

2 Material und Methode

Im folgenden Abschnitt werden das Studiendesign dargelegt, das studienrelevante Monitoring beschrieben und die Messzeitpunkte definiert. Außerdem werden verwendeten Leberfunktionstests sowie die Parameter zur Überprüfung der Sauerstoffmangelversorgung und die Parameter zur Früherkennung einer systemisch inflammatorischen Entzündungsreaktion beschrieben und deren Messprinzip erläutert.

2.1 Patienten

Nach Zustimmung der Ethikkommission der Charité wurden in Frage kommende Patienten, die sich einer elektiven aortokoronaren Bypassoperation unterziehen mussten, im Rahmen dieser Studie nach Ein- bzw. Ausschlusskriterien ausgewählt und am Vorabend des Operationstages ausführlich über das Anliegen der Studie aufgeklärt. Sie erhielten sowohl mündliche als auch schriftliche Informationen über das Ziel, den Ablauf und die möglichen Risiken der Studie und wurden nach ihrer schriftlichen Einwilligung in das Projekt aufgenommen. Für alle Patienten bestand jederzeit die Möglichkeit ihre Teilnahme an der Studie zurückzuziehen. Im Zeitraum von Januar 2004 bis Januar 2005 wurden insgesamt 58 männliche und 4 weiblichen Patienten während ihres Aufenthaltes in der Klinik für Anästhesie und Intensivmedizin, Campus Charité Mitte, in die Studie eingeschlossen. Bereits im Vorfeld wurde in Zusammenarbeit mit dem Biometrieinstitut der Charité eine Randomisierungsliste erstellt, mit deren Hilfe die eingeschlossenen Patienten auf 2 Behandlungsgruppen zufällig verteilt wurden. Es bestand die Aufgabe, durch das Verfahren der isovolämen Hämodilution (IHD), in den Behandlungsgruppen einen Hämatokritwert (Hk-Werte) von 20% bzw. 25% unter normothermer extrakorporaler Zirkulation zu erreichen. 31 Patienten, einschließlich der 4 weiblichen, wurden nach dem Zufallsprinzip der 25%-Hk-Gruppe zugeteilt und 28 Patienten kamen in die 20%-Hk-Gruppe. Insgesamt wurden 3 Patienten von der statistischen Auswertung ausgeschlossen. In einem Fall konnte das Eigenblut nach Bypassoperation nicht retransfundiert werden, da es in den Konservebeuteln geronnen war. In einem anderen Fall wurde intraoperativ ein kombiniertes Operationsverfahren aus Bypass und Herzklappe angewandt. Ein dritter Patient entschied sich unmittelbar vor der Operation gegen die Teilnahme an der Studie.

2.2 Ein-, Ausschluss- und Abbruchkriterien

Die Tabelle 1 gibt einen Überblick über die angewendeten Ein- und Ausschlusskriterien.

Tab. 1: Zusammenstellung der Ein-, Ausschluss-, und Abbruchkriterien

Ein- schluss- kriterien	<p>Elektive aortokoronare Bypassoperation Alter zwischen 18 und 80 Jahren Ejektionfraktion > 40% Mindestgewicht > 70 Kilogramm</p>
Ausschlusskriterien	<p>Ablehnung des Patienten Nicht- Einwilligungsfähigkeit des Patienten Neurologische Vorerkrankung zerebrale Insulte innerhalb der letzten 2 Jahre zerebrale Insulte mit neurologischen Residuen ein- oder beidseitige Arteria carotis interna Stenose >50% Multiple Sklerose Morbus Parkinson Alkohol-, Drogen- und Medikamentenabhängigkeit endogene medikamentenpflichtige Depressionen Epilepsie chronischer Lungenerkrankung partielle Respiratorische Insuffizienz Asthma bronchiale eine Lungenfunktion FEV1 < 70% FEV1/VC < 70% kardialen Vorerkrankungen Instabile Angina pectoris Herzinfarkt innerhalb der letzten 4 Wochen NYHA III- IV klinisch relevante Klappenvitien Rebypassoperation Ejektionfraktion kleiner 40% Niereninsuffizienz chronischer kompensierte Niereninsuffizienz (Krea>1,5 mg/dl) Terminale Niereninsuffizienz Diuretikaeannahme > 40mg Furosemid/d Gastrointestinale Vorerkrankung chronischer entzündliche Darmerkrankung chronische Lebererkrankung aktiver oder chronischer Hepatitis Bilirubinwert > 2mg/dl Pharmako- hämatologische Interaktionen Einnahme von Aspirin bis 5 Tage präoperativ Einnahme von ADP- Antagonisten (Clopidogrel/ Ticlopidin) bis 7 Tage prä-operativ Therapie mit GPIIb/IIIa Rezeptorantagonisten bis 3 Tage präoperativ Plasmatische Gerinnungsstörung (Quick <70%, aPTT > 50%) Anamnetisch bekannte Leberinsuffizienz Bekannte Thrombozytopenie bzw. pathie Überempfindlichkeit gegen Lidocain und Zuckerstoffe</p>
Abbruch- kriterien	<p>Intraoperative Abfall des Hämatokrit um mehr als 2% unter den Gruppenwert randomisierte Hämatokrit mit Transfusionsbedarf Indikation für hypotherme extrakorporale Zirkulation postoperative postoperative Drainageverluste > 400ml/3h</p>

