

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I der Universität Würzburg

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Stefan Frantz

Einfluss von Geschwindigkeit, Richtung und Temperatur des Plasmaflusses auf die Selektivität einer Fraktionieremembran während der Doppelfiltrationsplasmapherese am Großtiermodell



**Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der Medizinischen Fakultät
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

vorgelegt von

Niclas Leonard Kiefer

aus Ulm

Würzburg, August 2022

Referent: apl. Prof. Dr. med. Detlef Krieter

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. med. Markus Böck

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 13.03.2023

Der Promovend ist Arzt

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	1
1.1 Hintergrund	1
1.2 Aphereseverfahren	2
1.3 Studienziele	5
2. MATERIAL UND METHODEN	7
2.1 Ethik- und Tierversuchsvotum	7
2.2 Beschreibung der Studie.....	7
2.3 Gerät zur extrakorporalen Behandlung	8
2.4 Verwendeter Plasmafilter	9
2.5 Verwendeter Kaskadenfilter	9
2.6 Versuchsablauf	10
2.6.1 Durchführung	10
2.6.2 Behandlungseinstellungen	11
2.6.3 Antikoagulation	12
2.6.4 Probenentnahme	12
2.6.5 Konzentrationsbestimmung	13
2.7 Berechnungen	13
2.7.1 Reduktionsratio	13
2.7.2 Siebkoeffizienten	14
2.7.3 Transmembranöser Druck	14
2.8 Statistische Evaluation.....	15
3. ERGEBNISSE	16
3.1 Studienverlaufsbeobachtungen.....	16
3.2 Siebkoeffizienten der untersuchten Moleküle	16
3.2.1 LDL-Cholesterin	16
3.2.2 HDL-Cholesterin	18
3.2.3 Immunglobulin G (IgG).....	19
3.2.4 Albumin.....	20
3.2.5 Fibrinogen	21
3.3 Plasmakonzentrationen und Entfernung der untersuchten Moleküle.....	23

3.4 HDL/LDL Ratio	32
3.5 Transmembranöser Druck (TMP) des Kaskadenfilters.....	32
3.6 Korrelation von Siebkoeffizienten und transmembranösen Druck (TMP).....	34
4. DISKUSSION	36
4.1 Bewertung der verschiedenen Aphereseverfahren	36
4.2 Zielsetzungen und Studienaufbau	38
4.3 Das Schafsmodell als Basis für die aktuellen Versuche.....	39
4.4 <i>In-vitro</i>- versus <i>In-vivo</i>-Versuche.....	41
4.5 Effekte der verschiedenen Behandlungseinstellungen auf die Proteinentfernung	43
4.6 Einfluss der verschiedenen Behandlungseinstellungen auf die Selektivität der Fraktionieremembran	45
5. ZUSAMMENFASSUNG	51
6. LITERATURVERZEICHNIS	53
7. ANHANG	
7.1 Materialienliste	
7.2 Abbildungen	
7.3 Abkürzungen	

1. Einleitung

1.1 Hintergrund

Kardiovaskuläre Erkrankungen führen die Liste der häufigsten Todesursachen unserer Zeit in Europa und den USA an (Nichols, Townsend et al. 2013). Der Begriff „kardiovaskulärer Risikofaktor“ tritt erstmals 1948 im Rahmen der Framingham-Studie auf (Mahmood, Levy et al. 2014). Zu den Hauptrisikofaktoren für die Entwicklung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen wie der koronaren Herzkrankheit gehören Rauchen, Hypertonie, Diabetes mellitus und Übergewicht. Eine weitere zentrale Rolle in der Pathogenese dieser Erkrankungen spielen Störungen des Lipoprotein-Stoffwechsels. Atherogenes Low-Density-Lipoprotein (LDL) ist Hauptbestandteil des Blutcholesterins, welches größtenteils verantwortlich für die Assoziation zwischen hohen Cholesterinkonzentrationen und der koronaren Herzkrankheit bzw. dem kardiovaskulären Risiko verantwortlich ist (Kannel and Sytkowski 1987). Erhöhte Lipoprotein (a) (Lp(a))-Konzentrationen spielen ebenfalls eine kausale Rolle in der Entwicklung kardiovaskulärer Erkrankungen (Klingel, Heibges et al. 2017). Das High-Density-Lipoprotein (HDL) hingegen weist einen protektiven antiatherogenen Effekt auf (Ahn and Kim 2016). Patienten mit erhöhten LDL-Cholesterinwerten im Serum profitieren von deren Senkung durch eine medikamentöse Therapie mit HMG-CoA-Reduktase-Hemmern, welche die Mortalität an kardiovaskulären Erkrankungen erheblich senken (Heart Protection Study Collaborative 2002).

In Fällen schwerer Lipidstoffwechselerkrankungen, wie der homozygoten Form der familiären Hypercholesterinämie, welche auf einen genetischen Defekt des LDL-Rezeptors zurückzuführen ist (Sprecher, Hoeg et al. 1985), können die Cholesterinwerte medikamentös nicht effektiv genug gesenkt werden. In diesen Fällen, aber auch bei Patienten mit stark erhöhten Lp(a)-Konzentrationen (Stefanutti, Morozzi et al. 2012), kann eine Therapieeskalation im Sinne eines geeigneten Lipoproteinaphereseverfahrens notwendig sein, um die Progression einer Arteriosklerose zu verhindern (Thompson, Barbir et al. 2010).

1.2 Aphereseverfahren

Es stehen diverse zugelassene Aphereseverfahren zur Verfügung, welche durch verschiedene physikochemische Mechanismen die Konzentration von atherogenem LDL- und Lp(a)-Cholesterin zwischen 60 und 70% senken können (Jaeger, Richter et al. 2009, Thompson, Barbir et al. 2010, Klingel, Heibges et al. 2017) und konsekutiv die Progression von Atherosklerose und kardiovaskulären Erkrankungen verhindern (Koga, Satoh et al. 1991, Kroon, Aengevaeren et al. 1996, Klingel, Heibges et al. 2017).

In den Anfängen wurde mit dem einfachen Prinzip des Plasma-Austauschverfahrens gearbeitet, bei welchem das Patientenplasma durch das eines Spenders ersetzt wurde. Da dies aber ein erhöhtes Infektionsrisiko aufgrund des Spenderplasmas (Stoffel, Borberg et al. 1981) und durch die unspezifische Entfernung von Plasmaproteinen diverse Nebenwirkungen mit sich brachte (Burns 2008), haben sich im klinischen Alltag heutzutage andere Verfahren etabliert. Das ideale Verfahren entfernt im Optimalfall hochselektiv das Pathogen, senkt andere Plasmaproteine aber nicht unter ihre physiologischen Konzentrationen und ist somit nebenwirkungsärmer.

Zu den in Deutschland zugelassenen Aphereseverfahren gehören die Dextransulfatadsorption (DSA), die direkte Adsorption von Lipiden (DALI™), die heparininduzierte extrakorporale LDL-Präzipitation (H.E.L.P.™), die LDL-Immunapherese und die Membran-Differential-Filtration (MDF). Alle Verfahren sind als gleichwertig bezüglich der Senkung von LDL- und Lp(a)-Cholesterin anzusehen, unterscheiden sich aber im Wirkmechanismus, der Selektivität und den zusätzlichen rheologischen Effekten (Thompson and Group 2008).

Die Adsorption von LDL-Cholesterin und Lp(a) bei der Dextransulfatadsorption beruht auf der Bindung von niedermolekularen, negativ geladenen Dextransulfatmolekülen und der positiv geladenen Lysin-Gruppe der Apo-B-100-Einheit der Lipoproteine. Die Dextransulfatmoleküle sind kovalent an einem Zelluloseträger gebunden. Der Selektivität des Verfahrens liegt zugrunde, dass beispielsweise HDL-Cholesterin diese Apo-B-100-Einheit nicht besitzt und somit auch nicht adsorbiert wird (Stefanutti, Isacchi et al. 1988).

Dieses Verfahren ermöglicht die Adsorption von Lipoproteinen sowohl aus Vollblut als auch aus separiertem Plasma (Julius, Parhofer et al. 2007).

Die direkte Adsorption von Lipiden (DALI™) erlaubt die direkte Entfernung von LDL-Cholesterin und Lp(a) aus dem Vollblut, ohne zuvor eine Abtrennung von Plasma aus dem Blut zu benötigen. Die Selektivität für LDL-Cholesterin und Lp(a) beruht auch hier auf der elektrostatischen Bindung der positiven Apo-B-100-Einheit mit negativ geladenen Polyacrylamid-Kügelchen, sogenannten „Beads“. Die zur Oberflächenvergrößerung benötigten Poren der „Beads“ sind lediglich 100 nm klein, so dass nur Blutplasma, jedoch keine Blutzellen eindringen können (Bosch, Schmidt et al. 1997).

Das technisch wohl komplizierteste Verfahren ist die heparininduzierte extrakorporale LDL-Präzipitation (HELP™). Hierbei wird sich zu Nutze gemacht, dass durch Absenkung des pH-Wertes auf 5,2 Komplexe bestehend aus negativ geladenem Heparin, und der positiv geladenen Lysin-Gruppe der Apo-B-100-Einheit des LDL-Cholesterins präzipitieren. Für diesen Vorgang wird nach der Plasmaseparation ein hochdosiert mit Heparin versetzter Acetatpuffer verwendet. Bevor das LDL-freie Plasma dem Patienten reinfundiert wird, fließt es durch einen Heparinadsorber und wird durch Bikarbonatdialyse wieder auf einen physiologischen pH-Wert gebracht (Stefanutti, Morozzi et al. 2012).

Bei der Immunadsorption werden aus immunisierten Schafen gewonnene immobilisierte Antikörper gegen Apolipoprotein B-100 eingesetzt. Diese Methode basiert auf dem Prinzip der Affinitätschromatographie (Stoffel, Borberg et al. 1981). LDL und Lp(a) aus zuvor abgetrenntem Plasma binden dann an die an einer Säule immobilisierten polyklonalen Antikörper. Diese Verbindung ist durch eine Erniedrigung des pH-Wertes reversibel, wodurch das System regeneriert wird und gleichzeitig die dadurch wieder abgelösten Lipoproteine verworfen werden können.

Das in dieser Studie verwendete Lipoproteinaphereseverfahren ist die Membran-Differential-Filtration, kurz MDF (Synonyme: Doppelfiltration, Kaskadenfiltration),

welche im Jahr 1980 von Agishi et al. beschrieben wurde (Agishi, Kaneko et al. 1980). Im ersten Schritt werden zelluläre von den humoralen Blutbestandteilen mittels eines Plasmafilters getrennt. Die zellulären Bestandteile werden dem Patienten direkt reinfundiert. Das Plasma passiert über ein vorgeschaltetes Heizelement, welches dessen Temperatur auf 38,5 °C erhöht, einen weiteren, seriellen Filter. Hierbei handelt es sich um einen als Plasmafraktionator bezeichneten Lipidfilter. Dieser hält nicht-selektiv hochmolekulare Substanzen wie LDL-Cholesterin, Fibrinogen und Lp(a) zurück. HDL, mit einem Durchmesser bis zu 12 nm, und Albumin sind hingegen zu klein, um durch die Poren der Fraktionierungsmembran signifikant retiniert zu werden. Anschließend wird das gereinigte Plasma dem Patienten wieder zugeführt.

Die MDF ist ein nicht-selektives Aphereseverfahren, dennoch hocheffizient in Bezug auf die Entfernung atherogener Lipoproteine. Als positiven Nebeneffekt profitieren die Patienten durch die Entfernung von Fibrinogen, Cholesterin und der Verminderung der Erythrozytenaggregation und konsekutiven Senkung der Blutviskosität von einer verbesserten Hämorrhheologie (Berrousot, Barthel et al. 1998). Außerdem ist das Verfahren kostengünstig, technisch eher unkompliziert und sehr sicher (Geiss, Parhofer et al. 1999). Neben der Behandlung der therapierefraktären Hypercholesterinämie eignet sich die MDF durch eine Verbesserung der Mikrozirkulation auch für die Therapie der altersbedingten Makuladegeneration (Klingel, Fassbender et al. 2000) und des Hyperviskositätssyndroms (Reinhart, Lutolf et al. 1992).

Die Porengröße der Fraktionierungsmembran ist die wichtigste selektierende Eigenschaft dieses Verfahrens. Sie wird unter anderem durch Faktoren wie die Temperatur des Plasmas beeinflusst, was konsekutiv zu einer veränderten Permeabilität für spezifische Plasmaproteine führt. Studien zeigten neben Unterschieden in den Siebkoeffizienten von HDL und LDL zwischen 37 und 40°C, dass im Vergleich zu 37°C die Filterkapazität der Membran bei höheren Temperaturen erst nach größeren Volumina filtrierte Plasmas erschöpft ist (Matsuda, Sueoka et al. 1995).

Die verschiedenen zugelassenen Verfahren sind grundsätzlich als gleichwertig zu betrachten und müssen nach dem therapeutischen Apheresestandard der deutschen

Gesellschaft für Nephrologie e.V. eine Absenkung des LDL-Ausgangswertes um mindestens 60% bei einer Therapiedauer von maximal 6 Stunden erreichen. Jedoch unterscheiden sich die einzelnen Verfahren in ihrer Spezifität bezüglich definierter Plasmaproteine, welche zur Übersicht in *Tabelle 1* nochmals genauer dargestellt wird.

Tabelle 1: Spezifität verschiedener Plasmaphereseverfahren (nach Schuff-Werner)

„+“ impliziert eine Reduktion um mindestens 60% des Ausgangswertes bezogen auf eine Behandlung; DALI™, direkte Adsorption von Lipiden; H.E.L.P.™, heparininduzierte extrakorporale LDL-Präzipitation; MDF, Membran-Differential-Filtration; DAS, Dextransulfatadsorption

	DALI™	DSA	Immunadsorption	H.E.L.P.™	MDF
Alpha-2-Makroglobulin	-	+	-	-	+
Fibrinogen	-	+		+	+
LDL-Cholesterin	+	+		+	+
IgM	-	+		-	+

1.3 Studienziele

Bereits in den 90er Jahren wurde die erste Fraktionierungsmembran für die Lipoproteinapherese mittels MDF eingeführt. Mittlerweile existieren insgesamt drei verschiedene derartige Membranen, die sich folgendermaßen unterscheiden. Die Fraktionierungsmembran Evaflux™ von Kawasumi Laboratories besteht aus einem Ethylen-Vinyl-Alkohol-Copolymer und hat einen Innendurchmesser von 175 µm (Copyright © 2019 Asahi Kasai Medical Co.). Die Fresenius Polysulfon®-Membran des MONET® genannten Verfahrens besteht aus einer Polysulfon-Polyvinylpyrrolidon-Mischung und hat einen Innendurchmesser von 185 µm (© Copyright 2012 Fresenius Medical Care Deutschland GmbH). Der 3M™ SelectiCure® H19-Filter ist ein neuartiger Fraktionator auf Basis der FractioPES™ 200-Membran bestehend aus einer Polyethersulfon-Polyvinylpyrrolidon-Mischung mit einem Innendurchmesser von 200 µm (3M Deutschland GmbH. (2014) SelectiCure H19). Die Definition optimaler Behandlungseinstellungen für diese Plasmafraktionierungsmembran des Kaskadenfilters

3M™ SelectiCure® H19 (3M Deutschland GmbH, Neuss, Deutschland), d.h. die Retention von atherogenen Molekülen bei erhaltener Permeabilität für andere, essenzielle Proteine, um eine größtmögliche Therapieeffektivität bei geringsten Nebenwirkungen zu erreichen und somit eine effektivere Behandlung mit gewünschter Selektivität für bestimmte Plasmaproteine zu erzielen, war die Zielsetzung dieser Studie. Zudem wurde der Effekt der Erhöhung der Plasmatemperatur, genannt Thermofiltration, untersucht.

Ein klinisch bekanntes Problem bei der MDF ist das Zusetzen der Fraktionierungsmembran (sog. "Clogging") durch Substanzen mit hohem Molekulargewicht und die dadurch entstehende Problematik hohe Plasmaflüsse aufrecht zu erhalten bzw. definierte Behandlungsvolumina und die benötigte Behandlungseffektivität zu erreichen (Dittrich-Riediger, Schatz et al. 2015). Daher war es sinnvoll, diese Studie an einem geeigneten Lipoproteinapherese-Modell durchzuführen, um reproduzierbare und klinisch realistische Blut- und Plasmavolumina behandeln zu können und somit einem *In-vitro*-Modell überlegen zu sein. Die Durchführung dieser Studie basierte daher auf einem etablierten Großtiermodell für die Kaskadenfiltration, mit welchem in einer vorangegangenen Studie bereits die Selektivität verschiedener Fraktionierungsmembranen verglichen wurde (Krieter, Lange et al. 2018).

2. Material und Methoden

2.1 Ethik- und Tierversuchsvotum

Der Tierversuchsantrag wurde von der Regierung Unterfranken genehmigt (Aktenzeichen 55.2-DMS-2532-2.100.).

Für die Studie wurden vier weibliche Merinofleischschafe mit ähnlichem Körpergewicht (42 ± 5 kg) ausgewählt. Alle Tiere waren unter einem Jahr alt und galten somit als Lämmer (Hecker 1983).

Das Schaf eignet sich besonders gut als Versuchstier für extrakorporale Verfahren, da seine rheologischen und homeostatischen Eigenschaften dem Menschen sehr ähneln, es zwei exponierte Venae jugulares zur einfachen Instrumentierung des Gefäßzuganges besitzt und eine ideale Möglichkeit zur unblutigen Blutdruckmessung am Schwanz zur Überwachung des Tieres aufweist (Krieter, Lange et al. 2018). Aufgrund der mit dem Menschen vergleichbaren Masse der Tiere konnten die verwendeten Materialien für den extrakorporalen Kreislauf ohne Miniaturisierung direkt aus der Humanmedizin verwendet werden.

2.2 Beschreibung der Studie

Zur Charakterisierung der Permselectivität einer Fraktionierungsmembran unter verschiedenen Behandlungseinflüssen wurde diese in einer prospektiven und randomisierten "Crossover-Studie" in einem bereits etablierten Großtiermodell unter alternierender Flussgeschwindigkeit, Plasmaflussrichtung ("Outside-In") und Thermofiltration an vier Versuchstieren getestet.

Nach definierten behandelten Plasmavolumina wurde die *In-vivo*-Performance der Fraktionierungsmembran anhand von Reduktionsrationes und Siebkoeffizienten für die folgenden, unterschiedlich großen Moleküle LDL-Cholesterin (2.500-3.000 kDa), HDL-Cholesterin (175-360 kDa), Albumin (67 kDa), Fibrinogen (305-385 kDa) und IgG (150 kDa) gemessen. *Abbildung 1* zeigt eine vereinfachte Darstellung des Versuchsaufbaus.

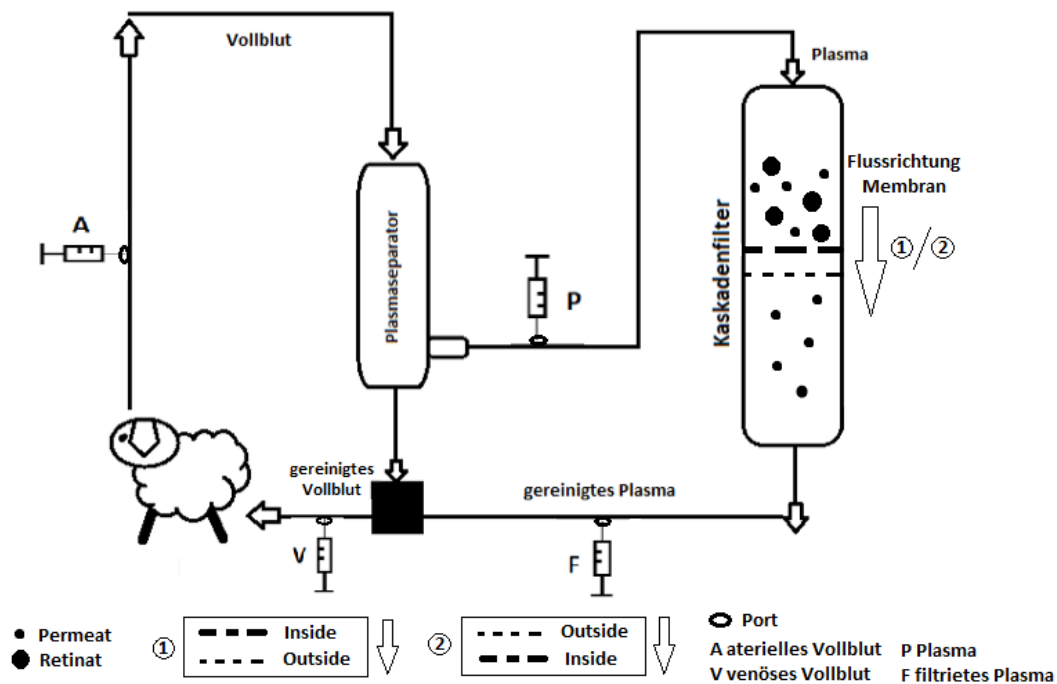


Abbildung 1: Versuchsaufbau der Doppelfiltrationsapherese mit sequentieller Filteranordnung. Im Gegensatz zur Routinekonfiguration (1) wurde bei der Outside-In-Filtration der Kaskadenfilter in Position (2) gedreht.

2.3 Gerät zur extrakorporalen Behandlung

Alle Versuche wurden mit der HF 440 von Infomed (Genf, Schweiz 1997) durchgeführt. Die HF 440 ist ein Gerät für sämtliche Formen der extrakorporalen Behandlung einschließlich der in dieser Studie genutzten Membran-Differenzial-Filtration (Synonyme: Kaskadenfiltration, Doppelfiltrationsplasmapherese).

Das System besitzt Drucksensoren zur Überwachung und Steuerung der Behandlungen im arteriellen (afferenten) und venösen (efferenten) extrakorporalen Blutkreislauf sowie im extrakorporalen Plasmakreislauf. Mithilfe des damit bestimmten transmembranösen Drucks (TMP) im Fraktionierungfilter wird ab einem TMP von 150 mmHg eine Rückspülung und damit Regeneration der Kaskadenfiltermembran mit einer NaCl-Lösung vorgenommen.

