

3. Patienten und Methodik

3.1. Methodik

Diese von der Ethikkommission genehmigte klinisch-experimentelle, randomisierte, doppelblinde und placebokontrollierte Pilotstudie wurde in der Klinik für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin des Universitätsklinikums Charité - Universitätsmedizin Berlin, Campus Mitte, unter der Leitung von Frau Prof. Dr. med. Claudia Spies und in Kooperation mit der orthopädischen Klinik, ehemaliger Direktor Prof. Dr. med. Zippel, durchgeführt.

3.2. Patienten

Alle Patienten der orthopädischen Klinik, die eine elektive Hüft- oder Kniegelenksendoprothese (TEP) beziehungsweise eine Wirbelsäuleninstrumentation erhielten, wurden präoperativ hinsichtlich der Ein- und Ausschlusskriterien geprüft. Bei Erfüllung der Einschlusskriterien erfolgte präoperativ ein ärztliches Aufklärungsgespräch über die Studie. Jeder teilnehmende Patient, gab schriftlich seine Einverständniserklärung ab.

Bei jedem Patienten wurden Basischarakteristika wie Alter, Geschlecht, Gewicht, Größe, Diagnosen, Nebendiagnosen dokumentiert und alkoholismusrelevante Diagnostik betrieben.

3.2.1. Einschlusskriterien

- elektiver orthopädischer Eingriff an Hüfte, Knie oder Wirbelsäule
- Alter \geq 18 Jahre
- schriftliche Einverständniserklärung des Patienten

3.2.2. Ausschlusskriterien

- Alter $<$ 18 Jahre
- fehlendes Einverständnis
- kongenitale oder erworbene Blutgerinnungsstörungen

- schwere Angina pectoris, dekompensierte Herzinsuffizienz
- Leberzirrhose (Klassifikation Child B oder C)
- terminale Niereninsuffizienz
- Polydipsie
- Einnahme gerinnungshemmender Mittel (Thrombozytenaggregationshemmer z.B. ASS; Cumarinderivate)

3.2.3. Abbruchkriterien

- Ablehnung des Patienten nach Studienbeginn
- lebensbedrohliche Komplikationen
- EKG-Abweichungen nach Medikamentengabe (ST-Strecken-Hebung oder -Senkung)

3.3. Gruppenaufteilung

- Gruppe 1: alkoholranke Patienten, die als Placebopräparat NaCl 0,9 % erhielten
- Gruppe 2: alkoholranke Patienten, die mit DDAVP behandelt wurden
- Gruppe 3: nicht-alkoholranke Patienten, die als Kontrollgruppe das Placebopräparat NaCl 0,9 % erhielten
- Gruppe 4: nicht-alkoholranke Patienten, die als Kontrollgruppe mit DDAVP behandelt wurden

3.4. Alkoholismusrelevante Diagnostik

Die Zuteilung zur Gruppe der alkoholranke Patienten erfolgte mittels der DSM-IV-Kriterien („Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorder“), dem CAGE-Fragenkatalog, Erfassung der täglichen Alkoholtrinkmenge (g/Tag) und durch präoperativ entnommene alkoholismusrelevante Laborparameter: das Mittlere Korpuskuläre Volumen (MCV, Normwerte: 86–98 fl), die Gamma-Glutamyl-Transferase (GGT, Normwert <15 U/l), das Kohlenhydrat-defiziente Transferrin (CDT, Normwert < 2,5 %) und der Blutalkoholspiegel (BAC).

Die Patienten wurden den Gruppen der alkoholranke Patienten zugeteilt, wenn mindestens 2 der Laborparameter CDT, GGT, MCV, BAC im pathologischen Bereich lagen, der CAGE >2 war oder die DSM IV-Kriterien erfüllt waren.

