

Aus dem
Institut für Laboratoriumsmedizin, Klinische Chemie und Pathobiochemie
der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin
und dem
Institut für Laboratoriumsmedizin des Unfallkrankenhauses Berlin

DISSERTATION

**Untersuchung des Einflusses
von Harnstoff, Glukose, Kreatinin und Guanidinbernsteinsäure auf
Gerinnungsvorgänge in vitro mittels ROTEM und PFA-100
-eine Pilotstudie-**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von

Michael HUBER
aus Rostock

Datum der Promotion: 06.09.2019

Meinem Vater gewidmet.

Vorwort

Während meiner Tätigkeit als Anästhesist war ich wiederholt mit Situationen konfrontiert, in denen urämische Patienten intra- oder postoperativ Blutungskomplikationen aufwiesen, welche sich nicht durch die Ergebnisse der üblichen Globaltests der Gerinnung erklären ließen.

Bei einem Literaturstudium zu diesem Thema stieß ich neben einer Vielzahl von Veröffentlichungen zur urämischen Thrombozytopathie auch auf eine Arbeit von KLINGEMANN, EGBRING und HAVEMANN aus dem Jahre 1980, in welcher die Autoren auf Grund diverser Befunde zu dem Schluss kamen, dass Harnstoff möglicherweise als Falschsubstrat für den fibrinstabilisierenden Faktor XIII dienen und so die Fibrinquervernetzung stören könnte. Interessanterweise fanden sich keine weiteren Arbeiten, die diesen interessanten Gedanken weiterverfolgt hätten.

Da mittlerweile mit der Rotationsthrombelastometrie (ROTEM) ein gut etabliertes Testverfahren zur Untersuchung der Fibrinpolymerisation und Clotstabilität zur Verfügung stand, welches zudem auch noch die zellulären Blutbestandteile berücksichtigt, lag es nahe, dieses Verfahren einzusetzen, um die Theorie von KLINGEMANN et al. unter kontrollierten Bedingungen mit künstlicher und isolierter Erhöhung der Harnstoffkonzentration im Blut in vitro zu untersuchen. Um das Bild abzurunden, wurde auch die Guanidinbernsteinsäure (GBS), deren Rolle bei der Entstehung der urämischen Thrombozytopathie mittlerweile gut belegt ist, in gleicher Weise getestet. Glukose und Kreatinin wurden als Vergleichssubstanzen gewählt. Ergänzt wurden die Untersuchungen durch die klassischen Globaltests der Gerinnung und Thrombozytenfunktionstests mit dem PFA-100.

Ziel dieser Studie war es in erster Linie, Hinweise darauf zu finden, ob Harnstoff und die anderen genannten Substanzen die Gerinnung in vitro, insbesondere im ROTEM, messbar beeinflussen. Die Ergebnisse der eigenen Messungen werden in den Kontext der Veröffentlichungen zu diesem Thema gestellt, wobei abschließend versucht werden soll, die Komplexität der Pathogenese der urämischen Koagulopathie darzustellen.

Michael Huber

Mende, den 28.12.2018

Inhaltsverzeichnis

<u>Vorwort</u>	III
<u>Inhaltsverzeichnis</u>	IV
<u>Abkürzungen und Einheiten</u>	VIII
<u>Verzeichnis der Abbildungen</u>	XI
<u>Verzeichnis der Tabellen</u>	XII
<u>Abstract</u>	XIII
1. <u>Einleitung</u>	1
1.1. Zusammenfassung	1
1.2. Die Urämie als Folgezustand des akuten und chronischen Nierenversagens	2
1.2.1. <u>Definitionen und Ätiologie</u>	2
1.2.2. <u>Epidemiologie des chronischen und akuten Nierenversagens</u>	3
1.2.3. <u>Pathogenese und Symptomatik der Urämie beim chronischen Nierenversagen</u>	3
1.2.3.1. Retention harnpflichtiger Substanzen	4
1.2.3.2. Störungen im Wasser- und Elektrolythaushalt, hormonale Veränderungen und Entzündungsprozesse beim urämischen Patienten	4
1.2.3.3. Klinische Symptome der chronischen Niereninsuffizienz und der Urämie	5
1.2.4. <u>Biochemie und Eigenschaften ausgewählter Urämietoxine</u>	5
1.2.4.1. Kreatinin	5
1.2.4.2. Harnstoff	6
1.2.4.3. Guanidinbernsteinsäure (GBS)	6
1.3. Das Gerinnungssystem	7
1.3.1. <u>Aufgaben des Gerinnungssystems bei der Aufrechterhaltung der Homöostase</u>	7
1.3.2. <u>Die Komponenten des Gerinnungssystems und deren Zusammenwirken</u>	8
1.3.2.1. Das Gefäßendothel und die subendothelialen Komponenten der Gefäßwand	8
1.3.3.2. Bedeutung der Thrombozyten für die Hämostase	9
1.3.3.3. Bedeutung der Erythrozyten für die Hämostase	9
1.3.3.4. Die Faktoren der klassischen Gerinnungskaskade	9
1.3.3.5. Primäre und sekundäre Hämostase	10

1.3.3.6.	Das klassische Modell der Gerinnungskaskade	10
1.3.3.7.	Das zellbasierte Modell der Gerinnung	11
1.3.3.8.	Vom Fibrinogen zum Fibringerinnsel	13
1.3.3.9.	Antagonisten und Regulatoren der Gerinnung	16
1.3.3.10.	Das fibrinolytische System	16
1.4.	Urämie und Gerinnung	16
1.4.1.	<u>Die klinische Symptomatik der urämischen Koagulopathie</u>	17
1.4.2.	<u>Die Pathophysiologie der urämischen Koagulopathie</u>	17
1.4.2.1.	Thrombozytenbezogene Veränderungen bei Urämie	18
1.4.2.2.	Die Rolle der renalen Anämie	18
1.4.2.3.	Störungen der Kalziumhomöostase und die Rolle von cAMP	19
1.4.2.4.	Stickstoffmonoxyd als Bindeglied zwischen GBS und urämischer Thrombopathie	19
1.4.2.5.	Die Fibrinpolymerisation im urämischen Plasma	19
1.5.	Die Aufgabenstellung der vorzustellenden Studie	21
1.5.1.	<u>Die Untersuchung des Einflusses ausgewählter Urämietoxine auf die Fibrinpolymerisation und Thrombozytenaggregation mittels ROTEM und PFA-100</u>	21
1.5.2.	<u>Fragestellungen</u>	22
2.	<u>Material und Methoden</u>	23
2.1.	Probanden und Blutentnahme	23
2.2.	Material und Geräte	23
2.2.1.	<u>Verbrauchsmaterialien</u>	23
2.2.2.	<u>Reagenzien und Chemikalien</u>	24
2.2.3.	<u>Geräte</u>	26
2.3.	Versuchsablauf der Studie	26
2.3.1.	<u>Ziel der Versuche und Zusammenfassung des Ablaufs</u>	26
2.3.2.	<u>Stammlösungen der zu untersuchenden Urämietoxine</u>	28
2.3.3.	<u>Blutentnahme</u>	29
2.3.4.	<u>Exposition der Blutproben</u>	30
2.3.5.	<u>Durchgeführte Analysen</u>	30
2.4.	Beschreibung der Messmethoden	31
2.4.1	<u>Rotationsthrombelastometrie (ROTEM®)</u>	31

2.4.2.	<u>Globaltests der Gerinnung</u>	34
2.4.2.1.	Die Thromboplastinzeit nach Quick (Quicktest)	34
2.4.2.2.	Die aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPPT)	35
2.4.2.3.	Die Bestimmung des Fibrinogengehalts im Plasma	35
2.4.3.	<u>Untersuchung der Thrombozytenfunktion</u>	36
2.4.4.	<u>Hämatologische Untersuchungen</u>	37
2.4.5.	<u>Biochemische Untersuchungen am Plasma</u>	37
2.4.5.1.	Bestimmung der Harnstoffkonzentration im Plasma	38
2.4.5.2.	Bestimmung der Kreatininkonzentration im Plasma	38
2.4.5.3.	Bestimmung der Glukosekonzentration im Plasma	38
2.5.	Statistische Auswertung der Daten	39
3.	<u>Ergebnisse</u>	40
3.1.	Das Ausgangsmaterial	40
3.1.1.	<u>Die Probanden</u>	40
3.1.1.2.	Labordiagnostische Charakterisierung der Probanden	40
3.1.2.	<u>Labordiagnostische Charakterisierung der Versuchsansätze</u>	42
3.1.2.1.	Ansatzbedingte Verdünnungseffekte auf labordiagnostische Parameter	42
3.1.2.2.	Labordiagnostische Charakterisierung der Versuchsansätze	44
3.2.	Versuchsergebnisse: Der Einfluss von Glukose, Harnstoff, Kreatinin und GBS auf die Gerinnung	46
3.2.1.	<u>Rotemuntersuchungen</u>	46
3.2.1.1.	EXTEM	47
3.2.1.2.	FIBTEM	52
3.2.1.3.	NATEM	55
3.2.1.4.	NATEM plus	55
3.2.2.	<u>Hämostaseologische Globalteste</u>	56
3.2.3.	<u>PFA-100</u>	58
3.2.4.	<u>Zusammenfassung der Ergebnisse</u>	59
4.	<u>Diskussion</u>	60
4.1.	Fragestellungen und Wahl der Untersuchungsmethoden	60
4.1.1.	<u>Untersuchung von Fibrinpolymerisation und Clotstabilität mittels ROTEM im künstlich mit Harnstoff und anderen Urämietoxinen exponierten Plasma</u>	60

4.1.2.	<u>Wahl der in der Arbeit verwendeten Kontrollsubstanzen</u>	62
4.2.	Harnstoff - ein möglicher Inhibitor von Faktor XIII?	63
4.2.1.	<u>Biochemische Bedeutung von Faktor XIII für die Stabilisierung des Fibrinclots und der mögliche Einfluss von Harnstoff</u>	63
4.2.2.	<u>Klinische Manifestationen eines Faktor-XIII-Mangels im Vergleich zu den Symptomen der urämischen Koagulopathie</u>	64
4.2.3.	<u>Zeichen eines Faktor XIII-Mangels im ROTEM</u>	65
4.2.4.	<u>Untersuchung der Fibrinpolymerisation im ROTEM in Gegenwart erhöhter Harnstoffkonzentrationen: eigene Untersuchungen und Diskussion der Ergebnisse</u>	65
4.3.	Plasmaosmolarität und Blutgerinnung	67
4.3.1.	<u>Einfluss von Glukose und Plasmooosmolarität auf die plasmatische Gerinnung</u>	67
4.3.2.	<u>Einfluss von Hyperglykämie und Hyperinsulinämie auf die Gerinnung in vivo</u>	68
4.3.3.	<u>Einfluss der Plasmaosmolarität auf die Thrombozytenfunktion</u>	69
4.4.	Die urämische Koagulopathie als Thrombopathie	69
4.4.1.	<u>Untersuchung der Thrombozytenaggreaction mittels PFA-100 in Vollblutproben nach Exposition mit Harnstoff, Glukose, Kreatinin und Guanidinbernsteinsäure</u>	70
4.4.2.	<u>Störungen der Thrombozytenadhäsion bei urämischen Patienten</u>	71
4.4.3.	<u>Störungen der Thrombozytenaggregation bei urämischen Patienten</u>	71
4.4.4.	<u>Stickstoffmonoxid als Bindeglied zwischen verschiedenen Faktoren bei der Entstehung der urämischen Thrombozytopathie</u>	73
4.5.	Weitere mögliche Ursachen der urämischen Koagulopathie	75
4.5.1.	<u>Die Thrombozytopenie bei Urämie</u>	75
4.5.2.	<u>Bedeutung der renalen Anämie</u>	76
4.5.3.	<u>Störungen der Kalziumhomöostase und die Rolle von cAMP</u>	76
4.6.	Schlussfolgerung	78
5.	<u>Literatur</u>	81
6.	<u>Eidesstattliche Versicherung</u>	92
7.	<u>Lebenslauf</u>	93
8.	<u>Publikation</u>	93
9.	<u>Danksagung</u>	94
10.	<u>Anhang</u>	95

Abkürzungen und Einheiten

%	Prozent
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µmol	Mikromol
Abb.	Abbildung
Abw.	Abweichung
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
ANV	akutes Nierenversagen
aPTT	aktivierte partielle Thromboplastinzeit
Aqua dest	Aqua destillata
ar. Mittel	arithmetisches Mittel
ATP	Adenosintri-phosphat
bzw.	beziehungsweise
c	Konzentration
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CD	Cluster of differentiation (Klasse von Rezeptorproteinen)
CFT	Clot Formation Time
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
c_{Plasma}	Konzentration im Plasma
crea	Kreatin Gruppe
Creat	Kreatinin
CRP	C-Reaktives Protein
CT	Clotting Time
c_{Urin}	Konzentration im Urin
d.h.	das heißt
D/DMSO	Deuteriertes Dimethylsulfoxid
dl	Deziliter
engl.	englisch
EPI	Epinephrin
EPO	Erythropoetin
et al.	et altera
Fa.	Firma
Fibr.	Fibrinogen
G	Gauche
g	Gramm
G-6-PDH	Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase
GBS	Guanidinbernsteinsäure
GFR	glomeruläre Filtrationsrate
GLDH	Glutamatdehydrogenase
Glu	Glukose/Glukosegruppe
GP	Glykoprotein
Gpt	Gigapartikel
GSA	Guanidinosuccinic acid

Hb	Hämoglobin
HCT	Hematocrit
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HGB	Hemoglobin
HK	Hexokinase
Hkt	Hämatokrit
HMWK	High molecular wight kinogen
Hst/HST	Harnstoff
HST	Harnstoffgruppe
kd	Kilodalton
Konz.	Konzentration
l	Liter
LI45	Lyseindex nach 45 min
L-NMMA	N-Methylarginin (N ^G -Monomethyl-L-Arginin)
M	molar
m2	Quadratmeter
max	maximal
MCF	Mean Clotfirmness
MCF-t	Mean Clotfirmness Time
MCH	Mean corpuscular hemoglobin
MCHC	Mean corpuscular hemoglobin concentration
MCV	mean corpuscular volume
MDRD	Modification of diet in renal disease
MG	Molekulargewicht
mg	Milligramm
min	Minute
min.	minimal
Mio	Millionen
ml	Milliliter
ML	Maximum Lysis
mm	Millimeter
mmol	Millimol
mosmol	Milliosmol
MPV	Mean Platelet Volume
MW	Molecular Wight
NAD⁺	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (oxidierte Form)
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (reduzierte Form)
NADP	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NIH	National Institute of Health (Thrombineinheiten)
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxidsynthetase
o.g.	oben genannt
P	P-Wert (statistischesSignifikanzniveau)
p.a.	pro analysis
PDW	Platelet Distribution Width
PFA	Platelet Function Analyser
PGI₂	Prostaglandin I ₂ (Prostacyclin)
PLT	Platelets

PTZ	Prothrombinzeit
RBC	Red blood cell count
RDW	Red cell distribution width
ROTEM	Rotationsthrombelastometrie
s	Sekunde
SD	Standarddeviation/Standardabweichung
sog.	sogenannt
Stdabw.	Standardabweichung
Tab.	Tabelle
TAFI	Thrombin aktivierbarer Fibrinolyse Inhibitor
TF	Tissue factor
TFPI	Tissue factor pathway inhibitor
t-PA	Tissue plasminogen activator
TPZ	Thromboplastinzeit
t_{verschl.}	Verschlusszeit (Kapillarverschlusszeit im PFA-100)
u.a.	unter anderem
U/min	Umdrehungen pro minute
v.	von/vom
vgl.	vergleiche
Vgl.	Vergleich
vs.	versus
V_{urin}	Urinvolumen
vWF	von Willebrandfaktor
WBC	White Blood Cell Count
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

Verzeichnis der Abbildungen

Abb. 1.1.:	Syntheseweg der Guanidinbernsteinsäure (GBS).	7
Abb. 1.2.:	Aktivierungswege der Fibrinbildung nach dem Klassischen Gerinnungsmodell.	11
Abb. 1.3.:	Das zellbasierte Gerinnungsmodell nach M. Hoffmann und D.M. Monroe III.	12
Abb. 1.4.:	Fibrinpolymerisation.	15
Abb. 1.5.:	Fibrin und Fibrinnetzwerk.	15
Abb. 1.6.:	Quervernetzung des Fibrinmoleküls durch Faktor XIII.	15
Abb. 1.7.:	Strukturelle Ähnlichkeit von Glutamin und dem Diamin Harnstoff.	20
Abb. 2.1.:	ROTEM [®] -Detektionsmethode.	32
Abb. 2.2.:	ROTEM [®] -Arbeitsplatz.	32
Abb. 2.3.:	ROTEM [®] -Kurve.	32
Abb. 2.4.:	Die für die Studie verwendeten PFA-100 -Messgeräte.	37
Abb. 3.1.:	Exemplarische Darstellung der Rotemkurven von Harnstoffansatz 2 Proband 6.	46
Abb. 3.2.:	Darstellung der einzelnen EXTEM-Messwerte sowie des Mittelwertes mit SD bei unterschiedlichen Glukosekonzentrationen.	48
Abb. 3.3.:	Einfluss unterschiedlicher Harnstoffkonzentrationen auf CT und CFT im EXTEM.	49
Abb. 3.4.:	Einfluss unterschiedlicher Kreatininkonzentrationen auf die CT im EXTEM.	50
Abb. 3.5.:	Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen von GBS auf die CFT im EXTEM.	51
Abb. 3.6.:	Einfluss der oben definierten Konzentrationen der Testsubstanzen auf die CT im FIBTEM.	53
Abb. 3.7.:	Einzelwerte der MCF im FIBTEM unter Harnstoff- und Glukosezusatz.	54
Abb. 3.8.:	Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen von Glukose, Harnstoff, Kreatinin und GBS auf die Globaltests der Gerinnung.	57
Abb. 3.9.:	Einfluss erhöhter Glukose-, Harnstoff-, Kreatinin- und GBS-Konzentrationen auf die Kapillarverschlusszeit im PFA-100-Kollagen-Epinephrintest.	58
Abb. 10.1.:	Fragebogen der Charité zur Gerinnungsanamnese.	95

Verzeichnis der Tabellen

Tab. 2.1.:	Stammlösungen der zu testenden Substanzen.	29
Tab. 3.1.:	Ergebnisse der hämatologischen Untersuchung der Probanden.	40
Tab. 3.2.:	Ergebnisse der hämostaseologischen Globalteste der Probanden.	41
Tab. 3.3.:	Ergebnisse der ROTEM-Testungen der Probanden.	41
Tab. 3.4.:	Konzentrationen von Glukose, Harnstoff und Kreatinin im Plasma der Probanden.	42
Tab. 3.5.:	Effekte durch ansatzbedingte Verdünnung in den Globaltests der Gerinnung.	42
Tab. 3.6.:	Effekte durch ansatzbedingte Verdünnung im ROTEM.	43
Tab. 3.7.:	Effekte durch ansatzbedingte Verdünnung beim Blutbild.	43
Tab. 3.8.:	Effekte durch ansatzbedingte Verdünnung von Glukose, Harnstoff und Kreatinin.	43
Tab. 3.9.:	Theoretische Erhöhung der Konzentrationen der Testsubstanzen in den Ansätzen im Vergleich zum Nullwert.	44
Tab. 3.10.:	Theoretische Erhöhung der Konz. der Testsubstanzen in den Ansätzen im Vergleich zum Nullwert.	44
Tab. 3.11.:	Gemessene Konzentrationen von Glukose Harnstoff und Kreatinin in den Versuchsansätzen.	45
Tab. 3.12.:	Anstieg der Osmolaritätswerte nach Zugabe der zu testenden Substanz.	45
Tab. 3.13.:	Einfluss der Glukose-Konzentration auf Parameter des EXTEM.	47
Tab. 3.14.:	Einfluss unterschiedlicher Harnstoffkonzentrationen auf die Extemparemeter.	49
Tab. 3.15.:	Einfluss unterschiedlicher Kreatininkonzentrationen auf die Extemparemeter.	50
Tab. 3.16.:	Einfluss unterschiedlicher Guanidinbernsteinsäurekonzentrationen auf die Extemparemeter.	51
Tab. 3.17.:	Einfluss unterschiedlicher Konz. von Glukose, Harnstoff, Kreatinin und GBS auf die CT im FIBTEM.	52
Tab. 3.18.:	Einfluss unterschiedlicher Konz. von Glukose, Harnstoff, Kreatinin u. GBS auf die MCF im FIBTEM.	54
Tab. 3.19.:	Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen von Glukose, Harnstoff, Kreatinin und GBS auf die Globaltests der Gerinnung.	56

Abstract

Die 1764 von MORGAGNI erstmals beschriebene Blutungsneigung urämischer Patienten wird heute auf Grund einer Vielzahl klinischer, tierexperimenteller und In-Vitro-Studien, die vor allem seit den 1950er Jahren durchgeführt wurden, im Wesentlichen als eine multifaktoriell bedingte Thrombozytopathie angesehen, auch wenn andere Faktoren wie die renale Anämie diese Blutungsneigung befördern.

Nur sehr wenige Arbeiten haben die Struktur des im Plasma urämischer Patienten gebildeten Fibrinclots untersucht. Sie gaben Hinweise darauf, dass auch diese pathologisch verändert sein könnte. Auf Grundlage der Ergebnisse ihrer 1980 veröffentlichten Arbeit zum Vergleich der Fibrinclotstruktur leber- und niereninsuffizienter Patienten schlugen KLINGEMANN, EGBRING und HAVEMANN vor, dass Harnstoff möglicherweise als Falschsubstrat für Faktor XIII wirken und so die Fibrinquervernetzung durch diesen stören könne.

In der vorzustellenden Studie wurde diese Idee wieder aufgegriffen und die Gerinnung im Vollblut *in vitro* unter künstlich erhöhten Harnstoffkonzentrationen mittels ROTEM untersucht, einem in der Routine gut etabliertem Verfahren zur Analyse der Dynamik der Gerinnung und der Clotfestigkeit. Auch wurden Guanidinbernsteinsäure (GBS), sowie Kreatinin und Glukose als Kontrollsubstanzen getestet, wobei jeweils EXTEM, FIBTEM, NATEM und ein modifizierter NATEM mit Thrombinzusatz sowie die klassischen Globaltests (Quick, aPTT) zur Anwendung kamen. Zusätzlich wurden Untersuchungen der Thrombozytenfunktion mittels des PFA-100-Epinephrintestes durchgeführt. Der PFA-100 dient in der diagnostischen Routine u.a. der Identifizierung thrombozytär bedingter Blutungsneigungen.

Weder im ROTEM noch in den Globaltests der Gerinnung wurden die Gerinnungszeiten durch die Zugabe der Testsubstanzen signifikant beeinflusst. Im ROTEM ergab sich keine signifikante Beeinflussung der Fibrinpolymerisation und Clotfestigkeit durch den Zusatz von Harnstoff, GBS oder der Kontrollsubstanzen Kreatinin und Glukose. Die Arbeit konnte also die Vermutung, dass Harnstoff als Falschsubstrat für Faktor XIII wirkt und so die Fibrinvernetzung stört, nicht bestätigen. Es wären jedoch weitere Untersuchungen nötig, um diese Hypothese endgültig zu widerlegen.

Im PFA-100-Epinephrintest zeigte sich keine Veränderung der Verschlusszeiten nach Zugabe der oben genannten Substanzen. Möglicherweise wäre aber der PFA-100-ADP-Test empfindlicher gewesen.

Abschließend werden verschiedene Ursachen der urämischen Blutungsneigung diskutiert, einschließlich des Zusammenhangs zwischen erhöhter Harnstoffkonzentration bei Urämie und vermehrter Bildung von GBS. Die durch erhöhte Konzentrationen von GBS im Blut urämischer Patienten bedingte vermehrte endotheliale NO-Produktion scheint einer der wesentlichen Gründe der urämischen Thrombozytopathie zu sein.

Letztendlich ist also Harnstoff möglicherweise doch zumindest teilweise und auf indirektem Wege für die urämische Koagulopathie verantwortlich.

The bleeding tendency of uraemic patients, which was first described by MORGAGNI in 1764, is nowadays essentially being considered as a thrombocytopathy conditioned by multiple factors, even if other causes such as renal anemia further increase this bleeding tendency. This is based on numerous studies involving animal and in-vitro testing that have been conducted since the 1950s.

Only a very few studies have examined the structure of the fibrin clots which are formed in the plasma of uraemic patients and suggested that their structure might also be changed pathologically. On the basis of the results of their studies which compared the fibrin clot structure of patients with hepatic and renal failure and which was published in 1980, KLINGEMANN, EGBRING and HAVEMANN proposed that possibly urea has the effect of a wrong substrate for Factor XIII and in this way might disturb the fibrin crosslinking.

In this study this idea was picked up, testing the coagulation of whole-blood in vitro with an artificially increased concentration of urea using ROTEM, a routinely well-established procedure to analyse the dynamic of coagulation and clot stability. Also Guanidinosuccinic Acid (GSA), creatinine and glucose were tested as control substances, applying EXTEM, FIBTEM, NATEM and a modified NATEM with thrombin additives as well as the class global tests (Quick, aPTT). In addition, the platelet function using the PFA-100-Epinephrine-test was examined. In diagnostic routine the PFA-100 is used amongst others to identify platelet-derived bleeding tendencies.

The addition of the testing substances did not significantly influence the coagulation times either in ROTEM or in the global coagulation tests.

In ROTEM, the fibrin polymerisation and clot stability was not significantly influenced by adding urea, GBS or the control substances creatinine and glucose. This study therefore could not confirm the hypothesis that urea has the effect of a wrong substrate for Factor XIII and hence disturbs the fibrin cross-linking. However more studies would be necessary to conclusively refute this hypothesis.

During the PFA-100-epinephrine-test no changes to the closure time occurred after the above-mentioned substances were added. Possibly the PFA-100-ADP-Test would have been more sensitive.

Finally, different causes of the uraemic bleeding tendency are being discussed, including the link between increased concentration of urea in the case of uremia and increased formation of GSA. The multiplied endothelial NO-production in the blood of uraemic patients due to the increased concentration of GSA seems to be one of the main reasons for the uraemic thrombocytopathy.

In conclusion urea is possibly at least partially and indirectly responsible for the uraemic coagulopathy.

1. Einleitung

1.1. Zusammenfassung

Obwohl das Phänomen der *Blutungsneigung urämischer Patienten* schon lange bekannt ist, sind dessen Ursachen immer noch nicht restlos aufgeklärt. Es ist mittlerweile allgemein anerkannt, dass es sich bei der urämischen Koagulopathie im Wesentlichen um eine Thrombozytopathie handelt, welche zum einen direkt oder indirekt durch bestimmte Urämetoxine, zum anderen durch die urämietypische generalisierte Entzündungsreaktion hervorgerufen wird (*vgl. Hörl 2006*).

Elektrophoretische Untersuchungen an Fibrin von Patienten mit chronischer Leber- oder Niereninsuffizienz, welche von KLINGEMANN, EGBRING und HAVEMANN Ende der siebziger Jahre durchgeführt wurden, legen jedoch nahe, dass auch eine veränderte Fibrinstruktur für die urämische Koagulopathie mitverantwortlich sein könnte. KLINGEMANN et al. vermuteten, dass das Diamin Harnstoff möglicherweise als Falschsubstrat für Faktor XIII dienen und so die Fibrinpolymerisation stören könne (*Klingemann et al. 1980*). Dieser Ansatz sollte mit der nachfolgenden Arbeit weiterverfolgt werden.

Grundlage der nachfolgend im Detail vorgestellten Studie war die Idee, eine isolierte Erhöhung der Plasmakonzentration von Harnstoff bzw. weiterer Urämetoxine wie Kreatinin und Guanidinbernsteinsäure (GBS) zu erzeugen, um so deren eventuellen spezifischen Effekt auf die Fibrinpolymerisation untersuchen zu können. Hierfür bot sich die Anfang der 90er Jahre von Andreas CALATZIS und Pablo FRITZSCHE (*Calatzis et al. 1996c*) als Weiterentwicklung der Thrombelastometrie nach HARTERT (*1948*) (*Calatzis et al. 1996a, b, c, Hartert 1948*) vorgestellte Rotationsthrombelastometrie (ROTEM) an. Wegen der Bedeutung der Thrombozyten bei der Entstehung der urämische Koagulopathie wurde zusätzlich zum ROTEM ein empfindlicher Suchtest für Thrombozytenaggregationsstörungen, der PFA-100-Epinephrintest, zum Einsatz gebracht. Ergänzt wurden die Untersuchungen durch die klassischen Globaltests der Gerinnung (aktivierte partielle Thromboplastinzeit, Thromboplastinzeit nach Quick) und die Bestimmung der Fibrinogenkonzentration.

1.2. Die Urämie als Folgezustand des akuten und chronischen Nierenversagens

1.2.1. Definitionen und Ätiologie

Als **Urämie** (vgl. urea (engl.) = Harnstoff) bezeichnet man einen klinisch-biochemischen Symptomenkomplex im Rahmen einer nicht oder nur unzureichend behandelten akuten oder chronischen Niereninsuffizienz, unabhängig von der Ätiologie der letzteren. Gekennzeichnet ist die Urämie durch eine Akkumulation harnpflichtiger Substanzen und eine Reihe komplexer biochemischer, hormonaler und inflammatorischer Folgereaktionen, die zu Fehlfunktionen unterschiedlichster Organsysteme führen (*Skorecki 2003*).

Die **chronische Niereninsuffizienz** ist durch eine **irreversible** Einschränkung der glomerulären Filtrationsrate (GFR) als Folge einer Verminderung der Anzahl funktionstüchtiger Nephrone gekennzeichnet, wobei nach den Kriterien der *National Kidney Foundation (2002)* mindestens eine der zwei folgenden Bedingungen für die Diagnose einer chronischen Nierenerkrankung erfüllt sein muss:

1. "Eine über 3 Monate andauernde Nierenschädigung, definiert durch strukturelle oder funktionelle Anomalien, mit oder ohne Einschränkung der glomerulären Filtrationsrate (GFR), die sich manifestiert in pathologischen Anomalien oder Markern einer Nierenschädigung, inklusive Anomalien in der Zusammensetzung des Blutes oder Urins, oder Anomalien in bildgebenden Verfahren."
2. Eine "GFR <60 ml/min/1,73m² über 3 Monate, mit oder ohne Nierenschädigung"

Unbehandelt geht die chronische Niereninsuffizienz ab einer GFR von unter 10ml/min in eine klinisch manifeste Urämie über, d.h. diese Patienten benötigen eine Nierenersatztherapie. Die häufigste Ursache für das chronische Nierenversagen ist die diabetische Nephropathie (Inzidenz 2006: 34 %), gefolgt von vaskulären Nephropathien (24%) und Glomerulonephritiden (13%). Weitere Ursachen sind: Interstitielle Nephritiden (8%), Nephropathien unbekannter Genese (8%), zystische Nierenerkrankungen (5%), hereditäre und kongenitale Nierenerkrankungen (1%), diverse Systemerkrankungen und Endzustände nach akutem Nierenversagen (*Frei u. Schober-Halstenberg 2008*).

Das **akute Nierenversagen** (ANV) ist ein klinisches Syndrom, welches durch den akuten Abfall der glomerulären Filtrationsrate mit einem dadurch bedingten Anstieg der harnpflichtigen Substanzen im Blut gekennzeichnet ist. Die Ursachen hierfür können in einem ischämischen Nierenparenchymschaden, in einer toxischen Nierenschädigung, in originär renoparenchymatösen Erkrankungen oder in postrenalen Harnabflussbehinderungen liegen. Vom ischämischen ANV muss das sog. funktionelle prärenale Nierenversagen infolge einer funktionellen Verminderung der GFR abgegrenzt werden, welches nach Ursachenbehebung (z.B. Ausgleich eines Volumenmangels) vollständig reversibel ist (*Brady und Brenner 2003*).

1.2.2. Epidemiologie des chronischen und akuten Nierenversagens

Folgende Zahlen verdeutlichen die gesellschaftliche Relevanz der chronischen Niereninsuffizienz: Am Stichtag 31.12.2006 wurden in Deutschland 91718 Patienten mittels einer Nierenersatztherapie, davon 66508 Patienten mit einem Dialyseverfahren behandelt. 25210 Patienten befanden sich in der Transplantatnachsorge. Hieraus ergab sich eine Prävalenz des chronischen Nierenversagens von 1114 pro 1 Mio Einwohner. 17548 Patienten wurden 2006 neu in die chronische Nierenersatztherapie aufgenommen. Dies ergab eine jährliche Inzidenz von 213 pro 1 Mio Einwohner (*Frei u. Schober-Halstenberg 2008*). Die Zahlen bezüglich der Inzidenz des akuten Nierenversagens sind wesentlich ungenauer. Man schätzt, dass ca. 30% aller Patienten, die auf einer Intensivstation aufgenommen werden, ein ANV entwickeln. Lediglich bei 10% der Patienten welche die akute Erkrankung, durch die das akute Nierenversagen verursacht wurde, überleben, wird eine chronische Nierenersatztherapie erforderlich (*Joannidis et al. 2009*).

1.2.3. Pathogenese und Symptomatik der Urämie beim chronischen Nierenversagen

Der Verlust funktionstüchtiger Nephrone führt nicht nur zu einer zunehmenden Einschränkung der exkretorischen Nierenfunktion, auch die inkretorische Funktion der Nieren wird hierdurch erheblich beeinträchtigt. Schließlich kommt es bei Patienten mit einer chronischen Niereninsuffizienz zu einer Reihe hormonaler und metabolischer Anpassungs- sowie inflammatorischer Folgereaktionen, die die Symptomatologie erheblich mitbestimmen.

Die chronische Einschränkung der exkretorischen Nierenfunktion führt zu einer Akkumulation harnpflichtiger Substanzen und sekundärer Stoffwechselprodukte und schließlich, bei

Oligurie oder Anurie, auch zu Störungen des Wasser-, Elektrolyt- und Säure-Basen-Haushalts (*Skorecki 2003*).

1.2.3.1. Retention harnpflichtiger Substanzen

Bei den retinierten Substanzen handelt es sich im Wesentlichen um Endprodukte des Protein- und Nukleinsäurestoffwechsels. *Vanholder et al.* listen in einer 2003 publizierten Übersichtsarbeit 45 frei wasserlösliche Urämietoxine mit einem MW von 59 bis 378 Dalton, 25 proteingebundene Urämietoxine mit einem Molekulargewicht von 58 bis 21200 Dalton sowie 22 sogenannte Mittelmoleküle mit einem Molekulargewicht von 555 bis 32000 Dalton auf, welche in z.T. erheblich erhöhten Konzentration im Blut von Urämikern gefunden werden. Auffällig ist unter anderem, dass einige Substanzen weitaus stärker akkumulieren als andere. So übersteigt die in dieser Veröffentlichung angegebene mittlere Konzentration für Guanidinbernsteinsäure (GBS) bei Urämikern die mittlere bei Gesunden angetroffene Konzentration um den Faktor 216, wohingegen Harnsäure im Mittel nur um den Faktor 1,24 anstieg (*Vanholder et al. 2003*). Bei den retinierten Substanzen handelt es sich sowohl um wasserlösliche als auch proteingebundene Moleküle unterschiedlichster Stoffklassen, von denen aber nur die in dieser Untersuchung verwendeten Substanzen Kreatinin, Harnstoff und GBS im Weiteren ausgeführt werden sollen.

1.2.3.2. Störungen im Wasser- und Elektrolythaushalt, hormonale Veränderungen und Entzündungsprozesse beim urämischen Patienten

Störungen des Wasser-, Elektrolyt- und Säure-Basen-Haushaltes wie Hypervolämie, Hyperkaliämie und metabolische Azidose sind regelmäßig im Rahmen des chronischen Nierenversagens anzutreffen, sind aber nicht primär Gegenstand dieser Arbeit.

Die Beeinträchtigung der inkretorischen Nierenfunktion mit unzureichenden Produktion von Erythropoetin und einer frühzeitig gestörten 1-alpha-Hydroxylierung des 25-OH-Vitamin D₃, sowie hormonale Anpassungsmechanismen mit einer verstärkten Sekretion von Parathormon, welches die tubuläre Reabsorption von Phosphat hemmt, bedingen eine Reihe von Symptomen und Folgeerscheinungen des chronischen Nierenversagens wie die renale Anämie und die renale Osteopathie (*Skorecki 2003*).

Die bei urämischen Patienten u.a. über erhöhte CRP- und Interleukin-6-Konzentrationen nachzuweisende chronische Entzündungsreaktion wird seit einiger Zeit mit einem erhöhten kardiovaskulären Risiko, einer häufig anzutreffenden Insulinresistenz, der urämietyptischen

Inappetenz und einer hieraus resultierenden Malnutrition in Verbindung gebracht (Stenvinkel 2005, Honda et al. 2006, Cheung et al. 2010).

1.2.3.3. Klinische Symptome der chronischen Niereninsuffizienz und der Urämie

Entsprechend der Komplexität der urämiebedingten pathophysiologischen Veränderungen sind die klinischen Symptome der Niereninsuffizienz und der Urämie vielfältig: Oligurie und Anurie, die renale Anämie, kardiovaskuläre Symptome wie z.B. arterielle Hypertonie, Arteriosklerose, Herzinsuffizienz, Lungenödem und periphere Ödeme, diverse gastrointestinale Beschwerden, Veränderungen des Hautkolorits und Pruritus, die urämische Polyneuropathie und Enzephalopathie, die renale Osteopathie und schließlich auch die **urämische Koagulopathie mit erhöhter Blutungs- und/oder Thromboseneigung** (Skorecki 2003, Hörl 2006).

1.2.4. Biochemie und Eigenschaften ausgewählter Urämietoxine

1.2.4.1. Kreatinin

Kreatinin ($C_4H_7N_3O$, 2-Imino-*N*-methylhydantoin, MG: $113,12 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) ist das renal eliminierbare Endprodukt des muskulären Kreatinstoffwechsels. Es entsteht durch einen Ringschluss aus Kreatinphosphat unter Abspaltung von anorganischem Phosphat. Kreatinphosphat ist einer der wichtigsten anaeroben Phosphatlieferanten der Muskulatur für die Bildung von ATP aus ADP. Das Serumkreatinin ist der in der klinischen Praxis am häufigsten zur Einschätzung der Nierenfunktion bestimmte Parameter.

