

Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung
der Technischen Universität München
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. B. Gänsbacher)

**DER EINSATZ DES ROTEG COAGULATION ANALYZERS
ZUR GLOBALEN HÄMOSTASEDIAGNOSTIK
IN KLINIK UND FORSCHUNG**

MICHAELA STEMBERGER

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin
der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades
eines Doktors der Medizin genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. S. Haas

2. Univ.– Prof. Dr. B. Gänsbacher

Die Dissertation wurde am 18.12.2002 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 12.02.2003 angenommen.

Meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	Das klassische Thromboelastogramm zur Analyse der Blutgerinnung ...	1
1.2	Der roTEG Coagulation Analyzer	7
1.3	Aufgabenstellung	12
2	MATERIAL UND METHODEN	13
2.1	roTEG Analysen	13
2.2	Versuche zur Imitation der von Stahloberflächen ausgehenden Aktivierung der Hämostase	13
2.3	Untersuchungen in Abhängigkeit von der Lagerung	13
2.3.1	roTEG Analyse	13
2.3.2	PMN-Elastase ELISA	14
2.4	Methoden zur Bestimmung der Wirkung von GPIIb/IIIa-Rezeptor- antagonisten durch roTEG und Thrombozytenaggregation	15
2.4.1	roTEG Analyse	15
2.4.2	Thrombozytenaggregation nach Born	16
2.5	Qualitätskontrolle von Fresh Frozen Plasma nach Virusinaktivierung mit einer Ultraschall Technik	17
2.6	Untersuchungen zur Hämokompatibilität von Biomaterial- beschichtungen	17
2.7	Untersuchungen zur Interaktion zwischen Röntgenkontrastmitteln und Blutgerinnung	18
2.7.1	roTEG Analyse	18
2.7.2	Thrombozytenaggregation nach Born	19
3	ERGEBNISSE	20
3.1	Daten zu der nicht aktivierten Thromboelastographie	20
3.2	Daten zur Wirkung von GPIIb/IIIa-Rezeptorantagonisten anhand von roTEG Analyse und kollageninduzierter Aggregation der Plättchen....	24

3.3	Daten der roTEG Analyse von ultraschallbehandelten FFP	28
3.4	Daten zur Hämokompatibilität von Biomaterialbeschichtungen	29
3.5	Daten zur Interaktion zwischen Röntgenkontrastmitteln und Blutgerinnung	30
4	DISKUSSION	36
4.1	Wertigkeit der nicht aktivierten Thromboelastographie	36
4.2	Monitoring von GPIIb/IIIa-Rezeptorantagonisten.....	42
4.3	Einfluß von Ultraschall auf die Gerinnungsfähigkeit von Blutplasma ..	49
4.4	Hämokompatibilität von Biomaterialbeschichtungen	53
4.5	Interaktion von Röntgenkontrastmitteln und der Blutgerinnung.....	56
5	ZUSAMMENFASSUNG	59
6	LITERATURVERZEICHNIS.....	61
7	ABBILDUNGEN UND TABELLEN.....	69
8	LEBENS LAUF	72
9	DANKSAGUNG.....	74

1 EINLEITUNG

1.1 Das klassische Thromboelastogramm zur Analyse der Blutgerinnung

Im Jahr 1947 stellte Professor *Hartert* erstmals die Methode der Thromboelastographie vor. Neben Medizin hatte Professor *Hartert*, der zeitlebens als Internist in Karlsruhe tätig war, Elektrotechnik studiert. Seine breite wissenschaftliche Ausbildung legte wahrscheinlich den Grundstein für die Entwicklung eines hochempfindlichen Gerätes, das nach einem völlig neuartigen Prinzip in ausgezeichneter Weise für die Untersuchung aller Gerinnungsphasen geeignet ist (22, 23, 24, 39).



Abb. 1.1-1: *Hellige*
Thromboelastograph

Im folgenden soll auf das theoretische Betriebssystem des Thromboelastographen und den klinischen Stellenwert eingegangen werden (3, 39). Das zu untersuchende Blut/Plasma wird in eine Stahlküvette gegeben, konstant auf der Temperatur von 37° gehalten und in eine Bewegung periodischer Drehungen versetzt, die jeweils in entgegengesetzter Richtung um die senkrechte Achse mit Hilfe einer geeigneten mechanischen Vorrichtung erfolgt. Weiter ist die Küvette mit einem Meßzylinder aus Stahl ausgerüstet, der während der Untersuchung in die darin enthaltene Gerinnungsflüssigkeit eintaucht und gleiche Abstände (1mm) vom Boden und den Wänden des Thromboelastographen einhält. Der Meßzylinder hängt schließlich an einem Torsionsdraht aus Stahl, der in Verbindung mit einem Hohlspiegel steht. Dieser Spiegel reflektiert Lichtpunkte auf ein durch einen sogenannten Kymographen in eine fortlaufende Bewegung versetztes fotoempfindliches Papier.

Solange das zu untersuchende Blut oder Plasma flüssig bleibt, werden die Bewegungen der Küvette nicht auf den Meßzylinder übertragen. Der Torsionsdraht, sowie der damit verbundene Spiegel bleiben unbeweglich. Folglich ist der Lichtpunkt auf der eingeteilten Skala unbeweglich und der Kymograph zeichnet eine gerade Linie auf das Photopapier.

Sobald in dem untersuchten Blut der Gerinnungsprozeß einsetzt, entwickelt sich ein Fibrinnetz, welches sich an die Wände der Küvette und des Zylinders anheftet und diese somit dynamisch miteinander verbindet. Von jetzt an werden die Bewegungen der Küvette auf den Zylinder übertragen. Die Breite der Auslenkung entspricht der mechanischen Festigkeit des Gerinnsels. Dadurch wird der Lichtpunkt von seinem festen Ausgangspunkt nach rechts und links in eine Bewegung versetzt, die der Kymograph an jedem Bewegungsende registriert und auf das fotoempfindliche Papier in Form einer Auslenkung von der ursprünglichen Gerade überträgt.

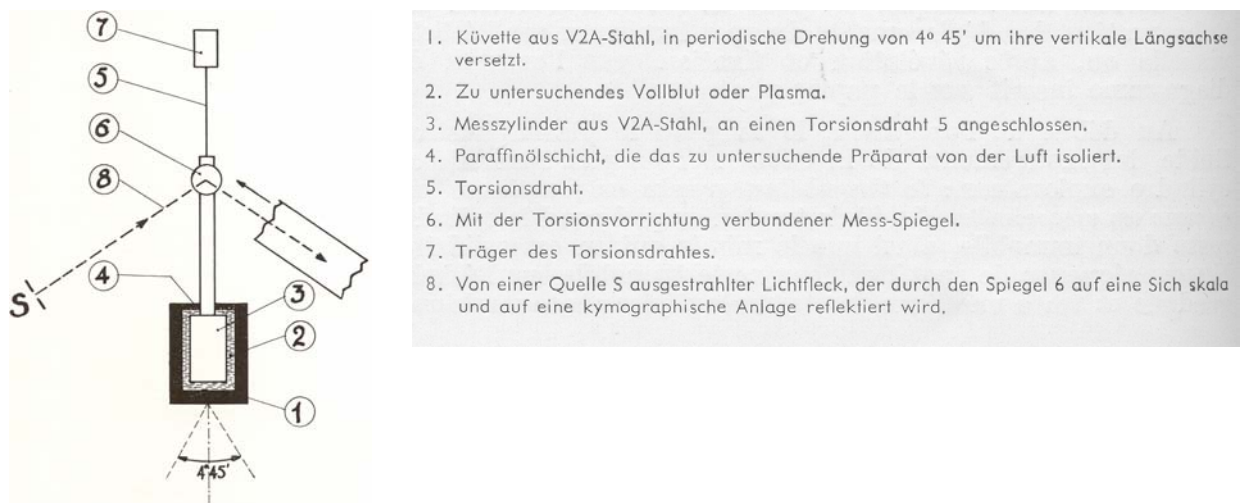


Abb. 1.1-2: Schema zum Prinzip des *Hellige* Thromboelastographens (39)

Insgesamt wird auf diese Weise ein Diagramm aufgezeichnet, das als Thromboelastogramm bezeichnet wird. Für normales Blut und Plasma beginnt die Aufzeichnung mit einer Geraden, die sich dann in zwei symmetrische Kurvenäste teilt und in seiner Gesamtheit die charakteristische Silhouette einer Stimmgabel hat.

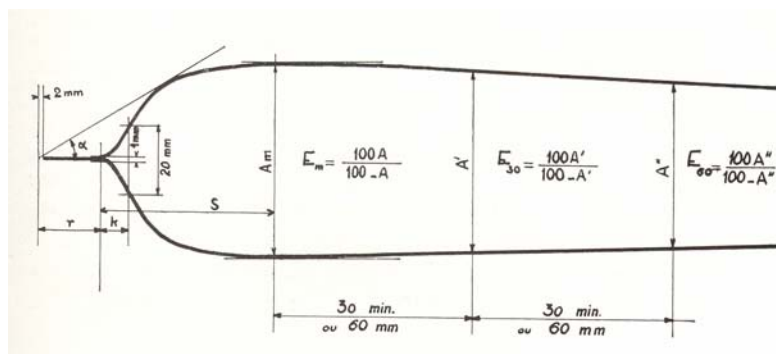


Abb. 1.1-3: Thromboelastogramm mit zugehörigen Parametern (39)

Zur Auswertung des Thromboelastogramms werden folgende von Hartert definierte mathematische Parameter herangezogen:

- Longitudinalkonstanten sind chronometrische Konstanten zur Beschreibung der verschiedenen Gerinnungsphasen. Die wichtigste Longitudinalkonstante ist die als „r“ bezeichnete Reaktionsgeschwindigkeit. Sie drückt den Abstand zwischen dem Start des Gerinnungsvorgangs (Zeitpunkt der Rekalzifizierung des Citratblutes oder Abnahmezeitpunkt bei der Verwendung von Nativblut) und dem Zeitpunkt des Diagramms, wo sich die Gerade in zwei Äste teilt, aus. Dieser Parameter ist sehr empfindlich gegenüber Veränderungen der plasmatischen Gerinnung in der Vorphase und betrifft Störungen wie die Hämophilie oder die von-Willebrand-Erkrankung. Die r-Zeit erfasst hingegen kaum Veränderungen auf der Ebene der Thrombozyten.
- Transversalkonstanten messen den Abstand der beiden Äste des Diagramms zu einem gegebenen Zeitpunkt und drücken den Zustand der dynamischen Eigenschaften des Gerinnens in diesem Augenblick aus. Dazu gehört die Konstante „ma“, welche die maximale Amplitude des Thromboelastogramms mißt. Aus ma wird die Maximalelastizität (me) berechnet, da me Veränderungen empfindlicher

anzeigt. MA/ ME ist abhängig von der Fähigkeit ein stabiles Fibrinnetz zu bilden und schließt neben den plasmatischen Faktoren, die eine Fibrinbildung induzieren auch Faktor XIII, der für eine kovalente Quervernetzung Fibrinmonomere verantwortlich ist, ein. Außerdem wird dieser Parameter von der Zahl und Funktion der Thrombozyten beeinflusst. In Abwesenheit von Thrombozyten erreicht der Parameter ma nur ein Drittel seines Ausgangswertes. Allerdings ist zu beachten, daß Thrombozytenaggregationshemmer wie Aspirin die Maximalamplitude nicht verändern.

- Winkelkonstanten drücken Verhältnisse von Transversalkonstanten auf Longitudinalkonstanten aus, d. h. die Entwicklung der dynamischen Eigenschaften als Funktion der Zeit. „k“ stellt die wichtigste Konstante dieser Art dar und entspricht der Entfernung zwischen dem Endpunkt von „r“ und derjenigen Querachse in der Aufzeichnung, bei der der Abstand der beiden Kurvenäste 20mm erreicht. Diese Norm wurde von Hartert unter Bezugnahme der Maximalbreite von normalem, völlig thrombozytenfreiem Plasma erstellt. Die ursprünglich als Gerinnungsgeschwindigkeit bezeichnete Konstante ist ein Marker der Fibrinbildungszeit. Dementsprechend sind Abweichungen bei einem Mangel an Gerinnungsfaktoren, insbesondere des Prothrombinkomplexes zu beobachten.

Schließlich kann auch eine gesteigerte fibrinolytische Aktivität, die als Hyper-Retraktionsfähigkeit bezeichnet wird, sichtbar gemacht werden. Die Retraktion führt zu einer Abnahme der Maximalamplitude und wird durch verschiedene chronometrische und dynamische Konstanten ausgedrückt auf die hier nicht weiter eingegangen werden soll. Die Diagramme haben ein besonderes Aussehen, wozu die „Flaschenhals“- , „Kreisel“- und „Treppenstufen“-Formen zählen. Eine beschleunigte Abnahme der Amplitude findet sich häufig bei Hyperfibrinolyse , sowie unter Lysetherapie und kann selten auch die Folge eines ausgeprägten Mangels an Faktor XIII oder α_2 -Antiplasmin sein.

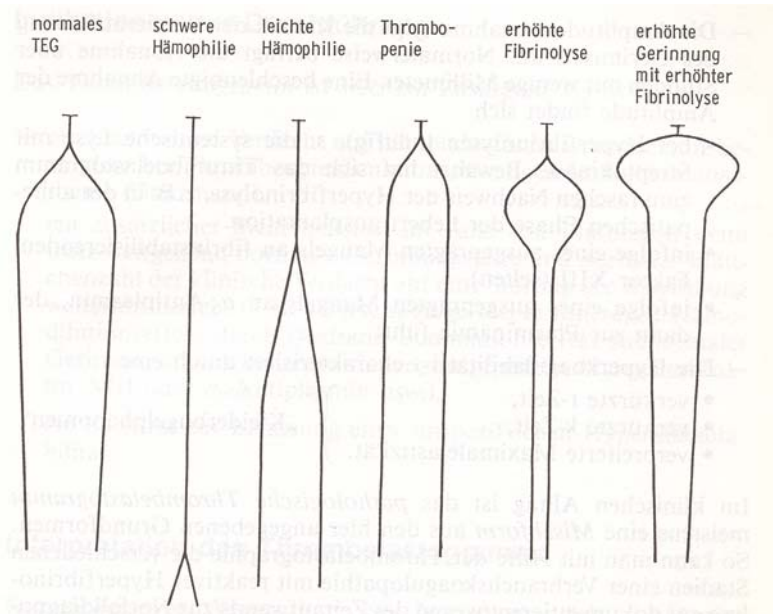


Abb. 1.1-4: Thromboelastogramme bei verschiedenen hämorrhagischen Diathesen (3)

Das Thromboelastogramm kann in Nativblut, rekalkifiziertem Citratblut und Plasma durchgeführt werden. Der Test in Nativblut ist neben der „clot observation time“ der einzig gebräuchliche Test, der venöses Blut ohne gerinnungshemmende Substanzen verwendet. Er reagiert besonders empfindlich auf Inhibitoren wie Heparin und erfäßt diese in Konzentrationen, bei denen die aPTT und die Thrombinzeit bereits normale Werte ergeben. Auch können Hyperfibrinogenämien und Thrombozythämien, die mit einer Hyperkoagulabilität vergesellschaftet sind aufgedeckt werden. Die Verwendung von thrombozytenreichem Plasma wird für die Diagnostik von Thrombopenien und Thrombasthenien vorgeschlagen (53).

Das Thromboelastogramm vermittelt ein objektivierbares Bild des gesamten Gerinnungsablaufes und bei Vorliegen einer Gerinnungsstörung Hinweise, in welchem Bereich die Störung liegen könnte. Jedoch läßt sich daraus nicht ersehen, welche Gerinnungsfaktoren im einzelnen betroffen sind. Deshalb bedarf ein pathologisches Thromboelastogramm immer der weiteren Diagnostik. Das Thromboelastogramm gilt in der klinischen Praxis als Zusatztest und wird für folgende Indikationen empfohlen:

Als Suchtest bei Verdacht auf hämorrhagische Diathesen, insbesondere bei Thrombozytenfunktionsstörungen, wie zum Beispiel der Thrombasthenie Glanzmann.

Es ist ein zusätzlicher Sicherheitstest, wenn trotz normaler Gerinnungsteste und normaler Thrombozytenzahl der klinische Verdacht auf eine Störung der Hämostase weiterhin besteht. Dazu gehört unter anderem eine unterschwellige Heparintherapie, ein Hämodilutionseffekt durch Dextrane und ein ausgeprägter Mangel an Faktor XIII oder α_2 -Antiplasmin (44).

Bewährt hat sich das Thromboelastogramm für das Gerinnungsmonitoring während Lebertransplantationen, da hier das Vorliegen einer Hyperfibrinolyse in der anhepatischen Phase nachgewiesen werden kann.

Weiter kann auch eine unspezifische Hyperkoagulabilität erkannt werden, welche durch verkürzte r-/ k- Zeiten und eine verbreiterte Maximalamplitude charakterisiert ist und als das sogenannte „Kleiderbügelphänomen“ bezeichnet wird.

Im weiteren soll auf die Probleme des klassischen Thromboelastographen in der Geräteausführung der Firma *Hellige* eingegangen werden. Zur Küvettendämpfung werden Ölwannen verwendet, die ein kippsticheres Aufstellen des Apparates erfordern und den Einsatz des Gerätes als Bedside Test unpraktikabel machen. Weiter sind die wiederverwertbaren Metallküvetten zu erwähnen, die nach jedem Gebrauch in Bariumsulfat-Pulver zu reinigen sind. Dies ist mit einem erhöhten Zeitbedarf verbunden, stellt ein sehr hohes Infektionsrisiko für Laborangestellte dar und ist daher nicht mehr zeitgemäß. Die Auswertung des Diagramms erfolgt manuell mit Hilfe einer Schablone, was zu Ungenauigkeiten führen kann und nicht mehr dem aktuellen Standard validierter Analytik entspricht. Dies sind alle Gründe, warum das klassische Thromboelastogramm zunehmend in Vergessenheit geraten ist, obgleich es eine gute Methode zur Beobachtung sämtlicher Gerinnungsphasen darstellt. Diese Schwachpunkte waren das Ziel der Entwicklung neuer Systeme wie des computergesteuerten roTEG Coagulation Analyzers und haben in den letzten Jahren zu einer „Renaissance“ der Thromboelastographie geführt.

1.2 Der roTEG Coagulation Analyzer

Der roTEG Coagulation Analyzer ist ein computergesteuerter Thromboelastograph, der ein schnelles und spezifisches Verfahren zur Gerinnungsanalyse am Ort des Geschehens darstellt (9, 10).

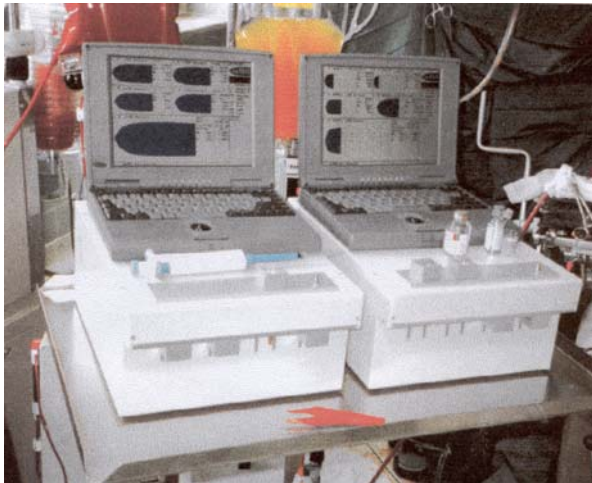


Abb. 1.2-1: RoTEG Coagulation Analyzer

Das roTEG besteht aus zwei Hauptkomponenten, dem Meßgerät, sowie einem Notebook Computer¹.

Die Mechanik des Meßgerätes setzt sich aus einem Meßblock mit Abtastmechanik und einem Vorwärmblock zum Anwärmen der Proben zusammen. Diese werden durch Sensoren mit On-Chip AD-Wandler auf $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ gehalten.

Durch eine speziell entwickelte Elektronik wird der Winkel des Meßsystems mittels einer Leuchtdiode und einem CCD-Zeilensensor digital abgetastet. Weiter kann die Phase des Antriebs des Meßsystems durch die Elektronik erfaßt werden.

Ein integriertes Computersystem mit einem Prozessor (Motorolla 68000 Prozessor) ist für die Auswertung des Meßsignals, die Steuerung der Heizungen und die Kommunikation mit dem Notebook zuständig.

¹ Bedienungsanleitung des roTEG Coagulation Analyzers, Fa Nobis/ Pentapharm

Weiter soll auf das elektronische Abtastverfahren genauer eingegangen werden, da es den grundlegenden Unterschied zum Funktionsprinzip des Thromboelastographen in der Geräteausführung der Firma *Hellige* darstellt. Im Gegensatz zum klassischen Thromboelastographen wird nicht die Küvette in Bewegung versetzt, sondern der Meßzylinder (Stempel), welcher mittels eines Stahldrahtes (Federprinzip) um die senkrechte Achse abwechselnd $4,75^\circ$ nach rechts und links gedreht wird. Diese Drehung wird durch einen Spiegel, der am oberen Ende des Stempels angebracht ist, optisch abgetastet.

Das Abtastsystem wird von einem Kugellager geführt, welches die Freiheitsgrade auf Rotation begrenzt (roTEG) und damit das System ohne Funktionseinbußen leicht transportabel macht. Die Verwendungsmöglichkeit wird hierdurch erweitert, insbesondere als Bedside Test und die Transportstabilität aufgrund der optischen Justierung stellt den entscheidenden Vorteil zum *Hellige* TEG dar.

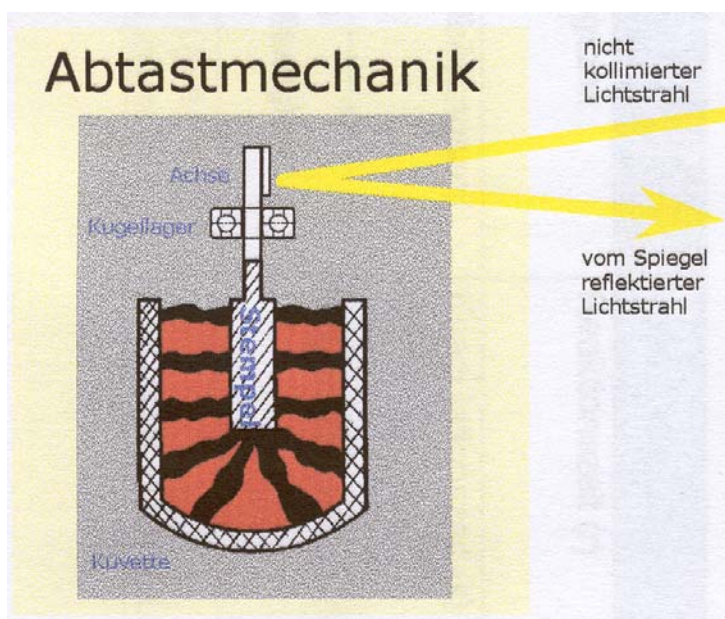


Abb. 1.2-2: Schema des Abtastsystems

Sobald ein Gerinnsel entsteht und dieses Kuvette und Stempel mechanisch verbindet wird die Auslenkung des Zylinders zunehmend eingeschränkt. Eine ungehinderte Stempeldrehung von $4,75^\circ$ wird mittels des Computersystems auf 0 mm TEG-Amplitude umgerechnet, während ein vollständiges Festhalten des Stempels durch das Gerinnsel einer Amplitude von 100 mm entspricht.

