

# **Einflüsse von Hydroxyethylstärke (200/0,5) und Hydroxyethylstärke (130/0,4) auf die Antigenexpression und Aktivierung von Thrombozyten**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
des Fachbereichs Humanmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen**

**vorgelegt von Antje Hartmann, geb. Köhler  
aus Bad Nauheim**

**Gießen 2006**

**Aus dem Medizinischen Zentrum für Chirurgie, Anästhesiologie und  
Urologie**

**Klinik für Anästhesiologie, Intensivmedizin, Schmerztherapie und  
Palliativmedizin**

**Leiter: Prof. Dr. med. Dr. h.c. G. Hempelmann**

**des Universitätsklinikums Gießen und Marburg, Standort Gießen**

**Gutachter: PD Dr. Dietrich**

**Gutachter: Prof. Dr. Bein**

**Tag der Disputation: 20.06.2007**

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich 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.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG</b>	<b>9</b>
1.1	ENTWICKLUNG DER VOLUMENERSATZMITTEL IM 20. JAHRHUNDERT	9
1.2	KRISTALLOIDE LÖSUNGEN	11
1.3	KOLLOIDALE LÖSUNGEN	12
1.3.1	<i>Hydroxyethylstärke</i>	13
1.4	STRUKTUR UND FUNKTION VON THROMBOZYTEN	16
1.5	ZIEL DER STUDIE	20
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>21</b>
2.1	STUDIENDESIGN	21
2.2	STUDIEN TEILNEHMER	21
2.3	STUDIENPROTOKOLL	22
2.3.1	<i>In vitro-Studie</i>	22
2.3.2	<i>In vivo-Studie</i>	23
2.4	ANALYSE DER BLUTPROBEN	25
2.4.1	<i>Verwendete Lösungen</i>	25
2.4.1.1	Probenaufbereitung	26
2.4.1.1.1	<i>In vitro-Studie</i>	26
2.4.1.1.2	<i>In vivo-Studie</i>	28
2.4.1.2	Messung der Thrombozyten am Cellcounter	28
2.4.1.3	Messung thrombozytärer Oberflächenantigene mittels Durchflusszytometrie	29
2.4.1.3.1	Grundprinzip	29
2.4.1.3.2	Vorgehen	34
2.4.2	<i>Durchflusszytometrie</i>	37
2.4.2.1	Monoklonale Antikörper	37
2.4.2.2	Antigenexpression bei Thrombozyten	40
2.4.2.2.1	CD9	40
2.4.2.2.2	CD31	40
2.4.2.2.3	CD36	41
2.4.2.2.4	CD41/61	41
2.4.2.2.5	CD42a/42b	41
2.4.2.2.6	CD62p	42
2.4.2.2.7	CD49b/49e	42
2.4.2.2.8	Thrombinrezeptoren S/W	43

2.4.2.2.9	Thrombospondin (TSP) .....	43
2.5	REAGENZIE <span>N</span> UND GERÄTE .....	43
2.5.1	<i>Geräte und Probengefäße</i> .....	43
2.5.2	<i>Reagenzien</i> .....	44
2.6	DATENAUSWERTUNG UND STATISTIK .....	45
2.6.1	<i>In vitro-Studie</i> .....	46
2.6.2	<i>In vivo-Studie</i> .....	46
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>47</b>
3.1	KONTROLLMESSUNGEN .....	47
3.2	<i>IN VITRO</i> -STUDIE .....	48
3.2.1	<i>CD62</i> .....	48
3.2.2	<i>CD42a/b und CD49b/e</i> .....	51
3.2.3	<i>CD31</i> .....	51
3.2.4	<i>CD36 und Thrombospondin (TSP)</i> .....	52
3.2.5	<i>CD41F, CD41PE, CD61 und CD9</i> .....	53
3.2.6	<i>Thrombinrezeptoren S/W</i> .....	53
3.3	<i>IN VIVO</i> -STUDIE .....	54
3.3.1	<i>Test auf Normalverteilung</i> .....	54
3.3.1.1	<i>CD62</i> .....	56
3.3.1.2	<i>CD42a/b und CD49b/e</i> .....	58
3.3.1.3	<i>CD31</i> .....	61
3.3.1.4	<i>CD36 und Thrombospondin (TSP)</i> .....	63
3.3.1.5	<i>CD41F, CD41PE, CD61 und CD9</i> .....	65
3.3.1.6	<i>Thrombinrezeptoren S/W</i> .....	70
3.4	ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE .....	72
3.4.1	<i>In vitro-Studie</i> .....	72
3.4.2	<i>In vivo-Studie</i> .....	72
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>74</b>
4.1	ZUSAMMENFASSE <span>N</span> DE BEWERTUNG DER ERGEBNISSE .....	74
4.2	DISKUSSION DER ERGEBNISSE .....	76
4.3	BEURTEILUNG DER METHODEN .....	83
4.4	SCHLUSSFOLGERUNGEN .....	85
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>86</b>
<b>6</b>	<b>SUMMARY</b> .....	<b>87</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>88</b>

<b>8</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>98</b>
<b>9</b>	<b>LEBENS LAUF .....</b>	<b>99</b>

## Abkürzungsverzeichnis

ASA	American Society of Anesthesiologists
C	Kohlenstoff
CD	Clusters of differentiation
F	French
FACS	Fluorescent Activated Cell Sorter = Fluoreszenzdurchflusszytometer
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
fl	Femtoliter
FL	Fluoreszenz
FSC	Forward Light Scatter
g	Gramm
G	Gauge
GP	Glykoprotein
HAT	Hypoxanthin, Aminopterin, Thymidin
HES	HydroxyethylstärkeLösung
Hg	Quecksilber
HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
ml	Milliliter
MS	Molarer Substitutionsgrad
Mw	Mittleres Molekulargewicht

MW	Mittelwert
NaCl	Natriumchlorid
nm	Nanometer
PBS	Phosphate buffered saline
PDA	Periduralanästhesie
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PE	Phycoerythrin
PECAM	Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule
PEG	Polyethylenglycol
PPP	Plättchenarmes Plasma
PRP	Plättchenreiches Plasma
PVP	Polyvinylpyrrolidon
RES	Retikuloendotheliales System
RHS	Retikuloendotheliales System
SD	Standardabweichung
SSC	Side Scatter
TSP	Thrombospondin
U	Umdrehungen
vWF	von Willebrand-Faktor
ZVK	Zentraler Venenkatheter

## **1 Einleitung und Problemstellung**

Bei der Therapie des intraoperativen Blutverlustes kann durch die perioperative Erhaltung der Normovolämie auch ohne Zufuhr von Blutkomponenten die Sauerstoffversorgung der Gewebe in einem weiten Bereich sichergestellt werden. Die kritische Grenze, ab wann eine Transfusion nötig ist, ist individuell verschieden. Als Orientierungswerte können Hämoglobin-Konzentrationen von 10 g/dl beim Intensivpatienten und 8-6 g/dl beim „Gesunden“ gelten (ADAMS et al. 1998).

Als Volumenersatzmittel stehen kristalloide und kolloidale Lösungen zur Verfügung. Der Einfluss von kolloidalen Volumenersatzmitteln auf die Blutgerinnung und deren klinische Relevanz wird schon seit langer Zeit kontrovers diskutiert. Die klinische Bedeutung dieser Fragestellung wird durch das Dilemma deutlich, dass einerseits eine adäquate Volumensubstitution zur Aufrechterhaltung des Kreislaufs durchgeführt werden muss und andererseits die Hämostase möglicherweise durch Gabe von kolloidalen Lösungen negativ beeinflusst und so der Blutverlust weiter vergrößert wird.

### **1.1 Entwicklung der Volumenersatzmittel im 20. Jahrhundert**

Im Jahre 1906 veranlasste MORAWITZ die Kenntnis über die Bedeutung hochmolekularer Verbindungen bei der Aufrechterhaltung des intravasalen Volumens zu ersten Versuchen mit Kohlenhydraten als Ersatz hochmolekularer Proteine (MORAWITZ 1906).

1918 mischte BAYLISS eine 0,9%-Kochsalzlösung mit Gummi arabicum, ein Gummiharz tropischer Akazienarten, das aus sauren Salzen der Arabinsäure und geringen Mengen an

Gerbstoff, Zucker und Fermenten besteht, mit dem Ziel, eine volumenwirksame Lösung zu erhalten (BAYLISS 1920). Dieser Weg wurde aufgrund ungenügender Kenntnisse über die Reinigung des Naturstoffes nicht weiter verfolgt, da es zu nicht vorhersehbaren Nebenwirkungen kam, wie beispielsweise allergischen Reaktionen. Weiterhin war der Volumeneffekt zu gering.

Polyvinylpyrrolidon (PVP) wurde als erstes klinisch einsetzbares Volumenersatzmittel im Zweiten Weltkrieg eingeführt. PVP, ein Thermoplast, war als Kollidon bzw. Periston® in 6%iger Lösung mit einem mittleren Molekulargewicht von 25.000 bis 50.000 Dalton im Handel erhältlich. PVP fand auch bei Patienten mit erhöhtem intrakraniellen Druck Verwendung, da es in Kombination mit hypertonischen Lösungen zu einer osmotischen Entwässerung führte (JORNS 1940). Als bekannt wurde, dass dieses Kolloid bis zu mehreren Monaten im Retikuloendothelialen System (RES) gespeichert wird, stellte man die Anwendung von PVP ein. Ein bekanntes und sehr gefürchtetes Krankheitsbild bei übermäßiger Infusion des Kolloids war die Speicherungsnephrose oder Nephrohydropse mit Einschränkung der Nierenfunktion (HÜSSELMANN 1952).

In Schweden wurde 1944 ein weiteres Volumenersatzmittel, Dextran, entwickelt (GRÖNWALL und INGELMANN 1944). Dextrane bestehen aus kettenförmigen, verzweigten Glucoseresten mit hauptsächlich  $\alpha$ -1,6-glykosidischer Bindung. Die Herstellung erfolgt durch gelenkte mikrobielle Synthese oder durch partielle Hydrolyse höhermolekularer Dextrane, die durch die Kultivierung von Milchsäurebakterien auf saccharosehaltigen Nährmedien entstehen.

Weitere Meilensteine in der Entwicklung von Plasmaersatzmitteln waren die Einführung der Oxypolygelatine 1951 durch CAMPBELL, der flüssigen Gelatine 1955 durch TOURTELOTTE sowie eines durch Harnstoffbrücken vernetzten Gelatinekolloids 1962 durch SCHMIDT-THOME.

Bereits 1957 wurde durch WIEDERSHEIM von einem neuen Plasmaexpander berichtet, der Oxyethylstärke, einem Stärkederivat (WIEDERSHEIM 1957). Zahlreiche weitere Untersuchungen mit verschiedenen Stärkederivaten führten im Dezember 1966 auf

Empfehlung des „Committee on Plasma and Plasmasubstitutes“ des National Research Council in Washington, USA, zur Einleitung der klinischen Prüfung dieser Medikamentengruppe. Als erste Hydroxyethylstärkepräparation wurde in Deutschland 1974 Plasmasteril<sup>®</sup> vom Bundesgesundheitsamt zugelassen.

## 1.2 Kristalloide Lösungen

Kristalloide Lösungen, wie die Ringer-Lactat-Lösung oder die isotone Kochsalzlösung (NaCl 0,9%) sind in den USA weit verbreitet. Sie zählen zu den Vollelektrolytlösungen und sind in der Elektrolytverteilung und -konzentration auf die extrazelluläre Flüssigkeit abgestimmt. Sie enthalten keine Makromoleküle und werden daher nicht onkotisch in der Blutbahn fixiert. Im Gegensatz zu kolloidalen Lösungen verteilen sie sich innerhalb weniger Minuten gleichmäßig auf den Intravasalraum und das Interstitium. Da Plasmavolumen und Interstitium im Verhältnis von 1:4 stehen, wird im Vergleich zu kolloidalen Lösungen die vierfache Menge an Kristalloiden benötigt, um einen analogen Volumeneffekt zu erzielen. Die damit verbundene interstitielle Überwässerung stellt den entscheidenden Nachteil der Volumensubstitution mit kristalloiden Lösungen dar (ADAMS et al. 1998).

Der Einfluss von kristalloiden Lösungen auf die Hämostase wird kontrovers diskutiert. RUTTMANN et al. beschrieben einen prokoagulatorischen Effekt nach Infusion von isotoner Kochsalzlösung, möglicherweise durch eine durch die Hämodilution verursachte erhöhte Thrombinbildung (RUTTMANN et al. 1998). Nach RUTTMANN et al. berichteten KRETSCHMER et al. von dem Einfluss einer kristalloiden Lösung auf Gerinnungsparameter in umgekehrter Richtung. In einer vergleichenden Untersuchung des Verhaltens von Thrombelastogrammen nach Hämodilution mit autologem plättchenarmem Plasma (ppp), Kochsalzlösung und HES 450 fanden KRETSCHMER et al. (2004) heraus, dass eine Gerinnungshemmung am stärksten nach der Gabe von Kochsalzlösung, nicht hingegen von Hydroxyethylstärke, auftrat. Die Arbeitsgruppe kam zu dem Schluss, dass die in einigen

Studien beobachtete Steigerung der Gerinnbarkeit nach Hämodilution methodisch bedingt sein muss, da sich diese am ausgeprägtesten nach Gabe von ppp beobachten ließ.

### 1.3 Kolloidale Lösungen

In Deutschland ist die Hydroxyethylstärke das klinisch bevorzugte künstliche Kolloid, während in anderen europäischen Ländern Gelatine und/oder Dextran-Präparate weit verbreitet sind. HES ist ein aus natürlicher Stärke abgeleitetes und aus Glucose-Einheiten aufgebautes Polysaccharid, das aus Mais, anderen Getreidearten oder Kartoffeln hergestellt wird. Das Polysaccharid wird durch Einbringen von Hydroxyethylgruppen in das Molekül vor dem raschen Abbau der  $\alpha$ -Amylase des Serums geschützt. Die vielfältigen Variationsmöglichkeiten des Moleküls haben dazu geführt, dass sich eine Vielzahl von klinisch verfügbaren Lösungen auf dem Markt befindet, die sich im Wesentlichen in der Konzentration, im Molekulargewicht und dem Substitutionsgrad unterscheiden. Die Gesamtbewertung der verschiedenen Eigenschaften bestimmt die unterschiedliche Verweildauer und Volumenwirksamkeit der Kolloide.

Sie werden je nach Volumenwirksamkeit in zwei verschiedene Gruppen eingeteilt:

- Kolloide mit einem höheren kolloidosmotischen Druck als dem des Plasmas werden *Plasmaexpander* genannt, da sie einen Einstrom von Wasser aus dem Interstitium in die Gefäße zur Folge haben. Hierzu zählen Dextrane, Humanalbumin 20% und Hydroxyethylstärke.
- *Plasmaersatzmittel* sind Kolloide mit einem plasmaisotonen kolloidosmotischen Druck. Der Volumeneffekt entspricht nur der zugeführten Menge, da es nicht zum Einstrom von Wasser aus dem Interstitium kommt. Zu den Plasmaersatzmitteln gehören Gelatine und Humanalbumin 5%.

### 1.3.1 Hydroxyethylstärke

Hydroxyethylstärke leitet sich chemisch vom Amylopektin ab, das z.B. in der Maisstärke bis zu 95% vorhanden ist. Amylopektin ist ein verzweigt gebautes Polysaccharid und enthält einen  $\alpha$ -1,4-glykosidisch aus D-Glucose aufgebauten Hauptstrang, der nach 8 bis 9 Glucoseeinheiten  $\alpha$ -1,6-glykosidisch angeheftete Seitenketten trägt, die aus 15 bis 25 D-Glucosebausteinen bestehen. HES kann aus Amylopektin durch die im alkalischen Milieu stattfindende Hydroxyethylierung unter Verwendung von Ethylenoxid hergestellt werden. Diese Substitutionsreaktion kann am C-Atom 2, 3 oder 6 ausgeführt werden. Das Substitutionsmuster ist durch entsprechende Variation der Reaktionsbedingungen innerhalb gewisser Grenzen manipulierbar. Daraus resultiert ein Gemisch heterogen substituierter Moleküle (MÜHLHAUSE-SCHLAU 1990).

Die Charakterisierung von Hydroxyethylstärke erfolgt durch folgende Faktoren:

- Konzentration (3%, 6%, 10%)
- Mittleres Molekulargewicht (Mw) (40.000 - 450.000 Da)
- Molarer Substitutionsgrad (MS) (0,4 - 0,5 - 0,62 - 0,7)
- C2/C6 ratio
- Mw der Bodenfraktion (Mw für die 10% kleinsten Moleküle)
- Mw der Spitzenfraktion (Mw für die 10% größten Moleküle)

Die Kolloidkonzentrationen bestimmen die initiale Volumenwirkung. Hyperonkotische Kolloidlösungen (10%) haben die Eigenschaft, zusätzliches Volumen intravasal binden zu können und haben somit eine plasmaexpandierende Wirkung. Niedermolekulare HES (3%), die einen plasmaitotonischen Druck ausüben, können kein zusätzliches freies Wasser binden und werden als Plasmaersatzmittel bezeichnet (TREIB und HAAS 1997, siehe Kapitel 1.3).

Kolloidpräparate werden in Abhängigkeit von ihrem Molekulargewicht in monodisperse und polydisperse Lösungen eingeteilt. Albumin zählt beispielsweise zu den monodispersen Lösungen, da es mit einem Molekulargewicht von 69 kDa lediglich aus Molekülen mit dem gleichen Gewicht besteht. HES-Präparate dagegen sind polydispers, d.h. sie bestehen aus Molekülen mit unterschiedlichen Gewichten. Daher wird das Molekulargewicht auch als mittleres Molekulargewicht angegeben (WARREN und DURIEUX 1997).

Durch Hydroxyethylierung werden Hydroxyethylgruppen an die C-Atome der Glucosemoleküle gebunden. Der molare Substitutionsgrad stellt das Verhältnis der Anzahl von Hydroxyethylgruppen zur Gesamtzahl der Glucosemoleküle dar und wird als Zahl zwischen 0 und 1 angegeben. Ein Substitutionsgrad von beispielsweise 0,7 bedeutet, dass auf 10 Glucosemoleküle 7 Hydroxyethylgruppen kommen (WARREN und DURIEUX 1997, BOLDT 2004). Hydroxyethylgruppen verzögern die Hydrolyse der Stärkekomponenten durch die  $\alpha$ -Amylase und damit auch den Abbau und die Elimination aus dem Blut. Damit lässt sich der lange Volumeneffekt bei der hochsubstituierten Stärke erklären (TREIB et al. 1996).

Neben dem Substitutionsgrad ist bei dem Abbau von Hydroxyethylstärke auch die Position der HES-Gruppen von Bedeutung. Sie können an die C-Atome 2, 3 oder 6 des Glucosemoleküls gebunden sein. Man spricht deshalb von der C2/C6 ratio, da die häufigste Bindung an den C-Atomen 2 und 6 stattfindet. Die C2/C6 ratio gibt das Verhältnis der Gesamtzahl der an C-Atom 2 gebundenen und der Gesamtzahl der an C-Atom 6 gebundenen Hydroxyethylstärken an. Wenn eine Hydroxyethylierung am C-Atom 2 dreizehnmal häufiger erfolgen würde als am C-Atom 6, würde das eine C2/C6 ratio von 13 bedeuten. Eine hohe C2/C6 ratio führt nach wiederholter HES-Gabe zu signifikanten Unterschieden in der Rheologie, der Blutgerinnung und der Elimination im Vergleich zu einer niedrigen C2/C6 ratio (TREIB et al. 1995).

Nach einmaliger Infusion von Hydroxyethylstärke kommt es regelmäßig zum Aktivitätsanstieg des abbauenden Enzyms, der Serumamylase. Durch die Serum- $\alpha$ -Amylase wird HES in nierengängige Fraktionen gespalten und nachfolgend renal ausgeschieden (WARREN und DURIEUX 1997). Wie alle künstlichen Kolloide kann HES in verschiedenen Geweben und Zellen des Retikuloendothelialen Systems (RES) eingelagert werden. Obwohl

geringe Mengen des gespeicherten Wirkstoffes noch längere Zeit (bis zu mehreren Monaten) nach der Verabreichung in den Speichervakuolen des RHS histologisch nachweisbar sind, bestehen keine Hinweise auf eine Beeinträchtigung der Funktion des RHS.

Die Auswirkungen einer HES-Therapie auf die Blutgerinnung sind Gegenstand kontroverser Diskussionen. Vor allem aus den USA liegen verschiedene Berichte über schwerwiegende Blutungskomplikationen vor (CHANG et al. 1990, TRUMPLE et al. 1995). Allerdings ist zu beachten, dass in den USA nur hochmolekulare, hochsubstituierte HES 480/0,7 zur Volumentherapie zugelassen ist (TREIB et al. 1999).

Verschiedene europäische Studien konnten bestätigen, dass höhermolekulare Stärken wahrscheinlich deutliche gerinnungshemmende Effekte haben (TREIB et al. 1999, ENTHOLZNER et al. 2000, BOLDT et al. 2002). Dagegen stehen Untersuchungen, die den Einfluss niedrigmolekularer Lösungen auf die Gerinnung in therapeutisch üblichen Dosierungen als nicht vorhanden oder marginal bewerten (TREIB et al. 1996, 1999, BLAICHER et al. 1998, WAITZINGER et al. 1998, 1999, ENTHOLZNER et al. 2000, GALLANDAT HUET et al. 2000, HÜTTNER et al. 2000, BOLDT et al. 2001, 2002, HAISCH et al. 2001, KRETSCHMER et al. 2004, KOZEK-LANGENECKER 2005, MADJDPOUR et al. 2005, NIEMI und KUITUNEN 2005).

Es ist also sinnvoll, die unterschiedlichen HES-Präparate differenziert zu betrachten. Die Auswirkungen verschiedener Präparate sind nach ENTHOLZNER vom Molekulargewicht, von der molaren Substitution und der C2/C6 ratio abhängig (ENTHOLZNER 2000). Lösungen mit hohem Molekulargewicht, hoher molarer Substitution und einer hohen C2/C6 ratio wurden in Zusammenhang gebracht mit gehäuft auftretenden Blutungskomplikationen (TREIB et al. 1996). In dieser Untersuchung wurde gezeigt, dass eine hochsubstituierte Hydroxyethylstärke die Plättchenfunktion stärker hemmt als eine niedrigsubstituierte HES. Für diese Beeinträchtigung der Plättchenfunktion soll eine verminderte Verfügbarkeit des GP IIb/IIIa-Rezeptors (CD41/61) auf der Thrombozytenoberfläche verantwortlich sein, die eine verringerte Interaktion mit Fibrinogen und von Willebrand-Faktor verursacht (THALER et al. 2005, FRANZ et al. 2001, BOLDT et al. 1993). Eine weitere Hypothese zum möglichen gerinnungshemmenden Effekt von HES beschrieben DEUTSCH et al. (2003). Sie gingen

davon aus, dass HES die Thrombozytenmembran einschließt („coating effect“) und dadurch die Verfügbarkeit von Rezeptoren, die für die Adhäsion nötig sind, mindert. Zudem seien die Auswirkungen von HES auf die Blutgerinnung von der infundierten Menge abhängig. Bei einem Infusionsvolumen, das  $20 \text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  überschreitet, wurden Koagulopathien beobachtet (BALDASSARRE und VINCENT 1997). Die aktuellen Studien empfehlen bevorzugt niedermolekulare bis mittelmolekulare sowie mittelsubstituierte HES-Lösungen zur Volumentherapie.

#### **1.4 Struktur und Funktion von Thrombozyten**

Das hämostatische System, bestehend aus der plasmatischen Komponente, den Gerinnungsfaktoren und der zellulären Komponente, den Thrombozyten, schützt den Organismus, indem es bei Verletzungen zu einer effektiven Blutstillung beiträgt. Für diese Funktion ist sowohl eine quantitative Balance der Komponenten, als auch die qualitative Funktionsfähigkeit der Bestandteile erforderlich, wobei den Thrombozyten eine besondere Bedeutung zukommt (MUELLER-ECKHARDT et al. 1993).

Thrombozyten sind kernlose Zytoplasmafragmente der Megakaryozyten und so per definitionem keine Zellen. Trotz dieser Tatsache wird in der deutschsprachigen Literatur vorwiegend der Ausdruck „Thrombozyt“ anstelle des Synonyms „Blutplättchen“ verwendet. Die physiologische Thrombozytenzahl im peripheren Blut liegt zwischen 150.000 bis 400.000/ $\mu\text{l}$  und das durchschnittliche Volumen zwischen 5 und 10 fl pro Thrombozyt. Ungefähr 65 bis 90% der zirkulierenden Thrombozyten liegen scheibenförmig vor, mit einem Durchmesser von 1,5 bis 3,5  $\mu\text{m}$  und einer Dicke von 0,8 bis 1,2  $\mu\text{m}$ . Die Plasmamembran mit ihren assoziierten Strukturen ist Träger wichtiger Rezeptoren für die Thrombozytenadhäsion und -aggregation. Weiterhin enthält sie die für die Thrombozytenfunktion benötigten Enzyme, wie z.B. Adenosintriphosphatasen. Unter der

Zellmembran liegt der Bereich, der die Signalübertragung zwischen Rezeptor und Zellinnerem vermittelt. Über die Invagination der Plasmamembran in das offene kanalikuläre System besteht die Möglichkeit des Metabolitentransportes zwischen der Oberfläche und dem Thrombozyteninneren (MUELLER-ECKHARDT et al. 1993).

