

Charité-Universitätsmedizin Berlin

Campus Benjamin Franklin

Aus der Klinik für Innere Medizin

Direktor: Professor Dr. med. E. Thiel

Abteilung für Innere Medizin III, Hämatologie, Onkologie und Transfusionsmedizin

Hirudin als in vitro-Antikoagulans in
Universalblutentnahmeröhrchen (UBT's)

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der Charité-Universitätsmedizin Berlin

vorgelegt von: Natascha Brandt
aus Stuttgart

Referent: Priv.-Doz. Dr. med. H.-D. Menssen

Korreferenten: Prof. Dr. med. E. Köttgen

Prof. Dr. med. L. Röcker

Gedruckt mit der Genehmigung der Charité-Universitätsmedizin Berlin

Campus Benjamin Franklin

Promoviert am 01. Juni 2008

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|----|
| I. Einleitung | 01 |
| I.1 Fragestellung | 05 |
| II. Material und Methoden | 07 |
| II.1 Studienkollektiv und Studiendurchführung | |
| II.2 Herstellung der Stammlösung und Zubereitung der Blutentnahmeröhrchen | 08 |
| II.3 Die Blutentnahme | |
| II.4 Experimente zur Ermittlung einer optimal antikoagulierenden Hirudin- konzentration im Blutentnahmeröhrchen | 10 |
| II.4.1 Visuelle Überprüfung der Gerinnung in Hirudin-antikoagulierte[m] Blut | 11 |
| II.4.2 Visuelle und mikroskopische Überprüfung der Gerinnung in Hirudin- antikoagulierte[m] Blut | 12 |
| II.4.3 Überprüfung der ermittelten optimalen Hirudinaktivität (1000 ATU/ml) und erste automatisierte Blutbilddiagnostik | |
| II.5 Hämatologische Messungen und Messmethoden | |
| II.6 Klinisch-chemische Messungen und Messmethoden | 14 |
| II.7 Wiederholungsmessungen hämatologischer und klinisch-chemischer Messparameter | 15 |
| II.7.1 Wiederholungsmessungen hämatologischer Messparameter | |
| II.7.2 Wiederholungsmessungen klinisch-chemischer Messparameter | 17 |
| II.8 Spezialuntersuchungen | |
| II.8.1 Hämatologische Versuche mit Kaliumchlorid, Kaliumbicarbonat und Lithiumchlorid als Zusätze zum hirudinierte[m] Blut | |
| II.8.2 Antikörperbestimmungen und Virusnachweise gegen Cytomegalieviren (CMV), Hepatitis-B und -C, HIV und HCV | 18 |
| II.8.3 Nachweis der Expression des Wilmstumorgens WT1 mittels PCR | |
| II.8.4 Bestimmung der quantitativen Immunglobuline im Blut | |
| II.8.5 Analyse tiefgefrorener Blutproben | 19 |
| II.8.6 Hormonbestimmungen | |

| | | |
|-----------|--|----|
| II.9 | Statistik | 19 |
| III. | Ergebnisse | 23 |
| III.1 | Die optimal antikoagulierende Hirudinkonzentration pro Blutentnahmeröhrchen | |
| III.1.1 | Visuelle Überprüfung des Gerinnungsverhaltens Hirudin-antikoagulierten Blutes im Blutentnahmeröhrchen mit variablen Hirudinkonzentrationen und zu verschiedenen Zeitpunkten | |
| III.1.2 | Visuelle und mikroskopische Überprüfung des Gerinnungsverhaltens Hirudin-antikoagulierten Blutes im Blutentnahmeröhrchen/Blutausstrichpräparat mit variablen Hirudinkonzentrationen und zu verschiedenen Zeitpunkten | 26 |
| III.1.3 | Zusammenfassung der Untersuchungsergebnisse zur Ermittlung einer optimal antikoagulierenden Hirudinkonzentration im Blutentnahmeröhrchen | 29 |
| III.1.4 | Überprüfung der ermittelten optimal antikoagulierenden Hirudinkonzentration (1000 ATU/ml) und automatisierte Blutbilddiagnostik | 31 |
| III.2 | Wiederholungsmessungen hämatologischer und klinisch-chemischer Messparameter | |
| III.2.1 | Unmittelbar hintereinander gemessene hämatologische Wiederholungsmessungen | |
| III.2.2 | Hämatologische Wiederholungsmessungen in größeren Zeitabständen | 33 |
| III.2.3 | Klinisch-chemische Wiederholungsmessungen | |
| III.3 | Vergleichende Untersuchungen der Blutbilder aus hirudiniertem und K ₂ -EDTA-antikoaguliertem Blut unter Einbeziehung der Referenzwerte | 34 |
| III.3.1 | Hämatologische Laboruntersuchungen der Blutwerte gesunder Probanden (kleine Blutbilder, Automaten- und Handdifferentialblutbilder) | |
| III.3.2 | Hämatologische Laboruntersuchungen der Blutwerte von Patienten | 35 |
| III.3.3 | Statistische Auswertung der hämatologischen Messergebnisse | |
| III.3.3.1 | Statistische Auswertung der Korrelationskoeffizienten | 36 |
| III.3.3.2 | Statistische Auswertung der Bland-Altman-Plots gesunder Probanden | 37 |
| III.3.3.3 | Statistische Auswertung der Bland-Altman-Plots erkrankter Probanden | 40 |
| III.4 | Vergleichende Untersuchungen der klinisch-chemischen Routineparameter aus Hirudinplasma und Serum unter Einbeziehung der Referenzwerte | 43 |

| | | |
|-------------|---|----|
| III.4.1 | Klinisch-chemische Laboruntersuchungen der Blutwerte gesunder Probanden | 43 |
| III.4.2 | Klinisch-chemische Laboruntersuchungen der Blutwerte von Patienten | 45 |
| III.4.3 | Statistische Auswertung der klinisch-chemischen Messergebnisse | 46 |
| III.4.3.1 | Statistische Auswertung der Korrelationskoeffizienten | |
| III.4.3.2.1 | Statistische Auswertung der Bland-Altman-Plots gesunder Probanden | 47 |
| III.4.3.2.2 | Statistische Auswertung der Bland-Altman-Plots erkrankter Probanden | 56 |
| III.5 | Vergleichende Spezialuntersuchungen aus hirudinierten Blut und den jeweiligen Routineuntersuchungsmethoden unter Einbeziehung der Referenzwerte | 64 |
| III.5.1 | Hämatologische Versuche mit Kaliumchlorid, Kaliumbicarbonat und Lithiumchlorid als Zusätze zum hirudinierten Blut | |
| III.5.2 | Antikörperbestimmungen und Virusnachweise gegen Cytomegalieviren (CMV), Hepatitis-B und -C, HIV und HCV | 65 |
| III.5.3 | Nachweis der Expression des Wilmstumorgens WT1 mittels PCR | 66 |
| III.5.4 | Bestimmung der quantitativen Immunglobuline im Blut | |
| III.5.5 | Hormonbestimmungen und Elektrophorese | |
| III.5.6 | Klinisch-chemische Laboruntersuchungen tiefgefrorener Blutproben | |
| IV. | Diskussion | 71 |
| V. | Zusammenfassung | 79 |
| VI. | Verzeichnis der verwendeten Literatur | 81 |
| VII. | Anhang Lebenslauf Danksagung | 87 |

I. Einleitung

Hirudo medicinalis, der europäische Blutegel, ist bereits seit über 100 Jahren für seine blutverdünnenden Fähigkeiten bekannt. Erstmals wurde seine antikoagulierende Eigenschaft im Jahre 1884 erkannt (Haycraft 1884¹ und Jacoby 1904²). Das Hirudin genannte antikoagulierende Agens, das zwanzig Jahre später zum ersten Mal isoliert werden konnte (Shinoya 1927³), produziert der Egel in seiner Speicheldrüse. In den späten 50er Jahren gelang es Markwardt, die blutverdünnenden Stoffe des Egels systematisch zu isolieren. Zudem charakterisierte er die polypeptidische Struktur des Hirudins (Markwardt 1957⁴). Natürliches Hirudin ist ein einkettiges carbohydratefreies Polypeptid, das sich aus 65 oder 66 Aminosäuren zusammensetzt und drei intramolekulare Disulfidbrücken und einen schwefelsauren Tyrosin-Rückstand enthält. Sein Molekulargewicht beträgt 7 KD.

Hirudin bindet mit seinem NH₃-Ende an Thrombin und blockiert so mit seinem COOH-Terminus das Ende des Thrombinmoleküls, das für die Interaktion mit dem Fibrinogenmolekül wichtig ist. In dem es die Bildung der Fibrinfaser und somit die gesamte Fibrin-Netzbildung unterbricht, verhindert Hirudin die Umwandlung von Fibrinogen zu Fibrin. In den Fibrinnetzen, zu denen sich die Fibrinfaser bei normalen Gerinnungsvorgängen bilden, bleiben wiederum Thrombozyten und Erythrozyten hängen, wodurch zunächst ein kleines Blutgerinnsel entsteht, aus dem schließlich ein Thrombus heranwachsen kann. Die vielen sauren Reste, die sich wiederum um das COOH-Ende des Hirudinmoleküls bilden, wirken in der Gerinnungskaskade *in vivo* hemmend auf Vorstufen des Prothrombinkomplexes, weil sie die Umwandlung von Faktor VIII zu Faktor VIIIa und von Faktor V zu Va verhindern (Markwardt, 1989⁵). So hemmt Hirudin die Blutgerinnung. In der Natur vorkommendes Hirudin ist am Thyrosin der Position 63 der Peptidstruktur posttranslational sulfatiert.

Die Entdeckung der Möglichkeit der industriellen Produktion von rekombinantem Hirudin (Harvey et al. 1986⁶, Bergmann et al. 1986⁷, Bender et al. 1990⁸, Benatti et al. 1991⁹, Lehmann et al. 1993¹⁰, Weydemann et al. 1995¹¹) führte zu dessen vorklinischen Evaluierung, klinischer Erprobung und schließlich zur Zulassung für die Patientenbehandlung. Dabei stellte sich heraus, dass die biologische Aktivität und die antikoagulatorische Potenz von natürlichem und rekombinant desulfatiertem Hirudin sehr ähnlich ist (Stringer et al. 1993¹², De Fillippis et al. 1999¹³). Daher wurde auch der Einsatz von rekombinantem desulfatiertem Hirudin als *in vivo* Antigerinnungsmittel für eine Vielzahl von medizinischen Indikationen intensiv klinisch erforscht und bestätigt wie der tiefen Venenthrombose (Agnelli et al. 1997¹⁴,

Schiele et al. 1997¹⁵, Eriksson et al. 1997¹⁶), akuten Koronararterien-Syndromen (Topol et al. 1994¹⁷, Serruys et al. 1995¹⁸, Bates 1997¹⁹, Meyer et al. 1998²⁰, Neuhaus et al. 1999²¹, Merlini et al. 2000²², Alt et al. 2000²³) und Lipopolysaccharid (LPS)-indiziertem Schock (Siebeck et al. 1997²⁴). Darüber hinaus wird desulfuriertes Hirudin Patienten verordnet, die kontinuierlich mit Hämodialyse behandelt werden (van Wyk et al. 1995²⁵, Fischer et al. 1999²⁶) oder an einer schweren Heparin-induzierten Thrombozytopenie leiden (Schiele et al. 1995²⁶, Greinacher et al. 1999²⁷, Koster et al. 2000²⁸). Inzwischen wird rekombinantes Hirudin als wesentlicher Wirkstoff von Refludan[®] und Revasc[®] therapeutisch eingesetzt. Während Refludan[®] bei Heparin-assoziiierter Thrombozytopenie (Typ II) und thromboembolischen Erkrankungen, die eine parenterale antithrombotische Therapie erfordern, zugelassen ist, wird Revasc[®] als Prophylaxe gegen tiefe Beinvenenthrombosen bei Patienten angewendet, die sich einer elektiven Hüft- oder Kniegelenkoperation unterziehen. Rekombinantes Hirudin besteht aus 64 bis 67 Aminosäuren und hat ebenfalls ein Molekulargewicht von 7 KD. Das aminoternale Ende des Lyophilisats (Rhein Biotech GmbH[®], Düsseldorf, Deutschland), das für die Untersuchungen in dieser Arbeit als Stammlösung des rekombinanten Hirudins eingesetzt wurde, besteht aus der Aminosäurefolge Valin-Valin-Thyrosin oder Isoleucin-Threonin-Thyrosin. Dieser Terminus ist für die irreversible non-kovalente Hirudin-Thrombin-Bindung verantwortlich.

Auf Grund seiner hoch spezifischen Wechselwirkung mit Thrombin beeinträchtigt Hirudin praktisch keine anderen löslichen Blutbestandteile. Daher lässt sich annehmen, dass Hirudin auch diagnostische Blut-Testsysteme kaum beeinflussen würde und somit ein ideales Antikoagulans bei der Routineblutdiagnostik sein könnte. Rekombinant hergestelltes Hirudin könnte, eingesetzt in einem Blutentnahmeröhrchen, menschliches Vollblut so antikoagulieren, dass aus einer einzigen Blutprobe die hämatologischen und klinisch-chemischen Routineparameter sowie immunologische und physikalische Parameter untersucht werden könnten.

So könnte der Einsatz von Hirudin den konventionellen Ablauf der Blutanalyse im Krankenhaus im Sinne der Patienten, aber auch organisatorisch erheblich vereinfachen. Denn der zur Zeit übliche organisatorische Ablauf der Blutanalyse von der Blutentnahme beim Patienten bis zur Aufarbeitung in den verschiedenen Laboratorien ist im Wesentlichen durch die methodisch erforderliche, unterschiedliche Vorbehandlung des Vollblutes bestimmt. So werden für die Bestimmung der klinisch-chemischen Routineparameter beispielsweise chemische, enzymatische oder immunologische Indikatorsysteme eingesetzt, die aus dem

flüssigen Anteil des Untersuchungsmaterials bestimmt werden. Dazu wird vollständig geronnenes Blut zentrifugiert (Serum) oder das Blut wird durch Zusatz von K_2 -EDTA, Citrat, Heparin oder Hirudin zunächst antikoaguliert, dann zentrifugiert und anschließend der Überstand (Plasma) abpipetiert.

Bei den Blutbildbestimmungen werden die Anzahl der Morpho- und der Blutzellen pro Volumeneinheit bestimmt. Dafür müssen die Blutzellen zum Zeitpunkt der Untersuchung vital sein. Entsprechend ist zur Durchführung hämatologischer Routineuntersuchungen eine antikoagulatorische Vorbehandlung des Blutes zwingend erforderlich. Gleichzeitig darf das Blut jedoch in seinen Volumenanteilen nicht durch einen Untersuchungszusatz verändert werden, was Verfälschungen der Messwerte zur Folge hätte. Daher ist das Verhältnis zwischen entnommener Blutmenge und der jeweiligen Antikoagulans genau festgelegt. In der gängigen Praxis wird das Blut für hämatologische Untersuchungen meist mit K_2 -EDTA antikoaguliert.

Da K_2 -EDTA in Blutplasma gelöste Ionen komplexiert, kann es grundsätzlich nicht zur Bestimmung einiger klinisch-chemischer Routineparameter wie der Elektrolyte (Natrium, Kalium, Kalzium, Magnesium und Phosphat) eingesetzt werden. Dasselbe gilt für das Antikoagulans Kalziumzitrat, das weltweit für die Bestimmung der Gerinnungsparameter in der klinischen Chemie (z.B. Quickwert, aPTT, TP, Fibrinogen, ATIII) und der Einzelfaktoren der Gerinnungsphysiologie eingesetzt wird und dabei nicht durch andere Antikoagulanzen wie K_2 -EDTA oder Heparin ersetzt werden kann, ohne dass die Messergebnisse in unkontrollierbarer Weise verfälscht werden würden. Wiederum andere Antikoagulanzen (z.B. Natriumheparinat) verursachen Interferenzen mit verschiedenen chemischen und photometrischen Indikatorsystemen zum Nachweis der molekular sehr unterschiedlichen über 100 klinisch-chemischen Messparameter (z. B. Schwermetallnachweis, Medikamentenspiegelbestimmungen und Nachweis von Vergiftungen).

Daher müssen in der klinischen Routine, verglichen z. B. in den Krankenhäusern Charité (Berlin) und Neuperlach (München), abhängig von den klinischen Erfordernissen des Patienten und den sich daraus ableitenden erforderlichen Laboruntersuchungen, pro Blutentnahme momentan zwischen einem und neun Blutentnahmeröhrchen abgenommen werden. Dabei ist neben der Anzahl auch die Art der Blutentnahmeröhrchen (z. B. Serum-, EDTA-, Zitrat- oder Glukoseröhrchen) bereits vor der Blutentnahme genau festgelegt. Nach der Blutentnahme werden die Röhrchen in die jeweils zuständigen Labore transportiert, die gerade in größeren Krankenhäusern meistens räumlich voneinander getrennt sind. So existieren in den meisten größeren Kliniken separate Labore für hämatologische und klinisch

chemische Blutuntersuchungen sowie oft weitere für speziellere Blutuntersuchungen (wie Virusnachweise und Immunophenotypisierung). Deshalb wird in vielen Kliniken auch ein hauseigener Hol- und Bringdienst unter anderem mit dem Transport der Blutentnahmeröhrchen beschäftigt. In den jeweiligen Laboren werden die Blutentnahmeröhrchen sortiert und gegebenenfalls zentrifugiert, bevor sie an die unterschiedlichen Arbeitsplätze weitergereicht werden. Die Messapparate müssen dann mit jeweils feststehenden Blutvolumina gefüllt werden (zwischen 10 und 100 µl Vollblut, Serum oder Plasma), bevor die automatischen Messungen starten, die zwischen wenigen Sekunden bis zu einigen Minuten (bei den meisten Messungen rund fünf Minuten) dauern. Anschließend werden die Testergebnisse ausgedruckt und der Absende-Station per Telefon oder über das Intranet kommuniziert oder persönlich überbracht.

Deshalb ist es momentan erforderlich, dass den Patienten, abhängig von der Art und der Anzahl der notwendigen Blutuntersuchungen, zwischen einem und neun Blutentnahmeröhrchen mit jeweils zwei bis zehn Milliliter Blut abgenommen werden. Das kann im Fall von ernsthaft erkrankten Patienten, die meist über einen längeren Zeitraum hinweg täglich eine oder zwei Blutentnahmen erdulden müssen, zu einem Blutverlust von bis zu 250 Milliliter pro Woche führen. Dies entspricht der Hälfte der Höchstmenge, die Frauen vier Mal und Männer sechs Mal pro Jahr beim Deutschen Roten Kreuz spenden dürfen. Was ein umso entscheidenderer Nachteil ist, wenn man bedenkt, dass schwer erkrankte Patienten oft an einer von unterschiedlichen Ursachen bedingten Anämie leiden.

Darüber hinaus sind die zahlreichen notwendigen Blutentnahmevorgänge ein nicht unerheblicher Kostenfaktor in der medizinischen Versorgung. Denn neben den Einkaufskosten für die Blutentnahmeröhrchen fallen auch nicht zu vernachlässigende Entsorgungskosten an. Momentan werden Blutentnahmeröhrchen als infektiöser Nassmüll klassifiziert und müssen zur Entsorgung in speziellen Behältern verbrannt werden. Im Fall von ernsthaft kranken Menschen werden pro Woche bis zu 40 Blutentnahmeröhrchen benötigt, die schließlich entsorgt werden müssen.

Aus den geschilderten Beispielen wird deutlich, dass der Einsatz von Hirudin als in vitro-Antikoagulans für hämatologische und klinisch-chemische Routineparameter sowie eine Vielzahl weiterer Blutuntersuchungen die Unannehmlichkeiten der Patienten bei der Blutabnahme vermindern könnte, in dem es die Anzahl der für die Laboranalyse notwendigen Blutröhrchen von je nach Untersuchungsumfang bis zu acht auf bis zu drei vermindern und dadurch Kosten einsparen könnte. Dafür müssten allerdings die momentan üblichen Routine-

Meßmethoden möglicherweise nach geringfügiger Anpassung an das rekombinante Hirudin vollständig und zuverlässig angewendet werden können.

Sollte es in einem nächsten Schritt dann auch noch möglich sein, mit hirudinierten Blutproben hämatologische, klinisch-chemische sowie weitere Laboranalysen an einem einzigem automatisierten Messplatz durchzuführen, könnte der Einsatz von Hirudin nach erforderlichen Anschubinvestitionen erhebliche weitere logistische Kosten einsparen.

Zunächst muss allerdings gezeigt werden, dass Hirudin ebenso zuverlässig und wirkungsvoll ist wie die momentan eingesetzten Antikoagulanzen.

I.1 Fragestellung

In dieser Arbeit wurde die Einsatzmöglichkeit und Zuverlässigkeit von Hirudin als *in vitro*-Antikoagulans in der Blutwertanalyse untersucht. In vergleichenden Probanden- und Patientenserien wurde untersucht, in welchem Ausmaß die Messreihen von einer Vielzahl Hämatologischer und Klinisch-chemischer Routineparameter, die aus Hirudinblut oder dem Standardsubstrat mit den gleichen Messmethoden bestimmt wurden, übereinstimmen.

Neben den Untersuchungen der hämatologischen und klinisch-chemischen Routineparameter wurden auch verschiedene Spezialuntersuchungen durchgeführt, wie Antikörper- und Hormonbestimmungen, Virus- und Gen-Nachweise, die Immunoglobuline quantitativ, Elektrophorese und die PCR. Darüber hinaus wurde die Einsatzmöglichkeit gefrorenen Hirudinplasmas für die Routinediagnostik und der Einfluss von Kaliumionen (Kaliumchlorid, Kaliumbikarbonat und Lithiumchlorid als Kontrolle) auf die Morphologie der Blutzellen (insbesondere Erythrozytengröße und Diskriminierbarkeit der Blutzellen beim automatisierten Differentialblutbild) untersucht. Mehrfachmessungen in unterschiedlichen zeitlichen Abständen sollten die Validität der Messwerte aus hirudiniertem Blut sicherstellen oder auf mögliche technische Probleme der Messautomaten hinweisen. Alle Resultate wurden mit den nach den jeweiligen Standardmethoden ermittelten Kontrollergebnissen und dafür zulässigen Referenzbereichen verglichen. Zur Beurteilung der Übereinstimmung der Messungen aus den zwei unterschiedlichen Substraten (Hirudinblut und Standardsubstrat) wurde im Wesentlichen der Residuenplot nach Bland und Altman (Bland et al. 1995²⁹) durchgeführt.

Konkret sollten folgende Fragen in der Studie beantwortet werden:

1. In welcher Dosis hemmt Hirudin am effektivsten die Blutgerinnung in einem Blutentnahmeröhrchen menschlichen Blutes?
2. Haben unterschiedlich aufgereinigte Hirudinchargen eine unterschiedliche antikoagulatorische Wirkung?
3. Sind in Hirudinblut erhobene Messergebnisse in wiederholter Messung reproduzierbar?
4. Sind Messergebnisse, die aus Hirudin-antikoagulierten Blutproben gewonnen wurden, innerhalb der hämatologischen und klinisch-chemischen Routineuntersuchungen ebenso zuverlässig wie Messergebnisse der jeweiligen Standard-Entnahmeröhrchen?
5. Sind Messergebnisse von Hirudin-antikoagulierten Blutproben auch in verschiedenen Spezialuntersuchungen (Blutuntersuchungen zum Virusnachweis, Antikörper- und Hormonbestimmungen, quantitative Immunglobuline, Elektrophorese) ebenso zuverlässig wie Messergebnisse der jeweiligen Standard-Entnahmeröhrchen?
6. Sind Messungen klinisch-chemischer Parameter aus länger eingefrorenen Hirudinplasma-proben zuverlässig möglich?

II. Material und Methoden

II.1 Studienkollektiv und Studiendurchführung

Die vorliegende Studie wurde an der Charité, Universitätsmedizin Berlin, im Campus Benjamin Franklin durchgeführt. Das Untersuchungsmaterial setzte sich aus 107 Proben von erwachsenen Freiwilligen zusammen. 53 von den Blutproben stammten von gesunden Probanden und 54 von Patienten des Universitätsklinikums. Die gesunden Blutspender waren Erwachsene zwischen 20 und 30 Jahren, wobei das Verhältnis zwischen Frauen und Männern 3 zu 5 betrug. Die Patienten litten an verschiedenen chronischen und akut internistischen Erkrankungen. In die Untersuchung gingen Blutproben von hämatologisch-onkologischen, kardiologischen, pulmonologischen, nephrologischen und gastroenterologischen Patienten ein mit so ernsten Erkrankungen wie terminaler Niereninsuffizienz, akuter Myokardinfarkt und Non-Hodgkin-Lymphom. Einige der Patienten wurden intensiv-medizinisch betreut. Nach Behandlungsmethoden wurde nicht unterschieden. Bei den Patienten war das Verhältnis Frauen zu Männern annähernd 1 zu 1. Das Blut von wenigen Probanden wurde mehrfach untersucht. Auf geschlechtsspezifische Betrachtung der Messergebnisse wurde grundsätzlich verzichtet. In die statistische Auswertung der hämatologischen Untersuchungen gingen schließlich die Daten von 80 Probanden ein, in die Auswertung der klinisch-chemischen Parameter die Messergebnisse von 74 Probanden.¹

Die antikoagulierende Aktivität von Hirudin wurde in Antithrombin-Einheiten pro ml Vollblut (ATU/ml) gemessen. 100 ATU Hirudin entsprechen 10 internationalen Units (IU) Heparin. Die Konzentration von K₂-EDTA betrug 1 mg pro ml Vollblut (mg/ml), die von Heparin 75 IU pro ml Vollblut (IU/ml).

¹ Gründe für die Reduktion der Anzahl der Blutproben waren, dass Proben von eigentlich als gesund gemeldeten Probanden bei mindestens einem Untersuchungsparameter erhöhte Werte hatten oder die Probanden offensichtlich krank, alkoholisiert oder anderweitig beeinträchtigt zur Blutentnahme erschienen. Zudem traten technische Probleme an der Messapparatur auf, Differentialblutausstrichpräparate zerbrachen und Blutentnahmeröhrchen mussten wegen fehlender, fehlerhafter oder verwischter Beschriftung aus der Untersuchung genommen werden.

II.2 Herstellung der Stammlösung und Zubereitung der Blutentnahmeröhrchen

Zur Herstellung der Stammlösung wurden jeweils 0,7 ml Aqua ad Injectabile (Braun[®], Melsungen, Deutschland) in eine Cuvette mit 4,25 mg wasserlösliches Hirudinlyophilisat aus der Hefe *Hansenula polymorpha* (Rhein Biotech[®], Düsseldorf, Deutschland) hineinpipettiert (Weydemann, 1995¹¹). Dabei handelte es sich um in Position 65 desulfiziertes Hirudin, das in drei unterschiedlichen Chargen vorlag, deren antikoagulatorische Equipotenz angenommen und durch Experimente (siehe III.1.) bestätigt wurde. Nach Herstellerangaben waren die unterschiedlichen Hirudinchargen unter anderem mittels HPLC eindeutig charakterisiert. 25 µl dieser Stammlösung ergab nach ihrer Verdünnung in drei Milliliter menschliches Vollblut (Standardmenge je Hirudin-Blutentnahmeröhrchen pro ml in der Studie) eine spezifische Aktivität von 1 000 Anti-Thrombin-Units (ATU) pro 1 ml Vollblut. Die Stammlösung wurde entweder sofort eingesetzt oder höchstens bis zu einer Woche lang in einem Kühlschrank bei vier Grad Celsius aufbewahrt.

Als Blutentnahmeröhrchen wurden Glasröhrchen mit Gummikorken (Becton Dickinson[®], Heidelberg, Deutschland) eingesetzt, die maximal fünf Milliliter Vollblut fassen. Diese wurden zunächst möglichst schnell unter einem Keimabzug entkorkt, um das vorhandene Vakuum im Röhrchen zu lösen und sicherzustellen, dass die Luft dabei keimfrei ist. Anschließend wurde das von der geplanten ATU/ml-Konzentration abhängige Volumen der Hirudinlösung (2,5 µl pro 100 ATU/ml für 3 ml menschliches Vollblut) aus der Cuvette herauspipettiert und in das Blutentnahmeröhrchen hineinpipettiert. Vor jeder Blutentnahme wurden das Blutentnahmeröhrchen erneut geöffnet und nachdem es mit exakt drei Milliliter Probanden-Blut über eine Einwegspritze befüllt wurde, möglichst rasch wieder verschlossen. Als Kontrollröhrchen wurden konfektionierte Blutentnahmeröhrchen (Vakutainer[®] von Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) eingesetzt, die entweder mit K₂-EDTA (1 mg/ml für 4 ml Blut), Heparin (75 IU/ml für 10 ml Blut) oder Zitrat (500 µl für 4,5 ml Blut) bestückt waren oder einen koagulationsfördernden Zusatz als Trenngel (10 ml Blut) hatten (Serumröhrchen). Die Serumröhrchen treten in Tabellen auch unzentrifugiert als „Blut nativ“- Proben auf.

II.3 Die Blutentnahme

Aus praktischen Gründen wurden die Blutentnahmen zusammen mit verschiedenen Stationschwestern zu zweit durchgeführt. Sie fanden unabhängig von der Nahrungsaufnahme

und der Tageszeit unter normalen Raumbedingungen im Krankenhaus statt. Nach grünlicher Desinfektion der Punktionsstelle mit Alkohol wurde den Probanden bei gestautem Oberarm eine Ellenbogen- oder Unterarmvene punktiert. Anschließend wurde ihnen in liegender Position venöses Blut abgenommen. Zunächst wurden die für die Gewinnung von Vergleichs- und Kontrollwerten eingesetzten K₂-EDTA- und Serum- sowie für manche Experimente zusätzlich Natrium-Heparinat-Röhrchen abgenommen. Dafür wurden die Standard-Blutentnahmeröhrchen (Vakutainer® von Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) am Korke durchstoßen, den Anweisungen des Herstellers entsprechend mit einem Nadelsystem (Butterfly) verbunden und mit dem Vollblut der Probanden gefüllt. Anschließend wurden über denselben Butterfly 10ml- und 20ml-Einwegspritzen ohne Antikoagulans (Braun®, Melsungen, Deutschland) mit dem Blut derselben Probanden gefüllt, wovon exakt drei Milliliter sofort in die vorbereiteten Hirudinröhrchen gefüllt wurden. Anschließend wurden die gefüllten Blutentnahmeröhrchen, die bereits vor der Blutentnahme beschriftet worden waren, alle zehn Minuten für circa acht Sekunden hin- und hergeschwenkt, um eine möglichst schnelle Vermischung des Blutes mit dem Antikoagulans zu erreichen. Anschließend wurden sie persönlich entsprechend der Zuständigkeit in das Hämatologische Zentrallabor, das Klinisch-Chemische Zentrallabor oder (bei Spezialuntersuchungen wie den Virusnachweisen und die Antikörperbestimmungen) in externe Laboratorien des Universitätsklinikums der Charité, Campus Benjamin Franklin in Berlin transportiert. Während die Blutröhrchen der gesunden Probanden beim fachgerechten krankenhausinternen Transport dabei für ungefähr fünf Minuten ohne Schutz vor Temperaturschwankungen im Freien befördert wurden, blieben die Blutproben der Patienten ständig im Haus. Beim Transport in die externen Laboratorien wurden sämtliche Blutentnahmeröhrchen fachgerecht in Styroporkästen transportiert. Wenn Wartezeiten zwischen der Blutentnahme und der Blutwertanalyse auftraten, wurden die Röhrchen gelegentlich geschwenkt. In den hausinternen Laboratorien konnten die Analysen der Blutproben nach einer Vereinbarung mit den zuständigen Laborleitern direkt nach den täglichen Routineblutwertuntersuchungen der Krankenhauspatienten durchgeführt werden. Zunächst wurden alleine oder mit Unterstützung einer oder eines Medizinisch-Technisch-Assistentin/-en im Hämatologischen Zentrallabor die hämatologischen Blutwerte der Hirudinprobe und der jeweiligen K₂-EDTA-Kontrolle untersucht. Anschließend wurden sämtliche Hirudinproben und ihre Serumkontrollen zentrifugiert und in das Klinisch-chemische Zentrallabor transportiert, wo die klinisch-chemischen Laborparameter bestimmt wurden. Sämtliche hämatologischen und klinisch-chemischen Laborergebnisse konnten

durchschnittlich innerhalb von sechs Stunden bestimmt werden und lagen noch am Untersuchungstag in Form von Ausdrucken vor. Die Gennachweise von WT1 aus EOL1-Leukämieblasten wurden zusammen mit einem Medizinisch Technischen Assistenten (Herr Leben) in einem für die AG Dr. Menssen zur Verfügung gestellten Labor durchgeführt. Die übrigen Spezialuntersuchungen, deren Ergebnisse durchschnittlich innerhalb von einer Woche vorlagen, wurden in externen Laboratorien des Universitätsklinikums der Charité Berlin, Campus Benjamin Franklin, durchgeführt.

