

**Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I
der Universität Würzburg**

Direktor: Prof. Dr. med. S. Frantz

**Entwicklung eines Großtiermodells zur Charakterisierung
der Permeabilität von Fraktionierungsmembranen für die
Lipoproteinapherese**



Inaugural – Dissertation

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

vorgelegt von

**Florian Lange
Heinestr. 11b, 97070 Würzburg
E-Mail: Lange_L@ukw.de
Matrikelnummer: 1688831**

Würzburg, Mai 2018

f

Referent: PD Dr. med D. Krieter

Koreferent: Prof. Dr. med. M. Böck

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 12.11.2018

Der Promovend ist Arzt

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	Übersicht	1
1.2	Ziele der Studie	6
2	MATERIAL UND METHODEN	8
2.1	Kurzbeschreibung der Studie	8
2.2	Charakterisierung der Versuchstiere	9
2.3	Gerät für die Doppelfiltrationsplasmapherese	9
2.4	Plasmafilter	10
2.5	Plasmafraktionator Evaflex™ 5A20	11
2.6	Plasmafraktionator FractioPES® 200	12
2.7	Versuchsdurchführung	14
2.8	Antikoagulation	15
2.9	Blutprobenentnahmen	15
2.10	Messungen	16
2.11	Berechnung der Reduktionsrationes	18
2.12	Berechnung der Siebkoeffizienten	19
2.13	Berechnung des transmembranösen Drucks	20
2.14	Statistische Auswertung	20
3	ERGEBNISSE	21
3.1	Klinische Beobachtungen und technische Aspekte	21
3.2	Plasmakonzentrationen und Siebkoeffizienten der untersuchten Stoffe	21
3.2.1	LDL- Cholesterin	22
3.2.2	HDL-Cholesterin	25
3.2.3	Fibrinogen	27

3.2.4	Albumin	29
3.2.5	Immunglobulin G (IgG)	31
3.3	Reduktionsrationes	33
3.4	Transmembranöser Druck der Fraktionatoren	34
3.5	Siebkoeffizienten vs. transmembranöser Druck (TMP)	35
4	DISKUSSION	37
4.1	Historische Einordnung der unterschiedlichen Lipoproteinaphereseverfahren	37
4.2	Notwendigkeit geeigneter In-vivo-Modelle	39
4.3	Das Schaf als Modellorganismus	40
4.4	Ziele und Design der Studie	41
4.5	Therapeutische Effizienz, Reduktionsrationes und Siebkoeffizienten	42
4.6	Zusammenfassung	50
5	LITERATURVERZEICHNIS	52
6	ANHANG	59
6.1	Auflistung aller verwendeten Materialien	59
6.2	Performance der Plasmafraktionatoren	61
6.3	S_K (IgG, Albumin und Fibrinogen) vs. TMP	63
6.4	Abkürzungsverzeichnis	65

1 Einleitung

1.1 Übersicht

In Europa und den USA stellen kardiovaskuläre Erkrankungen die häufigste Todesursache dar (Gillespie, 2013; Nichols, 2013). Mit Beginn der Framingham-Studie wurde 1948 erstmals systematisch der Einfluss verschiedener Risikofaktoren auf Herz-Kreislauf-Erkrankungen wie die koronare Herzkrankheit (KHK) untersucht. Es zeigten sich als unabhängige Risikofaktoren für die Inzidenz und Progredienz dieser Erkrankungen, neben erhöhten Blutdruckwerten und pathologischem Blutzuckerstoffwechsel vor allem auch erhöhte Blutfettwerte, insbesondere das LDL-Cholesterin (European Atherosclerosis Society, 1987). Hohe HDL-Cholesterin-Spiegel scheinen hingegen bezogen auf das Risiko für Herz-Kreislauf-Erkrankungen protektiv zu wirken (Castelli, 1986; Gordon, 1989).

In den folgenden Jahrzehnten gelang es unter anderem durch Senkung des LDL-Cholesterins mittels HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren und diätetischem Umdenken, die Mortalität kardiovaskulärer Erkrankungen zu senken (Heart Protection Study Collaborative Group, 2002).

Für einige schwere therapierefraktäre Lipidstoffwechselerkrankungen wie beispielsweise die familiäre Hypercholesterinämie (FH) sind dies jedoch nur unzureichende Strategien. Bei dieser Erkrankung kommt es durch ein Abschwächen der LDL-Rezeptorfunktion - welcher notwendig ist, um LDL-Cholesterin aus dem Blut in Körperzellen aufzunehmen – zu abnorm hohen LDL-Cholesterin-Plasmaspiegeln und konsekutiv zu einem deutlich erhöhten Risiko, bereits in den ersten Lebensdekaden an schweren Formen von Herz-Kreislauf-Erkrankungen wie Arteriosklerose oder koronarer Herzkrankheit zu erkranken (Schaefer, 1994).

Durch die Einführung extrakorporaler Blutreinigungsverfahren etablierte sich eine weitere Möglichkeit, schwere Formen der Hypercholesterinämie zu behandeln, wenn Standardtherapieoptionen versagen oder aufgrund von medikamentösen Unverträglichkeiten nicht durchführbar sind.

Als simpelstes Prinzip wurde anfangs durch Plasma-Austauschverfahren das Plasma des Patienten durch Spenderplasma ersetzt. So effizient der Plasma-Austausch ist, bietet er jedoch zwei große Nachteile: Einerseits besteht das Risiko der Infektiosität aufgrund der Notwendigkeit von Spenderplasma zum Ersatz des entfernten Plasmas (Stoffel, 1981), andererseits kann es aufgrund der unspezifischen Entfernung von Patientenplasma und konsekutiv fehlender Plasmaproteine zu Nebenwirkungen kommen (Burns, 2008).

Stoffel und Borberg beschrieben 1981 erstmalig erfolgreiche Versuche mittels extrakorporaler Immunadsorption, die Plasmaspiegel von LDL-Cholesterin bei Patienten mit familiärer Hypercholesterinämie deutlich zu senken (Borberg, 2009; Stoffel, 1981). In der Folge konnte gezeigt werden, dass mit Lipoproteinaphereseverfahren eine Senkung des Plasma-LDL-Cholesterins von mehr als 60 % erreicht werden kann (Matsuda, 1996; Matsuda, 1995; Suzuki, 1996) und dies zu einem relevanten positiven Einfluss auf die Progression von u.a. koronarer Atherosklerose (Aengevaeren, 1996; Koga, 1991; Mabuchi, 1998) und Makuladegeneration (Pulido, 2002) führt. Ein ideales Blutreinigungsverfahren sollte neben einer möglichst selektiven Entfernung pathogener Substanzen ohne zu großen Verlust physiologischer Substanzen nebenwirkungsarm sein und unter klinischen Standardbedingungen große Mengen eines Pathogens entfernen können.

Lipoproteinapherese ist ein Sammelbegriff für unterschiedliche extrakorporale Blutreinigungsverfahren mit dem Ziel, vor allem LDL-Cholesterin und Lipoprotein(a) zu entfernen (Thompson, 2008). Es haben

sich verschiedene Varianten etabliert: Zu den wichtigsten gehören die Heparin-induzierte extrakorporale LDL-Präzipitation (HELP), die Dextran-Sulfat-Cellulose-Adsorption (DSA), die Immunadsorption und die Doppelfiltrationsplasmapherese (DFPP). Diese nutzen verschiedene physikalische und chemische Mechanismen und unterscheiden sich neben ihrem Funktionsprinzip vor allem in ihrer Spezifität und rheologischen Effektivität (Thompson, 2008).

Bei der Heparin-induzierten extrakorporalen LDL-Präzipitation wird das Patientenplasma extrakorporal mittels Natriumacetatpuffer gesäuert. Anschließend wird diesem Gemisch Heparin versetzt. Heparin präzipitiert bei saurem pH mit LDL-Cholesterin, Lipoprotein(a) und Fibrinogen. Die gebildeten Komplexe werden anschließend heraus gefiltert, überschüssiges Heparin wird adsorbiert und ein physiologischer pH mittels Dialyse wieder eingestellt (Stefanutti, 2012).

Bei der Dextran-Sulfat-Cellulose-Adsorption (DSA) nutzt man positiv geladene Domänen der Plasmaproteine, um diese selektiv zu adsorbieren. Dextran-Sulfat besitzt eine negativ geladene Oberfläche und bindet so positiv geladene Anteile von Plasmaproteinen wie die Apo-B-100-Domäne des LDL-Cholesterins und des Lipoprotein(a). Die Selektivität wird erreicht, da nicht alle Plasmaproteine diese positive Domäne besitzen und damit nicht gebunden werden, wie beispielsweise das HDL-Cholesterin (Stefanutti, 1988).

Ebenfalls Apo-B-spezifisch ist die Immunadsorption, bei der polyklonale Apoprotein-B-Antikörper an einer Matrix immobilisiert werden und diese dann selektiv Proteine mit Apo-B-Domäne aus dem zuvor separierten Plasma adsorbieren (Banyai, 1998).

Ein weiteres Verfahren ist die direkte Adsorption von Lipoproteinen (DALI) als Hämoperfusion, bei welchem negativ geladene Polyacrylatliganden

direkt im Blut die positiven Apo-B-100-Domänen von LDL-Cholesterin und Lipoprotein(a) binden.

Bei der in dieser Studie verwendeten Doppelfiltrationsplasmapherese - eingeführt durch Agishi (Agishi, 1980) – wird wie bei fast allen anderen Lipoproteinapherese-Verfahren zunächst das zu reinigende Blut durch Filtration in Plasma und zelluläre Blutbestandteile getrennt (Thompson, 2008). Während die zellulären Bestandteile dem Patienten direkt wieder zugeleitet werden, durchläuft das Plasma einen zweiten Filter, den sogenannten Plasmafraktionator. Dieser trennt Plasmabestandteile mit hohem Molekulargewicht größenabhängig von solchen mit niedrigem Molekulargewicht. Die niedermolekulare Fraktion, zu der beispielsweise auch Albumin gehört (67 kDa), wird zusammen mit den zellulären Bestandteilen dem Patienten reinfundiert. Die hochmolekulare Fraktion wird retiniert und schließlich verworfen. Aus diesem Prinzip ergibt sich, dass die Doppelfiltration therapeutisch sinnvoll für Krankheiten genutzt werden kann, deren ursächliches Pathogen ein hohes Molekulargewicht hat. Beispiele sind die Makroglobulinämie mit einem IgM-Molekulargewicht von 900 kDa und die Hyperlipoproteinämie mit einem LDL-Gewicht von > 2500 kDa. Zusätzlich wird durch die Entfernung hochmolekularer Substanzen die Blutviskosität gesenkt (Dintenfass, 1977; Sepowitz, 1981) und somit unabhängig von der Grunderkrankung die Blutrheologie und konsekutiv die Mikrozirkulation verbessert (Berrouscht, 1998; Brunner, 1995). Dieser Aspekt wird beispielsweise bei der Therapie der altersbedingten Makuladegeneration genutzt (Swartz, 1999). Ein weiterer wichtiger Effekt ist die Entfernung prothrombotischen Fibrinogens (Klingel, 2000).

Die Größe der filtrierten Plasmabestandteile wird vor allem durch die Porengröße der Fraktionatormembran bestimmt, so dass kleine Plasmaproteine die Membran passieren können, während große Plasmaproteine zurückgehalten werden

Alle beschriebenen Lipoproteinapherese-Verfahren erreichen innerhalb von maximal sechs Stunden eine LDL-Cholesterin-Reduktion um mehr als 60 % (Thompson, 2010), entsprechend des in Deutschland anzuwendenden § 9 Absatz 2 der "Richtlinie des Gemeinsamen Bundesausschusses zu Untersuchungs- und Behandlungsmethoden der vertragsärztlichen Versorgung" (Stand: 30. November 2017). Eine Übersicht über die durch die verschiedenen Verfahren erreichte Spezifität gibt Tabelle 1.

Tabelle 1: Übersicht über die Spezifität unterschiedlicher extrakorporaler Hämotherapieoptionen (nach Schuff-Werner, freundlicherweise zur Verwendung freigegeben)

	Plasma- pherese	DFPP	HELP	DALI	Immunadsorption
Alpha-2- Makroglobulin	+	+	-	-	-
Fibrinogen	+	+	+	-	Je nach Zielmolekül selektiv für Fibrinogen LDL- Cholesterin oder IgM
LDL- Cholesterol	+	+	+	+	
IgM	+	+	-	-	

„+“ entspricht einer Reduktion um mehr als 60 %; HELP: Heparin-induzierte extrakorporale LDL-Präzipitation; DFPP: Doppelfiltrationsplasmapherese, DALI: direkte Adsorption von Lipoproteinen

Im Vergleich mit den anderen beschriebenen Lipoproteinaphereseverfahren ist die Doppelfiltrationsplasmapherese ein eher unselektives Verfahren. Dennoch und insbesondere deshalb hat sie sich zu einer der wichtigsten Therapiesäulen auf dem Gebiet der Lipidapherese etabliert. Die DFPP ist vergleichsweise einfach durchzuführen, kostengünstig und hocheffizient (Berroushot, 1998).

Neben der für die Lipoproteinapherese relevanten Entfernung des LDL-Cholesterins scheint auch die oben erwähnte Senkung der Plasmaviskosität durch die Entfernung der hochmolekularen Fraktion ein wichtiger therapeutischer Zusatzeffekt zu sein (Berrouschot, 1998), der die DFPP für viele Anwender zum bevorzugten Lipoproteinaphereseverfahren macht.

Wie beschrieben sind hohe LDL-Cholesterin-Spiegel mit einem erhöhten kardiovaskulären Risiko verbunden. Hohe HDL-Cholesterin-Spiegel scheinen hingegen protektiv zu wirken, da sie das Risiko für Herz-Kreislaufkrankungen senken (Castelli, 1986; Gordon, 1989).

Für die Lipoproteinapherese ist daher eine möglichst effiziente Entfernung von LDL-Cholesterin bei gleichzeitig möglichst geringem Verlust von HDL-Cholesterin wünschenswert. Trotz hoher Effizienz der bereits etablierten Plasmafraktionator-Membranen erscheint daher eine Weiterentwicklung hinsichtlich der Spezifität der entfernten Plasmaproteine sinnvoll.

1.2 Ziele der Studie

Zur Optimierung der Eigenschaften neu entwickelter Plasmafraktionatormembranen sind vergleichende In-vivo-Versuche notwendig.

Der Vergleich verschiedener therapeutischer DFPP am Menschen ist aufgrund oftmals stark variierender klinischer Bedingungen schwierig. Einerseits können nicht immer gleiche und konstante Blutfluss-, sowie Plasmaflussraten aufrechterhalten werden. Andererseits verhindert ein Zusetzen der Fraktionatormembran durch hochmolekulare Substanzen häufig das Erreichen vorher definierter, zu behandelnder Plasmavolumina und damit das Therapieziel bezüglich der Behandlungseffektivität (Dittrich-Riediger, 2015; Matsuda, 1995). Diese Probleme erschweren nicht nur die inter-individuelle, sondern auch die intra-individuelle Vergleichbarkeit. Eine mögliche Lösung dieses Problems wäre ein geeignetes Tiermodell. Ein

derartiges Modell sollte in der vorliegenden Studie am Beispiel einer neuartigen, in drei Iterationsvarianten hinsichtlich ihrer Trenneigenschaften zu charakterisierenden Polyethersulfon/Polyvinylpyrrolidon-Plasmafraktioniermembran (FractioPES[®], kurz FPES) etabliert werden.

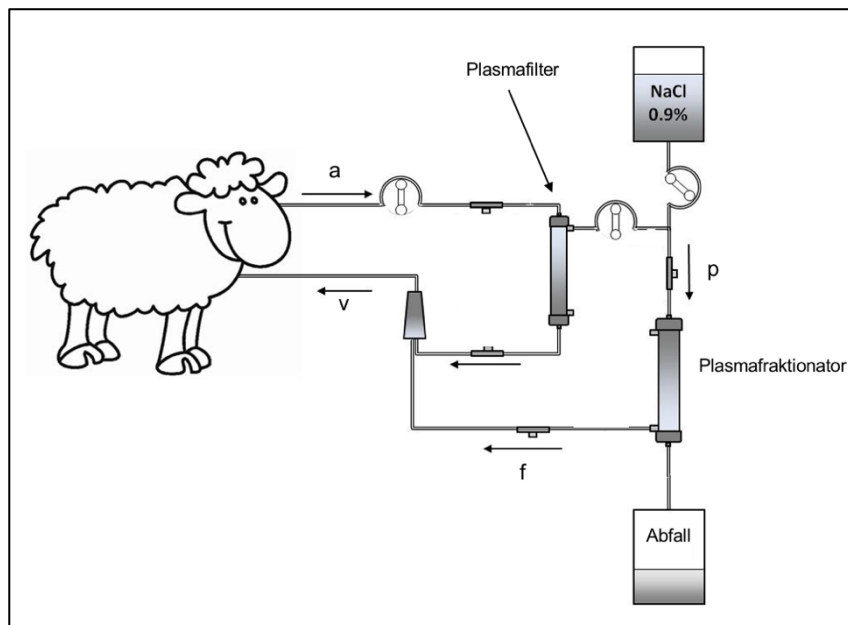
2 Material und Methoden

2.1 Kurzbeschreibung der Studie

Zur Etablierung eines Großtiermodells für die DFPP wurde in einer prospektiven, kontrollierten und randomisierten Crossover-Studie an vier Schafen die Performance von Plasmafraktionatoren mit drei verschiedenen Varianten der Fraktioniermembran FPES® sowie eines Referenzfraktionators (Evaflux™) getestet. Dazu wurde jedes Schaf mit jedem Filter einmalig, aber maximal einmal wöchentlich einer DFPP unter kontrollierten Bedingungen unterzogen.

Während der Behandlung wurde zu definierten Zeitpunkten die In-vivo-Performance anhand von Siebkoeffizienten und Reduktionsraten für LDL-Cholesterin, HDL-Cholesterin, Albumin, Fibrinogen und IgG bestimmt. *Abbildung 1* gibt einen schematischen Überblick über den Versuchsaufbau.

Abbildung 1: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus modifiziert nach Eric Devine (freundlicherweise zur Verfügung gestellt)



a: arterielles (=afferentes) Blut, p: Plasma, f: fraktioniertes Plasma
und v: venöses (=efferentes) Blut;

2.2 Charakterisierung der Versuchstiere

In der Studie wurden vier weibliche Schafe der Rasse Merinofleischschaf eingeschlossen. Jeweils zwei der Tiere wurden für den Studienzeitraum zeitgleich zusammen im Stall der Versuchseinrichtung untergebracht. Alle Schafe waren zum Zeitpunkt der Versuche maximal 12 Monate alt, galten somit als Lämmer (Hecker, 1983) und wurden nicht speziell für Untersuchungen gezüchtet. Für die Durchführung der Versuche nach dem Tierschutzgesetz lag eine Genehmigung der Regierung von Unterfranken vor (Aktenzeichen: 55.2-DMS-2532-2-100).

2.3 Gerät für die Doppelfiltrationsplasmapherese

Sämtliche Behandlungen wurden mit dem multifunktionellen Filtrationsgerät HF440 von Infomed (Infomed SA, Genf, Schweiz) durchgeführt, das unter anderem eine Doppelfiltrationsplasmapherese erlaubt.

Zur kontinuierlichen Überprüfung des laufenden Systems dienen eine Reihe von in das Filtrationsgerät integrierten Drucküberwachungen. Diese erfassen beispielsweise Druckanstiege durch abgeknickte Schläuche oder Thrombosierung aufgrund unzureichender Antikoagulation. So wurden auch die transmembranösen Drücke (engl. transmembrane pressure = TMP) in Plasma und Fraktionierungsfilter gemessen.

Darüber hinaus detektiert das Gerät mittels eines Sensors vor dem Übergang des Blutes in den system-efferenten Schenkel, und damit zum Schaf, Luftblasen und Thrombenbildung und kann dadurch über eine nachgeschaltete automatische venöse Sicherheitsabsperrklemme unter anderem eine Luftinsufflation verhindern. Durch ein Heizsystem wird das behandelte Plasma vor Rückführung auf physiologische Temperaturen erwärmt.