Die Hypothese, dass Thrombozyten durch unverletztes Endothel nicht aktiviert werden, ist auf die besonderen Eigenschaften der Glykokalix der Endothelzellmembran zurückzuführen, für die Thrombozyten keinen Rezeptor besitzen. Hinzu kommt, dass Endothelzellen Faktoren in das Gefäßlumen abgeben, die einer Plättchenaktivierung entgegenwirken (BAUER 1994). Bei einer Gefäßverletzung werden jedoch subendotheliale Strukturen, vor allem Kollagenfasern, freigelegt, an denen sich die Thrombozyten anlagern können (CLEMETSON 1995). Die Adhäsion von Thrombozyt und Gefäßwand erfolgt unter anderem mithilfe des von Willebrand-Faktors (vWF), ein von Endothelzellen und Thrombozyten gebildetes Protein (siehe Abbildung 1). Dieser Ligand interagiert mit seinem Hauptrezeptor, dem Glykoprotein GPIb-V-IX (CD42), das sich aus drei Untereinheiten zusammensetzt. Dem Komplex aus Thrombozyt und vWF wird in der ersten Phase der Blutgerinnung eine große Bedeutung beigemessen. Fehlt GPIb, ist die normale Adhäsion der Thrombozyten nicht mehr möglich, beispielsweise im Falle des Bernhard-Soulier-Syndroms, einer makrothrombozytären Thrombopathie (CLEMETSON und CLEMETSON 1995). Diese und andere Interaktionen sind bei der Induktion weiterer Signaltransduktionen innerhalb der Thrombozyten von essentieller Bedeutung; als Beispiel sei hier die thrombinabhängige Aktivierung genannt. Ermöglicht wird sie über Aktin-Bindungsproteine, die den GPIb-Komplex mit dem Thrombozytenskelett verbinden (LEFKOVITS et al. 1995). Die folgende Aktivierung der Thrombozyten wird durch verschiedene Agonisten unterstützt, wie z.B. Adenosindiphosphat, Thrombin und Adrenalin (CLEMETSON und CLEMETSON 1995).

Auf dem aktivierten Thrombozyten kommt es zu einer Konformitätsänderung bzw. zu einer Aktivierung des GPIIb-IIIa-Komplexes (CD41/61), der zur Familie der Adhäsionsrezeptoren, den sogenannten Integrinen, zählt. GPIIb (CD41) besteht aus einer großen  $\alpha$ - und einer kleineren  $\beta$ -Untereinheit. GPIIIa (CD61) ist eine einkettige Untereinheit, sein Rezeptor wird in der elektronendichten Granula und  $\alpha$ -Granula wie auch auf der

Oberfläche aller ruhenden und aktivierten Thrombozyten nachgewiesen (YOUSSEFIAN et al. 1997). Ein Thrombozyt trägt im Vergleich zu seinen anderen Oberflächenantigenen die relativ hohe Anzahl von ca. 50.000-80.000 GPIIb-IIIa-Komplexen auf seiner Oberfläche (70% aller Rezeptorenstrukturen), das entspricht ungefähr 1-2% seiner Gesamtproteine. Weitere 30% liegen als „verborgene“ GPIIb-IIIa-Komplexe zwischen der Membran des oberflächlichen kanalikulären Systems und in den  $\alpha$ -Granula des Zytoplasmas (PHILLIPS et al. 1988). Fehlt der GPIIb-IIIa-Komplex, kommt es zur Manifestation der Glanzmann-Thrombasthenie, einer hämorrhagischen Diathese, die bei normaler Thrombozytenkonzentration, aufgrund fehlender Thrombozytenaggregation, mit einer verlängerten Blutungszeit einhergeht (SHATTIL et al. 1985, PHILLIPS et al. 1988).

Auf aktivierten Thrombozyten hat der Komplex die Möglichkeit, eine Bindung zwischen verschiedenen „Adhäsionsproteinen“ einzugehen. Die Bindung an Fibronectin und vWF bewirkt die Thrombozytenadhäsion. Die Expression von Fibrinogenrezeptoren und die entsprechende Bindung von Fibrinogen erlaubt primär die Aggregation (SPANGENBERG et al. 1993, LEFKOVITS et al. 1995).

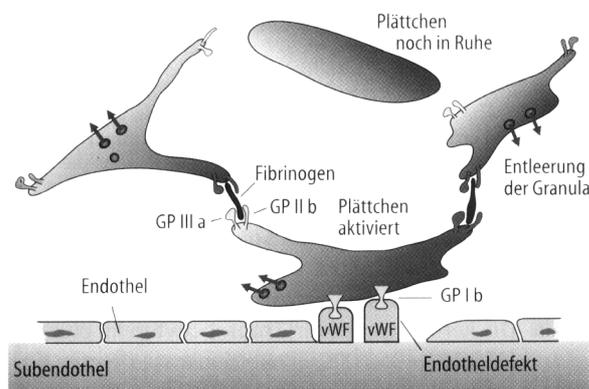


Abbildung 1: Entwicklung eines Thrombozytenpfropfes an einer verletzten Gefäßwand (Schmidt, Thews: Physiologie des Menschen, 26. Auflage, Seite 428)

Als weitere Reaktion der Thrombozyten auf Kontakt mit einem Agonisten kommt es zu einer Exozytose. Hierbei degranulieren zunächst die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Granula, nach einer Latenzzeit auch die lysosomalen Granula. Die Sekretion der Granula-Inhaltsstoffe ist an die Verfügbarkeit freier Kalziumionen gebunden und stellt einen energieabhängigen Prozess dar. Dieser ist das Ergebnis eines kombinierten Vorganges aus Kontraktion und Fusion der Granula. Die freigesetzten Substanzen, wie z.B. Adenosindiphosphat, nehmen bei der Sekretion lokal zu, was wiederum zu einer Aktivierung weiterer Thrombozyten führt. Während dieser Vorgänge werden aktivierungsabhängige Rezeptoren exprimiert, wie z.B. das P-Selektin (CD62p). Der Nachweis dieses Glykoproteins auf der Thrombozytenoberfläche mithilfe spezifischer monoklonaler Antikörper dient als Kriterium dafür, dass diese Zellen eine Sekretion bzw. Aktivierung durchlaufen haben (GUTENSOHN et al. 1996, 1997). Das P-Selektin ist in den  $\alpha$ -Granula ruhender Thrombozyten gespeichert, weiterhin findet es sich in Megakaryozyten und Endothelzellen (JOHNSTON et al. 1989). Die Funktion von CD62p ist weitgehend unbekannt, doch weiß man, dass es als Adhäsionsrezeptor die Interaktion zwischen aktivierten Thrombozyten vermitteln kann (LARSEN et al. 1989, LAWRENCE und SPRINGER 1991).

## 1.5 Ziel der Studie

Ziel der vorliegenden Arbeit war der Vergleich des Einflusses zweier Hydroxyethylstärkepräparationen (HES 6%, Mw 200/0,5 und HES 6%, Mw 130/0,4) auf die Thrombozytenaktivierung. Untersucht wurde als Hauptzielparameter die Antigenexpression verschiedener Glykoproteinrezeptoren auf der Thrombozytenzellmembran sowie die Thrombozytenaktivierung mittels quantitativer durchflusszytometrischer Messung mithilfe monoklonaler Antikörper. Dabei interessierte besonders, inwieweit sich die Thrombozytenaktivierung bei Patienten unter Volumensubstitution mit Hydroxyethylstärke mit dem mittleren Molekulargewicht von 200 kDa sowie 130 kDa unterscheiden. Ringerlösung bzw. NaCl 0,9% dienten als Kontrollsubstanzen.

Dabei sollte geklärt werden, ob HES 6% (130/0,4) durch den reduzierten Substitutionsgrad, seine veränderte C2/C6 ratio und durch eine engere Molekulargewichtsverteilung einen unterschiedlichen Einfluss auf die Thrombozytenaktivität hat als HES 6% (200/0,5).

Die Wirkung von HES auf die Thrombozytenaktivität sollte sowohl im Gesamtorganismus (*in vivo-Studie*) als auch isoliert und damit ohne Einfluss der im Organismus stattfindenden Vorgänge (*in vitro-Studie*) untersucht werden. Die klinischen Untersuchungen beschränkten sich auf den Einsatz bei Patienten, die sich einer radikalen Prostatektomie oder transvesikalen Prostataresektion unterzogen, das *in vitro*-Kollektiv bestand aus gesunden, männlichen Probanden.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Studiendesign**

Die Studie gliedert sich in zwei Teile. *In vitro* wurde durch Zugabe von NaCl oder zwei Hydroxyethylstärkelösungen (HES) zu den Thrombozyten gesunder Probanden die Antigenexpression auf der Thrombozytenoberfläche sowie die Aktivierung der Thrombozyten überprüft. Die HES unterschieden sich in Molekulargewicht und Substitutionsgrad: HES 6% 130/0,4 (Voluven<sup>®</sup>) und HES 6% 200/0,5 (HAES-Steril<sup>®</sup> 6%). Der *in vivo*-Teil, die klinische Studie, erfolgte als randomisierte Doppelblindstudie. Bei definierten Operationen wurde den Patienten als Volumenersatz entweder eines der beiden HES-Präparate oder Ringerlösung verabreicht. Auch hier wurde die Antigenexpression und Aktivierung von Thrombozyten untersucht. Die Studie wurde durch die Ethikkommission am Klinikum der Justus-Liebig-Universität Gießen genehmigt.

### **2.2 Studienteilnehmer**

Für die *in vitro*-Studie wurden zwölf männliche, gesunde Probanden rekrutiert, die sich freiwillig zur Verfügung stellten. Die mündliche Einwilligung über die einmalige Entnahme von 20 ml Blut lag vor. Die letzte Einnahme von Thrombozytenaggregationshemmern wie Acetylsalicylsäure lag zum Zeitpunkt der Untersuchung mindestens sieben Tage zurück.

An der *in vivo*-Studie nahmen 18 Männer teil. Alle Patienten wurden über Ziel und Ablauf der Studie detailliert aufgeklärt und genehmigten die Untersuchungen durch ihre schriftliche Einwilligung.

Es wurden nur Patienten ohne oder mit lediglich leichten Allgemeinerkrankungen ohne Leistungsminderung (American Society of Anesthesiologists = ASA Kategorie I und II) eingeschlossen, bei denen eine radikale Prostatektomie oder eine transvesikale Prostataresektion durchgeführt werden sollte. Als Narkosetechnik kam die Kombination aus Intubationsnarkose und Periduralanästhesie (PDA) zum Einsatz. 17 Patienten (94,4%) unterzogen sich einer radikalen Prostatektomie, ein Patient (5,6%) einer transvesikalen Prostataresektion.

Folgende Ausschlusskriterien wurden festgelegt:

- Systemerkrankung mit Leistungsminderung (ASA Kategorien größer als III)
- Gerinnungsstörungen
- Thrombozytopenien ( $<150.000/\mu\text{l}$ )
- Einnahme von Thrombozytenaggregationshemmern jeglicher Art in den letzten sieben Tagen vor der Operation.

## **2.3 Studienprotokoll**

### **2.3.1 In vitro-Studie**

Die Blutentnahme bei den gesunden Probanden erfolgte schonend mit großlumiger Kanüle (18 G) und geringer venöser Stauung mithilfe einer Blutdruckmanschette (40 mmHg) im Liegen, um eine Voraktivierung der Thrombozyten zu vermeiden. Es wurden vier Vollblutröhrchen à 5 ml Vollblut in Behälter mit einem selbstpräparierten Citrat/Glucose-Gemisch entnommen.

Zunächst wurde der Hämatokrit der jeweiligen Probe bestimmt. Anschließend erfolgte die Verdünnung der Blutproben auf einen einheitlichen Hämatokritwert von 30%. Zur Verdünnung diente plättchenarmes Plasma (ppp), das aus der Hämatokritprobe

abzentrifugiert wurde. Die drei verdünnten Blutröhrchen wurden nach der Einstellung des Hämatokrits mit NaCl, HES 130 (Voluven<sup>®</sup>) oder HES 200 (HAES-Steril<sup>®</sup>) inkubiert. Danach konnten die Thrombozyten isoliert werden, um sie mit den jeweiligen Antikörpern gegen die zu untersuchenden thrombozytären Antigene zu inkubieren. Anschließend wurde die Antigenexpression am Fluoreszenzdurchflusszytometer (FACS) gemessen und analysiert.

### 2.3.2 In vivo-Studie

Die Patienten wurden mit 7,5 mg Midazolam eine halbe Stunde vor Operationsabruf prämediziert. Nach Einschleusen der Patienten wurde das Monitoring, bestehend aus einem 5-Kanal-EKG, einer automatischen Blutdruckmanschette und einem Fingerclip zur kontinuierlichen Messung der peripheren Sauerstoffsättigung, etabliert. Nach Legen eines großlumigen venösen Zugangs erfolgte die Anlage eines Periduralkatheters auf Höhe der Zwischenwirbelräume L3/4 oder L2/3. Eine Testdosis von 5 ml Carbostesin 0,5% wurde injiziert, um die korrekte Lage des Katheters zu überprüfen. Anschließend leitete der zuständige Anästhesist die Narkose intravenös ein, wobei als Analgetikum Fentanyl, als Hypnotikum Thiopental und als Muskelrelaxantien Succinylcholin zur Einleitung und nach Intubation Vecuronium in bedarfsadaptierter Dosierung Verwendung fanden. Danach wurden ein arterieller Zugang sowie ein zentralvenöser Katheter (ZVK) gelegt (entweder ein 1-lumiger peripherer ZVK Certofix 375 in die Vena basilica eines Armes oder ein 3-lumiger ZVK 7 F in die Vena jugularis interna rechts). Die Narkose hielt der zuständige Anästhesist mit Isofluran und Lachgas aufrecht, ergänzt durch Repetitionsdosen von Fentanyl und Vecuronium. Die Beatmung während der Narkose orientierte sich am Zielwert 200-250 mmHg für den arteriellen Sauerstoffpartialdruck ( $p_aO_2$ ) und 40 mmHg für den arteriellen Kohlendioxidpartialdruck ( $p_aCO_2$ ). Das intraoperative Monitoring umfasste die Kontrolle des Elektrokardiogramms und der Pulsoxymetrie, die direkte arterielle Blutdruckmessung, die Messung des zentralen Venendruckes sowie wiederholte Messungen des Hämatokrits und der arteriellen Blutgase.

Nach der Narkoseeinleitung (vor periduraler Applikation der Wirkdosis des Lokalanästhetikums) erfolgte die Blutentnahme von 5 ml Vollblut von den Patienten zur Bestimmung der thrombozytären Adhäsionsmoleküle als „Leerwert“ (t1) sowie von 10 ml Vollblut zur Herstellung von plättchenreichem Plasma (PRP). Danach applizierte der zuständige Anästhesist die Wirkdosis (10 ml bis 15 ml Carbostesin 0,5%) peridural. Je nach Gruppe wurde ein Volumenausgleich mit 1000 ml des entsprechenden HES-Präparates bzw. mit 2000 ml Ringerlösung in der Kontrollgruppe durchgeführt. Im Anschluss an den Volumenausgleich erfolgte eine erneute Blutentnahme (t2). Die letzte Blutentnahme wurde vier Stunden nach der Hautnaht durchgeführt (t3; siehe Abbildung 2).

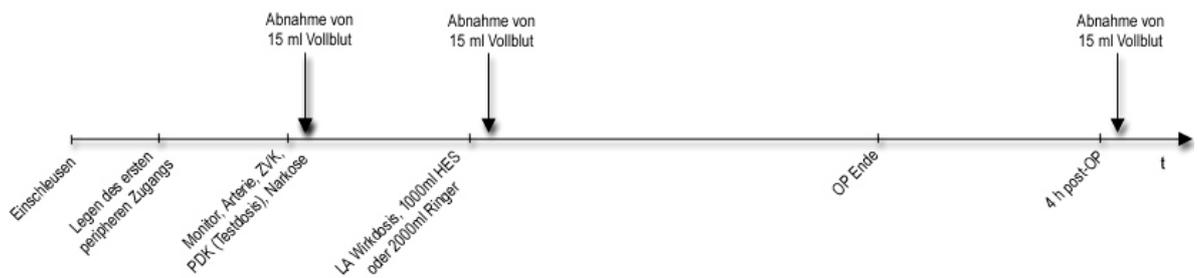


Abbildung 2: Schema der Probenentnahmen bei der *in vivo*-Studie (LA = Lokalanästhetikum)

## **2.4 Analyse der Blutproben**

### 2.4.1 Verwendete Lösungen

#### Phosphat Buffered Saline (PBS)-Puffer-Lösung

50 ml PBS-Konzentrat wurden mit 450 ml Wasser im Erlenmeyerkolben mittels Magnetrührer so lange verrührt, bis eine einphasige Lösung entstand. Nach Zugabe von 1 g Bovinem Serum Albumin war die Lösung gebrauchsfertig und lagerte maximal 6 Wochen im Kühlschrank.

#### Formaldehyd-Fixierlösung (1,19%ig)

30 ml PBS-Konzentrat wurden mit 270 ml Wasser im Erlenmeyerkolben mittels Magnetrührer verrührt, bis eine einphasige Lösung entstand. Nach Zugabe von 10 ml 37%iger Formaldehydlösung war die Lösung gebrauchsfertig und wurde unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur maximal 4 Wochen gelagert.

#### Röhrchen zur Blutentnahme mit einem Citrat/Glucose-Gemisch

Es wurden in einer Spritze 1,5 ml Citratlösung und 1,5 ml Glucoselösung aufgezogen und durchmischt. Pro Proband wurden vier 5 ml Röhrchen mit jeweils 0,75 ml dieses Gemisches bestückt.

### 2.4.1.1 Probenaufbereitung

#### 2.4.1.1.1 *In vitro*-Studie

Zunächst erfolgte die Messung des Hämatokrits (mittels Blutbildautomaten) mit Blut aus einem der vier Blutentnahmeröhrchen. Dieses Röhrchen wurden nach der Hämatokritbestimmung zentrifugiert (5 Minuten bei 3000 Umdrehungen/Minute), um plättchenarmes Plasma (PPP) zur Verdünnung der verbleibenden drei Blutproben zu gewinnen.

Die Verdünnung der Blutproben erfolgte auf einen einheitlichen Wert von 30%. Zur Berechnung der Menge an PPP, die zur Verdünnung nötig war, diente folgende Formel:

$$\text{Benötigte Menge PPP} = \frac{\text{Hämatokrit Ist}}{\text{Hämatokrit Soll (hier 30)}} - 1 * \text{Volumen der Blutprobe (hier 5 ml)}$$

Anschließend wurde das verdünnte Blut mit der jeweiligen Infusionslösung inkubiert. Die Menge der Inkubationslösung errechnete sich nach der Formel:

$$\text{Volumen} = \frac{\text{Hämatokrit Ist (hier 30)}}{\text{Hämatokrit Soll (hier 20)}} - 1 * \text{Volumen der Blutprobe}$$

$$\text{Volumen} = 0,5 * \text{Volumen der Blutprobe}$$

Anschließend erfolgte die Inkubation der drei Proben im Brutschrank bei 37° C für eine halbe Stunde. Die Proben wurden möglichst zeitnah in je 5 ml der vorbereiteten

Formaldehydlösung (vorgelegt in 10 ml Polystyrol-Reagenzgläsern) gegeben, vorsichtig umgeschwenkt und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation erfolgte die Zentrifugation der Proben bei 750 U/Minute für 10 Minuten (ohne Bremse). Etwa 1 ml plättchenreiches Plasma (PRP) wurde mit einer Transferpipette aus dem mittleren Bereich des Überstandes entnommen und in ein weiteres Reagenzglas überführt.

Nach der Bestimmung des Thrombozytengehaltes am Blutbildautomaten (Celltrak 11,12; Fa. Nova biomedical) wurde die Probe mit dem vorbereiteten PBS-Puffer auf 40.000 Thrombozyten/ $\mu$ l verdünnt.

Für jede Probe wurden 700  $\mu$ l Gesamtvolumen (bei 40.000 Thrombozyten/ $\mu$ l) benötigt. Die hierfür benötigte Menge des vorliegenden PRP berechnete sich wie folgt:

$$\text{Benötigte Menge PRP} = \frac{700\mu\text{l} * 40000 \text{ Thrombozyten pro ml}}{\text{Anzahl der gemessenen Thrombozyten pro ml}}$$

Die berechnete Menge wurde mit einer Mikroliterpipette entnommen und im Reagenzglas mit der vorbereiteten PBS-Puffer-Lösung auf 700  $\mu$ l aufgefüllt. Je 20  $\mu$ l dieses Ansatzes wurden mit je 20  $\mu$ l einer der Antikörperlösungen (konjugiert sowie unkonjugiert) in die Teströhrchen pipettiert. Der analoge Ansatz einer unkonjugierten Probe wurde zum Zweck der Negativkontrolle angesetzt. Um eine vollständige Vermischung der Antikörper mit dem Thrombozyten-PBS-Puffer-Gemisch zu erreichen, wurde die Lösung mehrfach mit der Pipettenspitze durchmischt. Nach zehnmütiger Inkubation bei Raumtemperatur und unter Lichtausschluss wurde jeweils 1 ml des vorbereiteten PBS-Puffers zugegeben. Die Teströhrchen wurden abschließend für mindestens zwölf Stunden unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur inkubiert, bevor sie am Fluoreszenzdurchflusszytometer (FACS) gemessen wurden.

#### 2.4.1.1.2 *In vivo*-Studie

Die venösen Blutproben der Patienten wurden analog zu denen der Probanden aufbereitet. Allerdings waren hier die Schritte zur Homogenisierung der Proben sowie zur Inkubation mit den einzelnen Infusionslösungen überflüssig. Die Verarbeitung der Blutproben begann mit der Fixierung der Proben in der vorbereiteten Formaldehydlösung. Danach wurde PRP zentrifugiert und die Thrombozytenzahl bestimmt. Alle weiteren Schritte sind Kapitel 2.4.1.1.1. zu entnehmen.

#### 2.4.1.2 *Messung der Thrombozyten am Cellcounter*

Zur quantitativen Analyse der Thrombozyten wurde ein Celltrak 12 (Nova) Analysator verwendet. Dieses Gerät benutzt Änderungen der elektrischen Leitfähigkeit für die Zählung und die Größenbestimmung von Zellen. Die Zellen sind in einer isotonischen leitfähigen Lösung suspendiert und ein definiertes Volumen dieser Lösung wird durch eine Messapparatur, die sich zwischen zwei Elektroden befindet, gesogen. Wenn elektrischer Strom durch die Lösung geleitet wird, kann eine konstante Leitfähigkeit gemessen werden. Sobald eine elektrisch schlechter leitende Zelle diese Apparatur durchquert, entsteht ein elektrischer Impuls, der elektronisch gezählt wird. Die Anzahl der Impulse ist proportional zu der Größe der Zellen.

Die Impulse der Thrombozyten werden während der Erythrozytenmessung erfasst, die Anzahl der Thrombozyten wird dabei aus dem Histogramm abgeleitet. Um die Signale zwischen Thrombozyten und Erythrozyten unterscheiden zu können, wird für die Thrombozytenzählung sowohl ein unterer als auch ein oberer Grenzwert festgelegt. Die untere Grenze trennt kleinste Verunreinigungen von den Thrombozyten ab, während die obere Grenze die Thrombozyten von den Erythrozyten separiert. Um auch bei einer geringen Thrombozytenanzahl die korrekte Zählung sicherzustellen, wird bei weniger als 40.000 Thrombozyten die Messzeit um 15 Sekunden verlängert. Die einzelnen erfassten Impulse

werden in insgesamt 256 größenabhängigen Kanälen digitalisiert und gespeichert. Nach der Zählphase wird das erfasste Histogramm mathematisch geglättet und es wird überprüft, ob ein Maximum und zwei Minima vorhanden sind. Das Histogramm wird nun in einem Bereich von 0 bis 35 fl in eine logarithmische Verteilungskurve umgerechnet.