Ein Ultraschall-Luftdetektor bietet die Sicherheit, dass z.B. Luftblasen im systemefferenten Schenkel rechtzeitig erfasst werden und Luftembolien durch das

automatische Abklemmen des venösen Schenkels und Unterbrechen der Behandlung verhindert werden können.

2.4 Verwendeter Plasmafilter

Die Separation von Plasma und Blutbestandteilen mittels Membranfiltration ist seit 1978 möglich und mittlerweile das bevorzugte Verfahren für den Plasmaaustausch (Glöckner, 1978).

Der in dieser Studie verwendete 3MTM PlasCure[®] 06 Plasmafilter (3M Deutschland GmbH, Neuss, Deutschland) mit seiner asymmetrischen Porenstruktur ermöglicht auch bei hohen Plasmaflüssen eine optimale Zellseparation. Er enthält die für Plasmaphereseverfahren etablierte hydrophile 3MTM MicroPES[®] TF 10-Membran. Der Plasmafilter ist ausgelegt für Plasmaflussraten von 20-30% der Blutflussraten.

2.5 Verwendeter Kaskadenfilter

In allen Versuchen dieser Studie wurde der Kaskadenfilter 3MTM SelectiCure[®] H19 (3M Deutschland GmbH, Neuss, Deutschland) verwendet. Er erlaubt die unselektive Depletion von hochmolekularen Substanzen wie LDL aus dem Blutplasma. Seine Membran besteht aus PES, hat eine Oberfläche von 1,9 m² und ist γ -sterilisiert (3M Deutschland GmbH. (2014) SelectiCure H19). Weitere Informationen zu den beiden Filtern sind in *Tabelle 2* angegeben.

Tabelle 2: Eigenschaften des 3M™ PlasCure® 06-Plasmafilters und 3M™ SelectiCure® H19 Kaskadenfilters im Vergleich (3M Deutschland GmbH. (2014) SelectiCure H19; 3M Deutschland GmbH. (2015) Plascure® Plasmafilter.). (PES, Polyethersulfon; PVP, Polyvinylpyrrolidon)

Eigenschaften	PlasCure®06	SelectiCure® H19
Oberfläche	0,6 m ²	1,9 m ²
Kapillarwanddicke	100 µm	40 µm
Maximale Porengröße	0,5 µm	Keine Angabe
Innendurchmesser Membran	300 µm	200 µm
Sterilisationsmethode	γ - Bestrahlung	γ - Bestrahlung
Gehäusematerial	Polycarbonat	Polycarbonat
Membranmaterial	PES-/PVP-Mischung	PES/PVP
Maximaler TMP	100 mmHg	-

2.6 Versuchsablauf

2.6.1 Durchführung

Zunächst wurde die Kasette mit dem Schlauchsystem (Blood purification devices DFPP Kit, Infomed SA, Genf, Schweiz) in das HF440 von Infomed (Infomed SA, Genf, Schweiz) eingelegt und anschließend mit 4 Liter physiologischer NaCl-Lösung (Serumwerk Bernburg Vertriebs GmbH Bernburg, Deutschland) gespült, um Luft, Rückstände und Verunreinigungen aus dem extrakorporalen Kreislauf zu entfernen.

Vor der Instrumentierung des Versuchstieres mit dem Highflow-Doppellumen-Dialysekatheter (Polyurethan, 11 French, Achim Schulz-Lauterbach, Iserlohn, Deutschland) mittels Seldinger-Technik wurde das Schaf über einer der beiden Venae jugulares geschoren und lokal mit Scandicain 2% (AstraZeneca, London, UK) anästhesiert.

Anschließend wurden sowohl venöser als auch arterieller Schenkel des Doppellumenkatheters zeitgleich mit dem Schlauchsystem konnektiert und die Sicherheitsklemme gelöst.

Um eine Gerinnungsaktivierung zu verhindern, wurde initial ein Bolus von 10.000 I.E. unfraktioniertem Heparin und eine adaptierte Antikoagulation mit Natriumcitrat (VWR International, Radnor, USA) vorgenommen, worauf detaillierter unter *Abschnitt 2.6.3* eingegangen wird.

Für den Zeitraum der Behandlung wurde das jeweilige Versuchstier in einem kleinen Gitterkäfig gehalten, um dessen Bewegungsraum einzuschränken und so für sichere und störungsfreie Bedingungen zu sorgen. Eine Sedierung der Tiere war für die Durchführung nicht nötig. Der Blutdruck des Tieres wurde jeweils vor und nach der Behandlung mit einer Blutdruckmanschette (GE Medical Systems- Information Technologies GmbH, USA) unblutig am Schwanz des Tieres gemessen.

Während jedem Versuch wurde ein definiertes Plasmavolumen von 1,5 Liter behandelt. Das behandelte Plasma wurde dem Versuchstier nach Passage des Kaskadenfilters über den systemefferenten venösen Schenkel wieder zugeführt.

2.6.2 Behandlungseinstellungen

Jedes Versuchstier wurde mit fünf Einstellungen behandelt. Blutfluss, Plasmaflussrate (PF), Plasmatemperatur (Thermofiltration) und Membranfiltrationsrichtung ("Outside-In") variierten während den verschiedenen Versuchen. Details der unterschiedlichen Behandlungsparameter sind in *Tabelle 3* dargestellt.

Tabelle 3: Behandlungseinstellungen der einzelnen Versuche

	Plasmaflussrate			Outside-In	Thermofiltration
	Niedrig	Mittel 36	Hoch 42		
Blutflussrate [ml/min]	120	120	140	140	140
Plasmaflussrate [ml/min]	30	36	42	42	42
Filtrationsfraktion [%]	25	30	30	30	30

2.6.3 Antikoagulation

In dieser Studie wurde die Antikoagulation initial durch die Gabe von 10.000 I.E. Heparin (Rotexmedica, Trittau, Deutschland) sichergestellt und mit einer regionalen und kontinuierlichen Citratantikoagulation (1M, 73,525g / 250ml, VWR International, Radnor, USA) aufrechterhalten.

Die Antikoagulation wurde mit Hilfe des ionisierten (ungebundenen) Calciumwertes im Plasma gesteuert und auf einen Zielwert von 0,3 mmol/l eingestellt. Dafür wurde nach zuvor definierten Plasmavolumina (300, 600, 900 und 1200 ml) während der Behandlung venöses Vollblut entnommen (*Abbildung 1*) und die Ca²⁺-Konzentration (*Abbildung 14*) mit Hilfe des Blutgas-Analysegerätes, dem Cobas b123 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) bestimmt. Um die physiologische Ca²⁺-Konzentration im Blut wiederherzustellen, wurde systemefferent, unmittelbar vor dem venösen Katheterschenkel adaptiert an der Höhe der Citratinfusion kontinuierlich Calciumchlorid (0,42 M, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) über einen Infusomaten (HARVARD APPARATUS, Holliston Massachusetts, USA) zugeführt.

2.6.4 Probenentnahme

Die Entnahme von Blut- beziehungsweise Plasmaproben erfolgte an verschiedenen Stellen des extrakorporalen Kreislaufes.

Sowohl vor der Verbindung mit dem Schlauchsystem als auch nach Diskonnektierung am Ende der Behandlung wurde eine Blutprobe direkt aus dem systemafferenten Schenkel, des zentralvenösen Katheters abgenommen.

Nach zuvor definierten Mengen behandelten Plasmavolumens (300, 600, 900 und 1200 ml) wurden während der Behandlung per Punktion an den in *Abbildung 1* eingezeichneten, im Schlauchsystem integrierten Entnahmestellen Proben mittels Blutmonovetten (Sarstedt AG, Nürnberg, Deutschland) gewonnen. Für die Punktion der Gummi-Ports wurden Einmalkanülen (Terumo Europe NV, Leuven, Belgien) verwendet.

2.6.5 Konzentrationsbestimmung

Die ionisierten Ca^{2+} -, Na^+ -, K^+ - und Cl^- -Konzentrationen der arteriellen und venösen Vollblutproben wurden mit Hilfe eines Blutgas-Analysegerätes, dem Cobas b123 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland), gemessen.

Der Hämatokrit-Wert der arteriellen Proben wurde nach Zentrifugation (Mikrozentrifuge (Z233M-2), Hermle Labortechnik GmbH, Wehingen, Deutschland) von in Glaskapillaren (BRAND GMBH + CO KG, Wertheim, Deutschland) aspiriertem Blut bei 5000U/min für 10 min visuell abgelesen. Quickwert und aPTT wurden mit Hilfe eines Kugelkoagulometers gemessen.

Die folgenden Parameter wurden aus Plasmaproben bestimmt. Die Proben wurden per Punktion von Gummi-Ports aus dem extrakorporalen Kreislauf jeweils vor und nach dem Kaskadenfilter (*Abbildung 1*) gewonnen und nach Abnahme bei -20°C bis zur Weiterverarbeitung eingefroren.

Als Verfahren für die Bestimmung von IgG wurde ein Schaf IgG ELISA KIT (Alpha Diagnostic Intl. Inc., San Antonio, Texas, USA) verwendet. Die photometrische Messung von LDL-Cholesterin und HDL-Cholesterin erfolgte mit einem Cobas c111-Multianalysegerät (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland). Albumin, Fibrinogen, Triglyceride und Gesamtcholesterin wurden ebenfalls photometrisch bestimmt.

2.7 Berechnungen

2.7.1 Reduktionsratio

Für die Beschreibung der Fraktionierungsmembranperformance wurden die Reduktionsrationes (RR) relevanter Plasmaproteine berechnet.

Hierbei wurde zunächst der Quotient von prä- (C_{pre}) und posttherapeutischer Plasmakonzentration (C_{post}) ermittelt (*Formel 1* (Krieter, Hackl et al. 2010)).

$$RR = \left(1 - \frac{C_{post}}{C_{pre}}\right) \times 100 [\%] \quad (\text{Formel 1})$$

Aufgrund von möglichen Verschiebungen der extrazellulären Flüssigkeit während der Filtration wurden die C_{post} -Werte basierend auf den Hämatokritveränderungen nach *Formel 2* und *Formel 3* volumenkoriert (Schneditz, Putz-Bankuti et al. 2012).

H_{pre} steht hier für den präinterventionellen Hämatokritwert, während H_{post} den Hämatokritwert nach der Behandlung und hp die Hämokonzentration beschreibt. Die korrigierte posttherapeutische Konzentration der Plasmaproteine C_{post_corr} wurde mit *Formel 3* berechnet.

$$hp = H_{post} \times \frac{(100 - H_{pre})}{H_{pre} \times (100 - H_{post})} \quad (\text{Formel 2})$$

$$C_{post_corr} = \frac{C_{post}}{hp} \quad (\text{Formel 3})$$

2.7.2 Siebkoeffizienten

Der Siebkoeffizient Sk charakterisiert die Permeabilität einer Membran für ein bestimmtes Molekül. Er ist für jede Substanz und Membran individuell unterschiedlich und wird mit einem Wert zwischen 0 und 1 beschrieben. Ein Wert von 0 bedeutet eine Undurchlässigkeit für das Molekül, während ein Wert von 1 die vollständige Durchlässigkeit ausdrückt.

Bei der MDF wurde der Siebkoeffizient nach *Formel 4* (Henderson 1996) aus dem Quotienten der Filtratkonzentration C_f und der Konzentration der Substanz im Plasma C_p berechnet.

$$Sk = \frac{C_f}{C_p} \quad (\text{Formel 4})$$

2.7.3 Transmembranöser Druck

Der transmembranöse Druck (TMP) der Fraktionierungsmembran wurde direkt über in das Apheresegerät HF440 integrierte Drucksensoren bestimmt und am Gerät abgelesen.

Der TMP ergibt sich aus dem arteriellen Druck (P_{art}), dem venösen Druck (P_{ven}) und dem Filtratdruck ($P_{filtrat}$) (*Formel 5* (Henderson 1996)).

$$TMP = \frac{(Part+Pven)}{2} - Pfiltrat \quad (Formel 5)$$

2.8 Statistische Evaluation

Die Datenauswertung wurde mit dem Statistikprogramm „Minitab 15 Statistical Software“ (Minitab, Inc., State College, PA, USA) durchgeführt. Hierfür wurden die Mittelwerte und Standardabweichungen der durchgeführten Messungen berechnet.

Die lineare Varianzanalyse zu den verschiedenen Abnahmezeitpunkten der verschiedenen Behandlungseinstellungen wurde mittels „ANOVA“ durchgeführt. Bei signifikanten Unterschieden wurde bei Normalverteilung ein paarweiser Mehrfachvergleich nach Tukey (Post-Hoc-Test) zur Herausstellung von Unterschieden zwischen den verschiedenen Behandlungseinstellungen durchgeführt. Bei Nicht-Normalverteilung wurde der Friedman-Test durchgeführt. Für die lineare Varianzanalyse der Korrelation von S_K und TMP der Fraktionierungsmembran wurde bei Normalverteilung der Korrelationskoeffizient nach Pearson berechnet.

Als Signifikanzniveau wurde ein p -Wert $< 0,05$ festgelegt.

3. Ergebnisse

3.1 Studienverlaufsbeobachtungen

Die Studie verlief ohne wesentliche Komplikationen. Weder gab es technische Probleme, noch relevante Thrombosierungen des extrakorporalen Systems oder andere ungeplante Unterbrechungen. Alle Behandlungseinstellungen (siehe *Abschnitt 2.6.2*) konnten wie geplant umgesetzt werden. Die verschiedenen Plasmaflussraten konnten kontinuierlich gehalten werden. Das vordefinierte Zielbehandlungsvolumen von $1,5 \pm 0$ L Plasma wurde in allen Versuchen erreicht. Im Mittel wurden $6,66 \pm 0,46$ L Blut behandelt.

Mit Hilfe der Drucksensoren der HF 440 von Infomed (Genf, Schweiz 1997) konnte das Zusetzen (sog. "Clotting") der Kaskadenfiltermembran, welches sich durch einen TMP-Anstieg auf über 150 mmHg bemerkbar machte, detektiert werden. Zur Regeneration der Membran wurde über alle Behandlungen insgesamt fünfmal automatisch eine Rückspülung mit 0,9 % NaCl-Lösung (Serumwerk Bernburg Vertriebs GmbH Bernburg, Deutschland) vorgenommen (Schaf 1, PF 36 ml/min, 1050 ml; Schaf 2, PF 30 ml/min, 680 ml; Schaf 4, PF 30 ml/min, 1300 ml; Schaf 4, Outside-In, 1040 ml; Schaf 3, Outside-In, 1250 ml).

Nach Beendigung der Versuche konnten alle vier Schafe, ohne gesundheitliche Beeinträchtigung genommen zu haben, in ihre Herde zurückgeführt werden.

3.2 Siebkoeffizienten der untersuchten Moleküle

3.2.1 LDL-Cholesterin

Entsprechend der niedrigen Siebkoeffizienten (S_K) war die Fraktionierungsmembran für LDL-Cholesterin während aller Behandlungseinstellungen nahezu undurchlässig. Der Verlauf ist relativ gleichförmig ohne größere Anstiege oder Abfälle mit S_K zwischen $0,047 \pm 0,023$ bei PF 36ml/min (300 ml) und $0,211 \pm 0,031$ bei Outside-In (300 ml) (*Abbildung 2*).

Während der S_K für LDL bei den meisten Behandlungseinstellungen mit der Behandlungszeit zunahm, sank er bei der "Outside-In" Filtration ab und lag mit $0,211 \pm 0,031$ (bei 300 ml) und $0,194 \pm 0,068$ (bei 600 ml) signifikant höher ($p < 0,05$) als $0,105 \pm 0,075$ (bei 1200 ml).

Im Gegensatz dazu lag der S_K bei einer PF von 42 ml/min zur ersten Abnahmezeit nach 300 ml behandeltem Plasma mit $0,076 \pm 0,008$ signifikant niedriger ($p < 0,05$) als zu den späteren Abnahmezeitpunkten.

Die S_K während der Behandlung im Outside-In-Modus mit $0,211 \pm 0,031$ (bei 300 ml) und $0,194 \pm 0,068$ (bei 600 ml) lagen signifikant höher ($p < 0,05$) als bei den anderen Behandlungseinstellungen.

Ein signifikant höherer ($p < 0,05$) S_K $0,165 \pm 0,022$ (bei 600ml) zeigte sich auch einmalig während der Behandlung mit einer hohen PF von 42 ml/min (Abbildung 2).

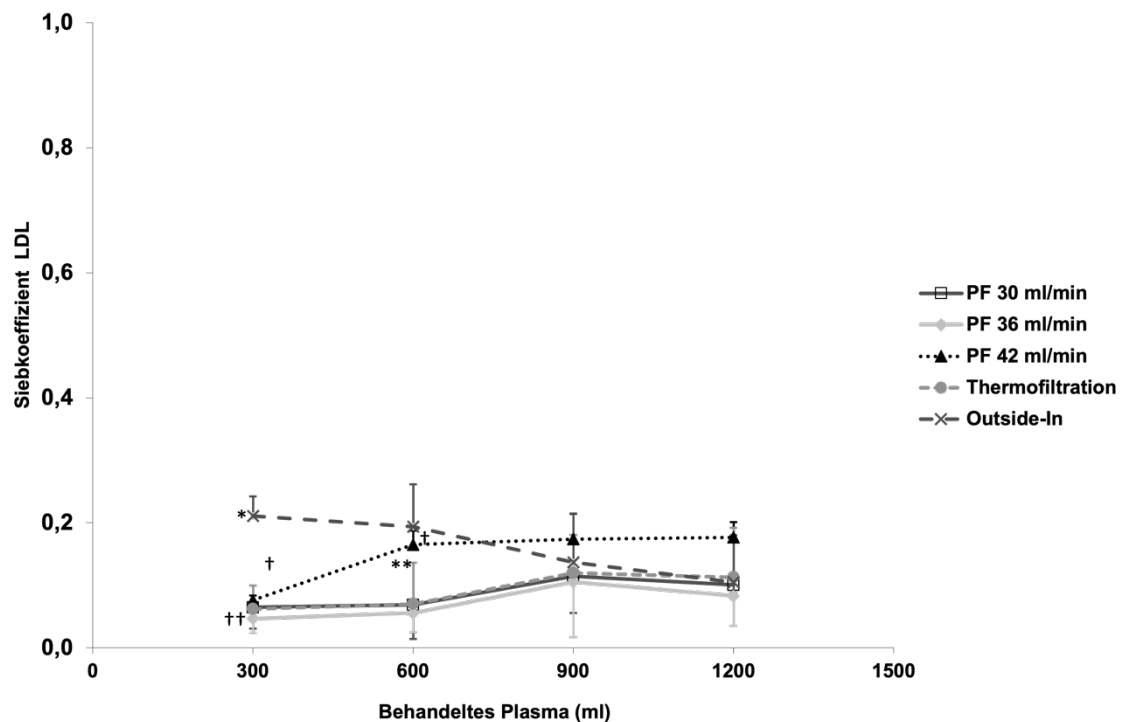


Abbildung 2: Verlauf der S_K für LDL-Cholesterin über die Behandlungen.

Signifikanzniveau: * $p < 0,05$ (Outside-In vs. Rest bei 300 ml); ** $p < 0,05$ (PF42 und Outside-In vs. PF30, PF36 und TF bei 600 ml); † $p < 0,05$ (Outside-In: 300, 600 vs. 1200ml); †† $p < 0,05$ (PF42: 300 ml vs. restliche Abnahmen)

3.2.2 HDL-Cholesterin

Für HDL-Cholesterin lagen die S_K zwischen $0,236 \pm 0,063$ (PF 30 ml/min bei 300 ml) und $0,799 \pm 0,188$ (PF 36 ml/min bei 1200 ml). Insgesamt stiegen alle S_K zwischen 300 und 600 ml außer bei der "Outside-In-Behandlung" stetig an. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Behandlungseinstellungen (Abbildung 3).

Zu verschiedenen Abnahmezeitpunkten zeigte sich bei "Outside-In" eine signifikante Erhöhung ($p = 0,035$) des S_K auf $0,746 \pm 0,092$ bei 600 ml im Vergleich zu $0,374 \pm 0,021$ bei 300 ml. Gegenätzlich zu den restlichen Einstellungen sank der S_K für HDL bei "Outside-In" zum Ende der Behandlung ab.

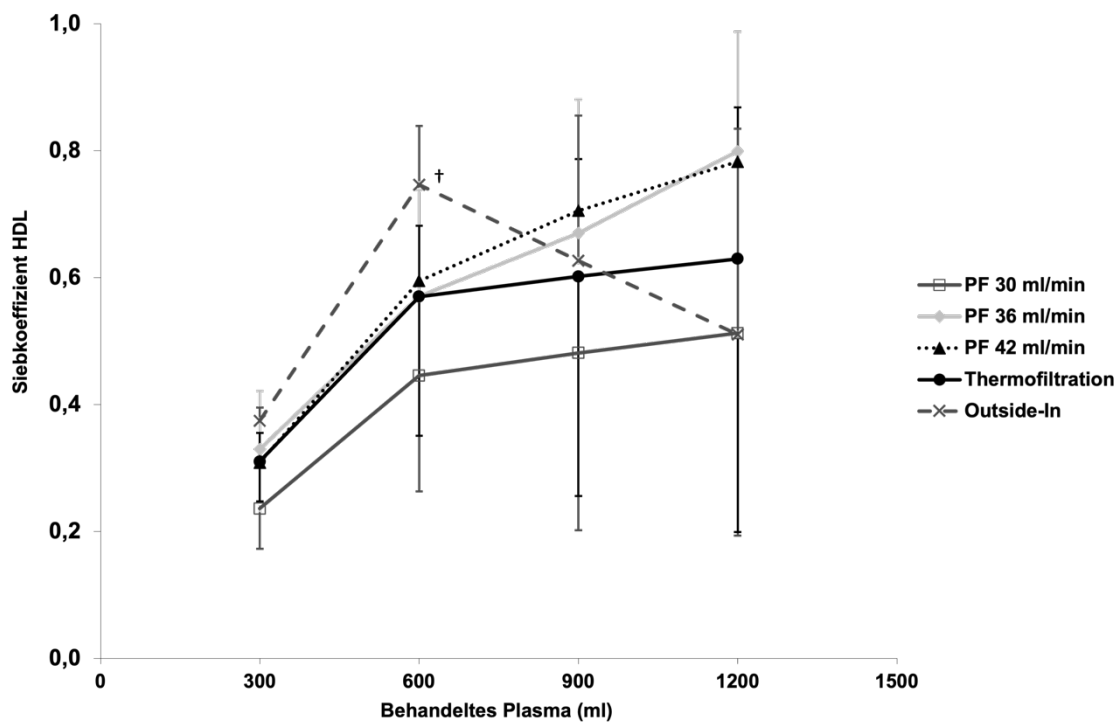


Abbildung 3: Verlauf der S_K für HDL-Cholesterin ohne signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Behandlungseinstellungen.