Als entscheidende Verbesserung gegenüber dem klassischen Thromboelastographen werden die Meßdaten „online“ mit einem Computer ausgewertet. Im folgenden soll auf den Notebook Computer eingegangen werden. Dieser dient der automatischen Auswertung der Thromboelastogramme in Echtzeit, sowie deren Dokumentation und Speicherung. Die Anzeige der Messungen erfolgt auf einem Farb-LCD-Monitor und stellt eine menuegeführte Benutzerschnittstelle dar.

In Anlehnung an das konventionelle TEG werden zur Auswertung des roTEGs die Parameter r , k und MA herangezogen, die mit einem entsprechenden Softwareprogramm errechnet werden.

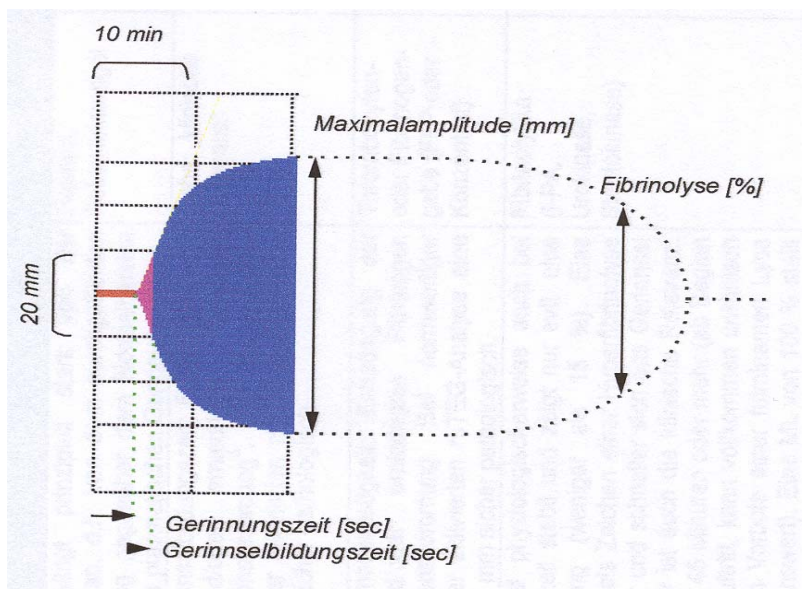


Abb. 1.2-3: RoTEG Thromboelastogramm

Im nachfolgenden soll auf die Korrelation von roTEG und *Hellige* TEG eingegangen werden. Die Parameter r und MA haben nach Angaben der Geräteentwickler einen Korrelationskoeffizienten von 0,99, während k einen Wert von 0,92 aufweist. Die Unterschiede können vor allem durch die verminderte Kontaktaktivierung der aus Plastik bestehenden Einmalartikel erklärt werden.

Neben dem nichtaktivierten Thromboelastogramm kommen auch aktivierte Teste in Vollblut zum Einsatz (9). Durch Zugabe spezifischer Aktivatoren werden schnell und vor allem reproduzierbare Ergebnisse gewonnen. Zu den bisher etablierten Standardtests am roTEG werden folgende Gerinnungsteste gezählt:

- Das sogenannte ExTEG: Bei diesem Testansatz wird die Gerinnungskaskade extrinsisch aktiviert mit einer Korrelation von $r=0,90$ zur aktivierten Thromboplastinzeit (aPT), die auch als Quickwert bekannt ist.
- Das sogenannte InTEG: Bei diesem Testansatz wird die Gerinnungskaskade intrinsisch aktiviert mit einer Korrelation von $r=0,94$ zur partiellen aktivierten Thromboplastinzeit (aPTT). Im Gegensatz zur aPTT erfolgt der Test einstufig. Die Calciumlösung wird unmittelbar nach Zugabe des Kontaktaktivators Kaolin beigegeben.

Mit der Bestimmung von ExTEG und InTEG kann eine Beurteilung der plasmatischen Gerinnung vorgenommen werden.

- Zur spezifischen Registrierung von Fibrinogenmangel im plättchenarmen Plasma (PPP) wird das sogenannten FibTEG herangezogen. Dabei besteht eine Korrelation von $r=0,77$ zwischen FibTEG und der Fibrinogenkonzentration. Die maximale Festigkeit (MA) des roTEG-Gerinnsels im Vollblut sowie PRP hängt von der Fibrinogen- und Thrombozytenkonzentration des Blutes ab. Weiteren Einfluß haben GPIIb/IIIa- Antagonisten. Mit diesen Medikamenten wird eine Blockade der Fibrinogenrezeptoren auf der Thrombozytenoberfläche erreicht und damit ein Einbau von Thrombozyten in das Gerinnsel unterbunden. In Gegenwart dieser Pharmaka ist die Gerinnselfestigkeit hauptsächlich von der Fibrinogenkonzentration abhängig. Dies wird zwischenzeitlich auch diagnostisch genutzt um bei

verminderter Maximalamplitude zwischen einer Thrombozytopenie und einem Fibrinogenmangel zu unterscheiden.

- Fibrinolytische Prozesse werden aufgedeckt, wenn sich das Gerinnsel während der Messung zurückbildet oder aber wenn nach externer Zugabe des Fibrinolyseinhibitors Aprotinin eine verbesserte Gerinnselbildung im Vergleich zum einfachen ExTEG beobachtet werden kann (ApTEG). Die Entscheidung für eine Therapie mit Aprotinin kann auf diese Weise gut abgeschätzt und gesteuert werden.
- Um den Einfluß von Heparinen auf den Gerinnungsstatus abzuschätzen wurde das HepTEG entwickelt. Hier hat man sich der heparinspaltenden Eigenschaften des Enzyms Heparinase bedient, um den Hemmeffekt verschiedener Heparine aufzuheben. Liegt eine ausgeprägte Verlängerung der plasmatischen Gerinnungszeit weiterhin vor, kann dies nicht auf die antikoagulatorische Wirkung von Heparin zurückgeführt werden.

Bevorzugte Einsatzgebiete der Gerinnungsdiagnostik mit dem roTEG Coagulation Analyzer sind vor allem große chirurgische Eingriffe, wie Lebertransplantationen oder herzchirurgische Operationen, die eine kritische Bewertung des aktuellen Gerinnungsstatus erfordern und bei denen Operationserfolge maßgebend von einem schnellen Gerinnungsmonitoring beeinflusst werden (9, 36).

Da es sich beim roTEG Coagulation Analyzer um eine kürzlich entwickelte Methode zur Gerinnungsdiagnostik handelt, werden derzeit Studien in mehreren klinischen Zentren durchgeführt um Indikationen, Referenzbereiche und Richtlinien zur Therapiesteuerung zu erarbeiten.

Für roTEG Messungen werden ausschließlich Einmalstempel und -küvetten aus Kunststoff verwendet.

1.3 Aufgabenstellung

Die Weiterentwicklung der klassischen Methode der Thromboelastographie zu einer Point-of-Care Methode ermöglichte die Bearbeitung klinisch relevanter Fragestellungen. Als Voraussetzung hierfür soll zunächst ein Verfahren zur Oberflächenaktivierung ausgearbeitet werden, um die für das roTEG vorgesehenen Plastikküvetten anstelle der bei herkömmlicher Thromboelastographie verwendeten Stahlküvetten einsetzen zu können.

Eine Aufgabe dieser Arbeit war, mögliche Ursachen für die bekannten Veränderungen der Vollblutgerinnung nach Blutabnahme und –lagerung zu untersuchen und fragliche Einflüsse verschiedener Antikoagulanslösungen zu prüfen.

In einem weiteren Teil der Doktorarbeit sollte der Einsatz des roTEG Coagulation Analyzers als „Researchtool“ zur Abklärung von Gerinnungsveränderungen für folgende Fragestellungen geprüft werden:

- Erfassung der Wirkung von GPIIb/IIIa- Rezeptorantagonisten sowie der Einfluß von sogenannten RGD-Peptiden auf die Mechanismen der plasmatischen Gerinnung und vor allem auf die Funktion der Thrombozyten
- Gerinnungsveränderungen, die nach Behandlung von „Fresh Frozen Plasma“ mit verschiedenen Ultraschallfrequenzen zur Inaktivierung von Viren zu beobachten sind
- Verwendung des roTEG Coagulation Analyzers zur Erfassung der Hämokompatibilität von Arzneistoffträgern nach Beschichtung von Biomaterialien
- Einfluß gängiger Röntgenkontrastmittel auf die Hämostase, insbesondere sollten hier Unterschiede zwischen ionischen und nichtionischen Substanzen herausgearbeitet und mit besonderem Interesse die Interaktion mit den aktivierten Faktoren des Prothrombinkomplexes sowie dem Einfluß auf die Mechanismen der Fibrinbildung abgeklärt werden.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 roTEG Analysen

Durchführung:

Die roTEG Analysen von Vollblut und Plasma wurden mit einem roTEG Coagulation Analyzer (Fa Nobis/ Pentapharm) wie vom Gerätehersteller angegeben unter Verwendung von Plastikkuvetten, -Stempel durchgeführt.

2.2 Versuche zur Imitation der von Stahloberflächen ausgehenden Aktivierung der Hämostase

Es wurde Blut von gesunden Probanden abgenommen (Monovette[®], Citrat Gerinnung, Artikel 40194, Klinikum rechts der Isar) und die roTEG Analyse mit/ohne Zugabe von Kaolin durchgeführt. Die Kaolinlösung wurde hergestellt durch Zugabe von 20µl Kaolin (Actin-FS[®], Fa Dade-Behring) zu 5ml einer 0,2M CaCl₂-Lsg.(StartTEG, Fa Pentapharm/ Nobis). Folgende Vorschrift wurde für die roTEG Analyse eingehalten:

- 300µl Citratblut
- 20µl CaCl₂-Kaolinlg.

Zu den Zeitpunkten 5', 30' und 60' nach Venenpunktion wurde die Untersuchung als 4fach Bestimmung durchgeführt (n=9).

2.3 Untersuchungen in Abhängigkeit von der Lagerung

2.3.1 roTEG Analyse

Für diese Untersuchungen wurde Blut in Citrat- sowie Citrat-Theophyllin-Adenosin-Dipyramidol (CTAD) -Röhrchen (4ml) unter Verwendung gängiger Blutentnahmesysteme der Firma Sarstedt mit dem Handelsnamen vacuette[®] abgenommen und 5', 30' und 60' bei Zimmertemperatur gelagert.

In weiteren Studien wurden jeweils die folgenden Reagenzien pro ml Blut den Citratröhrchen hinzupipettiert (sämtliche Reagenzien wurden nach Vorschrift angelöst):

- Prostaglandin E1 (0,25µg/ml, Fa Sigma)
- Tissue Factor Antikörper (25µg/ml, Fa American Diagnostica)
- IgG Kontrollantikörper (25µg/ml, Fa Sigma)
- Corn Trypsin Inhibitor zur FXIIa Inhibition (32µg/ml, Fa Haemochrom Diagnostika)
- Leukozytenelastase Inhibitor Eglin c (60-63)-methyl ester (0,32mM, Fa Bachem)
- Leukozytenelastase Inhibitor Tfa-Val-Tyr-Val-OH (1,12µM, Fa Bachem)
- Kathepsin G und Chymotrypsin Inhibitor Eglin c (42-45)-methyl ester (0,6mM, Bachem)

Die roTEG Analyse wurde wie unter 2.2 beschrieben durchgeführt.

2.3.2 PMN-Elastase ELISA

Die PMN-Elastase Konzentrationen wurden im Plasma (aus mit Citrat und CTAD antikoagulierten Blut hergestellt) nach Zentrifugation (3000rpm,15') zu den Zeitpunkten 5', 30' und 60' mit einem ELISA Testkit (DPC Biermann) bestimmt.²

² Die Befunderhebung wurde in der Abteilung für Klinische Chemie und Klinische Biochemie der Ludwig-Maximilians Universität München von Dr. C. Grippner.Steppert durchgeführt

2.4 Methoden zur Bestimmung der Wirkung von GPIIb/IIIa-Rezeptorantagonisten durch roTEG und Thrombozytenaggregation

Zur Untersuchung wurden die GPIIb/IIIa-Rezeptorantagonisten abciximab (Reopro[®], Fa Lilly) und Tirofiban (Aggrastat[®], Fa MSD) bzw. sogenannte cyclische RGD-Peptide³ eingesetzt. Von abciximab (2mg/ml laut Angabe des pharmazeutischen Unternehmens Lilly) und Tirofiban (0,25mg/ml laut Angabe des pharmazeutischen Unternehmens MSD) wurden die entsprechenden pharmazeutischen Spezialitäten eingesetzt. Aufgrund der Proteinadsorption des Antikörpers abciximab war es notwendig, alle Verdünnungen in mit Albumin abgesättigten Glas- bzw. Plastikgefäßen durchzuführen. Die Stammlösung der zyklischen Hexapeptide enthielt 2mmol/ml der entsprechenden Substanz.

Die RGD-Peptide wurden unverdünnt beigegeben, während bei abciximab Verdünnungen bis 1:500 und bei Tirofiban bis 1:1.000 eingesetzt wurden.

2.4.1 roTEG Analyse

Für die Versuche wurde Blut wie unter 2.2 beschrieben abgenommen und folgende Gerinnungsteste mit antikoaguliertem Vollblut und plättchenreichem Plasma (PRP, 1000rpm, 20', nicht älter als drei Stunden) am roTEG Coagulation Analyzer durchgeführt:

- ein nichtaktiviertes Thromboelastogramm in Vollblut (NaTEG):
 - 300µl Vollblut
 - 10µl der RGD-Peptidlg. oder der NaCl-Kontrolle
 - 20µl 0,2M CaCl₂- Kaolinlg.(wie unter 2.2 angegeben hergestellt)

³ Diese Peptide wurden von Prof. H. Keßler vom Institut für Organische Chemie und Biochemie der Technischen Universität München zur Verfügung gestellt

- ein nicht aktiviertes Thromboelastogramm (NaTEG) in PRP:
 - 300µl PRP
 - 10µl der RGD-Peptid-/Tirofiban-/abciximabls. oder der NaCl-Kontrolle
 - 20µl 0,2M CaCl₂- Kaolinls. (wie unter 2.2 angegeben hergestellt)
- ein extrinsisch aktiviertes TEG (ExTeg) in PRP:
 - 300µl PRP
 - 10µl der RGD-Peptid-/Tirofiban-/abciximabls. oder der NaCl-Kontrolle
 - 20µl 0,2M CaCl₂-Lsg. (StartTEG, Fa Nobis)
 - 20µl Thromboplastinls. (Innovin[®], Fa Dade-Behring) 1:2 verdünnt (mit aqua dest.)

2.4.2 Thrombozytenaggregation nach Born

Die Bestimmung der Thrombozytenaggregation nach Born (?) erfolgte an einem Plättchenaggregometer (APACT, Fa. LAbor) mit Kollagen als Induktor, anhand einer "GLP (good laboratory practice)" -Arbeitsvorschrift:

- 290µl PRP/ PPP
- 10µl Kollagen (Dia Colgen[®], Fa Diamed AG)

Zusätzlich wurden 10µl der Tirofiban-, abciximab-, zyklischen Hexapeptidlösung oder der NaCl-Kontrolle den 290µl Plasma hinzupipettiert. Dabei wurden die selben Verdünnungen, wie unter 2.4.1 angegeben, eingesetzt.

2.5 Qualitätskontrolle von Fresh Frozen Plasma nach Virusinaktivierung mit einer Ultraschall Technik

Sogenanntes Fresh Frozen Plasma (FFP) wurde aufgetaut, in einer entsprechenden Vorrichtung mit CO₂ begast und über einen Schwinger (260kHz, Fa Stangl Ultraschalltechnik), der in einem Wasserbad bei 20°C temperiert wurde, plaziert und beschallt.

Die Aktivität der Gerinnungsfaktoren nach Beschallung wurde mittels roTEG Analyse folgendermaßen überprüft:

- 300µl Plasma
- 20µl CaCl₂-Kaolinlg. (wie unter 2.2 beschrieben hergestellt)

2.6 Untersuchungen zur Hämokompatibilität von Biomaterialbeschichtungen

Zur Testung der Hämokompatibilität der Beschichtungen von Biomaterialien wurden Metallküvetten für das roTEG aus Metall gedreht⁴ und mit folgenden Polymeren mittels flüchtiger Lösungsmittel beschichtet:

- Sogenannte Tyrosinanaloga⁵ (pDTE-Succinat/ -Adipat/ -Sebeceat/ -Carbonat/ -co-5% PEG/ co-0,26% PEG)
- Niedermolekulare Polymilchsäure (Resomer[®] R203, Boehringer Ingelheim)

Um die Interaktion zwischen Fremdoberfläche und Hämostase zu untersuchen wurde eine roTEG Analyse der unbeschichteten sowie beschichteten Metallküvetten analog zu 2.2 durchgeführt.

⁴ Mein Dank gilt Herrn W. Regnet, sowie Herrn Gürtner für die Herstellung der Küvetten aus Aluminium

⁵ Diese Substanzen wurden von Prof. Kohn von der Rutgers University/USA zur Verfügung gestellt

2.7 Untersuchungen zur Interaktion zwischen Röntgenkontrastmitteln und Blutgerinnung

Für die Untersuchung wurden folgende gängige Röntgenkontrastmittel (RKM) verwendet:

Röntgen- kontrastmittel	Hersteller	Wirkstoff	Wirkstoffgehalt [mg/ml]	Jodgehalt [mg/ml]
Biliscopin	Schering	Iotroxinsäure, Dimegluminsalz	105	50
Isovist-240	Schering	Iotrolan (dimer, nichtionisch)	512,6	240
Visipaque 270	Nycomed	Iodixanol (nichtionisch)	550	270
Conray 60	Mallinckrodt	Iotalaminsäure, Megluminsalz	600	282
Imeron 350	Byk Gulden	Iomeprol (nichtionisch)	714,4	350
Omnipaque-350	Schering	Iohexol (nichtionisch)	755	350
Hexabrix 320	Guerbet	Ioxaglinsäure, Natrium- u. Megluminsalz	590 (393+197)	320

Weiter kamen folgende Jodverbindungen zum Einsatz:

- Die organischen Jodverbindungen 2,4,6-Trijodbenzoesäure (Fa E. Merck), PVP-Jod (Braunnol 2000, Fa Braun) und Jodessigsäure (Fa Sigma)
- Die anorganische Jodverbindung Kaliumjodid (Fa E. Merck)
- Kontrollen mit isotonischer Kochsalzlösung und Natriumacetat (Fa E. Merck)

2.7.1 roTEG Analyse

Es wurden folgende Analysen am roTEG durchgeführt:

- Die Gerinnungszeit von nativem Fibrinogen wurde durch Zugabe von Thrombin bestimmt:
- 150µl Fibrinogenlsg. (20mg/ml, Fibrogammin[®], Fa Aventis)

- 150µl des jeweiligen RKM bzw. der anorganischen/organischen Jodverbindung (unverdünnt und 1:2/ 1:4/ 1:8 verdünnt mit NaCl) oder der Kontrolle mit isotonischer Kochsalzlösung und Natriumacetat
- 40µl Thrombin (6 NIH/ml)
- Die Vollblutgerinnungszeit wurde wie folgt bestimmt:
 - 210µl Vollblut
 - 80µl des jeweiligen RKM (unverdünnt und 1:2/ 1:4/ 1:8 verdünnt mit NaCl) oder der NaCl-Kontrolle und wie unter 2.2 beschrieben, mit 20µl CaCl₂-Kaolinlösung aktiviert und analysiert

2.7.2 Thrombozytenaggregation nach Born

Die Thrombozytenaggregation wurde wie unter 2.4.2 beschrieben nach folgendem Ansatz durchgeführt:

- 290µl PRP/ PPP (2,5mg Fibrinogen/ml)
- 10µl des jeweiligen RKM oder Jodverbindung (unverdünnt bzw. 1:10/ 1:100/ 1:500 verdünnt)

und dann mit 10µl Kollagen (Dia Colgen®, Fa Diamed AG) gestartet

3 ERGEBNISSE⁶

3.1 Daten zu der nicht aktivierten Thromboelastographie

Die Analyse der Vollblutproben ohne Zusatz eines Aktivators in den verwendeten Plastikartikeln zeigten eine zeitabhängige Abnahme der mit dem TEG bestimmbaren Gerinnungsparameter. Weiter wurden hohe Variationskoeffizienten für die Parameter r, k und MA beobachtet.

t [min]	<i>r-Zeit</i>		<i>k-Zeit</i>		<i>Maximalamplitude</i>	
	MW [sec]	VK [%]	MW [sec]	VK [%]	MW [mm]	VK [%]
5	731	20,1	301	16,4	39	6,8
30	650	9,6	253	25,2	43	5,8
60	557	6,9	257	23,2	42	9,3

Tab. 3.1-1: NaTEG Analyse ohne Kaolin (n=9)

Die Zugabe von 0,4µg Kaolin/Test führte zu einer Verkürzung der r- und k-Zeiten zu den gemessenen Zeitpunkten. Weiter konnten niedrigere Variationskoeffizienten für die Parameter r, k und MA beobachtet werden.

t [min]	<i>r-Zeit</i>		<i>k-Zeit</i>		<i>Maximalamplitude</i>	
	MW [sec]	VK [%]	MW [sec]	VK [%]	MW [mm]	VK [%]
5	499	3	109	10,9	59,9	2,2
30	384	6,8	118	12,5	56,3	6,7
60	350	6,2	113	12,4	56,5	3,1

Tab. 3.1-2: NaTEG mit Kaolin (Kaolinzusatz von 0,4 µg/ Test, n=9)

⁶ In der vorliegenden Arbeit wurde geprüft in welchem Umfang die Anwendbarkeit des neu entwickelten roTEG Analyzers für klinisch relevante Fragestellungen nachgewiesen werden kann. Um eine Vielzahl klinikorientierter Fragestellungen zu bearbeiten, wurde auf eine große Anzahl der Einzeluntersuchungen verzichtet. Daher wurden die Ergebnisse nur beschreibend dargestellt.

