMALE AGGREGATION 70
ABBILDUNG 28 THROMBELASTOGRAPHIE IN DER KLINISCHEN STUDIE, R-ZEIT 71
ABBILDUNG 29 THROMBELASTOGRAPHIE IN DER KLINISCHEN STUDIE, K-ZEIT 72
ABBILDUNG 30 THROMBELASTOGRAPHIE IN DER PATIENTENSTUDIE, MAXIMALE AMPLITUDE 72
ABBILDUNG 31 THROMBELASTOGRAPHIE IN DER IN-VITRO UNTERSUCHUNG, R-ZEIT 73
ABBILDUNG 32 THROMBELASTOGRAPHIE IN DER IN-VITRO UNTERSUCHUNG, K-ZEIT 74

ABBILDUNG 33 THROMBELASTOGRAPHIE IN DER IN-VITRO UNTERSUCHUNG, MAXIMALE AMPLITUDE 74
ABBILDUNG 34 IN-VITRO-BLUTUNGSTEST IN DER KLINISCHEN STUDIE: VERSCHLUSSZEIT..... 76
ABBILDUNG 35 IN-VITRO-BLUTUNGSTEST IN DER KLINISCHEN STUDIE: BLUTUNGSVOLUMEN 76
ABBILDUNG 36 IN-VITRO-BLUTUNGSTEST IN DER KLINISCHEN STUDIE: INITIALER BLUTFLUSS 77
ABBILDUNG 37 IN-VITRO-BLUTUNGSTEST IN DER IN-VITRO UNTERSUCHUNG, VERSCHLUSSZEIT..... 78
ABBILDUNG 38 IN-VITRO-BLUTUNGSTEST IN DER IN-VITRO UNTERSUCHUNG, BLUTUNGSVOLUMEN 78
ABBILDUNG 39 IN-VITRO-BLUTUNGSTEST IN DER IN-VITRO UNTERSUCHUNG: INITIALER BLUTFLUSS..... 79
ABBILDUNG 40 THROMBOZYTENAGGREGATE IN DER KLINISCHEN STUDIE, REVERSIBLE AGGREGATE 80
ABBILDUNG 41 THROMBOZYTENAGGREGATE IN DER KLINISCHEN STUDIE, IRREVERSIBLE AGGREGATE 81
ABBILDUNG 42 THROMBOZYTENAGGREGATE IN DER IN-VITRO UNTERSUCHUNG, REVERSIBLE AGGREGATE 82
ABBILDUNG 43 THROMBOZYTENAGGREGATION IN DER IN-VITRO UNTERSUCHUNG, IRREVERSIBLE AGGREGATE..... 83
ABBILDUNG 44 AKTIVIERTE PTT IN DER KLINISCHEN STUDIE..... 84
ABBILDUNG 45 TPZ IN DER KLINISCHEN STUDIE..... 84
ABBILDUNG 46 REKALZIFIZIERUNGSZEIT IN DER KLINISCHEN STUDIE 85
ABBILDUNG 47 NICHT-AKTIVIERTE PTT IN DER KLINISCHEN STUDIE..... 86
ABBILDUNG 48 AKTIVIERTE REKALZIFIZIERUNGSZEIT IN DER KLINISCHEN STUDIE. 86
ABBILDUNG 49 AKTIVIERTE PARTIELLE THROMBOPLASTINZEIT IN DER IN-VITRO UNTERSUCHUNG. 87
ABBILDUNG 50 THROMBOPLASTINZEIT IN DER IN-VITRO UNTERSUCHUNG..... 88
ABBILDUNG 51 REKALZIFIZIERUNGSZEIT RCT IN DER IN-VITRO UNTERSUCHUNG 88
ABBILDUNG 52 NICHT AKTIVIERTE PTT IN DER IN-VITRO UNTERSUCHUNG..... 89
ABBILDUNG 53 AKTIVIERTE REKALZIFIZIERUNGSZEIT RCT IN DER IN-VITRO UNTERSUCHUNG..... 89
ABBILDUNG 54 β-THROMBOGLOBULIN IN DER KLINISCHEN STUDIE..... 90
ABBILDUNG 55 TRIGLYCERIDE IN DER KLINISCHEN STUDIE 91
ABBILDUNG 56 THROMBOZYTENZAHL IN DER KLINISCHEN STUDIE..... 92
ABBILDUNG 57 MITTLERES THROMBOZYTENVOLUMEN IN DER KLINISCHEN STUDIE 92
ABBILDUNG 58 ERYTHROZYTENZAHL IN DER PATIENTENSTUDIE 93
ABBILDUNG 59 MITTLERES KORPUSKULÄRES VOLUMEN IN DER PATIENTENTUDIE 93
ABBILDUNG 60 LEUKOZYTENZAHL IN DER PATIENTENSTUDIE 94