Das Gerät ist ausgelegt, bei einem vordefinierten TMP von 150 mmHg an der Fraktionierungsmembran eine retrograde Spülung mit Kochsalz-Lösung zur Regeneration der Membran im Sinne einer Entfernung von die Membran blockierenden Substanzen durchzuführen.

2.4 Plasmafilter

Seit 1978 besteht die Möglichkeit einer Separation von Plasma und Blutzellen nicht mehr nur durch Zentrifugation, sondern auch durch Membranfiltration (Glöckner, 1978).

In dieser Studie wurde bei jeder Versuchsbehandlung als Einwegartikel der PlasCure[®]-Plasmafilter (3M[™] – Membrana, Wuppertal, Deutschland) verwendet, in dem die MicroPES[®] TF10 Kapillarmembran verbaut ist. Diese besteht, wie auch FPES, aus hydrophobem Polyethersulfon (PES) und hydrophilem Poly-Vinyl-Pyrrolidon (PVP). Mit einer Oberfläche von 0,6 m² und einem Innendurchmesser der Hohl-faser von 300 µm wird ein Blutfluss

von 50-220 ml/min und ein Plasmafluss von bis zu 30 % des Blutflusses empfohlen. Der Wandaufbau der Membran ist aufgrund des Spinnprozesses asymmetrisch. Weitere Details sind der *Tabelle 2* zu entnehmen.

Tabelle 2: Eigenschaften des Plasmaseparators PlasCure; (3M Deutschland GmbH, 2014)

Membraneigenschaft	PlasCure
Kapillarmaterial der Membran	PES / PVP
Innendurchmesser der Membran	300 µm
Kapillarwandstärke der Membran	100 µm
Maximale Porengröße der Membran	0,5 µm
Oberfläche	0,6 m ²
Empfohlener Blutfluss	50-220 ml/min
Empfohlener max. Plasmafluss	30 % des Blutflusses
Sterilisationsmethode	γ-Bestrahlung
Gehäusematerial	Polycarbonat
Einbettungsmaterial	Polyurethan
Maximaler TMP	100 mmHg

PES: Polyethersulfon; PVP: Poly-Vinyl-Pyrrolidon; TMP: Transmembranöser Druck

2.5 Plasmafraktionator Evaflux™ 5A20

Als Referenzplasmafraktionator diente der Evaflux™ 5A20 von Kawasumi. Dieser Fraktionator besteht aus einem Ethylen-Vinyl-Alkohol-Copolymer mit einem Innendurchmesser von 175 µm und einer Kapillarwandstärke von 40 µm. Er ist einer der meistverwendeten Filter zur fraktionierten Entfernung der Lipoproteine LDL-Cholesterin und Lp(a) im klinischen Alltag und in zahlreichen Studien (Coker, 2009; Kardaş, 2012; Mednikov, 2016; Yeh, 2000).

2.6 Plasmafraktionator FractioPES® 200

Der FPES ist ein speziell für die Doppelfiltrationslipidapherese konzipierter Kaskadenfilter mit einem Innendurchmesser von 200 µm und einer Kapillarwandstärke von 40 µm. Wie auch beim Evaflux™ dient als Gehäusematerial Polycarbonat und zur Kapillareinbettung Polyurethan. *Abbildung 2* und *Abbildung 3* zeigen elektronenmikroskopische Aufnahmen in 800- und 8000-facher Vergrößerung des FPES. Eine Übersicht der technischen Spezifikationen beider Plasmafraktionatoren wird in *Tabelle 3* dargestellt.

Abbildung 2: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Querschnitts von FractioPES® 200, Vergrößerung: 800x (zur Verfügung gestellt von Membrana GmbH, Wuppertal)

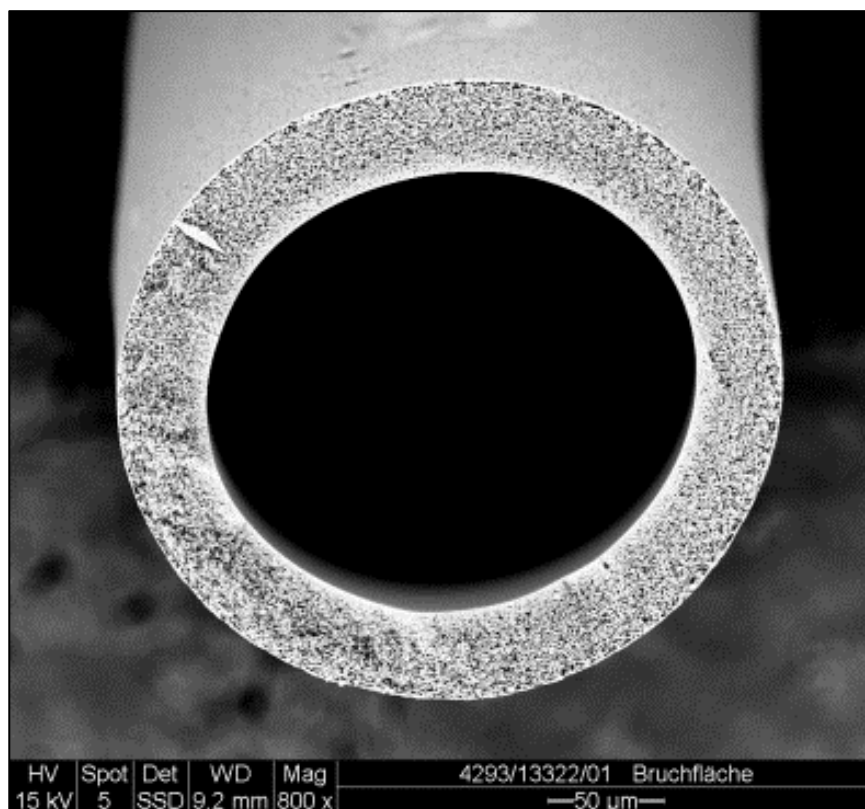
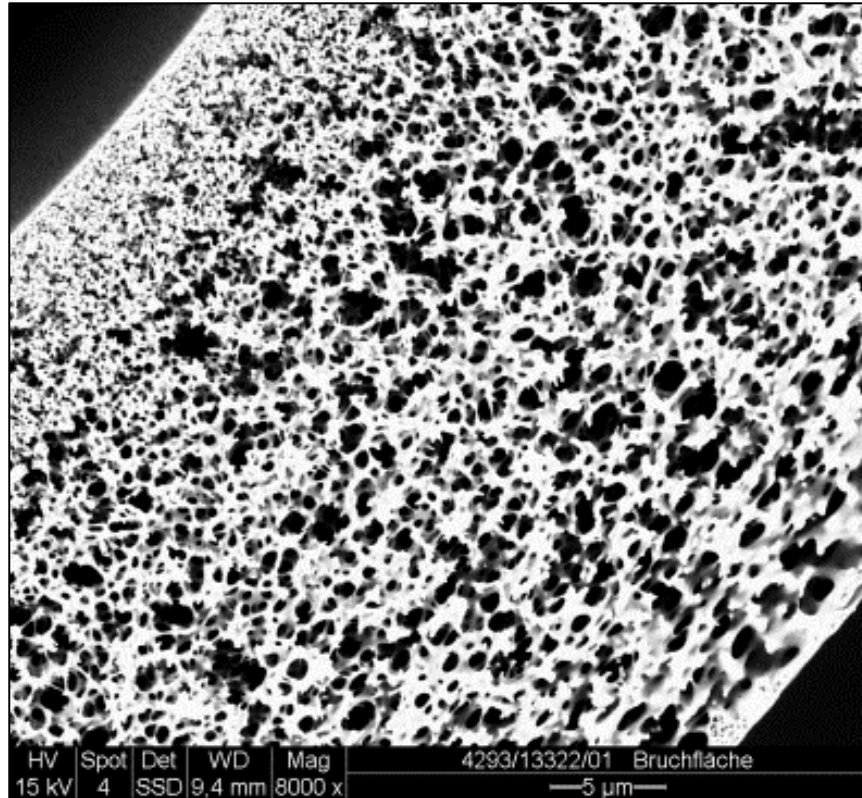


Abbildung 3: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Querschnitts von FractioPES® 200, Vergrößerung: 8000x (zur Verfügung gestellt von Membrana GmbH, Wuppertal)



Drei Varianten dieses neuartigen Plasmafraktionators FPES (3M™ Deutschland GmbH, Wuppertal, Deutschland) wurden untersucht. Diese drei FPES-Varianten (FPESa, FPESb, FPESc) unterschieden sich lediglich bezüglich ihrer in vitro gemessenen Siebkoeffizienten (S_K) für HDL-Cholesterin. FPESa wies einen In-vitro- S_K von 0,300 auf, FPESb einen S_K von 0,261 und FPESc einen S_K von 0,218.

Tabelle 3: Technische Daten der Plasmafraktionatoren im Vergleich
(bereitgestellt durch 3M Deutschland GmbH, 2015; Kawasumi Laboratories, 2017)

	Evaflex™ 5A20	FPESa	FPESb	FPESc
Kapillarmaterial der Membran	Ethylen-Vinyl-Alkohol-Copolymer	Polyethersulfon und Polyvinylpyrrolidon		
Innendurchmesser der Membran	175 µm	200 µm		
Kapillarwandstärke der Membran	40 µm	40 µm		
In vitro HDL-S _K	Nicht verfügbar	0,300	0,261	0,128
Oberfläche	2,0 m ²	1,9 m ²		
Sterilisationsmethode	γ-Bestrahlung	γ-Bestrahlung		
Gehäusematerial	Polycarbonat	Polycarbonat		
Einbettungsmaterial	Polyurethan	Polyurethan		

2.7 Versuchsdurchführung

Das extrakorporale System wurde nach Zusammenbau und vor Konnektion mit den Versuchstieren zur Entlüftung und Entfernung von Rückständen aus dem Schlauchsystem (Schlauchsystem: Blood purification devices DFPP Kit, Infomed SA, Les Acacias, Schweiz) und den Filtern mit vier Litern physiologischer Kochsalzlösung (Perfuflac, B.Braun, Melsungen, Deutschland) gespült. Den Schafen wurde unter Lokalanästhesie mit Scandicain 2 % (AstraZeneca, London, UK) ein Doppellumen-Dialysekatheter (Polyurethan, 11 French, Achim Schulz-Lauterbach, Iserlohn, Deutschland) in eine der Venae jugulares gelegt. Anschließend wurden beide Schenkel zeitgleich an den extrakorporalen Kreislauf

angeschlossen. Um eine Aktivierung der Gerinnung aufgrund des Fremdmaterialkontakts während der Doppelfiltrationsplasmapherese zu verhindern, war eine Antikoagulation notwendig. Details hierzu werden im *Abschnitt 2.8* beschrieben. Der Blutfluss wurde auf 120 ml/min eingestellt und die Plasmafiltrationsfraktion auf 25 % festgesetzt. Das vordefinierte Plasmazielvolumen betrug 1,5 l. Das filtrierte Plasma wurde dem Schaf anschließend über den efferenten (venösen) Schenkel des Doppellumenkathethers reinfundiert.

2.8 Antikoagulation

Zur zuverlässigen Vermeidung einer Aktivierung des Blutgerinnungssystems muss eine extrakorporale Therapie, bei welcher Blut in Kontakt mit Fremdmaterial kommt, unter effizienter Antikoagulation stattfinden. In der vorliegenden Studie wurde eine Kombination aus einer initialen Bolus-Heparin-Gabe (Heparin Rotexmedica 10.000 I.U., Rotexmedica, Trittau, Deutschland) und einer regionalen Citrat-Antikoagulation (Na-Citrat, 1 M, 73,525 g / 250 ml, VWR International, Radnor, Pennsylvania, USA) verwendet. Letztere wurde über die ionisierte Calcium-Plasmakonzentration mit einem Zielwert von 0,3 mmol/l im efferenten Schenkel des extrakorporalen Kreislaufs gesteuert.

Dem system-efferenten Schenkel wurde unmittelbar vor dem Anschluss an den venösen Katheterschenkel kontinuierlich CaCl_2 (0,833 M, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) zugeleitet, um das durch die Citrat-Antikoagulation chelatierte Serum-Calcium zu normalisieren. Die Dosis der CaCl_2 -Infusion wurde angepasst an die Ergebnisse der periodischen ionisierten Ca^{2+} -Messungen.

2.9 Blutprobenentnahmen

Die Blutentnahmen vor der Behandlung wurden direkt aus dem

systemafferenten Schenkel des zentralvenösen Katheters vor Konnektion mit dem Schlauchsystem entnommen. Während der Behandlung wurden Blutentnahmen jeweils per Punktion aus Gummimuffen des systemafferenten Schlauchs (a) und des systemeffferenten Schlauchs (v) sowie Plasmaentnahmen nach dem Plasmafilter (p) und nach dem Plasmafraktionator (f) vorgenommen. Die Entnahmen wurden zeitgleich zu vorher definierten, behandelten Plasmavolumina durchgeführt. Eine Übersicht der Probenabnahmen findet sich in Tabelle 4.

Tabelle 4: Übersicht über die Probenabnahmen

Behandeltes Plasmavolumen (l)	0	0,3	0,6	0,9	1,2	1,5
Probenabnahme	a	a,v,f,p	a,v,f,p	a,v,f,p	a,v,f,p	a

a: arteriell, v: venös, p: Plasma (=hinter dem Plasmafilter) f: filtriertes Plasma (=hinter dem Fraktionator)

Für die Probengewinnung wurde das Blutmonovetten-System der Firma Sarstedt (Sarstedt AG, Nürnberg, Deutschland) verwendet. Die Blutproben wurden ca. 15 min nach Entnahme bei 4000 U/min für 10 Minuten zentrifugiert (Mikrozentrifuge: Z233M-2 High-Capacity-MicroCentrifuge Hermle Labortechnik GmbH, Wehingen, Deutschland). Das Plasma wurde in Eppendorf-Reagiergefäße (Micro-Tubes, 1 ml, Firma Sarstedt AG, Nürnberg, Deutschland) pipettiert und bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C eingefroren.

2.10 Messungen

Zur vollautomatischen Messung von ionisiertem Ca^{2+} , K^+ , Na^+ und Cl^- wurde ein Cobas b123-Gerät (Roche Diagnostics AG, Rotkreuz, Schweiz) verwendet. Die Bestimmung von LDL-Cholesterin und HDL-Cholesterin

erfolgte photometrisch durch ein Cobas c111 (Roche Diagnostics AG, Rotkreuz, Schweiz). Die Hämatokrit-Bestimmung erfolgte nach Zentrifugation (Mikrozentrifuge: Z233M-2 High Capacity MicroCentrifuge Hermle Labortechnik GmbH, Wehingen, Deutschland). Die IgG-Bestimmung erfolgte mittels ELISA (Schaf IgG ELISA Kit, Alpha Diagnostic Intl. Inc., San Antonio, Texas, USA).

Albumin, Triglyceride, Fibrinogen und Cholesterin wurden photometrisch, aPTT und Quick-Wert mittels Kugelkoagulometer bestimmt. Eine Übersicht über die verwendeten Geräte und Methoden bietet *Tabelle 5*. Die Serien- und Lotnummern der verwendeten Geräte zeigt *Tabelle 6*.

Tabelle 5: Zusammenstellung der zur Messung verwendeten Geräte und Methoden

Parameter	Gerät / Methode
Ca ²⁺ , K ⁺ , Na ⁺ , Cl ⁻	Cobas 123
Hämatokrit	Mikroliterzentrifuge Z233M2
LDL, HDL	Cobas c111
IgG	ELISA Kit – sheep IgG
aPTT, Quick	Kugelkoagulometer
Triglyceride, Fibrinogen, Albumin, Cholesterin	photometrisch

Tabelle 6: Serien- und gegebenenfalls Lotnummern der verwendeten Geräte

Gerät / Methode	Hersteller	Seriennummer	Lotnummer
Cobas b123	Roche	1054	keine Lotnummer
cobas b123 Fluid Pack COOX	Roche	1048249	21456333
Mikroliterzentrifuge Z233M2	Hermle	51060115	keine Lotnummer
Cobas c111	Roche	1190	keine Lotnummer

2.11 Berechnung der Reduktionsrationes

Zur Beschreibung der Membranperformance wurden neben der Bestimmung der Siebkoeffizienten (*Absatz 2.12*) auch die Reduktionsrationes (RR) der o.g. Proteine berechnet. Diese ergeben sich aus dem Quotienten der prä- und posttherapeutischen Plasmakonzentration. Für die Berechnung der Reduktionsrationes wurde *Formel 1* verwendet (Basile, 1990; Krieter, 2010), wobei C_{post} die Post-Interventions-Konzentration und C_{pre} Prä-Interventions-Konzentration bezeichnet.

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

Da sich durch die Filtration Veränderungen des extrazellulären Flüssigkeitsvolumens ergeben können, wurden die Werte für C_{post} nach *Formel 2* und *Formel 3* anhand der Hämatokritveränderung volumenkoriert (Schneditz, 2012). H_{pre} bezeichnet den Prä-

Interventionshämatokrit, H_{post} den Post-Interventionshämatokrit und h_p die Hämokonzentration. *Formel 3* ergibt mit C_{post_corr} die korrigierte Postinterventions-Konzentration.

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

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

2.12 Berechnung der Siebkoeffizienten

Der Siebkoeffizient beschreibt die Durchlässigkeit einer Membran für eine gemessene Substanz. Da dieser je nach Membran- und Stoffeigenschaften variiert, hat jeder Stoff bezogen auf eine bestimmte Membran einen individuellen Siebkoeffizienten. Er setzt sich nach *Formel 4* (Henderson, 1996) aus dem Quotienten der Konzentration im Filtrat (C_f) sowie der Konzentration im afferenten Blut bzw. im vorliegenden Fall Plasma (C_a) zusammen.

$$S_K = \frac{C_f}{C_a} \quad (\text{Formel 4})$$

Der Siebkoeffizient liegt dabei zwischen 0 (Filtrationsmembran für einen Stoff undurchlässig) und 1 (Filtrationsmembran für einen Stoff komplett durchlässig).

2.13 Berechnung des transmembranösen Drucks

Der transmembranöse Druck beschreibt den über der Filtrationsmembran liegenden Druck. Er ergibt sich nach *Formel 5* (Henderson, 1996) aus dem arteriellen Druck (P_{art}), dem venösen Druck (P_{ven}) und dem Filtratdruck ($P_{filtrat}$). Die Messung sowohl des Plasmafilterdrucks als auch des Fraktionatordrucks erfolgte "online" via integrierter Druckabnehmer durch das Apheresegerät.

$$TMP = \frac{P_{art} + P_{ven}}{2} - P_{filtrat} \quad (\text{Formel 5})$$

2.14 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wurde mithilfe der „Minitab 15 Statistical Software“ (Minitab, Inc., State College, PA, USA) durchgeführt. Zur deskriptiven Datenanalyse wurden die Mittelwerte mit ihren Standardabweichungen berechnet. Intraindividuelle Unterschiede zwischen den Behandlungen und intraindividuelle Unterschiede innerhalb der Behandlung bezogen auf den Ausgangswert wurden bei Vorliegen von Normalverteilung mittels Varianzanalyse (ANOVA) und Post-hoc-Test nach Tukey ermittelt. Bei nicht-normalverteilten Daten wurde der Kruskal-Wallis-Test verwendet. Ein p -Wert $< 0,05$ wurde als signifikant unterschiedlich angenommen.

3 Ergebnisse

3.1 Klinische Beobachtungen und technische Aspekte

Bei keinem der Experimente kam es während der Messungen zu einer makroskopisch sichtbaren oder indirekt, beispielsweise über Druckanstieg, erkennbaren Thrombosierung der extrakorporalen Systeme einschließlich der Filter.