II.4 Experimente zur Ermittlung einer optimal antikoagulierenden Hirudinkonzentration im Blutentnahmeröhrchen

Dieses Experiment hatte zum Ziel, die Hirudinkonzentration zu ermitteln, die menschliches Vollblut im Blutentnahmeröhrchen optimal antikoaguliert. Dazu wurde visuell untersucht, ob bei unterschiedlichen Hirudinkonzentrationen zwischen 100 bis 2000 ATU/ml Minigerinnsel in den jeweiligen Blutproben auftreten, in dem die Blutentnahmeröhrchen gegen Licht gehalten wurden. Zusätzlich wurden Blutausstrichpräparate angefertigt, die mikroskopisch auf das Vorhandensein von Mikrogerinnseln untersucht wurden. Dabei wird unter einem Minigerinnsel ein gerade noch sichtbares korpuskuläres oder fadenförmiges Gebilde verstanden, das als Ausdruck einer beginnenden oder räumlich begrenzten Gerinnung einzuschätzen ist. Mini- oder Mikrogerinnsel, die in ansonsten vollständig antikoaguliertem Blut frei flottieren, finden sich gelegentlich auch in K₂-EDTA antikoaguliertem Blut und können zu Verfälschungen der Messergebnisse führen. Davon abzugrenzen sind Blutkoagel, die als größere Blutpfropfen (>0,25 cm Durchmesser) die Fließfähigkeit des Blutes stören und als Ausdruck der vollständigen Gerinnung zu verstehen sind. Die Blutausstriche wurden nach der Methode der Standard Pappenheim Färbung fünf Minuten mit Giemsa (Differentialfärbung methanolfixierter Blut- und Knochenmark-Ausstriche mit Azur-Eosin-Methylenblau-Lösung) und 15 Minuten mit May-Grünwald (Blutkörperchenfärbung mit eosinsaurem Methylenblau) gefärbt. Anschließend wurden die Präparate jeweils für circa fünf Minuten unter einer Vergrößerung von 1:630 mikroskopiert. Zur Kontrolle wurden pro Proband drei Blutproben in gebrauchsfertigen Blutentnahmeröhrchen untersucht: eines ohne Zusatz, eines mit Heparin und das dritte mit K₂-EDTA als Antikoagulans. Gleichzeitig wurde untersucht, ob sich unterschiedlich aufgereinigte Formen des Hirudin-Lyophilisats[®] (Rhein Biotech GmbH, Düsseldorf, Deutschland) in ihrer antikoagulatorischen Wirkung unterscheiden. Dafür wurden in einem verblindeten Experiment zufallsgesteuert drei unter-

schiedlich aufgereinigte Hirudinchargen (siehe Tabelle 1) eingesetzt, von deren Gesamtproteinmenge, Reinheit und spezifischen Aktivität erst nach Abschluss der Untersuchung bekannt gegeben wurde. Bei allen drei Chargen handelte es sich um in Position 65 desulfatiertes Hirudin, das sich in der Homogenität der rekombinanten Hirudinmoleküle unterschied, die bei der Expression des Hirudins in *Hansenula polymorpha* entstehen. Charge I war die höchstaufgereinigte Charge, bei der mehr als 98% aller Hirudinmoleküle 65 oder 66 Aminosäuren lang waren, gefolgt von Charge II (95 - 98%) und Charge III (90 - 95%).

Tabelle 1: Die untersuchten Chargen des rekombinant hergestellten Hirudin-Lyophilisats (Rhein Biotech, Düsseldorf, Deutschland)

| Hirudin | Gesamtprotein in mg (nach Lowery) | Reinheit bezüglich der 65-66 Aminosäuren und Reaktion in Prozent | Spezifische Aktivität in ATU/ml Hirudinlyophilisat |
|------------|------------------------------------|--|--|
| Charge I | 7,1 | > 98 | 22800 |
| Charge II | 9,4 | 95-98 | 22800 |
| Charge III | 12,5 | 90-95 | 21400 |

II.4.1 Visuelle Überprüfung der Gerinnung in Hirudin-antikoaguliertem Blut

Blut von gesunden Probanden wurde eingesetzt, um visuell die Gerinnung von hirudiniertem Vollblut mit verschiedenen Hirudinkonzentrationen zu unterschiedlichen Zeitpunkten sowie den antikoagulierenden Effekt von unterschiedlich aufgereinigten Hirudinchargen zu untersuchen. Dazu wurden im ersten Experiment Blutproben von zwei gesunden Probanden mit Hirudin der drei verschiedenen Chargen in den Konzentrationen 100 ATU/ml, 200 ATU/ml, 300 ATU/ml, 400 ATU/ml und 500 ATU/ml eingesetzt. Die visuelle Überprüfung der Blutröhrchen erfolgte stündlich von Stunde null bis Stunde 48. Um die Pünktlichkeit der Auswertung sicherzustellen, half bei der Durchführung und Auswertung dieser Experimente ein Wecker. Im zweiten Experiment mit Blutproben von drei gesunden Probanden betragen die Hirudinkonzentrationen 100 ATU/ml, 200 ATU/ml, 400 ATU/ml, 600 ATU/ml, 800 ATU/ml und 1000 ATU/ml. Sie wurden zur Stunde null und nach einer halben, einer, eineinhalb, zwei, vier, sechs, zwölf, 18, 24, 32 und 48 Stunden visuell auf Mikrogerinnung überprüft. Die Blutröhrchen wurden während der Lagerung auf einem Rollator in Bewegung gehalten.

II.4.2 Visuelle und mikroskopische Überprüfung der Gerinnung in Hirudin-antikoaguliertem Blut

In der zweiten Experimentreihe zur Ermittlung einer optimal antikoagulierenden Hirudinkonzentration im Blutentnahmeröhrchen wurden im ersten Experiment Blutproben von zwei Probanden mit Hirudin der drei Chargen in den Konzentrationen 400 ATU/ml, 600 ATU/ml, 800 ATU/ml und 1000 ATU/ml eingesetzt. Die visuellen Kontrollen erfolgten alle sechs Stunden von Stunde null bis einschließlich zur Stunde 72. Im zweiten Experiment wurden Blutproben von ebenfalls zwei gesunden Probanden verbunden mit Hirudin der drei Chargen in den Konzentrationen 600 ATU/ml, 800 ATU/ml, 1000 ATU/ml und 2000 ATU/ml eingesetzt und alle sechs Stunden von Stunde null bis einschließlich Stunde 48 visuell untersucht. Zudem wurden von allen Blutproben Blutausstrichpräparate angefertigt und zu den selben Zeitpunkten wie die visuellen Kontrollen mikroskopisch auf Mikrogerinnbildung analysiert. Die Auswertung der Blutausstrichpräparate erfolgte innerhalb weniger Tage nach der Blutentnahme durch unabhängige Medizinisch Technische Assistentinnen und Assistenten.

II.4.3 Überprüfung der ermittelten optimalen Hirudinaktivität (1000 ATU/ml) und erste automatisierte Blutbilddiagnostik

Um die in den vorangegangenen Untersuchungen ermittelte optimale Hirudinaktivität von 1000 ATU/ml zu überprüfen, wurde ihre antikoagulatorische Potenz mit der einer niedrigeren (600 ATU/ml) und der einer höheren (2000 ATU/ml) Hirudinkonzentration verglichen. Dazu wurde das Blut von vier Probanden mit Hirudin aller drei Chargen versetzt und nach null, zwei, vier-sechs, 12, 24, 48 und 72 Stunden mikroskopisch auf Mikrogerinnung im Blutausstrich untersucht. Zudem erfolgten zu allen Zeitpunkten automatisierte hämatologische Laboruntersuchungen und Handdifferenzialblutbildauswertungen.

II.5 Hämatologische Messungen und Messmethoden

Für sämtliche Laborexperimente im weiteren Verlauf der Studie wurde die in den Experimenten zur Ermittlung einer optimal antikoagulierenden Hirudinkonzentration im Blutentnahmeröhrchen ermittelte Konzentration von 1000 ATU Hirudin pro 1 Milliliter menschlichen Blutes je Hirudin-Blutentnahmeröhrchen eingesetzt. Bei allen hämatologischen Messungen wurden die hirudinierten Blutentnahmeröhrchen genau wie die Standardröhrchen

eingesetzt. Die Diagnostik erfolgte im Hämatologischen Zentrallabor der Charité Berlin, Campus Benjamin Franklin (CBF).

Für die automatisierte Blutbilddiagnostik wurden die für K₂-EDTA-Blut optimierten Zellzählautomaten Coulter STK[®] und Coulter STKS[®] (beide Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland) eingesetzt, die den Anweisungen des Herstellers entsprechend verwendet wurden. An diesen Automaten wurden das kleine Blutbild und das Differentialblutbild erstellt. Das kleine Blutbild umfasst die Anzahl der Leukozyten, Erythrozyten und Thrombozyten pro μl sowie den Hämoglobinwert in g/dl.

Im Differentialblutbild wird das prozentuale Verhältnis der unterschiedlichen weißen Blutkörperchen pro Volumeneinheit antikoagulierten Blutes im Vergleich zur Gesamtzahl der Leukozyten untersucht. Die weißen Blutkörperchen bestehen aus den Lymphozyten, Monozyten, eosinophilen Granulozyten, basophilen Granulozyten und neutrophilen Granulozyten. Die Granulozyten werden je nach Differenzierungsstadium zusätzlich noch in Stabkernige und Segmentkernige unterschieden. Für die Bestimmung der Messwerte zählen die Automaten die vitalen Blutzellen mittels elektrischer Widerstandsmessung in entsprechenden Zählkammern (50-500 fl Kanal für Leukozyten und Erythrozyten, 2-20 fl Kanal für Thrombozyten) und differenzieren sie je nach Größe (volumetrischer Ausschlag). Leukozytenpopulationen werden durch Widerstandsmessungen, volumetrische Messungen, nach Streulichtverhalten und Oberflächenstruktur im Laserstrahl sowie anhand des Gehaltes an zytoplasmatischen Granula (wichtig für die Lichtdurchlässigkeit) beurteilt und in unterschiedliche Fraktionen eingeteilt.

Zudem wurden die Erythrozytenindizes MCV, MCH und MCHC untersucht. Das mittlere Erythrozytenvolumen (MCV) ist der arithmetische Mittelwert der direkt gemessenen Einzelerythrozytenvolumina. Der mittlere zelluläre Hämoglobingehalt (MCH) und die mittlere zelluläre Hämoglobinkonzentration (MCHC) werden aus dem mittleren Erythrozytenvolumen, dem Hämoglobinwert und der Erythrozytenkonzentration berechnet.

Zusätzlich wurden von sämtlichen hirudinierten Blutproben und deren Kontrollen Ausstrichpräparate angefertigt, was im klinischen Alltag nur in Ausnahmesituationen geschieht, z. B. wenn die Unterscheidung des Messautomaten zwischen verschiedenen Zelltypen nicht eindeutig ist. Die Handdifferentialblutbilder wurden von Medizinisch-Technisch-Assistenten/innen unter einem Mikroskop bei einer Vergrößerung von 1:630 überprüft und ausgewertet.

In die Auswertung gingen am Coulter STK[®] und am Coulter STKS[®] erstellte große Blutbilder und manuell angefertigte Differenzialblutbilder gesunder Probanden und Patienten ein. Als Referenzbereiche für die automatisch bestimmten großen Blutbilder und die Handdifferentialblutbilder dienten die Referenzwerte des Hämatologischen Zentrallabors der Charité Berlin, CBF.

Tabelle 2: Referenzbereiche für die hämatologischen Messergebnisse (übernommen aus dem Hämatologischen Zentrallabor der Charité Berlin, CBF).

| Parameter | | Einheit | Referenzbereich der Charité, CBF |
|-----------------------------|--|---------|----------------------------------|
| Blutbild | | | |
| Leukozyten | | /nl | 4,0 – 10,0 |
| Erythrozyten | | /pl | 4,5 - 6,0 |
| Hämoglobin | | g/dl | 14,0 – 18,0 |
| Hämatokrit | | l/l | 0,38 - 0,52 |
| MCH | | Pg | 28 – 34 |
| MCV | | Fl | 82 – 92 |
| MCHC | | g/dl | 32 – 36 |
| Thrombozyten | | /nl | 150 - 400 |
| Differentialblutbild | | | |
| Segmentkernige Neutrophile | | % | 50 – 70 |
| Lymphozyten | | % | 25 – 40 |
| Monozyten | | % | 4 – 8 |
| Eosinophile | | % | 0 – 4 |
| Basophile | | % | 0 – 1 |

II.6 Klinisch-chemische Messungen und Messmethoden

Alle klinisch-chemischen Untersuchungen fanden im klinisch-chemischen Zentrallabor der Charité Berlin, CBF, statt. Die klinisch-chemischen Routineparameter wurden aus Hirudinplasma mit einer Konzentration von 1000 ATU/ml bestimmt, das fünf Minuten lang bei 3500 Umdrehungen pro Minuten mittels einer Hettich Universal 30 F -Zentrifuge (Hettich, Tuttingen, Deutschland) bei einer relativen Zentrifugationsbeschleunigung von 2191 G zentrifugiert wurde. Die jeweiligen Kontrollwerte wurden aus Serum bestimmt. Die Messungen aller 24 klinisch-chemischer Parameter wurden mit dem Roche Hitachi 917[®] System (Roche AG, Mannheim, Deutschland) durchgeführt, das gemäß den Anweisungen des Herstellers eingesetzt wurde. Die verwendeten Reagenzien stammten ebenfalls von Roche Diagnostics. Die Messmethoden des Automaten basieren auf ionenselektiven Elektroden (Na⁺, Ka⁺, Li⁺) und Absorbionsmessungen in Reaktionslösungen, denen üblicherweise das

reagenziengemischte Serum und in dieser Studie zusätzlich das hirudinierte Serum in einer Plastikkuvette zugegeben wird. Dafür war für jeden Parameter ein minimales Probenvolumen zwischen 2 und 35 Mikroliter erforderlich.

Für die Bestimmung der Parameter Cholesterin, Triglyzeride, Amylase, Pankreatische Amylase, Harnsäure, Lipase und Gamma Glutamyltransferase (GGT) nutzt das Roche Hitachi 917[®] System die enzymatische Kalorimetrie. Mit Hilfe des UV-Tests bestimmt der Automat Glukose (Glukose-Oxidase-Methode), ALT (Alanin Aminotransferase), GOT (ASAT), Hydroxybutyrat Dehydrogenase (HBDH), Kreatin-Kinase (CK), Laktat Dehydrogenase (LDH), Harnstoff und freies Hämoglobin im Serum. Kalium, Chlorid und Natrium wurden mit Ionenselektiven Elektroden gemessen. Verschiedene farbmessende Untersuchungen dienen der Bestimmung der Parameter Kalzium, Phosphat, Gesamteiweiß, Albumin, alkalische Phosphatase und Kreatinin. Die Bilirubinkonzentration wurde über die Jendrassik-Gróf-Methode ermittelt.

Für die Beurteilung der Messergebnisse wurden die Referenzbereiche des Zentrallabors am UKBF zugrunde gelegt (siehe Tabelle 3).

II.7 Wiederholungsmessungen hämatologischer und klinisch-chemischer Messparameter

Eine der beiden Hauptforderungen an wissenschaftliche Meßmethoden ist Validität, welche die Gültigkeit der Ergebnisse von Messungen und Beobachtungen bei einer gezielten Fragestellung beinhaltet. Validität beantwortet die Frage, ob ein Instrument oder eine Methode genau das misst, was gemessen werden soll. Daneben fordert die Reliabilität die Reproduzierbarkeit von Messergebnissen. Durch eine zuverlässige Methode bzw. Instrument erhält man bei wiederholten Messungen unter vergleichbaren Bedingungen Ergebnisse, die nur geringfügig voneinander abweichen. Sowohl Validität als auch Reliabilität sind Voraussetzungen dafür, dass Messergebnisse als wissenschaftlich gültig gelten können.

II.7.1 Wiederholungsmessungen hämatologischer Messparameter

Um die Reproduzierbarkeit der aus hirudiniertem Blut ermittelten Messwerte hämatologischer Parameter zu überprüfen und etwaige Messfehler der eingesetzten Zellzählautomaten auszuschließen, wurden hämatologische Mehrfachmessungen mit 1000 ATU/ml-Hirudin antikoaguliertem Blut aller drei Chargen durchgeführt. Dabei wurden die Blutbilder und Differentialblutbilder von 15 gesunden Probanden fünf Mal unmittelbar hintereinander

gemessen und jeweils ein Ausstrichpräparat angefertigt. Mit zehn Blutproben erfolgten die Messungen am Coulter STKS[®], mit fünf am Coulter STK[®] (beide Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland). K₂-EDTA-Blutproben dienten als Kontrollen.

Mit Mehrfachmessungen in größeren Zeitabständen wurde überprüft, ob die Blutzellen im hirudinierten Blut auch langfristig so stabil messbar sind, wie es im medizinischen Alltag erforderlich sein kann. Dafür wurden die Ergebnisse der Mehrfachmessung der automatisierten Blutbilddiagnostik innerhalb des Experiments zur Überprüfung der ermittelten optimalen Hirudinkonzentration (siehe III.1.4) unter diesen Aspekten analysiert. Das hirudinierte Blut von vier Probanden wurde jeweils nach 0, 2, 6, 12, 24, 48 und 72 Stunden auf die hämatologischen Routineparameter untersucht und zudem jeweils ein Ausstrichpräparat angefertigt und ausgewertet. K₂-EDTA-antikoagulierte-Blutentnahmeröhrchen dienten als Kontrollen.

Tabelle 3 Referenzbereiche für die klinisch-chemischen Messergebnisse (übernommen aus dem Klinisch-Chemischen Zentrallabor der Charité Berlin, CBF)

| Klinische Chemie | Einheit | Referenzbereich der Charité, CBF |
|-------------------------|----------------|---|
| GOT (ASAT) | U/l | - 18 |
| GPT (ALAT) | U/l | - 18 |
| GGT | U/l | 4 – 18 |
| Alk. Phosphatase | U/l | 60 – 170 |
| Lipase | U/l | - 190 |
| Amylase | U/l | - 120 |
| P-Amylase | U/l | 13 - 64 |
| Bilirubin ges. | µmol/l | 3,6 – 22 |
| Kreatinin | µmol/l | 50 – 98 |
| Harnstoff | Mmol/l | 1,7 - 8,3 |
| Harnsäure | µmol/l | 142 – 339 |
| Natrium | Mmol/l | 130 – 149 |
| Kalium | Mmol/l | 3,7 - 5,4 |
| Chlorid | Mmol/l | 94 – 109 |
| Kalzium | Mmol/l | 2,24 - 2,78 |
| Phosphat | Mmol/l | 0,87 - 1,45 |
| CK | U/l | 10 – 80 |
| HBDH | U/l | 55 – 140 |
| LDH | U/l | 120 – 240 |
| Glucose i.S. | Mmol/l | 3,5 - 5,7 |
| Cholesterin | Mmol/l | > 5,2 |
| Triglyzeride | Mmol/l | - 1,7 |
| Eiweiß, ges | g/l | 66 – 87 |
| Albumin | g/l | 38 – 51 |

II.7.2 Wiederholungsmessungen klinisch-chemischer Messparameter

Um die Reproduzierbarkeit der klinisch-chemischen Messergebnisse zu überprüfen und Messfehler des eingesetzten Roche/Hitachi 917 Systems[®] (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) auszuschließen, wurden mit den hirudinierten Blutproben von drei gesunden Probanden jeweils drei- und fünfmal unmittelbar hintereinander erfolgte Mehrfachmessungen durchgeführt. Dabei wurden folgende klinisch-chemischen Messparameter untersucht: GOT, GPT, AP, GGT, HBDH, Bilirubin gesamt, CK, Lipase, LDH, Amylase, Kreatinin, Harnstoff, Harnsäure, Glucose (im Serum), Cholesterin, Triglyzeride, Kalzium, Phosphat, Albumin, P-Amylase, Kalium, Natrium und Chlorid.

II.8 Spezialuntersuchungen

II.8.1 Hämatologische Versuche mit Kaliumchlorid, Kaliumbicarbonat und Lithiumchlorid als Zusätze zum hirudinierten Blut

Hirudin- und Lephirudin- (in Form von Refludan^{®2}, Höchst Marion Roussel[®], Frankfurt, Deutschland) antikoagulierte Blut wurde jeweils Kaliumchlorid, Kaliumbicarbonat und Lithiumchlorid zugesetzt. Mit der Analyse dieser so entstandenen Blutproben sollte überprüft werden, ob während der hämatologischen Messreihen aufgetretene Schwierigkeiten der Messautomaten Coulter STK[®] und Coulter STKS[®] mit hirudinierten Blutproben auf die deutlich niedrigere ⁺K-Ionen-Konzentration im hirudinierten Blut im Vergleich zu K₂-EDTA-antikoagulierte Blut zurückzuführen ist. Das in seiner biochemischen Wirkweise dem Kaliumchlorid ähnliche Lithiumionchlorid diente als Kontrolle. Kaliumchlorid, Kaliumbicarbonat und Lithiumchlorid wurden in der gleichen Molarität des Kaliumions in K₂-EDTA-behandeltem Blut zugesetzt. Es ist bekannt, dass der hohe Anteil frei gelöster Kaliumionen im K₂-EDTA-Plasma die Morphologie der Blutzellen verändert (Zellschrumpfung). Um Veränderungen in den Blutzellenpopulationen erkennen zu können, wurden die Blutbilder und Differentialblutbilder von fünf gesunden Probanden jeweils drei Mal unmittelbar hintereinander am Coulter STK gemessen. Untersucht wurden die Blutproben jeweils mit Hirudin pur, einer Kombination aus Hirudin und Kaliumchlorid, einer Kombination aus Hirudin und Kaliumbicarbonat sowie einer Kombination aus Hirudin und Lithiumchlorid. Zur Kontrolle wurden Blutproben mit Refludan pur, einer Kombination aus

² Refludan[®] ist ein zugelassenes rekombinant hergestelltes Hirudin zur intravenösen Injektion (Höchst Marion Roussel[®], Frankfurt, Deutschland)

Refludan und Kaliumbikarbonat, einer Kombination aus Refludan und Kaliumchlorid sowie einer Kombination aus Refludan und Lithiumchlorid analysiert. Dabei betrug die Hirudinkonzentration 1000 ATU/ml. Refludan wurde den Angaben des Herstellers (Höchst Marion Roussel, Frankfurt, Deutschland) entsprechend in 5 mg Dosen eingesetzt. Daraus wurde aus Hirudin mit Aqua Injectable eine Stammlösung hergestellt, die 700 Mikroliter ergab. Als Dosis, die mit der Refludankonzentration pro Blutentnahmeröhrchen verglichen wurde, wurden 33 Mikroliter Refludan pro Milliliter Vollblut eingesetzt. Die Konzentration des Kaliumchloridzusatzes betrug 2,238 mg, des Kaliumbikarbonatzusatzes 3,00 mg und des Lithiumchloridzusatzes 1,28 mg, jeweils pro 3 ml Blut. Als Kontrollwerte wurden K₂-EDTA-antikoagulierte Blutproben gemessen.

II.8.2 Antikörperbestimmungen und Virusnachweise gegen Cytomegalieviren (CMV), Hepatitis-B und -C, HIV und HCV

Verschiedene Antikörperbestimmungen und Virusnachweise sollten aufzeigen, ob immunologische und molekularbiologische Testsysteme mit Hirudin-antikoaguliertem Blut zuverlässig durchzuführen sind. Dazu wurde mit Hirudin-antikoagulierten Blutproben (1000 ATU/ml) und Serumröhrchen von sechs gesunden Probanden ein Virusnachweis nach der Methode des Enzym Immun Assays (EiA) (immunoassay system Axsym[®], Abbott Systems, Abbott Park IL, USA) durchgeführt. Daran schlossen sich Antikörperbestimmungen und Virusnachweise gegen Cytomegalieviren (CMV), gegen Hepatitis-B- und C sowie HIV an. Mit dem COBAS-Amplificor[®] (Roche, Mannheim, Deutschland) wurden die Blutproben zusätzlich über die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) auf das HIV- und das HCV-Genom untersucht.

II.8.3 Nachweis der Expression des Wilmstumorgens WT1 mittels PCR

Der Wilmstumor(WT1)-Genachweis wurde mittels qualitativer PCR exemplarisch anhand von Jurkat und EOL1-Leukämie-Blasten mit einem Hirudinzusatz bis zu 5000 ATU/ml im PCR-Reaktionsgefäß durchgeführt. Dabei wurde die Hirudinkonzentration bewusst so hoch gewählt, um mögliche Interferenzen mit der PCR besser erkennen zu können. Als Kontrolle diente die Genexpression ohne Zusatz von Hirudin.

III.8.4 Bestimmung der quantitativen Immunglobuline im Blut

Die Immunglobuline wurden exemplarisch anhand von Immunglobulin G (IgG), Immunglobulin M (IgM) und Immunglobulin A (IgA) quantitativ in den hirudinierten

Blutproben (Konzentration: 1000 ATU/ml) von zwei Patienten mittels Elektrophorese klassifiziert. In dieser Untersuchung werden die Proteine, Moleküle und das DNA analysiert, die frei in einem Puffer suspendiert sind, wo sie entsprechend ihrer Größe und/oder Oberflächenladung aufgetrennt werden. Analog behandeltes Serum diente als Kontrolle.

II.8.5 Analyse tiefgefrorener Blutproben

Es wurde überprüft, ob Hirudinplasma bei einer Konzentration von 1000 ATU/ml auch dann untersuchbar bleibt, wenn es längere Zeit eingefroren war, wie es im medizinischen Alltag beispielsweise für gerichtsmedizinische Zwecke erforderlich ist. Dazu wurden einige klinisch-chemische Routineparameter (GOT, Bilirubin gesamt, Natrium, Kalzium, CRP und Gesamteiweiß) sowie Anti-Hbs in tiefgefrorenen Hirudinplasmen gemessen. Zur Herstellung des Probenmaterials wurde der Überstand von zentrifugierten hirudinierten Blutproben neun gesunder Probanden abpipettiert und anschließend für vier Monate bei circa minus 80 Grad Celsius eingefroren. Direkt nach dem Auftauen folgten die Untersuchungen. Serumproben derselben Patienten wurden analog behandelt und dienten als Kontrollergebnisse.

II.8.6 Hormonbestimmungen

Aus denselben hirudinierten Blutproben, die für die Analyse tiefgefrorener Blutproben (neun gesunde Probanden) eingesetzt wurden, wurden mittels der elektrochemischen Lichtstrahlennachweis-Technologie des Elecsys System[®] 1010 (Roche Diagnostics, Frankfurt, Deutschland) exemplarisch auch die Bestimmungen von Hormonen (Schilddrüsenhormonen TSH und TG) sowie freiem Hämoglobin durchgeführt. Als Vergleichswerte wurden die von Herold vorgeschlagenen (Herold 2005²⁹) oder Herstellerangaben der Testkits eingesetzt, Serum diente jeweils als Kontrolle.

II.9 Statistik

Für die statistische Auswertung wurden die Computerprogramme Excel[®] (Version 95; Microsoft, Washington, USA), SPSS[®] (Version 6.1.1; SPSS Inc., USA) für Microsoft Windows[®] (Version Windows 95; Microsoft, Washington, USA) und BiAS[®] (Version 8.2; epsilon-Verlag, Frankfurt am Main) eingesetzt.

Um zunächst zu evaluieren, ob ein statistischer Zusammenhang, also eine Korrelation bzw. eine Abhängigkeit, zwischen den Messergebnissen der Hirudinproben und ihrer jeweiligen Kontrollproben besteht und um diesen zu quantifizieren, wurden die Daten auf verschiedene

Korrelationsmaße überprüft. Der Korrelationskoeffizient nach Bravais und Pearson ($=r$) dient dabei der Analyse von linearen Zusammenhängen zweier metrischer Merkmale. Man erhält den Wert von r , in dem man die Kovarianz s_{xy} durch die beiden Standardabweichungen s_x und s_y dividiert. r kann nur Werte zwischen -1 und $+1$ annehmen. Je weiter sich r dabei an $+1$ oder -1 annähert, desto größer ist der lineare Zusammenhang zwischen den beiden Merkmalen. Dabei steht ein positives Vorzeichen seines Wertes für einen gleichsinnigen Zusammenhang der beiden Merkmale (größere Werte des einen korrelieren mit größeren Werten des anderen Merkmals und umgekehrt), während ein negatives Vorzeichen einen gegensinnigen Zusammenhang bedeutet (kleinere Werte des einen korrelieren mit größeren Werten des anderen Merkmals und umgekehrt). $r=0$ bedeutet keinen linearen Zusammenhang zwischen beiden Merkmalen, während $r=+1$ dem maximalen gleichsinnigen Zusammenhang und $r=-1$ dem maximal gegensinnigen Zusammenhang entspricht.

Der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman ($=\rho$) ist eine Verallgemeinerung des Korrelationskoeffizienten nach Bravais und Pearson. Er misst unabhängig von linearen Zusammenhängen, ob es einen grundsätzlichen Zusammenhang zwischen zwei Merkmalen gibt, in dem er die monotone Abhängigkeit von Wertepaaren ausdrückt. Zur Berechnung transformiert man die zu vergleichenden Werte in Ränge zwischen eins und n und berechnet ρ anhand seiner Formel. Analog zum Korrelationskoeffizienten nach Bravais und Pearson liegt sein Wertebereich immer zwischen -1 und $+1$. Je mehr er zu $+1$ tendiert, desto größer ist der gleichsinnige monotone Zusammenhang zwischen den beiden Wertepaaren, je mehr er zu -1 tendiert, desto größer ist ihr gegensinniger monotoner Zusammenhang. $\rho=0$ bedeutet, dass kein monotoner Zusammenhang nachweisbar ist. Da weder der Mittelwert noch die Standardabweichung in die Berechnung von ρ einfließen, ist der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman gut anzuwenden, wenn die zu vergleichenden Werte numerisch weit auseinander liegen.

Da eines der Hauptziele dieser Arbeit in der Beurteilung der Übereinstimmung der beiden Meßmethoden (aus Hirudinblut bzw. aus Standardabstrat) lag, wurden die Messergebnisse der hämatologischen und klinisch-chemischen Parameter mit dem Bland-Altman-Plot verglichen (Bland et al. 1995²⁹). Das auch Methodenvergleich nach Bland und Altman oder Residuenplot genannte Verfahren ist eine statistisch relevante und bewährte graphische Darstellungsmethode zur Beurteilung zweier unabhängiger Mess-Methoden. In dieser Sonderform eines Punktediagramms werden alle Differenzen der zu vergleichenden Methoden gegen ihre jeweiligen Mittelwerte aufgetragen. Die Streuung ist durch die doppelte

positive wie negative Standardabweichung (genau: $+1,96 \cdot s$ bzw. $- 1,96 \cdot s$) definiert. Als Referenzlinien sind sie ebenso im Plot eingetragen wie der absolute Mittelwert aller Differenzen. Insgesamt bietet der Bland-Altman-Vergleich eine gute optische Beurteilungsmöglichkeit, wie hoch die Schwankungsbreite der Übereinstimmung zwischen den Messwerten der zu vergleichenden Messmethoden ist. Dabei ist die Übereinstimmung der zu vergleichenden Messwerte um so höher, je näher die Wertepaare an der Mittelwertsachse liegen. Ferner lässt sich aus dem Bland-Altman-Plot ableiten, ob ein systematischer Messfehler vorliegt (wenn z. B. eine Messmethode prinzipiell höher misst als die andere) und ob eine mögliche Abweichung der Methoden von der Höhe der Werte abhängig ist.

III. Ergebnisse

III.1 Die optimal antikoagulierende Hirudindosis pro Blutentnahmeröhrchen

Um die Ergebnisse der Experimente zur Ermittlung einer optimal antikoagulierenden Hirudindosis übersichtlich darstellen und besser vergleichen zu können, wurden sie anhand ihrer wesentlichen Faktoren (Ausprägung der Gerinnung und Art der Mikrogerinnsel) folgenderweise eingeteilt:

Tabelle 4 Klassifizierung der visuell und mikroskopisch beobachteten Thrombenbildung in hirudiniertem Vollblut (Blutentnahmeröhrchen)

| Bezeichnung | Bedeutung |
|--------------------|---|
| ++ | vollständige Blutgerinnung |
| + | kleine Agglutinationen im ungeronnenen Blut (Minigerinnsel) |
| 0 | keine sichtbare Blutgerinnung |

III.1.1 Visuelle Überprüfung des Gerinnungsverhaltens Hirudin-antikoagulierten Blutes im Blutentnahmeröhrchen mit variablen Hirudinkonzentrationen und zu verschiedenen Zeitpunkten

Im ersten Experiment, in dem Hirudinkonzentrationen zwischen 100 und 500 ATU/ml untersucht wurden, wurden Minigerinnsel bei einer Hirudindosis von 100 ATU/ml erstmalig nach einer Stunde (in fünf der sechs untersuchten Blutproben) sichtbar, bei 200 ATU/ml nach zwei Stunden (in allen sechs untersuchten Blutproben) und bei 300 ATU/ml sowie 400 ATU/ml nach jeweils vier Stunden (in jeweils allen sechs untersuchten Blutproben). Bei 500 ATU/ml Hirudin waren ab acht Stunden Minigerinnsel (in zwei von sechs untersuchten Blutproben) nach bereits 30 Minuten zu beobachten. Blutproben mit nicht-antikoaguliertem Blut geronnen immer vollständig, bei den K₂-EDTA- und Heparin-antikoagulierten Blutproben wurden zu keinem Zeitpunkt Minigerinnsel sichtbar. Die Untersuchungsergebnisse ergaben keine Anhaltspunkte für unterschiedliche Wirkung der drei verschiedenen Hirudin-Chargen (siehe Tabelle 5).

