

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I Grosshadern
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. G. Steinbeck

**Klinische Sicherheit, Effektivität und Biokompatibilität der DALI
Apherese mit modifizierter Antikoagulation im Vergleich zum
Standardverfahren**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Thorsten Wendler
aus Darmstadt

2008

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. W. Samtleben

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Dr. h.c. W. Schramm
Prof. Dr. W. Hofmann

Mitbetreuung durch den
habilitierten Mitarbeiter: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. T. Bosch

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 10.07.2008

1. Einleitung

1.1	Lipoproteine	1
1.2	Dyslipoproteinämie – Entstehung, klinische Bedeutung, Atherosklerose und Therapieoptionen	3
1.3	Lipidapherese-Verfahren – Indikationen und klinische Effektivität, Prinzipien und Schwierigkeiten unterschiedlicher Techniken zur extrakorporalen Lipidreduktion	8
1.4	Prinzip und technischer Ablauf der direkten Adsorption von Lipoproteinen (DALI) aus Vollblut	13
1.5	Biokompatibilitätsparameter und deren Bedeutung zur Beurteilung extrakorporaler Kreisläufe	13
1.6	Ziele der vorliegenden Arbeit	18

2. Patienten und Methoden

2.1.	Studiendesign	20
2.1.1	DALI ohne Heparin-Antikoagulation (OH-Studie)	20
2.1.2	DALI mit reduzierter Citrat-Antikoagulation („low-citrate“)	20
2.2	Beschreibung des Patientenkollektivs	21
2.2.1	Ohne Heparin (OH)-Studie	21
2.2.2	Patienten der „low-citrate“-Studie	24
2.3.	Protokoll und Ablauf der Studien	27
2.3.1.	Ohne Heparin (OH)-Studie	27
2.3.2	„low-citrate“-Studie	29
2.4	Labormethoden	30
2.5	Berechnungen	31

3. Ergebnisse

3.1	DALI-Apherese mit niedrig dosierter Citrat-Antikoagulation	33
3.1.1	Technischer Verlauf	33
3.1.2	Klinischer Verlauf und Vitalparameter	33
3.1.3	Hämatologie und Hämolyseparameter	34
3.1.4	Elektrolyte und Blutgasanalyse	37
3.1.5	Gerinnungsparameter	40
3.1.6	Lipoproteine und Fibrinogen	42
3.1.7	Biokompatibilitätsparameter	44
3.1.8	Sonstige Parameter	52
3.2.	DALI-Apherese ohne Heparin	54
3.2.1	Technischer Verlauf	54
3.2.2	Klinischer Verlauf und Vitalparameter	55
3.2.3	Hämatologie und Hämolyseparameter	56
3.2.4	Elektrolyte und Blutgasanalyse	57
3.2.5	Gerinnungsparameter	59
3.2.6	Lipoproteine und Fibrinogen	61
3.2.7	Biokompatibilitätsparameter	63

4. Diskussion

4.1	Sicherheit der modifizierten Verfahren	70
4.2	Biokompatibilität der modifizierten Verfahren	75
4.3	Effektivität der modifizierten Verfahren	81

5. Zusammenfassung	85
---------------------------	-----------

6. Abkürzungsverzeichnis	87
7. Literaturverzeichnis	89
8. Danksagung	100
9. Lebenslauf	101

1. Einleitung

1.1 Lipoproteine

Cholesterin, Cholesterinester, Triglyzeride und Phospholipide sind die Hauptlipide im Säugetier und als solche essentielle Bestandteile. Abgesehen von den amphipathischen Phospholipiden sind die hydrophoben Lipide erst durch komplexe Bindungen an spezialisierte Apoproteine hydrophil und damit im Blut transportabel. Erst dadurch stehen Lipide als unabdingbare Substrate dem Stoffwechsel als Energielieferant und der Synthese von Zellmembranen oder Makromolekülen, wie z.B. Gallensäuren, Steroidhormonen oder Vitamin D, zur Verfügung.

Diese komplexen Makromoleküle, Lipoproteine genannt, werden zu einem kleinen Anteil im Darm und im Wesentlichen in der Leber synthetisiert. In diesen Makromolekülen bilden Triglyzeride und Cholesterinester den Kern, freies Cholesterin, Phospholipide und die Apoproteine bilden die Oberfläche der Lipoprotein-Partikel und sorgen für den hydrophilen Charakter.

Cholesterin und Triglyzeride werden exogen durch Nahrungsaufnahme und endogen durch die mögliche de-novo-Synthese bereitgestellt. Die Menge des exogen aufgenommenen Cholesterins reguliert wesentlich die Cholesterin-Neusynthese. Bei einem intrazellulären Mangel an Cholesterin werden vermehrt LDL-Rezeptoren exprimiert und die Neusynthese von Cholesterin stimuliert indem die Aktivität des regulierenden Enzyms HMG-CoA-Reduktase (Hydroxymethylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase) gesteigert wird.

Es gibt unterschiedliche Lipoproteinklassen, die sich in ihren Bestandteilen qualitativ und quantitativ unterscheiden und die nach ihrer in der Ultrazentrifugation bestimmten Dichte klassifiziert werden. Die physiologischen Lipoproteine sind nachfolgend im Wesentlichen charakterisiert (*Keller et al. 1992; Kostner et al. 2001; Parhofer et al. 2004; Ginsberg et al. 1998*).

- Chylomikronen und Chylomikronen-Remnants sind große, sehr triglyzeridreiche Lipoproteine, die im Darm nach Aufnahme der Nahrungsfette synthetisiert werden und über den Ductus thoracicus in die Blutzirkulation gelangen und somit dem Transport von Nahrungsfetten dienen. Hauptbestandteile sind Triglyzeride und Apolipoprotein B48, aber auch Lipoprotein A, C und E sind enthalten. Der Dichtebereich der Chylomikronen

ist gering und beträgt $<0,95$ g/ml (Chylomikronen-Remnants: 0,95-1,006 g/ml) aufgrund des hohen Triglyzeridanteils und des geringen Proteinanteils ($<2\%$).

- VLDL (Very-low density Lipoproteine) sind triglyzeridreiche Lipoproteine, die in der Leber synthetisiert werden und dem Transport endogen synthetisierter Lipide dienen. Hauptbestandteile sind neben Triglyceriden die Proteine Apoprotein B100, Apoprotein E und auch C. Der Dichtebereich liegt zwischen 0,95 g/ml und 1,006 g/ml.
- IDL (Intermediate density Lipoproteine) entstehen durch Abspaltung von Triglyceriden aus VLDL durch Lipoproteinlipasen. IDL enthalten im Vergleich zu VLDL somit eine geringere Menge an Triglyceriden und einen höheren Anteil an Cholesterinestern. Wesentlicher Proteinbestandteil ist das Apoprotein B100, aber auch Apoprotein E ist enthalten. Die Dichte beträgt zwischen 1,006 g/ml und 1,019 g/ml. Über Apolipoprotein E und den korrespondierenden Rezeptor werden IDL zum Teil in Leberzellen aufgenommen. Ein anderer Teil wird unter Mitwirkung hepatischer Triglyceridlipasen und Abspaltung von Apoprotein E zu LDL umgebaut.
- LDL (Low density Lipoproteine) enthalten als einziges Protein Apolipoprotein B100 und bestehen zu ca. 50% aus Cholesterinestern. LDL transportieren den größten Cholesterinanteil zu peripheren Zellen und entstehen durch Delipidierung von VLDL/IDL. Lipoproteine niedriger Dichte lassen sich in 5 Subfraktionen einteilen, die wiederum unterschiedliche Halbwertszeiten und Zusammensetzungen aber auch unterschiedliche Atherogenität aufweisen. Der Dichtebereich liegt zwischen 1,019 g/ml und 1,063 g/ml. LDL tragen wesentlich zur Entstehung der Atherosklerose bei, es scheint, dass die Anzahl der Apolipoprotein B100 tragenden Partikel und somit die erwähnten unterschiedlichen Subfraktionen hier eine Rolle spielen. Kleine dichte LDL-Moleküle weisen daher die größte Atherogenität auf, in der klinischen Routine werden jedoch keine LDL-Subfraktionen bestimmt.
- HDL (High density Lipoproteine) bestehen zu größtem Anteil aus Cholesterinestern und den Lipoprotein A-Subfraktionen. Lipoproteine hoher Dichte werden in Leber und Darm gebildet und dienen dem Transfer von Cholesterinestern aus peripheren Zellen auf IDL und LDL. Die Dichte der HDL-Partikel liegt zwischen 1,063 g/ml und 1,121 g/ml. HDL-Cholesterin und seine wesentlichsten Apolipoproteine Apo A1 wirken antiatherogen, niedrige

Spiegel sind in den meisten Fällen sekundär verursacht durch einen hohen Gehalt an Chylomikronen, VLDL oder IDL.

- Lipoprotein (a) (Lp(a)) wird in Hepatocyten durch Synthese des Glycoproteins Apoprotein (a) und kovalente Bindung an Apolipoprotein B100 der LDL gebildet. Das Glycoprotein weist eine hohe Sequenzhomologie zu Plasminogen auf. Die Dichte der Lp(a)-Partikel liegt zwischen 1,08 g/ml und 1,1 g/ml. Die Lipoprotein (a)-Konzentration ist individuell im Wesentlichen konstant und nur gering beeinflussbar, hohe Konzentrationen sind atherogen.

Die Apolipoproteine sind die wesentlichen Stabilisatoren der komplexen Makromoleküle, regulieren den Transport und den Stoffwechsel der Lipide. Apolipoprotein B100 ist das Hauptprotein der VLDL (ca. 30% der Lipoproteine), IDL (ca. 60%) und LDL (ca. 95%). Apolipoprotein B100 wird in der Leber gebildet und wirkt als Ligand des LDL-Rezeptors mit dem Ziel LDL in Zellen zu internalisieren. Apolipoprotein CII wirkt als stimulierender Co-Faktor für die Lipoproteinlipase, durch deren Katalyse Triglyzeride hydrolytisch gespalten werden.

1.2 Dyslipoproteinämie – Entstehung, klinische Bedeutung, Atherosklerose und Therapieoptionen

Erhöhte Lipoprotein-Spiegel im Plasma des Menschen, vor allem die cholesterinreichen Klassen, tragen zu einer deutlichen Erhöhung des Risikos an einer Atherosklerose zu erkranken bei. In den meisten Fällen sind erhöhte Lipoprotein-Spiegel durch den Lebensstil westlicher Industrienationen begründet. Falsche Ernährungsgewohnheiten und Übergewicht können bei entsprechender genetischer Disposition eine folgenreiche Dyslipoproteinämie verursachen. Durch Mutationen der Gene, die im Lipoprotein-Metabolismus beteiligt sind, kann es z.B. zu drastischen Erhöhungen der Apolipoprotein B100 tragenden Makromoleküle kommen und eine prämaturne Atherosklerose entstehen.

Bekanntestes Beispiel einer genetisch verursachten Hyperlipoproteinämie ist die Familiäre Hypercholesterinämie (FHC). Die Erkrankung wurde erstmalig 1939 durch Thannhauser et al. und Müller et al. beschrieben (*Thannhauser et al. 1939; Müller 1939*) und ist eine der häufigsten monogenetisch vererbten Stoffwechselerkrankungen. Die Prävalenz beträgt ca. 0,2% der Bevölkerung, in manchen Bevölkerungsgruppen wie Libanesen, Finnen und Frankokanadiern auch

deutlich häufiger; insgesamt sind geschätzt ca. 10 Millionen Menschen betroffen. 1973 konnten Brown und Goldstein einen Defekt des LDL-Rezeptors (LDL-R) als Ursache der Krankheit identifizieren (*Goldstein et al. 1973; Goldstein et al. 2001*), über 800 Mutationen wurden inzwischen im LDL-R Gen (19p13.1-13.3) diagnostiziert (*Civeira et al. 2004*). Laborchemisch imponiert die autosomal dominant vererbte Erkrankung durch eine deutliche Erhöhung des LDL-Cholesterins ohne wesentliche Erhöhung der Triglyzeride und nicht obligat erniedrigte HDL-Cholesterinwerte (Hyperlipoproteinämie Typ IIa nach Fredrickson). Bei heterozygoter Erkrankung ist das LDL-Cholesterin zwei- bis dreifach erhöht, bei homozygoten Formen (ca. 1:1 Million) sind Erhöhungen bis zum 6-fachen der Norm möglich und selbst bei Geburt kann bereits ein Gesamt-Cholesterin von über 1000 mg/dl gemessen werden. Klinisch fallen die Patienten aufgrund tuberöser Xanthome an Ellenbogen und Patella auf; Xanthome der Fingergelenke dorsal und der Achillessehnen sowie Arcus lipoides in jungen Jahren sind weitere Phänomene der Erkrankung. Bei homozygoten Formen sind Hautxanthome schon bei Geburt möglich, generalisierte Hautxanthome entwickeln sich in den ersten Lebensjahren. Das größte Problem der FHC stellt die frühe Entwicklung atherosklerotischer Gefäßläsionen dar, ca. 50% der betroffenen Männer erleiden bereits vor dem 45. Lebensjahr einen Myocardinfarkt, Frauen ca. 10 Jahre später. Bei homozygoten Formen treten Angina pectoris und Myocardinfarkte bereits ab dem 10. Lebensjahr auf. Extrakardiale Atherosklerose, insbesondere die Beteiligung extrakranieller Abschnitte der A. carotis sind zusätzliche Komplikationen, valvuläre und supra-valvuläre Xanthome der Aortenklappe mit symptomatischer Aortenklappenstenose und seltener Xanthome der Mitralklappe sind beschrieben. Neben weiteren genetischen Formen der Hyperlipoproteinämie gibt es sekundäre Formen der Hyperlipoproteinämie, wie z.B. im Rahmen einer Hypothyreose, eines Diabetes mellitus, eines Morbus Cushing oder eines nephrotischen Syndroms.

Die Atherosklerose ist aufgrund ihrer möglichen Folgeerkrankungen trotz vieler Jahrzehnte Forschungs- und Aufklärungsarbeit auch heute noch die häufigste Todesursache in der westlichen Industriegesellschaft. In der deutschen Bevölkerung sterben etwa 50% an Folgen der arteriosklerotischen Herz-Kreislaufkrankung, zu diesen zählen die koronare Herzerkrankung (KHK) mit Manifestation eines Myocardinfarktes oder einer schwerwiegenden Herzrhythmusstörung, dem zerebralschämischen Insult oder der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit

(*Windler 2001; Ross 1993; Lusis 2000; Braunwald 1997*). Die Atherosklerose ist charakterisiert durch Akkumulation von Lipiden und fibrösen Elementen in Gefäßwänden (*Lusis 2000*). Die Pathophysiologie der Atherosklerose ist sehr komplex und beinhaltet nicht nur die Ablagerung von Lipiden, wie lange Zeit angenommen, sondern ist Ergebnis einer Interaktion zahlreicher Risikofaktoren. Zu den etabliertesten Risikofaktoren gehören die arterielle Hypertonie, Nikotinabusus, Diabetes mellitus, Adipositas sowie mangelnde körperliche Aktivität, Mangel an HDL-Cholesterin, Erhöhung von Lipoprotein (a) und weitere genetische Faktoren (*Braunwald 1997; Lusis 2000*). Nach vielen kontrovers geführten Diskussionen ist die Hyperlipoproteinämie sicher einer der Hauptrisikofaktoren, der in zahlreichen epidemiologischen Untersuchungen, wie z.B. der „Framingham Heart Study“ belegt werden konnte (*Wilson et al. 1980; Steinberg 2005*). Die Risikofaktoren wirken als Noxen schädigend auf das Gefäßendothel, die resultierende Endotheldysfunktion wird als initiales Ereignis der Entstehung atherosklerotischer Gefäßläsionen verstanden („response to injury“) (*Ross 1993*). Die Hypercholesterinämie verursacht eine fokale Aktivierung des Gefäßendothels, die Einlagerung von LDL-Cholesterin in die Gefäßintima initiiert eine komplexe inflammatorische Reaktion.

Bei erhöhten Spiegel des LDL-Cholesterins entsteht eine Akkumulation der Lipide in der subendothelialen Matrix (Intima) begünstigt durch eine erhöhte Permeabilität geschädigten Endothels. Die Retention des LDL-Cholesterins an der Gefäßwand wird durch Wechselwirkungen zwischen Proteoglykanen des Endothels und Apolipoprotein B des LDL-Cholesterins begünstigt (*Boren et al. 1998*). Dort erfolgen zahlreiche Modifikationen des LDL-Cholesterins, wesentlich ist die Entstehung von oxidiertem LDL-Cholesterin (ox-LDL). Diese Veränderungen unterstützen schließlich inflammatorische Prozesse, die zur Bildung von Schaumzellen führen. Ox-LDL verursacht eine verringerte Synthese von Stickstoffmonoxid (NO) und stimuliert Endothelzellen zur Sekretion proinflammatorischer Moleküle, Wachstumsfaktoren (M-CSF) und Adhäsionsmoleküle. Durch diese zum Teil chemotaktisch wirksamen Moleküle werden Monocyten und T-Lymphocyten angezogen und an das Endothel gebunden. Hierbei sind diverse Adhäsionsmoleküle wie P-Selektin, E-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1 notwendig. Nach Transmigration der Leukocyten bewirken Cytokine die Proliferation und Differenzierung der Monocyten zu Makrophagen. Diese sind in der Lage über Rezeptoren wie den „scavenger“ Rezeptor stark oxidiertes LDL-Cholesterin aufzunehmen und bilden somit die sogenannten

Schaumzellen. Gemeinsam mit T-Lymphocyten werden die Schaumzellen „fatty streaks“ genannt, den Vorläufern der fortgeschrittenen atherosklerotischen Läsionen. Nach Absterben der Schaumzellen gelangt der lipidreiche Inhalt in die Kerne atherosklerotischer Läsionen (*Ross 1993; Lusis 2000*). Makrophagen und T-Lymphocyten selbst sezernieren vermehrt Cytokine, die wiederum die Migration und Proliferation glatter Muskelzellen (SMC) aus der Tunica media in die Intima stimulieren (*Libby et al. 2005*). Die Akkumulation der nekrotisch-lipidreichen Debris sowie der glatten Muskelzellen und deren vermehrte Bildung von extrazellulärer Matrix Metalloproteasen sind letztlich die Charakteristika der fibrösen Plaques. Die Zusammensetzung und Vulnerabilität der Plaques entscheidet über die mögliche Entstehung einer thrombotischen Komplikation wie dem akuten Koronarsyndrom. Plaques, die einen lipidreichen Kern besitzen, entwickeln eine dünne Hülle, sind reich an inflammatorischen Zellen und bergen die größere Gefahr zu rupturieren (*Levine et al. 1995*). Die Ruptur eines Plaques provoziert den thrombotischen Gefäßverschluss über drei Wege. Möglich ist zum einen die Aktivierung der Thrombocyten durch freiwerdendes Kollagen der Plaque Matrix. Die Sekretion des „tissue factors“ (TF) durch Makrophagen und glatte Muskelzellen und der daraus resultierenden Aktivierung der Gerinnungskaskade stellt einen weiteren Weg dar. Die vermehrte Freisetzung von Plasminogen-activator-inhibitor 1 (PAI 1) nimmt zusätzlich Einfluss auf die Entstehung thrombotischer Ereignisse. Diese Prozesse beeinflussen sich gegenseitig verstärkend (*Libby et al. 2005, Hansson 2005*).

Die Lipidtherapie hat sich in Abhängigkeit des individuellen Atheroskleroserisikos in zahlreichen Interventionsstudien als wirksam erwiesen. Die Indikation zur Lipidtherapie ist nicht alleine von der absoluten Höhe des LDL-Cholesterins abhängig, sondern erfordert eine gründliche Stratifizierung des Risikos an dem Massenphänomen Arteriosklerose manifest zu erkranken. Insbesondere bei Vorliegen weiterer Risikofaktoren der Arteriosklerose kann eine Absenkung des LDL-Cholesterins und Anhebung des HDL-Cholesterins eine deutliche Reduktion der kardiovaskulären Ereignisse wie Angina pectoris oder Myocardinfarkt sowie eine Absenkung der kardialen Mortalität und Letalität erreichen. Sowohl in Studien mit dem Ziel zur Verhinderung primärer kardialer Ereignisse bei entsprechendem Risikoprofil (Primärprävention) (WOSCOP, Helsinki-Heart-Study, AFCAPS/TexCAPS) als auch in Studien mit dem Ziel der Minderung einer

Progression manifester Arteriosklerose und Verhinderung von Zweitereignissen (Sekundärprävention) (Scandinavian Simvastatin Survival Study – 4S, REGRESS, CARE, LIPID) konnten Beweise für die Effektivität der Lipidtherapie erbracht werden (*Thompson et al. 1999; Shepherd et al. 1995; Frick et al. 1987; Downs et al. 1998; Scandinavian Simvastatin Survival Study Group 1994; Pedersen et al. 1998; Pedersen et al. 2000; van Boven et al. 1996*).

So wurde in der West of Scotland Coronary Prevention Study (WOSCOP) durch eine Therapie mit einem HMG-CoA-Reduktase-Hemmer eine Absenkung des LDL-Cholesterins um 26% und eine Anhebung des HDL-Cholesterins um 5% erreicht. Dabei konnte die Häufigkeit letaler und nicht-letaler kardialer Ereignisse nach 5 Jahren um ca. ein Drittel gesenkt werden. Die in der Studie AFCAPS/TexCAPS untersuchte Therapie mit einem HMG-CoA-Reduktase-Hemmer erbrachte bei einem relativ jungen Studienkollektiv mit niedrigem HDL-Cholesterin und LDL-Cholesterin Werten zwischen 130 mg/dl und 190 mg/dl vergleichbare Ergebnisse. In der Sekundärprävention konnte im Rahmen der 4S-Studie durch Therapie mit Simvastatin eine Absenkung des LDL-Cholesterins um 35% und eine Anhebung des HDL-Cholesterins um 8% erreicht werden. In Folge dessen wurde die Rate an Herzinfarkten um ca. 40% und die Gesamtmortalität um ca. 30% reduziert.

Entsprechend der zahlreich erhobenen Daten können die in Tabelle 1.1 dargestellten Therapieziele formuliert werden.

Tab.: 1.1: Therapeutische Zielwerte für LDL-Cholesterin (NCEP ATP III Guidelines)

LDL-Zielwerte (mg/dl) gemäß individuellen Risikoprofils nach ATP III		LDL-Konzentration (mg/dl) zur Einleitung einer therapeutischen Intervention	
Risikokategorie	LDL-Zielwert	Lebensstiländerung	Medikamentös
KHK oder Äquivalente	< 100	> 99	> 129
Keine KHK, > 1 Risikofaktor	< 130	> 129	> 159
Keine KHK, max. 1 Risikofaktor	< 160	> 159	> 189

Es ist zu berücksichtigen, dass das Vorliegen des Risikofaktors Diabetes mellitus auch in der Primärprävention die Therapieziele der Sekundärprävention erfordert.

Neben der Änderung des Lebensstils und Einhaltung einer lipidarmen und –modifizierenden Diät kommt der pharmakologischen Therapie der Hyperlipoproteinämie ein wesentlicher therapeutischer Bestandteil zu. Hierzu stehen unterschiedliche Medikamentengruppen zur Verfügung, zu denen die HMG-CoA-Reduktase-Hemmer, Fibrate, Gallensäureaustauscherharze, Cholesterinresorptionshemmer (Ezetimib) und Nikotinsäure und ihre Derivate zählen. In der Praxis hat sich insbesondere aufgrund der überwältigenden Studienlage die Therapie mit HMG-CoA-Reduktase-Hemmern („Statine“) etabliert. Statine hemmen das geschwindigkeitsbestimmende Enzym der Cholesterinsynthese, 3-Hydroxy-3-Methyl-Glutaryl-CoA-Reduktase, und vermindern somit das in der Leber vorkommende Cholesterin. Dadurch kommt es zur vermehrten Expression des LDL-Cholesterin-Rezeptors und konsekutiv zur Absenkung des LDL-Cholesterins im Serum. In der Monotherapie mit einem HMG-CoA-Reduktase-Hemmer sind Absenkungsraten bis zu 60% beschrieben. Im Falle einer erforderlichen zusätzlichen Reduktion des LDL-Cholesterins sind Kombinationstherapien mit weiteren Medikamenten der genannten Gruppen sinnvoll.

Bei schwerer Hyperlipoproteinämie reichen die konservativen Maßnahmen jedoch möglicherweise nicht aus, so dass die Anwendung der Lipidapherese einen zusätzlichen LDL-Cholesterin senkenden Nutzen verspricht.

1.3 Lipidapherese-Verfahren – Indikationen und klinische Effektivität, Prinzipien und Schwierigkeiten unterschiedlicher Techniken zur extrakorporalen Lipidreduktion

Nachdem bereits 1967 Plasmaaustausch zur Therapie bei schwerer Hyperlipoproteinämie durch De Gennes und Kollegen als letzte Therapie-Alternative durchgeführt wurde (*Bosch 1996*), erfolgte 1975 erstmals von Thompson (*Thompson et al. 1975*) die systematische Beschreibung der Plasmapherese als lipidsenkende Therapieoption bei Patienten mit schwerer homozygoter familiärer Hypercholesterinämie. Erste Hinweise, dass dieses Verfahren einen günstigen Effekt auf das Fortschreiten der koronaren Atherosklerose und eine Lebensverlängerung bei Patienten mit homozygoter familiärer Hypercholesterinämie bewirken könnte, wurden 1980 und 1985 veröffentlicht (*Thompson et al. 1980; Thompson et al. 1985*). Nachdem 1976 Versuche eines selektiveren Verfahrens der Cholesterin-Elimination aufgrund seiner Nebenwirkungen scheiterten (*Lupien et al. 1976*), wurde 1981

erstmalig ein klinisch anwendbares selektives LDL-Apherese System beschrieben (*Stoffel et al. 1981*). Die unselektive Plasmapherese findet heute aufgrund der Verluste nicht-pathogener Proteine wie Albumin, Immunglobuline und antiatherogenes HDL-Cholesterin sowie möglicher allergischer Reaktionen auf das notwendigerweise infundierte Albumin kaum noch Verwendung (*Bosch 1996*).

Die LDL-Apherese konnte bei relativ niedrigen Fallzahlen bisher nicht wie die bereits genannten Medikamenten-Studien mit sehr hohen Fallzahlen die überzeugenden Studienergebnisse bezüglich kardialer Ereignisse und kardialer Letalität erbringen. Es gibt jedoch eine Reihe kleinerer Studien, die einen positiven Einfluss der LDL-Apherese auf diverse Surrogat Parameter nachweisen. So konnte durch LDL-Apherese eine Verbesserung der ergometrischen Belastung bis zum Auftreten signifikanter elektrokardiographischer Ischämiezeichen nachgewiesen werden (*Kroon et al. 1996*). Durch Anwendung der LDL-Apherese scheint eine Optimierung der koronaren Flussreserve, der Viskosität und der Endothelfunktion möglich zu sein (*Mellwig et al. 1998, Tamai et al. 1997*). In einigen Studien wie z.B. L-CAPS (*Nishimura et al. 1999*) und LARS (*Tatami et al. 1992*) wurden Hinweise erbracht, dass regelmäßige Anwendungen der LDL-Apherese einen angiographisch nachweisbaren günstigen Effekt auf den Progress der Atherosklerose in Koronargefäßen besitzt. Die Studienlage erscheint bezüglich dieser Aussage jedoch nicht eindeutig und ist kritisch zu beurteilen, es fehlen große, kontrollierte, randomisierte Studien hierzu. Eine Metaanalyse von Thompson scheint bezüglich der Progression der Koronarsklerose einen Vorteil der LDL-Apherese in Kombination mit einer medikamentösen Therapie zu belegen (*Thompson 2003*). Nur wenige Studien mit geringer Fallzahl zeigen ein längeres kardial ereignisfreies Überleben der Patienten mit kombinierter medikamentöser Therapie und LDL-Apherese in der Sekundärprophylaxe (*Mabuchi et al. 1998*).

Aktuell stehen in Deutschland im Wesentlichen 5 verschiedene (semi-)selektive extrakorporale Verfahren zur routinemäßigen Behandlung der Hyperlipoproteinämie zur Verfügung: die Kaskadenfiltration (Membran-Differential-Filtrations-Lipidapherese/ MDF-Lipidapherese) (1982), die Immunadsorption (1981), die heparininduzierte extrakorporale LDL-Präzipitation (HELP) (1986), die Adsorption an Dextran-Sulfat Cellulose (DSA) (1985) und die Vollblut-Lipid-Apherese (DALI) (1993)

(*Parhofer et al. 2000; Bosch 1996*). Alle diese Lipidapherese-Techniken sind bezüglich der Absenkung von LDL-Cholesterin und Lipoprotein (a) vergleichbar (*Thiery et al. 1998*), unterscheiden sich jedoch in der Selektivität, im Nebenwirkungsspektrum und in der Handhabung.

Die Kaskadenfiltration ist ein semiselektives Lipidapherese System und setzt wie auch DSA, Immunadsorption und HELP eine vorangehende Plasmaseparation mittels Plasmafilter oder Zentrifugation voraus. Bei der Kaskadenfiltration werden durch einen zweiten Membranfilter mit definierter Porengröße große Moleküle wie LDL-Cholesterin, Lipoprotein (a) und Fibrinogen zurückgehalten und als Eluat verworfen, kleinere Moleküle wie z.B. Albumin, Immunglobuline und HDL-Cholesterin durchwandern die Poren und können als Filtrat dem Blut zurückgegeben werden (*Tanaka et al. 1982*). Die Ausbildung einer Sekundärmembran durch Einlagerung von Makromolekülen in die Filtermembran verändert die Porengröße während der Apherese, so dass schließlich auch kleinere Moleküle wie z.B. HDL-Cholesterin und Immunglobuline nur in reduziertem Ausmaß filtrierbar sind (*Matsuda et al. 1995*). Dies hat einen Rückgang der Selektivität bereits nach 1500 ml behandeltem Plasma zur Folge. Um eine ausreichende Absenkung von LDL-Cholesterin zu erreichen, müssen ca. 2000-4000 ml Plasma behandelt werden (*Geiss 2001*).

Als erstes selektives LDL-Apherese Verfahren wurde die Immunadsorption beschrieben (*Stoffel et al. 1981*). Hierbei werden polyklonale Schafs-Antikörper, die gegen Apolipoprotein B 100 gerichtet und an ein Sepharose-Gel gebunden sind, verwendet. Das Plasmaverfahren bindet hochselektiv LDL-Cholesterin und Lipoprotein (a), die Apolipoprotein B100 enthalten (*Richter et al. 1993*). Die benutzten Säulen können während und nach der Behandlung regeneriert und daher bei gleichem Patienten wiederverwendet werden. Es werden ca. 4000 – 6000 ml Plasma behandelt, die Antikoagulation wird mit ACD-A und Heparin durchgeführt (*Thompson 2003*). Bei den meisten Patienten können anti-Schaf-IgG Antikörper nachgewiesen werden, jedoch ohne dass klinische Konsequenzen beobachtet worden seien.

Die extrakorporale LDL-Elimination mit dem HELP-Verfahren (*Eisenhauer et al. 1987*) basiert auf elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen dem Polyanion Heparin und positiv geladenen heparinbindenden Proteinen wie z.B. die Apolipoprotein B-enthaltenden LDL- und VLDL-Cholesterine und Lipoprotein (a). Aber auch Fibrinogen wird gebunden. Die Absenkung des Blutplasma-pH auf 5,12

durch Zugabe eines heparinisierten Acetatpuffers vermehrt die Anzahl der positiven Ladungen, so dass die Präzipitation der LDL-Fibrinogen-Heparin-Komplexe optimal erfolgen kann. Durch einen Präzipitatfilter werden diese großen Heparin-Protein Aggregate zurückgehalten, überschüssiges Heparin wird mittels eines DEAE-Zelluloseadsorbers komplett adsorbiert und am Ende des extrakorporalen Kreislaufes geschieht die pH- und Volumen-Korrektur durch eine Bikarbonat-Dialyse mit Ultrafiltration. Um eine ausreichende Absenkung des LDL-Cholesterins und Lipoprotein (a) zu bewirken müssen ca. 3 l Plasma behandelt werden (*Eisenhauer et al. 1992*); aufgrund der in einigen Fällen vorteilhaften Fibrinogen-Reduktion ist die Behandlung größerer Plasma-Volumina mit einem höheren Blutungsrisiko verbunden (*Bosch 1992; Parhofer et al. 2000*).

Die Dextran-Sulfat Adsorption ist ebenfalls ein Plasmaverfahren basierend auf elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen den positiv geladenen Apolipoprotein B 100 Molekülen und den Polyanionen Dextran-Sulfat. Die Polyanionen sind als Liganden an Cellulose-Kügelchen kovalent gebunden und adsorbieren selektiv LDL-Cholesterin, VLDL-Cholesterin und Lipoprotein (a) (*Yokoyama et al. 1985*). Zusätzlich werden weitere polykationische Moleküle wie z.B. Komplementfaktor C3a und Gerinnungsfaktoren gebunden (*Bosch et al. 1987*). Während der Heparin-antikoagulierten Behandlung werden zwei Liposorber abwechselnd verwendet, so dass eine mehrfache Regeneration der Adsorber während der Apherese möglich ist (*Mabuchi et al. 1989*) und somit bis zu 5000 ml Plasma behandelt werden können. Eine Co-Medikation mit ACE-Hemmern ist aufgrund möglicher Bradykinin-Bildung kontraindiziert (*Olbricht et al. 1992*). Dies trifft ebenso auf das DALI-System zu, welches im Detail in Kapitel 1.4. beschrieben wird.