Um das Phänomen der zeitabhängigen Abnahme der Gerinnungsparameter in den Griff zu bekommen wurde bei der Blutentnahme die Stabilisatorlösung Citrat-Theophyllin-Adenosin- Dipyridol eingesetzt. Blut, das in kommerziell erhältlichen CTAD Röhren abgenommen wurde, zeigte im Verlauf des Beobachtungszeitraumes deutlich verlängerte r-Zeiten im Vergleich zu Blut, das nur mit Citrat antikoagulierte wurde. Wie diese Untersuchungen eindeutig zeigen, blieb das Phänomen der verkürzten Gerinnungszeiten durch den Zusatz der Stabilisatoren Adenosin, Theophyllin und Dipyridol zu Citrat unbeeinträchtigt.

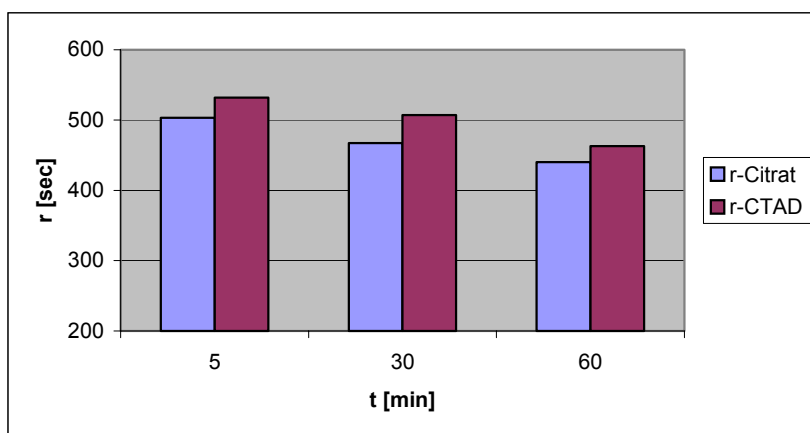


Abb. 3.1-1: r-Zeit in Abhängigkeit vom Abnahmesystem (n=7)

Die Zugabe von Prostaglandin führte nur innerhalb der ersten 5 Minuten nach Blutentnahme zu einer Verlängerung der Gerinnungszeiten, die r-Zeiten zu den Zeitpunkten 30' und 60' waren unverändert.

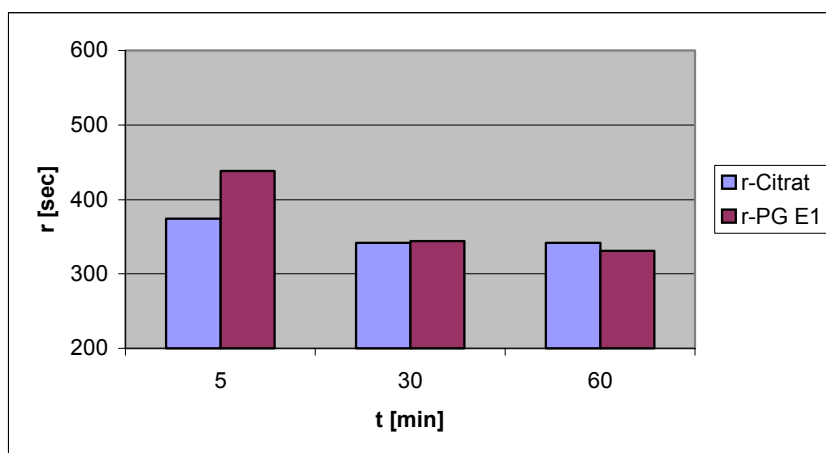


Abb. 3.1-2: Einfluß von PG E1 auf die r-Zeit in Abhängigkeit von der Lagerung (n=7)

Der Zusatz von Antikörpern gegen Tissue Factor hatte keinen signifikanten Einfluß auf das beschriebene Phänomen, daß sich die Gerinnungszeiten im Verlauf der Lagerung verkürzen.

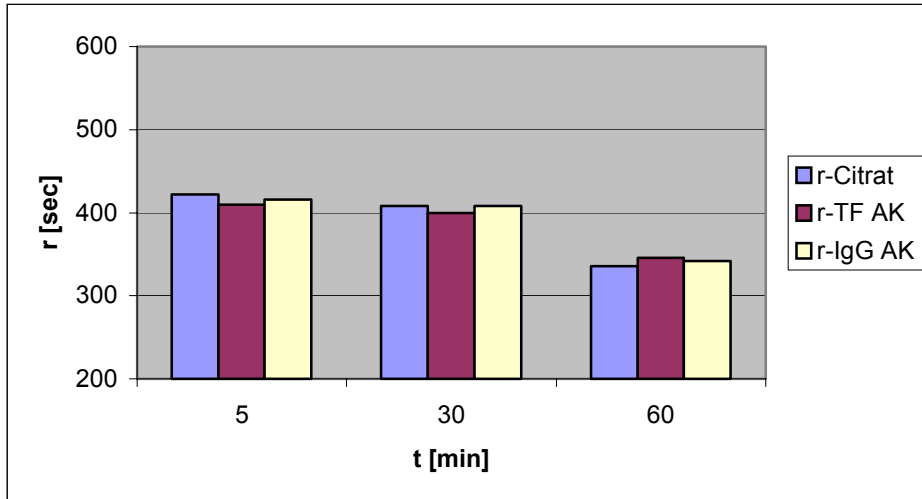


Abb. 3.1-3. Einfluß von „tissue factor“ Antikörper auf die r-Zeit in Abhängigkeit von der Lagerung (n=7)

In weiteren Versuchsansätzen wurde Corn Trypsin Inhibitor zugegeben, der die Aktivität des Faktor XIIa beeinflusst. Dieser Inhibitor bewirkte eine starke Verlängerung der r-Zeit, allerdings war im Verlauf der Lagerung eine Verkürzung weiterhin zu beobachten.

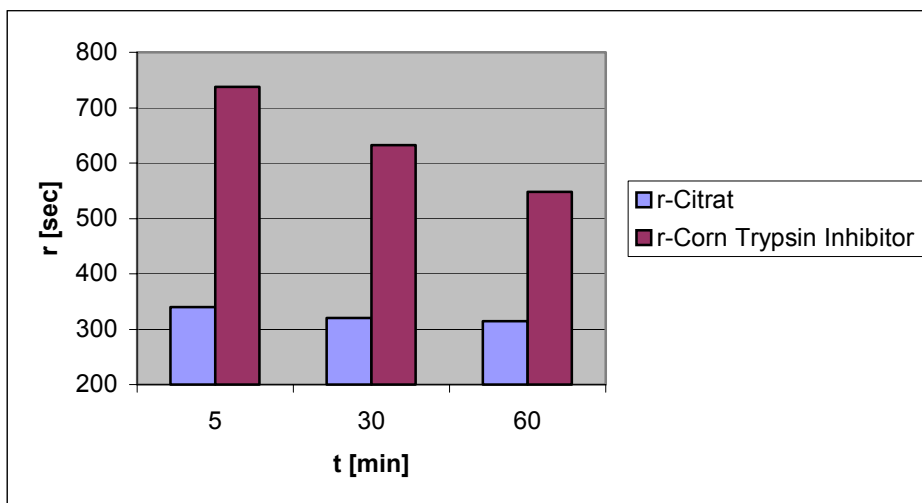


Abb. 3.1-4: Einfluß von Corn Trypsin Inhibitor auf die r-Zeit (n=7)

Als weiterer Parameter zur Abklärung der Mechanismen, die auf die zeitabhängige Lagerung wirksam wurde die Bestimmung der im Blut nachweisbaren PMN-Elastase herangezogen. Wie in der Tabelle dargestellt konnte im Verlauf der Lagerung eine geringfügige Erhöhung nachgewiesen werden, die jedoch statistisch nicht signifikant ist. Die Freisetzung der Elastase wird auch nicht von Stabilisatoren im Abnahmesystem beeinflusst.

t [min]	PMN-Elastasekonz. in Citratplasma [ng/ml]		PMN-Elastasekonz. in CTAD-Plasma [ng/ml]	
	MW	VK	MW	VK
5	20,1	27,26	22,5	51,2
30	23,8	30,88	23,3	42,15
60	24,1	42,66	26,1	50,88

Tab. 3.1-3: PMN-Elastase Konzentration im Plasma (n=7)

Um den Einfluß von Inhibitoren gegen Leukozytenelastase, Kathepsin G sowie Chymotrypsin zu studieren wurden die in Material und Methoden beschriebenen Substanzen zugegeben. Diese Inhibitoren zeigten eine Verlängerung der r-Zeit, hatten jedoch keinen Einfluß auf die Verkürzung im Verlauf der Lagerung.

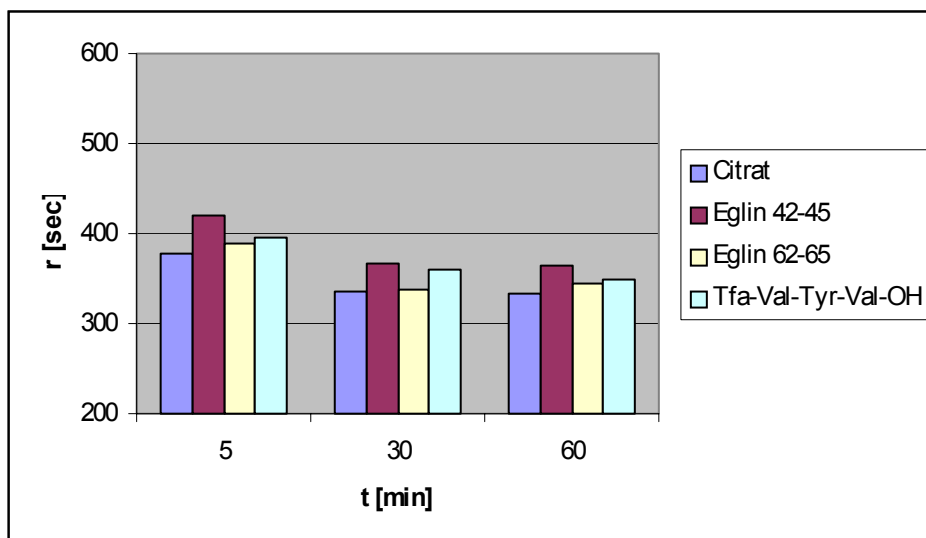


Abb. 3.1-5: Einfluß von Inhibitoren der Leukozytenelastase, Kathepsin G und Chymotrypsin auf die zeitabhängige Änderung der r-Zeit (n=7)

3.2 Daten zur Wirkung von GPIIb/IIIa-Rezeptorantagonisten anhand von roTEG Analyse und kollageninduzierter Aggregation der Plättchen

Die cyclischen RGD-Peptide hatten auch nach Zugabe der hohen Konzentrationen keinen Einfluß auf die Gerinnung im Vollblut.

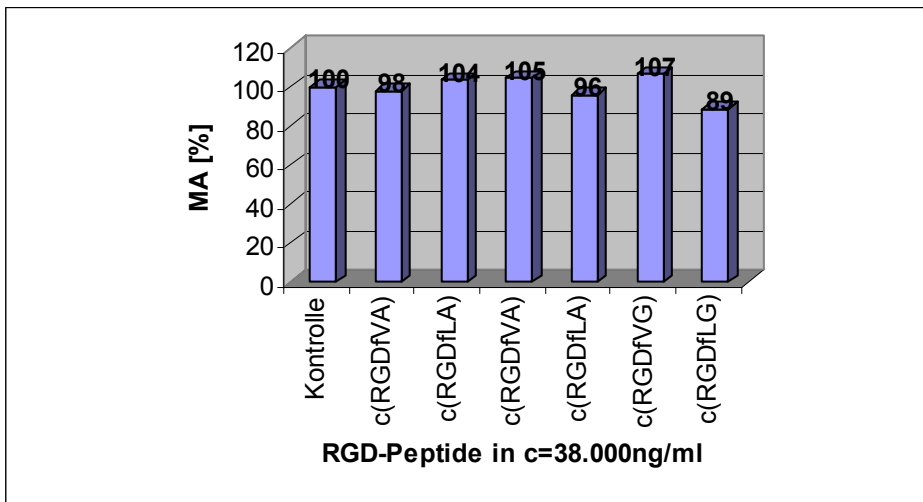


Abb. 3.2-1: NaTEG in Vollblut nach Zugabe der RGD-Peptide (n=5)

Für abciximab konnte eine Reduktion der Gerinnselfestigkeit (MA) auf 31% bei einer Konzentration von 588 ng/ml beobachtet werden. Bei einer Konzentration <117,6 ng/ml war kein Effekt mehr im roTEG zu beobachten.

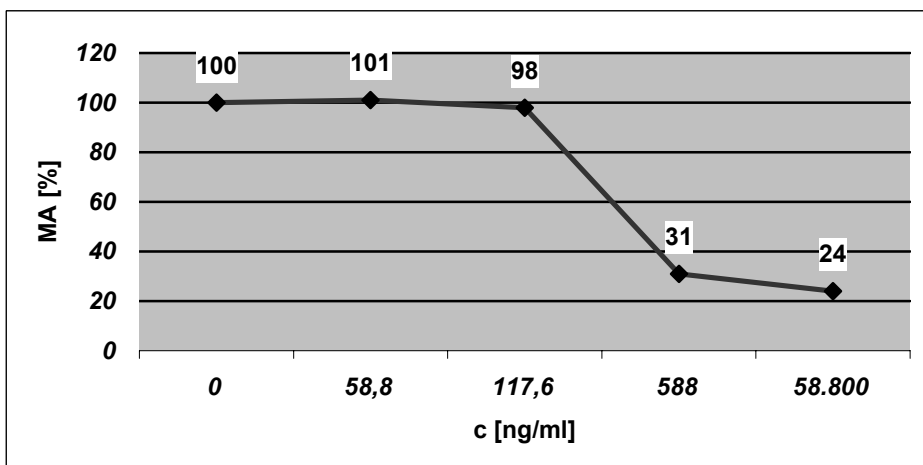


Abb.: 3.2-2: NaTEG in PRP nach Zusatz von abciximab (n=5)

Für Tirofiban konnte eine Reduktion der Gerinnselfestigkeit (MA) auf 30% bei einer Konzentration von 7.400 ng/ml erreicht werden. Bei einer Konzentration <7,4 ng/ml war kein Effekt mehr im roTEG zu beobachten.

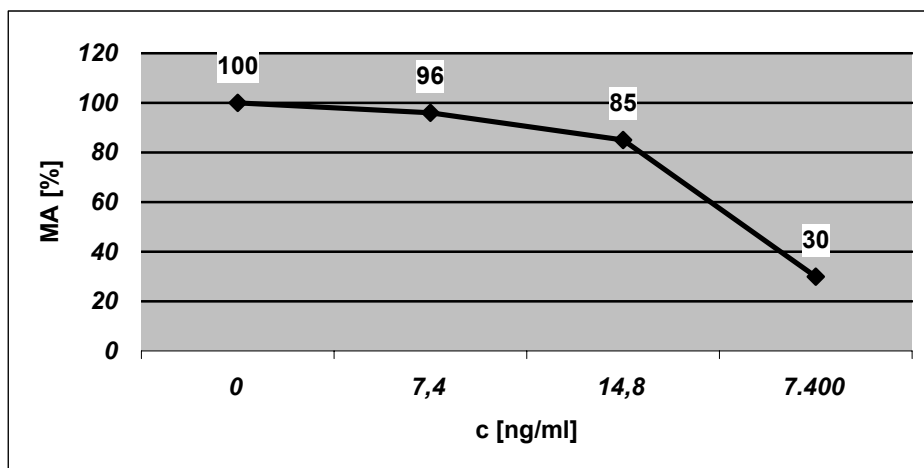


Abb. 3.2-3: NaTEG in PRP nach Zusatz von Tirofiban (n=5)

Alle cyclischen RGD-Peptide hatten auch nach Zugabe der hohen Konzentrationen keinen Einfluß auf die Blutgerinnung im plättchenreichen Plasma.

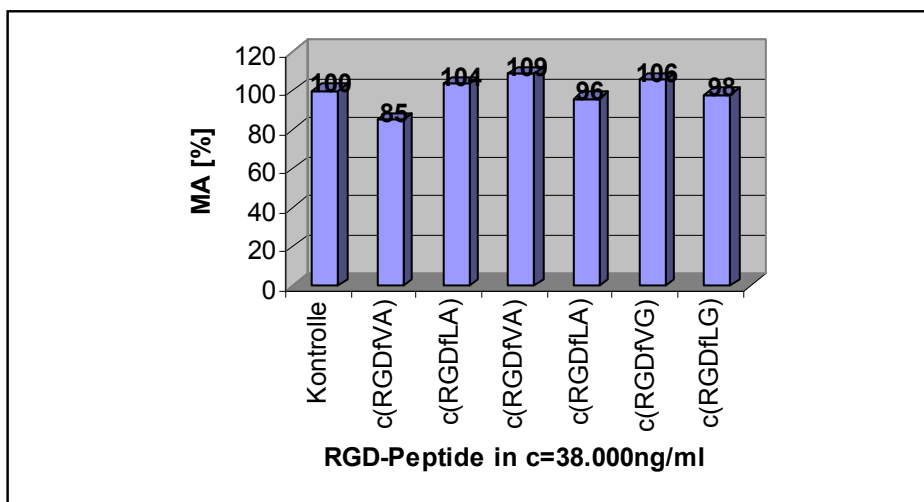


Abb. 3.2-4: NaTEG in PRP nach Zusatz der RGD-Peptide (n=5)

Für abciximab konnte eine Reduktion der Gerinnselfestigkeit (MA) auf 46% bei einer Konzentration von 58.800 ng/ml erreicht werden. Bei einer Konzentration <294 ng/ml war kein Effekt mehr im roTEG zu beobachten.

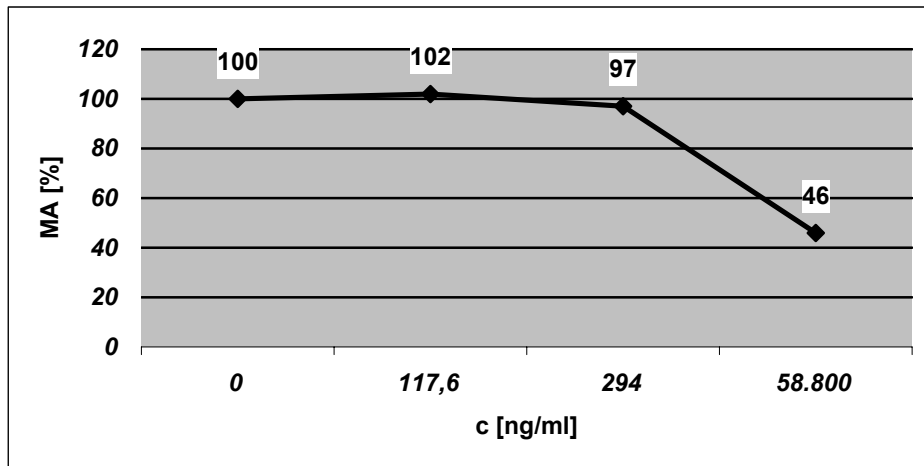


Abb. 3.2-5: ExTEG in PRP nach Zusatz von abciximab (n=5)

Für Tirofiban konnte eine Reduktion der Gerinnselfestigkeit (MA) auf 62% bei einer Konzentration von 7.400 ng/ml erreicht werden. Bei einer Konzentration <14,8 ng/ml vor war kein Effekt mehr im roTEG zu beobachten.

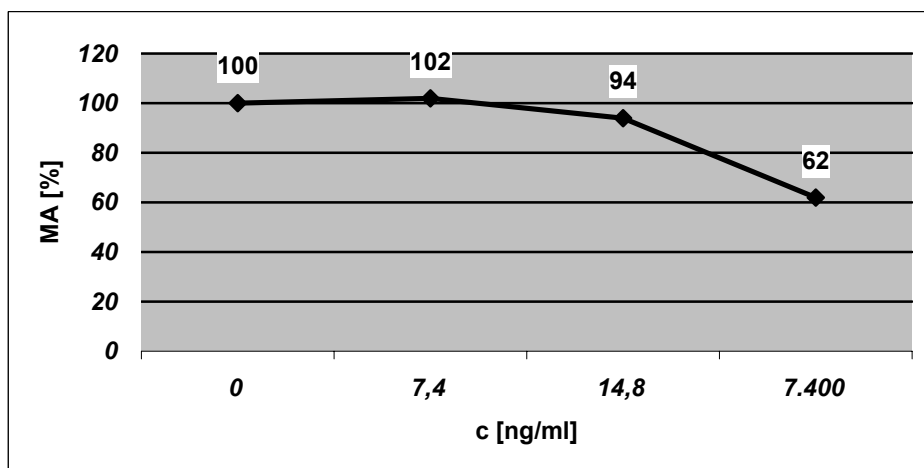


Abb. 3.2-6: ExTEG in PRP nach Zusatz von Tirofiban (n=5)

Die cyclischen RGD-Peptide hatten auch nach Zugabe der hohen Konzentrationen keinen Einfluß auf die Gerinnung im plättchenreichen Plasma.