Tabelle 5: Visuelle Überprüfung auf Vorkommen von Minigerinnseln im Blut zweier gesunder Probanden (1,2), das mit je einer von drei Chargen oder Standardsubstanzen zur Antikoagulation versetzt war

| | Hirudin Charge | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 |
|-----------|----------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | Dosis (ATU/ml) | 100 | 100 | 100 | 200 | 200 | 200 | 300 | 300 | 300 |
| Zeitpunkt | Proben | | | | | | | | | |
| 30 Min. | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 2 | 0 | 0 | + | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 1 Std. | 1 | + | + | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 2 | + | + | + | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 1,5 Std. | 1 | + | + | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 2 | + | + | + | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 2 Std. | 1 | + | + | + | + | + | + | 0 | 0 | 0 |
| | 2 | + | + | + | + | + | + | 0 | 0 | nd |
| 2,5 Std. | 1 | + | + | + | + | + | + | 0 | 0 | 0 |
| | 2 | + | + | + | + | + | + | 0 | 0 | 0 |
| 3 Std. | 1 | + | + | + | + | + | + | 0 | 0 | 0 |
| | 2 | + | + | + | + | + | + | 0 | 0 | 0 |
| 4 Std. | 1 | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| | 2 | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 5 Std. | 1 | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| | 2 | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 6 Std. | 1 | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| | 2 | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 7 Std. | 1 | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| | 2 | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 8 Std. | 1 | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| | 2 | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 9 Std. | 1 | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| | 2 | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 10 Std. | 1 | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| | 2 | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 11 Std. | 1 | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| | 2 | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 12 Std. | 1 | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| | 2 | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 24 Std. | 1 | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| | 2 | + | + | + | + | + | + | + | + | + |

++ = vollständige Blutgerinnung, + = kleine Agglutinationen im ungeronnenen Blut, Minigerinnsel, 0 = keine sichtbare Blutgerinnung, nd = nicht untersucht;

Fortsetzung von Tabelle 5: Visuelle Überprüfung auf Vorkommen von Minigerinnseln im Blut zweier gesunder Probanden (1,2) das jeweils mit einer der drei Chargen Hirudin oder einem Standardsubstanzen zur Antikoagulation versetzt war

| | Hirudin Charge | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 | | | | |
|-----------|-------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|----------------------|---------|-----------------------|
| | Dosis (ATU/ml) bzw. Kontrolle | 400 | 400 | 400 | 500 | 500 | 500 | | K ₂ -EDTA | Heparin | keine Antikoagulation |
| Zeitpunkt | Proben | | | | | | | | | | |
| 30 Min. | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | 0 | 0 | ++ |
| | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | 0 | 0 | ++ |
| 1 Std. | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | 0 | 0 | ++ |
| | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | 0 | 0 | ++ |
| 1,5 Std. | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | 0 | 0 | ++ |
| | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | 0 | 0 | ++ |
| 2 Std. | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | 0 | 0 | ++ |
| | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | 0 | 0 | ++ |
| 2,5 Std. | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | 0 | 0 | ++ |
| | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | 0 | 0 | ++ |
| 3 Std. | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | 0 | 0 | ++ |
| | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | 0 | 0 | ++ |
| 4 Std. | 1 | + | + | + | 0 | 0 | 0 | | 0 | 0 | ++ |
| | 2 | + | + | + | 0 | 0 | 0 | | 0 | 0 | ++ |
| 5 Std. | 1 | + | + | + | 0 | 0 | 0 | | 0 | 0 | ++ |
| | 2 | + | + | + | 0 | 0 | 0 | | 0 | 0 | ++ |
| 6 Std. | 1 | + | + | + | 0 | 0 | 0 | | 0 | 0 | ++ |
| | 2 | + | + | + | 0 | 0 | 0 | | 0 | 0 | ++ |
| 7 Std. | 1 | + | + | + | 0 | 0 | 0 | | 0 | 0 | ++ |
| | 2 | + | + | + | 0 | 0 | 0 | | 0 | 0 | ++ |
| 8 Std. | 1 | + | + | + | + | 0 | 0 | | 0 | 0 | ++ |
| | 2 | + | + | + | 0 | + | 0 | | 0 | 0 | ++ |
| 9 Std. | 1 | + | + | + | + | 0 | 0 | | 0 | 0 | ++ |
| | 2 | + | + | + | 0 | + | 0 | | 0 | 0 | ++ |
| 10 Std. | 1 | + | + | + | + | + | + | | 0 | 0 | ++ |
| | 2 | + | + | + | + | + | + | | 0 | 0 | ++ |
| 11 Std. | 1 | + | + | + | + | + | + | | 0 | 0 | ++ |
| | 2 | + | + | + | + | + | + | | 0 | 0 | ++ |
| 12 Std. | 1 | + | + | + | + | + | + | | 0 | 0 | ++ |
| | 2 | + | + | + | + | + | + | | 0 | 0 | ++ |
| 24 Std. | 1 | + | + | + | + | + | + | | 0 | 0 | ++ |
| | 2 | + | + | + | + | + | + | | 0 | 0 | ++ |

++ = vollständige Blutgerinnung, + = kleine Agglutinationen im ungeronnenen Blut, Minigerinnsel, 0 = keine sichtbare Blutgerinnung, nd = nicht untersucht

Im zweiten Experiment, in dem Hirudinkonzentrationen zwischen 100 ATU/ml und 1000 ATU/ml untersucht wurden, waren Minigerinnsel nach vier Stunden in den Dosen 100 ATU/ml und 200 ATU/ml in sämtlichen neun untersuchten hirudinierten Blutproben zu beobachten. Bei 400 ATU/ml wurden noch in einer der neun untersuchten Blutproben Minigerinnsel beobachtet, bei 600 ATU/ml, 800 ATU/ml und 1000 ATU/ml in keiner Blutprobe. Nach 12 Stunden waren in sämtlichen hirudinierten Blutproben Minigerinnsel zu beobachten: bei 100 ATU/ml und 200 ATU/ml in allen neun untersuchten Blutentnahmeröhrchen, bei 400 ATU/ml in sechs von neun, bei 600 ATU/ml und bei 800 ATU/ml in zwei von neun und bei 1000 ATU/ml in einem der neun untersuchten Blutentnahmeröhrchen. Auch nach 24 Stunden waren bei allen untersuchten Hirudindosen Minigerinnsel sichtbar: Bei 100 ATU/ml, 200 ATU/ml und 400 ATU/ml Hirudin in allen neun untersuchten Blutentnahmeröhrchen, bei 600 ATU/ml in acht von neun, bei 800 ATU/ml in sieben von neun und bei 1000 ATU/ml in sechs der neun untersuchten Blutentnahmeröhrchen.

Zu den Untersuchungszeitpunkten 4, 12 und 24 Stunden waren in den K₂-EDTA-antikoagulierten Blutentnahmeröhrchen in keiner Blutprobe, in den Heparin-antikoagulierten Blutproben dagegen zu jedem Untersuchungszeitpunkt in jeweils einer (von drei) Blutproben Minigerinnsel sichtbar. Wiederum war kein erkennbarer Einfluss der drei unterschiedlichen Hirudinchargen auf den Zeitpunkt und die Häufigkeit der Minigerinnselbildungen in den Blutentnahmeröhrchen erkennbar.

III.1.2 Visuelle und mikroskopische Überprüfung des Gerinnungsverhaltens Hirudin-antikoagulierten Blutes im Blutentnahmeröhrchen/Blutausstrichpräparat mit variablen Hirudinkonzentrationen und zu verschiedenen Zeitpunkten

Im ersten Experiment, in dem Hirudinkonzentrationen von 400 ATU/ml bis 1000 ATU/ml untersucht wurden, wurden erst nach 12 Stunden die ersten Minigerinnsel bei einer Hirudinkonzentration von 400 ATU/ml (in allen sechs untersuchten Blutentnahmeröhrchen) und von 600 ATU/ml (in einer der sechs untersuchten Blutentnahmeröhrchen) sichtbar, während bei den Hirudinkonzentrationen 800 ATU/ml und 1000 ATU/ml noch keine Minigerinnsel zu beobachten waren. Zum Untersuchungszeitpunkt 24 Stunden waren in allen untersuchten Hirudinkonzentrationen Minigerinnsel sichtbar: bei 400 ATU/ml und 600 ATU/ml in allen sechs, bei 800 ATU/ml in vier von sechs und bei 1000 ATU/ml in zwei von sechs untersuchten Blutentnahmeröhrchen.

In den Ausstrichpräparaten der hirudinierten Blutproben in Dosen zwischen 400 ATU/ml und 1000 ATU/ml wurden zum ersten Untersuchungszeitpunkt sechs Stunden in allen untersuchten Präparaten (24) mikroskopisch Thrombozytenaggregate sichtbar, ebenso wie zu den Zeitpunkten 12 Stunden (23), 18 Stunden (23) und 24 Stunden (24).

In den Blutproben und -ausstrichpräparate mit nicht-antikoaguliertem Blut fanden sich immer Minigerinnsel. Waren in den K₂-EDTA-antikoagulierten Blutproben zwar visuell keine Minigerinnsel zu beobachten, wurden jedoch in den entsprechenden Ausstrichpräparaten zum Zeitpunkt 6 Stunden erste Thrombozytenaggregate nachgewiesen. Die heparinierten Blutproben bildeten in der visuellen Auswertung ab 12 Stunden Minigerinnsel (in einer von zwei Blutproben), während in sämtlichen heparinierten Blutausstrichpräparaten zu jedem Untersuchungszeitpunkt Minigerinnsel zu beobachten waren. Wiederum hatten die drei unterschiedlichen Hirudin-Chargen keinen erkennbaren Einfluss auf den Zeitpunkt und die Häufigkeit der Bildung von Minigerinnseln in den Blutentnahmeröhrchen (siehe Tabelle 6).

Im zweiten Experiment mit erhöhten Hirudinkonzentrationen (600 - 2000 ATU/ml) waren zum Zeitpunkt sechs Stunden bei 600 ATU/ml und 800 ATU/ml in jeweils drei von sechs, bei 1000 ATU/ml in zwei von sechs und bei 2000 ATU/ml in einer der sechs hirudinierten Blutproben visuell erste Minigerinnsel sichtbar. Zum Zeitpunkt 18 Stunden war nur noch in sieben (davon vier mit 2000 ATU/ml Hirudin) der insgesamt 24 untersuchten Blutproben keine sichtbaren Anzeichen der beginnenden Blutgerinnung zu beobachten, zum Zeitpunkt 24 Stunden nur noch in insgesamt vier Blutproben.

Die Ergebnisse der mikroskopisch untersuchten Blutausstrichpräparate waren ähnlich. Zur Stunde 6 waren bei den Hirudinkonzentrationen 600 ATU/ml, 1000 ATU/ml und 2000 ATU/ml jeweils in allen sechs Ausstrichpräparaten Thrombozytenaggregate zu beobachten und bei 800 ATU/ml in fünf der sechs untersuchten Blutausstrichpräparate. Nach 18 Stunden waren in 23 der insgesamt 24 untersuchten Blutausstrichpräparate Thrombozytenaggregate zu beobachten. Nach 24 Stunden wurden bei einer Hirudinkonzentration von 600 ATU/ml in vier der sechs Blutausstrichpräparate Thrombozytenaggregate beobachtet, bei den Hirudinkonzentrationen 800 ATU/ml und 1000 ATU/ml in jeweils drei und vier von sechs Blutausstrichpräparaten und bei einer Hirudinkonzentration von 2000 ATU/ml in fünf der sechs untersuchten Blutausstrichpräparate.

Tabelle 6: Visuelle und mikroskopische Überprüfung auf Vorkommen von Minigerinnseln und Thrombozytenaggregaten im Blut zweier gesunder Probanden (1,2) wie in Tabelle 5

| Minigerinnsel | Hirudin Charge | Dosis in ATU/ml | 6 Stunden | | 12 Stunden | | 18 Stunden | | 24 Stunden | |
|--------------------|----------------------|-----------------|-----------|----|------------|----|------------|----|------------|----|
| | | | 1 | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 |
| Proband | | | | | | | | | | |
| Visuelle Kontrolle | 1 | 400 | 0 | 0 | + | + | + | + | + | + |
| Mikroskop.Kontr. | 1 | 400 | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Visuelle Kontrolle | 2 | 400 | 0 | 0 | + | + | + | + | + | + |
| Mikroskop.Kontr. | 2 | 400 | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Visuelle Kontrolle | 3 | 400 | 0 | 0 | + | + | + | + | + | + |
| Mikroskop.Kontr. | 3 | 400 | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Visuelle Kontrolle | 1 | 600 | 0 | 0 | 0 | 0 | + | + | + | + |
| Mikroskop.Kontr. | 1 | 600 | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Visuelle Kontrolle | 2 | 600 | 0 | 0 | 0 | + | + | + | + | + |
| Mikroskop.Kontr. | 2 | 600 | + | + | Nd | + | + | + | + | + |
| Visuelle Kontrolle | 3 | 600 | 0 | 0 | 0 | 0 | + | + | + | + |
| Mikroskop.Kontr. | 3 | 600 | + | + | + | + | + | nd | + | + |
| Visuelle Kontrolle | 1 | 800 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | + | + | + |
| Mikroskop.Kontr. | 1 | 800 | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Visuelle Kontrolle | 2 | 800 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | + | + | + |
| Mikroskop.Kontr. | 2 | 800 | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Visuelle Kontrolle | 3 | 800 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Mikroskop.Kontr. | 3 | 800 | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Visuelle Kontrolle | 1 | 1000 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | + | 0 | + |
| Mikroskop.Kontr. | 1 | 1000 | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Visuelle Kontrolle | 2 | 1000 | 0 | 0 | 0 | 0 | + | 0 | + | 0 |
| Mikroskop.Kontr. | 2 | 1000 | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Visuelle Kontrolle | 3 | 1000 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Mikroskop.Kontr. | 3 | 1000 | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Visuelle Kontrolle | K ₂ -EDTA | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Mikroskop.Kontr. | | | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Visuelle Kontrolle | Heparin | | 0 | 0 | 0 | + | + | + | + | + |
| Mikroskop.Kontr. | | | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Visuelle Kontrolle | Plasma, nativ | | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ |
| Mikroskop.Kontr. | | | + | ++ | + | + | + | + | ++ | ++ |

++ = vollständige Blutgerinnung, + = kleine Agglutinationen im ungeronnenen Blut, Minigerinnsel visuell oder mikroskopisch Thrombozytenaggregate, 0 = keine sichtbare Blutgerinnung, nd = nicht untersucht

Von den visuell und mikroskopisch untersuchten Nativ-Blutproben geronnen 12 von 14 vollständig. Die K₂-EDTA-antikoagulierten Blutproben bildeten in der visuellen Auswertung in keiner der acht Blutproben Mikrogerinnsel, während mikroskopisch in allen vier untersuchten Ausstrichpräparaten Thrombozytenaggregate zu beobachten waren. Bei den heparinierten Blutproben wurden visuell in sämtlichen acht untersuchten Blutproben Mikrogerinnsel beo-

bachtet. Sämtliche Ausstrichpräparate waren nach 6 und 12 Stunden positiv auf Thrombozytenaggregate, während nach 18 und 24 Stunden in keinem der zwei untersuchten Ausstrichpräparate Thrombozytenaggregate aufzufinden waren. Auch in dieser Untersuchung ergab sich kein Anhalt für eine unterschiedliche Wirkung der drei Hirudin-Chargen (siehe Tabelle 7).

III.1.3 Zusammenfassung der Untersuchungsergebnisse zur Ermittlung einer optimal antikoagulierenden Hirudinkonzentration im Blutentnahmeröhrchen

In den ersten sechs Stunden des Untersuchungszeitraumes hatten die Hirudin-antikoagulierten Blutproben bis zu einer Konzentrationen von einschließlich 300 ATU/ml Hirudin unzureichende Antikoagulationsergebnisse. Die qualitativ ähnlichen Gerinnungsergebnisse der Hirudinkonzentrationen zwischen 400 ATU/ml und 2000 ATU/ml erfüllten dagegen alle das Ziel des Vorhandenseins möglichst weniger Mikrogerinnsel und Thrombozytenaggregate im menschlichen Blut. Für sämtliche Laborexperimente im weiteren Verlauf der Studie wurde die Konzentration 1000 ATU Hirudin pro 1 Milliliter menschlichen Blutes je Hirudin-Blutentnahmeröhrchen eingesetzt, da es diese Dosis im Vergleich zu niedrigeren Konzentrationen besser ermöglicht, potentielle negative Effekte des Hirudin-Einsatzes auf die automatisierten Testsysteme zu erkennen. Höhere Hirudinkonzentrationen (als 2000 ATU/ml) wurden ausgeschlossen, da nicht anzunehmen war, dass dadurch weniger Mikrogerinnsel entstehen oder weniger Automatenfehler auftreten würden als bei niedrigeren Konzentrationen.

K₂-EDTA versetzte Blutproben zeigten in der visuellen Beobachtung keine Anzeichen für Blutgerinnung, mikroskopisch wurden dagegen in allen untersuchten Ausstrichpräparaten Thrombozytenaggregate beobachtet.

Heparin-antikoagulierte Blutproben zeigten in der visuellen Beobachtung bis zum Untersuchungszeitpunkt 12 Stunden keine Anzeichen für Blutgerinnung, danach waren jedoch Mikrogerinnsel vorhanden. Auch in den Ausstrichpräparaten wurden erst nach längeren Untersuchungszeiträumen (ab 18 Stunden) Thrombozytenaggregate beobachtet.

Blutproben und Ausstrichpräparate ohne antikoagulierenden Zusatz geronnen immer vollständig.

Tabelle 7: Visuelle und mikroskopische Überprüfung auf Vorkommen von Minigerinnseln und Thrombozytenaggregaten im Blut zweier gesunder Probanden (1,2) in Verbindung mit drei Chargen Hirudin und Kontrollen

| Mikrogerinnsel | Hirudin Charge | Dosis in ATU/ml | 6 Stunden | 6 Stunden | 12 Stunden | 12 Stunden | 18 Stunden | 18 Stunden | 24 Stunden | 24 Stunden |
|-------------------|----------------------|-----------------|-----------|-----------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| Proband | | | 1 | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 |
| Art der Kontrolle | | | | | | | | | | |
| Visuell | 1 | 600 | 0 | + | + | + | + | + | + | + |
| mikroskopisch | 1 | 600 | + | + | + | + | + | + | + | 0 |
| Visuell | 2 | 600 | 0 | + | + | + | + | + | + | + |
| mikroskopisch. | 2 | 600 | + | + | + | + | + | + | + | 0 |
| Visuell | 3 | 600 | 0 | + | + | + | + | + | + | + |
| mikroskopisch. | 3 | 600 | + | + | + | + | + | + | + | + |
| | | | | | | | | | | |
| visuell | 1 | 800 | 0 | 0 | + | + | + | + | + | + |
| Mikroskopisch | 1 | 800 | + | + | + | 0 | + | + | 0 | + |
| Visuell | 2 | 800 | 0 | + | 0 | + | + | + | 0 | + |
| Mikroskopisch | 2 | 800 | 0 | + | + | + | + | 0 | + | 0 |
| Visuell | 3 | 800 | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Mikroskopisch | 3 | 800 | + | + | + | + | + | + | + | 0 |
| | | | | | | | | | | |
| Visuell | 1 | 1000 | 0 | 0 | + | 0 | + | + | + | + |
| Mikroskopisch | 1 | 1000 | + | + | + | + | + | + | + | 0 |
| Visuell | 2 | 1000 | 0 | + | + | 0 | 0 | 0 | + | 0 |
| Mikroskopisch | 2 | 1000 | + | + | + | + | + | + | + | nd |
| Visuell | 3 | 1000 | 0 | + | 0 | + | + | + | 0 | + |
| mikroskopisch | 3 | 1000 | + | + | + | + | + | + | + | Nd |
| | | | | | | | | | | |
| Visuell | 1 | 2000 | 0 | 0 | + | 0 | + | 0 | + | + |
| Mikroskopisch | 1 | 2000 | + | + | + | + | + | + | 0 | + |
| Visuell | 2 | 2000 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | + |
| Mikroskopisch | 2 | 2000 | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Visuell | 3 | 2000 | + | 0 | + | 0 | + | 0 | + | + |
| Mikroskopisch | 3 | 2000 | + | + | + | + | + | + | + | + |
| | | | | | | | | | | |
| Visuell | K ₂ -EDTA | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Mikroskopisch | | | + | + | + | + | nd | nd | nd | Nd |
| Visuell | Heparin | | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Mikroskopisch | | | + | + | + | + | 0 | nd | 0 | Nd |
| Visuell | Plasma, nativ | | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ |
| Mikroskopisch | | | ++ | ++ | ++ | ++ | + | nd | + | Nd |

++ = vollständige Blutgerinnung, + = kleine Agglutinationen im ungeronnenen Blut, Minigerinnsel visuell oder mikroskopisch Thrombozytenaggregate, 0 = keine sichtbare Blutgerinnung, nd = nicht untersucht

III.1.4 Überprüfung der ermittelten optimal antikoagulierenden Hirudinkonzentration (1000 ATU/ml) und automatisierte Blutbilddiagnostik

Zu den Untersuchungszeitpunkten Stunde null, vier, sechs und zwölf wurde bei den Hirudinkonzentrationen 1000 ATU/ml und 2000 ATU/ml in jeweils allen zwölf Blutausstrichpräparaten Minigerinnsel beobachtet. Bei 600 ATU/ml wurden nach sechs Stunden in zehn von zwölf untersuchten Blutausstrichpräparaten mikroskopisch Thrombozytenaggregate beobachtet.

In den K₂-EDTA-zugesetzten Blutausstrichpräparaten wurden sehr selten mikroskopisch Thrombozytenaggregate beobachtet.

Die Ergebnisse der automatisierten Blutbilddiagnostik werden unter dem Kapitel hämatologischer Wiederholungsmessungen in längeren Zeitabständen erläutert (Kapitel III.2.2).

Zur Bestätigung der Wahl der Hirudinkonzentration 1000 ATU/ml soll das Auftreten von Thrombozytenaggregaten der im weiteren Verlauf der Studie angefertigten Handdifferentialblutbilder vorweggenommen werden: In den Hirudin-antikoagulierten Blutproben von 31 gesunden Probanden traten bei 71 % der Blutausstrichpräparate Thrombozytenaggregate auf und in 12 % der K₂-EDTA-Ausstrichpräparate derselben Probanden. Im Patientenkollektiv (n=54) fanden sich Thrombozytenaggregate in 75% der mikroskopischen Präparate aus Hirudin und in 27 % der K₂-EDTA-Ausstrichpräparate.

III.2 Wiederholungsmessungen hämatologischer und klinisch-chemischer Messparameter

Hämatologische und klinisch-chemische Wiederholungsmessungen bestätigten die Reproduzierbarkeit der Untersuchungsergebnisse.

III.2.1 Unmittelbar hintereinander gemessene hämatologische Wiederholungsmessungen

Die fünf Mal unmittelbar hintereinander erfolgten Messungen belegten eine gute Reproduzierbarkeit der Messergebnisse.

Allerdings entsprachen einige Ergebnisse der Automatenmessungen hirudiniertes Blutentnahmeröhrchen nicht den Messergebnissen der Handdifferentialblutbilder und der K₂-EDTA-versetzten Blutproben und lagen außerhalb des Referenzbereiches für Gesunde. So zeigte der Coulter STKS im Laufe der Fünffach-Messung bei jeder Hirudin-antikoagulierten Blutprobe mindestens ein Mal die Warnung „atypische Leukozyten“, „atypische Thrombozyten“,

„atypische Erythrozyten“ oder „atypische Lymphozyten“ an. Daneben warnte der Automat in 14 der 15 untersuchten Hirudinröhrchen mit der Anzeige „kleine Thrombozyten“ vor einem Thrombozytenwert außerhalb des Referenzbereiches und zeigte bei drei Blutproben Blasten an. Bei vier Blutproben meldete er zudem „R-Alarm“³.

Bei sämtlichen Unregelmäßigkeiten der Messergebnisse waren die Werte der ersten Messungen meist innerhalb des Referenzbereiches und entsprachen den Messwerten der Handdifferentialblutbilder und der K₂-EDTA-Blutproben. Die Unregelmäßigkeiten traten überwiegend in späteren Messungen der Fünffach-Messreihe auf, meist bei der vierten oder fünften Wiederholungsmessung. Gelegentlich wurden bei erneuter Messung nach unregelmäßigen Messergebnissen am Automaten wieder Messergebnisse erreicht, die den Messergebnissen der Kontrollen entsprachen.

Daneben maß der Coulter STKS in neun der 15 untersuchten hirudinierten Blutproben Basophilenwerte außerhalb des Referenzbereiches und meldete in vier der untersuchten 15 Hirudinproben Neutropenie. Beide Abweichungen wurden durch die Auswertung der Handdifferentialblutbilder nicht bestätigt.

In der morphologischen Beurteilung der Automaten-Differentialblutbilder zeigte der Coulter STKS innerhalb der hirudinierten Blutproben bei einzelnen Leukozyten-Populationen ein anderes Verteilungsmuster als das ihrer K₂-EDTA-Kontrollen, weil sie vom Messautomaten offensichtlich optisch nicht gut voneinander zu trennen waren. Bei der Beurteilung der Handdifferentialblutbilder aus hirudiniertem Blut fiel jedoch keine der untersuchten Zellen als atypisch auf. So erwies sich die mikroskopische Auswertung der angefertigten Blutausschmearpräparate aus Hirudinblut bezogen auf den Referenzbereich des Zentrallabor der Charité am Campus Benjamin Franklin (siehe Tabelle zwei) als verlässlich und entsprach den Messergebnissen der jeweiligen K₂-EDTA-Blutproben.

Dagegen fielen im Handdifferentialblutbild in allen 15 untersuchten Hirudinproben Thrombozytenaggregate auf, die der Messautomat nur in einem Fall meldete.

³ Der R-Alarm ist ein hoher Piepton. Damit warnen Coulter STK und Coulter STKS vor unverarbeitbaren atypischen Zellformationen.

III.2.2 Hämatologische Wiederholungsmessungen in größeren Zeitabständen

Bei den hämatologischen Wiederholungsmessungen in größeren Zeitabständen (0, 2, 6, 12 und 24 Stunden nach der Blutentnahme) von Hirudin-antikoagulierten Blutproben von vier Probanden waren sämtliche Messergebnisse des kleinen Blutbildes und des Handdifferentialblutbildes im jeweiligen Referenzbereich und entsprachen den Messergebnissen der K₂-EDTA-Blutproben. Innerhalb der Messwerte der automatisiert erstellten Differentialblutbilder zeigten vier Messparameter bei den Blutproben aller vier Probanden im Laufe der Wiederholungsmessungen Abweichungen von den Messergebnissen der Handdifferentialblutbilder und der K₂-EDTA-Kontrollen. Während die Messwerte der stab- und segmentkernigen Granulozyten in nachfolgenden Messungen tendenziell abnahmen, stiegen gleichzeitig die Messwerte der Lymphozyten, der Monozyten und Eosinophilen. Dabei gab das Automatendifferenzialblutbild für den Nullstundenwert aller vier Probanden jeweils normale Zellverteilungen an. Bei zwei der vier Probanden waren die größten Schwankungen zwischen Stunde null und zwei zu beobachten, bei den anderen beiden zwischen Stunde zwei und Stunde sechs. In den nachfolgenden Messungen erwiesen sich die Ergebnisabweichungen vom Ausgangswert in fünf der insgesamt zwölf untersuchten Blutproben in der Wiederholungsmessung als reversibel und die Messergebnisse entsprachen wieder den Werten der 0-Stunden-Messung. Trotz dieser Messschwankungen lagen alle Messwerte im Referenzbereich. Bei der Untersuchung der Mikrogerinnselbildung und der morphologischen Beurteilung der Zellen im Handdifferentialblutbild wurden keine systematischen Veränderungen beobachtet. Trotz der Schwierigkeiten mit der numerischen Auswertung der Differentialblutbilder aus Hirudinblut lieferten die Messautomaten eine sehr gute optische Auftrennung der Leukozytenfraktion.

III.2.3 Klinisch-chemische Wiederholungsmessungen

Sämtliche Messwerte der fünf Mal unmittelbar hintereinander erfolgten klinisch-chemischen Wiederholungsmessungen an drei gesunden Probanden lagen innerhalb des Referenzbereiches und entsprachen den Messergebnissen der Serumproben.

III. 3 Vergleichende Untersuchungen der Blutbilder aus hirudiniertem und K₂-EDTA-antikoaguliertem Blut unter Einbeziehung der Referenzwerte

III.3.1 Hämatologische Laboruntersuchungen der Blutwerte gesunder Probanden (kleine Blutbilder, Automaten- und Handdifferentialblutbilder)

Die Messergebnisse der kleinen Blutbilder von 35 gesunden Probanden aus hirudinierten Blutproben und K₂-EDTA-Blutentnahmeröhrchen entsprachen sich überwiegend: Während die Thrombozytenwerte (meist um 3/nl - 10/nl), die Leukozytenwerte (meist um 0,1/nl bis 0,4/nl) und Hämoglobin (meist um 0,2g/dl) im hirudinierten Blut niedriger als die jeweiligen Messwerte der K₂-EDTA-Blutentnahmeröhrchen waren, wurden die Erythrozytenwerte (meist um 0,03/pl bis 0,3/pl) höher gemessen.

Im Abgleich mit den Referenzwerten des Hämatologischen Zentrallabors der Charité Berlin, CBF für Gesunde (siehe Tabelle 2), lagen sowohl bei den Hirudinproben als auch bei den K₂-EDTA-Kontrollen sämtliche Thrombozytenwerte innerhalb des Referenzbereiches des Hämatologischen Zentrallabors der Charité Berlin, CBF (siehe Tabelle 2), bei den Erythrozytenwerte trat jeweils eine sehr diskrete Abweichung auf. Bei den Leukozytenwerten und bei Hämoglobin waren bei den K₂-EDTA-Blutentnahmeröhrchen leicht mehr der meist diskreten Abweichungen aus dem Referenzbereich zu beobachten als bei den Hirudinproben (Leukozyten: 7 zu 6 und Hämoglobin: 4 zu 3).

Die Messwerte der Automaten-Differentialblutbilder aus hirudinierten und K₂-EDTA-antikoagulierten Blutproben unterschieden sich absolut um höchstens drei Prozent. Während im hirudinierten Blut die Messwerte der neutrophilen Granulozyten (um 0,5% - 2,0%), der Lymphozyten (um 1,7% - 3%) und der eosinophilen Granulozyten (um 0,1%) leicht erhöht waren, waren die Monozyten- (meist um 0,5% - 2,5%) und die basophilen Granulozytenwerte (meist um 0,5% - 1,0%) erniedrigt.

Dabei hatten die Blutproben aus K₂-EDTA-Standardsubstrat bei allen Parametern eine höhere Anzahl ganz überwiegend diskreter Abweichungen als die hirudinierten Blutproben: sowohl bei den Neutrophilen (15 Abweichungen im K₂-EDTA-antikoagulierten Blut zu 9 Abweichungen im hirudinierten Blut) und den Monozyten (10 zu 6) als auch bei den Lymphozyten (8 zu 5), den Basophilen (6 zu 3) und den Eosinophilen (4 zu 2).

Bei der Untersuchung der Handdifferentialblutbilder wiesen die Messwerte der Hirudinproben allerdings mehr Abweichungen auf als die der Automaten-Differentialblutbilder und teilweise auch mehr als die K₂-EDTA-Kontrollen. So hatten die

hirudinierten Proben bei den Monozyten zehn (Kontrolle: 7) und bei den Eosinophilen fünf (Kontrolle: 4) Abweichungen. Bei den Basophilen hatten die beiden unterschiedlich antikoagulierten Blutproben jeweils eine Abweichung, während bei den übrigen Parametern bei den K₂-EDTA-Proben wiederum mehr Abweichungen auftraten als bei den Hirudin-antikoagulierten (Monozyten 10 zu 7 und Eosinophile 5 zu 4) (siehe Tabelle 8).

Tabelle 8 Absolute Anzahl der Abweichungen der hämatologischen Messwerte aus hirudiniertem und K₂-EDTA-antikoaguliertem Blut aus dem Referenzbereich für Gesunde (Hämatologisches Zentrallabor der Charité Berlin, CBF).

| Parameter | Anzahl der Blutproben (n) | Hirudin Automat | Hirudin Hand | K ₂ -EDTA Automat | K ₂ -EDTA Hand |
|-----------------------------|---------------------------|-----------------|--------------|------------------------------|---------------------------|
| Kleines Blutbild | | | | | |
| Erythrozyten | 35 | 1 | - | 1 | - |
| Leukozyten | 35 | 7 | - | 6 | - |
| Thrombozyten | 35 | 0 | - | 0 | - |
| Hämoglobin | 35 | 4 | - | 3 | - |
| Differentialblutbild | | | | | |
| Basophile | 26 | 3 | 1 | 6 | 1 |
| Lymphozyten | 26 | 5 | 10 | 8 | 9 |
| Neutrophile | 26 | 9 | 12 | 15 | 10 |
| Monozyten | 26 | 6 | 7 | 10 | 10 |
| Eosinophile | 26 | 2 | 4 | 4 | 5 |

III.3.2 Hämatologische Laboruntersuchungen der Blutwerte von Patienten

Die aus Hirudin- und K₂-EDTA-antikoagulierten Blutproben ermittelten Messwerte waren sehr ähnlich und entsprachen jeweils der Diagnose wie dem Schweregrad der jeweiligen Patientenerkrankung.

III.3.3 Statistische Auswertung der hämatologischen Messergebnisse

Um die hämatologischen Messergebnisse aus hirudinierten Blutproben und ihren K₂-EDTA-Kontrollen statistisch vergleichen zu können, wurden zu allen hämatologischen Parametern der Korrelationskoeffizient nach Bravais und Pearson und der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman berechnet sowie nach gesunden und erkrankten Probanden differenzierte Bland-Altman-Plots angefertigt.