Die Berechnung der GFR erfolgt nach folgender Formel:

$$\text{Renale Clearance} = \frac{C_{\text{Urin}} (\mu\text{mol/l}) \cdot V_{\text{Urin}} (\text{ml})}{C_{\text{Plasma}} (\mu\text{mol/l}) \cdot \text{Urinsammelzeit} (\text{min})}$$

(C=Konzentration, V=Volumen)

Kreatinin wird jedoch nicht nur glomerulär filtriert, sondern auch zu 20% tubulär sezerniert, so dass die nach dieser Formel bestimmte GFR vor allem im fortgeschrittenen Nierenversagen die Nierenfunktion regelmäßig überschätzt. In der klinischen Praxis wird die Kreatininclearance

häufig nach der Formel von COCKROFT und GAULT (1976) oder der MDRD-Formel geschätzt („estimated GFR“) (*Löffler und Petrides 1988: 964-965, Guder 1989a*).

1.2.4.2. Harnstoff

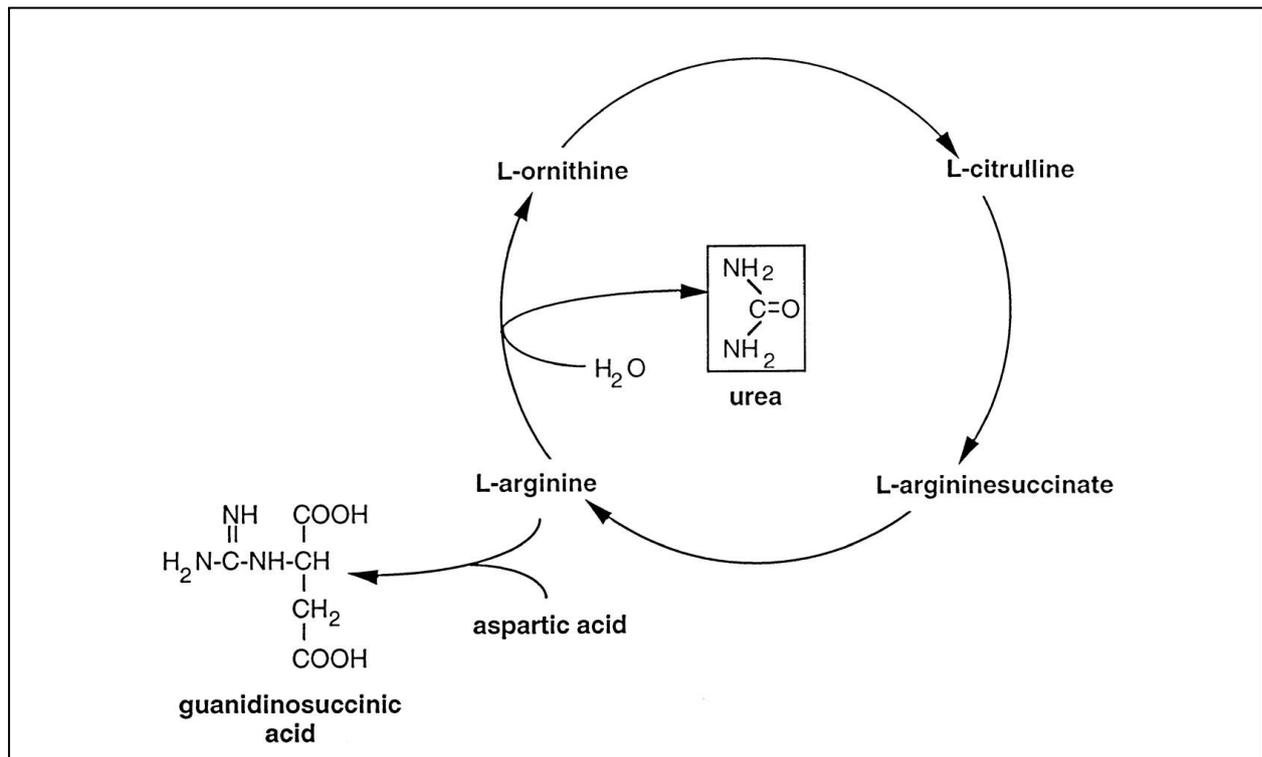
Harnstoff ($\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$, Kohlensäurediamid MG: $60,06 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) ist das wichtigste Endprodukt des Aminosäurenstoffwechsels. Ziel der Biosynthese des Harnstoffs ist die Eliminierung von überschüssigem Ammoniak. Die Bildung von Harnstoff erfolgt fast ausschließlich in der Leber aus Ammoniak, Bicarbonat und dem alpha-Aminostickstoff von Aspartat, im sog. KREBS-HENSELEIT-Zyklus. Ein 70 kg schwerer Mensch produziert etwa 0,5 mol Harnstoff pro Tag, bei proteinreicher Kost zwei bis dreimal mehr. In der Niere wird Harnstoff glomerulär filtriert und im proximalen Tubulus zu 50% wieder reabsorbiert. Im weiteren Verlauf des Nephrons wird Harnstoff dann wieder teilweise sezerniert. Harnstoff spielt im inneren Nierenmark eine wichtige Rolle als osmotisch wirksamer Regulator der Wasserabsorption. Die Harnstoffkonzentration im Blut wird durch drei Komponenten bestimmt: die Menge der Nahrung und deren Zusammensetzung (Proteinanteil), die hepatische Syntheseleistung und die renale Ausscheidung (*Löffler u. Petrides 1988: 458-59, 830, 957*).

1.2.4.3. Guanidinbernsteinsäure (GBS)

Die Guanidinbernsteinsäure (GBS, $\text{C}_5\text{H}_9\text{N}_3\text{O}_4$, MG: $175 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) ist eines der vielen wasserlöslichen Moleküle, die in der Urämie akkumulieren. Beim Gesunden kaum nachweisbar, ist die GBS das Molekül, welches in der Urämie den prozentual höchsten Anstieg aufweist (*Dobbelstein et al. 1971a*). Dies lässt sich dadurch erklären, dass die Bildung von GBS in der Leber (*Dobbelstein et al. 1971a, b*) eine direkte Folge der Harnstoffakkumulation in der Urämie ist. Erhöhte Harnstoffkonzentrationen hemmen die Enzyme des KREBS-HENSELEIT-Zyklus. Dies führt zu einer Aktivierung alternativer Stoffwechselwege, wie der Bildung von GBS aus L-Arginin und Aspartat (Transamidation) (*Perez et al. 1976*) (siehe Abb. 1.1).

GBS wurde schon früh mit Thrombozytenfunktionsstörungen (siehe auch Kapitel 1.4.2.4.) und der urämischen Neuropathie (*Dobbelstein et al. 1971a*), in jüngster Zeit aber auch mit der urämischen Enzephalopathie in Verbindung gebracht (*De Deyn et al. 2009*).

Abb. 1.1.: Syntheseweg der Guanidinbernsteinsäure (GBS): Bei Anhäufung von Harnstoff kommt es zur vermehrten Bildung von GBS aus Arginin und Aspartat (*aus: Noris und Remuzzi 2009*).



1.3. Das Gerinnungssystem

Um mögliche Ansatzpunkte von Urämietoxinen im Gerinnungssystem besser darstellen zu können, wird dieses im Folgenden in detaillierter Form beschrieben.

1.3.1. Aufgaben des Gerinnungssystems bei der Aufrechterhaltung der Homöostase

Eine der grundlegenden Eigenschaften lebender Systeme ist die zeitlich begrenzte Fähigkeit zur Aufrechterhaltung eines inneren dynamischen Gleichgewichtszustands trotz störender Einwirkungen aus der Umwelt. Dieses grundlegende Prinzip wurde um 1878 von dem französischen Physiologen CLAUDE BERNARD erstmals beschrieben (*Gross 1998*). Der amerikanische Physiologe WALTER CANNON prägte hierfür den Begriff "Homöostase" (*1932*). Höherorganisierte vielzellige Organismen haben für den Stoffaustausch mit der Umwelt spezifische Stofftransportsysteme entwickelt, wie das Kreislaufsystem der Wirbeltiere mit dem Blut als Transportmedium. Dem Gerinnungssystem fällt die komplexe Aufgabe zu, die Integrität

des Kreislaufsystems bzw. die schnelle Wiederherstellung derselben im Falle einer Verletzung unter gleichzeitiger Wahrung der Fließfähigkeit des Blutes zu gewährleisten. Hierzu hat sich ein subtiles Netzwerk aus zellulären und humoralen Komponenten entwickelt. Es finden sich sowohl zur Blutstillung notwendige prokoagulatorische Faktoren als auch zur Wahrung oder Wiederherstellung der Fließfähigkeit des Blutes notwendige antikoagulatorische und fibrinolytische Faktoren. Diese stehen normalerweise in einem dynamischen Gleichgewicht zueinander. So bleibt die durch eine Verletzung eines Blutgefäßes ausgelöste Gerinnung lokal beschränkt (*Davissson et al. 2003, Riddel et al. 2007*).

1.3.2. Die Komponenten des Gerinnungssystems und deren Zusammenwirken

1.3.2.1. Das Gefäßendothel und die subendothelialen Komponenten der Gefäßwand

Das die Gerinnung auslösende Primäreignis ist die Verletzung des durch seine negativ geladene Glykokalyx (*AJ Drake-Holland und Noble 2018, Friedhoff und Sonenberg 1983, Constantinescu et al. 2003*) normalerweise unbenetzbaren Endothels (*Barthels und Depka 2003: 49*) mit der daraus resultierenden Freilegung des positiv geladenen subendothelialen Kollagens (*Löffler und Petrides 1990: 831*). Die Adhäsion der Thrombozyten (*Varga-Szabo et al. 2008*) an die Subendothelschicht wird durch den vom Endothel produzierten von Willebrand-Faktor (*Kanaji et al. 2012*) vermittelt, das subendothelial befindliche Thromboplastin (tissue factor) aktiviert Faktor VII und initiiert den sog. extrinsischen Weg der plasmatischen Gerinnung (*Barthels und Depka 2003: 49*). Aus der verletzten Gefäßwand freigesetztes Adrenalin und Endothelin-1 vermitteln u.a. neben von Thrombozyten produziertem Serotonin und Thromboxan eine Vasokonstriktion mit Verlangsamung des Blutflusses und Plasmaextravasation (*vgl. Voigt et al 2016*). Die Rolle des Endothels und der Gefäßwand im Rahmen der Hämostase ist aber wesentlich komplexer, wie die Vielzahl der vom Endothel produzierten pro- und antikoagulatorischen Faktoren, der exprimierten Rezeptoren, Mediatoren und Enzyme zeigt (*Übersicht: Steffel und Lüscher 2010*).

1.3.3.2. Bedeutung der Thrombozyten für die Hämostase

Die kernlosen 2-4 µm großen, im Knochenmark aus den Megakaryozyten gebildeten Thrombozyten sind die wichtigsten zellulären Komponenten des Gerinnungssystems. Sie gewährleisten im Rahmen der sogenannten primären Hämostase eine erste provisorische Abdichtung des verletzten Blutgefäßes und sind wesentlich an der Aktivierung, Regulation und lokalen Konzentration der nachfolgenden sog. plasmatischen Gerinnungsvorgänge beteiligt.

Die Lebensdauer eines Thrombozyten beträgt etwa sieben Tage. Ihr Abbau erfolgt im retikuloendothelialen System. Das wichtigste Speicherorgan für Thrombozyten ist die Milz. Die Thrombozytenzahl im Plasma (150 bis 350 Gpt/l) (*Gawaz 2001, Witt 1989: S.754*) ist das Ergebnis eines dynamischen Gleichgewichts aus Produktion, Abbau, Verbrauch und Sequestrierung (*Slichter 1978, Witt 1989*). Ein Abfall der Thrombozyten unter 10 Gpt/l kann auch bei sonst normalen Hämostaseparametern zu spontanen Blutungen führen (*Estcourt et al. 2017*). Thrombozyten können eine Vielzahl an Inhaltsstoffen aus verschiedenen Granula sezernieren (*siehe Jurk und Kehrel 2010*) und beeinflussen hierüber und über verschiedene membrangebundene Moleküle die Gerinnung (*siehe Kapitel 1.3.3.7*).

1.3.3.3. Bedeutung der Erythrozyten für die Hämostase

Die Korrelation zwischen einem Abfall des Hämatokrits und dem Auftreten von Blutungskomplikationen legt eine indirekte Beteiligung der Erythrozyten an der Hämostase nahe. Rheologische Phänomene, wie die Marginalisierung der Thrombozyten im Blutstrom, sind hier besonders bedeutsam (*siehe auch Kapitel 1.4.2.2. u. 4.5.2.*) (*Hellem et al. 1961*).

1.3.3.4. Die Faktoren der klassischen Gerinnungskaskade

Bei den Faktoren der plasmatischen Gerinnung handelt es sich biochemisch gesehen um Proteine, Lipoprotein-Phosphatid-Cholesterol-Komplexe (Faktor III) und Kalziumionen. Die Gerinnungsfaktoren sind größtenteils Enzyme, einige wirken als Coenzyme und das Fibrinogen als Substrat. Die Faktoren II, VII, IX, X, XI und XII gehören zur Gruppe der Serinproteasen, einer der vier Hauptfamilien proteolytischer Enzyme bei Wirbeltieren (*Stryer 1991: 238-39, 256-67*). Die Faktoren II, VII, IX und X benötigen für Ihre Synthese die Anwesenheit von Vitamin K (gamma-Carboxylierung in der Leber) (*Stryer 1991: 263-264*). Die Synthese des von Willebrand-Faktors erfolgt in den Megakaryozyten und im Endothel (*Barthels und Depka 2003:*

488). Der den extrinsischen Weg der Gerinnung auslösende Faktor III (tissue factor) lässt sich in fast allen Geweben nachweisen, wobei seine Aktivität im Hirn, im Lungengewebe und der Plazenta am stärksten ist (*Fleck et al. 1990, Morrissey 2001*). Alle Gerinnungsfaktoren liegen im physiologischen Zustand in inaktivierter Form vor und werden durch die Bindung eines Cofaktors oder durch die enzymatische Abspaltung einer Peptidkette aktiviert (*Stryer 1991: 259-269, Löffler und Petrides: 832-834*).

1.3.3.5. Primäre und sekundäre Hämostase

Herkömmlicherweise werden zwei Phasen der Blutstillung unterschieden: die **primäre Hämostase** mit Vasokonstriktion, Adhäsion der Thrombozyten an der verletzten Gefäßwand und nachfolgender Thrombozytenaggregation mit der Bildung eines sog. Thrombozytenpfropfes. Dieser wird dann in der sogenannten **sekundären Hämostase** durch die enzymatisch katalysierte Bildung eines Fibringerinnsels stabilisiert (*Löffler und Petrides 1990: 830-837*).

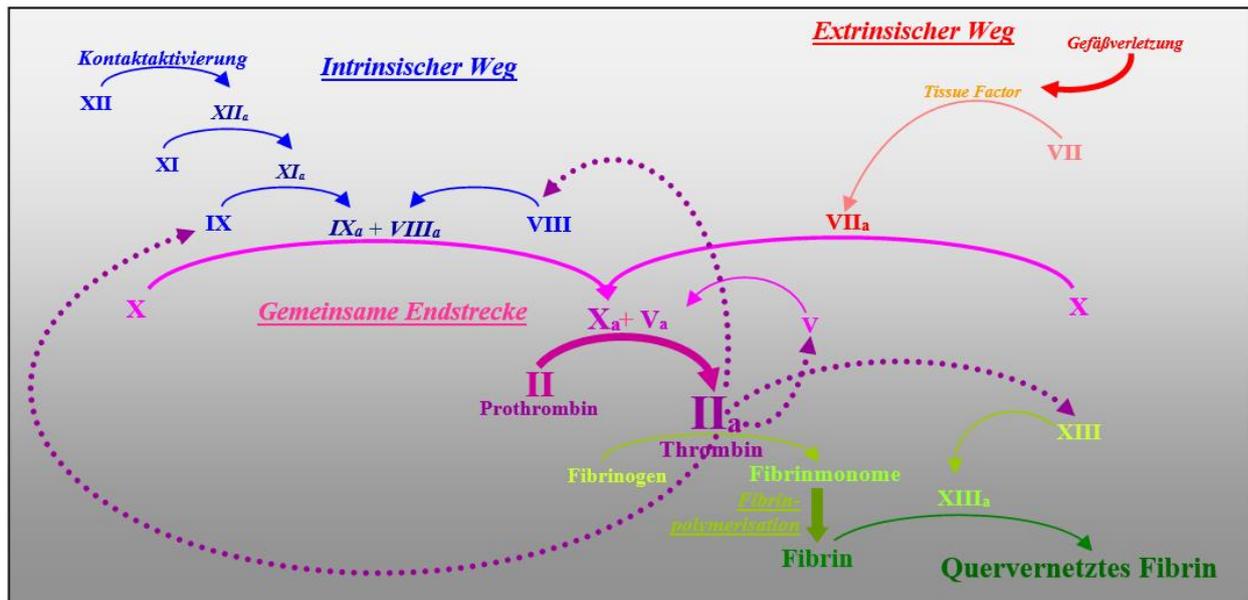
Das 2001 vorgestellte zellbasierte Modell der Gerinnung fasst diese zwei Phasen in komplexer Weise zusammen (siehe Kapitel **1.3.3.7.**).

1.3.3.6. Das klassische Modell der Gerinnungskaskade

Das enzymzentrierte Modell der sog. Gerinnungskaskade wurde 1964 unabhängig voneinander von E.W. DAVIE und O.D. RATNOFF in der Zeitschrift *Science* und von R.G. MACFARLANE in der Zeitschrift *Nature* (1964) vorgestellt und bestimmt bis heute entscheidend die Vorstellungen zum Ablauf der Gerinnung. Es erklärt eine Fülle von in vitro beobachtbaren Phänomenen. Es beschreibt den Ablauf der Gerinnung als eine sich selbst verstärkende enzymatische Kettenreaktion. Auch viele klinische Fragen können dank dieses Modells beantwortet werden. Abbildung **1.2.** gibt eine Übersicht über die beteiligten Gerinnungsfaktoren und deren Aktivierungswege im klassischen Gerinnungsmodell.

Nach initialer Aktivierung von Faktor XII (intrinsischer Weg) bzw. von Faktor VII (extrinsischer Weg) werden eine Reihe weiterer Gerinnungsfaktoren bis hin zum Thrombin (Faktor II) in kaskadenartigen, sich stufenweise verstärkenden, teilweise kalziumabhängigen enzymatischen Reaktionen aktiviert. Thrombin katalysiert die Bildung von Fibrin aus Fibrinogen, das schließlich durch Faktor XIII quervernetzt und stabilisiert wird.

Abb. 1.2.: Aktivierungswege der Fibrinbildung nach dem Klassischen Gerinnungsmodell.



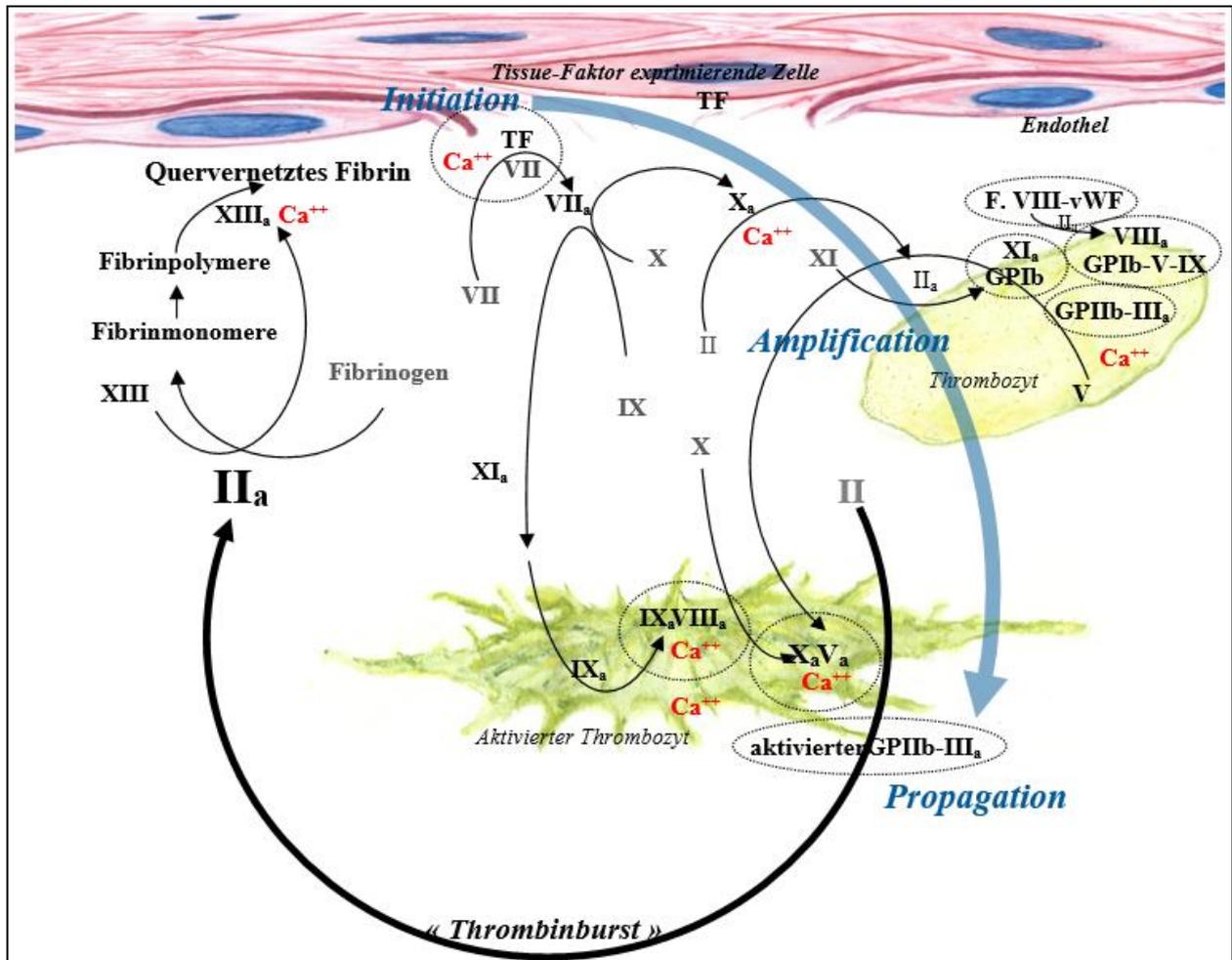
1.3.3.7. Das zellbasierte Modell der Gerinnung

Eine Reihe von Fragen u.a. im Zusammenhang mit der Hämophilie A und B, die sich mit dem Modell der klassischen Gerinnungskaskade nicht hinreichend erklären ließen, haben zur Publikation eines neuen zellbasierten Gerinnungsmodells durch M. HOFFMAN und D.M. MONROE III geführt (2001), das einen grundsätzlich anderen Blick auf die Gerinnung wirft.

Auch wenn bereits zuvor Einigkeit darüber herrschte, dass die zellulären Komponenten des Gerinnungssystems und insbesondere die Thrombozyten mit ihrer Phosphatidylserin liefernden Oberfläche beim Ablauf der Gerinnung in vivo eine wichtige Rolle spielen, nahm man an, dass die Regulation der Gerinnungsvorgänge hauptsächlich durch die Konzentrationen und Kinetik der beteiligten Enzyme selbst bestimmt wird. Maureane HOFFMAN und Douglas M. MONROE III hingegen postulierten in ihrer Arbeit, dass die Gerinnung in vivo nicht nur einfach an der phosphatidylserinhaltigen zellulären Oberfläche nach enzymkinetischen Gesichtspunkten abläuft, sondern, dass die zellulären Oberflächen mittels spezifischer Rezeptoren für Gerinnungsfaktoren und Inhibitoren aktiv in die Regulation und lokale Begrenzung der Gerinnung involviert sind. Die durch die klassischen Labortests Thromboplastinzeit nach Quick und aPTT so geläufige Gerinnungskaskade mit dem extrinsischen und intrinsischen Aktivierungsweg wird zugunsten eines neuen Konzepts mit drei überlappenden Phasen der Gerinnung aufgegeben: der **Initiierungsphase**, der **Verstärkungsphase** (Amplifikation) und der **Propagationsphase** (vgl. Abb. 1.3.)

Die Autoren betonen in ihrer Arbeit die Bedeutung der adäquaten Rezeptorkombination an der Zelloberfläche. Neben dem Tissue-Faktor (TF) werden auch zelluläre Rezeptoren für das Zusammensetzen des Prothrombinasekomplexes benötigt, um so eine effektive Thrombinbildung zu starten.

Abb. 1.3.: Das zellbasierte Gerinnungsmodell nach M. Hoffmann und D.M. Monroe III (eigene Bildgestaltung frei nach Lier et al. 2009).



Obwohl sie selbst keinen TF exprimieren, kommt den Thrombozyten im zellbasierten Gerinnungsmodell die Schlüsselrolle zu. Sie können über den vWF an das Subendothel binden und auf verschiedenen Wegen aktiviert werden. Mit der Aktivierung der Thrombozyten kommt es zu einem sog. Membran-flip-flop bei dem die Innenseite der Zellmembran nach außen gekehrt wird und so das gerinnungsaktivierende Phosphatidylserin und andere Phospholipide freigelegt werden (siehe auch Barthels u. Depka 2002: 50). Die ebenfalls mit der Thrombozytenaktivierung einhergehende sog. Freisetzungsreaktion führt zur Entleerung u.a. der alpha-Granula,

welche große Mengen von Faktor V enthalten. Parallel dazu werden neben den dense bodys auch eine Vielzahl von z.T. noch nicht näher charakterisierten Oberflächenrezeptoren aktiviert. Diesen Rezeptoren wird eine Schlüsselrolle u.a. beim Aufbau der oben erwähnten Enzymkomplexe zugeschrieben.

Auch bei der Begrenzung der Gerinnungsvorgänge auf den Ort der Verletzung spielen Oberflächenrezeptoren eine entscheidende Rolle: intakte Endothelzellen exprimieren Thrombomodulin. Durch die Bindung an Thrombomodulin verliert Thrombin seine prokoagulatorischen Eigenschaften und wirkt über die Aktivierung von Protein C antikoagulativ. Die an der Oberfläche des intakten Endothels befindlichen heparinähnlichen Glucosaminoglykane verstärken die Wirkung von Antithrombin und TFPI.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass im zellbasierten Gerinnungsmodell die Bindung der Gerinnungsfaktoren an zelluläre Rezeptoren diese nicht nur räumlich konzentriert und so deren Zusammenwirken erst ermöglicht, sondern z.T. auch in ihrer Funktion moduliert. Des Weiteren schützt die zelluläre Bindung die Rezeptoren vor der Inaktivierung durch im Plasma zirkulierende Inhibitoren.

Auch zum Verständnis der Thrombose als pathologisch entgleister Gerinnung leistet das zellbasierte Gerinnungsmodell einen nicht zu unterschätzenden Beitrag. Die Erkenntnis, dass die Endothelzellen in verschiedenen Gefäßabschnitten unterschiedliche Expressionsmuster von Oberflächenrezeptoren aufweisen und dass Entzündungsprozesse diese verändern, könnte den Weg weisen weg von einer thrombozyten- oder enzymorientierten hin zu einer endothelzellrezeptororientierten antithrombotischen Therapie (*Hoffman und Monroe 2001*).

1.3.3.8. Vom Fibrinogen zum Fibringerinnsel

Die Umwandlung des im Blutplasma gelösten Fibrinogens in Fibrinmonomere und die nachfolgende spontane Polymerisation derselben zum faserförmigen Fibrin ist zweifelsohne der entscheidende Prozess der Blutstillung. Das in der Leber synthetisierte (*Corin u. Anisiaux 1894*) Fibrinogen ist damit das Schlüsselsubstrat der Blutgerinnung.

Beim Fibrinogen (Faktor I) handelt es sich um ein 340 kd schweres Glykoprotein, mit einer Plasmakonzentration von ca. 2-4 g/l und einer Plasmahalbwertszeit von 3-5 Tagen. Das Molekül weist eine dimere, aus drei Kettenpaaren (α -, β - und γ -Ketten) bestehende Struktur auf. Das Gesamtprotein ist aus drei globulären Untereinheiten aufgebaut, welche durch zwei stabförmige

Elemente miteinander verbunden sind. Diese Verbindungselemente bestehen aus dreisträngigen alpha-helikalen Superhelices (*Stryer 1991: 260-263, Löffler und Petrides 1990: 834-835*).

Die Spaltung von vier Arginin-Glycinbindungen der zentralen globulären Region des Fibrinogenmoleküls durch Thrombin führt zur Freisetzung von je zwei Fibrinopetidpaaren. Durch die Abspaltung der stark negativ geladenen Fibrinopeptide verändert sich das Oberflächenladungsmuster des Fibrinogenmoleküls, welches nun als Fibrinmonomer bezeichnet wird (*Stryer 1991: 261*).

Mehrere Fibrinmonomere lagern sich dann spontan (Lateralassoziation) zu geordneten faserförmigen Strukturen, den Fibrinprotofibrillen zusammen (siehe Abb. 1.4). Diese bilden lange Fasern, welche sich schließlich zu einem verzweigten Netzwerk verdichten (vgl. Abb. 1.5). Da das spontan polymerisierte Fibrin initial noch instabil ist, ist zur Stabilisierung dieses Netzwerkes ein weiterer, durch den sog. Fibrinstabilisierenden Faktor (Faktor XIII oder Laki-Lorand-Faktor) enzymkatalysierter Schritt nötig. Faktor XIII ist eine durch Thrombin aktivierte Transaminase, welche zwischen spezifischen Seitenketten der Fibrillen kovalente Quervernetzungen knüpft. Bei diesen Seitenketten handelt es sich um Glutamin- und Lysinreste zwischen denen Faktor XIII die Bildung einer Isopetidbindung katalysiert (siehe Abb. 1.6) (*Stryer 1991: 262*).

Zunächst erfolgt relativ rasch (ca. 30 min) die Bildung von Dimeren auf der Ebene der gamma-Ketten, dann wesentlich langsamer (innerhalb von ca. 2h) (*Barthels u. Depka 2002: 63*) die Vernetzung der alpha-Fibrinogen-Ketten, welche von entscheidender Bedeutung für die Gerinnselfestigkeit ist, wobei eine vollständige Quervernetzung der Fibrinmonomere in vitro Inkubationszeiten von mehr als 12 h erfordert (*Siebenlist et al. 2001*). Die Bedeutung des hereditären und erworbenen Faktor XIII-Mangels für die Pathogenese postoperativer Nachblutungen ist gut belegt (*Wettstein et al. 2004, Korte 2006*).

Abb.1.4.: Fibrinpolymerisation (eigene Bildgestaltung, frei nach Stryer 1991: 261).

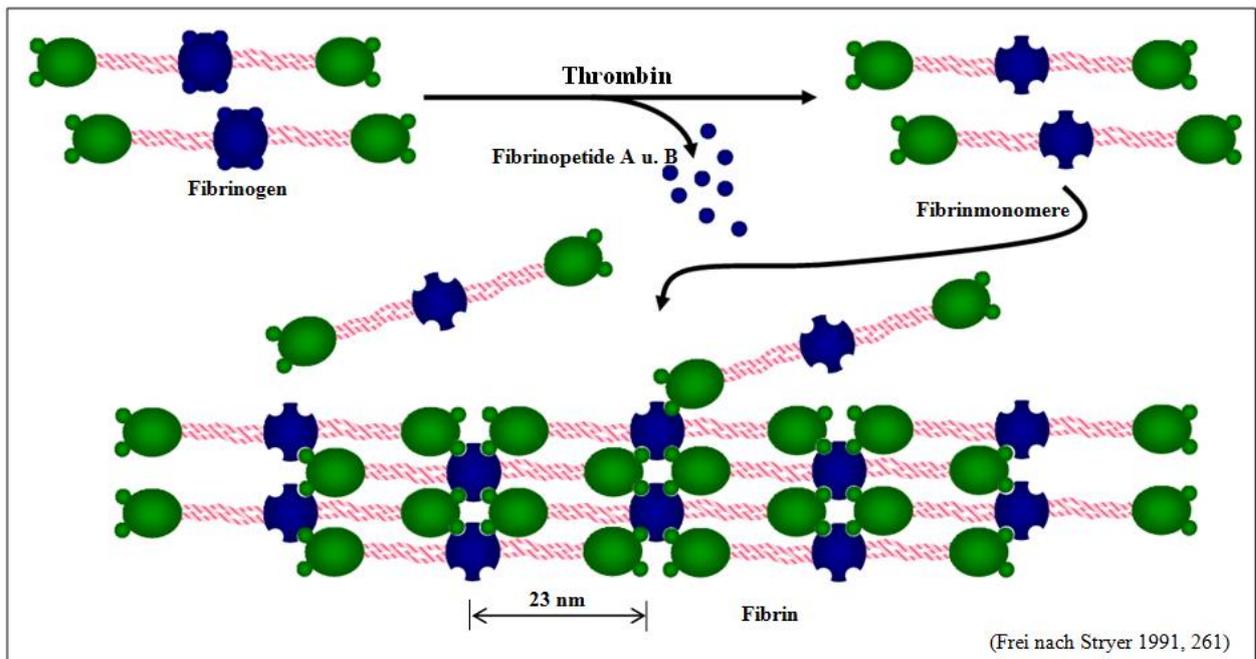


Abb. 1.5.: Fibrin und Fibrinnetzwerk (eigene Bildgestaltung [links nach einer elektronenmikroskopischen Aufnahme von H. Slater in Stryer 1991: 261]).

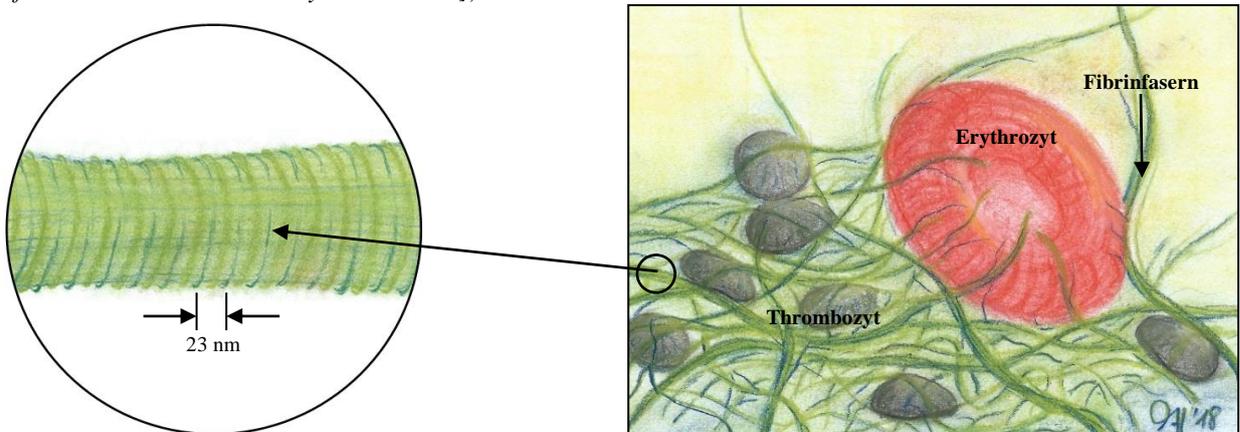
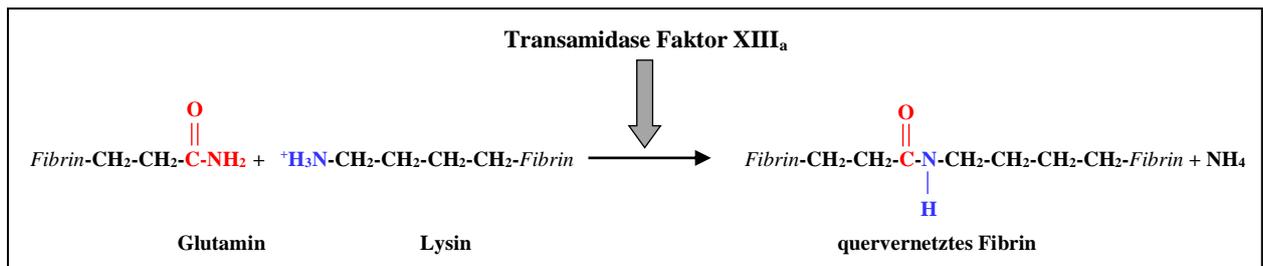


Abb. 1.6.: Quervernetzung des Fibrinmoleküls durch Faktor XIII (nach Stryer 1991: 262).



1.3.3.9. Antagonisten und Regulatoren der Gerinnung

Um eine unkontrollierte Ausbreitung der am Ort einer Gefäßverletzung initiierten Gerinnungsprozesse und die damit verbundenen Folgen, wie den thrombotischen Verschluss ganzer Gefäßregionen und den Verbrauch der plasmatischen Gerinnungsfaktoren zu vermeiden, werden zeitgleich mit den plasmatischen Gerinnungsfaktoren auch Antagonisten und Regulatoren der Gerinnung aktiviert. Auf diese kann im Rahmen dieser Arbeit nicht näher eingegangen werden (*Barthels u. Depka 2002: 64 -67*).

1.3.3.10. Das fibrinolytische System

Unter dem von A. DESATRE (1893) geprägten Begriff der Fibrinolyse versteht man die enzymatische Spaltung von Fibrin und Fibrinogen durch die Serinprotease Plasmin, deren Vorstufe Plasminogen (*Deutsch u. Mertz 1970*) vor allem in der Leber synthetisiert wird. Die Umwandlung des Proenzym Plasminogen in seine aktive Form Plasmin wird durch weitere Serinproteasen katalysiert: den Tissue-Plasminogenaktivator (t-PA) und die vor allem in den Nieren und Harnwegen nachweisbare Urokinase (*Barthels u. Depka 2002: 520-526*). Ziel der Fibrinolyse ist die Begrenzung der Bildung von Fibringerinnseln auf den Ort der Verletzung und die Rekanalisierung von durch Gerinnsel verschlossenen Blutgefäßen. Plasmin wird im Plasma relativ schnell durch alpha-2-Antiplasmin über eine Komplexbildung inaktiviert. An Fibrin gebundenes Plasmin hingegen ist für alpha-2-Antiplasmin unangreifbar (*Barthels u. Depka 2002: 577-578*). Natürlich bedarf auch das fibrinolytische System einer feinabgestimmten Regulierung und Begrenzung seiner Aktivität. Neben dem alpha-2-Antiplasmin sind weitere Faktoren wie z.B. der Thrombin-aktivierbare Fibrinolyse-Inhibitor (TAFI) an der Regulierung und Begrenzung der Fibrinolyse beteiligt (*Barthels u. Depka 2002: 582-583*).