Signifikanzniveau: † $p < 0,05$ (Outside-In: 600 ml vs. 300 ml)

3.2.3 Immunglobulin G (IgG)

Die IgG-S_K lagen zwischen $0,336 \pm 0,048$ (Outside-In bei 300 ml) und $1,047 \pm 0,07$ (PF 42 ml/min bei 900 ml). Sie stiegen zu Anfang der Behandlung an und fielen im Outside-In-Modus nach 600 ml Behandlungsvolumen und bei PF 42 ml/min nach 900 ml leicht ab. Die übrigen Einstellungen zeigten einen relativ konstanten S_K-Verlauf mit einem leichten Anstieg zum Behandlungsende.

Bei einer PF von 42 ml/min lag der S_K bei 900 ml $1,047 \pm 0,07$ signifikant höher ($p < 0,05$) als bei 300, 600 und 1200 ml. Bei 300 ml lag er mit $0,463 \pm 0,089$ signifikant niedriger ($p < 0,05$) als zu den anderen Zeitpunkten.

Nach 300 ml mit TF behandeltem Plasma war der S_K $0,386 \pm 0,041$ ebenfalls signifikant niedriger ($p < 0,05$) als zu den anderen Abnahmezeitpunkten.

Bei der Outside-In-Einstellung gab es ebenfalls einen signifikanten Unterschied ($p < 0,05$). Bei 300 ml lag der S_K $0,336 \pm 0,048$ signifikant niedriger als bei 600 und 900 ml.

Nach 900 ml behandeltem Plasma lag der S_K für IgG $1,047 \pm 0,070$ bei PF 42 ml/min signifikant höherer ($p = 0,049$) als bei PF 30ml/min $0,573 \pm 0,321$ (*Abbildung 4*).

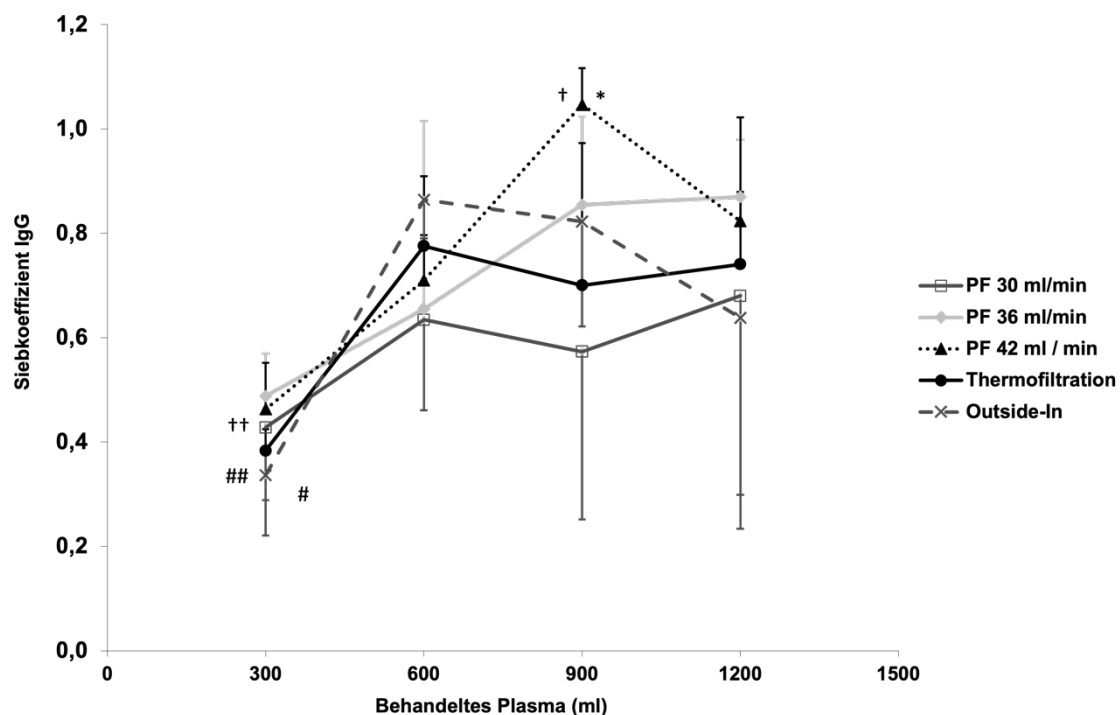


Abbildung 4: IgG S_K mit signifikanten Unterschieden.

Signifikanzniveau: * $p < 0,05$ (PF 42 vs. PF 30 bei 900 ml); † $p < 0,05$ (PF 42: 900 ml vs. restliche Abnahmen); †† $p < 0,05$ (PF 42: 300 ml vs. restliche Abnahmen); # $p < 0,05$ (Outside-In: 300 vs. 600, 900 ml); ## $p < 0,05$ (TF: 300 ml vs. restliche Abnahmen);

3.2.4 Albumin

Die Bestimmungen der S_K für Albumin ergaben keine signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungsmethoden. Sie lagen zwischen $0,282 \pm 0,045$ (Outside-In bei 300 ml) und $0,94 \pm 0,059$ (PF 42 ml/min bei 1200 ml). Der höchste S_K während der Outside-In-Filtration wurde bereits zum zweiten Abnahmezeitpunkt erreicht und fiel dann deutlich ab (Abbildung 5). Die restlichen Einstellungen zeigten ebenfalls einen starken Anstieg zwischen 300 und 600 ml und verliefen dann konstant.

Bezogen auf die Abnahmezeiten war der S_K $0,434 \pm 0,057$ (PF 30 ml/min bei 300 ml) signifikant niedriger ($p < 0,05$) als zu den späteren Messpunkten. Identisch verhielt er sich bei PF 42 ml/min ($0,493 \pm 0,07$ ($p < 0,05$)) und der TF-Einstellung ($0,375 \pm 0,036$ ($p < 0,05$)).

Bei PF 36 ml/min und Outside-In Filtration war der S_K jeweils bei 300 ml signifikant niedriger ($p < 0,05$) als zu den Abnahmezeitpunkten 900 und 1200 ml (PF 36 ml/min: $0,551 \pm 0,242$ und Outside-In: $0,282 \pm 0,045$).

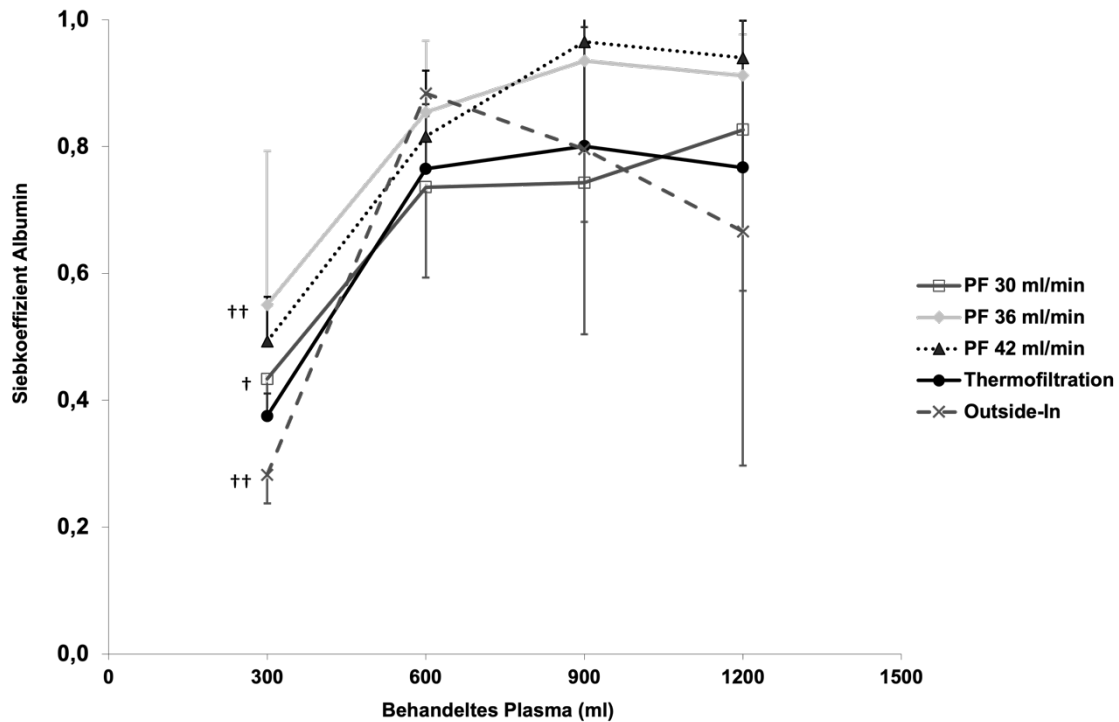


Abbildung 5: S_K Albumin ohne signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Behandlungseinstellungen.

Signifikanzniveau: † $p < 0,05$ (PF 30, PF 40, TF: 300 ml vs. restliche Abnahmen) †† $p < 0,05$ (Outside-In, PF 36: 300 ml vs. 900, 1200 ml)

3.2.5 Fibrinogen

Die Fibrinogen- S_K lagen zwischen $0,015 \pm 0,01$ (Outside-In 300 ml) und $0,369 \pm 0,12$ (Outside-In 900 ml). Die Kurve Outside-In verlief deutlich höher als die der anderen Einstellungen und zeigte nach 900 ml einen leichten Abfall, wohingegen die übrigen Kurven einen konstant aufsteigenden Trend verfolgten.

Nach 600 ml behandeltem Plasmavolumen während der Outside-In-Behandlung zeigte sich ein signifikant höherer ($p < 0,05$) S_K $0,229 \pm 0,03$ als bei den anderen Behandlungseinstellungen.

Ein weiterer signifikant höherer ($p < 0,05$) S_K $0,369 \pm 0,12$ (bei 900 ml) wurde im Vergleich zu den Behandlungen mit PF 42 ml/min und PF 30 ml/min gemessen (Abbildung 6).

Bei PF 42 ml/min stieg der S_K $0,133 \pm 0,013$ bei 900ml signifikant höher als bei 300 und 600 ml. Auch bei 1200 ml lag dieser mit $0,284 \pm 0,037$ signifikant höher ($p < 0,05$) als zu den restlichen Abnahmezeitpunkten.

Während der Outside-In Filtration lag er zum ersten Abnahmezeitpunkt (300 ml) $0,015 \pm 0,01$ signifikant niedriger ($p < 0,05$) als bei den restlichen Messungen.

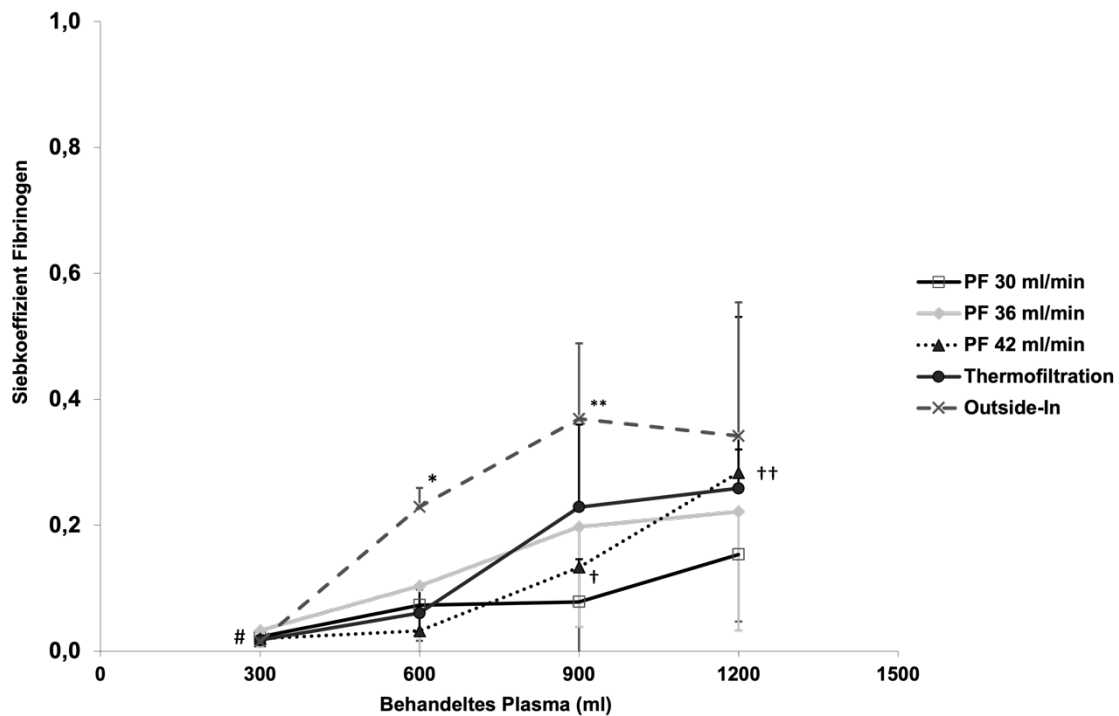


Abbildung 6: S_K Fibrinogen mit signifikant höheren Werten bei der Outside-In Filtration.

Signifikanzniveau: * $p < 0,05$ (Outside-In vs. Rest bei 600 ml); ** $p < 0,05$ (Outside-In vs. PF 30, PF 42 bei 900 ml); † $p < 0,05$ (PF 42: 900 ml vs. 300, 600 ml); †† $p < 0,05$ (PF 42: 1200 ml vs. restliche Abnahmen); # $p < 0,05$ (Outside-In: 300 ml vs. restliche Abnahmen)

3.3 Plasmakonzentrationen und Entfernung der untersuchten Moleküle

Die Plasmakonzentrationen der untersuchten Stoffe konnten in allen Versuchen mit jeweils unterschiedlichen Behandlungseinstellungen effizient gesenkt werden.

Abbildung 7 zeigt den im arteriellen Blut gemessenen Konzentrationsverlauf von LDL-Cholesterin. Prätherapeutisch lag die arterielle LDL-Konzentration zwischen $0,34 \pm 0,11$ (PF 42 ml/min) und $0,53 \pm 0,28$ mmol/L (PF 30 ml/min) und konnte mit allen Einstellungen, bis auf die Durchführung mit einer niedrigen PF (30 ml/min) signifikant gesenkt werden ($p < 0,05$). Nach der Behandlung lag die Konzentration zwischen $0,15 \pm 0,05$ (PF 42 ml/min) und $0,25 \pm 0,1$ mmol/L (PF 30 ml/min).

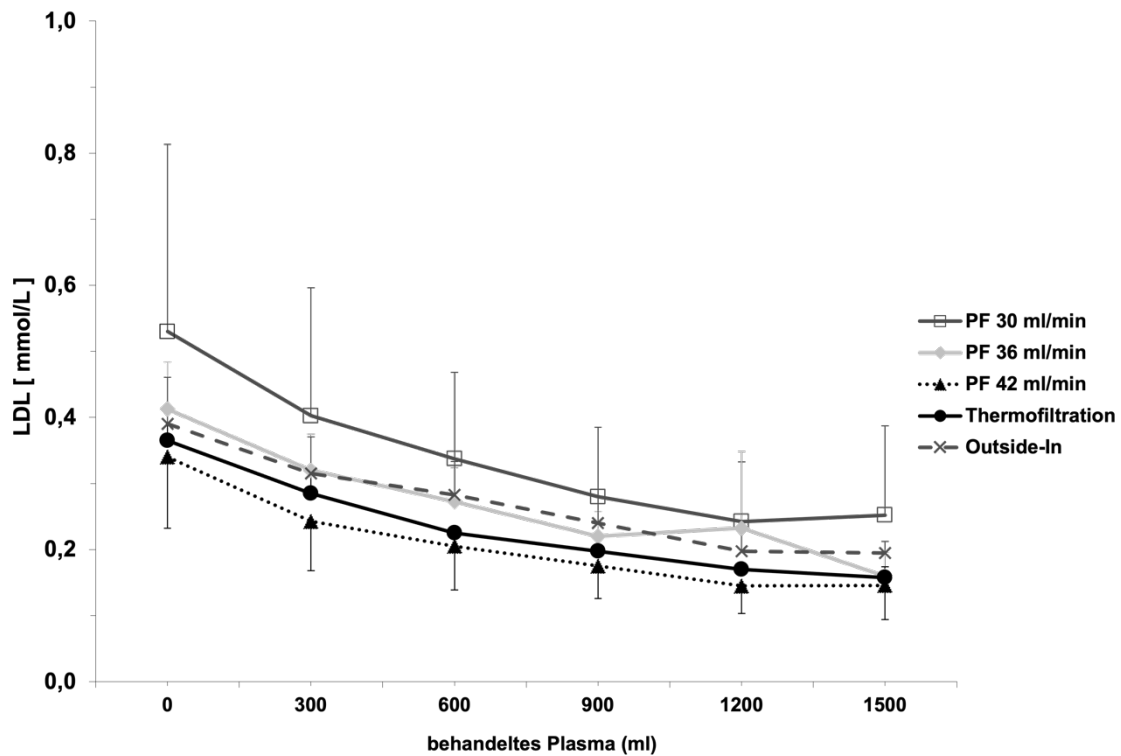


Abbildung 7: Verlaufskonzentration LDL-Cholesterin im arteriellen Blut

Die arterielle HDL-Konzentration wurde mit allen Behandlungseinstellungen, außer mit einer PF von 30 ml/min signifikant ($p < 0,05$) gesenkt (Abbildung 8). Prätherapeutische Spiegel reichten von $0,68 \pm 0,08$ ("Outside-In") bis $0,87 \pm 0,43$ mmol/L (PF 30 ml/min). Posttherapeutisch lag die Konzentration zwischen $0,4 \pm 0,00$ (PF 36 ml/min) und $0,6 \pm 0,3$ mmol/L (PF 30 ml/min).

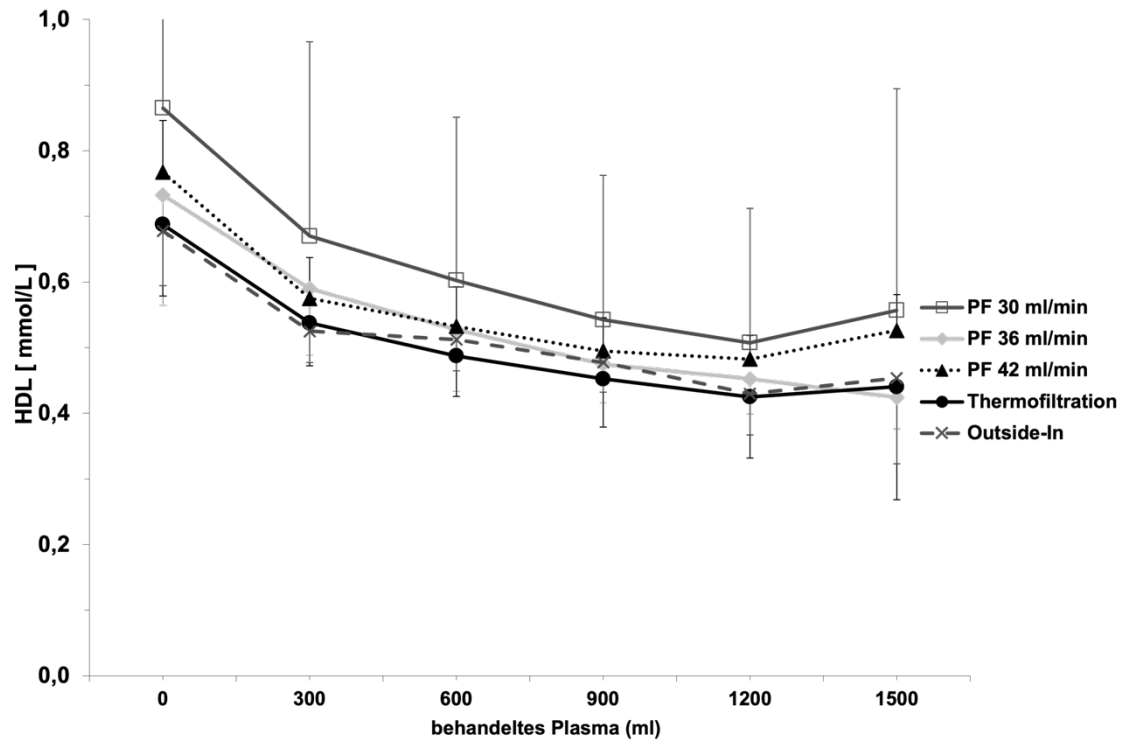


Abbildung 8: Verlaufskonzentration HDL-Cholesterin im arteriellen Blut

Abbildung 9 zeigt die arterielle IgG-Konzentration, welche mit allen Behandlungsmethoden signifikant reduziert werden konnte ($p < 0,05$). Hierbei lagen die Werte vor der Behandlung zwischen 1308 ± 209 (PF 36 ml/min) und 1440 ± 163 mg/dL (Outside-In). Posttherapeutisch lagen sie zwischen 795 ± 174 (PF 36 ml/min) und 1079 ± 103 mg/dL (PF 42 ml/min).