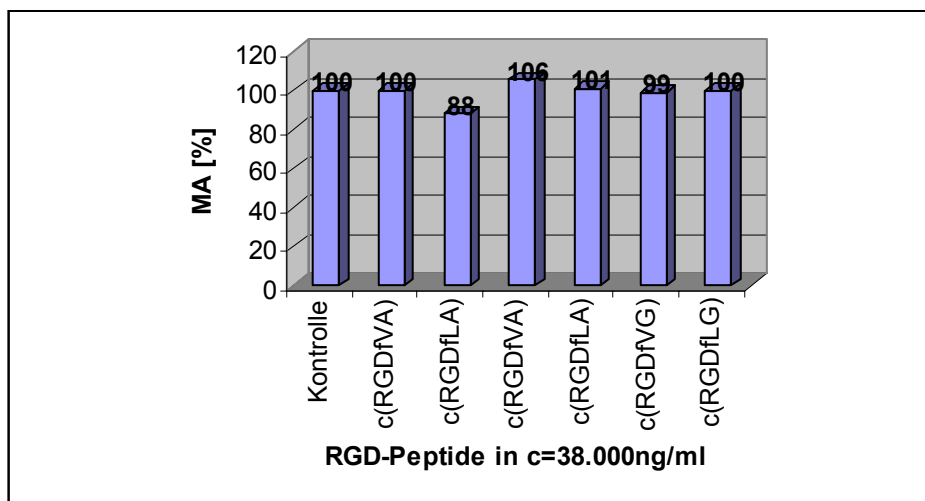


Abb. 3.2-7: ExTEG in PRP nach Zusatz der RGD-Peptide (n=5)

Mit dem gewählten Aggregationstest konnte die Wirkung von GPIIb/IIIa-Rezeptorantagonisten in plättchenreichem Plasma sehr gut bestimmt werden. Eine 50% Hemmung der kollageninduzierten Thrombozytenaggregation wurde mit ca. 645ng/ml abciximab, bzw. mit 4ng/ml (0,008mMol/ml) Tirofiban erreicht. Die cyclischen RGD-Peptide zeigten eine entsprechende Wirkung in einer Konzentration von ca. 64nmol/ml.

	c [ng/ml]	M [nMol/ml]
abciximab	< 645	
Tirofiban	< 4	< 0,008
c(RGDfVA)	41.470	< 64
c(RGDfLA)	42.570	< 64
c(RGDfVA)	41.360	< 64
c(RGDfLA)	42.600	< 64
c(RGDfVG)	40.770	< 64
c(RGDfLG)	41.350	< 64

Tab. 3.2-1: Aggregation der Thrombozyten durch Kollagen im PRP (50%ige Hemmung der Aggregation, n=5)

3.3 Daten der roTEG Analyse von ultraschallbehandelten FFP

Bei Einhaltung der vorgegebenen Parameter der Ultraschallbehandlung bei 290kHz unter Kohlendioxid als Schutzgas und Kühlung bei 20°C konnte „fresh frozen plasma“ mindestens sechs Stunden beschallt werden ohne Gerinnungsaktivität zu verlieren. Ohne Schutzgas verlor das mit Ultraschall bei 290kHz behandelte Plasma bei 20°C kontinuierlich und bereits nach vier Stunden die Fähigkeit zu gerinnen.

t [h]	<i>beschalltes FFP mit CO₂</i>		<i>beschalltes FFP</i>		<i>Kontrolle</i>	
	r [sec]	MA [mm]	r [sec]	MA [mm]	r [sec]	MA [mm]
0,5	697,1	21,2	655,1	19	595	22,2
1	655,5	22	893	18		
2	773,5	25,5	921,4	9,5		
6	710,1	20,5	kein Clot			
13	684	7	kein Clot		keine Veränderung innerhalb der 13 Stunden	

Tab. 3.3-1: NaTEG Analyse von ultraschallbehandeltem „fresh frozen plasma“ in Abhängigkeit vom Schutzgas CO₂ (n=5)

3.4 Daten zur Hämokompatibilität von Biomaterialbeschichtungen

Die roTEG Analyse von Polymer-beschichteten Metallküvetten erfolgte im Vergleich mit unbeschichteten Metallküvetten und den Standardküvetten aus Plastik. Für diese Untersuchung wurde die maximale Amplitude als Parameter zur Beurteilung der Anheftung des Blutgerinnsels an die Küvettenwand herangezogen. Zwischen den Standardküvetten aus Plastik und den unbeschichteten Metallküvetten konnte kein Unterschied im NaTEG festgestellt werden. Hinsichtlich der Biokompatibilität zeigten die Polymere pDTE-co 5% PEG und -co 0,26% PEG sowie das niedermolekulare pD,L-Laktid Resomer (R203) die besten Ergebnisse. Die Polymere pDTE-Sebeceat, -Succinat und-Adipat brachten lediglich eine geringgradige Reduktion der Maximalamplitude mit sich. Keinen Effekt hatten die mit dem Polymer pDTE-Carbonat beschichteten Metallküvetten.

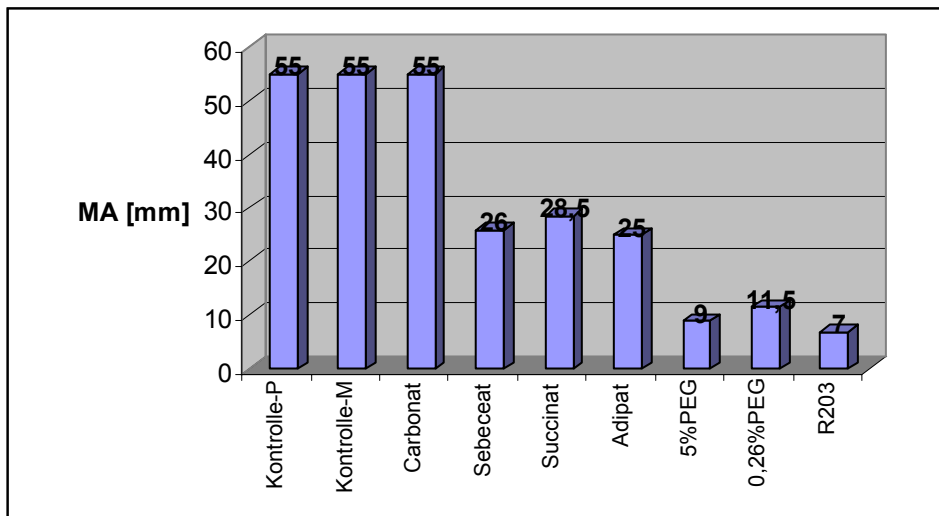


Abb. 3.4-1: NaTEG von Polymer-beschichteten Küvetten (n=5)

3.5 Daten zur Interaktion zwischen Röntgenkontrastmitteln und Blutgerinnung

Von den getesteten Röntgenkontrastmitteln zeigte Hexabrix gefolgt von Imeron und Conray, sowie Omipaque einen großen Einfluß auf die Fibrinbildung. Insgesamt gesehen wurde durch Hexabrix die Fibrinbildung bereits durch sehr geringe Konzentrationen des Röntgenkontrastmittels inhibiert. Hier zeigte sich, daß sowohl anhand der Berechnung in mg Substanz/mg Fibrinogen oder mg Jod/mg Fibrinogen identische Ergebnisse erhoben wurden.

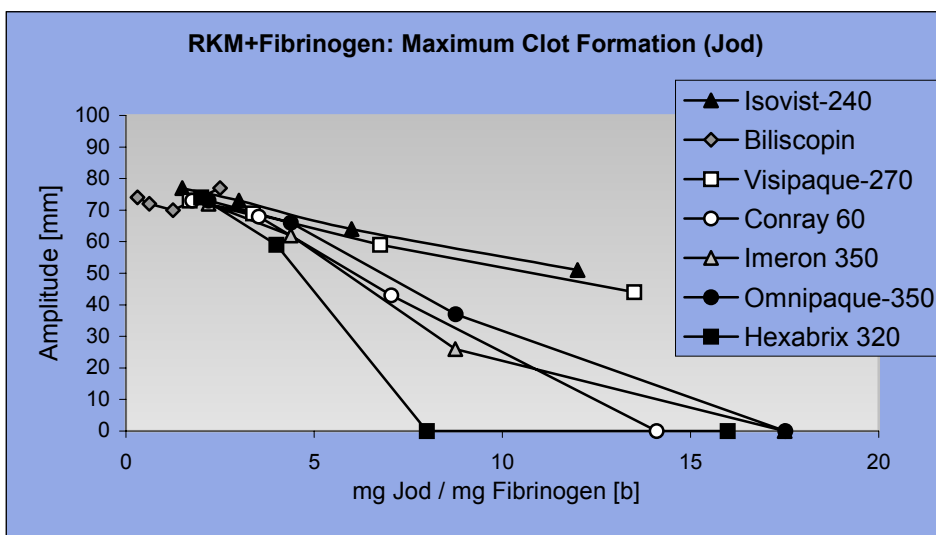
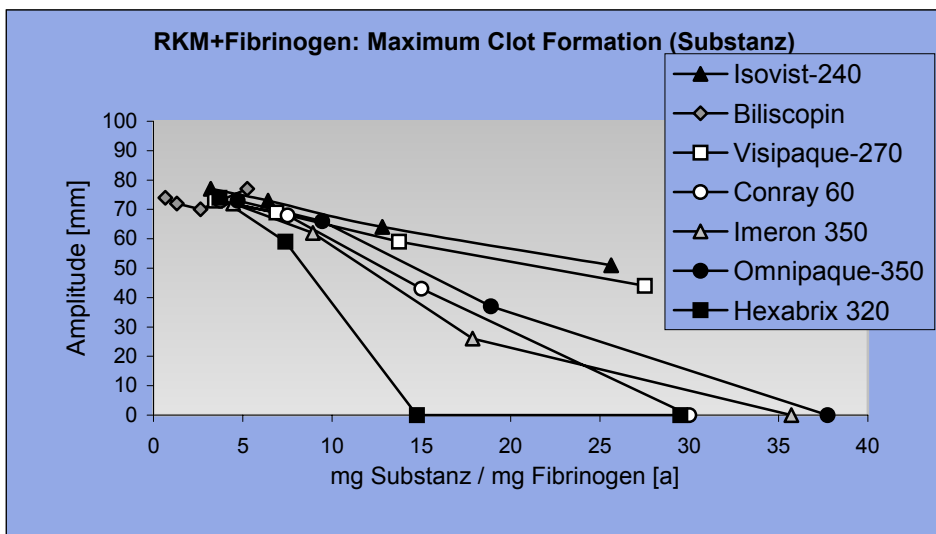


Abb. 3.5-1: Einfluß der Kontrastmittel auf die Fibrinbildung (Darstellung der Ergebnisse in mg Substanz/mg Fibrinogen [a], bzw. mg Jod/mg Fibrinogen [b])

Die eingesetzten jodhaltigen anorganischen, sowie organischen Verbindungen zeigten bereits in sehr geringer Konzentration einen starken Effekt auf die Fibrinbildung unabhängig unter welchem Bezugspunkt (mg Substanz/mg Fibrinogen oder mg Jod/mg Fibrinogen) die Daten errechnet wurden.

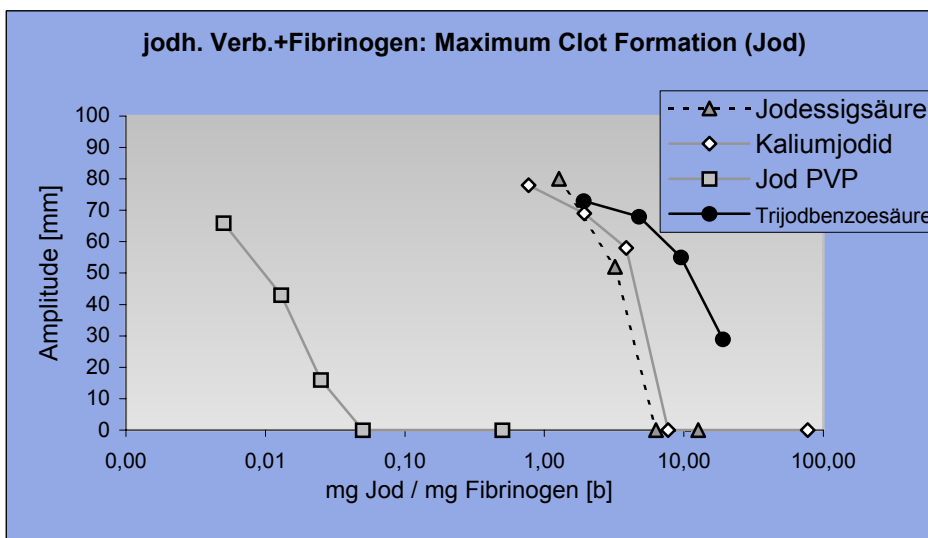
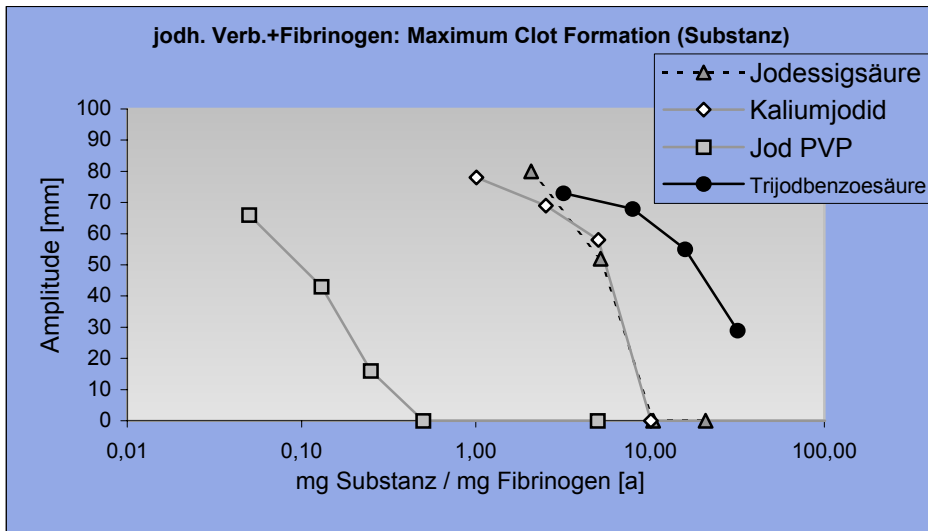


Abb. 3.5-2: Einfluß jodhaltiger Verbindungen auf die Fibrinbildung [a, b]

Wie bereits bei der Analyse der Fibrinbildung nachgewiesen zeigten die eingesetzten Röntgenkontrastmittel, sowie die organischen und anorganischen Jodverbindungen einen großen Einfluß auf den Ablauf der Gerinnung im Vollblut. Insgesamt gesehen wurde im Vergleich zur Fibrinbildung in Gegenwart aller getesteten jodhaltigen Verbindungen bereits bei geringerer Konzentration der Gerinnungsablauf gestört.

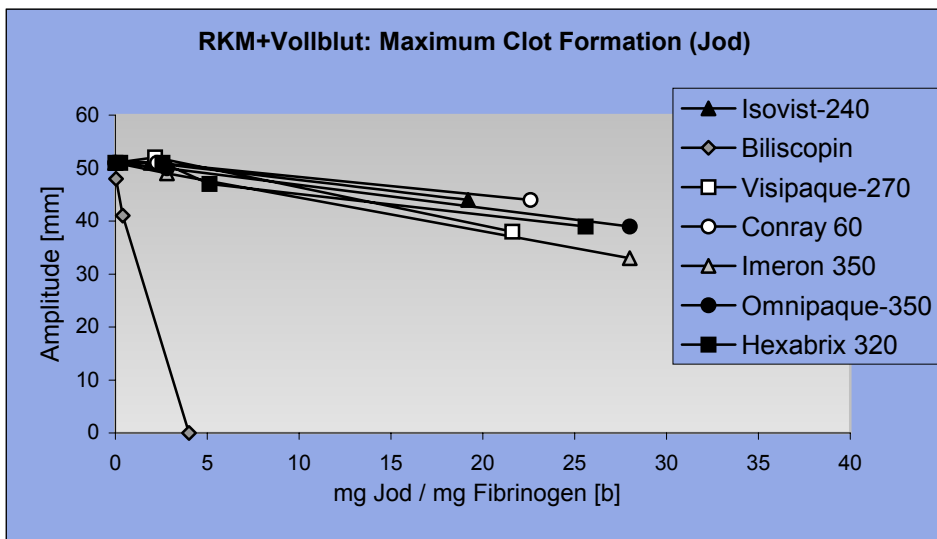
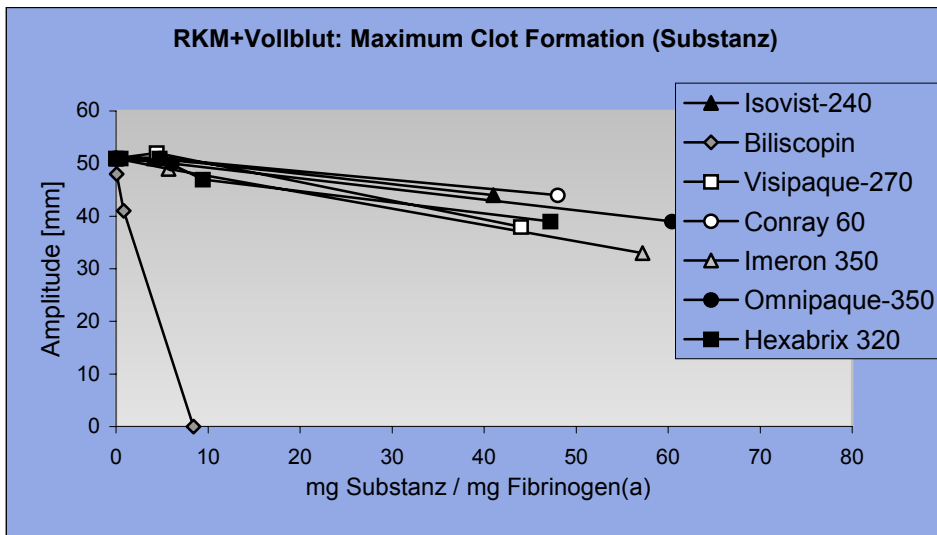


Abb. 3.5-3: Einfluß der Röntgenkontrastmittel auf die Vollblutgerinnung [a, b]

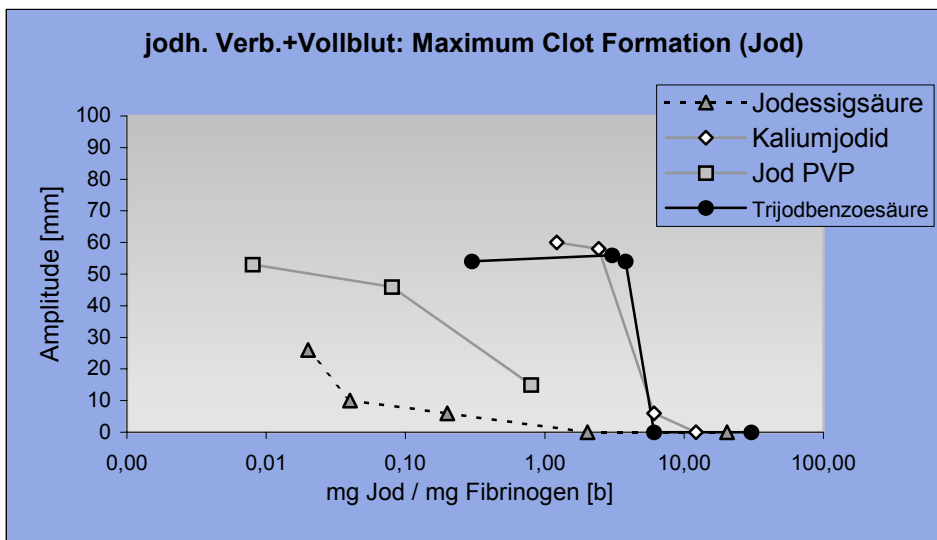
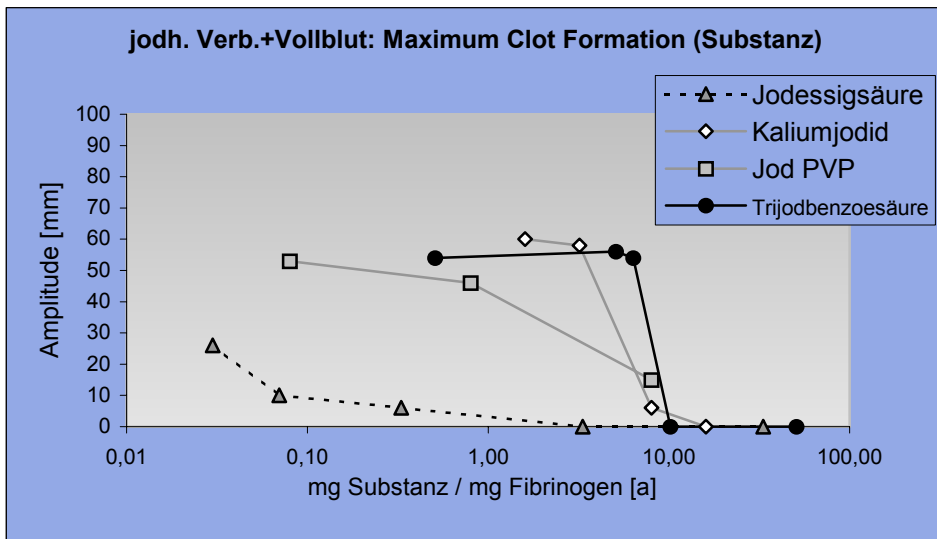
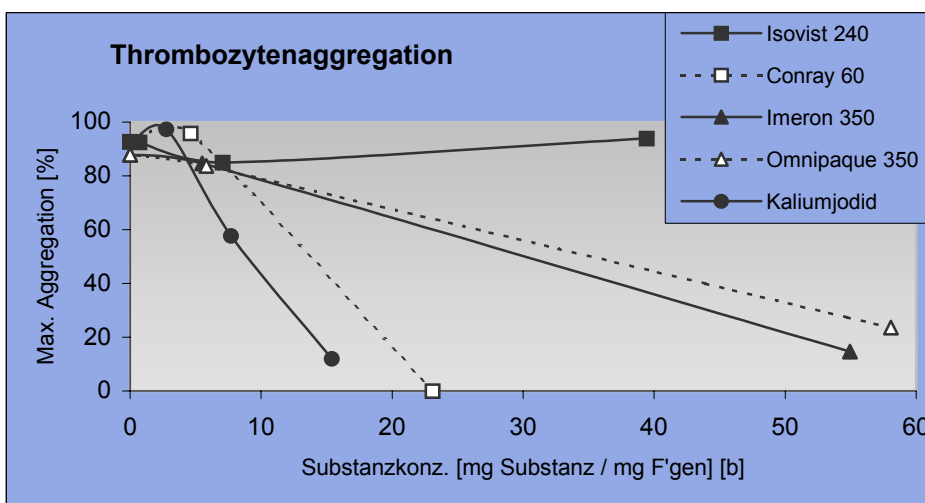
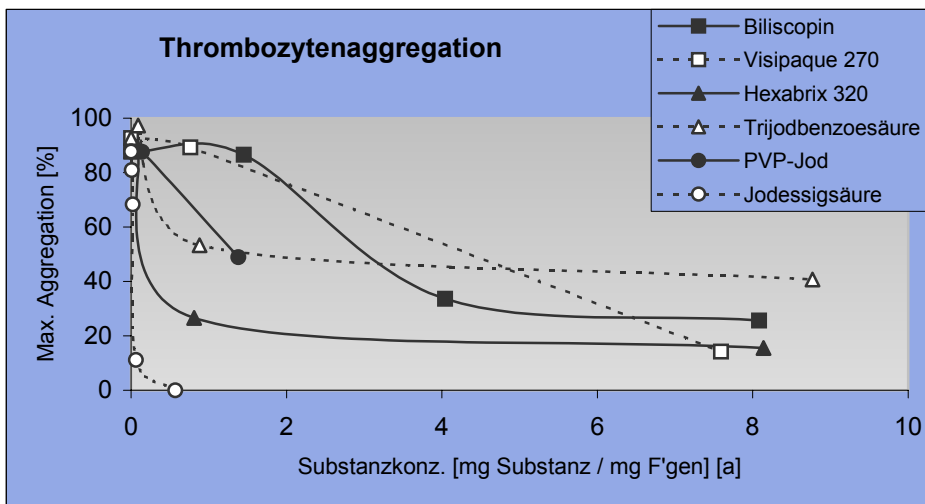


Abb. 3.5-4: Einfluß jodhaltiger organischer und anorganischer Jodverbindungen auf die Vollblutgerinnung [a, b]

Wie in den nachfolgenden Abbildungen von 3.5.5 dargestellt, hatten sowohl die Röntgenkontrastmittel, als auch die getesteten anorganischen und organischen Jodverbindungen einen Einfluß auf den Ablauf der Aggregation von Thrombozyten. Hier zeigte sich das Jodessigsäure in diesem Testsystem die Aggregation bereits in sehr geringer Konzentration vollständig inhibierte. Von den getesteten Röntgenkontrastmitteln war Hexabrix die Substanz mit der höchsten Aktivität. Die anderen organischen Verbindungen zeigten in der Regel bereits bei einer Konzentration kleiner 10mg Substanz/mg Fibrinogen einen großen Einfluß auf die Aggregation der Thrombozyten. Die Wirkung von Kaliumjodid ist schwächer und mit der von Conray 60 vergleichbar.