Die Indikation zur Lipidapherese besteht nach einer Übereinkunft von Apherese Anwendern (*Greten et al. 1992; Schuff-Werner et al. 2001*) bei Patienten mit:

- homozygoter familiärer Hypercholesterinämie mit LDL-Cholesterin Werten > 600 mg/dl bereits in der Primärprävention.
- LDL-Cholesterin > 190 mg/dl unter maximaler diätetischer und medikamentöser Therapie, positiver Familienanamnese bezüglich koronarer Herzerkrankung und angiographisch nachgewiesenen Veränderungen der Koronargefäße bereits in der Primärprävention.
- LDL-Cholesterin > 135 mg/dl unter maximaler diätetischer und medikamentöser Therapie in der Sekundärprophylaxe bei angiographisch nachgewiesenen Koronargefäßveränderungen im Stadium III-IV.

Im aktuellen Beschluss des Bundesausschusses der Ärzte und Krankenkassen werden in den BUB-Richtlinien in der Fassung vom 24. März 2003 (Deutsches Ärzteblatt 2003) die Indikationen zur Durchführung der ambulanten extrakorporalen LDL-Apherese definiert. In Deutschland sind gemäß dieser Richtlinien LDL-Apheresen nur indiziert bei Patienten mit Ausprägung einer homozygoten familiären Hypercholesterinämie sowie Patienten mit einer schweren Hypercholesterinämie, bei denen mittels einer diätetischen und maximal tolerablen medikamentösen Therapie, durchgeführt über mindestens 12 Monate, keine ausreichende Absenkung des LDL-Cholesterins erreicht werden kann. Bei der Indikationsstellung sind Medikamenten-Unverträglichkeiten und individuelles Atherosklerose-Risiko zu berücksichtigen. Die Aphereseverfahren sind prinzipiell frei wählbar, Voraussetzung ist jedoch eine Absenkung des jeweiligen LDL-Vorwertes um mindestens 60% bei einer maximalen Behandlungsdauer von 6 Stunden.

Zielwerte für LDL-Cholesterin werden hierbei nicht explizit genannt. Befolgt man die Empfehlungen großer medikamentöser Interventionsstudien sollte wie bereits gesagt bei fortschreitender koronarer Herzkrankheit der LDL-Cholesterin-Spiegel unter 100 mg/dl liegen. Die Zulassungen zur Lipidapherese sind abhängig von den jeweiligen Zulassungsbehörden der verschiedenen Staaten, so sind z.B. in den USA gemäß der „Food and Drug Administration“ (FDA) Lipidapheresen bei höheren Lipidwerten als den Genannten indiziert (homozygote FHC: LDL-C > 13 mmol/l (500 mg/dl); heterozygote FHC: LDL-C > 7,8 mmol/l (300 mg/dl); heterozygote FHC und dokumentierte KHK: LDL-C > 5,2 mmol/l (200 mg/dl)).

Bei Patienten mit manifester koronarer Herzkrankheit und erhöhtem Lipoprotein (a) > 60 mg/dl ohne weitere Risikofaktoren inklusive Erhöhung des LDL-Cholesterins, ist die Lipidapherese eine akzeptierte Therapieform (*Schuff-Werner 2001; Thompson 2003; Keller 2007*).

1.4 Prinzip und technischer Ablauf der direkten Adsorption von Lipoproteinen (DALI) aus Vollblut

Anders als die zuvor genannten Techniken ist DALI das erste selektive Lipidapherese-Verfahren, das durch Adsorption LDL-Cholesterin (LDL-C) und Lipoprotein (a) (Lp(a)) direkt aus Vollblut eliminieren kann. Eine vorangehende Plasmaseparation entfällt somit und der extrakorporale Kreislauf wird deutlich vereinfacht (*Bosch et al. 1997*). Die Adsorption der genannten Lipoproteine erfolgt aufgrund der elektrostatischen Wechselwirkung zwischen dem positiv geladenen Apolipoprotein B 100, einem Bestandteil des LDL-C, des VLDL-Cholesterins und des Lp(a), und der negativ geladenen Polyacrylat-Oberfläche des Adsorbergels. Das verwendete Adsorbergel (Fa. Fresenius, St. Wendel, Deutschland), erstmalig beschrieben 1993 (*Bosch et al. 1993*), besteht aus porösen Polyacrylamid-Kügelchen, die einen Durchmesser von ca. 150-200 µm messen und an die Polyacrylat-Liganden kovalent gebunden sind. Zelluläre Bestandteile des Blutes können aufgrund ihrer Größe nicht in die Poren eindringen. Die Kontaktfläche zwischen den zellulären Bestandteilen und der Adsorbermatrix wird somit verkleinert da über 99% der Gesamtoberfläche (ca. 1000 m²) der Adsorbermatrix sich innerhalb der Kügelchen befinden (*Dräger et al. 1998; Bosch et al. 2002*). Dieses Prinzip der Größenausschluss-Chromatographie trägt entscheidend zur guten Biokompatibilität des verwendeten Adsorbermaterials bei (*Bosch et al. 1997*).

1.5 Biokompatibilitätsparameter und deren Bedeutung zur Beurteilung extrakorporaler Kreisläufe

Der menschliche Organismus verfügt bei Kontakt von Blut oder Gewebe mit Fremdmaterial über biologische Abwehrreaktionen, die schwerwiegende Folgen bis zu systemischen inflammatorischen Reaktionen haben können. Das Ausmaß der komplexen Wechselwirkungen hängt von den jeweiligen Verfahren, den verwendeten Materialien und vom Patienten selbst ab. Der Einsatz extrakorporaler Kreisläufe wie die Verwendung einer Herz-Lungen-Maschine, der Nierenersatztherapie durch z.B.

Hämodialyse oder Hämofiltration aber auch der Einsatz der beschriebenen Lipidapherese-Verfahren können unerwünschte kaskadenartige Ereignisse zur Folge haben. Diese Ereignisse werden durch unterschiedliche sich teilweise beeinflussende Mechanismen ausgelöst (*Schiffel et al. 1999; Bosch et al. 1989*). Der Begriff Biokompatibilität bedeutet in diesem Zusammenhang die Möglichkeit ein Material, Gerät oder System zu verwenden, ohne klinisch signifikante Reaktionen seitens des menschlichen Organismus auszulösen (*Gurland et al. 1994*). Prinzipiell kann jeder Bestandteil eines extrakorporalen Kreislaufes und die Sterilisation der Komponenten unerwünschte Reaktionen durch mögliche Biokompatibilität auslösen; die größte Gefahr geht hierbei jedoch von den Dialysatoren, Plasmaseparatoren oder Adsorbentien aus, die den weitaus größten Oberflächenanteil eines extrakorporalen Kreislaufes einnehmen und daher die größte Blutkontaktfläche besitzen. In den letzten Jahren wurden eine Reihe von Biokompatibilitätsparameter definiert zu denen plasmatische wie zelluläre Systeme zählen. Schiffel beschreibt vier generelle Mechanismen der Wechselwirkungen zwischen biologischen Systemen und Fremdmaterialien, im besonderen Dialysemembranen:

- Allergische oder toxische Reaktionen.
- Transformation von Plasmaproteinen mit Thrombogenität, Komplementaktivierung, Bradykinin-vermittelten Reaktionen.
- Aktivierung von zirkulierenden Leukocyten.
- Zytokin-Induktion durch bakterielle Kontamination.

Prinzipiell sind toxische oder allergische Reaktionen auch gegenüber Sterilisationsrückständen, durch Migration von Kunststoff Weichmachern oder durch Freisetzung von Plastikpartikeln möglich.

Erforderliche Biokompatibilitätsparameter bzw. Hämoompatibilitätstests sind von den Zulassungsbehörden für Medizinprodukte standardisiert geregelt und fordern für Produkte, die von außen mit dem Körperinneren in Wechselwirkung treten die Testung von 5 Prüfkategorien, die in folgender Tabelle (1.2) verkürzt dargestellt werden.

Tab.: 1.2: Vereinfachte Darstellung der Prüfkategorien nach ISO 10993-4.

Prüfkategorie	Methode
Thrombose	Druckabfall über dem Produkt
Koagulation	PTT, optional TAT
Thrombocyten	Thrombocytenzahl, optional β -TG
Hämatologie	Leukocytenzahl, Hämolyse, optional: Freisetzungsprodukte aktivierter Zellen
Immunologie	C3a, C5a, optional Cytokine

PTT: partielle Thromboplastinzeit, TAT: Thrombin-Antithrombin-Komplex, β -TG: β -Thromboglobulin, C3a: aktivierte Komplementfaktoren von C3, C5a: aktivierte Komplementfaktoren von C5.

Das Komplementsystem ist Teil des komplexen angeborenen Immunsystems, welches bei der Verteidigung gegen bakterielle Infektionen mitwirkt, Verbindungsglied zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem ist und Immunkomplexe sowie Produkte der inflammatorischen Antwort beseitigt. Die Aktivierung des mehr als 30 Proteine enthaltenden Komplementsystems erfolgt über drei mögliche Wege: den klassischen Weg, den alternativen Weg und über Mannosebindendes Protein (*Walport 2001*). Alle drei Aktivierungswege münden in einer gemeinsamen Endstrecke, die letztlich zur Bildung des aktiven „Membran-attackierenden Komplexes“ C5b-9 führt. Eine Aktivierung des Komplementsystems durch Kontakt mit nichtbiologischen Oberflächen erfolgt über den alternativen Aktivierungsweg, wobei in der Literatur auch Hinweise auf eine klassische Komplementaktivierung zu finden sind (*Thylen et al. 1996*). Bereits 1977 beschrieb Craddock erstmalig, dass Dialysemembranen die Bildung des Komplementanaphylatoxin C5a induzieren kann und dies wiederum zu einer Leukocytenaggregation und Sequestrierung in der kapillaren Lungenstrombahn führt (*Craddock et al. 1977*). Freie Hydroxylgruppen der verwendeten artefiziellen Oberflächen besitzen bei der Komplementaktivierung neben inaktivierenden und aktivierenden Faktoren (Faktor I; Faktor B und D) eine wichtige Funktion. Das Komplementsystem tritt hierbei mit dem Gerinnungs- und Kallikrein-Kininsystem in Wechselwirkung. Untersuchungen zur Aktivierung des Komplementsystems, C3a und C5a, sind wesentliche Parameter zur Beurteilung der Biokompatibilität, da neben einer möglichen transienten Leukopenie direkt oder indirekt auch andere klinische Inkompatibilitätsreaktionen durch die Aktivierung des Komplementsystems ihre Ursache finden. C5b-9 ist in der Lage die Synthese von Prostaglandin E2 und

Thromboxan A₂ anzuregen, Thrombocyten zu aktivieren und Entzündungsmediatoren zu mehren; C3a kann die Freisetzung von Histamin aus Mastzellen und basophilen Granulocyten induzieren, Kontraktion der glatten Muskulatur und die Kapillarpermeabilität verstärken; C5a kann darüber hinaus polymorphnukleare Leukocyten zur Freisetzung lysosomaler Enzyme anregen (*Hakim 1996*). Die Aktivierung des Komplementsystems kann durch Citrat und Heparin teilweise inhibiert werden (*Kazatchkine et al. 1981; Wegmüller et al. 1983*).

Bradykinin, ein proinflammatorisches Peptid, wird durch Aktivierung von Kallikrein verstärkt aus seinem Vorläuferprotein HMWK (high molecular weight kininogen) freigesetzt (*Renaux et al. 1999*). Kallikrein wiederum wird als Folge einer kaskadenartigen Reaktion des Kallikrein-Kininsystems nach Aktivierung des Faktors XII (Hagemann-Faktor) durch den Plasmakontakt mit negativ geladenen Oberflächen eines extrakorporalen Kreislaufes induziert (*Schulman et al. 1993*). Bradykinin besitzt eine kurze Halbwertszeit und wird durch das Angiotensin-converting-enzyme (ACE, auch Kininase II genannt) abgebaut. Die Anwendung eines extrakorporalen Kreislaufes mit negativ geladenen Oberflächen wie z.B. das DALI-System oder die Lipid-Adsorption mittels Dextran-Sulfat, bei gleichzeitiger Therapie mit einem ACE-Inhibitor kann daher zu einem extremen Anstieg des Bradykinin-Spiegels mit schockähnlichen Folgen führen.

Mögliche klinische Folgen dieses Phänomens sind Hypotension und Schock. Bradykinin wirkt hierbei über die vermehrte Bildung von Stickstoffmonoxid (NO), katalysiert durch die endotheliale NO Synthase (NOS), vasodilatatorisch (*Coppo et al. 2000*). Aus Experimenten mit Dialysatoren, die eine negativ geladene Oberfläche besitzen ist bekannt, dass der pH Wert bei der Kontaktaktivierung von Bradykinin und der NO Synthase eine wichtige Rolle spielt. Bei pH Werten über 7,4-7,6 ist die Aktivierung von Bradykinin und der NO Synthase geringer. Bei Verwendung bestimmter Dialysemembranen wird innerhalb der ersten 10-20 Minuten einer Hämodialyse eine seltene, aber schwere Hypersensitivitätsreaktion (HRS) als Ausdruck der Bioinkompatibilität beschrieben. Diese Reaktion kann geringe Ausmaße mit Übelkeit, Pruritus, Flush, Schwächegefühl und Hypotension annehmen aber auch lebensbedrohliche Situationen mit Schock, Schwellung der Zunge und der Halsschleimhaut sowie Bronchospasmus auslösen. Bradykinin steht hierbei unter

hochgradigem Verdacht einer der möglichen Verursacher dieser Hypersensitivitätsreaktion zu sein (*Coppo et al. 2000*).

Thrombin-Antithrombin-Komplexe sind Verbindungen zwischen erzeugtem Thrombin und dem zirkulierenden Antithrombin und sind Indiz einer Aktivierung der plasmatischen Gerinnung.

β -Thromboglobulin ist ein etablierter Heparin-unabhängiger Marker der Thrombocytenaktivierung, der bei Aktivierung der Zellen sezerniert wird (*Bosch et al. 1997*). Weitere Faktoren wie z.B. Plättchenfaktor 4 (PF4), Thrombospondin und P-Selektin (CD62) – ein integrales Membranprotein, die sich gemeinsam mit β -Thromboglobulin innerhalb der α -Granula der Thrombocyten befinden, werden ebenfalls im Rahmen einer Aktivierung sezerniert (*Michelson et al. 1996; Gawaz et al. 1991*). Die sezernierten Faktoren vermitteln letztlich über Wechselwirkungen zwischen Thrombocyten, mit Leukocyten und Endothelzellen die Bildung von Thromben; dies gilt es bei Gebrauch eines extrakorporalen Kreislaufes zu verhindern.

Bei Kontakt mit artefiziellen Oberflächen eines extrakorporalen Kreislaufes besteht die Möglichkeit einer Aktivierung von Leukocyten wie z.B. Granulocyten. Neutrophile Granulocyten werden durch die Aktivierung zur Degranulation intrazellulär gespeicherter Proteasen, wie z.B. Elastase, Lactoferrin angeregt (*Bosch et al. 1989*). Diese Reaktion ist durch vielseitige Wechselwirkungen mit dem Komplement- und Kinin-Kallikrein-System beeinflussbar (*Hakim 1996*). Neuere Studien beweisen, dass bei Leukocytenaktivierung durch Kontakt mit artefiziellen Oberflächen vermehrt leukocytaire Oberflächenmarker wie z.B. bestimmte Zell-Adhäsionsmoleküle zu finden sind. Die vermehrte Expression solcher Adhäsionsmoleküle wie z.B. β 2-Integrin (CD11/CD18) spielt möglicherweise eine wichtige Rolle bei der bioinkompatibilitäts-assoziierten Leukopenie (*Cheung et al. 1993*).

Der Tumornekrosefaktor α (TNF- α), ein pluripotentes Cytokin, wird unter anderem in Monocyten synthetisiert und dient somit als möglicher Aktivierungsparameter dieser Zellen.

1.6 Ziele der vorliegenden Arbeit

Der Einsatz der DALI-Apherese benötigt zur Verhinderung möglicher Gerinnungskomplikationen und bioinkompatibler Reaktionen eine Antikoagulation. Zu diesem Zweck kommt im Standardverfahren Citrat und Heparin in definierter Dosis zum Einsatz.

Für einige Reaktionen der Gerinnungskaskade sind zweiwertige Calcium-Ionen erforderlich. Reduziert man den Gehalt der physiologisch vorkommenden Calcium-Ionen durch Chelatbildung kann eine suffiziente Antikoagulation im extrakorporalen Kreislauf erreicht werden. Citrat ist ein solcher Komplexbildner und wird als „acid citrate dextrose“ (ACD-A) bei DALI verwendet. Die Gabe der ACD-A Formulierung kann einen initialen pH-Abfall verursachen und den systemischen Calciumspiegel über ein gewünschtes Maß hinaus reduzieren. Mit dem Ziel das Risiko einer klinisch relevanten Hypocalciämie und initiale pH-Verschiebungen mit möglichen Folgen der Bioinkompatibilität zu verhindern, sollte im ersten Teil der vorliegenden Arbeit das Standardverfahren durch geringere ACD-A Applikationen und kompensatorisch erhöhter Heparindosierung optimiert werden.

Eine Optimierung fordert eine zumindest gleichwertige Effektivität der Lipidreduktion, eine identische oder bessere klinische Sicherheit und Biokompatibilität. Dies galt es in vorliegender Arbeit zu prüfen.

Heparine sind im menschlichen Organismus in geringer Menge physiologisch vorkommende negativ geladene sulfatierte Glucosaminoglykane unterschiedlichen Molekulargewichts. Durch Komplexbildung mit Thrombin und Antithrombin (AT III), durch Umwandlung des AT III in eine schnell wirksame Form und Inhibition des Faktors Xa wirken Heparine antikoagulatorisch und können daher bei Zugabe suffizient die Gerinnung in einem extrakorporalen Kreislauf verhindern. Nebenwirkungen der Heparine sind prinzipiell selten, so sind bei dauerhafter Anwendung Haarausfall, Osteoporose, allergische Reaktionen und Blutungskomplikationen (4-6%) beschrieben (*Glusa et al. 1996*). Heparine inhibieren aber auch die Thrombocytenfunktion und erhöhen die Gefäßpermeabilität (*Hirsh 1991*). Eine gefürchtete Nebenwirkung der fraktionierten und unfraktionierten Heparine ist in einigen Publikationen als heparin-induzierte Thrombocytopenie (HIT) beschrieben. Die HIT 1 ist durch einen raschen aber milden Abfall der Thrombocyten gekennzeichnet, der bei Beendigung der Heparin-gabe schnell rückläufig ist und keine ernsthafte Komplikation bedeutet (*Hirsh et al., 1991*). Die HIT 2 hingegen ist

eine schwere Komplikation, die durch Antikörperbildung gegen Plättchenfaktor 4 verursacht wird und sich daher frühestens 5-8 Tage nach Applikation erstmanifestiert (*Aster 1995*). Klinisch imponiert die HIT 2 durch ein potentiell tödliches Krankheitsbild mit dramatischer Reduktion der Thrombocyten, arterieller und venöser Thrombembolien mit folgenden Organkomplikationen. Angaben über die Häufigkeit der HIT 2 variieren zwischen 0,5% und 5%. Bei Auftreten einer HIT ist eine erneute Gabe unfraktionierten wie auch fraktionierten Heparins strengstens kontraindiziert (*Kleinschmidt et al. 1999*).

Da ein komplexes Verfahren wie DALI durch Entzug eines komplexen Moleküls wie Heparin beeinträchtigt werden könnte, sollte der zweite Teil der vorliegenden Studie die Frage beantworten, ob das etablierte System DALI mit einer ausschließlichen Citrat-Antikoagulation ohne Verwendung von Heparin angewendet werden kann und dabei im Vergleich zum Standardverfahren die gleiche klinische Sicherheit besteht, die gute Biokompatibilität des Systems erhalten bleibt und die Effizienz der Lipidelimination verändert wird.

Die Fragestellungen der vorliegenden Arbeit lauten:

1. Wird die klinische Sicherheit der DALI-Apherese durch Reduktion der Citratdosis bei kompensatorischer Erhöhung der Heparindosis oder durch Vermeidung eines initialen Heparinbolus beeinflusst?
2. Wird die Effektivität der DALI-Apherese durch Reduktion der Citratdosis bei kompensatorischer Erhöhung der Heparindosis oder durch Vermeidung eines initialen Heparinbolus beeinflusst?
3. Wird die Biokompatibilität der DALI-Apherese durch Reduktion der Citratdosis bei kompensatorischer Erhöhung der Heparindosis oder durch Vermeidung eines initialen Heparinbolus verändert?

2. Patienten und Methoden

2.1 Studiendesign

Die im folgenden beschriebenen klinischen Prüfungen wurden gemäß den Richtlinien „good clinical practice“ durchgeführt und von der Ethikkommission der Ludwig-Maximilians-Universität München genehmigt.

Die Patienten wurden über Ziele und Risiken der Studie informiert und gaben ihr schriftliches Einverständnis zur Teilnahme.

2.1.1 DALI ohne Heparin-Antikoagulation (OH-Studie)

Die Studie DALI ohne Heparin-Antikoagulation wurde monozentrisch, deskriptiv sowie prospektiv an 4 chronischen DALI-Patienten in einer Behandlungsphase durchgeführt. Die Patienten wurden je 2 auswertbaren DALI-Apheresen ohne Heparin-Antikoagulation unterzogen (N=8), bei einer Patientin wurden die erforderlichen Blutentnahmen auf 4 DALI-Behandlungen ohne Heparin-Antikoagulation verteilt, um eine mögliche Zunahme der vorbestehenden Anämie zu vermeiden. Die Behandlungen erfolgten im wöchentlichen Abstand.

Als Kontrolle diente ein historisches Kollektiv einer 1997 durchgeführten Studie (*Bosch et al. 2000*), in der die klinische Verträglichkeit, Effektivität, Selektivität und Biokompatibilität des sich etablierenden Standardverfahrens getestet wurde. Ausgewertet wurden die damals erhobenen Primärdaten der Behandlungen, die mit einer Blutflußgeschwindigkeit von 60 ml/min und einem 750 ml Adsorber durchgeführt wurden, diese Bedingungen erfüllten 5 Patienten in fünfzehn Behandlungen. Eine Patientin konnte bei der retrospektiven Betrachtung nicht berücksichtigt werden, da diese Patientin die standardmäßigen Heparin-Boli vor Beginn der Lipid-Apherese nicht erhalten hatte.

2.1.2 DALI mit reduzierter Citrat-Antikoagulation („low-citrate“)

Die klinische Prüfung von DALI mit reduzierter Citrat-Antikoagulation wurde in 2 Behandlungsphasen kontrolliert, monozentrisch, prospektiv und deskriptiv vorgenommen. Fünf chronische DALI-Patienten wurden in die Studie eingeschlossen und zunächst in wöchentlichen Abständen dreimal nach dem DALI Standard-Protokoll apherisiert. Diesen Behandlungen folgten je 3 DALI-Apheresen mit

modifiziertem Antikoagulationsregime. Test- und Kontrollkollektiv waren somit identisch.

2.2 Beschreibung des Patientenkollektivs

2.2.1 Ohne Heparin (OH)-Studie

4 Patienten wurden in die Studie zur Untersuchung der Biokompatibilität und Effektivität von DALI ohne Antikoagulation mit Heparin eingeschlossen. Bei allen vier Patienten bestand eine symptomatische Atherosklerose bei Hyperlipoproteinämie. Die zwei weiblichen und zwei männlichen Patienten waren zum Zeitpunkt der Studie im Alter zwischen 33 und 60 Jahren, im Mittel 51 ± 11 Jahre. Das mittlere Körpergewicht betrug $78,3 \pm 31,2$ kg (51 kg bis 130 kg) bei einer durchschnittlichen Größe von $1,70 \pm 0,1$ m (1,60 m bis 1,85 m). Die Patienten SK, WR und BH litten an einer koronaren Herzerkrankung, die Patienten SK und WR mußten daher einer koronaren Bypass-Operation unterzogen werden. Patient WR erlitt in der Vorgeschichte einen Myocardinfarkt. Bei Patient EB lag eine ausgeprägte pAVK mit Z. n. mehrfachen peripheren Bypass-Operationen sowie Z. n. symptomatischer Mesenterialarterien-Stenose mit notwendiger chirurgischer Intervention vor. Ferner litt dieser Patient an einer beidseitigen Carotis-Stenose mit Patchplastik der linken Carotis interna. Bei Patient WR war ein Carotis interna Verschuß rechts bekannt. In allen Fällen erfolgte eine maximale, für den Patienten tolerable, medikamentöse lipidsenkende Therapie mit HMG-CoA-Reduktase Hemmern, die bei den Patienten SK, WR und BH jedoch keine Reduktion des LDL-Cholesterins in den gewünschten Zielbereich unter 100 mg/dl bewirkte. Bei diesen Patienten kam daher bereits vor Teilnahme an dieser Studie die DALI-Apherese als sekundär-präventive Maßnahme regelmäßig zur Anwendung. Im Falle der Patientin EB konnte eine ausreichende Absenkung des LDL-Cholesterins medikamentös erreicht werden, die Indikation zur Lipid-Apherese bestand in einer deutlichen Erhöhung des Lipoprotein (a). Im Überblick der Tab. 2.1. sind die demographischen Daten der Patienten zusammenfassend dargestellt.

Die Lipid-Apherese wurde bei den Patienten WR und BH veno-venös durch Punktion antecubitaler Venen beider Arme durchgeführt, bei den Patienten SK und EB wurde der Gefäßzugang jeweils durch eine bestehende a-v-Fistel (Shunt) gewährleistet.

Die Patienten WR und EB erhielten eine Marcumar-Therapie zur Antikoagulation, die Gabe von ASS erfolgte bei den Patienten SK und WR. Bei Patient BH erfolgte

während der Studie keine orale Antikoagulation trotz bestehender koronarer Herzerkrankung.

Keiner der Patienten erhielt einen ACE-Inhibitor, Patient WR nahm einen AT-I Rezeptor-Antagonisten ein (siehe Tab. 2.1.).

Maligne oder schwere akute Erkrankungen konnten vor Studieneinschluss bei allen 4 Patienten ausgeschlossen werden.

Tab. 2.1: Demographische Patientendaten (DALI ohne Heparin) zum Zeitpunkt der Studienteilnahme.

Patient/ Initialen	Geschlecht	Alter [Jahre]	BMI [kg/m ²]	Diagnosen	LDL-C/ Lp(a) [mg/dl]	Medikamente
1/ SK	M	33	38,0	HLP KHK, ACVB	245/82	ASS, Molsidomin, Simvastatin, Eisen III,
2/ WR	M	53	27,9	HLP KHK, MI, ICM, pAVK Ila, CAST	134/13	Phenprocoumon, ISMN, Molsidomin, Metoprolol, Lorsartan, HCT, ASS, Atorvastatin
3/ BH	W	60	22,3	HLP KHK	129/33	Atorvastatin, Atenolol, ISMN,
4/ EB	W	58	18,7	HLP pAVK Mesenterialinfarkt CAST	91/162	Phenprocoumon, Atorvastatin, Brotizolam, Amitryptilin
MW		51	26,7		150/73	
Std		11	7,3		58/57	

BMI: Body mass index; LDL-C: LDL-Cholesterin; M: männlich; W: weiblich. HLP: Hyperlipoproteinämie; KHK: Koronare Herzerkrankung; ACVB: Aorto-coronarer Bypass; MI: Myocardinfarkt; ICM: ischämische Cardiomyopathie; pAVK: periphere arterielle Verschlusskrankheit; CAST: Stenose der A. carotis interna.

Historisches Vergleichskollektiv:

Da im Rahmen der OH-Studie alle 4 oben beschriebenen Patienten ausschließlich gemäß des modifizierten Behandlungsprotokolls (siehe 2.1.1) apherisiert wurden, dienten fünf Personen aus der bereits erwähnten DALI-Studie von 1997 (*Bosch et al. 2000*) als vergleichbare, historische Kontrollgruppe. Die demographischen Daten der fünf Vergleichspersonen sind im Einzelnen der Tabelle 2.2 zu entnehmen.

Die bereits oben beschriebene Patientin BH nahm sowohl an der OH-Studie als auch an der Vergleichsstudie von 1997 teil.

Die fünf Patienten der Kontroll-Studie litten an einer symptomatischen Atherosklerose in Form einer koronaren Herzerkrankung. Es wurden drei männliche Patienten und zwei weibliche Patientinnen, im Alter von 50 bis 67 Jahren (im Mittel 56,8 Jahre), als Kontrollkollektiv retrospektiv ausgewertet.

Tab. 2.2: Demographische Daten des historischen Kontrollkollektivs bei DALI ohne Heparin.

Patient/ Initialen	Geschlecht	Alter [Jahre]	BMI [kg/m ²]	Diagnosen	LDL-C/ Lp(a) [mg/dl]	Medikamente
1/ DE	M	50	25,9	HLP KHK NI	122/41	Phenprocoumon Pravastatin
2/ BH	W	58	21,9	HLP KHK	175/38	Lovastatin, Colestyramin, Atenolol, ISMN,
3/ MJ	W	67	29,0	HLP KHK ACVB	295/8	Atorvastatin Colestyramin
4/ JM	M	52	26,7	HLP KHK	176/6	Simvastatin ASS Fenofibrat
5/ SW	M	57	23,9	HLP KHK	102/19 0	Simvastatin ASS Metoprolol Nitrendipin Minoxidil
MW		57	25,5		174/57	
Std		6	2,4		67/68	

BMI: Body mass index; LDL-C: LDL-Cholesterin; M: männlich; W: weiblich. HLP: Hyperlipoproteinämie; KHK: Koronare Herzerkrankung; ACVB: Aorto-coronarer Bypass; MI: Myocardinfarkt; ICM: ischämische Cardiomyopathie; pAVK: periphere arterielle Verschlusskrankheit; CAST: Stenose der A. carotis interna; NI: Niereninsuffizienz im Stadium der kompensierten Retention.

2.2.2 Patienten der „low-citrate“-Studie

Die fünf Patienten mit bekannter Hyperlipoproteinämie und daraus resultierenden Folgeschäden, die an der klinischen Prüfung von DALI mit reduzierter Citrat-Dosis teilnahmen wurden zuvor mindestens ein Jahr mit dem DALI-System Lipidapheresiert. Im Durchschnitt waren die zwei weiblichen und drei männlichen Patienten 62 ± 6 Jahre alt, 170 ± 10 cm groß und 71 ± 13 kg schwer. Die in Tab. 2.3 zusammenfassend beschriebenen Patienten litten alle an einer KHK, bei den

Patienten MW, FB und RG sich in Form eines Myocardinfarktes manifestierend. Die Patienten AS und RG erhielten einen aorto-coronaren Venenbypass (ACVB). Bei AS war zusätzlich eine Carotis interna-Stenose (CAST), bei FB eine Nierenarterien-Stenose (NAST) bekannt.

Die LDL-Cholesterin Werte lagen bei allen Patienten trotz HMG-CoA-Reduktasehemmer Behandlung über dem empfohlenen Zielbereich, bei AS bestand darüber hinaus eine deutliche Erhöhung des Lp(a). Eine orale Antikoagulation mit Phenprocoumon wurde bei keinem der Patienten durchgeführt, MW, FB und RG nahmen ASS ein. Keiner der Patienten erhielt einen ACE-Inhibitor.

Als Gefäßzugänge für die Apherese-Behandlung dienten bei MW und RG angelegte a-v-Fisteln, die anderen drei Patienten wurden veno-venös behandelt.

Auch in der klinischen Prüfung von DALI mit niedrig dosierter Citrat-Antikoagulation waren maligne oder schwere akute Erkrankungen Ausschlußkriterien.

Tab. 2.3: Demographische Daten des „low-citrate“ Kollektivs.