1.4. Urämie und Gerinnung

Bei urämischen Patienten lassen sich zwei gegensätzliche Phänomene beobachten: einerseits eine signifikant erhöhte Blutungsneigung und andererseits auch eine erhöhte Neigung zu thrombotischen Komplikationen.

Die erste Beschreibung einer Koagulopathie bei Nierenfunktionsstörungen stammt von MORGAGNI aus dem Jahre 1764. Weitere Beschreibungen des Phänomens finden sich bei

RIESMAN 1907 sowie bei JAFTE und LAING 1937. Ab den fünfziger Jahren häufen sich die Publikationen zu diesem Thema (*Lewis et al. 1956, Kuhlback 1957, Rath et al. 1957*).

Trotz zahlreicher Untersuchungen zum Thema sind die Ursachen dieser erhöhten Blutungsneigung immer noch nicht restlos aufgeklärt. Es ist mittlerweile jedoch allgemein anerkannt, dass die urämische Koagulopathie im Wesentlichen eine Thrombozytopathie ist. Aber auch andere Faktoren spielen beim Zustandekommen der urämischen Blutungsneigung eine Rolle (*Hörl 2006*). Einige Arbeitsgruppen fanden Hinweise auf eine veränderte Fibrinclotstruktur bei urämischen Patienten (*Klingemann et al. 1980, Sjøland et al. 2007*). Deren Bedeutung für die urämische Koagulopathie ist jedoch noch weitgehend unklar.

Diese Arbeit legt deshalb einen besonderen Schwerpunkt auf die Untersuchung der Stabilität des unter erhöhten Harnstoffkonzentrationen oder in Anwesenheit weiterer Urämietoxine gebildeten Fibrinclots.

1.4.1. Die klinische Symptomatik der urämischen Koagulopathie

Die klinischen Manifestationen der urämischen Koagulopathie sind vielfältig: bei operativen Eingriffen, Gefäßpunktionen und zahnärztlichen Behandlungen muss mit einer erhöhten Rate an Blutungskomplikationen gerechnet werden. Ekchymosen, Epistaxis, gastrointestinale, intrakranielle, retroperitoneale, intraokulare und verschiedene andere Blutungen wurden beschrieben. Im Rahmen der Urämie kann ebenfalls eine hämorrhagische Pleuritis oder Perikarditis auftreten. Uterine Blutungen sind möglich (*Boccardo et al. 2004*).

Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz haben paradoxerweise auch eine erhöhte Thromboseneigung. Besondere klinische Bedeutung hat hierbei die Komplikation der Shuntthrombose (*siehe Hörl 2006*).

1.4.2. Die Pathophysiologie der urämischen Koagulopathie

Sowohl die laborchemisch bei Urämikern erfassten Befunde als auch bei In-vitro-Experimenten gewonnenen Ergebnisse zeigen, dass es sich bei der urämischen Blutungsneigung um ein sehr komplexes Geschehen mit vielen Ursachen handelt. Eine umfassende Übersicht gibt hierzu *Walter H. Hörl 2006* in der Wiener Klinischen Wochenschrift in seiner Arbeit „*Thrombozytopathie und Blutungskomplikationen bei Urämie*“.

1.4.2.1. Thrombozytenbezogene Veränderungen bei Urämie

Thrombozytenbezogene Veränderungen scheinen eine Schlüsselrolle beim Zustandekommen der urämiebedingten Koagulopathie zu spielen.

Diese Veränderungen der Thrombozytenfunktion und ihre möglichen pathophysiologischen Ursachen werden im Folgenden nur kurz erwähnt, jedoch im Kapitel **4.4.** vertiefend besprochen.

Die Thrombozytopenie des Urämikers

Die bei urämischen Patienten relativ häufige Thrombozytopenie, scheint bei Blutungen eine nur untergeordnete Rolle zu spielen, da nur selten Werte von 80000/mm³ unterschritten werden (*Hörl 2006*).

Die gestörte Thrombozytenadhäsion

Die Störungen der Thrombozytenadhärenz urämischer Patienten stehen wahrscheinlich im Zusammenhang mit einer gestörten Funktion des von Willebrand Faktors (vWF) und des seine Wirkung vermittelnden GPIIb-IIIa-Rezeptors (*Sloand et al. 1991, Mezzano et al. 1996, Casonato et al. 2001, Gralnick et al. 1988, Hörl 2006*).

Störungen der Thrombozytenaggregation

Bei urämischen Patienten wurde neben der verminderten Thrombozytenadhäsion am Subendothel auch eine verminderte Thrombozytenaggregation gefunden (*Hörl 2006*). Die möglichen Ursachen sind sehr vielfältig und werden in Kapitel **4.4.3.** ausführlicher besprochen.

1.4.2.2. Die Rolle der renalen Anämie

Eine Korrektur der renalen Anämie bewirkt durch rheologische Effekte ab einem Hämatokrit von >30% eine verbesserte Marginalisation der Thrombozyten im Blutstrom und führt damit zu einer Verbesserung der Hämostase (*Hellem et al. 1961, Livio et al. 1982, Vigano et al. 1991*) (siehe auch Kapitel **4.5.2.**).

1.4.2.3. Störungen der Kalziumhomöostase und die Rolle von cAMP

Kalziumionen sind nicht nur ein wichtiger Kofaktor für eine Reihe von Enzymen der plasmatischen Gerinnung, sie haben auch eine entscheidende Bedeutung bei der Regulation der Thrombozytenaktivierung (*Rink 1988*). Der bei urämischen Patienten typische Hyperparathyreodismus führt zu einer Reihe von Störungen in der Kalziumhomöostase, die auch die Thrombozyten betreffen (*Ware et al. 1989*) (siehe Kapitel **4.5.3.**).

1.4.2.4. Stickstoffmonoxyd als Bindeglied zwischen GBS und urämischer Thrombopathie

Eine der wenigen Substanzen, für die sich eine Korrelation zwischen ihrer Konzentration und Stärke und Häufigkeit urämischer Blutungskomplikationen darstellen lässt, ist das Stickstoffmonoxid NO. Es existiert eine Vielzahl von Befunden, die auf eine entscheidende Rolle von NO beim Zustandekommen der urämischen Thrombozytopathie hinweisen. Das Verdienst, den Zusammenhang zwischen erhöhten Harnstoffkonzentrationen in der Urämie, den daraus resultierenden erhöhten GBS-Konzentrationen im Blut urämischer Patienten und der die Thrombozytenfunktion beeinträchtigenden verstärkten NO-Synthese aufgezeigt zu haben, gebührt Marina NORIS und Giuseppe REMUZZI (*1999*). Ihre Arbeit und die ihren Schlussfolgerungen zugrundeliegenden Befunde sind Gegenstand der Diskussion (Kapitel **4.4.4.**).

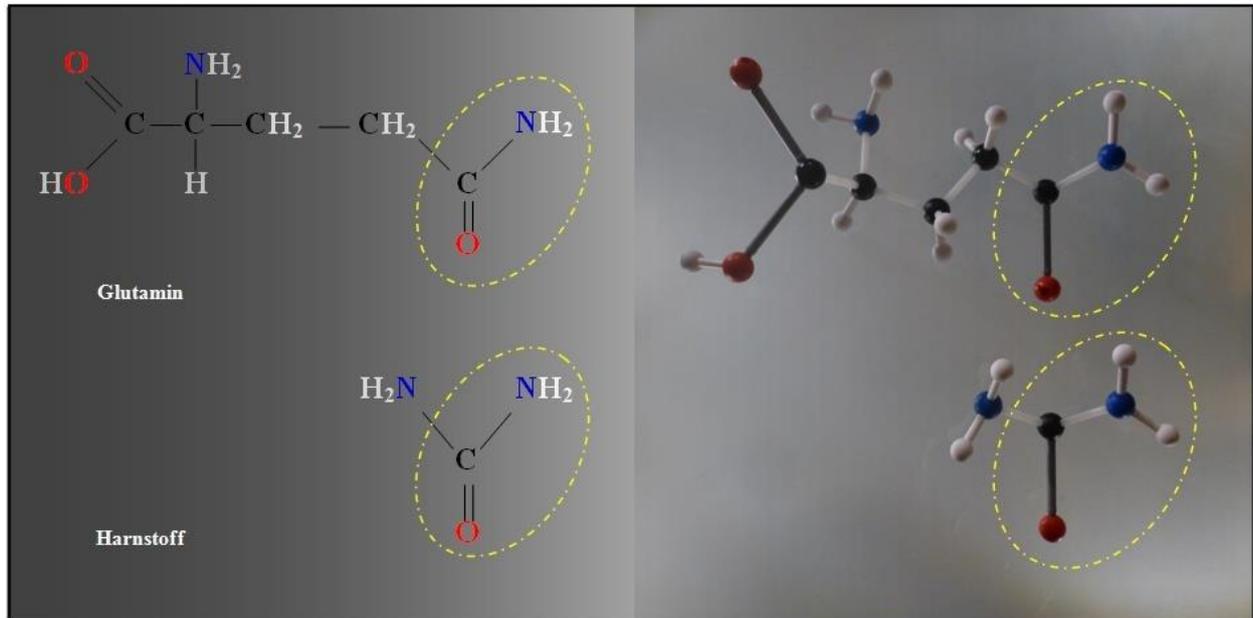
1.4.2.5. Die Fibrinpolymerisation im urämischen Plasma

Auch wenn die urämische Koagulopathie seit langem schon im Wesentlichen als eine sekundäre Thrombozytopathie angesehen wird, wurden auch urämiebedingte Störungen der Fibrinpolymerisation diskutiert:

Elektrophoretische Untersuchungen an Fibrin von Patienten mit chronischer Leber- oder Niereninsuffizienz, welche von KLINGEMANN, EGBRING und HAVEMANN Ende der siebziger Jahre durchgeführt wurden (*Klingemann et al. 1980*), legen nahe, dass auch eine veränderte Fibrinstruktur für die urämische Koagulopathie mitverantwortlich sein könnte. Die Veränderungen der Fibrinstruktur konnte bei den Zirrhosepatienten gut durch ein Faktor XIII-Defizit erklärt werden. Bei den niereninsuffizienten Patienten wurden jedoch normale Faktor XIII-Konzentrationen gefunden. KLINGEMANN et al. vermuteten, dass die hier beobachteten Fibrinvernetzungsstörungen auf die Wirkung des dem Glutamin strukturell ähnlichen Harnstoffs

(siehe **Abb. 1.7.**) als Falschsubstrat der Transglutaminase Faktor XIII zurückzuführen sein könnten. Diese Annahme wurde durch die Tatsache gestützt, dass C¹⁴-markierter Harnstoff während der Gerinnung in Fibrin eingebaut wurde. Es wurden jedoch keine weiteren Arbeiten gefunden, die diesen Ansatz weiterverfolgt hätten.

Abb. 1.7.: Strukturelle Ähnlichkeit von Glutamin und dem Diamin Harnstoff (*eigene Bildgestaltung*).



Eine veränderte Struktur des im Plasma von urämischen Patienten gebildeten Fibrinclots wurde auch von SJÖLAND et al. (2007) gefunden, allerdings ohne direkte Korrelation zu den Parametern der Stickstoffretention. Diese Befunde werden in Kapitel 4.2.1. noch ausführlicher diskutiert.

1.5. Die Aufgabenstellung der vorzustellenden Studie

1.5.1. Die Untersuchung des Einflusses ausgewählter Urämietoxine auf die Fibrinpolymerisation und Thrombozytenaggregation mittels ROTEM und PFA-100

Da mit der Entwicklung der auf dem Prinzip der von HARTERT 1948 vorgestellten Thrombelastometrie (TEG) beruhenden Rotationsthrombelastometrie (ROTEM) durch Andreas CALATZIS und Pablo FRITZSCHE in den 90er Jahren (*Calatzis et al 1996 a, b, c*) eine zuverlässige Methode zur Untersuchung der Fibrinpolymerisation und Clotstabilität zur Verfügung stand, lag es nahe, diese Technik zur Untersuchung des Einflusses erhöhter Harnstoffkonzentration auf die Bildung und Stabilität von Fibrinclots zu verwenden. Ein wesentlicher Vorteil dieser Methode besteht in der Tatsache, dass die Untersuchung der Clotformation im Vollblut erfolgt. Die Rolle der Thrombozyten bei der Initiation der Gerinnungsvorgänge und der schließlich hieraus resultierenden Fibrinpolymerisation bleibt demnach nicht unberücksichtigt. Die Grundlage nachfolgend im Detail vorgestellter Studie war die Idee, in Blutproben gesunder Probanden eine isolierte Erhöhung der Plasmakonzentration von Harnstoff und weiterer Urämietoxine wie Kreatinin und Guanidinbernsteinsäure (GBS) zu erzeugen, um deren eventuellen spezifischen Effekt auf die Fibrinpolymerisation untersuchen zu können. Wegen der bekannten Bedeutung der Thrombozyten bei der Entstehung der urämischen Koagulopathie wurde zusätzlich zum ROTEM ein empfindlicher Suchtest für Thrombozytenaggregationsstörungen, der PFA-100-Epinephrintest zum Einsatz gebracht. Ergänzt wurden die Untersuchungen durch die klassischen Globaltests der Gerinnung (aPTT, Thromboplastinzeit nach Quick) und die Bestimmung der Fibrinogenkonzentration.

Harnstoff und GBS sind die zwei in dieser Studie untersuchten Substanzen, die in der Literatur, wie zuvor besprochen, in der einen oder anderen Weise mit dem Zustandekommen der urämischen Koagulopathie in Verbindung gebracht wurden. Als Kontrollsubstanz wurde erstens Kreatinin, der in der klinischen Praxis am häufigsten verwendete Marker einer gestörten renalen Funktion, gewählt. Erhöhte Kreatininkonzentrationen werden im Gegensatz zu den anderen beiden zitierten Substanzen bislang nicht als ursächlich für das Zustandekommen von Gerinnungsstörungen angesehen. Als zusätzliche Kontrollsubstanz wurde Glukose gewählt. Die bei entgleistem Diabetes mellitus zuweilen anzutreffenden Blutglukosekonzentrationen ähneln nach eigener klinischer Erfahrung und Literaturangaben in ihrer Größenordnung den

Harnstoffkonzentrationen beim Urämiker (*Referenzbereiche siehe Guder in Greiling u. Gressner 1989: 581, Kruse-Jarres et al. in Greiling u. Gressner 1989: 196, siehe auch Vanholder et al. 2003, Joint British Diabetes Societies Inpatient Care Group 2012*). Der Vergleich der Auswirkung auf das Gerinnungssystem einer künstlich erhöhten Blutglukosekonzentration mit einer identisch erhöhten Harnstoffkonzentration sollte zudem eine Aussage darüber erlauben, ob eine erhöhte Blutosmolarität die Initiation der plasmatischen Gerinnung und die Fibrinpolymerisation beeinflussen kann.

1.5.2. Fragestellungen

Zusammenfassend sollen die vorzustellende Studie und Diskussion folgende Fragen beantworten:

1. Beeinflussen erhöhte Harnstoff- oder GBS-Konzentrationen im ROTEM die Fibrinpolymerisation? Gibt es unter erhöhten Harnstoff- oder GBS-Konzentrationen relevante Veränderungen in der Geschwindigkeit der Clotformation, in der maximalen Clotfestigkeit und in der Stabilität des Clots (Lyseanfälligkeit)?
2. Sind eventuell zu beobachtende Veränderungen auf einen osmotisch bedingten Effekt zurückzuführen?
3. Beeinflussen die untersuchten Substanzen die Verschlusszeit im PFA-100-Epinephrintest?
4. Eignen sich die eingesetzten Verfahren ROTEM und der PFA-100-Epinephrintest möglicherweise zum Screening der urämischen Koagulopathie für klinische Belange?

2. Material und Methoden

2.1. Probanden und Blutentnahme

Untersucht wurden Blutproben von insgesamt 12 freiwilligen Probanden ohne auffällige Gerinnungsanamnese und schwerwiegende Allgemeinerkrankungen im Alter von 29 bis 67 Jahren, wobei 5 Probanden weiblichen und 7 Probanden männlichen Geschlechts waren. Das arithmetische Altersmittel lag bei 45,4 Jahren, der Altersmedian bei 39 Jahren.

Bei allen Probanden wurden jeweils zwei Blutentnahmen durchgeführt.

Vor der Blutentnahme wurden alle Probanden schriftlich und mündlich über Inhalt und Zielstellung der Studie informiert und über mögliche Risiken der Blutentnahme, die Freiwilligkeit der Teilnahme an der Studie sowie über den Datenschutz aufgeklärt. Dies wurde entsprechend dokumentiert und durch die Unterschrift des Probanden bestätigt. Zudem wurde bei jedem Probanden eine ausführliche Gerinnungsanamnese anhand des standardisierten *“Fragebogens zur Ermittlung eines erhöhten Blutungsrisikos”* (Koscielny et al. 2007, siehe Anhang) der Charité erhoben.

Alle erhobenen Daten wurden für die Auswertung anonymisiert. Die Originalunterlagen wurden entsprechend den geltenden Datenschutzrichtlinien im Sekretariat des Instituts für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie der Charité für die zugriffssichere Archivierung hinterlegt.

2.2. Material und Geräte

2.2.1. Verbrauchsmaterialien

- 21-G-Butterfly-Kanülen mit Adapter (Vacutainer Systems der Fa. Becton Dickinson)
- Halter für Vacutainer Systems Blood Collection Set (Fa. Becton Dickinson)
- Vacutainer Röhrchen 9NC 0,129M/4,5ml (Na-Zitrat) (Fa. Becton Dickinson) für Thrombozytenfunktionstests
- S-Monovetten 9NC 10/8,2ml und 10ml (Trinatrium-Zitrat 0,106M) (Fa. Sarstedt)
- 50 ml-Falcon-Tubes mit Schraubverschluss (Fa. Falcon)
- 10 ml-Sarstedt-Röhrchen mit Verschluss (Fa. Sarstedt)
- Diverse Standzylinder und Bechergläser aus Glas

- 2 ml Eppendorfgefäße mit Deckel (Fa. Eppendorf)
- Eppendorfpipetten (“Reference” und “Research”) variabel von 10 - 100µl, 50 - 200µl und 100 - 1000 µl (Fa. Eppendorf)
- Pipettenspitzen epTIPS gelb (2 - 200µl) und epTIPS blau (50 - 1000µl)
- Finnpipette regelbar 0,5 - 5 ml (Fa. Thermo SCIENTIFIC)
- Finntip- Pipettenspitzen (5 ml) blau
- 30 ml-Luer-LokTM-Spritze (BD-Plastipack)
- 0,22 µm Hydrophilic PES-Millipore-Filter Millex-GB
- Cups und Pins für die ROTEM-Analyse ”Cup & Pin pro” (Fa. Pentapharm)
- Spitzen für die automatische ROTEM-Pipette “TIPTRAY e-line” (10-320 µl)

2.2.2. Reagenzien und Chemikalien

Reagenzien zur Herstellung der Stammlösungen für die Testreihen

- Harnstoff p.a. (Kohlensäurediamid) (Fa. MERCK)
- Kreatinin p.a. (2-Amino-1-methylimidazolidin-4-on) (Fa. Serva)
- D(+)-Glukose Monohydrat (Fa. MERCK)
- Guanidinbersteinsäure (Fa. Sigma-Aldrich)
- isotone Natriumchloridlösung NaCl 0,9% 10-ml-Ampullen (Fa. Braun)
- Aqua ad iniectabilia 10-ml-Ampullen (Fa. Braun)

Testreagenzien für die ROTEM-Messungen

- star-TEM®-Reagenz (Fa. Pentapharm) (0,2 mol/l CaCl₂ in HEPES Puffer pH 7,4 und 0,1% Na-Azid)
- ex-TEM®-Reagenz (Fa. Pentapharm) (Thromboplastin aus Kaninchenhirn mit Konservierungsmittel, Heparin-Inhibitor und Puffer)
- fib-TEM®-Reagenz (Fa. Pentapharm) (Cytochalasin D/DMSO Lösung, 0,2 mol/l CaCl₂ in HEPES Puffer pH 7,4, Konservierungsmittel)
- Rotrol N–Kontrollreagenz (Fa. Pentapharm) (lyophilisiertes mit Natriumzitat als Antikoagulanzen gewonnenes Humanplasma)
- STA-Thrombin-Reagenz (Fa. Roche)

Reagenzien für die Thrombozytenfunktionstests

- PFA-Messzellen Kollagen/EPI mit je 210 µg Epinephrin-Bitartrat und 2 mg Kollagen Typ I (Pferd) (Fa. DADE BEHRING)

Reagenzien für die Gerinnungsanalytik

- STA-Neoplastin-Plus-Reagenz zur Bestimmung der Prothrombinzeit in Zitratplasma (Thromboplastin-Reagenz aus Kaninchenhirn und einer Kalziumchloridlösung (ca. 1,47 g/l)) (Fa. DIAGONSTCA STAGO / Roche)
- STA-aPTT-Reagenz zur Bestimmung der aktivierten partiellen Thromboplastinzeit in Zitratplasma (aus lyophilisiertem, aus Kaninchenhirngewebe gewonnenem Cephalin und Kieselerde in gepuffertem Medium) (Fa. DIAGONSTCA STAGO / Roche)
- STA-Fibrinogen-Reagenz zur Bestimmung von Fibrinogenspiegeln in Zitratplasma nach Clauss

Reagenzien für hämatologische Untersuchungen

- Cellpack-Verdünnungsreagenz (Fa. Symex)
- Sulfolyser-Reagenz zur Hb-Bestimmung (Fa. Sysmex)
- Stromatolyser-fb-Reagenz (Fa. Sysmex)

Reagenzien für klinisch-chemische Untersuchungen

- GLUC2 In vitro Test zur quantitativen Bestimmung von Glukose in Humanserum, -plasma, -liquor und -urin mit Roche/Hitachi cobas c Systemen (Fa. Roche Diagnostics)
- CA In vitro Test zur quantitativen Bestimmung von Kalzium in Humanserum, -plasma und -urin mit Roche/Hitachi cobas c Systemen (Fa. Roche Diagnostics)
- UREAL In vitro Test zur quantitativen Bestimmung von Harnstoff/Harnstickstoff in Humanserum, -plasma und -urin mit Roche/Hitachi cobas c Systemen (Fa. Roche Diagnostics)
- CREJ2 In vitro Test zur quantitativen Bestimmung der Kreatininkonzentration in Humanserum, -plasma und -urin mit Roche/Hitachi cobas c Systemen (Fa. Roche Diagnostics)

- ISE indirect Na, K, Cl for Gen.2 Modul zur quantitativen Bestimmung von Natrium, Kalium und Chlorid in Serum, Plasma und Urin mittels ionenselektiver Elektroden (Fa. Roche Diagnostics)

2.2.3. Geräte

- Wasserbad mit Temperaturregler und Umwälzpumpe (Fa. MLW und Fa. Haake)
- Zentrifuge Rotina 35 R (Fa. Hettich)
- Feinwaage Sartorius MC 1 Analytic 120S (Fa. Sartorius)
- Feinwaage Sartorius ME 235S (Fa. Sartorius)
- 4 Rotationsthrombelastometer ROTEM®delta “Whole Blood Hemostasis Analyser” zur Gerinnungsanalyse im Vollblut (Fa. Pentapharm)
- 2 PFA 100 Platelet Function Analyser (Fa. Dade Behring)
- STA-Revolution, Gerät zur automatisierten Gerinnungsanalyse (Fa. Stago)
- Sysmex XE-2100 Hämatologiesystem (Fluoreszenzdurchflusszytometer Fa. Sysmex)
- cobas c 501 Analysensystem für die klinische Chemie (Fa. Roche/Hitachi)
- OSMOMAT (“CRYOSCOPIC OSMOMETER”) (Fa. Gonotec)

2.3. Versuchsablauf der Studie

2.3.1. Ziel der Versuche und Zusammenfassung des Ablaufs

Ziel der nachfolgend beschriebenen Versuchsanordnung war die Untersuchung des Einflusses ausgewählter Urämietoxine auf die Gerinnungsfähigkeit menschlichen Blutes. Hierzu wurden die ausgewählten Substanzen jeweils zu Vollblutproben (Zitratblut) gesunder Spender gegeben (In-vitro-Untersuchung), wobei die Zielkonzentration so gewählt wurden, dass sie im Bereich der üblicherweise bei Urämiepatienten angetroffenen Konzentration lagen (siehe Kapitel 1.5.1.). Auf diese Art und Weise wurde eine isolierte Erhöhung des jeweiligen Urämietoxins simuliert. Als Kontrollgruppe diente jeweils eine mit einem äquivalenten Volumen einer physiologischen Kochsalzlösung versetzte Blutprobe (Nullwert) und zusätzlich bei der Untersuchung des Einflusses von Harnstoff eine mit einer Glukoselösung versetzte Blutprobe zum Ausschluss eventuell durch die Erhöhung der Blutosmolarität bedingter Effekte.

Bei den untersuchten Substanzen handelte es sich im Einzelnen um

- Harnstoff
- Glukose
- Kreatinin
- Guanidinbernsteinsäure (GBS)

Da die Verwendbarkeit der entnommenen Vollblutproben insbesondere für die ROTEM-Analyse zeitlich begrenzt ist (Probenstabilität 4 Stunden) und insgesamt nur 4 ROTEM® delta-Geräte für die Untersuchung der Proben zur Verfügung standen, wurden zwei zeitlich aufeinander folgende Versuchsreihen durchgeführt. Jeder der 12 Probanden gab insgesamt zweimal im Abstand von einigen Tagen eine Blutprobe ab. In der ersten Versuchsreihe wurden die Blutproben nach entsprechender Aliquotierung mit physiologischer Kochsalzlösung (Nullwert), Glukose (Kontrolle zum Harnstoff), Harnstoff oder Kreatinin in aufsteigenden Konzentrationen versetzt. Die zweite Versuchsreihe diente der Untersuchung von GBS, der Bestimmung eines neuen Nullwerts analog zur ersten Versuchsreihe und Kontrolluntersuchungen an unbehandelten und unverdünnten Proben.

An den künstlich mit o.g. Substanzen versetzten Blutproben und den als Kontrolle dienenden unbehandelten Proben wurden nachfolgend folgende Untersuchungen durchgeführt:

- ROTEM-Analyse mit: EXTEM, FIBTEM, NATEM und dem sogenannten "NATEM plus" (NATEM unter Zusatz von Thrombin als Aktivatorssubstanz)
- Globaltests der Gerinnung im Zitratplasma mit aPTT, Thromboplastinzeit (Quick) und Bestimmung der Fibrinogenkonzentration
- Blutbild mit Thrombozytenzählung
- Kollagen-Epinephrintest im PFA 100
- Bestimmung der Plasmakonzentrationen von Harnstoff, Kreatinin und Glukose
- Bestimmung der Plasmaosmolarität

2.3.2. Stammlösungen der zu untersuchenden Urämietoxine

Um den Einfluss der isolierten Erhöhung ausgewählter Urämietoxine auf das Gerinnungssystem untersuchen zu können, war es zunächst erforderlich, die besagten Substanzen in Lösung zu bringen, um sie dann den Blutproben beimischen zu können. Um eine zu starke Verdünnung der Blutproben durch die Zugabe der Urämietoxine bzw. Kontrollsubstanz zu vermeiden, wurden die Stammlösungen auf die zehnfache Konzentration der maximalen Zielkonzentration eingestellt, d.h. dem Zitratblut sollten besagte Stammlösungen jeweils im Verhältnis 1:10 (1 Teil Stammlösung auf 9 Teile Zitratblut) beigemischt werden. Die Nullwertproben sollten dementsprechend nur mit physiologischer Kochsalzlösung im gleichen Verhältnis verdünnt werden. Die aus diesem Vorgehen resultierende moderate Verdünnung der Blutproben wurde auch unter dem Aspekt in Kauf genommen, dass niereninsuffiziente Patienten häufig eine Anämie aufweisen (siehe Kapitel **1.4.2.2.**).

Die Zielkonzentration der Urämietoxine orientierte sich an praktischen Gesichtspunkten der Versuchsplanung und an den im Blut urämischer bzw. diabetischer (für die Kontrollsubstanz Glukose) Patienten angetroffenen Werten (*Referenzbereiche siehe Guder in Greiling u. Gressner 1989: 581, Kruse-Jarres et al. in Greiling u. Gressner 1989: 196, siehe auch Vanholder et al. 2003 und Joint British Diabetes Societies Inpatient Care Group 2012*).

Aus Gründen der Praktikabilität wurde entschieden, die Blutproben verschiedener Probanden nicht auf eine einheitliche Endkonzentration für die jeweilige Testsubstanz einzustellen, sondern den im Normalbereich liegenden Ausgangswert durch die Zugabe einer fixen Menge der zu untersuchenden Substanz um einen einheitlichen Wert zu erhöhen. Dies schien zum einen dadurch gerechtfertigt, dass die maximalen Zielkonzentrationen für Harnstoff, Glukose und Kreatinin die oberen Normwerte in etwa um den Faktor Zehn übertrafen und zum anderen dadurch, dass die für jede Probe resultierende Konzentration der zu untersuchenden Substanz nachfolgend gemessen werden konnte. Guanidinbernsteinsäure (GBS) ist in der Regel nicht in relevanten Konzentrationen im Blut gesunder Probanden nachweisbar, so dass auf eine gesonderte Bestimmung der GBS-Konzentration in den Proben verzichtet wurde. Für die Auswertung wurde die berechnete GBS-Konzentration zugrunde gelegt.

Tab. 2.1.: Stammlösungen der zu testenden Substanzen.

Substanz	Max. Zielkonzentration nach Verdünnung im Blut	Konz. Stammlösg. mmol/l	Konz. Stammlösg. mg/l	Einwaage/Volumen mg/ x ml NaCl 0.9%
Harnstoff	50 mmol/l über Ausgangswert	500	3005	601 mg/20 ml
Glukose	50 mmol/l über Ausgangswert	500	9010	1981 mg/20 ml*
Kreatinin	900 µmol/l über Ausgangswert	9	102	102 mg/100 ml
GBS	50 mg/l	2,86	500 mg/l	8 mg/ 16 ml

(*Bei der Einwaage von Glukose musste beachtet werden, dass es sich bei der Ausgangssubstanz um D(+)-Glukose Monohydrat handelte, das mit einer molaren Masse von 198,17 g/mol geringfügig schwerer ist als reine Glukose (180,1581 g/mol).)

Die Testsubstanzen wurden nachfolgend in physiologischer Kochsalzlösung in Lösung gebracht und auf die in obenstehender Tabelle genannte Konzentration eingestellt. Die GBS-Stammlösung wurde zusätzlich über einen Millipore-Filter filtriert. Die Stammlösungen wurden in sterile 10 ml-Sarstedt-Röhrchen abgefüllt und bis zur Verwendung bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt.

2.3.3. Blutentnahme

Die zweimalige Entnahme von Blut für die nachfolgenden In-vitro-Untersuchungen an 12 freiwilligen Probanden erfolgte unter strikter Beachtung der Hygieneregeln (vorherige zweimalige Hautdesinfektion mit alkoholischer Hautdesinfektionslösung Softasept N [Fa. Braun], Tragen von Schutzhandschuhen). Unmittelbar nach Anlegen eines Staubandes wurde eine Cubitalvene mit einer 21-G-Butterfly-Kanüle punktiert. Die Blutabnahme erfolgte mittels Vacutainer Röhrchen 9NC 0,129M 4,5ml (Na-Zitrat) (Fa. Becton Dickinson) für die Thrombozytenfunktionstest, bzw. mittels Sarstedt-S-Monovetten 9NC 10/8,2 ml (Trinatrium-Zitrat 0,106M) (Fa. Sarstedt) für die übrigen Tests. Um eine homogene Durchmischung des Blutes mit dem Na-Zitrat zu gewährleisten, wurden die Röhrchen fünf Mal über Kopf geschwenkt. Insgesamt wurden in der Regel pro Proband und Testreihe max. 59 ml Zitratblut (1:10) (entsprechend max. 53 ml Nativblut) gewonnen, davon jeweils 9 ml für den Thrombozytenfunktionstest.

2.3.4. Exposition der Blutproben

Nach Entnahme wurde das Blut aus den Sarstedt-Zitrat-Monovetten in einen 50-ml-Falcontube überführt, mittels einer 5-ml-Pipette vorsichtig durchmischt und für die nachfolgenden Tests aliquotiert. Zu jeweils 5,4 ml Zitratblut wurden 0,6 ml Stammlösung der Testsubstanz für die gewünschte Maximalkonzentration bzw. 0,3 ml Stammlösung und 0,3 ml physiologische Kochsalzlösung für die halbmaximale Konzentration bzw. 0,6 ml physiologische Kochsalzlösung für den Nullwert zu pipettiert. Das Zitratblut wurde also im Verhältnis 1:10 verdünnt. Nach vorsichtigem Durchmischen der Proben ruhten diese bei Raumtemperatur 20 min. Am Ende der Expositionszeit wurden die Proben erneut durch vorsichtiges Schwenken gemischt und wie nachfolgend beschrieben analysiert.

2.3.5. Durchgeführte Analysen

Nach der 20-minütigen Exposition der Blutproben mit der jeweiligen Testsubstanz in maximaler und halbmaximaler Konzentration wurden an dieser unverzüglich folgende Analysen durchgeführt:

- ROTEM-Analyse mit EXTEM, FIBTEM, NATEM und sog. "NATEM plus"
- Thrombozytenfunktionstest im PFA 100 (Kollagen/EPI)
- Blutbild mit Thrombozytenzählung

Nach Zentrifugation des restlichen Blutes für 10 min bei 4000 U/min wurde der Überstand (Plasma) abpipettiert und zunächst bei -80°C eingefroren. Nach Abschluss der beiden Versuchsreihen, wurden das Plasma im Wasserbad bei 37°C wieder aufgetaut, um nachfolgend folgende Analysen durchzuführen:

- Globaltests der Gerinnung: aPTT, Thromboplastinzeit nach Quick, Fibrinogen
- Bestimmung der Plasmakonzentrationen von Harnstoff, Kreatinin, Glukose
- Plasmaosmolarität

Aufgrund der begrenzten Menge zur Verfügung stehenden Blutes wurde jeder Parameter pro Probe nur einmal gemessen.

2.4. Beschreibung der Messmethoden

2.4.1. Rotationsthrombelastometrie (ROTEM®)

Im Unterschied zur den klassischen Globaltests der Gerinnung (Thromboplastinzeit nach Quick, aPTT) erfolgt die Untersuchung der Blutgerinnung bei der Rotationsthrombelastometrie nicht im Plasma, sondern im Vollblut, d.h. in Anwesenheit der zellulären Blutbestandteile. Die für den Ablauf der Blutgerinnung wichtige Interaktion zwischen Thrombozyten, Erythrozyten und plasmatischen Gerinnungsfaktoren bleibt also nicht unberücksichtigt. Des Weiteren erlaubt die Rotationsthrombelastometrie im Gegensatz zu den o.g. genannten Globaltests auch eine Beurteilung der Dynamik der Bildung des Thrombus sowie von dessen Qualität und Stabilität.

Für die Messung werden 300 µl einer auf 37°C erwärmten Zitratblutprobe in eine Küvette pipettiert. Danach erfolgt die Rekalzifizierung (star-TEM®-Reagenz) des Zitratblutes sowie je nach Test die Zugabe einer spezifischen Aktivatorsubstanz (ex-TEM®, in-TEM®, fib-TEM®, ap-TEM®, hep-TEM®). Nach Aufsetzen des Küvettenhalters auf den gewünschten Kanal taucht nun ein zylindrischer Stempel senkrecht in die Küvette ein, so dass zwischen der Wand der Küvette und dem Stempel nur noch ein ca. 1 mm breiter mit Blut gefüllter Spalt verbleibt. Der Stempel führt eine oszillierende Drehbewegung aus. Diese Drehbewegung des Stempels wird über ein optisches System aufgezeichnet. Mit Einsetzen der Blutgerinnung wird die oszillierende Bewegung des Stempels durch das sich bildende Gerinnsel gehemmt (siehe **Abb. 2.1.**). Die Hemmung der Drehbewegung ist proportional zur Festigkeit des Gerinnsels. Aus den gewonnen Bewegungsdaten des Stempels werden die ROTEM®-Kurve sowie deren Parameter berechnet.

Die Darstellung der Kurve in der in **Abb. 2.3.** gezeigten Form geht auf das historische Thrombelastogramm nach HARTERT zurück (*Calatzis et al. 1996 a-c, Hartert 1948, Calatzis et al 2013*).

Abb. 2.1.: ROTEM®-Detektionsmethode (nach Calatzis et al. 2013).

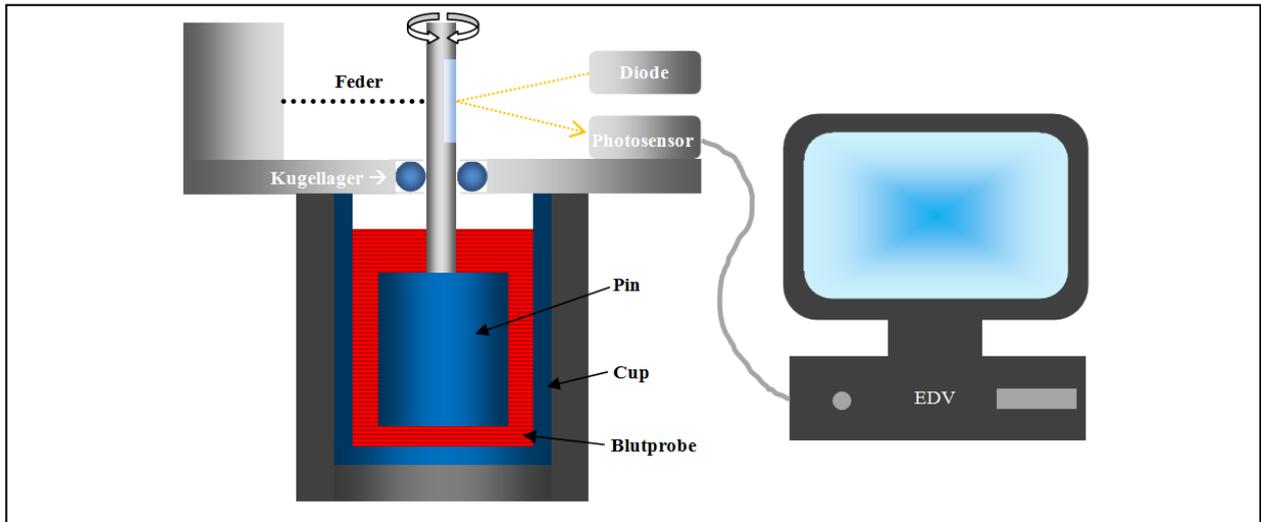


Abb. 2.2.: ROTEM®-Arbeitsplatz (eigenes Foto).