### *2.4.1.3 Messung thrombozytärer Oberflächenantigene mittels Durchflusszytometrie*

#### 2.4.1.3.1 Grundprinzip

Die Messung der Thrombozytenantigene erfolgte an dem Fluoreszenzdurchflusszytometer (FACS) „FacsCalibur“ der Firma Becton & Dickinson. Für die Messung mit dem FACS muss die zu messende Probe in Form einer Einzellsuspension mit einer Konzentration von 0,5 bis 20 Millionen Zellen pro Milliliter vorliegen. Die Zellsuspension wird über eine Stahlkapillare durch Überdruck in die aus Quarzsand bestehende Messküvette eingeführt. Die Zellen passieren, von einem Hüllstrom umgeben, den Laserschnittpunkt. Der Hüllstrom stabilisiert den Probenstrom im Zentrum der Messküvette und verengt ihn so, dass die Zellen hintereinander einzeln zum Analysepunkt gelangen (siehe Abbildung 3).

Trifft ein Lichtstrahl auf eine Zelle, wird die Richtung, aber nicht die Wellenlänge des Lichtes verändert. Sobald der Laserstrahl auf eine Zelle trifft, entsteht also Lichtstreuung (HOLME und HEATON 1988). Jede Störung des gradlinig laufenden Laserlichts wird als „Event“ bezeichnet. Das Licht wird nicht in alle Richtungen gleichzeitig gestreut; der größte Anteil des Lichts wird in die Vorwärtsrichtung reflektiert, d.h., entlang des einfallenden Lichtstrahls und wird somit als Vorwärtsstreulicht bezeichnet. Es ist überwiegend ein Maß für die Zellgröße, d.h., kleine Zellen streuen weniger Licht. Das Ausmaß des im rechten Winkel zum einfallenden Lichtstrahl gestreuten Lichtes hängt hauptsächlich von der Zelldichte sowie der Granularität und nur zum Teil von der Zellgröße ab.

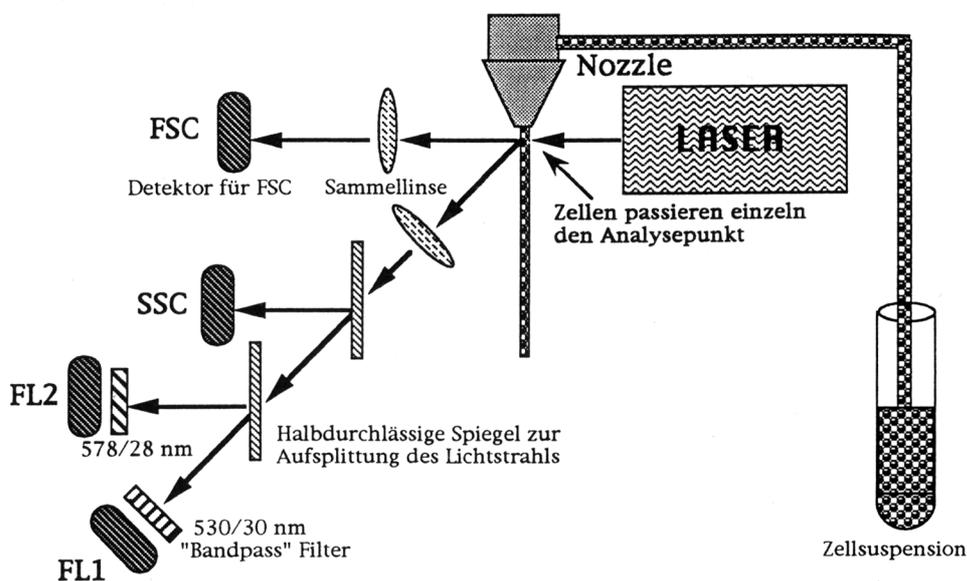


Abbildung 3: Schematischer Aufbau des Fluoreszenzdurchflusszytometers ( HUBER und LÖFFLER 1994): Zellen werden über eine Stahlkapillare zum Laserschnittpunkt geführt. Je nach Zellgröße und Zelldichte wird das Licht entweder in Vorwärtsrichtung oder Seitwärtsrichtung gestreut. Fluoreszierende Verbindungen emittieren langwelliges Licht (FL 1, FL 2). Detektoren messen das auftreffende Licht und wandeln es in ein elektronisches Signal um (Nozzle = Düse).

Fluoreszierende Verbindungen absorbieren Lichtenergie über einen weiten, für sie charakteristischen, Wellenlängenbereich (Absorptionsspektrum) und emittieren langwelliges Licht (Emissionsspektrum). Normalerweise sollte das gebildete Fluoreszenzsignal proportional zur Farbstoffmenge sein. Dazu ist für einen definierten Farbstoff eine geeignete Anregungswelle notwendig. In der analytischen Durchflusszytometrie werden überwiegend luftgekühlte Argon-Ionenlaser verwendet, die einen Lichtstrahl mit einer Wellenlänge von 488 nm generieren. Somit sind für Fluoreszenzmarkierungen alle Farbstoffe geeignet, die von 488 nm angeregt werden können (HUBER und LÖFFLER 1994). In dieser Studie wurden Fluoresceinisothiocyanat (FITC) und Phycoerythrin (PE) für Immunfluoreszenz als Farbstoffe eingesetzt.

Sobald eine Zelle den Laserschnittpunkt passiert, wird das Streulicht und das emittierte Fluoreszenzlicht mittels Detektoren gemessen, in ein elektronisches Signal umgewandelt, verstärkt und am Computer sichtbar gemacht.

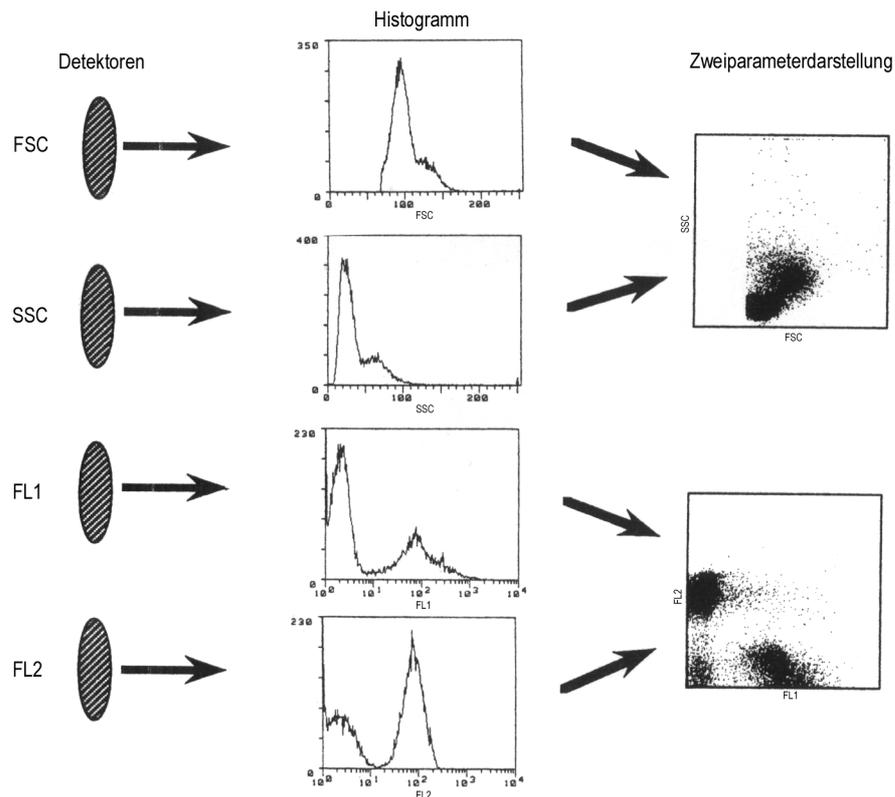


Abbildung 4: Elektronische Verstärkung der Detektorsignale und Darstellung als Histogramm oder Dot Plot ( HUBER und LÖFFLER 1994).

Die „Events“ werden anhand der Höhe des Analogpulses (in Volt) erfasst. Wenn man annimmt, dass diese Pulshöhe zwischen 0,00 und 10,24 Volt liegt und die Unterteilung zur Messung in 0,01-Schritten erfolgt, errechnet man einen Bereich von 1025 Intensitätsstufen, die man auch als Kanäle bezeichnet. Wird ein „Event“ mit einem bestimmten Spannungspuls gemessen, fällt ein Wert in den entsprechenden Kanal.

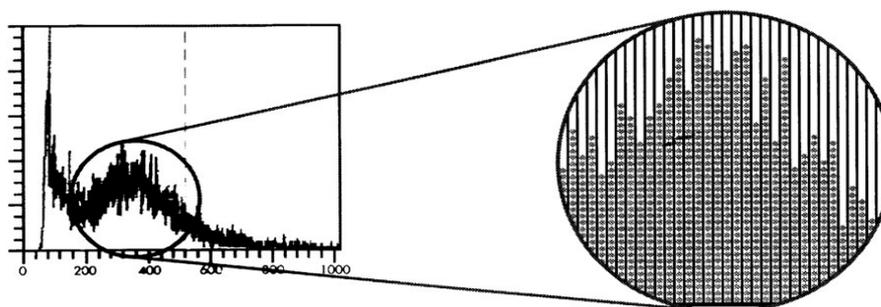


Abbildung 5: Prinzip der Kurvenerstellung von gemessenen Events (LANGEFELD 2000)

Neben der Charakterisierung der Zelleigenschaften durch die Messung des Vorwärts- und Seitwärtsstreulichtes können gleichzeitig mittels fluoreszierender Substanzen sichtbar gemachte Merkmale der Zellen gemessen werden. Fluoreszenz 1 (FL 1) erlaubt die Messung grüner Fluoreszenz (Wellenlänge ca. 520 nm). Antigene können zum Beispiel mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC) markiert und somit sichtbar gemacht werden. Fluoreszenz 2 (FL 2) kann orangefarbene Fluoreszenz messen (Wellenlänge ca. 580 nm), beispielsweise mit Phycoerythrin (PE) markierte Antigene (HUBER und LÖFFLER 1994).

Mittels Datenverarbeitung wird die Aufnahme auf bestimmte Zellpopulationen beschränkt und diese später selektiv analysiert. Dies erfolgt über die Einstellung der Grenzwerte für die Zellgrößen und durch elektronische Korrektur bei leicht überlappenden Emissionsspektren, z.B. klarere Differenzierung der PE-markierten von den FITC-markierten Zellen. Die gewonnenen Daten können entweder als Histogramm oder als Punktdiagramm dargestellt werden.

Im Gegensatz zur Messung von anderen korpuskulären Blutelementen bietet die durchflusszytometrische Untersuchung von Thrombozyten einige Besonderheiten. Beispielsweise reagieren Thrombozyten während der Blutentnahme und der Probenvorbereitung vergleichsweise empfindlich auf Voraktivierung. Darüber hinaus sind

die Zellen relativ klein und die Streulichteigenschaften sind häufig schwer von Rauschimpulsen zu unterscheiden (Abbildung 6, TSCHÖPE 1992). Entsprechend ist die Intensität der Lichtemission von markierten Thrombozyten gering. Grundsätzlich lassen sie sich jedoch an einen Fluoreszenzfarbstoff gebunden nachweisen (HAYASHI et al. 1986).

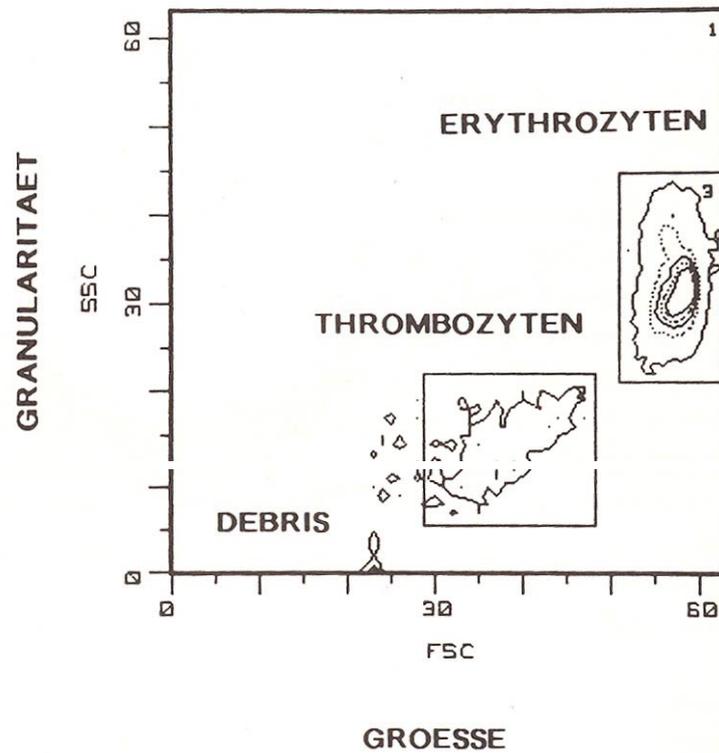


Abbildung 6: Zweidimensionale Umrisskarte von Debrisignalen, nativen Thrombozyten und Erythrozyten im Vollblut, aufgetrennt nach Größe (Vorwärtsstreuung) und Granularität (Seitwärtsstreuung, TSCHÖPE 1992)

#### 2.4.1.3.2 Vorgehen in dieser Studie

Die vorbereiteten Proben (fluoreszierender Antikörperansatz sowie nicht fluoreszierende Maus-IgG-Isotyp-Kontrolle zum Zweck der Negativkontrolle) wurden nach Inkubation von mindestens 12 Stunden mit einem Fluoreszenzdurchflusszytometer der Firma Becton & Dickinson (Heidelberg) gemessen und mit der Cellquest Software (ebenfalls von der Firma Becton & Dickinson Heidelberg, Version 1.2.2. Seriennummer C10CBCH83WLP) mithilfe eines Macintosh PCs analysiert. Vor der eigentlichen Analyse erfolgte die für die Durchflusszytometrie übliche Einstellung des Gerätes unter Eingrenzung der Thrombozyten anhand ihrer Größe und Granularität sowie die Einstellung des Durchflusszytometers mit fluoreszierenden Kunststoffbeads (Calibrite<sup>®</sup>, Becton Dickinson) aufgrund täglicher Schwankungen der Laserleistung. Anschließend erfolgte die Analyse der Proben, hierbei wurden mindestens 10.000 Zellen pro Probe aufgenommen und für spätere Analysen bezüglich der Dichte und prozentualer Häufigkeit des Oberflächenantigens mithilfe des Cellquest Programms gespeichert. Zunächst wurden über ein FSC-/SSC-Dot Plot die Thrombozyten dargestellt. Um Zelldebris und Rauschsignale auszuschließen, wurde ein Schwellenwert (threshold) eingestellt. Außerdem war es durch Setzen einer entsprechenden Begrenzung (gate) möglich nur Ereignisse zu berücksichtigen, die Thrombozyten darstellten. Da sowohl Thrombozyten als auch monoklonale Antikörper eine unspezifische Eigenfluoreszenz besitzen, ist es bei der Untersuchung erforderlich, die unspezifische Fluoreszenz (Negativkontrolle) in die Auswertung mit einzubeziehen. Dies geschah mithilfe einer so genannten Isotyp-Kontrolle. Bei der Isotyp-Kontrolle handelt es sich um einen nicht fluoreszenzmarkierten Antikörper, der an das entsprechende Antigen (z.B. Oberflächenmarker oder Rezeptor) auf den Thrombozyten gebunden wird. Die vom Durchflusszytometer gemessene „Eigenfluoreszenz des Thrombozyts mit dem gebundenen Antikörper“ ist die Negativkontrolle und wird auch als cut off bezeichnet. Als ein „positives“ Ereignis galt jedes Fluoreszenzsignal, das höher als die Fluoreszenz der Isotyp-Kontrolle lag. Die Auswertung erfolgte so, dass die für die Antigenstruktur spezifische Fluoreszenz mit der Fluoreszenz der Negativkontrolle in einem Histogramm überlagert und subtrahiert wurde (Schwellenwert >97% der Thrombozytenereignisse), d.h. der cut off wurde von der gemessenen Probe abgezogen. Dieses Prinzip wurde sowohl bei der Messung des Anteils an fluoreszierenden

Thrombozyten als auch bei der Messung der Antigendichte der untersuchten Oberflächenglykoproteine angewendet.

Für die Darstellung der Ergebnisse wurden der Geo Mean zur Bestimmung der Antigendichte sowie der Wert „% Gated“ zur Bestimmung des Anteils der fluoreszierenden Thrombozyten herangezogen.

Das Gerät war mit einem Argonlaser der Wellenlänge 488 nm ausgestattet. Die FITC-Fluoreszenz wurde mit einem 530/30, die PE-Fluoreszenz mit einem 585/42 Breitbandfilter bestimmt. Verwendet wurden monoklonale mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC) markierte Antikörper gegen CD9, CD36, CD41, CD42a, CD42b, CD49b, CD49e, CD61p, CD62 (Firma Immunotech, Marseille, Frankreich). Ebenso standen monoklonale mit Phycoerythrin (PE) markierte Antikörper gegen CD31, CD41, Thrombospondin, Thrombin-S und Thrombin-W zur Verfügung.



Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch
All	0, 1023	9639	100.00	96.39	97.33	67.22	73.81	90.00	12
M1	0, 41	2785	28.89	27.85	19.17	17.50	46.46	14.00	12
M2	41, 341	6888	71.46	68.88	127.01	114.71	42.84	123.00	57
M3	341, 1023	18	0.19	0.18	669.39	652.34	20.55	721.00	743



Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch
All	0, 1023	9808	100.00	98.08	659.97	655.10	9.67	657.00	651
M1	0, 41	6	0.06	0.06	22.33	20.58	45.10	23.00	23
M2	41, 341	51	0.52	0.51	214.86	198.63	34.49	226.00	236
M3	341, 1023	9751	99.42	97.51	662.70	660.60	7.95	658.00	651

Abbildung 7: Darstellung einer durchflusszytometrischen Thrombozytenmessung am Beispiel der Markierung mit CD42b: Oben zu sehen die Negativkontrolle mit dem unkonjugierten, nicht fluoreszierenden Antikörper. Unten die analoge Messung mit fluoreszierendem CD42b. Links sind die Dot-Plots in logarithmischer Skalierung, rechts die dazugehörigen Histogramme dargestellt. Die Auswertung erfolgt durch Setzen der Marker 1 - 3: Die Negativkontrolle wurde der eigentlichen Messung überlagert und subtrahiert (>97% der Thrombozytenereignisse), sodass nur die eigentliche Fluoreszenz und nicht die Eigenfluoreszenz der Thrombozyten gemessen wurde.

## 2.4.2 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie bietet sich zur Untersuchung der Antigenalteration an Thrombozyten an. Bis vor wenigen Jahren war sie ausschließlich in der Grundlagenforschung vertreten. Zu einer weiten Verbreitung in der klinischen Routine kam es durch Optimierungen auf dem Gebiet der Herstellung monoklonaler Antikörper, durch die Entdeckung geeigneter Fluoreszenzfarbstoffe sowie durch die Verbesserung der Zytometer, verbunden mit einer einfacheren Gerätebedienung (ECKHARDT 1994, SCHMIDT 1994).

### *2.4.2.1 Monoklonale Antikörper*

Die monoklonalen Antikörper wurden von KÖHLER und MILSTEIN entwickelt, die dafür den Nobelpreis für Medizin erhielten (KÖHLER und MILSTEIN 1975). Das von ihnen etablierte Verfahren ermöglicht es, gegen nahezu jedes Antigen monoklonale Antikörper zu produzieren. Der Medizin und anderen Bereichen der Diagnostik wurden dadurch neue Möglichkeiten eröffnet, die den bis dahin konventionellen Nachweismethoden nicht zur Verfügung standen (ERNST 1987).

Die Herstellung monoklonaler Antikörper erfolgt mittels Hybridomtechnik. Hierzu werden Lymphozyten aus der Milz einer immunisierten Maus isoliert und mit Myelomzellen fusioniert. Durch Zusatz von Polyethylenglycol (PEG) wird die Zahl der Fusionen erhöht. Die entstehenden Hybridome sind im Gegensatz zu den Lymphozyten potentiell unsterblich. Um nur die Hybridome zu gewinnen, wird für längere Zeit in einer Primärkultur mit HAT-Medium (Hypoxanthin, Aminopterin, Thymidin) inkubiert. Aminopterin blockiert die endogene Purinbiosynthese. Die Myelomzellen, denen im Gegensatz zu den Milzzellen das Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase-Enzym fehlt, können kein exogenes Hypoxanthin

zur Purinsynthese verwenden und sterben ab. Die Milzzellen unterliegen nach 1-2 Wochen dem natürlichen Zelltod. So verbleiben in der Kultur nur die Hybridome, weil sie über die autonome Zellproliferation der Myelomzellen und das HPRT-Enzym (Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase) der Milzzellen verfügen (PETRIGES 1990). Da von den Hybridomen nur einige wenige auch Antikörper bilden, müssen diese durch Verdünnung vereinzelt und anschließend durch Klonierung vermehrt werden. Unter diesen kann ein Klon, der Antikörper mit möglichst hoher Spezifität gegen das gesuchte Antigen produziert, ausgewählt werden (STEWART und MALE 1995).

Nach der Etablierung dieses Verfahrens entstanden viele nebeneinander existierende Nomenklaturen von Antikörpern, bedingt durch die Entwicklung verschiedener Labore und kommerzieller Hersteller. Um die Vielfalt der Reagenzien zu systematisieren, werden seit 1980 regelmäßig internationale Workshops abgehalten. Monoklonale Antikörper, die das gleiche Zelloberflächenantigen erkennen, wurden zu sogenannten „Clusters of differentiation“ (CD) zusammengefasst (BERNARD et al. 1984). Nach der CD-Klassifizierung folgen die typischen Zellpopulationen und das Molekulargewicht des spezifischen Antigens in Kilodalton (kDa), die voranstehenden Buchstaben p (protein), gp (glycoprotein), gl (glycolipid), CHO (carbohydrate) oder u (unknown) beschreiben das Antigen. Vorläufige Cluster-Definitionen werden als „CDw“ gekennzeichnet.

Im klinischen Sprachgebrauch wird diese Nomenklatur allerdings nicht durchgängig verwendet.

Folgende Synonyme sind gebräuchlich (METCALFE et al. 2003):

- CD9: MRP1
- CD31: GPIIa, PECAM-1
- CD36: GPIV, GPIIb
- CD41: GPIIb

- CD42a/b: GPIX/ GPIb
- CD49b/49e: GPIa/IIa
- CD61: GPIIIa
- CD62p: P-Selektin, PADGEM

Das Hauptanwendungsgebiet monoklonaler Antikörper findet sich in der Immunfluoreszenztechnik, hier werden sie unter anderem zur Markierung von Zelloberflächenstrukturen eingesetzt, indem werden sie entweder direkt oder indirekt an einen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt werden. Bei der indirekten Markierung wird ein zweiter monoklonaler Antikörper, der gegen den ersten Antikörper gerichtet ist, zur Immunfluoreszenzmarkierung benötigt. Vorteil der direkten Färbung ist eine schnelle und einfache Durchführung. Ein Nachteil besteht allerdings in der unter Umständen nicht ausreichenden Fluorochromkonjugation für den Nachweis schwach exprimierter Antigenstrukturen. Im Routinelabor häufig verwendete Farbstoffe sind Phycoerythrin (PE) mit einer Fluoreszenz im roten Bereich (578 nm) des sichtbaren Lichtes sowie Fluoresceinisothiocyanat (FITC) mit einer Fluoreszenz im grünen Bereich (525 nm), die beide mit dem Argonlaser angeregt werden können. Weiterhin ist bei der Wahl der Farbstoffkombinationen auf die relative Sensitivität der Fluorochrome zu achten. Da PE eine zehnfach höhere Empfindlichkeit als z.B. FITC aufweist, empfiehlt es sich, für schwach exprimierte Antigenstrukturen PE-konjugierte Antikörper einzusetzen (RAFFAEL et al. 1994).

### *2.4.2.2 Antigenexpression bei Thrombozyten*

Aktivierte Thrombozyten tragen nach dem Formwandel andere Thrombozytenmembranproteine (Glykoproteine bzw. Glykoproteinrezeptoren) auf ihrer Membran als die nicht-aktivierten Thrombozyten.

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchflusszytometrisch mit monoklonalen Antikörpern markierten Thrombozytenmembranproteine sind das CD9, CD31, CD36, CD41, CD42a/42b, CD61, CD62p, CD49b/49e, Thrombin-S und-W sowie Thrombospondin (TSP).

#### *2.4.2.2.1 CD9*

CD9, welches auch als MRP1 bezeichnet wird, überträgt die Signale, die für die Zelladhäsion notwendig sind und ist neben der Expression auf Thrombozyten unter anderem auch auf der Oberfläche von Endothelzellen, B-Zellen und T-Zellen zu finden. CD9 triggert die Plättchenaktivierung und -aggregation, die von dem Membranprotein CD32 blockiert wird.