Patient/ Initialen	Geschlecht	Alter [Jahre]	BMI [kg/m ²]	Diagnosen	LDL-C/ Lp(a) [mg/dl]	Medikamente
1/ BH	W	60	22,3	HLP KHK	135/41	Atorvastatin, ISMN, Atenolol, Eisen II
2/ AS	M	72	28,4	HLP KHK, ACVB, CAST	122/107	Simvastatin, Metoprolol, Allopurinol, ISDN, HCT, Triamteren, Bromazepam, Felodipin
3/ MW	W	63	23,0	HLP KHK, MI, Stent	212/63	Fluvastatin, ISMN, ASS, HCT, Eisen II, Mg ²⁺ , Ca ²⁺ , Diltiazem, Spironolacton,
4/ FB	M	64	26,3	HLP KHK, MI, NAST	162/7	Fluvastatin, ASS, ISMN, HCT, Prednisolon,
5/ RG	M	53	28,1	HLP KHK, MI, ACVB	218/57	Fluvastatin, ASS, Acetyldigoxin, Mepindolol
MW		62	25,6		170/55	
Std		6	2,5		39/33	

BMI: Body mass index; LDL-C: LDL-Cholesterin; M: männlich; W: weiblich. HLP: Hyperlipoproteinämie; KHK: Koronare Herzerkrankung; ACVB: Aorto-coronarer Bypass; MI: Myocardinfarkt; ICM: ischämische Cardiomyopathie; pAVK: periphere arterielle Verschlusskrankheit; CAST: Stenose der A. carotis interna;

2.3 Protokoll und Ablauf der Studien

2.3.1 Ohne Heparin (OH)-Studie

Die DALI Apherese wurden mittels des Hämadsorptionsgerätes 4008 ADS (Fresenius, St. Wendel) durchgeführt. Zur Stabilisierung der Körpertemperatur wurde bei den Patienten WR, BH und EB ein Blutwärmer (Fa. Astotherm, focus Süd GmbH) nach dem Adsorber zwischengeschaltet. Bei Patient SK wurde ein Polyacrylat-Adsorbervolumen von 1000 ml eingesetzt (zwei in Reihe geschaltete 500 ml Adsorber), bei den Patienten WR, BH und EB erfolgte die Apherese mit einem Adsorbervolumen von 750 ml. Die Blutflußrate betrug 60 ml/min. Bei Patient SK wurde ein Blutvolumen von 9990 ml, bei den Patienten WR, BH und EB 5000 ml behandelt, durchschnittlich wurde das 1,30-fache Blutvolumen (berechnet nach Nadler) apherisiert.

Vor der Behandlung wurde der extrakorporale Kreislauf mit 3 x 2000 ml Spüllösung perfundiert, die Spüllösung enthielt im Gegensatz zur Routinemethode (siehe folgende Seite) kein Heparin. Die Patienten erhielten keinen Heparin-Bolus. Die Antikoagulation erfolgte von Beginn an mittels ACD-A (Citrat-Dextrose) Infusion im Verhältnis 1:20. Bei Patient WR wurde im zweiten Versuch ab einem Behandlungsvolumen von 1500 ml die Citrat-Antikoagulation auf ein Verhältnis von 1:40 reduziert. Der Behandlungsaufbau ist in Abbildung 2.1 zur Veranschaulichung skizziert.

Bei den Patienten SK und EB wurden die Apherese via eines vorbestehenden Shunts durchgeführt, bei den Patienten WR und BH wurden die Kubitalvenen zur Gewährleistung eines veno-venösen Flusses punktiert.

Vor, während und nach der Behandlung wurden die Vitalparameter Blutdruck und Puls gemessen.

Bei Patienten mit schlechtem Blutfluß oder geringem Körpergewicht wurden die Blutentnahmen auf mehrere Behandlungen verteilt.

Die Zeitpunkte der Blutentnahmen sind der Tabelle 2.4 zu entnehmen.

Tab. 2.4: Blutentnahmeprotokoll

Behandeltes Blutvolumen :	0ml	500ml	1000ml	2000ml	Ende
Blutbild	a				a
Blutgase	a	a+v	a+v	a+v	a
Elektrolyte	a	a+v	a+v	a+v	a
Quick	a				a
Partielle Thromboplastinzeit	a				a
Fibrinogen	a				a
Lee White Test	a				a
Aktivierete Gerinnungszeit (ACT)	a		a	a	a
Cholesterin	a				a
Triglyceride	a				a
Lipoproteine	a				a
C3a, Elastase, β TG, TAT, Bradykinin,	a	a+v	a+v	a+v	a
α 2-Haptoglobin, Lactatdehydrogenase	a				a

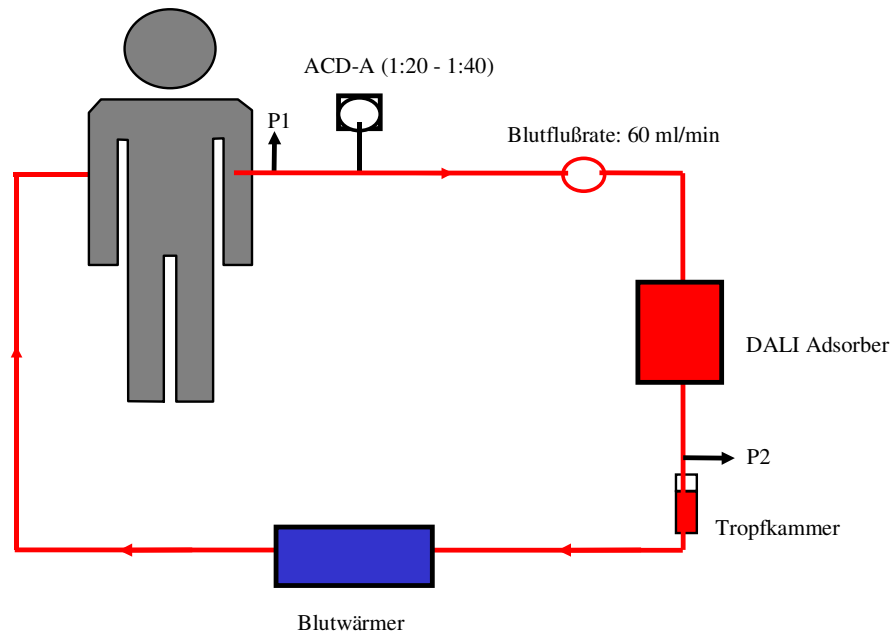
a=arteriell (vor dem Adsorber), v=venös (hinter dem Adsorber). Komplement C3a (C3a), β -Thromboglobulin (β -TG), Thrombin-Antithrombin-Komplex (TAT).

Die Behandlung der historischen Kontrollgruppe fand im wesentlichen wie zuvor beschrieben statt. Unterschiedlich war lediglich das Antikoagulationsschema.

Die 5 Patienten erhielten 16 Apherese-Behandlungen (n=16).

Vor der Behandlung wurde der extrakorporale Kreislauf mit 3 x 2000 ml Spüllösung perfundiert, die ersten 2000 ml Spüllösung enthielten 10 000 IE Heparin. Die Antikoagulation des Patienten erfolgte durch einen initialen Heparinbolus (20 IE/kg KG) und der kontinuierlichen Citrat-Dextran Zugabe im Verhältnis von anfänglich 1:20. In den meisten Fällen wurde das Verhältnis im Aphereseverlauf auf 1:30 reduziert. Der Blutfluß betrug 60 ml/min, das Behandlungsvolumen im Mittel das 1,32-fache des Blutvolumens nach Nadler (*Bosch et al. 2000*).

Abb. 2.1: DALI-Behaltungsaufbau



ACD-A: acid citrate dextrose, Formula A; P: Druckmessung.

2.3.2 „low-citrate“-Studie

Die DALI Apheresen wurden auch in diesem Teil der vorliegenden Arbeit mittels des Hämadsorptionsgerätes 4008 ADS (Fresenius, St. Wendel) durchgeführt. Zur Stabilisierung der Körpertemperatur wurde bei allen Patienten ein Blutwärmer (Fa. Astotherm, focus Süd GmbH) nach dem Adsorber zwischengeschaltet. Bei allen Patienten erfolgte die Apherese mit einem Adsorbervolumen von 750 ml. Die Blutflußrate betrug ausnahmslos 60 ml/min. Das behandelte Volumen betrug durchschnittlich das 1,30-fache Blutvolumen (berechnet nach Nadler) (BH: 5650 ml, AS: 8690 ml; MW: 5420 ml; FB: 7100 ml; RG: 8330 ml).

Vor der Behandlung wurde der extrakorporale Kreislauf mit 3 x 2000 ml Spüllösung perfundiert, die Spüllösung enthielt 20000 IE Heparin. Im Kontrollarm erfolgte die Antikoagulation von Beginn an mittels ACD-A (Citrat-Dextrose) Infusion im Verhältnis 1:20 und der Applikation eines initialen Heparin-Bolus von 20 IE/kg KG. Im Studienarm wurde die Citrat-Antikoagulation von Beginn an auf ein Verhältnis von

1:40 reduziert, der initiale Heparin-Bolus wurde kompensatorisch auf 60 IE/kg KG erhöht. Der Behandlungsaufbau ist in Abbildung 2.1 zur Veranschaulichung skizziert. Bei den Patienten MW und RG wurden die Apheresen via eines vorbestehenden Shunts durchgeführt, bei den Patienten BH, AS und FB wurden die Kubitalvenen zur Gewährleistung eines veno-venösen Flusses punktiert.

Vor, während und nach der Behandlung wurden die Vitalparameter Blutdruck und Puls gemessen.

Die Blutentnahmen erfolgten analog der Tabelle 2.4, die Zeitpunkte variierten jedoch. Die zu untersuchenden Blutproben wurden vor Beginn der Behandlung, nach einem Behandlungsvolumen von 100 ml, 300 ml, 500 ml, 3000 ml sowie am Ende der Behandlung entnommen. Zusätzlich wurden mit Beginn der Apherese Proben nach dem Adsorber entnommen (Zeitpunkt „0“).

2.4 Labormethoden

Die Blutentnahmen erfolgten vor Beginn der Behandlung direkt aus dem Zugang, während und nach der Behandlung aus dem Schlauchsystem. Es erfolgten Blutentnahmen aus dem arteriellen System, d.h. dem Adsorber zuführenden Schlauchsystem vor ACD-A-Zugabe: zu Beginn, nach einem Behandlungsvolumen von 500 ml, 1000 ml, 2000 ml und am Ende der Apherese. Blutentnahmen aus dem venösen System (dem Patienten zuführenden System) wurden nach einem Behandlungsvolumen von 500 ml, 1000 ml und 2000 ml vorgenommen (siehe Tab. 2.4).

Blutbild und Differentialblutbild wurden im Coulter Counter gemessen. Die Elektrolyte Natrium, Kalium und ionisiertes Calcium wurden mit dem Ionometer EF (Fresenius, Oberursel) sowie dem ABL 555 (Fa. Radiometer, Kopenhagen) bestimmt. Die Messung der Blutgase erfolgte mit dem ABL 30 Gascheck (Fa. Radiometer, München) und dem ABL 555 (Fa. Radiometer, Kopenhagen). Zur Quantifizierung der Routineserumchemie (Nierenretentionsparameter, Transaminasen, Cholestaseparameter, Gesamteiweiß, CK) und der Gerinnungsparameter (Quick, PTT, Fibrinogen) wurden Standardmethoden eingesetzt.

Die Bestimmung des Gesamt- und HDL-Cholesterins sowie der Triglyzeride wurde mit Testkits der Fa. Boehringer, Mannheim, die des LDL-Cholesterins mit Quantolip (Fa. Immuno, Heidelberg), und die des Lp(a) turbidometrisch (polyclonale Antikörper der Fa. Greiner BioChemica, Flacht) durchgeführt.

Die Überwachung der Gerinnungsparameter während der Behandlung erfolgte durch Bestimmung der Vollblutgerinnungszeit nach Lee-White und der aktivierten Gerinnungszeit (ACT) mittels Hemochron 401 (International Technidyne Corp., Edison, USA).

Zur Quantifizierung der Biokompatibilitätsparameter erfolgten die Probeentnahmen in eisgekühlte Spritzen. Die Proben wurden sofort nach Entnahme eisgekühlt, bei 4°C zentrifugiert (2993 g) und das Serum bei –70°C bis zur Bestimmung aufbewahrt.

β-Thromboglobulin (Asserachrom β-TG, Fa. Boehringer Mannheim), C3a (C3a-des Arg ELISA, Progen Biotechnik GmbH), Elastase (PMN Elastase, Fa. Merck Immunoassay) und Thrombin-Antithrombin-Komplex (Enzygnost TAT micro, Fa. Behring Diagnostics GmbH) wurden im ELISA gemessen.

Zur Bestimmung der Bradykininkonzentration wurden 2 ml Blut mit 0,2 ml Inhibitorcocktail (10000 IE TrasyloI/ml, Sojabohnen-Trypsininhibitor 0,8 mg/ml, Polybrene 4 mg/ml, 1,10-Phenanthrolin 10 mg/ml, Na₂-EDTA 20 mg/ml) in Polypropylenröhrchen gemischt. Nach unmittelbar folgender Zentrifugation (3000g, 10 min., 4°C) wurden 0,8 ml des Plasmas mit 3 ml eisgekühltem, absoluten Ethanol versetzt, 15 min. auf Eis inkubiert und anschließend erneut zentrifugiert (2000g, 10 min., 4°C). Der Überstand wurde dekantiert und im Luftstrom eingedampft, der Rückstand schließlich in 0,6 ml 66% Aceton wieder aufgenommen und mit 1,4 ml Petrolether extrahiert. Zur Phasentrennung erfolgte eine erneute Zentrifugation (2000g, 10 min., Raumtemperatur), die obere flüssige Phase wurde abgesaugt und verworfen, die untere flüssige Phase im Luftstrom eingedampft und schließlich im RIA die Bradykininkonzentration in Doppelkontrolle gemessen (*Shimamoto et al. 1982*).

2.5 Berechnungen:

Die durch Apherese erreichten prozentualen Reduktionen der Lipoproteine und des Fibrinogen wurden nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Reduktion} = (\text{Konzentration}_{\text{vor}} - \text{Konzentration}_{\text{nach}}) * 100 / \text{Konzentration}_{\text{vor}}$$

Die im Ergebnisteil genannten prozentualen Konzentrationsänderungen allgemein wurden wie folgt berechnet:

$$\text{Änderung} = (\text{Konzentration}_{\text{nach}} - \text{Konzentration}_{\text{vor}}) * 100 / \text{Konzentration}_{\text{vor}}$$

Das individuelle Blutvolumen wurde nach der Nadler-Formel berechnet (*Nadler et al. 1962*):

Für Frauen gilt:

Blutvolumen [ml] = 1000 * (0,3561 * Größe³ [m³] + 0,03308 * Körpergewicht [kg] + 0,1833).

Für Männer gilt:

Blutvolumen [ml] = 1000 * (0,3669 * Größe³ [m³] + 0,03219 * Körpergewicht [kg] + 0,6041).

Die Ergebnisse werden als Mittelwerte \pm Standardabweichungen angegeben und dargestellt. Im Versuchskollektiv beträgt N=8, in der Kontrollgruppe N=16, Abweichungen werden im Kapitel 4 gesondert aufgeführt.

3. Ergebnisse

3.1 DALI-Apherese mit niedrig dosierter Citrat-Antikoagulation

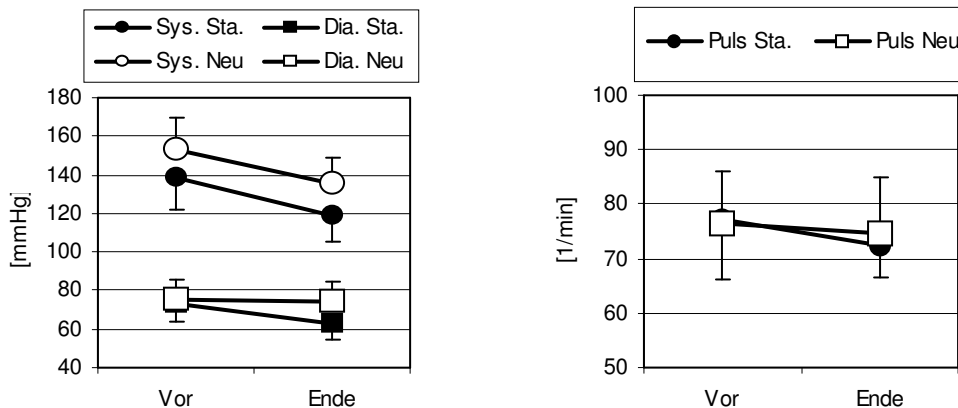
3.1.1 Technischer Verlauf

Technische Komplikationen traten im Wesentlichen nicht auf. Alle fünfzehn Behandlungen konnten abgeschlossen werden, die verwendeten Hämadsorptionsgeräte DALI 4008 funktionierten einwandfrei. Die Behandlungszeiten lagen in Abhängigkeit der gewählten Adsorberkonfigurationen zwischen 78 Minuten und 107 Minuten. Die gemessenen Druckdifferenzen zwischen Adsorbereingang und Adsorbereingang stiegen im Mittel während der Behandlung um 5 mmHg (von 45 mmHg auf 50 mmHg) an. Die verwendeten Adsorber wiesen nach vollständiger Rückgabe des Patientenblutes am Ende der Behandlung keine relevanten Blutreste als Zeichen möglicher Thrombosierung auf.

3.1.2 Klinischer Verlauf und Vitalparameter

Die DALI-Apheresen wurden im Wesentlichen alle gut vertragen, klinische Nebenwirkungen wurden weder bei der Durchführung des Standardverfahrens noch bei Verwendung des modifizierten Antikoagulationsregimes beobachtet. Insbesondere fielen keine Zeichen einer hypocalcämischen Tetanie auf. Die Apheresetherapie konnte in jedem Fall beendet werden. Körpertemperatur und Körpergewicht blieben in beiden Studienarmen unbeeinflusst von den durchgeführten Lipidapheresen. Die Vitalparameter Blutdruck und Puls zeigten im Mittel geringe, jedoch stets asymptotische Veränderungen, der mittlere systolische Blutdruck lag bei 139/73 mmHg vor und 119/63 mmHg nach Beendigung des Standardverfahrens (Δ RR: -20/10 mmHg) sowie 153/75 mmHg vor und 136/74 mmHg nach Lipidapherese mit modifizierter Citrat-Antikoagulation (Δ RR: -17/1 mmHg) (siehe Abb. 3.1.1). Die Patientin BH reagierte in einem Fall mit einem systolischen Blutdruckabfall bis auf minimal 93 mmHg, dieser war klinisch asymptotisch (2. Apherese nach Standardprotokoll). Der Puls blieb während aller durchgeführten Behandlungen im Normbereich (Abb. 3.1.1).

Abb. 3.1.1: Blutdruckwerte und Puls vor und nach Apherese in Abhängigkeit vom Antikoagulationsregime.



Vor: vor Behandlung; Ende: nach Behandlung; Sys.: Systolischer Blutdruck; Dia.: Diastolischer Blutdruck; Sta.: Standardregime; Neu: reduzierte Citrat-Dosis. Darstellung von Mittelwert±Standardabweichung; N=15.

3.1.3 Hämatologie und Hämolysparameter

Die absoluten Zellzahlen, Erythrocyten, Leukocyten und Thrombocyten sind wichtige Parameter der Hämokompatibilität eines extrakorporalen Blutkreislaufs. Die Wahl des Antikoagulationsregimes nahm keinen Einfluss auf die Erythrocytenzahl am Ende der Apherese, in beiden Studienarmen wurde eine Reduktion der Zellanzahl um 8% beobachtet. Auch im Verlauf der Lipidapheresen blieben die Erythrocyten im arteriellen System in beiden Studiengruppen stets im Normbereich (siehe Tab. 3.1.1). Bei Betrachtung von Hämatokrit und Hämoglobin bestätigten sich die beschriebenen Erythrocyten-Resultate. Die Messungen der Erythrocyten im venösen Schenkel ergaben keine relevanten Unterschiede zwischen den Behandlungsmodifikationen. Nach 100 ml behandeltem Blut zeigte sich ein klarer Verdünnungseffekt durch die priming Lösung, die nach Vorbereitung der Adsorber im System verblieb, nach 300 ml behandeltem Blutvolumen wurde offensichtlich nur durch die Antikoagulation verdünntes Blut reinfundiert (Tab. 3.1.1).

Auch die Leukocyten blieben im Wesentlichen in beiden Studienarmen unbeeinflusst von der Wahl der Antikoagulation, bei Verwendung der Citrat-reduzierten Dosierung zeigte sich am Ende der Apherese im Durchschnitt eine Reduktion von 9%, die maximale Reduktion von 16% wurde nach 3000 ml behandeltem Blutvolumen erreicht. Die absoluten Zellzahlen lagen während der Behandlung durchwegs im Normbereich.

Tab. 3.1.1: Erythrocyten [T/I] vor, während und nach Lipidapherese in Abhängigkeit vom Antikoagulationsregime.

Behandeltes Vol. [ml]	Standard Art.	Standard Ven.	Neu Art.	Neu Ven.
Vor	4,43±0,51		4,21±0,49	
0		1,03±0,16		0,99±0,16
100	4,19±0,51	2,94±0,48	3,91±0,50	2,85±0,40
300	4,10±0,52	3,70±0,48	3,87±0,49	3,67±0,40
500	4,13±0,52	3,77±0,45	3,86±0,49	3,73±0,45
3000	4,16±0,50	3,96±0,45	3,95±0,48	3,86±0,47
Ende	4,09±0,49		3,86±0,46	
Reduktion [%]	8±6		8±2	

Vol.: Volumen; Art.: im arteriellen System vor dem Adsorber; Ven.: im venösen System nach dem Adsorber; Standard: herkömmliche Citrat-Dosierung; Neu: reduzierte Citrat-Dosierung. Reduktion: Änderung der Ergebnisse am Ende der Behandlung bezogen auf die entsprechenden Vorwerte. Mittelwert±Standardabweichung; N=15.

Im Studienarm der Standardbehandlung lagen die Leukocyten am Ende im Mittel 5% über dem Ausgangswert, nach 500 ml behandeltem Blutvolumen wurde die maximale Reduktion von 7% beobachtet und während der lipidreduzierenden Therapie blieben die Leukocyten insgesamt im Normbereich (siehe Tab. 3.1.2). Die Ergebnisse im venösen System wiesen keine Unterschiede zwischen den beiden Behandlungsgruppen auf und ergaben den bereits für die Erythrocyten beschriebenen Verdünnungseffekt. Bei Betrachtung der Differentialblutbilder fiel auf, dass es in beiden Gruppen gleichermaßen zu einem kontinuierlichen Abfall der Monocyten um 20% bzw. 21% (Neu) kam, die weiteren Leukocytenarten blieben durch die Apherese unbeeinflusst.

Die Messungen der Thrombocytenzahlen schlossen einen relevanten Abfall in beiden Studienarmen aus, die maximale durchschnittliche Reduktion der Thrombocyten in der Standard-Gruppe wurde am Ende der Behandlung erreicht (5%). Bei Testung des modifizierten Antikoagulationsregimes zeigte sich der maximale Rückgang der Blutplättchen nach 500 ml behandeltem Blutvolumen. Am Ende betrug die Reduktion dieser Zellen 6%. Ein deutlicher Thrombocyten-Nadir während der Behandlung konnte ausgeschlossen werden (siehe Tab. 3.1.3).

Tab. 3.1.2: Leukocyten [G/l] vor, während und nach Lipidapherese in Abhängigkeit vom Antikoagulationsregime.

Behandeltes Vol. [ml]	Standard Art.	Standard Ven.	Neu Art.	Neu Ven.
Vor	5,87±1,38		6,43±1,50	
0		0,85±0,31		1,21±0,35
100	5,51±1,29	3,26±0,81	5,66±1,37	3,86±0,95
300	5,47±1,22	4,45±1,11	5,59±1,37	4,64±1,18
500	5,45±1,28	4,82±1,25	5,52±1,47	4,64±1,28
3000	5,73±1,63	5,21±1,34	5,31±1,30	4,71±1,25
Ende	6,08±1,32		5,75±0,94	
Reduktion [%]	-5±12		9±14	

Vol.: Volumen; Art.: im arteriellen System vor dem Adsorber; Ven.: im venösen System nach dem Adsorber; Standard: herkömmliche Citrat-Dosierung; Neu: reduzierte Citrat-Dosierung. Reduktion: Änderung der Ergebnisse am Ende der Behandlung bezogen auf die entsprechenden Vorwerte. Mittelwert±Standardabweichung; N=15.

Die Messergebnisse der Thrombocyten im venösen System stellten sich im Vergleich zu den vorbeschriebenen Zellen unterschiedlich dar. In beiden Studiengruppen fielen gleichermaßen ein verzögerter Wiederanstieg der Thrombocytenzahlen auf und erst nach 3000 ml behandeltem Blut lagen die Thrombocyten auf einem den systemischen Ergebnissen vergleichbarem Niveau (siehe Tab. 3.1.3).

Zeichen einer stattgefundenen Hämolyse wie z. B. Anstieg der LDH und klinisch relevanter Abfall des Haptoglobins wurden in keiner der 30 durchgeführten Lipidapheresen nachgewiesen. Die Messergebnisse der LDH lagen nach Apherese im Mittel 11% (Neu) bzw. 16% (Standard) unter den entsprechenden Vorwerten. Haptoglobin wurde in beiden Gruppen durch die Apherese reduziert, lag jedoch auch am Ende jeder Behandlung im Normbereich (Standard: 1,39 g/l vor und 1,13 g/l nach Apherese (Reduktion um 20%); Neu: 1,56 g/l vor und 1,31 g/l nach Behandlung (Reduktion: 16%)).

Tab. 3.1.3: Thrombocyten [G/l] vor, während und nach Lipidapherese in Abhängigkeit vom Antikoagulationsregime.

Behandeltes Vol. [ml]	Standard Art.	Standard Ven.	Neu Art.	Neu Ven.
Vor	208±54		228±53	
0		31±11		33±10
100	197±51	94±44	215±50	108±36
300	198±48	79±68	208±49	100±76
500	196±49	152±63	205±47	133±58
3000	200±46	193±44	213±45	215±48
Ende	187±49		213±45	
Reduktion [%]	8±14		6±5	

Vol.: Volumen; Art.: im arteriellen System vor dem Adsorber; Ven.: im venösen System nach dem Adsorber; Standard: herkömmliche Citrat-Dosierung; Neu: reduzierte Citrat-Dosierung. Reduktion: Änderung der Ergebnisse am Ende der Behandlung bezogen auf die entsprechenden Vorwerte. Mittelwert±Standardabweichung; N=15.

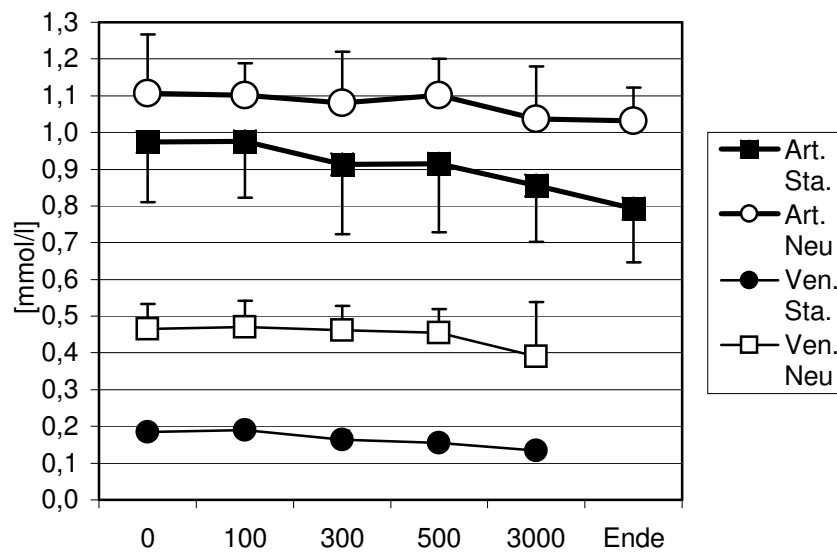
3.1.4 Elektrolyte und Blutgasanalyse

In der beschriebenen klinischen Studie lag ein besonderes Interesse bei möglichen Veränderungen des systemischen Calciumgehalts sowie dem pH des Blutes, da die Verringerung der Citrat-Dosierung (ACD-A: acid citrate dextrose, formula A) im Studienarm „Neu“ aufgrund des Citrat-eigenen pH und der calziumbindenden Eigenschaft des verwendeten Antikoagulans solche Änderungen erwarten ließ.

Das gemessene ionisierte Natrium und Kalium zeigten keine Konzentrationsänderungen während der Standardbehandlungen oder der modifiziert durchgeführten Lipidapheresen. In beiden Studienarmen wurden während der gesamten Apherese Natriumkonzentrationen zwischen 135±3 mmol/l und 137±3 mmol/l im arteriellen Schenkel gemessen. Auf der venösen Seite des extrakorporalen Blutkreislaufes wurden in beiden Behandlungsarmen bis zu einem behandelten Blutvolumen von 300 ml unphysiologisch erniedrigte Natriumkonzentrationen zwischen 128±3 mmol/l und 132±3 mmol/l gemessen. Ab einem Blutvolumen von 500 ml lagen die Natriumkonzentrationen im reinfundierten Blut im physiologischen Bereich. Die ionometrisch bestimmten Kaliumkonzentrationen lagen in beiden Gruppen sowohl auf der systemischen als auch auf der venösen Seite der Adsorber im Normbereich. Bei Verwendung des herkömmlichen Antikoagulationsregimes ergab sich durch die Apherese eine systemische Reduktion des Kaliums um 5,8%

($3,9\pm 0,3$ mmol/l vor; $3,7\pm 0,4$ mmol/l nach Apherese). Die Citrat reduzierte Behandlungsweise ergab eine Verringerung der Kaliumkonzentration um 2,6% ($4,1\pm 0,5$ mmol/l vor; $4,0\pm 0,5$ mmol/l nach Apherese). Bei Untersuchung des ionisierten Calciums zeigten sich dagegen erwartungsgemäße Unterschiede zwischen den beiden Studienarmen (siehe Abb. 3.1.2)

Abb. 3.1.2: Ionisiertes Calcium vor, während und nach der Apherese in Abhängigkeit von der verwendeten Citrat-Dosis.



Abszisse: Zeitpunkt der Blutentnahme vor Apherese, nach 100, 300, 500 und 3000 ml behandeltem Blutvolumen und nach Apherese.

Art.: Arteriell System vor dem Adsorber; Ven.: Venöses System nach dem Adsorber; Sta.: Standarddosierung des Citrats; Neu: Modifizierte Citrat-Dosierung. Mittelwerte \pm Standardabweichung; N=15.

Wie erwartet zeigte sich in der Kontrollgruppe „Standard“ eine deutlichere systemische Absenkung des ionisierten Calciums von initial $0,97\pm 0,16$ mmol/l auf minimal $0,79\pm 0,15$ mmol/l am Ende der Lipidapherese im Vergleich zur Citrat-modifizierten Behandlung. Bei diesem Apherese-Schema ergab sich eine Reduktion des ionisierten Calciums um 5% (versus 18%) von initial $1,11\pm 0,16$ mmol/l auf $1,03\pm 0,09$ mmol/l nach Beendigung der Behandlung. Wie der Abb. 3.1.2 zu ersehen ist erfolgte entsprechend den systemischen Ergebnissen bei Verwendung des normalen Antikoagulationsregimes die Reinfusion von calciumärmerem Blut als in der Testgruppe „Neu“. In der Standard-Gruppe lag das ionisierte Calcium auf der venösen Seite des extrakorporalen Kreislaufs minimal bei $0,13\pm 0,02$ mmol/l

gemessen nach einem behandelten Blutvolumen von 3000 ml. Im Gegensatz hierzu lag das Minimum bei Verringerung der Citrat-Dosierung nach einem behandelten Blutvolumen von 3000 ml bei $0,39 \pm 0,15$ mmol/l.

Der beschriebene Einfluss der Antikoagulation auf das ionisierte Calcium hatte allerdings keinen Effekt auf die gemessenen Konzentrationen des Gesamt-Calciums. Durch die Standardbehandlung war lediglich eine Calciumreduktion um 3% zu beobachten ($2,32 \pm 0,06$ mmol/l vor; $2,25 \pm 0,09$ mmol/l nach Apherese). In der neuen Behandlungsgruppe lag das Gesamt-Calcium nach Beendigung der Lipidapherese um 2% unter dem entsprechenden Vorwert ($2,30 \pm 0,09$ mmol/l vor; $2,25 \pm 0,09$ mmol/l nach Apherese).

Die Änderungen der Phosphatkonzentrationen nach DALI lagen in beiden Gruppen unter 10%, in der Standardgruppe fiel eine Absenkung um 7% auf, nach den DALI-Behandlungen mit 1:40 Citrat zeigte sich sogar eine um 4% erhöhte Phosphatkonzentration.

Bei Betrachtung des Säure-Basen-Haushaltes, in dieser Studie speziell Blut-pH und Basen Exzess (BE) ergaben sich die im Folgenden beschriebenen Ergebnisse:

Der systemisch, also im arteriellen Schenkel gemessene pH zeigte weder in der Standardgruppe noch in der neuen Testgruppe während und nach Durchführung der DALI-Behandlung Veränderungen, die bestimmten pH-Werte lagen jederzeit im Normbereich zwischen $7,41 \pm 0,04$ und $7,43 \pm 0,04$. Auch die systemischen BE-Ergebnisse lagen stets im Normbereich. Auffälliger waren die Ergebnisse der entnommenen Blutproben des venösen Schenkels. Bei Durchführung des herkömmlichen Antikoagulationsprinzips wurde initial ein deutlich azideres Blut/Primer-Gemisch reinfundiert als bei verringerter Citrat-Gabe (siehe Tab. 3.1.4). Während der Standard-Apherese wurde auch bei einem behandelten Volumen von 3000 ml ein azides Gemisch reinfundiert wohingegen in der Testgruppe nach 300 ml ein nahezu pH-physiologisches Blut zurückgegeben wurde.

Diese Ergebnisse wurden auch durch die Bestimmung des BE im venösen Schenkel bestätigt, ein deutlicher Basenverbrauch war insbesondere während des Standardregimes auffällig (BE zwischen $-12,7$ und $-6,3$).

Tab. 3.1.4: pH im venösen System vor und während der Lipidapherese in Abhängigkeit vom Antikoagulationsregime.