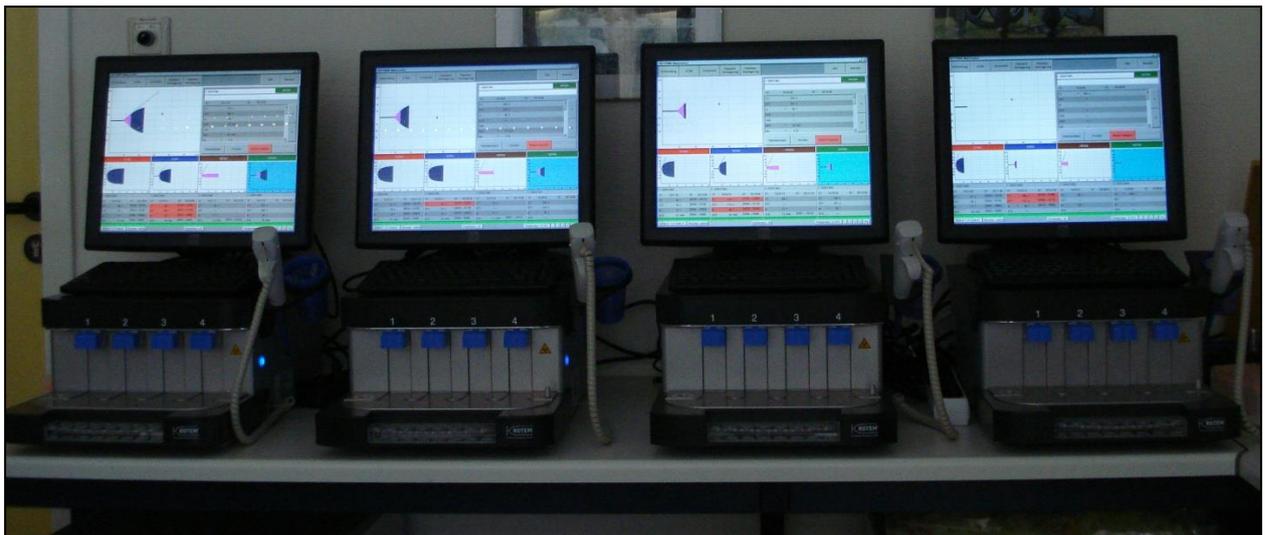
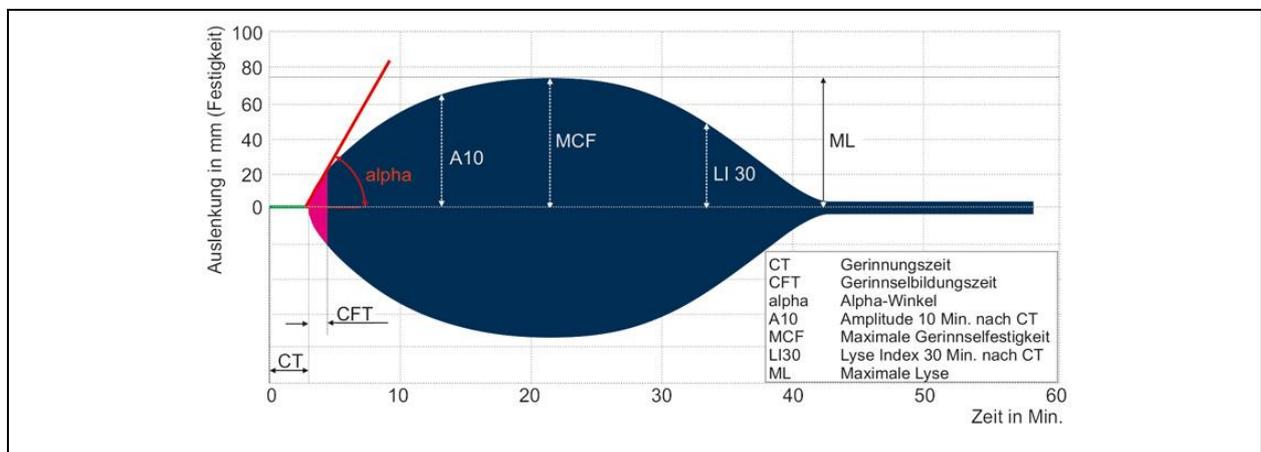


Abb. 2.3.: ROTEM®-Kurve (aus Calatzis et al 2013).



Die in dieser Arbeit untersuchten Parameter der ROTEM®-Analyse sind:

- **CT**, die **Clotting Time**, die Zeit vom Beginn der Messung (letzte Zugabe eines Reagenz) bis zum Beginn einer signifikanten Gerinnungsbildung, in der Praxis entspricht dies einer Amplitude von 2 mm im Thrombelastogramm;
- **CFT**, die **Clot Formation Time**, die Zeit, die das Gerinnsel (der Clot) benötigt, um eine Festigkeit von 20 mm zu erreichen;
- **alpha-Winkel**: Winkel zwischen der horizontalen Mittellinie und einer durch einem der CT entsprechendem Punkt auf der Mittellinie gehenden Tangente an die Kurve (gibt über die Dynamik der Clotbildung Auskunft);
- **MCF**, die **Maximum Clot Firmness**, die maximale Festigkeit des Gerinnsels; diese entspricht der maximalen Hemmung der Rotationsbewegung des Stempels;
- **MCF-t**, Zeit bis zum Erreichen der MCF;
- **LI45**, der **Lysis Index**, gibt die Festigkeit des Gerinnsels 45 min nach Einsetzen der Gerinnung und in Prozent der MCF an;
- **ML**, die **Maximum Lysis**, die Ausprägung der Gerinnsel-Lyse in Prozent der MCF, diese sollte weniger als 15 % innerhalb der ersten Stunde betragen (*Calatzis et al. 2013*).

Für die hier zu beschreibende Studie kamen folgende ROTEM®-Tests zum Einsatz:

- **EXTEM**: Die Aktivierung der Gerinnung erfolgt nach Rekalzifizierung der Probe durch 20 µl star-TEM®-Reagenz durch die Zugabe von Gewebsthromboplastin (tissue factor) aus Kaninchenhirn (20 µl ex-TEM®-Reagenz). Dies entspricht dem extrinsischen Aktivierungsweg mit den Faktoren VII, X, V, II, I.
- **FIBTEM**: Die Aktivierung der Gerinnung erfolgt nach Rekalzifizierung der Probe durch 20 µl star-TEM®-Reagenz durch die Zugabe von Gewebsthromboplastin (tissue factor) aus Kaninchenhirn welchem zusätzlich Cytochalsin D beigemischt ist (20 µl fib-TEM®-Reagenz). Dies entspricht wie beim EXTEM dem extrinsischen Aktivierungsweg, wobei allerdings hier die Thrombozyten durch den Thrombozyteninhibitor Cytochalsin D inhibiert sind. Die Fibrinpolymerisation läuft also von den Thrombozyten unbeeinflusst ab. Der Vergleich mit dem EXTEM ermöglicht so eine Aussage zum Beitrag der Thrombozyten zur Clotfestigkeit (*Calatzis et al. 2013*).

- **NATEM:** Hier erfolgt nach Rekalzifizierung mit 20 µl star-TEM-Reagenz lediglich eine Kontaktaktivierung an der Oberfläche von Küvette und Stempel.
- **"NATEM-plus":** Um die den Einfluss der zu untersuchenden Urämietoxine bzw. Kontrollsubstanzen auf die Fibrinpolymerisation unabhängig vom Plasmaspiegel der übrigen Gerinnungsfaktoren untersuchen zu können, wurde auf Anregung von Frau Dr. Ziemer dem rekalzifiziertem Blut anstelle eines ex- oder intrinsischen Aktivators 20 µl verdünntes Thrombinreagenz (= 0,0075 NIH) zugegeben. Dadurch lief die Fibrinpolymerisation unter einem Thrombinüberschuss ab. Die günstigste Verdünnung (in physiologischer Kochsalzlösung) für das Thrombinreagenz wurde in einer vorherigen Testreihe an Blut eines freiwilligen Spenders ermittelt. Die Durchführung des „NATEM-plus“-Tests am ROTEM®-Gerät entsprach im Algorithmus einem EXTEM-Test.

2.4.2. Globaltests der Gerinnung

Nach Zentrifugation der Proben wie oben beschrieben, wurde das Plasma bei -80°C eingefroren, um dann zu einem späteren Zeitpunkt bei 37 °C im Wasserbad wieder aufgetaut zu werden. Die Durchführung der klassischen Globaltests konnte so für alle Proben zeitlich zusammengefasst werden.

An den Plasmaproben wurden jeweils folgende Untersuchungen durchgeführt:

- Bestimmung der Thromboplastin-/ Prothrombinzeit (Quick-Test)
- Bestimmung der aktivierten partiellen Thromboplastinzeit (aPTT)
- Bestimmung der Fibrinogenkonzentration.

Die Bestimmung erfolgte jeweils auf einem automatisierten System der Firma STAGO vom Typ STA-Revolution.

2.4.2.1. Die Thromboplastinzeit nach QUICK (Quicktest)

Der Quicktest beruht auf einer Aktivierung des sog. extrinsischen Weges der plasmatischen Gerinnung durch die Zugabe von Kalziumionen und Gewebethromboplastin (hier STA Neoplastin Plus) zu Zitratplasma. Erfasst wird mit hoher Empfindlichkeit die Aktivität der

Faktoren VII, X und II sowie mit geringerer Empfindlichkeit die des Faktors V und des Substrats Fibrinogen (*Quick et al. 1935, Witt et al. 1996, Barthels und Depka 2003: 317-30*).

Die Bestimmung des Thromboplastinzeit (Quick) erfolgte auf einem automatisierten System der Firma STAGO vom Typ STA-Revolution

Der Quickwert (in %) wird durch den Vergleich des aktuellen Messwertes mit den Werten einer über die schrittweise Verdünnung eines Plasmapools gewonnenen Bezugskurve ermittelt. Dieser Plasmapool enthält das Plasma von mindestens 40 sogenannten Normal Spendern. Die Thromboplastinzeit des unverdünnten Plasmapools entspricht 100%. Durch die zunehmende Verdünnung des Normalplasmas mit physiologischer Kochsalzlösung wird die Thromboplastinzeit entsprechend verlängert. Durch Zuordnung der Verdünnung zur jeweiligen Gerinnungsaktivität ergibt sich dann die o.g. Bezugskurve (*Barthels und Depka 2003: 320*).

2.4.2.2. Die aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT)

Die aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT) erfasst im Gegensatz zum Quicktest (extrinsisches System) die Faktoren des sogenannten intrinsischen Aktivierungsweges: XII, XI, VIII und IX, das Präkallikrein und das High Molecular Weight Kininogen (HMWK/Fitzgeraldfaktor) und überlappend zum Quicktest die Faktoren X, V, II (Prothrombin) sowie das Fibrinogen. Die Aktivierung der Gerinnung erfolgt bei der aPTT durch Zugabe eines Oberflächenaktivators mit negativer Oberfläche, (wie z.B. Kaolin, Kieselgur oder Elagsäure), von Phospholipiden und Kalziumionen. Gemessen wird die Zeit (in s) von der Zugabe der Kalziumionen bis zur fassbaren Bildung von Fibringerinnseln. (*Proctor und Rapaport 1961, Köhler 1995, Barthels und Depka 2003: 330-348*).

Für die hier vorgestellte Studie erfolgte die Messung der aPTT wie des Quick-Wertes nach der Kugelmethode auf einem automatisierten Analysesystem STA-Revolution unter Verwendung des STA-aPTT-Reagenzes (Lyophilisiertes, aus Kaninchenhirn gewonnenes Cephalin mit Partialaktivator (Kieselerde) in gepuffertem Medium), welches nach Herstellerangaben in Aqua dest. rekonstituiert wurde.

2.4.2.3. Die Bestimmung des Fibrinogengehalts im Plasma

Die Bestimmung des Fibrinogengehaltes erfolgte nach der Methode von CLAUSS (*Clauss 1957, Barthels und Depka 2003: 390*). Der Test beruht auf der Tatsache, dass die Gerinnungszeit eines verdünnten Plasmas (bei Fibrinogen-Zielkonzentration von 0,1-0,4 g/l) in Gegenwart eines

Thrombinüberschusses umgekehrt proportional zur Fibrinkonzentration ist. Das verwendete STA-Fibrinogen-Reagenz (lyophilisiertes Humanthrombin mind. 70 NIH-Einheiten unter Zusatz eines Heparininhibitors) wurde nach Herstellerangaben in Aqua dest. rekonstituiert. Die Verdünnung des Zitratplasmas erfolgte automatisch mit STA-Diluent-Buffer durch das verwendete automatisierte Analysegerät STA-Revolution.

2.4.3. Untersuchung der Thrombozytenfunktion

Als Suchtest für eventuell durch die Zugabe der ausgewählten Urämietoxine ausgelöste Thrombozytenfunktionsstörungen wurde der Kollagen-Epinephrin-Test des PFA-100-Systems ausgewählt. Der Test simuliert in vitro den Prozess der Thrombozytenadhäsion und -aggregation nach einer Gefäßverletzung. Die Einmalmesszelle des Systems besteht u.a. aus einer Kapillare und einer biologisch aktiven Membran mit einer zentralen Öffnung. Diese Membran ist mit Kollagen und einer thrombozytenaktivierenden Substanz (hier Epinephrin) beschichtet. Das zu untersuchende Blut wird während des Messvorganges durch die Kapillare und schließlich durch die Öffnung in der Membran gepresst. Hierbei sind die Thrombozyten hohen Scherkräften ausgesetzt. An der kollagenbeschichteten Membran kommt es zunächst zur Thrombozytenadhäsion und dann durch den Kontakt mit dem Thrombozytenaktivator Epinephrin zur Freisetzung des Inhalts der Thrombozytengranula. Dies führt zur Aggregation der Thrombozyten und somit zum Verschluss der Kapillare durch den sich bildenden Thrombozytenpfropf. Das PFA-100-System misst den Blutfluss in der Kapillare und gibt die Zeit vom Beginn des Tests bis zum vollständigen Verschluss der Kapillare als sog. Verschlusszeit an. Eine Verlängerung der Verschlusszeit im Kollagen-Epinephrin-Test über die Normwerte zeigt eine Thrombozytenfunktionsstörung an (*Fressinaud et al. 1998, Mammen et al. 1998, Fressinaud et al. 1999, Domsch et al 1999, Kretschmer et al. 2003, Barthels und Depka 2003: 616-619*).

Die Aufbereitung der Proben erfolgte analog zu der für die ROTEM-Untersuchungen beschriebenen Vorgehensweise, d.h. den Proben wurden nach Aliquotierung die zu untersuchenden Substanzen (Urämietoxine und Kontrollsubstanzen) im gleichen Verhältnis wie oben beschrieben beigemischt. Nach einer Exposition von 20 min bei Raumtemperatur erfolgte die Messung mit dem PFA-100-System. Aufgrund der begrenzten Menge zur Verfügung stehenden Blutes wurde jede Probe nur einmal gemessen. Eine zweite Bestimmung erfolgte nur in Einzelfällen, bei Störungen im Messablauf.



Abb. 2.4.: Die für die Studie verwendeten PFA-100-Messgeräte.

2.4.4. Hämatologische Untersuchungen

Von allen Proben wurde parallel zur ROTEM-Analyse auf einem automatisierten Hämatologiesystem vom Typ XE-2100 der Fa. Sysmex ein Blutbild angefertigt.

Die Untersuchung umfasste folgende Parameter:

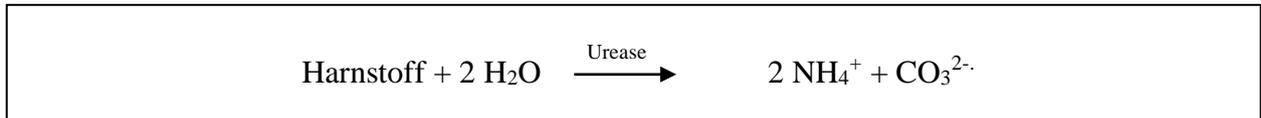
- Hämoglobingehalt (Hb)
- Erythrozytenzahl (RBC)
- Hämatokrit (Hkt)
- mittleres korpuskuläres Hämoglobingewicht (MCH)
- mittlere korpuskuläre Hämoglobinkonzentration (MCHC)
- mittleres korpuskuläres Volumen (MCV)
- Verteilungsbreite der Erythrozyten, Red Cell Distribution Width (RDW)
- Thrombozytenzahl (PLT)
- mittleres Plättchenvolumen (MPV)
- Leukozytenzahl (WBC)

2.4.5. Biochemische Untersuchungen am Plasma

Alle biochemischen Untersuchungen am Plasma erfolgten am Analysesystem cobas c 501 der Fa. Roche/Hitachi. Die für die Analyse wie oben beschrieben gewonnenen und rückgestellten Plasmaproben wurden nach dem Auftauen im Wasserbad in Eppendorfgefäße umpipettiert, mit welchen dann das Analysesystem beschickt wurde. Die Analyse erfolgte dann vollautomatisch.

2.4.5.1. Bestimmung der Harnstoffkonzentration im Plasma

Die Harnstoffkonzentration wird auf dem cobas-c-System mittels eines kinetisch-enzymatischen Tests bestimmt: Hierbei wird der Harnstoff zunächst durch das Enzym Urease zu Ammonium und Carbonat hydrolysiert:



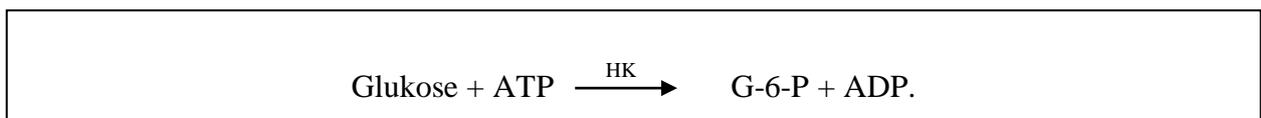
Das entstehende Ammonium reagiert dann mit 2-Oxoglutarat in Anwesenheit von Glutamatdehydrogenase (GLDH) und dem Coenzym NADH zu L-Glutamat. Dabei werden für jedes hydrolysierte Mol Harnstoff 2 Mol NADH zu NAD⁺ oxidiert. Die der Harnstoffkonzentration proportionale Geschwindigkeit der Abnahme der NADH-Konzentration wird photometrisch gemessen (*Talke u. Schubert 1965, Guder 1989b*).

2.4.5.2. Bestimmung der Kreatininkonzentration im Plasma

Grundlage der Bestimmung der Kreatininkonzentration im Plasma und Urin im Cobas-c-Systeme-CREJ2-Test ist die sogenannte Jaffé-Reaktion ohne Deproteinisierung. Hierbei reagiert Kreatinin mit Pikrat unter Bildung eines gelbroten Addukts. Die Geschwindigkeit der Bildung dieses Komplexes ist direkt proportional zur Kreatininkonzentration in der Probe und kann photometrisch bestimmt werden. Da Serum- und Plasmaproben Proteine enthalten, welche bei der Jaffé-Methode unspezifisch reagieren, erfolgt eine automatische Korrektur. (*Guderet al. 1986, Narayanan 1980, Spencer 1986, Guder 1989c*).

2.4.5.3. Bestimmung der Glukosekonzentration im Plasma

Grundlage des Tests GLUC2 ist laut der Cobas-c-Systeme-GLUC2-Produktinformation eine enzymatische Reaktion unter Verwendung von Hexokinase und Glukose-6-phosphatdehydrogenase. Hexokinase katalysiert die Phosphorylierung von Glukose durch ATP zu Glukose-6-phosphat:



Glukose-6-phosphatdehydrogenase katalysiert in Anwesenheit von NADP die Umwandlung von Glukose-6-phosphat zu Gluconat-6-phosphat. Bei dieser Reaktion wird NADPH gebildet, dessen Bildungsgeschwindigkeit direkt proportional zur Glukosekonzentration ist und photometrisch gemessen werden kann (*Burrin und Price 1985, Kruse-Jarres 1989*):



2.5. Statistische Auswertung der Daten

Die gewonnenen Messwerte wurden mittels des Shapiro-Wilk Tests auf Ihre Normalverteilung untersucht (*Shapiro und Wilk 1965, Harms 1992a, Dittami 2009*). Für alle Probengruppen wurden mittels einer EXCEL-Tabelle der Mittelwert, der Median und die Standardabweichung bestimmt. Die statistische Signifikanz eventueller Abweichungen der Messwerte der wie oben beschrieben mit Urämietoxinen oder der Kontrollsubstanz (Glukose) behandelten Proben untereinander und von der jeweiligen Nullwertgruppe wurde mittels eines Wilcoxon-Rangsummen-Test für kleine Stichproben überprüft (*Harms 1992b, Gwet 2012*). Zur graphischen Darstellung der Ergebnisse wurde die Software *GraphPadPrism6* verwendet.

3. Ergebnisse

3.1. Das Ausgangsmaterial

Für die hier vorgestellte Pilotstudie wurde Blut von insgesamt 12 klinisch gesunden Spendern in zwei getrennten Versuchsreihen unter Zusatz der Testsubstanzen bzw. physiologischer Kochsalzlösung für den Nullwert untersucht:

Versuchsreihe 1: Harnstoff, Glukose und Kreatinin;

Versuchsreihe 2: Guanidinbernsteinsäure (GBS)

Die zu testenden Substanzen wurden in jeweils zwei Konzentrationen (maximal und halbmaximal) zugegeben. Des Weiteren wurde das Blut ohne Zusätze, also nativ, untersucht.

3.1.1. Die Probanden

7 Probanden waren männlichen und 5 Probanden weiblichen Geschlechts. Das arithmetische Altersmittel lag bei 45,52 Jahren, der Altersmedian bei 39 Jahren. Der jüngste Proband (m) war 36, die zwei ältesten Probanden waren jeweils 67 Jahre alt.

3.1.1.2. Labordiagnostische Charakterisierung der Probanden

a) Zum Blutbild

Keiner der Probanden wies klinisch relevante pathologische Veränderungen des Blutbildes auf. Drei weibliche Probanden (40, 64 u. 67 Jahre alt) hatten eine leichte normozytäre Anämie zwischen 11,9 und 11,3 g/dl Hämoglobin und 5 von 12 Probanden wiesen eine leichte ($114 - 136 \cdot 10^3/\mu\text{l}$) bis moderate Thrombopenie ($86 \cdot 10^3/\mu\text{l}$) auf.

Tab. 3.1.: Ergebnisse der hämatologischen Untersuchung der Probanden.

Wert	WBC $10^3/\mu\text{l}$	RBC $10^6/\mu\text{l}$	HGB g/dl	HCT %	MCV fl	MCH pg	MCHC g/dl	PLT $10^3/\mu\text{l}$	PDW fl	MPV fl
min	3,72	3,72	11,3	33,2	80,6	27,9	33,8	86	7,8	8,1
max	8,2	4,8	14,4	40,7	93,3	33	36,3	205	12,3	10,9
Median	5,44	4,345	13	37,05	86,1	30,2	35	160,5	11,25	9,85

b) Die Globaltests der plasmatischen Gerinnung

Keiner der Probanden wies wesentlich von der Norm abweichende Werte für die Prothrombinzeit (PTZ) bzw. den Quickwert, die partielle Thromboplastinzeit oder die Fibrinogenkonzentration auf.

Tab. 3.2.: Ergebnisse der hämostaseologischen Globalteste der Probanden.

Wert	Quick %	aPTT s	Fibr. mg/dl
min.	79	30,1	216
max.	109	36,5	413
Median	95,5	33	265,5

c) Rotemanalysen an Nativblut

An den nativen Blutproben wurden ebenfalls ROTEM-Analysen durchgeführt: Nur drei Werte wichen marginal von den Erwartungswerten ab: im EXTEM hatte ein Proband eine leicht verlängerte CT von 83 s, im FIBTEM hatte ein Proband eine leicht verminderte Clotfestigkeit (MCF) von 7 mm und im NATEM eine leicht verminderte MCF von 39 mm. Kein Proband wies signifikante Abweichungen von der Norm auf (vgl. Lang u. von Depka 2006).

Tab. 3.3.: Ergebnisse der ROTEM-Testungen der Probanden.

	CT s	CFT s	MCF mm	MCF-t s	alpha °	LI45 %	ML %
EXTEM							
min	43	59	54	1001	68	86	3
max	83	111	69	1504	78	99	7
Median	54	69	59,5	1216	76	92,5	10,5
FIBTEM							
min	39		7	386	53	96	0
max	72		22	2275	77	100	8
Median	49,5		13	878,5	71	100	0,5
NATEM							
min	467	176	39	1501	32	32	0
max	816	430	56	2218	58	100	11
Median	608	319	46,5	1744,5	42	97,5	4
NATEM plus							
min	362	117	47	1408	43	92	1
max	487	290	63	2195	68	100	12
Median	437	175	53,5	1545	57,5	96,5	6,5

d) Konzentrationen von Glukose, Harnstoff und Kreatinin im Plasma

Bei der Beurteilung der Metabolitenkonzentrationen ist zu beachten, dass die Bestimmung der oben genannten Parameter im Zitratplasma und nicht im Serum erfolgte. Keiner der Probanden wies pathologisch erhöhte Glukose-(Glu), Harnstoff- (HST) oder Kreatininkonzentrationen (Creat) auf.

Tab. 3.4.: Konzentrationen von Glukose, Harnstoff und Kreatinin im Plasma der Probanden.

Wert	Glu mg/dl	Glu mmol/l	HST mg/dl	HST mmol/l	Creat mg/dl	Creat µmol/l
min	38,5	2,14	15,9	2,64	0,55	48,62
max	93,8	5,21	37,6	6,24	0,87	76,91
Median	64,9	3,6	25,5	4,235	0,78	68,955

3.1.2. Labordiagnostische Charakterisierung der Versuchsansätze

3.1.2.1. Ansatzbedingte Verdünnungseffekte auf labordiagnostische Parameter

Für die Untersuchung des Einflusses von Harnstoff, Kreatinin und GBS sowie der Kontrollsubstanz Glukose auf die Gerinnung wurden die Blutproben zwangsläufig verdünnt. Es wurden jeweils 0,6 ml der "Stammlösung" der zu testenden Substanzen zu 5,4 ml Zitratblut gegeben (1 Teil Stammlösung zu 9 Teilen Zitratblut), dies entspricht einer zehnpromzentigen Verdünnung des Zitratblutes. Der Nullwert wurde in jeder Versuchsreihe anhand einer mit einem analogen Volumen physiologischer Kochsalzlösung verdünnten Blutprobe ermittelt.

Tab. 3.5.: Effekte durch ansatzbedingte Verdünnung in den Globaltests der Gerinnung.

Globaltests der Gerinnung und PFA-100					
Abweichung %	Quick	PTZ	aPTT	Fibr.	PFA-100
von	-15,24	4,9	1	-20,27	-10,6
bis	-7,06	9,45	5,98	-8,14	29,01
Median	-9,9	6,35	3,005	-15,15	5,51

Tab. 3.6.: Effekte durch ansatzbedingte Verdünnung im ROTEM.

EXTEM						
Abweichung %	CT	CFT	MCF	MCF-t	alpha	LI45
von	-19,3	0	-9,09	-6,79	-4,29	-2,33
bis	36,36	21,74	-1,69	16,39	0	2,17
Median	0,925	12,06	-4,635	1,56	-2,615	0
FIBTEM						
von	-16,33		-16,67	-58,76	-7,58	-7
bis	15,91		254,55	197,54	37,74	1,01
Median	2,345		-8,01	36,085	0	0
NATEM						
von	-14,12	-26,17	-9,26	-15,93	-12	-2,02
bis	29,34	25,55	5,13	12,42	18,92	0
Median	0,67	-8,92	-2,2	-2,36	5,895	0
"NATEM plus Thrombin"						
von	-20,19	-39,05	-9,09	-15,08	-12,9	-2,13
bis	23,5	34,69	7,55	13,13	20,69	1,05
Median	-2,525	-4,55	-1,82	0,34	1,865	0

Tab. 3.7.: Effekte durch ansatzbedingte Verdünnung beim Blutbild

Blutbild										
Abweichung %	WBC	RBC	HGB	HCT	MCV	MCH	MCHC	PLT	PDW	MPV
von	-14,03	-10,83	-11,81	-10,59	-0,24	-1,66	-1,41	-15,35	-21,43	-11,54
bis	-6,51	-7,61	-7,97	-7,69	1,25	0,72	0,84	88,37	8,4	3,7
Median	-9,865	-10,195	-10,15	-10,065	0,245	-0,16	-0,57	-7,59	-4,865	-1,71

Tab. 3.8.: Effekte durch ansatzbedingte Verdünnung von Glukose, Harnstoff und Kreatinin.

Metabolite			
Abweichung %	Glu	HST	Creat
von	-18,59	-13,24	-21,82
bis	-4,94	-9,04	-9,86
Median	-10,26	-11,28	-14,97

Wie an den oben in Tabellenform dargestellten Abweichungen der Messwerte der mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnten Blutprobe vom unverdünntem Zitratblut zu erkennen ist, wirkt sich die zehnpromtente Probenverdünnung sehr unterschiedlich auf die einzelnen Tests aus: während der Quickwert, wie erwartet, durchschnittlich um ungefähr zehn Prozent abnimmt, fällt die Verlängerung der TPZ und der aPTT deutlich geringfügiger aus. Im PFA-100 findet sich eine durchschnittliche Verlängerung der Verschlusszeit um 7%. Die Werte für die Fibrinogenkonzentration und die Rotemanalysen waren von einer wesentlich höheren Streuung gekennzeichnet, so dass sich hier kein eindeutiger Trend ablesen lässt. Die

verdünnungsbedingten Abweichungen der Konzentrationen von Glukose, Harnstoff und Kreatinin lagen im Erwartungsbereich.

Die Erythrozyten- und Thrombozytenindices wurden nicht wesentlich durch die Zugabe der Testsubstanzen beeinflusst. Die Erhöhung der Plasmaosmolarität durch die künstliche Erhöhung der Glukose bzw. Harnstoffkonzentration in den Proben führte also nicht, wie man hätte vermuten können, zu einer osmotisch bedingten Schrumpfung der Erythro- oder Thrombozyten.

3.1.2.2. Labordiagnostische Charakterisierung der Versuchsansätze

Um die Versuchsdurchführung möglichst einfach zu gestalten, wurden die Konzentrationen der Substanzen, deren Einfluss auf die Gerinnungsvorgänge untersucht werden sollte, durch ihre Zugabe in einer fixen Menge um einen festgelegten Wert erhöht.

Tab. 3.9.: Theoretische Erhöhung der Konzentrationen der Testsubstanzen in den Ansätzen im Vgl. zum Nullwert.

Erhöhung der	Nullwert	Ansatz 1	Ansatz 2
Glukose			
delta	0	+ 25 mmol	+ 50 mmol
Harnstoff			
delta	0	+ 25 mmol	+ 50 mmol
Kreatinin			
delta	0	+ 450 µmol	+ 900µmol
GBS			
delta	0	+ 25 mg/l	+ 50 mg/l

Tab. 3.10.: Theoretische Erhöhung der Konz. der Testsubstanzen in den Ansätzen im Vergleich zum Nullwert.

Ansatz		Nullwert	Glu1	Glu2	HST1	HST2	Crea1	Crea2	GBS1	GBS2
Erhöhung der der Konzentration gegenüber dem Nullwert um										
Glukose	mmol/l	0	+25	+50	0	0	0	0	0	0
	mg/dl	0	+450,5	901	0	0	0	0	0	0
Harnstoff	mmol/l	0	0	0	+25	+50	0	0	0	0
	mg/dl	0	0	0	+150,15	+300,3	0	0	0	0
Kreatinin	µmol/l	0	0	0	0	0	+450	+900	0	0
	mg/dl	0	0	0	0	0	+5,1	+10,2	0	0
GBS	µmol/l	0	0	0	0	0	0	0	142,7	285,5
	mg/l	0	0	0	0	0	0	0	+25	+50

Die naturgemäßen Schwankungen der Ausgangskonzentrationen fielen in den Testansätzen prozentuell je weniger ins Gewicht, je höher die angestrebte Zielkonzentration der Testsubstanz war. Um die erreichten Zielkonzentrationen zu überprüfen, wurden die entsprechenden Substanzkonzentrationen quantifiziert. Die Ausgangs- und Zielkonzentration für die

Guanidinbernsteinsäure (GBS) wurden nicht gemessen, da die GBS im Blut von nierengesunden Patienten nicht in nennenswerten Konzentrationen vorkommt und somit davon auszugehen war, dass die Zielkonzentration in den Proben allein durch die Menge der zugegeben Testsubstanz GBS bestimmt wurde. Die Osmolarität der Proben wurde nur für jeweils einen Probanden exemplarisch gemessen.

Tab. 3.11.: Gemessene Konzentrationen von Glukose, Harnstoff und Kreatinin in den Versuchsansätzen.

	Nullwert		Ansatz 1		Ansatz 2	
	mg/dl	mmol/l	mg/dl	mmol/l	mg/dl	mmol/l
Glukose						
min	50,3	2,79	527,8	29,29	965	53,56
max	75,8	4,21	556,1	30,86	1019,3	56,57
Median	66,3	3,68	543,8	30,18	993,35	55,13
Anstieg um Faktor	1	1	8,3	8,3	15,2	15,2
Harnstoff						
min	15,2	2,52	164,1	27,24	312,7	51,91
max	38,9	6,46	197,6	32,8	341,9	56,76
Median	23,9	3,965	181,25	30,09	324,15	53,81
Anstieg um Faktor	1	1	7,1	7,1	12,8	12,8
Kreatinin						
min	0,39	34,48	5,92	523,33	10,79	953,84
max	0,77	68,07	6,72	594,05	12,31	1088,2
Median	0,61	53,925	6,325	559,13	11,735	1037,375
Anstieg um Faktor	1	1	10,2	10,3	18,8	18,9

Tab. 3.12.: Anstieg der Osmolaritätswerte nach Zugabe der zu testenden Substanz.

Osmolarität	Nullwert	Konzentration 1	Konzentration 2
	mosmol	mosmol	mosmol
Glukose	298	327	356
Osmolaritätsanstieg um Faktor	1	1,097	1,195
Harnstoff	298	330	351
Osmolaritätsanstieg um Faktor	1	1,107	1,178
Kreatinin	298	299	299
Osmolaritätsanstieg um Faktor	1	1,003	1,003

Die gemessenen Anstiege der Plasmakonzentrationen von Glukose, Harnstoff und Kreatinin entsprachen den bei der Versuchsplanung erwarteten Werten.

Die Plasmaosmolaritäten in den einzelnen Versuchsansätzen waren vergleichbar. Insofern konnte Glukose als Vergleichssubstanz für die osmolaren Effekte erhöhter Konzentrationen von Harnstoff herangezogen werden. Der Konzentrationsanstieg von Kreatinin um circa das 20fache des Ausgangswertes hatte aufgrund der geringen Ausgangskonzentrationen keinen signifikanten Effekt auf die Plasmaosmolarität.

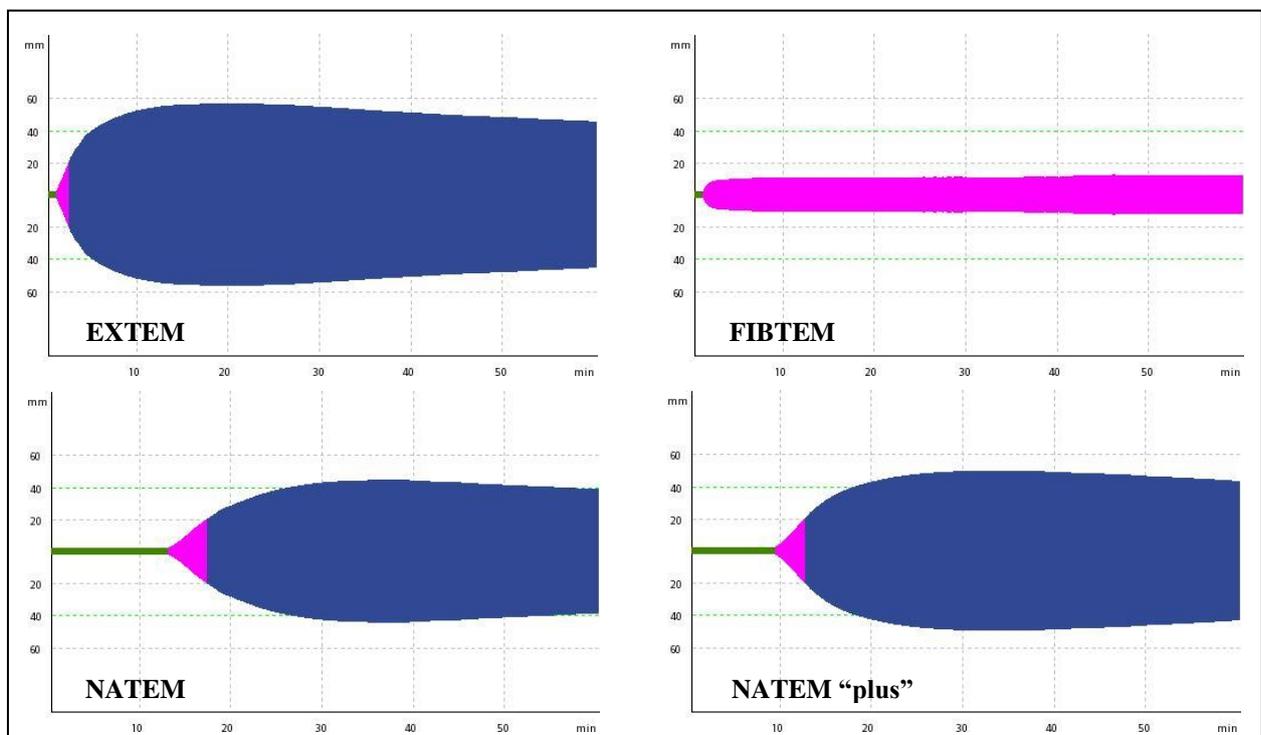
3.2. Versuchsergebnisse: Der Einfluss von Glukose, Harnstoff, Kreatinin und GBS auf die Gerinnung

3.2.1. Rotemuntersuchungen

Ausgangshypothese der Untersuchung war, dass die Zugabe von Glukose oder Kreatinin keine signifikante Veränderung der Gerinnungsparameter im EXTEM verursacht, Harnstoff hingegen eventuell die Clotfestigkeit und die Lyseresistenz des Gerinnsels herabsetzt. Die Zugabe von GBS zu den Blutproben sollte möglicherweise die Gerinnungszeit verlängern und ebenfalls die Clotfestigkeit und die Lyseresistenz des Gerinnsels vermindern.