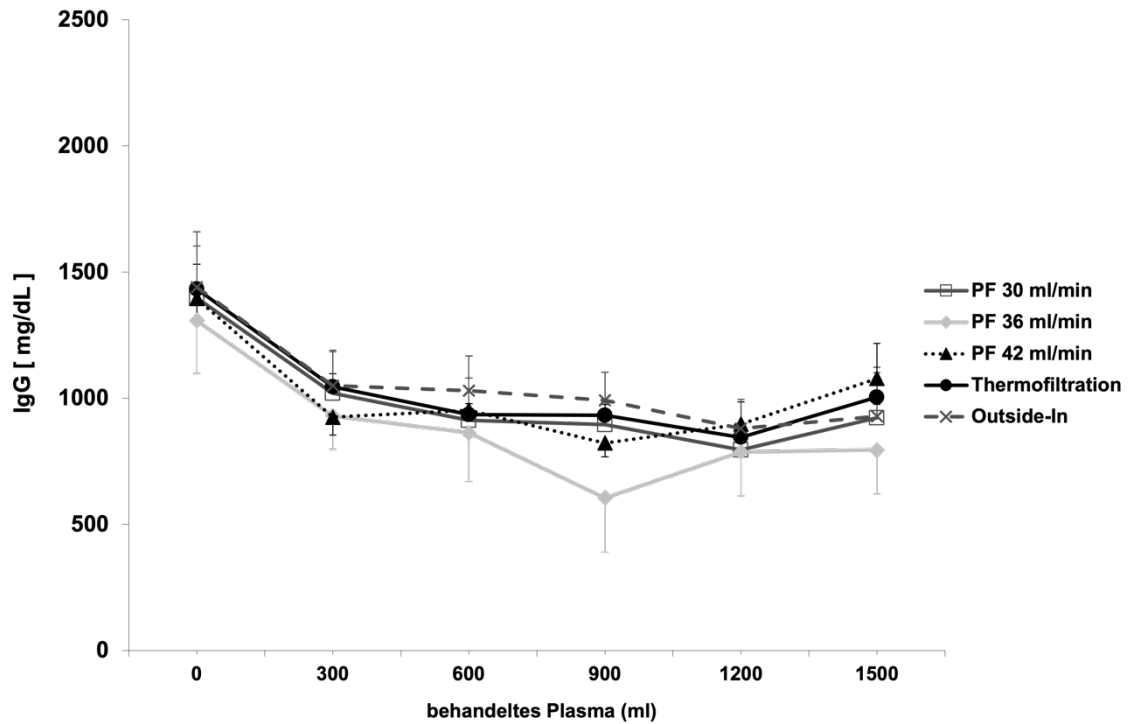


Abbildung 9: Verlaufskonzentration Immunglobulin G (IgG) im arteriellen Blut

Auch die gemessenen Albumin-Konzentrationen konnten mit allen Einstellungen signifikant gesenkt werden ($p < 0,05$) (Abbildung 10). Diese reichten prätherapeutisch von $30,4 \pm 0,9$ (PF 36 ml/min) bis $32,6 \pm 2$ (TF) und posttherapeutisch von $21,5 \pm 2,5$ (PF 36 ml/min) bis $24,3 \pm 3,3$ g/L (PF 42 ml/min).

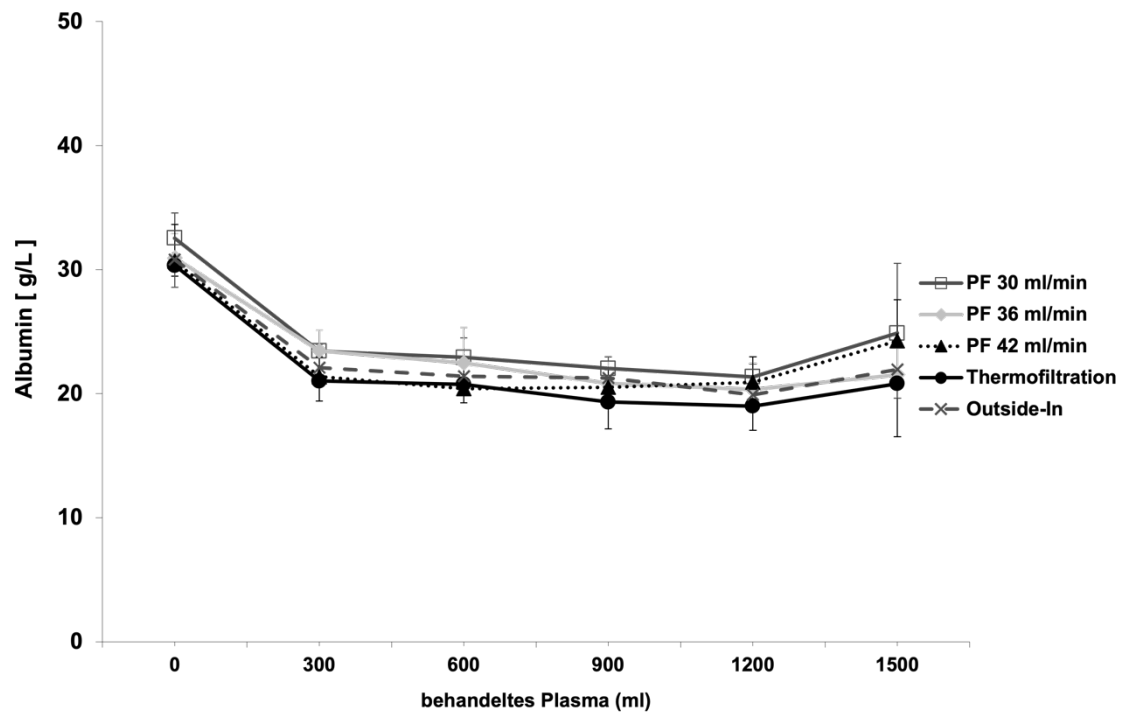


Abbildung 10: Verlaufskonzentration Albumin im arteriellen Blut

Fibrinogen konnte ebenfalls mit allen Behandlungseinstellungen signifikant ($p < 0,05$) im arteriellen Blut gesenkt werden (*Abbildung 11*). Prätherapeutische Konzentrationen lagen zwischen $63,42 \pm 17,7$ (TF) und $99,77 \pm 30,27$ (PF 30 ml/min) und posttherapeutische zwischen $30,2 \pm 11,3$ (TF) und maximal $49,1 \pm 23$ mg/dL (PF 30 ml/min).

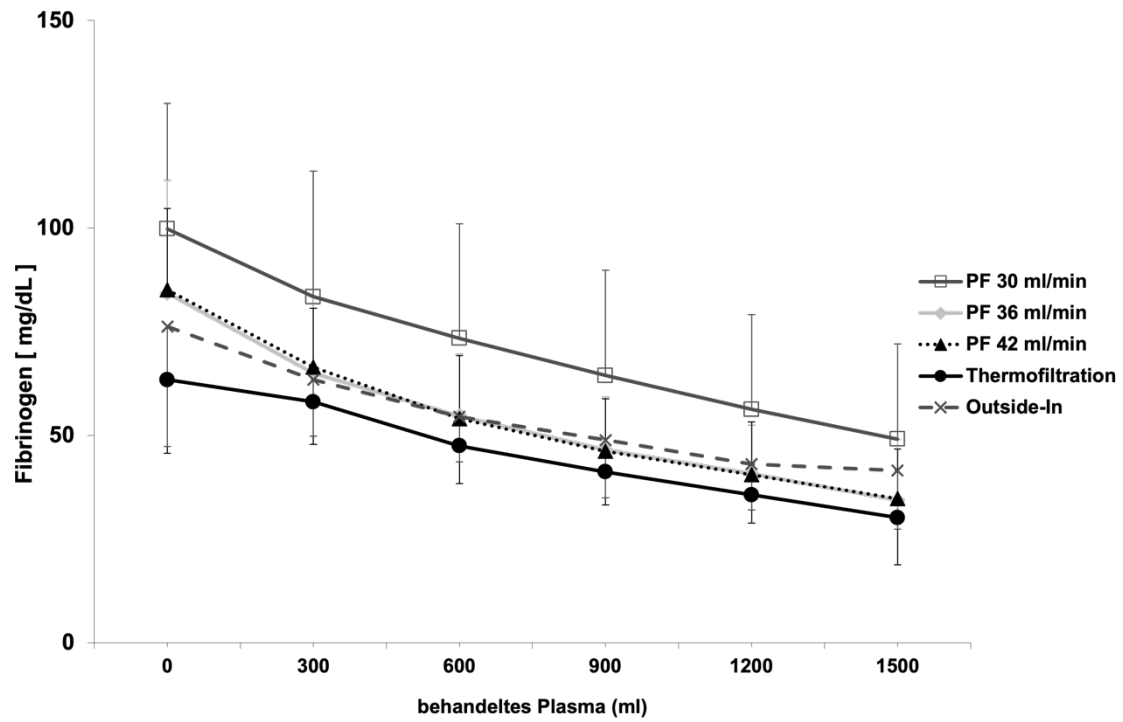


Abbildung 11: Verlaufskonzentration Fibrinogen im arteriellen Blut

Die Verlaufskonzentration von Cholesterin konnte mit allen Einstellungen ähnlich effektiv ($p < 0,05$) gesenkt werden (Abbildung 12). Prätherapeutische Werte lagen zwischen $0,9 \pm 0,1$ (Outside-In) und $1,4 \pm 0,8$ (PF 30 ml/min) und posttherapeutische zwischen $0,4 \pm 0,2$ (Outside-In) und maximal $0,8 \pm 0,7$ mmol/L (PF 30 ml/min).

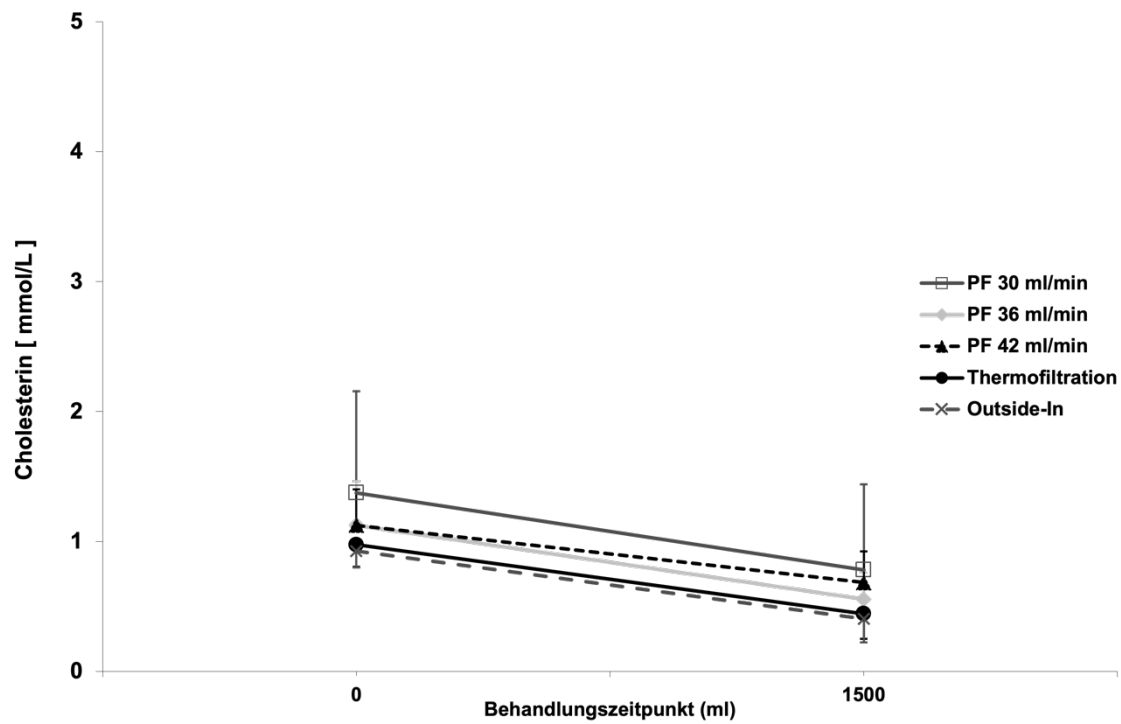


Abbildung 12: Verlaufskonzentration Cholesterin im arteriellen Blut

Bis auf die Einstellung mit einer PF von 36 ml/min konnten auch die Triglyceride mit allen Behandlungseinstellungen signifikant ($p < 0,05$) von Werten zwischen $0,28 \pm 0,06$ (PF 42 ml/min) und $0,38 \pm 0,13$ (PF 30 ml/min) auf Werte zwischen $0,14 \pm 0,04$ (PF 42 ml/min) und $0,17 \pm 0,05$ mmol/L (Outside-In) reduziert werden.

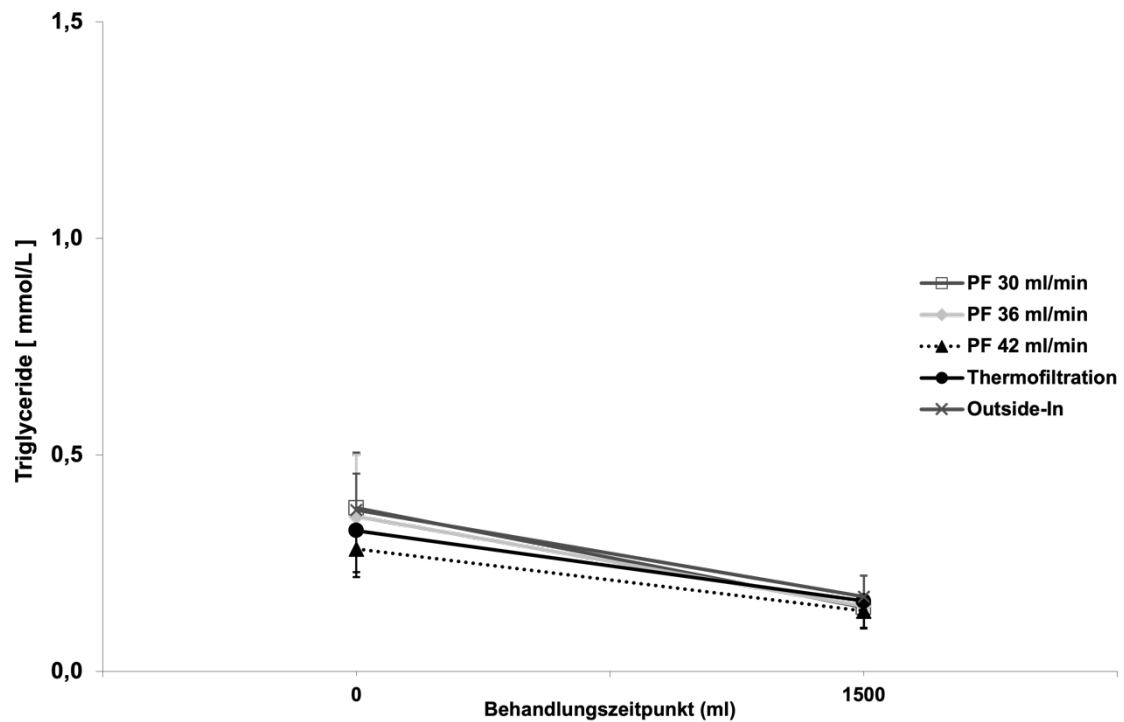


Abbildung 13: Verlaufskonzentration Triglyceride im arteriellen Blut

Die Messungen der Ca^{2+} -Konzentration im venösen Vollblut beträgt über alle Behandlungen, wie für die Antikoagulation vorgesehen um die 3 mmol/L (Abschnitt 2.6.3) und verläuft ähnlich (Abbildung 14). Zu Beginn der Behandlungen sinkt die prätherapeutische Konzentration ab und liegt von 300 bis 900 ml behandeltem Plasmavolumen zwischen $0,31 \pm 0,08$ (PF 30 bei 900 ml) und maximal $0,56 \pm 0,21$ mmol/L (Outside-In bei 900 ml). Zum Ende der Behandlung steigt die Ca^{2+} -Konzentration wieder auf prätherapeutische Spiegel an.

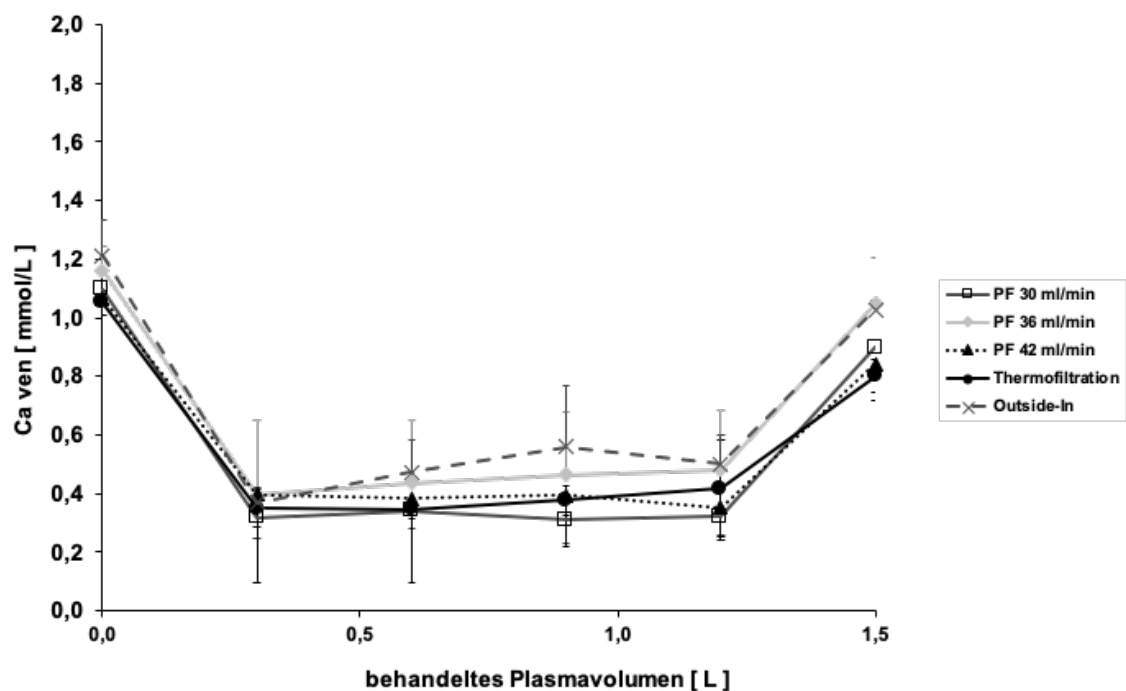


Abbildung 14: Verlauf der Ca^{2+} -Konzentration im venösen Vollblut. Steuerung der Antikoagulation.

Im Vergleich der Reduktionsrationes (RR) der untersuchten Stoffe konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Behandlungseinstellungen herausgestellt werden (Abbildung 15, Abbildung 16).

Für LDL lag sie zwischen $49,0 \pm 8,9$ (Outside-In) und $60,6 \pm 9,7$ % (PF 36 ml/min). Die RR für HDL lag zwischen $31,1 \pm 9,0$ (PF 42 ml/min) und $39,7 \pm 14,5$ % (PF 36 ml/min). Auch für IgG erreichte die Behandlung mit PF 36 ml/min die höchste RR mit $38,8 \pm 11,6$ %. Die niedrigste RR lag bei $22,7 \pm 5,1$ % bei einer PF 42 ml/min. Für Albumin lag sie zwischen $21 \pm 6,4$ (PF 42 ml/min) und $31,7 \pm 12,2$ % (TF), für Fibrinogen zwischen $44,6 \pm 7,6$ (Outside-In) und $60,2 \pm 6,2$ % (PF 36 ml/min), für Cholesterin zwischen $40,5 \pm 7,5$ (PF 42 ml/min) und $56,3 \pm 19$ % (Outside-In) und für Triglyceride zwischen $47,2 \pm 22$ (TF) und $55 \pm 26,6$ % (PF 30 ml/min).

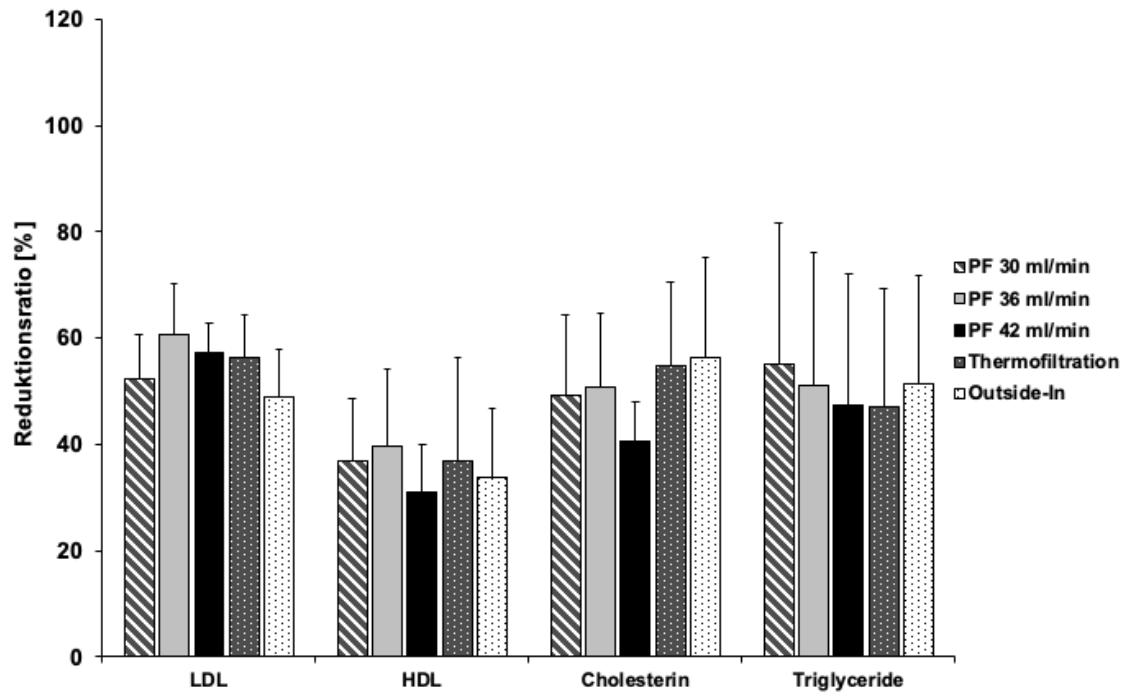


Abbildung 15: Vergleich der RR von LDL, HDL, Cholesterin und Triglyceriden. Es waren keine signifikanten Unterschiede nachweisbar.