6.3 Tabellenverzeichnis

TABELLE 1 DEMOGRAPHISCHE CHARAKTERISTIKA DER PATIENTEN DER IN-VIVO-STUDIE 17
TABELLE 2 EINSCHLUSS-, AUSSCHLUSS- UND ABBRUCHKRITERIEN FÜR DIE TEILNAHME AN DER KLINISCHEN STUDIE 19
TABELLE 3 ANTIKOAGULANTIEN UND STABILISATOREN FÜR BLUTPROBEN 21
TABELLE 4 STANDARDISIERTE BLUTENTNAHME 23
TABELLE 5 VERWENDETE LABORHILFSMITTEL UND CHEMIKALIEN 54
TABELLE 6 IM RAHMEN DER STUDIE VERWENDETE LIPIDLÖSUNGEN 56
TABELLE 7 ZUR AUSWERTUNG VORGESEHENE MERKMALE 57
TABELLE 8 IN-VITRO-STUDIE MIT LIPIDINFUSIONEN 121
TABELLE 9 KLINISCHE STUDIE. SÄMTLICHE PARAMETER ZUR GERINNUNGSAKTIVITÄT DER KLINISCHEN IN-VIVO-STUDIE 124
TABELLE 10 BLUTBILD DER PROBANDEN DER IN-VITRO UNTERSUCHUNG 127

6.4 Abkürzungsverzeichnis

β-TG	β-Thromboglobulin
A.dest.	Aqua destillata, destilliertes Wasser
aPTT	aktivierte partielle Thromboplastinzeit
aRCT	aktivierte Rekalzifizierungszeit
$CaCl_2$	Calciumchlorid
CTAD	Citrat, Theophyllin, Adenosin, Dipyridamol
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraacetat
EN	Enterale Ernährung (enteral nutrition)
EPA-TG	Trieicosapentaenoylglycerol
Glc	Glucose
Hb	Haemoglobin
Hk	Hämatokrit
MCT	mittelkettige Triglyceride
MPV	mittleres Plättchenvolumen
NaCl	Natriumchlorid
NaPTT	nicht aktivierte partielle Thromboplastinzeit
PAF	Plättchenaktivierender Faktor
PF 4	Plättchenfaktor 4
PFA	Platelet Function Analyzer
PLT	Platelets, Thrombozyten
PL-TG-Ratio	Phospholipid-Triglycerid-Ratio
PMN	polymorphkernige neutrophile Granulozyten
PPP	Plättchenarmes Plasma
PRP	Plättchenreiches Plasma
RBC	Red blood cell, Erythrozyten
RCT	Rekalzifizierungszeit
RES	Retikuloendotheliales System
RT	Raumtemperatur
TEG	Thrombelastographie
TPN	Totale parenterale Ernährung(total parenteral nutrition)
TPZ	Thromboplastinzeit

WBC	White blood cells, Leukozyten

7 Literaturverzeichnis

[1] Koletzo B, Demmelmair H, Socha P
Nutritional support of infants and children: supply and metabolism of lipids.
Baillieres Clinical Gastroenterology, 1998, 12: 671-696

[2] Schricker T, Georgieff M
Fett in der parenteralen Ernährungstherapie.
Anaesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther 1994, 29: 137-145

[3] Ferezou J, Lai NG, Leray T, Hajri T, Frey A, Caberet Y, Courtieu J, Lutton C, Bach AC
Lipid composition and structure of commercial parenteral emulsions.
Biochimica et Biophysica Acta 1994, 1213: 149-158

[4] Olivecrona G, Olivecrona T
Clearance of artificial triacylglycerol particles.
Curr Opin Clin Nutr Metab Care 1998, 1: 143-151

[5] Hajri T, Ferezou J, Lutton C
Effects of intravenous infusions of commercial fat emulsions (Intralipid® 10% or 20%) on rat plasma lipoproteins: phospholipids in excess are the main precursors of lipoprotein-x-particles.
Biochim Biophys Acta 1990, 1047: 121-130

[6] Redgrave TG, Maranhao RC
Metabolism of protein-free lipid emulsion models of chylomicrons in rats.
Biochim Biophys Acta 1985, 835: 104-112

[7] Dupont IE, Carpentier YA
Clinical use of lipid emulsions.
Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care 1999, 2: 139-145

[8] Haumont D, Deckelbaum RJ, Richelle M, Dahlan W, Coussaert E, Bihain BE, Carpentier YA
Plasma lipid and plasma lipoprotein concentrations in low birth weight infantsgiven parenteral nutrition with twenty or ten percent lipid emulsion.
J Paediatr 1989, 115: 787-793

[9] Chanson NF, Lontie JF, Carpentier YA, Motta C
Incubation of lipid emulsions with plasma lipoproteins modifies the fluidity of each particle.
Lipids 2001, 36(8),: 819-825

[10] Kalfarentzos F, Kokkinis K, Leukaditi K, Maroulis J et al
Comparison between two fat emulsions: Intralipid® 30% vs Intralipid® 10% in critically ill patients.
Clinical Nutrition 1998, 17: 31-34

[11] Carpentier YA, Nordenstom J, Askanzi J, Elwyn DH, Gunp FE, Kinney JM
Relationship between rates of clearance and oxidation of 14C-Intralipid in surgical patients.