2.3 Anästhesieverfahren, Kardiopulmonale Bypasstechnik und Transfusionsmanagement

2.3.1 Anästhesieführung

Am Vorabend des Operationstages wurden die Patienten im Rahmen des Prämedikationsgesprächs routinemäßig über den Anästhesieablauf aufgeklärt. Dabei wurden die Patienten mit dem Anliegen der Studie vertraut gemacht sowie bei Einwilligung zur Teilnahme über den Studienablauf und möglichen Risiken aufgeklärt. Die Einwilligung in die Studie wurde durch eine Unterschrift dokumentiert. Als orale Prämedikation wurde ihnen Flunitrazepam (0,5-2mg) zur Nacht angeordnet. Am nächsten Morgen, eine Stunde vor Narkoseeinleitung, wurde den Patienten die gewohnte Herzmedikation sowie Midazolam (0,1mg/kg) verabreicht. Im Anästhesieeinleitungsraum legte man den Patienten zunächst in örtlicher Betäubung mit Prilocain eine Femoralarterie (Pulsionkatheter, Pulsion, München, Deutschland) zur kontinuierlichen Blutdruckmessung an. Es folgte die Narkoseeinleitung nach den Standards der Klinik für Anästhesie und operative Intensivmedizin der Charité Campus Mitte [86] mit Midazolam (0,05-0,1 mg/kg), Fentanyl (0,5µg/kg), Etomidat (0,2mg/kg) und Pancuronium (0,1mg/kg). Zur Aufrechterhaltung der Narkose wurden Isofluran (0,6-1Vol%) und Fentanyl (0,5- 10µg/kg/h) gegeben. Midazolam (0,1mg/kg) und Pancuronium (0,03mg/kg) wurden vor dem Anschluss an die HLM repetitiv injiziert. Nach erfolgreicher endotrachealer Intubation wurden die Patienten mit einem arteriellen Ziel-CO₂ (35-40mmHg) kontrolliert beatmet. Zum kontinuierlichen, perioperativen Monitoring zählten das Anlegen eines 5 Kanal EKG's, invasive Blutdruckmessung über die A. femoralis-Kanüle, die Kontrolle der Sauerstoffsättigung mittels Pulsoxymetrie, das Anlegen einer naso- oder orogastralen Sonde und eines Blasenkatheters sowie die Anlage eines vierlumigen zentralvenösen Katheters in die Vena jugularis interna zur Bestimmung des zentralvenösen Drucks und der venösen Sauerstoffsättigung. Zusätzlich zum ZVK erhielten die Patienten einen Pulmonalarterienkatheter (Thermodilution Catheter, Arrow, Reading, PA, USA) in die rechte Jugularvene, um mit dessen Hilfe das Herzzeitvolumen, den lungenkapillären Verschlussdruck und die Pulmonalarteriendrucke zu ermitteln. Um während der extrakorporalen Zirkulation eine Antikoagulation zu erreichen, wurde allen Patienten 400I.E/kg Heparin verabreicht und über die Messung der Activated Clotting Time (ACT) überwacht. Zur Entwöhnung von der extrakorporalen Zirkulation wurden Dopamin (5-8µg/kg/min) und Nitro (0,5-

2µg/kg/min) nach den Standards der Klinik für Anästhesiologie und operativen Intensivmedizin [86] eingesetzt. Alle Patienten erhielten vor und nach dem chirurgischen Eingriff eine Antibiotikaprohylaxe mit Cefuroxim. Nach Beendigung der Operation wurden die Patienten auf die Intensivstation verlegt und mittels Propofol (2-6mg/kg/h) für mindestens weitere 6 Stunden unter druckkontrollierter, maschineller Beatmung sediert. Neben der medikamentösen Unterstützung des Herz-Kreislaufsystems durch Dopamin (3-8µg/kg/min) und Nitro (0,5-2µg/kg/min) wurde eine Analgesie nach den klinischen Standards durchgeführt. Beginnend etwa 6 Stunden nach der Operation, wurde allen Patienten pro Tag Heparin (250 I.E./h) und Acetylsalicylsäure 100mg i.v. zur Thromboseprohylaxe verabreicht. Traten keine weiteren hämodynamischen oder sonstige interkurrente Komplikationen auf, wurden die Patienten nach Beendigung der Sedierung und Wiedereintreten einer suffizienten Spontanatmung extubiert. Zum weiteren standardisierten, postoperativen Management auf der Intensivstation [86] zählten eine physiotherapeutisch geleitete Frührehabilitation am ersten postoperativen Tag sowie in vorgegebenen Zeitabständen EKG-Kontrollen, Laboruntersuchungen (inklusive BB, Gerinnung, Kreatinin, Harnstoff, Creatininkinase, Creatininkinase-Myoglobin, Troponin, Aspartat-Aminotransferase), Blutgasanalysen und Röntgenkontrollen.

2.3.2 Technik der extrakorporalen Zirkulation

Alle Patienten unterzogen sich einer elektiven aortokonaren Bypassoperation. Zum standardisierten Priming der HLM gehörten 500ml kristalloide Flüssigkeit, 500ml einer 10%igen Hydroxyethylstärke (Voluven®, Fresenius-Kabi, Bad Homburg, Germany), 8000 I.E. Heparin und 50.000 I.E. Aprotinin/kg Körpergewicht. Nach Anschluss an die HLM wurde die Perfusion und Oxygenierung des Organismus durch non-pulsatilen Blutfluss mittels einer Zentrifugalpumpe (Jostra, Hirrlingen, Germany) und durch die Verwendung eines Kapillarmembranoxygenator (Jostra, Hirrlingen, Germany) unter normothermen (35°C-36°C) Bedingungen durchgeführt. Der Blutfluss wurde so eingestellt, dass ein mittlerer arterieller Blutdruck von 60mmHg erzielt wurde. Bei Unterschreitung des Zielwertes trotz maximaler Leistung der Zentrifugalpumpe erhielten die Patienten nach den Standards für kardiovaskuläre Chirurgie zur Unterstützung der Kreislauffunktion bolusweise Noradrenalin.

2.4 Studiendesign und Monitoring

2.4.1 Studiendesign

Es wurde eine prospektiv randomisierte Studie durchgeführt, bei der die Patienten präoperativ entsprechend einer Randomisierungsliste zufällig in 2 Gruppen eingeteilt wurden. Insgesamt 59 Patienten wurden auf eine Studien- und Kontrollgruppe verteilt.