Im ROTEM wurden folgende Tests durchgeführt: EXTEM, FIBTEM, NATEM, NATEM mit Thrombinzusatz (“NATEM plus”). Nachfolgende Abbildung zeigt beispielsweise den typischen Verlauf der Rotemkurve eines ausgewählten Probanden anhand eines Rotemtests mit Harnstoffzusatz.

Abb. 3.1: Exemplarische Darstellung der Rotemkurven von Harnstoffansatz 2 Proband 6.



In den folgenden Abschnitten werden die Ergebnisse der einzelnen ROTEM-analysen tabellarisch und nur in Einzelfällen grafisch dargestellt.

3.2.1.1. EXTEM

a) EXTEM: Einfluss von Glukose

In den EXTEM-Untersuchungen bei verschiedenen Glukose-Konzentrationen zeigte sich ein signifikanter Unterschied für die Clottingtime (CT) im Vergleich der Wertegruppen Nullwert vs. glu2 (P=0,01), wobei die CT bei hoher Glukose-Konzentration niedriger war als im Ansatz ohne Glukose-Zugabe. Ein Blick auf die grafische Darstellung der Messergebnisse zeigt, dass nur bei zwei von zwölf Probanden die Abnahme der CT deutlich ausfiel. Für die Clot-formation-time (CFT) ist ein ähnlicher Trend mit einer Abnahme bei erhöhten Glukosekonzentrationen festzustellen (Nullwert vs. glu2 und glu1 vs. glu2) (P=0,01).

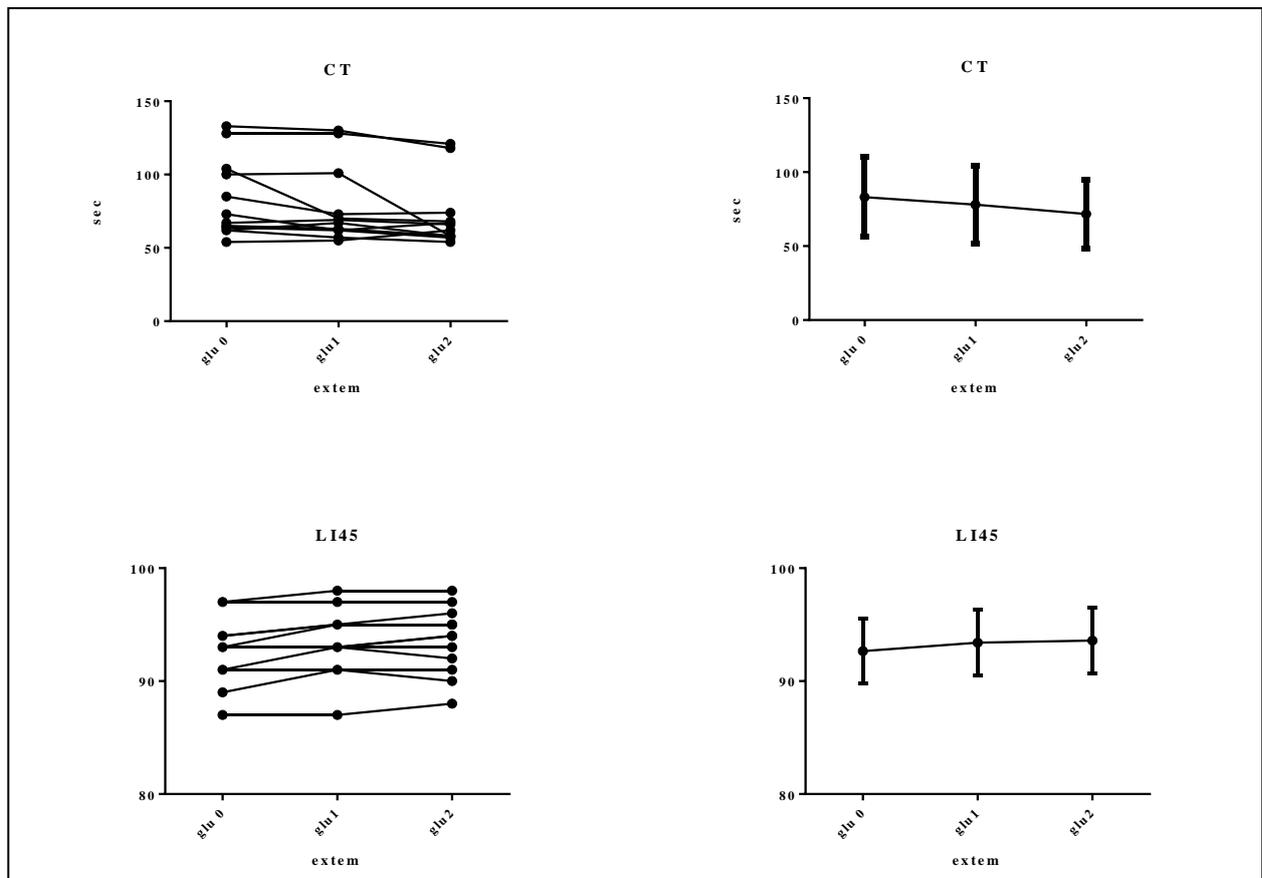
Während in der mittleren Clotfestigkeit (MCF) keine relevanten Unterschiede zwischen den einzelnen Ansätzen feststellbar waren, zeigte sich im Lyseindex bei 45 min (LI45) im glu2-Ansatz ein im Vergleich zum Nullwert signifikant höherer Wert (P=0,03).

Diese Befunde stehen in Widerspruch zu der in der Hypothese angenommenen Unabhängigkeit der Gerinnung von der Glukose-Konzentration.

Tab. 3.13.: Einfluss der Glukose-Konzentration auf Parameter des EXTEM.

Glukose	Nullwert	Ansatz 1	Ansatz 2
CT			
ar. Mittel	83,08	78,08	71,75
Stdabw.	27,007	26,511	23,03
Abw. % v. Nullwert	0	-6,02	-13,64
CFT			
ar. Mittel	83	83,58	88,25
Stdabw.	20,798	19,966	19,643
Abw. % v. Nullwert	0	0,7	6,33
MCF			
ar. Mittel	58,5	58,58	58,5
Stdabw.	3,655	4,481	3,873
Abw. % v. Nullwert	0	0,14	0
LI45			
ar. Mittel	92,67	93,42	93,58
Stdabw.	2,902	2,938	2,938
Abw. % v. Nullwert	0	0,81	0,98

Abb. 3.2.: Darstellung der einzelnen EXTEM-Messwerte sowie des Mittelwertes mit SD bei unterschiedlichen Glukosekonzentrationen (glu0: Nullwert, glu1: +25 mmol/l , glu2: +50 mmol/l Glukose).



Anmerkung: Der **Nullwert** (Ansatz mit NaCl 0,9% anstelle einer Testsubstanz) wurde in jeder Versuchsreihe nur einmal bestimmt. Die Abkürzung "**glu0**" in den Abbildungen steht also für den Nullwert der "Glukosegruppe" aber auch für den der "Harnstoffgruppe" (HST) und der "Kreatinigruppe" (crea). Der für die zweite Versuchsreihe bestimmte Nullwert wurde mit "GBS0" bezeichnet.

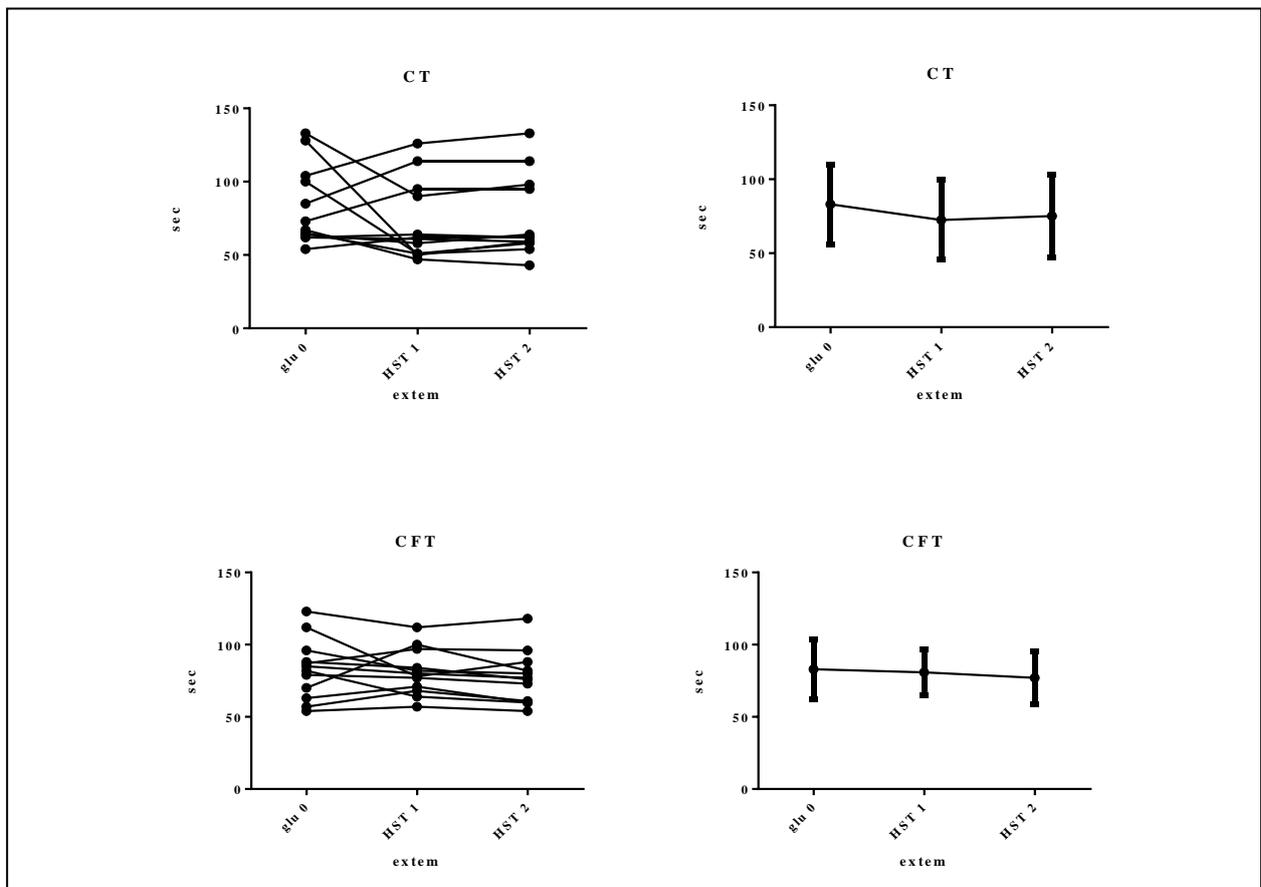
b) EXTEM: Einfluss von Harnstoff

Auch wenn die CT und CFT nach Harnstoffzugabe im Mittel abnimmt, ergibt sich bei der statistischen Betrachtung kein signifikanter Unterschied zwischen Nullwert und den Ansätzen HST1 und HST2. In Hinblick auf MCF und LI45 war kein relevanter Unterschied zwischen den Ansätzen ohne bzw. mit Harnstoffzugabe feststellbar.

Tab. 3.14.: Einfluss unterschiedlicher Harnstoffkonzentrationen auf die Extempparameter.

Harnstoff	Nullwert	Ansatz 1	HST 2
CT			
ar. Mittel	83,08	72,42	75,08
Stdabw.	27,007	26,973	27,862
Abw. % v. Nullwert	0	-12,83	-9,63
CFT			
ar. Mittel	83	80,83	77,08
Stdabw.	20,798	15,805	18,032
Abw. % v. Nullwert	0	-2,61	-7,13
MCF			
ar. Mittel	58,5	58,64	58,75
Stdabw.	3,655	4,056	4,245
Abw. % v. Nullwert	0	0,24	0,43
LI45			
ar. Mittel	92,67	93,09	92,58
Stdabw.	2,902	3,59	3,778
Abw. % v. Nullwert	0	0,45	-0,1

Abb. 3.3.: Einfluss unterschiedlicher Harnstoffkonzentrationen auf CT und CFT im EXTEM
(glu0: Nullwert, HST1: + 25 mmol/l, HST2: +50 mmol/l Harnstoff).



c) EXTEM: Einfluss von Kreatinin

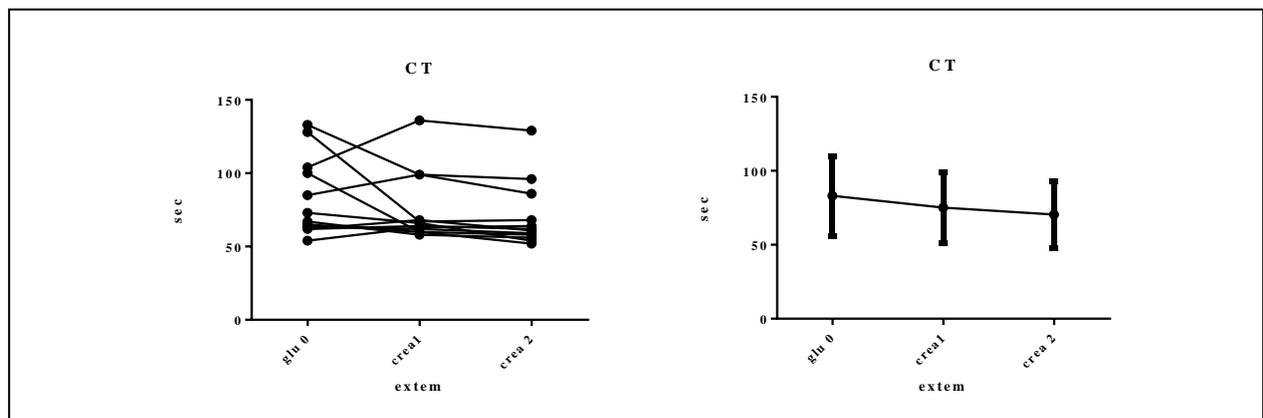
Im EXTEM zeigten sich signifikant niedrigere CT in den Ansätzen mit Kreatinin verglichen mit dem Nullwert (P=0,01). Es war ein Trend dahingehend feststellbar, dass die CT in den Ansätzen mit der höheren Kreatininkonzentration (crea2) niedriger war als im Ansatz crea1. In den weiteren Parametern CFT, MCF und LI45 waren keine relevanten Unterschiede zwischen den einzelnen Kreatinin-Konzentrationen feststellbar.

Tab. 3.15.: Einfluss unterschiedlicher Kreatininkonzentrationen auf die Extemp Parameter.

Kreatinin	Nullwert	Ansatz 1	Ansatz 2
CT			
ar. Mittel	83,08	75,17	70,42
Stdabw.	27,007	23,817	22,637
Abw. % v. Nullwert	0	-9,52	-15,24
CFT			
ar. Mittel	83	82,92	85,58
Stdabw.	20,798	18,456	18,153
Abw. % v. Nullwert	0	-0,1	3,11
MCF			
ar. Mittel	58,5	58,42	58,08
Stdabw.	3,655	4,337	4,757
Abw. % v. Nullwert	0	-0,14	-0,72
LI45			
ar. Mittel	92,67	93,33	93,42
Stdabw.	2,902	3,143	2,968
Abw. % v. Nullwert	0	0,71	0,81

Abb. 3.4.: Einfluss unterschiedlicher Kreatininkonzentrationen auf die CT im EXTEM

(glu0: Nullwert, crea 1: + 450 µmol, crea 2: + 900 µmol Kreatinin)



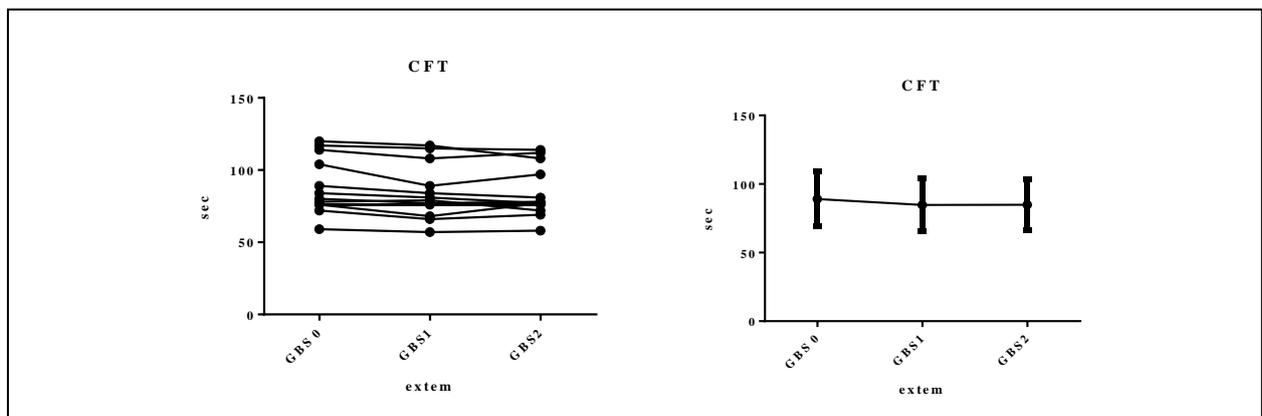
d) EXTEM: Einfluss von Guanidinbernsteinsäure

In der mit GBS durchgeführten Versuchsreihe war festzustellen, dass die Werte für die CFT jeweils im Vergleich zur Nullprobe niedriger ausfielen ($P=0,01$), zwischen den Proben der Gruppen GBS1 und GBS2 war jedoch kein Unterschied in Bezug auf CFT feststellbar. Für die anderen Parameter (CT, MCF und LI45) wurden in allen Gruppen weitgehend vergleichbare Messergebnisse erhalten.

Tab. 3.16.: Einfluss unterschiedlicher Guanidinbernsteinsäurekonzentrationen auf die Extempparameter.

GBS	Nullwert	Ansatz 1	Ansatz 2
CT			
ar. Mittel	59,08	56,42	56,42
Stdabw.	9,491	8,295	8,207
Abw. % v. Nullwert	0	-4,5	-4,5
CFT			
ar. Mittel	89,08	84,75	84,92
Stdabw.	19,884	19,307	18,268
Abw. % v. Nullwert	0	-4,86	-4,67
MCF			
ar. Mittel	57,17	57,25	57,42
Stdabw.	4,55	5,03	4,757
Abw. % v. Nullwert	0	0,14	0,44
LI45			
ar. Mittel	93,33	92,33	93
Stdabw.	3,626	5,433	3,256
Abw. % v. Nullwert	0	-1,07	-0,35

Abb. 3.5.: Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen von GBS auf die CFT im EXTEM (GBS0: Nullwert, GBS1: +25mg/l, GBS2+50 mg/l).



3.2.1.2. FIBTEM

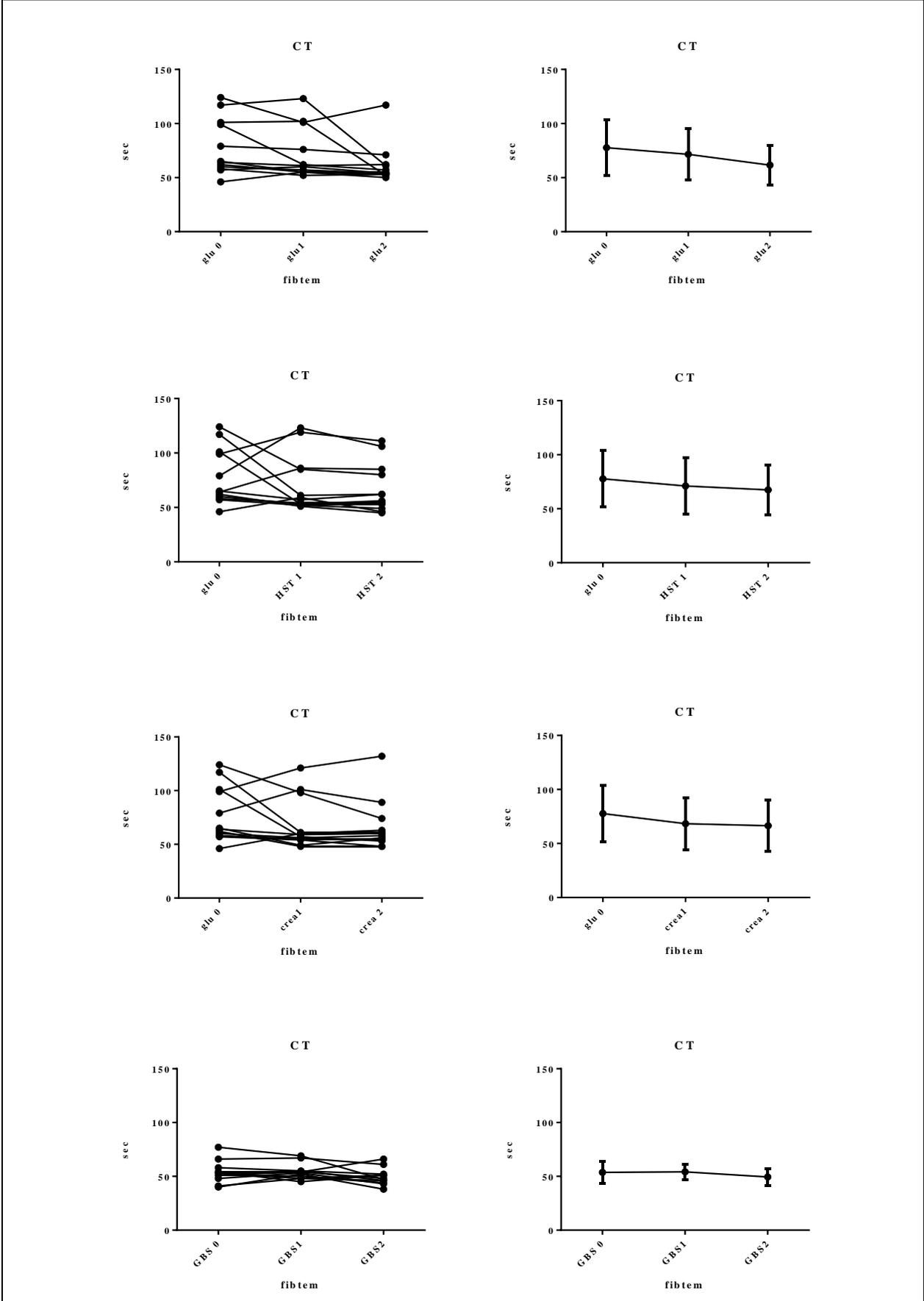
Im FIBTEM zeigten sich in den Ansätzen mit Glukose, Harnstoff und Kreatinin konzentrationsabhängige Abnahmen der CT, die allerdings nur für Glukose ein Signifikanzniveau von $P < 0,05$ erreichten.

In den Versuchen mit GBS waren keine relevanten Veränderungen der CT erkennbar. Eine Ermittlung der CFT erfolgte für den FIBTEM nicht, da die MCF für die Mehrzahl der Proben unter 20 mm lag, die CFT jedoch als Zeit vom Einsetzen der Gerinnung bis zum Erreichen einer Clotfestigkeit von 20 mm Rotemamplitude definiert ist.

Tab. 3.17.: Einfluss unterschiedlicher Konz. von Glukose, Harnstoff, Kreatinin und GBS auf die CT im FIBTEM.

FIBTEM -CT	Nullwert	Ansatz 1	Ansatz 2
Glukose			
ar. Mittel	77,67	71,58	61,58
Stdabw.	25,966	23,766	18,372
Abw. % v. Nullwert	0	-7,84	-20,72
Harnstoff			
ar. Mittel	77,67	71,08	67,42
Stdabw.	25,966	26,228	22,829
Abw. % v. Nullwert	0	-8,48	-13,2
Kreatinin			
ar. Mittel	77,67	68,25	66,42
Stdabw.	25,966	24,087	23,585
Abw. % v. Nullwert	0	-12,13	-14,48
GBS			
ar. Mittel	53,67	54,17	49,42
Stdabw.	10,076	7,197	7,705
Abw. % v. Nullwert	0	0,93	-7,92

Abb. 3.6.: Einfluss der oben definierten Konzentrationen der Testsubstanzen auf die CT im FIBTEM.



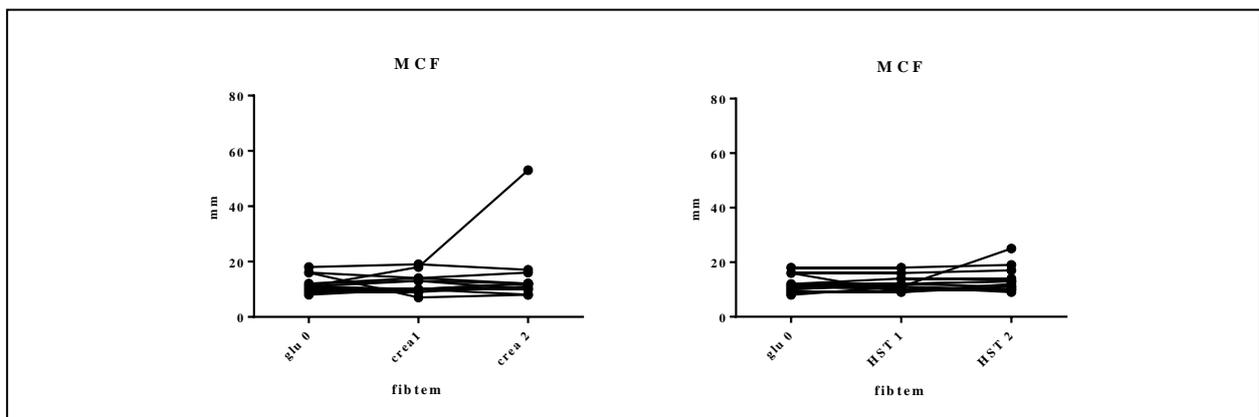
Für die MCF und den LI-45 wurden in keiner Testreihe im FIBTEM systematische Abweichungen zwischen den Ansätzen nachgewiesen.

Tab. 3.18.: Einfluss unterschiedlicher Konz. von Glukose, Harnstoff, Kreatinin u. GBS auf die MCF im FIBTEM.

FIBTEM-MCF	Nullwert	Ansatz 1	Ansatz 2
Glukose			
ar. Mittel	12	11,75	12,58
Stdabw.	3,074	2,702	4,963
Abw. % v. Nullwert	0	-2,08	4,83
Harnstoff			
ar. Mittel	12	12,08	13,67
Stdabw.	3,074	2,713	4,618
Abw. % v. Nullwert	0	0,67	13,92
Kreatinin			
ar. Mittel	12	12,25	15,08
Stdabw.	3,074	3,621	12,243
Abw. % v. Nullwert	0	2,08	25,67
GBS			
ar. Mittel	12,73	11,91	12,5
Stdabw.	3,165	3,646	3,754
Abw. % v. Nullwert	0	-6,44	-1,81

Der auffällige Anstieg des arithmetischen Mittels der MCF im FIBTEM im Vergleich zwischen Nullwert und crea 2 (25,7%) und HST2 (13.9%) war, wie **Abb. 3.7.** zeigt, auf jeweils einen einzelnen Ausreißer zurückzuführen. Deshalb ergab sich im Wilcoxontest keine statistische Signifikanz für den beobachteten Anstieg der MCF.

Abb. 3.7.: Einzelwerte der MCF im FIBTEM unter Harnstoff- und Glukosezusatz.



3.2.1.3. NATEM

Die Ergebnisse der Messungen der Blutgerinnungsvorgänge im NATEM waren sowohl für CT als auch für CFT, MCF und LI45 in allen Ansätzen, d.h. mit Zugabe von Glukose, Harnstoff, Kreatinin oder GBS, nicht signifikant vom Nullwert verschieden. Für keine der Konstellationen konnte eine tendenzielle Veränderung in Bezug auf den Nullwert festgestellt werden.

3.2.1.4. NATEM plus

Wie schon im NATEM-Ansatz (s. Abschnitt **3.2.1.3.**) konnte auch im modifizierten NATEM mit Zusatz von Thrombin anhand keiner der Messgrößen ein Einfluss von Glukose, Kreatinin, Harnstoff oder GBS auf die Gerinnung festgestellt werden.

Die Gerinnungszeiten CT und CFT waren im NATEM+ verglichen mit dem NATEM um etwa die Hälfte verkürzt (Mittelwerte und SD), was aufgrund des Thrombinzusatzes im NATEM+ zu erwarten war, die Werte lagen aber noch deutlich über den im EXTEM gemessenen. Die MCF war in NATEM+ und NATEM in etwa vergleichbar.

Zum Abschnitt 3.2.1. kann abschließend festgestellt werden, dass die dieser Arbeit zugrundeliegende Hypothese, insbesondere Harnstoff oder GBS könnten über eine Verlängerung der Gerinnungszeiten, eine geringere Gerinnselfestigkeit und/oder eine erhöhte Fibrinolyseanfälligkeit des Gerinnsels eine urämiebedingte Blutungsneigung miterklären, durch die hier vorgestellten Versuche am ROTEM nicht bestätigt werden konnte.

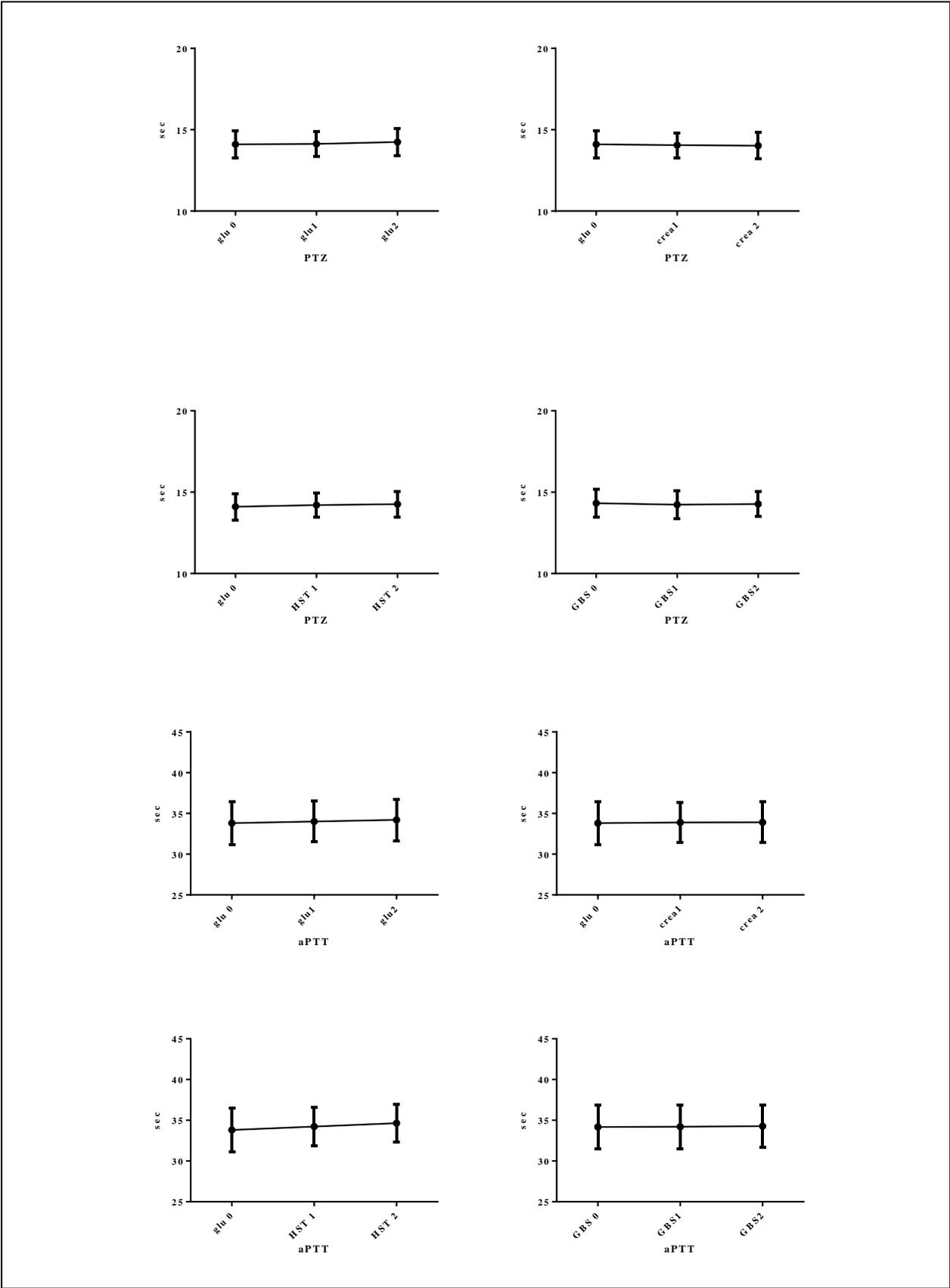
3.2.2. Hämostaseologische Globalteste

Bei der Messung der Blutgerinnungsvorgänge mittels sogenannter Globalteste fallen in allen Testkonstellationen nur marginale Veränderungen in Quick-Wert, Thromboplastinzeit (TPZ) oder aPTT auf. Die Messung der Fibrinogenkonzentration wurde, wie erwartet, nicht durch die Zugabe der Testsubstanzen beeinflusst.

Tab. 3.19.: Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen von Glukose, Harnstoff, Kreatinin und GBS auf die Globaltests der Gerinnung.

Test +		Nullwert	Ansatz 1	Ansatz 2	Nullwert	Ansatz 1	Ansatz 2
		Glukose			Harnstoff		
Quick %	Median	86,5	86,5	86	86,5	86	85,5
	ar. Mittel	87,75	87,5	86,25	87,75	86,5	86,08
	Stdabw.	8,486	8,263	8,192	8,486	7,392	8,017
	Abw. % v. Nullwert	0	-0,28	-1,71	0	-1,42	-1,9
PTZ s	Median	14,15	14,15	14,2	14,15	14,2	14,25
	ar. Mittel	14,1	14,13	14,24	14,1	14,21	14,27
	Stdabw.	0,819	0,787	0,831	0,819	0,735	0,787
	Abw. % v. Nullwert	0	0,21	0,99	0	0,78	1,21
aPTT s	Median	32,9	33,2	33,45	32,9	33,6	33,75
	ar. Mittel	33,81	34	34,21	33,81	34,23	34,64
	Stdabw.	2,65	2,512	2,546	2,65	2,366	2,278
	Abw. % v. Nullwert	0	0,56	1,18	0	1,24	2,45
		Kreatinin			GBS		
Quick %	Median	86,5	88	87	86	86	86,5
	ar. Mittel	87,75	88,25	88,5	85,5	86,58	86
	Stdabw.	8,486	8,192	8,702	8,273	8,479	7,361
	Abw. % v. Nullwert	0	0,57	0,85	0	1,26	0,58
PTZ s	Median	14,15	14	14,1	14,2	14,2	14,15
	ar. Mittel	14,1	14,05	14,03	14,33	14,23	14,28
	Stdabw.	0,819	0,768	0,806	0,872	0,849	0,762
	Abw. % v. Nullwert	0	-0,35	-0,5	0	-0,7	-0,35
aPTT s	Median	32,9	33,2	33,2	34,35	34,55	34,3
	ar. Mittel	33,81	33,9	33,91	34,18	34,2	34,28
	Stdabw.	2,65	2,464	2,51	2,661	2,683	2,615
	Abw. % v. Nullwert	0	0,27	0,3	0	0,06	0,29

Abb.3.8: Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen von Glukose, Harnstoff, Kreatinin und GBS auf die Globaltests der Gerinnung (arr. Mittel mit Standardabweichung).