Auch traten keinerlei relevante technische Probleme auf. Sämtliche Geräteeinstellungen konnten wie geplant während der gesamten Behandlungszeit unverändert beibehalten werden. Es wurden im Mittel $7,13 \pm 0,27$ l Blut behandelt. Das behandelte Zielplasmavolumen wurde bei jedem Versuch erreicht und betrug demnach 1500 ± 0 ml. Die Blutflussgeschwindigkeit wurde konstant bei 120 ml/min gehalten. Die eingestellte Filtrationsfraktion betrug 25 %, woraus ein durchgehender Plasmafluss von 30 ± 0 ml/min resultierte. Eine Spülung des Fraktionators zur Regeneration der Membran wurde bei insgesamt drei Behandlungen an zwei Schafen bei jeweils zwischen 1200 ml und 1500 ml prozessiertem Plasmavolumen durchgeführt.

Das Gewicht der Versuchstiere betrug $39 \pm 1,6$ kg. Alle Tiere wurden nach Beendigung der Versuche in die Herde des Züchters zurückgeführt, ohne Schaden genommen zu haben.

3.2 Plasmakonzentrationen und Siebkoeffizienten der untersuchten Stoffe

Durch die Behandlungen konnte die Konzentration aller gemessenen Stoffe erwartungsgemäß deutlich gesenkt werden. Für LDL-Cholesterin waren alle untersuchten Fraktionatormembranen quasi undurchlässig (S_K zwischen

0,03 ± 0,04 FPESa bei 300 ml und 0,16 ± 0,05 Eval bei 1200 ml), es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede (*Abbildung 4, Abbildung 5*).

Für HDL-Cholesterin wurden signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) der Siebkoeffizienten zwischen FPESc und Eval bei 300, 600 und 1200 ml behandelten Plasmavolumens und zwischen FPESc und FPESa bei 600 ml gefunden (jeweils FPESc mit niedrigeren S_K).

Bezüglich Fibrinogen waren die Siebkoeffizienten von FPESb gegenüber Eval signifikant niedriger bei 600, 900 und 1200 ml ($p < 0,01$) und gegenüber FPESa bei 900 ml ($p < 0,01$). Für FPESc konnten bei 600, 900 und 1200 ml signifikant niedrigere S_K ($p < 0,01$) als bei Eval gezeigt werden (*Abbildung 9*).

Für Albumin konnte bei 1200 ml behandelten Plasmavolumens ein signifikanter Unterschied ($p = 0,048$) der Durchlässigkeit zwischen FPESa ($S_K = 0,99 \pm 0,18$) und FPESc ($S_K 0,75 \pm 0,12$) gezeigt werden (*Abbildung 10, Abbildung 11*).

Die Unterschiede zwischen den einzelnen Fraktioniermembranen bezüglich der Reduktion von Immunglobulin G (IgG) waren nicht signifikant (*Abbildung 12 und Abbildung 13*).

3.2.1 LDL- Cholesterin

Das mit ca. 3.000 kDa größte der untersuchten Moleküle war LDL-Cholesterin. *Abbildung 4* zeigt den Verlauf des arteriellen LDL-Cholesterins. Die prätherapeutischen LDL-Spiegel reichten von 9,2 mg/dl (FPESb) bis 19,1 mg/dl (Eval), die posttherapeutischen 3,9 mg/dl (FPESb) bis 6,7 mg/dl (Eval).

Es kam bei allen Fraktionatoren zu einer kontinuierlichen, signifikanten Abnahme des LDL-Cholesterins. FPESa zeigte eine Reduktion des LDL von $15,85 \pm 7,26$ auf $5,50 \pm 2,1$ mg/dl, FPESb eine Reduktion von $9,27 \pm 2,34$ auf $3,96 \pm 1,38$ mg/dl, FPESc eine Reduktion von $15,07 \pm 7,40$ auf $5,15 \pm 2,44$ mg/dl und Eval eine Reduktion von $19,19 \pm 10,98$ auf $6,79 \pm 3,42$ mg/dl.

Abbildung 5 zeigt die Siebkoeffizienten (S_K) für LDL-Cholesterin. Alle verwendeten Fraktionatormembranen waren für LDL-Cholesterin quasi undurchlässig, ausgedrückt durch die sehr niedrigen Siebkoeffizienten. Diese reichten von $0,03 \pm 0,04$ (FPESa bei 300 ml) bis $0,16 \pm 0,05$ (Eval bei 1200 ml). Es wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Fraktionatormembranen gefunden.

Abbildung 4: Verlauf der LDL-Cholesterinkonzentration arteriell

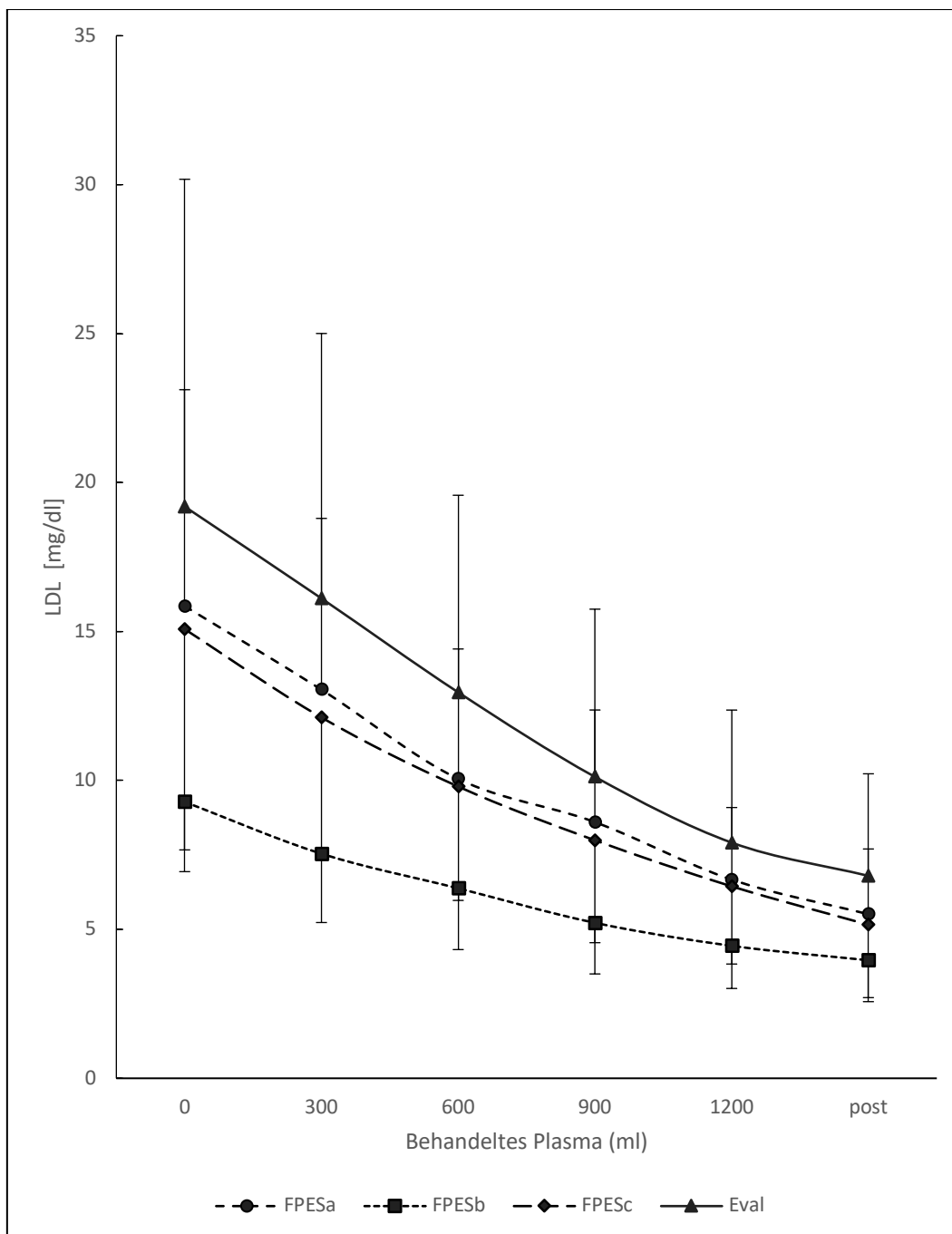
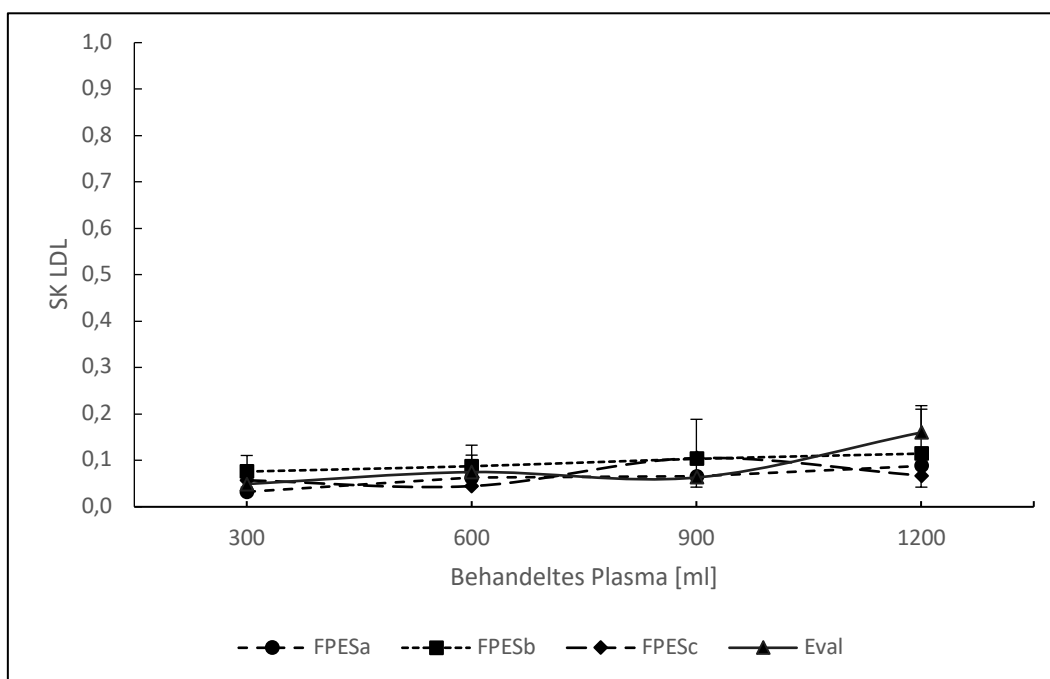


Abbildung 5: Verlauf der Siebkoeffizienten für LDL-Cholesterin ohne signifikante Unterschiede zwischen der Fraktionatoren



3.2.2 HDL-Cholesterin

Auch für HDL-Cholesterin (175-360 kDa) zeigten alle Fraktionatoren eine signifikante Reduktion der arteriellen Plasmaspiegel (*Abbildung 6*). Die prätherapeutischen HDL-Spiegel reichten von 26,5 mg/dl (FPESb) bis 35,1 mg/dl (FPESa), die posttherapeutischen Spiegel von 15,3 mg/dl (FPESb) bis 19,4 mg/dl (FPESa).

Die Reduktion der arteriellen HDL-Cholesterin-Spiegel reichte bei FPESa von $35,08 \pm 11,6$ auf $19,42 \pm 6,30$ mg/dl, bei FPESb von $26,48 \pm 5,5$ auf $15,27 \pm 4,00$ mg/dl, bei FPESc von $33,2 \pm 9,03$ auf $17,78 \pm 4,41$ mg/dl und bei EvaflexTM von $29,19 \pm 6,01$ auf $17,39 \pm 4,90$ mg/dl.

Abbildung 7 zeigt den Verlauf der Siebkoeffizienten für HDL-Cholesterin. Es zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen FPESc und Eval bei 300,

600 und 1200 ml behandelten Plasmavolumens (FPESc: 300 ml: $0,30 \pm 0,003$; 600 ml: $0,46 \pm 0,045$; 1200 ml: $0,40 \pm 0,11$ vs. Eval: 300 ml: $0,42 \pm 0,03$; 600 ml: $0,62 \pm 0,05$; 1200 ml: $0,74 \pm 0,08$) mit $p < 0,05$ und zwischen FPESc und FPESa bei 600 ml ($0,46 \pm 0,05$ vs. $0,59 \pm 0,04$) mit $p < 0,01$.

Abbildung 6: Verlauf der HDL-Konzentration arteriell

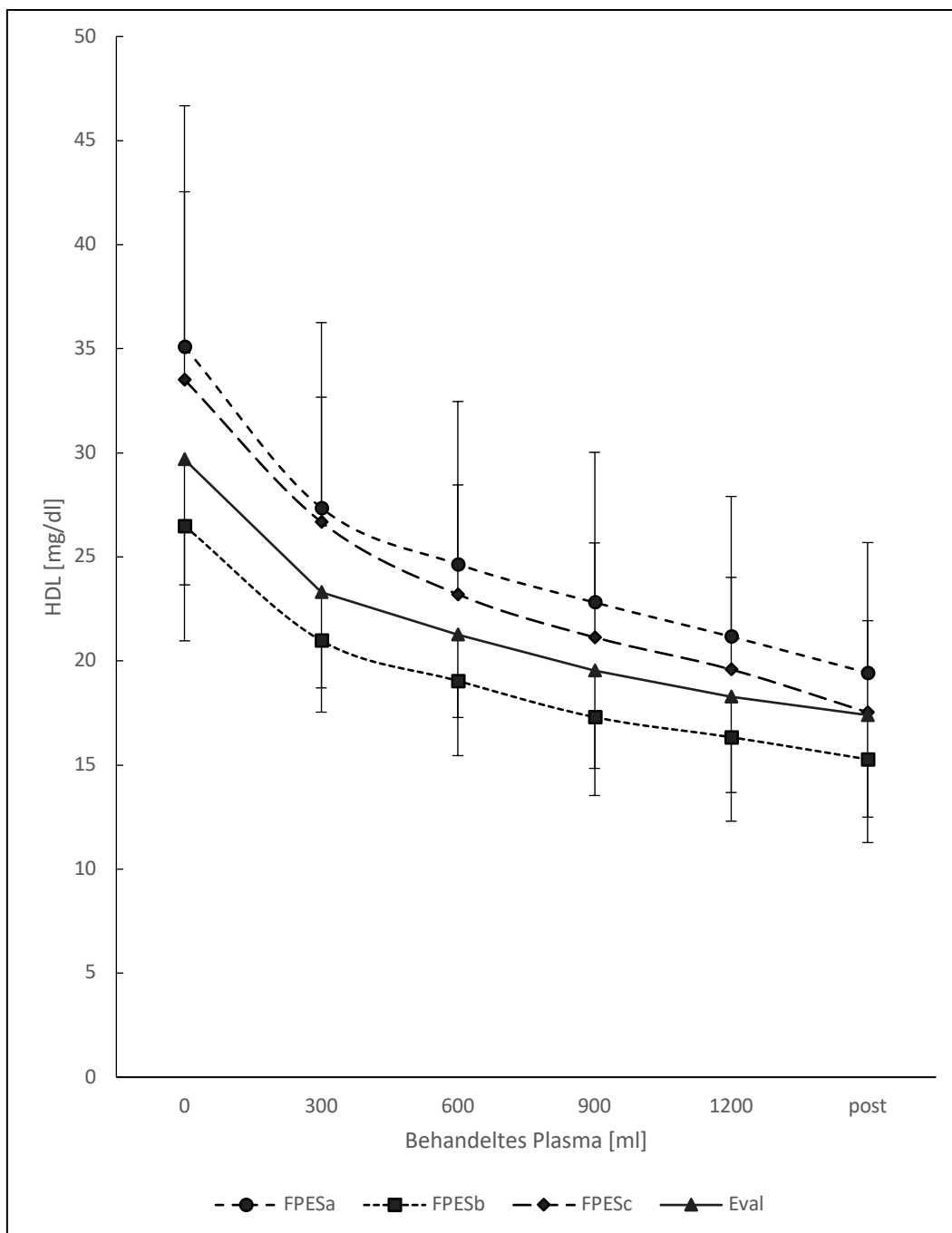
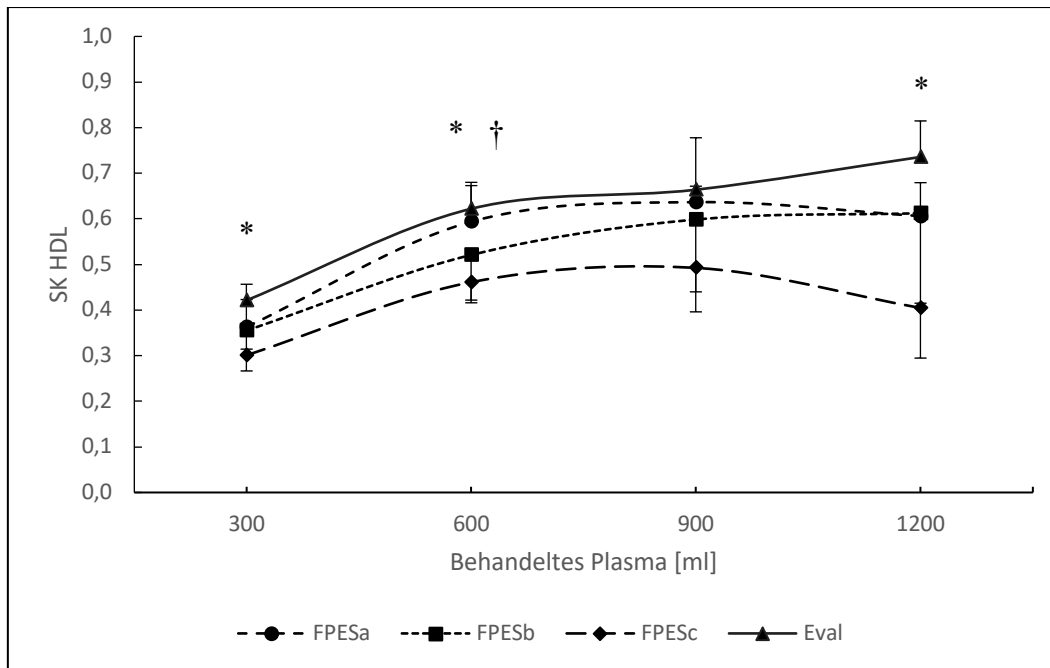


Abbildung 7: Verlauf der Siebkoeffizienten für HDL-Cholesterin



Signifikanzniveau: * = $p < 0,05$ (FPESc vs. Eval), † = $p < 0,01$ (FPESc vs. FPESa)

3.2.3 Fibrinogen

Mit 305–385 kDa ist Fibrinogen nach den Lipoproteinen einer der größeren untersuchten Stoffe. Auch für den in *Abbildung 8* dargestellten Verlauf der Fibrinogen-Plasmaspiegel zeigten alle untersuchten Fraktionatoren eine signifikante Reduktion. FPESa erreichte eine Reduktion von $76,63 \pm 18,21$ auf $32,82 \pm 8,97$ mg/dl, FPESb von $61,87 \pm 6,68$ auf $25,45 \pm 3,48$ mg/dl, FPESc von $79,71 \pm 14,30$ auf $34,34 \pm 5,99$ mg/dl und Eval von $92,96 \pm 35,85$ auf $39,91 \pm 15,23$ mg/dl.

Abbildung 9 zeigt den Verlauf der Siebkoeffizienten für Fibrinogen. Für FPESc konnten signifikant niedrigere Siebkoeffizienten (S_K) bei 600, 900 und 1200 ml gegenüber Eval gezeigt werden (FPESc: 600ml: $0,07 \pm 0,06$; 900ml: $0,18 \pm 0,1$; 1200ml: $0,21 \pm 0,16$ vs. Eval: 600ml: $0,21 \pm 0,03$; 900ml: $0,32 \pm 0,06$; 1200 ml: $0,39 \pm 0,08$) mit $p < 0,01$.

FPESb zeigte signifikant niedrigere S_K bei 600, 900 und 1200 ml gegenüber

Eval (FPESb: 600ml: $0,05 \pm 0,02$; 900ml: $0,08 \pm 0,07$; 1200ml: $0,15 \pm 0,10$ vs. Eval: 600ml: $0,21 \pm 0,03$; 900ml: $0,32 \pm 0,06$; 1200ml: $0,39 \pm 0,08$) und bei 900 ml gegenüber FPESa ($0,09 \pm 0,08$ vs. $0,26 \pm 0,12$) jeweils mit $p < 0,01$.