III.3.3.1 Statistische Auswertung der Korrelationskoeffizienten

Sämtliche untersuchten hämatologischen Blutwertparameter aus Hirudin-antikoagulierten und K₂-EDTA-zugesetzten Blutproben korrelierten nach dem Korrelationskoeffizienten von Bravais und Pearson sowie nach dem Rang-Korrelationskoeffizienten (Spearman) in unterschiedlicher Stärke positiv. Dabei ist die Korrelation der Erythrozyten-, Leukozyten-, Thrombozyten-, Lymphozyten- und Eosinophilenwerte sowie von Hämoglobin auf einem sehr hohen Signifikanzniveau (zwischen 0,8739 und 0,9904). Für die Monozytenwerte ($r = 0,7468$ und $\rho = 0,508$) ergab sich zwar eine schwächere, aber dennoch Signifikanz und Korrelation, für die Basophilenwerte ($r=0,3472$ und $\rho=0,2408$) eine lediglich schwache positive Korrelation. Auch für die aus den primären Testparametern abgeleiteten Messwerte MCV, MCH, MCHC, RDW, PCT, MPV und PDW zeigten eine Signifikanz sowie eine Korrelationen (siehe Tabelle 9).

Tabelle 9: Statistische Auswertung der hämatologischen Messparameter gemessen im Serum aus Hirudin- und K₂-EDTA-Blutentnahmeröhrchen

| Testparameter | Anzahl der Proben | Korrelation (r; Pearson) | Rang-Korrelation (rho, Spearman) |
|---------------|-------------------|--------------------------|----------------------------------|
| Erythrozyten | 80 | 0,9904* | 0,9902* |
| Leukozyten | 80 | 0,9527* | 0,9464* |
| Thrombozyten | 80 | 0,9158* | 0,9085* |
| Hämoglobin | 80 | 0,9887* | 0,9886* |
| Neutrophile | 78 | 0,8911* | 0,8739* |
| Lymphozyten | 78 | 0,9654* | 0,9652* |
| Monozyten | 78 | 0,7468* | 0,508* |
| Eosinophile | 78 | 0,8777* | 0,8775* |
| Basophile | 77 | 0,3472* | 0,2408* |
| MCV | 76 | 0,975* | 0,973* |
| MCH | 76 | 0,961* | 0,956* |
| MCHC | 76 | 0,871* | 0,854* |
| RDW | 76 | 0,69* | 0,946* |
| PCT | 76 | 0,648* | 0,662* |
| MPV | 76 | 0,868* | 0,884* |
| PDW | 76 | 0,313+ | 0,674* |

*Signifikanzniveau $p < 0.001$; +Signifikanzniveau $p < 0.01$

III.3.3.2.1 Statistische Auswertung der Bland-Altman-Plots gesunder Probanden

Um die Übereinstimmung der Messergebnisse aus hirudinierten Blutproben und den K₂-EDTA-Kontrollen gesunder Probanden statistisch zu untersuchen, wurden Bland-Altman-Plots der einzelnen hämatologischen Parameter angefertigt.

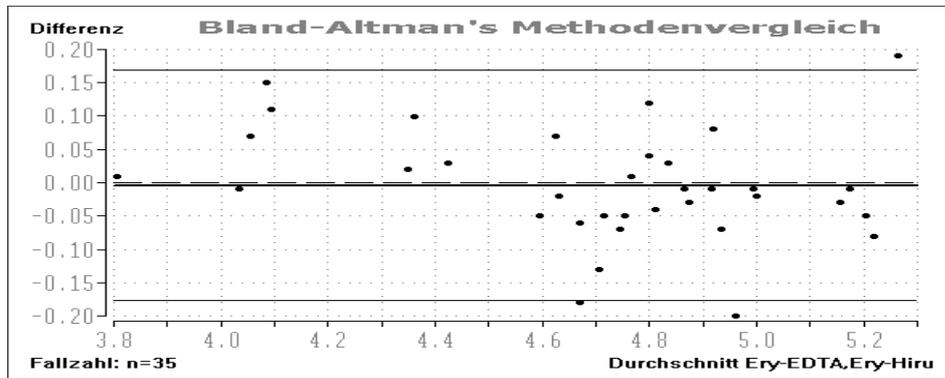


Abbildung 1: Bland-Altman-Plot für die Messergebnisse der Erythrozyten aus hirudiniertem und K₂-EDTA-antikoaguliertem Blut gesunder Probanden. Die mittlere Abweichung (dicke schwarze Linie) liegt bei 0,00, die mittleren, zweifachen Standardabweichungen (dünne schwarze Linien) liegen im von Bland und Altman empfohlenen Toleranzbereich von 95% bei 0,17 (+2 SD) und -0,18 (-2 SD).

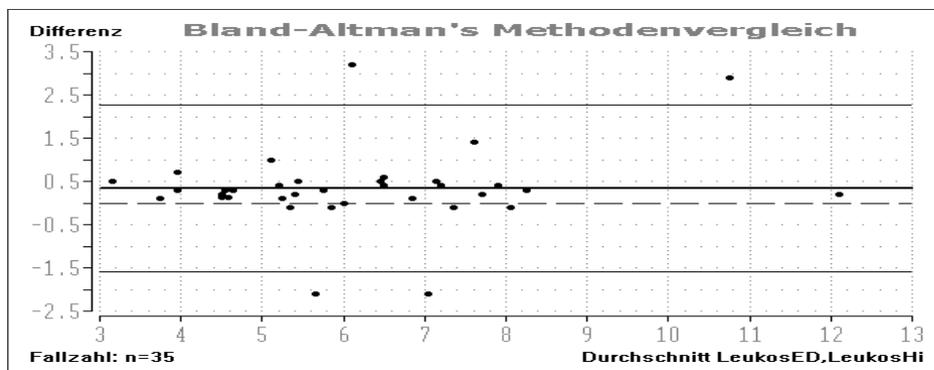


Abb. 2: Bland-Altman-Plot für die Messergebnisse der Leukozyten aus hirudiniertem und K₂-EDTA-antikoaguliertem Blut gesunder Probanden. Die mittlere Abweichung liegt bei 0,33, die mittleren, zweifachen Standardabweichungen im Toleranzbereich von 95% bei 2,26 (+2 SD) und -1,59 (-2 SD).

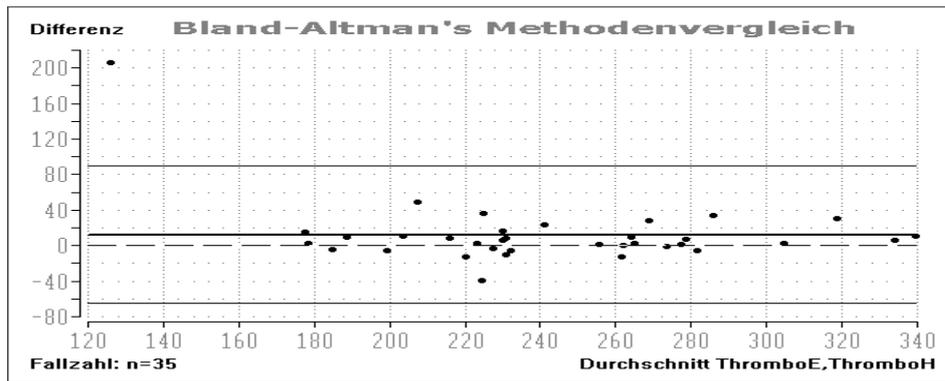


Abb. 3: Bland-Altman-Plot für die Messergebnisse der Thrombozyten aus hirudiniertem und K_2 -EDTA-antikoaguliertem Blut gesunder Probanden. Die mittlere Abweichung liegt bei 12.26, die mittleren, zweifachen Standardabweichungen im Toleranzbereich von 95% bei 89.36 (+2 SD) und -64.84 (-2 SD).

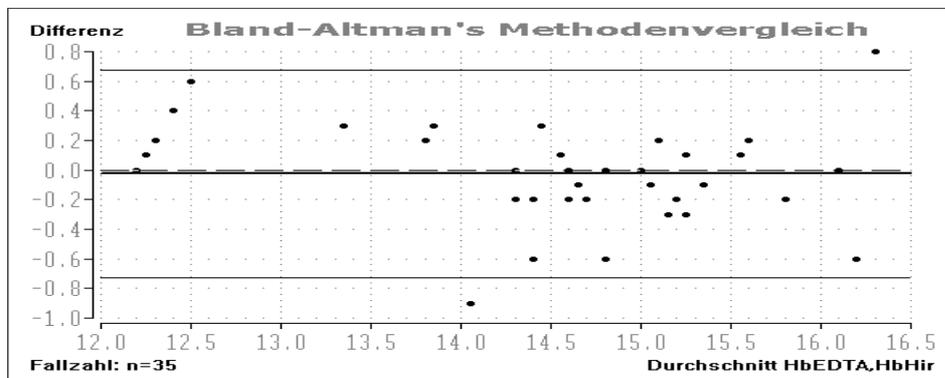


Abb. 4: Bland-Altman-Plot für die Messergebnisse des Hämoglobins aus hirudiniertem und K_2 -EDTA-antikoaguliertem Blut gesunder Probanden. Die mittlere Abweichung liegt bei -0,03, die mittleren, zweifachen Standardabweichungen im Toleranzbereich von 95% bei 0,68 (+2 SD) und -0,73 (-2 SD).

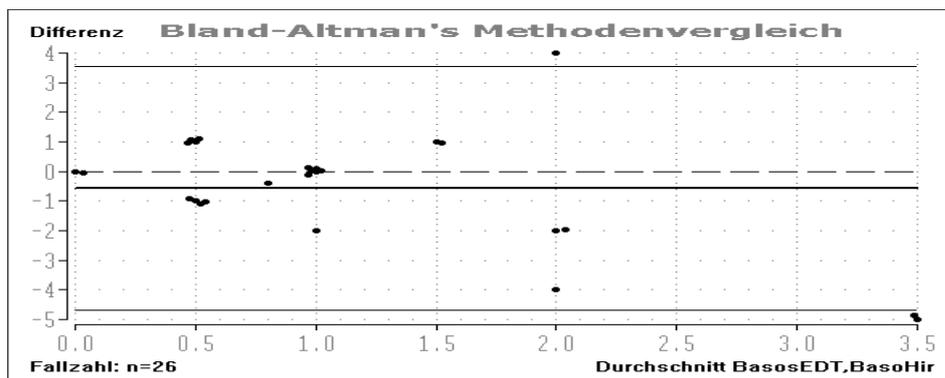


Abb. 5: Bland-Altman-Plot für die Messergebnisse der Basophilen gesunder Probanden aus hirudiniertem und K_2 -EDTA-antikoaguliertem Blut. Die mittlere Abweichung liegt bei -0.55, die mittleren, zweifachen Standardabweichungen im Toleranzbereich von 95% bei 4.41 (+2 SD) und bei -5.52 (-2 SD).

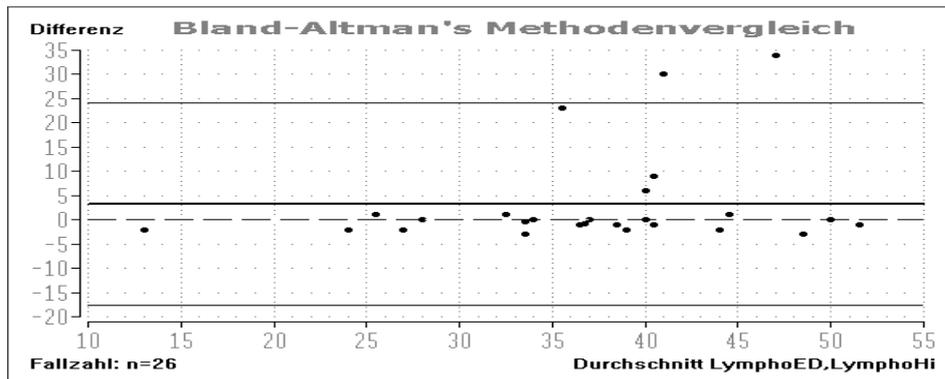


Abb. 6: Bland-Altman-Plot für die Messergebnisse der Lymphozyten gesunder Probanden aus hirudiniertem und K₂-EDTA-antikoaguliertem Blut. Die mittlere Abweichung liegt bei 3.23, die mittleren, zweifachen Standardabweichungen im Toleranzbereich von 95% bei 24.12 (+2 SD) und bei -17.65 (-2 SD).

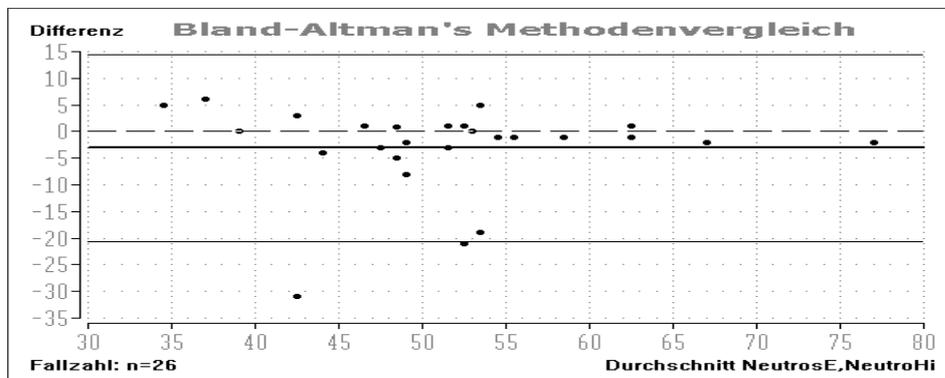


Abb. 7: Bland-Altman-Plot für die Messergebnisse der Neutrophilen gesunder Probanden aus hirudiniertem und K₂-EDTA-antikoaguliertem Blut. Die mittlere Abweichung liegt bei -3.08, die mittleren, zweifachen Standardabweichungen im Toleranzbereich von 95% bei 14.50 (+2 SD) und bei -20.67 (-2 SD).

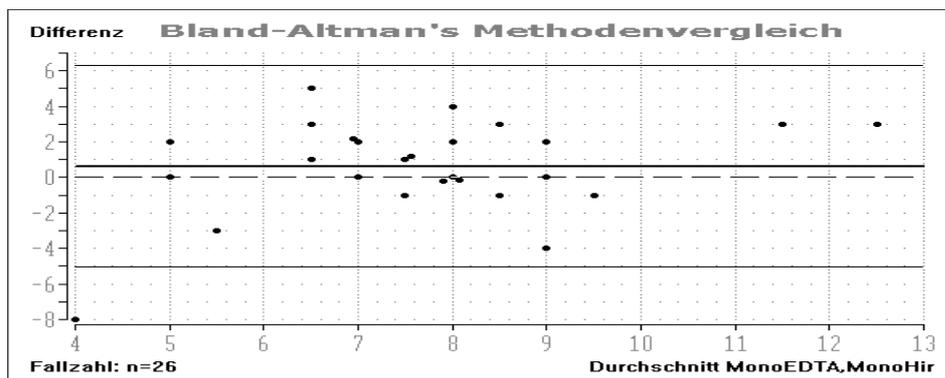


Abb. 8: Bland-Altman-Plot für die Messergebnisse der Monozyten gesunder Probanden aus hirudiniertem und K₂-EDTA-antikoaguliertem Blut. Die mittlere Abweichung liegt bei 0.61, die mittleren, zweifachen Standardabweichungen im Toleranzbereich von 95% bei 6.28 (+2 SD) und bei -5.06 (-2 SD).

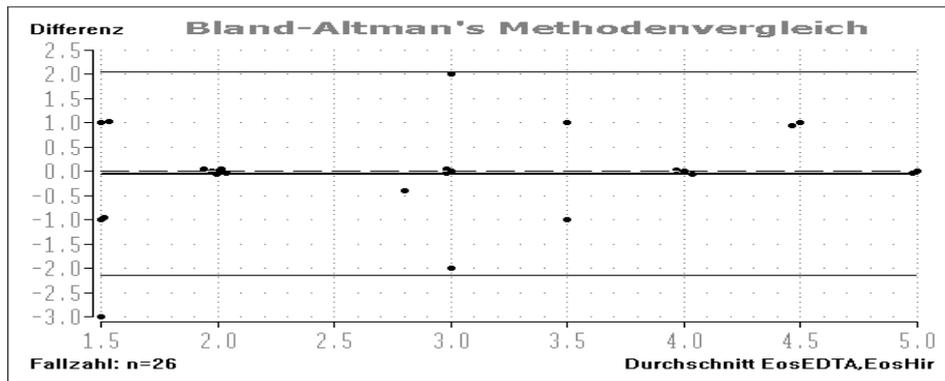


Abb. 9: Bland-Altman-Plot für die Messergebnisse der Eosinophilen gesunder Probanden aus hirudiniertem und K₂-EDTA-antikoaguliertem Blut. Die mittlere Abweichung liegt bei -0.05, die mittleren, zweifachen Standardabweichungen im Toleranzbereich von 95% bei 2.05 (+2 SD) und bei -2.16 (-2 SD).

III.3.3.2.2 Statistische Auswertung der Bland-Altman-Plots erkrankter Probanden

Analog zu den Messergebnissen gesunder Probanden wurden auch für die hämatologischen Messergebnisse der erkrankten Probanden Bland-Altman-Plots erstellt, um die Übereinstimmung der Messergebnisse zu untersuchen.

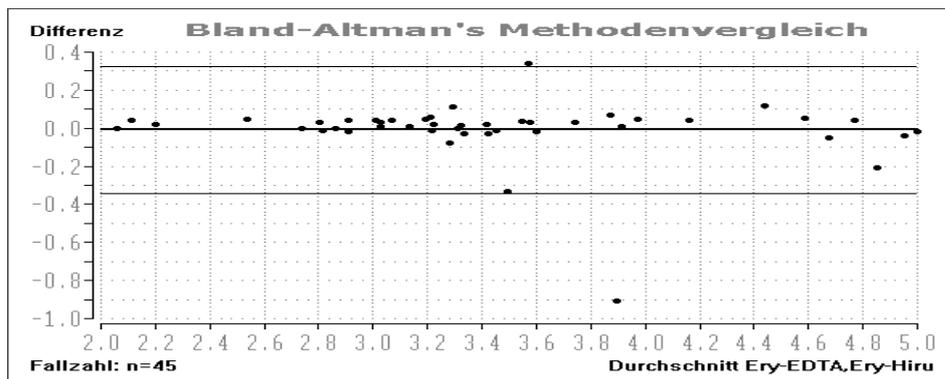


Abb. 10: Bland-Altman-Plot für die Messergebnisse der Erythrozyten erkrankter Probanden aus hirudiniertem und K₂-EDTA-antikoaguliertem Blut. Die mittlere Abweichung (fette schwarze Linie) liegt bei 0,00, die mittleren, zweifachen Standardabweichungen (dünne schwarze Linien) liegen im von Bland und Altman empfohlenen Toleranzbereich von 95% bei 0.32 (+2 SD) und bei -0.34 (-2 SD).

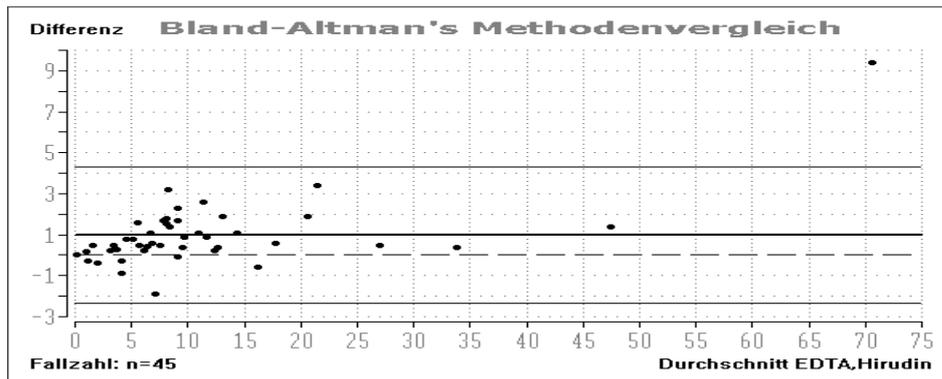


Abb. 11: Bland-Altman-Plot für die Messergebnisse der Leukozyten erkrankter Probanden aus hirudiniertem und K_2 -EDTA-antikoaguliertem Blut. Die mittlere Abweichung liegt bei 0.98, die mittleren, zweifachen Standardabweichungen im Toleranzbereich von 95% bei 4.32 (+2 SD) und bei -2.36 (-2 SD).

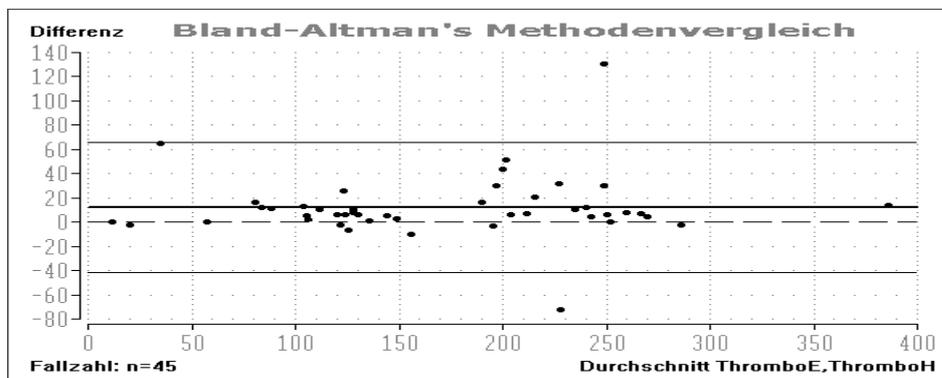


Abb. 12: Bland-Altman-Plot für die Messergebnisse der Thrombozyten erkrankter Probanden aus hirudiniertem und K_2 -EDTA-antikoaguliertem Blut. Die mittlere Abweichung liegt bei 12.01, die mittleren, zweifachen Standardabweichungen im Toleranzbereich von 95% bei 65.93 (+2 SD) und bei -41.92 (-2 SD).

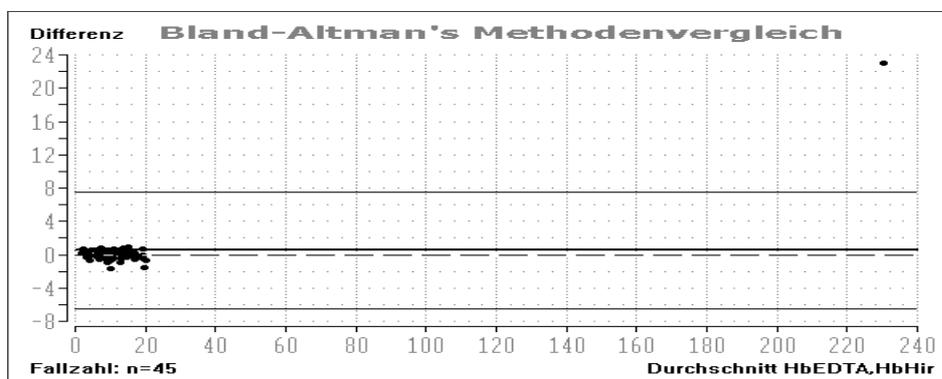


Abb. 13: Bland-Altman-Plot für die Messergebnisse des Hämoglobins erkrankter Probanden aus hirudiniertem und K_2 -EDTA-antikoaguliertem Blut. Die mittlere Abweichung liegt bei 0.51, die mittleren, zweifachen Standardabweichungen im Toleranzbereich von 95% bei 7.53 (+2 SD) und bei -6.50 (-2 SD).

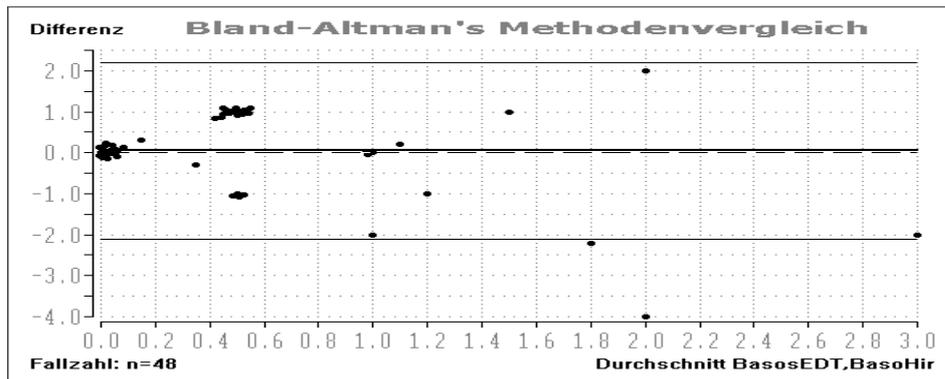


Abb. 14: Bland-Altman-Plot für die Messergebnisse der Basophilen erkrankter Probanden aus hirudiniertem und K_2 -EDTA-antikoaguliertem Blut. Die mittlere Abweichung liegt bei 0.04, die mittleren, zweifachen Standardabweichungen im Toleranzbereich von 95% bei 2.21 (+2 SD) und bei -2.12 (-2 SD).

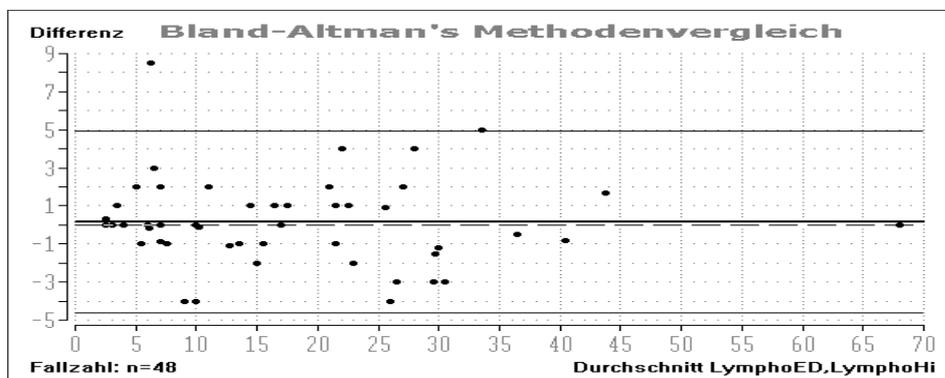


Abb. 15: Bland-Altman-Plot für die Messergebnisse der Lymphozyten erkrankter Probanden aus hirudiniertem und K_2 -EDTA-antikoaguliertem Blut. Die mittlere Abweichung liegt bei 0.15, die mittleren, zweifachen Standardabweichungen im Toleranzbereich von 95% bei 4.95 (+2 SD) und bei -4.64 (-2 SD).

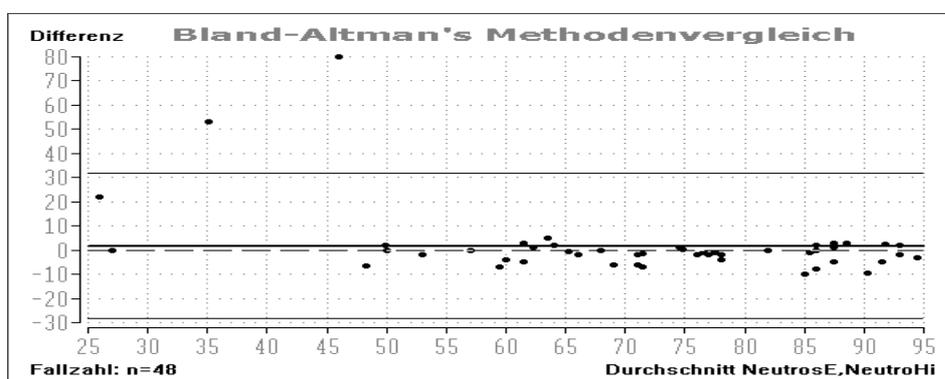


Abb. 16: Bland-Altman-Plot für die Messergebnisse der Neutrophilen erkrankter Probanden aus hirudiniertem und K_2 -EDTA-antikoaguliertem Blut. Die mittlere Abweichung liegt bei -0.44, die mittleren, zweifachen Standardabweichungen im Toleranzbereich von 95% bei 31.67 (+2 SD) und bei -28.43 (-2 SD).

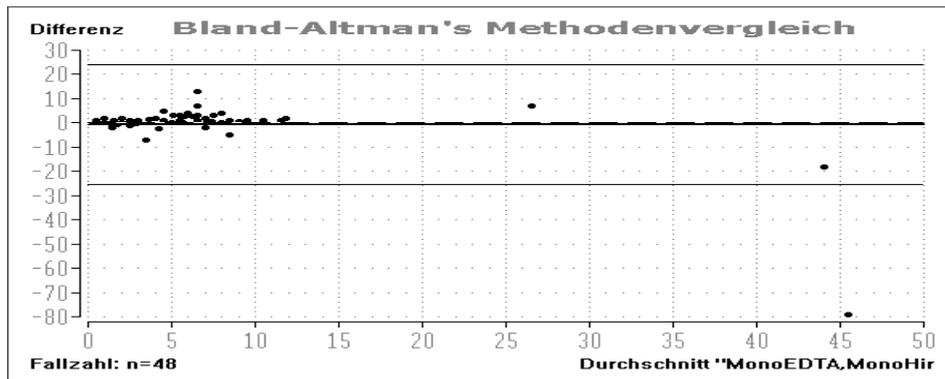


Abb. 17: Bland-Altman-Plot für die Messergebnisse der Monozyten erkrankter Probanden aus hirudiniertem und K₂-EDTA-antikoaguliertem Blut. Die mittlere Abweichung liegt bei -0.70, die mittleren, zweifachen Standardabweichungen im Toleranzbereich von 95% bei 24.18 (+2 SD) und bei -25.58 (-2 SD).

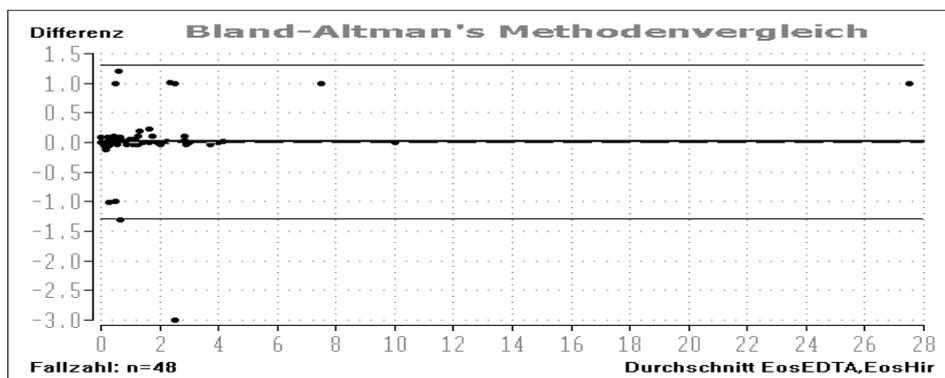


Abb. 18: Bland-Altman-Plot für die Messergebnisse der Eosinophilen erkrankter Probanden aus hirudiniertem und K₂-EDTA-antikoaguliertem Blut. Die mittlere Abweichung liegt bei 0.01, die mittleren, zweifachen Standardabweichungen im Toleranzbereich von 95% bei 1.31 (+2 SD) und bei -1.29 (-2 SD).

III.4 Vergleichende Untersuchungen der klinisch-chemischen Routineparameter aus Hirudinplasma und Serum unter Einbeziehung der Referenzwerte

III.4.1 Klinisch-chemische Laboruntersuchungen der Blutwerte gesunder Probanden

Im hirudinierten Plasma von 26 gesunden Probanden waren sämtliche Messwerte der klinisch-chemischen Parameter GOT, HBDH, CK, Lipase, Harnstoff, Protein, Albumin, Chlorid, Natrium und Pankreas-Amylase innerhalb des zulässigen Referenzbereiches des klinisch-chemischen Zentrallabors der Charité Berlin, CBF (siehe Tabelle 3).

Bei Amylase und GPT (jeweils eine Abweichung), Kreatinin, Bilirubin und Glucose (jeweils zwei), GGT, Phosphat und AP (jeweils drei), LDH und Harnsäure (jeweils vier), Cholesterin (jeweils sechs), Triglyzeride sowie Kalzium (jeweils sieben) wurde eine geringe Anzahl von Abweichungen aus dem Referenzbereich beobachtet. Der Kaliumwert wurde dagegen mit

insgesamt 17 Abweichungen konstant zu niedrig gemessen. Er war um circa 0,5 mmol/l niedriger als der Serumwert (bei einer Schwankungsbreite des Referenzbereiches von 3,2-5,4mmol/l). Bei der Lipase lag der Messwert der Hirudinprobe um circa 10 U/l niedriger als im Serum (bei einer Schwankungsbreite des Referenzbereiches von 0-190U/l). Auch bei Glucose und Kreatinin (in vier Fällen) waren die Messwerte der Hirudinproben konstant niedriger als im Serum, ohne zu falschen Einschätzungen über den Gesundheitszustand der Probanden zu führen.

Die Serumproben hatten bei zahlreichen Parametern die gleiche Anzahl von Abweichungen aus dem Referenzbereich wie die Hirudin-antikoagulierten Blutproben: keine bei GOT, HBDH, CK, Lipase, Harnstoff, Protein, Albumin, Chlorid, Natrium und Pankreas-Amylase und nur wenige bei Amylase (keine), GPT (eine), Kreatinin (zwei), Phosphat (drei), und Triglyceride (sieben). Eine im Vergleich zu den Hirudin-antikoagulierten Blutproben geringere Anzahl von Abweichungen aus dem Referenzbereich fand sich beim Kalzium (fünf), sowie der LDH und der Harnsäure (jeweils drei), geringfügig mehr Abweichungen hatten die Serumwerte von GGT (vier) sowie Billirubin und Glucose (jeweils drei). Während die Serumwerte der Alkalischen Phosphatase häufiger außerhalb des Normbereiches lagen (6:3g), fanden sich beim im hirudinierten Blut konstant zu niedrig gemessenen Kaliumwert im Serum drei Abweichungen.