#### *2.4.2.2.2 CD31*

Das CD31-Antigen wird auch Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1 (PECAM-1) oder Glykoprotein IIa genannt. Es ist exprimiert auf der Oberfläche von Thrombozyten, Endothelzellen, Monozyten, Granulozyten, B-Zellen und einer T-Zell-Untereinheit. Es wird beschrieben als endotheliales Adhäsionsmolekül, eine enzymatische Aktivität ist bislang nicht bekannt.

#### 2.4.2.2.3 CD36

Dieses Antigen beschreibt das Glykoprotein GPIV oder GPIIIb, das vielfältige Eigenschaften besitzt. Es agiert als Zelladhäsionsmolekül bei der Plättchenadhäsion und -aggregation. Der Antikörper bindet fetale, aber keine adulten Erythrozyten. Er reagiert sowohl mit fetalen als auch mit adulten Monozyten, Megakaryozyten, Thrombozyten und Retikulozyten.

#### 2.4.2.2.4 CD41/61

Dieses Antigen wird auch als GPIIb/IIIa-Komplex bezeichnet. Der GPIIb/IIIa-Komplex ist eines der bedeutendsten Glykoproteine auf der Thrombozytenoberfläche. Beim letzten Schritt der Thrombozytenaggregation erfolgt eine kalziumabhängige Änderung in der Konformation des GPIIb/IIIa-Komplexes, wobei Bindungen mit Fibrinogen eingegangen werden und Thrombozyten miteinander interagieren können (PHILLIPS et al. 1988). Der Komplex verbindet sich mit Thrombospondin, Fibronectin, Vitronectin und vWF, der sich in Folge mit Kollagen zusammenschließen kann. Aufgrund seiner Fähigkeit, mit multiplen Proteinen zu interagieren, ist GPIIb/IIIa essentiell für die Fixierung und Ausbreitung von aktivierten Plättchen am Subendothel. Seine vielfältigen Eigenschaften machen GPIIb/IIIa zu einem aussagekräftigen „Zielantigen“ für die Erforschung der Thrombozytenfunktion.

#### 2.4.2.2.5 CD42a/42b

Das Antigen wird auch als GPIb/V/IX-Komplex bezeichnet, wobei GPIb CD42b entspricht und GPIX CD42a. Der GPIb/V/IX-Komplex ist neben dem GPIIb/IIIa-Komplex das wichtigste bis heute bekannte Membran-Glykoprotein der Thrombozyten. Das Glykoprotein vermittelt die Thrombozytenadhäsion durch eine Interaktion mit dem subendothelialen vWF.

#### 2.4.2.2.6 CD62p

Antigene, die bei aktivierten Thrombozyten in einem anderen quantitativen Verhältnis nachweisbar sind als bei nicht-aktivierten Thrombozyten, werden als Aktivierungsantigene bezeichnet (CD62p ist ein solches Aktivierungsantigen und kann mit dem Durchflusszytometer leicht nachgewiesen werden). Synonym findet man die Bezeichnungen PADGEM („Platelet Activation Dependent Granule to External Membrane Protein“) (BERMAN et al. 1989) und P-Selektin (Plättchen-Selektin). CD62l bezeichnet ein Protein auf Leukozyten, CD62e ist ein Protein auf Endothelzellen, beide unterscheiden sich von CD62p (LEFER et al. 1994). CD62p gehört zur Familie der Selektine (MCEVER 1991, JOHNSTON et al. 1989), das sind Rezeptoren, die Zell-zu-Zellkontakte vermitteln. CD62p ist Bestandteil der Membranen von  $\alpha$ -Granula und wird nachweisbar, wenn Thrombozyten degranulieren und dabei die  $\alpha$ -Granula-Membranen mit der Thrombozytenoberfläche fusionieren (BERMAN et al. 1986, MCEVER et al. 1984). Die physiologische Funktion von CD62p konnte bisher nicht vollständig definiert werden. CD62p ist möglicherweise einer von mehreren Faktoren, welche die Adhäsion von Monozyten und Granulozyten an Thrombozyten und Endothelzellen im Bereich einer Gewebsverletzung oder Entzündung vermitteln (LÖSCHE et al. 1996, MCEVER 1991). Allerdings konnte bisher nicht bewiesen werden, dass CD62p einen direkten, fördernden Effekt auf die Gerinnungsbildung hat (HERNANDEZ et al. 1997). Neben der membranständigen Form findet man im Plasma gelöstes CD62p (MCEVER 1991, JOHNSTON et al. 1989), das im Rahmen von Aktivierungsprozessen freigesetzt wird (BLANN et al. 1997). Gelöstes CD62p interferiert nicht mit der Messung CD62p-positiver Thrombozyten am Zytometer.

#### 2.4.2.2.7 CD49b/49e

Diese Oberflächenrezeptoren werden auch als GPIa/IIa-Komplex oder als Kollagenrezeptor bezeichnet. Die Thrombozytenadhäsion an das Kollagen spielt eine Schlüsselrolle während der primären Hämostase. Hierbei kommt dem GPIa/IIa-Komplex als Bindeglied zwischen Thrombozyten und Kollagen besondere Bedeutung zu.

#### 2.4.2.2.8 Thrombinrezeptoren S/W

Thrombin ist eine „Koagulationsprotease“, die bei Gefäßverletzungen gebildet wird und eine Aktivierung von Thrombozyten, Endothelzellen, Leukozyten und Mesenchymalzellen induziert.

#### 2.4.2.2.9 Thrombospondin (TSP)

TSP wird ähnlich wie das P-Selektin in den  $\alpha$ -Granula von Thrombozyten gespeichert und bei Aktivierung an deren Oberfläche exprimiert. TSP ist an der Bindung von Thrombozyten untereinander und an andere Zellen maßgeblich beteiligt.

## **2.5 Reagenzien und Geräte**

### 2.5.1 Geräte und Probengefäße

- FacsCalibur, Becton & Dickinson, Heidelberg, Seriennr. E0443, IC-Nr. 9103
- Laborzentrifuge, Heraeus Sepatech-Minifuge RF, Heraeus Hanau, Seriennr. 4670
- Celltrak 12, Nova biomedical, Rödermark-Urberach
- Brutschrank, Heraeus Instruments, Hanau, Typ BB16 Artikelnummer 51010689
- Falcon Röhrchen 5 ml, Becton & Dickinson, N.J. USA, Artikelnummer 352054
- Röhren (10 ml, Polystyrol-), Sarstedt, Artikelnummer 60.506
- Röhrchen (10 ml), Kabevette, Kabe Labortechnik, Nümbrecht, Artikelnummer 050601

- Röhrrchen (7 ml), Kabevette, Kabe Labortechnik, Nümbrecht, Artikelnummer 051001
- CTAD-Vacutainer, Becton & Dickinson, N.J., USA
- Transferpipette 3,5 ml, Sarstedt, Bestellnummer 86.1171
- Variable Pipette 10-100  $\mu$ l, Eppendorff, Hamburg
- Variable Pipette 100-1000  $\mu$ l, Eppendorff, Hamburg, Artikelnummer 481000.029

### 2.5.2 Reagenzien

- FacsFlow-Lösung, Becton & Dickinson, Artikelnummer 342003
- FacsSafe-Lösung, Becton & Dickinson, Artikelnummer 340345
- FacsRinse-Lösung, Becton & Dickinson, Artikelnummer 340346
- PBS-Lösung, BAG Lich, Ch.Nr.127304, Artikelnummer 3613
- Formaldehydlösung, Merck, Darmstadt, Ch.Nr.1.03999
- Bovines Serum Albumin, Sigma, USA, A 2153
- Natriumzitrat 4%, Haemonetics, Massachusetts, Artikelnummer 6714567.02.01
- Glucose 5, Braun, Melsungen, Artikelnummer 3705310
- Monoklonale Antikörper, Immunotech, Frankreich (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1: Verwendete monoklonale Antikörper (Fa. Immunotech, Lumigny, Frankreich)

<b>Unkonjugiert</b>	<b>Bestellnummer</b>	<b>Konjugiert</b>	<b>Bestellnummer</b>
CD9	0117	CD9 FITC	1755
CD31	2052	CD31 PE	2409
CD36	0765	CD36 FITC	0766
CD41	0145	CD41 FITC	0649
		CD41 PE	1416
CD42a	0538	CD42a FITC	1757
CD42b	0409	CD42b FITC	0648
CD49b	0717	CD49b FITC	1425
CD49e	0771	CD49e FITC	1854
CD61	0540	CD61 FITC	1758
CD62p	0767	CD62 FITC	1164
Thrombospondin	0367	Thrombospondin PE	1499
Thrombin-S	2086	Thrombin-S PE	2583
Thrombin-W	2085	Thrombin-W PE	2584

## 2.6 Datenauswertung und Statistik

Die Tests wurden mit dem Statistikprogramm SPSS (SPSS Inc., Chicago, Illinois 60606, USA) durchgeführt, das Konfidenzintervall wurde jeweils mit 95% festgesetzt.

### 2.6.1 In vitro-Studie

Es handelt sich um abhängige Stichproben. Die drei Inkubationslösungen wurden mit dem Kruskal-Wallis-Test verglichen. Lag ein signifikantes Ergebnis vor, so wurde als post-hoc-Test der U-Test durchgeführt.

In den Tabellen und Abbildungen sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen nach Inkubation mit den drei untersuchten Lösungen dargestellt. Als Ausgangswerte für die Mittelwertbildung wurde der geometrische Mittelwert der Einzelmessungen für die Antigendichte sowie der Wert „% Gated“ für den Anteil fluoreszierender Thrombozyten verwendet.

### 2.6.2 In vivo-Studie

Zunächst wurde für die Parameter die Normalverteilung geprüft (Kolmogorov-Smirnov-Test, Ergebnisse siehe Kapitel 3.3.1). Bei Vorliegen der Normalverteilung konnte eine multivariante Analyse mit Messwiederholung auf dem Faktor Zeit (ANOVA, ANalysis Of VAriance) durchgeführt werden; alle signifikanten Ergebnisse wurden mit dem Kruskal-Wallis-Test (Faktor Gruppe) oder der Friedman-Rangvarianzanalyse nachgeprüft und bei nicht signifikantem Ergebnis des Tests verworfen. Lag ein signifikantes Ergebnis für den Faktor Zeit, den Faktor Gruppe oder eine signifikante Interaktion von Zeit und Gruppe vor, wurde als post-hoc-Test der U-Test angewendet.

In den Tabellen und Abbildungen sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen an den Zeitpunkten t1, t2 und t3 dargestellt. Zur Auswertung wurden die gleichen Ausgangswerte wie in der in vitro Studie herangezogen.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Kontrollmessungen

An jedem Messtag wurden die Geräteeinstellungen vor jeder Messung von Thrombozyten mit Leerproben kontrolliert. Zur Bewertung der Kontrollmessungen zeigt Abbildung 8 die Messwerte für den Anteil der positiv gemessenen Thrombozyten bei allen 756 Kontrollmessungen ohne Antikörperzugabe. In Abbildung 9 sind die kumulierten Prozentanteile der Anzahl der Messwerte dargestellt. Hier ist ersichtlich, dass 90% aller Messwerte ohne fluoreszierenden Indikator unter 4,5% liegen, was der Toleranz des Messgerätes entspricht.

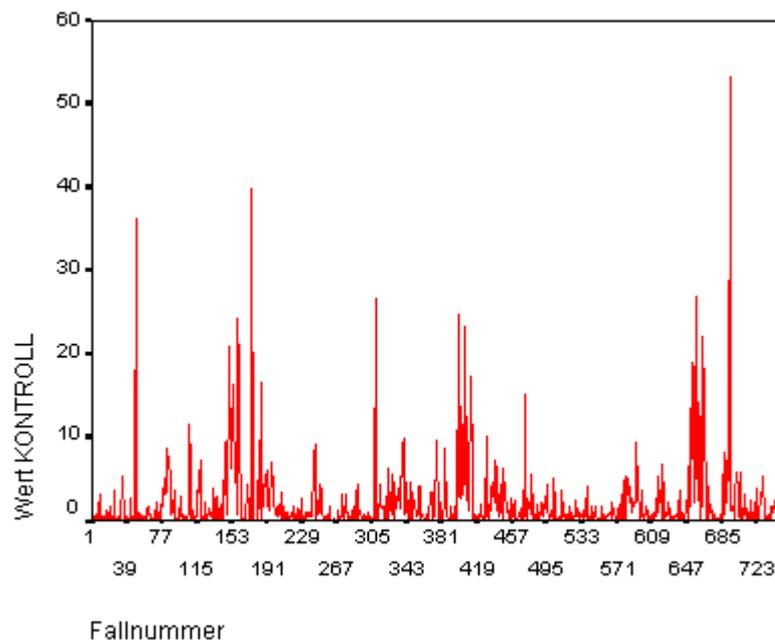


Abbildung 8: Anteil der positiv gemessenen Thrombozyten bei allen 756 Kontrollmessungen ohne Antikörperzugabe (Dimension der Ordinate: %)

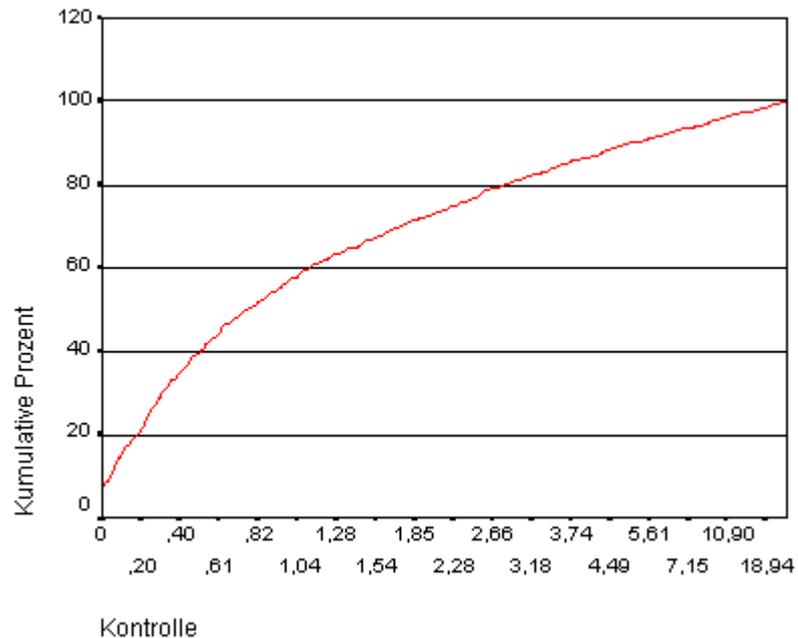


Abbildung 9: Kumulative Darstellung der Messergebnisse aller Leerwertkontrollen. 90% der Leerwertkontrollen ergaben Messwerte unterhalb von 4,5% positiver Thrombozyten.

## 3.2 *In vitro*-Studie

Eingeschlossen wurden zwölf männliche, gesunde Probanden im Alter von 18 bis 34 Jahren, im Mittel 26 Jahren.

### 3.2.1 CD62

Nach Inkubation mit CD62 und NaCl, HAES-Steril<sup>®</sup> oder Voluven<sup>®</sup> war die Antigendichte statistisch signifikant unterschiedlich (Kruskal-Wallis-Test,  $p = 0,018$ ). Die Antigendichte

war sowohl nach Inkubation mit HAES-Steril<sup>®</sup> als auch nach Inkubation mit NaCl statistisch signifikant höher als nach Inkubation mit Voluven<sup>®</sup> (siehe Tabelle 2 und Abbildung ). Der Anteil Antigen-exprimierender Thrombozyten war dagegen nach Inkubation mit Voluven<sup>®</sup> höher als nach Inkubation mit HAES-Steril<sup>®</sup> oder NaCl, der Unterschied ließ sich im Kruskal-Wallis-Test aber nicht nachweisen (Kruskal-Wallis-Test,  $p = 0,097$ , siehe Tabelle 2).

Tabelle 2: CD62 - Vergleich des Anteils der fluoreszierenden Thrombozyten in % (G) und Antigendichte (Intensität der Fluoreszenz = M) bei den Thrombozyten der Probanden nach Inkubation mit NaCl, HAES-Steril<sup>®</sup> oder Voluven<sup>®</sup>

		Voluven <sup>®</sup>		HAES-Steril <sup>®</sup>		NaCl	
		MW	SD	MW	SD	MW	SD
<b>CD62</b>	<b>G</b>	23,7	4,2	20,7	2,6	20,7	4,1
	<b>M<sup>1</sup></b>	355,3	16,0	369,4	13,8	369,5	12,4

MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, 1 = Statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen (Kruskal-Wallis-Test,  $p = 0,046$ ) für NaCl und Voluven<sup>®</sup> (U-Test,  $p = 0,033$ ) sowie HAES-Steril<sup>®</sup> und Voluven<sup>®</sup> (U-Test,  $p = 0,033$ )

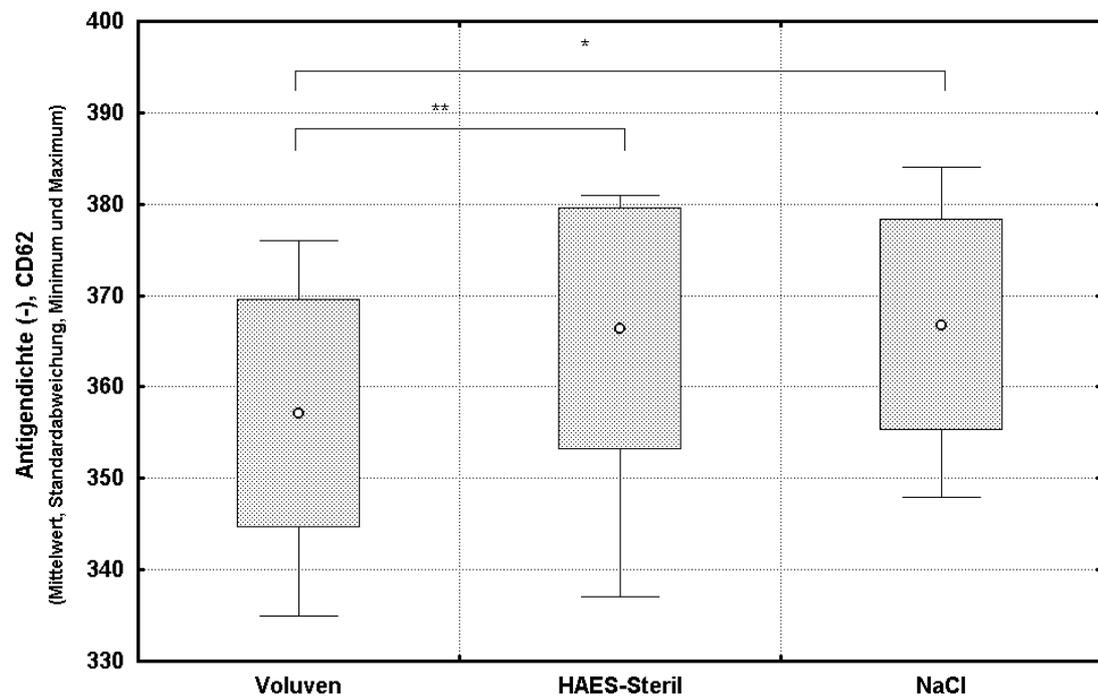


Abbildung 10: CD62, Antigendichte (Intensität der Fluoreszenz) bei Thrombozyten nach Inkubation mit NaCl, HAES-Steril® oder Voluven® (Kruskal-Wallis-Test,  $p < 0,05$ , post-hoc U-Tests, \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ )

### 3.2.2 CD42a/b und CD49b/e

Nach Inkubation mit CD42a, CD42b, CD49b oder CD49e zeigten die Thrombozyten keine statistisch signifikanten Unterschiede im Anteil exprimierender Thrombozyten oder in der Antigendichte (siehe Tabelle 3).

Tabelle 3: CD42a, CD42b, CD49b und CD49e - Vergleich des Anteils der fluoreszierenden Thrombozyten in % (G) und Antigendichte (Intensität der Fluoreszenz = M) bei den Thrombozyten der Probanden nach Inkubation mit NaCl, HAES-Steril® oder Voluven®

		Voluven®		HAES-Steril®		NaCl	
		MW	SD	MW	SD	MW	SD
<b>CD42a</b>	<b>G</b>	28,8	3,0	26,8	2,1	27,5	2,4
	<b>M</b>	325,5	18,7	336,2	14,8	332,5	9,5
<b>CD42 b</b>	<b>G</b>	25,5	2,0	25,3	2,4	27,1	3,6
	<b>M</b>	371,4	12,4	373,8	14,8	361,2	10,4
<b>CD49 b</b>	<b>G</b>	27,2	2,1	27,3	3,0	28,5	3,7
	<b>M</b>	391,4	29,4	392,4	19,2	398,7	28,5
<b>CD49 e</b>	<b>G</b>	25,2	7,4	25,3	7,3	25,1	5,4
	<b>M</b>	278,5	25,8	270,6	14,5	276,5	20,5

MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung

### 3.2.3 CD31

Der Anteil exprimierender Thrombozyten und die Antigendichte unterschieden sich nach Inkubation der Thrombozyten mit den drei Testlösungen nicht statistisch signifikant (siehe Tabelle 4).

Tabelle 4: CD31 - Vergleich des Anteils der fluoreszierenden Thrombozyten in % (G) und Antigendichte (Intensität der Fluoreszenz = M) bei den Thrombozyten der Probanden nach Inkubation mit NaCl, HAES-Steril® oder Voluven®

		Voluven®		HAES-Steril®		NaCl	
		MW	SD	MW	SD	MW	SD
<b>CD31</b>	<b>G</b>	29,6	3,1	30,8	3,0	31,4	3,2
	<b>M</b>	401,4	23,5	391,2	21,9	389,8	16,4

MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung

### 3.2.4 CD36 und Thrombospondin (TSP)

Für CD36 und Thrombospondin ließen sich nach Inkubation mit NaCl, HAES-Steril® oder Voluven® sowie den entsprechenden Antikörpern keine statistisch signifikanten Unterschiede im Anteil exprimierender Thrombozyten oder in der Antigendichte nachweisen (siehe Tabelle 5).

Tabelle 5: CD36 und Thrombospondin (TSP) - Vergleich des Anteils der fluoreszierenden Thrombozyten in % (G) und Antigendichte (Intensität der Fluoreszenz = M) bei den Thrombozyten der Probanden nach Inkubation mit NaCl, HAES-Steril® oder Voluven®

		Voluven®		HAES-Steril®		NaCl	
		MW	SD	MW	SD	MW	SD
<b>CD36</b>	<b>G</b>	30,4	3,0	29,5	4,1	30,3	3,6
	<b>M</b>	341,1	15,5	342,1	19,1	337,8	16,3
<b>TSP</b>	<b>G</b>	26,9	3,3	27,6	3,2	26,5	4,6
	<b>M</b>	368,9	32,7	362,4	21,5	365,2	24,9

MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung

### 3.2.5 CD41F, CD41PE, CD61 und CD9

Nach Inkubation mit den drei untersuchten Lösungen ergab sich für keinen der vier Antikörper einen statistisch signifikanten Unterschied, weder im Anteil exprimierender Thrombozyten noch in der Antigendichte (siehe Tabelle 6).

Tabelle 6: CD41F, CD41PE und CD61 und CD9 - Vergleich des Anteils der fluoreszierenden Thrombozyten in % (G) und Antigendichte (Intensität der Fluoreszenz = M) bei den Thrombozyten der Probanden nach Inkubation mit NaCl, HAES-Steril® oder Voluven®

		Voluven®		HAES-Steril®		NaCl	
		MW	SD	MW	SD	MW	SD
<b>CD41F</b>	<b>G</b>	29,2	3,4	30,5	4,0	28,6	6,0
	<b>M</b>	401,9	16,0	397,4	17,0	389,9	33
<b>CD41PE</b>	<b>G</b>	25,0	4,7	22,2	6,4	25,0	4,5
	<b>M</b>	291,7	14,4	309,1	37,2	302,6	31,6
<b>CD61</b>	<b>G</b>	33,0	4,1	34,3	2,4	33,6	4,1
	<b>M</b>	422,4	23,3	414,4	20,9	416,2	21,3
<b>CD9</b>	<b>G</b>	30,8	3,3	30,3	3,3	31,1	3,0
	<b>M</b>	364,0	15,6	362,8	23,4	358,4	17,2

MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung

### 3.2.6 Thrombinrezeptoren S/W

Weder der Anteil exprimierender Thrombozyten noch die Antigendichte war nach Inkubation der Thrombozyten mit NaCl, HAES-Steril® oder Voluven® und den Antikörpern gegen Thrombin-S bzw. -W-Rezeptor statistisch signifikant unterschiedlich (siehe Tabelle 7).