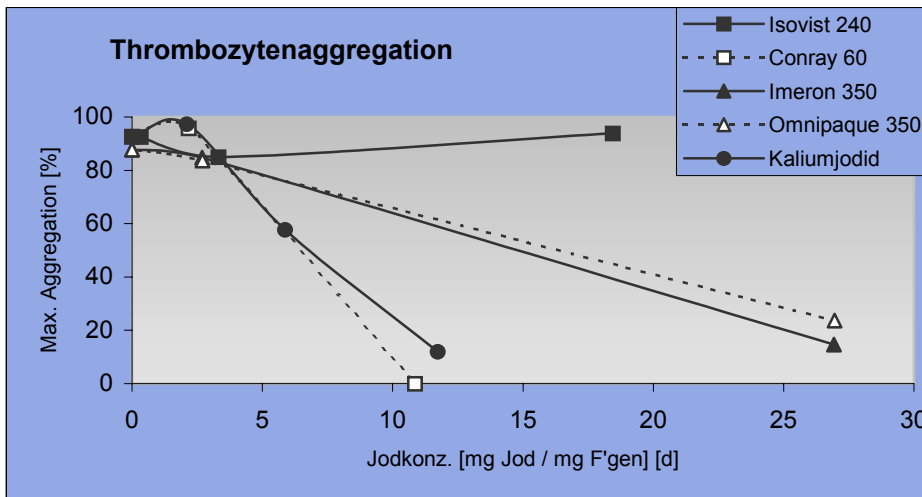
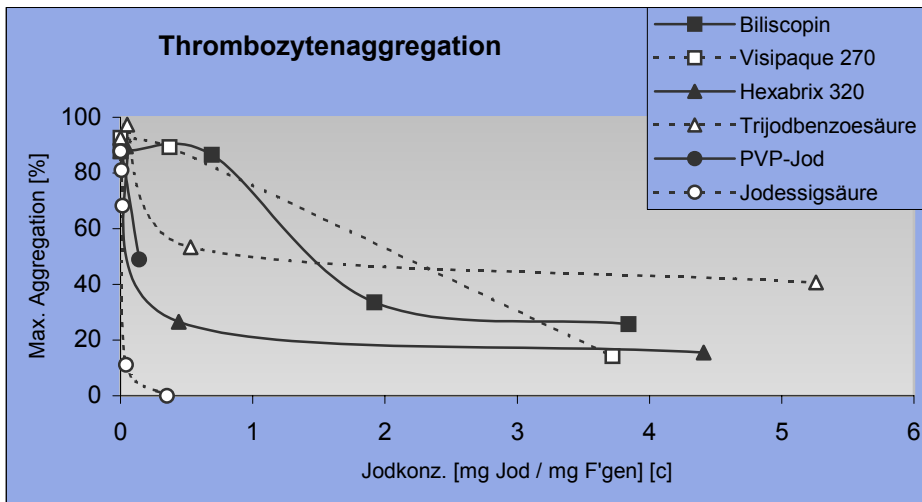


Abb. 3.5-4: Einfluß der Röntgenkontrastmittel und Jodverbindungen auf die Thrombozytenaggregation [a, b, c, d]

4 DISKUSSION

4.1 Wertigkeit der nicht aktivierten Thromboelastographie

Der roTEG Coagulation Analyzer wurde ursprünglicher Weise zur Bestimmung der aktivierten partiellen Thromboplastinzeit bzw. der partiellen Thromboplastinzeit (Quick-Wert) in Vollblut konzipiert. Durch Zugabe von Aktivatoren, die diesem Testsystemen zugrunde liegen, können sehr rasch spezifische Informationen zum Ablauf des Gerinnungssystem gewonnen werden. Allerdings ist nur durch Kombination verschiedener Tests eine globale Bewertung des Gerinnungsstatus möglich. Deshalb wird einem nicht aktiviertem Thromboelastogramm (NaTEG) ein hoher Stellenwert eingeräumt. NaTEG ist definiert als eine einfache Rekalzifizierung von Citratblut ohne Zugabe aktivierender Reagenzien. Damit wird versucht die physiologische Interaktion zwischen den verschiedenen Komponenten des Gerinnungssystem und den Blutzellen zu imitieren. Neben der globalen Aussage dieser Methode ist vor allem die geringe Blutmenge (300µl), die für einen Testansatz benötigt wird, zu erwähnen. Dies könnte große Bedeutung für die Bestimmung des globalen Gerinnungsstatus haben, insbesondere für Neugeborene.

Bei der Anwendung des roTEG Coagulation Analyzers haben sich Probleme mit der Reproduzierbarkeit der Analysen ergeben. Verschiedene Faktoren beeinflussen das NaTEG und somit die Aussagekraft des Verfahrens hinsichtlich der Reliabilität und Variabilität.

Im Zeitalter von HIV und anderen durch Blut übertragbaren viralen Erkrankungen steht es außer Frage die für das *Hellige* TEG verwendeten wiederverwertbaren Metallküvetten und –stifte durch Einmalartikel zu ersetzen. Hier ergibt sich das Problem, daß Plastikoberflächen, der für das roTEG verwendeten Einmalartikel nur eine geringere Kontaktaktivierung bewirken. Dies führt zu verlängerten Gerinnungszeiten und vor allem zu großen Ungenauigkeiten bei Doppelbestimmung. Dies bedeutet eine geringe Aussagekraft und Zuverlässigkeit des Tests.

Weiter sind die hohen Schwankungen des NaTEGs nach Blutlagerung zu berücksichtigen. Innerhalb der ersten Stunde nach Blutentnahme werden diese Veränderungen beobachtet. In diesem Zusammenhang konnte das bereits bekannte

Phänomen, daß die Vollblutgerinnungszeiten während der Lagerung deutlich abnehmen, bestätigt werden (50, 51, 52). In der Vergangenheit wurden diese Veränderungen dem Einfluß von Blutzellen, als essentielle Bestandteile von Vollbluttesten, zugeschrieben. Nach Zentrifugation von Blut bleiben die Daten zur Gerinnung von Plasma stabil und es werden keine zeitabhängigen Verkürzungen beobachtet.

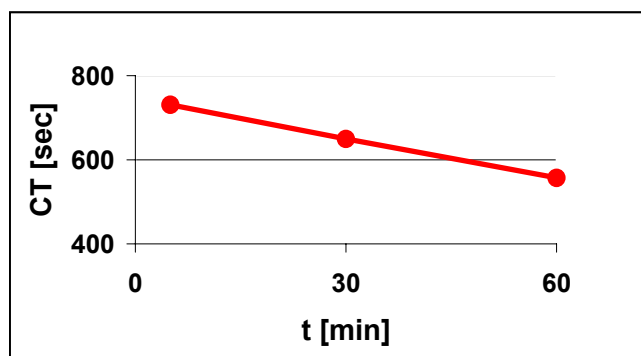


Abb. 4.1-2: r-Zeit Verkürzung am roTEG

Um die Oberfläche, der für das sogenannte *Hellige* TEG verwendeten Metallküvetten zu imitieren wurden daher geringe Konzentrationen von Kaolin der Calciumlösung als Induktor hinzupipettiert. Die Konzentration an Kaolin, die in den unter 2.2 beschriebenen Versuchen zugegeben entspricht einer hohen Verdünnung des sogenannten aPTT Assays. Auf diese Weise konnten Gerinnungszeiten (r-Zeiten), die mit den in der Literatur für Metallküvetten beschriebenen r-Zeiten im *Hellige* TEG vergleichbar sind, erreicht werden. Dies ist auf eine geringgradige Aktivierung des intrinsischen Gerinnungssystems zurückzuführen, die durch den Kontaktaktivator Kaolin induziert wurde. Durch Zugabe von Kaolin in den Plastikküvetten wird die in den Stahlküvetten des *Hellige* Testsystems ablaufende Beschleunigung der Gerinnung nachgeahmt.

Nach Zugabe von Kaolin konnte weiter eine höhere Präzision erreicht werden. Die Variationskoeffizienten der Parameter r, k und MA waren deutlich erniedrigt im Vergleich zur Kontrolle, die nur mit der Calciumchloridlösung aktiviert wurde. Diese einfache Modifikation des nicht aktivierten Thromboelastogramms ist somit ein vielversprechender Ansatz, um bei Verwendung von Plastikküvetten und -stiften die

geforderte Zuverlässigkeit erreichen. Das roTEG Analysesystem führt bei der Verwendung von Kaolin mit Plastikkuvetten zu Ergebnissen mit hoher Präzision. Die Verwendung des NaTEGs als einfacher Test für Gerinnungsuntersuchungen kann durch Zugabe von Kaolin empfohlen werden. In weiteren Untersuchungen dieser Arbeit wurde diese Methode als globale Funktionsanalyse der Gerinnung angewendet.

Ungeklärt sind die Mechanismen, die an der Verkürzung der Gerinnungszeiten bei Lagerung beteiligt sind. Diskutiert werden insbesondere zelluläre Mechanismen, Freisetzung von Mediatoren wie Tissue Factor (TF) aus Monozyten, Elastase aus neutrophilen Granulozyten und sogenannte Mikropartikel aus Plättchen als Quelle von Lipidmembranen, sowie die Kontaktaktivierung des Hagemann Faktors an den Oberflächen der Fremdoberfläche des Blutentnahmesystems.

Große Bedeutung wird dem Einfluß von TF auf lagerungsbedingte Veränderungen, insbesondere der r-Zeit zugeschrieben. TF wird größtenteils in Monozyten synthetisiert und nach deren Stimulierung auf den Zelloberflächen exprimiert (42). TF ist für den sogenannten Tenasekomplex verantwortlich, der eine Schlüsselrolle in der Aktivierung des extrinsischen Systems darstellt. Ungebundener Faktor VII weist nur eine sehr geringe Aktivität auf, während die Komplexbildung mit TF die Aktivität von Faktor VII um ein Vielfaches erhöht (8).

Deshalb war es von besonderem Interesse, die TF-Expression der Monozyten während der Blutlagerung zu untersuchen. Allerdings konnte, wie die eigenen Ergebnisse belegen, durch Zugabe von Tissue Factor Antikörpern keine Beeinflussung der r-Zeit erreicht werden. Aus diesem Grund wird eine Aktivierung und somit Externalisierung von TF auf der Monozytenmembran im Verlauf der Lagerung als unwahrscheinlich angesehen. TF kann damit nicht als Ursache für das zu beobachtende Verkürzungsphänomen herangezogen werden. Gestützt wurden diese Beobachtungen anhand der Daten des kürzlich entwickelten TiFact-assays (Tissue factor assay) verglichen (45). Bei diesem Testsystem handelt es sich wie beim Thromboelastogramm um eine Vollblutmethode, die Aktivierung der Gerinnung wird in Citratblut durch Rekalzifizierung eingeleitet. Die Gerinnungszeit dieses Assays wird von der TF-Expression der Monozyten beeinflusst und macht sich durch verkürzte Gerinnungszeiten bemerkbar. Auch für diesen Assay wurden Untersuchungen zur Blutlagerung

durchgeführt. Eine zeitabhängige Tissue Factor Expression und eine daraus folgende Verkürzung der Gerinnungszeit nach der Lagerung konnte lediglich nach vorangegangener Stimulation mit Lipopolysacchariden beobachtet werden.

Weiter war es Aufgabe, den Einfluß der Kontaktaktivierung via Hagemann Faktor (Faktor XII) während der Blutlagerung zu untersuchen. Faktor XII liegt im Plasma in Zymogenform vor und besitzt keine meßbare esterolytische und/ oder amidolytische Aktivität. Erst durch Kontakt mit negativ geladenen Oberflächen wird das Proenzym in die aktive Form (Faktor XIIa) überführt. Faktor XIIa induziert die Kontaktaktivierung und kann auf diese Weise die Gerinnungskaskade intrinsisch in Gang setzen. Die Aktivierung der plasmatischen Gerinnung ist jedoch nicht der einzige Prozeß, der durch den Kontakt von Blut und Fremdoberflächen durch Faktor XIIa in Gang gesetzt wird. So werden auch das Komplementsystem, sowie Aggregation und Degranulierung von Neutrophilen durch den Mechanismus der Kontaktaktivierung eingeleitet (37).

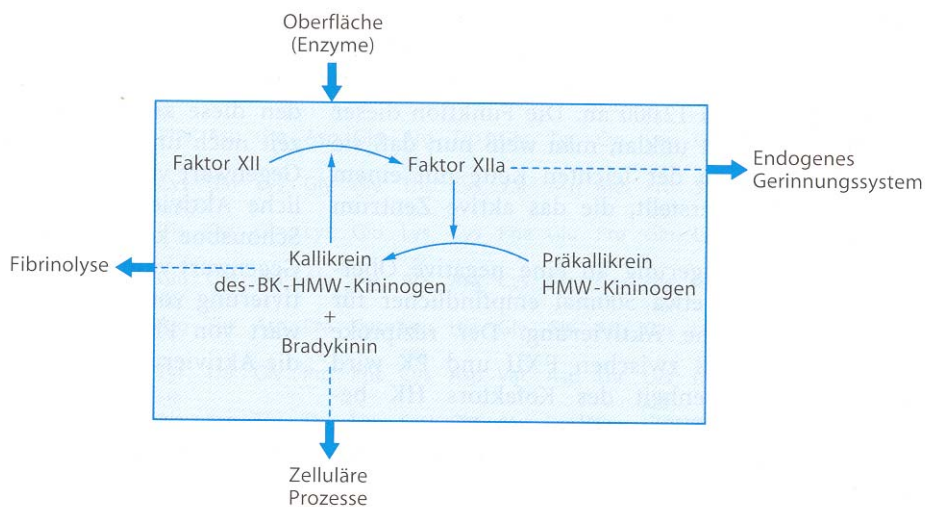


Abb. 4.1-2: Funktionen des Faktor XII in Gerinnung und Fibrinolyse (37)

Aufgrund des multifaktoriellen Einflusses von Faktor XIIa auf die Gerinnung, Fibrinolyse und das Komplementsystem war es von besonderem Interesse, den Einfluß des aktivierten Enzyms Faktor XIIa hinsichtlich des Lagerungsphänomens zu untersuchen. Insbesondere da es sich beim Vorgang der Kontaktaktivierung um eine nicht calciumabhängige Reaktion handelt, die durch Antikoagulation mit Citrat somit nicht beeinflusst wird. Sandwichtubes der Firma Sarstedt, die nach Angaben des

Herstellers die Oberflächenaktivierung der Blutröhrchen minimieren, wurden für diese Untersuchungen verwendet und zur Inaktivierung von Faktor XIIa Corn Trypsin Inhibitor zugesetzt. Durch Corn Trypsin Inhibitor sollte es möglich sein, den nach Oberflächenkontakt gebildeten Faktor XIIa vollständig zu inhibieren. Wie die Ergebnisse zeigen, war nach Zugabe von Corn Trypsin Inhibitor eine starke Verlängerung der r-Zeit zu beobachten. Dies ist auf die Hemmung der Kontaktaktivierung und damit einer mangelnden Aktivierung des intrinsischen Systems zurückzuführen. Jedoch ist es nicht gelungen, durch Inhibition von Faktor XIIa die Verkürzung der r-Zeit im Verlauf der Lagerung zu beeinflussen. Aus diesen Ergebnissen kann gefolgert werden daß Reaktionswege, die durch Faktor XIIa in Gang gesetzt werden, keine Schlüsselrolle in lagerungsbedingten Veränderungen des Blutes spielen.

Um den Einfluß der Thrombozyten auf dieses Phänomen zu studieren, wurde Prostaglandin E1 als Hemmstoff der Thrombozyten zugegeben. Weiter wurde als Stabilisator zur Citratlösung Theophyllin-Adenosin-Dipyridol (CTAD) zur Antikoagulation angewendet. Bei Prostaglandin E1 handelt es sich um einen hochpotenten Inhibitor, der die Thrombozytenaggregation hemmt. Die vorliegenden Daten der Versuche haben gezeigt, daß in Gegenwart von Prostaglandin E1 nur initial die Gerinnung verlängert wurde, während die r-Zeiten zu den Zeitpunkten 30' und 60' nicht von denen der Kontrolle zu unterscheiden waren. Verstoffwechslung oder Zerfall von Prostaglandin E1 während der Lagerungszeit könnten mögliche Ursachen für den ausbleibenden Effekt zu diesen Zeitpunkten darstellen, sind aber rein spekulativ.

Mit Theophyllin-Adenosin-Dipyridol enthalten die CTAD-Lösungen ein Gemisch hochwirksamer Thrombozytenhemmstoffe. Dieser Zusatz wurde ursprünglich zur Konservierung von Blutprodukten entwickelt und diese Mischung wird neuerdings auch zur Stabilisierung der Gerinnung in Blutentnahmeröhrchen angewendet. Wie auch die vorliegenden Untersuchungen zeigen, haben diese Substanzen keinen Effekt auf das Lagerungsphänomen. Dieses Substanzgemisch führte zu einer deutlichen Verlängerung der r-Zeit, das sogenannte Verkürzungsphänomen gelagerter Blutproben blieb jedoch unbeeinflußt. Deshalb kann hier eine primäre Beteiligung der Plättchen ausgeschlossen werden. Die Frage nach der Rolle von Plättchenmikropartikeln kann mit diesen

Versuchen nicht vollständig beantwortet werden. Bei diesen Mikropartikeln handelt es sich um Membranbestandteile der Innenseite der Thrombozytenmembranen, die bei Stimulierung der Thrombozyten freigesetzt werden. Sie liegen im Plasma frei vor und dienen als geeignete Phospholipidoberfläche zur Einleitung der Gerinnung.

Elastase, die aus neutrophilen Granulozyten freigesetzt wird, kann als Protease zahlreiche Proteine angreifen - Elastase inaktiviert Inhibitoren wie Antithrombin III, α_2 -Antiplasmin und C1-Esterase Inhibitor und kann außerdem FV aktivieren, wenn dieser in geringen Konzentrationen und/oder unter verminderten Calciumkonzentrationen vorliegt (27, 43). Um den Einfluß von Elastase auf das Lagerungsphänomen zu untersuchen wurden daher im Vollblut eine Reihe von kommerziell erhältlichen Inhibitoren zugesetzt. Bei den verwendeten Inhibitoren handelt es sich um den hochpotentesten Inhibitor gegen humane Elastase, ein Peptid mit der Struktur Tfa-Val-Tyr-Val-OH, sowie um den Leukozytenelastase Inhibitor Eglin c (60-63)-methyl ester. Weiter wurde der Kathepsin G und Chymotrypsin Inhibitor Eglin c (42-45)-methyl ester eingesetzt. Die Experimente zeigten, daß nach Zusatz dieser Inhibitoren lediglich eine geringe Verlängerung der r-Zeit zu beobachten war. Dies wird parallel durch die Untersuchungen zum Plasmaspiegel der PMN-Elastase bestätigt. Eine signifikante Erhöhung dieses Enzyms in gelagertem Vollblut konnte nicht festgestellt werden. Offensichtlich hat dieser Reaktionsweg keinen Einfluß auf das Lagerungsphänomen, wie durch Verwendung von potenten Inhibitoren und der im Plasma nicht nachweisbaren PMN-Elastase Veränderung im Plasma gezeigt wurde.

Aufgrund dieser Untersuchung kann gesagt werden, daß die dem Lagerungsphänomen zugrunde liegenden Mechanismen mit dem verwendeten Testsystem nicht aufgeklärt werden konnten und weitere Strategien zur Klärung erforderlich sind.

Es wurde mit diesem Testsystem die Kontaktaktivierung untersucht, der Einfluß von Blutzellen wie Monozyten mit TF als Schlüsselaktivator der plasmatischen Gerinnung sowie die Freisetzung von Elastase aus neutrophilen Granulozyten.

Es ist notwendig, ein genau definiertes Zeitprotokoll zu erstellen und weiter entsprechende Normalwerte, wie sie für das *Hellige* TEG vorliegen, zu ermitteln.

Bei Analyse der Blutgerinnung mit dem *Hellige* Thromboelastographen kann auf die entsprechenden Normwerte zurückgegriffen werden, die Analysenvorschriften enthalten auch Angaben zur Lagerung der Blutproben (50, 51, 52). Die Ausarbeitung entsprechender Vorschriften und die Erstellung von Normwerten sind nun für den roTEG Coagulation Analyzer unbedingt erforderlich.

4.2 Monitoring von GPIIb/IIIa-Rezeptorantagonisten

In einem weiteren Teil der Arbeit wurde der Einfluß von sogenannten RGD-Peptiden auf die Mechanismen der plasmatischen Gerinnung und vor allem auf die Funktion der Thrombozyten parallel im Zusammenhang mit der Suche nach Methoden zur Erfassung der Wirkung von GPIIb/IIIa-Rezeptorantagonisten mit einfachen Testsystemen durchgeführt. Dies ist von besonderem Interesse, da diese Inhibitoren ein sehr enges therapeutisches Fenster haben und bei Vorliegen einer latenten Thrombasthenie (Glanzmann-Naegeli Defekt des GPIIb/IIIa Rezeptors) lebensbedrohliche Blutungen auslösen können.

Für das Verständnis der Wirkung dieser Substanzen sind Kenntnisse über den grundlegenden Aufbau der Thrombozytenintegrine wie den sogenannten Thrombozytenrezeptors GPIIb/IIIa sowie verwandter Integrine notwendig. Bei den Integrinen handelt es sich um eine Familie strukturell verwandter Transmembran-Proteine, sie setzen sich aus zwei nicht kovalent verbundenen Transmembran-Glykoproteinen zusammen, die man als Untereinheit α und β bezeichnet (46).

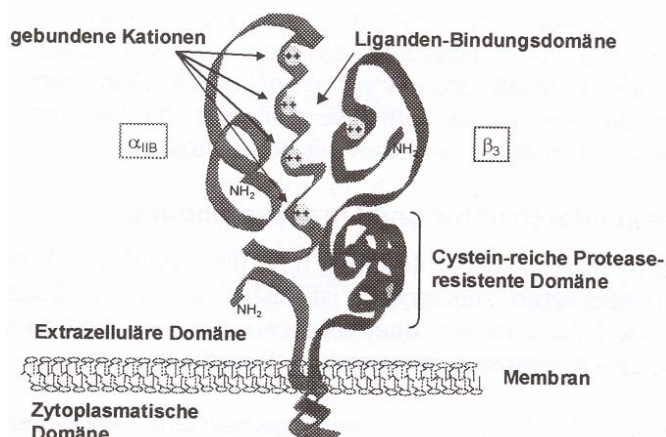


Abb. 4.2-1: Struktur des $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Integrins (GPIIb/IIIa) (46)

Die meisten dieser Integrine erkennen die Aminosäuresequenz Arginin, Glycin und Asparaginsäure, die sogenannte RGD-Sequenz an Adhäsionsmolekülen. Über diese Interaktion kann eine Anheftung verschiedener Proteine an die extrazelluläre Matrix erfolgen (31).