Surg Forum 1979, 30: 72-74

[12] Carpentier YA , Richelle M, Bihain BE, Dahlan W, Haumont D, Deckelbaum RJ
Interactions between exogenous fat and plasma lipoproteins.
Infusionstherapie 1987, 14s - 3: 29-32

[13] Carpentier YA, Richelle M, Haumont D, Deckelbaum RJ
New developments in fat emulsions.
Proceedings of the nutrition society 1990, 49: 375-380

[14] Ge Y, Xu Y, Liao L
Comparison of the fat elimination between long-chain triglycerides and medium-chain triglycerides in rats with ischemic acute renal failure.
Ren Fal 2002, 24: 1-9

[15] Adolph M
Lipid emulsions in parenteral nutrition.
Ann Nutr Metab 1999, 43: 1-13

[16] Garnacho-Montero J, Ortiz-Leyba C, Jimenez-Jimenez FJ, Garcia-Garmendia JL, Jimenez-Jimenez LM, Garnacho-Montero MC, Barrero-Almodovar A
Clinical and metabolic effects of two lipid emulsions on the parenteral nutririon of septic patients.
Nutrttion 2002, 18: 134-138

[17] Martin-Pena G, Culebras JM, De P, Barro-Ordovas JP, Catala R, Ruiz-Galiana J
Effects of 2 lipid emulsions (LVT versus MCT/LCT) on te fatty acid composition of plasma phospholipid: a double-blind randomized trial.
JPEN 2002, 26: 30-41

[18] Carpentier YA, Thonnart N, Devroye H, Bihain B, Dahlan W, Lindholm M, Deckelbaum RJ
Effect of infusion rate and phospholipid content of fat emulsion in man.
Clin Nutr 1986, 5s: 43

[19] Ferezou J, Bach AC
Structure and metabolic fate of triacylglycerol- and phospholipid-rich particles of commercial parenteral fat emulsions.
Nutrition 1999, 15: 44-50

[20] Velaskar DS, Chitre AP
Clinical laboratory assassment of atherosclerosis - role of hyperlipidaemia and hyperactive platelets.
Angiology 1986, 37: 306-313

[21] Buchmann AL, Ament ME
Comparative hypersensitivity in intravenous lipid emulsios.
JPEN J Parenter Enteral Nutr 1991, 15: 345-346

[22] Seidner DL, Mascioli EA, Istfan NW
Effects of long-chain triglycerid emulsions on reticuloendothelial system function in humans.

JPEN 1989, 13: 614-619

[23] Levene MI, Batisti O, Wigglesworth JS et al
A prospective study of intrapulmonary fat accumulation in the newborn lung following intralipid infusion.
Acta Paediatr Scand 1984, 73: 454-460

[24] Puntis JW, Rushton DI
Pulmonary intravascular lipid in neonatal necropsy specimens.
Arch Dis Child 1991; 66: 26-28

[25] Baldermann H, Wicklmayr M, Rett K et al
Changes of hepatic morphology during parenteral nutrition with lipid emulsions containing LCT or MCT/LCT quantified by ultrasound.
JPEN 1991; 15: 601-603

[26] Barbier J, Gineste D, Kraims JL
Complications hepatobiliaires de la nutrition parenterale totale.
Chirurgie 1992; 118: 47-53

[27] Beau P, Chammartin F, Matuchansky C
Anomalies biologiques hepatiques, icteres cholestatiques et nutrition artificielle a l`hopital.
Gastroenterol Clin Biol 1988; 12: 326-331

[28] Colomb V, jobert-Giraud A, Lacaille F, Goulet O, Fournet JC, Ricou C
Role of lipid emulsions in cholestasis associated with long-term parenteral nutririon in children.
JPEN 2000, 24: 345-350

[29] Riedeir H, Ramadori G
Zur Pathogenese der Thromboseentstehung bei parenteraler Ernährung.
Gastroenterol 1990; 28: 22-23

[30] Orth M, Luley C, Wieland H
Effects of VLDL, chylomicrons and chylomicron remnants on platelet aggregability.
Thromb Res 1995, 79: 297-305

[31] Taylor FB, He SE, Chang AC, Box J, Ferrell G, Lee D, Lockhart M, Peer G, Esmon CT
infusion of phospholipid vesicles amplifies the local thrombotic response to TNF and anti-protein C into a consumtive response.
Thromb Haemost 1996, 75: 578-584

[32] Loughrey HC, Bally MB, Reinish LW, Cullis PR
The binding of phosphatidylglycerol liposomes to rat platelets is mediated by complement.
Thromb Haemost 1990, 64: 172-176