Studiengruppe: Isovolumäre Hämodilution auf einen Hämatokrit von 20% unter HLM

Kontrollgruppe: Isovolumäre Hämodilution auf einen Hämatokrit von 25% unter HLM

2.4.2 Studienrelevantes Monitoring

Zunächst wurde bei allen Studienteilnehmern die Narkoseeinleitung nach den klinischen Standards [86] durchgeführt. Mittels Pulmonalarterienkatheter erfolgte die Messung des Herzzeitvolumen über die Anwendung der Thermodilutionsmethode [87], die Bestimmung des lungenkapillären Verschlussdruckes sowie die Ermittlung der Pulmonalarteriendrucke. Aus den kontinuierlich gemessenen Werten wurden über Standardformeln der Cardiacindex, der systemische Widerstand und der pulmonalvaskuläre Widerstand berechnet. Zum weiterführenden Monitoring im Rahmen der Studie zählten außerdem die Evaluierung des intrathorakalen Blutvolumens und extravaskulären Lungenwassers über den PICCO-Plus-Monitor (PICCO Plus, Pulsion Medical System, München, Deutschland) sowie multiple Blutentnahmen aus dem arteriellen, venösen und gemischtvenösen Schenkel der jeweiligen Katheter, um den Sauerstoffgehalt, den Hämatokrit, den Hämoglobingehalt, die Laktatbildung, die Elektrolyte Natrium, Kalium und ionisiertes Calcium sowie den Säure-Basen-Haushalt zu überwachen. Zur Leberfunktionsprüfung wurden die Aspartat-Aminotransferase und die α -Gluthation-S-Transferase bestimmt, sowie die Leberperfusion mittels Plasmadisappearance-Rate und der Leberstoffwechsel durch den MEGX-Test überprüft. Die Messung der Zytokinausschüttung erfolgte aus einer arteriellen Blutprobe mittels Enzym Immunoassay. Die Dünn- und Dickdarmfunktion wurde prä- und postoperativ mit Hilfe des Permeabilitätstestes überwacht.

2.4.3 Messzeitpunkte

In Tabelle 2 ist eine Übersicht aller studienrelevanten Parameter mit den entsprechenden Abnahmezeitpunkten zusammengestellt. Im nachfolgenden werden die Messzeitpunkte erläutert:

präoperativ

M1 Messzeitpunkt 1: vor Narkoseeinleitung

M2 Messzeitpunkt 2: vor Hämodilution, nach Narkoseeinleitung

intraoperativ

M3 Messzeitpunkt 3: nach Hämodilution, vor Anschluss an HLM,

M0'-105' Messzeitpunkte 0-105 Minuten: während HLM

M4 Messzeitpunkt 5: nach Kalibrierung, nach Abschluss der HLM

postoperativ

M5 Messzeitpunkt 6: 1 Stunde postoperativ, auf der ITS

M6 Messzeitpunkt 7: 6 Stunden postoperativ, auf der ITS

M7 Messzeitpunkt 8: 18 Stunden postoperativ, auf der ITS

Tab. 2: Messzeitpunkte

Parameter		Messzeitpunkte															
		M1	M2	M3	Zeit an der Herz-Lungenmaschine [min]								M4	M5	M6	M7	
					0	15	30/b1	45	60	75	90	105					
häodynamisches Monitoring	ABP		X	X									X	X	X	X	
	ZVD		X	X									X	X	X	X	
	CI		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
	SVR		X	X									X	X	X	X	
	PVR		X	X									X	X	X	X	
	ITBV		X	X									X	X	X	X	
	EVLW		X	X									X	X	X	X	
Blutgasanalyse	pH	X	X										X	X	X	X	
	pCO ₂	X	X										X	X	X	X	
	pO ₂	X	X										X	X	X	X	
	sO ₂	X	X										X	X	X	X	
	Hb	X	X										X	X	X	X	
	Hk	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	stHCO ₃	X	X										X	X	X	X	
	ABE	X	X										X	X	X	X	
	Na ⁺	X	X										X	X	X	X	
	K ⁺	X	X										X	X	X	X	
	CL ⁻	X	X										X	X	X	X	
	Glucose	X	X										X	X	X	X	
Laktat	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
Leberfunktion	ASAT		X											X	X	X	
	α GST		X											X	X	X	
	PDR		X											X	X	X	
	MEGX		X											X	X	X	

Zum häodynamischen Monitoring zählten die invasiven Messungen des arteriellen, zentralvenösen und pulmonalkapillären Verschlussdruckes (ABP, ZVD, PCWP), des Cardiacindex (CI), des systemischen und pulmonalen Gefäßwiderstandes (SVR, PVR), des intrathorakalen Blutvolumens (ITBV) und des extravaskulären Lungenwassers (EVLW). Die Bestimmung erfolgte an sechs verschiedenen Messzeitpunkten (M:2, 3, 4, 5, 6, 7).

Die Überwachung des Blutgases mit Bestimmung des pH-Wertes, des Sauerstoff- und Kohlenstoffdioxidpartialdruckes (pCO₂, pO₂), der Sauerstoffsättigung (sO₂), des

Hämoglobin- (Hb), des Hämatokrit- (Hk) und des Standard-Bikarbonat-Wertes ($s\text{HCO}_3$), des aktuellen Basenüberschusses (ABE), der Elektrolyten (Na^+ , K^+ , Cl^-) sowie des Glucose- und Laktatspiegels wurde an 5 Messzeitpunkten (M: 1, 2, 4, 5, 6, 7) durchgeführt.

An der Herz-Lungen-Maschine wurden der Cardiacindex, das gemischtvenöse Laktat und der arterielle Hämatokritwert alle 15 Minuten (M: 0'-105') und ins Messprotokoll aufgenommen.