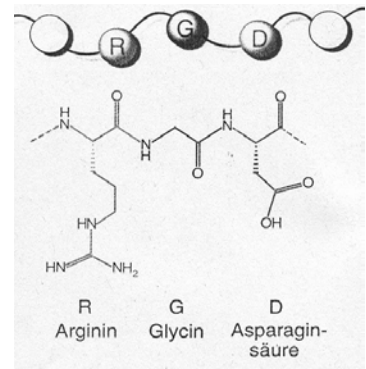


Abb. 4.2-2: RGD-Sequenz (31)

Die verschiedenen Untertypen der Integrinfamilie stellen eine hohe Selektivität in der Erkennung zahlreicher Matrixproteine sicher. So bevorzugt das Integrin $\alpha\text{IIb}\beta_3$ der Thrombozyten die RGD-Sequenz des Gerinnungsproteins Fibrinogen. Dagegen wird das Integrin $\alpha_v\beta_3$ von Endothelzellen, sowie einigen Tumorzellen exprimiert und weist hauptsächlich eine Affinität für das Matrixprotein Vitronektin auf. Dabei stellt sich die Frage, wie Integrine verschiedenen Proteine unterscheiden obgleich diese die gleiche RGD-„Kennung“ tragen. Derzeit wird die Hypothese vertreten, daß eine bestimmte räumliche Konformation der RGD-Sequenz die Unterscheidung ermöglicht.

Eine Arbeitsgruppe der Technischen Universität München unter Leitung von Prof. Dr. H. Kessler⁷ arbeitet derzeit an der Entwicklung verschiedener RGD-Peptide. Beim Design von synthetischen RGD-Peptiden wurde insbesondere der Einfluß der räumlichen Struktur auf die selektive Integrinbindung berücksichtigt. Aufgrund dieser Untersuchungen konnten von dieser Arbeitsgruppe fünf- bis sechsgliedrige cyclische Peptide synthetisiert werden. Die ringförmige Gestalt dieser Peptide soll eine Schleife simulieren, da wie frühere Arbeiten belegen, Erkennungssequenzen in Form einer Schleife tiefer in den gewünschten Rezeptor eintauchen und somit eine bessere Wirkung vermitteln können. Durch die starre Struktur des kurzkettigen Peptidrings ist die räumliche Struktur und damit das Bindungsverhalten dieser RGD-Peptide weitgehend festgelegt. Unerwünschte Nebenwirkungen können auf diese Weise minimiert werden, da hauptsächlich eine Interaktion mit dem gewünschten Rezeptor stattfindet.

⁷ Für die Zusammenstellung der Peptide möchte ich der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. H. Kessler danken

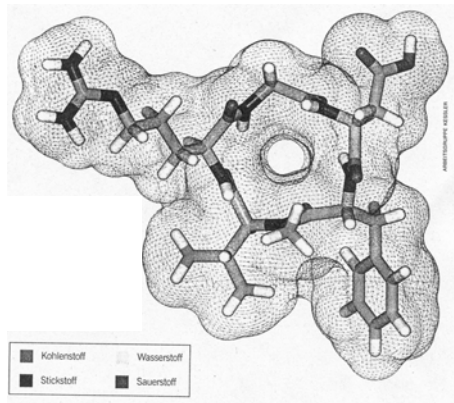


Abb. 4.2-3: Cyclisches RGD-Peptid (31)

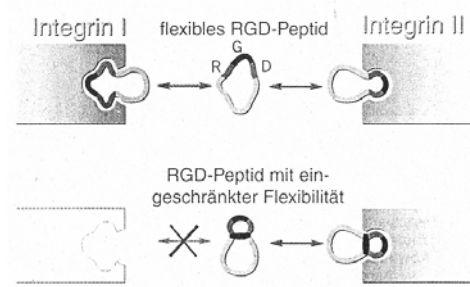


Abb. 4.2-4: Selektives Bindungsverhalten cyclischer RGD-Pep (31)

Ziel dieser Arbeitsgruppe ist die Weiterentwicklung der cyclischen Peptide als Medikamente. Zu den Einsatzgebieten dieser Substanzen soll die Hemmung der tumorvermittelten Neo-Angiogenese gehören. Das hierfür gewählte Pentapeptid RGDFV weist eine sehr hohe Affinität für das $\alpha_v\beta_3$ -Integrin sowie für das verwandte $\alpha_v\beta_5$ -Integrin auf, das gleichfalls auf Endothelzellen wachsender Blutgefäße auftritt. Auf diese Weise sollte es möglich sein, die tumorinduzierte Neo-Angiogenese zu unterbinden und damit die Tumorausbreitung einzuschränken. Außerdem konnte von der Arbeitsgruppe eine direkt toxische Wirkung auf die Tumorzellen beobachtet werden. Bleibt die Anheftung von Tumorzellen an die extrazelluläre Matrix aus, werden Apoptosemechanismen in den malignen Zellen aktiviert. Tierversuche, sowie eine erste Anwendung in der Klinik (klinische Phase II) haben vielversprechende Ergebnisse ergeben.

Eine weitere Anwendungsmöglichkeit ist die Herstellung von körperverträglichen Implantaten. Die unphysiologischen Eigenschaften synthetischer Biomaterialien äußern sich häufig in einer schlechten Integration der Implantate in humanen oder tierischen Gewebe. Abstoßungsreaktionen, mangelnde mechanische Stabilität, Infektionen und Entzündungen sind unerwünschte Folgen der unzureichenden Integration des Implantats und machen oftmals eine Revision notwendig. Beim sogenannten „tissue remodeling“ wird eine Beschichtung von Implantaten mit integrinspezifischen zellselektiven Molekülen angewendet. Auf diese Weise soll eine integrinvermittelte Bindung derjenigen körpereigenen Zellen induziert werden, die durch Knochenumbauprozesse

dessen Integration ins Gewebe ermöglichen. Dabei wird das für den $\alpha_v\beta_3$ - und $\alpha_v\beta_5$ -Rezeptor hochselektive Integrinligand c (-RGDfX-) verwendet. Es konnte gezeigt werden, daß diese Oberflächen integrinbindende Osteoblasten binden, diese zur Proliferation anregen und somit die natürliche Geweberegeneration induzieren (29).

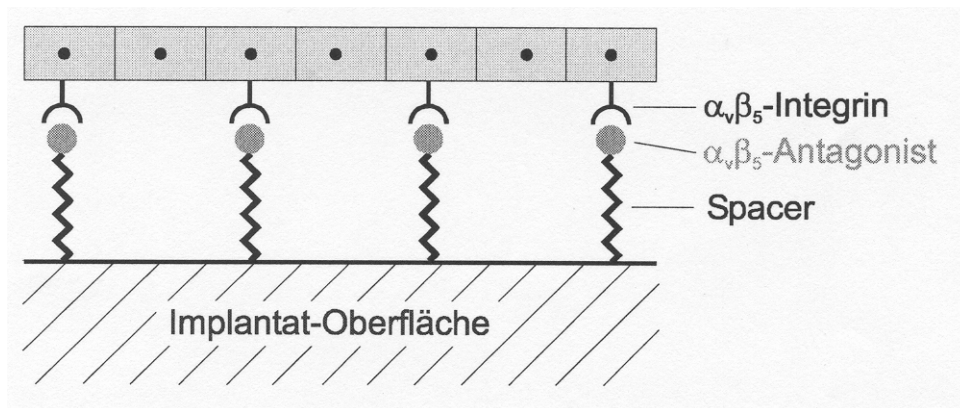


Abb. 4.2-5: Schematische Darstellung der Interaktion zwischen Implantatoberfläche und Osteoblasten

Ungeklärt bleibt die Restaktivität der α_v -selektiven Peptide gegenüber dem $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Integrin der Thrombozyten, sowie der Einfluß auf die plasmatische Gerinnung und die Fibrinolyse. Aufgrund der kürzlich entwickelten Thrombozytenhemmstoffe abciximab und Tirofiban ist erstmals ein direkter Vergleich mit diesen Substanzen und damit eine Einschätzung der antikoagulatorischen Eigenschaften auf der Ebene der Thrombozyten möglich.

Pharmakologische Grundlage der klinischen Anwendung von Thrombozytenfunktionshemmern ist die Umkehr der Thrombozytenhyperreaktivität, der meist eine endotheliale Dysfunktion, insbesondere bei arteriosklerotischen Gefäßerkrankungen zugrunde liegt. Letztendlich münden alle Wege der Thrombozytenaktivierung in die Mobilisierung von GPIIb/IIIa-Rezeptoren aus internen Speicherpools an die Thrombozytenmembran. Diese Konformationsänderung erlaubt eine Bindung über ein Dekapeptid der γ -Kette von Fibrin/Fibrinogen am GPIIb, sowie über die RGD- und KGD (Lys-Gly-Asp) -Sequenz am GPIIIa und damit die Bildung von Thrombozytenaggregaten. Weitere Adhäsionsproteine die an der RGD-Sequenz des GPIIb/IIIa-Rezeptors binden sind Von-Willebrand-Faktor, Thrombospondin,

Vitronektin und Fibronektin. Der GPIIb/IIIa-Rezeptor ist der zahlenmäßig mit Abstand dominierende Thrombozytenrezeptor und ein α IIb β ₃-Integrin, das nur in von Megakaryozyten abgeleiteten Zellen vorkommt. Daher ist die Wirkung der kürzlich entwickelten selektiven Antagonisten von GPIIb/IIIa sehr spezifisch und effektiv. Der chimäre monoklonale Antikörper abciximab (Reopro[®]), der gegen den GPIIb/IIIa-Komplex gerichtet ist, war die erste Substanz dieser Gruppe, die klinisch eingeführt wurde. Weiter zeigt abciximab auch Bindungseigenschaften gegen andere β ₃-Integrine, wie z.B. den Vitronektinrezeptor, die einen Teil der klinischen Wirkung von abciximab ausmachen (12).

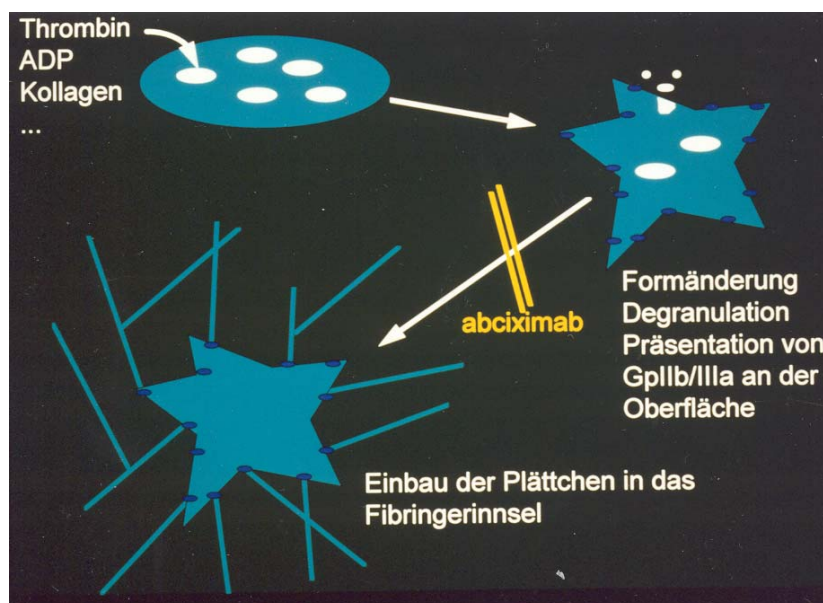


Abb. 4.2-6: Wirkmechanismus von abciximab

Zu den neueren, niedermolekularen Substanzen gehört der Wirkstoff Tirofiban (Aggrastat[®]), der selektiv mit der RGD-Sequenz konkurriert (33). Die Wirkung dieser Substanzen ist kompetitiv und reversibel. Durch abciximab, sowie Tirofiban kann eine Destabilisierung von Thromben, sowie ein Schutz vor einer Re-Thrombose erreicht werden. Für einen klinisch relevanten Effekt ist eine mindestens 80-85% Besetzung der GPIIb/IIIa-Rezeptoren erforderlich (47).

Das therapeutische Fenster ist sehr eng, da bei Rezeptorbesetzungen über 90% bereits ein erhebliches Blutungsrisiko besteht. Nicht selten führt ein nicht diagnostizierter Defekt des GPIIb/IIIa Rezeptors, wie zum Beispiel die Thrombasthenie Glanzmann zu lebensbedrohlichen Blutungskomplikationen. Eine strenge Therapieüberwachung vor Ort ist deshalb dringend notwendig. Dies gilt auch für Patienten ohne diesen Defekt, da große Schwankungen des Plasmaspiegels entsprechender Pharmaka auftreten können. Die Entwicklung eines Pharmakons für die orale Anwendung ist noch nicht gelungen, da eine konstante Wirkkonzentration von 80-90% besetzter GPIIb/IIIa-Rezeptoren schwierig und bei Wirkdauer bis zu 3 Tagen nach Einmalgabe auch hinsichtlich der Kumulation des Wirkstoffes problematisch ist. Deshalb werden diese Substanzen bisher nicht für eine Langzeittherapie eingesetzt, sondern bleiben ausschließlich der Akuttherapie in der interventionellen Kardiologie (PTCA, Stent-Implantation) vorbehalten.

Bei Tirofiban handelt es sich im Vergleich zu den cyclischen RGD-Peptiden ebenfalls um eine chemisch definierte Substanz mit bekannten Molekulargewicht. Laut Angaben des pharmazeutischen Unternehmers wird bei gesunden Probanden eine 50%ige Hemmung der Thrombozytenaggregation mit 13ng/ml (0,024 nMol/ml) in Vollblut erreicht. Eine Verminderung der Gerinnselfestigkeit auf ca. 30% im NaTEG/ bzw. 60% im ExTEG konnte nach Zugabe von 7400ng/ml (14nMol/ml) zu plättchenreichem Plasma ermittelt werden. Daraus kann gefolgert werden, daß therapeutisch relevante Plasmaspiegel dieser Substanz mittels Thromboelastographie nicht erfaßt werden können.

Die cyclischen RGD-Peptide zeigten in der hohen Konzentration von ca. 60nMol keine Wirkung im NaTEG bzw. ExTEG von PRP. Da neben PRP auch in Vollblut keine Wirkung sichtbar war wird angenommen, daß cyclische RGD-Peptide auf die Gerinnungsenzyme Thrombin und Faktor Xa sowie auf die zellulären Komponenten keinen relevanten inhibitorischen Effekt haben.

Bei abciximab handelt es sich um einen chimären Antikörper zur IgG-Gruppe gehörend, dessen Molekulargewicht nicht genau definiert ist. Deshalb können die vorliegenden eigenen Daten nicht auf molarer Basis angegeben werden und somit nicht direkt mit den cyclischen RGD-Peptiden verglichen werden. In der sogenannten EPIC und Epilog

Studie wurden Daten zur Pharmakokinetik von abciximab erhoben (13). Für die angewendete initiale Bolusgabe (0,25mg/kg) wurden maximale Plasmakonzentrationen $> 1\mu\text{g/ml}$ erzielt. Mit dieser Dosierung konnte eine $> 80\%$ Blockade thrombozytärer GPIIb/IIIa Integrine erreicht werden. Mit einer anschließenden kontinuierlichen intravenösen Infusion von $10\mu\text{g/min}$ wurde nach ca. 3-6h eine steady state Plasmakonzentration von $0,3\mu\text{g/ml}$ erzielt, die ungefähr dem therapeutisch anzustrebenden Bereich entspricht. Eine Verminderung der Gerinnselfestigkeit auf ca. 30% konnte im NaTEG nach Zugabe von $0,588\mu\text{g/ml}$ abciximab zu plättchenreichem Plasma ermittelt werden. Für das ExTEG in plättchenreichen Plasma wurde eine Verminderung der Gerinnselfestigkeit auf ca. 50% erreicht lediglich mit einer Abciximabkonzentration von $58,8\text{mg/ml}$. Klinisch relevante Plasmaspiegel dieser Substanz können somit mittels NaTEG in plättchenreichem Plasma nachgewiesen werden. Das ExTEG in plättchenreichem Plasma ist hierfür nicht geeignet.

Am Aggregometer konnte eine 50% Hemmung der Thrombozytenaggregation durch die RGD-Peptide erreicht werden, wenn diese in einer Konzentration von 64nMol vorlagen. Die Ergebnisse, die am Aggregometer für die Substanz Tirofiban und abciximab ermittelt wurden sind mit den von den Firmen angegebenen Werten vergleichbar. Allerdings ist ein Speziallabor notwendig um dieses Testverfahren durchzuführen. Als Bedside Test ist die Aggregometrie deshalb nicht geeignet.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die Wirkung der von Prof. Keßler synthetisierten RGD-Peptide sehr spezifisch ist. Lediglich in sehr hohen Konzentrationen kommt es zu einer relevanten Interaktion mit dem Plättchenrezeptor GPIIb/IIIa. Eine Interaktion mit der plasmatischen Gerinnung konnte nicht nachgewiesen werden.

Die Wirkung des GPIIb/IIIa-Rezeptorantagonisten Tirofiban kann wie gezeigt mittels Thromboelastographie nicht zufriedenstellend überwacht werden. Therapeutisch angestrebte Plasmakonzentrationen von abciximab können im NaTEG in plättchenreichem Plasma nachgewiesen werden. Allerdings ist dies nur nach Zentrifugation in plättchenreiches Plasma und damit nicht „vor Ort“ möglich.

4.3 Einfluß von Ultraschall auf die Gerinnungsfähigkeit von Blutplasma

Im nachfolgenden Teil der Diskussion soll auf die chemikalienfreie Inaktivierung von Bakterien und Viren im Blutplasma oder entsprechenden Lösungen eingegangen werden. Mit der Transfusion von Blut oder von daraus gewonnenen Blutprodukten besteht das Risiko der Übertragung von Infektionskrankheiten. Blut oder zelluläre Komponenten können Bakterien, Parasiten, Pilze und Viren übertragen. Bei Blutplasma und den hieraus gewonnenen Produkten sind in der Regel nur Viren an transfusionsrelevanten Erkrankungen beteiligt. Durch die heute per Gesetz vorgeschriebenen Maßnahmen wird für Vollblut und oder die zellulären Komponenten, eine hohe Sicherheit erreicht. Für die von der Industrie hergestellten Blutprodukte wurden zwischenzeitlich umfangreiche Qualitätssicherungsmaßnahmen etabliert und effektive Verfahren zur Virusreduktion entwickelt (2, 7, 18, 38).

Gemäß den in Europa vorgeschriebenen Richtlinien werden für die Validierung von Inaktivierungstechniken hauptsächlich folgende Viren eingesetzt:

- HIV als Risikovirus für mittelgroß behüllte Viren
- BVD (bovines virales Diarrhoe-Virus) als Modell für Hepatitis-C- und Hepatitis-G-Viren
- HSV (Herpes simplex Virus Typ 1) als Modell für mittelgroße behüllte DNS-Viren
- Poliomyelitis Virus als Modell für unbehüllte kleine RNS-Viren

Um die notwendige Virussicherheit von Blutprodukten wie z.B. “fresh frozen plasma” oder von Gerinnungspräparaten zu gewährleisten sind neben der Auswahl der Spender und umfangreichen Testverfahren vor allem validierte Inaktivierungsverfahren notwendig (11).

Die derzeit gebräuchlichen Verfahren beruhen auf komplexen physikalischen und oder chemischen Technologien, die aufwendige Anlagen benötigen und in der Regel mit einer Reduzierung der Aktivität der hergestellten Plasmaproducte verbunden sind. Viruzide Verfahren zur Herstellung von Blutprodukten beruhen auf der Erhitzung gefriergetrockneter Zwischenprodukte (“dry heating”) mit gespanntem Wasserdampf

bei 80 C, Erhitzen in Lösung bei 60 C unter Zusatz von Stabilisatoren wie Zucker usw., Erhitzen mit organischen Lösungsmitteln wie n-Heptan, Behandlung mittels des sog. solvent detergent Verfahrens (SD-Verfahren), Inkubation mit Methylenblau oder Nanofiltration, um nur einige zu nennen (16). Techniken wie das SD-Verfahren erfassen nur lipophile Viren, es werden daher bei der industriellen Herstellung von Blutderivaten einige der aufgezählten Verfahren kombiniert. Problematisch ist die Entfernung der zugesetzten Chemikalien und Schutzstoffe, die Abtrennung inaktivierter Proteine sowie deren Aufkonzentrierung in aufwendigen Produktionsschritten. In der Regel sind diese Verfahren mit einem hohen Aktivitäts- und Ausbeuteverlust verbunden. Das Ziel des vorgelegten Projektes ist die Übertragung der vorhandenen Technologie zum Abbau von Makrostrukturen durch Ultraschallbehandlung zur mechanischen Zerstörung von Viren im Blutplasma oder in Lösungen von Gerinnungsfaktoren. Mit diesem Verfahren sollte es möglich sein, simultan umhüllte und nicht umhüllte Viren neben Bakterien unter Erhalt der Funktion der Plasmaproteine zu inaktivieren. Die Behandlung von Blutplasma oder isolierten Blutprodukten mit Ultraschall im Frequenzbereich 290 – 390 kHz. unter einem Schutzgas in einem geschlossenem System ist relativ einfach durchzuführen. Mit diesem Verfahren entfallen zudem aufwendige Abtrennschritte und die Reinigung von Resten der eingesetzten Chemikalien (Sicherheitsaspekt für die Blutprodukte) sowie die Entsorgung von problematischen Reststoffen und Abwässern (Umweltaspekt). Dieses Verfahren würde damit eine äußerst kostengünstige und umweltverträgliche Alternative zu den herkömmlichen Verfahren darstellen.