Behandeltes Vol [ml]	Standard	Neu
0	6,87±0,02	7,19±0,03
100	6,91±0,11	7,22±0,04
300	7,17±0,04	7,34±0,04
500	7,22±0,04	7,33±0,04
3000	7,21±0,03	7,32±0,04

Vol.: Volumen; Standard: herkömmliche Citrat-Dosierung; Neu: reduzierte Citrat-Dosierung. Mittelwert±Standardabweichung; N=15.

3.1.5 Gerinnungsparameter

Selbstverständlich war ein weiterer wichtiger Aspekt der hier beschriebenen Studie der Einfluss der unterschiedlichen Antikoagulationsschemata während der DALI-Apherese auf unterschiedliche Gerinnungsparameter. Hierbei wurden Routineparameter wie Thromboplastinzeit (Quick) und partielle Thromboplastinzeit (PTT), aber auch die aktivierte Gerinnungszeit (ACT), der Lee-White Test, D-Dimere und Antithrombin III (AT III) untersucht. In beiden Studienarmen kam es durch die Lipidapherese mit unterschiedlicher Antikoagulation erwartungsgemäß zu Veränderungen der Gerinnungsparameter. Diese Änderungen sind für die Parameter Quick, PTT und Lee-White Test der Tab. 3.1.5 zu entnehmen. Bei Anwendung der citratarmen Antikoagulation wurde laut Protokoll ein stärkerer Heparin-Bolus vor Beginn der Apherese appliziert, daher war die PTT-Verlängerung bei Standard-Antikoagulation im Vergleich geringer ausgeprägt (354% versus 429% des Vorwertes). Umgekehrt verhielt sich der Quick-Wert, dieser wurde im Rahmen der herkömmlichen DALI-Apherese um 29% reduziert (versus 17%). Die Vollblutgerinnungszeit nach Lee-White zeigte eine gute Antikoagulation in beiden Studienarmen an, durch die Verringerung der Citrat-Dosis bei gleichzeitiger Intensivierung der Heparin bedingten Antikoagulation lag die Vollblutgerinnungszeit am Ende der Apherese um 199% über dem Ausgangswert und war somit deutlicher verlängert als bei Einsatz des Standardprotokolls (124%).

Die bestimmten D-Dimere zeigten keinerlei Unterschied vor und nach Apherese oder zwischen den beiden Studienarmen, sie lagen ausnahmslos im Normbereich.

Antithrombin III wurde durch die Lipidapherese in beiden Gruppen gleichermaßen reduziert (16%) (Standard: $102 \pm 10\%$ vor; $86 \pm 9\%$ nach Apherese; Neu: $105 \pm 11\%$ vor; $89 \pm 10\%$ nach Apherese).

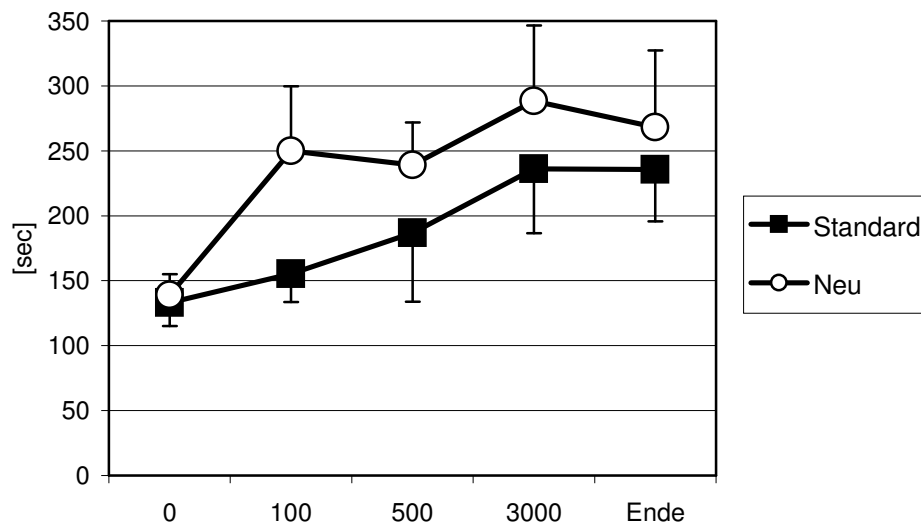
Tab. 3.1.5: Gerinnungsparameter vor und nach der Lipidapherese in Abhängigkeit vom Antikoagulationsregime.

	Zeitpunkt	Standard	Neu
Quick [%]	Vor	96 ± 4	94 ± 3
	Ende	68 ± 7	79 ± 6
PTT [sec]	Vor	38 ± 26	33 ± 2
	Ende	153 ± 40	173 ± 17
Lee-White [min]	Vor	$6,6 \pm 1,8$	$6,1 \pm 1,9$
	Ende	$13,8 \pm 4,2$	$16,8 \pm 4,8$

Standard: herkömmliche Citrat-Dosierung; Neu: reduzierte Citrat-Dosierung.
Mittelwert \pm Standardabweichung; N=15.

Nur die Vollblutgerinnungszeit wurde im gesamten Verlauf der Apheresen als Maß der Antikoagulation gemessen. Hier zeigte sich rasch nach Beginn der Behandlung (100 ml behandeltes Blutvolumen) eine klare Verlängerung der ACT im Sinne einer stärkeren Antikoagulation im Vergleich zur Standardapherese (siehe Abb. 3.1.3). Nach ca. 50 Minuten Behandlungszeit (3000 ml) war in beiden Gruppen die maximale Inhibierung der Gerinnung erreicht (Standard: 236 ± 50 sec versus Neu: 288 ± 50 sec).

Abb. 3.1.3: ACT vor, während und nach der Apherese in Abhängigkeit vom verwendeten Antikoagulationsregime.



Abszisse: Zeitpunkt der Blutentnahme vor Apherese, nach 100, 500 und 3000 ml behandeltem Blutvolumen und nach Apherese. Standard: Standarddosierung des Citrats; Neu: modifizierte Citrat-Dosierung. Mittelwerte \pm Standardabweichung; N=15.

3.1.6 Lipoproteine und Fibrinogen

Wichtige Parameter zur Beurteilung der Effektivität des DALI-Verfahrens und mögliche Einflüsse der Antikoagulation auf die Adsorption der Lipide sind Gesamt-Cholesterin, Triglyzeride, LDL-Cholesterin, VLDL-Cholesterin, HDL-Cholesterin und Lipoprotein (a). Da die Adsorption von Fibrinogen bei verschiedenen Lipidapherese-Verfahren beschrieben wurde und die Verminderung des Fibrinogen-Gehaltes im Blut durchaus eine zusätzliche Indikation zur Lipidapherese darstellen kann, werden die Untersuchungen zur Fibrinogen-Adsorption in diesem Kapitel mitbeschrieben.

Die Mittelwerte der Lipoproteine und des Fibrinogens vor und nach Lipidapherese sind der Tabelle 3.1.6 zu entnehmen.

Tab. 3.1.6: Lipoproteine und Fibrinogen vor und nach der Lipidapherese in Abhängigkeit vom Antikoagulationsregime.

	Standard		Neu	
	vor	Ende	vor	Ende
TC [mg/dl]	227±61	95±20	222±43	103±18
TG [mg/dl]	185±74	87±21	182±63	80±28
LDL [mg/dl]	158±44	50±16	151±32	57±14
HDL [mg/dl]	47±8	37±7	47±11	39±8
VLDL [mg/dl]	25±11	8±3	24±10	7±3
Lp(a) [mg/dl]	60±22	19±11	64±31	24±19
Fib [mg/dl]	355±86	290±79	389±99	349±92

Standard: herkömmliche Citrat-Dosierung; Neu: reduzierte Citrat-Dosierung. TC: Total-Cholesterin; TG: Triglyzeride; LDL: LDL-Cholesterin; HDL: HDL-Cholesterin; VLDL: VLDL-Cholesterin; Lp(a): Lipoprotein (a); Fib: Fibrinogen. Mittelwert±Standardabweichung; N=15; für Lp(a) N=12.

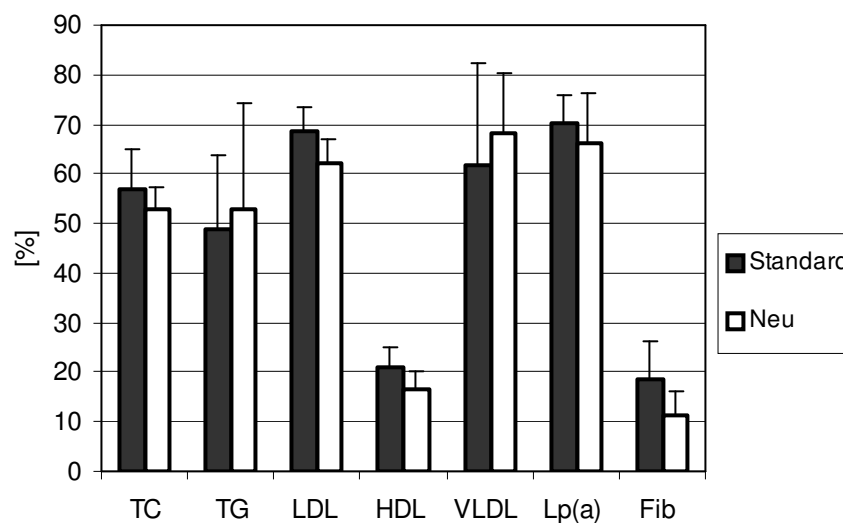
Die Reduktionen der Lipoproteine und des Fibrinogens (siehe Abb. 3.1.4) lagen in beiden Gruppen im erwarteten Ausmaß und erreichten somit die Forderungen an die Lipidapherese. Allerdings ergaben sich im Vergleich der beiden Studienarme signifikante Unterschiede. Die Absenkungen von Gesamt-Cholesterin, LDL-Cholesterin und Lipoprotein (a) waren in der Standardgruppe geringfügig, aber zum Teil signifikant besser. LDL-Cholesterin konnte durch das Standardverfahren um 69% reduziert werden, das modifizierte Verfahren erreichte eine Absenkung des LDL-Cholesterins um 62%. Das Gesamt-Cholesterin wurde in der Kontrollgruppe um 57% reduziert, dies war nur gering, aber ebenfalls signifikant besser als in der Gruppe „Neu“ (53%). Die mittlere Absenkungsrate für Lipoprotein (a) betrug in der Standardgruppe 70%, berücksichtigt man nur die Vorwerte, die im pathologischen Bereich lagen (> 30 mg/dl). Im Vergleich lag die Reduktion von Lp(a) in der Citrat-reduzierten Gruppe bei 66%. Dieser Unterschied war gering und nicht signifikant.

Die Rückgaberate von HDL-Cholesterin nach Apherese war bei Anwendung des neuen Antikoagulationsverfahrens signifikant besser, hier wurden noch 84% des Ausgangswertes detektiert im Gegensatz zu 79% in der Kontrollgruppe (in der Abb. 3.1.4 sind die Reduktionen dargestellt). Deutlichere Absenkungen konnten bei Anwendung des modifizierten Verfahrens für Triglyzeride und VLDL-Cholesterin erreicht werden, der Unterschied der Triglyzeridreduktion war hierbei signifikant

(Standard: 49%; Neu: 53%). Die Ergebnisse der VLDL-Cholesterin Reduktion waren nur gering unterschiedlich und nicht signifikant (Standard: 62%; Neu: 68%).

Die Reduktion des Fibrinogens lag in der Gruppe herkömmlicher Antikoagulation bei 18%, diese Absenkung war signifikant deutlicher als in der Gruppe „Neu“ (Standard: 18%; Neu: 11%).

Abb. 3.1.4: Reduktion der Lipoproteine und Fibrinogen durch DALI-Apherese in Abhängigkeit vom verwendeten Antikoagulationsregime.



Standard: herkömmliche Citrat-Dosierung; Neu: reduzierte Citrat-Dosierung. TC: Total-Cholesterin; TG: Triglyzeride; LDL: LDL-Cholesterin; HDL: HDL-Cholesterin; VLDL: VLDL-Cholesterin; Lp(a): Lipoprotein (a); Fib: Fibrinogen. Mittelwert±Standardabweichung; Standard N=14; für Lp(a) N=8 . OH N=8.

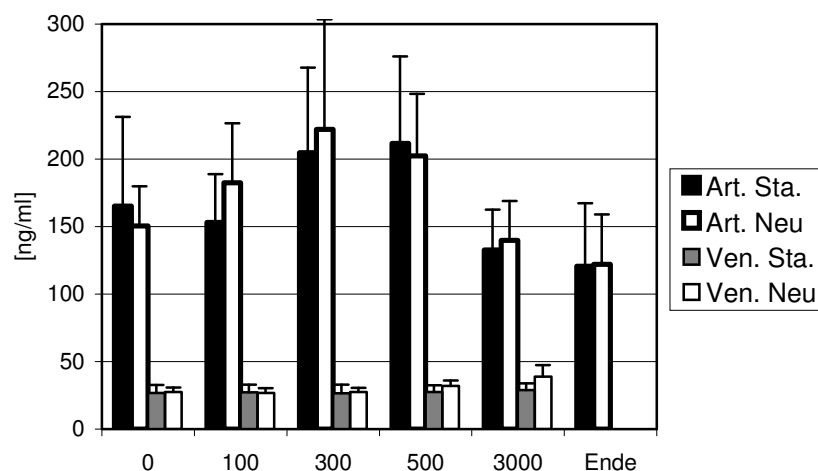
3.1.7 Biokompatibilitätsparameter

Zur Beurteilung der Biokompatibilität des extrakorporalen Systems DALI mit reduzierter Citrat-Dosis und intensivierter Heparin-Antikoagulation wurden im Vergleich zur Standard DALI-Apherese die Komplementfaktoren C3a und C5a, Tumornekrosefaktor- α (TNF), Elastase, β -Thromboglobulin (β -TG), Thrombin-Antithrombinkomplex (TAT) und Bradykinin bestimmt.

Erfreulicherweise konnte in dieser Studie eine stärkere Komplementaktivierung in beiden Studienarmen ausgeschlossen werden. Im arteriellen Schenkel, entsprechend den systemischen Konzentrationen, zeigte sich ein minimaler Anstieg des Komplementfaktors C3a über den Normbereich hinaus (siehe Abb. 3.1.5). So lag das mittlere Maximum in der Standardgruppe bei 212 ± 64 ng/ml (Normbereich bis 200

ng/ml) nach 500 ml behandeltem Blutvolumen (ca. 8-9 Minuten nach Beginn der Behandlung), in der Gruppe „Neu“ bei 222 ± 82 ng/ml nach ca. 5 Minuten. Am Ende der Behandlungen lagen die C3a-Konzentrationen in beiden Gruppen im Normbereich. Die Messergebnisse im venösen Schenkel lagen deutlich niedriger, die Maxima betrug 27 ± 6 ng/ml (Standard) bzw. 39 ± 9 ng/ml (Neu).

Abb. 3.1.5: Komplementfaktor C3a vor, während und nach DALI-Apherese in Abhängigkeit vom verwendeten Antikoagulationsregime.



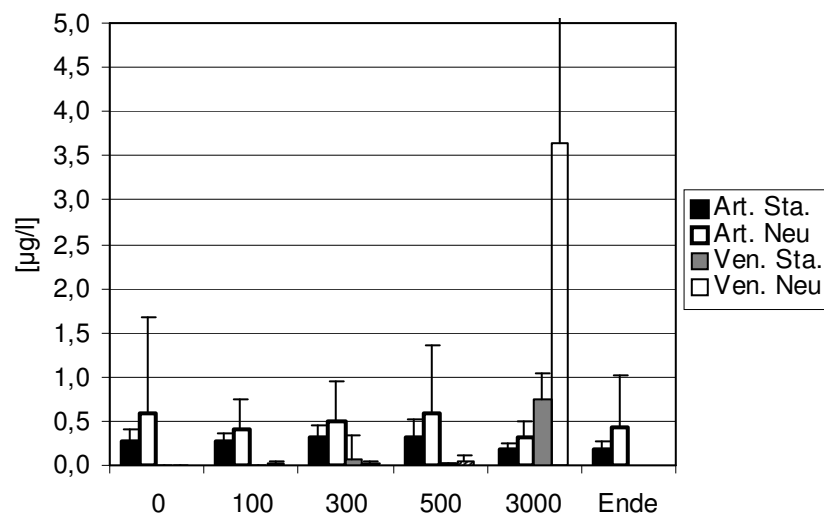
Abszisse: Zeitpunkt der Blutentnahme vor Apherese, nach 100, 300, 500 und 3000 ml behandeltem Blutvolumen und nach Apherese.

Art.: Arteriell System vor dem Adsorber; Ven.: Venöses System nach dem Adsorber; Sta.: Standarddosierung des Citrats; Neu: modifizierte Citrat-Dosierung. Mittelwerte \pm Standardabweichung; N=15.

Die C5a Untersuchungen bestätigten die beschriebenen C3a Resultate im Wesentlichen. In beiden Studiengruppen lagen die systemischen Konzentrationen von C5a im Normbereich, die Maxima wurden nach ca. 8-9 Minuten erreicht (Standard: $0,32 \pm 0,13$ μ g/l; Neu: $0,59 \pm 0,77$ μ g/l). Die nach dem Adsorber entnommenen Proben (venös) wiesen in beiden Gruppen bis zur neunten Minute (500 ml) ebenfalls normwertige Ergebnisse auf (siehe Abb. 3.1.6). Nach ca. 50 Minuten (3000 ml) war in der Gruppe „Neu“ jedoch ein durchschnittlicher Anstieg des Komplementfaktors C5a auf $3,63 \pm 3,63$ μ g/l auffällig. Zu diesem Zeitpunkt waren in 12 von 15 Behandlungen Konzentrationen über $1,5$ μ g/l festzustellen, die maximalen Werte lagen zwischen $4,0$ μ g/l und $6,45$ μ g/l bei Patient AS und zwischen $9,0$ μ g/l und $13,8$ μ g/l bei Patient MW. Einen systemischen Anstieg von C5a oder klinische

Nebenwirkungen der Behandlung hatte dies nicht zur Folge. Die Standardbehandlung verursachte einen nur sehr geringen mittleren venösen Anstieg von C5a bis maximal $0,74 \pm 0,3 \mu\text{g/l}$, das Maximum lag bei $1,5 \mu\text{g/l}$, 12 von 15 Behandlungen lagen unter $1,0 \mu\text{g/l}$.

Abb. 3.1.6: Komplementfaktor C5a vor, während und nach DALI-Apherese in Abhängigkeit vom verwendeten Antikoagulationsregime.

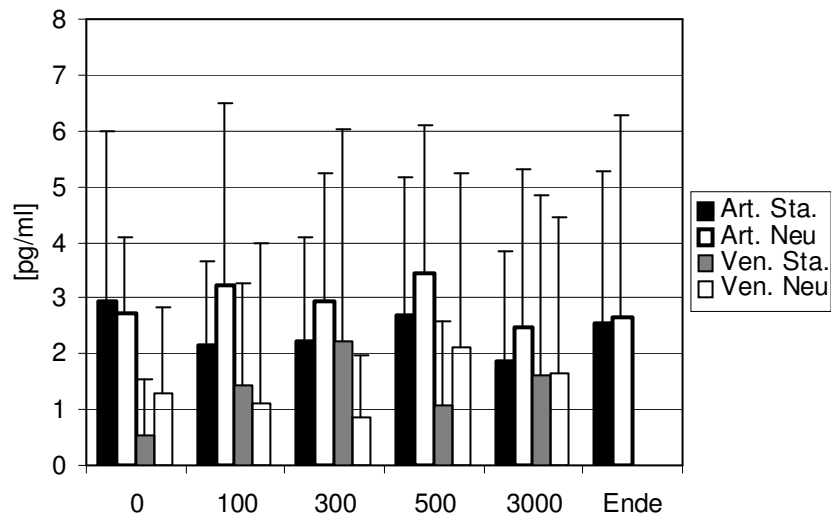


Abszisse: Zeitpunkt der Blutentnahme vor Apherese, nach 100, 300, 500 und 3000 ml behandeltem Blutvolumen und nach Apherese.

Art.: Arteriell System vor dem Adsorber; Ven.: Venöses System nach dem Adsorber; Sta.: Standarddosierung des Citrats; Neu: modifizierte Citrat-Dosierung. Mittelwerte \pm Standardabweichung; N=15.

Eine Monocytenaktivierung durch die DALI-Apherese fand weder bei einer Citrat-Antikoagulation im Verhältnis 1:20 noch im Verhältnis 1:40 statt (siehe Tab. 3.1.7). Als Indikator für eine mögliche Aktivierung der Monocyten wurde der Tumornekrosefaktor α , der in diesem Fall durch die Monocyten sezerniert werden würde, gemessen. In beiden Versuchsgruppen lagen die entsprechenden mittleren Konzentrationen sowohl systemisch als auch venös im Normbereich. Tendenziell waren bei Verwendung der 1:40 Verdünnung geringfügig höhere TNF α Konzentrationen systemisch zu messen, die venösen Bestimmungen ergaben in jedem Fall niedrigere Spiegel.

Abb. 3.1.7: Tumornekrosefaktor α vor, während und nach DALI-Apherese in Abhängigkeit vom verwendeten Antikoagulationsregime.



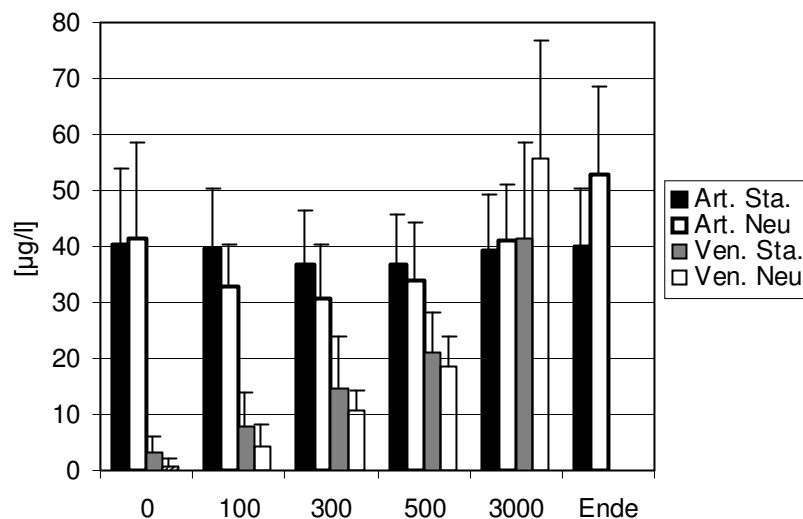
Abszisse: Zeitpunkt der Blutentnahme vor Apherese, nach 100, 300, 500 und 3000 ml behandeltem Blutvolumen und nach Apherese.

Art.: Arteriell System vor dem Adsorber; Ven.: Venöses System nach dem Adsorber; Sta.: Standarddosierung des Citrats; Neu: modifizierte Citrat-Dosierung. Mittelwerte \pm Standardabweichung; N=15.

Polymorphnukleäre Leukocyten (PMN-Leukocyten), die nach Stimulation Elastase sezernieren, wurden nicht im klinisch relevanten Umfang, aber doch messbar aktiviert. Die durchschnittlichen Elastase Konzentrationen lagen in beiden Gruppen vor Apherese geringfügig über der Norm (12-32 $\mu\text{g/l}$) bei ca. 40 $\mu\text{g/l}$, im Verlauf der Behandlungen zeigte sich ein leichter Abfall der systemischen Elastase Werte, in der Gruppe „Neu“ etwas deutlicher als in der Vergleichsgruppe (siehe Abb. 3.1.8). Nach einer Behandlungsdauer von 50 Minuten (3000 ml) lagen die gemessenen Konzentrationen in beiden Gruppen wieder auf Ausgangsniveau. Die nach dem Adsorber gemessenen Werte waren bis zu einem behandelten Blutvolumen von 500 ml niedriger als in den simultan entnommenen arteriellen Proben. Bei Betrachtung der Abbildung 3.1.8 fällt aber ein kontinuierlicher Konzentrationsanstieg auf, der nach 50 Minuten Behandlungsdauer in der Gruppe „Neu“ signifikant stärker als in der Kontrollgruppe ausfällt (Standard: $41,3 \pm 17,1$ $\mu\text{g/l}$; Neu: $55,6 \pm 21,0$ $\mu\text{g/l}$). Die maximalen Werte lagen zu diesem Zeitpunkt venös zwischen 82,6 $\mu\text{g/l}$ und 91,6 $\mu\text{g/l}$ in der Gruppe „Neu“ (Patient FB in allen 3 Behandlungen) bzw. 43,2 $\mu\text{g/l}$ und 79,0 $\mu\text{g/l}$ in der Standardgruppe (Patient FB in 2 Behandlungen). Dieser festgestellte signifikante Konzentrationsunterschied resultierte zum Ende der Lipidapherese auch

in einem Unterschied der systemischen Elastase Spiegel. Bei Verwendung des modifizierten Antikoagulationsregimes zeigte sich eine geringe aber signifikante Aktivierung der PMN-Leukocyten (Elastase: $53,0 \pm 15,4 \mu\text{g/l}$) im Gegensatz zur Kontrolle ($39,9 \pm 10,5 \mu\text{g/l}$). Diese Feststellung bestätigte sich auch bei Ansicht der Einzelergebnisse, in der Gruppe „Neu“ wurden in 11 von 15 Behandlungen Werte über $48 \mu\text{g/l}$ gemessen während in der Standardgruppe lediglich 2 Apheresen einen Anstieg über diesen Wert verursachten (Patient FB).

Abb. 3.1.8: Elastase vor, während und nach DALI-Apherese in Abhängigkeit vom verwendeten Antikoagulationsregime.



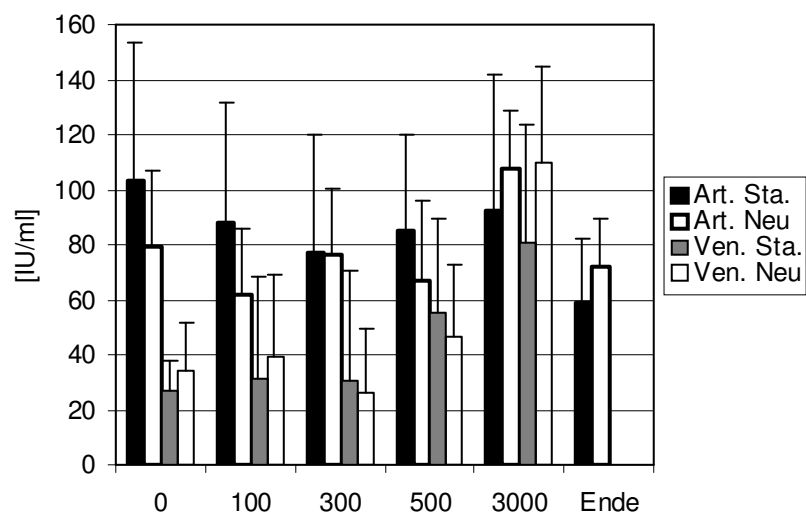
Abszisse: Zeitpunkt der Blutentnahme vor Apherese, nach 100, 300, 500 und 3000 ml behandeltem Blutvolumen und nach Apherese.

Art.: Arterielles System vor dem Adsorber; Ven.: Venöses System nach dem Adsorber; Sta.: Standarddosierung des Citrats; Neu: modifizierte Citrat-Dosierung. Mittelwerte \pm Standardabweichung; N=15.

Die Veränderung eines Antikoagulationsregimes im Rahmen eines extrakorporalen Blutkreislaufes lässt ein besonderes Augenmerk auf die Thrombocyten richten. Der Marker der Thrombocytenaktivierung, β -Thromboglobulin (β -TG), zeigte in der hier beschriebenen Untersuchung eine moderate, erwartete Aktivierung in beiden Studienarmen an (siehe Abb. 3.1.9). Schon die entnommenen Vorwerte waren bis auf maximal $104 \pm 50 \text{ IU/ml}$ (Standard) bzw. $79 \pm 28 \text{ IU/ml}$ („Neu“) erhöht. Vor Apherese und in der frühen Behandlungsphase lagen die β -TG Konzentrationen bei Verwendung des herkömmlichen Antikoagulationsregimes höher, im späteren Behandlungsverlauf lagen die gemessenen β -TG Spiegel in der modifizierten Gruppe

geringgradig höher. Diese Unterschiede waren jedoch klinisch nicht relevant und nicht signifikant. Nach Beendigung der Behandlung lagen die Werte in beiden Gruppen unter den entsprechenden Vorwerten (Standard: 59 ± 23 IU/ml; Neu: 72 ± 18 IU/ml), so dass eine Aktivierung der Thrombocyten, bedingt durch die unterschiedlichen Antikoagulationsregime, ausgeschlossen werden kann. Die venös gemessenen β -TG Werte lagen initial niedriger als die systemischen Werte, es zeigte sich jedoch ein kontinuierlicher Anstieg während der Apherese, der nach 50 Minuten in der Gruppe „Neu“ stärker imponierte (Standard: 81 ± 43 IU/ml; Neu: 110 ± 35 IU/ml).

Abb. 3.1.9: β -Thromboglobulin vor, während und nach DALI-Apherese in Abhängigkeit vom verwendeten Antikoagulationsregime.



Abszisse: Zeitpunkt der Blutentnahme vor Apherese, nach 100, 300, 500 und 3000 ml behandeltem Blutvolumen und nach Apherese.

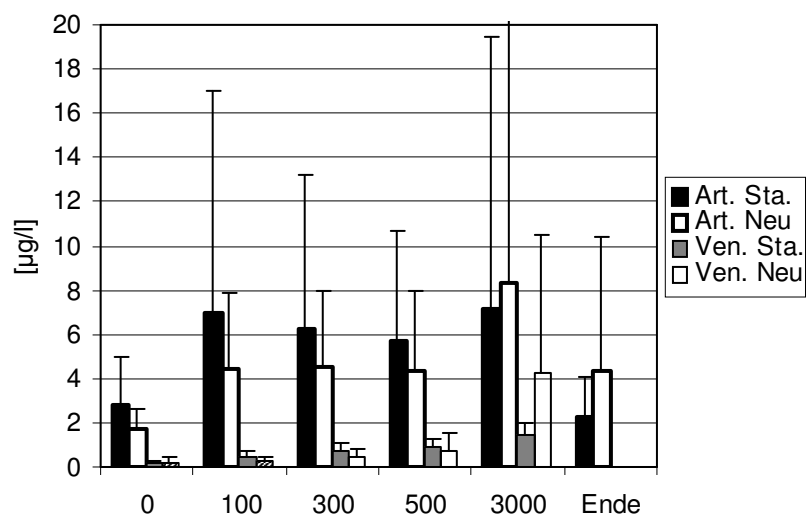
Art.: Arteriell System vor dem Adsorber; Ven.: Venöses System nach dem Adsorber; Sta.: Standarddosierung des Citrats; Neu: modifizierte Citrat-Dosierung. Mittelwerte \pm Standardabweichung; N=15.

Die Untersuchungen der plasmatischen Gerinnung, bestimmt mittels Messungen von Thrombin-Antithrombinkomplex (TAT), ergaben keinen relevanten Unterschied zwischen den beiden Studienarmen (siehe Abb. 3.1.10). Vor und nach der DALI-Apherese lagen die TAT Konzentrationen in beiden Gruppen im Normbereich ($1-4,1$ $\mu\text{g/l}$). Während der Apheresen jedoch waren systemisch erhöhte TAT Spiegel zu detektieren, diese lagen nach 50 Minuten (3000 ml) maximal bei $7,2 \pm 12,3$ $\mu\text{g/l}$ (Standard) bzw. $8,3 \pm 11,9$ $\mu\text{g/l}$ auf das zweifache der Norm erhöht. Signifikante Unterschiede zwischen den beiden Behandlungsweisen bestanden nicht. Die zum

Teil auftretenden großen Standardabweichungen sind möglicherweise durch individuelle Unterschiede zu erklären, so scheint der Patient MW empfindlicher auf die Umstellung der Antikoagulation reagiert zu haben. Bei diesem Patienten waren in allen 3 Behandlungen am Ende der „neuen“ Behandlung TAT Werte über 5 µg/l messbar während am Ende der Standardbehandlungen bei diesem Patienten keine TAT Erhöhungen über den Normbereich auffielen. In drei Fällen waren die TAT Werte ca. zehnfach erhöht, so z. B. bei Patient RG (Standard, 2. Behandlung) und Patient MW (Neu, 2. Behandlung und Standard, 1. Behandlung).

Die TAT Werte der venösen Proben lagen bis zu einem behandelten Blutvolumen von 500 ml in beiden Gruppen im Normbereich. Nach 50 Minuten zeigte sich allerdings innerhalb des Normbereiches eine Tendenz zu Ungunsten der Gruppe „Neu“, vier Einzelmessungen lagen über 6 µg/l.

Abb. 3.1.10: Thrombin-Antithrombinkomplex vor, während und nach DALI-Apherese in Abhängigkeit vom verwendeten Antikoagulationsregime.