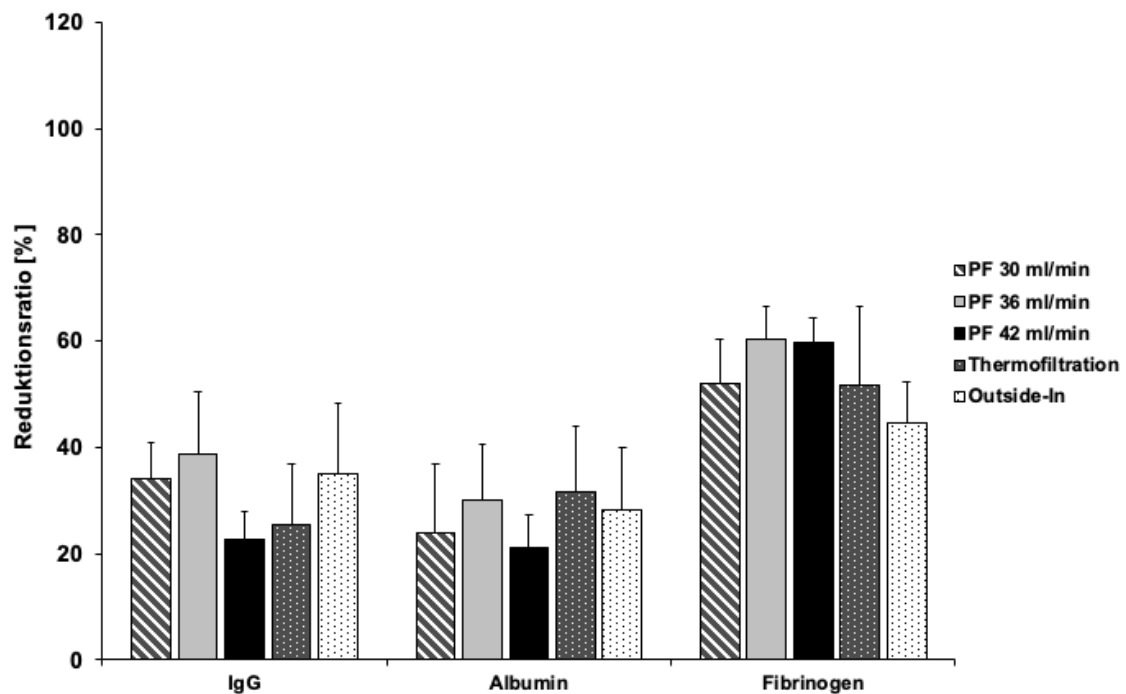


Abbildung 16: Vergleich der RR von IgG, Albumin und Fibrinogen. Es waren keine signifikanten Unterschiede nachweisbar.

3.4 HDL/LDL Ratio

Abbildung 17 zeigt die HDL/LDL Ratio der verschiedenen Behandlungen und weist wie auch die RR keine signifikanten Unterschiede zwischen den Einstellungen auf. Die kleinste Ratio (geringstes Verhältnis zwischen membranpassierendem HDL und vor der Membran zurückgehaltenen LDL) lag mit $0,544 \pm 0,153$ bei PF 42. Die höchste Ratio hatte PF 30 mit $0,706 \pm 0,184$.

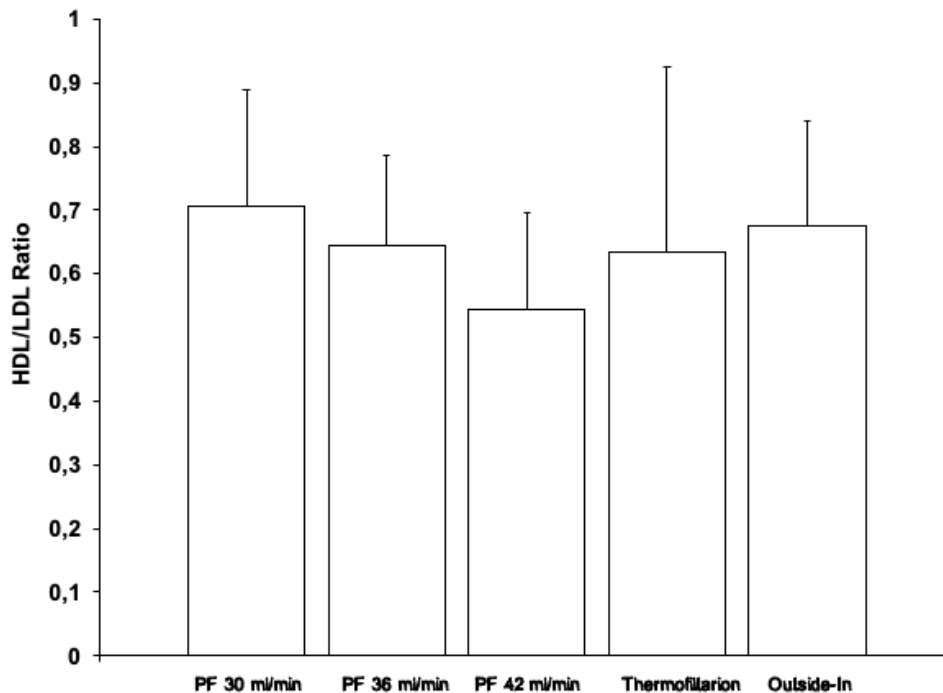


Abbildung 17: HDL/LDL Ratio der verschiedenen Behandlungen.

3.5 Transmembranöser Druck (TMP) des Kaskadenfilters

Der TMP der Kaskadenfiltrationsmembran zeigte einen unregelmäßigen inter- und intraindividuellen Verlauf der einzelnen Behandlungsmethoden (Abbildung 18). Während der TMP zu Anfang aller Behandlungen kontinuierlich anstieg unterschied sich der weitere Verlauf ab 900 ml. Hier gab es bei der TF und der PF 36 ml/min einen Ausreißer nach oben mit anschließendem Abfall zum letzten Messzeitpunkt. Bei PF 30 ml/min gab es bei 900 ml eine deutliche Erniedrigung im intraindividuellen Kurvenverlauf mit anschließendem Anstieg. Der höchste TMP $98,3 \pm 34$ mmHg wurde

während der TF bei 0,9 L behandeltem Plasmavolumen erreicht. Der niedrigste TMP lag während der Outside-In Filtration bei 0,3 L bei $36,3 \pm 2$ mmHg.

Einen signifikant höherer ($p = 0,007$) TMP wurde bei 0,3 L während der TF 54 ± 9 mmHg gegenüber der Outside-In Filtration $36,3 \pm 2$ mmHg gemessen.

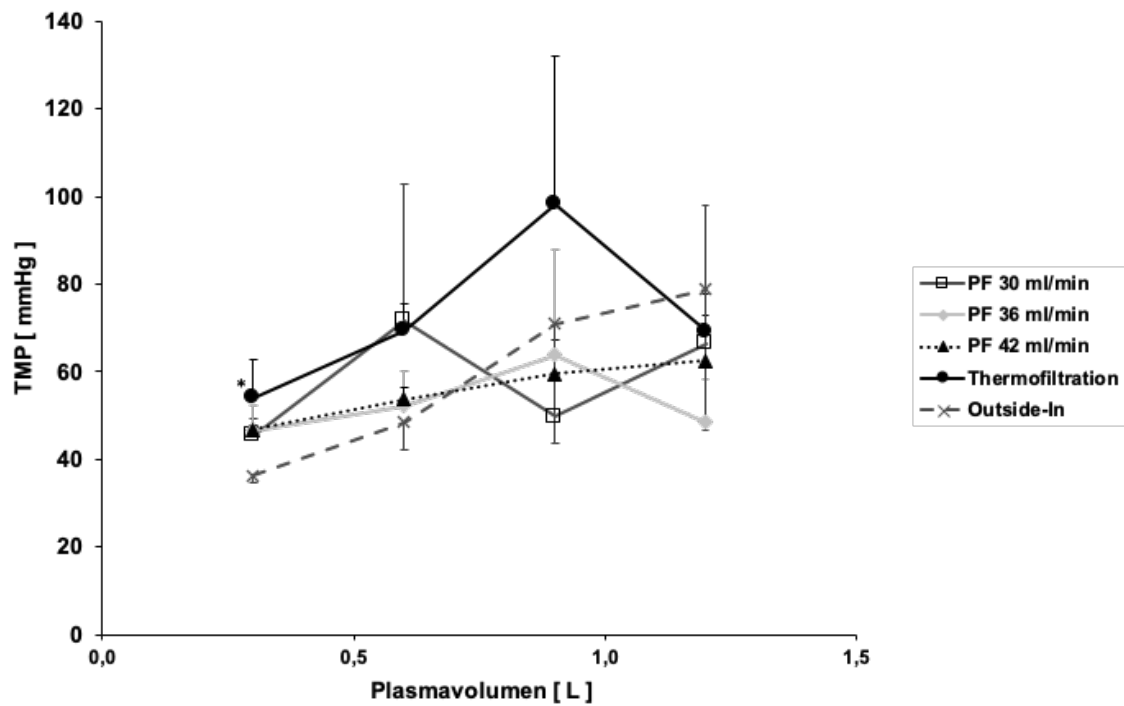


Abbildung 18: TMP-Verlauf der Fraktionierungsmembran.

Signifikanzniveau: * $p < 0,05$ (TF vs. Outside-In bei 0,3 L)

3.6 Korrelation von Siebkoeffizienten und transmembranösen Druck (TMP)

Bei der Analyse der Korrelationskoeffizienten ($r=$) von S_K und transmembranösen Drücken der Fraktionierungsmembran zeigte sich für LDL-Cholesterin bei 300 ($r= -0,529$; $p = 0,017$), 600 ($r= -0,493$; $p = 0,027$) und 900 ml behandeltem Plasma ($r= -0,498$; $p = 0,025$) jeweils eine signifikante Korrelation der beiden Werte.

Bezogen auf die Behandlungseinstellungen bestand sowohl bei der Behandlung mit PF 42 ml/min ($r= 0,732$; $p = 0,001$) als auch bei Outside-In ($r= -0,838$; $p < 0,001$) eine signifikante Korrelation. Bei PF 42 ml/min stieg der S_K mit dem TMP an, während er bei "Outside-In" mit steigendem Druck absank (*Abbildung 19*). Die Trendlinien der übrigen Einstellungen orientieren sich an der von PF 42 ml/min.

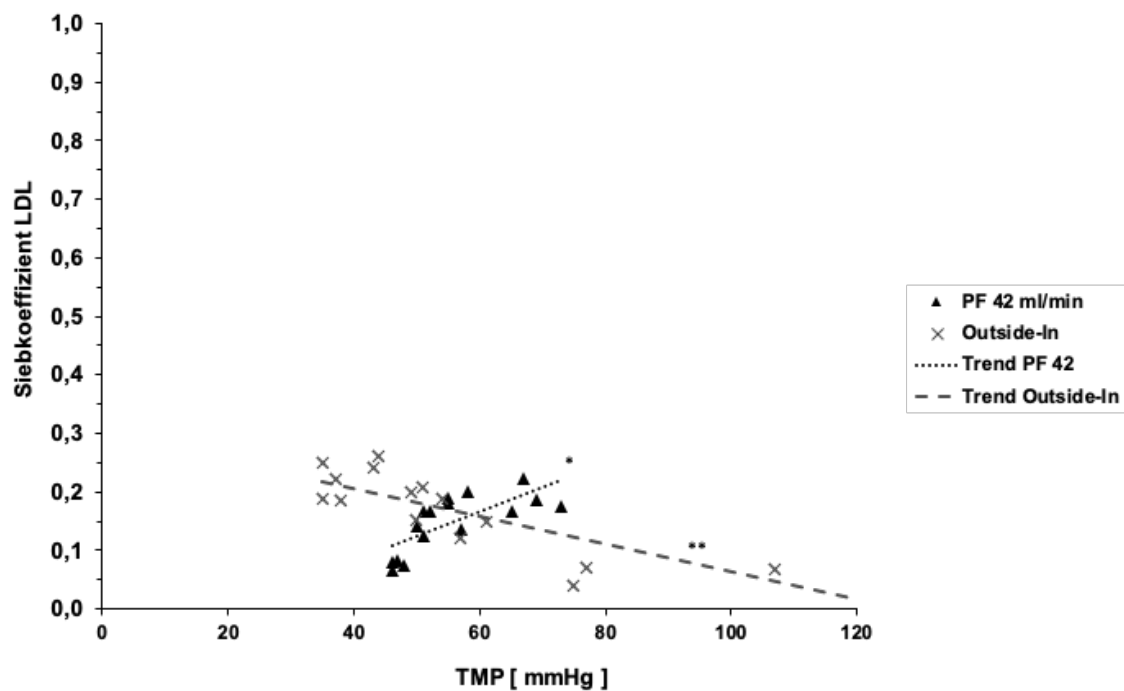


Abbildung 19: Korrelation von LDL S_K und TMP bei PF 42 ml/min und Outside-In.

Signifikanzniveau: * $p = 0,001$ (LDL S_K vs. TMP bei PF 42); ** $p < 0,001$ (LDL S_K vs. TMP bei Outside-In)

Auch für die S_K von HDL gab es bei 600 ($r = -0,631$; $p = 0,003$), 900 ($r = -0,586$; $p = 0,007$) und 1200 ml ($r = -0,484$; $p = 0,031$) einen signifikanten Zusammenhang mit dem TMP.

Signifikant ist außerdem die Korrelation bei PF 42 ($r = 0,502$; $p = 0,048$). Die Trendlinie zeigt bei geringem Anstieg des Druckes eine deutliche Erhöhung des S_K (Abbildung 19).

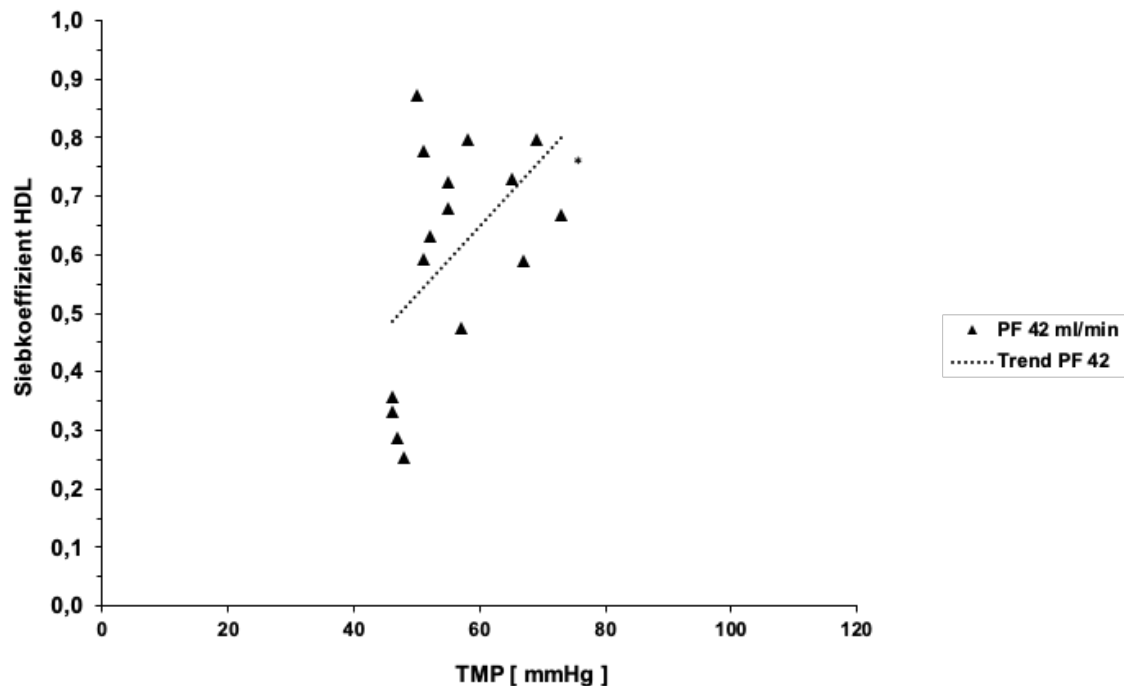


Abbildung 20: Signifikante Korrelation von HDL S_K und TMP bei PF 42 ml/min.

Signifikanzniveau: * $p < 0,05$ (HDL S_K vs. TMP bei PF 42)

Auch IgG ($r = 0,518$; $p = 0,04$), Albumin ($r = 0,594$; $p = 0,015$) und Fibrinogen ($r = 0,702$; $p = 0,002$) weisen einen dem von LDL und HDL ähnlichen und signifikanten Korrelationstrend bei einer PF von 42 ml/min auf (siehe Abbildungen 21 bis 23 im Anhang).

Die nicht signifikanten Korrelationen der übrigen Behandlungseinstellungen befinden sich zur Komplettierung im Anhang (siehe Tabellen 6 bis 10 im Anhang).

4. Diskussion

4.1 Bewertung der verschiedenen Aphereseverfahren

Durch die Lipoproteinapherese kann die Progression von kardiovaskulären Erkrankungen durch Atherosklerose (Koga, Satoh et al. 1991, Kroon, Aengevaeren et al. 1996, Klingel, Heibges et al. 2017) verhindert werden. Sie wird schon seit den 80er Jahren als effektive Therapieform für die familiäre Hypercholesterinämie genutzt (Keller 2009).

Alle derzeit in der Praxis verwendete Verfahren senken die Konzentration von atherogenem LDL- und Lp(a)-Cholesterin um 60 bis 70% (Jaeger, Richter et al. 2009, Thompson, Barbir et al. 2010, Klingel, Heibges et al. 2017). Sie unterscheiden sich jedoch hinsichtlich Wirkmechanismus, Selektivität für verschiedene andere Moleküle und rheologischen Begleiteffekten (Thompson and Group 2008). Eine höhere bzw. geringere Selektivität für die verschiedenen Moleküle kann, je nach Grunderkrankung des Patienten und Behandlungsziel, Vor- und Nachteil zugleich sein. Während nicht-selektive Verfahren die unerwünschte Entfernung von protektivem HDL (Ahn and Kim 2016) bewirken, sind auf der anderen Seite hochselektive Verfahren, wie die Immunadsorption bezüglich der erwünschten zusätzlichen Entfernung von bestimmten Plasmamolekülen weniger effektiv. Nennenswert ist hier die schwächere Reduktion von atherogenem Fibrinogen.

In der Vergangenheit wurde der nicht-selektive therapeutische Plasmaaustausch genutzt, bei welcher das Patientenplasma durch das eines Spenders ersetzt wurde. Neben den aufwändigen Prozessen im Zusammenhang mit der Generierung von Spenderplasma ist dessen Verwendung mit einem erhöhten Infektionsrisiko und anderen Nebenwirkungen verbunden (Stoffel, Borberg et al. 1981), was klinisch ein entscheidender Nachteil gegenüber den heutzutage gängigen Verfahren ist. Der Plasmaaustausch ist somit als dauerhafte Therapieform für Patienten mit Fettstoffwechselstörungen kaum geeignet.

Ein jüngeres Verfahren ist die Immunadsorption, deren Vorteile ihre hohe Selektivität, Effektivität und Regenerationskapazität sind. Anschaffung und Regeneration des Systems sind jedoch mit enormen Kosten verbunden (Stoffel and Demant 1981), die

durch die mehrfache Wiederverwendung bei denselben individuellen Patienten nach Regenerationen wieder aufgefangen werden.

Ähnliches trifft auf die DSA zu, welche ebenfalls nur eine geringe Fibrinogenreduktion im Plasma aufweist (Bambauer, Bambauer et al. 2012).

Weniger spezifisch, dafür aber effektiver bezüglich der Fibrinogen-Reduktion als die beiden zuletzt genannten Verfahren, ist das HELP-Verfahren. Genau diese starke Reduktion des Fibrinogens und anderer prokoagulatorischer Moleküle (C3, C4, Plasminogen, Faktor VIII) wirkt sich jedoch limitierend auf das mögliche Behandlungsvolumen aus, da ein ausgeprägter Mangel dieser Faktoren eine verstärkte Blutungsneigung verursacht (Bambauer, Bambauer et al. 2012).

Die direkte Adsorption von Lipiden (DALI™) ist ein in der Anwendung simpel durchzuführendes und selektives Vollblut-Verfahren, welches 1993 das erste Mal beschrieben wurde (Bosch, Schmidt et al. 1993). Durch die negativ geladene Polyacrylamid-Oberfläche der verwendeten Kugeln werden Apo-B-aufweisende Moleküle, wie die von LDL und Lp(a), gebunden und Apo-AI-Proteine, wie von HDL, nur in geringem Maße gebunden und eliminiert.

Leider wurden in der Vergangenheit, durch einen extremen Anstieg von Bradykinin getriggert, anaphylaktoide Reaktionen als gravierende Nebenwirkung beschrieben (Kojima, Ogi et al. 1997). Diese gefährliche Nebenwirkung trat vor allem bei Patienten unter medikamentöser Therapie mit ACE-Inhibitoren (Angiotensin-Converting-Enzym-Inhibitoren) während Aphereseverfahren mit negativ geladenen Oberflächen (DSA und DALI) auf. Daher ist die gleichzeitige Einnahme von ACE-Inhibitoren bei diesen beiden Verfahren kontraindiziert. Beim HELP™-Verfahren wurde diese Eigenschaft nicht beobachtet, weshalb es für Patienten, die einen ACE-Hemmer benötigen, als geeignetere Alternative erscheint (Krieter, Steinke et al. 2005).

Die MDF ist sehr effizient bezüglich der Reduktion von LDL und Fibrinogen. Außerdem profitieren die Patienten von einem hämorheologischen Effekt. Als Nebeneffekt der hohen Effizienz werden neben den erwünschten Proteinen ebenfalls vasoprotektives HDL zurückgehalten und dadurch den Patienten entzogen. Dies wird durch inhomogen verteilte Porengrößen, welche die wichtigsten selektierenden Effektoren dieses

Verfahrens sind, begünstigt und neben der Morphologie der Membran auch durch die Behandlungseinstellungen beeinflusst (Krieter and Lemke 2011). Auch die MDF birgt über die den extrakorporalen Verfahren allgemein anhaftenden Nebenwirkungen, wie hypotensive Ereignisse, potenzielle Gefahren. So soll beispielsweise durch die Entfernung von Immunglobulinen das Auftreten entzündlicher Komplikationen begünstigt werden (Geiss, Parhofer et al. 1999), auch wenn Studien, die dies belegen, nicht verfügbar sind. Um eine hohe Effizienz der Fraktionierungsmembran bei möglichst geringem Nebenwirkungsrisiko zu gewährleisten, erscheinen daher stetige Verbesserungen und Untersuchungen notwendig.