Abbildung 8: Verlauf der Fibrinogen-Konzentration arteriell

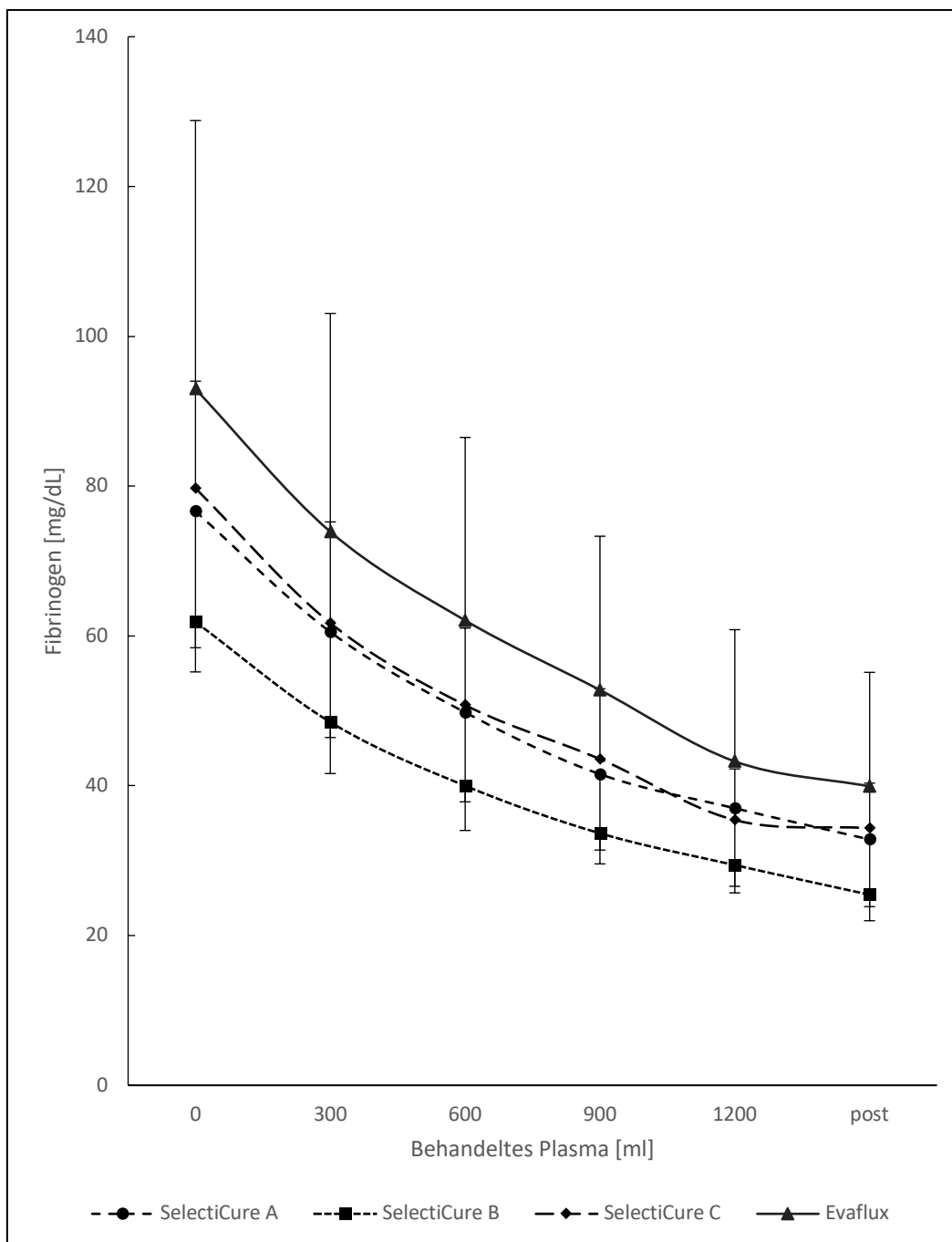
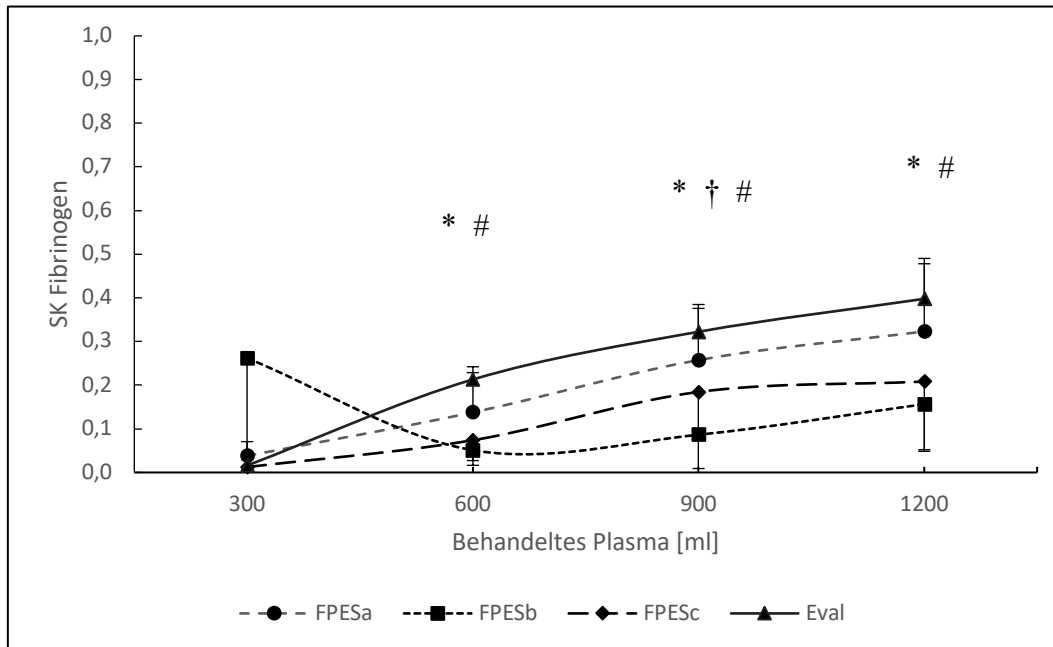


Abbildung 9: Verlauf der Siebkoeffizienten für Fibrinogen



Signifikanzniveau: * = $p < 0,01$ (FPESb vs. Eval), † = $p < 0,01$ (FPESb vs. FPESa), # = $p < 0,01$ (FPESc vs. Eval)

3.2.4 Albumin

Albumin ist mit circa 67 kDa die kleinste der untersuchten Substanzen, mit bis zu 60 % der Plasmaproteine aber mengenmäßig die bedeutsamste. Der Verlauf der Albuminspiegel ist in *Abbildung 10* dargestellt. Alle Fraktionatoren erreichten relativ einheitlich bereits nach 300 ml eine relativ steile Absenkung der Albuminkonzentration im Blut, die dann im Verlauf nur noch gering weiter absank. FPESa erbrachte eine Prä-Post-Reduktion von $28,75 \pm 2,20$ auf $19,80 \pm 2,71$ g/l, FPESb von $25,08 \pm 1,26$ auf $17,50 \pm 0,43$ g/l, FPESc von $29,60 \pm 2,75$ auf $20,48 \pm 1,82$ g/l und Eval von $26,75 \pm 0,57$ auf $17,85 \pm 2,00$ g/l. Die Siebkoeffizienten für Albumin (*Abbildung 11*) zeigten nur bei 1200 ml einen signifikanten Unterschied zwischen FPESa ($0,99 \pm 0,18$) und FPESc ($0,75 \pm 0,12$) mit $p < 0,05$.

Abbildung 10: Verlauf der Albumin-Konzentration arteriell

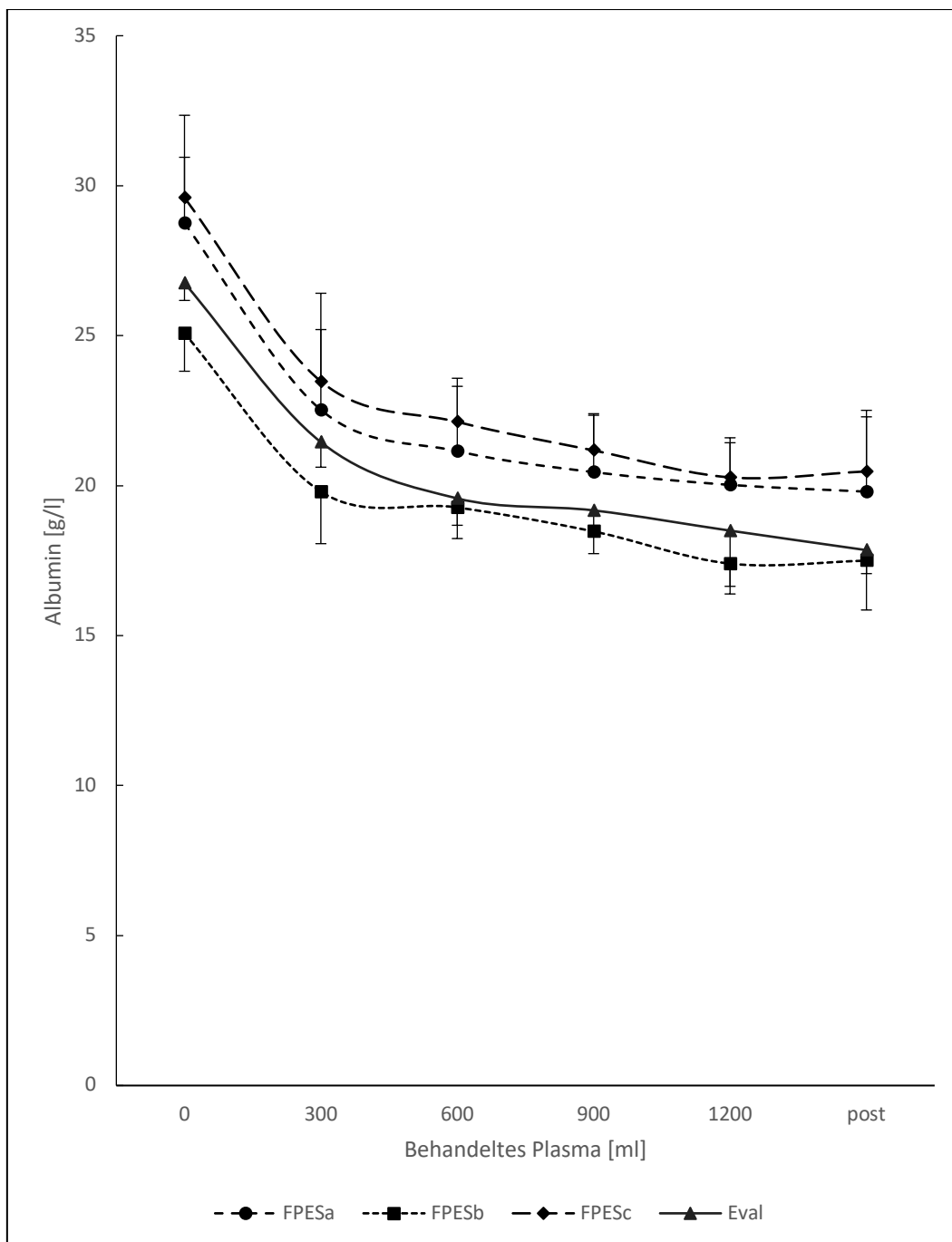
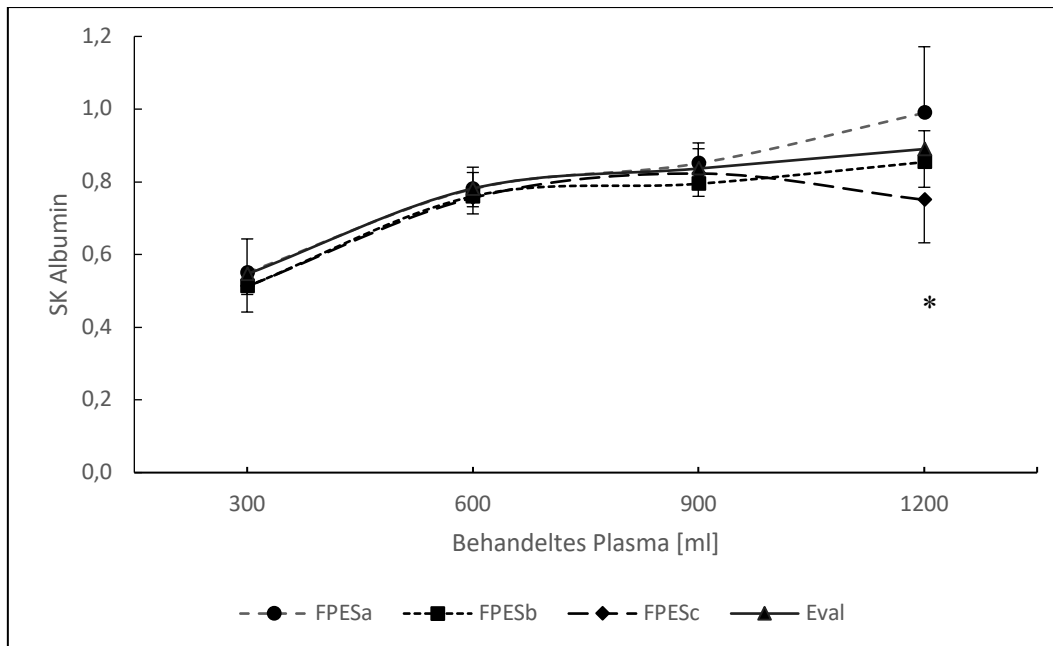


Abbildung 11: Verlauf der Siebkoeffizienten für Albumin



Signifikanzniveau: * = $p < 0,05$ (FPESa vs. FPESc)

3.2.5 Immunglobulin G (IgG)

IgG ist mit einer Größe von ca. 150 kDa etwas größer als Albumin (67 kDa) und nur geringfügig kleiner als HDL-Cholesterin (175-360 kDa). Alle Fraktionatormembranen erreichten eine deutliche Reduktion der IgG-Plasmaspiegel bis etwa 600 ml und erzielten anschließend nur noch eine geringfügige weitere Absenkung (*Abbildung 12*). Es zeigte sich eine ausgeprägte Streuung der S_K für IgG ohne signifikante Unterschiede (*Abbildung 13*).

FPESa erbrachte eine Prä-Post-Reduktion von $11,9 \pm 1,5$ auf $8,2 \pm 3,1$ g/l, FPESb von $16,4 \pm 5,3$ auf $10,3 \pm 3,2$ g/l, FPESc von $14,5 \pm 2,5$ auf $7,25 \pm 0,6$ g/l und Eval von $11,3 \pm 4,5$ auf $7,7 \pm 2,20$ g/l.

Abbildung 12: Verlauf der IgG-Konzentration arteriell

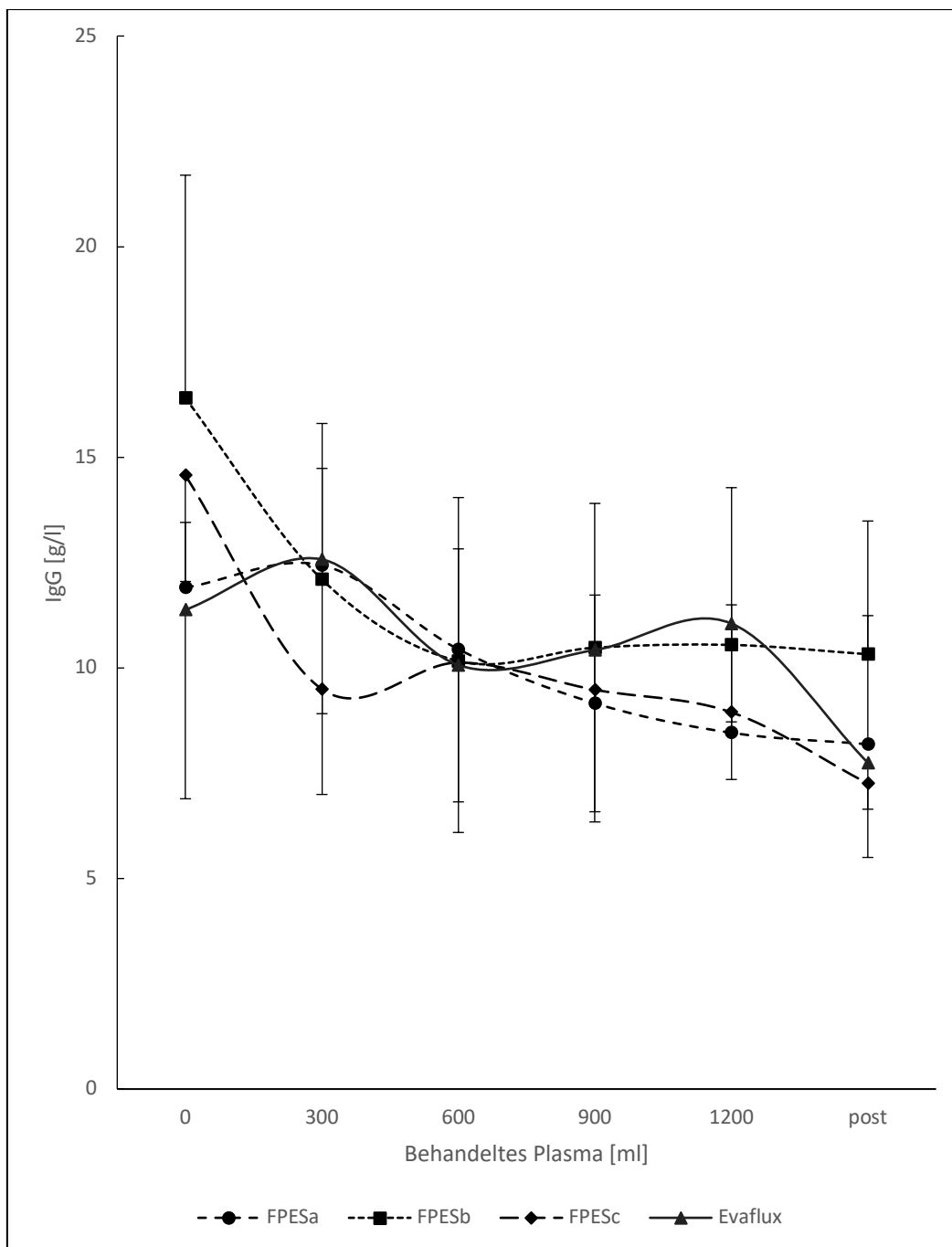
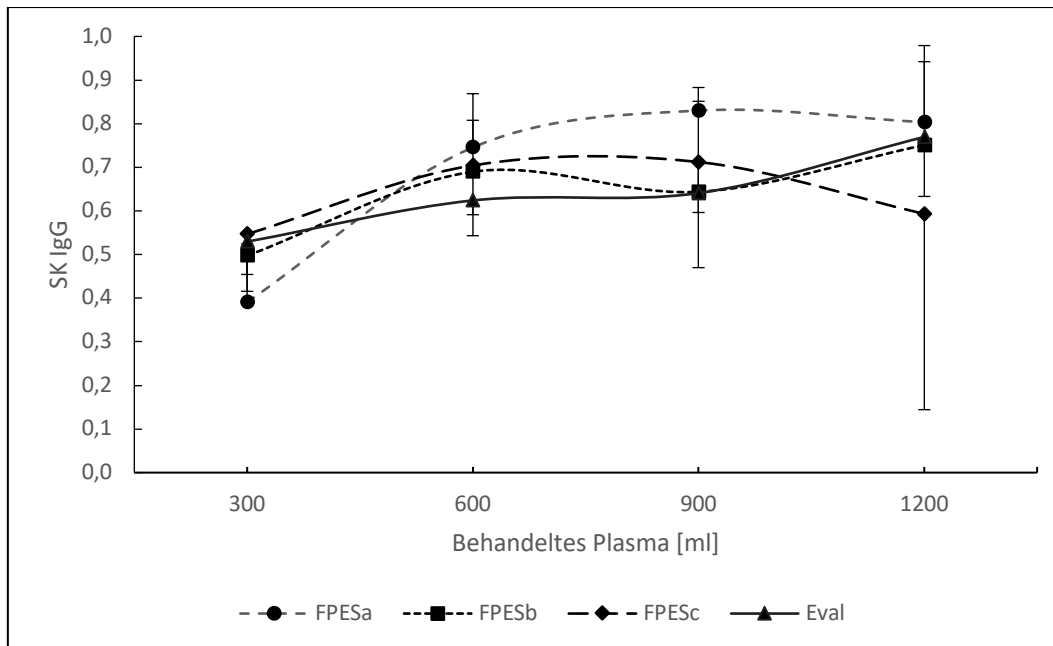