Tabelle 7: Thrombin-S und -W-Rezeptor - Vergleich des Anteils der fluoreszierenden Thrombozyten in % (G) und Antigendichte (Intensität der Fluoreszenz = M) bei den Thrombozyten der Probanden nach Inkubation mit NaCl, HAES-Steril® oder Voluven®

		Voluven®		HAES-Steril®		NaCl	
		MW	SD	MW	SD	MW	SD
<b>S</b>	<b>G</b>	29,0	2,4	28,7	2,4	29,7	2,9
	<b>M</b>	400,5	14,6	403,6	16,2	396,5	13,6
<b>W</b>	<b>G</b>	24,6	3,1	24,3	1,6	23,8	3,8
	<b>M</b>	407,6	17,7	405,6	14,7	406,3	7,2

MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung

### 3.3 *In vivo*-Studie

Eingeschlossen wurden 18 Patienten im Alter von 60 bis 72 Jahren, im Mittel 66 Jahre.

#### 3.3.1 Test auf Normalverteilung

Bei den folgenden 14 biologischen Merkmalen wurde die Normalverteilung mittels Kolmogorov-Smirnov-Test geprüft. Untersucht wurde der Zeitpunkt t1 mit 18 Messwerten. Zu den Zeitpunkten t2 und t3 konnten nur jeweils 6 Messwerte analysiert werden, diese Stichprobenmenge reicht nicht aus, um die Normalverteilung abzulehnen.

Bis auf die Messung des CD41PE kann für alle Parameter die Normalverteilung angenommen werden.

Für das Antigen CD41PE kann die Normalverteilung auf der Basis des Kolmogorov-Smirnov-Tests nicht angenommen werden. Allerdings besteht eine hohe Anzahl von fünf „Ausreißern“, dies ist ein Indiz für eine ungenaue Messung mit relativ vielen Messfehlern. Alle Werte wurden in die Auswertung eingeschlossen. Der Vergleich erfolgte ebenfalls mit ANOVA. Die Verletzung der Normalverteilungsvoraussetzung muss bei der Interpretation der Ergebnisse zu diesem Parameter berücksichtigt werden.

Tabelle 8: Irrtumswahrscheinlichkeit alpha [%] für das Verwerfen der Nullhypothese (Vorliegen von Normalverteilung)

	Antigendichte (-)			Anteil exprimierender Thrombozyten (%)		
	Gesamt (n=18)	Ohne Ausreißer		Gesamt (n=18)	Ohne Ausreißer	
		$\alpha$	$\alpha$		n	$\alpha$
<b>CD9</b>	11,0	77,6	17	32,4		
<b>CD31</b>	11,2	91,6	17	36,8	75,8	16
<b>CD36</b>	18,7	75,9	17	10,8	31,1	16
<b>CD41F</b>	66,2			23		
<b>CD41PE</b>	4,1	73,7	13	34,3		
<b>CD42a</b>	36,1	57,8	16	29,2		
<b>CD42b</b>	47,3			52,9		
<b>CD49b</b>	77,3			42,1		
<b>CD49e</b>	99,7			53,3		
<b>CD61</b>	20,9	57,8	16	12		
<b>CD62</b>	99,2			18,2		
<b>TSP</b>	100,0			87,7		
<b>Thrombin-S</b>	83,4			30,5		
<b>Thrombin-W</b>	68,8			15,9	28,8	17

### 3.3.1.1 CD62

Für CD62 ließen sich im Anteil exprimierender Thrombozyten keine statistisch signifikanten Unterschiede nachweisen, weder für die Messzeitpunkte noch für die Gruppen oder die Zeitverläufe in den Gruppen (siehe Tabelle 9).

Tabelle 9: CD62 - Anteil der fluoreszierenden Thrombozyten in %

		Voluven®		HAES-Steril®		Ringerlösung	
		MW	SD	MW	SD	MW	SD
<b>CD62</b>	<b>t1</b>	30,4	10,6	21,8	4,3	24,8	6,4
	<b>t2</b>	30,0	8,1	22,9	5,2	27,2	7,2
	<b>t3</b>	26,6	7,5	23,6	5,0	28,3	5,7

t1 = nach Narkoseeinleitung, t2 = nach Volumenausgleich, t3 = 4 Stunden nach Hautnaht,  
MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung

Die Antigendichte war in den Gruppen bereits vor Beginn der Studieninterventionen unterschiedlich (ANOVA,  $p = 0,021$ ), sie lag in der Gruppe der Patienten mit Substitution durch HAES-Steril® höher als in der mit Substitution durch Ringerlösung (U-Test,  $p = 0,006$ ). Im Zeitverlauf insgesamt und im Zeitverlauf in den Gruppen bestanden dagegen keine statistisch signifikanten Unterschiede (siehe Tabelle 10 und Abbildung).

Tabelle 10: CD62 - Antigendichte

		Voluven®		HAES-Steril®		Ringerlösung	
		MW	SD	MW	SD	MW	SD
<b>CD62<sup>1</sup></b>	<b>t1</b>	384,5	16,4	411,3	28,2	376,4	18,9
	<b>t2</b>	387,8	13	405,1	34,4	376,4	20,8
	<b>t3</b>	391,3	26,1	414,5	25,2	366,0	19,4

t1 = nach Narkoseeinleitung, t2 = nach Volumenausgleich, t3 = 4 Stunden nach Hautnaht, MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, 1 = Statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen insgesamt (Kruskal-Wallis-Test,  $p = 0,0002$ ) sowie für Ringerlösung und HAES-Steril® (U-Test,  $p = 0,0001$ ) sowie für Voluven und HAES-Steril® (U-Test,  $p = 0,0192$ )

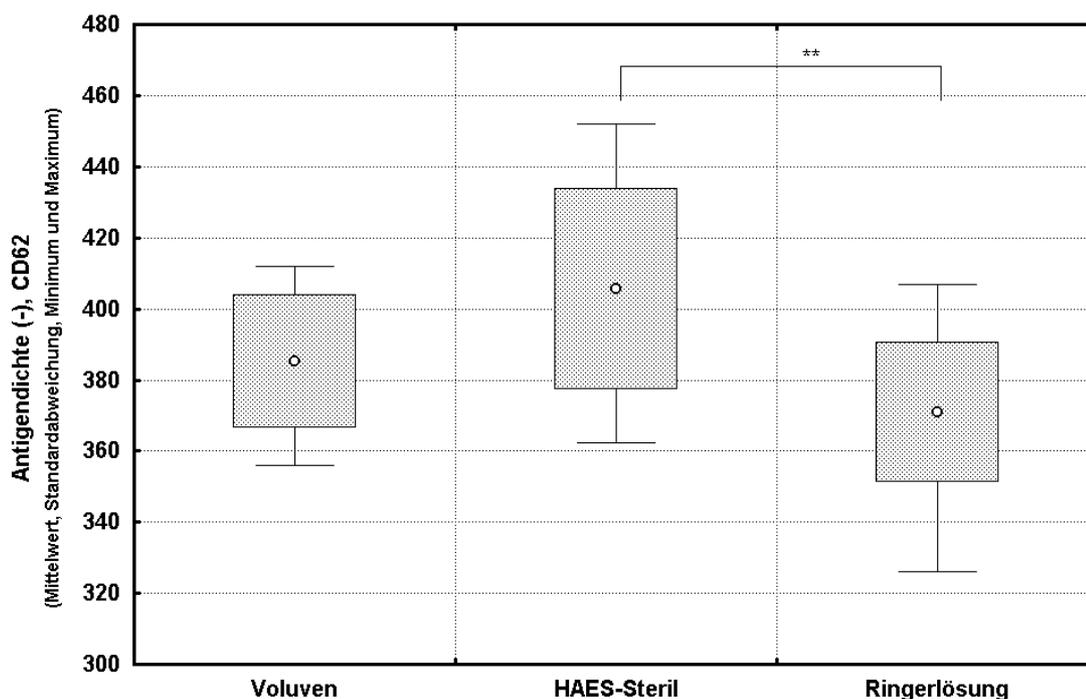


Abbildung 11: CD62, Antigendichte (Intensität der Fluoreszenz) bei Thrombozyten in den drei Gruppen mit Ringerlösung, HAES-Steril® oder Voluven® (Messzeitpunkte zusammengefasst); \* post-hoc U-Test,  $p < 0,05$ ; \*\* post-hoc U-Test,  $p < 0,001$

### 3.3.1.2 CD42a/b und CD49b/e

Der Anteil der exprimierenden Thrombozyten war für CD42a, CD42b, CD49b und CD49e in der Gesamtgruppe bei den 3 Messpunkten vergleichbar. Es ergaben sich keine Unterschiede zwischen den 3 Patientengruppen, Interaktionen zwischen Zeit und Gruppe waren ebenfalls nicht nachweisbar (siehe Tabelle 11).

Tabelle 11: CD42a, CD42b, CD49b und CD49e - Anteil der fluoreszierenden Thrombozyten in %

		Voluven®		HAES-Steril®		Ringerlösung	
		MW	SD	MW	SD	MW	SD
<b>CD42a</b>	<b>t1</b>	29,8	10,1	28,4	3,6	25,3	22,1
	<b>t2</b>	28,6	9,0	27,3	2,3	31,6	6,5
	<b>t3</b>	30,3	9,0	29,8	3,2	34,3	12,6
<b>CD42b</b>	<b>t1</b>	36,0	12,5	32,4	7,1	30,3	4,0
	<b>t2</b>	44,9	26,8	29,8	3,5	25,5	11,4
	<b>t3</b>	35,8	11,0	31,2	6,4	32,2	9,4
<b>CD49b</b>	<b>t1</b>	36,9	12,5	31,1	7,1	34,0	9,4
	<b>t2</b>	47,6	27,2	28,9	6,2	34,6	9,5
	<b>t3</b>	35,8	10,9	31,0	5,8	36,1	10,5
<b>CD49e</b>	<b>t1</b>	20,7	7,5	20,2	4,8	25,9	6,4
	<b>t2</b>	26,7	11,6	18,1	6,1	19,2	7,5
	<b>t3</b>	20,3	8,7	19,6	8,1	30,0	4,9

t1 = nach Narkoseeinleitung, t2 = nach Volumenausgleich, t3 = 4 Stunden nach Hautnaht,  
MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung

Die Antigendichte war sowohl für CD42a und 42b als auch für CD49e insgesamt in den Gruppen unterschiedlich (siehe Tabelle 12). Sie war bei den Patienten, die Voluven<sup>®</sup> erhielten, höher als bei den Patienten, die mit Ringerlösung substituiert wurden; zusätzlich ergab sich für CD42b ein knapp signifikant höherer Wert für Voluven<sup>®</sup> gegenüber HAES-Steril<sup>®</sup>. Der Verlauf über die Zeit war für CD42b in den 3 Patientengruppen unterschiedlich (Friedman-Test,  $p = 0,030$ ). Statistisch signifikant waren wiederum die Unterschiede zwischen den Patienten mit Substitution durch Ringerlösung bzw. Voluven<sup>®</sup> (U-Test,  $p = 0,016$ ). Während die Antigendichte für CD42b nach Infusion von Voluven<sup>®</sup> auf hohem Niveau rückläufig war, blieben die Werte nach Infusion von Ringerlösung auf niedrigem Niveau gleich (siehe Tabelle 12). Für CD49e ließ sich eine ähnliche Interaktion zwischen Zeit und Gruppe nachweisen (Friedman-Test,  $p = 0,045$ ).

Tabelle 12: CD42a, CD42b, CD49b und CD49e - Antigendichte

		Voluven®		HAES-Steril®		Ringerlösung	
		MW	SD	MW	SD	MW	SD
<b>CD42a<sup>1</sup></b>	<b>t1</b>	467,9	136,7	393,0	43,7	319,1	56,1
	<b>t2</b>	461,4	136,7	392,3	37,3	346,5	29,4
	<b>t3</b>	439,6	85,1	402	90,9	355,9	41,6
<b>CD42b<sup>2</sup></b>	<b>t1</b>	465,8	63,9	411,5	34,9	379,0	26,1
	<b>t2</b>	505,5	116,7	405,2	28,3	355,6	31,9
	<b>t3</b>	419,2	46,7	414,8	41,3	370,3	16,6
<b>CD49b</b>	<b>t1</b>	441,5	39,2	447,2	28,8	399,0	14,1
	<b>t2</b>	489,9	143,7	443,0	31,2	403,9	26,0
	<b>t3</b>	421,5	31,2	468,1	60,1	391,4	18,1
<b>CD49e<sup>3</sup></b>	<b>t1</b>	336,3	56,9	332,4	28,8	292,8	28,4
	<b>t2</b>	305,6	28,8	343,7	34,0	310,7	34,5
	<b>t3</b>	318,8	43,2	339,2	47,2	274,0	21,5

t1 = nach Narkoseeinleitung, t2 = nach Volumenausgleich, t3 = 4 Stunden nach Hautnaht, MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, 1 = Statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen insgesamt (Kruskal-Wallis-Test,  $p = 0,005$ ) für Ringerlösung und Voluven® (U-Test,  $p = 0,0011$ ), 2 = Statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen insgesamt (Kruskal-Wallis-Test,  $p < 0,0001$ ), für HAES-Steril® und Voluven® (U-Test,  $p = 0,0275$ ), 3 = Statistisch signifikanter Unterschied den Gruppen insgesamt (Kruskal-Wallis-Test,  $p = 0,0017$ ) sowie für Ringerlösung und HAES-Steril® (U-Test,  $p = 0,0022$ )

### 3.3.1.3 CD31

Der Anteil exprimierender Thrombozyten war für CD31 in der Gesamtgruppe bei den 3 Messzeitpunkten nicht statistisch signifikant unterschiedlich.

Tabelle 13: CD31 - Anteil der fluoreszierenden Thrombozyten in %

		Voluven®		HAES-Steril®		Ringerlösung	
		MW	SD	MW	SD	MW	SD
<b>CD31</b>	<b>t1</b>	42,2	13,9	36,2	5,3	39,7	12,1
	<b>t2</b>	40,5	15,0	30,8	7,1	37,1	10,5
	<b>t3</b>	37,4	6,1	35,0	4,6	36,7	11,4

t1 = nach Narkoseeinleitung, t2 = nach Volumenausgleich, t3 = 4 Stunden nach Hautnaht,  
MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung

Die Antigendichte war über alle Messzeitpunkte in den Gruppen unterschiedlich (Kruskal-Wallis-Test,  $p = 0,0002$ ), und zwar in der Gruppe mit Substitution durch Ringerlösung statistisch signifikant höher als in der Gruppe mit Substitution durch Voluven® (U-Test,  $p = 0,0002$ ) bzw. HAES-Steril® (U-Test,  $p = 0,0098$ , siehe Tabelle 14 und Abbildung 12).

Tabelle 14: CD31 - Antigendichte

		Voluven®		HAES-Steril®		Ringerlösung	
		MW	SD	MW	SD	MW	SD
<b>CD31<sup>a</sup></b>	<b>t1</b>	474,2	81,9	440,7	39,4	396,3	15,4
	<b>t2</b>	466,1	77,1	466,4	42,1	401,9	23,9
	<b>t3</b>	483,5	70,1	448,2	41,8	395,7	46,7

t1 = nach Narkoseeinleitung, t2 = nach Volumenausgleich, t3 = 4 Stunden nach Hautnaht, MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, a = Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen (Kruskal-Wallis-Test,  $p = 0,00002$ ), für Ringerlösung und Voluven® (U-Test,  $p = 0,0002$ ) sowie für Ringerlösung und HAES-Steril® (U-Test,  $p = 0,0098$ )

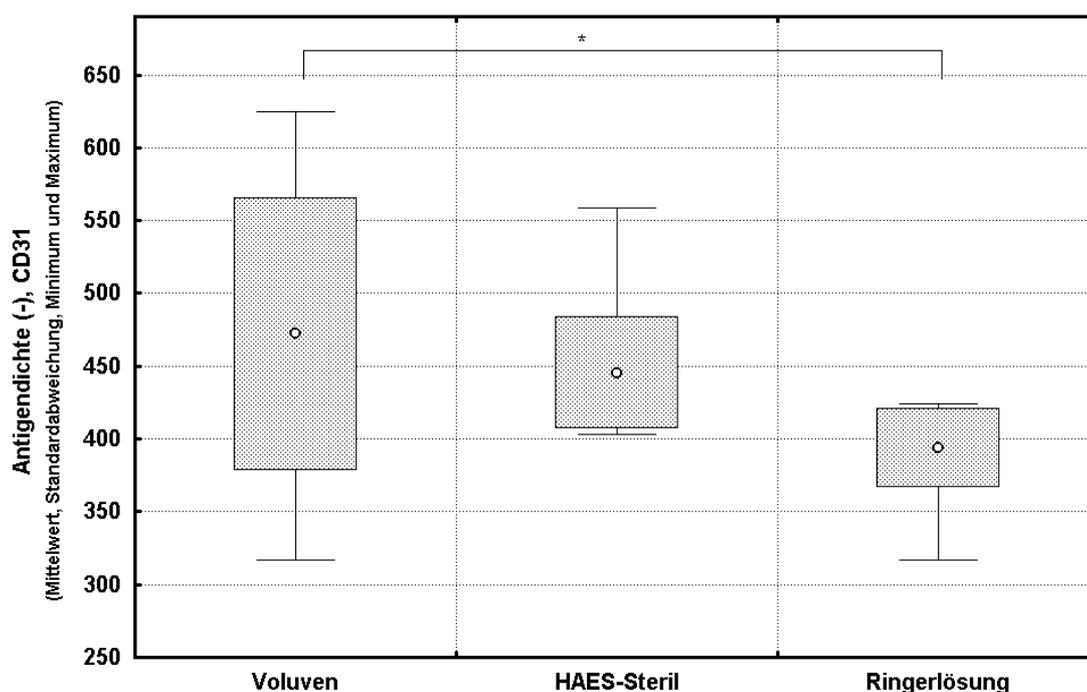


Abbildung 12: CD31, Antigendichte (Intensität der Fluoreszenz) bei Thrombozyten in den drei Gruppen mit Ringerlösung, HAES-Steril® oder Voluven® (Messzeitpunkte zusammengefasst); \* post-hoc U-Test,  $p < 0,01$ , \*\*  $p < 0,001$

### 3.3.1.4 CD36 und Thrombospondin (TSP)

Der Anteil exprimierender Thrombozyten war für CD36 an den verschiedenen Messzeitpunkten statistisch signifikant unterschiedlich (Kruskal-Wallis-Test,  $p = 0,011$ ). Der Anteil exprimierender Thrombozyten nahm zwischen den Zeitpunkten nach Narkoseeinleitung und nach Volumengabe statistisch signifikant ab (U-Test,  $p = 0,002$ ), nach Volumengabe nahm der Anteil exprimierender Thrombozyten bis zur Messung 4 Stunden nach Hautnaht wieder statistisch signifikant zu (U-Test,  $p = 0,039$ , siehe Abbildung 13 und Tabelle 15). Die Gruppen und die Zeitverläufe in den Gruppen waren dagegen nicht statistisch signifikant unterschiedlich. Für Thrombospondin ließen sich zwischen den Zeitpunkten, zwischen den Gruppen und für die Zeitverläufe in den Gruppen keine Unterschiede nachweisen (siehe Tabelle 15).

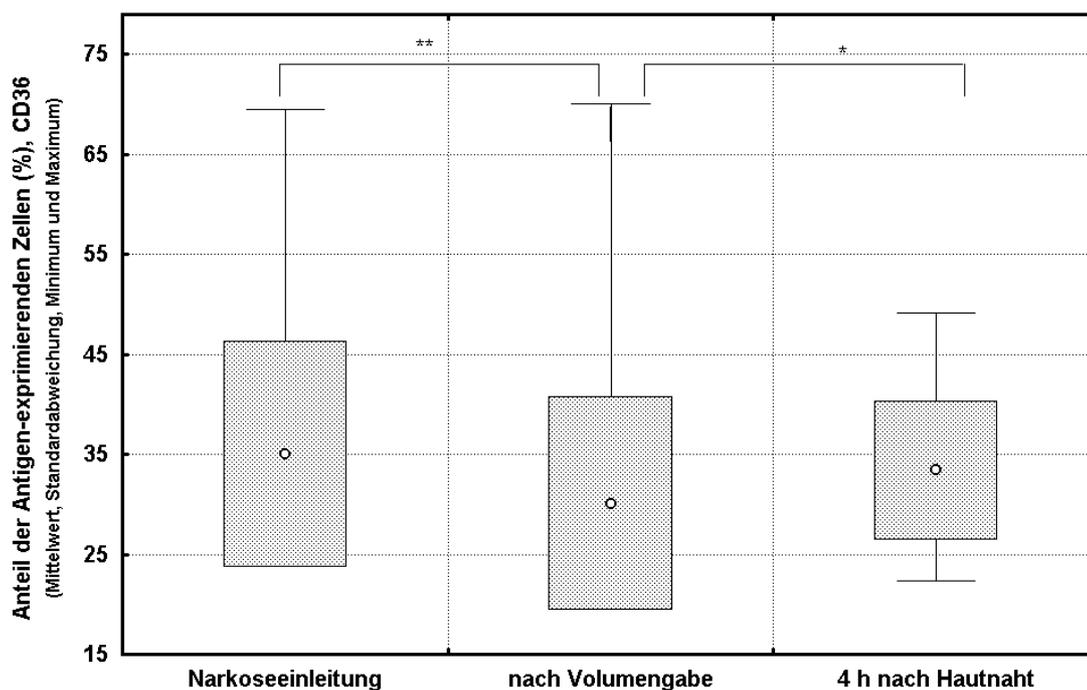


Abbildung 13: CD36, Anteil exprimierender Thrombozyten (%) nach Narkoseeinleitung, nach Volumenausgleich mit Ringerlösung, HAES-Steril® oder Voluven® und 4 Stunden nach Hautnaht bei allen untersuchten Probanden; \*\* post-hoc U-Test,  $p < 0,01$ , \* post-hoc U-Test,  $p < 0,05$

Tabelle 15: CD36 und Thrombospondin - Anteil der fluoreszierenden Thrombozyten in %

		Voluven®		HAES-Steril®		Ringerlösung	
		MW	SD	MW	SD	MW	SD
<b>CD36*</b>	<b>t1</b>	36,6	12,5	31,0	3,5	37,4	11,7
	<b>t2</b>	32,9	9,5	29,1	3,4	28,2	5,2
	<b>t3</b>	33,7	9,2	31,8	2,3	34,5	9,7
<b>Thrombo- spondin</b>	<b>t1</b>	35,5	6,4	33,0	4,1	31,0	6,7
	<b>t2</b>	33,9	10,8	23,4	11,5	31,4	7,0
	<b>t3</b>	31,4	6,6	32,8	3,8	32,7	6,6

t1 = nach Narkoseeinleitung, t2 = nach Volumenausgleich, t3 = 4 Stunden nach Hautnaht, MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, \* = Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Zeitpunkten (Kruskal-Wallis-Test,  $p = 0,011$ ) für t1 und t2 (U-Test,  $p = 0,002$ ) und t2 und t3 (U-Test,  $p = 0,039$ )

In der Antigendichte ließen sich für CD36 und Thrombospondin zwischen den Zeitpunkten, zwischen den Gruppen und für die Zeitverläufe in den Gruppen keine signifikanten Unterschiede nachweisen (siehe Tabelle 16).

Tabelle 16: CD36 und Thrombospondin (TSP) - Antigendichte

		Voluven®		HAES-Steril®		Ringerlösung	
		MW	SD	MW	SD	MW	SD
<b>CD36</b>	<b>t1</b>	430,6	86,9	398,0	31,6	341,2	28,1
	<b>t2</b>	437,4	99,8	407,7	27,5	364,8	25,3
	<b>t3</b>	415,1	70,8	409	76,2	352,1	24,3
<b>TSP</b>	<b>t1</b>	384,3	38,1	390,8	29,6	363,9	31,8
	<b>t2</b>	390,3	29,3	368,2	58,9	363,4	21,7
	<b>t3</b>	390,1	34,0	378,0	38	360,4	13,0

t1 = nach Narkoseeinleitung, t2 = nach Volumenausgleich, t3 = 4 Stunden nach Hautnaht, MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung

### 3.3.1.5 *CD41F, CD41PE, CD61 und CD9*

Der Anteil exprimierender Thrombozyten war für CD41F an den verschiedenen Messzeitpunkten signifikant unterschiedlich (Kruskal-Wallis-Test,  $p = 0,002$ ). Die Werte fielen nach Volumengabe gegenüber der Messung nach Narkoseeinleitung ab (U-Test,  $p = 0,001$ ) und stiegen zwischen den Messungen nach Volumengabe und 4 Stunden nach Hautnaht an (U-Test,  $p = 0,043$ , siehe Tabelle 17 und Abbildung 14). Ein analoger Verlauf war für CD9 nachzuweisen (Kruskal-Wallis-Test,  $p < 0,001$ , U-Test, t1-t2  $p < 0,001$ , t2-t3  $p = 0,003$ , siehe Tabelle 17 und Abbildung 15). Die Gruppen und die Zeitverläufe in den Gruppen waren dagegen nicht statistisch signifikant unterschiedlich. Für CD41PE und CD61 ließen sich keine statistisch signifikanten Unterschiede nachweisen.