4.2 Zielsetzungen und Studienaufbau

Im Rahmen eines für die MDF modifizierten (Krieter, Lange et al. 2018) und ursprünglich für die Hämodialyse etablierten Großtiermodells am Schaf (Krieter, Fink et al. 1995) sollte in dieser Studie der Einfluss verschiedener Plasmaflussraten sowie der Plasmatemperatur (TF) auf die Filtration definierter, relevanter Proteine durch eine Plasmafraktionierungsmembran *in vivo* untersucht werden. Darüber hinaus wurde der Effekt der transmembranösen Plasmaflussrichtung bezogen auf die Fraktionierungsmembran (Outside-In-Modus) getestet. Sowohl S_K als auch RR für LDL-Cholesterin, HDL-Cholesterin, Albumin, Fibrinogen und IgG wurden gemessen. Zudem wurden das Reduktionsverhältnis von HDL und LDL und die Korrelationskoeffizienten zwischen S_K und TMP bestimmt.

Ziel der Arbeit war es, ideale Behandlungsbedingungen im Rahmen eines verlässlichen und kontrollierten *In-vivo*-Modells, welches sich realistisch auf die klinische Behandlung übertragen lässt, für die relativ neue PES-Fraktionierungsmembran zu definieren. Die Versuchsplanung konnte im Sinne einer prospektiven, randomisierten Cross-Over-Studie problemlos umgesetzt werden.

4.3 Das Schafsmodell als Basis für die aktuellen Versuche

Mit Tierversuchen in der medizinischen Forschung assoziieren die meisten Menschen zunächst wohl die klassischen Labortiere wie Ratten, Kaninchen oder Mäuse. Die Erforschung und Optimierung extrakorporaler Blutreinigungsverfahren profitiert jedoch von größeren Versuchstieren, um einen realitätsnahen Vergleich zum Menschen zu erzielen. Daher wurden für diese Art der Forschung schon früher Großtiere wie Hunde, Schweine und auch Schafe erfolgreich genutzt (Schmer, Teng et al. 1976).

Speziell das Schaf als Großtiermodell für extrakorporale Verfahren wie die MDF bringt einige Vorteile mit sich. Wichtig sind die dem Menschen ähnlichen Proportionen bezüglich des Körpergewichts und des Blutvolumens. Dadurch können Behandlungsvolumen und Plasmaflussgeschwindigkeiten entsprechend dem klinischen Setting reproduziert werden. Deutlich einfacher als beim Menschen ist der venöse Zugang über die stark exponierten Jugularvenen am Hals des Tieres, die eine einfach durchzuführende zentrale Venenkatheteranlage als Gefäßzugang erlauben (Krieter, Fink et al. 1995). Verglichen mit anderen großen Tieren wie Schweinen oder Hunden ist das Schaf wesentlich friedlicher, weshalb viele Versuche ohne Narkose stattfinden können und dadurch unnötige Risiken für das Tier wegfallen (Krieter, Fink et al. 1995).

Neben den vergleichbaren Proportionen des Versuchstieres sind auch eine ähnliche Zusammensetzung dessen Blutes und vergleichbare koagulatorische Eigenschaften wichtig, um die direkte Interaktion des Blutes mit dem untersuchten medizinischen Produkt zu testen. Anfangs wurden vor allem Hunde und Hasen für die Untersuchung der Biokompatibilität und Interaktion mit Fremdmaterial genutzt (Abel, J. J., Rowntree 1914). Bereits in den frühen 70er Jahren konnte die Ähnlichkeit der Gerinnungseigenschaften von Schaf und Menschen anhand von gleichartigen Werten der Blutgerinnungszeit, partiellen Thromboplastinzeit, Thrombinzeit und Prothrombinzeit nachgewiesen werden (Gajewski and Povar 1971). Grabowski und Kollegen konnten herausstellen, dass die Thrombozyten von Schafen, Rhesusaffen und Schweinen ähnlich denen des Menschen mit Fremdmaterial interagieren, wohingegen die von Hasen und Hunden eine stärkere Adhäsion zeigen. So konnte die Studie begründen, dass das Schaf gut für die Untersuchung von künstlichen Organen und Fremdmaterialien geeignet ist

(Grabowski, Didisheim et al. 1977). Neben der Hämodialyse (Schmer, Teng et al. 1976) wurden viele weitere herausragende medizinische Neuentwicklungen, wie die ECMO (extrakorporale Membranoxygenierung) (Birek, Duffin et al. 1976, Kolobow, Tomlinson et al. 1976), Herzschrittmacher (Cummings, Gelok et al. 1973) und Bypass-Operationen am Herzen (Peters, Fukumasu et al. 1978), erfolgreich am Schaf getestet.

In der vorliegenden Studie bewährten sich die Schafe durchweg als verträgliche und einfach zu handhabende Versuchstiere. Die Instrumentierung inklusive der Katheterisierung der, nach Scheren des Fells, deutlich hervorgehobenen Jugularvenen konnte unter adäquater Positionierung des Tieres jederzeit erfolgreich in lediglich lokaler Betäubung vorgenommen werden. Dies war nicht zuletzt aufgrund des ruhigen Temperaments der Tiere möglich. Die Option der einfachen, nicht-invasiven Überwachung des Blutdrucks am Schwanz des Tieres gewährleistete eine sichere und unaufwändige Kreislaufüberwachung. Die zuvor definierten Behandlungsvolumina wurden in allen Versuchen erreicht. Die Aufrechterhaltung der Antikoagulation, gesteuert über die ionisierte Calciumkonzentration (*Abb. 14*), verlief ebenso problemlos und nach Beendigung des jeweiligen Versuches wurden wieder physiologische Calciumwerte erreicht. Die gemessenen LDL-S_K waren nachvollziehbar und lagen im Bereich der *in vitro* gemessenen S_K des Herstellers (3M Deutschland GmbH. (2014) SelectiCure H19) (*Abschnitt 4.4*). Diese nur geringen Abweichungen lassen die Schlussfolgerung zu, dass das Schafsmodell eine sehr genaue Messung und Einschätzung der Membranperformance *in vivo* gewährleistet.

4.4 *In-vitro*- versus *In-vivo*-Versuche

Geeignete *In-vivo*-Modelle für die Testung und konsekutive Zulassung medizinischer Produkte zu etablieren, stellt eine vielschichtige Herausforderung dar. Neben einer realitätsnahen klinischen Übertragbarkeit sind die Studienfinanzierung und die Sicherheit des Versuchstieres zu gewährleisten. Speziell die Charakterisierung einer Fraktionierungsmembran für die MDF stellt weitere Herausforderungen an die klinisch praktische Forschung. Aufgrund des in der Klinik auftretenden Verstopfens der Fraktionierungsmembran (Synonyme: Membranfouling, Clogging) durch Substanzen mit hohem Molekulargewicht und des damit einhergehenden Problems, hohe Plasmaflüsse aufrechtzuerhalten, ohne zu hohe transmembranöse Drucke in Kauf nehmen zu müssen (seitens der installierten Maschinensoftware war der maximale TMP in der vorliegenden Studie auf 150 mmHg begrenzt), werden definierte Behandlungsvolumina und die erwünschte Behandlungseffektivität oft nicht erreicht (Dittrich-Riediger, Schatz et al. 2015). Außerdem zeigen die Plasmaflussgeschwindigkeiten große inter- und intraindividuelle Schwankungen, da der vaskuläre Zugang für die MDF (peripher-venös, zentral-venös oder arterio-venöse Shunts) aufgrund der Gefäßverhältnisse bei den Patienten stark variiert. Diese Störfaktoren galt es, in einem geeigneten *In-vivo*-Modell zu kontrollieren, um vordefinierte realitätsnahe Blut- und Plasmavolumina behandeln zu können und somit einem weniger komplexen *In-vitro*-Modell nicht unterlegen zu sein. Die Durchführung dieser Studie basierte auf einem bereits etablierten Großtiermodell für die Kaskadenfiltration, mit welchem bereits in einer vorangegangenen Studie die Selektivität verschiedener Fraktionierungsmembranen verglichen worden war, wobei die vom Membranhersteller angegebenen *In-vitro*- S_K zuvor unter klinischen Bedingungen in menschlichem Plasma überprüft worden waren (Krieter, Lange et al. 2018). In der vorliegenden Studie konnten im Schafsmodell wiederholt nachvollziehbare S_K für LDL gemessen werden, welche mit den *in vitro* gemessenen S_K des Herstellers überwiegend übereinstimmten (3M Deutschland GmbH. (2014) SelectiCure H19.). Diese sind zur detaillierteren Übersicht in Tab. 4 gegenübergestellt. Lediglich die LDL- S_K lagen bei PF 42 und im Outside-In-Modus ca. 50% höher als die *in vitro* gemessenen Werte. Aber auch im direkten Vergleich zu den übrigen Einstellungen waren sie um circa 50% höher (Tabelle 4, Abb. 2). Zudem wurden bei der Outside-In-Einstellung auch für Fibrinogen, einem ebenfalls höhermolekularen Protein von 350 kDa, höhere S_K als bei den anderen

Behandlungseinstellungen gemessen (Abbildung 6). Die nur geringen Abweichungen zeigen, dass das Schafsmodell eine gute Einschätzung der Membranperformance *in vivo* gewährleistet.

Tabelle 4: *In-vitro* versus *In-vivo* S_K, *abweichende S_K

In-vitro S_K des Herstellers: 3M Deutschland GmbH. (2014) SelectiCure H19. Website: [https://www.membrana.com/healthcare/healthcare-data/documents/medical-devices/selecticure%C2%AE-\(english\)/selecticureh19_rev00.aspx](https://www.membrana.com/healthcare/healthcare-data/documents/medical-devices/selecticure%C2%AE-(english)/selecticureh19_rev00.aspx)

	<i>In-vitro</i> S _K (Herstellerangaben)	<i>In-vivo</i> S _K (Mittelwerte der Behandlungseinstellungen)
LDL (2.500-3.000 kDa)	<0,1 ca. 0,075	PF 30: 0,087 PF 36: 0,073 *PF 42: 0,148 TF: 0,091 *Outside-In: 0,162
HDL (175-360 kDa)	0,55	PF 30: 0,419 PF 36: 0,592 PF 42: 0,598 TF: 0,528 Outside-In: 0,564
IgG (150 kDa)	0,7	PF 30: 0,579 PF 36: 0,717 PF 42: 0,761 TF: 0,65 Outside-In: 0,665
Albumin (67 kDa)	0,85	PF 30: 0,685 PF 36: 0,813 PF 42: 0,804 TF: 0,677 Outside-In: 0,657

4.5 Effekte der verschiedenen Behandlungseinstellungen auf die Proteinentfernung

Die Plasmakonzentrationen der untersuchten Moleküle konnten mit jeder der Behandlungseinstellungen effektiv gesenkt werden. Die für die klinische Anwendung vorgeschriebene RR von 60 % für LDL wurde größtenteils erreicht, lag jedoch mit Mittelwerten zwischen $49 \pm 8,9$ % (Outside-In) und $60,6 \pm 9,7$ % (PF 36) zum Teil knapp darunter (*Abb. 15*). Da das behandelte Plasmavolumen mit 1,5 L als die Versuchsapherese beendendes Behandlungsziel verglichen mit den üblichen kalkulierten klinischen Volumina der Patienten recht klein war (Sprenger, Huber et al. 1987), die therapeutische Eliminierung aller untersuchten Stoffe jedoch einer Kinetik erster Ordnung entspricht (starke Senkung zu Beginn der Behandlung und zunehmend langsamere Reduktion im Verlauf (Krieter, Lange et al. 2018)), kann mit einer Erhöhung des Behandlungsvolumens von einem Erreichen des von der deutschen Gesellschaft für Nephrologie e.V. festgelegten Therapieziels (Standard der Therapeutischen Apherese 2019 der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie e.V.) gerechnet werden.

Die kleinen Unterschiede der S_K führten trotz der verschiedenen Behandlungseinstellungen weder zu signifikanten Unterschieden bei den RR noch bei den HDL/LDL-Quotienten der untersuchten Stoffe (*Abbildung 15, Abbildung 16*). Das günstigste HDL/LDL-Verhältnis wurde jedoch mit PF 42 erreicht ($0,544 \pm 0,153$). Ein möglichst kleines HDL/LDL-Verhältnis ist als wünschenswert anzusehen, da es beschreibt, dass möglichst nicht zu entfernendes HDL die Membran passiert, während gleichzeitig viel atherogenes LDL retiniert wird (*Abb. 17*). Die höchste und damit ungünstigste Ratio lag mit $0,706 \pm 0,184$ bei PF 30. Die statistisch fehlende Signifikanz beruht vermutlich auf der begrenzten Anzahl von lediglich vier Versuchstieren und würde mit einer größeren Stichprobe mutmaßlich zu erreichen sein.

Bei der Einstellung des im vorliegenden Versuch niedrigsten PF von 30 ml/min lag definitionsgemäß ein niedrigerer Fluss durch die Membran vor, was im Vergleich zu den Einstellungen mit höheren Flüssen eine geringere Konvektion durch die Membranporen zur Folge hat. HDL mit 175-360 kDa liegt seitens der Größe im Bereich der Trennschärfe der Membran. Eine höhere Plasmaflussrate und die daraus resultierende Steigerung der konvektiven Kräfte verstärkt bekanntermaßen die Passage gelöster Substanzen durch die Membran (Ledebo and Blankestijn 2010). Diese war bei PF 30 in der vorliegenden Studie

am niedrigsten, entsprechend wurde mehr HDL in unerwünschter Weise retiniert, was sich im Folgenden (*Abschnitt 4.6*) auch in den S_K widerspiegelte. Bei PF 42 konnte es die Membran besser passieren, während LDL, welches mit 2.500-3.000 kDa das größte der gemessenen Proteine ist, auch bei höheren Plasmaflüssen von der Membran zurückgehalten wurde, was letztlich in der günstigeren HDL/LDL-Ratio resultierte. Daher ist PF 42 den niedrigeren Plasmaflüssen hinsichtlich der Behandlungseffektivität überlegen.

Auffällig war außerdem die Diskrepanz der RR für HDL zu den aus der klinischen Praxis bekannten Werten. Zwischen $31,1 \pm 9,0 \%$ (PF 42 ml/min) und $39,7 \pm 14,5 \%$ (PF 36 ml/min) liegend waren diese deutlich höher und bestätigen somit die von Krieter und Lange 2018 berichteten Befunde aus vergleichbaren Versuchen am Schaf (Krieter, Lange et al. 2018). Klinisch wird am Menschen normalerweise eine Reduktion von 10-20% beobachtet (Nakaji and Yamamoto 2002). Diese unerwünscht starke Senkung der HDL-Plasmakonzentration könnte am ehesten auf Eigenheiten des Versuchstiers selbst zurückzuführen sein, da Schafe bekannter Weise vor allem die HDL2-Subklasse besitzen (Mackness and Walker 1988). HDL ist aus verschiedenen Proteinen und Lipiden zusammengesetzt. Subklassen können nach verschiedenen Kriterien, wie z.B. Größe, Dichte, Form oder anhand ihres Verhaltens, während der Elektrophorese eingeteilt werden (Gordon, Probstfield et al. 1989, Lund-Katz, Liu et al. 2003). Da die Trennschärfe bei der MDF und somit die Permselectivität vor allem auf dem Porendurchmesser der Membran und somit nach Molekülgröße und -form selektierenden Prinzip basiert, würde die beim Schaf dominierende größere HDL2-Subklasse (10,6 nm) im Vergleich zu den beim Menschen vorkommenden HDL1 bis HDL5 (7,6 bis 10,6 nm) größere HDL2-Subklasse (10,6 nm) (Mackness and Walker 1988) die höhere Retention und somit höhere RR hinreichend erklären. Eine sichere Verifizierung dieses Aspekts hätte jedoch die aufwändige Bestimmung der HDL-Subklassen erfordert.

Entsprechend der Membranselektivität bzw. der Größe und Form der Moleküle zeigten auch die übrigen Stoffe erwartete RR. Fibrinogen (305-385 kDa), welches zwar eine ähnliche Größe wie HDL hat, wurde aufgrund seiner bekanntermaßen länglichen (Everse, Spraggon et al. 1998) und sich damit deutlich von HDL (Bibow, Polyhach et al. 2017)

unterscheidenden tertiären (räumlichen) Struktur ebenfalls effektiv reduziert (*Abbildung 11*). Die kleineren Moleküle IgG (150 kDa) und Albumin (67 kDa) wurden hingegen quasi nur als Beifang von der Membran retiniert und zeigten im Vergleich zu den größeren Substanzen wie erwartet deutlich geringere RR (*Abbildung 16*).

Die S_K und weitere für die Performanceanalyse wichtige Parameter, wie die Korrelationskoeffizienten von S_K und TMP, werden im folgenden *Abschnitt 4.6* nochmals detaillierter analysiert.

4.6 Einfluss der verschiedenen Behandlungseinstellungen auf die Selektivität der Fraktionierungsmembran

Die verglichen mit den späteren Messzeitpunkten initial, d.h. bei 300 ml behandeltem Plasmavolumina geringeren S_K sind für alle untersuchten Stoffe mutmaßlich auf deren Adsorption in der Fraktionationsmembran und die Verdünnung mit der im System befindlichen Kochsalzlösung zurückzuführen, die zur Spülung vor den Versuchen verwendet und nur langsam über die Zeit durch das behandelte Plasma verdrängt wurde. Hinsichtlich der Membrandurchlässigkeit ist zu ergänzen, dass Membranen vor bzw. zu Beginn der Behandlung besonders offen sind, da sie noch nicht mit Proteinen belegt sind (Abdelrasoul, Doan et al. 2018). Daher sprechen die niedrigen S_K in diesem Fall nicht für eine geringere Durchlässigkeit der Membran, sondern müssen entsprechend der Abläufe beim Füllen des Systems mit Plasma unter Berücksichtigung der geringen Plasmaflussraten und des Füllvolumens des Filters betrachtet werden. Die Aussagekraft der Werte des ersten Messzeitpunkts müssen entsprechend interpretiert werden und sind nicht geeignet, um in die Beurteilung der Membranperformance einbezogen zu werden. Folglich stehen die Messwerte ab 600 ml in der folgenden Analyse im Vordergrund. Theoretisch wären die S_K demnach anfangs besonders hoch und würden dann leicht abfallen und ein Plateau erreichen. Obwohl der Verlauf der S_K durch das Zusetzen der Fraktionierungsmembran beeinflusst wird, da es durch eine proteinadsorptionsbedingte Passagebehinderung der Stoffe durch die Poren typischerweise zu einer Absenkung der Filtrationsleistung über die Zeit kommt (Matsuda, Sueoka et al. 1995, Dittrich-Riediger, Schatz et al. 2015), konnte dies in den vorliegenden Versuchen nicht nachvollzogen werden. Die S_K fielen bei fast allen Einstellungen nicht ab (*Abbildungen 2-6*). Der Grund

dürfte in den immer noch ausreichend großen Poren liegen, um die Substanzen passieren zu lassen, und im sog. „Dead-end-Filtrationsmodus“, der den Plasmafluss nur in eine Richtung zulässt und bei vorliegendem „Zwangsfluss“ die Moleküle quasi hindurchdrückt.

Eine Ausnahme ist die Outside-In-Einstellung, bei welcher die S_K für alle Stoffe außer Fibrinogen während der zweiten Behandlungshälfte eindrücklich abfielen (*Abbildungen 2,3,4,5*). Diese Einstellung unterscheidet sich in mehrfacher Hinsicht signifikant von den anderen. Die Gründe für diese Unterschiede sind im Folgenden genannt.

Der Verlauf der S_K für die unterschiedlichen Stoffe unterscheidet sich aufgrund deren räumlicher Struktur (Krieter, Lange et al. 2018) aufgrund deren Größe. In der vorliegenden Studie wurde er zudem durch verschiedene Plasmaflussgeschwindigkeiten, Temperaturen und Flussrichtungen innerhalb der Membran beeinflusst.

Mit zunehmendem Membranfouling über die Zeit werden die Poren der Membran zugesetzt, der Cut-off bzw. die Trennschärfe der Membran sinkt und die Passage der in ihrer Größe unveränderten Moleküle wird behindert. Entsprechend steigt der TMP. Bei der höchsten Flussrate und bei den Molekülen mit dem geringsten S_K ist dieser Effekt am stärksten ausgeprägt, solange die Substanz überhaupt durch die Membran passieren kann. Daher wäre bei PF 42 ein stärker sinkender S_K über den Behandlungsverlauf erwartet worden, dies trifft jedoch nicht zu. Durchweg höhere LDL- S_K inklusive eines signifikant höheren ($p < 0,05$) S_K $0,165 \pm 0,022$ (bei 600ml) zeigten sich während der Behandlung mit einem hohen Plasmafluss von 42 ml/min verglichen mit den Einstellungen mit niedrigerem Plasmafluss (*Abbildung 2*). Die Begründung ist die schon in *Abschnitt 4.5* beschriebene stärkere Konvektion durch den höheren Plasmafluss, wodurch ein zwar immer noch kleiner, im Vergleich mit den niedrigen Plasmaflüssen aber größerer Anteil von LDL-Molekülen durch die Membran hindurchgedrückt wird. Da dies aber auch für HDL gilt, welches in den übrigen Einstellungen stärker retiniert wird als bei PF 42, resultiert dies in einer günstigeren HDL/LDL Ratio. Die LDL- S_K waren bei den Einstellungen PF 30, PF 36 und TF stets niedrig und waren mit den vom Hersteller ebenfalls in humanem Blutplasma *in vitro* gemessenen S_K (ca. 0,075) vergleichbar (3M Deutschland GmbH. (2014) SelectiCure H19).

Für die HDL-S_K (175-360 kDa) ließen sich zwar keine signifikanten Unterschiede für die verschiedenen Behandlungen herausstellen, jedoch sanken auch diese während des Outside-In-Modus im Gegensatz zu den anderen Behandlungen über den Behandlungsverlauf ab. PF 42 wies über die zweite Behandlungshälfte den stärksten Trend zu steigenden S_K-Werten der Einstellungen auf und bestätigte, wie bereits beschrieben, eine hohe Membran-Permeabilität für HDL (*Abbildung 3*).

Die HDL-, Albumin- und IgG-S_K zeigten einen vergleichbaren Kurvenverlauf (*Abbildung 3,4,5*). Die geringste Streuung der S_K wies LDL auf, da es deutlich größer (2.500-3.000 kDa) und über dem Trennschärfenbereich der Membran liegend nicht so stark von einer inhomogenen Porenmorphologie mit wenigen sehr großen Poren betroffen ist (Krieter and Lemke 2011).