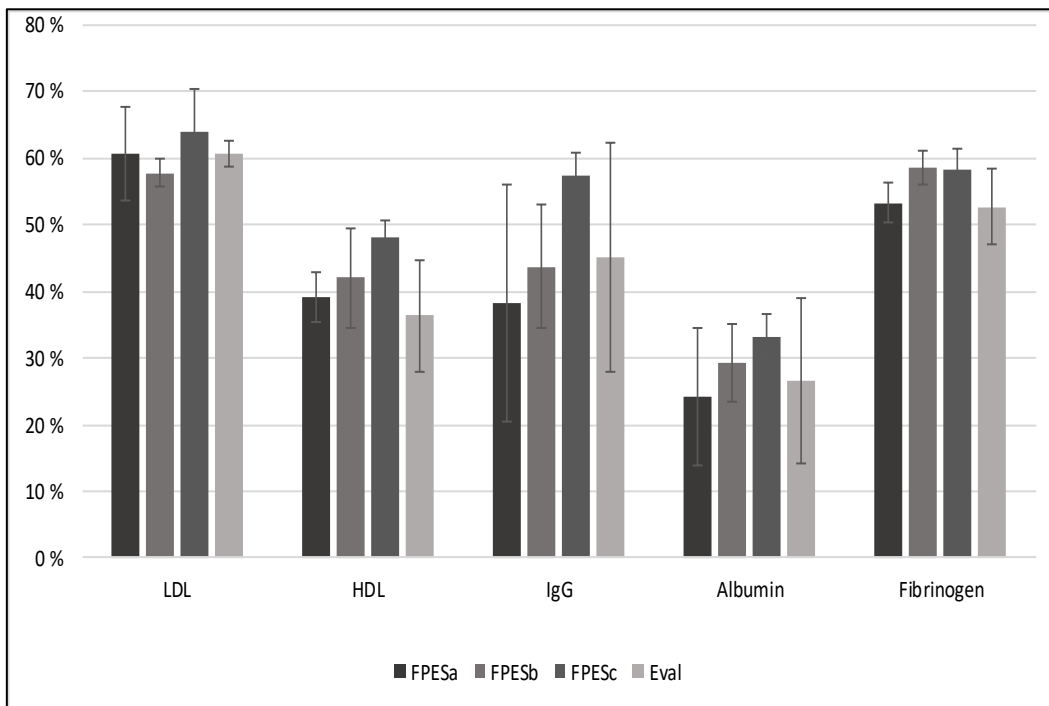
Abbildung 13: Verlauf der Siebkoeffizienten für IgG



3.3 Reduktionsrationes

Die Reduktionsrationes (RR) für LDL, HDL, IgG, Albumin und Fibrinogen wurden wie beschrieben nach *Formel 1* berechnet. *Abbildung 14* zeigt diese Reduktionsrationes. Es wurden keine signifikanten Unterschiede bei den Fraktionatoren gefunden. Die Reduktionsrationes lagen für LDL-Cholesterin zwischen $57,76 \pm 2,1$ % (FPESb) und $63,81 \pm 6,6$ % (FPESc), für HDL-Cholesterin zwischen $36,33 \pm 8,4$ % (Eval) und $48,17 \pm 2,4$ % (FPESc), für IgG zwischen $38,23 \pm 17,9$ % (FPESa) und $57,45 \pm 3,4$ % (FPESc), für Albumin zwischen $24,29 \pm 10,3$ % (FPESa) und $33,23 \pm 3,5$ % (FPESc) und für Fibrinogen zwischen $52,74 \pm 5,6$ % (Eval) und $58,52 \pm 3,0$ % (FPESb).

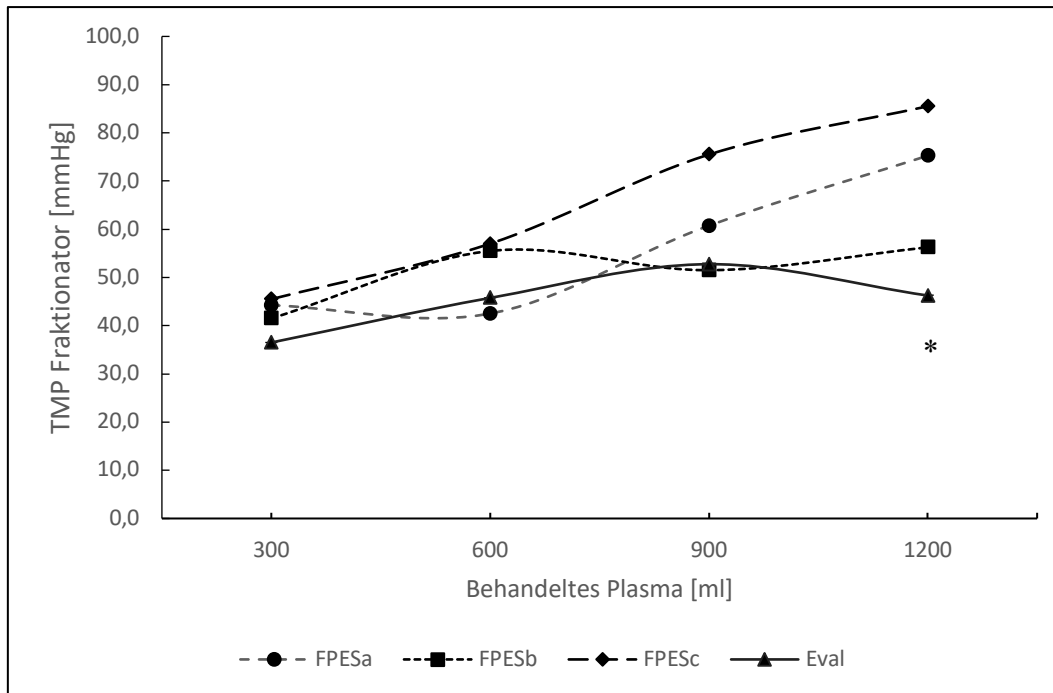
Abbildung 14: Reduktionsrationes (RR) aller getesteten Fraktionatormembranen



3.4 Transmembranöser Druck der Fraktionatoren

Abbildung 15 zeigt die gemittelten TMP-Verläufe der unterschiedlichen Fraktionatormembranen. Die TMP liegen bei 300 ml behandeltem Plasmavolumen noch relativ einheitlich (im Mittel $41,9 \pm 3,9$ mmHg) und stiegen im Verlauf der Behandlung unterschiedlich stark an. FPESc erreichte bei 1200 ml mit durchschnittlich $85,5 \pm 27,20$ mmHg die höchsten, Eval mit $46,3 \pm 9,06$ mmHg die durchschnittlich niedrigsten transmembranösen Drücke. Die TMP waren nur zwischen Eval und FPESc bei 1200ml signifikant unterschiedlich (TMP Fraktionator FPESc $85,5 \pm 27,2$ vs. Eval $46,3 \pm 9,0$).

Abbildung 15: Verlauf der gemittelten TMP nach Fraktionatoren



Signifikanzniveau: * = $p < 0,05$ (FPESc vs. Eval)

3.5 Siebkoeffizienten vs. transmembranöser Druck (TMP)

Die Siebkoeffizienten aller untersuchten Plasmaproteine zeigten keine signifikante Korrelation zum transmembranösen Druck (TMP). Exemplarisch zeigen *Abbildung 16* und *Abbildung 17* die Trendlinien für eine Auftragung der S_K (LDL-Cholesterin und HDL-Cholesterin) gegen den TMP. Die übrigen Auftragungen finden sich im Anhang (Absatz 6.3).

Abbildung 16: SK LDL vs. TMP: keine signifikante Korrelation

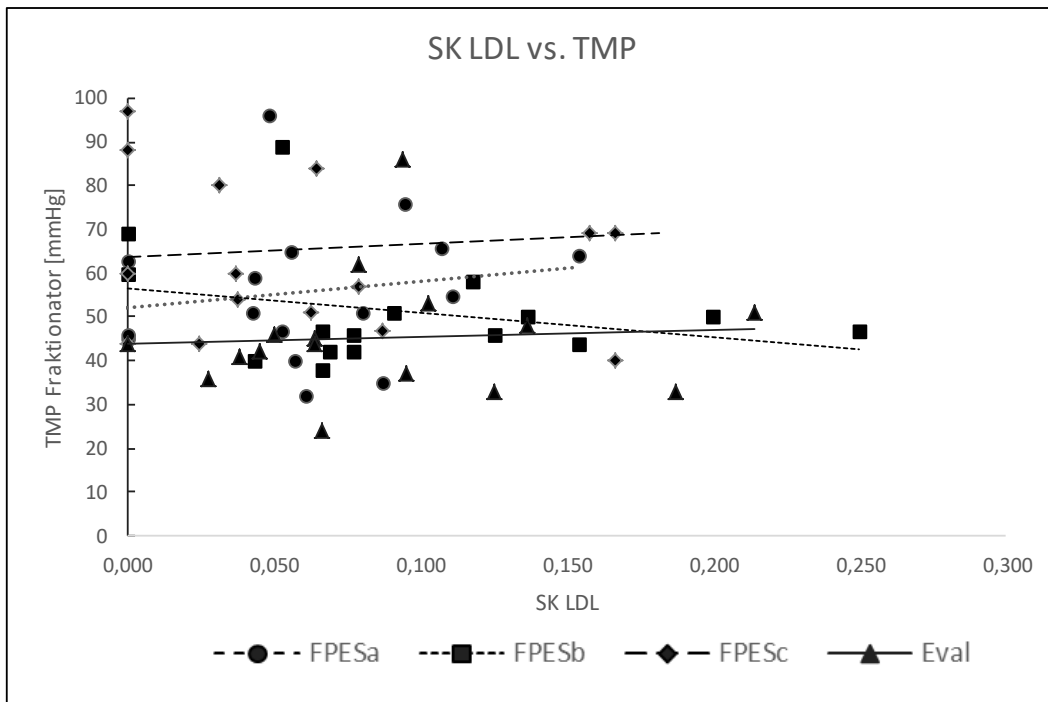
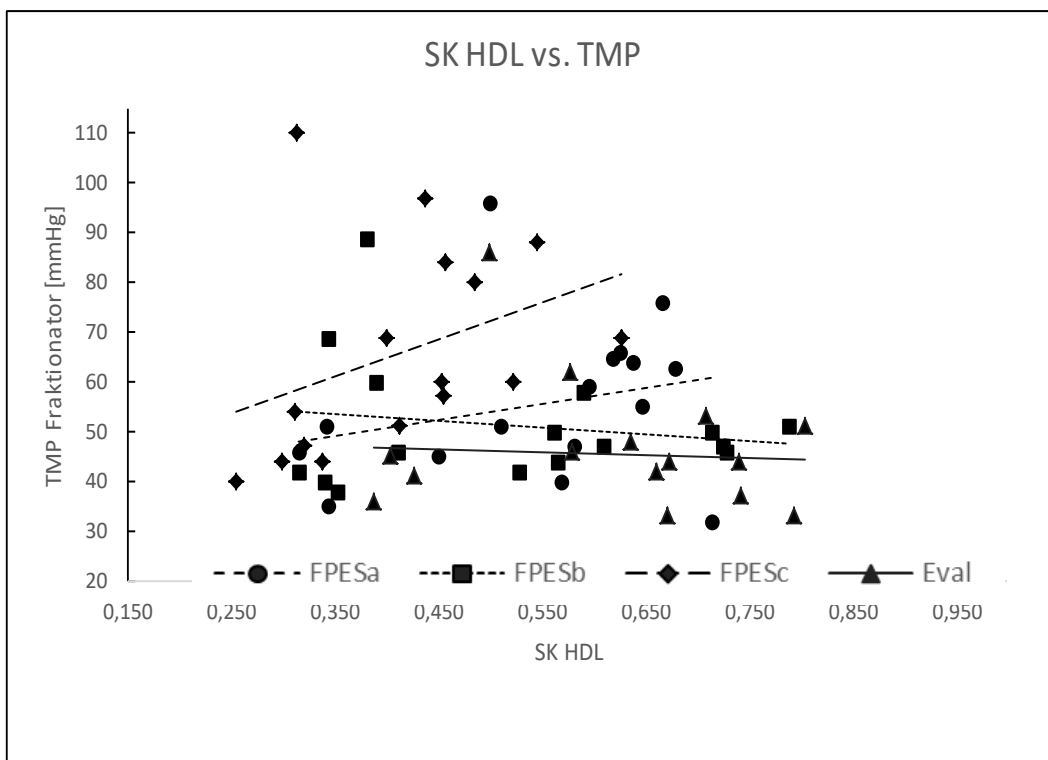


Abbildung 17 SK HDL vs. TMP: keine signifikante Korrelation



4 Diskussion

4.1 Historische Einordnung der unterschiedlichen

Lipoproteinaphereseverfahren

Seit Beginn der 1980er Jahre steht mit der Lipoproteinapherese eine effektive Therapieoption zur Senkung deutlich erhöhter LDL-Cholesterin-Spiegel (Keller, 2009) und damit zur Prävention und Verzögerung der Progression kardiovaskulärer Erkrankungen bei Hochrisikopatienten zur Verfügung (Koga, 1991).

Es wurden eine Reihe unterschiedlicher Verfahren zur Lipoproteinapherese entwickelt, die sich insbesondere in Hinblick auf ihre Selektivität für LDL-Cholesterin unterscheiden (Thompson, 2008). In der klinischen Praxis sind Verfahren zu bevorzugen, die bei gleicher Effizienz möglichst einfach und nebenwirkungsarm zu verwenden sind.

Neben der Entfernung von LDL-Cholesterin scheint auch die Entfernung anderer Plasmabestandteile wie Fibrinogen eine Rolle in der protektiven Wirkung der Lipoproteinapherese zu spielen (Balletshofer, 2005; Klingel, 2000). Somit könnte insbesondere eine sehr hohe Selektivität für LDL-Cholesterin einiger der Verfahren, insbesondere der Immunadsorption, eher ein Nachteil sein.

Die wichtigsten Verfahren werden im Folgenden kurz zusammengefasst. Die Plasmapherese war früh eines der effektiven Verfahren, hat jedoch den entscheidenden Nachteil, dass Spenderplasma zur Durchführung der Behandlung notwendig ist. Ein Verfahren, welches ohne Spenderplasma auskommt, vermindert die Infektionsgefahr und die Möglichkeit einer Sensibilisierung durch Fremdproteine (Bambauer, 2012), so dass die Plasmapherese als Dauertherapie uneignet ist.

Das hochselektive Immunaphereseverfahren ist komplex im Aufbau und muss aufgrund der immensen Kosten teilweise regeneriert und wiederverwendet werden, sodass eine ergänzende Infrastruktur zur Wiederverwendung geschaffen werden muss. Auch das Dextran-Sulfat-Cellulose-Adsorptions-Verfahren ist technisch aufwändig und zeigt darüber hinaus keine relevante Reduktion des Fibrinogens.

Einfach aufzubauen und zumindest teilweise Fibrinogen-reduzierend ist das DALI-Verfahren (Direkte Adsorption von Lipoproteinen). Ein Nachteil dieses Systems liegt jedoch in der Möglichkeit von anaphylaktoiden Reaktionen durch eine Aktivierung des Kallikrein-Kinin-Systems und damit lebensbedrohlichen Komplikationen (Kojima, 1997; Tielemans, 1990). Die Einnahme von ACE-Hemmern - Standardtherapie bei Herzinsuffizienz, eine der häufigsten Komorbiditäten von Patienten an der Lipoproteinapherese – kann lebensbedrohliche anaphylaktoide Reaktionen triggern und ist daher kontraindiziert (Krieter, 2005).

Unkompliziert in der Verwendung, haemorheologisch günstig und hocheffizient in der LDL-Senkung ist die Doppelfiltrationsplasmapherese (DFPP). Nach Separation des Plasmas wird dieses durch einen Plasmafraktionator grössenselektiv filtriert und auf diese Weise Moleküle entsprechend der membranspezifischen Trennschärfe entfernt. Die Membranporengröße und damit die Trennschärfe der Membran können im Rahmen der Herstellung variiert werden.

Der ungewollte Verlust bestimmter Plasmaproteine, beispielsweise der Immunglobuline, ist mit potentiell lebensgefährlichen Nebenwirkungen wie Infektionen bis hin zur Sepsis für den Patienten behaftet (Geiss, 1999). Auch ist eine Verminderung der gefäßprotektiven HDL-Plasmaspiegel nicht wünschenswert, so dass eine HDL-Entfernung im Rahmen der Lipoproteinapherese möglichst zu vermeiden ist (Yamamoto, 1988). So ergibt sich als Therapieziel eine möglichst effiziente LDL-Entfernung unter

Belassung des HDL-Cholesterins.

Trotz der Effizienz der Doppelfiltrationsplasmapherese in Hinblick auf eine Verminderung des Serum-LDL-Cholesterins sowie des Fibrinogens bietet sich somit Raum für eine Verbesserung des Verfahrens.

4.2 Notwendigkeit geeigneter In-vivo-Modelle

Neu entwickelte Plasmafraktionatoren sollten, wie alle Medizinprodukte, in angemessener Weise in vitro und in vivo getestet und verglichen werden. Gerade der anschließende Transfer von laborexperimentellen Daten auf den klinischen Alltag ist jedoch häufig problematisch.

Nach wie vor bleiben die Erfolgsraten klinischer Studien oft deutlich hinter den Erwartungen zurück, die durch vielversprechende Studien in vitro geschürt werden (Arrowsmith, 2011a, 2011b; Denayer, 2014). Gleichzeitig steigen die Kosten und der Aufwand klinischer Studien unter anderem aufgrund höherer Standards bezüglich Patientensicherheit und Studiendesign. Daraus folgt, dass eine bessere Übertragbarkeit präklinischer Forschung auf die klinische Anwendung wünschenswert ist. Eine der wichtigsten Methoden zur Übertragung präklinischer Ergebnisse in die klinische Forschung ist der Einsatz von Tiermodellen (Choudhary, 2013). Ein geeignetes Tiermodell kann einen wertvollen Beitrag leisten, um laborexperimentelle Ansätze zur klinischen Reife zu bringen. Im günstigsten Fall kann ein Tiermodell bezüglich der Reproduzierbarkeit der gewonnenen Daten sogar der klinischen Anwendung überlegen sein. Dies gilt möglicherweise auch in Hinsicht auf die Lipoproteinapherese.

Neben der Antikoagulation hängen bei Plasmaphereseverfahren die Filtrationseigenschaften der verwendeten Membranen unter anderem mit den eingestellten Plasmaflussraten zusammen. Diese werden durch die Blutflussraten bestimmt und diese letztlich durch den Gefäßzugang am

Patienten. Je nach Gefäßstatus des Patienten und verwendetem Zugangsweg (periphere Venen, arterio-venöse Fistel oder zentralvenöse Katheter) können die möglichen Flussraten von Behandlung zu Behandlung beträchtlich variieren.

Im klinischen Alltag kommt, anders als im Labor, hinzu, dass vorher definierte, zu behandelnde Plasmazielvolumina häufig nicht erreicht werden. Einer der Gründe liegt im Verstopfen der Fraktioniermembran (sog. „Clogging“) vor dem geplanten Abschluss der Behandlung, das konsekutiv regelmäßig zum vorzeitigen Abbruch führt (Dittrich-Riediger, 2015; Matsuda, 1995). Daraus ergibt sich eine deutlich erschwerte inter- und intraindividuelle Vergleichbarkeit der Behandlungen, was letztlich die Entwicklung neuer, innovativer Filtrationssysteme wesentlich erschwert, da hierdurch die Bewertung technischer Veränderungen auf das Behandlungsergebnis beeinträchtigt wird.