3.4.1. Der CAGE-Fragenkatalog

Der CAGE-Fragenkatalog [20] beinhaltet folgende Fragen:

1. **Cut down:** Haben Sie jemals versucht, Ihren Alkoholkonsum zu reduzieren?
2. **Annoyed:** Haben Sie sich jemals über die Kritik ihrer Umgebung an Ihrem Trinkverhalten geärgert?
3. **Guilty:** Hatten Sie jemals wegen Ihres Alkoholkonsums Schuldgefühle?
4. **Eye opener:** Haben Sie jemals am Morgen Alkohol getrunken, um einsatzfähig zu werden oder Entzugssymptome zu vermeiden?

Bewertung: Jede Frage, die mit „Ja“ beantwortet wird, zählt 1 Punkt, „Nein“ zählt 0 Punkte; ein CAGE>2 Punkte gilt als pathologisch.

3.4.2. DSM-IV-Kriterien

DSM-IV-Kriterien [63], Kriterien für Abhängigkeit (3 von 7 müssen erfüllt sein)

- Toleranzentwicklung:
 - Verlangen nach Dosissteigerung, um einen Intoxikationszustand oder erwünschten Effekt herbeizuführen
 - deutlich verminderte Wirkung bei fortgesetzter Einnahme derselben Dosis
- Entzugssymptome:
 - charakteristisches Entzugssyndrom der jeweiligen Substanz
 - dieselbe oder ähnliche Substanzen werden eingenommen, um Entzugssymptome zu lindern oder zu vermeiden
- Die Substanz wird häufig und in größeren Mengen oder länger als beabsichtigt eingenommen
- Anhaltender Wunsch oder erfolglose Versuche, den Substanzgebrauch zu verringern oder zu kontrollieren
- Viel Zeitaufwand für Aktivitäten, um die Substanz zu beschaffen, sie zu gebrauchen oder sich von den Effekten der Substanz zu erholen
- Wichtige soziale, berufliche oder Freizeitaktivitäten werden aufgrund des Substanzgebrauchs eingeschränkt oder aufgegeben
- Fortgesetzter Substanzmissbrauch trotz Kenntnis eines anhaltenden oder wiederkehrenden körperlichen oder psychischen Problems, das wahrscheinlich durch den Substanzgebrauch verursacht oder verstärkt wurde

3.5. Studienprotokoll

Jedem Patienten wurde zu 5 Messzeitpunkten Blut entnommen:

präoperativ (PräOp), unmittelbar postoperativ (Op), sowie 2 (2h PostOp), 4 (4h PostOp) und 24 (24h PostOp) Stunden postoperativ.

Die Abnahmen erfolgten entweder durch venöse Punktion der Ellenbeugerven, durch venös liegende Verweilkanülen oder durch arteriell liegende Verweilkatheder. Jeder Patient erhielt randomisiert unmittelbar nach der postoperativen Blutentnahme die Studienmedikationen (DDAVP oder Placebo), die sich äußerlich nicht voneinander unterscheiden.

Die Gruppen 2 und 4 wurden nach der postoperativen Blutentnahme und 12 Stunden postoperativ mit DDAVP (Minirin[®], Ferring, Kiel, Deutschland) behandelt (0,3 µg/Kg Körpergewicht über 30 Minuten als 50 ml Kurzinfusion).

Den Gruppen 1 und 3 wurde nach der postoperativen Blutentnahme und 12 Stunden postoperativ ein Placebopräparat verabreicht (0,9 % NaCl-Lösung über 30 Minuten als 50 ml Kurzinfusion).

Jeweils eine Stunde nach Medikamentengabe wurde ein 12-Kanal-Elektrokardiogramm abgeleitet, um eventuell aufgetretene Ischämien zu erkennen.

Zusätzlich erfolgte bei jedem Patienten ein 24-Stunden-Holter-Monitoring zur ST-Streckenanalyse, welches unmittelbar präoperativ gestartet wurde.

Die intraoperativen Blutverluste wurden durch den operierenden Orthopäden beziehungsweise den Anästhesisten erfasst und notiert. Die postoperativen Blutverluste wurden durch Ablesen der Blutspiegel in den Drainagen zu bestimmten Zeitpunkten (Op-Tag, 1Po-Tag und weitere Tage) verfolgt.