So ergaben die Messwerte der klinisch-chemischen Routineparameter aus hirudiniertem Blut mit Ausnahme des konstant zu niedrig gemessenen Kaliumwertes keine bedeutenden Unterschiede, weder im Vergleich zu den Messwerten der Serumproben noch zu den jeweiligen Referenzwerten (siehe Tabelle 11).

Tabelle 11: Anzahl der Abweichungen der klinisch-chemischen Messparameter aus dem Referenzbereich des Zentrallabors der Charité, Campus Benjamin Franklin von gesunden Probanden in hirudiniertem Blut im Vergleich zu Serum

| Parameter | Anzahl der Blutproben (n) | Hirudinplasma | Serum |
|----------------|---------------------------|---------------|-------|
| Kalium | 26 | 17 | 3 |
| Triglyzeride | 26 | 7 | 7 |
| Kalzium | 26 | 7 | 5 |
| Cholesterin | 26 | 6 | 6 |
| LDH | 26 | 4 | 3 |
| Harnsäure | 26 | 4 | 3 |
| AP | 26 | 3 | 6 |
| Gamma GT | 26 | 3 | 4 |
| Phosphat | 26 | 3 | 3 |
| Bilirubin ges. | 26 | 2 | 3 |
| Glucose | 26 | 2 | 3 |
| Kreatinin | 26 | 2 | 2 |
| GPT | 26 | 1 | 1 |
| Amylase | 26 | 1 | 1 |
| GOT | 26 | 0 | 0 |
| HBDH | 26 | 0 | 0 |
| CK | 26 | 0 | 0 |
| Lipase | 26 | 0 | 0 |
| Harnstoff | 26 | 0 | 0 |
| Gesamtprotein | 26 | 0 | 0 |
| Albumin | 26 | 0 | 1 |
| P-Amylase | 26 | 0 | 0 |
| Natrium | 26 | 0 | 0 |
| Chlorid | 26 | 0 | 0 |

III.4.2 Klinisch-chemische Laboruntersuchungen der Blutwerte von Patienten

Insgesamt fand sich zwischen den aus Hirudinplasma und Serum gewonnenen Messwerten der klinisch-chemischen Routineparameter von erkrankten Probanden eine gute Übereinstimmung. Ausnahmen davon fanden sich bei den Parametern Kalium (in allen 33 Blutproben), Phosphat (in elf), Lipase (in fünf), CK (in drei), Harnsäure (in zwei) und GGT (in einer), wobei die Messwerte der Hirudinproben jeweils niedriger waren als die des Serums. Bei drei Proben bei HBDH sowie bei vier bei AP war der Hirudinwert jeweils höher als der Serumwert. Bei Kalzium waren jeweils drei Messwerte erhöht und drei niedriger. Nähere Betrachtungen der abweichenden Messergebnisse, die zu keiner falschen Beurteilung über den Gesundheitszustand der Probanden und über die Schwere der Erkrankungen führten,

zeigten, dass die entsprechenden Messwerte meist im Rahmen der Schwankungsbreite der Referenzwerte lagen.

III.4.3 Statistische Auswertung der klinisch-chemischen Messergebnisse

Die aus hirudinierten und aus Serum-Proben gewonnenen Messergebnisse der klinisch-chemischen Parameter wurden anhand von Korrelationskoeffizienten und Bland-Altman-Plots statistisch miteinander verglichen und bewertet.

III.4.3.1 Statistische Auswertung der Korrelationskoeffizienten

Mit Koeffizienten aus Pearsons Korrelation (r) und der Rang-Korrelation (ρ) von mindestens 0,9000 korrelierten sämtliche Messwerte der klinisch-chemischen Routineparameter aus Hirudinplasma und Serum auf sehr hohem Signifikanzniveau. Einzige Ausnahmen sind Kalium ($r=0,8904$ und $\rho=0,7536$) und Gesamtprotein ($\rho=0,8841$) (siehe Tabelle 13).

Tabelle 13: Statistische Auswertung der Messergebnisse aus Hirudinplasma und Serum der klinisch-chemischen Routineparameter

| Test Messparameter | Anzahl der Proben | Korrelation (r; Pearson) | Rang-Korrelation (rho; Spearman) |
|---------------------------|--------------------------|---------------------------------|---|
| GOT | 74 | 0,9904* | 0,9986* |
| GPT | 65 | 0,9973* | 0,8004* |
| AP | 64 | 0,9884* | 0,9874* |
| Gamma GT | 65 | 0,9726* | 0,9717* |
| HBDH | 65 | 0,9829* | 0,9825* |
| Bilirubin gesamt | 74 | 0,9178* | 0,914* |
| CK | 65 | 0,9969* | 0,9956* |
| Lipase | 65 | 0,9808* | 0,9801* |
| LDH | 65 | 0,9751* | 0,973 * |
| Amylase | 65 | 0,9958* | 0,9952* |
| Kreatinin | 64 | 0,9768* | 0,9766* |
| Harnstoff | 64 | 0,9963* | 0,9937* |
| Harnsäure | 65 | 0,9964* | 0,9956* |
| Phosphat | 64 | 0,9627* | 0,9278* |
| Glucose | 64 | 0,9223* | 0,9169* |
| Cholesterin | 65 | 0,9936* | 0,9895* |
| Triglyzeride | 65 | 0,9412* | 0,9223* |
| Kalzium | 72 | 0,8246* | 0,8239* |
| Gesamtprotein | 73 | 0,9113* | 0,8841* |
| Albumin | 65 | 0,9855* | 0,9849* |
| P-Amylase | 65 | 0,9952* | 0,9949* |
| Kalium | 64 | 0,8904* | 0,7536* |
| Natrium | 73 | 0,8857* | 0,8394* |
| Chlorid | 65 | 0,8782* | 0,8622* |

Signifikanzniveau $p < 0.0001$

III.4.3.2.1 Statistische Auswertung der Bland-Altman-Plots gesunder Probanden

Um die Übereinstimmung der klinisch-chemischen Messergebnisse gesunder Probanden aus hirudinierten Blutproben und ihren Serumkontrollen statistisch zu untersuchen, wurden für alle klinisch-chemischen Parameter Bland-Altman-Plots angefertigt.

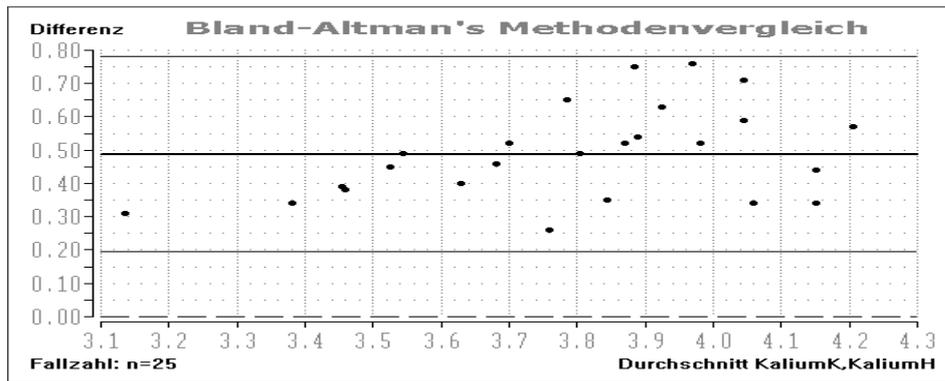


Abbildung 19: Bland-Altman-Plot für die Messergebnisse des Kaliums gesunder Probanden aus hirudiniertem Blut und aus Serum. Die mittlere Abweichung (dicke schwarze Linie) liegt bei 0.49, die mittleren, zweifachen Standardabweichungen im von Bland und Altman empfohlenen Toleranzbereich von 95% bei 0.78 (+2 SD) und bei 0.20 (-2 SD).

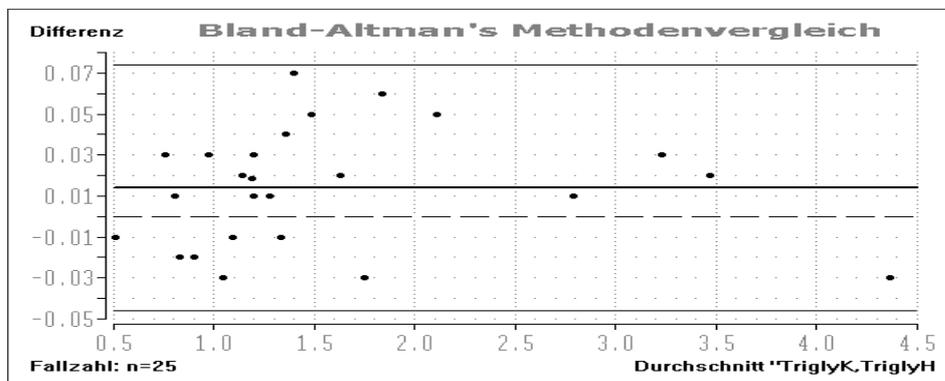


Abb. 20: Bland-Altman-Plot für die Messergebnisse der Triglyzeride gesunder Probanden aus hirudiniertem Blut und aus Serum. Die mittlere Abweichung liegt bei 0.01, die mittleren, zweifachen Standardabweichungen im Toleranzbereich von 95% bei 0.07 (+2 SD) und bei -0.05 (-2 SD).

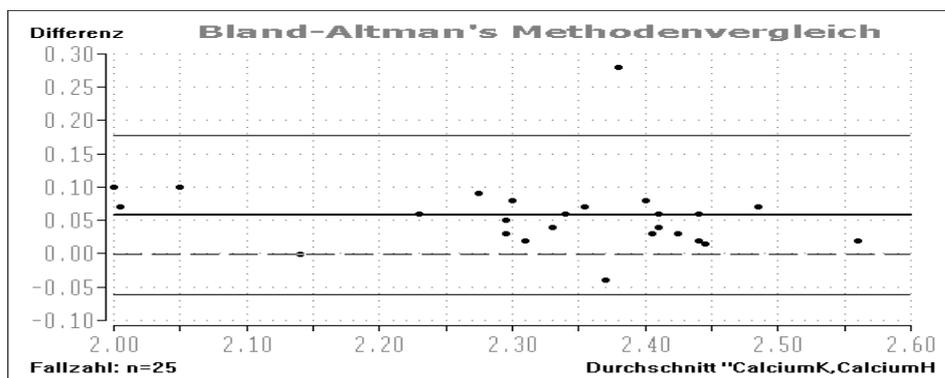


Abb. 21: Bland-Altman-Plot für die Messergebnisse des Kalziums gesunder Probanden aus hirudiniertem Blut und aus Serum. Die mittlere Abweichung liegt bei 0.06, die mittleren, zweifachen Standardabweichungen im Toleranzbereich von 95% bei 0.18 (+2 SD) und bei -0.06 (-2 SD).

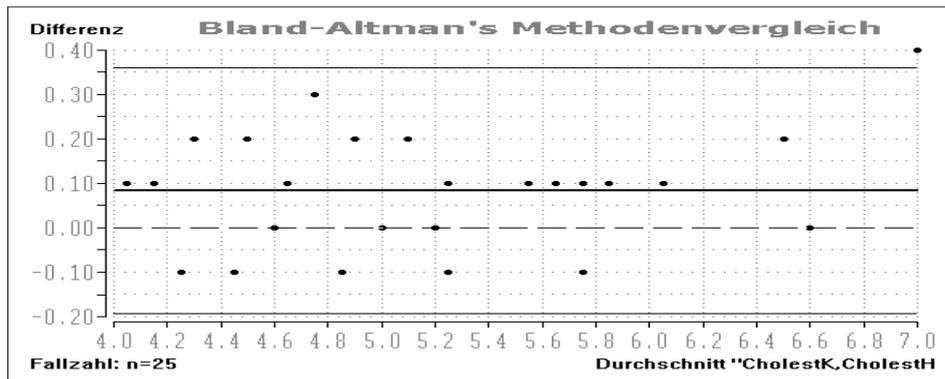


Abb. 22: Bland-Altman-Plot für die Messergebnisse des Cholesterin gesunder Probanden aus hirudiniertem Blut und aus Serum. Die mittlere Abweichung liegt bei 0.08, die mittleren, zweifachen Standardabweichungen im Toleranzbereich von 95% bei 0.36 (+2 SD) und bei -0.19 (-2 SD).

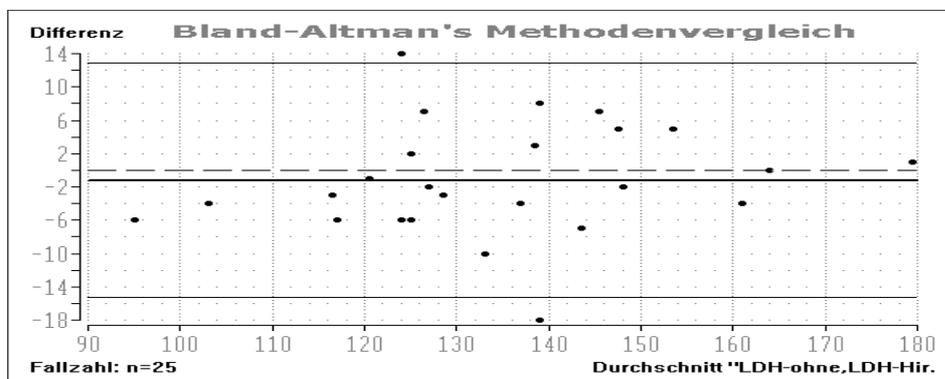


Abb. 23: Bland-Altman-Plot für die Messergebnisse des LDH gesunder Probanden aus hirudiniertem Blut und aus Serum. Die mittlere Abweichung liegt bei -1.20, die mittleren, zweifachen Standardabweichungen im Toleranzbereich von 95% bei 12.91 (+2 SD) und bei -15.31 (-2 SD).

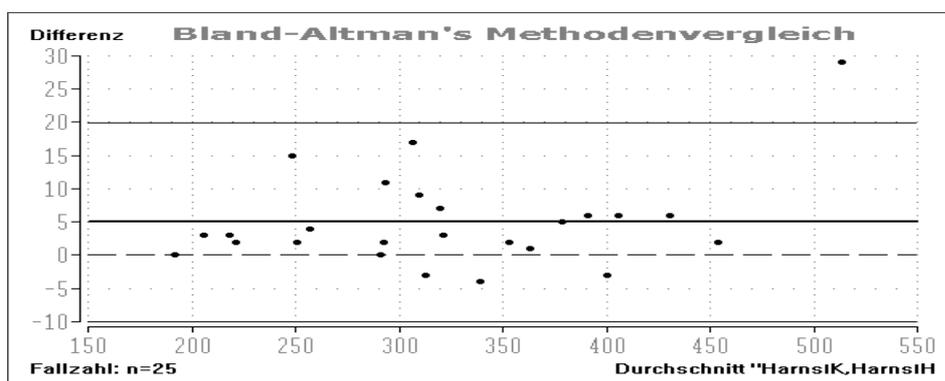


Abb. 24: Bland-Altman-Plot für die Messergebnisse der Harnsäure gesunder Probanden aus hirudiniertem Blut und aus Serum. Die mittlere Abweichung liegt bei 5.00, die mittleren, zweifachen Standardabweichungen im Toleranzbereich von 95% bei 19.96 (+2 SD) und bei -9.96 (-2 SD).

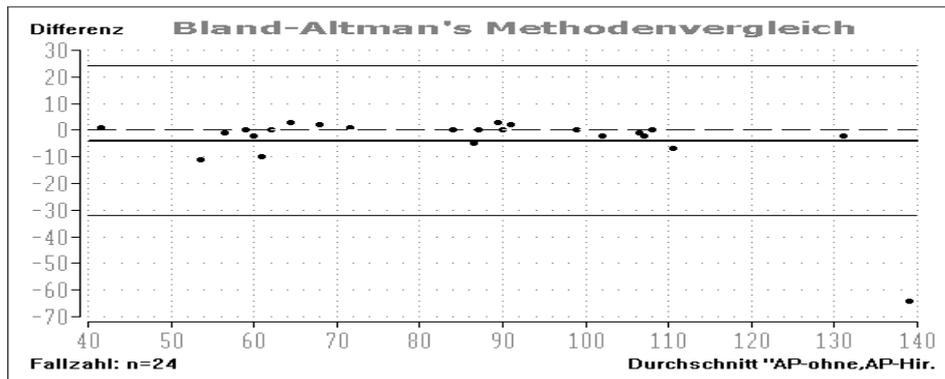


Abb. 25: Bland-Altman-Plot für die Messergebnisse des AP gesunder Probanden aus hirudiniertem Blut und aus Serum. Die mittlere Abweichung liegt bei -3.96, die mittleren, zweifachen Standardabweichungen im Toleranzbereich von 95% bei 24.10 (+2 SD) und bei -32.01 (-2 SD).

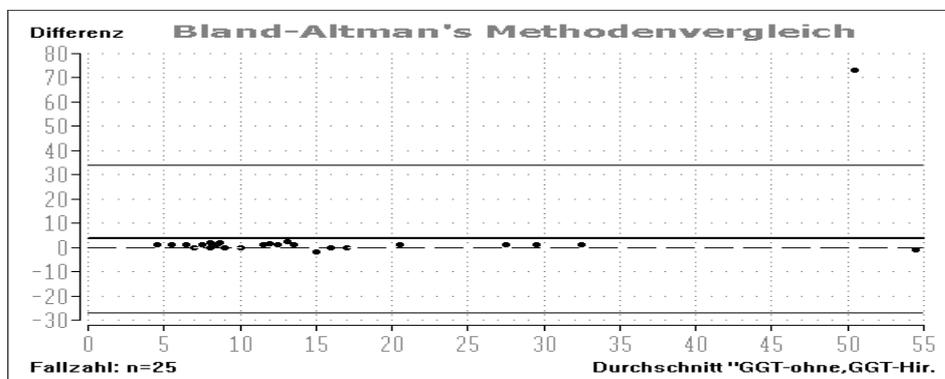


Abb. 26: Bland-Altman-Plot für die Messergebnisse des Gamma GT gesunder Probanden aus hirudiniertem Blut und aus Serum. Die mittlere Abweichung liegt bei 3.48, die mittleren, zweifachen Standardabweichungen im Toleranzbereich von 95% bei 34.01 (+2 SD) und bei -27.05 (-2 SD).

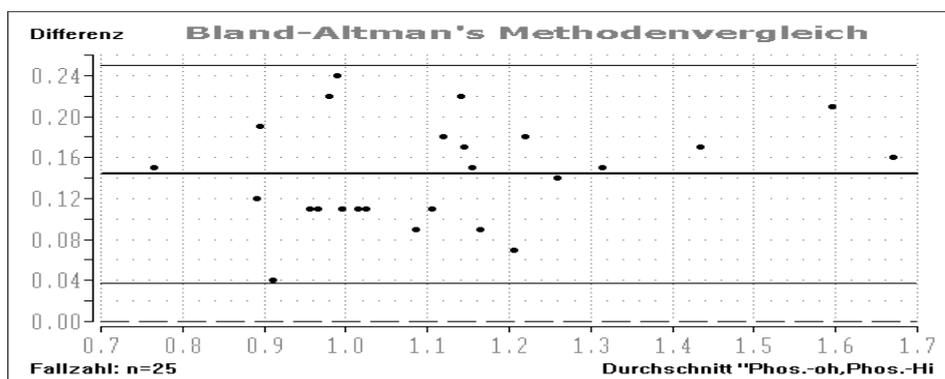


Abb. 27: Bland-Altman-Plot für die Messergebnisse des Phosphats gesunder Probanden aus hirudiniertem Blut und aus Serum. Die mittlere Abweichung liegt bei 0.14, die mittleren, zweifachen Standardabweichungen im Toleranzbereich von 95% bei 0.25 (+2 SD) und bei 0.04 (-2 SD).

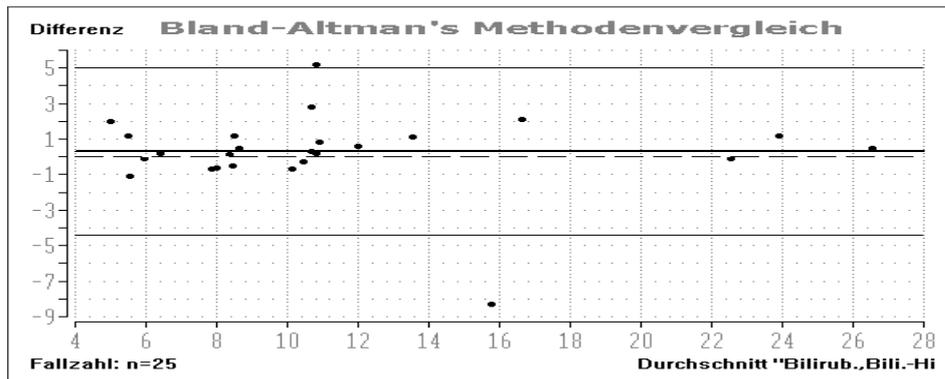


Abb. 28: Bland-Altman-Plot für die Messergebnisse des Bilirubins gesunder Probanden aus hirudiniertem Blut und aus Serum. Die mittlere Abweichung liegt bei 0.30, die mittleren, zweifachen Standardabweichungen im Toleranzbereich von 95% bei 5.01 (+2 SD) und bei -4.40 (-2 SD).

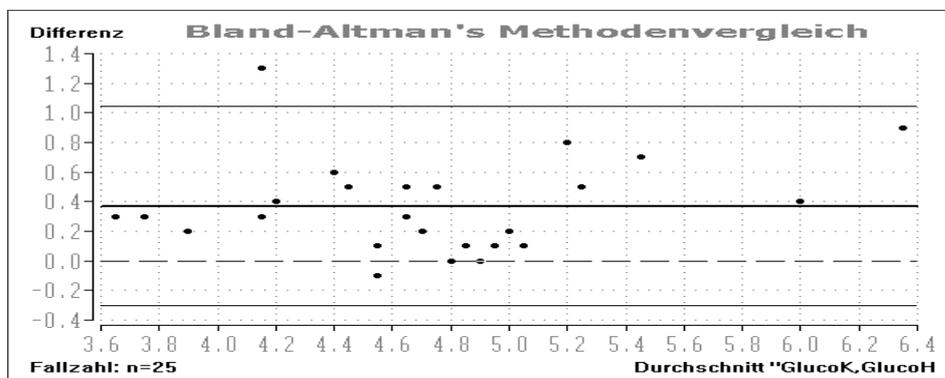


Abb. 29: Bland-Altman-Plot für die Messergebnisse der Glukose gesunder Probanden aus hirudiniertem Blut und aus Serum. Die mittlere Abweichung liegt bei 0.37, die mittleren, zweifachen Standardabweichungen im Toleranzbereich von 95% bei 1.04 (+2 SD) und bei -0.31 (-2 SD).

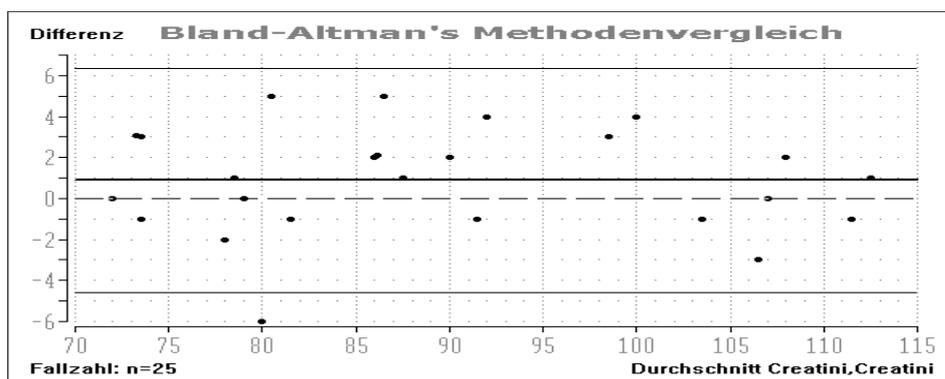


Abb. 30: Bland-Altman-Plot für die Messergebnisse des Kreatinin gesunder Probanden aus hirudiniertem Blut und aus Serum. Die mittlere Abweichung liegt bei 0.88, die mittleren, zweifachen Standardabweichungen im Toleranzbereich von 95% bei 6.36 (+2 SD) und bei -4.60 (-2 SD).

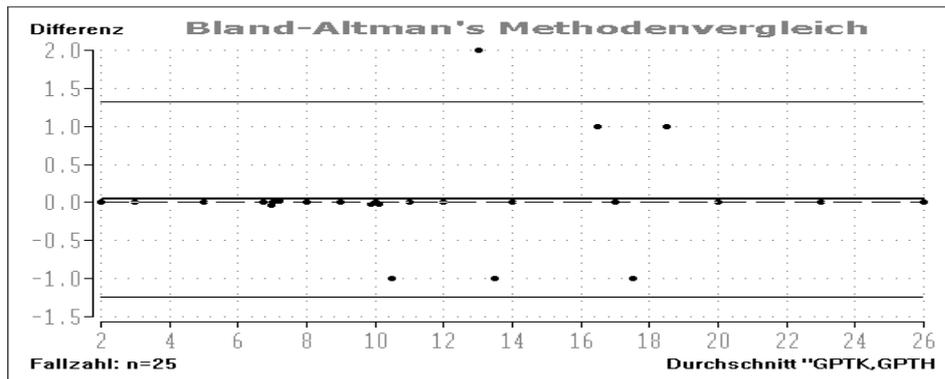


Abb. 31: Bland-Altman-Plot für die Messergebnisse des GPT gesunder Probanden aus hirudiniertem Blut und aus Serum. Die mittlere Abweichung liegt bei 0.04, die mittleren, zweifachen Standardabweichungen im Toleranzbereich von 95% bei 1.33 (+2 SD) und bei -1.25 (-2 SD).

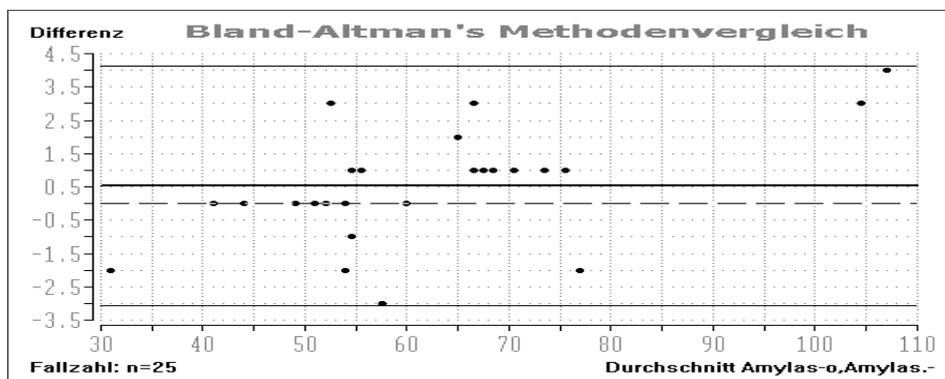


Abb. 32: Bland-Altman-Plot für die Messergebnisse der Amylase gesunder Probanden aus hirudiniertem Blut und aus Serum. Die mittlere Abweichung liegt bei 0.52, die mittleren, zweifachen Standardabweichungen im Toleranzbereich von 95% bei 4.12 (+2 SD) und bei -3.08 (-2 SD).

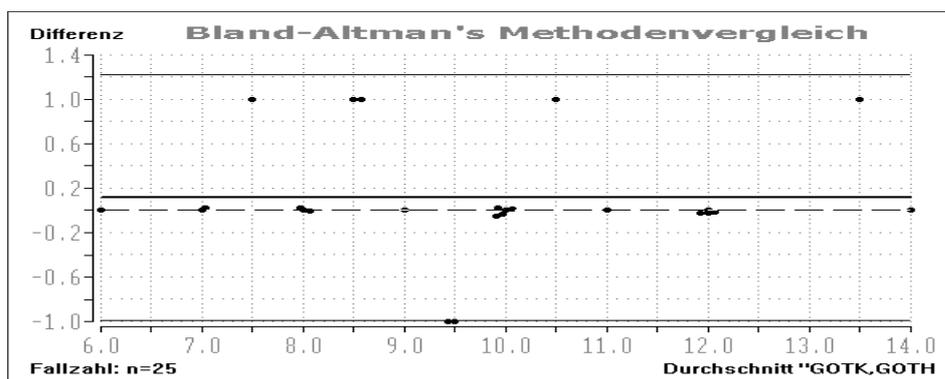


Abb. 33: Bland-Altman-Plot für die Messergebnisse des GOT gesunder Probanden aus hirudiniertem Blut und Serum. Die mittlere Abweichung liegt bei 0.12, die mittleren, zweifachen Standardabweichungen im empfohlenen Toleranzbereich von 95% bei 1.23 (+2 SD) und bei -0.99 (-2 SD).

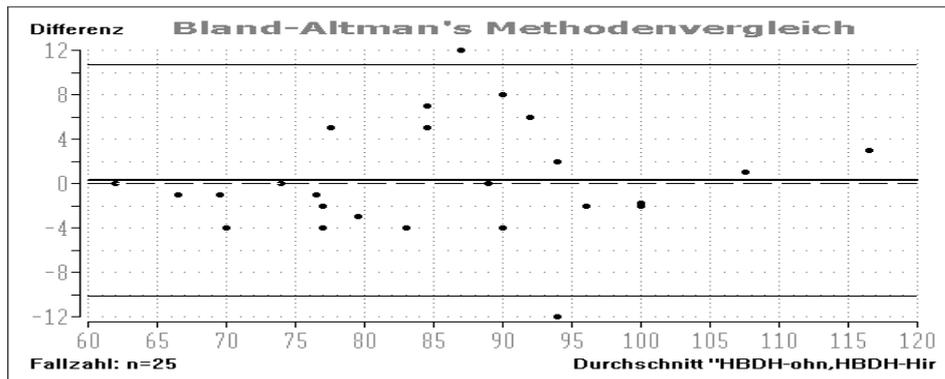


Abb. 34: Bland-Altman-Plot für die Messergebnisse des HBDH gesunder Probanden aus hirudiniertem Blut und Serum. Die mittlere Abweichung liegt bei 0.28, die mittleren, zweifachen Standardabweichungen im empfohlenen Toleranzbereich von 95% bei 10.73 (+2 SD) und bei -10.17 (-2 SD).

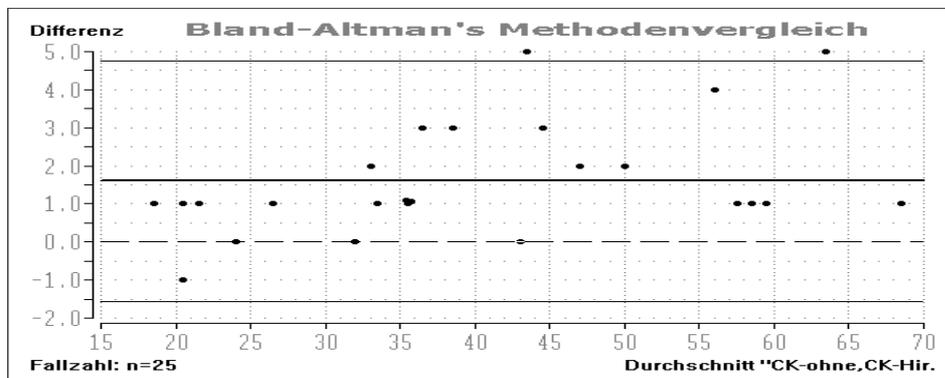


Abb. 35: Bland-Altman-Plot für die Messergebnisse des CK gesunder Probanden aus hirudiniertem Blut und Serum. Die mittlere Abweichung liegt bei 1.60, die mittleren, zweifachen Standardabweichungen im empfohlenen Toleranzbereich von 95% bei 4.76 (+2 SD) und bei -1.56 (-2 SD).

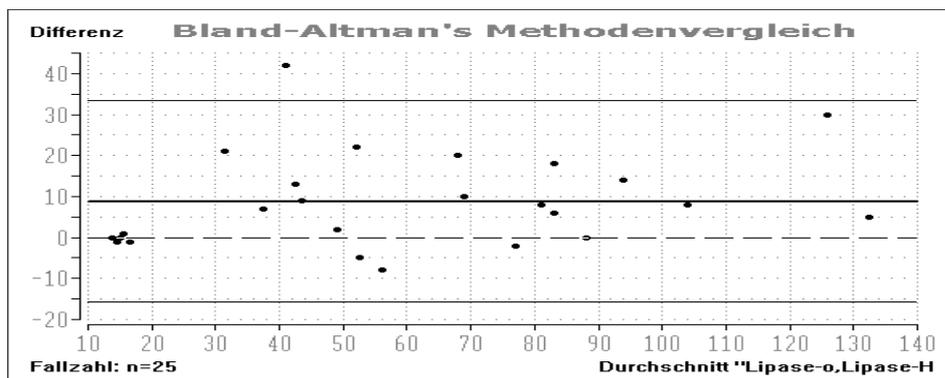


Abb. 36: Bland-Altman-Plot für die Messergebnisse der Lipase gesunder Probanden aus hirudiniertem Blut und Serum. Die mittlere Abweichung liegt bei 8.76, die mittleren, zweifachen Standardabweichungen im empfohlenen Toleranzbereich von 95% bei 33.36 (+2 SD) und bei -15.84 (-2 SD).