Die Bestimmung der Leberperfusion über die Plasma Disappearance Rate (PDR) mittels Indocyaningrün und die hepatische Metabolisierung von Lidocain zu Monoethylglycinxylylidid (MEGX) sowie die Bestimmung der Aspartat-Aminotransferase (ASAT) und α -Gluthation-S-Transferase (α -GST) erfolgte zu 4 Zeitpunkten (M:2, 5, 6, 7).

Patienten, die aufgrund von interkurrenten Komplikationen länger als bis zum Messzeitpunkt M7 auf der Intensivstation verweilten, wurden einmal täglich nachvisitiert. In einer Verlaufsbeobachtung wurden kardiale, neurologische, nephrologische und pulmonale Auffälligkeiten, das Auftreten von Infektionen und die Ergebnisse routinemäßiger Blutbildkontrollen protokolliert. Ebenfalls wurden der tägliche Blutverlust über die Drainagen und der Verbrauch an homologen Blutprodukten dokumentiert.

2.4.4 Hämodilutionsverfahren

Um unter extrakorporaler Zirkulation den geforderten Hämatokritwert zu erreichen, wurde den Patienten nach Narkoseeinleitung Eigenblut entnommen und simultan das Blutvolumen isovoläm mit 6%iger Hydroxyethylstärke (HAES 6%, Voluven, Fresenius-Kabi, Bad Homburg, Deutschland) ersetzt. Die Eigenblutentnahme erfolgte in für diese Zwecke kommerziell hergestellte Blutkonservenbeutel, welche mit den Patientendaten und dem Abnahmezeitpunkt beschriftet wurden. Das abzunehmende Eigenblut berechnet sich nach folgender Formel:

Formel 1: Hämodilutionsformel zur Berechnung des abzunehmenden Eigenblutes

$$Hb_{HLM} = Hb_{baseline} (g / dl) - (Hb_{baseline} (g / dl) \cdot V_{priming} (l))$$

(Hb_{HLM} = Hämoglobin nach Hämodilution durch Primingvolumen der HLM ($\text{kg} \cdot \text{KG} \cdot 10^{-1}$), $Hb_{baseline}$ = Hämoglobin vor Hämodilution (g/dl), $V_{priming}$ = Primingvolumen der HLM (l)).

Der angestrebte Hämatokrit unter normothermer extrakorporaler Zirkulation betrug $20 \pm 1\%$ für die Studiengruppe und $25 \pm 1\%$ für die Kontrollgruppe. Zur Bestimmung des

Hämatokritwertes unter extrakorporaler Zirkulation wurde eine Blutgasanalyse (BGA) zu Beginn und im weiteren alle 15min an der HLM durchgeführt. Zeigte sich nach der ersten BGA-Messung ein zu hoher Hk- Wert, wurde erneut Volumenersatzlösung über den venösen Schenkel der HLM injiziert. Bei Unterschreitung des zu erreichenden Hämatokritwertes erhielten die Patienten das gewonnene Eigenblut bereits unter HLM zurück. Nach Abgang von der HLM wurde den Patienten zunächst autolog gewonnenes Eigenblut retransfundiert, dann das in der HLM befindliche Blutvolumen (HLM-Perfusat). Erst bei zusätzlichem Blutproduktebedarf setzte man Fremdblutspenden ein.

2.4.5 Intra- und postoperatives Transfusionsmanagement

Fanden sich intraoperativ Hinweise für eine Sauerstoffminderversorgung durch z.B. ST-Strecken-Senkung oder –hebung im EKG, neu aufgetretene Laktatazidose bzw. Herzrhythmusstörungen oder sank der Hämatokrit unter den jeweiligen Zielwert von 20 vs. 25% in den Gruppen, erhielten die Patienten das entsprechend dem präoperativen Hämodilutionsverfahren gewonnene Eigenblut eher zurück. Erst nach Rückgabe des gesamten Eigenblutes und der Retransfusion des Restblutvolumens aus der HLM wurde auf Fremdblutkonserven zurückgegriffen. Bei komplikationslosem Operationsverlauf wurden den Patienten das präoperativ gewonnene Eigenblut sowie das Reserveblutvolumen der extrakorporalen Zirkulation nach Abgang von dieser HLM retransfundiert. Nach einer postoperativen Stabilisierungsphase von drei Stunden bekamen diejenigen eine Fremdblutkonserve, bei denen entweder der Hämatokritwert kleiner 24% war oder sich das Bild einer Sauerstoffminderversorgung (ST-Pathologie, Laktatazidose, neu aufgetretene Herzrhythmusstörungen, periphere Zirkulationsstörung) darstellte. Die Fremdbluttransfusion erfolgte gemäß den Transfusionsrichtlinien der Bundesärztekammer [5]. EKs und FFPs wurden AB0-gleich, TKs AB0-kompatibel, nach präoperativer Aufklärung und schriftlicher Zustimmung des Patienten, über den ZVK mittels Standardfilter (DIN 58360, Porengröße 170-230µm) transfundiert.

2.5 Hämoglobin, Hämatokrit und Cardiacindex

Zur Hämoglobinbestimmung (Hb) wurde 1ml arterielles, gemischtvenöses und venöses Blut mit Hilfe des Probennehmers (Pico50, Radiometer™, Medical A/S, Kopenhagen, Dänemark) aus den entsprechenden Kathetern entnommen. Der Probennehmer ist zur Vermeidung von Gerinnselbildung mit 80 I.U. elektrolyt-kompensiertem Heparin

versehen. Unter Anwendung des Blutgasanalysegerätes (Radiometer™ ABL700, Medical A/S, Kopenhagen, Dänemark) erfolgte direkt im Anschluss an die Abnahme über das Prinzip der Absorptionsspektroskopie die Auswertung. Sie basiert auf dem Lambert-Beerschen Gesetz.