Als Blutungskomplikationen wurden Gabe von Transfusionen (Erythrozyten, Thrombozyten, Plasma), Gabe von Gerinnungsfaktoren und blutungsbedingte Reoperationen definiert.

3.6. Laborparameter

MCV, GGT, CDT, CK (Kreatinin Kinase) und Troponin wurden in der klinischen Routine bestimmt. CK und Troponin wurden ermittelt, um Ischämien am Herzen zu erkennen.

Der BAC wurde in der Abteilung für Toxikologische Chemie (Institut der Gerichtsmedizin) bestimmt.

3.6.1. Probenentnahme und Konservierung für Faktor VIII, von Willebrand Faktor:Ristocetin-Cofaktor und die vWF:Collagen Bindungsaktivität

Pro Abnahmezeitpunkt wurden zwei 5 ml Natriumcitrat-Röhrchen (S-Monovetten[®], Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) mit Blut gefüllt. Diese wurden 10 Min bei 16 °C und 1500 x g (Laborzentrifuge 2-15, Sigma, Deutschland) zentrifugiert. Das Plasma wurde abpipettiert und nochmals 10 Min bei 1500 x g zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand in 4 x 0,5 ml Standardreaktionsgefäße (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) pipettiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C bis zur Analyse aufbewahrt.

3.6.2. Faktor VIII und von Willebrand Faktor Bestimmung am BCT[®]

3.6.2.1. Faktor VIII, Prinzip der Methode

Der Mangel an einem Faktor des intrinsischen Systems führt zu einer Verlängerung der aktivierten partiellen Thromboplastinzeit (aPTT). Um Faktor VIII zu bestimmen, wird die aPTT einer Mischung aus Gerinnungsfaktor VIII-Mangelplasma (Gerinnungsfaktor VIII-Mangelplasma, Dade Behring, Marburg, Deutschland) und dem Patientenplasma gemessen. Fehlt dem Patientenplasma der entsprechende Faktor oder ist es nicht in der Lage, den Mangel zu kompensieren, resultiert eine verlängerte aPTT.

Als Nachweisreaktion dient die Umwandlung von Fibrinogen zu Fibrin nach Zugabe des Startreagenzes Calciumchlorid-Lösung 0,025 mol/l (Dade Behring, Marburg, Deutschland). Der Behring Coagulation Timer (BCT[®], Dade Behring, Deutschland) misst eine Reduktion der optischen Dichte und ermittelt die Aktivität des Gerinnungsfaktors in % der Norm über eine Bezugskurve, die durch Verdünnungen von Standard-Human-Plasma erstellt wird. Referenzbereich: 70 – 150 % der Norm. (Wird im angelsächsischen Bereich häufig in U/ml angegeben, 1 U/ml = 100 %.)

Durchführung: Unmittelbar vor Messung wird die Probe im Wasserbad aufgetaut und auf Zimmertemperatur (+19 bis +23°C) erwärmt. Die Plasmaprobe wird 1:5 in Imidazol-Pufferlösung verdünnt, je 100 µl Mangelplasma, Probenverdünnung und Actin[®] (Actin[®], Dade Behring, Marburg, Deutschland) werden in ein vorgewärmtes Teströhrchen pipettiert und bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe von 100 µl Calciumchlorid wird die Gerinnungsreaktion ausgelöst und die Gerinnungszeit gemessen.

Bei Gerinnungszeiten, die einem Faktorengehalt von über 100 % der Norm entsprechen, sind höhere Probeverdünnungen (1:10) erforderlich.