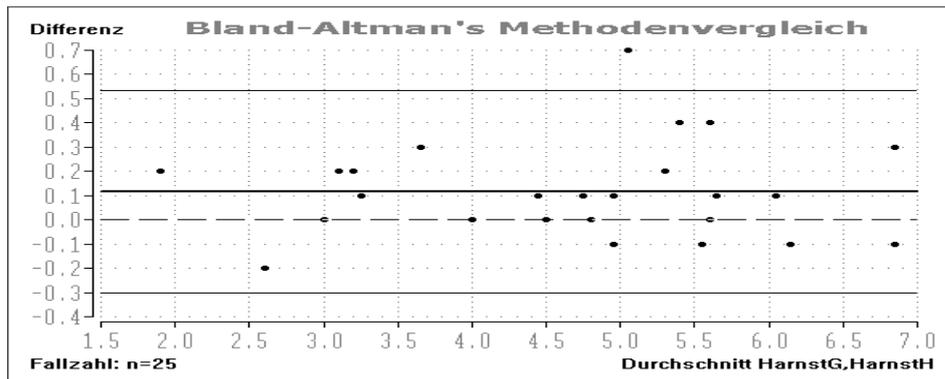


Abb. 37: Bland-Altman-Plot für die Messergebnisse des Harnstoffs gesunder Probanden aus hirudiniertem Blut und Serum. Die mittlere Abweichung liegt bei 0.12, die mittleren, zweifachen Standardabweichungen im empfohlenen Toleranzbereich von 95% bei 0.54 (+2 SD) und bei -0.30 (-2 SD).

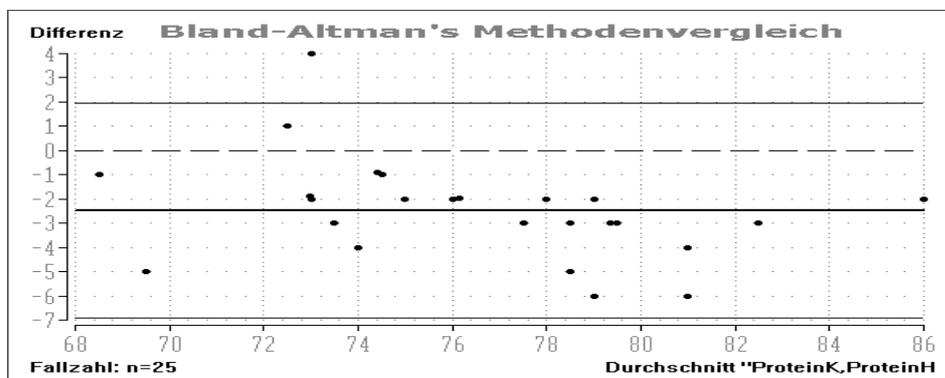


Abb. 38: Bland-Altman-Plot für die Messergebnisse des Gesamtproteins gesunder Probanden aus hirudiniertem Blut und Serum. Die mittlere Abweichung liegt bei -2.48, die mittleren, zweifachen Standardabweichungen im empfohlenen Toleranzbereich von 95% bei 1.95 (+2 SD) und bei -6.91 (-2 SD).

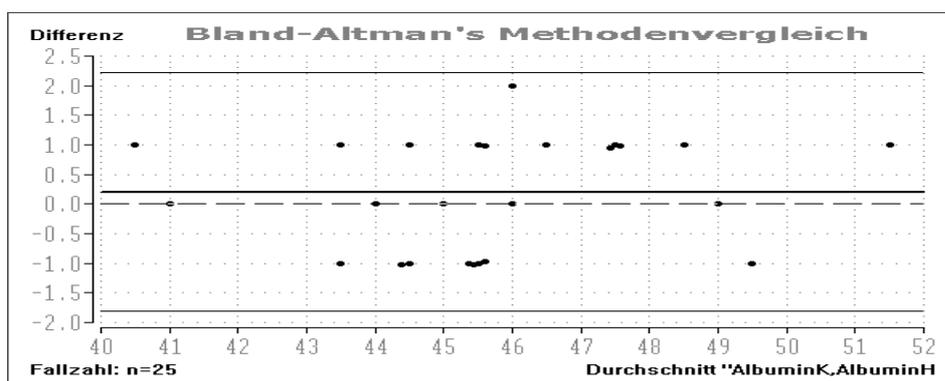


Abb. 39: Bland-Altman-Plot für die Messergebnisse des Albumins gesunder Probanden aus hirudiniertem Blut und Serum. Die mittlere Abweichung liegt bei 0.2000, die mittleren, zweifachen Standardabweichungen im empfohlenen Toleranzbereich von 95% bei 2.22 (+2 SD) und bei -1.82 (-2 SD).

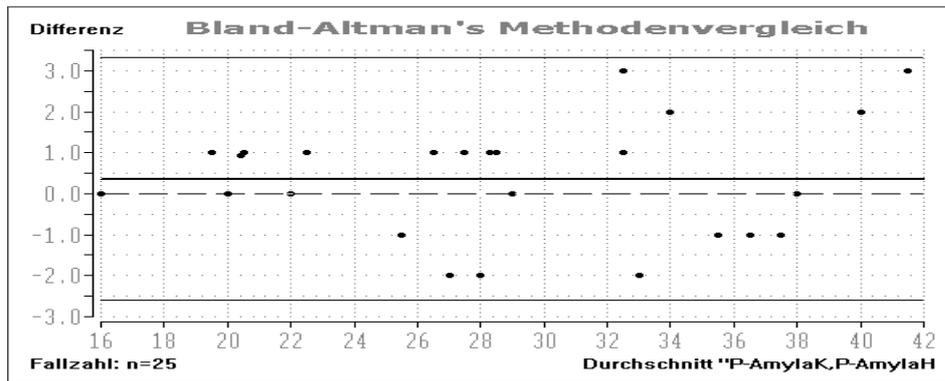


Abb. 40: Bland-Altman-Plot für die Messergebnisse der P-Amylase gesunder Probanden aus hirudiniertem Blut und Serum. Die mittlere Abweichung liegt bei 0.36, die mittleren, zweifachen Standardabweichungen im empfohlenen Toleranzbereich von 95% bei 3.33 (+2 SD) und bei -2.61 (-2 SD).

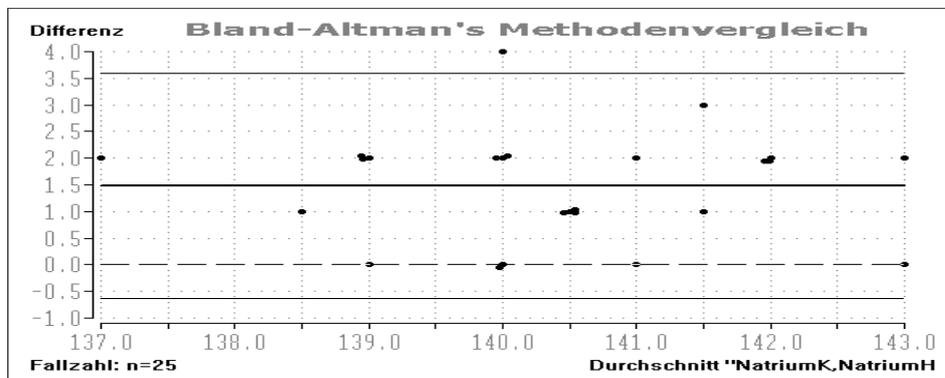


Abb. 41: Bland-Altman-Plot für die Messergebnisse des Natriums gesunder Probanden aus hirudiniertem Blut und Serum. Die mittlere Abweichung liegt bei 1.48, die mittleren, zweifachen Standardabweichungen im empfohlenen Toleranzbereich von 95% bei 3.60 (+2 SD) und bei -0.64 (-2 SD).

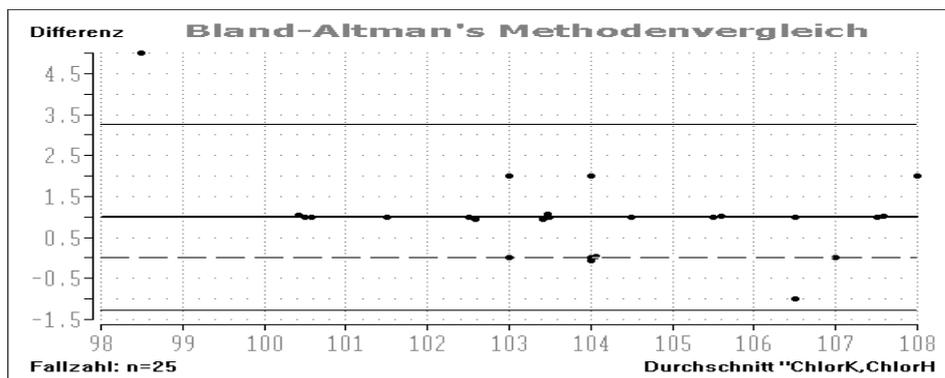


Abb. 42: Bland-Altman-Plot für die Messergebnisse des Chlors gesunder Probanden aus hirudiniertem Blut und Serum. Die mittlere Abweichung liegt bei 1.00, die mittleren, zweifachen Standardabweichungen im empfohlenen Toleranzbereich von 95% bei 3.27 (+2 SD) und bei -1.27 (-2 SD).

III.3.3.4 Bland-Altman-Plots der klinischen-chemischen Messergebnisse erkrankter Probanden:

Um auch die Übereinstimmung der Messergebnisse zwischen hirudinierten Blutproben und ihren Kontrollen der erkrankten Probanden zu untersuchen, wurden Bland-Altman-Plots sämtlicher klinisch-chemischer Messparameter angefertigt.

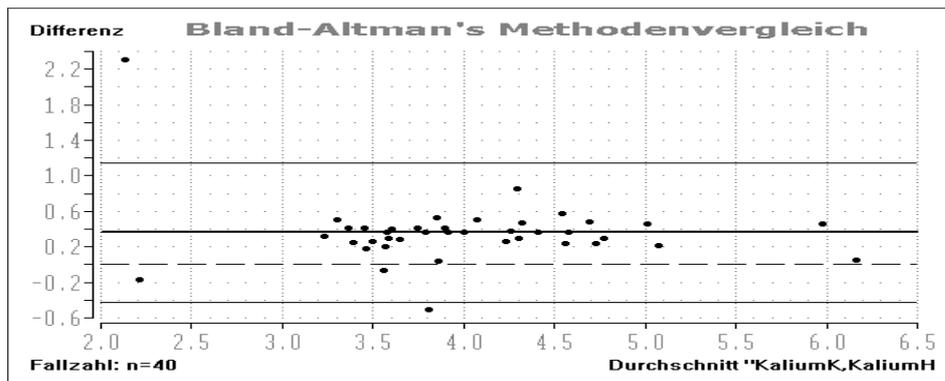


Abbildung 43: Bland-Altman-Plot für die Messergebnisse des Kaliums erkrankter Probanden aus hirudiniertem Blut und Serum. Die mittlere Abweichung (dicke schwarze Linie) liegt bei 0.36, die mittleren, zweifachen Standardabweichungen (dünne schwarze Linien) im von Bland und Altman empfohlenen Toleranzbereich von 95% bei 1.15 (+2 SD) und bei -0.43 (-2 SD).

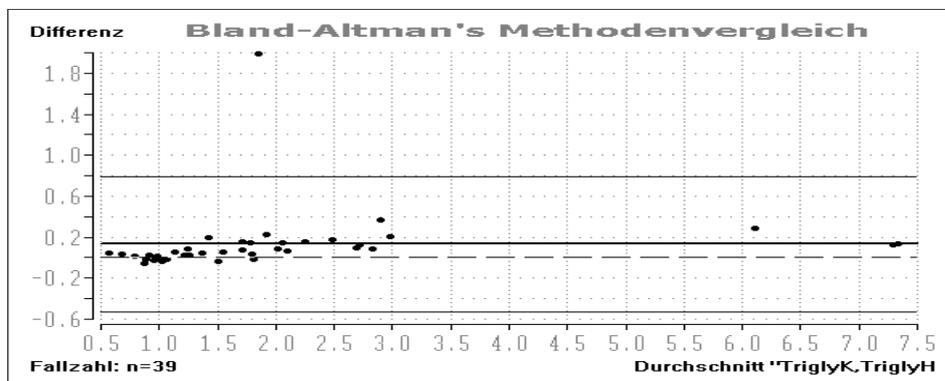


Abb. 44: Bland-Altman-Plot für die Messergebnisse der Triglyzeride erkrankter Probanden aus hirudiniertem Blut und Serum. Die mittlere Abweichung liegt bei 0.13, die mittleren, zweifachen Standardabweichungen im Toleranzbereich von 95% bei 0.79 (+2 SD) und bei -0.53 (-2 SD).

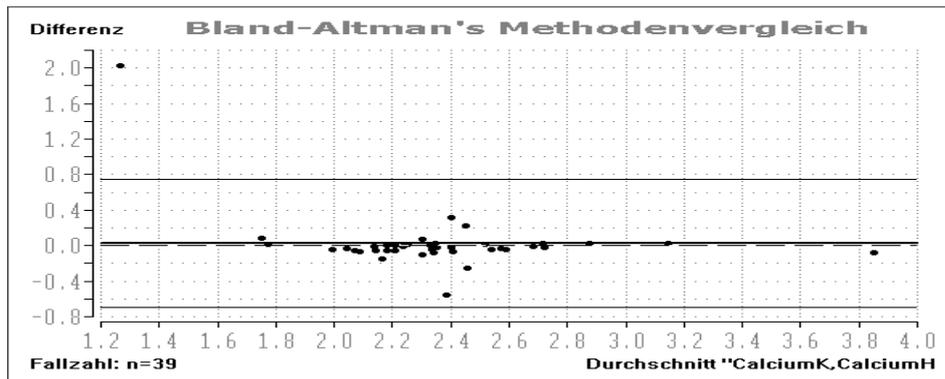


Abb. 45: Bland-Altman-Plot für die Messergebnisse des Kalziums erkrankter Probanden aus hirudiniertem Blut und Serum. Die mittlere Abweichung liegt bei 0.02, die mittleren, zweifachen Standardabweichungen im Toleranzbereich von 95% bei 0.75 (+2 SD) und bei -0.70 (-2 SD).

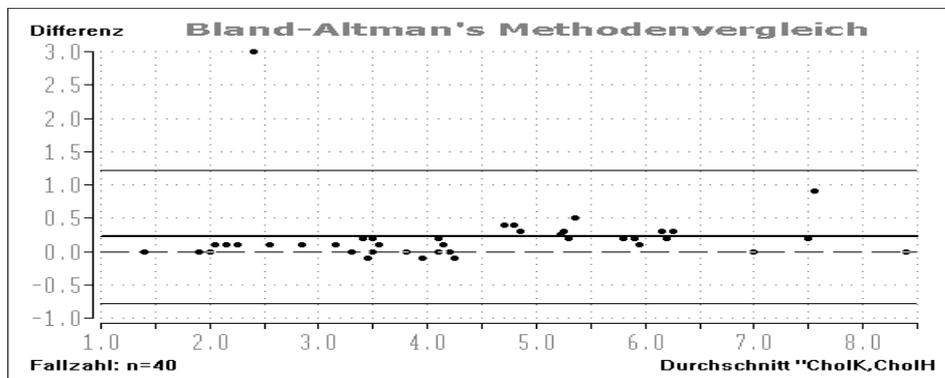


Abb. 46: Bland-Altman-Plot für die Messergebnisse des Cholesterins erkrankter Probanden aus hirudiniertem Blut und Serum. Die mittlere Abweichung liegt bei 0.22, die mittleren, zweifachen Standardabweichungen im Toleranzbereich von 95% bei 1.22 (+2 SD) und bei -0.78 (-2 SD).

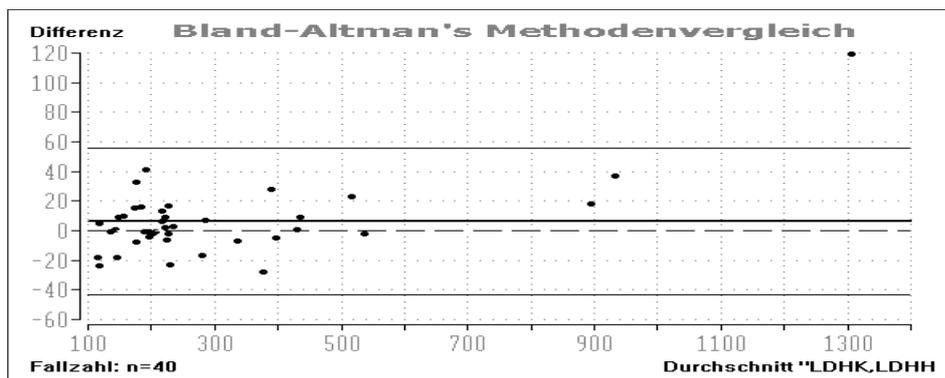


Abb. 47: Bland-Altman-Plot für die Messergebnisse des LDH erkrankter Probanden aus hirudiniertem Blut und Serum. Die mittlere Abweichung liegt bei 6.35, die mittleren, zweifachen Standardabweichungen im Toleranzbereich von 95% bei 55.80 (+2 SD) und bei -43.10 (-2 SD).

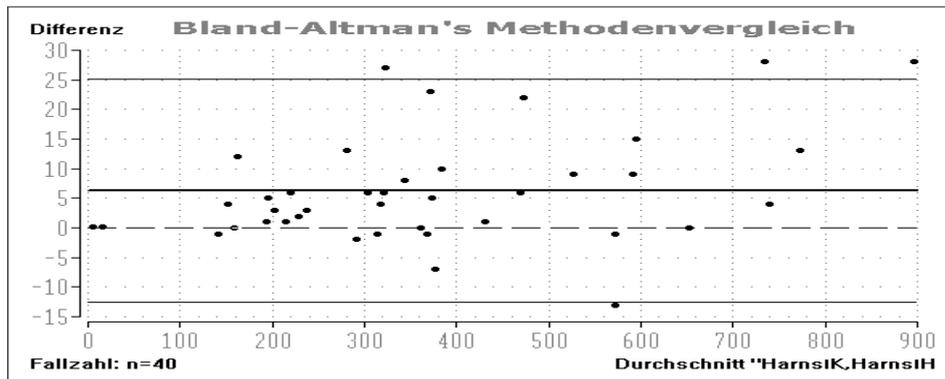


Abb. 48: Bland-Altman-Plot für die Messergebnisse der Harnsäure erkrankter Probanden aus hirudiniertem Blut und Serum. Die mittlere Abweichung liegt bei 6.21, die mittleren, zweifachen Standardabweichungen im Toleranzbereich von 95% bei 25.03 (+2 SD) und bei -12.62 (-2 SD).

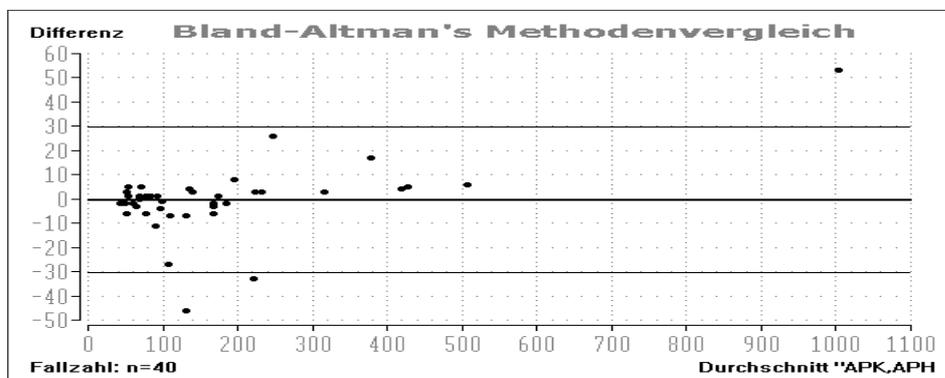


Abb. 49: Bland-Altman-Plot für die Messergebnisse des AP erkrankter Probanden aus hirudiniertem Blut und Serum. Die mittlere Abweichung liegt bei -0.38, die mittleren, zweifachen Standardabweichungen im Toleranzbereich von 95% bei 29.57 (+2 SD) und bei -30.32 (-2 SD).

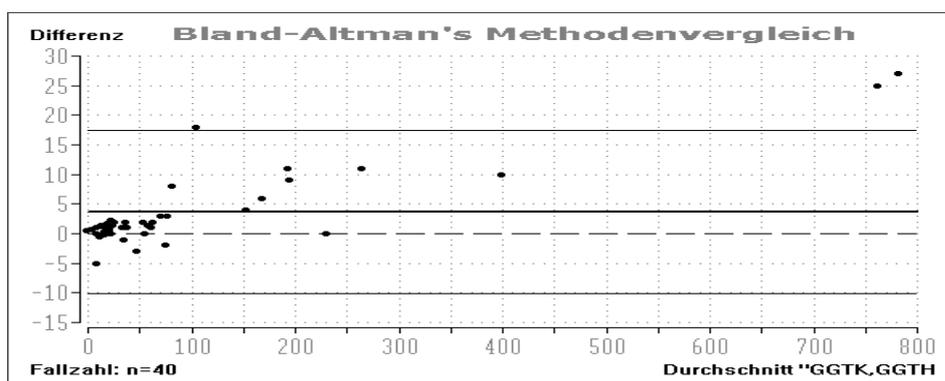


Abb. 50: Bland-Altman-Plot für die Messergebnisse des GGT erkrankter Probanden aus hirudiniertem Blut und Serum. Die mittlere Abweichung liegt bei 3.68, die mittleren, zweifachen Standardabweichungen im Toleranzbereich von 95% bei 17.47 (+2 SD) und bei -10.12 (-2 SD).

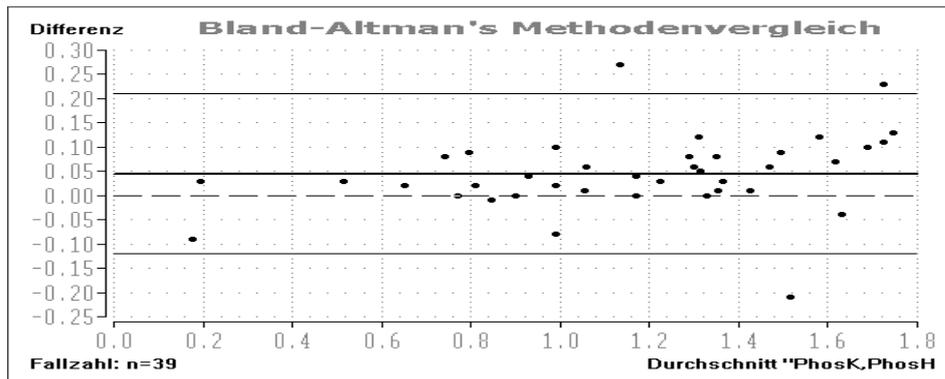


Abb. 51: Bland-Altman-Plot für die Messergebnisse des Phosphats erkrankter Probanden aus hirudiniertem Blut und Serum. Die mittlere Abweichung liegt bei 0.05, die mittleren, zweifachen Standardabweichungen im Toleranzbereich von 95% bei 0.21 (+2 SD) und bei -0.12 (-2 SD).

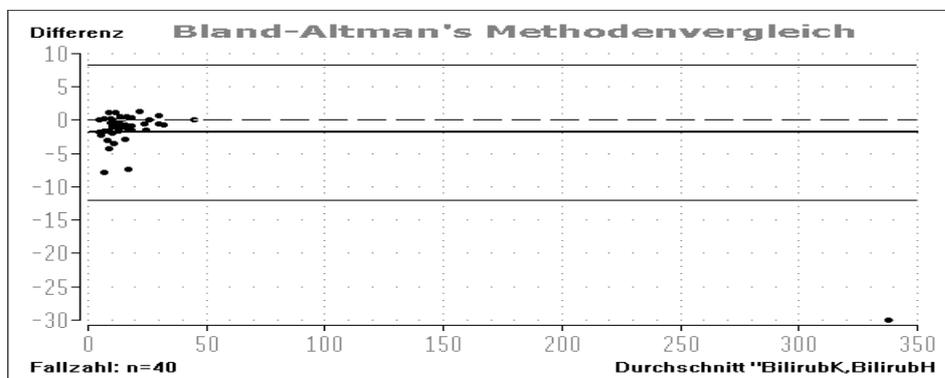


Abb. 52: Bland-Altman-Plot für die Messergebnisse des Bilirubins erkrankter Probanden aus hirudiniertem Blut und Serum. Die mittlere Abweichung liegt bei -1.82, die mittleren, zweifachen Standardabweichungen im Toleranzbereich von 95% bei 8.36 (+2 SD) und bei -11.99 (-2 SD).

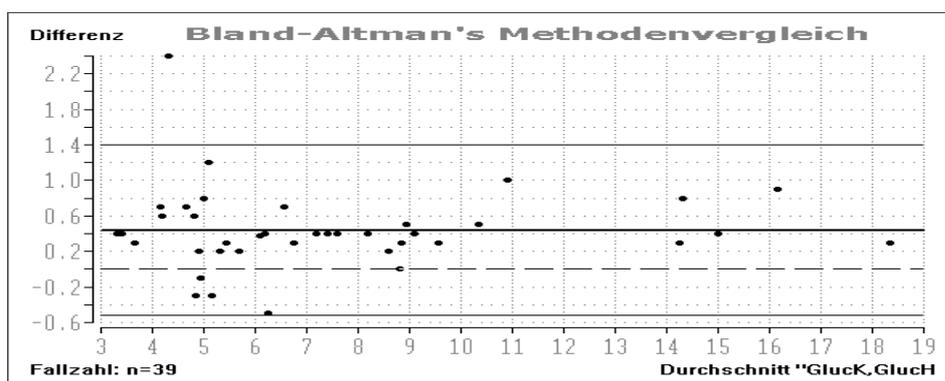


Abb. 53: Bland-Altman-Plot für die Messergebnisse der Glukose erkrankter Probanden aus hirudiniertem Blut und Serum. Die mittlere Abweichung liegt bei 0.44, die mittleren, zweifachen Standardabweichungen im Toleranzbereich von 95% bei 1.40 (+2 SD) und bei -0.52 (-2 SD).

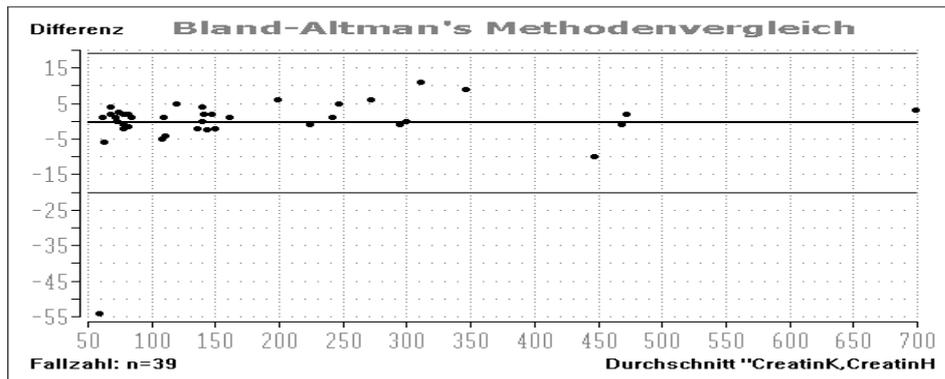


Abb. 54: Bland-Altman-Plot für die Messergebnisse des Kreatinin erkrankter Probanden aus hirudiniertem Blut und Serum. Die mittlere Abweichung liegt bei -0.488, die mittleren, zweifachen Standardabweichungen im Toleranzbereich von 95% bei 19.20 (+2 SD) und bei -20.17 (-2 SD).

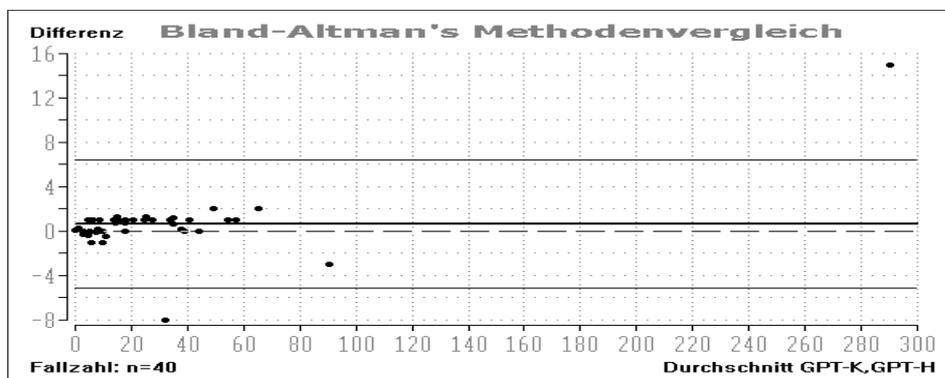


Abb. 55: Bland-Altman-Plot für die Messergebnisse des GPT erkrankter Probanden aus hirudiniertem Blut und Serum. Die mittlere Abweichung liegt bei -0.488, die mittleren, zweifachen Standardabweichungen im Toleranzbereich von 95% bei 19.20 (+2 SD) und bei -20.17 (-2 SD).

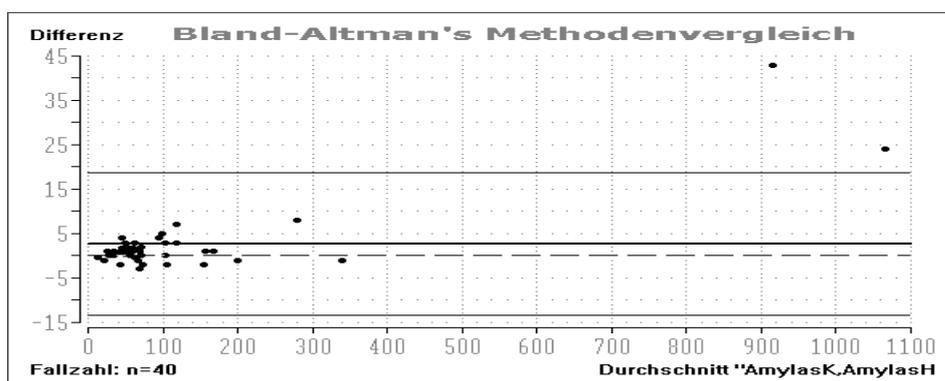


Abb. 56: Bland-Altman-Plot für die Messergebnisse der Amylase erkrankter Probanden aus hirudiniertem Blut und Serum. Die mittlere Abweichung liegt bei 2.65, die mittleren, zweifachen Standardabweichungen im Toleranzbereich von 95% bei 18.72 (+2 SD) und bei -13.42 (-2 SD).

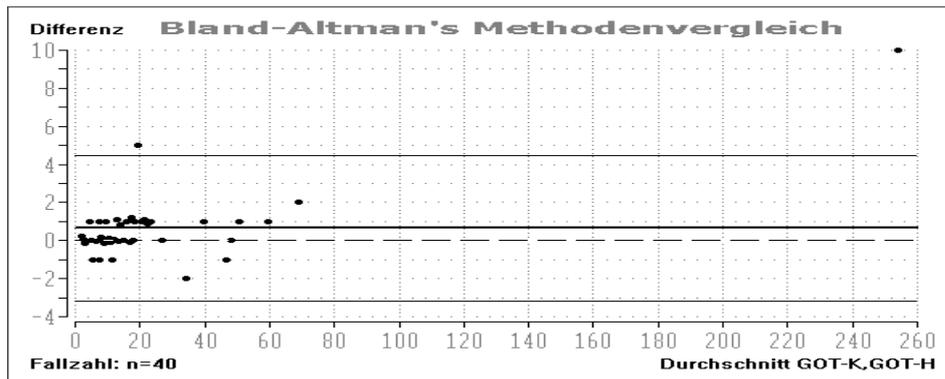


Abb. 57: Bland-Altman-Plot für die Messergebnisse des GOT erkrankter Probanden aus hirudiniertem Blut und Serum. Die mittlere Abweichung liegt bei 0.65, die mittleren, zweifachen Standardabweichungen im Toleranzbereich von 95% bei 4.46 (+2 SD) und bei -3.16 (-2 SD).

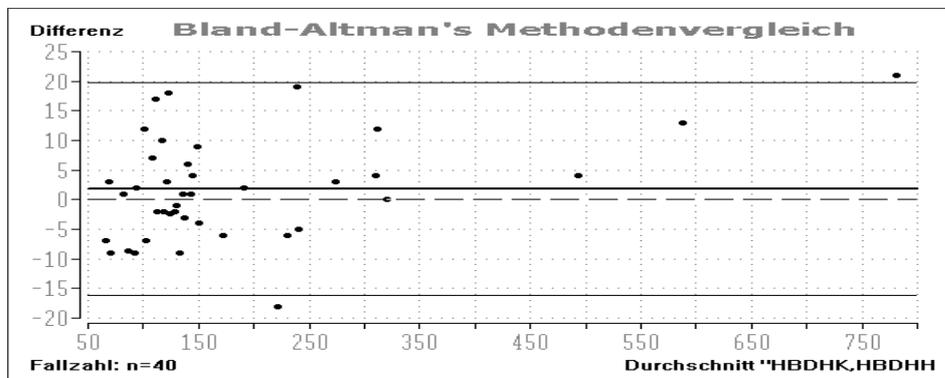


Abb. 58: Bland-Altman-Plot für die Messergebnisse des HBDH erkrankter Probanden aus hirudiniertem Blut und Serum. Die mittlere Abweichung liegt bei 1.78, die mittleren, zweifachen Standardabweichungen im Toleranzbereich von 95% bei 19.68 (+2 SD) und bei -16.13 (-2 SD).

