Universitätsklinikum Ulm

Klinik für Herz-, Thorax- und Gefäßchirurgie

Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. Andreas Liebold

Intraoperative Bestimmung des Blutplasmavolumens von herzchirurgischen Patienten zur Steuerung der Antikoagulation: Untersuchung neuer Ansätze und Methodenvergleich

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

vorgelegt von

Gerrit Detlef Nannen

Sigmaringen

2023

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Thomas Wirth

1. Berichterstatter: PD Dr. Markus Hönicka

2. Berichterstatter: PD Dr. med. Simone Kagerbauer

Tag der Promotion: 16.01.2025

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis III

1 Einleitung 1

2 Material und Methoden 5

2.1 Labormaterial 5

2.2 Stammlösungen 6

2.3 Probenmaterial 7

2.4 Ethikvotum 8

2.5 Verwendete Messverfahren 8

2.6 Versuchsaufbau 13

2.7 Datenverarbeitung und statistische Auswertung 16

3 Ergebnisse 20

3.1 Extinktionswerte der Verdünnungsstufen in den vier Messverfahren 20

3.2 Regressionsanalyse 22

3.3 Ermittelte Blutplasmavolumina (BPV) 24

3.4 Bland-Altman-Analyse der Differenzen der Blutplasmavolumina 28

3.5 Standardabweichungen 31

3.6 Fehlerberechnung weitere Methoden 32

4 Diskussion 34

4.1 Bewertung der untersuchten Protein-Nachweismethoden 34

4.2 Weitere Methoden zur Bestimmung des Verdünnungsfaktors 37

4.3 Einordnung 38

4.4 Limitierungen 40

4.5 Schlussfolgerungen 40

5 Zusammenfassung 42

6 Literaturverzeichnis 44

7 Anhang 52

7.1 Berechnung des Blutplasmavolumens (BPV) 52

7.2 Chargennummern der Serumproben 54

8 Danksagung 55

9 Lebenslauf 56

Abkürzungsverzeichnis

ACT:	activated clotting time
BPV:	Blutplasmavolumen
DPBS:	Dulbecco’s Phosphate Buffered Saline
EKZ:	Extrakorporale Zirkulation
HLM:	Herz-Lungen-Maschine
ICG:	Indocyaningrün
PoC:	Point of Care
TBV:	Totales Blutvolumen

1 Einleitung

Bei zahlreichen etablierten herzchirurgischen Operationsverfahren ist eine temporäre Kardioplegie indiziert. Dieses Verfahren ermöglicht die Durchführung von Operationsschritten am nicht schlagenden Herzen. Zudem ist bei der Eröffnung einer Herzhöhle eine weitgehende Blutleere wünschenswert.

Unkontrolliert hat ein Herzstillstand einen Stillstand der Blutzirkulation zur Folge. Eine fehlende Blutversorgung führt insbesondere bei Organen mit geringer Ischämietoleranz, wie dem Gehirn, innerhalb weniger Minuten zu irreversiblen Schäden.

Zur Vermeidung von Ischämieschäden während der Kardioplegie wird eine Herz-Lungen-Maschine (HLM) eingesetzt. Die extrakorporale Zirkulation (EKZ) gewährleistet die Blutzirkulation, Oxygenierung und Decarboxylierung des Blutes auch während der Kardioplegie. Die HLM besteht aus einem Reservoir, einer Pumpe, einem Oxygenator, Filtern, einem Entschäumer und einem Wärmetauscher. Bei einigen Systemen besteht die Möglichkeit über ein zusätzliches Reservoir intraoperativ mit einem Sauger Blut aufzunehmen und für eine autologe Transfusion aufzubereiten. Einige Systeme beinhalten intraluminal mit Heparin beschichtete Schläuche. Detaillierte Informationen zum Aufbau einer HLM finden sich in der einschlägigen Fachliteratur [22, 61].