[33] Roulet M, Wiesel PH, Pilet M, Chapius G, Carpentier YA
Effects of intravenously infused egg phospholipids on lipid and lipoprotein metabolism in postoperative trauma.
JPEN 1993, 17: 107-112

[34] Carpentier Y
Intravascular metabolism of fat emulsion.
Clin Nutr 1989, 8: 115-125

[35] Thonnart N, Bracamonte M, Denis P, Carpentier YA
Substrate utilization during simultaneous i.v. infusion of glucose and fat in man.
Clin Nutr 1985, 4: suppl p 89

[36] Goulet O, Girot R, Maier-Redelsberger M, Bougle D, Virelizier JL, Ricour C
Hematologic disorders following prolonged use of intravenous fat emulsions in children.
JPEN 1986, 10: 284-288

[37] Altomare DF, Semeraro N, Colucci M
Reduction of the plasma levels of tissue plasminogen activator after infusion of a lipid emulsion in humans.
JPEN 1993, 17: 274-276

[38] Campbell AN, Freedman MH, Pencharz PB et al
Bleeding disorder from the "fat overload syndrome".
JPEN 1984, 8: 447-449

[39] Dahlstom KA, Goulet OJ, Roberts RL, Ricour C, Ament ME
Lipid tolerance in children receiving long-term parenteral nutrition: a biochemical and immunlogic study.
J Pediatr 1988, 113: 985-990

[40] Von Way CW, Dunn EL, Hamstra RD
The effect of intravenous safflower oil emulsion on the clotting mechanism.
Am Surg 1983, 49: 460-464

[41] Porta I, Planas M, Padro JB et al
Effect of two lipid emulsions on platelet function.
Infusionsther 1994, 21: 316-321

[42] Wakefield A, Cohen Z, Connolley P et al
Thrombogenicity of total parenteral nutrition solutions: I. Effect on induction of monozyte/macrophage procoagulant activity.
Gastroenterology 1989, 97: 1210-1219

[43] Wakefield A, Cohen Z, Rosenthal A et al
Thrombogenicity of total parenteral nutrition solutions: II. Effect on induction of endothelial cell procoagulant activity.
Gastroenterology 1989, 97: 1220-1228

[44] Tremoli E, Maderna B, Colli S, Morazzoni G, Sirtori M et al
Increased platelet sensitivity and thromboxane B2 formation in type-II hyperlipoproteinaemic patients.
Europ J Clin Invest 1984, 14: 329-333

[45] Corash L, Andersen J, Pointdexter BJ, Schäfer E
Platelet function and survival in patients with severe hypercholesterolemia.
Atherosclerosis 1981, 1: 443-448

[46] Van Rensburg EJ, Heyns A DU P
The effect of age, arteriosclerosis and hypercholesterolemia on platelet function tests.
Thromb Haemorrh Disorders 1990, 1: 11-16

[47] Sinzinger-H, Pirich C, Bednar J, O´Grady J
Ex-vivo and in-vivo platelet function in patients with severe hypercholesterolemia undergoing LDL-apheresis.
Thrombosis Research 1996 May15; 82(4): 291-301

[48] Bröijerse´n A, Eriksson M, Larsson PT, Beck O, Berglund L, Angelin B, Hjemdahl P
Effects of selective LDL-apheresis and pravastatin therapie on platelet function in familiar hypercholesterolemia.
Europ J Clin Invest 1994, 24: 488-498

[49] Jarnvig IL, Naesh O, Hindberg I, Behnke O, Bregengaad C, Wilhjelm B
Platelet responses to intravenous infusion of Intralipid® in healthy volunteers.
Am J Clin Nutr, 1990, 52: 628-631

[50] Wang WQ, Ning X, Gustafson A
Pharmacology Lipid changes in plasma and blood cells following intravenous 10% fat infusion in man.
Pharmacology and Toxicology, 1995, 77: 377-381

[51] Aviram-M, Deckelbaum RJ
Intralipid infusion into humans reduces in vitro platelet aggregation and alters platelet lipid composition.
Metabolism, 1989, 38: 343-347

[52] Hayek T, Fuhrmann B, Levy Y, Aviram M, Brook JG
Intralipid infusion in patients with familiar hypercholesterolemia. Effect of serum and plasma lipoproteins on platelet aggregation and on macrophage cholesterol metabolism.
Atherosclerosis 1990, 81: 61-69

[53] Zhou-L
Intralipid rapidly attenuates the agonist-induced activation of rat platelets in vitro.
Thrombosis Research 1997, 85: 53-62

[54] Dietrich GV, Schueck R, Menges T, Kiesenbauer NP, Fruehauf A, Marquardt I
Comparison of four methods for the determination of platelet functions in whole blood in cardiac surgery.
Thrombosis Research 1998, 89: 295-301

[55] Liu M, Slutsky AS
Antiinflammatory therapies: application of molecular biology techniques in intensive care medicine.
Intens Care Med 1997, 23:718-731

[56] Jeejeebhoy KN
Total parenteral nutrition: potion or poison?