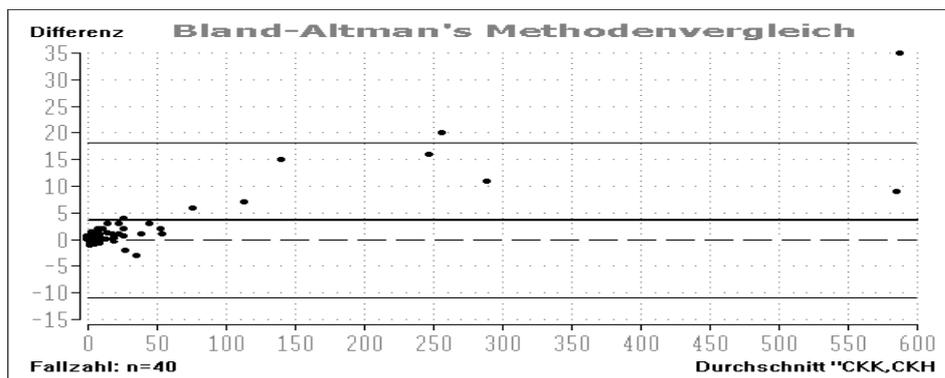


Abb. 59: Bland-Altman-Plot für die Messergebnisse des CK erkrankter Probanden aus hirudiniertem Blut und Serum. Die mittlere Abweichung liegt bei 3.58, die mittleren, zweifachen Standardabweichungen im Toleranzbereich von 95% bei 18.11 (+2 SD) und bei -10.96 (-2 SD).

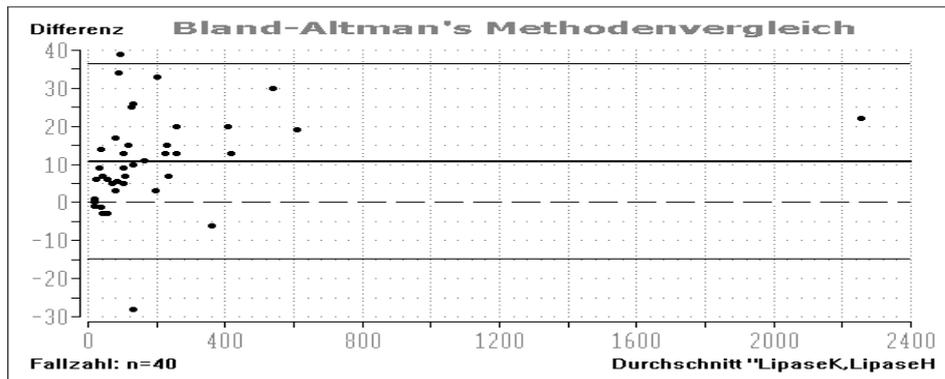


Abb. 60: Bland-Altman-Plot für die Messergebnisse der Lipase erkrankter Probanden aus hirudiniertem Blut und Serum. Die mittlere Abweichung liegt bei 10.83, die mittleren, zweifachen Standardabweichungen im Toleranzbereich von 95% bei 36.38 (+2 SD) und bei -14.73 (-2 SD).

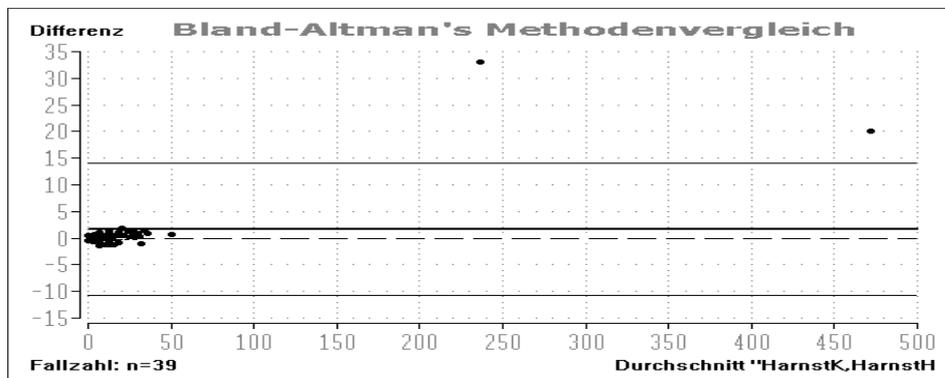


Abb. 61: Bland-Altman-Plot für die Messergebnisse des Harnstoffs erkrankter Probanden aus hirudiniertem Blut und Serum. Die mittlere Abweichung liegt bei 1.64, die mittleren, zweifachen Standardabweichungen im Toleranzbereich von 95% bei 14.06 (+2 SD) und bei -10.77 (-2 SD).

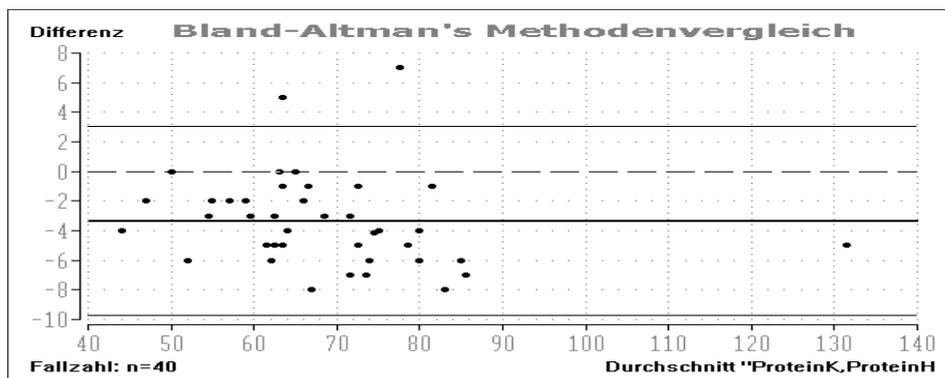


Abb. 62: Bland-Altman-Plot für die Messergebnisse des Proteins erkrankter Probanden aus hirudiniertem Blut und Serum. Die mittlere Abweichung liegt bei -3.35, die mittleren, zweifachen Standardabweichungen im Toleranzbereich von 95% bei 3.03 (+2 SD) und bei -9.73 (-2 SD).

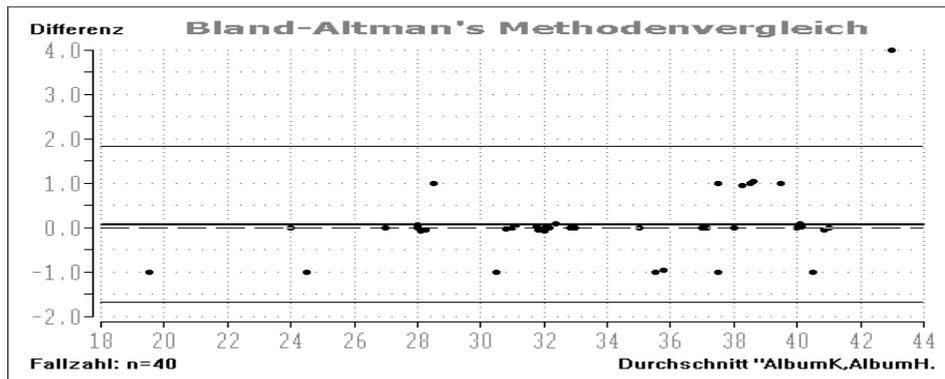


Abb. 63: Bland-Altman-Plot für die Messergebnisse des Albumins erkrankter Probanden aus hirudiniertem Blut und Serum. Die mittlere Abweichung liegt bei 0.08, die mittleren, zweifachen Standardabweichungen im Toleranzbereich von 95% bei 1.83 (+2 SD) und bei -1.68 (-2 SD).

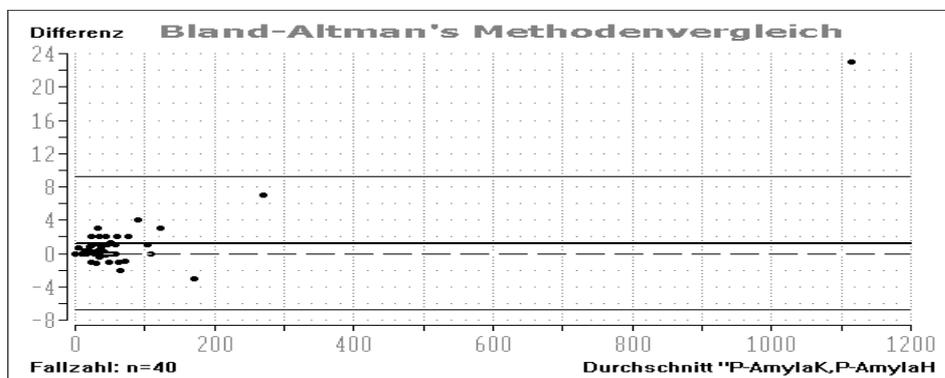


Abb. 64: Bland-Altman-Plot für die Messergebnisse der P-Amylase erkrankter Probanden aus hirudiniertem Blut und Serum. Die mittlere Abweichung liegt bei 1.23, die mittleren, zweifachen Standardabweichungen im Toleranzbereich von 95% bei 9.25 (+2 SD) und bei -6.80 (-2 SD).

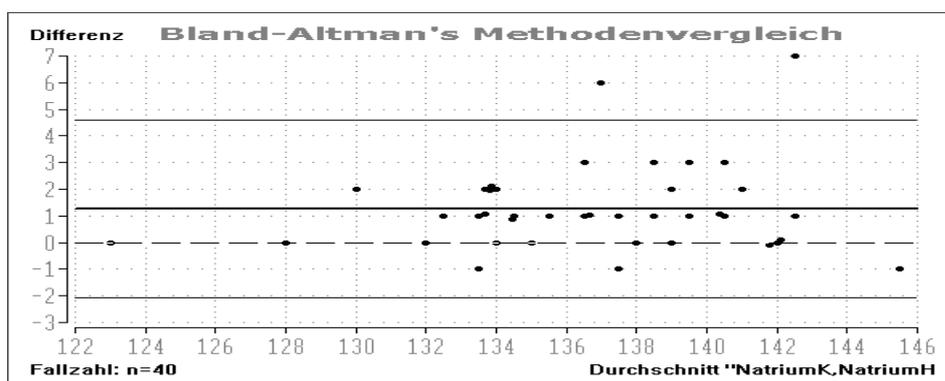


Abb. 65: Bland-Altman-Plot für die Messergebnisse des Natriums erkrankter Probanden aus hirudiniertem Blut und Serum. Die mittlere Abweichung liegt bei 1.25, die mittleren, zweifachen Standardabweichungen im Toleranzbereich von 95% bei 4.59 (+2 SD) und bei -2.09 (-2 SD).

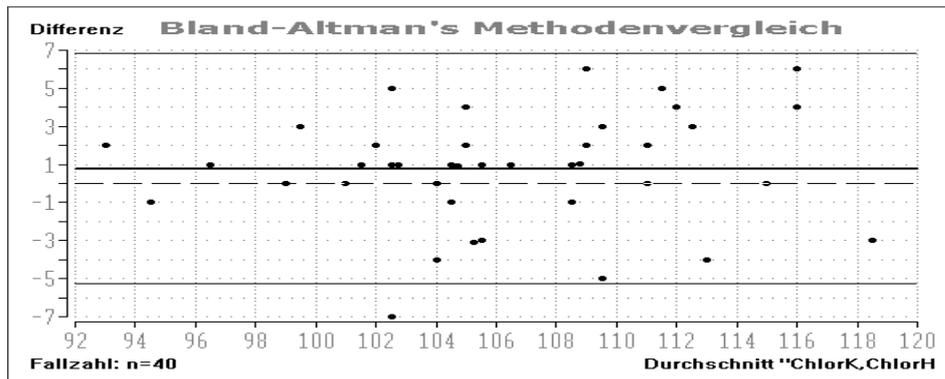


Abb. 66: Bland-Altman-Plot für die Messergebnisse des Chlorids erkrankter Probanden aus hirudiniertem Blut und Serum. Die mittlere Abweichung liegt bei 0.78, die mittleren, zweifachen Standardabweichungen im Toleranzbereich von 95% bei 6.81 (+2 SD) und bei -5.26 (-2 SD).

III.5 Vergleichende Spezialuntersuchungen aus hirudiniertem Blut und den jeweiligen Routineuntersuchungsmethoden unter Einbeziehung der Referenzwerte

III.5.1 Hämatologische Versuche mit Kaliumchlorid, Kaliumbicarbonat und Lithiumchlorid als Zusätze zum hirudinierten Blut

Der Großteil der Messergebnisse der automatisiert gemessenen kleinen Blutbilder und Hand-differentialblutbilder der Hirudin-antikoagulierten Blutproben von fünf gesunden Probanden lagen sowohl mit als auch ohne den Zusätzen Kalium-Chlorid, Kalium-Bikarbonat und Lithium-Chlorid innerhalb des Referenzbereiches des Hämatologischen Zentrallabors der Charité Berlin, CBF, (Tabelle 2) und entsprachen den Messwerten der jeweiligen Handdifferentialblutbilder aus K_2 -EDTA-zugesetzten Blutproben. Zudem waren die Blutzellen unabhängig von Antikoagulans oder Zusätzen morphologisch unauffällig. Drei Messwerte der Handdifferentialblutbilder zeigten eine Lymphozytose im Messautomaten. Andere, den unterschiedlichen Antikoagulanzen und Zusätzen nicht systematisch zuzuordnende Abweichungen wurden von den Messautomaten nicht bestätigt: „vereinzelte Kernpyknose“ (zwei Mal bei Refludan und Lithium-Chlorid und je ein Mal bei Hirudin pur, Hirudin und Lithium-Chlorid sowie bei Hirudin und Kalium-Chlorid), „Vakuolisierung zweier Segmentkernige“ (je ein Mal bei Refludan und Kalium-Bikarbonat sowie Refludan und Lithium-Chlorid), „teilweise Vakuolisierung“ (je ein Mal bei Hirudin pur und bei K_2 -EDTA), „Thrombozyten zum Teil an Leukozyten angelagert“ (je ein Mal bei Refludan und Lithium-Chlorid, bei Hirudin pur und Refludan pur), „vereinzelte Zellreste“ (je ein Mal bei Refludan pur, bei Refludan und Kalium-Bikarbonat sowie bei Refludan und Lithium-Chlorid)

und „teilweise Stechapfelform der Erythrozyten“ (ein Mal bei K₂-EDTA). Insgesamt wurden in den Handdifferentialblutbildern der hirudinierten und K₂-EDTA-antikoagulierten Blutproben keine spezifisch morphologischen Veränderungen durch die verschiedenen Zusätze beobachtet.

Nur bei den vom Messautomaten Coulter STKS erstellten Differentialblutbildern traten Ergebnisschwankungen auf, die probandenspezifisch teilweise stark von den Referenzbereichen abwichen. So meldete der Messautomat kleine Thrombozyten (je drei Mal bei allen neun untersuchten Blutentnahmeröhrchen), Neutropenie (je drei Mal bei Hirudin und Lithium-Chlorid, Hirudin und Kalium-Bikarbonat, Refludan und Lithium-Chlorid sowie Refludan und Kalium-Bikarbonat, je zwei Mal bei Hirudin und Kalium-Chlorid, Refludan und Kalium-Chlorid sowie Refludan pur und je ein Mal bei K₂-EDTA und Hirudin pur), Basophilie (vier Mal bei Refludan und Kalium-Bikarbonat, je zwei Mal bei Hirudin und Lithium-Chlorid, Hirudin und Kalium-Bikarbonat sowie Refludan und Kalium-Chlorid und je ein Mal bei Hirudin pur, Hirudin und Kalium-Chlorid sowie Refludan und Lithium-Chlorid), Monozytose (je zwei Mal bei Hirudin und Lithium-Chlorid, Hirudin und Kalium-Bikarbonat sowie Refludan und Lithium-Chlorid und je ein Mal bei Hirudin pur, Refludan pur und Hirudin und Kalium-Chlorid), Blasten (drei Mal bei Refludan und Lithium-Chlorid, je zwei Mal bei Hirudin und Lithium-Chlorid sowie Refludan pur und je ein Mal bei Hirudin und Kalium-Chlorid sowie Hirudin und Kalium-Bikarbonat), Lymphozytose (zwei Mal bei Refludan und Kalium-Chlorid und je ein Mal bei Hirudin und Kalium-Chlorid, Hirudin und Lithium-Chlorid, Hirudin und Kalium-Bikarbonat sowie Refludan und Kalium-Bikarbonat) und atypische Lymphozyten (je ein Mal bei Hirudin und Kalium-Chlorid, Hirudin und Lithium-Chlorid, Refludan und Kalium-Chlorid sowie Refludan und Lithium-Chlorid).

III.5.2 Antikörperbestimmungen und Virusnachweise gegen Cytomegalieviren (CMV), Hepatitis-B und -C, HIV und HCV

Beinahe sämtliche mit hirudinierten Blutröhrchen durchgeführte Antikörperbestimmungen und Virusnachweise hatten Messergebnisse, die den Messergebnissen aus Serum entsprachen. Einzige Ausnahme waren drei der neun durchgeführten Hepatitis B-Untersuchungen, in denen die Messergebnisse des Hirudinplasmas Unterschiede zu den Messergebnissen aus Serum aufwiesen (absolute Differenzen: 188 IU/L, 361 IU/L und 4664 IU/L). Diese Ergebnisunterschiede waren allerdings ohne Auswirkung auf die Einschätzung der Frage, ob der jeweilige Proband infiziert war (siehe Tabelle 14).

III.5.3 Nachweis der Expression des Wilmstumorgens WT1 mittels PCR

Nach Inkubationszeit mit Hirudin von einer Stunde wurde RNA aus Leukämieblasten extrahiert und zu cDNA transkribiert. Im Anschluss wurde eine PCR durchgeführt, um die WT1-Genexpression nachzuweisen. WT1-cDNA-Fragmente waren in allen Präparaten gut zu erkennen, sogar wenn Hirudin in einer Konzentration von bis zu 5000 ATU/ml zum Untersuchungsmaterial eine Stunde vor RNA-Extraktion hinzugefügt wurde. Im Vergleich zu den zusatzlosen Präparaten wurden in den Hirudin enthaltenen Präparaten keine Unterschiede in der WT1-Bandbreite beobachtet.

III.5.4 Bestimmung der quantitativen Immunglobuline im Blut

Die Messergebnisse der Hirudinplasmen bezüglich der quantitativen Bestimmung der Immunglobuline (IgG, IgA, IgM) von Patienten entsprachen den Messergebnissen aus Serum.

III.5.5 Hormonbestimmungen und Elektrophorese

Bei den aus Hirudinplasma durchgeführten Hormonbestimmungen waren sämtliche Messergebnisse des Schilddrüsenhormons TSH im Referenzbereich der Charité, CBF, und entsprachen den Serumproben. Bei der mit Hirudinplasma gut durchzuführenden Elektrophorese traten geringe Ergebnisunterschiede zu den Serumwerten auf. Diese sind auf den generellen Unterschied des Ausgangsmaterials Serum und Plasma hinsichtlich des Verdünnungsvolumens und des Gehalts an Gerinnungsproteinen zurückzuführen und daher messmethodisch erklärbar. Die Messergebnisse des Freien Hämoglobins wiesen innerhalb des Referenzbereiches in sieben von neun Fällen Differenzen zwischen Hirudinplasma und Serumkontrollen auf. Dabei wurde in den Hirudinplasmen immer ein deutlich niedrigerer Wert als im Serum gemessen. Im korrespondierenden Serum fand sich ein von 43% bis zu 98% höherer Messwert an freiem Hämoglobin. Thyreoglobulin wies in acht von neun Proben erhöhte Messwerte im Hirudinplasma auf, ohne dass sich hieraus eine abweichende klinische Tendenz ergeben hätte (siehe Tabellen 15 und 16).

III.5.6 Klinisch-chemische Laboruntersuchungen tiefgefrorener Blutproben

Die Messwerte der klinisch-chemischen Routineparameter (GOT, Bilirubin gesamt, Natrium, Kalzium, CRP und Gesamteiweiß) aus tiefgefrorenen Hirudinplasmen ergaben einige geringe und klinisch unbedeutende Abweichungen zwischen hirudinierten Blutproben und Serum.

Tabelle 14: Vergleich spezieller serologischer Infektionsparameter gesunder Probanden, gemessen in Hirudinplasma und Serum (n = 9; Serum; H=Hirudin-plasma).

| Proband / Material | CMV-AK | Anti-Hbs-AK (IU/L) | HBs-AG | HCV-AK | HIV1/2-AK | HCV genetis. Material (ctl/hcv) |
|----------------------|--------|--------------------|--------|--------|-----------|---------------------------------|
| 1/Serum | - | >1000 | - | - | - | +/- |
| H-plasma | - | >1000 | - | - | - | +/- |
| Übereinstimmung in % | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 2/Serum | + | - | - | - | - | - |
| H-plasma | + | - | - | - | - | - |
| Übereinstimmung in % | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 3/Serum | + | - | - | - | - | - |
| H-plasma | + | - | - | - | - | - |
| Übereinstimmung in % | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 4/Serum | - | >1000 | - | - | - | +/- |
| H-plasma | - | >1000 | - | - | - | +/- |
| Übereinstimmung in % | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 5/Serum | - | - | - | - | - | - |
| H-plasma | - | - | - | - | - | - |
| Übereinstimmung in % | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 6/Serum | + | - | - | - | - | - |
| H-plasma | + | - | - | - | - | - |
| Übereinstimmung in % | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 7/Serum | Nd | 6040 | nd | nd | nd | nd |
| H-plasma | Nd | 1376 | nd | nd | nd | nd |
| Übereinstimmung in % | Nd | 22,78 | nd | nd | nd | nd |
| 8/Serum | Nd | 527 | nd | nd | nd | nd |
| H-plasma | Nd | 339 | nd | nd | nd | nd |
| Übereinstimmung in % | Nd | 64,33 | nd | nd | nd | nd |
| 9/Serum | Nd | 1595 | nd | nd | nd | nd |
| H-plasma | Nd | 1956 | nd | nd | nd | nd |
| Übereinstimmung in % | Nd | 122,63* | nd | nd | nd | nd |

Die Untersuchungen der serologischen Infektionsparameter CMV-AK, HBs-AG, HCV-AK, HIV 1/2-AK kontrollieren das Vorhandensein (positiv = +) oder Nicht-Vorhandensein (negativ= -) von Antikörpern bzw. Antigenen. Anti-Hbs-Ak misst den Hepatitstitel beispielsweise nach einer Impfung oder zur Verlaufskontrolle, HCV genetis. Material die Copies pro Milliliter.

nd = nicht untersucht; Eine Übereinstimmung von z. B. 98% bedeutet, dass der Hirudinwert 98% des Serumwerts beträgt, vom Hirudinwert aus betrachtet und auf den Serumwert bezogen.

* bedeutet: Eine über 100 prozentige Übereinstimmung ist möglich, wenn der Vergleichswert größer ist als die Bezugsgröße

Untersucht im Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie der Charité, CBF.

Tabelle 15 Vergleich der Messergebnisse der Elektrophorese gesunder Probanden, gemessen in Hirudinplasma und Serum (n = 9).

| Proband/ Material | Albumin (%) | α-1-Globulin (%) | A-2-Globulin (%) | β-Globulin (%) | γ-Globulin (%) |
|------------------------------|------------------------|---|-----------------------------|--|---|
| 1 Serum | 62,7 | 3,2 | 9,2 | 9,2 | 15,7 |
| 1 Hirudin | 60,8 | 3,2 | 8,6 | 10,9 | 16,3 |
| 2 Serum | 64,6 | 3,0 | 6,9 | 9,2 | 16,3 |
| 2 Hirudin | 62,4 | 3,0 | 5,3 | 9,2 | 18,8 |
| 3 Serum | 64,8 | 2,4 | 6,3 | 9,2 | 17,0 |
| 3 Hirudin | 63,5 | 2,3 | 6,8 | 9,8 | 17,6 |
| 4 Serum | 67,1 | 2,4 | 6,0 | 9,8 | 14,7 |
| 4 Hirudin | 63,6 | 3,8 | 6,8 | 10,5 | 15,3 |
| 5 Serum | 65,7 | 3,2 | 9,2 | 10,1 | 11,8 |
| 5 Hirudin | 65,2 | 3,1 | 8,6 | 10,8 | 12,3 |
| 6 Serum | 72,2 | 1,4 | 6,3 | 7,6 | 12,5 |
| 6 Hirudin | 70,6 | 1,6 | 6,1 | 8,2 | 13,5 |
| 7 Serum | 70,9 | 2,2 | 6,7 | 8,0 | 12,2 |
| 7 Hirudin | 69,9 | 2,1 | 7,2 | 7,9 | 12,9 |
| 8 Serum | 70,6 | 2,4 | 6,5 | 7,5 | 13,0 |
| 8 Hirudin | 70,1 | 3,4 | 6,6 | 7,2 | 13,7 |

Die für diese Untersuchung übernommene Referenzbereiche des Instituts für Klinische Chemie und Pathobiochemie, Charité, CBF, sind: Albumin 49,7 - 64,4 %, α -1-Globulin 4,8 – 10,1 %, α -2-Globulin 8,2 – 15,1 %, β -Globulin 7,8 – 13,1 % und γ -Globulin 10,5 – 15,5 %.

Tabelle 16: Vergleich der Hormonbestimmung gesunder Probanden, gemessen in Hirudinplasma und Serum nach dreimonatiger Lagerung bei - 80 Grad Celsius (n = 9; S=Serum; H=Hirudin).

| Patienten / Material | Freies Hämoglobin (mg/dL) | TSH (mU/L) | Thyreoglobulin (µg/L) |
|----------------------|---------------------------|------------|-----------------------|
| 1-Serum | 78,62 | 2,02 | 5,6 |
| H-Plasma | 24,95 | 2,03 | 4,9 |
| Übereinstimmung in % | 31,74 | 100,50* | 87,50 |
| 2-Serum | 54,52 | 1,03 | 3,8 |
| H-Plasma | 31,08 | 1,14 | 4,4 |
| Übereinstimmung in % | 57,01 | 110,68* | 115,79* |
| 3-Serum | 38,3 | 2,22 | 13 |
| H-Plasma | 21,84 | 2,25 | 7,4 |
| Übereinstimmung in % | 57,02 | 101,35* | 56,92 |
| 4-Serum | 77,87 | 2,18 | 7 |
| H-Plasma | 23,94 | 2,47 | 8,3 |
| Übereinstimmung in % | 30,75 | 113,30* | 118,57* |
| 5-Serum | 131,5 | 0,82 | 5,1 |
| H-Plasma | 2,18 | 0,85 | 5,8 |
| Übereinstimmung in % | 1,65 | 103,66* | 113,73* |
| 6-Serum | 130,8 | 1,72 | 11 |
| H-Plasma | 32,42 | 1,78 | 11 |
| Übereinstimmung in % | 24,78 | 103,49* | 100,0 |
| 7-Serum | 133,1 | 1,88 | 2,7 |
| H-Plasma | 27,3 | 1,84 | 2,6 |
| Übereinstimmung in % | 20,5 | 97,87 | 96,27 |
| 8-Serum | 129,1 | 1,26 | 11 |
| H-Plasma | 65,18 | 1,34 | 12 |
| Übereinstimmung in % | 50,49 | 106,35 | 109,10* |
| 9-Serum | Nd | 1,93 | 4,6 |
| H-Plasma | Nd | 1,89 | 4,9 |
| Übereinstimmung in % | Nd | 97,93 | 106,52* |

nd = nicht untersucht; eine Übereinstimmung von z. B. 98 % bedeutet, dass der Hirudinwert 98% des Serumwerts beträgt, vom Hirudinwert aus betrachtet und auf den Serumwert bezogen.

Die für diese Untersuchung übernommenen Referenzbereiche des Instituts für Klinische Chemie und Pathobiochemie, Charité, CBF, sind: Freies Hämoglobin (Heparinplasma) < 5 mg/dl; TSH (basal) 0,24 – 4,20 mU/l und Thyreoglobulin (Serum) 3,2 – 56,7 µg/l.

* bedeutet: Eine über 100 prozentige Übereinstimmung ist möglich, wenn der Vergleichswert größer ist als die Bezugsgröße .

IV. Diskussion

Schon seit mehreren Jahrhunderten ist Hirudin für seine blutverdünnenden Fähigkeiten bekannt. Die Mitte des 20. Jahrhunderts etablierte industrielle Produktion von rekombinant hergestelltem Hirudin ermöglichte seinen Einsatz als *in vivo* Antigerinnungsmittel bei Indikationen wie tiefer Venenthrombose, heparininduzierter Thrombozytopenie und akutem Koronarsyndrom. Doch der *in vitro*-Einsatz von Hirudin für die Blutdiagnostik wurde bisher nicht systematisch evaluiert.

Das Hauptziel der vorliegenden Arbeit war im Rahmen einer Pilotstudie zu erforschen, ob der Einsatz von Hirudin als Antikoagulans vorgelegt in Blutentnahmeröhrchen die diagnostischen Untersuchungsmethoden, -apparaturen und -reagenzien, die routinemäßig eingesetzt werden, um korpuskuläre und gelöste Blutbestandteile zu messen, grundsätzlich beeinträchtigen würde. Da industriell gefertigte Hirudinröhrchen zum Zeitpunkt der Untersuchung nicht vorlagen und sich somit die Blutgewinnung zur Routinediagnostik (Füllen der K₂-EDTA-Blutentnahmeröhrchen und Serum-Röhrchen nach Vacutainer-Prinzip) systematisch von der Füllung des experimentellen Hirudinröhrchens mit venösem Vollblut unterschied und darüber hinaus die Messinstrumente und Testkits nicht auf Hirudinblut optimiert waren, kann mit dieser Arbeit grundsätzlich nicht der Anspruch einer Validierung des Hirudin-Blutentnahmeröhrchens für Routine-Blutuntersuchungen verbunden werden. Eine solche Studie sollte viel mehr aufbauend auf den hier vorgelegten Ergebnissen geplant werden. In dieser Arbeit wurden die Ergebnisse hämatologischer Routineuntersuchungen (kleines und großes Blutbild), klinisch-chemischer Routineparameter und serologischer Infektionsparameter verglichen, die aus hirudiniertem im Vergleich zu routinemäßig gemessenem Blut gewonnen wurden. Darüber hinaus wurde überprüft, ob mit hirudiniertem Untersuchungsmaterial verschiedene Spezialuntersuchungen wie Antikörper- und Hormonbestimmungen, Virus- und Gennachweise, quantitative Immunglobuline, Elektrophorese und die Untersuchung gefrorenen Plasmas zuverlässig durchzuführen ist. Daneben wurde der Einfluss einer kaliumhaltigen Hirudin-Antikoagulation auf die Morphologie der Blutzellen und deren Messbarkeit im Automaten untersucht. So sollte geprüft werden, ob eine äquimolare K⁺-Ionenkonzentration im Hirudinblut im Vergleich zum K₂-EDTA-antikoaguliertem Blut zu einer besseren automatischen Bestimmbarkeit des Differentialblutbildes aus Hirudinblut führt.

Zunächst wurde eine optimale Hirudinkonzentration pro Blutentnahmeröhrchen für die weiteren Experimente ermittelt. Dafür wurde mit sechs Stunden ein Kernuntersuchungszeitraum gewählt, in dem im Krankenhaus die hämatologischen und klinisch-chemischen Routine-Blutanalysen meist abgeschlossen sind. Unter anderem um die Untersuchbarkeit einiger Spezialparameter im hirudinierten Blut zu überprüfen, mögliche Beeinträchtigungen beispielsweise durch längere Versandwege oder Mehrfachmessungen auf die hirudinierten Blutproben auszuschließen und die tendenzielle Weiterentwicklung der Gerinnungsvorgänge bei den verschiedenen Hirudinkonzentrationen zu beobachten, wurde der Untersuchungszeitraum aber auf bis zu 72 Stunden ausgedehnt. Zum Zeitpunkt 6 Stunden erfüllten Hirudinkonzentrationen zwischen 400 ATU/ml bis 2000 ATU/ml das Ziel, möglichst wenige Minigerinnsel oder Thrombozytenaggregate im Blutentnahmeröhrchen entstehen zu lassen. Als Hirudinkonzentration für die weiteren Experimente wurde schließlich 1000 ATU/ml gewählt, da es im Vergleich zu niedrigeren Hirudinkonzentrationen Interferenzen des Hirudins mit den automatisierten Testsystemen leichter erkennen lässt. Stocker bestätigte diese Ergebnisse im Grundsatz. Er berichtete, dass 150, 300 und 1000 ATU/ml desulfuriertes Hirudin nötig waren, um Blutgerinnungen für 3, 5, 6 bzw. 24 Stunden zu verhindern (Stocker 1991³⁰). In der hier vorliegenden Studie erwiesen sich drei unterschiedlich aufgereinigte Hirudinchargen als äquipotent in Bezug auf ihre antikoagulierende Wirkung. Daher wurden die drei Hirudinchargen auch gleichwertig in den nachfolgenden Untersuchungen eingesetzt. Insgesamt deutet dieses Ergebnis an, dass auch Hirudin, das nichtpharmazeutisch hoch aufgereinigt wurde und dessen Herstellung daher erheblich preiswerter ist, für die Blutwertanalyse eingesetzt werden kann. Anhaltspunkte für einen geschlechtsspezifischen Unterschied in der Hirudinwirkung ergaben sich nicht.