4.3 Das Schaf als Modellorganismus

Bei der Entwicklung extrakorporaler Blutreinigungsverfahren wurden in der Vergangenheit verschiedene Großtiermodelle verwendet, darunter vor allem Hunde, Schweine und Schafe (Abel, 1914; Schmer, 1976).

Das Schaf eignet sich für diese Zwecke besonders gut als Versuchstier, da aufgrund dem Menschen vergleichbarer Proportionen in der Regel keine oder kaum Anpassungen („downscaling“ / „upscaling“) an den zu testenden Medizinprodukten vorgenommen werden müssen und vergleichbare Blutflussraten möglich sind. Darüber hinaus verfügt das Schaf aufgrund der exponierten Lage seiner Vv. jugulares über einen sehr einfach zu etablierenden venösen Gefäßzugang (Krieter, 1995).

Im Vergleich zu Schweinen und Hunden sind Schafe wesentlich kooperativer und ungefährlicher, so dass die Versuche auch an nicht

narkotisierten Tieren durchgeführt werden können, wodurch unnötige Risiken entfallen (Krieter, 1995).

Essentiell für einen Vergleich zwischen Spezies ist eine ähnliche Physiologie, um valide Rückschlüsse auf die Biokompatibilität von Medizinprodukten zuzulassen, die in direktem Blutkontakt stehen. Einen Aspekt stellt in diesem Zusammenhang das Koagulationsverhalten dar. Gajewski und Povar konnten zeigen, dass sich das Gerinnungsverhalten zwischen Schaf und Mensch nicht relevant unterscheidet und Parameter wie Blutgerinnungszeit, partielle Thromboplastinzeit, Prothrombinzeit und Thrombinzeit in ähnlichen Bereichen liegen (Gajewski, 1971). Besonders das Verhalten der Schafthrombozyten im Kontakt mit künstlichen Oberflächen scheint dem von menschlichen Thrombozyten wesentlich ähnlicher zu sein, als das von Thrombozyten anderer Spezies wie Hasen oder Hunde (Grabowski, 1977).

So konnten eine Reihe herausragender Innovationen der Medizin, wie die extrakorporale Membranoxygenierung (ECMO; (Fountain, 1979; Kolobow, 1976), die Hämodialyse (Schmer, 1976), der Herzschrittmacher (Cummings, 1973) sowie Gefäßprothesen (Trudell, 1978) erfolgreich am Schaf getestet werden.

4.4 Ziele und Design der Studie

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, basierend auf einem Schafmodell für die Hämodialyse (Krieter, 1995; Krieter, 1998; Krieter, 2006) ein Modell für die Doppelfiltrationsplasmapherese zu etablieren. Mithilfe dieses angepassten Modells wurde eine neuartige Polyethersulfon/Polyvinylpyrrolidon-Plasmafraktionierungsmembran in drei verschiedenen Permeabilitäten bezüglich der Trennschärfe für die im Zusammenhang mit der Lipoproteinapherese relevanten Plasmaproteine charakterisiert und mit einer Referenzplasmafraktionierungsmembran

verglichen.

Hierzu wurde eine randomisierte, prospektive, „Cross-over-Studie“ an vier Schafen durchgeführt, wobei jedes Schaf einmal wöchentlich einer Doppelfiltrationsplasmapherese jeweils mit einem anderen Plasmafraktionator unterzogen wurde. Um weitere Variablen zu reduzieren, wurde zur Plasmagenerierung in jedem Versuch der gleiche Plasmafilter unter standardisierten Einstellungen (Blutfluss, Plasmafluss, Antikoagulation) verwendet. Alle Experimente konnten wie geplant und ohne Komplikationen durchgeführt werden, was zunächst für die prinzipielle Eignung des Modells spricht.

4.5 Therapeutische Effizienz, Reduktionsrationes und Siebkoeffizienten

Thompson et al. empfehlen eine LDL-Reduktionsratio von 60 % als Minimalziel für die klinisch wirksame Lipoproteinapherese (Thompson, 2010). Alle in dieser Studie verwendeten Fraktionatormembranen konnten Reduktionsrationes in diesem Bereich erreichen (zwischen FPESb: 57,76 % \pm 2,1 und FPESc: 63,81 % \pm 6,6), obwohl nur ein einfaches Plasmazielvolumen behandelt wurde. Bei Steigerung des Behandlungsziels auf z.B. ein 1,5-faches Plasmavolumen kann somit von einem Erfüllen des Primärziels einer effektiven LDL-Cholesterin-Senkung bei allen Fraktionatormembranen ausgegangen werden, da für die Filtration aller untersuchten Plasmaproteine eine Kinetik erster Ordnung mit einem starken Abfall zu Beginn und einer zunehmenden Nivellierung im Verlauf der Behandlung gezeigt werden konnte (*Abbildung 4, Abbildung 6, Abbildung 8, Abbildung 10*). Eine Ausnahme bildet IgG, eine Erläuterung diesbezüglich folgt (s.u.).

Als Zeichen einer gewünschten, fast vollständigen und anhaltenden LDL-Retention zeigten sich die LDL-S_K für alle Fraktionatoren durchweg sehr

niedrig ($< 0,16$; *Abbildung 5*). Bis auf die undurchlässigste getestete Membran des FPESc zeigten alle Kurven der LDL-Cholesterin-Siebkoefizienten einen diskreten Anstieg im Verlauf, gleichbedeutend mit einer geringfügigen Abnahme der Retention, bis zu einem Plateau bei etwa 900 ml behandelten Plasmavolumens.

Unerwartet waren die hohen Reduktionsraten für HDL-Cholesterin. Diese reichten von 48,2 % (FPESc) bis 36,3 % (Eval) und lagen damit deutlich über den Ergebnissen, die mit Doppelfiltrationsplasmapherese in der klinischen Praxis erzielt werden. Wie bereits erwähnt ist eine Absenkung des Serum-HDL-Cholesterins jedoch nicht gewünscht. Für Eval gibt es bereits langjährige klinische Erfahrung. Im klinischen Alltag sind mit Eval deutlich geringere Reduktionsraten zwischen 10 % und 25 % bei Patienten mit Familiärer Hypercholesterinämie typisch (Nakaji, 2002). Vereinzelt wurden jedoch auch für Eval HDL-Cholesterin-Reduktionsraten bis zu 40,7 % bei Erwachsenen berichtet (Kardaş, 2012).

Eine Erklärung für die beobachteten deutlich höheren HDL-Cholesterin-Reduktionsraten im Schafmodell bietet möglicherweise die HDL-Cholesterin-Zusammensetzung. HDL-Cholesterin ist kein einheitliches Lipoprotein, sondern besteht aus verschiedenen Fraktionen, die sich unter anderem in ihrer Zusammensetzung aus Lipiden und Proteinen unterscheiden. Das resultierende HDL weist entsprechend Variationen in Bezug auf Form, Dichte, Größe und Elektrophoreseverhalten auf (Gordon, 1989; Lund-Katz, 2003). Anhand dieser Faktoren konnten verschiedene HDL-Subklassen identifiziert werden, die sich in ihrem physiologischem Verhalten unterscheiden (von Eckardstein, 1994).

Je nach verwendetem Nachweisverfahren lassen sich verschiedene dieser Subklassen unterteilen. Nach Dichte sortiert ergeben sich zwei und nach Größe sortiert mindestens fünf Subklassen (Barter, 2003). Die Doppelfiltrationsplasmapherese ist ein nahezu ausschließlich

größenselektiv trennendes Verfahren. Da beim Schaf mit HDL₂ das räumlich größte HDL-Molekül dominiert (Mackness, 1988), ist eine deutlich höhere HDL-Retention plausibel.

Ob dieser vermutete Zusammenhang für die Schafe im vorliegenden Tierversuch tatsächlich relevant war, hätte die Bestimmung der HDL-Subklassen notwendig gemacht. Diese Bestimmung wäre allerdings mit einem erheblichen Mehraufwand ohne relevanten Zusatznutzen in Bezug auf die Membrancharakterisierung verbunden gewesen und wurde daher nicht durchgeführt.

Die neu entwickelten FPES-Membranen unterschieden sich *in vitro* hinsichtlich ihrer HDL-Siebkoefizienten. Eine der relevantesten Fragen dieser Studie war, ob es mithilfe des Tiermodells möglich ist, diese minimalen *In-vitro*-Unterschiede auch *in vivo* zu reproduzieren. Bemerkenswerterweise konnten diese Unterschiede der drei FPES-Varianten (*In-vitro*-HDL-S_K: FPESa: 0,30; FPESb: 0,26 und FPESc: 0,22) tatsächlich nachvollzogen werden. Die mit einem *In-vitro*-Siebkoefizienten von 0,22 am wenigsten HDL-durchlässige FPESc-Membran zeigte auch im Schafsmodell einen signifikant niedrigeren HDL-S_K als FPESa ($p < 0,01$ bei 600 ml behandeltem Plasmavolumen, S_K: 0,46 vs. 0,59).

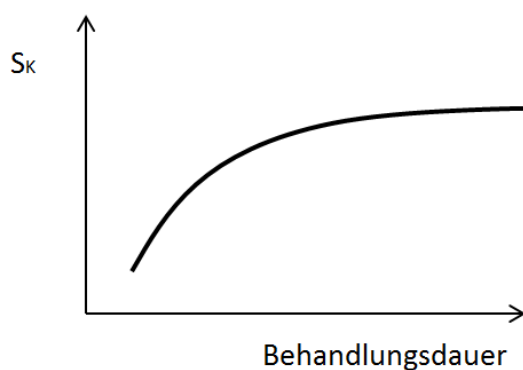
Allerdings fiel auf, dass die *In-vitro*-S_K insgesamt deutlich niedriger als die in den Tierversuchen gemessenen *In-vivo*-S_K lagen. Ursächlich hierfür dürfte die Sterilisation mittels γ -Strahlung der verwendeten Fraktionatoren gewesen sein. Bekanntermaßen bewirkt Bestrahlung in Abhängigkeit von der eingebrachten Dosis und der Restfeuchtigkeit der zu sterilisierenden Filter nach Trocknung eine erhebliche Permeabilitätssteigerung (Takesawa, 1987). Ein direkter Vergleich zwischen den unsterilisierten Fraktionatoren, die zur werksseitigen Messung der *In-vitro*-S_K herangezogen wurden, und dem im Tierversuch verwendeten sterilisierten Endprodukt wurden demnach nicht gemacht.

Auch für Fibrinogen konnten Unterschiede der Siebkoeffizienten zwischen den FPES-Varianten gezeigt werden (*Abbildung 9*). Statistisch signifikant niedriger waren diese für FPESb bei 900 ml gegenüber FPESa ($p < 0,01$) sowie gegenüber Eval bei 600, 900 und 1200 ml ($p < 0,01$). Ebenfalls bei 600, 900 und 1200 ml zeigte auch FPESc gegenüber Eval signifikant niedrigere Siebkoeffizienten ($p < 0,01$).

Die Doppelfiltrationsplasmapherese ist aufgrund des Mechanismus der Membranfiltration ein gröÙenselektives Verfahren mit dem Ziel große Moleküle zu entfernen, so dass Stoffe mit einem geringen Molekulargewicht quasi nur als „Beifang“ herausgefiltert werden. Passend dazu wurde für das kleinste der untersuchten und möglichst nicht zu retinierenden Stoffe - Albumin mit ca. 67 kDa – erwartungsgemäß für alle Membranen insgesamt nur eine geringe Absenkung der Plasmaspiegel beobachtet.

Die Kinetik der errechneten Siebkoeffizienten für Albumin, Fibrinogen und HDL-Cholesterin in dieser Studie zeigt einen steilen Anstieg zu Beginn der Behandlung mit einer Abflachung der Kurve im Verlauf. Modellhaft zeigt dies *Abbildung 18*. Für die S_K von Albumin, Fibrinogen und HDL-Cholesterin siehe *Abbildung 6*, *Abbildung 8* und *Abbildung 12*.

Abbildung 18: Modellierte Kinetik der S_K - während der Apherese (Albumin, Fibrinogen und HDL-Cholesterin)



Auffällig ist die scheinbare Diskrepanz zwischen der schnellen Absenkung der Plasmakonzentrationen der untersuchten Stoffe und den niedrigeren Siebkoeffizienten zu Beginn der Behandlung. Wären allein Transportvorgänge durch die Fraktioniermembran für die Kinetik der Siebkoeffizienten verantwortlich, sollte sich eigentlich ein umgekehrtes Bild ergeben. Erklärend für die niedrigen Siebkoeffizienten bei gleichzeitig rascher Abnahme der Plasmakonzentration zu Beginn der Behandlung dürften insbesondere zwei Effekte sein. Einerseits muss das extrakorporale System vor der Behandlung mit Kochsalzlösung gespült werden, so dass anfangs eine erhebliche Verdünnung des anflutenden Plasmas stattfindet. Ein weiterer Effekt kommt durch die Membranstruktur zustande. Der Wandaufbau einer synthetischen, mikroretikularen Filtrationsmembran aus Polyethersulfon, wie FPES, besteht aus mehreren Schichten (Krieter, 2011). Dabei stellt die Stützstruktur der Membranwand ein sehr feinmaschiges Geflecht dar, in welches sich Moleküle quantitativ bedeutsam einlagern können bzw. adsorbieren (Membranbelegung, engl. membrane fouling). Beide Effekte bewirken einen raschen Konzentrationsabfall der im Plasma gemessenen Proteine zu Beginn der Behandlung, ohne dass diese im Filtrat, also hinter der Membran, deutlich ansteigen. Beide Mechanismen schwächen sich im Verlauf der Behandlung ab, so dass anschließend die reine Filtration der Substanzen an Einfluss gewinnt und so die Siebkoeffizienten messbar ansteigen.

Das Phänomen der Membranbelegung führt im Verlauf durch eine Passagebehinderung von Stoffen durch die Membranporen jedoch zu einer Absenkung der Filtrationsleistung. Messbare Indikatoren hierfür sind sowohl ein sinkender Fluss über die Membran bei konstantem TMP als auch ein ansteigender TMP bei konstantem Fluss (Abdelrasoul, 2013).

Bei Übersteigen einer kritischen Druckgrenze, in der vorliegenden Studie war diese Obergrenze seitens der Maschinensoftware auf einen TMP von 150 mmHg festgelegt, kann dieser Effekt durch Unterbrechen der

Behandlung und Rückspülung der Membran zur Regeneration (bsp. mit NaCl) zuverlässig rückgängig gemacht werden.

Relevant für die Vergleichbarkeit der Versuchsbedingungen war, dass dieses Rückspülen nicht mit den Versuchsparametern interagierte, um eine Verfälschung der gemessenen S_K durch Verdünnung des fraktionierten Plasmas auf der Filtratseite des Fraktionators zu verhindern. Ein Spülen der Membran wurde während der Studie nur bei drei Experimenten notwendig, jeweils zwischen 1200 ml und 1500 ml und somit nach Abschluss der letzten Probenabnahmen für die Berechnung der S_K bei 1200 ml. Der Spülvorgang und die damit verbundene Dilution des fraktionierten Plasmas kann also auf die gemessenen Konzentrationen bzw. Siebkoeffizienten keinen Einfluss gehabt haben.

Das Spülen zur Regeneration betraf darüber hinaus drei unterschiedliche Fraktionortypen, so dass eine Korrelation einer speziellen Fraktionatormembran mit einer erhöhten Membranbelegung unwahrscheinlich erscheint. Dabei waren sowohl die Frequenz als auch der Zeitpunkt des Spülens vergleichbar mit der therapeutischen Lipoproteinapherese im klinischen Alltag an Patienten.

Auffallend an den Ergebnissen dieser Studie war die starke Streuung der IgG-Siebkoeffizienten (*Abbildung 13*). IgG weist ein Molekulargewicht von 150 kDa auf und ähnelt damit dem HDL-Cholesterin (175-360 kDa). Es sollte daher eigentlich schärfer zu trennen sein. Mathematische Modelle zur Berechnung der Entfernungskinetik während der therapeutischen Apherese sind derzeit (noch) nicht zuverlässig (Reverberi, 2007). Komplex ist insbesondere die Berücksichtigung sich während der Behandlung ändernder Variablen (Reverberi, 2007). Relevante Faktoren sind unter anderen: das Gesamtplasmavolumen des Patienten (a), das behandelte Plasmavolumen (b), die Verteilungsgeschwindigkeit zwischen extravasalem und intravasalem Kompartiment des untersuchten Stoffes (c)

und die Durchlässigkeit der Fraktionatormembran (d).

Weder a, noch b können starke Veränderungen der Entfernungsgeschwindigkeit während der Behandlung erklären. Die Verteilungsgeschwindigkeit zwischen extravasalem und intravasalem Kompartiment (c) sollte nur relevant werden, wenn diese schnell genug ist, rasch große Mengen eines Stoffes aus dem extra- in das intravasale Kompartiment zu mobilisieren. Für kleine Moleküle und Ionen wie Elektrolyte sind diese Transportvorgänge so schnell, dass Schwankungen während der etwa 60 min andauernden Behandlung denkbar sind. Allerdings ist die Verteilungsgeschwindigkeit für großmolekulare Stoffe, wie IgG und LDL-Cholesterin, so gering (Kellogg, 1988), dass relevante Konzentrationsunterschiede nicht zu erwarten sind.

Wie bereits erläutert, ist jedoch eine Änderung der Durchlässigkeit der Fraktionatormembran während der Behandlung, als Membranbelegung, zu erwarten.

Ein Spülen der Fraktionatormembran aufgrund ansteigenden TMP wurde jedoch erst nach den letzten Blutentnahmen (bei 1200 ml) notwendig, sodass auch eine relevante Membranbelegung als Erklärung der IgG-Streuung unwahrscheinlich erscheint. Auch hätten vor allem die größeren gemessenen Proteine HDL-Cholesterin und Fibrinogen ebenfalls erhebliche Schwankungen aufweisen müssen.

Vom Krankheitsbild der Kryoglobulinämie ist bekannt, dass IgG, ebenso wie IgM, temperaturabhängig pathologisch Aggregate bilden können. Allerdings lassen sich Kryoglobuline nicht nur bei klinisch symptomatischen Patienten nachweisen, sondern in geringer Konzentration bei circa 40-50 % der Probanden in gesunden Kontrollgruppen (Oliver, 2004; Takada, 2012), . Zborowski und Malchesky (Zborowski, 1990) beschrieben bei gesunden Menschen eine Temperaturabhängigkeit der Membranseparierung von IgG

mit einer deutlichen Abnahme der IgG-Reduktion bei kühleren Temperaturen (bis zu 4° C).

Die Versuche der vorliegenden Studie fanden bei unkontrollierter Umgebungstemperatur deutlich unter 21° C statt, so dass eine Abkühlung des extrakorporalen Blutes während der Therapie als sicher anzunehmen ist. Hiervon war insbesondere auch das Plasma im Fraktionator betroffen, was eine temporäre Agglutination einzelner Immunglobuline begünstigt haben könnte. Erst nach Durchlaufen des Fraktionators und damit unmittelbar vor Reinfusion in die Tiere wurde das Plasma wieder erwärmt.

Die gute Trennschärfe für die gröÙenselektive Trennung der Plasmabestandteile konnte für die nur geringfügig größeren HDL-Cholesterin-Moleküle in dieser Studie gezeigt werden. Sollten einzelne IgG tatsächlich temporär agglutiniert und damit zu groß für die Membranporen gewesen sein, wäre dies eine Erklärung für die deutliche Streuung der IgG-S_K.

Derzeit bleiben diese Überlegungen reine Spekulation, relevante Daten zur Agglutination von IgG unter physiologischen Bedingungen existieren weder beim Menschen, noch beim Schaf. Letztlich bleibt die Ursache für die starke Streuung der IgG-S_K unklar. Sie dürfte aber trotz unauffälliger Validierung des Essays über das oben Genannte hinaus möglicherweise auch bei den Labormessungen oder bei der tertiären Molekularstruktur von IgG zu suchen sein, da die Plasmaprobe für die Bestimmung aus derselben Monovette entnommen wurde, aus welcher auch andere Proteine gemessen wurden.