3.6.2.2. Von Willebrand Faktor:Ristocetin-Cofaktor, Prinzip der Methode

Quantitative Angaben über den vWF lassen sich durch vWF:Antigen Nachweis darstellen. Die Messung der Ristocetin-Cofaktor-Aktivität des vWF ist die älteste Methode zur Darstellung der funktionalen Aktivität des vWF. Sie wird über die ristocetinabhängige Plättchenagglutination bestimmt:

Der von Willebrand Faktor (Ristocetin-Cofaktor) der Probe verursacht in Gegenwart des Antibiotikums Ristocetin eine Agglutination der im BC von Willebrand-Reagenz (Dade Behring, Marburg, Deutschland) enthaltenen, stabilisierten Plättchen. Die ablaufende Agglutination vermindert die Trübung des Reaktionsansatzes. Der BCT[®] misst die Veränderung der optischen Dichte und bestimmt automatisch die Ristocetin-Cofaktor-Aktivität (vWF:RCof) der Probe in % der Norm über eine Bezugskurve. Laborinterner Referenzwert: 50 – 150 % der Norm. Im angelsächsischen Bereich wird die Aktivität häufig in U/ml angegeben, 1 U/ml = 100 %. Bei Gerinnungszeiten, die einem Faktorengehalt von über 100% der Norm entsprechen, sind höhere Probeverdünnungen (1:2) erforderlich.

3.6.2.3. Gerät: Behring Coagulation Timer

Durch Nutzung des BCT[®] (Behring Coagulation Timer, Dade Behring, Deutschland) laufen alle Schritte nach Bestückung der entsprechenden Positionen mit Reagenzien und, falls erforderlich, verdünnten Patientenproben, vom Verdünnen über die Reagenzzugabe, der Inkubation bis zur Messung, vollautomatisch ab.

Der BCT[®] arbeitet nach dem photometrischen Messprinzip. Als Lichtquelle dient eine Halogenlampe, welche weißes Licht erzeugt. Durch Filterung erhält man je nach Test annähernd monochromatisches Licht bestimmter Wellenlänge (für die hier angewandte koagulometrische Methode 405 / 620 nm).

Gemessen wird eine Änderung in der optischen Dichte, die durch die entsprechende Nachweisreaktion verursacht wird. Dies führt zu einer Erhöhung / Reduktion der Lichtdurchlässigkeit (Transmission), die photometrisch gemessen wird. Zur Messsignalerfassung befindet sich im Inneren von jedem Messrotor eine Platine mit je

einem lichtempfindlichen Empfänger für die Messposition. Jeder Empfänger nimmt die Restintensität des Lichtstrahls nach Durchgang durch die zugehörige Küvette auf. Proportional der Intensität wird das Licht in Spannung umgewandelt und verstärkt. Alle 100 ms wird diese Spannung in ein logarithmisch-proportionales Signal umgewandelt, welches zeitkodiert ist. Die Zeitdauer ist proportional zur optischen Dichte des Küvetteninhaltes. Die Auswertung erfolgt nach Übertragung des Signals an den PC, wo die zugehörigen Extinktionen nach folgender Formel berechnet werden:

$$E = \text{Const} \cdot (T_{\text{Mess}} - T_{\text{Max}})$$

Const	Die Konstante ist abhängig von den verwendeten elektronischen Bauteilen
T_{Mess}	Zeitdauer des aktuellen Signals
T_{Max}	Maximale Zeitdauer des Signals (100% Transmission)

Zur Darstellung des Messsignals werden die berechneten Extinktionen gegen die Zeit aufgetragen.

In dieser Arbeit wurde die Kalibration mit Standardplasma (Standard Human Plasma, Dade Behring, Marburg, Deutschland) und den vom BCT[®] erstellten Verdünnungen (1:5, 1:10, 1:50, 1:500) durchgeführt und von Zeit zu Zeit und bei Reagenzchargenwechsel wiederholt. Die gefundenen Gerinnungszeiten (Ordinate) wurden auf logarithmischem Papier den in Prozent angegebenen Faktorenaktivitäten (Abszisse) zugeordnet.