Tabelle 17: CD41F, CD41PE, CD61 und CD9 - Anteil der fluoreszierenden Thrombozyten in %

		Voluven®		HAES-Steril®		Ringerlösung	
		MW	SD	MW	SD	MW	SD
<b>CD41F*</b>	<b>t1</b>	38,9	12,0	34,0	5,7	38,8	12,0
	<b>t2</b>	32,3	12,1	32,5	5,7	35,9	9,9
	<b>t3</b>	39,2	8,9	32,6	2,4	36,9	8,3
<b>CD41PE</b>	<b>t1</b>	28,4	12,7	28,1	7,7	26,0	7,7
	<b>t2</b>	25,6	5,2	24,0	7,2	28,4	6,8
	<b>t3</b>	27,0	5,9	22,6	4,2	27,8	6,5
<b>CD61</b>	<b>t1</b>	41,2	13,3	33,2	6,9	37,4	10,0
	<b>t2</b>	51,3	25,8	33,4	4,9	30,5	10,6
	<b>t3</b>	42,6	10,6	33,2	7,3	39,8	10,7
<b>CD9<sup>§</sup></b>	<b>t1</b>	35,1	8,2	34,6	4,5	34,3	6,5
	<b>t2</b>	31,0	5,7	27,7	5,8	30,7	6,5
	<b>t3</b>	36,8	9,6	30,2	1,4	36,6	9,9

t1 = nach Narkoseeinleitung, t2 = nach Volumenausgleich, t3 = 4 Stunden nach Hautnaht, MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, \* = Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Zeitpunkten (Kruskal-Wallis-Test,  $p = 0,002$ ) für t1 und t2 (U-Test,  $p = 0,001$ ) und t2 und t3 (U-Test,  $p = 0,043$ ), § = Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Zeitpunkten (Kruskal-Wallis-Test,  $p < 0,001$ ) für t1 und t2 (U-Test,  $p < 0,001$ ) und t2 und t3 (U-Test,  $p = 0,003$ )

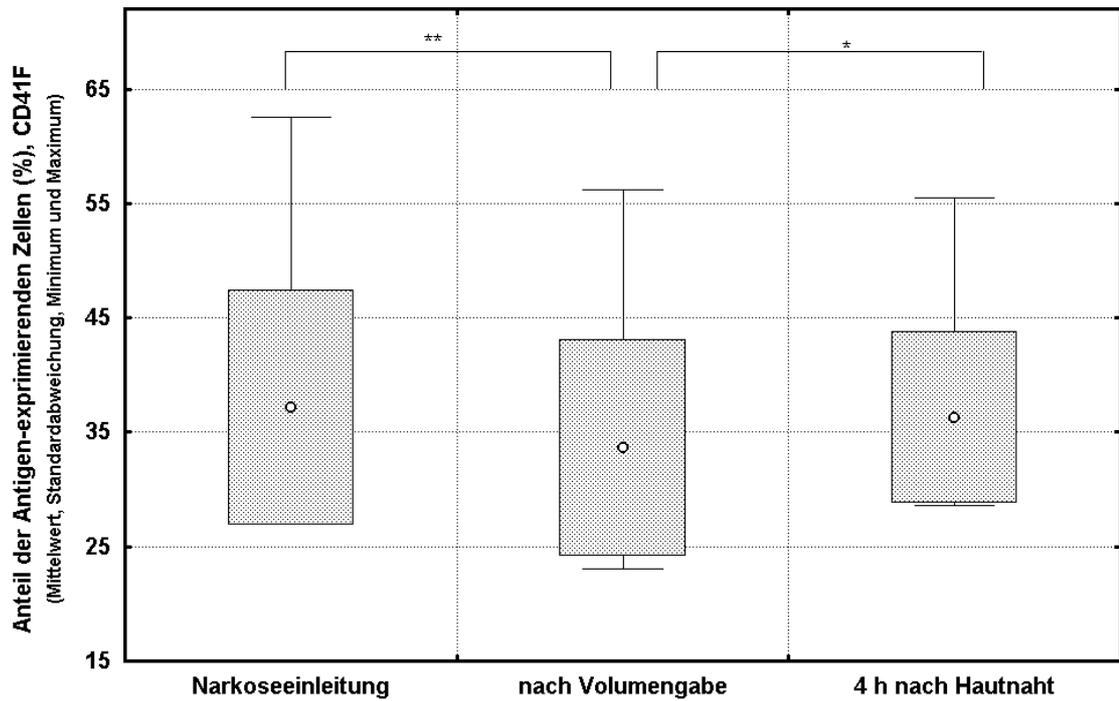


Abbildung 14: CD41F, Anteil exprimierender Thrombozyten (%) nach Narkoseeinleitung, nach Volumenausgleich mit Ringerlösung, HAES-Steril® oder Voluven® und 4 Stunden nach Hautnaht bei allen untersuchten Probanden; \*\* post-hoc U-Test,  $p < 0,01$ , \* post-hoc U-Test,  $p < 0,05$

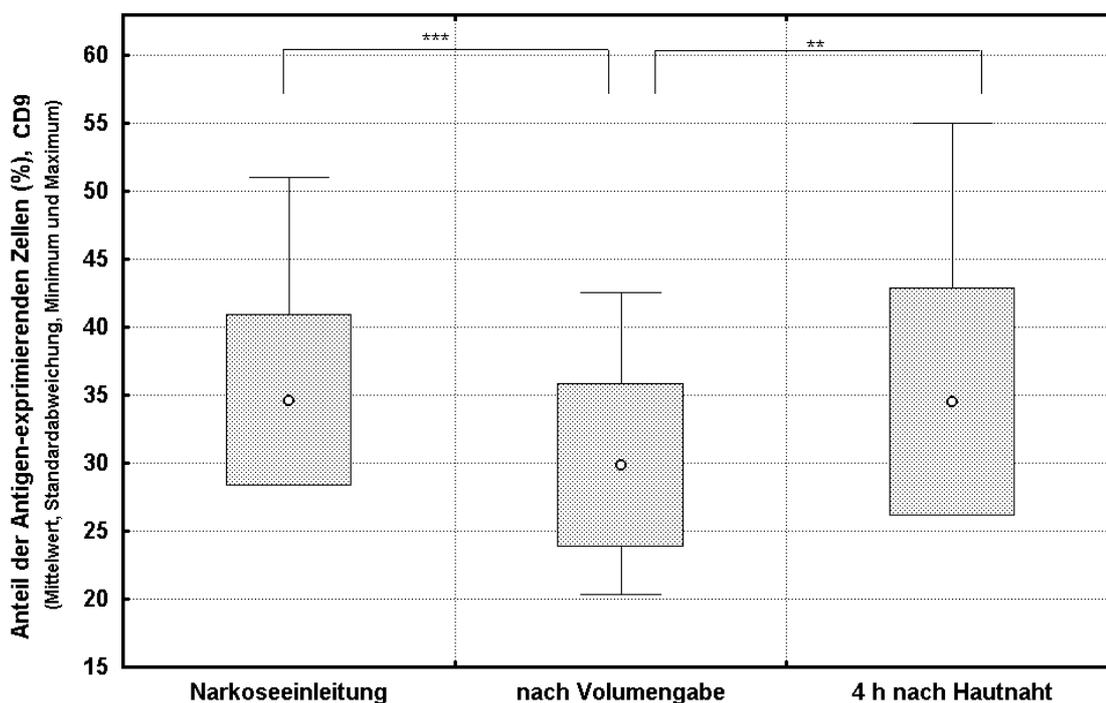


Abbildung 15: CD9, Anteil exprimierender Thrombozyten (%) nach Narkoseeinleitung, nach Volumenausgleich mit Ringerlösung, HAES-Steril® oder Voluven® und 4 Stunden nach Hautnaht bei allen untersuchten Probanden; \*\*\* post-hoc U-Test,  $p < 0,001$ , \*\* post-hoc U-Test,  $p < 0,01$

Die Antigendichte war nur für CD61 insgesamt in den Gruppen unterschiedlich (Kruskal-Wallis-Test,  $p = 0,0007$ ). Sie war bei den Patienten, die Voluven® erhielten, höher als bei den Patienten, die mit Ringerlösung substituiert wurden (U-Test,  $p = 0,009$  siehe Tabelle 18 und Abbildung 16). Ein gleichsinniger, aber schwächer ausgeprägter Unterschied fand sich zwischen Patienten der HAES-Steril®-Gruppe und der Ringerlösung-Gruppe (U-Test,  $p = 0,0338$ ). Der Verlauf über die Zeit war nicht unterschiedlich.

Der Verlauf über die Zeit war für CD9 in den 3 Patientengruppen nicht unterschiedlich. Es fand sich aber ein signifikant höherer Wert in beiden HES-Gruppen gegenüber der Gruppe

mit Substitution durch Ringerlösung (Kruskal-Wallis-Test,  $p = 0,0044$ , post-hoc U-Test jeweils  $p < 0,05$ ).

Für CD41F und CD41PE wurden keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Zeitpunkten, den Gruppen oder den Zeitverläufen in den Gruppen nachgewiesen (siehe Tabelle 18).

Tabelle 18: CD41F, CD41PE, CD61 und CD9 - Antigendichte

		Voluven®		HAES-Steril®		Ringerlösung	
		MW	SD	MW	SD	MW	SD
<b>CD41F</b>	<b>t1</b>	506,9	96,7	495,8	56,2	399,1	24,2
	<b>t2</b>	476,2	149,9	466,3	42,1	407,7	31,6
	<b>t3</b>	462,7	68,0	464,8	60,0	410,2	30,8
<b>CD41PE</b>	<b>t1</b>	527,9	204,9	384,5	119,2	306,1	20,8
	<b>t2</b>	445,1	158,9	376,4	84,6	299,4	19,3
	<b>t3</b>	504,0	220,6	412,1	127,9	303,3	52,0
<b>CD61<sup>1</sup></b>	<b>t1</b>	493,1	83,1	502,0	82,3	428,6	19,8
	<b>t2</b>	519,8	104,8	454,5	24,2	404,8	61,1
	<b>t3</b>	491,0	59,0	467,1	43,2	425,5	31,5
<b>CD9<sup>2</sup></b>	<b>t1</b>	491,2	138,0	421,7	33,2	372,4	13,8
	<b>t2</b>	420,8	54,6	442,8	29,5	392,3	18,7
	<b>t3</b>	418	69,2	455,7	66,5	372,4	31,2

t1 = nach Narkoseeinleitung, t2 = nach Volumenausgleich, t3 = 4 Stunden nach Hautnaht, MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, 1 = Statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen (Kruskal-Wallis-Test,  $p = 0,0007$ ) für Ringerlösung und Voluven® (U-Test,  $p = 0,0009$ ) sowie für Ringerlösung und HAES-Steril® (U-Test,  $p = 0,0338$ ), 2 = Statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen insgesamt (Kruskal-Wallis-Test,  $p = 0,0044$ ), für Ringerlösung und Voluven® (U-Test,  $p = 0,01277$ ) sowie für Ringerlösung und HAES-Steril® (U-Test,  $p = 0,0190$ )

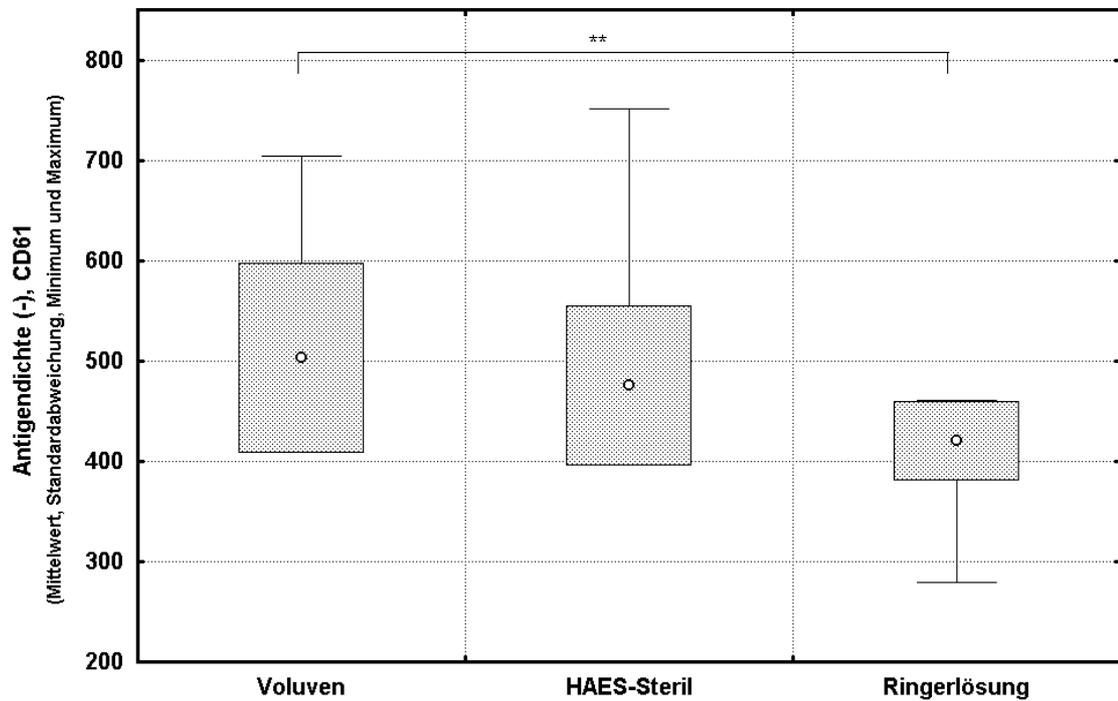


Abbildung 76: CD61, Antigendichte (Intensität der Fluoreszenz) bei Thrombozyten in den drei Gruppen mit Ringerlösung, HAES-Steril® oder Voluven® (Messzeitpunkte zusammengefasst); \* post-hoc U-Test,  $p < 0,05$ ; \*\* post-hoc U-Test,  $p < 0,001$

### 3.3.1.6 Thrombinrezeptoren S/W

Für den Thrombin-S und -W-Rezeptor waren weder im Anteil der exprimierenden Thrombozyten noch in der Antigendichte statistisch signifikante Unterschiede bei den Messpunkten, bei den Gruppen oder im Zeitverlauf innerhalb der Gruppen nachweisbar (siehe Tabelle 19 und Tabelle 20).

Tabelle 19: Thrombin-S und –W-Rezeptor - Anteil der fluoreszierenden Thrombozyten in %

Thrombin - rezeptor		Voluven®		HAES-Steril®		Ringerlösung	
		MW	SD	MW	SD	MW	SD
<b>S</b>	<b>t1</b>	36,0	10,5	29,1	5,4	37,1	11,1
	<b>t2</b>	30,6	13,4	25,9	7,5	34,6	8,5
	<b>t3</b>	35,6	5,9	31,7	6,4	34,7	13,3
<b>W</b>	<b>t1</b>	34,0	10,1	26,0	5,1	36,1	10,8
	<b>t2</b>	36,8	10,8	27,2	4,5	32,1	6,3
	<b>t3</b>	34,2	6,5	28,4	6,7	480,6	1091,8

t1 = nach Narkoseeinleitung, t2 = nach Volumenausgleich, t3 = 4 Stunden nach Hautnaht,  
MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung

Tabelle 20: Thrombin-S und –W-Rezeptor - Antigendichte

Thrombin - rezeptor		Voluven®		HAES-Steril®		Ringerlösung	
		MW	SD	MW	SD	MW	SD
<b>S</b>	<b>t1</b>	420,8	19,1	432,1	48,0	402,8	24,6
	<b>t2</b>	405,8	76,6	449,7	23,9	406,6	27,2
	<b>t3</b>	422,0	22,4	432,4	22,6	404,7	24,0
<b>W</b>	<b>t1</b>	427,0	17,4	430,2	55,4	398,1	22,1
	<b>t2</b>	432,5	52,2	444,3	22,6	409,5	42,4
	<b>t3</b>	420,1	20,1	444,5	11,1	402,3	22,4

t1 = nach Narkoseeinleitung, t2 = nach Volumenausgleich, t3 = 4 Stunden nach Hautnaht,  
MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung

### **3.4 Zusammenfassung der Ergebnisse**

#### **3.4.1 In vitro-Studie**

Nach Inkubation mit NaCl, HAES-Steril<sup>®</sup> und Voluven<sup>®</sup> waren die Thrombozyten hinsichtlich der Oberflächenexpression von CD42a und b (GPIb/V/IX), CD49b (GPIa) und CD49e (GPIIa), CD31 (GPIIa), CD36 (GPIV), Thrombospondin, CD41F, CD41PE, CD61 (GPIIb/IIIa), CD9 und Thrombin-S sowie -W nicht statistisch signifikant unterschiedlich.

Statistisch signifikante Unterschiede bestanden lediglich in der Antigendichte von CD62 (P-Selektin). Diese war nach Inkubation mit NaCl oder HAES-Steril<sup>®</sup> höher als nach Inkubation mit Voluven<sup>®</sup>. CD62 war nach Inkubation mit Voluven<sup>®</sup> geringer als nach Inkubation mit NaCl oder HAES-Steril<sup>®</sup> exprimiert.

#### **3.4.2 In vivo-Studie**

Zwischen den 3 Messzeitpunkten nach Narkoseeinleitung, nach Volumenersatz und 4 Stunden nach Hautnaht ließen sich in der Gesamtgruppe für den Anteil exprimierender Thrombozyten statistisch signifikante Unterschiede nachweisen. Für CD36 (GPIV) und CD41F (GPIIb) sowie für CD9 ließen sich ein Abfall zwischen den Messungen nach Narkoseeinleitung und nach Volumensubstitution mit nachfolgendem Wiederanstieg bis zur Messung 4 Stunden nach Hautnaht nachweisen, für CD49e (GPIIa) war nur der initiale Abfall statistisch signifikant. Ein Unterschied zwischen den Gruppen bestand dabei nicht.

Die Antigendichte war bei den Patienten mit Volumensubstitution durch HES-Präparate höher als bei den Patienten mit Volumensubstitution durch Ringerlösung (was im Sinne einer stärkeren Aktivierung der Thrombozyten durch die HES-Präparate interpretiert werden könnte). Statistisch signifikant war der Unterschied zwischen den Gruppen mit Ringerlösung und Voluven<sup>®</sup> für CD9, CD31 (GPIIa), CD42a, CD42b (GPIb), und CD61 (GPIIb/IIIa), zwischen den Gruppen mit Ringerlösung und HAES-Steril<sup>®</sup> für CD9, CD31 (GPIIa), CD49e, CD61 und CD62 sowie zwischen HAES-Steril<sup>®</sup> und Voluven<sup>®</sup> für CD62 (P-Selektin) und CD42b (GPIb).

Der Zeitverlauf der Antigendichte in den Gruppen war für CD42b (GPIb) bei den Patienten mit Ringerlösung anders als bei den Patienten mit Voluven<sup>®</sup>. Während die Werte bei den Patienten mit Ringerlösung auf niedrigem Niveau weitgehend gleich blieben, fielen bei den Patienten mit Voluven<sup>®</sup> die Werte auf hohem Niveau ab. Die Antigendichte lag allerdings auch 4 Stunden nach Hautnaht bei den Patienten mit Voluven<sup>®</sup> noch über den Werten der Patienten mit Ringerlösung (dies könnte grundsätzlich für eine geringere Ausprägung von CD42a/CD42b auf der Oberfläche und damit für eine Aktivierung der Thrombozyten sprechen). Ähnliche Verläufe bestanden auch bei CD49e und CD9. Hier waren aber trotz signifikanter Ergebnisse im Kruskal-Wallis-Test und in den post-hoc-Tests (U-Test) keine Gruppendifferenzen nachweisbar.

Ein geringfügiger Unterschied zwischen den HES-Präparaten unterschiedlichen Molekulargewichts bestand lediglich in der Expression von CD62 und CD42b. Allerdings war die „Richtung“ des Unterschieds uneinheitlich (CD62 HAES-Steril<sup>®</sup> > Voluven<sup>®</sup> ; CD42b HAES-Steril<sup>®</sup> < Voluven<sup>®</sup> ), so dass ein systematischer Unterschied insgesamt zu verneinen ist.

Zusammenfassend zeigten die Patienten mit Volumenausgleich durch Voluven<sup>®</sup> oder HAES-Steril<sup>®</sup> Hinweise auf eine stärkere Aktivierung der Thrombozyten. Die Unterschiede zwischen den HES-Präparaten waren statistisch nicht überzeugend nachweisbar.

## 4 Diskussion

### 4.1 Zusammenfassende Bewertung der Ergebnisse

Ziel der vorliegenden Arbeit war der Vergleich des Einflusses zweier Hydroxyethylstärkepräparationen (HES 6%, Mw 200/0,5 und HES 6%, Mw 130/0,4) auf die Thrombozytenaktivierung und Expression verschiedener Oberflächenantigene. Untersucht wurde als Hauptzielparameter die Antigenexpression auf der Thrombozytenzellmembran sowie die Thrombozytenaktivierung mittels quantitativer durchflusszytometrischer Messung mithilfe monoklonaler Antikörper. Dabei interessierte besonders, inwieweit sich die Thrombozytenaktivierung bei Patienten unter Volumensubstitution mit Hydroxyethylstärke mit dem mittleren Molekulargewicht von 200 kDa sowie 130 kDa unterscheiden. Ringelösung bzw. NaCl 0,9% dienten als Kontrollsubstanzen.

Dabei sollte geklärt werden, ob HES 6% (130/0,4) durch den reduzierten Substitutionsgrad, seine veränderte C2/C6 ratio und durch eine engere Molekulargewichtsverteilung einen unterschiedlichen Einfluss auf die Thrombozytenaktivität hat als HES 6% (200/0,5).

Die Wirkung von HES auf die Thrombozytenaktivität sollte sowohl im Gesamtorganismus (*in vivo-Studie*) als auch isoliert und damit ohne Einfluss der im Organismus stattfindenden Vorgänge (*in vitro-Studie*) untersucht werden. Die klinischen Untersuchungen beschränkten sich auf den Einsatz bei Patienten, die sich einer radikalen Prostatektomie oder transvesikalen Prostataresektion unterzogen, das *in vitro*-Kollektiv bestand aus gesunden, männlichen Probanden.

Im *in vitro*-Teil der Untersuchung gab es keine nennenswerten Unterschiede zwischen den getesteten HES-Zubereitungen. Als einziger möglicher Effekt zeigte sich eine niedrigere CD62-Antigendichte, d.h. geringere Ausschüttung der  $\alpha$ -Granula nach Inkubation mit HES 130 (Voluven<sup>®</sup>), der mit einer antikoagulatorischen Wirkung kompatibel ist und nach isotonischer Kochsalzlösung bzw. HES 200 nicht auftrat. CD62 (P-Selektin) wird nur auf

aktivierten, aber nicht auf ruhenden Thrombozyten exprimiert. Die  $\alpha$ -Granula enthalten PDGF, Plättchenfaktor IV, Faktor V, XIII und Fibrinogen. Da die Degranulation der  $\alpha$ -Granula der CD62-Expression zeitlich und kausal vorgeschaltet ist, ist ein gleichsinniger Einfluss auf diese beiden Parameter als möglicher Hinweis auf eine Suppression der Degranulation durch HES 130 zu bewerten.

Allerdings zeigte die Expression des Glykoproteinkomplexes CD41/CD61 (GPIIb-IIIa) keinen Gruppenunterschied. THALER et al (2005) fanden zwar einen solchen, dieser zeigte aber eine umgekehrte Tendenz: hier hemmte HES 200 die CD61-Expression *stärker* als HES 130. Es scheint einen kausalen Ansatzpunkt zur Erklärung der selektiven Inhibition durch das HES 130 zwischen der CD61-Expression und der Degranulation zu geben; HES 130 könnte einen inhibitorischen Einfluss auf einen Effektormechanismus der Signalübertragung zwischen CD61 und CD62 vermitteln, den HES 200 nicht ausüben kann. Ein solcher Einfluss ist zwar für bestimmte Adapterproteine gezeigt worden (HUANG et al. 2004), für Volumenersatzmittel auf Stärkebasis dagegen gibt es auch in anderen Studien keinerlei Hinweise auf einen solchen Mechanismus. Da CD62 aber nach der Ligandenbindung eine ganze Reihe von Strukturmodifikationen durchläuft (z.B. CALVETE 1999, QUINN et al. 2003) wäre ein Einfluss der HES 130, den höhermolekulare Zubereitungen nicht aufweisen, durchaus denkbar. Bei einem Molekulargewicht von etwa 300 kDa für das GPIIb-IIIa (CALVETE 1999) wäre z.B. eine mechanische Interaktion des niedermolekularen HES mit der Strukturänderung vorstellbar, zu der höhermolekulare Zubereitungen nicht in der Lage sind.