Bei ultraschallunterstützten chemischen Umsetzungen sind neben radikalischen und thermischen Reaktionen für Makromoleküle vor allem die mechanischen Wirkungen von Ultraschall zu berücksichtigen (4). Obwohl die unterschiedlichen Wirkungen des Ultraschalls auf die Bildung von Kavitationsblasen zurückgeführt werden, hängen die einzelnen Effekte in großem Maß von Parametern wie Ultraschallfrequenz und -leistung sowie gelöstem Gas, Temperatur, Viskosität oder Geometrie des Reaktionsraumes ab (35). Dies erklärt sich dadurch, daß einerseits die bei der Implosion erreichten Temperaturen und andererseits die auftretenden Zerrkräfte eine Rolle spielen. Die fundierte Kenntnis des Einflusses der Ultraschallfrequenz auf die ablaufenden chemischen Reaktionen in der Lösung an einem Modellsystem von definierten Molekülen mit hohem bzw. niederen Molekulargewicht ermöglicht die Wahl der am

besten geeigneten Beschallungsparameter. Es hat sich bei den Untersuchungen zum Ultraschallabbau von Makrostrukturen auf der Basis von Dextranen gezeigt, daß sowohl die mechanischen als die radikalischen Effekte sowie beide Effekte simultan genutzt werden können. Das mechanische Zerreißen von Molekülen wird ab Molmassen oberhalb von ca. 20.000 Dalton beobachtet. Erste systematische Untersuchungen mit hochmolekularen Dextranen wurden am Institut für Radiochemie der TU München von Dr. Portenlänger durchgeführt und dienen als hilfreiche Grundlagen für dieses Vorhaben (41).

Im Rahmen einer Kooperation von den Instituten der Radiochemie und experimenteller Onkologie der Technischen Universität München wurde der Abbau von hochmolekularem Heparin zu den pharmakologisch interessanten niedermolekularen Heparinen durch hochfrequenten Ultraschall untersucht. Mittels Ultraschall gelang es, ein neues niedermolekulares Heparin mit einer bis zu doppelt so hohen biologischen Aktivität, verglichen mit den bisherigen Verfahren, herzustellen (26). Neben diesem radikalinduzierten Verfahren soll nun versucht werden, die mechanische Wirkung des Ultraschall gezielt nutzbar zu machen. Der mechanisch induzierte Ultraschallabbau von Makromolekülen scheint ohne störende radikalinduzierte Reaktionen des Ultraschalls möglich. Ausgehend von einer im Labormaßstab bereits gelungenen deutlichen Verminderung der Radikalbildung bei Verwendung von Ultraschall in Gegenwart von Kohlendioxid als Schutzgas, sollte bei weiterer Optimierung der Sättigung mit CO₂ die Radikalbildung vollständig unterdrückt werden können.

Übertragen auf Viren bedeutet dies, daß mit diesem Verfahren eine rein mechanisch induzierte Schädigung der Molekülstruktur bei Viren ermöglicht wird. In einem Multikomponenten-System wie z.B. Blutplasma werden so durch Ultraschall nur Strukturen mit großen Molmassen angegriffen, wobei die niedermolekularen Bestandteile nicht von diesem mechanischen Abbau betroffen sind.

Der gezielte Abbau von Makromolekülen durch die Anwendung von Ultraschall ist nachgewiesen und ebenso, daß eine Ultraschallbehandlung von „fresh frozen plasma“ in einem Frequenzbereich von 290-390 kHz unter Schutzgas die physiologische Funktion

der Proteine im Plasma nicht verändert⁸. Durch die Makrostruktur der Viren, die sich in ihrer Größe von anderen Blutbestandteilen des Blutplasmas unterscheiden, sollte die Verwendung von Ultraschall zu einer selektiven mechanischen Beschädigung der Virenbestandteile wie Virenhülle und oder DNA/RNA führen, ohne Proteine zu verändern.

Eine Virusinaktivierung auf Ultraschallbasis könnte mit relativ geringem apparativen Aufwand auf rein physikalischem Weg ohne Zusatz weiterer Chemikalien erfolgen. Für erste Screening Versuche wurden die Beutel mit „fresh frozen plasma“ wie in Material und Methoden beschrieben nach Sättigung mit dem Schutzgas CO₂ über dem Ultraschallschwinger platziert und beschallt. Nach der Ultraschallbehandlung wurde die Gerinnungsaktivität des „fresh frozen plasma“ mit dem roTEG bestimmt. Für diese Untersuchungen kam ein nicht aktiviertes Thromboelastogramm aufgrund seiner globalen Aussagekraft zum Einsatz.

Aufgrund der vorliegenden Daten kann gesagt werden, daß Plasmaproben für ca. 6 Stunden unter Schutzgas mit Ultraschall behandelt werden können. Der mechanische Abbau ist ohne störende radikalische Reaktionen für mindestens 6 Stunden möglich, was bedeutet, daß die physiologische Funktion von Gerinnungsproteinen während dieses Zeitraumes nicht verändert wird. Weiter konnte gezeigt werden daß das gleichzeitige Einleiten des Schutzgases die Stabilität der Gerinnungsfaktoren deutlich verbessern konnte. Aufgrund dieser Untersuchung kann gefolgert werden, daß es sich hier um ein innovatives Verfahren zur Virusinaktivierung von Blutprodukten handelt.

Es ist geplant, anhand von Spikeversuchen mit humanpathogenen Viren von „fresh frozen plasma“ den Nachweis zu führen, daß Viren durch die angewendete Ultraschalltechnik inaktiviert werden unter Erhalt der physiologischen Funktion der Proteine. Dabei eignet sich als Funktionsanalyse der Gerinnung ein nicht aktiviertes Thromboelastogramm als Screening Test, bevor genaue Einzelfaktorenanalysen zum Einsatz kommen werden.

⁸ bisher unveröffentlichte Ergebnisse der Arbeitsgruppe

4.4 Hämokompatibilität von Biomaterialbeschichtungen

Die Entwicklung von Biomaterialien zur Anwendung in der Medizin hat in den letzten Jahren die Lebensqualität entscheidend verbessert und zur Etablierung neuer interdisziplinärer Forschungsrichtungen wie „Bioengineering“ und „Tissueremodelling“ geführt. Nahezu alle Teile des menschlichen Körpers können heutzutage durch künstliche „Ersatzteile“ ausgetauscht werden. Dazu gehören zum Beispiel Gelenkprothesen, künstliche Herzklappen oder Gefäßprothesen um nur einige zu nennen. Nach Implantation in den menschlichen Körper stehen diese Materialien in andauerndem Kontakt mit den verschiedenen Geweben der entsprechenden Organe. Da Biomaterialien vom menschlichen Körper als Fremdkörper erkannt werden kann abhängig von der Materialoberfläche eine mehr oder weniger ausgeprägte Abwehrreaktion ausgelöst werden. Insbesondere moderne Therapie- und Diagnoseverfahren erfordern einen, wenn auch nur kurzfristigen Kontakt zwischen körpereigenem Gewebe und Fremdoberflächen der Biomaterialien. Hierzu zählen unter anderem Geräte wie Oxygenatoren und Dialysatoren, bei denen es zu einer starken Wechselwirkung zwischen Blut und entsprechenden Membranen kommt.

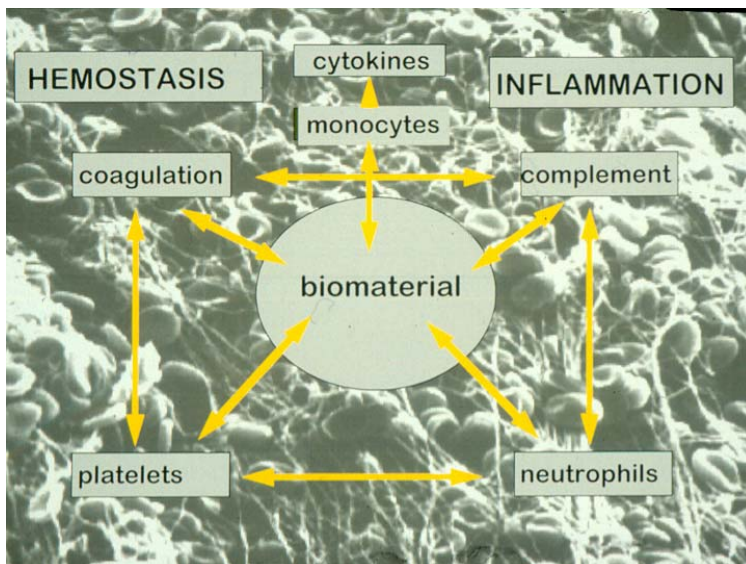


Abb. 4.4-1: Interaktion zellulärer und plasmatischer Blutkomponenten mit Biomaterialien

Bei Materialien mit Blutkontakt steht eine Aktivierung des Hämostasesystems im Vordergrund, während eine Entzündungsreaktion mit nachfolgender Bildung von Granulationsgewebe an der Außenseite von Osteosynthesematerialien zu beobachten ist. Weiter wird über eine Anheftung bestimmter Adhäsionsproteine eine bakterielle Besiedlung der eingebrachten Fremdkörper begünstigt. Eine schlechte Integration implantierter Biomaterialien, sowie thromboembolische Ereignisse und Sepsis stellen ernstzunehmende Komplikationen dar (14, 15, 19, 20, 21, 32, 34).

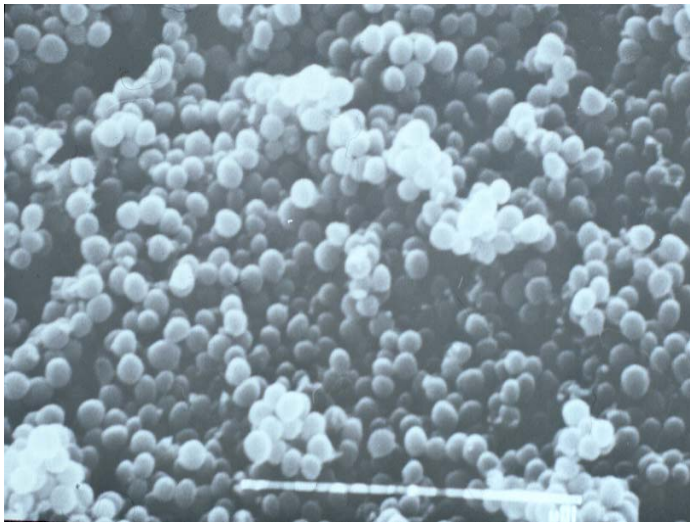
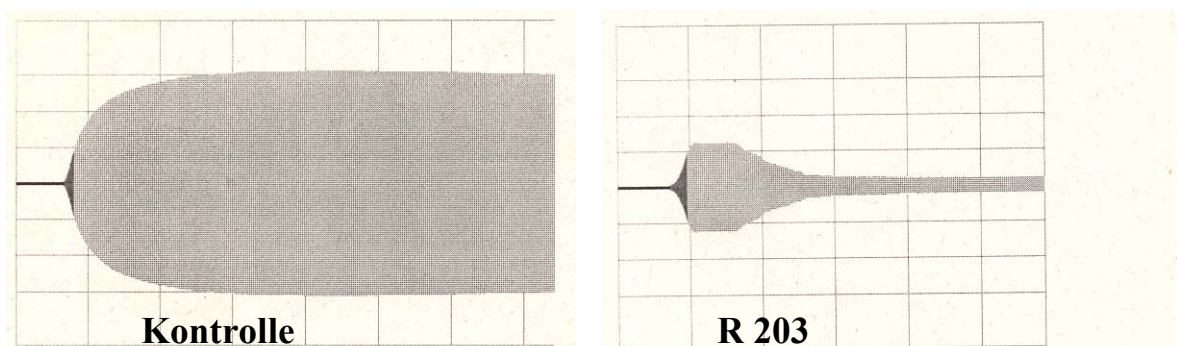


Abb. 4.4-2: Staph. aureus auf einer Implantatoberfläche

Deshalb ist es von besonderem Interesse antithrombogene und antiinfektive Beschichtungen zu etablieren um eine bessere Integration der Biomaterialien zu ermöglichen. Hierfür galt es geeignete resorbierbare Polymere als Träger verschiedener Pharmaka auszuwählen. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde die Hämostabilität der Tyrosinderivate pDTE-Carbonat, -Sebeceat, -Succinat, -Adipat, -co 5% PEG und-co 0,26% PEG sowie des niedermolekularen pD,L-Laktid Resomer (R203) untersucht (6, 54, 55). Niedermolekulare Milchsäure ist als Hauptbestandteil von resorbierbaren Nahtmaterial und Knochenschrauben schon seit längerer Zeit bekannt. Diese Polymere werden im Körper vollständig durch Hydrolyse abgebaut und sind damit nicht toxisch.

Neben der Suche nach geeigneten Polymeren ist es dringend erforderlich validierte Testverfahren zur Überprüfung der Hämokompatibilität von Beschichtungen zu etablieren. Da es sich beim nicht aktivierten Thromboelastogramm um eine globale Testmethode zur Überprüfung des Hämostasesystems handelt wurde die Einsatzmöglichkeit des roTEG Coagulation Analyzers für diese Fragestellung überprüft. Spezielle Metallküvetten wurden hierfür mit den entsprechenden Polymeren mittels *solvent casting* Technik beschichtet und mit herkömmlichen Plastikküvetten verglichen. Zur Beurteilung der Antithrombogenität der gewählten Beschichtungen konnte das Anhaftungsverhalten des wachsenden Blutgerinnsels an die Küvettenwand herangezogen werden. Wie die nun vorliegenden Ergebnisse gezeigt haben, korreliert die Maximalamplitude (MA) mit der Adhäsion des Gerinnsels. Weiter wurde durch geeignete Polymerbeschichtungen ein Abscheren und damit eine rasche Abnahme von MA während der Analyse beobachtet. Es kann somit gesagt werden, daß mit dem roTEG Coagulation Analyzer die Hämokompatibilität von Biomaterialbeschichtungen schnell und zuverlässig überwacht werden kann. In der Literatur finden sich hierzu nur wenige relevante Arbeiten wie zum Beispiel der Nachweis der verminderten Thrombogenität im klassischen Thromboelastogramm nach Beschichtung von Stempel und Küvette mit Phosphatidylcholin (5).

Augrund der Analyseergebnisse haben sich die Polymere pDTE-co 5% PEG und-co 0,26% PEG, sowie das niedermolekulare pD,L-Laktid Resomer R203 als besonders geeignet erwiesen.



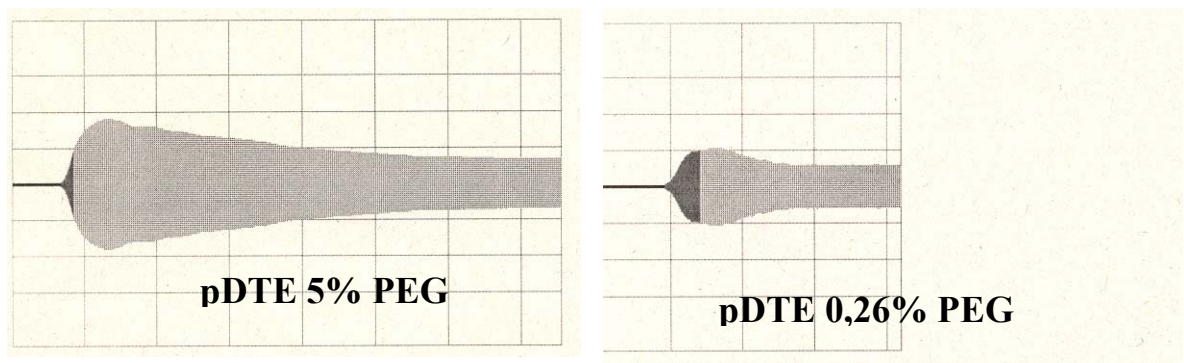


Abb. 4.4-3: RoTEG Thromboelastogramme von beschichteten Metallküvetten

Die restlichen Polymere hatten gar keinen oder nur einen geringen Einfluß auf das Anheftungsverhalten des Blutgerinnsels an die Küvettenwand. Für eine weitere Evaluation dieser Arzneistoffträger ist es notwendig mechanische Stabilität, Freisetzungsverhalten inkorporierter Pharmaka sowie die Biokompatibilität im Tierversuch zu untersuchen. Die Arbeitsgruppe hat für antithrombogene und antiinfektiöse Beschichtungen zwischenzeitlich relevante Daten erhoben (1, 19, 25, 49).

4.5 Interaktion von Röntgenkontrastmitteln und der Blutgerinnung

Röntgenkontrastmittel zur Darstellung von Blutgefäßen haben neue Verfahren der interventionellen Kardiologie wie z. B. die Platzierung von Koronarstents ermöglicht. Seit langem wird in Abhängigkeit vom Typ der Pharmaka diskutiert, daß Röntgenkontrastmittel im Organismus thrombogen bzw. athrombogen wirken können (17, 28, 30, 40). Wie von Markou im Tierversuch gezeigt kann nach Platzierung von Koronarstents im extrakorporalen Kreislauf in Abhängigkeit vom Röntgenkontrastmittel eine geringe oder große Ablagerung von Thromben nachgewiesen werden. Eine Arbeitsgruppe in der experimentellen Onkologie beschäftigt sich seit einiger Zeit mit der Frage zur Nebenwirkung von Röntgenkontrastmitteln hinsichtlich deren thrombogenen Eigenschaft. Zur Abklärung dieser Frage ist hier das roTEG ein geeignetes „tool“ um die mit den Röntgenkontrastmitteln verbundenen Fragen der Thrombogenität abzuklären. Es wurde daher der Einfluß der Röntgenkontrastmittel auf den Ablauf der Vollblutgerinnung untersucht und, da die roTEG Analyse immer von der

Fibrinbildung abhängt, der Einfluß dieser Pharmaka auf die Bildung von Fibrin studiert. In einem weiteren Versuchsansatz wurde dann die Wechselwirkung von Röntgenkontrastmitteln auf den Ablauf der Aggregation von Thrombozyten anhand eines Aggregometers verfolgt. Die hier vorgelegten Daten haben gezeigt, daß alle getesteten Röntgenkontrastmittel in hoher Konzentration die Vollblutgerinnung, Fibrinbildung und Aggregation der Thrombozyten wie Antikoagulanzen beeinflussen. Nach Verdünnung der Röntgenkontrastmittel sind insbesondere Ioxaglinsäure auch noch in geringer Konzentration in der Lage, die Fibrinbildung bzw. die Aggregation der Thrombozyten zu unterbinden.

Zur weiteren Abklärung dieser Befunde wurden dann jodhaltige organische, also aliphatische und aromatische Verbindungen, sowie anorganische Jodverbindungen wie die Röntgenkontrastmittel eingesetzt. Diese Ergebnisse zeigen, daß generell jodhaltige Verbindungen in den Ablauf der Blutgerinnung eingreifen. Es wurden die Vollblutgerinnung, die Fibrinbildung und die Aggregation der Thrombozyten abhängig von der Substanz inhibiert. In diesem Zusammenhang ist in der Gebrauchsanweisung von Fibrinklebern der Hinweis von Interesse, daß Jod PVP, das zur Hautdesinfektion vor der Operation eingesetzt wird, bei Hauttransplantationen die Klebekraft des Fibrinklebers negativ beeinflußt. Dies ist ein Hinweis auf die Interaktion von Jod mit Fibrin. In der Fibrinchemie ist seit langem die Wirkung von Substanzen wie Halogen bekannt, die bei der Fibrinpolymerisation eine Ausbildung von Wasserstoffbrücken verhindern (48). Bei der Affinitätschromatographie löslicher Fibrinmonomerkomplexe im Plasma an hochreinen Fibrinogen wird Fibrin gebunden und durch einen Puffer der Kaliumbromid enthielt, Fibrin eluiert und nachgewiesen. Von den getesteten jodhaltigen Verbindungen zeigte auf Gewichtsbasis Jodessigsäure bzw. Jodacetat bei pH 7 die beste Wirkung. Die in der Literatur immer wieder diskutierte Frage, daß Röntgenkontrastmittel die Blutgerinnung aktivieren wurde von der Arbeitsgruppe (Calatzis persönliche Mitteilung) anhand eines Assays unter Verwendung des für Thrombin spezifischen Substrates aufgeklärt. Nach Inkubation von Blutplasma mit Röntgenkontrastmittel wurde keine Spaltung des Substrats beobachtet. In einem weiteren Versuchsansatz wurde nach Inkubation von Thrombin mit dem chromogenen Substrat die Frage zur möglichen Inhibierung der Enzymaktivität abgeklärt. Diese Daten zeigen, daß es in Gegenwart von Röntgenkontrastmitteln weder zur Aktivierung

von Thrombin aus Prothrombin kommt, noch die enzymatische Aktivität von Thrombin inhibiert wird. Diese Daten könne wie folgt zusammengefaßt werden.

- Röntgenkontrastmittel bewirken weder eine Inhibition noch eine Aktivierung von Thrombin
- Die Fibrinbildung wird durch ionische und nichtionische Röntgenkontrastmittel beeinflusst
- Generell verhindern organische und anorganische Jodverbindungen in Abhängigkeit von der Konzentration die Fibrinbildung

Organische und anorganische Jodverbindungen spalten Wasserstoffbrückenbindungen und dieser Effekt ist die Erklärung der bekannten Effekte der Röntgenkontrastmittel auf die Blutgerinnung. Thrombogene Ablagerungen auf Biomaterialien wie Kathetern oder Stents im Blutsystem können durch Kontakt mit Röntgenkontrastmitteln vor Ort aufgelöst und nach Verdünnung der Röntgenkontrastmittel im Blut an einem anderen Ort wieder ausgefällt werden. Röntgenkontrastmittel sind eigentlich antithrombogene Substanzen und können somit paradoxerweise thrombogen wirken.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die Weiterentwicklung der klassischen Methode der Thromboelastographie zu einer Point-of-Care Methode ermöglichte die Bearbeitung klinisch relevanter Fragestellungen. Als Voraussetzung hierfür musste zunächst ein Verfahren zur Oberflächenaktivierung ausgearbeitet werden, um die für das roTEG vorgesehenen Plastikküvetten anstelle der bei herkömmlicher Thrombelastographie verwendeten Stahlküvetten einsetzen zu können. Dies gelang durch umfangreiche in-vitro-Untersuchungen, bei denen durch Zugabe einer geringen Menge von Kaolin die besten Ergebnisse erzielt wurden. Diese Arbeiten waren eine Voraussetzung für eine zukünftige Anwendbarkeit des roTEG zur Beantwortung hämostaseologischer Fragestellungen in der Neonatologie, wo nur minimale Blutmengen zur Verfügung stehen.

Eine Aufgabe dieser Arbeit war, mögliche Ursachen für die bekannten Veränderungen der Vollblutgerinnung nach Blutabnahme und -lagerung zu untersuchen und fragliche Einflüsse verschiedener Antikoagulanslösungen zu prüfen. Hierbei konnte trotz komplexer Untersuchungen kein Beweis geführt werden, daß hierbei die Freisetzung von tissue factor oder die Entstehung von aktivierten Gerinnungsfaktoren einschließlich Freisetzung von Elastase sowie Fragmentierung von Plättchenbestandteilen verantwortlich sind.

Nach diesen umfangreichen Voruntersuchungen wurde das roTEG zur Beantwortung hämostaseologischer Fragestellungen als "Research Tool" eingesetzt, die mit der Fibrinbildung verknüpft sind.