Im Übrigen zeigte sich keine Korrelation zwischen den transmembranösen Drücken und den Siebkoeffizienten sämtlicher gemessener Markerproteine. Eine Erklärung hierfür gibt das bekannte Phänomen der Konzentrationspolarisation (McDonogh, 1990): Wird ein Fluss über eine

semipermeable Membran erzeugt, so sammeln sich nichtdurchgängige Makromoleküle vor den Membranporen und bilden dort ein Konzentrationsgefälle. Der transmembranöse Fluss wird konsekutiv reduziert. Dieser Effekt ist potentiell reversibel und kann durch Spülen der Membran aufgehoben werden.

4.6 Zusammenfassung

Die Doppelfiltrations-Lipoproteinapherese stellt ein etabliertes extrakorporales Verfahren zur Therapie schwerer Fettstoffwechselstörungen dar. Ziel der vorliegenden Promotionsarbeit war die Etablierung eines Großtiermodells als Basis für die Untersuchung und Weiterentwicklung dabei verwendeter Fraktioniermembranen. Zu diesem Zweck wurden ein für die Dialyse entwickeltes Schafmodell erweitert und drei verschiedene Iterationsstufen einer neuartigen Fraktioniermembran (FractioPES[®], Membrana GmbH; FPESa, FPESb, FPESc), die sich geringfügig in der *In-vitro*-Permeabilität für HDL-Cholesterin unterschieden, im Vergleich mit einem Referenzfraktionierer (Evaflux[™], Kawasumi) getestet. Im Rahmen einer prospektiven, randomisierten „Cross-over-Studie“ an vier Schafen wurden die Reduktionsraten sowie Siebkoeffizienten für LDL-Cholesterin, HDL-Cholesterin, Albumin, Fibrinogen und IgG während der Doppelfiltrations-Lipoproteinapherese ermittelt.

Alle Versuche konnten wie geplant durchgeführt werden, ohne dass es zu klinischen Auffälligkeiten bei den Tieren kam. Für LDL-Cholesterin erreichten alle Membranen Reduktionsraten zwischen 57,76 % (FPESb) und 63,81 % (FPESc) als Zeichen einer wirksamen Lipoproteinapherese. Die durchweg sehr niedrigen LDL-Cholesterin-Siebkoeffizienten (< 0,16) dokumentierten eine nahezu vollständige und anhaltende LDL-Cholesterin-Retention aller verwendeten Filter.

Die *in vitro* gemessenen Permeabilitätsunterschiede der Membranen für HDL-Cholesterin konnten im Schafmodell reproduziert werden. So zeigten die FPESb- und FPESc-Membranen eine niedrigere Durchlässigkeit gegenüber den annähernd gleich permeablen FPESa- und Eval-Membranen. Signifikant war dies für HDL-Cholesterin bei 300 ml (S_K : $0,30 \pm 0,003$ vs. $0,42 \pm 0,03$), 600 ml (S_K : $0,46 \pm 0,045$ vs. $0,62 \pm 0,05$) und 1200 ml (S_K : $0,40 \pm 0,11$ vs. $0,74 \pm 0,08$) zwischen FPESc vs. Eval mit $p < 0,05$ und bei 600 ml (S_K : $0,46 \pm 0,045$ vs. $0,59 \pm 0,04$) zwischen FPESc vs. FPESa mit $p < 0,01$, für Albumin bei 1200 ml (S_K : $0,75 \pm 0,12$ vs. $0,99 \pm 0,18$) zwischen FPESc vs. FPESa mit $p < 0,05$ und für Fibrinogen bei 600 ml (S_K : $0,21 \pm 0,03$ vs. $0,05 \pm 0,02$), 900 ml (S_K : $0,32 \pm 0,06$ vs. $0,08 \pm 0,07$) und 1200 ml (S_K : $0,39 \pm 0,08$ vs. $0,15 \pm 0,10$) zwischen Eval vs. FPESb mit $p < 0,01$, sowie bei 900 ml (S_K : $0,09 \pm 0,08$ vs. $0,26 \pm 0,12$) zwischen FPESb vs. FPESa mit $p < 0,01$.

Unerwartet hoch waren die Reduktionsrationes der Membranen für HDL-Cholesterin (zwischen 48,2 % FPESc und 36,3 % Eval). Eine mögliche Erklärung hierfür könnte die unterschiedliche Zusammensetzung der HDL-Cholesterin-Subklassen beim Schaf bieten, welche im Vergleich zum Menschen zugunsten der größeren HDL₂-Subklasse verschoben ist. Die Reduktionsrationes aller anderen gemessenen Proteine zeigten keine derartigen Auffälligkeiten.

Zusammenfassend war das neu zu etablierende Schafmodell einfach in der Durchführung, ermöglichte komplikationslose Doppelfiltrations-Lipoproteinapherese-Behandlungen und war geeignet, selbst die minimalen *In-vitro*-Permeabilitätsunterschiede der getesteten Membranen zu unterscheiden. Das Schafsapheresemodell stellt somit ein nützliches Instrument für die Weiterentwicklung und *In-vivo*-Charakterisierung von Fraktionatormembranen für die Doppelfiltrationsplasmapherese dar.

5 Literaturverzeichnis

- 3M Deutschland GmbH. (2014) Plascure® Plasmafilter. Website: [http://membrana.com/healthcare/healthcare-data/documents/medical-devices/plascure%C2%AE-\(english\)/3m_plascure_rev02.aspx](http://membrana.com/healthcare/healthcare-data/documents/medical-devices/plascure%C2%AE-(english)/3m_plascure_rev02.aspx) (zuletzt geändert im Oktober 2015, abgerufen am 03. Februar 2018).
- 3M Deutschland GmbH. (2015) SelectiCure H19. Website: [http://ww.membrana.com/healthcare/healthcare-data/documents/medical-devices/selecticure%C2%AE-\(english\)/selecticureh19_rev00.aspx](http://ww.membrana.com/healthcare/healthcare-data/documents/medical-devices/selecticure%C2%AE-(english)/selecticureh19_rev00.aspx) (zuletzt geändert im August 2015, abgerufen am 10. Februar 2018).
- Abdelrasoul, A., Doan, H., & Lohi, A. (2013). Abschnitt: „Fouling in membrane filtration and remediation methods“ aus dem Buch: *Mass transfer-advances in sustainable energy and environment oriented numerical modeling*: veröffentlicht durch: InTech.
- Abel, J. J., Rowntree, L. G., & Turner, B. B. (1914). On the removal of diffusible substances from the circulating blood of living animals by dialysis. *Journal of Pharmacology and experimental Therapeutics*, 5(3), 275-316.
- Aengevaeren, W. R., Kroon, A. A., Stalenhoef, A. F., Uijen, G. J., & Van Der Werf, T. (1996). Low density lipoprotein apheresis improves regional myocardial perfusion in patients with hypercholesterolemia and extensive coronary artery disease: the LDL-Apheresis Atherosclerosis Regression Study (LAARS). *Journal of the American College of Cardiology*, 28(7), 1696-1704.
- Agishi, T., Kaneko, I., Hasuo, Y., Hayasaka, Y., Sanaka, T., Ota, K., . . . Sugino, N. (1980). Double filtration plasmapheresis with no or minimal amount of blood derivative for substitution. *Plasma exchange*, 53.
- Arrowsmith, J. (2011a). Trial watch: Phase II failures: 2008–2010. *Nature reviews Drug discovery*, 10(5), 328-329.
- Arrowsmith, J. (2011b). Trial watch: phase III and submission failures: 2007–2010. *Nature reviews Drug discovery*, 10(2), 87-87.
- Balletshofer, B. M., Stock, J., Rittig, K., Lehn-Stefan, A., Braun, N., Burkart, F., . . . Häring, H. U. (2005). Acute effect of rheopheresis on peripheral endothelial dysfunction in patients suffering from sudden hearing loss. *Therapeutic Apheresis and Dialysis*, 9(5), 385-390.
- Bambauer, R., Bambauer, C., Lehmann, B., Latza, R., & Schiel, R. (2012). LDL-apheresis: technical and clinical aspects. *The Scientific World Journal*, 2012.

- Banyai, S., Strobl, Gabriel, Gottsauner-Wolf, Rohac, Weidinger, Hörl, Derfler. (1998). Therapeutic efficiency of lipoprotein(a) reduction by low-density lipoprotein immunopheresis. *Metabolism*, 47(9), 1058-1064.
- Barter, P., Kastelein, J., Nunn, A., & Hobbs, R. (2003). High density lipoproteins (HDLs) and atherosclerosis; the unanswered questions. *Atherosclerosis*, 168(2), 195-211.
- Basile, C., Casino, F., & Lopez, T. (1990). Percent reduction in blood urea concentration during dialysis estimates Kt/V in a simple and accurate way. *American Journal of Kidney Diseases*, 15(1), 40-45.
- Berrouschot, J., Barthel, H., Scheel, C., Köster, J., & Schneider, D. (1998). Extracorporeal membrane differential filtration—a new and safe method to optimize hemorheology in acute ischemic stroke. *Acta neurologica scandinavica*, 97(2), 126-130.
- Borberg, H. (2009). 28 years of LDL-apheresis: a review of experience. *Transfusion and Apheresis Science*, 41, 49-59.
- Brunner, R., Widder, R., Walter, P., Borberg, H., & Oette, K. (1995). Change in hemorrheological and biochemical parameters following membrane differential filtration. *The International journal of artificial organs*, 18(12), 794-798.
- Burns, T. M. (2008). *Guillain-Barré syndrome*. Paper präsentiert auf der Konferenz Seminars in neurology.
- Castelli, W. P., Garrison, R. J., Wilson, P. F., Abbott, R. D., Kalousdian, S., & Kannel, W. B. (1986). Incidence of coronary heart disease and lipoprotein cholesterol levels: The framingham study. *JAMA*, 256(20), 2835-2838.
- Choudhary, A., & Ibdah, J. A. (2013). Animal models in today's translational medicine world. *Mo Med*, 110(3), 220-222.
- Coker, M., Ucar, S. K., Simsek, D. G., Darcan, S., Bak, M., & Can, S. (2009). Low density lipoprotein apheresis in pediatric patients with homozygous familial hypercholesterolemia. *Therapeutic Apheresis and Dialysis*, 13(2), 121-128.
- Cummings, J., Gelok, R., Grace, J., & Salkind, A. (1973). Long-term evaluation in large dogs and sheep of a series of new fixed-rate and ventricular synchronous pacemakers. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*, 66(4), 645-652.
- Denayer, T., Stöhr, T., & Van Roy, M. (2014). Animal models in translational medicine: Validation and prediction. *New Horizons in Translational Medicine*, 2(1), 5-11.
- Dintenfass, L., & Kammer, S. (1977). Plasma viscosity in 615 subjects. Effect of fibrinogen, globulin, and cholesterol in normals, peripheral vascular disease retinopathy, and melanoma. *Biorheology*, 14(5-6), 247-251.

- Dittrich-Riediger, J., Schatz, U., Hohenstein, B., & Julius, U. (2015). Adverse events of lipoprotein apheresis and immunoabsorption at the Apheresis Center at the University Hospital Dresden. *Atherosclerosis Supplements*, 18, 45-52.
- European Atherosclerosis Society. (1987). Strategies for the prevention of coronary heart disease. *Eur Heart J*, 8, 77-88.
- Fountain, S. W., Duffin, J., Ward, C. A., Osada, H., Martin, B. A., & Cooper, J. D. (1979). Biocompatibility of standard and silica-free silicone rubber membrane oxygenators. *Am J Physiol*, 236(2), H371-375.
- Gajewski, J., & Povar, M. (1971). Blood coagulation values of sheep. *American journal of veterinary research*, 32(3), 405.
- Geiss, H. C. (1999). Low density lipoprotein apheresis by membrane differential filtration (cascade filtration). *Therapeutic Apheresis and Dialysis*, 3(3), 199-202.
- Gillespie, C. D., Wigington, C., & Hong, Y. (2013). Coronary heart disease and stroke deaths - United States, 2009. *MMWR supplements*, 62(3), 157-160.
- Glöckner, W., & Sieberth, H. (1978). Plasmafiltration, a new method of plasma exchange. *Proc Eur Soc Artif Organs*, 5, 214-217.
- Gordon, D. J., & Rifkind, B. M. (1989). High-density lipoprotein--the clinical implications of recent studies. *The New England journal of medicine*, 321(19), 1311-1316.
- Grabowski, E., Didisheim, P., Lewis, J., Franta, J., & Stropp, J. (1977). Platelet adhesion to foreign surfaces under controlled conditions of whole blood flow: human vs rabbit, dog, calf, sheep, pig, macaque, and baboon. *ASAIO Journal*, 23(1), 141-149.
- Heart Protection Study Collaborative Group. (2002). MRC/BHF Heart Protection Study of cholesterol lowering with simvastatin in 20 536 high-risk individuals: a randomised placebocontrolled trial. *The Lancet*, 360(9326), 7-22.
- Hecker, J. F. (1983). *The sheep as an experimental animal*: veröffentlicht durch: Academic Press.
- Henderson, L. W. (1996). Abschnitt: „Biophysics of ultrafiltration and hemofiltration“ aus dem Buch: *Replacement of renal function by dialysis* (pp. 114-145): veröffentlicht durch: Springer.
- Kardaş, F., Çetin, A., Solmaz, M., Büyükoğlan, R., Kaynar, L., Kendirci, M., . . . Ünal, A. (2012). Successful treatment of homozygous familial hypercholesterolemia using cascade filtration plasmapheresis. *Turkish Journal of Haematology*, 29(4), 334.

- Kawasumi Laboratories. (2017) Plasma Fractionator Evaflux. Website: http://www.kawasumi.jp/e/business/pdf/evaflux_eng_KJE-EF-1601-01-FF.pdf (zuletzt geändert im Juni 2017, abgerufen am 25. Oktober 2017).
- Keller, C. (2009). LDL-Apheresis in Homozygous LDL-Receptor-Defective Familial Hypercholesterolemia: The Munich Experience. *Atherosclerosis Supplements*, 10(5).
- Kellogg, R. M., & Hester, J. P. (1988). Kinetics modeling of plasma exchange: Intra- and post-plasma exchange. *Journal of clinical apheresis*, 4(4), 183-187.
- Klingel, R., Fassbender, C., Fassbender, T., Erdtracht, B., & Berrouschot, J. (2000). Rheopheresis: rheologic, functional, and structural aspects. *Therapeutic Apheresis*, 4(5), 348-357.
- Koga, N., & Iwata, Y. (1991). Pathological and angiographic regression of coronary atherosclerosis by LDL-apheresis in a patient with familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*, 90(1), 9-21.
- Kojima, S., Ogi, M., Yoshitomi, Y., Kuramochi, M., Ikeda, J., Naganawa, M., & Hatakeyama, H. (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., Tomlinson, T., Pierce, J., & Gattinoni, L. (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., Fink, E., Bönner, G., You, H., & Eisenhauer, T. (1995). Anaphylactoid reactions during haemodialysis in sheep are associated with bradykinin release. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 10(4), 509-513.
- Krieter, D. H., Grude, M., Lemke, H.-D., Fink, E., Bönner, G., Schölkens, B. A., . . . Müller, G. A. (1998). Anaphylactoid reactions during hemodialysis in sheep are ACE inhibitor dose-dependent and mediated by bradykinin. *Kidney international*, 53(4), 1026-1035.
- Krieter, D. H., Hackl, A., Rodriguez, A., Chenine, L., Moragues, H. L., Lemke, H.-D., . . . Canaud, B. (2010). Protein-bound uraemic toxin removal in haemodialysis and post-dilution haemodiafiltration. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 25(1), 212-218.
- Krieter, D. H., & Lemke, H.-D. (2011). Abschnitt: „Polyethersulfone as a high-performance membrane“ aus dem Buch: *High-Performance Membrane Dialyzers* (Vol. 173, pp. 130-136): veröffentlicht durch: Karger Publishers.
- Krieter, D. H., Morgenroth, A., Barasinski, A., Lemke, H.-D., Schuster, O., von Harten, B., & Wanner, C. (2006). Effects of a polyelectrolyte additive on

- the selective dialysis membrane permeability for low-molecular-weight proteins. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 22(2), 491-499.
- Krieter, D. H., Steinke, J., Kerkhoff, M., Fink, E., Lemke, H. D., Zingler, C., . . . Schuff-Werner, P. (2005). Contact Activation in Low-density Lipoprotein Apheresis Systems. *Artificial organs*, 29(1), 47-52.
- Lund-Katz, S., Liu, L., Thuahnai, S. T., & Phillips, M. C. (2003). High density lipoprotein structure. *Front. Biosci*, 8, d1044-d1054.
- Mabuchi, H., Koizumi, J., Shimizu, M., Kajinami, K., Miyamoto, S., Ueda, K., & Takegoshi, T. (1998). Long-term efficacy of low-density lipoprotein apheresis on coronary heart disease in familial hypercholesterolemia. *The American journal of cardiology*, 82(12), 1489-1495.
- Mackness, M. I., & Walker, C. H. (1988). Multiple forms of sheep serum A-esterase activity associated with the high-density lipoprotein. *Biochemical Journal*, 250(2), 539-545.
- Matsuda, Y., Malchesky, P. S., & Nose, Y. (1996). Low-Density Lipoprotein Removal Methods by Membranes and Future Perspectives. *Artificial organs*, 20(4), 346-354.
- Matsuda, Y., Sueoka, A., & Nose, Y. (1995). An effective LDL removal filter for the treatment of hyperlipidemia. *Artificial organs*, 19(2), 129-134.
- McDonogh, R., Bauser, H., Stroh, N., & Chmiel, H. (1990). Concentration polarisation and adsorption effects in cross-flow ultrafiltration of proteins. *Desalination*, 79(2-3), 217-231.
- Mednikov, R. V., Rabinovich, V. I., Kizlo, S. N., Belyakov, N. A., & Sokolov, A. A. (2016). Double Filtration Plasmapheresis in Treatment of Patients With Co-Infection of Hepatitis C and Human Immunodeficiency Virus. *Therapeutic Apheresis and Dialysis*, 20(4), 413-419.
- Nakaji, S., & Yamamoto, T. (2002). Membranes for therapeutic apheresis. *Therapeutic Apheresis and Dialysis*, 6(4), 267-270.
- Nichols, M., Townsend, N., Scarborough, P., & Rayner, M. (2013). Cardiovascular disease in Europe: epidemiological update. *European Heart Journal*, 34(39), 3028-3034.
- Oliver, M., Coton, T., Ragot, C., Chianea, D., Moalic, J., & Debonne, J. (2004). *Cryoglobulins: detection, type determination and quantitation. A study of healthy subjects and patients with chronic hepatitis C*. Paper präsentiert auf der Konferenz Annales de biologie clinique.
- Pulido, J. S., & Group, M. I. o. R. f. A. S. (2002). Multicenter prospective, randomized, double-masked, placebo-controlled study of Rheopheresis to treat nonexudative age-related macular degeneration: interim analysis. *Transactions of the American Ophthalmological Society*, 100, 85.