Formel 2: Lambert- Beersche Gesetz

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot d$$

(A= Absorption in nm, ε = molarer Extentionskoeffizient in L/mol/cm, c= Konzentration der zu messenden Substanz in der Probe, d= Schichtdicke in cm).

Durch die Inanspruchnahme eines 128-Wellen-Spektrophotometer werden im Bereich der Wellenlänge von 478-672nm die entsprechenden Absorptionsmaxima des Hämoglobins erfasst. Analog zur Hämoglobinbestimmung erfolgte die Messung des Hämatokritwertes (Hk) aus arteriellen, venösen und gemischtvenösen Blutproben. Dazu wurde jeweils 1ml Blut mittels eines Probenaufnehmers (Pico50, Radiometer™, Medical A/S, Kopenhagen, Dänemark), dessen Wand mit elektrolyt-kompensiertem Heparin behaftet war, gewonnen. Unter Anwendung des im Blutgasanalysegerät gemessenen Hämoglobinwertes (Radiometer™ ABL700, Medical A/S, Kopenhagen, Dänemark) wurde der Hämatokrit berechnet. Der Cardiacindex (CI) ist ein Parameter der sich aus dem Quotienten von gemessenem Herzzeitvolumen und der individuellen Körperoberfläche des Patienten berechnen lässt. Dabei stellt sich die Herzzeitvolumenmessung als eine essentielle Messmethode für die Überwachung der Herz- und Kreislauffunktion dar, welche mit Hilfe der Thermodilutionsmethode über den Pulmonalarterienkatheter ermittelt wird [88,89]. Beruhend auf dem Fick'schen Prinzip [90] wird diskontinuierlich ein Kältebolus in den rechten Vorhof des Herzens injiziert, der einen Temperaturunterschied zwischen normaler Bluttemperatur und dem Gemisch aus Injektat und Blut herbeiführt. Ein Temperaturfühler nimmt den Temperaturunterschied auf und wandelt ihn in elektrische Signale um, die sich dann am Monitor in Form einer Kurve darstellen lassen. Aus der resultierenden Fläche unter der Temperaturkurve kann das Herzzeitvolumen berechnet werden, welches in die Berechnung des Cardiacindexes wie folgt eingeht:

Formel 3: Berechnung des Herzzeitvolumens

$$HZV = \frac{V_i \cdot (T_b - T_i) \cdot DF \cdot K}{T_b(t)dt}$$

Formel 4: Berechnung des Cardiacindexes

$$CI = \left(\frac{Vi \cdot (Tb - Ti) \cdot DF \cdot K}{Tb(t)dt} \right) / KO$$

(HZV= Herzzeitvolumen, CI= Cardiacindex; Vi= Injektionsvolumen; Tb= Bluttemperatur; Ti= Injektionslösungstemperatur; DF= Dichtefaktor; K= Berechnungskonstante; Tb(t)dt= Temperaturveränderung in Abhängigkeit von der Zeit, KO= Körperoberfläche).

Zur Messung wurde ein vierlumiger Pulmonalarterienkatheter über eine Schleuse in die rechte Vena jugularis interna eingeführt. Sein proximales Ende diente zur Injektion der kalten Thermodilutionslösung und wurde im rechten Vorhof positioniert. Im Anschluss wurden 10ml physiologischer Kochsalzlösung eingespritzt, die sich mit dem Blutvolumen vermischten und zu einer Absenkung der Bluttemperatur führten. Die Detektion des Temperaturunterschiedes erfolgte entlang des PAK am Injektionsschenkel der Thermodilutionslösung (Injektattemperatur) und an der Spitze des Katheters, wo die Bluttemperatur vor und nach Injektion der kalten Kochsalzlösung gemessen wurde. Das PICCO-System misst die Abkühlung des Blutes nach Injektion der Thermodilutionslösung über einen Temperatursensor an der Femoralarterie.

2.6 Leberenzyme

2.6.1 Aspartat-Aminotransferase

Zur Bestimmung der Aspartat-Aminotransferase (ASAT) wurden 2,7ml arterielles Blut entnommen und in ein EDTA-Plasmaröhrchen (Monovette, FA. Sarstedt, Nürnberg) gefüllt und bei 3000 Umdrehungen/min für 10 Minuten zentrifugiert (Allegra 21R Zentrifuge, Firma Beckmann Coulter, München). Im Anschluss wurden 500µl des Plasmaüberstandes in ein Eppendorfgesäß pipettiert und bei -83°C eingefroren. Die Konzentrationsbestimmung der ASAT erfolgte in der Abteilung für Klinische Chemie am Campus Charité Mitte im Rahmen der klinischen Routine am Analysegerät der Firma Roche (MODULAR® Analytics D2400, P800, Roche, Deutschland). Das Testprinzip basiert auf dem Transfer von Aminogruppen von L-Aspartat und 2 Oxoglutarat auf Oxalacetat und L-Glutamat und der anschließenden Bildung von L-Malat aus Oxalacetat und NADH unter Verbrauch von Malatdehydrogenase. Zur entnommenen Probe werden schrittweise Puffer, Enzym, Coenzym und α-Ketoglutarat hinzugefügt, sodass aus Aminosäuren α-Ketosäuren entstehen und umgekehrt. Der daraus resultierende NADH-Verbrauch bzw. die NAD-Bildung werden photometrisch gemessen. Diese Werte korrelieren mit der vorhandenen Menge an Aspartat-

Aminotransferase.