Entsprechend dem therapeutischen Ziel das kleinste der untersuchten Moleküle, Albumin (67 kDa), welches essenziell für den kolloidosmotischen Druck im Blut ist (Blunt, Nicholson et al. 1998), sowie das ebenfalls kleine IgG (150 kDa) nur unwesentlich zu retinieren, waren die RR für diese Substanzen gering (*Abb. 9,10,16*). Auch die S_K für beide Moleküle näherten sich dem Wert 1, beide Substanzen konnten die Membran also zum größten Teil frei passieren (*Abb. 4,5*). Nach 900 ml behandeltem Plasma lag der S_K für IgG mit $1,047 \pm 0,070$ bei PF 42 signifikant höherer ($p = 0,049$) als bei PF 30 mit $0,573 \pm 0,321$ (*Abbildung 4*), wobei naturgemäß bei der „Dead-end-Filtration“ als Grund für einen S_K größer als 1 nur eine Messungenauigkeit infrage kommt.

Anders als bei den anderen Stoffen lagen die S_K für Fibrinogen, welches mit Blick auf das Molekulargewicht (305-385 kDa) (Hall and Slayter 1959) mit HDL (Camejo, Munoz et al. 1971) vergleichbar ist, während PF 42 zeitweise niedriger als bei den Einstellungen mit niedrigem PF (*Abbildung 6*). Die Kurve der Fibrinogen S_K während des Outside-In-Modus (*Abbildung 6*) verlief deutlich höher als bei anderen Einstellungen, d.h. die S_K waren konstant höher. Bei 600 ml behandeltem Plasmavolumen zeigte sich sogar ein signifikant höherer ($p < 0,05$) S_K $0,229 \pm 0,03$ als bei den anderen Einstellungen. Ein weiterer signifikant höherer ($p < 0,05$) SK $0,369 \pm 0,12$ (bei 900 ml) wurde im Vergleich zu den Behandlungen mit PF 42 ml/min und PF 30 ml/min gemessen (*Abbildung 6*). Auch der LDL-S_K bei Outside-In lag mit $0,194 \pm 0,068$ (600 ml) signifikant höher ($p < 0,05$) als bei PF30, PF36 und TF.

Die großen Unterschiede der S_K im Outside-In-Modus ergeben sich aus der Membranomorphologie, d.h. es liegen natürlich physikalische Ursachen vor. Bei der FractioPES™ 200-Membran handelt es sich um eine sogenannte asymmetrische Membran, bei der innen eine dichte, relativ dünne Trennschicht („separation layer“) und nach außen nur noch eine schwammartige, sich zunehmend öffnende Stützstruktur vorhanden ist, in der Proteine allenfalls noch zu geringen Teilen adsorbiert werden. Steuert man den Fluss nun von außen nach innen, wirkt die Membran wie ein sogenannter Tiefenfilter, d.h. die Proteine dringen in die Membran ein und setzen sie vor der Trennschicht viel effektiver zu, als das bei einer Flussrichtung von innen nach außen an der Trennschicht passieren kann, da hier primär nur kleinere Proteine eindringen können und dann die Membran passieren (Yuzbasi, Krawczyk et al. 2022). Das Clogging wird also durch die Flussrichtung von außen nach innen deutlich verstärkt. Um die Outside-in-Flussrichtung, die den Vorteil der deutlich größeren Membranoberfläche aufweist, besser nutzen zu können, braucht es eine Membran, bei der sich die Trennschicht außen befindet. Solche Membranen sind für extrakorporale medizinische Anwendungen bisher aber nur experimentell verfügbar (Dukhin, Tabani et al. 2014, Ter Beek, van Gelder et al. 2021).

Um das Phänomen der proteinadsorptionsbedingten Membranbelegung besser veranschaulichen zu können, wurden trotz der geringen Stichprobengröße die Korrelationskoeffizienten von S_K - und TMP-Werten für die verschiedenen Settings berechnet (*Abschnitt 3.6*). Dieses Clogging wie auch eine eventuelle Ablagerung geronnener Proteinkomplexe führt zu einem sinkenden Membranfluss bei konstantem TMP bzw. aufgrund der konstant aufrechterhaltenen Plasmaflüsse zu einem ansteigenden TMP wie im vorliegenden Setting (Abdelrasoul, Doan et al. 2018). Ein Anstieg des TMP während der Behandlung wird durch die integrierten Drucksensoren des Apheresegeräts detektiert. Bei dem in der vorliegenden Studie verwendeten Gerät wurde bei einem Anstieg über 150 mmHg das System mit 0,9 % NaCl- rückgespült, um verstopfte Membranporen wieder zu öffnen und die Behandlung fortsetzen zu können. Insgesamt kam dies zu fünf verschiedenen Zeitpunkten vor (Schaf 1, PF 36 ml/min, 1050 ml; Schaf 2, PF 30 ml/min, 680 ml; Schaf 4, PF 30 ml/min, 1300 ml; Schaf 4, Outside-In, 1040 ml; Schaf 3, Outside-In, 1250 ml). Die geplanten zu behandelnden Zielplasmavolumina

konnten dadurch immer erreicht werden. Relevant für die durchgeführten S_K -Bestimmungen waren diese drei Spülungen: Schaf 1, PF 36 ml/min, 1050 ml; Schaf 2, PF 30 ml/min, 680 ml; Schaf 4, Outside-In, 1040 ml. Diese Spülungen verursachten naturgemäß eine Dilution des Filtrats, und hatten somit auch Einfluss auf die nachfolgend gemessenen S_K , was möglicherweise zu Schwankungen der Einzelmessungen führte und Einfluss auf die statistische Analyse der Ergebnisse nahm.

Während die Spülungen bei PF 30 und 36 die S_K für Fibrinogen und etwas geringer auch für HDL der darauffolgenden Messzeitpunkte leicht erniedrigten, hatte die Spülung bei 1040 ml während der Outside-In-Einstellung den gravierendsten Effekt auf die S_K . Diese lagen zwischen 60 (LDL- S_K) und 80 % (Fibrinogen- S_K) niedriger als der Mittelwert aller vier Versuche zu diesem Zeitpunkt. Dieser stärkere Effekt dürfte neben dem Verdünnungseffekt primär mit dem Membranaufbau zusammenhängen, welcher das proteinadsorptionsbedingte Zusetzen der Membran begünstigt. Wie bereits beschrieben, passieren die Stoffe wegen des von außen nach innen gesteuerten Flusses erst eine schwammartige Stüttschicht und dann die Trennschicht. Die „Schwammschicht“ begünstigt die Proteinadsorption und trotz Spülung wird die zugesetzte Trennschicht nicht regeneriert, was die niedrigen S_K erklärt.

Wie bereits erwähnt machen sich das Clogging, genauso wie eine eventuelle Ablagerung geronnener Proteinkomplexe, durch einen Anstieg des TMP bemerkbar.

Beim Vergleich der Behandlungseinstellungen bestand sowohl bei der Behandlung PF 42 ($r= 0,732$; $p = 0,001$) als auch im Outside-In-Modus ($r= -0,838$; $p < 0,001$) eine sehr gute und signifikante Korrelation der LDL-SK zum TMP, d.h. bei PF 42 stieg der S_K mit dem TMP an, während er bei der Outside-In-Einstellung mit steigendem Druck absank (*Abbildung 19*). Im Outside-In-Modus lag der LDL- S_K mit $0,211 \pm 0,031$ bei 600 ml signifikant höher ($p < 0,05$) als $0,105 \pm 0,075$ bei 1200 ml. Entsprechend fand sich eine negative Korrelation des S_K mit dem TMP. Die Trendlinien der übrigen Einstellungen orientieren sich an der von PF 42. Auch die S_K für HDL ($r= 0,502$; $p = 0,048$) (*Abbildung 20*), IgG ($r= 0,518$; $p = 0,04$), Albumin ($r= 0,594$; $p = 0,015$) und Fibrinogen ($r= 0,702$; $p = 0,002$) korrelierten bei PF 42 signifikant mit dem TMP und waren durch einen ähnlichen Verlauf gekennzeichnet (*Abb. 21, 22, 23 im Anhang*).

Die im Outside-In-Modus zu beobachtende negative S_K /TMP-Korrelation (*Abbildung 19*) ist nachzuvollziehen, da der steigende TMP, wie bereits beschrieben, bei konstantem Fluss das proteinadsorptionsbedingte Zusetzen der Fraktionierungsmembran über den Behandlungsverlauf und den damit einhergehenden Verlust ihrer Selektivität (sinkende S_K) anzeigt. Im Endeffekt war das Membranclogging im Outside-In-Modus am stärksten ausgeprägt, da die FractioPESTM 200-Membran hier wie bereits beschrieben aufgrund der umgekehrten Flussrichtung als Tiefenfilter wirkte. Die anderen Einstellungen zeigten eine positive S_K /TMP-Korrelation. Trotz geringem Zusetzen der Membran, angezeigt durch den TMP-Anstieg blieb die Selektivität der Membran bei leicht erhöhter Permeabilität für alle Stoffe erhalten.

Die TF, eine Behandlungsoptimierung durch Temperaturerhöhung des separierten Plasmas, welche in der Klinik bei der Verwendung anderer Lipoproteinapheresemembranen (aus Ethylenvinalalkohol-Co-Polymer) einen positiven Effekt auf die Effizienz der MDF hat (Suzuki, Yamane et al. 1996) konnte in unserer Studie keine signifikant bessere Reduktion der atherogenen Moleküle erreichen. Da somit kein Mehrwert in der TF besteht, würde ein Weglassen der Plasmatemperaturerhöhung eine Vereinfachung der Behandlung bedeuten, auch wenn ein Heizelement im extrakorporalen Kreislauf ohnehin erforderlich ist, um ein Auskühlen der Patienten durch das extrakorporal geführte Blut zu verhindern.

5. Zusammenfassung

Die Doppelfiltrationsapherese stellt eine Therapieform zur extrakorporalen Entfernung von atherogenen Lipoproteinen bei Patienten mit schweren Lipidstoffwechselstörungen und konsekutiven kardiovaskulären Erkrankungen dar. Das Ziel der vorliegenden Studie bestand darin, optimale Behandlungsbedingungen für eine neuere synthetische Fraktionierungsmembran (FractioPES™ 200; 3M Deutschland GmbH, Neuss) für die Doppelfiltrations-Lipoproteinapherese im Rahmen eines *In-vivo*-Modells am Schaf zu definieren.

In einer prospektiven und randomisierten "Crossover-Studie" an vier Schafen wurde hierzu die Permselectivität der Fraktionierungsmembran unter unterschiedlichen Plasmaflussraten (PF 30, 36 und 42 ml/min), umgekehrter Plasmaflussrichtung (Outside-In-Filtration) und erhöhter Plasmatemperatur untersucht. Nach definierten behandelten Plasmavolumina wurde dafür die *In-vivo*-Performance der Fraktionierungsmembran anhand von Reduktionsrationes und Siebkoeffizienten für die relevanten Moleküle LDL, HDL, Fibrinogen, Albumin und IgG gemessen.

Entsprechend des Therapieziels war die Fraktionierungsmembran für LDL-Cholesterin während aller Behandlungseinstellungen nahezu undurchlässig, was sich an niedrigen S_K und statistisch sich nicht unterscheidenden Reduktionsrationes ($49,0 \pm 8,9$ (Outside-In) bis $60,6 \pm 9,7$ % (PF 36)) zeigte. Lediglich bei 600 ml behandeltem Plasmavolumen wurde unter PF 42 und Outside-In ein signifikant höherer LDL- S_K ($0,165 \pm 0,022$ bzw. $0,194 \pm 0,068$) im Vergleich zu PF 30 und 36 ($p < 0,05$) bestimmt.

Eine gewünschte geringe Membrandurchlässigkeit fand sich ebenfalls für Fibrinogen, wobei signifikant höhere und damit ungünstigere S_K für Outside-In nach 600 ml ($0,229 \pm 0,03$ ($p < 0,05$)) gegenüber allen anderen Behandlungsmethoden und nach 900 ml (S_K $0,369 \pm 0,12$ ($p < 0,05$)) im Vergleich zu PF 30 und PF 42 gemessen wurden.

Bezüglich der unerwünscht entfernten Substanzen waren zwischen den Behandlungsmethoden keine Unterschiede bei HDL-Cholesterin und Albumin nachweisbar. Lediglich für IgG lag nach 900 ml ein höherer S_K ($1,047 \pm 0,070$ ($p = 0,049$)) bei PF 42 im Vergleich zu PF 30 ($0,573 \pm 0,321$) vor.

Grundsätzlich stiegen bei allen Behandlungsarten die S_K für alle Substanzen mit zunehmendem Plasmavolumen teilweise signifikant an. Eine Ausnahme stellte der Outside-In-Modus dar, bei dem es nach 600 ml zu einem Abfall der S_K kam.

Bei PF 42 war die günstigste HDL/LDL-Ratio der Reduktionsrationes nachweisbar, d.h. die höchste Retention atherogenen LDL bei geringster Entfernung des vasoprotektiven HDL.

Die Anwendung verschiedener Behandlungsbedingungen bei Verwendung der FractioPESTM 200-Membran führte nur zu geringen Unterschieden bei der Entfernung der Zielsubstanzen. Als günstigste Einstellung erwies sich die höchste Plasmaflussrate, PF 42 ml/min, in standardmäßiger Flussrichtung, während sich die Outside-In-Filtration nachteilig auswirkte. Der Grund dafür dürfte im asymmetrischen Wandaufbau der Fraktionierungsmembran mit den kleinsten Poren, d.h. der Separationsschicht, innen liegen, der zu Unterschieden beim Verstopfen („Clogging“) der Membranporen führt. Das Schafsmodell erwies sich erneut als zuverlässiges und auf die klinische Doppelfiltrations-Lipoproteinapherese übertragbares *In-vivo*-Experiment.

6. Literaturverzeichnis

7339951_MONET_Prodktbroschuere_neu.pdf, © Copyright 2012 Fresenius Medical Care Deutschland GmbH

3M Deutschland GmbH. (2015) Plascure® Plasmafilter. Website: [https://www.membrana.com/healthcare/healthcare-data/documents/medical-devices/plascure%C2%AE-\(english\)/3m_plascure_rev02.aspx](https://www.membrana.com/healthcare/healthcare-data/documents/medical-devices/plascure%C2%AE-(english)/3m_plascure_rev02.aspx)

3M Deutschland GmbH. (2014) SelectiCure H19. Website: [https://www.membrana.com/healthcare/healthcare-data/documents/medical-devices/selecticure%C2%AE-\(english\)/selecticureh19_rev00.aspx](https://www.membrana.com/healthcare/healthcare-data/documents/medical-devices/selecticure%C2%AE-(english)/selecticureh19_rev00.aspx)

Produkt Broschüre Cascadeflow™ EC, Copyright © 2019 Asahi Kasai Medical Co., Ltd. Printed in Japan No.2019.6-2980

Abdelrasoul, A., H. Doan, A. Lohi and C. H. Cheng (2018). "The effect of contaminated particle sphericity and size on membrane fouling in cross flow ultrafiltration." Environ Technol **39**(2): 203-220.

Agishi, T., I. Kaneko, Y. Hasuo, Y. Hayasaka, T. Sanaka, K. Ota, H. Amemiya, N. Sugino, M. Abe, T. Ono, S. Kawai and T. Yamane (1980). "Double filtration plasmapheresis." Trans Am Soc Artif Intern Organs **26**: 406-411.

Ahn, N. and K. Kim (2016). "High-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) in cardiovascular disease: effect of exercise training." Integr Med Res **5**(3): 212-215.

Bambauer, R., C. Bambauer, B. Lehmann, R. Latza and R. Schiel (2012). "LDL-apheresis: technical and clinical aspects." ScientificWorldJournal **2012**: 314283.

Berrouschot, J., H. Barthel, C. Scheel, J. Koster and D. Schneider (1998). "Extracorporeal membrane differential filtration--a new and safe method to optimize hemorheology in acute ischemic stroke." Acta Neurol Scand **97**(2): 126-130.

Bibow, S., Y. Polyhach, C. Eichmann, C. N. Chi, J. Kowal, S. Albiez, R. A. McLeod, H. Stahlberg, G. Jeschke, P. Guntert and R. Riek (2017). "Solution structure of discoidal high-density lipoprotein particles with a shortened apolipoprotein A-I." Nat Struct Mol Biol **24**(2): 187-193.

Birek, A., J. Duffin, M. F. Glynn and J. D. Cooper (1976). "The effect of sulfinpyrazone on platelet and pulmonary responses to onset of membrane oxygenator perfusion." Trans Am Soc Artif Intern Organs **22**: 94-101.

Blunt, M. C., J. P. Nicholson and G. R. Park (1998). "Serum albumin and colloid osmotic pressure in survivors and nonsurvivors of prolonged critical illness." Anaesthesia **53**(8): 755-761.

Bosch, T., B. Schmidt, M. Blumenstein and H. J. Gurland (1993). "Lipid apheresis by hemoperfusion: in vitro efficacy and ex vivo biocompatibility of a new low-density lipoprotein adsorber compatible with human whole blood." Artif Organs **17**(7): 640-652.

Bosch, T., B. Schmidt, W. Kleophas, V. Otto and W. Samtleben (1997). "LDL hemoperfusion--a new procedure for LDL apheresis: biocompatibility results from a first pilot study in hypercholesterolemic atherosclerosis patients." Artif Organs **21**(10): 1060-1065.

Burns, T. M. (2008). "Guillain-Barre syndrome." Semin Neurol **28**(2): 152-167.

Camejo, G., V. Munoz and E. Avila (1971). "The size and chemical characteristics of six fractions obtained by differential centrifugation from human high density lipoprotein." Acta Cient Venez **22**(2): 45-48.

Cummings, J. R., R. Gelok, J. L. Grace and A. J. Salkind (1973). "Long-term evaluation in large dogs and sheep of a series of new fixed-rate and ventricular synchronous pacemakers." J Thorac Cardiovasc Surg **66**(4): 645-652.

Dittrich-Riediger, J., U. Schatz, B. Hohenstein and U. Julius (2015). "Adverse events of lipoprotein apheresis and immunoadsorption at the Apheresis Center at the University Hospital Dresden." Atheroscler Suppl **18**: 45-52.

Dukhin, S. S., Y. Tabani, R. Lai, O. A. Labib, A. L. Zydney and M. E. Labib (2014). "Outside-In Hemofiltration for Prolonged Operation without Clogging." J Memb Sci **464**: 173-178.

Everse, S. J., G. Spraggon, L. Veerapandian, M. Riley and R. F. Doolittle (1998). "Crystal structure of fragment double-D from human fibrin with two different bound ligands." Biochemistry **37**(24): 8637-8642.

Gajewski, J. and M. L. Povar (1971). "Blood coagulation values of sheep." Am J Vet Res **32**(3): 405-409.

Geiss, H. C., K. G. Parhofer, M. G. Donner and P. Schwandt (1999). "Low density lipoprotein apheresis by membrane differential filtration (cascade filtration)." Ther Apher **3**(3): 199-202.

Gordon, D. J., J. L. Probstfield, R. J. Garrison, J. D. Neaton, W. P. Castelli, J. D. Knoke, D. R. Jacobs, Jr., S. Bangdiwala and H. A. Tyroler (1989). "High-density lipoprotein cholesterol and cardiovascular disease. Four prospective American studies." Circulation **79**(1): 8-15.

Grabowski, E. F., P. Didisheim, J. C. Lewis, J. T. Franta and J. Q. Stropp (1977). "Platelet adhesion to foreign surfaces under controlled conditions of whole blood flow: human vs rabbit, dog, calf, sheep, pig, macaque, and baboon." Trans Am Soc Artif Intern Organs **23**: 141-151.

Hall, C. E. and H. S. Slayter (1959). "The fibrinogen molecule: its size, shape, and mode of polymerization." J Biophys Biochem Cytol **5**(1): 11-16.

Heart Protection Study Collaborative, G. (2002). "MRC/BHF Heart Protection Study of cholesterol lowering with simvastatin in 20,536 high-risk individuals: a randomised placebo-controlled trial." Lancet **360**(9326): 7-22.

Jaeger, B. R., Y. Richter, D. Nagel, F. Heigl, A. Vogt, E. Roeseler, K. Parhofer, W. Ramlow, M. Koch, G. Utermann, C. A. Labarrere, D. Seidel and I. Group of Clinical (2009). "Longitudinal cohort study on the effectiveness of lipid apheresis treatment to reduce high lipoprotein(a) levels and prevent major adverse coronary events." Nat Clin Pract Cardiovasc Med **6**(3): 229-239.

Julius, U., K. G. Parhofer, A. Heibges, S. Kurz, R. Klingel and H. C. Geiss (2007). "Dextran-sulfate-adsorption of atherosclerotic lipoproteins from whole blood or separated plasma for lipid-apheresis--comparison of performance characteristics with DALI and Lipidfiltration." J Clin Apher **22**(4): 215-223.

Kannel, W. B. and P. A. Sytkowski (1987). "Atherosclerosis risk factors." Pharmacol Ther **32**(3): 207-235.

Keller, C. (2009). "LDL-apheresis in homozygous LDL-receptor-defective familial hypercholesterolemia: the Munich experience." Atheroscler Suppl **10**(5): 21-26.

Klingel, R., C. Fassbender, T. Fassbender, B. Erdtracht and J. Berrouschot (2000). "Rheopheresis: rheologic, functional, and structural aspects." Ther Apher **4**(5): 348-357.

Klingel, R., A. Heibges, C. Fassbender and G. ProLiFe-Study (2017). "Prevention of cardiovascular complications in patients with Lp(a)-hyperlipoproteinemia and progressive cardiovascular disease by long-term lipoprotein apheresis according to German national guidelines." Clin Res Cardiol Suppl **12**(Suppl 1): 38-43.

Koga, N., T. Satoh, K. Watanabe, K. Kohchi, Y. Iwata and H. Minami (1991). "LDL-apheresis and improvement in the coronary atherosclerosis of familial hypercholesterolemia--correlation of computerized quantitative coronary angiography with autopsy findings." Biomater Artif Cells Immobilization Biotechnol **19**(1): 37-52.

Kojima, S., M. Ogi, Y. Yoshitomi, M. Kuramochi, J. Ikeda, M. Naganawa and H. Hatakeyama (1997). "Changes in bradykinin and prostaglandins plasma levels during dextran-sulfate low-density-lipoprotein apheresis." Int J Artif Organs **20**(3): 178-183.