- Reverberi, R., & Reverberi, L. (2007). Removal kinetics of therapeutic apheresis. *Blood Transfusion*, 5(3), 164.
- Schaefer, E. J., Genest, J. J., Ordovas, J. M., Salem, D. N., & Wilson, P. W. (1994). Familial lipoprotein disorders and premature coronary artery disease. *Atherosclerosis*, 108, S41-S54.
- Schmer, G., Teng, L., Cole, J., Vizzo, J., Francisco, M., & Scribner, B. (1976). Successful use of a totally heparin grafted hemodialysis system in sheep. *Trans Am Soc Artif Intern Organs*, 22(654), 1976.
- Schneditz, D., Putz-Bankuti, C., Ribitsch, W., & Schilcher, G. (2012). Correction of plasma concentrations for effects of hemoconcentration or hemodilution. *ASAIO journal (American Society for Artificial Internal Organs : 1992)*, 58(2), 160-162.
- Sepowitz, A. H., Chien, S., & Smith, F. R. (1981). Effects of lipoproteins on plasma viscosity. *Atherosclerosis*, 38(1-2), 89-95.
- Stefanutti, C., Isacchi, G., Antonini, R., Bucci, A., Cardillo, A., Di Nucci, G., . . . Mazarella, B. (1988). Selective continuous removal of low density lipoproteins by dextran sulfate cellulose column adsorption apheresis in the therapy of familial hypercholesterolemia. *Beiträge zur Infusionstherapie= Contributions to infusion therapy*, 23, 172.
- Stefanutti, C., Morozzi, C., Perrone, G., Di Giacomo, S., Vivencio, A., & D'Alessandri, G. (2012). The lipid-and lipoprotein-[LDL-Lp (a)] apheresis techniques. Updating. *Il giornale di chirurgia*, 33(11/12), 444-449.
- Stoffel, W., Borberg, H., & Grepe, V. (1981). Application of specific extracorporeal removal of low density lipoprotein in familial hypercholesterolemia. *Lancet*, 318, 1005-1007.
- Suzuki, M., Yamane, S., Matsugane, T., Nobuto, T., Azuma, N., Nishideu, T., . . . Nose, Y. (1996). Evaluation of Double Filtration Plasmapheresis, Thermofiltration, and Low-Density Lipoprotein Adsorptive Methods by Crossover Test in the Treatment of Familial Hypercholesterolemia Patients. *Artificial organs*, 20(4), 296-302.
- Swartz, M., & Rabetoy, G. (1999). *Treatment of non-exudative age-related macular degeneration using membrane differential filtration apheresis*. Paper präsentiert auf der Konferenz Investigative Ophthalmology & Visual Science.
- Takada, S., Shimizu, T., Hadano, Y., Matsumoto, K., Kataoka, Y., Arima, Y., . . . Sorano, S. (2012). Cryoglobulinemia. *Molecular medicine reports*, 6(1), 3-8.
- Takesawa, S., Ohmi, S., Konno, Y., Sekiguchi, M., Shitaokoshi, S., Takahashi, T., . . . Sakai, K. (1987). Varying methods of sterilisation, and their effects on

- the structure and permeability of dialysis membranes. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 1(4), 254-257.
- Thompson, G. R. (2008). Recommendations for the use of LDL apheresis. *Atherosclerosis*, 198(2), 247-255.
- Thompson, G. R., Barbir, M., Davies, D., Dobral, P., Gesinde, M., Livingston, M., . . . Watkins, S. (2010). Efficacy criteria and cholesterol targets for LDL apheresis. *Atherosclerosis*, 208(2), 317-321.
- Tielemans, C., Madhoun, P., Lenaers, M., Schandene, L., Goldman, M., & Vanherweghem, J. L. (1990). Anaphylactoid reactions during hemodialysis on AN69 membranes in patients receiving ACE inhibitors. *Kidney international*, 38(5), 982-984.
- Trudell, L. A. B., L.; Van De Water, J. M.; Jauregui, H.; Richardson, P. D.; Galletti, P. M. (1978). Alcohol-treated PTFE vascular grafts *Transactions - American Society for Artificial Internal Organs*., 24(1), 320-323.
- von Eckardstein, A., Huang, Y., & Assmann, G. (1994). Physiological role and clinical relevance of high-density lipoprotein subclasses. *Current Opinion in Lipidology*, 5(6), 404-416.
- Yamamoto, A., Yokoyama, S., Satani, M., Kikkawa, T., & Kishino, B.-i. (1988). Evaluation of selective LDL-removal in the treatment of familial hypercholesterolemia: double membrane filtration and adsorption system. *Progress in clinical and biological research*, 255, 357.
- Yeh, J.-H., & Chiu, H.-C. (2000). Comparison between double-filtration plasmapheresis and immunoabsorption plasmapheresis in the treatment of patients with myasthenia gravis. *Journal of neurology*, 247(7), 510-513.
- Zborowski, M., & Malchesky, P. (1990). Pore size and temperature effects in membrane separation of albumin from immunoglobulins. *ASAIO transactions*, 36(3), M730-733.

6 Anhang

6.1 Auflistung aller verwendeten Materialien

Tabelle 7 gibt einen Überblick über die in dieser Studie verwendeten Materialien mit den dazugehörigen Serien- und gegebenenfalls Lotnummern.

Tabelle 7: Auflistung aller verwendeten Materialien

Material	Hersteller	Seriennummer	Lotnummer
Mikrozentrifuge (Z233M-2)	Hermle Labortechnik GmbH, Wehingen, Deutschland	51060115	keine Lotnummer
Apheresemaschine: HF 440	Infomed SA, Les Acacias, Schweiz	0443-012	keine Lotnummer
Cobas b123	Roche Diagnostics AG, Rotkreuz, Schweiz	1054	keine Lotnummer
Cobas b123 Fluid Pack COOX	Roche Diagnostics AG, Rotkreuz, Schweiz	1048249	21456333
Cobas c111	Roche Diagnostics AG, Rotkreuz, Schweiz	1190	keine Lotnummer
IgG ELISA Kit	Alpha Diagnostic Intl. Inc., San Antonio, Texas, USA	7620	151216K6

Material	Hersteller	Seriennummer	Lotnummer
Plasmafilter Plascure	3M Deutschland GmbH, Neuss, Deutschland	86052324	309914324
Plasmafraktionator EvafluxTM	Kawasumi, Tokyo, Japan	5A20	141216
Plasmafraktionator FPESa	3M Deutschland GmbH, Neuss, Deutschland	Testmodul	301215118
Plasmafraktionator FPESb	3M Deutschland GmbH, Neuss, Deutschland	Testmodul	301615131
Plasmafraktionator FPESb	3M Deutschland GmbH, Neuss, Deutschland	Testmodul	301715132
zentralvenöser Doppellumen- Katheter (11 French)	Achim Schulz- Lauterbach, Iserlohn, Deutschland	DL 11/20 - 50256	766639
Extrakorporales Schlauchsystem	Infomed SA, Les Acacias, Schweiz	TU-306-11	22383015
Blutmonovetten	Sarstedt AG, Nürnberg, Deutschland	03.1524	7032311
Natriumcitrat (1M)	VWR International, Radnor, USA	27833.237	11L160024
Calciumchlorid (0,833M)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	Ca3306	SLBB1939V

Material	Hersteller	Seriennummer	Lotnummer
Scandicain 2 %	AstraZeneca, London, UK	00910860	2319Z
Infusions- und Spüllösung: 2000 ml Beutel isotonische NaCl-Lösung	Perfuflac, B.Braun, Melsungen, Deutschland	6900347.00.00	1165014

6.2 Performance der Plasmafraktionatoren

Tabelle 8 bis Tabelle 11 geben einen Überblick über die Performance der Plasmafraktionatoren mit jeweils n = 4.

Tabelle 8: Performance des Plasmafraktionators FPESa (SD: Standardabweichung)

n = 4	Prä- Apherese	SD Prä- Apherese	Post- Apherese	SD Post- Apherese	Reduktion in %	SD Reduktion
LDL	15,9 mg/dl	± 4,7	5,5 mg/dl	± 1,1	60,6	± 6,9
HDL	35,1mg/dl	± 11,6	19,4 mg/dl	± 6,3	39,1	± 3,9
IgG	14,4 g/l	± 1,5	8,2 g/l	± 3,1	38,2	± 17,9
Cholesterin	1,3 mmol/l	± 0,3	0,7 mmol/l	± 0,1	39,2	± 7,6
Triglyceride	0,3mmol/l	± 0,1	0,0 mol/l	± 0,0	86,9	± 13,4
Albumin	28,8 g/l	± 2,2	19,8 g/l	± 2,7	24,3	± 10,3
Fibrinogen	76,6 mg/dl	± 18,2	32,8 mg/dl	± 9,0	53,3	± 3,1

Tabelle 9: Performance des Plasmafraktionators FPESb (SD: Standardabweichung)

n = 4	Prä-Apherese	SD Prä-Apherese	Post-Apherese	SD Post-Apherese	Reduktion in %	SD Reduktion
LDL	9,3 mg/dl	± 2,3	4,0 mg/dl	± 1,4	57,8	± 2,1
HDL	26,5 mg/dl	± 5,5	15,3 mg/dl	± 4,0	42,0	± 7,5
IgG	16,4 g/l	± 5,3	9,1 g/l	± 3,2	43,7	± 9,3
Cholesterin	1,0 mmol/l	± 0,1	0,6 mmol/l	± 0,1	37,8	± 7,4
Triglyceride	0,2 mmol/l	± 0,0	0,0 mmol/l	± 0,0	90,5	± 4,4
Albumin	25,1 g/l	± 1,3	17,5 g/l	± 0,4	29,3	± 5,8
Fibrinogen	61,9 mg/dl	± 6,7	25,4 mg/dl	± 3,5	58,5	± 2,6

Tabelle 10: Performance des Plasmafraktionators FPESc (SD: Standardabweichung)

n = 4	Prä-Apherese	SD Prä-Apherese	Post-Apherese	SD Post-Apherese	Reduktion in %	SD Reduktion
LDL	16,0 mg/dl	± 7,9	5,9 mg/dl	± 2,8	63,8	± 6,6
HDL	33,2 mg/dl	± 9,0	17,8 mg/dl	± 4,4	48,2	± 2,4
IgG	15,6 g/l	± 2,5	6,8 g/l	± 0,6	57,4	± 3,4
Cholesterin	1,2 mmol/l	± 0,4	0,6 mmol/l	± 0,2	52,5	± 5,5
Triglyceride	0,2 mmol/l	± 0,1	0,0 mmol/l	± 0,0	60,7	± 35,5
Albumin	29,6 g/l	± 2,7	20,5 g/l	± 1,8	33,2	± 3,5
Fibrinogen	79,7 mg/dl	± 14,3	34,3 mg/dl	± 6,0	58,3	± 3,0

Tabelle 11: Performance des Plasmafraktionators Evaflex™ 5A20 (SD: Standardabweichung)

n = 4	Prä-Apherese	SD Prä-Apherese	Post-Apherese	SD Post-Apherese	Reduktion in %	SD Reduktion
LDL	19,7 mg/dl	± 10,4	7,0 mg/dl	± 3,2	60,7	± 2,0
HDL	29,7 mg/dl	± 6,0	17,4 mg/dl	± 4,9	36,3	± 8,4

n = 4	Prä-Apherese	SD Prä-Apherese	Post-Apherese	SD Post-Apherese	Reduktion in %	SD Reduktion
IgG	15,0 g/l	± 4,5	7,7 g/l	± 2,2	45,1	± 17,2
Cholesterin	1,3 mmol/l	± 0,2	0,7 mmol/l	± 0,1	39,7	± 4,2
Triglyceride	0,2 mmol/l	± 0,0	0,0 mmol/l	± 0,0	77,5	± 17,1
Albumin	26,8 g/l	± 0,6	17,9 g/l	± 2,0	26,5	± 12,5
Fibrinogen	93,0 mg/dl	± 35,9	39,9 mg/dl	± 15,2	52,7	± 5,6

6.3 S_K (IgG, Albumin und Fibrinogen) vs. TMP

Abbildung 19 bis Abbildung 21 zeigen die restlichen Auftragungen der Siebkoeffizienten (IgG, Albumin und Fibrinogen) gegen den transmembranösen Druck (keine signifikante Korrelation).

Abbildung 19: SK IgG vs. TMP: keine signifikante Korrelation

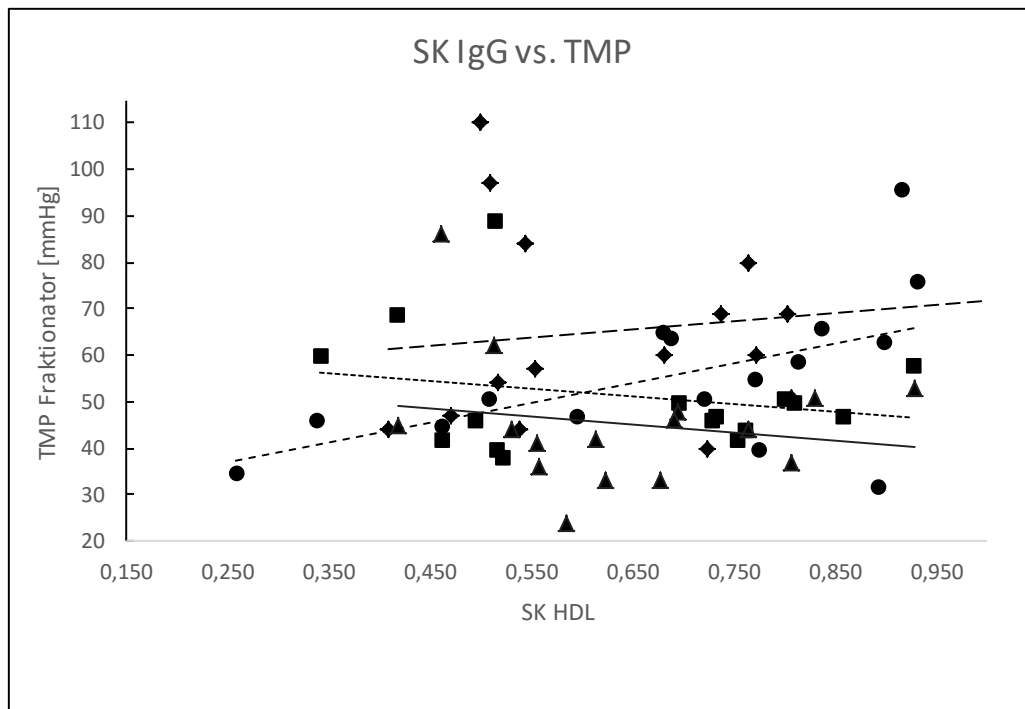


Abbildung 20: SK Albumin vs. TMP: keine signifikante Korrelation

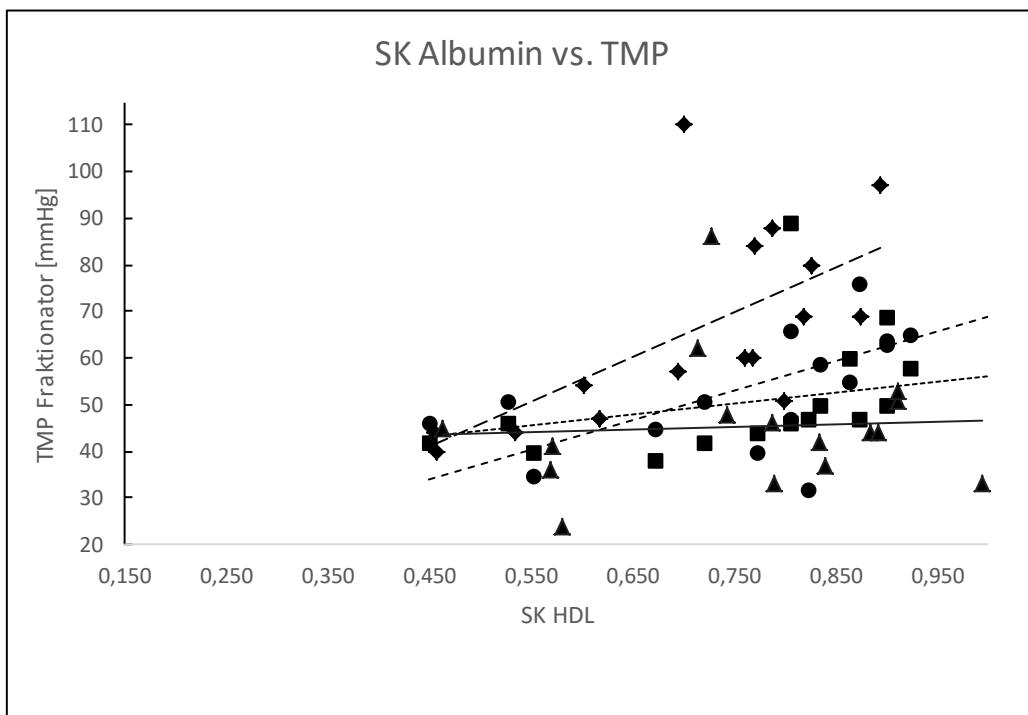
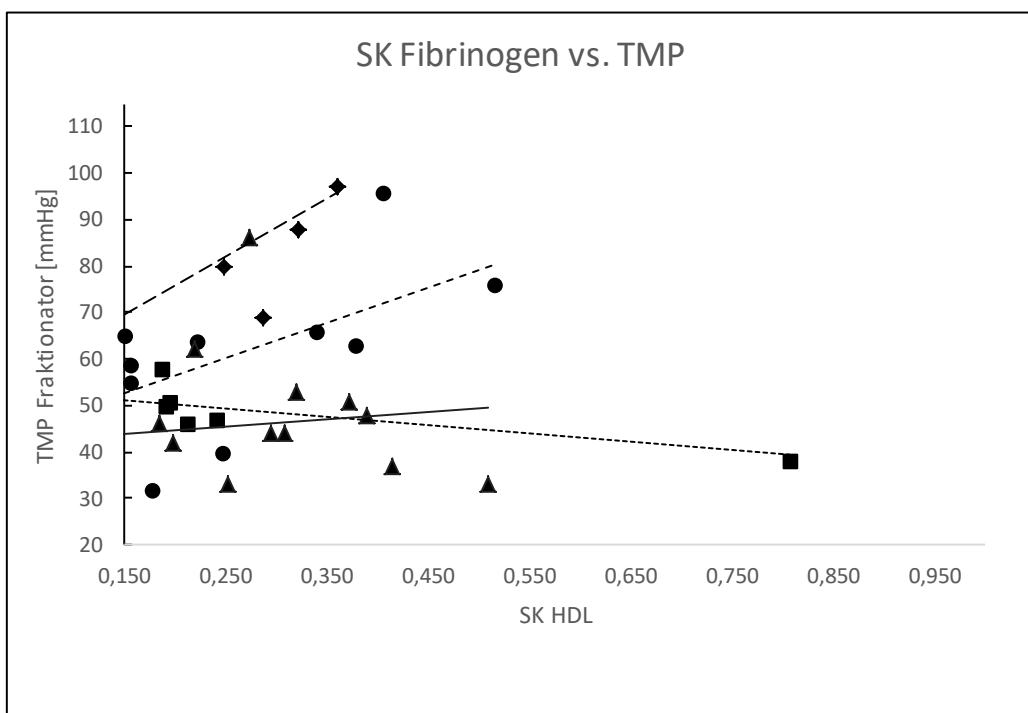


Abbildung 21: SK Fibrinogen vs. TMP: keine signifikante Korrelation



6.4 Abkürzungsverzeichnis

Ca	Konzentration im afferenten Blut
Cf	Konzentration im Filtrat
Cpost	Post-Interventions-Konzentration und
Cpre	Prä-Interventions-Konzentration bezeichnet
Cpost-corr	Korrigierte Postinterventions-Konzentration
DALI	direkte Adsorption von Lipoproteinen
DFPP	Doppelfiltrationsplasmapherese
DSA	Dextran-Sulfat-Cellulose-Adsorption
EVAL	Evaflex™
ECMO	Extrakorporale Membranoxygenierung
FH	Familiäre Hypercholesterinämie
FPES	FractioPES
HDL	High-density-lipoprotein
HELP	Heparin-induzierte extrakorporale LDL-Präzipitation
hp	Hämokonzentration
Hpost	Post-Interventionshämatokrit
Hpre	Prä-Interventionshämatokrit
IgG / IGM	Immunglobulin G/M
KHK	Koronare Herzkrankheit
LDL	Low-density-lipoprotein
PES	Polyethersulfon
PVP	Poly-Vinyl-Pyrrolidon
PTT	Partielle Thromboplastinzeit
SD	Standard deviation = Standardabweichung
S _K	Siebkoefizient
TMP	Transmembrane pressure = Transmembranöser Druck

Danksagung

Mein erster Dank gilt Herrn PD Dr. D. Krieter für die Einarbeitung und Unterstützung bei der Durchführung der Versuche sowie für die konstruktive Kritik bei der Erstellung der Dissertation.

Mein Dank gilt all denen die moralische Unterstützung geleistet haben, hier vordringlich meinen Eltern Ursula und Gerhart Lange, sowie insbesondere auch Jannika Reitz.