Die interne Qualitätskontrolle wurde mit Kontroll-Plasma für den Normalbereich (Kontrollplasma N, Dade Behring, Marburg, Deutschland) und Kontroll-Plasma für den pathologisch niedrigen Bereich (Kontrollplasma P, Dade Behring, Marburg, Deutschland) durchgeführt.

3.6.3. Collagen-Bindungsaktivität des vWF Bestimmung mittels Enzym-Immuno-Assay

Benutzt wurden die kommerziell erhältlichen Enzym-Immuno-Assay zur Bestimmung von vWF:CBA (IMMUNOZYM vWF:CBA; Baxter, Wien, Österreich). Die Bestimmung der Collagen Bindungsaktivität des vWF (vWF:CBA) entspricht mehr der physiologischen Funktion des vWF als die sonst genutzte ristocetinabhängige Plättchenagglutination. Zur Erfassung der adhäsiven Eigenschaften des vWF nutzt

man die Bindung des vWF an Collagen, wie es auch an verletzten Gefäßwänden geschieht.

3.6.3.1. Testprinzip

IMMUNOZYM vWF:CBA ist ein Zwei-Schritt-ELISA. Die Vertiefungen der ELISA-Teststreifen sind mit Human-Collagen Typ III bestrichen. Verdünnte Plasmaproben werden in die Vertiefungen des Teststreifens inkubiert. Während der Inkubationszeit wird vWF an Collagen gebunden. Unspezifische Probenbestandteile werden in einem Waschschrift entfernt.

Im zweiten Inkubationsschritt erfolgt die Konjugatreaktion. Das vWF-Peroxidase-Konjugat reagiert mit gebundenem vWF. Ungebundenes Konjugat wird in einem weiteren Waschschrift entfernt.

Im dritten Inkubationsschritt erfolgt die Substratreaktion, wobei die Peroxidase des Konjugats mit dem Substrat H_2O_2 das Chromogen zu einer blau gefärbten Substanz oxidiert. Durch Zugabe von Schwefelsäure wird diese Reaktion gestoppt und ein Farbumschlag nach gelb erreicht. Die Farbintensität ist der vWF:CBA direkt proportional. Bei einer Wellenlänge von 450 nm wird die Extinktion in einem ELISA-Reader (Reader 530, Organon Technika, Turnhout, Belgien) gemessen und über eine Bezugskurve quantitativ bestimmt.

3.6.3.2. Durchführung

Vor Testbeginn wurden alle benötigten Testkomponenten auf Raumtemperatur (+19 bis +23°C) erwärmt und der Waschpuffer aus Waschpufferkonzentrat (Phosphate-buffered-solution (PBS); pH 7,3) und destilliertem Wasser (1:10 verdünnt) hergestellt. Die Kalibratoren und Kontrollplasmen wurden mit 500 µl destilliertem Wasser rekonstituiert und nach 15 Minuten Rekonstitutionszeit für 10 Sekunden im Probenmischer gemischt.

10 µl Proben, 10 µl Kalibratoren bzw 10 µl Kontrollen wurden mit jeweils 400 µl vWF:CBA-Inkubationspuffer (PBS, pH 7,3; rot gefärbt) verdünnt (1:41) und 10 Sekunden im Probenmischer gemischt.

Die Herstellung der Konjugatgebrauchslösung wurde durch Verdünnung (1:101) des Konjugats (polyklonaler Anti-vWF-POD; blau gefärbt) mit Inkubationspuffer erreicht (für 96 Testvertiefungen 120 µl Konjugat mit 12 ml Inkubationspuffer).

Die Substratlösung (1:21) wurde erst kurz vor dem letzten Waschgang angesetzt. Für 96 Testvertiefungen wurden 600 µl Chromogen (TMB Tetramethylbenzidin in DMSO/Ethanol) mit 12 ml Substratpuffer (0,025 mol/l Acetatpuffer; mit H₂O₂ pH 5,0) gemischt.