Das Konzept einer spezifischen Gerinnungshemmung durch HES 130, nicht aber durch HES 200, wird insgesamt von den Befunden der vorliegenden Studie nicht ausreichend gestützt. Aufgrund des fehlenden Einflusses auf die anderen untersuchten Parameter der Thrombozytenaktivierung und auch des fehlenden Einflusses auf die klinischen Gerinnungsparameter (siehe dazu MÖLLER 2005) ergibt sich insgesamt kein überzeugender Hinweis auf einen antikoagulatorischen Effekt der niedermolekularen Zubereitung der HES.

Dieser wäre auch mit den Befunden des *in vivo*-Teils der Studie nicht in Einklang zu bringen: hier zeigten sich punktuell Hinweise auf eine *Aktivierung* der Thrombozyten durch HES und dabei keine verwertbaren Unterschiede in Abhängigkeit vom Molekulargewicht der beiden verwendeten Zubereitungen. Der befürchtete Effekt einer Gerinnungshemmung ist - zumindest auf der Ebene der Thrombozytenaktivierung - damit aufgrund der vorliegenden Untersuchung weder HES 200 noch HES 130 nachzuweisen.

## 4.2 Diskussion der Ergebnisse

Die Ergebnisse der *in vitro*-Studie erlauben insgesamt keinen Rückschluss auf einen systematischen Einfluss der Hydroxyethylstärke auf eine Aktivierung der Thrombozyten. Gegen eine weitergehende Interpretation der sporadisch aufgetretenen, signifikanten Unterschiede (niedrigere CD62-Antigendichte und geringere Expression von CD61 nach Inkubation mit HES 130) sprechen zwei Gründe:

- Von einer Vielzahl getesteter Parameter wies nur eine relativ geringe Zahl statistisch signifikante Unterschiede auf, weshalb die Möglichkeit der zufälligen Signifikanz zu berücksichtigen ist.
- Die gefundenen Unterschiede waren zudem im Kontext der vorliegenden aktuellen Literatur nicht schlüssig. In der *in vitro*-Studie unterschied sich HES 130 von HES 200 einerseits und isotoner Kochsalzlösung andererseits; kausale Einflüsse der Hydroxyethylstärke auf das Gerinnungssystem wurden aber in der Vergangenheit überwiegend für die hochmolekularen Zubereitungen (z.B. das mittlerweile seltener verwendete HES 450) konstatiert (TREIB et al. 1999, ENTHOLZNER et al. 2000, BOLDT et al. 2002).

Die Ergebnisse der *in vivo*-Studie sind ebenfalls nicht konsistent, lassen sich aber mit dem oben genannten Argument der zufälligen Signifikanz nicht entkräften. Dagegen spricht zunächst die deutlich höhere Zahl der gefundenen Zusammenhänge. Damit ergeben sich zunächst aus der *in vivo*-Studie Hinweise auf eine Aktivierung der Thrombozyten durch Hydroxyethylstärke, aber keine verwertbaren Unterschiede in Abhängigkeit vom Molekulargewicht.

Aus den Ergebnissen lässt sich schließen, dass weitere Einflüsse im Zusammenhang mit der Narkose und dem chirurgischen Eingriff auch dann, wenn sie nur bei einzelnen Patienten auftreten, einen relativ großen Einfluss ausüben. Dass solche Unterschiede in den „Rahmenbedingungen“ (z.B. bei dem zweifellos für das Gerinnungssystem äußerst wichtigen Blutverlust) in der vorliegenden Stichprobe bestanden haben müssen, wird nachfolgend anhand der deutlich unterschiedlichen Substitutionsvolumina (siehe Kapitel 4.3) gezeigt.

Ein weiterer Beleg für diese Annahme sind die deutlichen Gruppenunterschiede bezüglich der Ausgangswerte: zum Zeitpunkt t1 hatten die Patienten noch keinen Volumenersatz erhalten, wiesen aber teilweise sehr unterschiedliche Antigenexpressionen auf. Unter Berücksichtigung der Ausgangswerte sind die in den Ergebnissen dargestellten signifikanten Unterschiede zwischen den Volumenersatzmitteln (siehe Kapitel 3.4) bei einigen Parametern zu relativieren:

- CD31-Antigendichte, Ringerlösung signifikant höher als HES 130: hier lauten die Prozentverläufe für HES 130 100% (t1)-97,5% (t2)-99,2% (t3) und für Ringerlösung 100% (t1)-100,5% (t2)-97,8% (t3). In beiden Gruppen bleiben die Werte somit über die Beobachtungsperiode nahezu konstant, nur auf unterschiedlichem Niveau.
- CD61-Antigendichte, HES 130 signifikant höher als Ringerlösung: hier lauten die Prozentverläufe für HES 130 100% (t1)-107,2% (t2)-100,4% (t3) und für Ringerlösung 100% (t1)-94,1% (t2)-98,8% (t3). Hier finden sich in beiden Gruppen lediglich zum Zeitpunkt t2 Unterschiede zum Ausgangswert, die jeweils deutlich unter 10% liegen.

Damit rücken mögliche Unterschiede zwischen den Gruppen, die nicht durch das Volumenersatzmittel verursacht sind, in den Vordergrund; in erster Linie ist hier der sehr deutlich unterschiedliche Blutverlust anzuführen. Die Patienten, die mit HES 130 substituiert wurden, haben - gemessen am substituierten Volumen - deutlich weniger Blut verloren als Patienten mit HES 200 bzw. Ringerlösung. Das könnte auch die Tatsache erklären, dass die beiden letztgenannten Gruppen sich tendenziell ähnlicher verhalten und punktuell Unterschiede zu HES 130 aufweisen.

SAMAMA et al. (2001) beschrieben in der perioperativen Phase von Patienten mit größeren gefäßchirurgischen Eingriffen, die keine HES erhalten hatten, folgende Veränderungen des Gerinnungssystems:

- Eine signifikante Steigerung der Adenosindiphosphat-induzierten Plättchenaggregation 24 und 46 Stunden nach der Operation;
- eine erhöhte Fibrinogenrate zwei und sieben Tage nach der Operation;
- erhöhte Konzentrationen des Plasminogen-Aktivator-Inhibitors 1 nach einer und nach 24 Stunden postoperativ;

Sowohl die Thrombinbildung als auch die Fibrinolyse waren damit postoperativ inhibiert. Es fand sich zwar keine Plättchenaktivierung, aber eine erhöhte Aktivierbarkeit.

Ein weiterer Faktor, der die Thrombozytenfunktion nachhaltig beeinflusst, ist die Narkosetechnik, da verschiedene Inhalations- und Injektionsnarkotika (z.B. Halothan, Sevofluran und Propofol) auf verschiedenen Wegen erheblich in die Mechanismen der Thrombusformation eingreifen (KOZEK-LANGENECKER 2002).

In großer Deutlichkeit wird die Bedeutung anderer Faktoren durch eine Untersuchung belegt, in der auch bei Verwendung von autologem plättchenarmen Plasma zum Volumenersatz Alterationen der Gerinnung auftraten, die nur etwas geringer ausgeprägt waren als nach Gabe von HES (KRETSCHMER et al. 2004). Schließlich lässt sich aus der gleichen Untersuchung

ablesen, dass die Verwendung von Ringerlösung als inerte Referenz, die einer Interpretation der Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung im Sinne einer systematischen Beeinflussung der Thrombozytenfunktion durch HES zwingend zugrunde liegen müsste, ebenfalls problematisch ist. Einen Einfluss der Ringerlösung auf Gerinnungsparameter hatten vor KRETSCHMER et al. (2004) z.B. auch schon RUTTMANN et al. (1998) beschrieben, allerdings mit umgekehrter Tendenz, d.h. im Sinne eines gerinnungsfördernden Effekts (siehe unten).

In allen Untersuchungen ist somit ein nicht genauer zu bestimmender „Leerwert“ von Gerinnungsveränderungen zu berücksichtigen, was die Quantifizierung möglicher Effekte von Volumenersatzmitteln problematisch macht. Studien, in denen ein gerinnungshemmender Effekt von HES-Lösungen ohne Verwendung zumindest einer möglichst gerinnungsneutralen Referenz konstatiert wird (z.B. JAMNICKI et al. 2000), sind in der Interpretation grundsätzlich problematisch, da hier ein kausaler Einfluss der oben genannten Faktoren nicht verifiziert bzw. quantifiziert werden kann.

Insgesamt sind in der vorliegenden Arbeit damit zwar mögliche Hinweise auf eine Thrombozytenaktivierung zu sehen; diese sind aber nicht konsistent und schlüssig, um darauf ein pathophysiologisches Erklärungskonzept zur Wirkung durch die eingesetzte Hydroxyethylstärke und eventuelle Unterschiede zwischen den eingesetzten Zubereitungen aufzubauen. Ein solches Konzept lässt sich auch aus der vorliegenden Literatur zu dieser Frage nicht ableiten. Die Diskussion von möglichen Unterschieden würde zudem durch die Beobachtung von TREIB et al. (1995) eingeschränkt, dass sich auch HES-Präparate gleichen Molekulargewichts in Abhängigkeit vom C2/C6-Verhältnis *in vivo* deutlich unterschiedlich verhalten. Bereits in älteren Untersuchungen, in denen der HES-Volumensubstitution insgesamt ein gerinnungshemmender Effekt nachgewiesen wurde, ließen sich Unterschiede zwischen HES verschiedener Molekulargewichte überwiegend nicht zeigen (JAMNICKI et al. 1998, 2000, PETROIANU et al. 2000).

Der mögliche gerinnungshemmende Effekt von HES wird auf ganz unterschiedliche Weise versucht zu erklären. Neben einer spezifischen Beeinflussung der Thrombozytenfunktion durch Rezeptor-Liganden-Interaktionen vermuteten DEUSCH et al. (2003) einen dosisabhängigen „Beschichtungseffekt“ von HES 200, der ab einer Dilution von 10% des

Blutvolumens zu einer signifikanten Steigerung der FITC/HES-positiven Thrombozyten führte.

Es liegen aber auch andere Erklärungsansätze für gefundene Unterschiede im Gerinnungsverhalten vor. RUTTMANN et al. (1998) kamen anhand einer vergleichenden *in vivo*-Untersuchung an gesunden Freiwilligen zu dem Schluss, dass die Hämodilution grundsätzlich einen pro-koagulatorischen Effekt ausübte, der durch eine Hemmung der Thrombozytenfunktion durch HES teilweise kompensiert wurde.

Während höhermolekulare Stärken (HES 450 oder 550) wahrscheinlich deutliche gerinnungshemmende Effekte haben (TREIB et al. 1999, ENTHOLZNER et al. 2000, BOLDT et al. 2002) - und deshalb auch heute seltener Verwendung finden - werden der Einfluss von HES 200 und HES 130 (sowie im übrigen auch HES 70) und die möglichen Unterschiede der verschiedenen Molekulargewichte hinsichtlich der Thrombozytenfunktion und des von Willebrand-Faktors bei Verabreichung therapeutisch üblicher Volumina in der Literatur überwiegend als nicht vorhanden oder marginal bewertet (TREIB et al. 1996, 1999, BLAICHER et al. 1998, WAITZINGER et al. 1998, 1999, ENTHOLZNER et al. 2000, GALLANDAT HUET et al. 2000, HÜTTNER et al. 2000, BOLDT et al. 2001, 2002, HAISCH et al. 2001, KRETSCHMER et al. 2004, KOZEK-LANGENECKER 2005, MADJPOUR et al. 2005, NIEMI und KUITUNEN 2005).

Dies wurde in zahlreichen Studien anhand des Verhaltens von Thrombelastogrammen untersucht. MÖLLER (2005) untersuchte für das gleiche Patientenkollektiv wie in der vorliegenden Arbeit das Gerinnungsverhalten. In der klinischen Studie zeigte sich in allen Gruppen ein Zustand verringerter Blutgerinnung, der auf Dilutionseffekte, d.h. die relative Abnahme der plasmatischen und zellulären Bestandteile des Blutes, zurückgeführt wurde. Postoperativ kam es zum Messzeitpunkt t3 - wiederum gleichermaßen in allen Gruppen - zu einer gesteigerten Blutgerinnung als Ausdruck einer Stressantwort des Organismus. Die *in vitro*-Studie zeigte keine relevanten Unterschiede zwischen den einzelnen Infusionslösungen. Über die gleichen Resultate berichteten HÜTTNER et al. (2000), allerdings im Vergleich von HES 70, HES 200 und Gelatine 4%.

In einer weiteren vergleichenden Untersuchung des Verhaltens von Thrombelastogrammen nach Hämodilution mit autologem plättchenarmem Plasma (PPP), Kochsalzlösung und HES 450 kamen KRETSCHMER et al. (2004) zu dem Schluss, dass die in einigen Studien beobachtete Steigerung der Gerinnbarkeit nach Hämodilution methodisch bedingt sei, da sich diese am ausgeprägtesten nach PPP-Gabe beobachten ließ. Eine Gerinnungshemmung trat am stärksten nach der Gabe von Kochsalzlösung, nicht hingegen nach HES auf. Dieser Befund spricht zum einen gegen einen relevanten Einfluss von HES auf die Gerinnungsfunktion, lässt aber zum anderen auch Zweifel daran aufkommen, ob die Verwendung von Kochsalzlösung als inerte Referenz, die den meisten Studien zu einer möglichen Beeinträchtigung der Gerinnung durch HES zugrunde liegt, gerechtfertigt ist.

Nach einer Untersuchung von DAILEY et al. (2005) ist auch das Medium, in dem die Stärke gelöst wird, im Hinblick auf die Interaktion mit dem Gerinnungssystem unbedeutend. Die Autoren fanden keinen Unterschied zwischen Kochsalz- und Ringerlösung als Träger von HES 450.

Auch zur Antigenexpression liegen unterschiedliche Untersuchungen vor, die sich aber derzeit nicht zu einem homogenen Gesamtbild zusammenfügen lassen. Einen Effekt von HES auf die Expression von CD61, das aufgrund seiner Schlüsselfunktion bei der Thrombusformation diesbezüglich besonders gut untersucht ist, ist umstritten. Es wurde zwar in einigen Untersuchungen berichtet, dass HES die Expression reduziert (z.B. STÖGERMÜLLER et al. 2000 [HES 200], KOZEK-LANGENECKER 2005), es liegen aber auch gegenteilige Untersuchungen vor (DEUSCH et al. 2004). In der letztgenannten Studie wird sogar von einer Stimulation durch eine HES 550-Zubereitung berichtet, allerdings erklärt durch deren Calciumchloriddihydrat-haltiges Lösungsmittel.

Vergleichende Studien verschiedener Molekulargewichte zeigen überwiegend keinen verwertbaren Unterschied zwischen den HES-Präparaten.

FRANZ et al. (2001) legten eine vergleichende klinische Untersuchung der Volumensubstitution mit HES der Molekulargewichte 70, 130, 200 und 450 kDa sowie Kochsalzlösung vor. Dabei fand sich eine Hemmung der Plättchenfunktion, ausgedrückt

durch eine Reduktion der Expression von CD61 durch HES der Molekulargewichte 70, 200 und 450 kDa, nicht aber nach HES 130. Dieses Ergebnis bestätigte eine spätere Studie der gleichen Arbeitsgruppe (THALER et al. 2005). In der vorliegenden Untersuchung war die Vergleichbarkeit der Gruppen durch deutlich unterschiedliche Ausgangswerte eingeschränkt; dennoch ließ sich allenfalls ein Abfall - von einem deutlich höheren Ausgangsniveau - nach HES 130 nachweisen, während die Expression nach HES 200 eher leicht anstieg. Diese Ergebnisse lassen sich mit den Befunden von FRANZ et al. (2001), der ebenfalls die durchflusszytometrische Messung anwendete, nicht in Einklang bringen. Sie sind vielmehr direkt gegensätzlich.

JÜTTNER et al. (2004) fanden bei thrombopenischen Patienten nach Lebertransplantation keinerlei Einfluss von HES 200 auf die CD61-Expression. Auch DEUSCH et al. (2004) konnte keine Auswirkungen von HES 200 bzw. 600 auf die CD61-Expression feststellen.

Insgesamt wird ein Einfluss der HES (und ein Unterschied der verschiedenen Molekulargewichte) auf die Expression des CD61 (Glykoprotein IIb/IIIa, das meist untersuchte Oberflächenmerkmal) zumindest für die schnell abbaubaren Zubereitungen niedrigen Molekulargewichts überwiegend abgelehnt, ebenso wie ein relevanter Einfluss auf die Gerinnungsfunktion. Allenfalls wird (z.B. von FRANZ et al. 2001, KOZEK-LANGENECKER 2005, THALER et al. 2005) auf eine mögliche Inhibition der CD61-Expression und nicht auf eine Steigerung, wie sie sich aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit ergeben könnte, hingewiesen.

Ganz abgesehen von möglichen formalen Einflüssen auf den Gerinnungsprozess wird der klinisch relevante Einfluss von HES - eine Steigerung des Blutverlustes - in der Literatur abgelehnt (z.B. HAHN 1996).

Eine klinisch sichtbare diffuse Blutung unter HES kann daher auf rheologische Faktoren oder auch Fibrinpolymerisationsstörungen zurückzuführen sein. Ein leichter thrombozytenaktivierender Effekt primärer (direkt durch die Infusionslösung) oder sekundärer Natur (durch Hypervolämie, Hämodilution oder höhere

Blutflussgeschwindigkeit) kann zwar aufgrund der Ergebnisse unserer Untersuchung nicht ausgeschlossen werden, ist aber höchstwahrscheinlich für die Gerinnungsfunktion irrelevant.

Mögliche Einschränkungen der Anwendung von HES-Lösungen ergeben sich durch ihre Nebenwirkungen, in erster Linie Nierenfunktionsstörungen, Juckreiz und das Risiko anaphylaktoider Reaktionen. Deren Relevanz wird in der Literatur intensiv diskutiert, sie zu beurteilen, ist aber nicht Gegenstand der vorliegenden Untersuchung. Auch diesbezüglich unterscheiden sich HES 130 und HES 200 allerdings nicht (WIEDERMANN 2004).

### **4.3 Beurteilung der Methoden**

Die Interpretation der Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung muss unter methodischen Gesichtspunkten kritisch diskutiert werden. Dafür sind folgende Gründe zu nennen:

1. In der Untersuchung erfolgte die Bestimmung der Antigenexpression im plättchenreichen Plasma nach PBS-Verdünnung und Inkubation, während in der aktuellen Literatur ausschließlich die durchflusszytometrische Messung im Vollblut verwendet wird (z.B. FRANZ et al. 2001, JÜTTNER et al. 2004, THALER et al. 2005). Dadurch wird nicht nur die Vergleichbarkeit der Ergebnisse eingeschränkt, sondern der erheblich niedrigere Zeitaufwand der Durchflusszytometrie erlaubt auch wesentlich höhere Fallzahlen, als sie in der vorliegenden Untersuchung praktikabel waren. Darüber hinaus ist eine Methode gegenüber Störungen und Fehlern grundsätzlich umso anfälliger, je zahlreicher und komplexer die einzelnen Arbeitsschritte sind. Im Fall von widersprüchlichen Ergebnissen sind die Resultate der Durchflusszytometrie daher wohl als „robuster“ anzusehen, weshalb sich diese Methode durchgesetzt hat.

2. „Per protocol“ wurden den Patienten zunächst 1000 ml HES- bzw. 2000 ml Ringerlösung verabreicht, die weitere Substitution erfolgte nach jeweilig erforderlichem Blutverlust. Entsprechend unterschiedlich waren die tatsächlich verabreichten Mengen:

- Ringerlösung: 4500 bis 10100 ml (Mittelwert  $6183 \pm 2078$  ml)
- HAES-Steril<sup>®</sup>: 1500 bis 5000 ml (Mittelwert  $3583 \pm 1393$  ml), dazu durchschnittlich 4433 ml Ringerlösung
- Voluven<sup>®</sup>: 1000 bis 2000 ml (Mittelwert  $1667 \pm 408$  ml), dazu durchschnittlich 2583 ml Ringerlösung

Es muss aufgrund dieser Volumenunterschiede (nahezu die doppelte Substitutionsmenge in der HAES-Steril<sup>®</sup>- gegenüber der Voluven<sup>®</sup>-Gruppe) von einem deutlich unterschiedlichen Blutverlust in den Gruppen ausgegangen werden.

3. Zudem wurden die Operationen, auf denen die vorliegende Untersuchung basiert (radikale Prostatektomie oder transvesikale Prostataresektion), während der Datenerhebungsphase aus klinikexternen Gründen nicht mehr mit der erwarteten Frequenz vorgenommen, so dass die ursprünglich angestrebte Patientenzahl verfehlt wurde. Die Zahl von nur mehr 6 Patienten pro Gruppe limitiert die Übertragbarkeit der Ergebnisse der Studie auf die Grundgesamtheit aller Patienten.

#### **4.4 Schlussfolgerungen**

Die in der vorliegenden Untersuchung verwendeten HES-Zubereitungen (HAES-Steril<sup>®</sup> und Voluven<sup>®</sup>) üben bei Gabe von therapeutisch üblichen Volumina keinen klinisch relevanten Einfluss auf die Thrombozytenfunktion aus. Überzeugende Unterschiede in Abhängigkeit vom Molekulargewicht der HES fanden sich nicht. Überwiegend wird in der aktuellen Literatur auch ein Einfluss höhermolekularer Präparate verneint, dennoch sollte aber der Einsatz von HES der Molekulargewichte  $\leq 200$  kDa vorgezogen werden.

In Übereinstimmung mit der aktuellen Literatur ist der Einsatz von niedermolekularer HES zur perioperativen Volumensubstitution bei Patienten mit intaktem Gerinnungssystem als unproblematisch und sicher zu betrachten (DIETERICH 2001, KOZEK-LANGENECKER 2005). Auch unter dem Gesichtspunkt des Kosten-Nutzen-Verhältnisses ist HES gegenüber Kristalloiden vorteilhaft (BOLDT et al. 2001).

## 5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Studie wurde *in vitro* und *in vivo* der Einfluss von Hydroxyethylstärke (HES) von 130 bzw. 200 kDa Molekulargewicht (Voluven<sup>®</sup> bzw. HAES-Steril<sup>®</sup>) auf die Antigenexpression von Thrombozyten untersucht. *In vitro* wurde durch Zusatz von HES oder isotoner Kochsalzlösung in der Kontrollgruppe zu den Thrombozyten gesunder Probanden die Aktivierung der Thrombozyten überprüft. Die klinische Studie erfolgte als randomisierte Doppelblindstudie an 18 Patienten, die sich unter einer Kombinationsnarkose (Intubationsnarkose und Periduralanästhesie), einer radikalen Prostatektomie (n=17) bzw. einer transvesikalen Prostataresektion (n=1) unterzogen. Die Blutverluste der Kontrollgruppe wurden hier mit Ringerlösung substituiert.

Während die Ergebnisse der *in vitro*-Studie keinen Hinweis auf einen Einfluss der HES im Sinne einer Aktivierung der Thrombozyten ergaben, sahen wir in der *in vivo*-Studie mögliche Hinweise auf eine solche: Statistisch signifikant war beispielsweise der Unterschied zwischen den Gruppen mit Ringerlösung und Voluven<sup>®</sup> für CD42b (GP Ib), CD31 (GP IIa) und CD61 (GP IIb/IIIa) sowie zwischen den Gruppen mit Ringerlösung und HAES-Steril<sup>®</sup> für CD62 (P-Selektin), CD61 und CD31 (GP IIa). Unterschiede in Abhängigkeit vom Molekulargewicht der HES ergaben sich zwischen HAES-Steril<sup>®</sup> und Voluven<sup>®</sup> für CD62 und CD42b. Die Hinweise auf eine mögliche Thrombozytenaktivierung sind jedoch nicht eindeutig, und auch die aktuelle Literatur kommt überwiegend zu dem Schluss, dass eine Beeinflussung des Gerinnungssystems, sofern sie überhaupt auf die HES-Gabe zurückzuführen ist, quantitativ marginal und klinisch wahrscheinlich unbedeutend ist und bei Verwendung niedermolekularer Zubereitungen  $\leq 200$  kDa keine Abhängigkeit vom Molekulargewicht zeigt.

Der Einsatz von niedermolekularer HES zur perioperativen Volumensubstitution bei Patienten mit intaktem Gerinnungssystem ist damit bezüglich der untersuchten Parameter der Koagulation als unproblematisch und sicher zu betrachten, da die Befunde eher auf einen prokoagulatorischen Effekt, nicht jedoch auf eine Gerinnungshemmung hindeuten.

## 6 Summary

The objective was to determine the effect of hydroxyethyl starch (HES) with molecular weights of 130 and 200 kD (Voluven<sup>®</sup> and HAES-Steril<sup>®</sup> respectively) on the antigen expression of platelets *in vitro* and *in vivo*. *In vitro*, platelet activation was determined after addition of HES in the intervention group or isotonic saline solution in the control group using platelets from healthy volunteers. The clinical trial was conducted as a randomised, double-blind study including 18 patients undergoing radical prostatectomy (n=17) or transvesical resection of the prostate gland (n=1) under combined (general and peridural) anaesthesia. The blood loss in the control group was substituted with Ringer's solution.