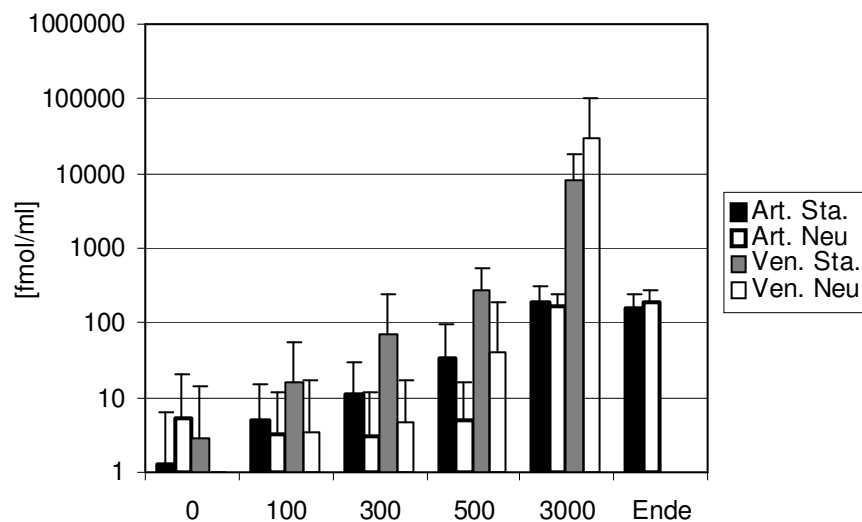
Abszisse: Zeitpunkt der Blutentnahme vor Apherese, nach 100, 300, 500 und 3000 ml behandeltem Blutvolumen und nach Apherese.

Art.: Arteriell System vor dem Adsorber; Ven.: Venöses System nach dem Adsorber; Sta.: Standarddosierung des Citrats; Neu: modifizierte Citrat-Dosierung. Mittelwerte±Standardabweichung; N=15.

Das DALI-System verursachte in beiden Studienarmen eine mäßige Aktivierung des Kallikrein-Kinin Systems, bestimmt anhand des Bradykinins. Allerdings war diese nur in den venösen, nach dem Adsorber entnommenen Proben nachweisbar ohne Einfluss auf die systemischen Bradykinin Konzentrationen (siehe Abb. 3.1.11). Die

durchschnittlichen systemischen Werte lagen in beiden Studiengruppen vergleichbar, es zeigte sich ein kontinuierlicher Anstieg bis zur fünfzigsten Minute (3000 ml) bis auf 192 ± 126 fmol/ml (Standard) bzw. 170 ± 68 fmol/ml (Neu). Am Ende der Behandlung lagen die Werte weiterhin auf diesem Niveau (Standard: 157 ± 68 fmol/ml; Neu: 188 ± 95 fmol/ml). Die venösen Spiegel lagen zu Beginn der Apherese nur wenig höher, nach einem Behandlungsvolumen von 3000 ml aber um ein vielfaches höher, in beiden Studiengruppen war ein Maximum von 8091 ± 9765 fmol/ml (Standard) bzw. 29921 ± 70521 fmol/ml (Neu) erreicht. Die Veränderung des Antikoagulationsregimes verursachte offenbar eine stärkere Aktivierung des Kinin-Kallikrein Systems jedoch ohne statistische Signifikanz. Insgesamt fielen bei Betrachtung der Einzelergebnisse große intra- und interindividuelle Unterschiede auf, was sich in den hohen Standardabweichungen widerspiegelte. Patient AS wies die stärkste Bereitschaft zur Bradykininbildung auf, nach 50 Minuten Lipidapherese waren während allen 3 Standardbehandlungen und allen 3 modifizierten Behandlungen die maximalen Bradykinin Konzentrationen messbar (Alt: 21600 fmol/ml bis 30600 fmol/ml; im Durchschnitt: 25600 fmol/ml; Neu: 51000 fmol/ml bis 277000 fmol/ml; im Durchschnitt: 128300 fmol/ml). Dagegen waren nach 500 ml behandeltem Volumen bei diesem Patienten in keinem der 6 Apherese Bradykinin detektierbar. Patientin BH bot nach 50 Minuten in beiden Behandlungsarmen die geringsten Bradykinin Spiegel auf (Alt: durchschnittlich 683 ± 156 fmol/ml; Neu: durchschnittlich 1356 fmol/ml) aber nach bereits ca. 8-9 Minuten Behandlungsdauer (500 ml) waren in ihren venösen Proben die höchsten Spiegel messbar (Neu: 0 ± 0 fmol/ml; Alt: 598 ± 431 fmol/ml). Die Patienten MW und FB reagierten im Gegensatz zu den 3 anderen Patienten nach 50 Minuten in beiden Studienarmen vergleichbar stark.

Abb. 3.1.11: Logarithmische Darstellung von Bradykinin vor, während und nach DALI-Apherese in Abhängigkeit vom verwendeten Antikoagulationsregime.



Abszisse: Zeitpunkt der Blutentnahme vor Apherese, nach 100, 300, 500 und 3000 ml behandeltem Blutvolumen und nach Apherese.

Art.: Arteriell System vor dem Adsorber; Ven.: Venöses System nach dem Adsorber; Sta.: Standarddosierung des Citrats; Neu: modifizierte Citrat-Dosierung. Mittelwerte \pm Standardabweichung; N=15.

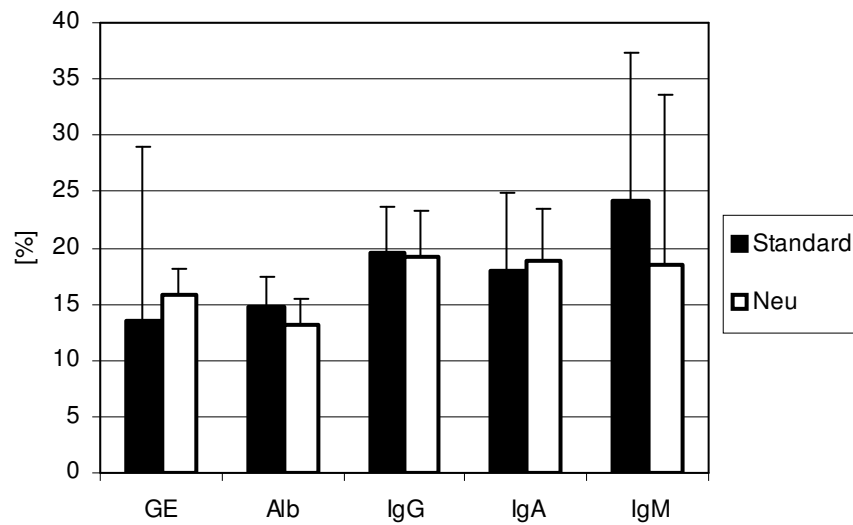
3.1.8 Sonstige Parameter

An den Beispielen von Gesamt-Eiweiß, Albumin und den Immunglobulinen IgG, IgA und IgM sind der Tabelle 3.1.12. die unspezifischen Reduktionen durch den DALI-Adsorber dargestellt. Die Veränderung des Antikoagulationsregimes hatte keinen Einfluss auf die Adsorption von Gesamt-Eiweiß, Albumin, IgG und IgA (zwischen 14% und 20%). IgM wurde offensichtlich durch Anwendung des neuen Antikoagulationsregimes geringer adsorbiert (24% versus 19%), dieser Unterschied war nicht signifikant.

Weitere Parameter sind der Tabelle 3.1.7 zu entnehmen. Nierenretentionsparameter, Leberwerte, Cholestaseparameter, Kreatinkinase und CRP wiesen keine relevanten Unterschiede zwischen den Studienarmen auf und lagen vor und nach den Apheresen im Normbereich.

Die Blutzuckerwerte lagen nach den Apheresen über den entsprechenden Vorwerten, in der Standardgruppe um 25% und in der Gruppe „Neu“ um 8%. Dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant. Transferrin wurde in beiden Studienarmen durch die Behandlung um 18% reduziert, auch die Verringerung von Ferritin war in beiden Gruppen vergleichbar.

Abb. 3.1.12: Reduktion verschiedener Proteine vor und nach DALI-Apherese in Abhängigkeit vom verwendeten Antikoagulationsregime.



Standard: Standarddosierung des Citrats; Neu: modifizierte Citrat-Dosierung. GE: Gesamteiweiß; Alb: Albumin; IgG: Immunglobulin G; IgA: Immunglobulin A; IgM: Immunglobulin M. Mittelwerte \pm Standardabweichung; N=15.

Eisen wurde, wie vorbekannt, durch Verwendung des Standardregimes verringert, nicht jedoch bei Anwendung des modifizierten Verfahrens.

Tab. 3.1.7: Sonstige Parameter vor und nach der Lipidapherese in Abhängigkeit vom Antikoagulationsregime.

	Standard		Neu	
	vor	Ende	vor	Ende
Krea [mg/dl]	1,0±0,1	0,9±0,1	1,0±0,1	0,9±0,1
Hast [mg/dl]	34±10	32±9	32±9	30±9
Bili [mg/dl]	0,4±0,2	0,4±0,2	0,4±0,2	0,4±0,2
AP [U/l]	111±19	92±18	120±27	100±22
γ-GT [U/l]	34±41	28±35	32±34	27±30
GPT [U/l]	13±4	11±4	12±4	11±4
GOT [U/l]	10±2	9±2	10±2	9±2
CK [U/l]	33±20	26±17	27±8	21±6
Hsre [mg/dl]	6,2±1,8	5,8±1,7	6,0±1,6	5,7±1,5
CRP [mg/dl]	0,7±0,3	0,6±0,2	0,8±0,4	0,7±0,3
Glucose [mg/dl]	104±19	129±13	107±16	113±8
Fe [µg/dl]	72±16	59±12	71±27	70±49
TF [g/l]	3,0±0,5	2,5±0,4	3,1±0,6	2,5±0,4
Ferr [ng/ml]	78±41	69±35	80±45	65±38

Krea: Kreatinin; Hast: Harnstoff; Bili: Gesamt-Bilirubin; AP: Alkalische Phosphatase; γ-GT: γ-Glutamyltransferase; GPT: Alanin-Aminotransferase; GOT: Aspartat-Aminotransferase; CK: Kreatinkinase; Hsre: Harnsäure; CRP: C-reaktives Protein; Fe: Eisen; TF: Transferrin; Ferr: Ferritin.

3.2 DALI-Apherese ohne Heparin

3.2.1 Technischer Verlauf

Die im Rahmen der Studie DALI ohne Heparin durchgeführten 8 Lipidapheresen konnten alle ohne technische Komplikationen durchgeführt werden. Die verwendeten Hämasorptionsgeräte DALI 4008 funktionierten fehlerlos. Die Dauer der Apherese war abhängig vom behandelten Blutvolumen. Die durchschnittliche Dauer der Apherese mit einem behandelten Blutvolumen von 5000 ml betrug 94 Minuten (80 Minuten bis 105 Minuten), der Patient SK benötigte bei einem behandelten Blutvolumen von 9990 ml durchschnittlich 183 Minuten.

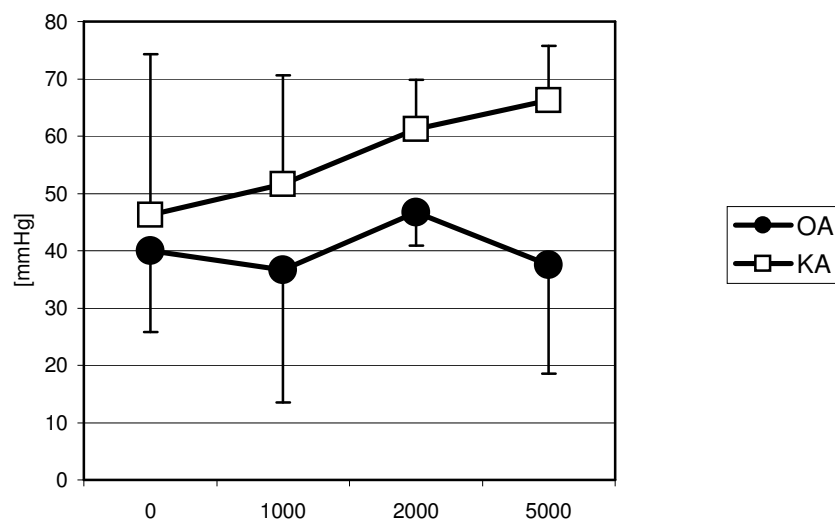
Während der Apherese wurde kontinuierlich die Druckdifferenz zwischen Adsorbereingang und Adsorbereingang gemessen, um eine drohende Koagulation des Adsorbens rechtzeitig festzustellen. Diese Druckdifferenz stieg im Verlauf der

Apherese von durchschnittlich 43 mmHg zu Beginn der Behandlung auf 52 mmHg am Ende der Behandlung an. Im gewählten historischen Vergleichskollektiv mit Heparingabe stieg die Druckdifferenz im Mittel von 48 mmHg zu Beginn der Apherese auf 50 mmHg am Ende der extrakorporalen Behandlung an.

2 von 4 Patienten der Testgruppe, die kein Heparin zur Vorbereitung des Systems bzw. zu Beginn der Apherese bekamen, erhielten eine dauerhafte medikamentös-orale Antikoagulation mit Phenprocoumon (Marcumar®). Diese beiden Patienten wiesen auch ohne Heparin einen nur geringen Druckanstieg auf, die 2 Patienten, die kein Marcumar® einnahmen zeigten am Ende der Behandlung im Mittel einen Druck von 66 mmHg (siehe Abb. 3.2.1).

Zu erwähnen ist, dass in der Subgruppe ohne Marcumartherapie der Patient SK mit einer Adsorberkonfiguration von 1000 ml behandelt wurde, diese Tatsache könnte einen Druckanstieg mitbegründen.

Abb. 3.2.1: Druckdifferenz vor, während und am Ende der Apherese in Abhängigkeit von oraler Antikoagulation.



Abszisse: Zeitpunkt der Blutentnahme vor Apherese, nach 1000 und 2000 ml behandeltem Blutvolumen und nach Apherese. OA: orale Antikoagulation; KA: keine orale Antikoagulation. Mittelwerte±Standardabweichung; N=4.

3.2.2 Klinischer Verlauf und Vitalparameter

Die im Rahmen dieser Pilotstudie durchgeführten DALI-Apheresen ohne Einsatz von Heparin wurden im Wesentlichen gut vertragen. Patient WR klagte gegen Ende einer

Behandlung über einen brennenden Schmerz in Brust und Bauch sowie Augenbrennen. Das Befinden des Patienten besserte sich rasch nach intravenöser Substitution von 10 ml Calciumglukonat 10% und Beendigung der Apherese. WR war zum Zeitpunkt der Beschwerden hypoton (Blutdruck: 90/60 mmHg).

Patient WR entwickelte in einer zweiten Behandlung ebenfalls eine hypotone Phase mit systolischem Blutdruck von 95 mmHg, diese blieb jedoch asymptotisch. Insgesamt ergab sich für alle Patienten ein durchschnittlicher Blutdruck von 127/66 mmHg vor Apherese und 117/62 mmHg nach Apherese (Δ RR: -10/4 mmHg). Die gemessenen Pulsfrequenzen aller Patienten lagen im Normbereich und wiesen im Verlauf der Behandlung keine relevanten Veränderungen auf.

3.2.3 Hämatologie und Hämolyseparameter

Wie bereits in Kapitel 3.1.3 erwähnt, sind Zellverluste, die während eines extrakorporalen Kreislaufes auftreten mögliche Indikatoren einer mangelnden Hämokompatibilität. Daher wurden in der hier beschriebenen Pilotstudie Erythrocyten, Leukocyten, Differentialblutbild und Thrombocyten vor und nach der Apherese analysiert.

Wie der Tabelle 3.2.1 im Einzelnen zu entnehmen gab es keine relevanten Unterschiede zwischen der Studiengruppe und dem historischen Vergleichskollektiv. In beiden Gruppen lagen die Ergebnisse für Hämatokrit, Hämoglobin und Erythrocyten durchwegs im Normbereich, eine geringfügige Reduktion dieser Parameter zwischen 7% und 8% sind durch eine mögliche Hämodilution im Rahmen der Lipidapherese erklärt. Leukocyten und Thrombocyten blieben ebenso in jedem Fall im Normbereich. Ein leichter Rückgang der Thrombocyten um 9% und der Leukocyten um 7%, festgestellt im Studienarm „ohne Heparin“, war zwar etwas stärker ausgeprägt als in der Vergleichsgruppe „mit Heparin“, aber in der Beurteilung irrelevant. Eine Bestimmung der Zellzahlen während der DALI-Apheresen ohne Heparin Gabe fand nicht statt, so dass keine Aussage über eventuelle Zellverluste in einer frühen Phase der Behandlung getroffen werden kann.

Tab. 3.2.1: Zellzahlen vor und nach Lipidapherese in Abhängigkeit vom Antikoagulationsregime.

		Hk [%]	Ery [T/l]	Leuko [G/l]	Throm [G/l]
Mit Heparin	Vor	39,3±2,4	4,5±0,3	5,5±0,9	193±28
	Nach	36,6±2,8	4,1±0,2	5,3±0,9	193±28
	Reduktion [%]	7±4	7±4	3±13	0±5
Ohne Heparin	Vor	40,0±4,8	4,4±0,5	5,6±1,6	204±38
	Nach	35,0±4,8	4,1±0,6	5,0±0,7	186±32
	Reduktion [%]	8±3	8±3	7±19	9±5

Hk: Hämatokrit; Ery: Erythrocyten; Leuko: Leukocyten; Throm: Thrombocyten; Reduktion: Änderung der Ergebnisse am Ende der Behandlung bezogen auf die entsprechenden Vorwerte. Mittelwert±Standardabweichung; Mit Heparin: N=16, ohne Heparin N=8.

Anhand der gewonnenen Blutplasmen konnte in allen Behandlungen eine Hämolyse ausgeschlossen werden. Auch laborchemische Hämolysezeichen, so zum Beispiel Anstieg der LDH oder relevanter Abfall von Haptoglobin unter den Normbereich, waren weder in der Studiengruppe „ohne Heparin“ noch in der Kontrollgruppe „mit Heparin“ nachweisbar. LDH lag bei allen Messungen vor und nach der Apherese im Normbereich (ohne Heparin: 195±33 U/l vor und 157±21 nach Apherese, 19% Reduktion; mit Heparin: 188±47 U/l vor und 166±42 U/l nach Apherese, 10% Reduktion). Haptoglobin wurde zwar im Rahmen der Apheresen in beiden Studiengruppen reduziert (ohne Heparin: 20%; mit Heparin: 11%), die absoluten Werte nach Apherese waren aber ausnahmslos normwertig, so dass eine Hämolyse nicht wahrscheinlich ist (ohne Heparin: 0,89±0,3 g/l vor und 0,72±0,27 g/l nach Apherese; mit Heparin: 0,89±0,53 g/l vor und 0,78±0,4 nach Apherese).

3.2.4 Elektrolyte und Blutgasanalyse

Es fielen keine Veränderungen der Natriumkonzentration oder der Kaliumkonzentration während der Lipidapherese ohne Heparin auf. Die gemessenen Natriumkonzentrationen lagen sowohl systemisch (136±2 mmol/l bis 137±2 mmol/l) als auch an der venösen Blutentnahmestelle (138±1 mmol/l bis 139±3 mmol/l) ausnahmslos im Normbereich. In der historischen Kontrollgruppe lagen die systemisch entnommenen Natriumkonzentrationen vor und nach Apherese ebenfalls im Normbereich (vor: 138±2 mmol/l; nach: 138±2 mmol/l). In der Kontrollstudie wurden weder während der Apherese noch an der venösen Entnahmestelle Natrium-

oder Kaliumproben gewonnen. Während der Behandlung ohne Heparin zeigte sich ein diskreter kontinuierlicher Kaliumabfall von initial $3,9\pm 0,3$ mmol/l auf $3,7\pm 0,2$ mmol/l systemisch gemessen. Eine Hypokaliämie trat nicht auf. Die Messungen im venösen Schenkel offenbarten die Reinfusion von leicht hypokaliämischem Blut nach 500 ml, 1000 ml und 2000 ml behandeltem Blutvolumen ($3,4\pm 0,3$ mmol/l bis $3,6\pm 0,3$ mmol/l). Die Kaliumkonzentrationen vor und nach Lipidapherese mit Heparin lagen im Normbereich ($4,1\pm 0,6$ mmol/l).

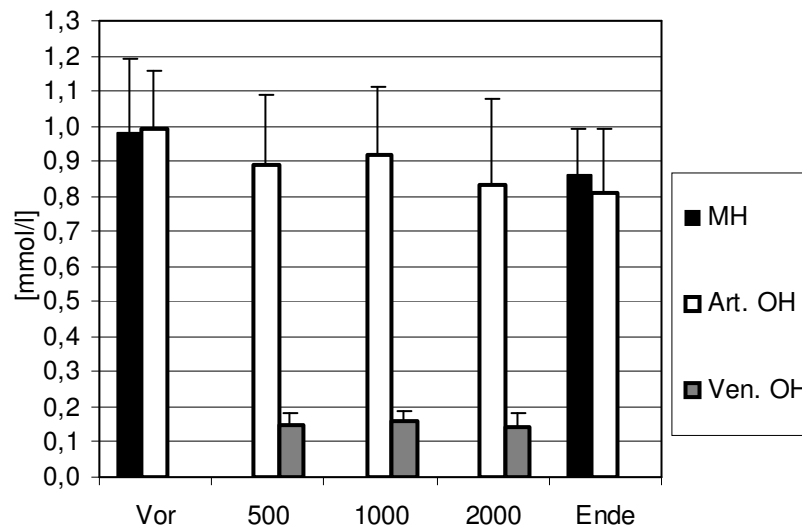
In den beiden Studienarmen wurden zur Antikoagulation unterschiedliche Konzentrationen des calciumbindenden ACD-A eingesetzt. Die Lipidapheresen ohne Heparin wurden mit einem Citratverhältnis von 1:20 antikoaguliert, dies hatte die Reinfusion eines Blutes mit niedriger Konzentration ionisierten Calciums zur Folge (zwischen $0,14\pm 0,04$ mmol/l und $0,16\pm 0,03$ mmol/l). Daraus resultierte ein kontinuierlicher Rückgang der Konzentration ionisierten Calciums im systemischen Schenkel von $0,99\pm 0,17$ mmol/l vor Apherese auf $0,81\pm 0,18$ mmol/l nach Beendigung der Behandlung (siehe Abb. 3.2.2). Auch die Kontrollapheresen verursachten trotz der Verwendung einer geringeren ACD-A Konzentration (1:40) einen durchschnittlichen Rückgang des ionisierten Calciums, der jedoch im Ausmaß geringer war ($0,98\pm 0,21$ mmol/l vor und $0,86\pm 0,13$ mmol/l nach Apherese).

In der Kontrollstudie wurden keine Calciumbestimmungen im venösen Schenkel des Apheresesystems oder während der Apherese vorgenommen (siehe Abb. 3.2.2).

In beiden Studienarmen blieben die pH-Werte im zuführenden, arteriellen DALI-System stabil im Normbereich (mit Heparin: $7,37\pm 0,05$ vor und $7,38\pm 0,07$ nach Apherese; ohne Heparin: $7,39\pm 0,03$ vor und $7,40\pm 0,02$ nach Apherese). Im venösen Schenkel ergaben sich bei reiner Citratantikoagulation erniedrigte pH-Werte, die im Verlauf keine Veränderungen zeigten ($7,17\pm 0,03$). Entsprechende Kontrollwerte im historischen Studienkollektiv lagen nicht vor.

Die Untersuchungen des BE bestätigten die beschriebenen pH-Ergebnisse.

Abb. 3.2.2: Ionisiertes Calcium vor, während und am Ende der Apherese in Abhängigkeit vom Antikoagulationsregime.



Abszisse: Zeitpunkt der Blutentnahme vor Apherese, nach 500, 1000 und 2000 ml behandeltem Blutvolumen und nach Apherese. MH: mit Heparin; OH: ohne Heparin. Art.: Arteriell System, vor dem Adsorber; Ven.: Venöses System, nach dem Adsorber. MH: N=16. OH: N=8.

3.2.5 Gerinnungsparameter

Im Folgenden werden die Effekte der Wahl verschiedener Antikoagulationsschemata während der DALI-Apherese auf unterschiedliche Gerinnungsparameter beschrieben. Hierbei wurden wie bereits im ersten Teil der hier vorliegenden Arbeit Routineparameter wie die Thromboplastinzeit (Quick) und partielle Thromboplastinzeit (PTT), aber auch die aktivierte Gerinnungszeit (ACT) untersucht. In beiden Studienarmen kam es durch Antikoagulation während der Lipidapherese erwartungsgemäß zu Veränderungen der Gerinnungsparameter. Diese Änderungen sind für die Parameter Quick der Tab. 3.2.2 und PTT sowie ACT den Abbildungen 3.2.3 und 3.2.4 zu entnehmen. Die Anwendung der Standardantikoagulation mit Heparin und Citrat führt erwartungsgemäß unabhängig von den Ausgangswerten zu einer Verlängerung der PTT (74 ± 8 s auf 143 ± 43 s bei Patienten mit Phenprocoumon, 31 ± 1 s auf 142 ± 42 s ohne Phenprocoumon; siehe Abb. 3.2.3).

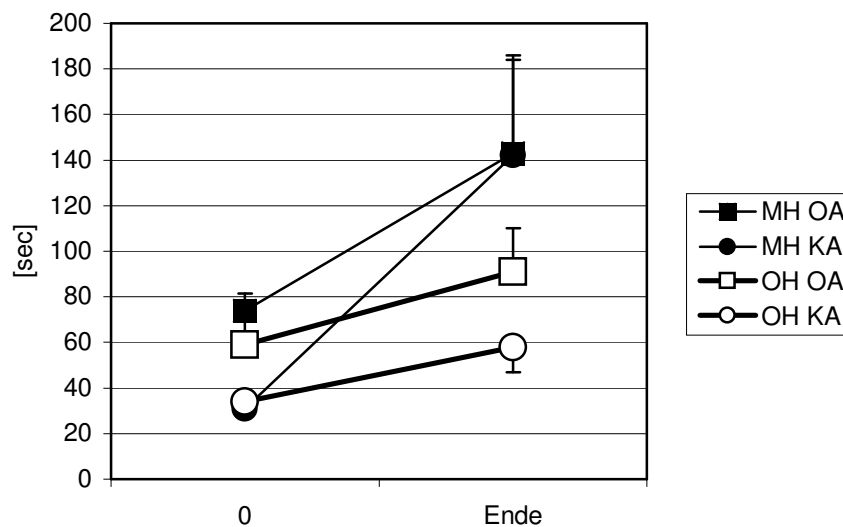
Tab. 3.2.2: Thromboplastinzeit vor und nach der Lipidapherese in Abhängigkeit vom Antikoagulationsregime und der oralen Antikoagulation.

	Zeitpunkt	Standard	OH
Quick [%] OA	Vor	24±1	22±5
	Ende	20±1	18±5
Quick [%] KA	Vor	94±5	93±10
	Ende	67±6	75±9

Standard: herkömmliche Antikoagulation mit Heparin und ACD-A; OH: ohne Heparin. OA: orale Antikoagulation; KA: keine orale Antikoagulation. Mittelwert±Standardabweichung; Standard: N=4.

Verzichtet man auf die Gabe eines Heparin-Bolus ist nach Beendigung der Lipidapherese dennoch eine mäßige PTT-Verlängerung zu messen (59±11 s auf 91±19 s bei Patienten mit Phenprocoumon, 34±1 s auf 58±14 s ohne Phenprocoumon).

Abb. 3.2.3: Partielle Thromboplastinzeit vor und nach Apherese in Abhängigkeit vom Antikoagulationsregime.

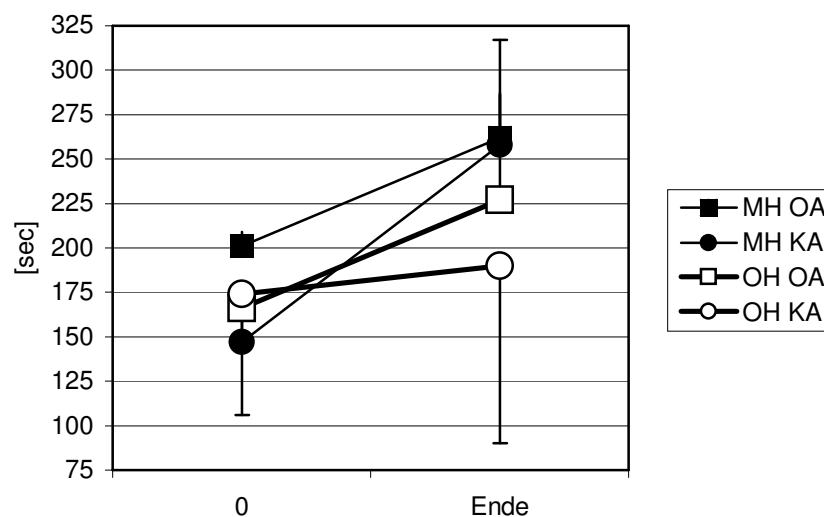


Abszisse: Zeitpunkt der Blutentnahme vor Apherese und nach Apherese. MH: mit Heparin; OH: ohne Heparin. OA: orale Antikoagulation; KA: keine orale Antikoagulation. Mittelwerte±Standardabweichung; N=4.

Die Vollblutgerinnungszeit wurde vor und nach den Apheresen als Maß der Antikoagulation gemessen. Unter Anwendung des Standardregimes verlängerte sich bei Patienten, die keine dauerhafte orale Therapie mit Phenprocoumon (Marcumar®)

erhielten die ACT-Zeit nach Applikation des Heparin-Bolus und der kontinuierlichen Citratantikoagulation (zu Beginn der Apherese 1:20) von 147 ± 21 s auf 258 ± 59 s am Ende der Apherese. Nahmen die Patienten Marcumar® ein verlängerte sich die ACT-Zeit von 201 ± 8 s auf 262 ± 24 s. Wurde die Lipidapherese mit modifizierter Antikoagulation ohne Heparin durchgeführt zeigte sich eine Verlängerung der ACT-Zeit von 166 ± 14 s auf 227 ± 60 s in der Patientengruppe mit Einnahme von Marcumar® und eine Verlängerung der ACT-Zeit von 174 ± 68 s auf 190 ± 100 s bei fehlender Einnahme von Marcumar®.

Abb. 3.2.4: ACT vor und nach Apherese in Abhängigkeit vom Antikoagulationsregime.



Abszisse: Zeitpunkt der Blutentnahme vor Apherese und nach Apherese. MH: mit Heparin; OH: ohne Heparin. OA: orale Antikoagulation; KA: keine orale Antikoagulation. Mittelwerte \pm Standardabweichung; N=4.

3.2.6 Lipoproteine und Fibrinogen

Wie schon zuvor in Kapitel 3.1.6 werden die Untersuchungsergebnisse zur Reduktion der Lipoproteine und des Fibrinogens gemeinsam in einem Kapitel beschrieben. Auch in diesem Teil der vorliegenden Arbeit waren die Einflüsse der unterschiedlichen Antikoagulationsregime auf die Effektivität der Adsorption von Lipoproteinen und Fibrinogen von besonderem Interesse.

Die Mittelwerte der Lipoproteine und des Fibrinogens vor und nach Lipidapherese sind der Tabelle 3.2.2. zu entnehmen.

Tab. 3.2.2: Lipoproteine und Fibrinogen vor und nach der Lipidapherese in Abhängigkeit vom Antikoagulationsregime.

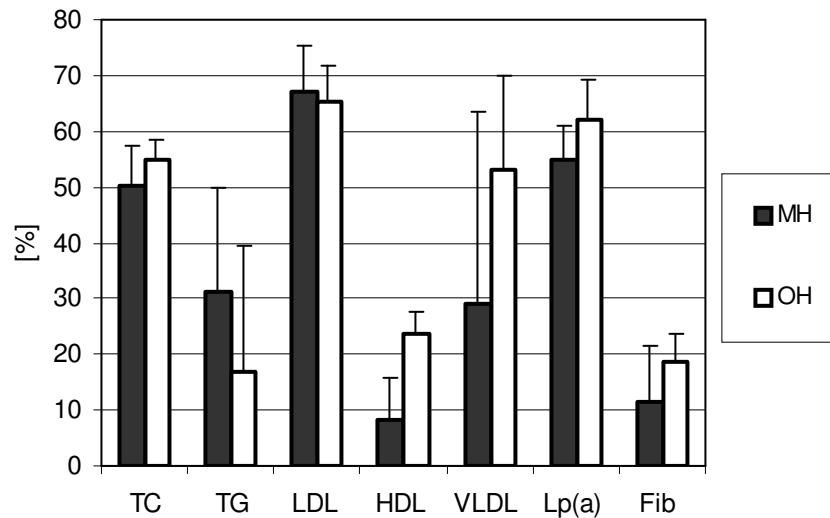
	Mit Heparin		Ohne Heparin	
	vor	Ende	vor	Ende
TC [mg/dl]	243±55	119±27	223±76	101±37
TG [mg/dl]	248±201	191±169	204±105	172±88
LDL [mg/dl]	149±63	45±16	150±63	54±30
HDL [mg/dl]	48±12	43±11	42±10	32±9
VLDL [mg/dl]	45±42	32±28	32±18	15±11
Lp(a) [mg/dl]	88±51	38±21	122±51	45±16
Fib [mg/dl]	326±92	282±102	306±93	249±42

TC: Total-Cholesterin; TG: Triglyzeride; LDL: LDL-Cholesterin; HDL: HDL-Cholesterin; VLDL: VLDL-Cholesterin; Lp(a): Lipoprotein (a); Fib: Fibrinogen. Mittelwert±Standardabweichung; Mit Heparin: N=14, für Lp(a) N=7. Ohne Heparin: N=7, für Lp(a) N=4. Es wurden nur Lp(a)- Ausgangswerte > 30 mg/dl berücksichtigt.