Durch verschiedene Mehrfachmessungen konnte die Reproduzierbarkeit der Messergebnisse bestätigt werden. Dabei traten innerhalb einiger Messreihen Ergebnisschwankungen auf, wie zwischen den Automatenmesswerten der Leukozyten und Thrombozyten (unmittelbar hintereinander erfolgte hämatologische Wiederholungsmessungen) und zwischen den Automatenmesswerten der stab- bzw. segmentkernigen Granulozyten und Lymphozyten, Monozyten und eosinophilen Granulozyten (hämatologische Wiederholungsmessungen in größeren Zeitabständen). Teilweise erwiesen sie sich jedoch in nachfolgenden Messungen der selben Messreihen als reversibel. Zudem bewiesen die jeweils angefertigten Handdifferentialblutbilder, welche die Ergebnisschwankungen nicht bestätigten, dass diese nicht auf biochemische

Phänomene, wie eine durch den Einsatz von Hirudin verursachte generelle Veränderung des Blutbildes oder einzelner Blutzellen, zurückzuführen sind. Stattdessen sind die Ursachen der Schwankungen offensichtlich Probleme der Messautomaten mit der Verarbeitung des hirudinierten Blutes. Denn Coulter STK[®] und Coulter STKS[®] werden täglich vor Inbetriebnahme auf K₂-EDTA-antikoaguliertes Blut optimiert. Minigerinnsel, die in hirudinierten Blutproben zwar in geringer Menge, aber häufiger als in K₂-EDTA-Blut vorkommen, könnten die Ansaug-Kanülen der Automaten partiell verstopft haben. Dafür spricht auch die zunehmende Häufung der Ergebnisschwankungen bei der vierten oder fünften Wiederholungsmessung im Vergleich zur ersten oder zweiten Messung. Deshalb müssten die Messautomaten vor einem dauerhaften Einsatz von Hirudin auf hirudiniertes Blut geeicht werden oder andere Modifikationen vorgenommen werden wie zum Beispiel häufigere Reinigungen. Wichtiger noch, der Abfüllprozess des experimentellen Hirudinröhrchens mit Vollblut, der möglicherweise die Minigerinnselbildung begünstigt, müsste durch den Einsatz eines konfektionierten Hirudinröhrchens optimiert werden (siehe unten).

Diese Probleme der Messautomaten mit der Verarbeitung hirudinierter Blutproben erklären auch die hohe Anzahl von Abweichungen einiger automatisch erstellter Differentialblutbild-Parameter aus dem Referenzbereich, die sowohl bei „puren“ Hirudinproben als auch bei Hirudinproben mit unterschiedlichen Zusätzen (Kaliumchlorid, Kaliumbicarbonat und Lithiumchlorid) auftraten. Auch diese Abweichungen fanden sich nicht in den Auswertungen der jeweiligen Handdifferentialblutbilder. Ansonsten konnten sowohl die Messungen der kleinen Blutbilder als auch der Automaten- und Handdifferentialblutbilder gut reproduzierbar durchgeführt werden. Statistisch bewiesen sowohl der Korrelationskoeffizient nach Pearson als auch der Rang-Korrelationskoeffizient nach Spearman einen statistischen Zusammenhang zwischen den Messwerten aus Hirudin- und K₂-EDTA-antikoagulierten Blutproben. Beide Koeffizienten korrelierten meist auf einem sehr hohem Niveau ($r \geq 0,8739$ und $\rho \geq 0,8775$) und die Korrelation blieb bei den einzigen beiden Ausnahmen (Monozyten und Basophile) immer noch signifikant. Der entscheidende Befund aber liegt in den Bland-Altman-Plots der einzelnen hämatologischen Parameter von gesunden und erkrankten Probanden, die eine sehr gute Übereinstimmung der Messergebnisse aus Hirudinproben im Vergleich zu ihren K₂-EDTA-Kontrollen belegen. Beinahe sämtliche Wertepaare aller hämatologischen Parameter lagen innerhalb des Intervalls zwischen +1.96 und -1.96

Standardabweichung. Bei den gesunden Probanden wuch nur je ein Wertepaar bei Monozyten und Eosinophilen, je zwei bei Thrombozyten, Hämoglobin, Neutrophilen und Lymphozyten und je drei bei Erythrozyten und Basophilen oftmals nur leicht aus dem Bereich, der nach Bland und Altman für keine klinisch relevanten Unterschiede zwischen beiden Methoden steht. Bei den Erkrankten waren sogar höchstens nur zwei Ausreißer aus dem Intervall zwischen doppelter positiver und negativer Standardabweichung zu beobachten: jeweils einer bei Hämoglobin und Monozyten und jeweils zwei bei Erythrozyten, Thrombozyten, Neutrophilen, Lymphozyten, Eosinophilen und Basophilen. Daneben ergaben die Bland-Altman-Plots der hämatologischen Messparameter weder Anzeichen auf systematische Messfehler noch auf systematische Abweichungen. Die bisher beschriebenen Probleme bestätigten die Bland-Altman-Plots insofern, dass zwar viele Wertepaare um die mit Methodenäquivalenz interpretierbare Mittelwertachse lagen, die übrigen aber in unterschiedlicher Anzahl innerhalb des Intervalls gestreut waren.

Minigerinnsel und Thrombozytenaggregate sind Ausdruck einer beginnenden, inkompletten oder örtlich begrenzten Blutgerinnung und erschweren die automatisierte Diagnostik von Differentialblutbildern zum Teil erheblich. Die Ursache für ihre Entstehung im hirudinierten Blut war letztendlich nicht ganz sicher zu klären. Eine wahrscheinliche Erklärung leitet sich aus dem Blutabnahmeverfahren ab. So wurde das Vollblut der Patienten für die K₂-EDTA-enthaltenden Röhren unter den bewährten, optimalen Krankenhausbedingungen abgenommen: das Vollblut floss über Butterfly und Schlauchsystem direkt in die konfektionierten K₂-EDTA-Röhren und hatte dabei nur minimale Kontaktzeiten mit thrombogenen Grenzflächen. Da zum Untersuchungszeitpunkt jedoch konfektionierte, Hirudin-enthaltende Blutentnahmeröhren nicht verfügbar waren, musste das Vollblut für die Hirudin-Röhren über das Butterfly zunächst in eine aus methodischen Gründen ohne Antikoagulans ausgestattete 20ml-Spritze gesaugt werden, von wo es unter unvermeidbarem Luftkontakt in die Hirudinröhren verteilt wurde. Obwohl dieser Vorgang so schnell wie möglich vollzogen wurde, war er wahrscheinlich ausreichend, um an den thrombogenen Grenzflächen der Spritze eine partielle Blutgerinnung mit Bildung von Minithromben und Thrombozytenaggregaten auszulösen, die dann auch durch den Zusatz von Antikoagulans nicht mehr rückgängig zu machen waren. Diese potentielle Induktion zur Minigerinnselbildung bei der Blutentnahme musste billigend in Kauf genommen werden, da zum einen aus methodischen Gründen (maximale Gleichbehandlung von Hirudin- und K₂-EDTA-enthaltenden Blutentnahmeröhren) auf den Einsatz von Hirudin oder anderen

Antikoagulanzen in der 20ml-Plastikspritze verzichtet werden musste und zum anderen die Eigenproduktion von vakuum-haltigen Hirudin-antikoagulierten Blutentnahmeröhrchen zu schwierig war. Doch die Ergebnisse dieser Studie rechtfertigen die Produktion von vakuum-haltigen Blutentnahmeröhrchen, in denen Hirudin vorgelegt ist (konfektioniertes Hirudin-Röhrchen) und mit denen dann die Ursache für die Mikrogerinnselbildung in Hirudinblutentnahmeröhrchen weiter abgeklärt werden kann.

Alle 24 klinisch-chemischen Routineparameter konnten im hirudinierten Plasma reproduzierbar gemessen werden. Wenige Parameter (Kalium, Lipase, Phosphat, Glucose und Bilirubin) wurden allerdings im hirudinierten Plasma in konstant niedrigere Konzentrationen gemessen als im Serum. Neben der Systematik der Abweichungen sprechen auch die Messwerte der restlichen klinisch-chemischen Routineparameter, die den jeweiligen Serumwerten entsprachen, für die Eignung von Hirudin als Antikoagulans für klinisch-chemische Routineuntersuchungen. Diese konnte auch statistisch belegt werden. Korrelationskoeffizienten (r) zwischen 0,8246 und 0,9973 (wobei r bei 20 der 24 klinisch-chemischen Parameter größer als 0,9 war) und Rangkorrelationskoeffizienten (ρ) zwischen 0,7536 und 0,9986 (wobei ρ bei 18 Parametern größer als 0,9 war) beweisen einen statistischen Zusammenhang zwischen den Messwerten aus Hirudin-antikoagulierten Blutproben und aus Serum. Auch die zu den einzelnen klinisch-chemischen Parameter angefertigten Bland-Altman-Plots demonstrierten eine gute Übereinstimmung der jeweiligen Messergebnisse. Ähnlich wie bereits bei den Methodenvergleichen der hämatologischen Messergebnisse beobachtet, lagen viele Wertepaare in unterschiedlicher Anzahl nahe der Mittelwertachse, während die meisten der übrigen Wertepaare innerhalb des Intervalls zwischen zweifacher positiver und negativer Standardabweichung lagen, das nur wenige Wertpaare verließen: bei den erkrankten Probanden lag bei Cholesterin, LDH, Glucose, HBDH, Albumin, P-Amylase, Triglyzeride, Bilirubin ges., Kreatinin und Chlorid jeweils ein Wertepaar sowie bei Kalium, Kalzium, Lipase, Harnsäure, CK, Harnstoff, Gesamtprotein, Natrium und Amylase jeweils zwei Wertepaare außerhalb des Intervalls. Bei AP, Phosphat und bei Gamma GT zeigt der Bland-Altman-Plot jeweils drei Abweichungen. Bei den gesunden Probanden lagen bei den Bland-Altman-Plots der Parameter Kalium, Triglyzeride, Harnsäure, Amylase, Albumin und P-Amylase sogar alle Wertepaare innerhalb des Intervalls zwischen +1,96 und -1,96-Standardabweichung. Die Parameter Cholesterin, Gamma GT, Glucose, Lipase, Harnstoff, Kalzium, AP, Phosphat, Kreatinin und Natrium hatten jeweils ein abweichendes Wertepaar, die Parameter LDH, Bilirubin ges., HBDH, Gesamtprotein, Chlorid

und CK jeweils zwei. Auch die Bland-Altman-Plots der klinisch-chemischen Messwerte ergaben keine Anzeichen auf systematische Messfehler sowie konstante oder proportionale Abweichungen.

Das Phänomen der konstanten Abweichungen hirudiniertes Blutproben gegenüber ihren Serumkontrollen bei einigen klinisch-chemischen Parametern ist wahrscheinlich zumindest teilweise dem Volumenunterschied zwischen Serum und Plasma zuzuschreiben, der ungefähr vier Prozent zu Gunsten von Plasma beträgt und eine höhere Konzentration löslicher Blutbestandteile im Serum bewirkt. Darüber hinaus führt die Zentrifugation von koaguliertem Blut erwiesenermaßen zur Zerstörung von Erythrozyten, so dass intrazelluläres Kalium in das Serum ausfließt. Dadurch erklärt sich die Beobachtung, dass freies Hämoglobin im hirudinierten Plasma in viel geringeren Konzentrationen gemessen wurde als im Serum. Somit entspricht der im Hirudinplasma gemessene Wert für freies Hämoglobin eher dem tatsächlichen freien Hämoglobin-Gehalt im Blut des Patienten zur Zeit der Blutentnahme als das durch die artifizielle Blutbehandlung (Zentrifugation von geronnenem Blut) unkontrollierbar verfälschte, erhöhte freie Hämoglobin im Serum. Dieser Befund spricht für den *in vitro*-Einsatz von rekombinanten Hirudin als Untersuchungsmatrix bei der Beurteilung von Hämolysezuständen. Vor dem Einsatz von Hirudin-zugesetzten Blutentnahmeröhrchen für die klinisch-chemische Blutanalyse müssen allerdings neue, auf Hirudin abgestimmte Standard- und Referenzwerte für die Routineparameter und für freies Hämoglobin bestimmt werden. Darüber hinaus konnten auch serologische Infektionsparameter im hirudinierten Plasma vergleichbar gut wie im Serum gemessen werden und RT-PCR-Protokolle wurden auch dann nicht von Hirudin beeinträchtigt, wenn hohe Hirudinkonzentrationen eingesetzt wurden.

Neben meiner Untersuchung, welche die Einsatzmöglichkeit von rekombinanten Hirudin für hämatologische und klinisch-chemische Routineblutuntersuchungen sowie für Antikörperbestimmungen, Virusnachweise, Hormonbestimmungen und Spezialuntersuchungen bekräftigte, wurde bereits eine weitere diagnostische Einsatzmöglichkeiten von Hirudin erforscht. Menssen et al. konnten zeigen, dass der Nachweis von Oberflächenmarkern auf Blutzellen zur diagnostischen Bewertung mit hirudiniertem Blut gut durchzuführen ist (Menssen et al. 1998³¹). Diese Zelloberflächen-Strukturen werden hauptsächlich zur Immunphänotypisierung der kernhaltigen Blutzellen bestimmt und z.B. zur Sub-Klassifikation von Leukämien eingesetzt.

Dagegen ist Hirudin-antikoaguliertes Blut nicht zur Bestimmung der Globalparameter des Gerinnungssystems (PTT, Quicktest) geeignet, da Hirudin irreversibel das Thrombinmolekül blockiert. Der Zusatz von vorher entzogenen Kalziumionen und proagulatorischen Komponenten beim PTT- und beim Quicktest kann daher nicht zu einer zeitlich messbaren Blutgerinnung führen. Allerdings sind Einzelfaktorbestimmungen wahrscheinlich möglich.

Insgesamt zeigen die vorgelegten Untersuchungen, dass mit hirudiniertem Blut die hämatologischen Routineparameter (kleines und großes Blutbild) und ein Großteil klinisch-chemischer Routineparameter sowie eine Vielzahl anderer Untersuchungsparameter gut reproduzierbar zu untersuchen sind, ohne die konventionellen Untersuchungsmethoden, -reagenzien und -apparate entscheidend verändern zu müssen. Somit könnte Hirudin als universales Antikoagulans in Zukunft die medizinische Routine-Diagnostik erheblich bereichern. Der Einsatz von Hirudin-Blutentnahmeröhrchen in der Routine-Blutbilddiagnostik könnte den diagnostischen Blutverlust insbesondere bei schwerkranken hospitalisierten Patienten möglicherweise deutlich reduzieren. Außerdem würde sich möglicherweise auch die Laborlogistik erheblich vereinfachen, so dass Kosten eingespart werden könnten. Bevor der Gebrauch von hirudiniertem Blut für diagnostische Zwecke allerdings allgemein empfohlen werden kann, müssten in einer groß angelegten multizentrischen Machbarkeitsstudie (Feasibility-Studie) mit industriell hergestellten hirudinierten Blutentnahmeröhrchen die Ergebnisse dieser Untersuchungen bestätigt werden. Anschließend müsste das Hirudin-Blutentnahmeröhrchen für Routine-Blutuntersuchungen zusammen mit hirudin-optimierten Messmethoden und Testkits in einer weiteren Studie validiert werden.

V. Zusammenfassung

Hirudin, das antikoagulierende Agens des europäischen Blutegels *Hirudo Medicinalis*, verhindert die Bildung von Blutgerinnseln. Dabei beeinträchtigt es auf Grund seiner hoch spezifischen, irreversiblen Wechselwirkung mit Thrombin andere lösliche Blutbestandteile wie Mineralien und Proteine nur minimal. Daher könnte Hirudin für diagnostische Zwecke allen übrigen antikoagulierenden Substanzen überlegen sein. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde hirudiniertes und routinemäßig verarbeitetes Blut aus insgesamt 107 Blutproben von gesunden Freiwilligen und Patienten einer Vielzahl von Bluttests unterzogen, die zum größten Teil automatisiert erfolgten.

Zunächst wurde die optimale Hirudinkonzentration für die weiteren Experimente ermittelt, in dem die Blutgerinnung bei Hirudinkonzentrationen zwischen 100 und 2000 ATU/ml visuell und mikroskopisch beobachtet und verglichen wurde. In den nachfolgenden Untersuchungen wurde schließlich 1000 ATU/ml eingesetzt, da es diese Hirudinkonzentration besser als die in den Experimenten qualitativ gleichwertigen Konzentrationen ab 400 ATU/ml ermöglicht, etwaige, durch den Einsatz von Hirudin bedingte Interferenzen mit den automatisierten Testsystem zu erkennen.

Die ebenfalls untersuchte antikoagulatorische Wirkung von drei unterschiedlich aufgereinigten Hirudinchargen erwies sich als gleichwertig. Das bedeutet, dass auch pharmazeutisch unaufgereinigtes und daher preiswertes Hirudin für diagnostische Zwecke eingesetzt werden kann. Sowohl für die hämatologischen (kleines und großes Blutbild) als auch für die klinisch-chemischen Routineparameter erwiesen der Korrelationskoeffizient nach Pearson und der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman durch Korrelationen auf meist sehr hohen Signifikanzniveau einen statistischen Zusammenhang zwischen den Messergebnissen der Hirudin-antikoagulierten Blutproben und ihren K_2 -EDTA- bzw. Serumkontrollen. Darüber hinaus belegten die zu allen hämatologischen und klinisch-chemischen Parametern jeweils für gesunde und erkrankte Probanden angefertigten Bland-Altman-Plots keinen klinisch relevanten Unterschied zwischen den Messergebnissen aus hirudinierten Blutproben und ihren nach den aktuellen klinischen Methoden erzeugten Kontrollen. Hämatologische und klinisch-chemische Wiederholungsmessungen sicherten die Reproduzierbarkeit der Untersuchungsergebnisse ab. Hämatologische Untersuchungen der mit verschiedenen Zusätzen (Kaliumchlorid, Kaliumbicarbonat und Lithiumchlorid) versetzten hirudinierten Blutproben widerlegten die Annahme, dass aufgetretene Automatenmessschwierigkeiten im Diffe-

rentialblutbild durch einen Mangel an ^{+}K -Ionen oder ^{+}Li -Ionen im Hirudinblut zu erklären sind.

Die aufgetretenen Schwierigkeiten bei der Erstellung der Automatendifferentialblutbilder aus Hirudinblut konnten nicht sicher ursächlich geklärt werden. Wahrscheinlich ist die häufigere Verwechslung von Blutzellen aus Hirudinblut im Automatendifferentialblutbild wesentlich mitbedingt durch die Irritation der Messsonden durch Minigerinnsel und Thrombozytenaggregate, die sich im Hirudinblut deutlich häufiger fanden. Solche Minigerinnsel und Thrombozytenaggregate im Hirudinblut sind möglicherweise durch den artifiziellen Kontakt des noch unantikoagulierten Blutes mit thrombogenen Grenzflächen bei der Blutentnahme in den Hirudinröhrchen entstanden und damit grundsätzlich vermeidbar, wenn in Zukunft konfektionierte Vakuum-enhaltende Hirudinröhrchen verwendet würden.

Verschiedene Antikörperbestimmungen (Anti-Hbs-Antikörper, HCV-Antikörper, CMV-Antikörper, HIV-Antikörper), Virusnachweise (Hbs-Antigen und HC-Antigen) und Hormonbestimmungen (anhand der Schilddrüsenhormone TSH und TG) konnten mit hirudiniertem Blut zuverlässig durchgeführt werden. Rekombinant hergestelltes Hirudin verändert den Nachweis der Wilms' Tumor Gen-Expression mittels der RT-PCR Technologie nicht. Ebenso ließen sich Elektrophorese und Immunglobulinnachweise mit hirudiniertem Blut zuverlässig durchführen. Die Ergebnisse der klinisch-chemischen Untersuchungen tiefgefrorener Blutproben zeigten, dass Hirudinplasma auch nach längerer fachgerechter Lagerung zuverlässig untersuchbar bleibt.

So zeigen meine Untersuchungen die grundsätzliche Eignung von Hirudin als mögliches universales Antikoagulans für die medizinische Blutwertanalyse. Somit wird es vorstellbar, dass in Zukunft aus einem mit Hirudin beschichteten „universellen Blutentnahmeröhrchen“ die Mehrheit aller Blutuntersuchungen durchführbar ist. Vor dem praktischen Einsatz eines solchen Hirudin-Blutentnahmeröhrchens sollten jedoch große, multizentrische Studien unter Verwendung eines industriell angefertigten Hirudin-Blutentnahmeröhrchens durchgeführt werden, um die vorliegenden Ergebnisse meiner Pilotstudie zu bestätigen und das konfektionierte Hirudin-Blutentnahmeröhrchen für Routine-Blutuntersuchungen an Hirudinblut-optimierten Messinstrumenten und Testkits zu validieren.

VI. Verzeichnis der verwendeten Literatur

1. Hycraft JB. On the action of a secretion obtained from the medicinal leech on the coagulation of the blood. *Pro R Soc London* 1884; 36: 478-487.
2. Jacoby C. Über Hirudin. *Deutsche Medizinische Wochenschrift* 1904; 30: 1786-1794.
3. Shinoya T. Studies in experimental extracorporate thrombosis; effects on certain anticoagulants (heparin and hirudin) on extracorporal thrombosis and on the mechanism of thrombus formation. *J Experiment Med* 1927; 49:19-26.
4. Markwardt F. Die Isolierung und chemische Charakterisierung des Hirudin. *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem* 1957; 308:147-56.
5. Markwardt, F. Development of Hirudin as an antithrombic agent. *Sem. Throb. Hemost* 1989; 15:269
6. Harvey RP, Degryse E, Stefani L, et al. Cloning and expression of a cDNA coding for the anticoagulant hirudin from the bloodsucking leech, *Hirudo medicinalis*. *Proc Nat. Acad Sci USA* 1986; 83:1084-8.
7. Bergmann C, Dodt J, Kohler S, Fink E, Gassen HG. Chemical synthesis and expression of a gene coding for hirudin, the thrombin-specific inhibitor from the leech *Hirudo medicinalis*. *Biol Chem Hoppe Seyler* 1986; 367:731-40.
8. Bender E, Vogel R, Koller KP, Engels J. Synthesis and secretion of hirudin by *Streptomyces lividans*. *Appl Microbiol Biotechnol* 1990; 34:203-7.
9. Benatti L, Scacheri E, Bishop DH, Sarmientos P. Secretion of biologically active leech hirudin from baculovirus-infected insect cells. *Gene* 1991; 101:255-260.

10. Lehmann ED, Joyce JG, Bailey FJ, et al. Expression, purification and characterization of multigram amounts of a recombinant hybrid HV1-HV2 hirudin variant expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *Protein Expr Purif* 1993; 4:247-255.
11. Weydemann U, Keup P, Piontek M, et al. High-level secretion of hirudin by *Hansenula polymorpha* - authentic processing of three different preprohirudins. *Appl Microbiol Biotechnol* 1995; 44:377-85.
12. Stringer KA, Lindenfeld JA. Hirudinis: antithrombin anticoagulants. *Ann Pharmacother* 1993; 26:1535-40.
13. De Filippis V, Russo J, Vindigni A, Di Cera E, Salmaso S, Fontana A et al. Incorporation of noncoded amino acids into the N-terminal domain 1-47 of hirudin yields a highly potent and selective thrombin inhibitor. *Protein Sci* 1999; 8, 2213-7.
14. Agnelli G, Sonaglia F. Recombinant hirudin in the prevention of venous thromboembolism in patients undergoing elective hip surgery. *Semin Thromb Hemost* 1997; 23:143-8.
15. Schiele F, Lindgaerde F, Eriksson H, Bassand JP, Wallmark A, Hansson PO et al. Subcutaneous recombinant hirudin (HBW 023) versus intravenous sodium heparin in treatment of established acute deep vein thrombosis of the legs: multicentre prospective dose-ranging randomized trial. International Multicentre Hirudin Study Group. *Thromb. Haemost* 1997; 77:834-8.
16. Eriksson BI, Ekman S, Lindbratt S, Baur M, Bach D, Torholm C, et al. Prevention of Thromboembolism with use of recombinant hirudin. Results of a double-blind, multicenter trial comparing the efficacy of desirudin (Revasc) with that of unfractionated heparin in patients having a total hip replacement. *J Bone Joint Surg Am* 1997; 79:326-33.

17. Topol EJ, Fuster V, Harrington RA, Califf RM, Kleiman NS, Kereiakes DJ, et al. Recombinant hirudin for unstable angina pectoris. A multicenter, randomized angiographic trial. *Circulation* 1994; 89:1557-66.
18. Serruys PW, Herrman JP, Simon R, Rutsch W, Bode C, Laarman GJ, et al. A comparison of hirudin with heparin in the prevention of restenosis after coronary angioplasty. Helvetica Investigators. *N Engl J Med* 1995; 333:757-63.
19. Bates ER. Clinical trial results with hirudin and bivalirudin for acute coronary artery syndromes. *Semin Thromb Hemost* 1997; 23:575-81.
20. Meyer BJ, Badimon JJ, Chesebro JH, Fallon JT, Fuster V, Badimon L. Dissolution of mural thrombus by specific thrombin inhibition with r-hirudin: comparison with heparin and aspirin. *Circulation* 1998, 97:681-5.
21. Neuhaus KL, Molhoek GP, Zeymer U, Tebbe U, Wegscheider K, Schroder R, et al. Recombinant Hirudin (Lepirudin) for the Improvement of Thrombolysis With Streptokinase in Patients With Acute Myocardial Infarktion: Results of the HIT-4 trial. *JA Coll Cardiol* 1999; 34:966-73.
22. Merlini PA, Ardissino D, Rosenberg RD, Colombi E, Agricola P, Oltrona L, Ottani F, Galvani M, Bauer KA, Bottasso B, Bertocchi F, Mannuccio P. In Vivo Thrombin Generation an Activity During and After Intravenous Infusion of Heparin or Recombinant Hirudin in Patients With Unstable Angina Pectoris. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:2162-6.
23. Alt E, Haehnel I, Beilharz C, Prietzel K, Preter D, Stemberger A, et al. Inhibition of neointima formation after experimental coronary artery stenting: a new biodegradable stent coating releasing hirudin and the prostacyclin analogue iloprost. *Circulation* 2000; 101:1453-8.

24. Siebeck M, Spannagl M, Bichler J, Hoffmann H, Gippner-Steppert C, Jochum M. Delayed treatment with desulfato-hirudin prevents fibrin formation in lipopolysaccharide-induced shock. *Thrombosis Res* 1997; 88; 473-80.
25. Van Wyk V, Badenhorst PN, Luus HG, Kotze HF. A comparison between the use of recombinant hirudin and heparin during hemodialysis. *Kidney Int* 1995; 48:1338-43.
26. Fischer KG, van de Loo A, Bohler J. Recombinant hirudin (lepirudin) as anticoagulant in intensive care patients treated with continuous hemodialysis. *Kidney Int Suppl* 1999; 72:46-50.
27. Greinacher A, Janssens U, Berg G, Bock M, Kwasny H, Kemkes-Matthes B, Eichler P, Volpel H, Pötzsch B, Luz M. Lepirudin (Recombinant Hirudin) for Parental Anticoagulation in Patients With Heparin-induced Thrombocytopenia. Heparin-Assoziated Thrombozytopenia Study (HAT) investigators. *Circulation* 1999; 100:587-93.
28. Koster A, Hansen R, Kuppe H, Hetzer R, Crystal GJ, Mertzlufft F. Recombinant hirudin as an alternative for anticoagulation during cardiopulmonary bypass in patients with heparin-induced thrombocytopenia type II: a 1-year experience in 57 patients (In Process Citation). *J Cardiothorac Vasc Anesth* 2000; 14:243-8.
29. Bland JM, Altman DG. Comparing two methods of clinical measurements. A personal history. *Int. J. Epidemiol* 1995 ; 24:7-14.
30. Stocker K. Laboratory use of hirudin. *Semin Thromb Hemost* 1991; 17:113-21.
31. Menssen HD, Renkl HJ, Rieder H. et. al. Distinction of eosinophilic leukemia from idiopathic hypereosinophilic syndrome by analysis of Wilm's tumor gene expression, *Br J Hämatol* 1998, 101:325-34.
32. Rydel TJ, Ravichandran KG, Tulinsky A, Bode W, Huber R, Roitsch C, et al. The structure of a complex of recombinant hirudin an human alpha-thrombin. *Science* 1990; 249:277-80.

33. Chang JY, Ngai PK, Rink H, Dennis S, Schlaeppli JM. The structural element of hirudin which bind to the fibrinogen recognition site of thrombin are exclusively located within its acidic C-terminal tail. *FEBS Lett* 1990; 261:287-90.
34. Chang JY. Stability of hirudin, a thrombin-specific inhibitor. The structure of alkaline-inactivated hirudin. *J Biol Chem* 1991; 266:10839-43.
35. Stocker K. Hirudin for diagnostic purposes. *Haemostasis* 1991; 21:161-7.
36. Griessbach U, Sturzebecher J, Markwardt F. Assay of hirudin in plasma using a chromogenic thrombin substrate. *Thromb Res* 1985; 37:347-50.
37. Glantz SA. Biostatistik. Ein Fach für die Praxis. In: Heinicke A, Köpke W, eds. 4th ed. Frankfurt/Main: McGraw-Hill, 1999:241-44.
38. Schiele F, Vuilleminot A, Kramarz P, Kieffer Y, Anguenot T, Bernard Y, Bassand JP. Use of recombinant hirudin as antithrombotic treatment in patients with heparin-induced thrombocytopenia. *Am J Hematol* 1995; 50:20-5.
39. Engstad CS, Gutteberg TJ, Osterud B. Modulation of blood cell activation by four commonly used anticoagulants. *Thromb Haemost* 1997; 77:690-6.
40. Lyon AW, Harding SR, Drubot D, Lyon ME. Use of thrombin inhibitors ex vivo allows critical care clinical chemistry and hematology testing on common specimens. *Clin Biochem* 1997; 30:121-7.
41. Keil E, Fiedler H. *Klinische Chemie systematisch*. Bremen: Uni-med Verlag AG, 2000.
42. Tietz N, W., Pruden EL, Siggard-Anderses O. Electrolytes, blood gases, and acidic-base balance. In: Tietz NW, editor. *Textbook of clinical chemistry*. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1986:1176.

43. Lutomski DM, Bower RH. The effect of thrombocytosis on serum potassium and phosphorous concentration. *Am J Med Sci* 1994; 307:255-8.
44. Dale JC, Pruett SH. Phlebotomy - a minimalist approach. *Mayo Clin Proc* 1993; 68:249-55.
45. Henry ML, Garnet WL, Fabri PJ. Iatrogenic anemia. *Am J Surg* 1986; 151:362-3.
46. Nabb DP. A systematic approach to materials handling in clinical laboratories. *Clin Chem* 1990; 36:1576-8.
47. O'Bryan D. A way to link the "islands of automation". *Clin Lab Man Rev* 1994; 8:446-60.
48. Schrezenmeier H, Müller H, Gunsilius E, Heimpel H, Seifried E, Anticoagulation-induced pseudothrombocytopenia and pseudoleukocytosis, *Thromb Hemost* 1995, 73: 506-13.
49. Menssen HD, Renkl HJ, Rodeck U et al. Presence of Wilms' tumor gene (wt 1) transcripts and WT 1 nuclear protein in the majority of human acute leukemias. *Leukemia* 1995; 9: 1060- 7.
50. Menssen HD, Renkl HJ, Rodeck U. et. al. Detection of monoclonal antibodies of Wilm's tumor (WT 1) nuclear in patients with acute leukemia. *Int J Cancer* 1997, 70:518-523.
51. Menssen HD, Brandt N, Leben R, Thiel E et al. Measurement of Hematological , Clinical Chemistry, and infection Parameters from Hirudinized Blood Collected in Universal Blood Sampling Tubes. *Sem Thromb Hemost*, 2001, 27(04): 349-56.
52. Menssen HD, Melber K, Brandt N, Thiel E. The Use of Hirudin as Universal Anticoagulant in Haematology, Clinical Chemistry and Blood Grouping. *Clin Chem Lab Med* 2001; 39: 1267-77.

VII. Anhang

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Priv.-Doz. Dr. Hans Dietrich Menssen für die Überlassung des Themas und seine unermüdliche Bereitschaft zur wissenschaftlichen Anleitung. Herrn Prof. Thiel danke ich ganz herzlich, dass ich diese Arbeit in seiner Klinik und seinen Laboratorien durchführen konnte. Herrn Rainer Leben, Dipl. Biotechnologe, danke ich für seine tatkräftige Unterstützung. Weiter bin ich den Schwestern der Thrombozytenspende, Anni Schmid, Christiane Seedorf, Bokyon Yum, Hildegard Simon, Angelika Nierenheim-Ulrich, Christine Henel, Susanne Vogell und Frau Giesela Stieler sowie den Medizinisch-Technischen Assistentinnen Brigitte Susanto, Sigrid Breitzkreuz, Sabine Pilz, Janet Ratei, Steffi Peach und Manuela Bolle (Hämatologisches Zentrallabor am Campus Benjamin Franklin der Charité, Universitätsmedizin Berlin) sowie Frau Komischke und Frau Österreicher für ihre exzellente technische Unterstützung zu großem Dank verpflichtet genauso wie Herrn Prof. Dr. Tauber, Herrn S. Pfeiffer und Dr. F. Perschel (Klinisch-chemisches Zentrallabor am Campus Benjamin Franklin der Charité, Universitätsmedizin Berlin) sowie Priv.-Doz. Dr. Dr. Werner Hopfenmüller (Institut für Biometrie und klassische Epidemiologie, Universitätsmedizin Berlin) für ihre sehr hilfreichen Vorschläge. Nicht zuletzt möchte ich mich bei allen Freiwilligen und den Patienten des Universitätsklinikums Benjamin Franklin für ihr Interesse und für ihr Blut, das sie mir für die Studie zur Verfügung stellten, herzlich bedanken.

München, den 13.Mai 2008

(Natascha Brandt)

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.

Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr der Erscheinens), Band und Seite des Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

München, den 13. Mai 2008

Natascha Brandt

Folgende, auf meinen Ergebnisse basierende Publikationen sind bereits erschienen:

1. Menssen HD, Brandt N, Leben R, Müller F, Thiel E, Melber K.: Measurement of Hemtological, Clinical Chemistry and Infection Meßparameters from Hirudinized Blood Collected in Universal Blood Sampling Tubes. Thromb Hemost, 2001; 27(04):349-56
2. Menssen HD, Melber K, Brandt N, Thiel E.: The Use of Hirudin as Universal Anticoagulant in Hematology, Clinical Chemistray and Blood Grouping. Clin Chem Lab Med 2001; 39: 1267-77.