Am J Clin Nutr 2001, 74:160-163

[57] Xiao-Hua J., Ning L, Jie-Shou L.
Intestinal permeability in patients after surgical trauma and effect of enteral nutrition versus parenteral nutrition
World J Gastroenterol 2003, 9(8):1878-1880

[58] Neumayer LA, Smout RJ, Horn HG, Horn SD
Early and sufficient feeding reduces length of stay and charges in surgical patients.
J Surg Res 2001, 95(1):73-77

[59] Pacelli F, Bossola M, Papa V, Sgadari A, Doglietto GB
Enteral vs parenteral nutrition after major abdominal surgery: an even match.
Arch Surg 2001; 136:933-936)
Postoperative enteral versus parenteral nutrition
The Lancet 2002, 359:1697-1698

[60] R D Griffiths, T Bongers
Nutrition support for patients in the intesive care unit.
Postgraduate medical journal 2005, 81:629-636

[61] Holman R
Essential fatty acid deficiancy in humans.
Dietary Lipids and Postnatal Development, Ravens Press, New York 1973, pp 127-143

[62] Koller M, Senkal M, Kemen M, Konig W, Zumtobel V, Muhr G
Impact of omega-3 fatty acids enriched TPN on leukotriene synthesis by leukocytes after major surgery.
Clin Nutr 2003, 22: 59-64

[63] Matsusue S, Nishimura S, Koizumi S, Nakamura T, Takeda H
Preventive effect of simultaneously infused lipid emulsion against thrombophlebitis during postoperative peripheral parenteral nutrition.
Surg Today 1995, 25: 667-671

[64] Human D
Declaration of Helsinki.
Lancet 2001, 357: 236

[65] Cardinal DL, Flower RJ
The electronic aggregometer: A novel device for assessing platelet behaviour in blood.
J Pharmacol Methods, 1980, 3: 135-158

[66] Tanindi S, Kurekci AE, Koseoglu V, Kurt M, Ozcan O
The normalization period of platelet aggregation in newborns.
Thromb Res 1995, 80: 57-62

[67] Mascelli MA, Worley S, Veriabo NJ, Lance ET, Mack S, Schaible T, Weismann HF, Jordan RE
Rapid assessment of platelet function with a modified whole-blood aggregometer in percutaneous transluminal coronary angioplastx patients receiving anti-GP IIb/IIIa therapy.

Circulation 1997, 96: 3860-3866

[68] Born GVR
Aggregation of blood platelet by adenosine diphosphate and its reversal.
Nature 1962, 194: 279-299

[69] Hartert H
Klinische Blutgerinnungsstudien mit der Thrombelastographie.
Deutsches Arch Klein Med. 1952, 199: 284-292

[70] Hartert H
Resonance-thrombography, theoretical and practical elements.
Biorheology 1981, 18: 693-701

[71] Hartert H
Orbitometer flow and thrombus formation.
Biorheology 1990, 27:921-929

[72] Spiess BD, Gillies BS, Chandler W, Verrier E
Changes in transfusion therapy and reexploration rate after institution of a blood management program in cardiac surgical patients.
J Cardiothorac Vasc Anaesth 1995, 9: 168-173

[73] Essell JH, Martin TJ, Salinas J, Thompson JM, Smith VC
Comparison of thrombelastography to bleeding time and standard coagulation tests in patients after cardiopulmonary bypass.
J Cardiothorac Vasc Anaesth 1993, 7:410-415

[74] Martin P, Horkay F, Rajah SM, Walker DR
Monitoring of coagulation status using thrombelastography during paediatric open heart sur gery.
Int J Clin Monit Comput 1991, 8:183-187

[75] Kundu SK, Heilmann EJ, Sio R, Garcia C, Davidson RM, Ostgaard RE
Description of an in vitro platelet function analyzer - PFA 100.
Sem Thromb Hemostas 1996, 21 S 2 :112

[76] Dietrich GV, Kretschmer V, Weber D, Haupt W, Langen B, Huss B
Variables influencing the Thrombostat 4000: recommended standardization.
Semin Thromb Hemost 1995, 21 Suppl 2: 11-19

[77] Kratzer MA, Born GV
Simulation of primary hemostasis in vitro.
Hemostasis 1985, 15: 357-362

[78] Fressinaud E, Veyradier A, Truchaud F, Martin I, Boyer-Neumann C, Trossaert M, Meyer D
Screening for von Willebrand desease with a new analyzer using high shear stress: a study of 60 cases.
Blood 1998, 91: 1325-1331

[79] Wu KK, Hoak JC
A new method for the quantitative detection of platelet aggregates in patients with arterial insufficiency.
Lancet 1974, I : 924-926