2.6.2 α -Gluthation-S-Transferase

Zur α -Gluthation-S-Transferase-Messung (α -GST) wurden den Patienten 2,7ml arterielles Blut entnommen und in ein Plasmaröhrchen mit EDTA-Zusatz (Monovette, FA. Sarstedt, Nürnberg) gefüllt. Nach zehnmütigem Zentrifugieren (Allegra 21R Zentrifuge, Firma Beckmann Coulter, München) bei 3000 Umdrehungen/min wurden 500 μ l des Plasmaüberstandes in einem Eppendorfgefäß bei -83°C aserviert. Die Bestimmung der α -GST basiert auf dem Enzymimmunoassay-Testverfahren (Biotrin, Herpkit[®]-Alpha, Dublin, Irland). Dazu werden 50 μ l Plasmaprobe mit 200 μ l Waschlösung, bestehend aus phosphatgepuffertem Kochsalz, verdünnt und in jede Vertiefung (Well) einer Mikrotiterplatte eingebracht, die bereits mit einem α -GST Antikörper beschichtet sind, und für ca. 60 Minuten inkubiert. Während dieser Inkubationszeit binden die an der Mikrotiterplatte haftenden Antikörper das eingebrachte Antigen. Nach mehrmaligem Waschen mit 250 μ l Waschlösung werden jedem Well 100 μ l Konjugat, zusammengesetzt aus anti- α -GST-IgG und Meerrettichperoxidase, hinzugefügt und erneut für 30 Minuten inkubiert. Nach erneutem Waschen verbleiben ausschließlich Komplexe aus haftendem Antikörper, Probenmaterial und enzymmarkiertem Antikörper in den Vertiefungen der Mikrotiterplatte. In einem weiteren Reaktionsschritt werden 100 μ l stabilisierende TMB-Substratlösung in jede Vertiefung hineinpipettiert und für 15 Minuten in dunkler Umgebung inkubiert, um eine Farbentwicklung hervorzurufen. Die Ausprägung der Farbentwicklung ist abhängig von der Menge an gebundenem Antigen. Um die Antigen-Antikörper-Reaktion zu beenden, erfolgt das Hinzufügen von 100 μ l Schwefelsäure. Entsprechend der Menge an gebundenem Substrat werde deren Extinktion bei einer Wellenlänge von 450nm photometrisch gemessen und die sich dazu proportional verhaltende α -GST Konzentration bestimmt. Die Obergrenze des Referenzbereiches für die α -GST-Bestimmung liegt bei 11,4 $\mu\text{g/l}$. In Vorbereitung zur α -GST-Messung wurden den Patienten 10ml Blut aus der Arteria femoralis abgenommen und in ein EDTA-Röhrchen gegeben und anschließend bei 3000 Umdrehungen/min 10 Minuten zentrifugiert. Aus dem Überstand wurden 500 μ L Serum bei -83°C eingefroren.

2.7 Leberperfusion mittels Plasmadisappearance-Rate des Indocyaningrünes

Um die Plasmadisappearance-Rate (PDR) des Indocyaningrünes (ICG) zu ermitteln,

wurde bei den Patienten ein Ohrdensitrometer (PV50100 Limon, Pulsion Medical System AG, München) befestigt. Nach Anlegen dieser Messsonde wurde den Patienten 0,5mg/kg Körpergewicht Indocyaningrün in definierter Lösung über den zentralvenösen Katheter injiziert. Die Aufzeichnung der Farbstoffextraktionsrate erfolgte am Limon-Monitor (PC 5000 Limon, Pulsion Medical System AG, München). Die ICG-Konzentrationsbestimmung basiert auf dem Prinzip der Pulsdensitrometrie. Die qualitative und quantitative Absorption des Lichtes wird im sichtbaren und infraroten Wellenlängenbereich gemessen und physikalisch durch das Lambert-Beersche Gesetz (siehe Formel 2) beschrieben. Die PDR des Indocyaningrün wird analog zur Pulsoxymetrie über die quantitative Messung der Farbstoffmenge pro Flächeneinheit bestimmt. Dabei durchdringt Licht definierter Wellenlänge Strukturen, wie Haut, Bindegewebe, Knochen, arteriell- oder venös durchblutete Gefäße und wird von diesen Geweben zu einem bestimmten Anteil absorbiert. Der übrige Lichtanteil wird reemittiert und mit dem Ausgangswert verglichen. In Abhängigkeit von der pulsatilen Blutvolumenänderung des mit Farbstoff beladenen Hämoglobins verändert sich die Absorption des Lichtes. Je mehr Farbstoff vorliegt, desto weniger Licht kann zurückgesendet werden. In den übrigen Schichten bleibt die Absorption konstant. Das Absorptionsmaximum des ICG Farbstoffes liegt in der Regel bei einer Wellenlänge von 805 nm, kann sich jedoch in Abhängig von der Konzentration des Farbstoffes und der Beschaffenheit des Lösungsmittels ändern.

2.8 Leberfunktion durch Monoethylglycinoxylididbestimmung

Für die Bestimmung der MEGX-Konzentration wurde den Patienten ein Bolus mit 1mg/kg Körpergewicht Lidocain in den zentralvenösen Katheter injiziert. Nach 15 min wurden 9ml arterielles Blut in ein Serumröhrchen (Monovette, FA. Sarstedt, Nürnberg) pipettiert und bei 3000 Umdrehungen/min für 10 Minuten zentrifugiert (Allegra 21R Zentrifuge, Firma Beckmann Coulter, München). Anschließend wurden 500µl des Überstandes in ein Eppendorfgefäß abpipettiert und bei -83°C eingefroren. Beim MEGX-Test wird eine intravenös applizierte Lidocaintestdosis mit dem Blutkreislauf zur Leber befördert und dort gemäß dem First-Pass-Effekt nahezu vollständig über spezifische Transporter in die Hepatozyten eliminiert. Der Abbau von Lidocain zu Monoethylglycinoxylidid wird durch das Isoenzym Cytochrom P450 katalysiert. Im menschlichen Organismus sind vor allem die Cytochrome 3A4 und 1A2, die das erste Abbauprodukt darstellen, für die Umwandlung von Lidocain zu Monoethylglycinoxylidid