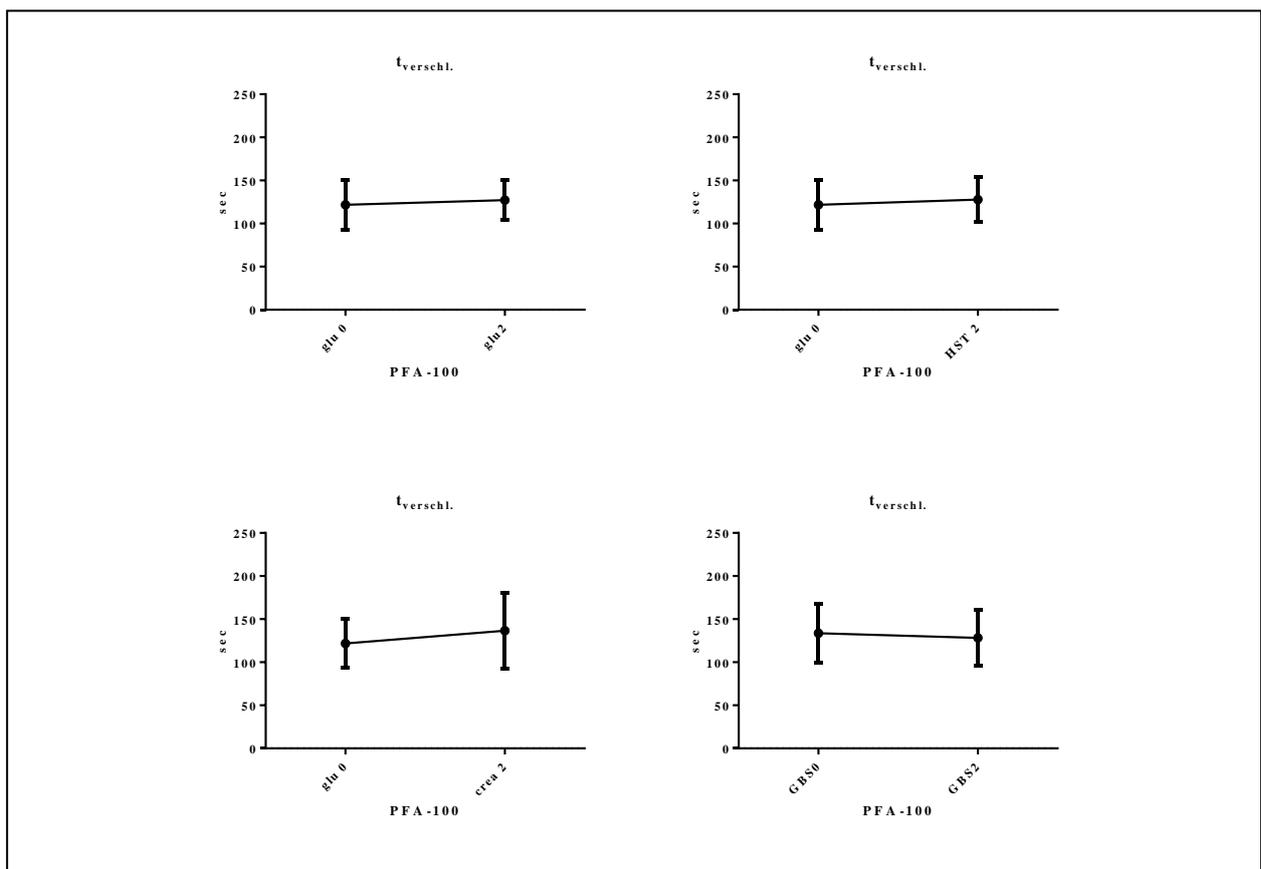


3.2.3. PFA-100

Die Zugabe von Glukose, Harnstoff und Kreatinin führte im Versuch zu einem leichten Anstieg der kapillären Verschlusszeit im PFA-100 im Vergleich zur mit physiologischer Kochsalzlösung versetzten Probe (Nullwert: glu0). Für Glukose lag der Anstieg bei durchschnittlich 3,7%, für Kreatinin bei 13,3% und für Harnstoff bei 4,4%. Die Zugabe von GBS führte zu einer Abnahme von -4,4%. Diese Veränderungen erwiesen sich jedoch im Wilcoxon-Test als nicht signifikant. Die Werte im mit Kreatininzusatz durchgeführten Test wiesen eine erhebliche Streuung auf (Variationskoeffizient 31%!).

Die Hypothese, dass insbesondere GBS eine Verlängerung der kapillären Verschlusszeit im Kollagen-Epinephrin-Test hervorrufen könnte wurde nicht bestätigt.

Abb.3.9.: Einfluss erhöhter Glukose-, Harnstoff-, Kreatinin- und GBS-Konzentrationen auf die Kapillarverschlusszeit im PFA-100-Kollagen-Epinephrin-Test (arr. Mittel mit Standardabweichung).



3.2.4. Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Arbeitshypothese vorliegender Arbeit stützte sich auf elektrophoretische Untersuchungen zur Fibrinstruktur urämischer Patienten, welche nahelegten, dass möglicherweise eine direkte Beeinflussung der Fibrinpolymerisation durch die erhöhten Harnstoffkonzentrationen im Blut dieser Patienten eine Ursache der bei Urämie häufig auftretenden Blutungsneigung sein könnte (Klingemann *et al* 1980). Dieser Einfluss sollte vor allem mittels des ROTEMs untersucht werden. Für einen möglichen Einfluss des urämietyptischen Metaboliten Guanidinbernsteinsäure auf die Thrombozytenfunktion gibt es eine Vielzahl von experimentellen und klinischen Hinweisen. Deshalb sollte der Einfluss dieser Substanz auf die Gerinnungsvorgänge im ROTEM und im PFA-100 ebenfalls untersucht werden. Ergänzt wurden die Untersuchungen durch die klassischen Globaltests der Gerinnung.

In den Versuchsansätzen wurden neben den in Frage stehenden Substanzen auch Glukose und Kreatinin eingesetzt, um Effekte beispielsweise durch geänderte osmotische Bedingungen erfassen zu können.

In den durchgeführten Untersuchungen konnten lediglich im EXTEM für mehrere Konstellationen Veränderungen in Bezug auf den Nullwert festgestellt werden. So waren in den Ansätzen mit Glukose CT sowie CFT, im Ansatz mit Kreatinin die CT und im Ansatz mit GBS die CFT signifikant kürzer als die korrespondierenden Messgrößen im Ansatz ohne Zusatz. Darüber hinaus war lediglich im FIBTEM eine signifikante Verkürzung der CT mit Glukose nachweisbar. Für MCF oder LI45 im ROTEM, für die hämostaseologischen Globalteste oder den PFA-100 war kein Einfluss durch Zugabe einer der genannten Substanzen feststellbar.

Mittels der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Methoden konnte daher kein systematischer Einfluss von Harnstoff oder GBS auf die Hämostase nachgewiesen werden, der eine urämiebedingte hämophile Diathese zumindest teilweise erklären könnte. Insbesondere die wichtigste Ausgangshypothese der vorgestellten Versuche, dass Harnstoff vor allem die Clot-Festigkeit (MCF) oder die Lyseanfälligkeit (LI45) des Blutgerinnsels negativ beeinflussen könnte, kann durch die Ergebnisse nicht unterstützt werden.

4. Diskussion

4.1. Fragestellungen und Wahl der Untersuchungsmethoden

4.1.1. Untersuchung von Fibrinpolymerisation und Clotstabilität mittels ROTEM im künstlich mit Harnstoff und anderen Urämietoxinen exponierten Plasma

Die zentrale Fragestellung der hier vorgestellten Studie war, ob sich mittels der Untersuchung der Fibrinpolymerisation im ROTEM Hinweise auf eine Störung derselben durch erhöhte Konzentrationen von Harnstoff oder anderer Urämietoxine finden lassen und ob diese einen relevanten Einfluss auf die Stabilität des Fibrinclots haben.

Die Urämie ist sowohl durch einen Anstieg primär retinierter Stoffwechselprodukte (z.B. Harnstoff oder Kreatinin) als auch das Auftreten neuer, normalerweise nur in vernachlässigbaren Konzentrationen vorhandener Stoffwechselprodukte wie z.B. Guanidinbernsteinsäure im Blut der betroffenen Patienten gekennzeichnet. Die Vielzahl der in der Urämie akkumulierenden Substanzen (*Vanholder et al. 2003*) und der dadurch resultierenden pathophysiologischen Folgeprozesse einerseits (*Skorecki 2003, Vanholder et al. 2006, Vanholder et al. 2008*) und die Komplexität der Gerinnungsvorgänge mit dem Zusammenspiel von plasmatischen und zellulären Komponenten (*Hoffmann und Moore 2001*) andererseits machen die Suche nach den für die Koagulopathie des urämischen Patienten verantwortlichen Substanzen und Mechanismen zu einer methodisch komplizierten Angelegenheit (*siehe Hörl 2006*).

Die Idee, die hier vorgestellte Studie durchzuführen, entstand zum einen auf Grund persönlicher klinischer Erfahrungen von intra- und postoperativen Blutungen bei niereninsuffizienten Patienten, für die die Standardtests der Gerinnung wie aPTT und Quicktest keine Erklärung lieferten und zum anderem als Ergebnis eines in diesem Zusammenhang durchgeführten Literaturstudiums, bei dem unter anderem eine Arbeit gefunden wurde, in der eine mögliche Störung der Fibrinpolymerisation durch Harnstoff diskutiert wurde (*Klingemann et al. 1980*).

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, wurde die Möglichkeit, dass die erhöhten Harnstoffkonzentrationen die Stabilität des Fibringerinnsels bei urämischen Patienten negativ beeinflussen könnten, durch eine Studie von KLINGEMANN, EGBRING und HAVEMANN

aus dem Jahr 1980 nahegelegt. Sie untersuchten vergleichend elektrophoretisch Fibrin von urämischen Patienten und leberinsuffizienten Patienten mit erworbenem Faktor-XIII-Mangel. KLINGEMANN et al. vermuteten, dass das Diamin Harnstoff möglicherweise als Falschsubstrat für Faktor XIII dienen und so die Fibrinvernetzung stören könne (*Klingemann et al. 1980*). Weitere Untersuchungen, die diesen Ansatz weiterverfolgt hätten, wurden bei der Literaturrecherche nicht gefunden.

Auch SJØLAND et al. fanden eine veränderte Struktur des im Plasma von urämischen Patienten gebildeten Fibrinclots (*Sjøland et al. 2007*) (siehe auch Kapitel: **4.2.1.**).

Die Anfang der 1990er Jahre von Andreas CALATZIS und Pablo FRITZSCHE (*Calatzis et al. 1996c*) in Weiterentwicklung der Thromboelastometrie von HARTERT (*vgl. Calatzis et al. 1996 a, b, Hartert 1948*) vorgestellte Rotationsthromboelastometrie (ROTEM) bot sich dazu an, die Fibrinpolymerisation in vitro in Gegenwart künstlich erzeugter erhöhter Konzentrationen von Harnstoff und anderen Urämiotoxinen zu untersuchen. Der Ansatz, einzelne Komponenten des Gerinnungssystems erhöhten Konzentration bestimmter urämiotypischer Stoffwechselprodukte und Toxine auszusetzen und die hieraus resultierenden Veränderungen zu untersuchen, ist keineswegs neu. Derartige Untersuchungen wurden an Thrombozyten durchgeführt (*Vonend et al. 1975*). Auch wurde der Einfluss von Guanidinbernsteinsäure auf die Stickstoffmonoxid-Bildung im Endothel von isolierten Rattenaorten untersucht (*Thomas und Ramwell 1992 u. 93*). Das besondere Interesse der Untersuchung eines möglichen Einflusses von Harnstoff auf die Gerinnungsvorgänge mittels ROTEM lag zum einen in der Tatsache, dass diese Methode dank konstruktiver Veränderungen im Vergleich zur herkömmlichen Thrombelastometrie weniger stör anfällig ist und auf einfache Weise die Untersuchung sowohl der Dynamik der Fibrinpolymerisation als auch der Clotstabilität ermöglicht. Zum anderen erfolgt die Untersuchung im Vollblut, so dass das Wechselspiel aller Komponenten des Gerinnungssystems mit Ausnahme des Endothels besser berücksichtigt wird als mit vielen anderen Methoden der Gerinnungsanalyse (*Calatzis et al. 1996a-c*).

ROTEM ist in der klinischen Praxis einer der häufigsten angewandten Teste zum direkten Nachweis einer Fibrinolyse (*Harr et al. 2015*). Dies machte das Verfahren besonders attraktiv für die Überprüfung der Hypothese, dass Harnstoff eventuell als Falschsubstrat für den fibrinstabilisierenden Faktor XIII wirken könnte, da eine durch die Gegenwart erhöhter Harnstoffkonzentrationen verminderte funktionelle Faktor-XIII-Aktivität sich insbesondere auf die Fibrinolysestabilität des Fibrinclots auswirken sollte (*Weber et al. 2008*).

Die aber am häufigsten mit urämietyptischen Gerinnungsstörungen assoziierte Substanz ist die Guanidinbernsteinsäure (GBS). Diese wird für eine NO-vermittelte Thrombozytenfunktionsstörung verantwortlich gemacht (*Norris und Remuzzi 1999*).

Die Thrombozyten spielen nach dem derzeit favorisierten zellbasierten Modell der Gerinnung eine weitaus wichtigere und komplexere Rolle bei den Vorgängen der Gerinnung als im klassischen Gerinnungsmodell angenommen (*Hoffmann und Monroe 2001*). Da die ROTEM-Tests im Vollblut und also, mit Ausnahme des FIBTEMs, in Anwesenheit funktionstüchtiger Thrombozyten realisiert werden, lag es nahe, auch die GBS nach dem gleichen Prinzip in einer weiteren Testreihe im ROTEM zu untersuchen und diese Untersuchungen mit einem empfindlichen Suchtest für Thrombozytenfunktionsstörungen, dem PFA-100-Kollagen-Epinephrintest zu ergänzen

4.1.2. Wahl der in der Arbeit verwendeten Kontrollsubstanzen

Als Substanzen, welche zu den Blutproben der Kontrollgruppen anstelle von Harnstoff zugegeben werden sollten, wurden Glukose und Kreatinin gewählt.

Glukose, weil die in hochpathologischen Situationen beim Diabetiker (z.B. im hyperosmolaren Koma) gefundenen Glukosekonzentrationen im Serum mit den Serumharnstoffkonzentrationen von urämischen Patienten vergleichbar sind und diese den gleichen Einfluss auf die Blutosmolarität haben. Die Verwendung von Glukose als Kontrollsubstanz in äquivalenten Konzentrationen zum Harnstoff sollte es erlauben, eventuell osmotisch bedingte Effekte auf die Gerinnung zu erfassen bzw. auszuschließen (siehe Kapitel **1.5.1.**, **2.3.2.** u. **3.1.2.2.**).

Kreatinin wurde gewählt, weil es ein typisches Urämietoxin darstellt, welches zwar in der Urämie um ein Vielfaches des Normbereiches ansteigt aber aufgrund seiner geringen Ausgangskonzentration die Blutosmolarität im Gegensatz zu Harnstoff nicht wesentlich beeinflusst. Zudem ist Kreatinin in der Literatur bislang nicht direkt mit einer Beeinflussung des Gerinnungssystems in Verbindung gebracht worden.

4.2. Harnstoff - ein möglicher Inhibitor von Faktor XIII?

4.2.1. Biochemische Bedeutung von Faktor XIII für die Stabilisierung des Fibrinclots und der mögliche Einfluss von Harnstoff

Wie in Kapitel 1.3.3.8. beschrieben führt die Gerinnungsaktivierung letztendlich über die Bildung von Fibrinmonomeren und deren Polymerisation zu faserförmigen Fibrinprotofibrillen. Diese durch elektrostatische Wechselwirkungen zusammengehaltenen Fibrinmoleküle sind jedoch noch relativ instabil. Für die Stabilisierung des Fibrinclots sorgt Faktor XIII, welcher die Bildung kovalenter Bindungen zwischen Glutamin- und Lysinseitenketten der zusammengelagerten Fibrinmonomere katalysiert (*Stryer 1991: 262, Doolittle 1984, Mosesson 2005*).

Glutamin mit seiner endständigen Amidgruppe ähnelt hier strukturell dem Kohlendiamin Harnstoff (vgl. **Abb.1.7.**, *Stryer 1991: 20, 522*). Dies und die Tatsache, dass C¹⁴-markierter Harnstoff in Fibringerinnsel eingebaut wird, legt nahe, dass Harnstoff ebenfalls als Substrat für Faktor XIII dienen kann. Die Idee von KLINGEMANN et al, dass Harnstoff als Falschsubstrat für Faktor XIII wirken und so die Bildung der clot-stabilisierenden kovalenten Quervernetzung der Fibrinmonomere stören könnte, scheint daher schlüssig. Unterstützt wird diese These durch folgende Befunde: KLINGEMANN et al führten elektrophoretische Untersuchungen der Fibrinstruktur bei zirrhotischen Patienten und Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz durch: die bei 71% der zirrhotischen Patienten beobachteten Polymerisations- und Vernetzungsstörungen korrelierten gut mit einer verminderten Faktor-XIII-Aktivität. Diese Fibrinpolymerisationsstörungen waren auch bei 45% der niereninsuffizienten Patienten beobachtet worden, allerdings bei normalen Faktor-XIII-Spiegeln (*Klingemann et al. 1980*).

Im Widerspruch zu dieser These steht die Tatsache, dass SJØLAND et al. in ihrer Arbeit (2007) zwar eine veränderte Struktur des im Plasma von urämischen Patienten gebildeten Fibrinclots fanden, jedoch keine Korrelation mit erhöhten Werten der klassischen Stickstoffretentionsparameter bestand. Es war aber ein deutlicher Zusammenhang zwischen veränderter Clotstruktur und urämietyperischer systemischer Entzündungsreaktion zu erkennen.

4.2.2. Klinische Manifestationen eines Faktor-XIII-Mangels im Vergleich zu den Symptomen der urämischen Koagulopathie

Patienten mit kongenitalem Faktor-XIII-Mangel können eine Vielzahl von Blutungssymptomen aufweisen. M. LAK *et al.* konnten an 93 Patienten aus dem Iran, wo der angeborene Faktor-XIII-Mangel überdurchschnittlich häufig vorkommt, die statistische Häufigkeit der einzelnen Symptome genauer ermitteln: Am häufigsten traten intraoperative Blutungen auf (84%), sehr häufig waren Nabelschnurblutungen (73%), Weichteilhämatome (58%), Gelenkblutungen (55%), Fehlgeburten (50%), sowie Blutungen der Mundschleimhaut (48%). Des Weiteren traten Menorrhagien (35%), Epistaxis (32%), intrakranielle Blutungen (25%) sowie Hämaturien und gastrointestinale Blutungen (jeweils 10%) auf.

Die in dieser Arbeit beschriebenen schweren Blutungskomplikationen betrafen homozygote Patienten (*Lak et al. 2003*). Eine Faktor-XIII-Aktivität von 2-3% ist mindestens erforderlich; um eine ausreichende Hämostase zu gewährleisten. Patienten mit angeborenem schwerem Faktor-XIII-Mangel müssen vor invasiven Eingriffen entsprechend mit Faktor-XIII-Präparaten substituiert werden und profitieren auch hinsichtlich spontaner Blutungskomplikationen von einer regelmäßigen prophylaktischen Substitution (*Mannucci 2010*). Patienten mit milden Faktor-XIII-Mangelzuständen galten lange Zeit als asymptomatisch. Dies scheint aber so nicht vollständig zuzutreffen. Auch bei heterozygoten Patienten mit mildem Faktor-XIII-Mangel (Restaktivität 23-71%) wurden vermehrte Blutungssymptome wie z.B. perioperative Blutungen, Blutungen nach Trauma und Zahnextraktionen aber auch spontane Schleimhautblutungen und Menorrhagien beobachtet (*Ivaskevicius et al. 2010*).

Es wird seit einiger Zeit darüber diskutiert, ob ein moderater Faktor XIII-Mangel eine Ursache von bis dahin schlecht erklärbaren intraoperativen Blutungen sein könnte. Ein diagnostischer Marker zur präoperativen Früherkennung eines solchen Defizits könnten neben der Faktor-XIII-Verminderung als solcher auch erhöhte Konzentrationen von Fibrinmonomeren im Blut der betroffenen Patienten sein (*Korte et al. 2005, Korte 2006, Korte et al. 2010, Spahn und Asmis 2009, Wettstein et al. 2004*).

Die klinische Symptomatik der urämischen Koagulopathie ähnelt zumindest teilweise der eines milden Faktor-XIII-Mangels: bei operativen Eingriffen, Gefäßpunktionen und zahnärztlichen Behandlungen treten Blutungskomplikationen gehäuft auf. Auch werden andere Blutungen wie Ekchymosen oder Epistaxis, beschrieben (siehe Kap. 1.4.1.) (*Boccardo et al. 2004*).

Angesichts einer gewissen Ähnlichkeit der Symptomatologie des milden Faktor-XIII-Mangels und der urämischen Koagulopathie kann die Möglichkeit von Gemeinsamkeiten in der Pathogenese (verminderte Festigkeit des Fibrinclots) nicht von der Hand gewiesen werden.

4.2.3. Zeichen eines Faktor-XIII-Mangels im ROTEM

Ein Grundgedanke dieser Arbeit war, dass eine urämiebedingte funktionell verminderte Aktivität von Faktor XIII durch eine verminderte Stabilität des Fibringerinnsels im ROTEM sichtbar sein müsse. Dass diese Annahme für den Faktor-XIII-Mangel als solchen richtig ist, haben mittlerweile mehrere Arbeiten gezeigt.

Die Veröffentlichungen zu diesem Thema umfassen u.a. einen Fallbericht von WEBER et. al, bei dem ein Faktor-XIII-Mangel als Ursache einer vermehrten intraoperativen Blutungsneigung anhand einer verminderten Clotfestigkeit im ROTEM diagnostiziert wurde. Außerdem wurden die klinische Wirksamkeit einer Faktor-XIII-Substitution und die daraus resultierende Verbesserung der Clotfestigkeit im ROTEM bestätigt (*Weber et al. 2008*, *Winstedt et al 2014*, *Shams Hakimi et al. 2018*).

Die Sensitivität der Thrombelastometrie mit künstlicher Verstärkung der Fibrinolyse durch den Zusatz von Kalzium und Streptokinase wurde von MARTINUZZO et al. untersucht. Die Arbeitsgruppe fand, dass diese Methode zum Nachweis eines Faktor-XIII-Mangels dem Harnstofflöslichkeitstest, also dem klassischen Test der Fibrinvernetzung, überlegen ist. (*Martinuzzo et al. 2016*).

Auch wurde eine Korrelation von Faktor-XIII-Aktivität und Clotfestigkeit im ROTEM bei Leberzirrhosepatienten (*Bedreli et al. 2017*) und Intensivpatienten belegt (*von Rappard et al 2017*).

4.2.4. Untersuchung der Fibrinpolymerisation im ROTEM in Gegenwart erhöhter Harnstoffkonzentrationen: eigene Untersuchungen und Diskussion der Ergebnisse

Die hier vorgestellte Arbeit hatte u.a. zum Ziel, Hinweise darauf zu finden, ob erhöhte Harnstoffkonzentrationen im Blut eventuell die Stabilisierung des Fibrinclots durch Faktor XIII stören könnten. Wie in Kapitel **4.2.3.** aufgezeigt, spricht vieles dafür, dass sich eine durch die Anwesenheit von Harnstoff funktionell verminderte Faktor-XIII-Aktivität in einer verminderten Clotfestigkeit im ROTEM und einer damit verbundenen erhöhten Lyseanfälligkeit zeigen

müsste. Die isolierte Zugabe von Harnstoff in zwei Konzentrationen (Ausgangskonzentration plus 25 bzw. 50 mmol/l) führten in der hier vorgestellten Arbeit zu keiner signifikanten Veränderung der maximalen Clotfestigkeit oder des Lyseindex 45 min nach Einsetzen der Clotbildung. Insofern konnte die Ausgangshypothese eines Einflusses erhöhter Harnstoffkonzentrationen auf die Fibrinvernetzung im ROTEM nicht bestätigt werden.

Kritisch ist jedoch anzumerken, dass der durch Faktor XIII katalysierte Prozess der Quervernetzung der durch elektrostatische Wechselwirkung zusammengelagerten Fibrinmonomere bis zu zwei Stunden andauert (*Barthels u. Depka 2003: 63, vgl. auch Kurniawan et al 2014*), so dass es retrospektiv wünschenswert gewesen wäre, die Beobachtung des Clotfestigkeit im ROTEM auf diesen Zeitraum auszudehnen.

Auch wäre eine Erhöhung der Sensitivität des Tests für die Fibrinolyse durch die Zugabe von Kalzium und Streptokinase möglicherweise sinnvoll gewesen (*siehe auch Viennet et al 2014*).

Neben weiter gesteigerten Harnstoffkonzentrationen (z.B. bis 80mmol/l) hätte auch die gezielte Untersuchung von Blut urämischer Patienten weiterführend sein können.

Es wäre in diesem Zusammenhang auch noch ein anderer Mechanismus zu diskutieren, über den das Diamin Harnstoff möglicherweise die Fibrinpolymerisation stören könnte: Harnstoff in hoher Konzentration interferiert über elektrostatische Wechselwirkungen in vitro mit der Spontanassoziation der Fibrinmonomere, ist sogar in der Lage, bereits gebildete Fibrinpolymere wieder aufzulösen. Dieses macht man sich z.B. beim sogenannten Harnstofflöslichkeitstest zu nutze. Ob diese Wechselwirkung aber in vivo bei den in der Urämie angetroffenen weit unter den im Labor verwendeten Harnstoffkonzentrationen (5 M) eine Rolle spielt, ist unklar und bedürfte weiterer Untersuchungen (*Löffler, Petrides 1990 S: 128, 834-835., Barthels u. Depka 2003: 484, Karges 1984*).

Ein weiterer Untersuchungsansatz könnte darin bestehen, die Fibrinpolymerisation isoliert unter Verwendung gereinigter Fibrinogen-, Thrombin- und Faktor-XIII-Präparate mit und ohne Harnstoffzusatz zu untersuchen. Die Beurteilung der Qualität des Fibrinclots könnte mittels klassischer Löslichkeitsteste (*Sanfelippo et al. 2014*) sowie mit Hilfe des Elektronenmikroskops erfolgen.

Außerdem könnten weitere Strategien darin bestehen, die Beeinflussung der spezifisch gemessenen funktionellen Faktor-XIII-Aktivität durch Harnstoff zu untersuchen. Hierzu böten sich verschiedene Methoden und Ansätze an:

- Die Photometrische Methode nach Fickenscher (Berichrom® F XIII), ein Test der Enzymaktivität, bei dem das durch Faktor XIII freigesetzte Ammoniak gemessen wird (*Fickenscher et al. 1991, Lawrie et al. 2010*);
- Der Incorporationstest nach Lorand, der auf der Inkorporation eines mit enzymatischen oder immunologischen Methoden nachweisbaren Amins in ein glutaminhaltiges Substrat durch Faktor XIII beruht (*Lorand et al. 1969, Letheby et al. 1974*);
- Die Bestimmung der Fibrinmonomer- und Harnstoffkonzentrationen im Blut urämischer Patienten, mit der Fragestellung, ob eine Korrelation zwischen beiden Parametern vorliegt. (*siehe auch Korte et al. 2005, Korte 2006, Korte et al. 2010, Spahn und Asmis 2009, Wettstein et al. 2004*).

4.3. Plasmaosmolarität und Blutgerinnung

Grundsätzlich sind neben spezifischen biochemischen Wechselwirkungen von Harnstoff mit den Komponenten des Gerinnungssystems auch unspezifische Effekte bei pathologisch erhöhter Osmolarität vorstellbar. Eine signifikante Erhöhung der Plasmaosmolarität könnte zum einen die Enzym-Substrat-Interaktion der plasmatischen Komponenten des Gerinnungssystems stören. Zum anderen führen Erhöhungen der Plasmaosmolarität zur intrazellulären Dehydratation, was unter anderem die Funktionsfähigkeit der Thrombozyten beeinflussen könnte. Wie in Kapitel 4.1.2. bereits dargelegt, wurde beschlossen, Glukose als osmotisch wirksame Vergleichssubstanz in zur Harnstoffuntersuchung vergleichbarer molarer Konzentration in den Untersuchungen zu verwenden.

4.3.1. Einfluss von Glukose und Plasmaosmolarität auf die plasmatische Gerinnung

In der hier vorgestellten in-vitro-Studie hatte weder die Zugabe von Harnstoff noch die Zugabe von Glukose einen signifikanten Einfluss auf die Gerinnungszeiten in den globalen Gerinnungstesten (Quicktest, aPTT) oder im ROTEM (CT, CFT). Auch die maximale Clotfestigkeit oder der Lyseindex-45 im ROTEM wurden nicht signifikant beeinflusst. Es ist durchaus denkbar, dass die durch Zugabe der Testsubstanzen Harnstoff und Glukose erzielte Erhöhungen der Plasmaosmolarität um 25 mosmol bzw. 50 mosmol unzureichend waren, um mit den verwendeten Methoden einen messbaren Effekt zu erzielen. Auch dürfte eine durch Harnstoff oder Glukose osmotisch bedingte Störung der Enzym-Substratwechselwirkung

innerhalb der Gerinnungskaskade davon abhängen, in welcher Konzentration Enzyme und Substrate des Gerinnungssystems selbst vorliegen. Anders ausgedrückt, ist es vorstellbar, dass bei einem Mangel an Gerinnungsfaktoren durch verminderte Synthese, Verlust oder Verdünnung eine isolierte Erhöhung der Plasmaosmolarität eine stärkere Wirkung entfaltet als bei sonst normalen Konzentrationen der Gerinnungsfaktoren. Versuche mit weiter verdünntem Plasma wären daher möglicherweise sinnvoll.

Dass erhöhte Konzentrationen an Glukose sowohl klassische Gerinnungstests als auch ROTEM-Tests im Sinne einer verminderten Gerinnbarkeit beeinflussen könnten, legen zwei kürzlich veröffentlichte Studien nahe, in denen venösen Blutproben unterschiedlich stark konzentrierte Glukoselösungen (bis zu 20%) zugegeben wurden. In der Tat fanden sich sowohl verlängerte Gerinnungszeiten in den klassischen Gerinnungstests als auch eine verminderte Clotfestigkeit im ROTEM nach Zugabe höherer Glukosekonzentrationen.

Die Versuche zielten jedoch eher auf die Frage ab, ob sich mit Glukose kontaminierte Proben für die Gerinnungsanalytik eignen oder verworfen werden sollten (*Lippi et al. 2015, Shin et al. 2016*).

4.3.2. Einfluss von Hyperglykämie und Hyperinsulinämie auf die Gerinnung in vivo

Untersuchungen verschiedener Gerinnungsparameter an Typ-II-Diabetikern legen eher eine prokoagulatorische Wirkung chronischer Hyperglykämien nahe. Es wurden erhöhte Konzentrationen fast aller Gerinnungsfaktoren, sowie eine gestörte Fibrinolyse gefunden. Dies geht mit einem erhöhten Risiko für thromboembolische Ereignisse einher. Die chronisch erhöhten Insulinspiegel bei diesen Patienten scheinen hierbei eine wichtige pathophysiologische Rolle zu spielen. Die Befunde sprechen dafür, dass neben den klassischen Risikofaktoren für Arteriosklerose beim Typ-II-Diabetiker auch spezifische Veränderungen des Gerinnungssystems das kardiovaskuläre Risiko erhöhen könnten (*Meigs et al. 2000*). Eine an gesunden Probanden durchgeführte Studie fand nach Glukoseexposition eine erhöhte Aktivität von Gewebsthromboplastin und des Plättchen-CD40-Liganden. Diese Befunde sprechen ebenfalls für einen spezifisch prokoagulatorischen Effekt von Hyperglykämie und Hyperinsulinämie (*Vaidyula et al. 2006*). Alles in allem scheinen in vivo prokoagulatorische Effekte chronischer Hyperglykämien wesentlich relevanter zu sein als eventuelle antikoagulatorische Wirkungen.

4.3.3. Einfluss der Plasmaosmolarität auf die Thrombozytenfunktion

Um einen durch die Zugabe der Testsubstanzen bedingten osmotischen Effekt auf die Thrombozyten und Erythrozyten im Sinne einer intrazellulären Dehydratation auszuschließen, wurden für alle Proben die Thrombozyten- und Erythrozytenindices bestimmt. Es konnte hierbei keinerlei Veränderung im Vergleich zur sogenannten Nullgruppe, bei der nur ein äquivalentes Volumen physiologischer Kochsalzlösung zu den Proben gegeben wurde, festgestellt werden.

Der Einfluss hyperosmolarer Milieus auf Erythrozyten und Thrombozyten scheint sich jedoch nicht nur auf Effekte der Osmose von Wasser durch die Zellmembran zu beschränken.

Ein osmolarer Schock durch Zugabe von NaCl oder Saccharose führt wie oxidativer Stress bei Erythrozyten und Thrombozyten zum intrazellulären Kalziumeintritt und zur Ceramidbildung. Auch kommt es zum sogenannten "scrambling" der Zellmembran mit konsekutiver Exposition von Phosphatidylserin an der Membranaußenseiten. Diese Prozesse entsprechen einer prokoagulatorischen Transformation der Thrombozyten. Interessanterweise wird diese Thrombozytentransformation durch die Anwesenheit von Harnstoff wesentlich abgeschwächt. Welche physiologische Bedeutung dies hat, ist unklar. Möglicherweise wird durch die Anwesenheit höherer Harnstoffkonzentrationen im hyperosmolaren Nierenmark eine Thrombose der Vasa recta verhindert (*Gatidis et al. 2010*).

4.4. Die urämische Koagulopathie als Thrombopathie

Die Thrombozytenfunktion kann heute routinemäßig mittels des PFA-100 untersucht werden, wobei die Plättchenadhäsion am Subendothel dadurch simuliert wird, dass die Testmembran des PFA-100 mit Kollagen beschichtet ist. Die Plättchenaggregation wird wahlweise durch Epinephrin (Adrenalin) oder ADP ausgelöst. Das ROTEM erlaubt die Untersuchung der Wechselwirkung von Thrombozyten und plasmatischen Gerinnungsfaktoren. Dass die Thrombozyten für die Festigkeit des Fibringerinnsels eine entscheidende Rolle spielen, wird beim Vergleich der im EXTEM erzielten Clotfestigkeit mit der im FIBTEM erzielten deutlich: die nach funktioneller Ausschaltung der Thrombozyten im FIBTEM erreichte maximale Clotfestigkeit liegt signifikant unter der im EXTEM erzielten (*Lang u. von Depka 2006*).

Da die urämische Koagulopathie in der Literatur im Wesentlichen als eine erworbene Thrombozytopathie angesehen wird (*siehe Hörl 2006*), sollen die Ergebnisse der Studie auch unter diesem Aspekt diskutiert werden.

4.4.1. Untersuchung der Thrombozytenaggregation mittels PFA-100 in Vollblutproben nach Exposition mit Harnstoff, Glukose, Kreatinin und Guanidinbernsteinsäure

Die Zugabe von Harnstoff, Glukose oder Kreatinin führte in dieser Arbeit zu einem geringfügigen Anstieg der mittleren Verschlusszeiten im PFA-100-Kollagen-Epinephrintest. Dieser war in der Kreatinigruppe am deutlichsten, allerdings auch mit der größten Streuung der Messwerte. Insgesamt wurde in keinem Untersuchungsansatz ein statistisch belastbares Signifikanzniveau erreicht, so dass die Schlussfolgerung, die Zugabe der o.g. Testsubstanzen würde die Thrombozytenadhäsion und/oder -aggregation im PFA-100-Epinephrintest beeinträchtigen, nicht gezogen werden kann.

Die Zugabe von GBS hingegen führte zu einer leichten Abnahme der Verschlusszeiten im PFA-100-Kollagen-Epinephrintest, was im Widerspruch zur These stehen würde, dass GBS eine die Thrombozytenadhäsion und/oder -aggregation behindernde Thrombozytenfunktionsstörung auslöst. Die Ergebnisse waren jedoch auch hier nicht statistisch signifikant. Es muss in Frage gestellt werden, ob der PFA-100-Epinephrintest für den Nachweis einer subtilen, durch GBS bedingten Störung der Thrombozytenadhäsion und -aggregation geeignet ist. Obwohl sich der PFA-100-Epinephrintest mehreren Studien zufolge als Suchtest für ein erhöhtes Blutungsrisiko bei urämischen Patienten eignet, wäre der PFA-100-Kollagen-ADP-Test möglicherweise eine sinnvolle Ergänzung gewesen, denn mehrere Arbeiten weisen darauf hin, dass GBS die ADP-stimulierte Thrombozytenaggregation vermindert. (*Horowitz et al. 1967 u 1970*). GBS verursacht, wie in Kapitel 4.4.4. ausführlich dargestellt werden wird, die Thrombozytenfunktion wahrscheinlich nicht direkt, sondern durch erhöhte NO-Konzentrationen. Die vermehrte NO Produktion im Endothel ist wiederum eine Folge erhöhter GBS-Konzentration im Blut urämischer Patienten (*Noris und Remuzzi 1999*). Es scheint deshalb schlüssig, dass die einfache Zugabe von GBS zu einer Blutprobe *in vitro* die Thrombozytenfunktion nicht beeinträchtigt. Untersuchungen im PFA-100 mit Zusatz von NO zu den Blutproben könnten in diesem Zusammenhang einen interessanten Untersuchungsansatz darstellen.

4.4.2. Störungen der Thrombozytenadhäsion bei urämischen Patienten

Die Auslösung der Thrombozytenadhäsion mit nachfolgender Aggregation stellt ein komplexes Geschehen dar. Es spielen sowohl elektrostatische als auch rezeptorvermittelte Wechselwirkungen mit verschiedenen subendothelial lokalisierten Liganden eine Rolle (*Langer und Gawaz 2010*).

Thrombozyten urämischer Patienten haben einen verminderten Gehalt an GPIIb/IIIa-Rezeptoren. Dieser Rezeptor vermittelt die Interaktion der Thrombozyten mit dem Von-Willebrand-Faktor (vWF) (*Sloand et al. 1991, Hörl 2006*). Der Rezeptor wird bei Urämikern infolge erhöhter Plasmakonzentrationen proteolytischer Enzyme wie Plasmin und Thrombin verstärkt abgebaut. Das hieraus resultierende proteolytische Abbauprodukt Glycocalicin konkurriert zusätzlich am selben Rezeptor mit dem vWF (*vgl. Sloland et al. 1991, Mezzano et al. 1996, Himmelfarb et al. 1999, Hörl 2006*).

Es wurden außerdem Veränderungen in der Struktur des vWF von Urämiepatienten (*Deykin 1983, Casonato et al. 2001, Gralnick et al. 1988, Hörl 2006*) gefunden. Die klinische Bedeutung dieser Befunde wird dadurch unterstrichen, dass eine Behandlung des urämischen Patienten mit Medikamenten wie Desmopressin, die zu einer Erhöhung der Konzentration des vWF oder des vWF-Faktor-VIII-Komplexes führen, den Adhäsionsdefekt der Thrombozyten kompensieren kann und die Blutungszeit bei diesen Patienten verkürzt (*Lee et al. 2010, Galbusera et al. 2009, Kaufmann und Vischer 2003, Chen et al. 1997, Shapiro u. Kelleher 1984, Manucci et al. 1983*).

4.4.3. Störungen der Thrombozytenaggregation bei urämischen Patienten

Bei urämischen Patienten ist sowohl die Blutungszeit verlängert als auch Thrombozytenaggregation beeinträchtigt (*Steiner et al. 1979, Horowitz et al. 1970, Noris und Remuzzi 1999, Lee et al. 2010, Soyoral et al. 2012*). Die Ursachen sind auch hier vielfältig: Eine verminderte Thromboxansynthese von Thrombozyten urämischer Patienten wurde beschrieben. Die Thromboxanproduktion konnte nicht durch Stimulation mit Thrombin normalisiert werden. Es wurde auf Grund dieser Daten ein Cyclooxygenasedefekt in den Thrombozyten urämischer Patienten vermutet (*Remuzzi et al. 1983, Smith und Dunn 1981, Hörl 2006*). Neben der verminderten Bildung von Thromboxan können bei urämischen Patienten erhöhte Konzentrationen des antiaggregatorisch wirkenden Prostacyclins (PGI₂) beobachtet werden (*Remuzzi et al. 1977, Kyrle et al. 1988, Hörl 2006*). In vitro kann in Endothelzellen die

Produktion von PGI₂ durch Zugabe von Urämikerplasma stimuliert werden (*Defreyn et al. 1980, Hörl 2006*).