[80] Velaskar DS, Chitre AP
A new aspect of platelet aggregation and a test to measure it.
Am J Clin Pathol. 1982, 77: 267-274

[81] Bharadwaj D, Harris RJ, Kisiel W,Smith KJ
Enzymatic removal of sialic acid from human factor IX and factor X has no effect on their coagulant activity.
J Biol Chem 1995, 270: 6537-6542

[82] Harrap RS, Whyte GS, Farrugia A, Jones C
Some characteristics of blood shed into the Solcotrans postoperative orthopaedic drainage/reinfusion system.
Med J Aust 1992, 157: 95-96

[83] Prowse CV, Chirnside A, Elton RA
In vitro thrombogenicity tests of factor IX concentrates. I. A survey of available assays.
Thromb Haemost 1980, 42: 1355-1367

[84] Bergmann H, Blauhut, Brucke P, Necek S, Vinazzer H
Frühe Gerinnungsveränderungen bei akuter präoperativer Hämodilution mit Humanalbumin und Ringerlactat.
Anaesthesist 1976, 25: 175-180

[85] Saniabadi AR, Lowe GD, Madhok R, Spowart K, Shaw B, Barbenel JC, Forbes CD
A critical investigation into the existence of circulating platelet aggregates.
Thromb Haemost 1986, 56: 45-49

[86] Mani H, Kirchmayr K, Klaffling C, Schindewolf M, Luxembourg B, Linnemann B, Lindhoff-Last E
Influence of blood collection techniques on platelet function.
Platelets 2004, 15(5): 315-318

[87] Golanski J, Pietrucha T, Baj Z, Greger J, Watala C
Molecular insights into the anticoagulation-induced spontaneous activation of platelats in whole blood - various anticoagulants are not equal.
Thromb Res 1996, 83: 199-216

[88] Katzel R, Losche W, Selle B
Zur Messung der spontanen Thrombozytenaggregation im Zitratvollblut (SPAV) unter Verwendung des hämatologischen Automaten Coulter S plus VI.
Z Med Lab Diagn 1991, 32: 44-49

[89] Saniabadi AR, Lowe GD, Belch JJ, Forbes CD
Platelet aggregation inhibitory effects of the new positive inotropic agents pimobendan and UD CG 212 in whole blood.
Cardiovasc Res 1989, 23: 184-190

[90] Saniabadi AR, Lowe GD, Barbenel JC, Forbes CD
Effect of dipyridamole on spontaneous platelet aggregation in whole blood decreases with the time after venepuncture: evidence for the role of ADP.
Thromb Haemost 1987, 58: 744-748

[91] Splawinska B, Furmaga W, Nieszpaur M, Ziembicki W, Kuzniar J, Dluska Z, Rybak A, Splawinski J
Formation of prostacyclin-sensitive platelet aggregates in human whole blood in vitro. Part I. The occurrence of the phenomenon in healthy male volunteers.
Scand J Clin Lab Invest 1987, 47: 119-124

[92] Wahba A, Black G, Koksch M, Rothe G, Preuner J, Schmitz G, Birnbaum DE
Cardiopulmonary bypass leads to a preferential loss of activated platelets. A flow cytometric assay of platelet surface antigens.
Eur J Cardiothorac Surg 1996, 10: 768-773

[93] Abbate R, Favilla S, Boddi M, Costanzo G, Prisco D
Factors influencing platelet aggregation in whole blood.
Am J Clin Pathol 1986, 86: 91-96

[94] Müller MR, Salat A, Pulaki S, Stangl P, Ergun E, Schreiner W, Losert U, Wolner E
Influence of hematocrit and platelet count on impedance and reactivity of whole blood for electrical aggregometry.
J Pharmacol Toxicol Methods 1995, 34: 17-22

[95] Zhou L, Schmaier AH
Platelet aggregation testing in platelet-rich plasma: description of procedures with the aim to develop standards in the field.
Am J Clin Pathol 2005, 123 (2): 172-183

[96]Fijnheer R, Pietersz RN, de Korte D, Gouwerok CW, Dekker WJ, Reesink HW, Roos D
Platelet activation during preparation of platelet concentrates: a comparison of the platelet- rich plasma and the buffycoat methods.
Transfusion 1990, 30: 634-638

[97] Dyszkiewicz-Korpanty AM, Frenkel EP, Sarode R
Approach to the asessment of platelet function: comparison between optical-based platelet-rich plasma and impedance-based whole blood platelet aggregation methods.
Clin Appl Thromb Hemost 2005, 11(1): 25-35

[98] Hansen TN, Brockbank KG
Increased platelet aggregation due to chilling to 20 degrees C is not related to increased sensitivity to agonists.
Transfusion 1997, 37: 696-702