verantwortlich, wobei dem Cytochrom 3A4 jedoch die größere Bedeutung zukommt [91,92]. Die Auswertung der Proben resultierte aus einer Kombination von High-Pressure-Liquid-Chromatographie (HPLC) und Massenspektrometrie (LC-MS/MS). Sie erfolgte in der Abteilung für Klinische Chemie der Universitätsklinik Göttingen. In Vorbereitung auf die spektrometrische Messung wurden 100µl einer Probe mit 50µg Fällungsmittel, bestehend aus einem Gemisch von 70ml MPGX und 30ml 0,3 molarem ZnSO₄, versehen und durch einen Vibriermischer 30s gemischt. Anschließend sind die Proben mittels Tischzentrifuge bei 4000 Umdrehungen/min in ihre Fällungsprodukte zerlegt worden. Nach zehnteiliger Zentrifugieren wurde der neu entstandene Überstand in ein Eppendorfgefäß dekantiert. Das Prinzip der HPLC (PE Serie 200, Perkin Elmer, Überlingen, Deutschland) entspricht einer Flüssigkeitschromatographie, bei der unter Hochdruck, in der Regel 100-250 bar, die Analyten in Abhängigkeit von der Retentionszeit in einzelne Moleküle zerlegt werden. Durch die Wechselwirkung zwischen einer stationären Phase in einer Edelstahlsäule und einer mobilen Phase (Eluenten) wird diese Auftrennung erreicht. Die von der Säule partitionierten Analyten werden zusammen mit einem weiteren Eluenten über eine Kapillare in das Massenspektrometer (PE Sciex ABI 2000 von Applied Biosystem) eingebracht. Im Massenspektrometer findet eine Elektrospray-Ionisation (ESI) statt, bei der die partitionierten Analyte bis in einzelne Ionen zerlegt werden. Dazu wird eine Spannungsdifferenz, durch das Anlegen einer 5 kV Spannung an die Kapillarenspitze von außen und die im Kapillarinernen konstant gehaltene Niederspannung, erzeugt, die eine Ionisation des Analyten herbeiführt. Das Masse-Ladungsverhältnis der Ionen entscheidet, ob ein Ion den Detektor erreicht und als Signal registriert wird. Am Detektor werden aus Ionenfragmenten Elektronen separiert, gebündelt, um ein messbares Signal abzuleiten. Die Quantifizierung erfolgt durch die Bildung des Quotienten aus Signalfläche des Analyten und einem internen Standard.

2.8.1 Modellierung der Lidocain-Elimination und MEGX-Invasion

Um eine Vorstellung zum zeitlichen Verhalten der Lidocain- und MEGX-Konzentrationen zwischen den Messzeitpunkten zu gewinnen, wurden modellgestützte Berechnungen durchgeführt. Ausgehend von den aus der Literatur bekannten Halbwertszeiten [93,94,95] dieser Stoffe wurden die Halbwertszeiten und Anfangskonzentrationen im Modell so gewählt, dass die simulierten Werte an den Messzeitpunkten mit den aus dem Versuch ermittelten Median-Werten von Lidocain-

und MEGX übereinstimmen. Der Konzentrationsverlauf von MEGX wird als Kombination der Umwandlungsreaktion von Lidocain in MEGX und der Eliminierung von MEGX über die Batemanfunktion [96] berechnet. Die Lösung der Umwandlungsreaktion (5)

Formel 5: Konzentrationsverlauf des Lidocain

$$\frac{d}{dt} c_L(t) = -\frac{\ln 2}{t_{HL}} c_L(t) \rightarrow c_L(t) = c_{L0} e^{\left(\frac{-\ln 2 \cdot t}{t_{HL}}\right)}$$

($c_L(t)$ = Lidocain-Konzentration als Funktion der Zeit, t = Zeit; t_{HL} = Halbwertszeit von Lidocain, c_{L0} = Lidocainanfängskonzentration)

ergibt den zeitlichen Konzentrationsverlauf $c_L(t)$ von Lidocain.

Wir nehmen weiterhin an, dass die Invasion von MEGX in die Leber mit der Lidocain-Halbwertszeit t_{HL} und die Eliminierung von MEGX mit der Halbwertszeit t_{HM} erfolgt.

Die MEGX-Konzentration wurde aus der Gleichung (6) ermittelt.

Formel 6: Bateman-Funktion I

$$\frac{d}{dt} c_M(t) = c^* \cdot \frac{\ln 2}{t_{HL}} e^{\frac{-\ln 2 \cdot t}{t_{HL}}} - \frac{\ln 2}{t_{HM}} c_{(M)}(t)$$

($c_M(t)$ = MEGX-Konzentration als Funktion der Zeit, t = Zeit, c^* = bezeichnet den Quotienten aus Bioverfügbarkeit F und Verteilungsvolumen V_D , t = Zeit; t_{HM} = Halbwertszeit von MEGX).

Der Lösungsansatz (7) wurde in Gleichung (6) eingesetzt.

Formel 7: Bateman-Funktion II

$$c_M = c_1 \cdot e^{\frac{-\ln 2 \cdot t}{t_{HL}}} + c_2 e^{\frac{-\ln 2 \cdot t}{t_{HM}}}$$

(c_M = MEGX-Konzentration, c_1 = Konstante, c_2 =Konstnate, t_{HM} = Halbwertszeit von MEGX, t_{HL} = Halbwertszeit von Lidocain).