Testablauf:

Jeweils 100 µl der verdünnten Kalibratoren, Kontrollplasmen bzw. Proben wurden in die Testvertiefungen pipettiert, die Platte mit Klebefolie abgedeckt und 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die erste Position ist der Leerwert, dann folgten die Kalibratoren (1-6) in Doppelbestimmung und anschließend die Kontrollen.

Die Kontrollen wurden am Ende der Platte wiederholt. Nach der Inkubation wurde die Mikropipettierplatte mittels ELISA-Waschgerät (Microwell system Washer 200, Organon Technika, Turnhout, Belgien) mit 3 x 200 µl Waschpuffer gewaschen und anschließend jeweils 100 µl Konjugatgebrauchslösung mittels Multipipette (Eppendorf, Multipette®, Hamburg, Deutschland) in die Testvertiefungen pipettiert, mit Klebefolie abgedeckt und 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach Inkubation erfolgte eine Wiederholung des Waschvorgangs. Die Testvertiefungen mussten nach diesem Waschzyklus abschließend ausgesaugt und auf saugfähigem Papier ausgeklopft werden. Anschließend wurden jeweils 100 µl Substratlösung mittels Multipipette in die Testvertiefungen pipettiert und die Platte mit frischer Klebefolie abgedeckt. Die Substratreaktion wurde nach 30 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur durch Zugabe von jeweils 100 µl Stopplösung (Schwefelsäure 1,9 mol/l) mittels Multipipette gestoppt und ein Farbumschlag nach gelb erreicht.

Im ELISA-Reader (Reader 530, Organon Technika, Turnhout, Belgien) wurde nach 10 Sekunden Schütteln die Extinktion bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen und mittels zugehöriger Software ausgewertet. Über eine Bezugskurve wurde die vWF:CBA quantitativ bestimmt und in U/ml angegeben. Der Normalbereich beträgt: 0,6 – 1,8 U/ml.

Die Auswertbarkeit des Tests wurde anhand der ermittelten Kontrollwerte überprüft. Die Extinktion des höchsten Kalibrators sollte zwischen 1,0 und 2,5 liegen.

Lag die im Voraus bestimmte vWF:RCof-Aktivität einer Probe zwischen 100 % - 250 %, wurde die Probe für die vWF:CBA Messung 1:2 mit Inkubationspuffer vorverdünnt. Bei einer vWF:RCof-Aktivität > 250 % wurde eine Vorverdünnung von 1:4 mit Inkubationspuffer gewählt. Die Reproduzierbarkeit innerhalb einer Platte (Intraassay)

lag bei einem Variationskoeffizienten von 6,51 % und zwischen den Platten (Interassay) bei 7,9 %.

3.7. Statistik

Es handelt sich um eine Pilotstudie. Als Kennziffern für die beschreibende Statistik wurde bei nicht normalverteilten Variablen der Median und die Spannweite bzw. die 25./75. Perzentile angegeben und bei dichotomen Variablen die Häufigkeitsverteilung gewählt.

Aufgrund der Variation des basalen Gerinnungsfaktoren-Spiegels wurde eine relative Variable, der „Change from baseline“ in %, eingeführt. Sie bezeichnet den Anstieg eines Wertes in % im Verhältnis zur Baseline und berechnet sich nach folgender Formel:

$$((X - \text{Op-Wert}) / \text{Op-Wert}) * 100.$$

Als X wurde jeweils der 2h PostOp-Wert, der 4h PostOp-Wert und der 24h PostOp-Wert eingesetzt. Als Baseline wurde der OP-Wert gewählt, da er der letzte Wert vor Intervention (Medikamentengabe) ist und um den Operationseinfluss gering zu halten.

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Statistikprogramms SPSS 10.0 (SPSS INC, Chicago, IL) für Windows. Zur Darstellung und Auswertung wurden Nicht-parametrische Methoden und Verfahren gewählt. Der Vergleich zwischen den Gruppen erfolgte mit dem Mann-Whitney-U-Test und dem Kruskal-Wallis-Test. Das Signifikanzniveau wurde auf $p \leq 0,05$ festgelegt.