[99] Heller AR, Fischer S, Rossel T, Geiger S, Siegert G, Ragaller M, Zimmermann T, Koch T
Impact of n-3 fatty acid supplemented parenteral nutrition on haemostasis patterns after major abdominal surgery.
Br J Nutr 2002, 87 Suppl 1:95-101

[100] Hovig T, Grottum KA
Lipid infusion in man. Ultrastructural studies on blood platalet uptake of fat particles.
Thrombos Diathes Haemorrh 1973, 29: 450-460

[101] Grottum KA, Nordoy A, Hellem A
Lipid infusion in man. Blood platelet uptake of lipid and effects on platelet function.
Haemorrh 1973, 29: 701-711

[102] Tornvall P, Chirkova L, Toverud KD, Horowitz JD, Chirkov Y
Native and oxidized low density lipoproteins enhance platelet aggregation in whole blood.
Thromb Res 1999, 95: 177-183

[103] Breddin HK, Lippold R, Bittner M, Kirchmaier CM, Krzywanek HJ, Michaelis J
Spontaneous platelet aggregation as a predictive risk factor for vascular occlusions in healthy volunteers? Results of the HAPARG Study. Haemostatic parameters as risk factors in healthy volunteers.
Atherosclerosis 1999, 144: 211-219

[104] Ault KA, Cannon CP, Mitchell J, Mc Cahan J, Tracy RP, Novotny WF, Reimann JD, Braunwald E
Platelet activation in patients after acute coronary syndrome : results from the TIMI-12 trial. Thrombolysis in Myocardiel Infarction.
J Am Coll Cardiol 1999, 33: 634-639

[105] Reininger CB, Graf J, Reininger AJ, Spannagl M, Steckmeier B, Schweiberer L
Increased platelet and coagulatory activity indicate ongoing thrombogenesis in peripheral arterial desease.
Thromb Res 1996, 82: 523-532

[106] Fitzgerald DJ, Roy L, Catella F, Fitzgerald GA
Platelet activitation in unstable coronary desease.
N Engl J Med 1986, 315: 983-989

[107] Kerins DM, Roy L, Fitzgerald GA, Fitzgerald DJ
Platelet and vascular function during coronary thrombolysis with tissue-type plasminogen activator.
Circulation 1989, 80: 1718-1725

[108] Nakonechnicov S. Gabbasov Z, Chazova I, Popov E, Belenkov Yu
Platelet aggregation in patients with primary pulmonary hypertension.
Blood Coagul Fibrinolysis 1996, 7: 225-227

[109] Zdrojewski Z, Raszeja-Specht A, Kustosz J, Skibowska A, Rutkowski B
Evaluation of factors influencing platelet aggregation in patients with chronic glomerulonephritis.
Przegl Lek 1996, 53: 434-438

[110] Ahlawat S, Pati HP, Bathla N, Fatima L, Mittal S
Plasma platelet aggregating factor and platelet aggregation studies in pre-eclampsia.
Acta Obstet Gynecol Scand 1996, 75: 428-431

[111] Felfernig-Boehm D, Salat A, Vogl SE, Murabito M, Felfernig M, Schmidt D, Mittlboeck M, Husslein P, Mueller MR

Early detection of preeclampsia by determination of platelet aggregability.
Thromb Res 2000, 98: 139-146

[112] Lear JT, Graham C, Pavord S, Mitchell V, Hutchinson PE
Cutaneous vascular infarcts secondary to spontaneous aggregation.
Br J Dermatol 1998, 138: 1061-1063

[113] Armstrong R, May JA, Losche W, Heptinstall S
Factors that contribute to spontaneous platelet aggregation and streptokinase-induced aggregation in whole blood.
Thromb Haemoost 1995, 73: 297-303

[114] Fusegawa Y, Handa S
Platelet aggregation induced by ADP or Epinaphrine is enhanced in habitual smokers.
Thromb Res 2000, 97: 287-295

[115] De Padua Mansur A, Caramelli B, Vianna CB, Chamone D, Ramirez JA
Smoking and lipoprotein abnormalities on platelet aggregation in coronary heart desease.
Int J Cardiol 1997, 62: 151-154

[116] Zhang QH, Das K, Siddiqui S, Myers AK
Effects of acute, moderate ethanol consumption on human platelet aggregation in platelet-rich plasma and whole blood.
Alcohol Clin Exp Res 2000, 24: 528-534

[117] Iwase E, Tawata M, Aida K, Ozaki Y, Kume S, Satoh K, Qi R, Onaya T
A cross-sectional evaluation of spontaneous platelet aggregation in relation to complications in patients with type II diabetes mellitus.
Metabolism 1998, 47: 699-705

[118] Ersoz G, Ficicilar H, Pasin M, Yorgancioglu R, Yavuzer S
Platelet aggregation in traumatic spinal cord injury.
Spinal Cord 1999, 37: 644-647

[119] Saniabadi AR, Lowe GD, Barbenel JC, Forbes CD
Further studies on the role of red blood cells on spontaneous platelet aggregation.
Thromb Res 1985, 38: 225-232

[120] Kurata M, Tanaka K, Usami M
Different roles of endothelium-derived substances on inhibiting platelet aggregation in whole blood.
Gen Parmacol 1997, 28: 671-673

[121] Houston DS, Robinson P, Gerrard JM
Inhibition of intravascular platelet aggregation by endothelium-derived relaxing factor: reversal by red blood cells.
Blood 1990, 76: 953-958

[122] Suzuki Y, Takami H, Tamai Y, Narita M, Mayama K, Munakata A
Synergistic disaggregation of platelets by the products of endothelial cells or their analogs.