Dabei heben sich die c_1 -Terme auf und es folgt für c_2 (Gleichung (8)):

Formel 8: Bateman-Funktion III

$$c_2 = \frac{\frac{\ln 2}{t_{HL}} c^*}{\ln 2 \left(\frac{1}{t_{HM}} - \frac{1}{t_{HL}} \right)}$$

(c_2 =Konstnate, c^* = bezeichnet den Quotienten aus Bioverfügbarkeit F und Verteilungsvolumen V_D , t_{HM} = Halbwertszeit von MEGX, t_{HL} = Halbwertszeit von Lidocain)

Die Konstante c_1 lässt sich durch Einsetzen von (8) in (7) für $t=0$ bestimmen. Liegt zum

Anfangszeitpunkt die Konzentration c_{M0} vor, erhält man c_1 aus (9).

Formel 9: Bateman-Funktion IV

$$c_M(0) = c_{M0} = c_1 + c_2$$

(c_{M0})= MEGX-Konzentration zum Anfangszeitpunkt, c_1 = Konstante, c_2 =Konstante)

Formel 10: Bateman-Funktion V

$$c_1 = c_{M0} - \frac{\frac{\ln 2}{t_{HL}} c^*}{\ln 2 \left(\frac{1}{t_{HM}} - \frac{1}{t_{HL}} \right)}$$

(c_{M0} = MEGX-Konzentration zum Anfangszeitpunkt, c_1 = Konstante, c^* = bezeichnet den Quotienten aus Bioverfügbarkeit F und Verteilungsvolumen V_D , t_{HM} = Halbwertszeit von MEGX, t_{HL} = Halbwertszeit von Lidocain)

Die Lösung (7-10) der Gleichung (6) wird als Bateman-Funktion bezeichnet. Dabei lässt die Annahme: $c_M(0) = c_{M0} \neq 0$ auch eine Modellierung von Mehrfachinjektionen zu. Aus der Literatur bekannte Halbwertszeiten wurden als Startwert für eine iterative Annäherung der simulierten an die gemessenen Werte benutzt [93,94,95]. Mit Hilfe des simulierten MEGX-Konzentrationsverlaufes konnte zusätzlich ein „korrigierter MEGX-Wert“ an den vorgegebenen Messzeitpunkten ermittelt werden, um eine mögliche Kumulation in der MEGX-Bildung durch Multiinjektionen aufzuzeigen. Dieser korrigierte Wert ergibt sich, wenn vom aktuell gemessenen MEGX-Wert die jeweilige (Rest-) MEGX-Konzentration, die unmittelbar vor der wiederholten Lidocain-Injektion vorhanden war, abgezogen wird.

2.9 Laktat

Für die Laktat-Bestimmung wurden jeweils 1ml Blut aus arteriellem, gemischvenösem und venösem Katheter mit Hilfe eines Probennehmer (Pico50, RadiometerTM, Medical A/S, Kopenhagen, Dänemark), der zur Vermeidung von Thrombenbildung mit elektrolyt-kompensierendem Heparin benetzt ist, gewonnen. Mit Hilfe einer Metaboliten-Elektrode des Blutgasanalysators (RadiometerTM ABL700, Medical A/S, Copenhagen, Denmark) erfolgte die Laktat-Bestimmung zu den vorgegebenen Messzeitpunkten. Die Laktat-Elektrode besteht im Wesentlichen aus einer Silberkathode und einer Platinanode. Sie wird vervollständigt durch eine Multischichtmembran an der Spitze. Die äußere Schicht ist für Laktatmoleküle und die innere Membran für Wasserstoffperoxid durchlässig. Dazwischen befindet sich eine inaktive Enzymschicht mit Laktatoxidase. Führt man nun

dem Analysator eine Blutprobe zu, so passieren Laktatmoleküle die äußere Membran und werden durch die Laktatoxidase in Anwesenheit von Sauerstoff zu Pyruvat und Wasserstoffperoxid umgewandelt. Die Gesamtmenge an produziertem Wasserstoffperoxid wird der Platinanode zugeführt und durch Anlegen einer Spannungsquelle resultiert ein elektrischer Stromfluss. Dabei verhält sich die im Blut der Patienten vorhandene Laktatkonzentration proportional zum gebildeten Wasserstoffperoxid.

2.10 Statistische Analyse

Da bei dem untersuchten Patientengut nicht von einer Normalverteilung ausgegangen werden konnte, wurden alle Messdaten als Median und 25% und 75%-Perzentile angegeben. Die Normalverteilung wurde mittels Kolmogorov-Smirnov-Test überprüft. Um wesentliche Unterschiede zwischen den Untersuchungsgruppen darzustellen, wurde der Mann-Whitney-U-Test für unabhängige Stichproben verwendet. Ließ sich zu einem Messzeitpunkt ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen berechnen (Hb, Hk), wurde mit Hilfe der nichtparametrischen Analyse longitudinaler Daten nach Brunner der signifikante Unterschied über den zeitlichen Verlauf ermittelt. Differenzen der einzelnen Messparameter (sog. lokale Testung) im Vergleich zu ihrem Ausgangswert wurden über den Rangsummentest für abhängige Stichproben nach Wilcoxon analysiert. Ergaben sich dabei signifikante Unterschiede wurden diese mit Hilfe der Bonferoni-Holm Analyse überprüft. Dichotome Daten wurden über den Chi-Quadrat Test ausgewertet. Mit der Berechnung des Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman sollte der Zusammenhang zwischen zwei Variablen untersucht werden. Als signifikant unterschiedlich galten alle Messwerte mit $p^* < 0,05$ und als hochsignifikant mit $p^{**} < 0,01$. Alle Messwerte, die sich signifikant unterschiedlich zum Ausgangswert verhielten, wurden mit $p^\circ < 0,05$ gekennzeichnet.

Zur statistischen Auswertung aller Parameter wurden das Statistikprogramm SPSS (Version 11.5, SPSS GmbH Software, München) und SAS (Version 8.0, Institute Inc., Cary, USA) benutzt. Die graphische Darstellung erfolgte mit Sigmaplot (Version 9.0, Systat Software, Inc., San Jose, USA).