Zum Nachweis der Wirkung virusinaktivierender Verfahren wie Ultraschall auf Veränderungen der Gerinnung in Blutplasma ist es notwendig aussagekräftige und kostengünstige Gerinnungsuntersuchungen durchzuführen, insbesondere bei Anfall großer Probenzahlen. Dies gilt auch für Veränderungen der Gerinnung nach Blutkontakt mit Biomaterialien.

Die vorgelegten Ergebnisse zeigen, daß Veränderungen der Gerinnung nach Ultraschallbehandlung von Plasma mit dem roTEG sehr gut nachgewiesen werden konnten.

Durch neu entwickelte Arzneistoffträger auf der Basis im Körper degradierbarer aliphatischer Polyester können in der Medizin für die intravasale Anwendung bewährte Biomaterialien mit antithrombogenen Eigenschaften ausgerüstet werden. Hier hat sich nun gezeigt, dass durch eine Beschichtung der roTEG Küvetten mit den in Frage kommenden Polyestern deren antithrombogene Eigenschaft auf einfachem Wege sofort erkannt werden können, unter Umgehung aufwendiger und kostenintensiver Blutgerinnungsuntersuchungen. Die Übertragung der Ergebnisse auf Biomaterialien wie Katheter oder Stents ist zwischenzeitlich erfolgt.

Der sichere klinische Einsatz von GPIIb/IIIa Rezeptorantagonisten ist nur mit einem Monitoring durchzuführen. Hier ist das roTEG Verfahren nur bedingt geeignet, da zur Analyse im plättchenreichen Plasma unphysiologische hohe Konzentrationen dieser Pharmaka notwendig sind. Zum „Screening“ hinsichtlich pharmakologischer Wirkung neuer Substanzen ist die roTEG Analyse im plättchenreichem Vollblut jedoch gut geeignet.

Der Einfluß ionischer und nicht ionischer Röntgenkontrastmittel, sowie anderer organischer und anorganischer Jodverbindungen wurde in vitro untersucht. Durch die Zugabe dieser Substanzen zu einer definierten Fibrinogenlösung konnte im roTEG eine konzentrationsabhängige Inhibierung der Fibrinbildung nachgewiesen werden.

Die hier vorgestellten Untersuchungen haben einen Beitrag geleistet zur Etablierung der roTEG-Analyse als brauchbare Point-of-Care Methode in Klinik und Forschung.

6 LITERATURVERZEICHNIS

1. Alt E, Haehnel I, Beilharz C, Prietzel K, Preter D, Stemberger A, Fliedner T, Erhardt W, Schoemig A (2000)
Inhibition of neointima formation after experimental coronary artery stenting: A new biodegradable stent coating releasing hirudin and prostacyclin analogue iloprost
Circulation 101 (12): 101-112
2. Auer F (1995)
Gesetzgeberische Maßnahmen zur Arzneimittelsicherheit von Blut und Blutprodukten
Hämostaseologie 15: 179-181
3. Barthels M, Poliwoda H (1997)
Gerinnungsanalysen
Stuttgart, New York: 5. Aufl. Thieme Verlag
4. Basedow Am, Ebert KH (1975)
Zum Mechanismus des Abbaus von Polymeren in Lösung durch Ultraschall
Die Makromolekulare Chemie 176: 745-757
5. Bird RR, Hall B, Chapman D, Hobbs KEF (1988)
Material Thromboelastography: An Assessment of Phosphorylcholine Compounds as Models for Biomaterials
Thrombosis Research 51: 471-483
6. Brocchini S, James K, Tangpasuthadol V, Kohn J (1998)
Structure-property correlations in a combinatorial library of degradable biomaterials
J Biomed Mater Res 42 (1): 66-75
7. Bundesamt und Paul Ehrlich Institut (1994)
Anforderungen an Validierungsstudien zum Nachweis der Virussicherheit von Arzneimitteln aus menschlichem Blut oder Plasma
Bundesanzeiger 4742

8. Butenas S, Branda RF, van't Veer C, Cawthorn KM (2001)
Platelets and Phospholipids in Tissue Factor-initiated Thrombin Generation
Thromb Haemost 86: 660-667
9. Calatzis An, Haas S, Gödje O, Calatzis Al, Hipp R, Walenga J (2000)
Thromboelastographic Coagulation Monitoring during Cardiovascular Surgery with
the RoTEG Analyzer
In: Management of Bleeding in Cardiovascular Surgery
Eds: Roque Pifarré – Philadelphia: Hanley & Belfus Med. Pub, 215-226
10. Calatzis An, Hipp R, Stemberger A (1996)
The roTEG coagulation analyzer – a new thromboelastographic system for whole
blood coagulation analysis
Proceedings of the 16th international Congress of Clinical Chemistry B 610
11. Chudy M, Nübling CM, Scheiblauber M, Willkommen H, Kurth R, Löwer J (1995)
Virusübertragung durch Blutprodukte: Mögliche Ursachen und Konsequenzen
Hämostaseologie 15: 215- 219
12. Collier BS (1997)
GPIIb/IIIa-Antagonists: Pathophysiology and Therapeutic Insights from Studies of
c7E3-Fab
Sonderdruck aus *Thromb Haemost* 78: 730-735
13. Darius H (2000)
Abciximab: Klinische Anwendung
In: Abciximab
Hrsg: Schrör K – Frechen: Dr. Schrör Verlag, 52-82
14. David M, Andrew M (1993)
Venous thromboembolic complications in children
J. Pediatr. 123: 337-346

15. De Lalla F (1999)
Antimicrobial chemotherapy in the control of surgical infectious complications
J. Chemotherapy 11: 440-445
16. Doll M, Salge U, Lorenz M, Seitz R, Heiden M (1998)
Oxidative Alteration of Blood Coagulation in Methylene Blue- Treated Therapeutic Plasma
Ann Hematol 76 Suppl A 64
17. Fareed J, Walenga JM, Saravia GE, Moncada RM (1990)
Thrombogenic Potential of Nonionic Contrast Media
Radiology 174: 321-325
18. Fricke WA (1993)
Viral Safety of Clotting Factor Concentrates
Thromb Haemost 19: 54- 61
19. Gollwitzer H (2002)
Eine resorbierbare Poly-D,L-Laktid-Beschichtung zur Ausrüstung medizinischer Implantate: mit antithrombogenen Oberflächen in der Neonatologie und antiinfektiven Oberflächen in der Orthopädie
Dissertation an der Technischen Universität München
20. Gristina AG (1987)
Biomaterial-centered infection: Microbial adhesion versus tissue integration
Science 237: 1588-1595
21. Gristina AG, Naylor PT, Myrvik N (1991)
Mechanisms of musculoskeletal sepsis
Orthop. Clin. North Am. 22: 363-371
22. Hartert H (1948)
Blutgerinnungsuntersuchungen mit der Thromboelastographie, einem neuen Untersuchungsverfahren
Klinische Wochenschrift 26: 577-583

23. Hartert H (1949)
Thromboelastographische Untersuchungen zur Thrombusbildung. Über einen strukturbildenden Faktor in den Thrombozyten
Klinische Wochenschrift 27: 789-790
24. Hartert H (1952)
Das Thromboelastogram
Verh. Dtsch. Ges. Kreisl. 17: 562-569
25. Hermann R, Schmidmaier G, Märkl B, Hähnel I, Stemberger A, Alt E (1999)
Antithrombotic coating of stents using a biodegradable drug delivery technology
Thromb Haemost 82, 51-57
26. Heusinger H, Haas S, Portenlänger SG, Stemberger A, Gruhn B (1996)
Verfahren zum Herstellen von Abbauprodukten polymerer Glycosaminoglycane mittels Ultraschall
Applied for German Patent Akz 196 46 901.5-43
27. Hoyer RW, Wyshock EG, Colman RW (1994)
Coagulation Cofactors: Factors V and VIII
In: Hemostasis and Thrombosis
Eds: Colman WC, Hirsch J, Marder VJ, Salzman EW - Philadelphia: 3rd Edition J. B. Lipincott Company
28. Iqbal O, Jeske W, Hoppenstedt D, Koza M, Walenga JM, Fareed J, Moncada R (1995)
Procoagulant and Anticoagulant Effects of Intravascular Contrast Media as Assessed by Thromboelastography
Seminars in Thrombosis and Hemostasis 21 Suppl 4: 86-90
29. Kantlener M, Schaffner P, Finsinger D, Meyer J, Jonczyk A, Diefenbach B, Nies B, Holzemann G, Goodman SL, Kessler H (2000)
Surface coating with cyclic RGD peptides stimulates osteoblast adhesion and proliferation as well as bone formation
Chembiochem 1 (2): 107-114

30. Kaplan K (1991)
Methods for Assessing Activation of Coagulation by Contrast Materials or Catheters
Seminars in Hematology 28 (4) Suppl 7: 16-21
31. Kessler H (2000)
Hoffnung auf neues Krebsmedikament
Spektrum der Wissenschaft 11: 48-53
32. Kooji JD, van der Zant FM, van Beek EJ, Reekers JA (1997)
Pulmonary embolism in deep venous thrombosis of the upper extremity: more often
in the catheter-related thrombosis
Neth. J. Med. 50: 238-242
33. Kumar A, Herrmann HC (1997)
Tirofiban: an investigational platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor antagonist
Exp. Opin. Invest. Drugs 6 (9): 1257-1267
34. Lersch C, Paschalidis M, Theiss W (1999)
Tiefe Venenthrombosen durch zentralvenöse Thrombosen
VASA 28: 71-78
35. Lorimer JP, Mason TJ, Cuthbert TC, Brookfield EA (1995)
The effect of ultrasound on the degradation of aqueous native dextran
Ultrasonics Sonochemistry 2(1): 55-57
36. Mahla E, Lang T, Vicenzi MN, Werkgartner G, Maier R, Probst C, Metzler H
(2001)
Thromboelastography for Monitoring Prolonged Hypercoagulability After Major
Abdominal Surgery
Anesth Analg 92:572-577
37. Mannhalter C (1999)
Faktor XII: Biochemie, Molekularbiologie, Physiologie
In: Hämostaseologie
Hrsg: Müller-Berghaus G, Pötzsch B – Berlin: Springer Verlag, 122-131

38. Mannucci PM (1993)
Clinical Evaluation of Viral Safety of Coagulation Factor Concentrates
Hemophilia World 8: 1 –5
39. Marchal G, Leroux ME, Samana M (1962)
Atlas de Thrombodynamographie
Paris: Service de Propagande Édition Information
40. Markou CP, Chronos NAF Hanson SR (2001)
Antithrombotic Effects of Ionic and Non-ionic Contrast Media in Nonhuman
Thromb Haemost 85: 484-493
41. Portenlänger G (1996)
Auslösung chemischer Reaktionen in Kohlenhydratlösungen durch Ultraschall und
 γ -Strahlung
Dissertation an der Technischen Universität München
42. Ruf W, Mueller BM (1999)
Tissue factor Signaling
Thromb Haemost 82: 175-182
43. Salvesen G, Pizzo SV
Proteinase Inhibitors: α -Macroglobulins, Serpins and Kunins
In: Hemostasis and Thrombosis
Eds: Colman WC, Hirsch J, Marder VJ, Salzman EW - Philadelphia: 3rd Edition J.
B. Lipincott Company
44. Samama CM (2001)
Thromboelastography: The Next Step
Anesth Analg 92: 563-564
45. Santucci R, Erlich J, Wilson M, Kao K, Kickler T, Spillert C, Mackmann N (2000)
Measurement of Tissue Factor Activity in Whole Blood
Thromb Haemost 83: 445-54

46. Schrör K (2000)
Intergrine, Antiintegrine und Disintegrine
In: Abciximab
Hrsg: Schrör K – Frechen: Dr. Schrör Verlag, 1-24
47. Schrör K (1999)
Pharmakologie der Thrombozytenfunktionshemmer
In: Hämostaseologie
Hrsg: Müller-Berghaus G, Pötzsch B – Berlin: Springer Verlag, 642-652
48. Stemberger A, Hörmann H (1975)
Heterogeneity of Clottable Fibrinogen Isolated from Plasma by Affinity Chromatography
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 356: 341-348
49. Stemberger A, Schmidmaier G, Förster C, Alt E, Kohn J, Calatzis A (1997)
New antithrombin agents: Potential for coating biomaterials used in cardiopulmonary bypass
In: New Anticoagulants for the Cardiovascular Patient
Eds: Roque Pifarré – Philadelphia: Hanley & Belfus Med. Pub., 377-386
50. Sutor AH, Niemer J (1983)
Alteration of r-time (resonance-thrombography) by blood cells
Clin Hemorrhoeol 3: 541
51. Sutor AH, Niemer J (1983)
Normal values for parameter of resonance-thrombography
Clin Hemorrhoeol 3: 541
52. Sutor AH, Schorn P (1976)
Partielle (PTT)-Bestimmung im Kindesalter. Normalwerte und Veränderungen unter verschiedenen Lagerungsbedingungen
Klin Päd 188: 499-507

53. Tuman KJ, McCarthy RJ, Ivankovich AD (1991)
The Thromboelastograph: Is it the Solution Coagulation Problems?
Cardiothoracic and Vacular Anesthesia Update 2 (8): 1-13
54. Yu C, Mielewczyk SS, Breslauer KJ, Kohn J (1999)
Tyrosine-PEG-derived poly(ether carbonate)s as new biomaterials. Part II: study of
inverse temperature transitions
Biomaterials 20 (3): 265-272
55. Yu C Kohn J (1999)
Tyrosine-PEG-derived poly(ether carbonate)s as new biomaterials. Part I: synthesis
and evaluation
Biomaterials 20 (3): 253-264

7 **ABBILDUNGEN UND TABELLEN**

Abb.1.1-1: <i>Hellige</i> Thromboelastograph	1
Abb.1.1-2: Schema zum Prinzip des <i>Hellige</i> Thromboelastographen.....	2
Abb.1.1-3: Thromboelastogramm mit zugehörigen Parametern	3
Abb.1.1-3: Thromboelastogramme bei verschiedenen hämorrhagischen Diathesen	5
Abb.1.2-1: RoTEG Coagulation Analyzer	7
Abb.1.2-2: Schema des Abtastesystems	8
Abb.1.2-3: RoTEG Thromboelastogramm	9
Abb.3.1-1: r-Zeit in Abhängigkeit vom Abnahmesystem	21
Abb.3.1-2: Einfluß von PG E1 auf die r-Zeit in Abhängigkeit von der Lagerung	21
Abb.3.1-3: Einfluß von „tissue factor“ Antikörper auf die r-Zeit	22
Abb.3.1-4: Einfluß von Corn Trypsin Inhibitor auf die r-Zeit.....	22
Abb.3.1-5: Einfluß von Inhibitoren der Leukozytenelastase, Kathepsin G und Chymotrypsin auf die zeitabhängige Änderung der r-Zeit	23
Abb. 3.2-1: NaTEG in Vollblut nach Zugabe der RGD-Peptide.....	24
Abb.: 3.2-2: NaTEG in PRP nach Zusatz von abciximab	24
Abb. 3.2-3: NaTEG in PRP nach Zusatz von Tirofiban	25
Abb. 3.2-4: NaTEG in PRP nach Zusatz der RGD-Peptide	25
Abb. 3.2-6: ExTEG in PRP nach Zusatz von abciximab.....	26
Abb. 3.2-6: ExTEG in PRP nach Zusatz von Tirofiban	26
Abb. 3.2-7: ExTEG in PRP nach Zusatz der RGD-Peptide.....	27

Abb. 3.4-1: NaTEG von Polymer-beschichteten Küvetten	29
Abb. 3.5-1: Einfluß der Kontrastmittel auf die Fibrinbildung [a, b]	30
Abb. 3.5-2: Einfluß jodhaltiger Verbindungen auf die Fibrinbildung [a, b]	31
Abb. 3.5-3: Einfluß der Röntgenkontrastmittel auf die Vollblutgerinnung [a, b]	32
Abb. 3.5-4: Einfluß jodhaltiger organischer und anorganischer Jodverbindungen auf die Vollblutgerinnung [a, b].....	33
Abb. 3.5-5: Einfluß der Röntgenkontrastmittel und Jodverbindungen auf die Thrombozytenaggregation [a, b, c, d]	35
Abb. 4.1-2: r-Zeit Verkürzung am roTEG	37
Abb. 4.1-2: Funktionen des Faktor XII in Gerinnung und Fibrinolyse	39
Abb. 4.2-1: Struktur des α Ib β ₃ -Integrins (GPIIb/IIIa).....	42
Abb. 4.2-2: RGD-Sequenz.....	43
Abb. 4.2-3: Cyclisches RGD-Peptid.....	44
Abb. 4.2-4: Selektives Bindungsverhalten cyclischer RGD-Peptide	44
Abb. 4.2-5: Schematische Darstellung der Interaktion zwischen Implantatoberfläche und Osteoblasten	45
Abb. 4.2-6: Wirkmechanismus von abciximab	46
Abb. 4.4-1: Interaktion zellulärer und plasmatischer Blutkomponenten mit Biomaterialien.....	53
Abb. 4.4-2: Staph. aureus auf einer Implantatoberfläche	54
Abb. 4.4-3: RoTEG Thromboelastogramme von beschichteten Metallküvetten	55

Tab. 3.1-1: Na TEG Analyse ohne Kaolin.....	20
Tab.3.1-2: NaTEG mit Kaolin	20
Tab.3.1-3: PMN-Elastase Konzentration im Plasma	23
Tab. 3.2-1: Aggregation der Thrombozyten durch Kollagen im PRP	27
Tab. 3.3-1: NaTEG Analyse von ultraschallbehandeltem „fresh frozen plasma“ in Abhängigkeit vom Schutzgas CO2	28

8 LEBENSLAUF

PERSÖNLICHE DATEN

NAME MICHAELA ANDREA STEMBERGER
ADRESSE LANDWEHRSTR. 12A
80336 MÜNCHEN
TEL.: 089/55 96 96 66
EMAIL: michaela.stemberger@stud.tum.de
GEBURTSTAG/-ORT 19.02.1976 IN MÜNCHEN
NATIONALITÄT DEUTSCH
FAMILIENSTAND LEDIG

SCHUL-/UND HOCHSCHULBILDUNG

1982-1986 GRUNDSCHULE NEUBIBERG
1986-1995 GYMNASIUM NEUBIBERG
ABSCHLUß: ALLGEMEINE HOCHSCHULREIFE
WS 1995/96 STUDIUM DER BIOLOGIE, LMU MÜNCHEN
SS 1996-WS 1997/98 STUDIUM DER MEDIZIN (VORKLINIK), LMU MÜNCHEN
SEIT SS 1998 STUDIUM DER MEDIZIN (KLINIK), TU MÜNCHEN
03 1999 1. STAATSEXAMEN
09 2001 2. STAATSEXAMEN
11 2002 3. STAATSEXAMEN

ÄRZTIN IM PRAKTIKUM

AB JAN. 2003 NEUROLOGIE, KLINIKUM GROßHADERN, LMU MÜNCHEN

PRAKTISCHES JAHR

OKT.-NOV. 2001 NEUROLOGIE, AUSTAUSCHPROGRAMM DER TU MÜNCHEN,
BELLEVUE HOSPITAL, NEW YORK UNIVERSITY, NEW YORK
DEZ. 2001-FEBR. 2002 HÄMATOLOGIE/ONKOLOGIE, KLINIKUM RECHTS DER ISAR, TUM
FEBR.-APR. 2002 KARDIOLOGIE, INTENSIVSTATION DES DEUTSCHEN
HERZZENTRUMS MÜNCHEN
APR.-MAI 2002 NEUROLOGIE, BEN TAUB GENERAL HOSPITAL,
BAYLOR COLLEGE OF MEDICINE, HOUSTON
MAI-JUNI 2002 NEUROPÄDIATRIE, TEXAS CHILDREN'S HOSPITAL,
BAYLOR COLLEGE OF MEDICINE, HOUSTON
JUNI-SEPT. 2002 CHIRURGIE, INTENSIVSTATION UND NOTHILFE DES
KRANKENHAUSES MÜNCHEN-BOGENHAUSEN

FAMULATUREN

AUG. 1998	PÄDIATRIE, HÄMATOLOGIE/HÄMOSTASEOLOGIE UND INTENSIVSTATION DER UNIVERSITÄTS-KINDERKLINIK FREIBURG
OKT. 1998	ORTHOPÄDIE, KLINIKUM INGOLSTADT
SEPT.-OKT. 1999	ORTHOPÄDIE, DUKE UNIVERSITY MEDICAL CENTER, DURHAM
AUG.-SEPT. 2000	EXPERIMENTELLE ONKOLOGIE UND THERAPIEFORSCHUNG, TUM
APR.-MAI 2001	KARDIOLOGIE, LOYOLA UNIVERSITY MEDICAL CENTER, CHICAGO

STUDIENBEGLEITENDE TÄTIGKEITEN

1992-1994	SANITÄTER, JOHANNITER-UNFALL-HILFE OTTOBRUNN
APR. 1996	KRANKENPFLEGE IN DER GASTROENTEROLOGIE, KRANKENHAUS MÜNCHEN-NEUPERLACH
SEPT.-OKT. 1996	PRAKTIKUM IN DER PRÄVENTIVEN UND REHABILITATIVEN SPORTMEDIZIN, TUM
MÄRZ-APR. 1997	KRANKENPFLEGE IN DER KARDIOLOGIE, DEUTSCHES HERZZENTRUM MÜNCHEN
SS 1997	CO-ASSISTENTIN IM KURSUS DER MIKROSKOPISCHEN ANATOMIE, LMU MÜNCHEN
APR. 2000	BLOCKPRAKTIKUM PÄDIATRIE, ONKOLOGIE DER KINDERKLINIK MÜNCHEN-SCHWABING
SEPT.-OKT. 2000	INNOVATIONEN DER MOLEKULAREN MEDIZIN UND KLINISCHE FALLPRÄSENTATIONEN FERIENAKADEMIE DER TUM, SARNTAL, ITALIEN

MICHAELA STEMBERGER, MÜNCHEN IM DEZEMBER 2002

9 DANKSAGUNG

Danken möchte ich dem Direktor des Institutes für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung am Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München,

Herrn Univ. Prof. Dr. med. Bernd Gänsbacher,

unter dessen Leitung ich meine wissenschaftliche Arbeit durchführen durfte.

Mein Respekt und ganz herzlicher Dank gilt

Frau apl. Prof. Dr. med. Sylvia Haas,

die mich bei Planung, Durchführung und Auswertung meiner Arbeit hervorragend betreute.

Desweiteren gilt mein großer Dank

Herrn Prof. Dr. med. Anton Sutor,

der mich in die klinische Hämostaseologie der Pädiatrie einführte.

Weiter danke ich allen Mitarbeitern des Gerinnungslabors, insbesondere Frau Laimgruber und meinen Kommilitonen, die mit ihrer „Blutspende“ mir die Durchführung der Arbeit ermöglichten.

Auch für die Unterstützung und ausnahmslose Geduld seitens meiner Familie und meiner Freunde während der letzten Jahre möchte ich mich auf diesem Wege herzlichst bedanken.

Michaela Stemberger