Die Reduktionen der Lipoproteine und des Fibrinogens lagen in beiden Gruppen erwartungsgemäß (siehe Abb. 3.2.5). Ohne Verwendung von Heparin konnte Gesamt-Cholesterin um $55\pm 4\%$ und Lp(a) um $62\pm 6\%$ gesenkt werden, geringgradig besser als in der Vergleichsgruppe ($50\pm 7\%$ und $57\pm 8\%$). LDL-Cholesterin wurde hingegen in der Standardgruppe geringstgradig besser eliminiert ($67\pm 8\%$ vs. $65\pm 6\%$). Die Ausbeute von HDL-Cholesterin nach Apherese war bei Anwendung des Standardregimes deutlich besser, hier wurden noch $92\pm 7\%$ des Ausgangswertes detektiert im Gegensatz zu $86\pm 4\%$ in der Kontrollgruppe (in der Abb. 3.2.5 sind die Reduktionen dargestellt). Eindeutig geringere Absenkungen konnten bei Anwendung des modifizierten Verfahrens ohne Heparin erwartungsgemäß für Triglyzeride erreicht werden (Standard: $31\pm 19\%$; Modifiziert: $17\pm 23\%$). Hier ist jedoch anzumerken, dass in beiden Gruppen eine große Standardabweichung vorliegt. Die Ergebnisse der VLDL-Cholesterin Reduktion waren bei niedrigen Ausgangswerten deutlich unterschiedlich zu Gunsten der Apherese ohne Heparin-Antikoagulation (ohne Heparin: $53\pm 17\%$; Standard: $29\pm 34\%$).

Die Reduktion des Fibrinogens lag in der Gruppe modifizierter Antikoagulation bei $19\pm 5\%$, diese Absenkung war deutlicher als in der Kontrollgruppe ($11\pm 10\%$).

Abb. 3.2.5: Reduktion der Lipoproteine und Fibrinogen durch DALI-Apherese in Abhängigkeit vom verwendeten Antikoagulationsregime.

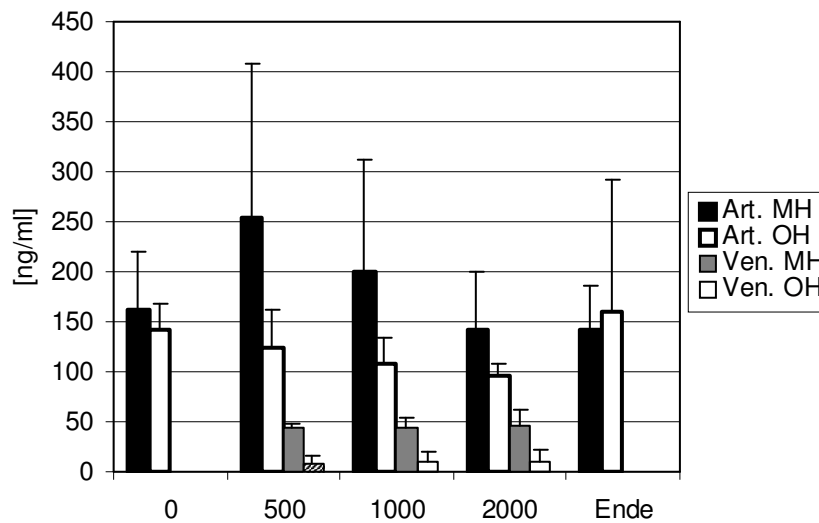


MH: mit Heparin; OH: ohne Heparin. TC: Total-Cholesterin; TG: Triglyzeride; LDL: LDL-Cholesterin; HDL: HDL-Cholesterin; VLDL: VLDL-Cholesterin; Lp(a): Lipoprotein (a); Fib: Fibrinogen. Mittelwert±Standardabweichung; MH: N=14; für Lp(a) N=7. OH: N=8; für Lp(a) N=4.

3.2.7 Biokompatibilitätsparameter

Eine wesentliche Komplementaktivierung, ermittelt anhand des Komplementfaktors C3a, fand weder bei der Durchführung des DALI-Standardverfahrens noch bei der Behandlung mit DALI ohne initialen Heparin-Bolus statt. Messungen der systemischen Konzentrationen zeigten in der Standardgruppe einen minimalen Anstieg des Komplementfaktors über den Normbereich hinaus (siehe Abb. 3.2.6), das mittlere Maximum lag bei 255 ± 154 ng/ml (Normbereich bis 200 ng/ml) nach 500 ml behandeltem Blutvolumen (ca. 8-9 Minuten nach Beginn der Behandlung). Im weiteren Verlauf der Apherese zeigten sich normwertige C3a-Werte. In der Behandlungsgruppe ohne initialen Heparin-Bolus lagen die gemessenen systemischen Werte für C3a bei einem mittleren Maximum von 160 ± 132 ng/ml am Ende der Behandlung. Dieser unerwartete Anstieg war durch die Reaktion des Patienten RW begründet, der als einziger am Ende beider Behandlungen über die Norm erhöhte Spiegel (439 ng/ml und 282 ng/ml) bot. Klinische Korrelate waren nicht zu beobachten. Die Messergebnisse im venösen Schenkel lagen erwartungsgemäß deutlich niedriger, die Maxima betragen 47 ± 15 ng/ml (Standard) bzw. 36 ± 11 ng/ml (ohne Heparin).

Abb. 3.2.6: Komplementfaktor C3a vor, während und nach DALI-Apherese in Abhängigkeit vom verwendeten Antikoagulationsregime.

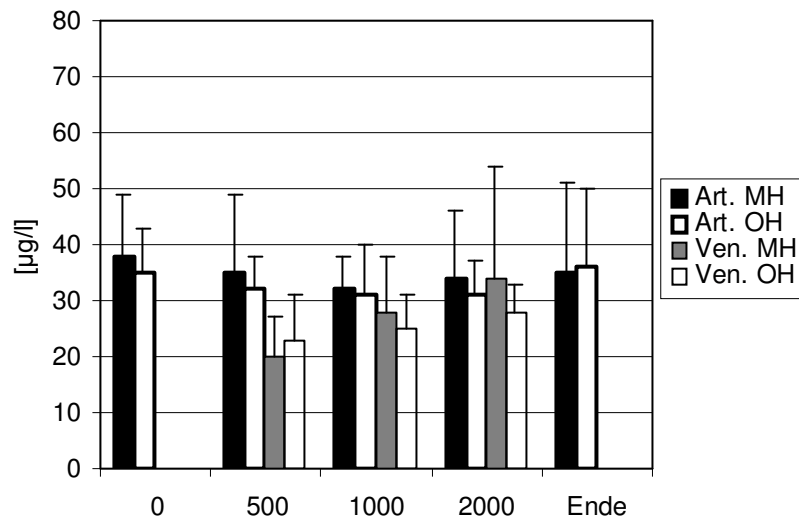


Abszisse: Zeitpunkt der Blutentnahme vor Apherese, nach 500, 1000 und 2000 ml behandeltem Blutvolumen und nach Apherese.

Art.: Arteriell System vor dem Adsorber; Ven.: Venöses System nach dem Adsorber; MH: mit Heparin; OH: ohne Heparin. Mittelwerte±Standardabweichung; MH: N=16. OH: N=8.

Eine relevante Stimulation polymorphnukleärer Leukocyten fand nicht statt. Die durchschnittlichen Konzentrationen der Elastase lagen in beiden Gruppen bereits vor Apherese marginal über der Norm (12-32 µg/l) (Standard: 38±11 µg/l, ohne Heparin: 35±8 µg/l). In der ersten Behandlungsphase zeigte sich bis zu einem Behandlungsvolumen von 2000 ml ein leichter Abfall der systemisch gemessenen Werte (siehe Abb. 3.2.7), im weiteren Verlauf stiegen die gemessenen Konzentrationen wieder auf Anfangsniveau. Die nach dem Adsorber gemessenen Werte lagen bis zu einem behandelten Blutvolumen von 1000 ml niedriger als in den simultan vor dem Adsorber entnommenen Proben. Bei Betrachtung der Abbildung 3.2.7 fällt ein kontinuierlicher Konzentrationsanstieg der Elastase im reinfundierten Blut auf, der die systemischen Werte aber nie entscheidend übertrifft. Die maximalen „venösen“ Werte lagen bei einem behandelten Volumen von 2000 ml bei 34±20 µg/l (Standard) und 28±5 µg/l in der Gruppe „ohne Heparin“. Relevante Unterschiede zwischen den beiden Studienarmen zeigten sich somit weder bei den Messungen der systemischen Elastase noch im reinfundierten Blut.

Abb. 3.2.7: Elastase vor, während und nach DALI-Apherese in Abhängigkeit vom verwendeten Antikoagulationsregime.

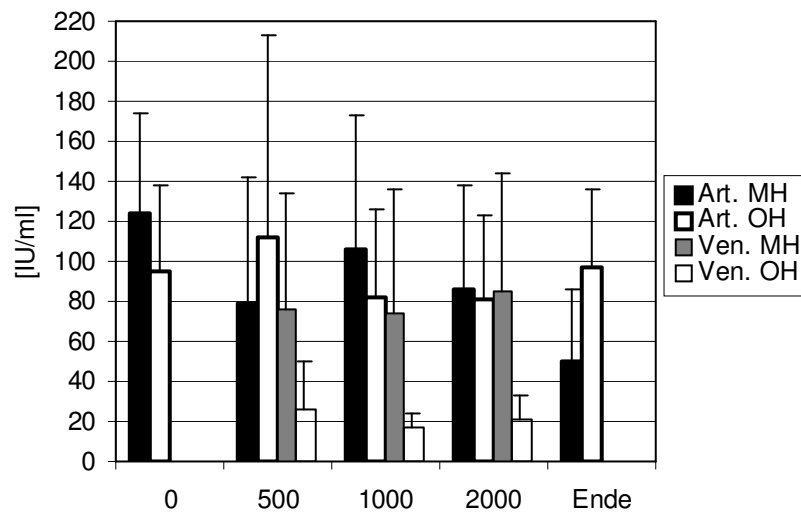


Abszisse: Zeitpunkt der Blutentnahme vor Apherese, nach 500, 1000 und 2000 ml behandeltem Blutvolumen und nach Apherese.

Art.: Arteriell System vor dem Adsorber; Ven.: Venöses System nach dem Adsorber; MH: mit Heparin; OH: ohne Heparin. Mittelwerte \pm Standardabweichung; MH: N=16. OH: N=8.

Die Vermeidung des initialen Heparin-Bolus bei Anwendung des DALI-Systems lässt ein besonderes Interesse auf die Thrombocyten richten. Der gewählte Aktivierungsmarker β -Thromboglobulin (β -TG) zeigte in der vorliegenden Untersuchung eine moderate Aktivierung der Thrombocyten an. In beiden Studienarmen (siehe Abb. 3.2.8) lagen die Resultate der vor der Behandlung entnommenen Proben über dem testspezifischen Normwert (10-40 IU/ml) (Standard: 124 ± 50 IU/ml, „ohne Heparin“: 95 ± 43 IU/ml). Am Ende der Kontrollbehandlungen lagen die Werte für β -TG deutlich unterhalb der mittelgradig erhöhten Ausgangswerte, bei Modifikation der Antikoagulation lagen die entsprechenden Konzentrationen etwa im Ausgangsbereich (Standard: 50 ± 36 IU/ml; „ohne Heparin“: 97 ± 39 IU/ml). Die im reinfundierten Blut gemessenen β -TG Werte lagen niedriger als die entsprechenden systemischen Werte. Im Verlauf der Behandlungen waren keine wesentlichen Veränderungen der „venösen“ Konzentrationen zu detektieren (Standard: 74 ± 62 IU/ml bis 85 ± 59 IU/ml, „ohne Heparin“: 17 ± 7 IU/ml bis 26 ± 24 IU/ml). Bei Betrachtung der beiden Studiengruppen ist allerdings auffällig, dass bei Weglassen des initialen Heparin-Bolus eine Aktivierung der Thrombocyten im reinfundierten Blut nicht zu messen ist, hingegen in der Vergleichsgruppe die Konzentrationen von β -TG auf das zweifache der Norm erhöht sind.

Abb. 3.2.8: β -Thromboglobulin vor, während und nach DALI-Apherese in Abhängigkeit vom verwendeten Antikoagulationsregime.



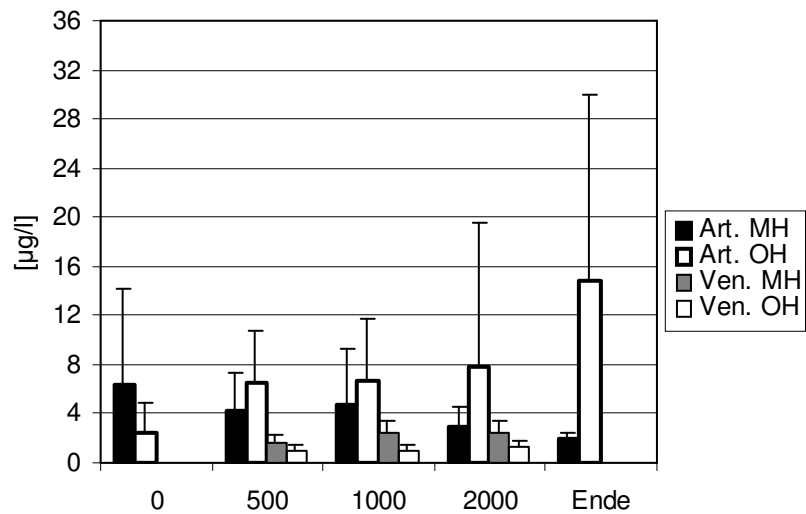
Abszisse: Zeitpunkt der Blutentnahme vor Apherese, nach 500, 1000 und 2000 ml behandeltem Blutvolumen und nach Apherese.

Art.: Arteriell System vor dem Adsorber; Ven.: Venöses System nach dem Adsorber; MH: mit Heparin; OH: ohne Heparin. Mittelwerte \pm Standardabweichung; MH: N=16. OH: N=8.

Die Untersuchungen der plasmatischen Gerinnung, bestimmt mittels Messungen des Thrombin-Antithrombinkomplex (TAT), zeigten relevante Unterschiede zwischen den beiden Untersuchungsgruppen an (siehe Abb. 3.2.9). Während der DALI-Apherese nach Standardprotokoll war keine vermehrte plasmatische Gerinnung zu beobachten. Sowohl die systemisch gemessenen Werte (Maximum nach einem behandelten Volumen von 1000 ml: $4,8 \pm 4,5 \mu\text{g/l}$) als auch die Spiegel im reinfundierten Blut (Maximum: $2,5 \pm 0,9 \mu\text{g/l}$) lagen im Normbereich ($1-4,1 \mu\text{g/l}$) oder diskret darüber. Die initiale Erhöhung des TAT Gehalts auf $6,3 \mu\text{g/l}$ vor Beginn der Apherese fiel auf und ist am ehesten durch Komplikationen des Gefäßzugangs bedingt.

Ohne Applikation von Heparin zu Beginn der Apherese waren bei normwertigen Ausgangswerten ($2,5 \pm 2,4 \mu\text{g/l}$) im Verlauf der Behandlung deutlich erhöhte TAT Spiegel systemisch zu detektieren. Diese waren bei auffälligen Standardabweichungen am Ende der Apherese am deutlichsten erhöht ($14,9 \pm 15,0 \mu\text{g/l}$). Die TAT Werte der „venösen“ Proben lagen im Normbereich.

Abb. 3.2.9: Thrombin-Antithrombinkomplex vor, während und nach DALI-Apherese in Abhängigkeit vom verwendeten Antikoagulationsregime.

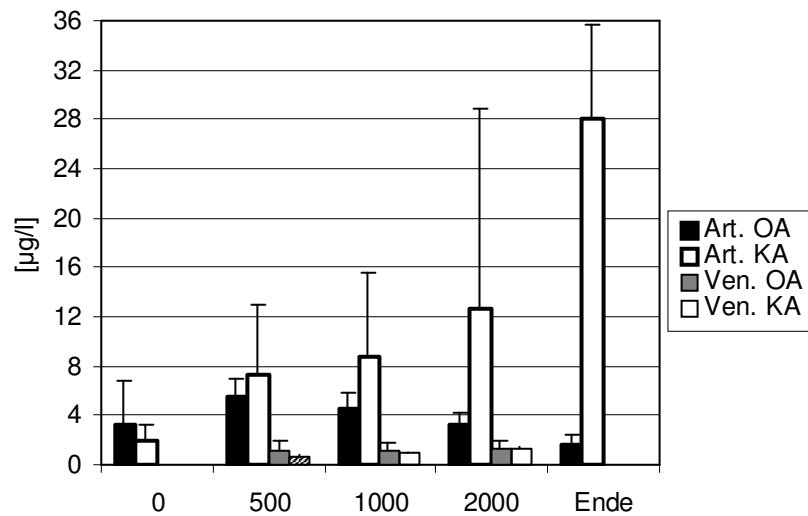


Abszisse: Zeitpunkt der Blutentnahme vor Apherese, nach 500, 1000 und 2000 ml behandeltem Blutvolumen und nach Apherese.

Art.: Arteriell System vor dem Adsorber; Ven.: Venöses System nach dem Adsorber; MH: mit Heparin; OH: ohne Heparin. Mittelwerte \pm Standardabweichung; MH: N=16. OH: N=8.

Die zuvor beschriebenen Ergebnisse und deren Standardabweichungen sind besser zu erklären, betrachtet man die Patienten in Abhängigkeit der medikamentösen oralen Antikoagulation. Zwei der vier Patienten, bei denen die Apherese ohne Gabe von Heparin durchgeführt wurden, erhielten dauerhaft eine Therapie mit Phenprocoumon. Bei beiden Patienten lagen die systemisch gemessenen TAT Werte vergleichbar zu Kontrollgruppe im Normbereich (nach Apherese im Mittel: $1,7\pm 0,8$ µg/l) oder allenfalls gering darüber (Maximum nach acht Minuten: $5,5\pm 1,4$ µg/l). Die Abbildung 3.2.10 macht deutlich, dass bei fehlender oraler Antikoagulation DALI ohne initialen Heparin-Bolus eine mittelgradige Aktivierung der plasmatischen Gerinnung zur Folge hat. Bereits acht Minuten nach Beginn der Apherese offenbaren sich erhöhte TAT Werte, die kontinuierlich bis zu einem Maximum von $28,1\pm 7,6$ µg/l am Ende der Behandlung ansteigen.

Abb. 3.2.10: Thrombin-Antithrombinkomplex vor, während und nach DALI-Apherese in Abhängigkeit von der oralen Antikoagulation.

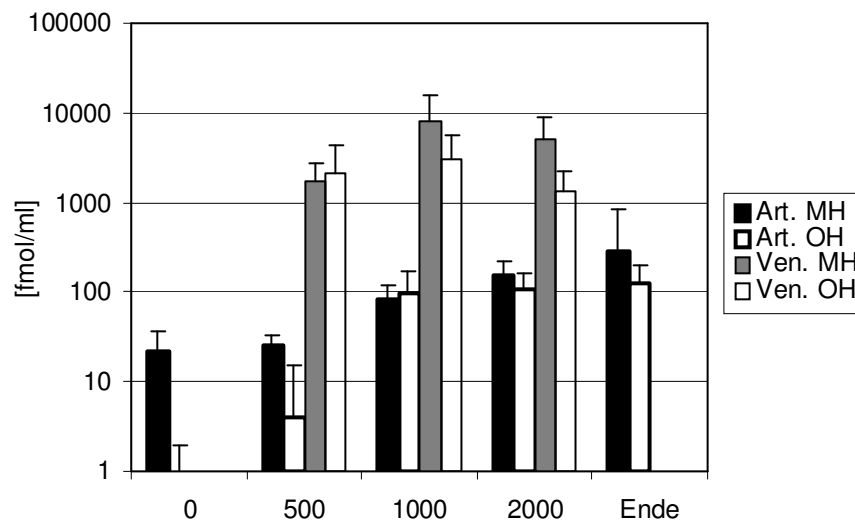


Abszisse: Zeitpunkt der Blutentnahme vor Apherese, nach 500, 1000 und 2000 ml behandeltem Blutvolumen und nach Apherese.

Art.: arterielles System vor dem Adsorber; Ven.: venöses System nach dem Adsorber; OA: orale Antikoagulation; KA: keine orale Antikoagulation. Mittelwerte±Standardabweichung; N=4.

Die Lipidapherese DALI verursachte in beiden Untersuchungsarmen eine mäßige Aktivierung des Kallikrein-Kinin Systems, evaluiert anhand der Bradykininmessungen (siehe Abb. 3.2.11).

Abb. 3.2.11: Logarithmische Darstellung von Bradykinin vor, während und nach DALI-Apherese in Abhängigkeit vom verwendeten Antikoagulationsregime.



Abszisse: Zeitpunkt der Blutentnahme vor Apherese, nach 500, 1000 und 2000 ml behandeltem Blutvolumen und nach Apherese.

Art.: Arteriell System vor dem Adsorber; Ven.: Venöses System nach dem Adsorber; MH: mit Heparin; OH: ohne Heparin. Mittelwerte±Standardabweichung; MH: N=16. OH: N=8.

Die durchschnittlichen systemischen Werte waren in beiden Studiengruppen zunächst vergleichbar, am Ende mit einem irrelevanten Vorteil für die Apherese ohne Heparin (Standard: 282 ± 573 fmol/ml, „ohne Heparin“: 126 ± 73 fmol/ml). Die Spiegel im reinfundierten Blut lagen erwartungsgemäß bereits acht Minuten nach Beginn der Apheresen deutlich über den Ausgangswerten, nach einem Behandlungsvolumen von 1000 ml wurde in beiden Studiengruppen ein Maximum von 8125 ± 7830 fmol/ml (Standard) und 3038 ± 2663 fmol/ml („ohne Heparin“) erreicht. Die Unterschiede zwischen den beiden Untersuchungsgruppen sind somit marginal. Insgesamt fielen bei Betrachtung der Einzelergebnisse große intra- und interindividuelle Unterschiede auf, was sich in den hohen Standardabweichungen widerspiegelte.

4. Diskussion

4.1 Sicherheit der modifizierten Verfahren

Direkte Adsorption von Lipoproteinen (DALI) stellt das erste vollblutkompatible Lipidapherese-System dar und erleichterte bei Einführung die Lipidapherese aufgrund der nicht mehr erforderlichen Plasmaseparation. Es werden hohe Anforderungen bezüglich Sicherheit und Biokompatibilität (siehe Kap. 2.5.), Effektivität und Selektivität an das Hämoperfusionssystem gestellt. Die Sicherheit des Systems wurde in vorangehenden Studien bestätigt: Technische und klinische Komplikationen, Hämolyse, Leukocyten- und Thrombocytenreaktionen, Gerinnungs- oder Blutungskomplikationen konnten ausgeschlossen werden (*Bosch et al. 2000; Bosch et al. 1997*). Bei Anwendung eines Hämoperfusionsverfahrens stellt die Antikoagulation eine besondere Herausforderung dar, zu diesem Zweck etablierte sich eine kombinierte Gabe eines initialen Heparinbolus (20-40 IE/kg KG) und eine kontinuierliche Citratsubstitution (ACD-A im Verhältnis von 1:20), die sich bereits in ex-vivo und in-vitro Experimenten als die sicherste Form präsentierte (*Bosch et al. 1996*). Bei unzureichender Antikoagulation könnten neben technischen Problemen auch eine mangelhafte Sicherheit und Biokompatibilität des Systems mit Zeichen der Hämolyse oder Leukocytenaktivierung resultieren. In beiden Teilen der vorliegenden Arbeit wurde gezielt die Antikoagulation modifiziert, daher galt den Folgen einer möglichen ungenügenden Antikoagulation ein besonderes Interesse. In der vorliegenden Studie erfolgte zum Einen die Reduktion der Citratdosierung auf ein Verhältnis von 1:40 bei kompensatorischer Erhöhung des initialen Heparinbolus (60 IE/kg KG), zum Anderen wurde eine ausschließliche Citrat-Antikoagulation im Verhältnis von 1:20 unter Verzicht auf Gabe eines Heparinbolus getestet.

Technische Komplikationen traten bei beiden getesteten Modifikationen der Gerinnungshemmung nicht auf. In beiden Kontrollgruppen und Studiengruppen zeigten die Adsorber keine wesentlichen Zeichen einer Thrombosierung, wie z.B. Blutreste nach Verwendung der Adsorber oder deutliche Druckanstiege gemessen vor den Adsorbern. Schaut man jedoch auf die Gruppe, die eine ausschließliche Citrat-Antikoagulation zur Apherese erhalten hatte, fällt ein sehr diskreter Druckanstieg zwischen Ein- und Auslass des Adsorbers auf. In dieser Gruppe befanden sich zwei Patienten, die unter Phenprocoumon-Dauertherapie (Marcumarisierung) standen, diese Patienten wiesen keinen Druckanstieg auf, die

zwei weiteren Patienten mit ausschließlicher Citrat-Antikoagulation ohne Phenprocoumon-Medikation boten einen deutlichen Druckanstieg, der jedoch keine technischen Komplikationen verursachte. In der Subgruppe mit Marcumar-Dauertherapie war bei therapeutischen Ausgangswerten der Thromboplastinzeit (Quick: 24%) kein Einfluss des Antikoagulationsregime im Verlauf der Behandlung zu beobachten, die Quick-Werte blieben erwartungsgemäß ohne und mit Heparinboli stabil. In der Subgruppe ohne dauerhafte orale Antikoagulation zeigte sich nach Apherese ohne Heparinbolus ein diskreter Abfall der Thromboplastinzeit von 93% auf 75%, dieser Effekt lässt sich durch die Citrat-bedingte Calciumbindung erklären und war nach Gabe eines initialen Heparinbolus etwas deutlicher. Die Ausgangswerte für die partielle Thromboplastinzeit (PTT) waren bei marcumarisierten Patienten bereits vor Apherese gering verlängert, ohne zusätzliches Heparin war nach Apherese in beiden Subgruppen ein mäßiger gleichförmiger Anstieg der PTT zu beobachten. Nach Gabe des initialen Heparinbolus war in beiden Gruppen eine adäquate PTT-Verlängerung auf gleichem Niveau zu messen. Die Bindung der notwendigen Calciumionen ist eine mögliche Erklärung der mäßigen, Apherese assoziierten PTT-Verlängerung auch ohne zusätzliche Gabe von Heparin. Es ist an dieser Stelle noch einmal auf den Charakter einer Pilotstudie mit sehr kleiner Fallzahl in den Subgruppen aufmerksam zu machen. Reduzierung der Citratzumischung bei kompensatorischer Erhöhung des initialen Heparinbolus zeigte erwartungsgemäß eine ausgeprägtere PTT-Verlängerung (nach Apherese: 173 s vs. 153 s), dafür aber eine geringfügigere Abnahme des Quick-Wertes (nach Apherese: 79% vs. 68%). In nahezu 600 auswertbaren DALI-Apheresen (*Bosch et al. 2002*) wurden entsprechende Veränderungen des Quick- und PTT-Wertes bei Anwendung des Standardverfahrens ermittelt (nach Apherese: Quick: 72% PTT: 126 s). Insgesamt traten in keinem der vier Behandlungsarme hämorrhagische oder thrombotische Komplikationen auf, im Wesentlichen war die Koagulation klinisch gut kontrolliert. Gemessen an der Vollblutgerinnungszeit nach Lee-White und ACT scheint die Stärke der Antikoagulation in beiden Kontrollgruppen mit einem Heparinbolus von 20 IE/ kg KG ähnlich gut zu sein (ACT am Ende der Behandlung: zwischen 236 s und 258 s). Erhöht man die Heparindosierung bei gleichzeitiger Reduktion von Citrat (Heparin 60IE/ kg KG; ACT: 268 s) ist die Antikoagulation am stärksten, jedoch vergleichbar mit der Standardantikoagulation bei marcumarisierten Patienten. Der Verzicht auf

den initialen Heparinbolus vor Apherese bei nicht marcumarisierten Patienten wies die mildeste Antikoagulation auf (ACT nach Apherese: 190 s).

Eine im Vergleich zur Kontrollgruppe und zu weiteren Studien adäquate Suppression der plasmatischen Gerinnung konnte trotz Reduktion des Citratgehaltes auch anhand der gemessenen Thrombin-Antithrombinspiegel demonstriert werden. Die systemischen Werte für TAT lagen vor und nach Apherese im Normbereich. Klinisch eher nicht entscheidend sind die doch bis auf das zweifache der Norm erhöhten systemischen TAT-Spiegel während der Apherese. Bei Anwendung von DALI ohne Heparinbolus hingegen machte sich im Verlauf der Behandlung ein moderater Anstieg des systemisch gemessenen TAT bemerkbar. Dieser ist begründet durch eine kontinuierliche Steigerung des TAT-Gehaltes bis auf das sechsfache der Norm auftretend bei den Patienten, die keine orale Dauerantikoagulation erhielten. Die unmittelbar nach dem Adsorber gemessenen Werte lagen auch in dieser Subgruppe im Normbereich, so dass eine systemische Reaktion eine mögliche Erklärung wäre.

Eine Aktivierung der Thrombocyten bei Anwendung von DALI mit erniedrigter Citratbeimischung und kompensatorischer Erhöhung der Heparindosis sowie bei Verzicht auf den initialen Heparinbolus fand nicht statt. Der Aktivierungsmarker β -Thromboglobulin (β -TG) war in beiden Versuchsarmen und Kontrollarmen bereits vor Apherese erhöht, möglicherweise verursacht durch Venenpunktion. Im Verlauf der Behandlung zeigten sich systemisch keine entscheidenden Unterschiede zwischen den Studienarmen und Kontrollarmen. Am Ende der Behandlung lagen die bestimmten Werte für β -TG auf Ausgangsniveau oder sogar unterhalb der jeweiligen Ausgangswerte mit leichten Vorteilen zugunsten der Anwendung einer etablierten Antikoagulation. Eine Aktivierung der Thrombocyten durch DALI konnte somit sowohl bei Standardantikoagulation, bei Verzicht auf Heparin als auch bei veränderter Citrat/Heparin-Antikoagulation ausgeschlossen werden. Da Heparin über ein Thrombocyten aktivierendes Potential verfügt ist bemerkenswert, dass die applizierte Dosis von Heparin systemisch offensichtlich keinen Einfluss auf eine Sekretion von β -TG hatte.

Betrachtet man die β -TG Werte, die unmittelbar nach dem Adsorber („venös“) abgenommen wurden, liegen diese nahezu immer unterhalb der systemischen Werte. Dieses Phänomen ist durch eine mögliche Adsorption von β -TG an den Adsorber zu erklären. Lediglich gegen Ende der citratreduzierten Apherese fiel auf, dass der venöse Spiegel anstieg. Die niedrigsten „venösen“ Werte für β -TG wurden

bei Verzicht auf Heparin ermittelt. Es bleibt spekulativ, ob bei längerer Behandlung mit citratreduzierter Antikoagulation doch leichte Nachteile gegenüber des Standardverfahrens messbar wären. Weitere Tests mit längerer Behandlungszeit oder aber zusätzlicher Testparameter der Thrombocytenaktivierung könnten zusätzliche Hinweise geben. Auch die Validierung der marginalen Aktivierung unmittelbar nach Adsorber im Versuchsarm ohne Heparin bedarf weiterer Untersuchungen. Bei Biokompatibilitätsuntersuchungen von Hämodialysemembranen haben sich FACS-Analysen zelloberflächenständiger Aktivierungsmarker etabliert, mögliche Marker wären z.B. CD 62 (P-Selektin), CD 63 (gp 53) und LIBS (ligand induced binding site des bereits Fibrinogen gebundenen Glycoproteins IIb/IIIa) (*Gutensohn et al. 1996; Michelson et al. 1996; Gawaz et al. 1999; Ginsberg et al. 1990*). Auch die Untersuchungen von Aggregaten zwischen Thrombocyten und neutrophilen Granulocyten oder Monocyten könnten zusätzliche Informationen über eine Thrombocytenaktivierung geben (*Sirrolli et al. 2000*). In Zusammenschau der diskutierten Gerinnungswerte und entsprechender Aktivierungsparameter wäre bei Einsatz einer citratgeminderten Antikoagulation aufgrund der ACT- und PTT-Werte eine Verringerung des kompensatorischen Heparinbolus auf beispielsweise 40 IE / kg KG gerechtfertigt. Der Verzicht auf die Gabe eines Heparinbolus scheint bei Patienten mit oraler Antikoagulation kein Problem zu sein, ohne orale Antikoagulation gibt es zumindest laborchemisch Hinweise auf eine Stimulierung der plasmatischen Gerinnung. Bosch et al. konnten zeigen, dass eine Antikoagulation mit Heparin ohne Citrat eine Aktivierung von Thrombocyten (PF4,) der plasmatischen Gerinnung (TAT), des Komplementsystems (C3a) und eine Aktivierung von Leukocyten (Elastase) zur Folge hat. Bei Antikoagulation mit Heparin in Kombination mit Citrat traten diese Reaktionen nicht auf (*Bosch et al. 1993*).