Haematologia 2000, 30: 81-90

[123] Siminiak T, Flores NA, Sheridan DJ
Neutrophil interactions with endothelium and platelets: possible role in the development of cardiovascular injury.
Eur Heart J 1995, 16: 160-170

[124] Joseph R, Welch KM, D´Andrea G, Riddle JM
Evidence for the presence of red and white cells within "platelet aggregates formed in whole-blood.
Thromb Res 1989, 53: 485-491

[125] Montemurro P, Lattanzio A, Chetta G, Lupo L, Caputi-Iambrenghi, Rubino M, Giordano D, Semeraro N
Increased in vitro and in vivo generation of procoagulant activity (tissue factor) by mononuclear phagocytes after Intralipid infusion in rabbits.
Blood 1985, 65: 1391-1395

[126] Lattanzio A, Montemurro P, Pannarale O, Altomare DF, Palasciano N, de Rinaldis P, Semeraro N
Increased production of coagulant activity (tissue factor) by human peripheral blood monocytes after Intralipid infusion.
Clin Nutr 1984, 3: 177-181

[127] Van der Poll T, Coyle SM,Levi M, Boermeester MA, Braxton CC, Jansen PM, Hack CE, Lowry SF
Fat emulsion infusion potentiates coagulation activation during human endotoxemia.
Thromb Heamost 1996, 75: 83-86

[128] Martinez MJ, Folch N, Torregrosa N, Alfaro A, Obaldia MC
Coagulation and total parenteral nutrition: the effect of 2 lipid emulsions.
Nutr Hosp 1995, 10: 74-80

[129] Elmadfa I, Hampshire J, Bartolomai M et al
Inhibition of platelet aggregation and alteration in thromboxane synthesis by intravenous application of LCT-containing fat emulsions.
5. European Nutrition Conference, Warsaw 1987

[130] Elmadfa I, Hampshire J, Brandt K et al
Einfluss parenteraler Verabreichung verschiedener Fettemulsionen auf die Thrombozytenaggregation und Thromboxansynthese.
Aktuel Ernähr Med 1987, 12: 97-101

[131] Hampshire J
Auswirkungen von Fettemulsionen auf Parameter des Lipidstoffwechsels, des Gerinnungs- und Antioxidantienstatus bei Probanden.
Dissertation Giessen 1989

[132] Elmadfa I, Stroh S, Brandt K, Schlotzer E
Influence of a single parenteral application of a 10 % fish oil emulsion on plasma fatty acid pattern and the function of thrombocytes in young adult men.
Ann Nutr Metab 1993, 37: 8-13

[133] Schacky C v, Weber PC
Metabolism and effects on platelet function of the purified eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid in humans.
J Clin Invest 1985, 76: 2446-2450

[134] Thomas MP, Gargett CE, West KR et al
The effect of Intralipid® on platelet function during parenteral nutrition.
Acta Chir Scand 1979, 494: 70-71

Danksagung

Ich bedanke mich bei allen, die mich bei dieser Arbeit unterstützt haben.

Lebenslauf

Persönliche Daten	**Anja Forster; geb. Maier**
	geb. am 08.11.67 in Nürnberg
	verheiratet mit Jürgen Forster, geb. 22.11.66, Elektroingenieur
	Kinder: David Forster, geb. 06.01.97
	Sarah Forster, geb. 02.01.00

Schulbildung

1974-1978	Grundschule Neunkirchen
1978-1988	Ohm-Gymnasium Erlangen, Abschluß Abitur
1988-1990	MTA-Schule Nürnberg, Abschluß Staatsexamen
1990-1992	Molekularbiologisches Labor, Medizin 1, Universität Erlangen
1992-1998	Studium der Humanmedizin an der Justus-Liebig-Universität Giessen
1998-1999	Praktisches Jahr an der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen (Chirurgie, Innere Medizin, Gynäkologie)
April 1999	3. Staatsexamen der Humanmedizin an der FAU Erlangen

Beruflicher Werdegang

6/2002 bis 11/2003	Ärztin im Praktikum in der Frauenklinik Fürth
seit 12/2003	Assistenzärztin in der Frauenklinik Fürth

Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angengeben habe. Alle Textstellen, die wörtlcih oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.