Als Ursache für die verminderte Thrombozytenaggregation wird neben einer verminderten Expression unter Stimulationsbedingungen auch eine Konformationsänderung des GPIIb/IIIa-Komplexes diskutiert (*Gawaz et al. 1994, Hörl 2006*). In der Tat ist die Bindung von vWF und Fibrinogen an Glycoproteine stimulierter Thrombozyten bei urämischen Patienten vermindert. (*Benigni et al. 1993, vgl Hörl 2006*). Da die Peritonealdialyse, welche die sogenannten Mittelmoleküle wesentlich effektiver eliminiert als die Hämodialyse (*Pietrzak et al. 2001, Lindsay et al. 1975, Lindsay et al. 1976, Lindsay et al 1978, vgl Hörl 2006*), auch wesentlich wirksamer bei der Korrektur der urämischen Thrombozytopathie ist, werden die auslösenden Faktoren der urämischen Thrombopathie in der genannten Stoffgruppe vermutet. Es wurden sowohl Untersuchungen durchgeführt, welche die Plasmakonzentration bestimmter Urämietoxine wie Kreatinin oder Methylguanidin in Beziehung zum Ausmaß der Thrombozytenfunktionsstörungen setzten (*Pietrzak et al. 2001*), als auch Untersuchungen in denen Thrombozyten gesunder Probanden mit Plasma urämischer Patienten oder isoliert mit bestimmten Urämietoxinen inkubiert wurden. So sollen Methylguanidin, GBS, Phenole und Hydroxyphenylelessigsäure in urämietyptischen Konzentrationen in vitro die Bindung von Fibrinogen an den GPIIa/IIIb-Rezeptor-Komplex vermindern. (*Sohal et al. 2006 vgl. Hörl 2006*) In einer Arbeit von VONEND et al. (1975) konnte hingegen keine Beeinflussung gesunder Thrombozyten durch Inkubation mit Urämikerplasma, Harnstoff, Kreatinin, Phenylalanin, Indikan, GBS und Guanidinessigsäure nachgewiesen werden. Eine Thrombozytenfunktionsstörung ließ sich jedoch tierexperimentell durch eine bilaterale Nephrektomie auslösen, woraus die Autoren auf das Vorhandensein eines oder mehrerer unbekannter Urämietoxine schlossen.

Wie bereits in Kapitel **4.4.1.** erwähnt, ist in der Urämie die ADP-stimulierte-Thrombozytenaggregation gestört (*Horowitz et al. 1970*). Hierfür scheinen u.a. erhöhte NO-Konzentrationen im Plasma urämischer Patienten verantwortlich zu sein. Für die verstärkte NO-Synthese ist die bei urämischen Patienten im Plasma in erhöhten Konzentrationen vorkommende GBS ein wichtiger pathogenetischer Faktor (*Noris u. Remuzzi 1999*). Auf diesen Zusammenhang wird in Kapitel **4.4.4.** noch näher eingegangen.

Während die o.g. Thrombozytenfunktionsstörungen erfolgreich durch eine Dialysebehandlung korrigiert werden können, bedarf die durch die Hyperphosphatämie des Urämitters bedingte Hemmung der thrombozytären Glycolyse und ATP-Bildung zu ihrer Korrektur in erster Linie einer phosphatsenkenden Therapie (*Albertazzi et al. 1985, vgl. auch Hörl 2006*).

Ein weiterer Faktor beim Zustandekommen von urämischen Blutungskomplikation ist der durch die Hämodialyse bedingte Kontakt der Thrombozyten mit bioinkompatiblen Membranmaterialien, der zu Defekten der Rezeptoren für vWF und Fibrinogen führt (*Sloand u. Sloand 1997, vgl Hörl 2006*).

4.4.4. Stickstoffmonoxid als Bindeglied zwischen verschiedenen Faktoren bei der Entstehung der urämischen Thrombozytopathie

Es hat sich als sehr schwierig, wenn nicht gar unmöglich erwiesen, eine eindeutige Korrelation zwischen der Konzentration der o.g. Urämietoxine (insbesondere Harnstoff, Kreatinin und GBS) und der Stärke und Häufigkeit urämischer Blutungskomplikationen herzustellen und dies unabhängig davon, ob eine erhöhte Konzentration der betreffenden Substanz als reiner Indikator für das Vorliegen einer Urämie (wie z.B. Kreatinin) oder nach bisherigen Erkenntnissen als direkt oder indirekt an der Pathogenese der urämischen Koagulopathie beteiligt (wie z.B. GBS) betrachtet werden muss.

Eine Substanz, für die sich jedoch diese Korrelation sehr anschaulich darstellen lässt, ist das Stickstoffmonoxid (NO). NO induziert eine vermehrte Bildung von cGMP in den Thrombozyten und wirkt so inhibierend auf deren Interaktion untereinander (*Radomski et al. 1990, Thuraisingham et al. 1997, Neri et al. 1998, vgl Hörl 2006*). Die NO-Produktionsrate von Thrombozyten urämischer Patienten ist im Vergleich zu der gesunder Probanden um das etwa Dreifache erhöht (*Noris et al. 1993, Noris und Remuzzi 1999, Brunini et al. 2003, vgl. Hörl 2006*). Die Aktivität der NO-Synthetase ist entsprechend erhöht (*Brunini et al. 2003, vgl. Hörl 2006*). Der Befund für Endothelzellen urämischer Patienten ist ähnlich. Ein Zusammenhang mit erhöhten Konzentrationen proinflammatorisch wirkender Zytokine wird vermutet (*Noris et al. 1993, Noris und Remuzzi 1999, Thuraisingham und Raine 1999, Descamps-Latscha et al. 1995, Pereira u. Dinarello 1994, Hörl 2006*). Für eine Beteiligung von NO an der Pathogenese der urämischen Koagulopathie sprechen weiterhin folgende Befunde:

- erhöhte NO-Konzentrationen in der Ausatemluft urämischer Patienten (*Matsumoto et al. 1999, vgl. Hörl 2006*),
- die Möglichkeit, eine Verlängerung der Blutungszeit und erhöhte cGMP-Spiegel experimentell oder klinisch durch Inhalation von NO zu induzieren (*Hogman et al. 1993, Gries et al. 1998, Hörl 2006*),

- die Tatsache, dass erhöhte Konzentrationen des NOS-Substrates L-Arginin die Plättchenaggregation hemmen und
- die Möglichkeit, eine gesteigerte NO-Produktion und parallel eine verlängerte Blutungszeit durch Infusion von NOS-Inhibitoren wie L-NMMA (N^G-Monomethyl-L-Arginin) zu normalisieren (*Remuzzi et al. 1990, Simon et al. 1995, Hörl 2006*).

Ex-vivo induziert NO an Thrombozyten eine verminderte Aggregabilität, eine verminderte Expression von P-Selektin und eine verminderte Bindung von Fibrinogen. Es wird vermutet, dass NO letztendlich seine aggregationshemmende Wirkung über eine verminderte Fibrinogenbindung über den GPIIb/IIIa-Rezeptor entfaltet (*Gries et al. 1998, Noris und Remuzzi 1999*).

Der Zusammenhang zwischen erhöhten Konzentration an GBS beim Urämiker, der gesteigerten NOS-Aktivität, der verlängerten Blutungszeit und der verminderten ADP-induzierten Plättchenaggregation wurde von Marina NORIS und Giuseppe REMUZZI zusammenfassend dargestellt. In der Tat ist L-Arginin nicht das einzige Ausgangssubstrat für die Bildung von NO. Auch GBS stimuliert die Bildung von NO. Im Gegensatz zu den meisten anderen urämietyptischen Guanidinverbindungen, die keinen Effekt auf die NO-Bildung in isolierten Rattenaorten zeigten, stimuliert GBS die NO-Bildung dosisabhängig. Die Vasodilatation dieser Aortenpräparate wird als Indikator für die NO-Bildung des Endothels genutzt. Sowohl die nach GBS-Gabe zu beobachtende Vasodilatation als auch die vermehrte Bildung von cGMP konnten durch NOS-Inhibitoren signifikant vermindert werden. (*Thomas u. Ramwell 1991, 1992, 1993*). Auch die Hemmung der ADP-induzierten Plättchenaggregation (*Horowitz et al. 1970, vgl Noris und Remuzzi 1999*) kann durch die Zugabe des NOS-Inhibitors N^ω-nitro-L-Arginin aufgehoben werden (*Macconi et al. 1999*). Auch konnte die gleiche Arbeitsgruppe einen signifikanten Effekt der Gabe von N^ω-nitro-L-Arginin auf die nach GBS-Infusion verlängerte Blutungszeit von Ratten zeigen. Bemerkenswert ist die Tatsache, dass die Gabe von konjugierten Östrogenen die Blutungszeit bei Urämikern reduziert und die Thrombozytenfunktion verbessern (*Liu et al. 1984, Livio et al. 1986, Viganò et al. 1988, Zoja et al. 1988, Heisteringer et al. 1990, Hörl 2006, Galbusera et al. 2009*). Gleichzeitig normalisieren konjugierte Östrogene die NO-Produktion bei Urämikern (*Bonazzola et al. 1998, Hörl 2006*). Die Infusion des NOS-Substrats L-Arginin hebt die positiven Östrogeneffekte auf und kann Blutungen induzieren (*Zoja et al. 1991, Hörl 2006*). All diese und weitere Befunde sprechen dafür, dass eine durch erhöhte GBS-Konzentrationen bedingte vermehrte NO-Produktion in der Urämie eine fundamentale Rolle bei der Entstehung der urämischen Koagulopathie spielt.

4.5. Weitere mögliche Ursachen der urämischen Koagulopathie

4.5.1. Die Thrombozytopenie bei Urämie

Eine gewisse Rolle spielt die bei Urämikern aus unterschiedlichen Gründen (Grundkrankheit, verminderte Thrombozytenhalbwertszeit, Zerstörung der Thrombozyten an Dialysemembranen) zu beobachtende **Thrombozytopenie**. Es werden allerdings nur selten Werte von 80000/ μ l unterschritten (*Hörl 2006*). Erkrankungen, die zu einer Niereninsuffizienz führen oder führen können und mit einer verminderten Thrombozytenzahl einhergehen, sind u.a. das hämolytisch urämische Syndrom, die Lupusvaskulitis, die thrombotisch-thrombozytopenische Purpura, die Sepsis und die disseminierte intravaskuläre Gerinnung, die Eklampsie oder eine Transplantatabstoßung (*Boccardo et al. 2004, Hörl 2006*). Eine mögliche Ursache für einen erhöhten Plättchenturnover ist eine vermehrte Phagozytose derselben durch Makrophagen. Dies wird vermutlich durch eine vermehrte Expression von negativ geladenem Phosphatidylserin auf der Thrombozytenoberfläche urämischer Patienten bewirkt (*Bonomini et al. 2001, Schroit et al 1985, Fadok et al. 1992 u. 1998, Hörl 2006*). Zu diskutieren wären auch die Wirkung der Urämietoxine auf das Knochenmark sowie der Mangel an EPO und Thrombopoetin (*Wirtz et al. 1992, McDonald et al. 1987, Cases et al. 1992, Kaupke et al. 1993, Papayannopoulou et al 1996*) (siehe auch Kapitel **4.5.2.**).

Da die heparininduzierten Thrombopenien vom Typ I und II normalerweise nicht mit Blutungskomplikationen assoziiert sind, werden sie hier nicht weiter diskutiert (*siehe Weismann u. Tobin 1958, Kelton 2002, Reilly 2003, Hörl 2006:142-143*).

Auch wenn die verminderte Thrombozytenzahl eine gewisse Rolle beim Zustandekommen der urämischen Koagulopathie spielen mag, scheint der entscheidende Faktor einer urämiebedingten Blutungsneigung die Störung der Plättchenfunktion zu sein (*Hörl 2006*).

4.5.2. Bedeutung der renalen Anämie

Ein weiterer, die Effizienz der Blutstillung beeinträchtigender Faktor ist die renale Anämie (*Turitto und Baumgartner 1979, Blasberg et al. 1983, Hörl 2006*). Ein Hämatokrit von >30% (*Vigano et al. 1991, Hörl 2006*) begünstigt die Annäherung der Thrombozyten an die Gefäßwand. Eine Korrektur der renalen Anämie z.B. durch Behandlung mit Erythropoetin oder die Transfusion von Erythrozytenkonzentraten wirkt sich nicht nur durch den Mechanismus der Thrombozytenmarginalisation im Blutstrom, sondern auch auf weiteren Wegen positiv auf die Blutungszeit aus: Erythropoetin stimuliert neben der Erythropoese auch die Freisetzung funktioneller Thrombozyten aus dem Knochenmark (*Maurin et al. 1995, Wirtz et al 1992, Hörl 2006*) und verbessert u.a. auch die verschiedenen funktionellen Parameter der Thrombozyten wie z.B. die Dichte des GPIIb/IIIa-Rezeptors (*Gawaz et al. 1994, Hörl 2006*) oder die Kalziummobilisation in den Thrombozyten (*Van Geet et al. 1990, Hörl 2006*). Die Transfusion von Erythrozyten wirkt sich positiv auf die Menge des zur Thrombozytenstimulation zur Verfügung stehenden ADPs aus (*Hellem et al. 1961, Gaarder et al. 1961, Born 1962, Born und Wehmeier 1979, Hörl 2006*). Zudem sind Erythrozyten in der Lage, das gerinnungshemmend und vasodilatatorisch wirkende Prostacyclin zu inaktivieren (*Hörl 2006*).

Die Tatsache, dass die Korrektur der renalen Anämie von Dialysepatienten durch die Behandlung mit Erythropoetin auch die Anzahl der unter der Dialyse auftretenden Blutungskomplikationen vermindert, weist u.a. auf die Bedeutung von Erythropoetin und eines ausreichenden Hämatokrits für eine effiziente Hämostase hin (*Moia et al. 1987, Noris und Ramuzzi 1999*).

4.5.3. Störungen der Kalziumhomöostase und die Rolle von cAMP

Kalziumionen sind nicht nur ein wichtiger Kofaktor für eine Reihe von Enzymen der plasmatischen Gerinnung, sie haben auch eine entscheidende Bedeutung bei der Regulation der Thrombozytenaktivierung (*Rink 1988, Ware et al. 1986*). Der bei urämischen Patienten typische Hyperparathyreodismus führt zu einer Reihe von Störungen in der Kalziumhomöostase, die auch die Thrombozyten betreffen. So ist in diesem Kontext die basale intrazelluläre Kalziumkonzentration der Thrombozyten erhöht (*Gura et al. 1982, Moosa et al. 1990, Van Geet et al. 1990, Hörl 2006*), die Kalziumfreisetzung nach Stimulation und die Thrombozytenaggregation jedoch gestört (*Ware et al. 1989, Zhou u. Vaziri 2002, Hörl 2006*). Die Resuspension betroffener Blutplättchen in Plasma gesunder Probanden beseitigt diesen Effekt

(Ware et al. 1989, Hörl 2006). Auch die intrazelluläre Konzentration von zyklischem AMP (cAMP), welche in Thrombozyten urämischer Patient erhöht ist (Vlachoyannis u. Schoeppe 1982, Hörl 2006), scheint in diesem Zusammenhang eine Rolle zu spielen. cAMP hemmt die Thrombozytenfunktion (Haslam u. Rosson 1975, Hörl 2006) und Parathormon stimuliert die cAMP-Produktion (Bogin et al. 1981). cAMP verhindert den Anstieg des zytosolischen Kalziums in den Thrombozyten nach Stimulation (Yamanishi et al. 1983). Parathormon scheint jedoch die Thrombozytenaggregation nicht direkt zu beeinflussen (Leithner et al. 1984). Das Ausmaß der Störung der thrombozytären Kalziumhomöostase wird auch durch den arteriellen Blutdruck mitbestimmt. Die effektive Senkung des Blutdrucks bei Hämodialysepatienten führt auch zu einer Senkung der intrathrombozytären Kalziumkonzentration (Schneider et al. 1974).

4.6. Schlussfolgerung

Die Vielfalt der bei urämischen Patienten oder in vitro unter Simulationsbedingungen erhobenen Befunde lässt vermuten, dass es sich bei der urämischen Koagulopathie nicht um ein monokausales sondern um ein komplexes Geschehen handelt. Eine Vielzahl von Faktoren begünstigt vermutlich die bei urämischen Patienten beobachtbare Blutungsneigung (*zusammenfassend in Hörl 2006*):

- der Erythropoetinmangel und die dadurch verursachte renale Anämie
- die bei Dialysepatienten häufige Thrombopenie
- die veränderte Fibrinstruktur
- die gestörte Thrombozyten-Endothelinteraktion bei
 - gestörter Thrombozytenadhäsion,
 - gestörtem Prostaglandinmetabolismus mit vermehrter Bildung von PGI₂
 - abnormem vWF
- funktionell-metabolische und strukturelle Veränderungen der Thrombozyten mit
 - vermindertem Substanzgehalt der dense bodies
 - vermindertem intrazellulärem Gehalt an Serotonin und ADP
 - erhöhtem intrazellulärem cAMP-Gehalt
 - gestörter Kalziumfreisetzung
 - verminderter Freisetzung von Thrombomodulin und alpha-Granula-Protein
 - anormalem Prostaglandinstoffwechsel der Thrombozyten
 - veränderter Bindungsaktivität des GPIIb-IIIa-Rezeptors
 - gestörter Interaktion der Thrombozyten untereinander
- medikamentöse Ursachen (Heparin, Betalactam-Antibiotika)
- erhöhte Stickstoffmonoxidkonzentrationen im Blut

Mögliche Störungen der Fibrinpolymerisation durch eine Interaktion von Harnstoff mit Faktor XIII wurden von KLINGEMANN und al. (1980) erstmals vermutet. Dieser Ansatz wurde später nicht weiterverfolgt, in der vorliegenden Arbeit jedoch wieder aufgegriffen. Anhand von ROTEM-Untersuchungen sollte nach Hinweisen auf eine derartige Wechselwirkung gesucht werden. Wie spätere Untersuchungen gezeigt haben, eignet sich das ROTEM prinzipiell gut zum Nachweis der Fibrinvernetzungsstörungen bei Vorliegen eines Faktor-XIII-Mangels. In

der hier vorgestellten Studie fanden sich jedoch keine Hinweise auf eine verminderte Clotfestigkeit nach Zugabe von Harnstoff oder den Vergleichssubstanzen Glukose und Kreatinin. Auch die Zugabe von GBS führte zu keiner Verminderung der Clotfestigkeit oder Lyseresistenz im ROTEM. Möglicherweise könnten jedoch eine längere Beobachtung des Fibrinclots (über mindestens zwei Stunden) bei höheren Harnstoffkonzentrationen und die Zugabe von Kalziumionen und Streptokinase zur sensitiveren Erfassung der Fibrinolyse im ROTEM doch noch Hinweise auf eine verminderte Clotfestigkeit und verminderte Lyseresistenz liefern.

Die Untersuchung der Thrombozytenfunktion im PFA-100-Kollagen-Epinephrintest ergab keine Hinweise auf eine Beeinträchtigung der Thrombozytenadhäsion an Kollagen oder der epinephrinstimulierten Thrombozytenaggregation durch Harnstoff, Glukose, Kreatinin oder GBS. Der PFA-100-Kollagen-ADP-Test wäre möglicherweise eine sinnvolle diagnostische Ergänzung gewesen, da GBS vor allem die ADP induzierte Thrombozytenaggregation vermindert (*Horowitz et al. 1967, Norris u. Remouzzi 1999*). Dass Harnstoff selbst keinen Einfluss auf die Thrombozytenfunktion im PFA-100-Kollagen-Epinephrintest sowie den PFA-100-ADP-Test hat, wird auch durch eine von G.E. LINTHORST 2010 veröffentlichte Studie der Thrombozytenfunktion an fünf Patienten mit familiärer Azotämie bestätigt. Die Thrombozytenfunktion erwies sich bei allen Patienten trotz hoher Harnstoffkonzentrationen bei ansonsten intakter Nierenfunktion als normal (*Linthorst et al. 2010*). Trotz der negativen Befunde im PFA-100-Kollagen-Epinephrintest für GBS gibt es, wie weiter oben ausgeführt eine Vielzahl von experimentellen und klinischen Studien, die darauf hindeuten, dass die urämische Koagulopathie bei aller Vielfalt der möglichen Ursachen im Wesentlichen auf die **plättchenadhäsions- und -aggregationshemmende Wirkung von NO** zurückzuführen ist. **GBS ist in der Lage, die NO-Produktion dosisabhängig zu stimulieren. Die GBS-Produktion ist aber wiederum das Resultat der erhöhten Harnstoffkonzentrationen im Blut urämischer Patienten.** Leider erfolgte in der o.g. Studie von LINTHORST et al. keine Messung der GBS und NO-Metaboliten-Konzentrationen im Blut der Patienten mit familiärer Azotämie. Da bei diesen Patienten lediglich die Harnstoffclearance, nicht jedoch die Kreatininclearance beeinträchtigt war, ist anzunehmen, dass gleichfalls eine normale Clearance für sogenannte Mittelmoleküle wie GBS bestand, so dass diese, falls sie infolge der erhöhten Harnstoffspiegel in der Leber gebildet wurde, wahrscheinlich nicht akkumulieren konnte. **Insofern steht die zuletzt genannte Studie keineswegs im Widerspruch zu der Schlussfolgerung, dass es indirekt doch die erhöhte Harnstoffkonzentration in der Urämie ist, die die urämische Koagulopathie zumindest mitverursacht.**

Auf der Grundlage der hier vorgestellten eigenen Daten und der diskutierten Literatur lassen u.a. folgende Schlussfolgerungen für die Praxis ziehen:

1. Im ROTEM gab es keinen Anhaltspunkt auf eine Störung der Fibrinpolymerisation durch Harnstoff, Glukose, Kreatinin oder GBS. Dies schließt aber nicht aus, dass Harnstoff möglicherweise doch in geringem Maße als Falschsubstrat für Faktor XIII wirkt.
2. Das ROTEM ist möglicherweise nicht als sensitive Nachweismethode einer urämischen Koagulopathie geeignet.
3. Im PFA-100-Kollagen-Epinephrintest wurde keine Beeinträchtigung der Plättchenfunktion in vitro durch die o.g. Substanzen festgestellt. Der PFA-100-Kollagen-ADP-Test wäre vermutlich besser geeignet gewesen, wurde aber in dieser Studie nicht verwendet. Weitere Untersuchungen in dieser Richtung wären wünschenswert.
4. Erhöhte Harnstoffkonzentration im Blut sollten bei niereninsuffizienten Patienten an die Möglichkeit einer urämiebedingten Blutungsneigung denken lassen.
5. Zur Vorhersage einer möglichen urämiebedingten Blutungsneigung eignen sich bedingt die Blutungszeit nach Ivy sowie Thrombozytenfunktionsanalysen mit dem PFA-100, wobei der PFA-100-Kollagen-Epinephrin-Test und der PFA-100-Kollagen-ADP-Test parallel eingesetzt werden sollten.
6. Die wichtigste Säule der Prophylaxe urämiebedingter Blutungen bei medizinischen Eingriffen ist eine wirksame Dialysebehandlung, wobei die Peritonealdialyse als besonders effektiv in der Elimination von Mittelmolekülen wie der GBS beschrieben wird.
7. Eine Behandlung urämischer Patienten mit Erythropoetin vermindert ebenfalls deren Blutungsrisiko sowohl durch die Korrektur der renalen Anämie als auch durch spezifische Effekte des Erythropoetins auf die Thrombozyten.
8. Für die Behandlung urämiebedingter Blutungen kann der Einsatz von Desmopressin und konjugierten Östrogenen erwogen werden. Die Verträglichkeit von NOS-Inhibitoren wie L-NMMA (N^G-Monomethyl-L-Arginin) ist noch nicht ausreichend untersucht worden und deshalb bislang nicht für die klinische Anwendung geeignet.

Obwohl in der hier vorgestellten Studie im ROTEM keine Hinweise auf eine Störung der Fibrinclotstabilisation durch Faktor XIII nach Zugabe von Harnstoff gefunden wurden, wäre es sicher verfrüht, diese Hypothese vollständig zu verwerfen. Weitere Untersuchungen wären notwendig, um die Frage abschließend zu klären.

5. Literatur

AJ Drake-Holland, MIM Noble: Development of the damaged glycocalyx hypothesis – A Review. *Cardiovasc Disord Med* **2018**; 3(2): 1-3

Albertazzi A, Spisni C, Palmieri PF, Ruzzi L, Di Guglielmo R, Di Filippo L, Evangelista M: Decreased factor XIII availability for thrombin and early loss of clot firmness in patients with unexplained intraoperative bleeding. *Anesth Analg* **2004**; 99: 1564-9

Albertazzi A, Spisni C, Palmieri PF, Ruzzi L, Di Guglielmo R, Di Filippo L, Evangelista M: Nucleotide deficit and functional platelet alterations in patients on regular dialysis treatment (RDT). *Life Support Syst* **1985**; 3 (Suppl 1): 77-81

Barthels M, von Depka M: Das Gerinnungskompodium: Schnellorientierung, Befundinterpretation, klinische Konsequenzen. Thieme Stuttgart, New York **2002**

Bedreli S, Sowa JP, Malek S, Blomeyer S, Katsounas A, Gerken G, Saner FH, Canbay A: Rotational thromboelastometry can detect factor XIII deficiency and bleedingdiathesis in patients with cirrhosis. *Liver Int* **4/2017**; 37(4): 562-568

Benigni A, Boccardo P, Galbusera M, Monteagudo J, De Marco L, Remuzzi G, Ruggeri ZM: Reversible activation defect of the platelet glycoprotein IIb-IIIa complex in patients with uremia. *Am J Kidney Dis* **1993**; 22: 668-676

Blasberg P, Wurzinger LJ, Schmidt-Schönbein H: Microheology of thrombocyte deposition: effect of stimulation, flow direction, and red cells; in: Schettler G, Nerem RM, Schmidt-Schönbein H, Mörl H, Diehm C (eds) *Fluids dynamics as a localizing factor for atherosclerosis*. Springer Berlin, Heidelberg, New York **1983**: 103-105

Boccardo P, Remuzzi G, Galbusera M: Platelet dysfunction in renal failure. *Semin Thromb Hemost* **2004**; 30: 879-89

Bogin E, Massry SG, Harary I: Effect of parathyroid hormone on rat heart cells. *J Clin Invest* **1981**; 67: 1215-1227

Bonazzola S, Noris M, Todeschini M, Zappella S, Zoja C, Corna D, Gaspari F, Marchetti G, Remuzzi G: 17 β -estradiol fully corrects abnormal primary hemostasis in experimental uremia by effectively limiting vascular endothelial overexpression of nitric oxide forming enzymes. *J Am Soc Nephrol*. **1998**; 9: 3088

Bonomini M, Sirolli V, Reale M, Arduini A : Involvement of phosphatidylserine exposure in the recognition and phagocytosis of uremic erythrocytes. *Am J Kidney Dis* **2001**; 37: 807-814

Born GV: Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature* **1962**; 194: 927-929

Born GV, Wehmeier A: Inhibition of platelet thrombus formation by chlorpromazine acting to diminish haemolysis. *Nature* **1979**; 282: 212-213

Brady HR, Brenner BM: Akutes Nierenversagen; in Dietel M, Dudenhausen J, Suttrop N: *Harrisons Innere Medizin 2*. Berlin, ABW Wissenschaftsverlag **2003**; 15. Aufl.: 1694-1703

Brunini TM, Yaqoob MM, Novaes Malagris LE, Ellory JC, Mann GE, Mendes Ribeiro A: Increased nitric oxide synthesis in uraemic platelets is dependent on L-arginine transport via system y(+)_L. *Pflügers Arch* **2003**; 445: 547-550

Burrin JM, Price CP: Measurement of blood glucose. *Ann clin Biochem* **1985**; 22: 327-342

Calatzis A, Spannagl M, Vorweg M: ROTEM Analyse Zielgerichtete Behandlung akuter Hämostasestörungen - Leitfaden ROTEM®-Analyse. <https://www.matel.org/assets/downloads/rotem/08-rotem-leitfaden-german.pdf> (08/2013) (download 10.10.2018)

- Calatzis A, Calatzis A, Fritzsche P, Kling M, Hipp R, Stemberger A:** An analysis of correlation of the RoTEG coagulation analyser and the Hellige thrombelastograph. *Ann Hematol* **1996**; 72 (Suppl I): 87
- Calatzis A, Fritzsche P, Calatzis A, Kling M, Hipp R, Stemberger A:** A comparison of the technical principle of the RoTEG coagulation analyser and conventional thrombelastographic systems. *Ann Hematol* **1996**; 76 (Suppl): 90
- Calatzis AN, Fritzsche P, Kling M., Calatzis AL, Mielke L, Stemberger A:** A new technique for fast and specific coagulation monitoring. *European Surgical Research* **1996**; 28, Suppl (I): 47-8
- Cannon WB:** *The Wisdom of the Body*. W. W. Norton Co., New York **1932**
- Cases A, Escolar G, Reverter JC, Ordinas A, Lopez-Pedret J, Revert L, Castillo R:** Recombinant human erythropoietin treatment improves platelet function in uremic patients. *Kidney Int* **1992**; 42: 668-672
- Casonato A, Pontara E, Vertolli UP, Steffan A, Durante C, De Marco L, Sartorello F, Girolami A:** Plasma and platelet von Willebrand factor abnormalities in patients with uremia: lack of correlation with uremic bleeding. *Clin Appl Thromb Hemost* **2001**; 7 : 81-86
- Chen KS, Huang CC, Leu ML, Deng P, Lo SK:** Hemostatic and fibrinolytic response to desmopressin in uremic patients. *Blood Purif* **1997**; 15(2): 84-91
- Cheung WW, Paik KH, Mak RH:** Inflammation and cachexia in chronic kidney disease. *Pediatr Nephrol* **4/2010**; 24(4): 711-24
- Clauss A:** Gerinnungsphysiologische Schnellmethode zur Bestimmung des Fibrinogens . *Acta haemat (Basel)* **1957**; 17: 237-46
- Constantinescu AA, Vink H, Spaan JA:** Endothelial cell glycocalyx modulates immobilization of leukocytes at the endothelial surface. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **2003**; 23: 1541-1547
- Corin, E., Anisiaux, G:** Untersuchungen über Phosphorvergiftungen. *Vierteljahresschr Gerichtl Med öffentl Sanitätswesen* **1894**; 7: 80-95
- Davidson CJ, Tuddenham EG, McVey JH:** 450 million years of hemostasis. *J Thromb Haemost* **2003**; 1: 1487-94
- Davie EW, Ratnoff, OD:** Waterfall sequence for intrinsic blood clotting. *Science* **1964**; 145: 1310-1312
- De Deyn PP, Vanholder R, Eloot S, Glorieux G:** Guanidino compounds as uremic (neuro)toxins. *Semin Dial* **2009**; 22(4): 340-5
- Defreyn G, Dauden MV, Machin SJ, Vermynen J:** A plasma factor in uraemia which stimulates prostacyclin release from cultured endothelial cells. *Thromb Res* **1980**; 19: 695-699
- Desatre A:** Fibrinolyse dans le sang. *Arch Physiol Norm Pathol* **1893**; 5: 661-663
- Descamps-Latscha B, Herbelin A, Nguyen AT, Roux-Lombard P, Zingraff J, Moynot A, Verger C, Dahmane D, de Groote D, Jungers P:** Balance between IL-1 beta, TNF-alpha, and their specific inhibitors in chronic renal failure and maintenance dialysis. Relationships with activation markers of T cells, B cells, and monocytes. *J Immunol* **1995**; 154: 882-892
- Deutsch DG, Mertz ET:** Plasminogen: Purification from human plasma by affinity chromatography. *Science* **1970**; 170: 1095 -1096
- Deykin D:** Uremic bleeding. *Kidney Int* **1983**; 24: 698-705
- Dittami S:** Shapiro-Wilk Normality Test. sdittami.altervista.org/shapiro-test/Shapiro-test.html (**2009**)
- Dobbelstein H, Edel HH, Schmidt M, Schubert G, Weinzierl M:** Guanidinbernsteinsäure und Urämie I Klinische Untersuchungen. *Klin Wochenschr* **1971**; 49: 348-357

- Dobbelstein H, Grunst J, Schubert G, Edel HH:** Guanidinbernsteinsäure und Urämie II Tierexperimentelle Befunde. *Klin Wochenschr* **1971**; 49: 1077-1083
- Domsch Ch, Müller-Beißenhirtz, Spannagl M:** Einsatz des PFA-100 bei angeborenen und erworbenen hämorrhagischen Diathesen. *Hämostaseologie* **1999**; 19: 176-81
- Doolittle RF:** Fibrinogen and Fibrin. *Ann Rev Biochem* **1984**; 53: 195-229
- Duranton F, Cohen G, De Smet R, Rodriguez M, Jankowski J, Vanholder R, Argiles A; European Uremic Toxin Work Group:** Normal and pathologic concentrations of uremic toxins. *J Am Soc Nephrol* **7/2012**; 23: 1258-70
- Estcourt LJ, Birchall J, Allard S, Stephen J, Bassey SJ, Hersey P, Kerr JP, Mumford AD, Stanworth SJ, Tinegate H on behalf of the British Committee for Standards in Haematology:** Guidelines for the use of platelet transfusions. *Br J Haematol* **2017**; 176(3): 365-394
- Fadok VA, Bratton DL, Frasch SC, Warner ML, Henson PM:** The role of phosphatidylserine in recognition of apoptotic cells by phagocytes. *Cell Death Differ* **1998**; 5: 551-562
- Fadok VA, Savill JS, Haslett C, Bratton DL, Doherty DE, Campbell PA, Henson PM:** Different populations of macrophages use either the vitronectin receptor or the phosphatidylserine receptor to recognize and remove apoptotic cells. *J Immunol* **1992**; 149: 4029-4035
- Fickenscher K, Aab A, Stüber W:** A photometric assay for blood coagulation factor XIII. *Thromb Haemost* **1991**; 65(5): 535-40
- Fleck RA1, Rao LV, Rapaport SI, Varki N:** Localization of human tissue factor antigen by immunostaining with monospecific, polyclonal anti-human tissue factor antibody. *Thromb Res* **1990**; 59(2): 421-37
- Frei U, Schober-Halstenberg H -J:** Nierenersatztherapie in Deutschland: Bericht über Dialysebehandlung und Nierentransplantation in Deutschland 2006/2007. *QuaSi-Niere gmbH* **2008**; ISBN 3-9809996-3-7 c: 35
- Fressinaud E, Veyradier A, Sigaud M, Boyer-Neumann C, Le Boterff C, Meyer D:** Therapeutic monitoring of von Willebrand disease: interest and limits of a platelet function analyser at high shear rates. *Br J Haematol* **1999**; 10: 777-83
- Fressinaud E, Veyradier A, Truchaud F, Martin I, Boyer-Neumann C, Trossaert M, Meyer D:** Screening for von Willebrand disease with a new analyser using high shear stress. *Blood* **1998**; 91: 1325-31
- Friedhoff LT, Sonenberg M:** The membrane potential of human platelets. *Blood* **1983**; 61: 180-185
- Gaarder A, Jonsen J, Laland S, Hellem A, Owren PA:** Adenosine diphosphate in red cells as a factor in the adhesiveness of human blood platelets. *Nature* **1961**; 192: 531-532
- Galbusera M, Remuzzi G, Boccardo P:** Treatment of Bleeding in Dialysis Patients. *Seminars in Dialysis* **2009**; 22 (3): 279-286
- Gatidis S, Borst O, Föller M, Lang F:** Effect of osmotic shock and urea on phosphatidylserine scrambling in thrombocyte cell membranes. *Am J Physiol Cell Physiol* **2010**; 299(1): C 111-8
- Gawaz M:** *Blood Platelets: Physiology, Pathophysiology, Membrane Receptors, Antiplatelet Principles, and Therapy for Arterothrombotic Diseases.* Thieme Stuttgart, New York **2001**: 4
- Gawaz MP, Dobos G, Spath M, Schollmeyer P, Gurland HJ, Mujais SK:** Impaired function of platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa in end-stage renal disease. *J Am Soc Nephrol* **1994**; 5: 36-46
- Gralnick HR, McKeown LP, Williams SB, Shafer BC, Pierce L:** Plasma and platelet von Willebrand factor defects in uremia. *Am J Med* **1988**; 85: 806-810