Whereas the *in vitro* study yielded no evidence that hydroxyethyl starch solutions have a systemic effect on platelet activation, the *in vivo* study provides indications for an activation: we were able to demonstrate a statistically significant difference between the groups for Ringer's solution and Voluven<sup>®</sup> for CD42b (GPIb), CD31 (GP IIa) and CD61 (GP IIb/IIIa) and between the groups for Ringer's solution and HAES-Steril<sup>®</sup> for CD62 (P-Selectin), CD61 and CD31 (GP IIa). Differences subjected to the molecular weight of HES were yielded between HAES-Steril<sup>®</sup> and Voluven<sup>®</sup> for CD62 and CD42b. However, these results are not unequivocal, and recent studies conclude that the effect of HES on coagulation is marginal and most probably of no clinical significance – irrespective of the molecular weight when HES preparations of low molecular weight  $\leq 200$  kD are used.

The application of low molecular weight HES in perioperative volume substitution in patients with intact coagulation is therefore considered safe; the results demonstrate a procoagulant rather than an anticoagulant effect.

## 7 Literaturverzeichnis

- Adams, H.A., Piepenbrock, S., Hempelmann G.: Volumenersatzmittel - Pharmakologie und klinischer Einsatz. *Anesthesiol. Intensivmed. Notfallmed. Schmerzther.* 33: 2-17 (1998)
- Baldassarre, S., Vincent, J.L.: Coagulopathy induced by hydroxyethyl starch. *Anesth. Anal.* 84: 451-453 (1997)
- Bauer, C.: Blut. In: Klinge R., Silbernagel S. (Hrsg): *Lehrbuch der Physiologie*. Thieme, Stuttgart: 183-211 (1994)
- Bayliss, W.M.: The action of gum acacia on the circulation. *J. Pharmac. Exp. Ther.* 15: 29 (1920)
- Berman, C.L., Yeo, E.L., Wencel-Drake, J.D., Furie, B.C., Ginsberg, M.H., Furie, B.: A platelet alpha-granule membrane protein that is associated with the plasma membrane after activation. *J. Clin. Invest.* 78: 130-137 (1986)
- Berman, C.L., Yeo, E.L., Furie, B.C., Furie, B.: PADGEM protein. *Methods Enzymol.* 169: 311-326 (1989)
- Bernard, A., Boumsell, L., Hill, C.: Joint report of the first international workshop on human leucocytes differentiation antigens by the investigators of the participating laboratories. In: Bernard, A., Boumsell, L., Dausset, J., Milstein, C. (eds.): *Leucocyte Typing*. Springer, Berlin: 621-630 (1984)
- Blaicher, A.M., Reiter, W.J., Blaicher, W., Kettner, S.C., Felfernig, M., Grabner, C.M., Zimpfer, M.: The effect of hydroxyethyl starch on platelet aggregation *in vitro*. *Anesth. Analg.* 86: 1318-1321 (1998)

- Blann, A.D., Lip, G.Y.H., Islim, I.F., Beevers, D.G.: Evidence of platelet activation in hypertension. *J. Hum. Hypertens.* 11: 607-609 (1997)
- Boldt, J., Knothe, C., Zickmann, B., Andres, P., Dapper, F., Hempelmann, G.: Influence of different intravascular volume therapies on platelet function in patients undergoing cardiopulmonary bypass. *Anesth. Analg.* 76: 1185-1190 (1993)
- Boldt, J., Suttner, S., Hüttner, I., Kumle, B., Piper, S., Krumholz, W.: Are costs of a crystalloid-based volume replacement regimen lower than of a colloid-based volume replacement strategy? *Infus. Ther. Transfus. Med.* 28: 144-149 (2001)
- Boldt, J., Haisch, G., Suttner, S., Kumle, B., Schellhaass, A.: Effects of a new modified, balanced hydroxyethyl starch preparation (Hextend<sup>®</sup>) on measures of coagulation. *Br. J. Anaesth.* 89: 722-728 (2002)
- Boldt, J.: Hydroxyethylstärke (HES). *Wien. Klin. Wochenschr.* 116/5: 159-169 (2004)
- Calvete, J.J.: Platelet integrin GPIIb/IIIa: structure-function correlations. An update and lessons from other integrins. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 222: 29-38 (1999)
- Chang, J.C., Gross, H.M., Jang, N.S.: Disseminated intravascular coagulation due to intravenous administration of hetastarch. *Am. J. Med. Sci.* 300: 301-303 (1990)
- Clemetson, K.J.: Platelet Activation: Signal transduction via membrane receptors. *Thromb. Haemost.* 74: 111-116 (1995)
- Clemetson, K.J., Clemetson, J.M.: Platelet GPIb-V-IX complex: structure, function, physiology and pathology. *Semin. Thromb. Hemost.* 21:130-156 (1995)
- Dailey, S.E., Dysart, C.B., Langan, D.R., Slye, M.J., Nuttall, G.A., Schrader, L.M., Williams, B.A., Oliver, W.C.: An *in vitro* study comparing the effects of Hextend, Hespan, normal saline, and lactated Ringer's solution on thrombelastography and the activated partial thromboplastin time. *J. Cardiovasc. Vasc. Anesth.* 19: 358-361 (2005)

- Deusch, E., Gamsjäger, T., Kress, H.-G., Kozek-Langenecker, S.A.: Binding of hydroxyethyl starch molecules to the platelet surface. *Anesth. Analg.* 97: 680-683 (2003)
- Deusch, E., Thaler, U., Kozek-Langenecker, S.A.: The effects of high molecular weight hydroxyethyl starch solutions on platelets. *Anesth. Analg.* 665-668 (2004)
- Dieterich, H.-J.: Dreimal „K“. Die Kristalloid-Kolloid-Kontroverse. *HAES-Info* 2: 2-8 (2001)
- Eckhardt, R.: Grundlagen der Durchflusszytometrie: Problemerkennung und -bewältigung (Teil 1). *MTA* 9: 992-994 (1994)
- Entholzner, E.K., Mielke, L.L., Calatzis, A.N., Feyh, J., Hipp, R., Hargasser, S.R.: Coagulation effects of a recently developed hydroxyethyl starch (HES 130/0.4) compared to hydroxyethyl starches with higher molecular weight. *Acta Anaesthesiol. Scand.* 44: 1116-1121 (2000)
- Ernst, M.: Monoklonale Antikörper: Theoretische Grundlagen und Produktion (Teil 1). *MTA* 11: 4-6 (1987)
- Franz, A., Bräunlich, P., Gamsjäger, T., Felfernig, M., Gustorff, B., Kozek-Langenecker, S.A.: The effects of hydroxyethyl starches of varying molecular weights on platelet function. *Anesth. Analg.* 92: 1402-1407 (2001)
- Gallandat Huet, R.C.G., Siemons, A.W., Baus, D., van Rooyen-Butijn, W.T., Haagenaars, J.A.M., van Oeveren, W., Bepperling, F.: A novel hydroxyethyl starch (Voluven<sup>®</sup>) for effective perioperative plasma volume substitution in cardiac surgery. *Can. J. Anesth.* 47: 1207-1215 (2000)
- Grönwall, A., Ingelmann, B.: Untersuchungen über Dextran und sein Verhalten bei parenteraler Zufuhr. I. *Acta. Physiol. Scand.* 7: 97 (1944)

- Gutensohn, K., März, M., Kühnl, P.: Alteration of platelet-associated membrane glycoproteins during extracorporeal apheresis of peripheral blood progenitor cells. *J. Hematother.* 6: 315-321 (1997)
- Gutensohn, K., Sputtek, A., Voss, A., Stahl, R., Kühnl, P.: Modification of activation-dependent platelet antigens CD62p and CD63 during haemodialysis. *Transf. Sci.* 17: 489-491 (1996)
- Hahn, R.G.: Dextran 70 and blood loss during transurethral resection of the prostate. *Acta Anaesthesiol. Scand.* 40: 820-823 (1996)
- Haisch, G., Boldt, J., Krebs, C., Kumle, B., Suttner, S., Schulz, A.: The influence of intravascular volume therapy with a new hydroxyethyl starch preparation (6% HES 130/0.4) on coagulation in patients undergoing major abdominal surgery. *Anesth. Analg.* 92: 565-571 (2001)
- Hayashi, K., Furukawa, K., Takamoto, S., Shiku, H., Yamada, K.: Analysis of cell surface molecules on human platelets with monoclonal antibodies. Identification of four platelet-specific surface molecules. I. *Acta Haematol.* 75: 141-146 (1986)
- Hernandez, M.R., Escolar, G., Bozzo, J., Galan, A.M., Ordinas, A.: Inhibition of fibrin deposition on the subendothelium by monoclonal antibody to polymorphonuclear leukocyte integrin CD11b. Studies in a flow system. *Haematologica* 82: 566-571 (1997)
- Huang, C.L., Cheng, J.C., Liao, C.H., Stern, A., Hsieh, J.T., Wang, C.H., Hsu, H.L., Tseng, C.P.: Disabled-2 is a negative regulator of integrin alpha(IIb)beta(3)-mediated fibrinogen adhesion and cell signaling. *J. Biol. Chem.* 279: 42279-42289 (2004)
- Huber, H., Löffler, H. (Hrsg.): *Methoden der diagnostischen Hämatologie.* Springer, Berlin (1994)
- Hüsselmann, H.: Speicherungserscheinungen beim Menschen nach Periston. *Klin. Wochenschr.* 30: 801 (1952)

- Hüttner, I., Boldt, J., Haisch, G., Suttner, S., Kumle, B., Schulz, H.: Influence of different colloids on molecular markers of haemostasis and platelet function in patients undergoing major abdominal surgery. *Br. J. Anaesth.* 85: 417-423 (2000)
- Jamnicky, M., Zollinger, A., Seifert, B., Popovic, D., Pasch, T., Spahn, D.R.: Compromised blood coagulation: An *in vitro* comparison of hydroxyethyl starch 130/0.4 and hydroxyethyl starch 200/0.5 using thrombelastography. *Anesth. Analg.* 87: 989-993 (1998)
- Jamnicky, M., Bombeli, T., Seifert, B., Zollinger, A., Camenzind, V., Pasch, T., Spahn, D.R.: Low- and medium-molecular-weight hydroxyethyl starches. Comparison of their effect on blood coagulation. *Anesthesiology* 93: 1231-1237 (2000)
- Johnston, G.I., Kurosky, A., McEver, R.: Structural and biosynthetic studies of the granule membrane protein, GMP-140, from human platelets and endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 264: 1816-1823 (1989)
- Johnston, G.I., Cook, R.G., McEver, R.P.: Cloning of GMP-140, a granule membrane protein of platelets and endothelium: sequence similarity to proteins involved in cell adhesion and inflammation. *Cell* 56: 1033 (1989)
- Jorns, G.: Osmotische Entwässerung bei Hirndruck durch hypertotonische Lösungen mit Kolloidzusatz. *Arch. Klein. Chir.* 168: 639 (1940)
- Jüttner, B., Kuse, E.R., Elsner, H.-A., Heine, J., Jaeger, K., Piepenbrock, S., Scheinichen, D.: Differential platelet receptor expression following hydroxyethyl starch infusion in thrombocytopenic orthotopic liver transplantation recipients. *Eur. J. Anaesthesiol.* 21: 309-313 (2004)
- Köhler, G., Milstein, C.: Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256: 495-497 (1975)
- Kozek-Langenecker, S.A.: The effects of drugs used in anaesthesia on platelet membrane receptors and on platelet function. *Curr. Drug Targets* 3: 247-258 (2002)

- Kozek-Langenecker, S.A.: Effects of hydroxyethyl starch solutions on hemostasis. *Anesthesiology* 103: 654-660 (2005)
- Kretschmer, V., Daraktchiev, A., Bade, S., Karger, R., Kratzer, M.A.A.: Geht Hämodilution mit gesteigerter Hämostase einher? *Anaesthesiol. Intensivmed. Notfallmed. Schmerzther.* 39: 751-756 (2004)
- Langefeld, T.: Durchflusszytometrische Untersuchungen zur Funktion polymorphkerniger Granulozyten und Monozyten bei dem Krankheitsbild des Diabetes mellitus TypII. Dissertation, Universität Gießen (2000)
- Langeron, O., Doelberg, M., Ang, E.-T., Bonnet, F., Capdevila, X., Coriat, P.: Voluven<sup>®</sup>, lower substituted novel hydroxyethyl starch (HES 130/0.4), causes fewer effects on coagulation in major orthopedic surgery than HES 200/0.5. *Anesth. Analg.* 92: 855-862 (2001)
- Larsen, E., Celi, A., Gilbert, G., Furie, B., Erban, J., Bonfanti, R., Wagner, D.: PADGEM Protein: A receptor that mediates the interaction of activated platelets with neutrophils and monocytes. *Cell* 59: 305-312 (1989)
- Lawrence, M., Springer, T.: Leukocytes roll on a selectin at physiologic flow rates: Distinction from prerequisite for adhesion through integrins. *Cell* 65: 859-873 (1991)
- Lefler, A.M., Weyrich, A.S., Buerke, M.: Role of selectins, a new family of adhesion molecules, in ischemia-reperfusion injury. *Cardiovasc. Res.* 28: 289-294 (1994)
- Lefkovits, J., Plow, E., Topol, E.: Platelet glycoprotein IIb-IIIa receptors in cardiovascular medicine. *N. Engl. J. Med.* 332: 1553-1559 (1995)
- Lösche, W., Dressel, M., Krause, S., Redlich, H., Spangenberg, P., Heptinstall, S.: Contact-induced modulation of neutrophil elastase secretion and phagocytic activity by platelets. *Blood Coagul. Fibrinolysis* 7:210-213 (1996)

- Madjdpour, C., Dettori, N., Frascarolo, P., Burki, M., Boll, M., Fisch, A., Bombeli, T., Spahn, D.R.: Molecular weight of hydroxyethyl starch: Is there an effect on blood coagulation and pharmacokinetics? *Br. J. Anaesth.* 94: 569-576 (2005)
- McEver, R.P., Martin, M.N.: A monoclonal antibody to a membrane glycoprotein binds only to activated platelets. *J. Biol. Chem.* 259: 9799-9804 (1984)
- McEver, R.P.: GMP-140: a receptor for neutrophils and monocytes on activated platelets and endothelium. *J. Cell. Biochem.* 45: 156-161 (1991)
- McEver, R.P.: Leukocyte interactions mediated by selectins. *Thromb. Haemost.* 66: 80-87 (1991)
- Metcalf, P., Watkins, N.A., Ouwehand, W.H., Kaplan, C., Newman, P., Kekomaki, R., De Haas, M., Aster, R., Shibata, Y., Smith, J., Kiefel, V., Santoso, S.: Nomenclature of human platelet antigens. *Vox Sang.* 85: 240-245 2003
- Möller, T.: Einflüsse von HES (200/0,5) und HES (130/0,4) auf die Thrombozytenfunktion und das zirkulierende Blutvolumen. Dissertation, Univ. Gießen (2005)
- Morawitz, C.H.: Beobachtungen über den Wiedereinsatz der Bluteiweißkörper. *Beitr. Chem. Physiol. Path.* 7: 153-164 (1906)
- Mueller-Eckhardt, C., Scharf, R., Greinacher, A.: Thrombozytäre hämorrhagische Diathesen. In: Begemann H., Rastetter J. (Hrsg.): *Klinische Hämatologie*. Thieme, Stuttgart: 938-943 (1993)
- Mühlhause-Schlau, M.: Hämodynamische Effekte verschiedener Hydroxäthylstärke-Lösungen bei kardiochirurgischen Patienten. Inaugural-Dissertation Gießen (1990)
- Niemi, T.T., Kuitunen, A.H.: Artificial colloids impair haemostasis. An *in vitro* study using thromboelastometry coagulation analysis. *Acta Anaesthesiol. Scand.* 49: 373-378 (2005)

- Petriges, P.: Immunsystem. In: Löffler, G., Petriges, P. (Hrsg.): Physiologische Chemie. Springer, Heidelberg: 927-950 (1990)
- Petroianu, G.A., Liu, J., Maleck, W.H., Mattinger, C., Bergler, W.F.: The effect of *in vitro* hemodilution with gelatin, dextran, hydroxyethyl starch, or Ringer's solution on Thrombelastograph. *Anesth. Analg.* 90: 795-800 (2000)
- Phillips, D.R., Charo, I.F., Parise, L.V., Fitzgerald, L.A.: The platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa complex. *Blood* 71: 831-843 (1988)
- Quinn, M.J., Byzova, T.V., Qin, J., Topol, E.J., Plow, E.F.: Integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 and its antagonism. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23: 945-952 (2003)
- Raffael, A., Nebe, T., Valet, G.: Grundlagen der Durchflusszytometrie. In: Schmitz, G., Rothe, G. (Hrsg.): Durchflusszytometrie in der klinischen Zelldiagnostik. Schattauer, Stuttgart (1994)
- Ruttman, T.G., James, M.F.M., Aronson, I.: *In vivo* investigation into the effects of haemodilution with hydroxyethyl starch (200/0.5) and normal saline on coagulation. *Br. J. Anaesth.* 80: 612-616 (1998)
- Samama, C.M., Thiry, D., Elalamy, I., Diaby, M., Guillosson, J.-J., Kieffer, E., Coriat, P.: Perioperative activation of hemostasis in vascular surgery patients. *Anesthesiology* 94: 74-78 (2001)
- Schmidt, R.: Monoklonale Antikörper in der Diagnostik von Zelloberflächenantigenen. In: Schmitz, G., Rothe, G. (Hrsg.): Durchflusszytometrie in der klinischen Zelldiagnostik. Schattauer, Stuttgart: 63-75 (1994)
- Schmidt-Thome, J., Mager, A., Schöne H.H.: Zur Chemie eines neuen Plasmaexpanders. *Arzneim. Forsch.* 12: 378 (1962)

- Shattil, S., Hoxie, J., Cunningham, M., Brass, L.: Changes in the platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa complex during platelet activation. *J. Biol. Chem.* 260: 11107-11114 (1985)
- Spangenberg, P., Redlich, H., Bergmann, I., Lösche, W., Götzrath, M., Kehrel, B.: The platelet glycoprotein II-IIIa complex is involved in the adhesion of activated platelets to leukocytes. *Thromb. Haemost.* 70: 514-521 (1993)
- Steward, M., Male, D.: Immunologische Testmethoden. In: Roitt, I., Brostoff, J., Male, D. (Hrsg.): *Kurzes Lehrbuch der Immunologie*. Thieme, Stuttgart: 352-354 (1995)
- Stöger Müller, B., Stark, J., Willschke, H., Felfernig, M., Hoerauf, K., Kozek-Langenecker, S.A.: The effect of hydroxyethyl starch 200 kD on platelet function. *Anesth. Analg.* 91: 823-827 (2000)
- Thaler, U., Deusch, E., Kozek-Langenecker, S.A.: *In vitro* effects of gelatin solutions on platelet function: A comparison with hydroxyethyl starch solutions. *Anaesthesia* 60: 554-559 (2005)
- Treib, J., Haass, A., Pindur, G., Seyfert, U.T., Treib, W., Grauer, M.T., Jung, F., Wenzel, E., Schimrigk, K.: HES 200/0.5 is not HES 200/0.5. Influence of the C2/C6 hydroxyethylation ratio of hydroxyethyl starch (HES) on hemorheology, coagulation and elimination kinetics. *Thromb. Haemost.* 74: 1452-1456 (1995)
- Treib, J., Haass, A., Pindur, G., Grauer, M.T., Treib, W., Wenzel, E., Schimrigk, K.: Influence of low and medium molecular weight hydroxyethyl starch on platelets during a long-term hemodilution in patients with cerebrovascular diseases. *Arzneimittelforschung* 46: 1064-1066 (1996)
- Treib, J., Haass, A.: Rheologische Eigenschaften von Hydroxyethylstärke. *Dtsch. Med. Wochenschr.* 122: 1319-1322 (1997)
- Treib, J., Baron, J.F., Grauer, M.T., Strauss, R.G.: An international view of hydroxyethyl starches. *Intensive Care Med.* 25: 258-268 (1999)

- Trumple, E.R., Muizelaar, J.P., Myseros, J.S., Choi, S.C., Warren, B.B.: Coagulopathy with the use of hetastarch in the treatment of vasospasm. *J. Neurosurg.* 82: 44-47 (1995)
- Tschöpe, D.: Diabetische Thrombozytopathie. Habilitationsschrift, Universität Düsseldorf (1992)
- Waitzinger, J., Bepperling, F., Pabst, G., Opitz, J., Müller, M., Baron, J.F.: Pharmacokinetics and tolerability of a new hydroxyethyl starch (HES) specification [HES (130/04)] after single-dose infusion of 6% or 10% solutions in healthy volunteers. *Clin. Drug Invest.* 16: 151-160 (1998)
- Waitzinger, J., Bepperling, F., Pabst, G., Opitz, J., Fackelmayer, A., Boldt, J.: Effect of a new hydroxyethyl starch (HES) specification [6% HES (130/0.4)] on blood and plasma volumes after bleeding in 12 healthy male volunteers. *Clin. Drug Invest.* 17: 119-125 (1999)
- Warren, B.B., Duriex M.E.: Hydroxyethylstarch: Safe or not? *Anesth. Analg.* 84: 206-212 (1997)
- Wiedermann, C.J.: Hydroxyethyl starch – can the safety problems be ignored? *Wien. Klin. Wochenschr.* 116: 583-594 (2004)
- Wiedersheim, M.: An investigation of oxyethyl starch as a new plasma volume expander in animals. *Archs. Int. Pharmacodyn.* 111: 353 (1957)
- Youssefian, T., Masse, J., Rendu, F., Guichard, J., Cramer, E.: Platelet and megakaryocyte dense granules contain glycoproteins Ib and IIb-IIIa. *Blood* 89: 4047-4057 (1997)

**Eigene Publikation zum Dissertationsthema:**

- Langefeld T.W., Köhler A., Dietrich G., Hirsch J., Menges T., Hempelmann G.: Die Antigenexpression auf Thrombozyten unter Volumensubstitution mit Hydroxyethylstärkepräparaten bei radikalen Prostatektomien. Deutscher Anästhesistencongress 9.-12.04.2003; Vortragsnummer FV-404.4

## 8 Danksagung

Ich widme diese Arbeit meinem lieben Ehemann, Thomas Hartmann. Danke, dass es dich gibt.

Besonderer Dank gilt meinem Doktorvater PD Dr. Gerald Dietrich und Professor Dr. Dr. Gunter Hempelmann für die Überlassung des Themas und die Bereitstellung der notwendigen Materialien.

Ebenfalls danken möchte ich Dr. Tanja Langefeld und Dr. Jan Hirsch für ihr persönliches Engagement bei der Betreuung der Arbeit.

Dank auch an die Mitarbeiterinnen des Lungenfunktionslabors für die Unterstützung bei der Labortätigkeit während der Einarbeitungsphase und dem folgenden experimentellen Teil dieser Untersuchung.

Bedanken möchte ich mich auch bei den Patienten, die sich trotz ihrer schwierigen Lebenssituation zur Teilnahme an der Studie bereiterklärt haben und ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Eben solcher Dank geht an die Probanden.

Für das Redigieren der Arbeit danke ich Dieter, Jürgen, Julia und Juliane. Thorsten, danke für dein Engagement.

Abschließend möchte ich mich bei meiner Familie für den immerwährenden Rückhalt und die stetige Unterstützung während des gesamten Studiums bedanken.

## 9 Lebenslauf

### **Antje Hartmann, geb. Köhler**

Geboren am 02.08.1976 in Bad Nauheim

Stammheimerstr.9; 63674 Altstadt

1983-1987	Grundschule Altstadt
1987-1992	Wolfgang-Ernst-Gymnasium Büdingen
1992-1996	Gymnasium Nidda
	Abschluss: Abitur
01.10.96-05.05.03	Studium der Humanmedizin an der Justus-Liebig-Universität Gießen
15.07.03-30.09.04	Ärztin im Praktikum im Hochwaldkrankenhaus Bad Nauheim in der Abteilung Anästhesiologie und Intensivmedizin; Leiterin: Dr. B. Dahlbokum
01.10.04-31.12.04	Ärztin in Weiterbildung im Hochwaldkrankenhaus Bad Nauheim in der Abteilung Anästhesiologie und Intensivmedizin; Leiterin: Dr. B. Dahlbokum
Seit 01.01.05	Ärztin in Weiterbildung am Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH, in der Klinik für Anästhesiologie, Intensivmedizin, Schmerztherapie und Palliativmedizin; Leiter: Prof. Dr. Dr. h. c. G. Hempelmann