Eine Reihe klinischer Nebenwirkungen des DALI-Systems sind durch die Gabe von Citrat und dessen Bindung zweiwertiger Kationen wie z.B. Calciumionen begründet (*Olson et al. 1977*). Das DALI-System wird in zahlreichen Studien als klinisch sicher beschrieben, Nebenwirkungen treten eher selten auf, am häufigsten sind beschrieben: Hypotension mit einer Inzidenz von 26% gefolgt von Parästhesien (23%), Schwindel (12%), Flush und Hitzegefühl (5-6%), Muskelkrämpfe (4%), Kreislaufkollaps (4%), Bradykardie (3%) und andere (*Bosch, Lennertz, et al. 2002*). Ein Teil dieser Nebenwirkungen sind durch eine behandlungsinduzierte

Verminderung des ionisierten Calciums bedingt. Durch Minderung der applizierten Citratdosis könnten demnach Nebenwirkungen minimiert werden. Erfreulicherweise wurde durch Verringerung des ACD-A/Blut Verhältnis auf 1:40 der systemische Spiegel des ionisierten Calciums über einer kritischen Grenze von 1,0 mmol/l gehalten (Reduktion um 5%). Bei Anwendung des Standardprotokolls wurde bei vorbestehendem Mangel an ionisierten Calciumkationen ein deutlicher Abfall um 18% beobachtet, der glücklicherweise keine relevanten Symptome einer Hypocalcämie zur Folge hatte. Der Gehalt an ionisiertem Calcium im reinfundierten Blut lag bei Citratreduktion deutlich über den Standardwerten (0,39 mmol/l vs. 0,13 mmol/l). Die heparinfreie Antikoagulation mit ACD-A im Verhältnis 1:20 hatte einen dem Standardprotokoll vergleichbaren Abfall des ohnehin von Beginn an reduzierten systemischen ionisierten Calciumspiegels zur Folge, am Ende der Apherese betrug der gemessene Wert für ionisiertes Calcium im Durchschnitt 0,81 mmol/l. Der Gehalt an ionisiertem Calcium im reinfundierten Blut lag hier zwischen 0,14 mmol/l und 0,16 mmol/l. Heparin selbst hatte offenbar keinen Einfluss auf das ionisierte Calcium. Im historischen Kontrollkollektiv wurde die Citratzumischung im Verlauf der Behandlung auf 1:40 reduziert, erwartungsgemäß fällt der Abfall des ionisierten Calciums geringer aus. Dennoch besteht auch hier bei vorbestehend niedrigen ionisierten Calciumwerten am Ende der Behandlung ein zu beachtender Mangel an ionisiertem Calcium. Bei Anwendung der heparinfreien DALI-Apherese verspürte ein Patient einmalig thorakales Missempfinden und Brennen der Augen, die Beschwerden traten bei einem gemessenen ionisierten Calcium unterhalb 1,0 mmol/l auf. Nach Applikation von 10 ml Calciumglukonat 10% sistierten die Beschwerden. Letztlich bleibt unklar, ob diese Symptome im Zusammenhang mit der modifizierten Antikoagulation standen. Zeitgleich bestand bei dem Patienten eine Hypotonie, die auch mehrfach bereits bei Standardtherapie auftrat.

Die gemessenen systemischen Werte für die monovalenten Kationen Natrium und Kalium zeigten keine entscheidenden Differenzen zwischen den einzelnen Studienarmen der vorliegenden Arbeit.

In der initialen Behandlungsphase des Standardregimes ist das reinfundierte Blut nach Passage des Adsorbers deutlich azidotisch (pH: 6,88-7,21). Dieser Befund entspricht den Ergebnissen der Vorstudien (*Bosch et al. 2000*) und ist durch den sauren Charakter des ACD-A begründet (pH-Wert: 4,8). Bei dosisreduzierter ACD-A Antikoagulation zeigte sich entsprechend eine mildere Azidose des reinfundierten

Blutes (pH: 7,18-7,32). Aus dieser Beobachtung resultierten keine systemischen Unterschiede, die gemessenen pH-Werte lagen unabhängig von der gewählten Citratdosis stets im Normbereich. Offensichtlich reicht die Pufferkapazität der Patienten aus, die Rückgabe des sauren Blutes auszugleichen. Der Verzicht auf Heparin in Kombination mit ACD-A in Standardkonzentration hatte ebenfalls keine Auswirkung auf den systemisch gemessenen pH, das reinfundierte Blut wies den gleichen Säuregehalt wie oben besagte Standard-Antikoagulation auf. Die Reduktion der Citratdosis könnte sich aufgrund der physiologischeren pH-Werte des reinfundierten Blutes günstig auf eine mögliche frühe Inkompatibilitätsreaktion auswirken.

4.2 Biokompatibilität der modifizierten Verfahren

Die Anwendung des Hämoperfusionsverfahrens DALI hat spezielle Kriterien der Biokompatibilität zu erfüllen, hierzu gehören auch möglichst geringe Interaktionen mit Erythrocyten, Leukocyten und Thrombocyten sowie die Abwesenheit von Hämolyse und das Ausbleiben einer Komplement- oder Kinin-Kallikrein-Reaktion.

Bei bisheriger Durchführung der DALI-Apherese mit dem etablierten Antikoagulationsregime konnte eine Hämolyse ausgeschlossen werden (*Bosch et al. 1997; Bosch et al. 2000*). Bei Betrachtung der Hämolyseparameter LDH und Haptoglobin sowie der Anzahl an Erythrocyten konnte die Induktion einer Hämolyse sowohl bei Reduktion der Citratdosis als auch bei Weglassen der zusätzlichen Heparin-Antikoagulation ausgeschlossen werden. Ein Anstieg der LDH wurde in keiner der Behandlungen beobachtet, Haptoglobin fiel in allen Behandlungsarmen diskret ab, war aber in allen Behandlungen auch am Ende normwertig. Die Reduktionen für Haptoglobin zeigten keinen relevanten Unterschied zwischen den Studienarmen, sie betragen im Mittel zwischen 11% und 20% und sind am ehesten durch unspezifische Bindung an den Adsorber begründet.

Abgesehen von einem Hämodilutionseffekt (ca. 8%) blieben die systemisch gemessenen Erythrocyten unabhängig des gewählten Antikoagulationsregimes während der gesamten Behandlung stabil normwertig. Der Hämodilutionseffekt im reinfundierten Blut war während der ersten 300 ml behandelten Blutvolumens durch Vermischung mit noch im Adsorber befindlicher priming Lösung deutlich, aber nicht abhängig von der Art der Antikoagulation.

Passend zu den unter 4.1. diskutierten Ergebnissen der Gerinnungsparameter waren bei keinem der getesteten Veränderungen der Antikoagulation relevante Verluste der Thrombocyten zu beobachten. Der Rückgang betrug in allen Studienarmen 5%-8% und ist durch Hämodilution zu erklären.

Auch die Leukocyten blieben bis auf einen hämodilutionsbedingten Abfall um 3%-9% am Ende der Behandlung stabil normwertig. Im Vergleich der unterschiedlichen Citratdosierungen fiel im Standardarm auf, dass dieser Verdünnungseffekt nicht nachzuweisen war, dies steht jedoch im Gegensatz zu anderen Studienergebnissen (*Bosch et al. 1999; Bosch et al. 2000*) und Langzeitbeobachtungen (*Bosch et al. 2002*). Insgesamt waren jedoch klinisch relevante Unterschiede zwischen den einzelnen Antikoagulationsregimen nicht nachweisbar. Ein früher Leukocyten-Nadir, als Zeichen einer durch Komplementaktivierung mitbegründeten Bioinkompatibilitätsreaktion, trat in keinem der untersuchten Studienarme auf. Jedoch konnten bedauerlicherweise keine Leukocyten während der frühen Behandlungsphase mit DALI ohne Heparinzugabe bestimmt werden. Der Hämodilutionseffekt für Leukocyten in den ersten 300 ml reinfundierten Blutes ist vergleichbar mit oben beschriebener Beobachtung für Erythrocyten.

Der Kontakt der Leukocyten mit körperfremden Oberflächen kann über diverse Mechanismen zur Aktivierung der leukocytären Zellreihen führen. Diese Aktivierung führt zur Degranulation und Freisetzung intrazellulär gespeicherter Proteine und Expression einer Vielzahl von Zelloberflächenmarker wie z.B. verschiedener Adhäsionsmoleküle. Eine Aktivierung der Leukocyten, gemessen anhand der freigesetzten Elastase, fand geringfügig aber signifikant statt. Bei Vergleich der unterschiedlichen Citratdosierungen zeigten sich vor Beginn der Behandlung diskret über die Norm erhöhte Elastasewerte, die im Verlauf der Behandlung bis zu einem Behandlungsvolumen von 3000 ml unterhalb oder auf Ausgangsniveau lagen. Ein Unterschied zwischen den beiden Studienarmen fiel erst am Ende der Apherese auf, möglicherweise begründet durch das Erreichen der Adsorbersättigung bei vorangegangener Adsorption der Elastase. Im reinfundierten Blut wurde bei einem Behandlungsvolumen von 3000 ml unter Verwendung des citratreduzierten Schemas ein Anstieg des Elastasewertes deutlich. Daraus resultierte schließlich auch ein tolerabler Anstieg der systemisch gemessenen Elastase am Ende der citratreduzierten Behandlung.

Die Komplementaktivierung durch körperfremde Oberflächen wurde verantwortlich gemacht für die Leukocytenaktivierung und Leukopenie. Möglicherweise spielen hierbei aber auch β -TG, PF-4 und IL-8 eine Rolle (*Ota et al. 2000*).

Die Aktivierung der Leukocyten und die resultierende Degranulation der neutrophilen Granulocyten und Monocyten ist zusätzlich abhängig von Rezeptoren der β 2-Integrin-Familie und scheint auch unabhängig vom Komplement-System möglich zu sein (*Hörl et al. 1985; Cheung et al. 1993*). Die in zahlreichen Studien zur Biokompatibilität von Dialysemembranen beschriebene Aktivierung von Leukocyten und der passagere Abfall der Leukocyten wird in der Regel in Abhängigkeit des gewählten Materials innerhalb der ersten zehn bis dreißig Minuten beobachtet. Dieser durch Zellaktivierung begründete Nadir ist komplex und noch nicht in allen Details geklärt. Neben der genannten Komplementaktivierung und der Beteiligung von Leukocyten-Adhäsionsmolekülen (z.B. MAC-1) spielt die Leukocytenbindung an Endothel sowie Sequestrierung der Leukocyten z.B. in den Lungenkapillaren eine Rolle. Das Komplement-bindende MAC-1 (CD11b/CD18; β 2-Integrin/CR3) wird bei Kontakt von Monocyten und Granulocyten mit diversen Hämodialyse-Membranen vermehrt auf diesen Zellen exprimiert, dies ist ein möglicher Mechanismus der Sequestrierung. Hier scheint neben dem alternativen auch der klassische Komplementaktivierungsweg eine Funktion innezuhaben indem er für die vermehrte Expression von MAC-1 sorgt.

Die Migration der Leukocyten aus Blutgefäßen in Gewebe beginnt durch Kontakt zwischen L-Selektin auf der Leukocytenmembran und Selektin-Liganden auf Endothelzellen. Leukocyten werden dadurch aktiviert, MAC-1 wird vermehrt exprimiert, L-Selektin wird degradiert und die Leukocyten adherieren am Endothel durch den Kontakt zwischen den Adhäsionsmolekülen MAC-1 und ICAM-1. Schließlich können die Leukocyten transmigrieren. Die Regulation der Exprimierung von MAC-1 geschieht analog zur Veränderung der Zellzahlen sehr schnell (*Rabb et al. 2002; Tielemans et al. 1993; Alvarez et al. 1991; Thylén et al. 1996*). Der genannte späte und klinisch zunächst irrelevante Anstieg des Elastasespiegels steht hierzu im Widerspruch und Bedarf der weiteren Abklärung. Möglicherweise wären Untersuchungen der oben genannten Faktoren dienlich. Bislang gibt es diese Biokompatibilitätsdaten nur bei Untersuchungen von Dialysemembranen und Plasmafiltern, nicht jedoch zu den unterschiedlichen Systemen der Lipidapherese.

Die Detektion gebildeter Leukocyten-Thrombocyten-Aggregate kann ein zusätzlicher nützlicher Marker der gesamten Zellaktivierung sein (*Hernandez et al. 1998*). So weiß man, dass nur neutrophile Granulocyten, die mit Thrombocyten aggregierten, Wasserstoffperoxid während der Hämodialyse in Abhängigkeit der gewählten Membran produzieren (*Stuard et al. 1998; Bonomini et al. 1997*). Diese Aggregatbildung scheint jedoch eher durch Thrombocyten initiiert zu sein (*Gawaz et al. 1994*).

Messung von Zelloberflächen-Degranulationsmarkern wie CD 63 und CD 66b als Indikatoren des Ausmaßes der PMN-Degranulation scheinen hingegen wenig nützlich zu sein (*Grootemann et al. 2000*).

Die vergleichende Untersuchung von DALI mit und ohne Heparin-Antikoagulation zeigte, wie zuvor beschrieben, diskret erhöhte Ausgangswerte für Elastase, die in beiden zu vergleichenden Gruppen während der gesamten Behandlung systemisch wie auch im reinfundierten Blut unterhalb oder im Ausgangsniveau verblieben. Heparin nahm offensichtlich keinen Einfluss auf den Aktivierungsmarker Elastase.

Untersuchungen des Tumornekrosefaktor α , ein Indikator der Aktivierung von Monocyten, bestätigten die soeben diskutierten Ergebnisse für Elastase. Eine Aktivierung der Monocyten fand weder bei einer Citrat-Antikoagulation im Verhältnis 1:20 noch im Verhältnis 1:40 statt.

Wie zuvor beschrieben können verschiedene Dialysemembranen trotz niedriger Komplementaktivierung Leukocyten, gemessen anhand von CD11b, CD15s und Leukocyten-Thrombocyten-Aggregate, vorübergehend aktivieren (*Carreno et al. 1996*). Dennoch spielt die Komplementkaskade eine ausgesprochen wichtige Rolle bei der Biokompatibilität körperfremder Oberflächen, so auch bei dem untersuchten DALI-System. Neben der erwähnten Fähigkeit Leukocyten zu aktivieren, können aktivierte Komplementfaktoren direkt klinische Komplikationen wie Hypotension, Schock und Dyspnoe verursachen (*Cheung et al. 1994*).

Eine ausgewogene Antikoagulation und entsprechende Materialeigenschaften des etablierten DALI-Systems verursachen keine Komplementaktivierung im relevanten Ausmaß. Im Gegensatz zu anderen Lipidaphereseverfahren fällt der Plasmaseparator als Bestandteil des extrakorporalen Kreislaufes weg und somit auch einer der Hauptverursacher der Komplementaktivierung (*Bosch et al. 1997*). Calcium dient als Cofaktor der Komplementkaskade und der Bildung von C3a und C5a (*Kazatchkine et al. 1981; Wegmüller et al. 1983*). Daher ist der kombinierte

Einsatz des Calcium-bindenden Citrats und Heparin zur Antikoagulation sinnvoll (*Nosé et al. 1986*). Durch Reduktion der Citratdosis ist neben dem erhofften Nutzen geringerer Hypocalciämie assoziierter Nebenwirkungen eine stärkere Komplementaktivierung durch reduzierte Calciumbindung zu befürchten.

Die Reduktion der Citratkonzentration auf 1:40 von Beginn der Behandlung an führte zu einer höheren Konzentration des systemischen als auch des reinfundierten ionisierten Calciums im Vergleich zur Standardapherese. Erfreulicherweise konnte dennoch eine relevante Erhöhung der C3a- und C5a-Spiegel ausgeschlossen werden. Im reinfundierten Blut lagen die gemessenen Werte für C3a und C5a deutlich unterhalb der systemisch gemessenen Werte, begründet durch die Fähigkeit des DALI-Adsorbers C3a und C5a zu binden. Diese Bindung basiert wohl auf elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen den C3a- oder C5a-Kationen und der negativen Ladung des Adsorbermaterials (*Bosch, Lennertz et al. 2000*). Eine Ausnahme stellen die Messungen von C5a bei einem behandelten Blutvolumen von 3000 ml dar. Hier ergaben sich bei einem Patienten deutlich erhöhte Werte zwischen 9,0 µg/l und 13,8 µg/l bei sonst maximalen Werten von 6,45 µg/l. Dieser individuelle Effekt bleibt letztlich ungeklärt, die Calciumspiegel lagen vergleichbar zu denen der anderen Patienten. Mögliche Erklärungen sind die de-novo Synthese auf der Adsorberoberfläche oder die vermehrte Reinfusion von C5a durch Desorption der zuvor gebundenen Moleküle.

Eine Komplementaktivierung durch DALI ohne Heparinabgabe, gemessen anhand C3a, war minimal und im Vergleich geringer als in der untersuchten Kontrollgruppe, die eine Reduktion der Citratdosierung nach definierter Zeit auf 1:40 enthielt. Wie erwartet offenbarte sich auch in diesen beiden Studiengruppen die Adsorption der Komplementfaktoren an das Adsorbermaterial durch geringe C3a-Werte im reinfundierten Blut.

Das vasoaktive Peptid Bradykinin wies einen markanten Anstieg im reinfundierten („venösen“) Blut auf ohne erkennbare klinische Zeichen einer Bradykinin assoziierten Nebenwirkung wie z.B. Hypotension, Dyspnoe oder Erhöhung der Gefäßpermeabilität mit angioneurotischem Ödem. Der Anstieg des „venösen“ Bradykinin-Spiegels ist durch die Bildung des Kinins während der Adsorberpassage verursacht. Negativ geladene Oberflächen wie das Polyacrylat des DALI-Adsorbers verursachen die Aktivierung des Faktors XII (Hagemann Faktor), der wiederum die Bildung von Kallikrein und daraus resultierend die Freisetzung von Bradykinin aus

den Vorläufermolekülen, den Kininogenen, bewirkt. Durch die Reduktion der Citratdosis auf ein Verhältnis von 1:40 fand offenbar eine stärkere Aktivierung des Kinin-Kallikrein Systems statt als bei Anwendung des Standardverfahrens. Hierbei zeigten sich jedoch sehr starke inter- und intraindividuelle Messschwankungen, die zu hohen Standardabweichungen führten (Standard: 8091 ± 9765 fmol/ml; Reduzierte Citratdosis: 29921 ± 70521 fmol/ml), und daher statistisch nicht signifikant waren. Es bleibt spekulativ eine Ursache für die stärkere Aktivierung des komplexen Kinin-Kallikrein Systems bei Reduktion der Citratdosis zu finden, jedoch könnte der höhere Gehalt an Calcium im reinfundierten Blut eine Rolle spielen. Der pH-Wert des reinfundierten Blutes ist nach Reduktion der Citratzumischung weniger sauer als bei Durchführung der herkömmlichen Apherese, kommt somit nicht als Verursacher der stärkeren Bradykininsynthese in Betracht, da diese bei niedrigeren pH-Werten (z.B. pH 7,1-7,3) begünstigt wird (*Renaux et al. 1999*). Bradykinin scheint im Stoffwechsel zu einem großen Anteil rasch abgebaut zu werden. Daher konnten nur gering erhöhte Mengen Bradykinin systemisch gemessen werden. Entscheidend ist, dass auch nach Reduktion der Citratdosis systemisch keine deutlich erhöhten Bradykinin-Werte messbar waren. Die vorliegenden Ergebnisse sind vergleichbar mit Ergebnissen anderer Studien, die das DALI-System charakterisieren (*Bosch, Lennertz et al. 2000; Bosch, Wendler et al. 2003*). Auch ex-vivo Versuche zu unterschiedlichen Dialysemembranen wiesen bei Testung von Dialysemembranen mit negativer Oberflächenladung vergleichbare Bradykinin-Werte im reinfundierten Blut auf (*Renaux et al. 1999*). Die Nutzung negativ geladener Oberflächen im extrakorporalen Kreislauf geht meist mit einer geringen Aktivierung des Kinin-Kallikrein Systems einher. Der rasche Abbau von Bradykinin geschieht durch proteolytische Spaltung, eine daran wesentlich beteiligte Peptidase ist das Angiotensin-converting-enzyme (ACE). Um eine Akkumulation des reinfundierten Bradykinins zu verhindern ist folglich der gleichzeitige medikamentöse Einsatz eines ACE-Inhibitors zu vermeiden, obgleich Bradykinin vermittelte Reaktionen nicht häufig sind (*Keller et al. 1993; Olbricht et al. 1992*). Es wird vermutet, dass bei der Entstehung der Hypersensitivitätsreaktion bei Verwendung extrakorporaler Zirkulation Bradykinin eine Rolle innehat. Diese Reaktionen, die bis zum Kreislaufschock reichen können, werden typischerweise zu Beginn der Verfahren beobachtet (*Tielemans et al. 1990*) und stehen somit im Gegensatz zu unseren Befunden des späten Kininanstiegs.

Führt man die DALI-Apherese ohne Gabe eines initialen Heparin-Bolus durch, lagen die systemisch gemessenen Werte vergleichbar gering erhöht. Im reinfundierten Blut zeigten sich erwartungsgemäß deutlich erhöhte Werte mit Vorteilen zugunsten der heparinfreien Gruppe im Vergleich zum herkömmlichen DALI-Verfahren.

Auch hier konnten bei starken inter- und intraindividuellen Unterschieden der Konzentrationen des „venösen“ Bradykinins keine Korrelationen zu intermittierenden Hypotensionen gefunden werden.

4.3 Effektivität der modifizierten Verfahren

Der Einsatz von Lipidapherese-Verfahren in der Therapie der medikamentös nicht ausreichend behandelbaren Hyperlipoproteinämie ist in der Sekundärprävention, bei homozygoter familiärer Hypercholesterinämie auch in der Primärprävention, ein etabliertes Verfahren. Hierbei sollte nach NUB-Richtlinien von 1998 eine Absenkung des LDL-Cholesterins um mindestens 60% erreicht werden. In vorangegangenen Studien konnte mehrfach gezeigt werden, dass das Standard DALI-Verfahren diese geforderte Absenkungsrate bei einer Blutflussgeschwindigkeit von maximal 80 ml/h in der Regel erzielt (*Bosch, Lennertz et al. 2000*). Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit sollte geprüft werden, ob eine Modifizierung der Antikoagulation bei Anwendung der DALI-Apherese durch Reduktion des Citrats von 1:20 auf 1:40 die Effektivität in irgendeiner Weise beeinflussen könnte. Wir konnten zeigen, dass DALI auch mit geringerer Beigabe von Citrat im Mittel eine Minderung des LDL-Cholesterins um 62% und somit auch problemlos die NUB-geforderte Absenkungsrate erreicht. Im Vergleich zu dem Standardverfahren ist die Absenkung diskret, aber signifikant geringer (vs. 69%). Auch die Untersuchungen der weiteren Lipoproteinsubfraktionen ergaben minimale, klinisch jedoch nicht entscheidende Unterschiede: Gesamt-Cholesterin wurde bei Standardantikoagulation um 57%, bei Anwendung des modifizierten Verfahrens um 53% gesenkt, dieser Unterschied war signifikant. Das atherogene Lipoprotein (a) konnte durch die etablierte DALI-Apherese nicht signifikant unterschiedlich zur modifizierten Apherese reduziert werden (70% vs. 66%).

Da HDL-Cholesterin einen nachgewiesenen protektiven Effekt gegen die Entstehung einer Atherosklerose besitzt, sollte der Verlust des Lipoproteins bei Lipidapherese möglichst gering sein. Wie bereits gezeigt werden konnte ist eine unspezifische Adsorption des HDL-Cholesterins bei DALI gering, da HDL-Cholesterin im Gegensatz

zu LDL-Cholesterin kein Lipoprotein B 100 besitzt, dieses aber zur adsorptiven Wechselwirkung mit dem DALI-System erforderlich wäre (*Bosch et al. 2002*). Erwartungsgemäß war die Wiederfindungsrate für HDL-Cholesterin bei Standardapherese gut (79%), bei Anwendung des modifizierten Antikoagulationsregimes sogar geringfügig, signifikant besser (84%). Erfreulicherweise konnte somit gezeigt werden, dass eine geringere Citratdosis bei gleichzeitig erhöhter Heparindosis keine wesentlichen Änderungen der Absenkungsraten für Lipoproteine zur Folge hat und die Effektivität vergleichbar zu Standard-DALI aber auch zu anderen Verfahren der Lipidapherese wie z.B. HELP (Heparininduzierte extrakorporale LDL Präzipitation) oder Dextransulfat-Cellulose Adsorption (DSA) ist (*Parhofer et al. 2000*).

Auch ohne Heparinisierung konnte die Lipidapherese mit dem DALI-System Gesamt-Cholesterin, LDL-Cholesterin, VLDL-Cholesterin und Lipoprotein (a) im Vergleich zum etablierten DALI-Verfahren aber auch zu anderen Systemen der Lipidapherese vergleichbar gut absenken. Die Reduktionen des LDL-Cholesterins und des Lipoprotein (a) erreichten die geforderten 60% auch ohne Heparinabgabe (LDL-Cholesterin: 65% und Lp(a): 62%). Der unerwünschte und unspezifische Verlust von HDL-Cholesterin war etwas höher als in Vergleichsstudien (24% vs. 8%). Dies ist möglicherweise durch eine Wechselwirkung mit den geringer reduzierten Triglyzeriden zu erklären (siehe unten).

In einer multizentrischen DALI-Langzeitbeobachtung werden Absenkungsraten für Triglyzeride von 27% mit hoher Standardabweichung (28%) beschrieben (*Bosch et al. 2002*). Die Triglyzeridreduktionen in der vorliegenden Arbeit lagen sowohl im Kontrollarm als auch in der Studiengruppe mit reduzierter Citrat-Antikoagulation über diesen Werten, in letztgenannter Gruppe sogar diskret aber signifikant besser (49% vs. 53%). Vergleichbar sind diese Werte mit Absenkungsraten zwischen 40% und 49% einer Studie aus dem Jahr 2000, die HELP, Immunadsorption, DSA und Kaskadenfiltration vergleicht (in genannter Reihenfolge: 41%, 42%, 40% und 49%) (*Parhofer et al. 2000*). Das bessere Abschneiden der Studiengruppe ist möglicherweise durch die intensivere Heparin-Antikoagulation zu erklären. Heparin induziert bei kurzzeitiger Gabe über Aktivierung der Lipoprotein Lipase eine Lipolyse, so dass Triglyzeride abgebaut werden (*Person et al. 1985*). Bei kontinuierlicher Heparinapplikation hingegen wurde ab dem vierten Tag eine Minderung der Enzymaktivität gemessen und konsekutiv ein Anstieg der Chylomikronen beobachtet

(Weintraub et al. 1994). Aufgrund des erstgenannten Effektes konnte angenommen werden, dass bei DALI ohne Heparinantikoagulation eine verminderte Absenkung der Triglyzeride zu beobachten sei. Dies bestätigte sich mit einer im Vergleich deutlich schlechteren Elimination der Triglyzeride (17% vs. 31% im Kontrollkollektiv). Durch Absenkung der Triglyzeride wird ein Anheben des HDL-Cholesterins ermöglicht, begründet durch Stoffwechselmechanismen, die bei Lipolyse Cholesterinester von VLDL-Partikel auf HDL-Partikel übertragen. Dennoch ist anzunehmen, dass dieses Phänomen klinisch keine Relevanz hat, da triglyzeridreiche Lipoproteine bereits eins bis zwei Tage nach Apherese auf Ausgangsniveau angestiegen sind und eine Apherese-Indikation zur Prophylaxe der Atherosklerose bei Hypertriglyzeridämie nicht gegeben ist (Parhofer et al. 2004).

Vergleicht man die vier Verfahren der Lipidapherese, Immunadsorption, DSA, HELP und DALI, so besitzt DALI das geringste Potential Fibrinogen abzusenken (in genannter Reihenfolge: 19%, 26%, 53% und 11%) (Thompson et al. 2003). Bosch et al. beschrieb 2002 eine mittlere Absenkungsrate für Fibrinogen von 15% (Bosch et al. 2002). In den Kontrollgruppen und Testgruppen beider Studien lagen die Absenkungen im Bereich der zu erwartenden Werte, bei Verringerung des Citrats war mit 11% eine schlechtere Reduktion zu beobachten als im Standardverfahren (18%). Hingegen zeigte sich im Standardverfahren bei Vergleich mit DALI ohne Heparin eine geringere Minderung des Fibrinogens (11% vs. 19%). Da diese Werte im Rahmen von Pilotstudien mit geringer Fallzahl ermittelt wurden scheinen die Abweichungen von den 15%, errechnet aus oben genannter Langzeitbeobachtung mit großer Fallzahl, ohne Belang. Eine wesentlich effektivere Elimination des Fibrinogens ist bei Anwendung des HELP-Verfahrens bekannt (Thompson et al. 2003; Julius et al. 2000). Bereits 1990 beschrieb Kleophas et al., dass die akute Elimination von LDL-Cholesterin und Fibrinogen, am ehesten bedingt durch eine Abnahme der Plasmaviskosität, einen günstigen Effekt auf Blutrheologie und Mikrozirkulation hat (Kleophas et al. 1990). Klinisch könnte dieser Effekt und die Tatsache, dass Fibrinogen die Aggregation von Erythrocyten beeinflusst, zu einer verbesserten myocardialen Perfusion führen (Mellwig et al. 2006). Aber auch DSA und DALI konnten trotz geringerer Verminderung des Fibrinogens eine Optimierung der Viskosität, Erythrocytenaggreabilität und Rheologie erreichen (Kobayashi et al. 2006; Bosch, Wendler et al. 2001). Daraus folgend darf angenommen werden, dass

die Anwendung unterschiedlicher Antikoagulationsregime bei DALI ohne Einfluss auf Fibrinogen wahrscheinlich diesbezüglich keine klinischen Effekte haben wird.

5. Zusammenfassung

Die Anwendung eines Hämoperfusionsverfahrens zur Lipidadsorption hat spezielle Kriterien der Biokompatibilität zu erfüllen, hierzu gehören das Fehlen von Interaktionen mit Erythrocyten, Leukocyten und Thrombocyten; die Abwesenheit von Hämolyse und Aktivierung der Gerinnung und Thrombosierung sowie Ausbleiben einer Komplement- oder Kinin-Kallikrein-Reaktion. Die direkte Adsorption von Lipoproteinen durch das DALI-Verfahren ist eine etablierte, vollblutkompatible, sichere, effektive und biokompatible Therapieoption zur Behandlung der Hyperlipoproteinämie. Modifikationen des etablierten und zugelassenen DALI-Systems müssen vor Anwendung in der Routinebehandlung nachweislich vergleichbare Eigenschaften aufweisen. Im standardisierten Verfahren erfolgt die erforderliche Antikoagulation mittels kombinierter Gabe eines Heparin-Bolus (20 IE/kg KG) und kontinuierlicher Citratzumischung im Verhältnis von 1:20.

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Modifikationen der standardisierten Antikoagulation getestet.

Unter Reduktion der Citratdosis auf ein Verhältnis von 1:40 bei gleichzeitiger Erhöhung des initialen Heparinbolus (60 IE/kg KG) konnte im Vergleich zur etablierten DALI-Apherese eine vergleichbar gute Effektivität des Verfahrens nachgewiesen werden. Die gemäß NUB-Richtlinien geforderte Absenkungsrate für LDL-Cholesterin über 60% konnte sowohl mittels modifizierter als auch etablierter Apherese erreicht werden. Die diskreten Vorteile des etablierten Verfahrens in der Absenkung des LDL-Cholesterins (69% vs. 62%), Gesamt-Cholesterins (57% vs. 53%) und des Lipoprotein (a) (70% vs. 66%) erscheinen klinisch nicht relevant. Die klinische Sicherheit beider Verfahren zeigte sich unbedenklich und ergab im Vergleich keine Unterschiede. Der Verlust an ionisiertem Calcium war bei Anwendung der modifizierten Antikoagulation erwartungsgemäß geringer (5% vs. 18%), klinisch resultierten daraus jedoch keine Unterschiede bezüglich der Verträglichkeit der Apheresen. Die Antikoagulation war bei Anwendung beider Antikoagulationsregime sicher und ausreichend gut, eine Aktivierung der plasmatischen Gerinnung gemessen anhand der Thrombin-Antithrombin-Komplexe fand in beiden Untersuchungsarmen nicht statt. Die Biokompatibilität beider Verfahren zeigte sich in der beschriebenen Studie vergleichbar zufriedenstellend. Zeichen der Hämolyse waren nicht detektierbar, Erythrocyten-, Leukocyten- und

Thrombocytenzahlen waren bei Anwendung beider Verfahren im Wesentlichen vergleichbar stabil. Eine Aktivierung des Komplementsystems fand weder bei Durchführung des Standardverfahrens noch bei Modifikation des Antikoagulationsregimes statt. Eine relevante Aktivierung von Thrombocyten, detektiert mittels β -Thromboglobulin, der polymorphnukleären Granulocyten (Elastase) oder der Monocyten konnte jeweils ausgeschlossen werden. Die Modifikation der Gerinnungshemmung aktivierte im tolerablen und vorbekannten Umfang das Kinin-Kallikrein-System, entscheidende Unterschiede zum etablierten Verfahren waren nicht nachweisbar. Aufgrund dieses Phänomens ist eine gleichzeitige Therapie mit ACE-Inhibitoren und DALI kontraindiziert. Insgesamt kann die untersuchte Modifikation der Antikoagulation bei DALI bedenkenlos in der klinischen Routine eingesetzt werden.