- Gries A, Bode C, Peter K, Herr A, Bohrer H, Motsch J, Martin E:** Inhaled nitric oxide inhibits human platelet aggregation, P-selectin expression, and fibrinogen binding in vitro and in vivo. *Circulation* **1998**; 97:1481-1487
- Gross CG:** Claude Bernard and the Constancy of the internal Environment. *The Neuroscientist* **1998**;4(5): 380-385
- Guder WG:** Niere und ableitende Harnwege in Greiling H, Gressner AM (Hrsg) Lehrbuch der klinischen Chemie und Pathobiochemie. Schattauer; Stuttgart, New York **1989**; 2. Aufl.: 574-577
- Guder WG:** Niere und ableitende Harnwege in Greiling H, Gressner AM (Hrsg) Lehrbuch der klinischen Chemie und Pathobiochemie. Schattauer; Stuttgart, New York **1989**; 2. Aufl.: 581-583
- Guder WG:** Niere und ableitende Harnwege in Greiling H, Gressner AM (Hrsg) Lehrbuch der klinischen Chemie und Pathobiochemie. Schattauer; Stuttgart, New York **1989**; 2. Aufl.: 578-580
- Guder WG, Hoffmann GE, Hubbuch A, Poppe WA, Seidel J, Price CP:** Multicenter evaluation of an enzymatic method for creatinin determination using a sensitive colour reagent. *J Clin Chem Clin Biochem* **1986**; 24: 889-902
- Gura V, Creter D, Levi J:** Elevated thrombocyte calcium content in uremia and its correction by 1 alpha (OH) vitamin D treatment. *Nephron* **1982**; 30: 237-239
- Gwet KL:** The Wilcoxon Non Parametric Tests MS Excel (Windows and Mac). Advanced Analytics LLC, Gaithersburg **2012**
- Harms V:** Biomathematik, Statistik und Dokumentation. Harms Verlag Kiel **1992**; 2. Aufl: 97-110
- Harms V:** Biomathematik, Statistik und Dokumentation. Harms Verlag Kiel **1992**; 2. Aufl: 204-206
- Harr JN, Moore EE, Chin TL, Chapman MP, Ghasabyan A, Stringham JR, Banerjee A, Si-lliman CC:** Viscoelastic hemostatic fibrinogen assays detect fibrinolysis early. *Eur J Trauma Emerg Surg* **2015**; 41(1): 49-56
- Hartert H:** Blutgerinnungsstudien mit der Thrombelastographie, einem neuen Untersuchungsverfahren. *Klinische Wochenschrift* **1948**; 26: 577-583
- Haslam RJ, Rosson GM:** Effects of adenosine on levels of adenosine cyclic 3',5'-monophosphate in human blood platelets in relation to adenosine incorporation and platelet aggregation. *Mol Pharmacol* **1975**;11: 528-544
- Heisting M, Stockenhuber F, Schneider B, Pabinger I, Brenner B, Wagner B, Balcke P, Lechner K, Kyrle PA:** Effect of conjugated estrogens on platelet function and prostacyclin generation in CRF. *Kidney Int* **1990**; 38: 1181-1186
- Hellem AJ, Borchgrevink CF, Ames SB:** The role of red cells in hemostasis : the relation between haematocrit, bleeding time and platelet adhesiveness. *Br J Haematol* **1961**; 7: 42-50
- Himmelfarb J, Nelson S, McMonagle E, Holbrook D, Benoit SE, Michelson AD, Ault K:** Elevated plasma glycoalbumin levels and decreased ristocetin-induced platelet agglutination in hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis* **1998**; 32: 132-138
- Hoffman M, Monroe DM:** A Cell-based Model of Haemostasis. *Thromb Haemost* **2001**; 85: 958-65
- Hogman M, Frostell C, Arnberg H, Hedenstierna G:** Bleeding time prolongation and NO inhalation. *Lancet* **1993**; 341: 1664-1665
- Honda H, Qureshi AR, Heimbürger O, Barany P, Wang K, Pecoits-Filho R, Stenvinkel P, Lindholm B:** Serum albumin, C-reactive protein, interleukin 6, and fetuin A as predictors of malnutrition, cardiovascular disease, and mortality in patients with ESRD. *Am J Kidney Dis*. 1/**2006**; 47(1): 139-48
- Hörl WH:** Thrombozytopathie und Blutungskomplikationen bei Urämie, Platelet dysfunction in Uremia. *Wiener Klinische Wochenschrift*, Springer Wien 4/**2006**;118: 134-150

- Horowitz HI, Cohen BD, Martinez P, Papayoanou MF:** Defective ADP-induced platelet factor 3 activation in uremia. *Blood* **1967**; 30: 331
- Horowitz HI, Stein IM, Cohen BD, White JG:** Further studies on the platelet-inhibitory effect of guanidinosuccinic acid and its role in uremic bleeding. *Am J Med* **1970**;49: 336-345
- Ivaskevicius V, Biswas A, Bevans C, Schroeder V, Kohler HP, Rott H, Halimeh S, Petrides PE, Lenk H, Krause M, Mitterski B, Harbrecht U, Oldenburg J:** Identification of eight novel coagulation factor XIII subunit A mutations: implied consequences for structure and function. *Haematologica*. 6/2010; 95(6): 956–962
- Jafte JH, Laing DR:** Changes of digestive tract in uremia. *Arch. Int. Med* **1934**; 53: 851
- Joannidis M, Metnitz B, Bauer P, Schusterschitz N, Moreno R, Druml W, Metnitz PG:** Acute kidney injury in critically ill patients classified by AKIN versus RIFLE using the SAPS 3 database. *Intensive Care Med*. 10/2009; 35(10):1692-702
- Joint British Diabetes Societies Inpatient Care Group: The management of the hyperosmolar hyperglycaemic state (HHS) in adults with diabetes.** http://www.diabetologists-abcd.org.uk/JBDS/JBDS_IP_HHS_Adults.pdf **2012**, (uploaded 10.10.2018)
- Jurk K, Kehrel BE:** Trombozytensekretion in Pötzsch B (Hrsg), Madlener K (Hrsg): Hämostaseologie. Springer Berlin, Heidelberg **2010**; 2.Aufl.: 67-72
- Kanaji S, Fahs SA, Shi Q, Haberichter SL, Montgomery RR:** Contribution of platelet vs. endothelial VWF to platelet adhesion and hemostasis. *J Thromb Haemost* **2012**; 10(8): 1646-52
- Karges HE:** Blood coagulation F XIII: determination by clot stability assays; in Bergemeyer HE (editor): *Methods of enzymatic analysis*. Verlag Chemie; Weinheim **1984**; 3rd ed, Vol V: 400-10
- Kaufmann JE, Vischer UM:** Cellular mechanisms of the hemostatic effects of desmopressin (DDAVP). *J Thromb Haemost* **2003**; 1(4): 682-9
- Kaupke CJ, Butler GC, Vaziri ND:** Effect of recombinant human erythropoietin on platelet production in dialysis patients. *J Am Soc Nephrol* **1993**; 3: 1672-1679
- Kelton JG :** Heparin-induced thrombocytopenia: an overview. *Blood Rev* **2002**; 16: 77-80
- Klingemann HG , Egbring R , Havemann K:** Structure of fibrin and fibrinmonomer in renal and hepatic failure. *Klin. Wochenschr* 5/1980; 58(5): 533-5
- Köhler M, Dati F, Kolde HJ:** Aktivierte Thromboplastinzeit (APTT)-Standortbestimmung - Standardisierung der Methode, Interpretation der Befunde und Grenzen der Anwendbarkeit. *Lab med* **1995**; 19: 162-66
- Korte W:** Fibrin monomer and factor XIII: a new concept for unexplained intraoperative coagulopathy. *Hämostaseologie* 8/2006; 26(3 Suppl1): 30-35
- Korte W:** F. XIII in perioperative coagulation management. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol* 3/2010; 24(1): 85-93
- Korte W, Gabi K, Rohner M, Gahler A, Szadkowski C, Schnider TW, Lange J, Riesen W:** Preoperative fibrin monomer measurement allows risk stratification for high intraoperative blood loss in elective surgery. *Thromb Haemost* **2005**; 94: 211–5
- Koscielny J, Ziemer S, Radtke H, Schmutzler M, Kiesewetter H, Salama A, von Tempelhoff GF:** Preoperative identification of patients with impaired (primary) haemostasis. A practical concept. *Hämostaseologie*. 8/2007; 27(3): 177-84
- Kretschmer V, Darakhtiev A, Bade S, Weippert-Kretschmer M:** Perioperative Disorders of Primary Hemostasis: Determination and Treatment. *Transfusion Alternatives in Transfusion Medicine* **2003**; 4(6): 193-197

Kruse-Jarres JD: Kohlenhydratstoffwechsel - Allgemeine Pathobiochemie und klinisch chemische Diagnostik in Greiling H (Hrsg.), Gressner AM (Hrsg.) Lehrbuch der Klinischen Chemie und Pathobiochemie. Schattauer; Stuttgart, New York **1989**; 2. Aufl.:194-197

Kuhlback B: The bleeding tendency in chronic renal failure. Acta Med Scand 4/**1957**; 157(3): 173-7

Kurniawan NA, Grimbergen J, Koopman J, Koenderink GH: Factor XIII stiffens fibrin clots by causing fiber compaction. J Thromb Haemost **2014**; 12(10): 1687-96

Kyrle PA, Stockenhuber F, Brenner B, Gossinger H, Korninger C, Pabinger I, Sunder-Plassmann G, Balcke P, Lechner K: Evidence for an increased generation of prostacyclin in the microvasculature and an impairment of the platelet alpha-granule release in chronic renal failure. Thromb Haemost 1988; 60: 205-208

Lak M, Peyvandi F, Ali Sharifian A, Karimi K, Mannucci PM: Pattern of symptoms in 93 Iranian patients with severe factor XIII deficiency. J Thromb Haemost **2003**; 1(8): 1852-3

Lang T, von Depka M: Diagnostische Möglichkeiten und Grenzen der Thrombelastometrie/-graphie - Possibilities and limitations of thrombelastometry/-graphy. Hämostaseologie **2006**; 26(S 01): S20-S29

Langer HF, Gawaz M: Thrombozytenadhäsion und -aggregation; in Pötzsch B (Hrsg), Madlener K (Hrsg): Hämostaseologie . Springer Berlin, Heidelberg **2010** ; 2.Aufl: 62-65

Lawrie AS, Green L, Mackie IJ, Liesner R, Machin SJ, Peyvandi F: Factor XIII--an under diagnosed deficiency--are we using the right assays?. J Thromb Haemost **2010**; 8(11): 2478-82

Lee HK, Kim YJ, Jeong JU, Park JS, Chi HS, Kim, SB: Desmopressin improves platelet dysfunction measured by in vitro closure time in uremic patients. Nephron Clin Pract **2010**; 114(4): c248-52

Leithner C, Kovarik J, Sinzinger H, Woloszczuk W: Parathyroid hormone does not inhibit platelet aggregation.Lancet **1984**; 1: 367-368

Letheby BA, Davis RB, Larsen AE: The Effect of Major Surgical Procedures on Plasma and Platelet Levels of Factor XIII. Thromb Haemost **1974**; 31(01): 020-029

Lewis, JH, Zucker, MB and Ferguson JH: Bleeding tendency in uremia. Blood **1956**; 11: 1073

Lier, H, Krep, H, Schöchl, H: Gerinnungsmanagement bei der Polytraumaversorgung. Anaesthesist **2009**; 58: 1010.

Lindsay RM, Friesen M, Aronstam A, Andrus F, Clark WF, Linton AL: Improvement of platelet function by increased frequency of hemodialysis. Clin Nephrol **1978**; 10: 67-70

Lindsay RM, Friesen M, Koens F, Linton AL, Oreopoulos D, de Veber G : Platelet function in patients on long term peritoneal dialysis. Clin Nephrol **1976**; 6: 335-339

Lindsay RM, Moorthy AV, Koens F, Linton AL: Platelet function in dialyzed and non-dialyzed patients with chronic renal failure. Clin Nephrol **1975**; 4: 52-57

Linthorst E, Avis HJ, Levi M: Uremic Thrombocytopeny Is not about Urea. J Am Soc Nephrol **2010**; 21(5): 753-755

Lippi G, Buonocore R, Musa R, Ippolito L, Picanza A, Favaloro EJ: The effect of hyperglycaemia on haemostasis testing--a volunteer study. Anaesthesia **2015**; 70(5): 549-54

Liu YK, Kosfeld RE, Marcum SG: Treatment of uraemic bleeding with conjugated oestrogen. Lancet **1984**; 2: 887-890

Livio M, Gotti E, Marchesi D, Mecca G, Remuzzi G, de Gaetano G: Uraemic bleeding: role of anaemia and beneficial effect of red cell transfusions. Lancet **1982**; 2: 1013-15

- Livio M, Mannucci PM, Viganò G, Mingardi G, Lombardi R, Mecca G, Remuzzi G:** Conjugated estrogens for the management of bleeding associated with renal failure. *N Engl J Med* **1986**; 315: 731-735
- Löffler G, Petrides P, Weiss L:** *Physiologische Chemie*. Springer Berlin, Heidelberg **1990**; 4, Aufl., 1, korr. Nachdr.
- Lorand L, Urayama T, Dekiewiet J. W. C, Nossel H. L:** Diagnostic and genetic studies on fibrin stabilizing factor with a new assay based on amine incorporation. *Journal of Clinical Investigation* **1969**; 48: 1054
- Macconi et al:** abstract submitted to the Congress of the American Society of Nephrology 1999 in Noris und Ramuzzi: Uremic bleeding: closing the circle after 30 years of controversies?. *Blood* 10/**1999**; 94(8): 2572
- Mammen EF, Comp PC, Gosselin R, Greenberg C, Hoots WK, Kessler CM, Larkin EC, Liles D, Nugent DJ:** PFA-100TMSystem: a new method for assessment of platelet dysfunction. *Sem Thromb Hemost* **1998**; 24: 195-202
- Mannucci PM, Remuzzi G, Pusineri F, Lombardi R, Valsecchi C, Mecca G, Zimmermann TS:** Deamino-8-d arginine vasopressin shortens the bleeding time in uremia. *N Engl J Med* **1983**; 308: 8-12
- Mannucci PM:** Bleeding symptoms in heterozygous factor XIII [corrected] deficiency. *Haematologica*. **2010**;95(9): e6
- Martinuzzo M., Barrera L., Altuna D., Tisi Baña F., Bieti J., Amigo Q., D'Adamo M., López MS., Oyhamburu J., Otao J.C:** Effects of Factor XIII Deficiency on Thromboelastography. Thromboelastography with Calcium and Streptokinase Addition is more Sensitive than Solubility Tests. *Mediterr J Hematol Infect Dis* **2016**; 8(1): e2016037; Published online 2016 Aug 16
- Matsumoto A, Hirata Y, Kakoki M, Nagata D, Momomura Si, Sugimoto T, Tagawa H, Omata M:** Increased excretion of nitric oxide in exhaled air of patients with chronic renal failure. *Clin Sci (Lond)* **1999**; 96: 67-74
- Maurin N, Fitzner S, Fritz H, Gladziwa U, Hagel J, Stefanidis I:** Influence of recombinant human erythropoietin on hematological and hemostatic parameters with special reference to microhemolysis. *Clin Nephrol* **1995**; 43: 196-200
- McDonald TP, Cottrell MB, Clift RE, Cullen WC, Lin FK:**High doses of recombinant erythropoietin stimulate platelet production in mice. *Exp Hematol* **1987**; 15: 719-721
- Meigs JB, Mittleman MA, Nathan DM, Tofler GH, Singer DE, Murphy-Sheehy PM, Lipinska I, D'Agostino RB, Wilson PW:** Hyperinsulinemia, hyperglycemia, and impaired hemostasis: the Framingham Offspring Study. *JAMA* **2000**; 283(2): 221-8
- Mezzano D, Tagle R, Panes O, Perez M, Downey P, Munoz B, Aranda E, Barja P, Thambo S, Gonzalez F, Mezzano S, Pereira J:** Hemostatic disorder of uremia: the platelet defect, main determinant of the prolonged bleeding time, is correlated with indices of activation of coagulation and fibrinolysis. *Thromb Haemost* 1996;76: 312-321
- Moia M, Mannucci PM, Vizzotto L, Casati S, Cattaneo M, Ponticelli C:** Improvement in the haemostatic defect of uraemia after treatment with recombinant human erythropoietin. *Lancet* **1987**; 2:1227
- Moosa A, Greaves M, Brown CB, MacNeil S:** Elevated platelet-free calcium in uraemia. *Br J Haematol* **1990**; 74: 300-305
- Morgagni GB:** *Sermo est de Urinae Suppressione.*"Opera Omnia"-Epistola Anatomico-Medica XLI-1764, Opera Omnia Ex Typographia Remondiniana. Venezia, Italy **1764**
- Morrissey JH:** Tissue factor: an enzyme cofactor and a true receptor. *Thrombosis and haemostasis* **2001**;86(01): 66-74
- Mosesson MW:** Fibrinogen and fibrin structure and functions. *J Thromb Haemost* 8/**2005**; 3: 1894-904
- Narayanan S, Appleton HD:** Creatinine: a review. *Clin Chem* **1980**; 26: 1119-1126

National Kidney Foundation: K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. *Am J Kidney Dis* 2/2002; 39(2, Suppl1): 44

Neri I, Marietta M, Piccinini F, Volpe A, Facchinetti F: The L-arginine-nitric oxide system regulates platelet aggregation in pregnancy. *J Soc Gynecol Investig* 1998; 5: 192-196

Noris M, Benigni A, Boccardo P, Aiello S, Gaspari F, Todeschini M, Figliuzzi M, Remuzzi G: Enhanced nitric oxide synthesis in uremia: implications for platelet dysfunction and dialysis hypotension. *Kidney Int* 1993; 44: 445-450

Noris M, Remuzzi G: Uremic bleeding: closing the circle after 30 years of controversies?. *Blood* 10/1999; 94(8): 2569-74

Papayannopoulou T, Brice M, Farrer D, Kaushansky K: Insights into the cellular mechanisms of erythropoietin-thrombopoietin synergy. *Exp Hematol* 1996; 24: 660-669

Pereira BJ, Dinarello CA: Production of cytokines and cytokine inhibitory proteins in patients on dialysis. *Nephrol Dial Transplant* 1994; 9: 60-71

Perez G, Rey A, Schiff E: The biosynthesis of guanidinosuccinic acid by perfused rat liver. *J Clin Invest* 1976; 57: 807

Pietrzak I, Komarnicki M, Zaremba-Drobnik D: Platelet aggregation and prostaglandin metabolism in uremic patients. *Am J Kidney Dis* 2001; 38: 111-114

Proctor RR, Rapaport SJ: The partial thromboplastin time with Kaolin: a simple screening test for first stage plasma clotting factor deficiencies. *Amer J Clin Path* 1961; 36: 212-19

Quick AJ, Stanley-Brown M, Bancroft FW: A study of the coagulation defect in hemophilia and in jaundice. *Amer J Med Sci* 1935; 190: 501-11

Radomski MW, Palmer RM, Moncada S: An L-arginine/nitric oxide pathway present in human platelets regulates aggregation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 5193-5197

Rath CE, Mailliard JA, Schreiner GE: Bleeding tendency in uremia. *N Engl J Med* 10/1957; 257(17): 808-11

Reilly RF: The pathophysiology of immune-mediated heparin-induced thrombocytopenia. *Semin Dial* 2003; 16: 54-60

Remuzzi G, Benigni A, Dodesini P, Schieppati A, Livio M, De Gaetano G, Day SS, Smith WL, Pinca E, Patrignani P, Patrono C: Reduced platelet thromboxane formation in uremia. Evidence for a functional cyclooxygenase defect. *J Clin Invest* 1983; 71: 762-768

Remuzzi G, Cavenaghi AE, Mecca G, Donati MB, de Gaetano G: Prostacyclin-like activity and bleeding in renal failure. *Lancet* 1977; 2: 1195-1197

Remuzzi G, Perico N, Zoja C, Corna D, Macconi D, Vigano G: Role of endothelium-derived nitric oxide in the bleeding tendency of uremia. *J Clin Invest* 1990; 86: 1768-1771

Riddel J, Aouizerat BE, Miaskowski C, Lillcrap DP: Theories of Blood Coagulation. *Journal of Pediatric Oncology Nursing* 2007; 24: 123-131

Riesman, D: Hemorrhages in the course of Bright's Disease with especial reference to the occurrence of a hemorrhagic diathesis of nephritic origin. *Am J.M.Sc* 1907; 134: 709

Rink TJ: Cytosolic calcium in platelet activation. *Experientia* 1988; 44: 97-100

Sanfelippo MJ, Mazza JJ, Mercier RJ: Symptomatic factor XIII deficiency with normal urea solubility test. *Clin Lab* 2014; 60(12): 2099-102

- Schneider W, Szanto T, Truat G:** Zyklisches Adenosinmonophosphat und Niereninsuffizienz. *Klin Wochenschr* **1974**; 52: 1175-1176
- Schroit AJ, Madsen JW, Tanaka Y:** In vivo recognition and clearance of red blood cells containing phosphatidylserine in their plasma membranes. *J Biol Chem* **1985**; 260: 5131-5138
- Shams Hakimi C, Carling MS, Hansson EC, Brisby H, Hesse C, Radulovic V, Jeppsson A:** The Effect of Ex Vivo Factor XIII Supplementation on Clot Formation in Blood Samples From Cardiac and Scoliosis Surgery Patients. *Clin Appl Thromb Hemost* **2018**; 24(4): 677-683
- Shapiro MD, Kelleher SP:** Intranasal deamino-8-d-arginine vasopressin shortens the bleeding time in uremia. *Am J Nephrol* **1984**; 4: 260-261
- Shapiro SS, Wilk MB:** Analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika* **1965**; 52:591-611
- Shin HJ, Na HS, Lee S, Lee GW, Do SH:** The effect of hyperglycemia on blood coagulation: In vitro, observational healthy-volunteer study using rotational thromboelastometry (ROTEM). *Medicine (Baltimore)* **2016**; 95(35): e4703; Published online 2016 Sep 2
- Siebenlist KR, Meh DA, Mosesson MW:** Protransglutaminase (factor XIII) mediated crosslinking of fibrinogen and fibrin. *Thromb Haemost* 11/**2001**; 86(5): 1221-8
- Simon DI, Stamler JS, Loh E, Loscalzo J, Francis SA, Creager MA:** Effect of nitric oxide synthase inhibition on bleeding time in humans. *J Cardiovasc Pharmacol* **1995**; 26: 339-342
- Sjøland JA, Sidelmann JJ, Brabrand M, Pedersen RS, Pedersen JH, Esbensen K, Standeven KF, Ariëns RA, Gram J:** Fibrin clot structure in patients with end-stage renal disease. *Thromb Haemost* 8/**2007**; 98(2): 339-45
- Skorecki K, Green J, Brenner BM, Budde K:** Chronische Niereninsuffizienz in Dietel M; Dudenhausen J; Suttorp N: *Harrisons Innere Medizin 2*. Berlin, ABW Wissenschaftsverlag **2003**; 15. Aufl.: 1704-1715
- Slichter SJ, Harker LA:** Thrombocytopenia: mechanisms and management of defects in platelet production. *Clin Haematol* 10/**1978**; 7(3): 523-539
- Sloand EM, Sloand JA, Prodouz K, Klein HG, Yu MW, Harvath L, Fricke W:** Reduction of platelet glycoprotein Ib in uraemia. *Br J Haematol* **1991**; 77: 375-81
- Sloand JA, Sloand EM:** Studies on platelet membrane glycoproteins and platelet function during hemodialysis. *J Am Soc Nephrol* **1997**; 8: 799-803
- Smith MC, Dunn MJ:** Impaired platelet thromboxane production in renal failure. *Nephron* **1981**; 29: 133-197
- Sohal AS, Gangji AS, Crowther MA, Treleaven D:** Uremic bleeding: Pathophysiology and clinical risk factors. *Thromb Res* **2006**; 118(3): 417-22
- Soyoral YU, Demir C, Begenik H, Esen R, Kucukoglu ME, Aldemir MN, Demirkiran D, Erkoc R:** Skin bleeding time for the evaluation of uremic platelet dysfunction and effect of dialysis. *Clin Appl Thromb Hemost* **2012**; 18(2): 185-8
- Spahn DR, Asmis LM: Excessive Perioperative Bleeding:** Are Fibrin Monomers and Factor XIII the Missing Link?. *Anesthesiology* 2/**2009**; 110(2): 212-213
- Spencer K:** Analytical reviews in clinical biochemistry: The estimation of creatinine. *Ann clin Biochem* **1986**; 23: 1-25
- Steffel J, Lüscher TF.** Endothelzellen in Pötzsch B, Madlener K (Hrsg.) *Hämostaseologie*. Springer Berlin, Heidelberg **2010**; 2.Aufl.: 98-104
- Steiner RW, Coggins C, Carvalho ACA:** Bleeding time in uremia: A useful test to assess clinical bleeding. *Am J Hematol* **1979**; 7: 107

- Stenvinkel P:** Inflammation in end-stage renal disease--a fire that burns within. *Contrib Nephrol.* **2005**; 149: 185-99
- Stryer L:** Biochemie. Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg, Berlin, New York **1991**, korr. Nachdr. d. Aufl. v. 1990 (Übersetzung der 3. Amerik. Aufl. v. 1988)
- Talke H, Schubert GE:** Enzymatische Harnstoffbestimmung im Blut und Serum im optischen Test nach Warburg. *Klin Wschr* **1965**; 43: 174-75
- Thomas G, Ramwell PW:** Effects of guanidino compounds on the endothelium-derived relaxing factor inhibitor NG-monomethyl L-arginine. *J Pharmacol Exp Ther* **1991**: 259:490
- Thomas G, Ramwell PW:** Identification of guanidino succinate as a putative endogenous source of the endothelium derived relaxing factor. *Biochem Biophys Res Commun* **1992**; 183: 584
- Thomas G, Ramwell PW:** Endothelium-derived relaxing factor and the vascular role of guanidino compounds. *Transplant Proc* **1993**; 25: 2057
- Thuraisingham RC, Cramp HA, McMahon AC, Wilkes M, Nott CA, Dodd SM, Yaqoob MM, Cunningham J:** Increased superoxide and nitric oxide production results in peroxynitrite formation in uremic vasculature. *J Am Soc Nephrol* **1997**; 8: 340A (abstr)
- Thuraisingham RC, Raine AE:** Maintenance of normal agonist-induced endothelium-dependent relaxation in uraemic and hypertensive resistance vessels. *Nephrol Dial Transplant* **1999**; 14: 70-75
- Turitto VT, Baumgartner HR:** Platelet interaction with subendothelium in flowing rabbit blood: effect of blood shear rate. *Microvasc Res* **1979**; 17: 38-54
- Vaidyula VR, Rao AK, Mozzoli M, Homko C, Cheung P, Boden G:** Effects of hyperglycemia and hyperinsulinemia on circulating tissue factor procoagulant activity and platelet CD40 ligand. *Diabetes* **2006**; 55(1): 202-8
- Van Geet C, Van Damme-Lombaerts R, Vanrusselt M, de Mol A, Proesmans W, Vermeylen J :** Recombinant human erythropoietin increases blood pressure, platelet aggregability and platelet free calcium mobilisation in uraemic children: a possible link? *Thromb Haemost* **1990**; 64: 7-10
- Vanholder R, Meert N, Schepers E, Glorieux G:** Uremic toxins: do we know enough to explain uremia?. *Blood Purif.* **2008**; 26(1): 77-81
- Vanholder R, Schepers E, Meert N, Lameire N:** What Is Uremia? Retention versus Oxidation. *Blood Purif* **2006**; 24: 33-38
- Vanholder R, De Smet R, Glorieux G, Argilés A, Baurmeister U, Brunet P, Clark W, Cohen G, De Deyn PP, Deppisch R, Descamps-Latscha B, Henle T, Jörres A, Lemke HD, Massy ZA, Passlick-Deetjen J, Rodriguez M, Stegmayr B, Stenvinkel P, Tetta C, Wanner C, Zidek W; European Uremic Toxin Work Group (EUTox):** Review on uremic toxins: classification, concentration, and interindividual variability. *Kidney Int* **2003**; 63: 1934-1943
- Varga-Szabo D, Pleines P, Nieswandt B:** Cell Adhesion Mechanisms in Platelets . *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **2008**; 28: 403-412
- Viennet C, Laurensou C, Goydadin AC, Faivre B, Muret P, Humbert P:** Development of an in vitro fibrin clot model to evaluate fibrinolytic agents for wound care application. *J Wound Care* **2014**; 23(2): 66-7
- Vigano G, Benigni A, Mendogni D, Mingardi G, Mecca G, Remuzzi G:** Recombinant human erythropoietin to correct uremic bleeding . *Am J Kidney Dis* **1991**; 18: 44-49
- Vigano G, Gaspari F, Locatelli M, Pusineri F, Bonati M, Remuzzi G:** Dose-effect and pharmacokinetics of estrogens given to correct bleeding time in uremia. *Kidney Int* **1988**; 34: 853-858

- Vlachoyannis J, Schoeppe W:** Adenylate cyclase activity and cAMP content of human platelets in uraemia. *Eur J Clin Invest* **1982**; 12: 379-381
- Voigt JA, Schmidt J, Riss R, Schmitz M:** Physiologie und Pathophysiologie der Blutgerinnung; in Kneser U, Horch RE, Lehnhardt M (Hrsg.), *Grundkurs Mikrochirurgie*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2016; 1. Aufl.: 16
- Von Rappard S, Hinnen C, Lussmann R, Rechsteiner M, Korte W:** Factor XIII Deficiency and Thrombocytopenia Are Frequent Modulators of Postoperative Clot Firmness in a Surgical Intensive Care Unit. *Transfus Med Hemother* **4/2017**; 44(2): 85-92
- Vonend E, Böttcher D, Fischer J, Heinze V:** Thrombozytenfunktionsstörungen bei Dauerdialysepatienten. Hemmung der Thrombozytenaggregation als Maß für die Wirkung von Urämietoxinen. *Med Welt* **1975**; 43: 1965-1970
- Ware JA, Clark BA, Smith M, Salzman EW:** Abnormalities of cytoplasmic Ca²⁺ in platelets from patients with uremia. *Blood* **1989**; 73: 172-176
- Ware JA, Johnson PC, Smith M, Salzman EW:** Effect of common agonists on cytoplasmic ionized calcium concentration in platelets. Measurement with 2-methyl-6-methoxy 8-nitroquinoline (quin2) and aequorin. *J Clin Invest* **1986**; 77: 878-886
- Weber CF, Jambor C, Marquardt M, Görlinger K, Zwissler B:** Erfassung eines Faktor-XIII-Mangels mit der Thrombelastometrie. *Anaesthesist* **5/2008**; 57(5): 487-90
- Weisel JW, Litvinov RI:** Mechanisms of fibrin polymerization and clinical implications. *Blood* **2013**; 121: 1712-1719
- Weismann RE, Tobin RW:** Arterial embolism occurring during systemic heparin therapy. *AMA Arch Surg* **1958**; 76: 219-227
- Wettstein P, Haerberli A, Stutz M, Rohner M, Corbetta C, Gabi K, Schnider T, Korte W:** Decreased factor XIII availability for thrombin and early loss of clot firmness in patients with unexplained intraoperative bleeding. *Anesth Analg*. **11/2004**; 99(5): 1564-9
- Winstedt D, Thomas OD, Nilsson F, Olanders K, Schött U:** Correction of hypothermic and dilutional coagulopathy with concentrates of fibrinogen and factor XIII: an in vitro study with ROTEM. *Scand J Trauma Resusc Emerg Med* **2014**; 22: 73
- Wirtz JJ, van Esser JW, Hamulyak K, Leunissen KM, van Hooff JP:** The effects of recombinant human erythropoietin on hemostasis and fibrinolysis in hemodialysis patients. *Clin Nephrol* **1992**; 38: 277-282
- Witt I:** Hämostase und Fibrinolyse. in Greiling H, Gressner AM *Lehrbuch der Klinischen Chemie und Pathobiochemie*. Schattauer; Stuttgart, New York **1989**; 2. Aufl.: 715-765
- Witt I, Beeser H, Lang H, Müller-Beißenhirtz W:** Thromboplastinzeit und INR: Standardisierung der Methode, Anwendung zur Kontrolle der oralen Antikoagulantientherapie und als Globaltest der Gerinnung - Standortbestimmung. *Lab med* **1996**; 20: 443-9
- Yamanishi J, Kawahara Y, Fukuzaki H:** Effect of cyclic AMP on cytoplasmic free calcium in human platelets stimulated by thrombin: direct measurement with quin2. *Thromb Res* **1983**; 32: 183-188
- Zhou XJ, Vaziri ND:** Defective calcium signalling in uraemic platelets and its amelioration with long-term erythropoietin therapy. *Nephrol Dial Transplant* **2002**; 17: 992-997
- Zoja C, Viganò G, Bergamelli A, Benigni A, de Gaetano G, Remuzzi G:** Prolonged bleeding time and increased vascular prostacyclin in rats with chronic renal failure: effects of conjugated estrogens. *J Lab Clin Med* **1988**; 112: 380-386
- Zoja C, Noris M, Corna D, Viganò G, Perico N, de Gaetano G, Remuzzi G:** L-arginine, the precursor of nitric oxide, abolishes the effect of estrogens on bleeding time in experimental uremia. *Lab Invest* **1991**; 65: 479-483

6. Eidesstattliche Versicherung

„Ich, **Michael Huber**, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: *„Untersuchung des Einflusses von Harnstoff, Glukose, Kreatinin und Guanidinbernsteinsäure auf Gerinnungsvorgänge in vitro mittels ROTEM und PFA-100 - eine Pilotstudie.“*

selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich erkläre ferner, dass mir die Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis bekannt ist und ich mich zur Einhaltung dieser Satzung verpflichte.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Mende, 28.12.2018

Michael Huber

7. Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

8. Publikation :

Sitte N, Huber M, Grune T, Ladhoff A, Doecke WD, Von Zglinicki T, Davies KJ : Proteasome inhibition by lipofuscin/ceroid during postmitotic aging of fibroblasts. *FASEB J.* **2000** Aug;14(11):1490-8.

9. Danksagung

Diese Arbeit wäre ohne den Rat und die Unterstützung einer Vielzahl von akademischen Lehrern, Kollegen, Freunden und Familienmitgliedern nicht möglich gewesen.

Mein Dank gilt meinem Doktorvater Herrn PD Dr. med. Berthold Hoppe, Direktor des Instituts für Laboratoriumsmedizin des Unfallkrankenhauses Berlin, für die kritisch-konstruktive Betreuung bei der Ausarbeitung der Dissertation, für seine Geduld und ständigen Ermutigungen.

Mein besonderer Dank gilt Frau OÄ Dr. med. Sabine Ziemer und Frau Dr. med. Elisabeth Langer vom Institut für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie der Charité (Campus Mitte). Sie haben mich bei der Planung und Durchführung der experimentellen Untersuchungen mit großem Enthusiasmus fachlich und logistisch unterstützt und betreut.

Ich möchte mich bei allen Medizintechnischen Assistentinnen des Instituts bedanken, die die Globaltests der Gerinnung und die biochemischen Messungen an den automatischen Analysesystemen durchführten und mich bei den hämatologischen Untersuchungen unterstützt haben.

Herrn Prof. Dr. med. Tauber bin ich für die freundliche Genehmigung, die Untersuchungen in seinem Institut durchführen zu dürfen, sehr zu Dank verpflichtet.

Ich danke Herrn OA Dr. Jens Gaedecke von der Klinik für Nephrologie und internistische Intensivmedizin der Charité für seinen Rat und die großzügige Bereitstellung der GBS.

Mein ganz besonders herzlicher Dank gilt allen Kollegen, Freunden und Verwandten, die sich mir in uneigennütziger Weise zweimal für eine Blutentnahme zur Verfügung gestellt haben.

Herrn Dr. med. Matthias Tregel danke ich dafür, bei mir das Interesse am ROTEM geweckt zu haben.

Die Firma Matel Medizintechnik GmbH hat vier ROTEM-Geräte leihweise für vier Wochen zur Verfügung gestellt. Dafür gilt der Firma mein besonderer Dank.

Meine Mutter schulde ich ganz besonderen Dank für ihre logistische Unterstützung und die vielen Fachartikel, die sie mir in den Berliner Bibliotheken besorgt hat.

Ich möchte aber auch meiner Frau und meinen Kindern herzlich für ihre Geduld und ihr Verständnis danken. Meiner Schwester danke ich ebenso für Ihre Unterstützung.

Meinem Vater, der leider die Fertigstellung dieser Arbeit nicht mehr erlebt hat, möchte ich für seine wohlwollenden Ermahnungen danken. Seinetwegen habe ich trotz aller Widrigkeiten des Lebens mein Ziel nicht aus den Augen verloren. Ihm sei diese Arbeit gewidmet.

10. Anhang :

Abb. 10.1.: Fragebogen der Charité zur Gerinnungsanamnese:



Name / Anschrift

Fragebogen zur Ermittlung eines erhöhten Blutungsrisikos

Ist Ihre Blutgerinnung in Ordnung ? Gibt es Hinweise auf eine gestörte Blutstillungsfunktion ? Haben Sie ein erhöhtes Risiko, im Falle einer Verletzung, eines Unfalles oder einer Operation stärker zu bluten und vermehrt Blut zu verlieren ?
Testen Sie sich selbst !
Beantworten Sie die nachfolgend aufgeführten Fragen durch Ankreuzen bzw. Eintragen der erforderlichen Angaben.
Die Auswertung und Beurteilung Ihres individuellen „Blutgerinnungsprofils“ können Sie selbst vornehmen. (Bitte ankreuzen und ausfüllen !)

1. Haben Sie bei sich selbst vermehrt Nasenbluten, auch ohne erkennbaren Grund, festgestellt?
JA: NEIN:

2. Treten oder traten bei Ihnen vermehrt - ohne sich anzustoßen - „blaue Flecke“ oder kleine, punktförmige Blutungen auf ?
JA: NEIN:

Wenn Sie diese Frage mit „Ja“ beantwortet haben, geben Sie bitte an, ob diese Symptome auch am Körperrumpf oder anderen, für Sie ungewöhnlichen Stellen aufgetreten sind ?
JA: NEIN:

3. Haben Sie bei sich selbst Zahnfleischbluten ohne erkennbaren Grund festgestellt ?
JA: NEIN:

4. Treten Blutungen oder blaue Flecke **mehr als** 1 bis 2 mal pro Woche,
JA: NEIN:

oder 1 bis 2 mal pro Woche,
JA: NEIN:

oder 1 bis 2 mal pro Monat auf ?
JA: NEIN:

5. Haben Sie den Eindruck, daß es bei Schnitt- oder Schürfwundenwunden (z.B. Rasieren) länger nachblutet ?

JA: NEIN:

6. Traten bei Ihnen bereits einmal längere und verstärkte Nachblutungen nach oder während Operationen (z.B. Mandeloperationen, Blinddarmoperationen, Geburten) auf ?

JA: NEIN:

7. Traten bei Ihnen längere und verstärkte Nachblutungen nach oder während dem Ziehen von Zähnen auf ?

JA: NEIN:

8. Wurden Ihnen bei einer Operation bereits einmal Blutkonserven oder Blutprodukte gegeben ?

JA: NEIN:

Bitte geben Sie die Art der Operation(en) an:

.....
.....

9. Gab oder gibt es in der Familie Fälle von Blutungsneigungen ?

JA: NEIN:

10. Nehmen Sie Schmerz- oder Rheumamittel ein ?

JA: NEIN:

Wenn ja, bitte Namen der Medikamente eintragen:

.....
.....

11. Nehmen Sie weitere Medikamente oder Vitaminpräparate ein ?

JA: NEIN:

Wenn ja, bitte Namen der Medikamente eintragen:

.....
.....

Folgende Frage ist nur von Frauen / Mädchen zu beantworten:

12. Haben Sie den Eindruck, daß Ihre Monatsblutungen verlängert (> 7 Tage) und / oder verstärkt (häufiger Tamponwechsel) sind ?

JA: NEIN:

.....
(Unterschrift, Datum)