Kolobow, T., T. Tomlinson, J. Pierce and L. Gattinoni (1976). "Platelet response to long-term spiral coiled membrane lung bypass without heparin using a carbon silicone rubber membrane." Trans Am Soc Artif Intern Organs **22**: 110-118.

Krieter, D. H., E. Fink, G. Bonner, H. M. You and T. Eisenhauer (1995). "Anaphylactoid reactions during haemodialysis in sheep are associated with bradykinin release." Nephrol Dial Transplant **10**(4): 509-513.

Krieter, D. H., A. Hackl, A. Rodriguez, L. Chenine, H. L. Moragues, H. D. Lemke, C. Wanner and B. Canaud (2010). "Protein-bound uraemic toxin removal in haemodialysis and post-dilution haemodiafiltration." Nephrol Dial Transplant **25**(1): 212-218.

Krieter, D. H., F. Lange, H. D. Lemke, F. Bonn and C. Wanner (2018). "Characterization of Fractionation Membranes in an Animal Model of Double Filtration Lipoprotein Apheresis." Ther Apher Dial **22**(2): 189-195.

Krieter, D. H. and H. D. Lemke (2011). "Polyethersulfone as a high-performance membrane." Contrib Nephrol **173**: 130-136.

Krieter, D. H., J. Steinke, M. Kerkhoff, E. Fink, H. D. Lemke, C. Zingler, G. A. Muller and P. Schuff-Werner (2005). "Contact activation in low-density lipoprotein apheresis systems." Artif Organs **29**(1): 47-52.

Kroon, A. A., W. R. Aengevaeren, T. van der Werf, G. J. Uijen, J. H. Reiber, A. V. Brusckhe and A. F. Stalenhoef (1996). "LDL-Apheresis Atherosclerosis Regression Study (LAARS). Effect of aggressive versus conventional lipid lowering treatment on coronary atherosclerosis." Circulation **93**(10): 1826-1835.

Ledebo, I. and P. J. Blankestijn (2010). "Haemodiafiltration-optimal efficiency and safety." NDT Plus **3**(1): 8-16.

Lund-Katz, S., L. Liu, S. T. Thuahnai and M. C. Phillips (2003). "High density lipoprotein structure." Front Biosci **8**: d1044-1054.

Mackness, M. I. and C. H. Walker (1988). "Multiple forms of sheep serum A-esterase activity associated with the high-density lipoprotein." Biochem J **250**(2): 539-545.

Mahmood, S. S., D. Levy, R. S. Vasan and T. J. Wang (2014). "The Framingham Heart Study and the epidemiology of cardiovascular disease: a historical perspective." Lancet **383**(9921): 999-1008.

Matsuda, Y., A. Sueoka and Y. Nose (1995). "An effective LDL removal filter for the treatment of hyperlipidemia." Artif Organs **19**(2): 129-134.

Nakaji, S. and T. Yamamoto (2002). "Membranes for therapeutic apheresis." Ther Apher **6**(4): 267-270.

Nichols, M., N. Townsend, P. Scarborough and M. Rayner (2013). "Cardiovascular disease in Europe: epidemiological update." Eur Heart J **34**(39): 3028-3034.

Peters, J. L., H. Fukumasu, J. C. McRea, M. Nakagaki, F. Iwaya, D. Owen, J. Kolff and W. J. Kolff (1978). "Prolonged, transapical left ventricular bypass (TALVB) in sheep and man." Trans Am Soc Artif Intern Organs **24**: 113-121.

Reinhart, W. H., O. Lutolf, U. R. Nydegger, F. Mahler and P. W. Straub (1992). "Plasmapheresis for hyperviscosity syndrome in macroglobulinemia Waldenstrom and multiple myeloma: influence on blood rheology and the microcirculation." J Lab Clin Med **119**(1): 69-76.

Schmer, G., L. N. Teng, J. J. Cole, J. E. Vizzo, M. M. Francisco and B. H. Scribner (1976). "Successful use of a totally heparin grafted hemodialysis system in sheep." Trans Am Soc Artif Intern Organs **22**: 654-663.

Schneditz, D., C. Putz-Bankuti, W. Ribitsch and G. Schilcher (2012). "Correction of plasma concentrations for effects of hemoconcentration or hemodilution." ASAIO J **58**(2): 160-162.

Sprecher, D. L., J. M. Hoeg, E. J. Schaefer, L. A. Zech, R. E. Gregg, E. Lakatos and H. B. Brewer, Jr. (1985). "The association of LDL receptor activity, LDL cholesterol level, and clinical course in homozygous familial hypercholesterolemia." Metabolism **34**(3): 294-299.

Sprenger, K. B., K. Huber, W. Kratz and E. Henze (1987). "Nomograms for the prediction of patient's plasma volume in plasma exchange therapy from height, weight, and hematocrit." J Clin Apher **3**(3): 185-190.

Stefanutti, C., G. C. Isacchi, R. Antonini, A. Bucci, A. Cardillo, G. D. Di Nucci, M. Gozzer, F. Malagnino, M. Masci, B. Mazzarella and et al. (1988). "Selective continuous removal of low density lipoproteins by dextran sulfate cellulose column adsorption apheresis in the therapy of familial hypercholesterolemia." Beitr Infusionsther **23**: 172-182.

Stefanutti, C., C. Morozzi, G. Perrone, S. Di Giacomo, A. Vivenzio and G. D'Alessandri (2012). "The lipid- and lipoprotein- [LDL-Lp(a)] apheresis techniques. Updating." G Chir **33**(11-12): 444-449.

Stoffel, W., H. Borberg and V. Greve (1981). "Application of specific extracorporeal removal of low density lipoprotein in familial hypercholesterolaemia." Lancet **2**(8254): 1005-1007.

Stoffel, W. and T. Demant (1981). "Selective removal of apolipoprotein B-containing serum lipoproteins from blood plasma." Proc Natl Acad Sci U S A **78**(1): 611-615.

Suzuki, M., S. Yamane, T. Matsugane, T. Nobuto, N. Azuma, T. Nishide, M. Shinomiya, K. Saito, N. Sasaki and Y. Nose (1996). "Evaluation of double filtration plasmapheresis, thermofiltration, and low-density lipoprotein adsorptive methods by crossover test in the treatment of familial hypercholesterolemia patients." Artif Organs **20**(4): 296-302.

Ter Beek, O. E. M., M. K. van Gelder, C. Lokhorst, D. H. M. Hazenbrink, B. H. Lentferink, K. G. F. Gerritsen and D. Stamatialis (2021). "In vitro study of dual layer mixed matrix hollow fiber membranes for outside-in filtration of human blood plasma." Acta Biomater **123**: 244-253.

Thompson, G. R., M. Barbir, D. Davies, P. Dobral, M. Gesinde, M. Livingston, P. Mandry, A. D. Marais, S. Matthews, C. Neuwirth, A. Pottle, C. le Roux, D. Scullard, C. Tyler and S. Watkins (2010). "Efficacy criteria and cholesterol targets for LDL apheresis." Atherosclerosis **208**(2): 317-321.

Thompson, G. R. and H.-U. L. A. W. Group (2008). "Recommendations for the use of LDL apheresis." Atherosclerosis **198**(2): 247-255.

Yuzbasi, N. S., P. A. Krawczyk, K. W. Domagala, A. Englert, M. Burkhardt, M. Stuer and T. Graule (2022). "Removal of MS2 and fr Bacteriophages Using MgAl₂O₄-Modified, Al₂O₃-Stabilized Porous Ceramic Granules for Drinking Water Treatment." Membranes (Basel) **12**(5).

7. Anhang

7.1 Materialienliste

Die folgende *Tabelle (5)* listet alle in der Studiendurchführung verwendeten Materialien mit ihrem Hersteller und gegebenenfalls Serien- und Lotnummern auf.

Tabelle 5: Auführung aller verwendeten Materialien

Material	Hersteller	Seriennummer	Lotnummer
HF 440 Infomed	Infomed SA, Genf, Schweiz	0443-012	-
HF 440 Fluid- Heater	E. Biegler GesmbH, Mauerbach, Deutschland	11089	-
HARVARD APPARATUS 22 Syringe Pump	HARVARD APPARATUS, Holliston Massachusetts, USA	A-43318	-
Blutdruckmessgerät DINAMAP® PRO SERIES 100 V2	GE Medical Systems- Information Technologies GmbH, USA	033M3329026	-
Mikrozentrifuge (Z233M-2)	Hermle Labortechnik GmbH, Wehingen, Deutschland	51060115	-
Mikrozentrifuge (Z300 K)	Hermle Labortechnik GmbH, Wehingen, Deutschland	55070031	-

Cobas b123	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland	1054	-
Cobas b123 Fluid-Pack COOX	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland	1048249	21456333
Cobas c111	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland	1190	-
IgG ELISA KIT	Alpha Diagnostic Intl. Inc., San Antonio, Texas, USA	7620	151216K6
Plasmafilter Plascure® 06	3M Deutschland GmbH, Neuss, Deutschland	PF1055	313618165
Kaskadenfilter 3M™ SelectiCure® H19	3M Deutschland GmbH, Neuss, Deutschland	FR1055	317816152
Highflow-Doppellumen-Dialysekatheter (11 French)	VMP Achim Schulz-Lauterbach, Iserlohn, Deutschland	DLS 11/20	775539
Schlauchsystem	Infomed SA, Genf, Schweiz	TU-306-11	34972818
Blutmonovetten	Sarstedt AG, Nürnbergrecht, Deutschland	-	-
Eppendorf Gefäße, Micro-Tubes 1ml	Sarstedt AG, Nürnbergrecht, Deutschland	-	-

Einmalkanülen Terumo® Neolus®	Terumo Europe NV, Leuven, Belgien	NN-2138R	1303017
Natriumcitrat (1M)	VWR International, Radnor, USA	27833.237	18F184123
Calciumchlorid (0,42M)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	Ca3306	SLBT3561V
Scandicain® 2 %	AstraZeneca, London, UK	22L14-7092707	-
Spüllösung: 2000ml NaCl 0,9%	Serumwerk Bernburg Vertriebs GmbH Bernburg, Deutschland	04-02-1356/04-1	03017
Heparin-Natrium 25000 I.E./5mL	Rotexmedica, Trittau, Deutschland	50068	-
Hämatokrit- Versiegelungskitt	BRAND GMBH + CO KG, Wertheim Deutschland	749510	1804943
Micro-Hämatokrit- Kapillaren	BRAND GMBH + CO KG, Wertheim Deutschland	749321	1811448

7.2 Abbildungen

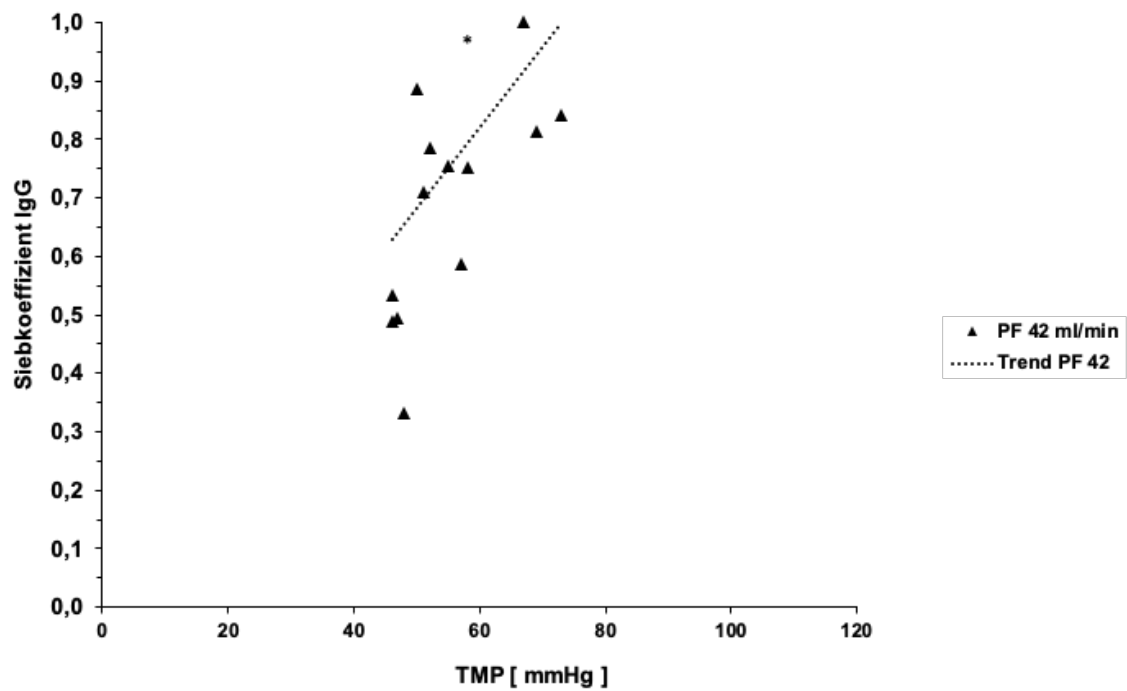


Abbildung 21: Signifikante Korrelation von IgG S_K und Fraktionator TMP bei PF 42.

Signifikanzniveau: * $p < 0,05$ (IgG S_K vs. TMP bei PF 42)

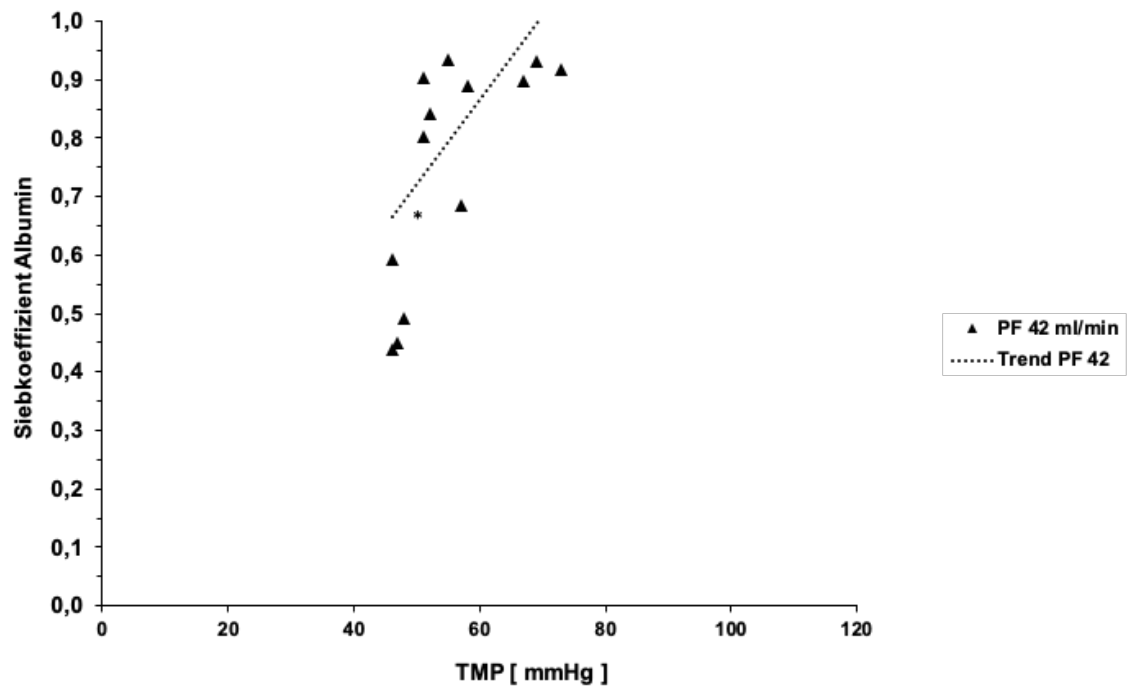


Abbildung 22: Signifikante Korrelation von Albumin S_K und Fraktionator TMP bei PF 42 ml/min

Signifikanzniveau: * $p < 0,05$ (Albumin S_K vs. TMP bei PF 42)

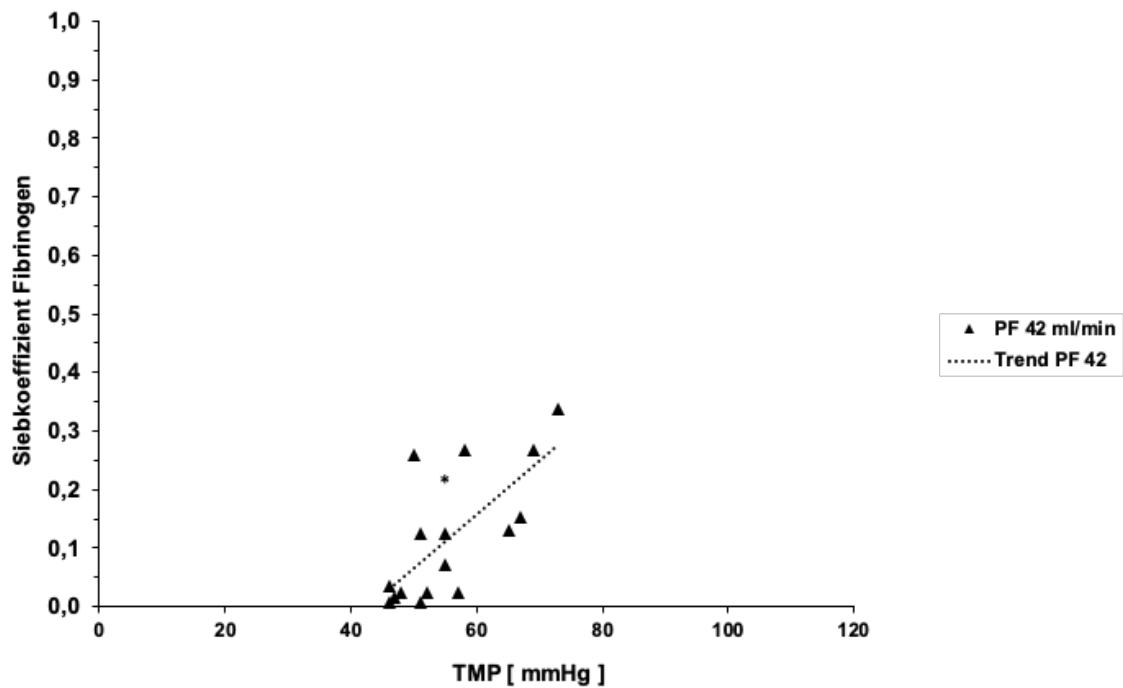


Abbildung 23: Signifikante Korrelation von Fibrinogen S_K und Fraktionator TMP bei PF 42 ml/min
 Signifikanzniveau: * $p < 0,05$ (Fibrinogen S_K vs. TMP bei PF 42)

Tabelle 6: p -Werte und Korrelationskoeffizienten Fibrinogen

		SK Fibrinogen			
		PF 30	PF 36	TF	Outside-In
Fraktionator	p	0,742	0,756	0,724	0,288
	TMP	$r=$	0,090	0,084	0,096
Plasmafilter	p	0,398	0,191	0,682	0,404
	TMP	$r=$	0,227	-0,345	0,111

Tabelle 7: p -Werte und Korrelationskoeffizienten Albumin

		SK Albumin			
		PF 30	PF 36	TF	Outside-In
Fraktionator	p	0,582	0,773	0,525	0,774
	TMP	$r=$	-0,149	0,078	0,172
Plasmafilter	p	0,100	0,671	0,618	0,871
	TMP	$r=$	0,425	0,115	0,135

Tabelle 8: *p*-Werte und Korrelationskoeffizienten IgG

		SK IgG			
		PF 30	PF 36	TF	Outside-In
Fraktionator TMP	<i>p</i>	0,182	0,894	0,799	0,936
	<i>r</i> =	-0,351	-0,036	-0,069	-0,022
Plasmafilter TMP	<i>p</i>	0,562	0,950	0,974	0,983
	<i>r</i> =	0,157	0,017	-0,009	-0,006

Tabelle 9: *p*-Werte und Korrelationskoeffizienten HDL

		SK HDL			
		PF 30	PF 36	TF	Outside-In
Fraktionator TMP	<i>p</i>	0,217	0,503	0,717	0,207
	<i>r</i> =	-0,326	-0,181	-0,098	-0,333
Plasmafilter TMP	<i>p</i>	0,072	0,225	0,689	0,255
	<i>r</i> =	0,462	0,321	-0,109	-0,302

Tabelle 10: *p*-Werte und Korrelationskoeffizienten LDL

		SK LDL		
		PF 30	PF 36	TF
Fraktionator TMP	<i>p</i>	0,241	0,442	0,834
	<i>r</i> =	-0,311	-0,207	-0,057
Plasmafilter TMP	<i>p</i>	0,027	0,144	0,461
	<i>r</i> =	0,550	-0,382	-0,198

7.3 Abkürzungen

ACE	Angiotensin Converting Enzym
Ca	Kalzium
DALI	direkte Adsorption von Lipiden
DFPP	Doppelfiltrationsplasmapherese
DSA	Dextransulfatadsorption
HDL	high-density-Lipoprotein
HELP	heparininduzierte extrakorporale LDL- Präzipitation
IgG	Immunglobulin G
LDL	low-density-Lipoprotein
MDF	Membran-Differential-Filtration
NaCl	Natrium Chlorid
PES	Polyethersulfon
PF	Plasmaflussrate
PVP	Polyvinylpyrrolidon
RR	Reduktionsratio
$r=$	Korrelationskoeffizient
SD	Standardabweichung
S_K	Siebkoefizient
TF	Thermofiltration
TMP	transmembranöser Druck

Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei den Menschen, welche mich seit Beginn dieser Arbeit vor 4 Jahren großartig unterstützt haben, bedanken.

In erster Linie richtet sich mein Dank an Herrn Prof. Dr. med. Detlef Krieter, für seine stetige und außerordentliche Zuverlässigkeit. Ich bin sehr glücklich, dass er sich der Rolle als mein Mentor hinsichtlich des wissenschaftlichen Arbeitens und Schreibens angenommen hat und in mir großes Interesse und Begeisterung für diese Studie und darüber hinaus erweckt hat.

Des Weiteren möchte ich Frau Leandra Esser für den kreativen Beistand, meiner Schwester Maren Kiefer und meinen Eltern Frau Heike Kiefer und Herrn PD Dr. med. Peter Kiefer für Ihre stetige Unterstützung danken.