Auch die Untersuchungen zu DALI ohne Gabe des etablierten initialen Heparin-Bolus und kontinuierlicher ACD-A Gabe im Verhältnis 1:20 zeigte sich klinisch sicher und bedenkenlos. Bedingt durch das dauerhafte ACD-A-Verhältnis 1:20 wurde im Vergleich zur historischen Kontrollgruppe eine geringere Konzentration ionisierten Calciums reinfundiert. Diese Tatsache bedarf ein besonderes Augenmerk bei Patienten, die zur Hypocalciämie neigen. Patienten, die eine orale Antikoagulation mit Phenprocoumon erhielten, wiesen eine ausreichend gute Antikoagulation während der heparinfreien DALI-Apherese auf, die Aktivierung der plasmatischen Gerinnung fiel gering und vergleichbar zum Kontrollkollektiv aus. Bei Patienten ohne orale Antikoagulation zeichnete sich eine mäßige Aktivierung der plasmatischen Gerinnung durch die heparinfreie DALI-Apherese ab, jedoch ohne offensichtliche Relevanz. Dennoch gebietet die Durchführung des Verfahrens ohne Heparin Vorsicht.

Die Zellzahlen für Thrombocyten, Leukocyten und Erythrocyten blieben auch ohne Gabe von Heparin stabil, eine Hämolyse bei heparinfreier Antikoagulation fand nicht statt. Eine klinisch relevante Aktivierung der Thrombocyten oder PMN-Granulocyten konnte nicht nachgewiesen werden. Die durch die negativ geladene Oberfläche des DALI-Adsorbers bedingte Aktivierung des Kallikrein-Kinin-Systems (Bradykinin) wurde durch das heparinfreie Verfahren nicht nennenswert verändert und hatte keine klinischen Nebenwirkungen zur Folge. Das Komplementsystem erfuhr keine evidente Aktivierung durch Weglassen des Heparins bei DALI. Die Effektivität der DALI-Apherese ohne Heparin ist vergleichbar zum etablierten Verfahren, LDL-Cholesterin konnte im Mittel um 65% gesenkt werden, Lp(a) um 62%.

6. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACD-A	Acidum Citricum Dextrose Formula A
ACE	Angiotensin converting enzyme
ACT	activated clotting time
ACVB	Aorto-koronarer Venenbypass
ASS	Acetyl-Salicylsäure
AT III	Antithrombin III
AT-I-Rezeptor	Angiotensin I Rezeptor
a-v-Fistel	arterio-venöse Fistel
BE	base excess
C3a	Komplementfaktor 3a
C5a	Komplementfaktor 5a
Ca.	Circa
CAST	Carotis-Arterien Stenose
CK	Kreatinkinase
DALI	Direkte Adsorption von Lipoproteinen
DAS	Lipidapherese mit Dextransulfat
FH	Familiäre Hypercholesterinämie
HCT	Hydrochlorothiazid
HDL	high density lipoprotein
HELP	Heparin induzierte extrakorporale LDL-Präzipitation
HMG-CoA	3-Hydroxy-3-Methyl-Glutaryl-CoA-Reduktase
IE	Internationale Einheiten
IgA	Immunglobulin A
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IL-6	Interleukin 6
ISDN	Isosorbitdinitrat
ISMN	Isosorbitmononitrat
Kg	Kilogramm
Kg	Körpergewicht

KHK	Koronare Herzkrankheit
LDH	Laktat-Dehydrogenase
LDL	low density lipoprotein
Lp(a)	Lipoprotein (a)
MW	Mittelwert
NAST	Nierenarterienstenose
NUB	Neue Untersuchungs- und Behandlungsmethoden
pAVK	Periphere arterielle Verschlusskrankheit
PBV	Patienten Blutvolumen
PF4	Plättchenfaktor 4
PMN	Polymorphnukleäre Granulocyten
PTT	Partielle Thromboplastinzeit
Qb	Blutfluss
SD	Standardabweichung
Tab.	Tabelle
TAT	Thrombin-Antithrombin Komplex
TC	Gesamt-Cholesterin
TG	Gesamt-Triglyzeride
TNF α	Tumornekrosefaktor α
VLDL	very low density lipoprotein
z.B.	zum Beispiel
Z.n.	Zustand nach
β -TG	β -Thromboglobulin

7. Literaturverzeichnis

1. **Alvarez V**, Pulido R, Campanero MR, Paraiso V, de Landázuri MO, Sánchez-Madrid F. Differentially regulated cell surface expression of leukocyte adhesion receptors on neutrophils. *Kidney Int* 1991, 40 (5): 899-905.
2. **Aster RH**. Heparin-induced thrombocytopenia and thrombosis. *N Engl J Med* 1995, 332 (20): 1374-1376.
3. **Bonomini M**, Stuard S, Carreno MP, Settefrati N, Santarelli P, Haeffner-Cavaillon N, Albertazzi A. Neutrophil reactive oxygen species production during hemodialysis: role of activated platelet adhesion to neutrophils through P-selectin. *Nephron* 1997, 75 (4): 402-411.
4. **Boren J**, Olin K, Lee I, Chait A, Wight TN, Innerarity TL. Identification of the principal proteoglycan-binding site in LDL. A single-point mutation in apo-B100 severely affects proteoglycan interaction without affecting LDL receptor binding. *J Clin Invest* 1998, 101 (12): 2658-2664.
5. **Bosch T**, Blumenstein M, Gurland HJ. Biokompatibilität bei Langzeithämodialyse: Fakten-Theorien-Klinische Bedeutung. *Z Urol Nephrol* 1989, 82: 69-76.
6. **Bosch T**, Gahr S, Belschner U, Schaefer C, Lennertz A, Rammo J, for the DALI Study Group. Direct adsorption of low-density lipoprotein by DALI-LDL-apheresis: results of a prospective long-term multicenter follow-up covering 12,291 sessions. *Ther Apher Dial*, 2006, 10 (3): 210-218.
7. **Bosch T**, Heinemann O, Duhr C, Wendler T, Keller C, Fink E, Kirschner T, Klebert S, Samtleben W. Effect of low-dose citrate anticoagulation on the clinical safety and efficacy of direct adsorption of lipoproteins (DALI apheresis) in hypercholesterolemic patients: A prospective controlled clinical trial. *Artif Organs* 2000; 24 (10): 790-796.
8. **Bosch T**, Lennertz A, Kordes B, Samtleben W. Low density lipoprotein hemoperfusion by direct adsorption of lipoproteins from whole blood (DALI apheresis): Clinical experience from a single center. *Ther Apher* 1999; 3 (3): 209-213.
9. **Bosch T**, Lennertz A, Schenzle D, Dräger J for the DALI Study Group. Direct adsorption of low-density lipoprotein and lipoprotein(a) from whole blood:

- results of the first clinical long-term multicenter study using DALI apheresis. *J Clin Apher* 2002; 17: 161-169.
10. **Bosch** T, Lennertz A, Schmidt B, Fink E, Keller C, Toepfer M, Dräger J, Samtleben W. DALI Apheresis in hyperlipidemic patients: Biocompatibility, efficacy and selectivity of direct adsorption of lipoproteins from whole blood. *Artif Organs* 2000; 24 (2): 81-90.
 11. **Bosch** T, Schmidt B, Blumenstein M, Gurland HJ. Lipid apheresis by hemoperfusion: in vitro efficacy and ex vivo biocompatibility of a new low-density lipoprotein adsorber compatible with human whole blood. *Artif Organs* 1993; 17 (7): 640-652.
 12. **Bosch** T, Schmidt B, Kleophas W, Gillen C, Otto V, Passlick-Deetjen J, Gurland HJ. LDL-Hemoperfusion – a new procedure for LDL apheresis: First clinical application of an LDL adsorber compatible with human whole blood. *Artif Organs* 1997; 21 (9): 977-982.
 13. **Bosch** T, Schmidt B, Kleophas W, Otto V, Samtleben W. LDL Hemoperfusion – a new procedure for LDL apheresis: Biocompatibility results from a first pilot study in hypercholesterolemic atherosclerosis patients. *Artif Organs* 1997; 21 (10): 1060-1065.
 14. **Bosch** T, Wendler T, Jaeger BR, Samtleben W. Improvement of hemorheology by DALI apheresis: acute effects on plasma viscosity and erythrocyte aggregation in hypercholesterolemic patients. *Ther Apher* 2001; 5 (5): 372-376.
 15. **Bosch** T, Wendler T, Maschke H. Modified DALI LDL-apheresis using trisodium citrate anticoagulation plus bicarbonate or lactate-buffered hemofiltration substitution fluids as primers. *Artif Organs* 2003, 6: 555-564.
 16. **Bosch** T. Lipid apheresis: from a heroic treatment to routine clinical practice. *Artif Organs* 1996, 20 (5): 414-419.
 17. **Bosch** T. Lipidapherese: Indikation – Methodik – Differentialtherapie. *Nieren- und Hochdruckkrankheiten* 1992, 21 (3): 89-102.
 18. **Bosch** T. State of the art of lipid apheresis. *Artif Organs* 1996, 20 (4): 292-295.
 19. **Braunwald** E. Shattuck lecture--cardiovascular medicine at the turn of the millennium: triumphs, concerns, and opportunities. *N Engl J Med* 1997, 337 (19): 1360-1369.

20. **Carreno** MP, Stuard S, Bonomini M, Settefrati N, Tetta C, Albertazzi A, Haeffner-Cavaillon N. Cell-associated adhesion molecules as early markers of bioincompatibility. *Nephrol Dial Transplant* 1996, 11 (11): 2248-2257.
21. **Cheung** AK, Parker CJ, Hohnholt M. Beta2 integrins are required for neutrophil degranulation induced by hemodialysis membranes. *Kidney Int* 1993, 43 (3): 649-660.
22. **Cheung** AK. Complement activation as index of haemodialysis membrane biocompatibility: the choice of methods and assays. *Nephrol Dial Transplant* 1994, 9 Suppl. 2: 96-103.
23. **Civeira** F, International Panel on management of familial hypercholesterolemia. Guidelines for the diagnosis and management of heterozygous familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 2004, 173 (1): 55-68.
24. **Coppo** R, Amore A, Cirina P, Scelfo B, Giacchino F, Comune L, Atti M, Renaux JL. Bradykinin and nitric oxide generation by dialysis membranes can be blunted by alkaline rinsing solutions. *Kidney Int* 2000, 58 (2): 881-888.
25. **Coppo** R, Amore A. Importance of the bradykinin-nitric oxide synthase system in the hypersensitivity reactions of chronic haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 2000, 15 (9): 1288-1290.
26. **Craddock** PR, Hammerschmidt D, White JG, Dalmosso AP, Jacob HS. Complement (C5-a)-induced granulocyte aggregation in vitro. A possible mechanism of complement-mediated leukostasis and leukopenia. *J Clin Invest* 1977, 60 (1): 260-264.
27. **Dräger** LJ, Julius U, Kraenzle K, Schaper J, Toepfer M, Zygan K, Otto V, Steinhagen-Thiessen E. DALI-the first human whole-blood low-density lipoprotein and lipoprotein (a) apheresis system in clinical use: procedure and clinical results. *Eur J Clin Invest* 1998, 28 (12): 994-1002.
28. **Eisenhauer** T, Armstrong VW, Wieland H, Fuchs C, Scheler F, Seidel D. Selective removal of low density lipoproteins (LDL) by precipitation at low pH: first clinical application of the HELP system. *Klin Wochenschr* 1987, 65 (4): 161-168.
29. **Eisenhauer** T, Schuff-Werner P, Armstrong VW, Talartschik J, Seidel D, Scheler F. Die extrakorporale LDL-Elimination mit dem HELP-Verfahren. *Nieren- und Hochdruckkrankheiten* 1992, 21 (3): 109-113.

30. **Forrester** JS, Bairey-Merz CN, Kaul S. The aggressive low density lipoprotein lowering controversy. *J Am Coll Cardiol* 2000, 36 (4): 1419-1425.
31. **Frick** MH, Elo O, Haapa K, Heinonen OP, Heinsalmi P, Helo P, Huttunen JK, Kaitaniemi P, Koskinen P, Manninen V, et al. Helsinki Heart Study: primary-prevention trial with gemfibrozil in middle-aged men with dyslipidemia. Safety of treatment, changes in risk factors, and incidence of coronary heart disease. *N Engl J Med* 1987, 317 (20): 1237-1245.
32. **Gawaz** MP, Mujais SK, Schmidt B, Blumenstein M, Gurland HJ. Platelet-leukocyte aggregates during hemodialysis: effect of membrane type. *Artif Organs* 1999; 23 (1): 29-36.
33. **Gawaz** MP, Mujais SK, Schmidt B, Gurland HJ. Platelet-leukocyte aggregation during hemodialysis. *Kidney Int* 1994, 46 (2): 489-495.
34. **Gawaz** MP, Ward RA. Effects of hemodialysis on platelet-derived thrombospondin. *Kidney Int* 1991, 40 (2): 257-265.
35. **Geiß** HC, Richter WO, Schwandt P. Membran-Differential-Filtrationsapherese (MDF-Lipidapherese). In: Schwandt P, Richter WO, Parhofer KG, ed. *Handbuch der Fettstoffwechselstörungen*. Schattauer: Stuttgart, New York 2001: 566-570.
36. **Ginsberg** HN, Goldberg IJ. Disorders of lipoprotein metabolism. In: Fauci AS, Braunwald E, Isselbacher KJ, Wilson JD, Martin JB, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, ed. *Harrison's principles of internal medicine*. McGraw-Hill: New York 1998: 2138-2148.
37. **Ginsberg** MH, Frelinger AL, Lam SC, Forsyth J, McMillan R, Plow EF, Shattil SJ. Analysis of platelet aggregation disorders based on flow cytometric analysis of membrane glycoprotein IIb-IIIa with conformation-specific monoclonal antibodies. *Blood* 1990; 76: 2017-2023.
38. **Glusa** E, Wenzel E, Forth W, Rummel W. Antikoagulantien, Aggregationshemmer, Fibrinolytika, Hemmstoffe der Fibrinolyse und Hämostyptika. In: Forth W, Henschler D, Rummel W, Starke K, ed. *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. Spektrum Akademischer Verlag: Heidelberg, Berlin, Oxford 1996: 473-501.
39. **Goldstein** JL, Brown MS. Molecular medicine. The cholesterol quartet. *Science* 2001, 292 (5520): 1394-1398.

40. **Goldstein** JL, Schrott HG, Hazzard WR, Bierman EL, Motulsky AG. Hyperlipidemia in coronary heart disease. II. Genetic analysis of lipid levels in 176 families and delineation of a new inherited disorder, combined hyperlipidemia. *J Clin Invest* 1973, 52 (7): 1544-1568.
41. **Grooteman** MP, van Tellingen A, van Houte AJ, Bos JC, Schoorl M, van Limbeek J, Nubé MJ. Hemodialysis-induced degranulation of polymorphonuclear cells: no correlation between membrane markers and degranulation products. *Nephron* 2000, 85 (3): 267-274.
42. **Gurland** HJ, Davison AM, Bonomini V. Definitions and terminology in bioincompatibility. *Nephrol Dial Transplant* 1994, 9: 4-10.
43. **Gutensohn** K, Sputtek A, Voss A, Stahl RA, Kuehnl P. Modification of activation-dependent platelet antigens CD62p and CD63 during haemodialysis. *Transfus Sci* 1996; 17 (4): 489-492.
44. **Hansson** GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med* 2005, 352 (16): 1685-1695.
45. **Heinemann** O, Bosch T. Evaluation of microparticle leakage during DALI LDL adsorption in a simulated clinical setting. *Int J Artif Organs* 2000; 23 (5): 338-344.
46. **Hernández** MR, Galán AM, Lozano M, Bozzo J, Cases A, Escolar G, Calls J, Ordinas A. Platelet-leukocyte activation during hemodialysis detected with a monoclonal antibody to leukocyte integrin CD11b. *Nephron* 1998, 80 (2): 197-203.
47. **Hirsh** J. Heparin. *N Engl J Med* 1991, 324 (22): 1565-1574.
48. **Hörl** WH, Schaefer RM, Heidland A. Effect of different dialyzers on proteinases and proteinase inhibitors during hemodialysis. *Am J Nephrol* 1985, 5 (5): 320-326.
49. **Julius** U, Siegert G, Gromeier S. Intraindividual comparison of the impact of two selective apheresis methods (DALI and HELP) on the coagulation system. *Int J Artif Organs* 2000; 23 (3): 199-206.
50. **Kazatchkine** MD, Fearon DT, Metcalfe DD, Rosenberg RD, Austen KF. Structural determinants of the capacity of heparin to inhibit the formation of the human amplification C3 convertase. *J Clin Invest* 1981, 67 (1): 223-228.

51. **Keller** C, Grützmaker P, Bahr F, Schwarzbeck A, Kroon AA, Kiral A. LDL-apheresis with dextran sulphate and anaphylactoid reactions to ACE inhibitors. *Lancet* 1993, 341 (8836): 60-61.
52. **Keller** C, Zöllner N. Primäre Hyperlipoproteinämien – Pathophysiologie, Klinik und Genetik. *Internist* 1992, 33: 9-15.
53. **Keller** C. Apheresis in coronary heart disease with elevated Lp (a): a review of Lp (a) as a risk factor and its management. *Ther Apher Dial* 2007, 11 (1): 2-8.
54. **Kleinschmidt** S, Seyfert UT. Die Heparin-induzierte Thrombozytopenie (HIT). Bedeutung für Anästhesie und Intensivmedizin. *Anaesthesist* 1999, 48 (11): 771-785.
55. **Kobayashi** S, Oka M, Moriya H, Maesato K, Okamoto K, Ohtake T. LDL-apheresis reduces P-Selectin, CRP and fibrinogen -- possible important implications for improving atherosclerosis. *Ther Apher Dial* 2006; 10 (3): 219-223.
56. **Kostner** GM, März W. Zusammensetzung und Stoffwechsel der Lipoproteine. In: Schwand P, Richter WO, Parhofer KG, ed. *Handbuch der Fettstoffwechselstörungen*. Schattauer: Stuttgart, New York 2001: 1-57.
57. **Kroon** AA, Aengevaeren WR, van der Werf T, Uijen GJ, Reiber JH, Brusckhe AV, Stalenhoef AF. LDL-Apheresis Atherosclerosis Regression Study (LAARS). Effect of aggressive versus conventional lipid lowering treatment on coronary atherosclerosis. *Circulation* 1996, 93 (10): 1826-1835.
58. **Levine** GN, Keaney JF Jr, Vita JA. Cholesterol reduction in cardiovascular disease. Clinical benefits and possible mechanisms. *N Engl J Med* 1995, 332 (8): 512-521.
59. **Libby** P, Theroux P. Pathophysiology of coronary artery disease. *Circulation* 2005, 111 (25): 3481-3488.
60. **Lupien** PJ, Moorjani S, Awad J. A new approach to the management of familial hypercholesterolaemia: Removal of plasma-cholesterol based on the principle of affinity chromatography. *Lancet* 1976, 1 (7972): 1261-1265.
61. **Lusis** AJ. Atherosclerosis. *Nature* 2000, 407 (6801): 233-241.
62. **Mabuchi** H, Koizumi J, Shimizu M, Kajinami K, Miyamoto S, Ueda K, Takegoshi T. Long-term efficacy of low-density lipoprotein apheresis on coronary heart disease in familial hypercholesterolemia. Hokuriku-FH-LDL-Apheresis Study Group. *Am J Cardiol* 1998, 82 (12): 1489-1495.

63. **Mabuchi** H, Michishita I, Takeda M, Fujita H, Koizumi J, Takeda R, Takeda S, Oonshi M. A new low density lipoprotein apheresis system using two dextran sulfate cellulose columns in an automated column regenerating unit (LDL continuous apheresis). *Atherosclerosis* 1987, 68 (1-2): 19-25.
64. **Matsuda** Y, Sueoka A, Nosé Y. An effective LDL removal filter for the treatment of hyperlipidemia. *Artif Organs* 1995, 19 (2): 129-134.
65. **Mellwig** KP, Baller D, Gleichmann U, Moll D, Betker S, Weise R, Notohamiprodjo G. Improvement of coronary vasodilatation capacity through single LDL apheresis. *Atherosclerosis* 1998, 139 (1): 173-178.
66. **Mellwig** KP, van Buuren F, Schmidt HK, Wielepp P, Burchert W, Horstkotte D. Improved coronary vasodilatory capacity by H.E.L.P. apheresis: comparing initial and chronic treatment. *Ther Apher Dial* 2006; 10 (6): 510-517.
67. **Michelson** AD. Flow cytometry: a clinical test of platelet function. *Blood* 1996; 87 (12): 4925-4936.
68. **Müller** C. Angina pectoris in hereditary xanthomatosis. *Arch Intern Med* 1939, 64: 675-680.
69. **Nadler** SB, Hidalgo JU, Bloch T. Prediction of blood volume in normal human adults. *Surgery* 1962, 51: 224-232.
70. **NCEP ATPIII**. Executive summary of the third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) expert panel on detection, evaluation and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA* 2001, 285: 2486-2497.
71. **Nishimura** S, Sekiguchi M, Kano T, Ishiwata S, Nagasaki F, Nishide T, Okimoto T, Kutsumi Y, Kuwabara Y, Takatsu F, Nishikawa H, Daida H, Yamaguchi H. Effects of intensive lipid lowering by low-density lipoprotein apheresis on regression of coronary atherosclerosis in patients with familial hypercholesterolemia: Japan Low-density Lipoprotein Apheresis Coronary Atherosclerosis Prospective Study (L-CAPS). *Atherosclerosis* 1999, 144 (2): 409-417.
72. **NUB-Richtlinien** (1991). Richtlinien über die Einführung neuer Untersuchungs- und Behandlungsmethoden. *Deutsches Ärzteblatt* 88: C672-674.

73. **Olbricht** CJ, Schaumann D, Fischer D. Anaphylactoid reactions, LDL apheresis with dextran sulphate, and ACE inhibitors. *Lancet* 1992, 340 (8824): 908-909.
74. **Olson** PR, Cox C, McCullough J. Laboratory and clinical effects of the infusion of ACD solution during plateletpheresis. *Vox Sang* 1977; 33 (2): 79-87.
75. **Parhofer** KG (Hrsg.). Schwere Dyslipoproteinämien – Strategien zur Diagnostik und Therapie. 1. Auflage – Bremen: UNI-MED, 2004. UNI-MED Verlag.
76. **Parhofer** KG, Geiss HC, Schwandt P. Efficacy of different low-density lipoprotein apheresis methods. *Ther Apher* 2000; 4 (5): 382-385.
77. **Pedersen** TR, Kjekshus J, Pvärälä K, Olsson AG, Cook TJ, Musliner TA, Tobert JA, Haghfelt T. Effect of simvastatin on ischemic signs and symptoms in the Scandinavian simvastatin survival study (4S). *Am J Cardiol* 1998, 81 (3): 333-335.
78. **Pedersen** TR, Wilhelmsen L, Faergeman O, Strandberg TE, Thorgeirsson G, Troedsson L, Kristianson J, Berg K, Cook TJ, Haghfelt T, Kjekshus J, Miettinen T, Olsson AG, Pvärälä K, Wedel H. Follow-up study of patients randomized in the Scandinavian simvastatin survival study (4S) of cholesterol lowering. *Am J Cardiol* 2000, 86 (3): 257-262.
79. **Person** E, Nordenstrom J, Nilsson-Ehle P, Hagenfeldt L. Lipolytic and anticoagulant activities of a low molecular weight fragment of heparin. *Eur J Clin Invest* 1985; 15 (4): 215-220.
80. **Rabb** H, Chandran PK, Arnaout MA, Kehrli ME Jr. Use of a bovine model to study the role of adhesion molecule CD11/CD18 in hemodialysis-induced neutropenia. *Am J Kidney Dis* 2002, 39 (3): 587-593.
81. **Renaux** JL, Thomas M, Crost T, Loughraieb N, Vantard G. Activation of the kallikrein-kinin system in hemodialysis: role of membrane electronegativity, blood dilution, and pH. *Kidney Int* 1999, 55 (3): 1097-1103.
82. **Richter** WO, Jacob BG, Ritter MM, Sühler K, Vierneisel K, Schwandt P. Three-year treatment of familial heterozygous hypercholesterolemia by extracorporeal low-density lipoprotein immunoadsorption with polyclonal apolipoprotein B antibodies. *Metabolism* 1993, 42 (7): 888-894.
83. **Ross** R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 1993, 362 (6423): 801-809.

84. **Scandinavian Simvastatin Survival Study Group.** Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *Lancet* 1994, 344 (8934): 1383-1389.
85. **Schiffl** H, Fischereder M, Sitter T. Biocompatibility of renal replacement therapy. *Internist* 1999, 40 (1): 37-48.
86. **Schuff-Werner** P. Heparininduzierte extrakorporale LDL-Präzipitation (HELP). In: Schwand P, Richter WO, Parhofer KG, ed. *Handbuch der Fettstoffwechselstörungen*. Schattauer: Stuttgart, New York 2001: 538-556.
87. **Schulman** G, Hakim R, Arias R, Silverberg M, Kaplan AP, Arbeit L. Bradykinin generation by dialysis membranes: possible role in anaphylactic reaction. *J Am Soc Nephrol* 1993, 3 (9): 1563-1569.
88. **Shepherd** J, Cobbe SM, Ford I, Isles CG, Lorimer AR, MacFarlane PW, McKillop JH, Packard CJ. Prevention of coronary heart disease with pravastatin in men with hypercholesterolemia. West of Scotland Coronary Prevention Study Group. *N Engl J Med* 1995, 333 (20): 1301-1307.
89. **Shimamoto** K, Ando T, Tanaka S, Imura O. The determination of kinin and glandular kallikrein in human biological fluids. *Atemwegs-Lungenkrankheiten* 1988, 1 Suppl. 14: 29-36.
90. **Sirolli** V, Di Stante S, Stuard S, Di Liberato L, Amoroso L, Cappelli P, Bonomini M. Biocompatibility and functional performance of a polyethylene glycol acid-grafted cellulosic membrane for hemodialysis. *Int J Artif Organs* 2000; 23 (6): 356-364.
91. **Steinberg** D. Thematic review series: the pathogenesis of atherosclerosis. An interpretive history of the cholesterol controversy: part II: the early evidence linking hypercholesterolemia to coronary disease in humans. *J Lipid Res* 2005, 46 (2): 179-190.
92. **Stoffel** W, Borberg H, Greve V. Application of specific extracorporeal removal of low density lipoprotein in familial hypercholesterolaemia. *Lancet* 1981, 2 (8254): 1005-1007.
93. **Stuard** S, Bonomini M, Settefrati N, Albertazzi A. Platelet-neutrophil interactions during hemodialysis: a proposed biocompatibility approach. *Int J Artif Organs* 1998, 21 (2): 75-82.

94. **Tamai** O, Matsuoka H, Itabe H, Wada Y, Kohno K, Imaizumi T. Single LDL apheresis improves endothelium-dependent vasodilatation in hypercholesterolemic humans. *Circulation* 1997, 95 (1): 76-82.
95. **Tatami** R, Inoue N, Itoh H, Kishino B, Koga N, Nakashima Y, Nishide T, Okamura K, Saito Y, Teramoto T, et al. Regression of coronary atherosclerosis by combined LDL-apheresis and lipid-lowering drug therapy in patients with familial hypercholesterolemia: a multicenter study. The LARS Investigators. *Atherosclerosis* 1992, 95 (1): 1-13.
96. **Thannhauser** SJ, Magendantz H. The different clinical groups of xanthomatous diseases: a clinical physiological study of 22 cases. *Ann Intern Med* 1939, 11:1662-1166.
97. **Thiery** J, Seidel D. Safety and effectiveness of long-term LDL-apheresis in patients at high risk. *Curr Opin Lipidol* 1998, 9 (6): 521-526.
98. **Thompson** GR, Barter PJ. Clinical lipidology at the end of the millennium. *Curr Opin Lipidol* 1999, 10 (6): 521-526.
99. **Thompson** GR, Lowenthal R, Myant NB. Plasma exchange in the management of homozygous familial hypercholesterolaemia. *Lancet* 1975, 1 (7918): 1208-1211.
100. **Thompson** GR, Miller JP, Breslow JL. Improved survival of patients with homozygous familial hypercholesterolaemia treated with plasma exchange. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1985, 291 (6510): 1671-1673.
101. **Thompson** GR, Myant NB, Kilpatrick D, Oakley CM, Raphael MJ, Steiner RE. Assessment of long-term plasma exchange for familial hypercholesterolaemia. *Br Heart J* 1980, 43 (6): 680-688.
102. **Thompson** GR. LDL apheresis. *Atherosclerosis* 2003, 167 (1): 1-13.
103. **Thylen** P, Fernvik E, Lundahl J, Hed J, Jacobson SH. Modulation of CD11b/CD18 on monocytes and granulocytes following hemodialysis membrane interaction in vitro. *Int J Artif Organs* 1996, 19 (3): 156-163.
104. **Tielemans** C, Madhoun P, Lenaers M, Schandene L, Goldman M, Vanherweghem JL. Anaphylactoid reactions during hemodialysis on AN69 membranes in patients receiving ACE inhibitors. *Kidney Int* 1990, 38 (5): 982-984.
105. **Tielemans** CL, Delville JP, Husson CP, Madhoun P, Lambrechts AM, Goldman M, Vanherweghem JL. Adhesion molecules and leukocyte common

- antigen on monocytes and granulocytes during hemodialysis. *Clin Nephrol* 1993, 39 (3): 158-165.
106. **Van Boven** AJ, Jukema JW, Zwinderman AH, Crijns HJ, Lie KI, Brusckhe AV. Reduction of transient myocardial ischemia with pravastatin in addition to the conventional treatment in patients with angina pectoris. REGRESS Study Group. *Circulation* 1996, 94 (7): 1503-1505.
107. **Walport** MJ. Complement. Second of two parts. *N Engl J Med* 2001, 344 (15): 1140-1144.
108. **Wegmüller** E, Kazatchkine MD, Nydegger UE. Complement activation during extracorporeal blood bypass. *Plasma Ther Transfus Technol* 1983, 4: 361-371.
109. **Weintraub** M, Rassin T, Eisenberg S, Ringel Y, Grosskopf I, Iaina A, Charch G, Lipron M, Rubinstein A. Continuous intravenous heparin administration in humans causes a decrease in serum lipolytic activity and accumulation of chylomicrons in circulation. *J Lipid Res* 1994, 35 (2): 229-238.
110. **Wilson** PW, Garrison RJ, Castelli WP, Feinleib M, McNamara PM, Kannel WB. Prevalence of coronary heart disease in the Framingham offspring study: role of lipoprotein cholesterol. *Am J Cardiol* 1980, 46: 649-654.
111. **Windler** E. Lipidtherapie. Prävention arteriosklerotischer Herz-Kreislauf-Erkrankungen. *Internist* 2001, 42: 92-110.
112. **Yokoyama** S, Hayashi R, Satani M, Yamamoto A. Selective removal of low density lipoprotein by plasmapheresis in familial hypercholesterolemia. *Arteriosclerosis* 1985, 5 (6): 613-622.

8. Danksagung

Mein größter Dank gilt Herrn Prof. W. Samtleben für die Übernahme der vorliegenden Arbeit, für die rasche und anregende Korrektur Dieser, aber auch für seine vorbildliche und engagierte klinisch-internistische und nephrologische Ausbildung. Ich bin froh unter seiner freundlichen und motivierenden Leitung arbeiten zu dürfen.

Gerne würde ich mich noch persönlich bei Herrn Prof. Dr. Dr. T. Bosch für das Überlassen des Themas dieser Doktorarbeit und für die Betreuung, die informativen Diskussionen und auch seine Vorbildfunktion als Wissenschaftler bedanken. Leider verstarb Herr Prof. Dr. Dr. Bosch viel zu zeitig, so dass mein persönlicher Dank nicht direkt an ihn gerichtet werden kann.

Natürlich gilt mein Dank meinen Eltern, die es mir ermöglichten zwei Studiengänge zu absolvieren, zu meinen Entscheidungen standen und mir ihr Vertrauen schenken. Meinem Vater wünschte ich, er könne am Abschluss dieser Arbeit noch bewusst teilhaben.

Meiner Schwester und ihrer Familie, Helmut, Nadine und Madeleine, möchte ich dafür danken, dass sie mich insbesondere in der Schlussphase der Erstellung dieser Arbeit von familiären Verpflichtungen entlasten konnte und in vielen Lebenslagen immer eine Hilfe war

Weiterhin gilt mein Dank Herrn Gahr für seine Hilfe in allen Computerfragen, Frau Belschner, Frau Duhr und Frau Buttig für die Unterstützung im nephrologischen Labor.

Schließlich möchte ich den Familien Sofie und Dirk Pelster-Mogelvang sowie Christina und Stephan Hiedl-Zeller für die allgemeine Unterstützung, ihre Motivation, ihre Fürsorge und das Korrekturlesen danken.

Catrin Häberlein gebührt Dank für die Motivation und tatkräftige Unterstützung während der „Gomera-Phase“.