Vor dem Einsatz und Anschluss der HLM wird das System mit Flüssigkeit vorgefüllt, um es zu entlüften. Dieser Vorgang ist unter dem Begriff „Priming“ bekannt. Je nach System und Klinik werden unterschiedliche Flüssigkeitsvolumina verwendet. In konventionellen Systemen sind es bis zu 2000 ml, in minimierten Systemen bis zu 450 ml [50]. Für die Herstellung der Priming-Lösungen werden in Abhängigkeit von den Klinikstandards verschiedene Mischungsverhältnisse von Infusionslösungen eingesetzt. Der Hauptbestandteil der Priming-Lösung ist entweder eine kristalloide oder eine kolloidale Infusionslösung. Außerdem wird Heparin zur Antikoagulation und in einigen Kliniken ein Puffer wie Natriumbikarbonat zugesetzt. Weitere medikamentöse Zusätze (z. B. Antifibrinolytika) können ebenfalls variieren [50].

Beim Start der EKZ führt die Mischung des Patientenbluts mit der Priming-Flüssigkeit zu einer Hämodilution.

Beim Einsatz einer HLM kommt das Blut mit Fremdoberflächen im Inneren der HLM in Kontakt. Neben den Effekten auf andere Blutbestandteile aktiviert dieser Kontakt das Gerinnungssystem mitsamt dem Fibrinolyse-System. Daher ist zur Prophylaxe von Komplikationen, wie Thrombenbildung in der HLM oder verstärkte Blutungen, eine wirksame Antikoagulation und eine Fibrinolyse-Hemmung erforderlich. Für die Antikoagulation wird standardmäßig Heparin eingesetzt. Die initiale Dosierung beträgt 300–400 Internationale Einheiten (IE) Heparin pro Kilogramm Körpergewicht. Die Antikoagulation wird klinisch durch die regelmäßige Messung der „activated clotting time“ (ACT) kontrolliert und bei Bedarf angepasst. Der ACT-Zielwert beträgt intraoperativ 400–600 Sekunden [17].

Nach Beendigung der EKZ wird die Heparin-Wirkung durch die Applikation des Heparin-Antagonisten Protamin, der freies Heparin komplexiert, terminiert [43]. In vitro wird eine Einheit Heparin mit einer Einheit Protamin antagonisiert. In vivo ist bei der Dosierung jedoch zu berücksichtigen, dass im Körper das Heparin dosis- und zeitabhängig eliminiert wird. Protamin hat in hohen Dosen ebenfalls eine intrinsische gerinnungshemmende Wirkung [43, 63], was bei einer ungewollten Überdosierung zu erhöhten Blutverlusten, die klinisch denen einer verbleibenden Heparin-Wirkung ähneln, führt [28, 29]. Auch die Antagonisierung mit Protamin wird klinisch über die Kontrolle der ACT gesteuert und bei Bedarf angepasst. Bei einer unerkannten Protamin-Fehldosierung führt diese Titration jedoch zu einem relevanten Zeitverlust mit der Gefahr eines erhöhten Blutverlustes durch eine verbleibende Heparin-Restwirkung oder Protamin-Überdosierung [25, 39, 63]. Laut einer Metaanalyse von Rasoli et al. lässt sich mit einem Verhältnis von einer Einheit Heparin zu 0,86 Einheiten Protamin ausgehend von der letzten ACT-Messung die gewünschte Wirkung erzielen [52]. In einer Arbeit von Hoenicka et al. lag das Verhältnis bei 0,73 [28].

Zur Umgehung der oben erläuterten Problematik bei der Dosierung von Heparin und Protamin besteht die Möglichkeit mittels Point-of-Care-(PoC)-Laborsystemen, wie dem Hämostase-Managementsystem „HMS Plus“ der Firma Medtronic (Minneapolis, USA), rasch mehrere für die individualisierte Heparin- und Protamin-

Dosierung wichtige Einflussgrößen zu bestimmen [3, 19, 20, 28, 40, 49, 53]. Das System führt hierbei die folgenden Messungen im Patientenblut durch: Heparin-Dosis-Wirkungskurve, aktueller ACT-Wert und aktuelle Heparin-Konzentration [10, 61]. Die Bestimmung der Heparin-Dosis-Wirkungskurve ist notwendig, da sich im Verlauf der EKZ durch Absättigung der Heparin-Bindungsstellen die Dosis-Wirkungsbeziehung des Heparins verändert [17]. Anhand dieser Größen kann der Behandler die Dosierung von Heparin und am Ende der EKZ die Dosierung von Protamin berechnen. In klinischen Erprobungen erwies sich die Anwendung des beschriebenen Systems bezüglich der Endpunkte des postoperativen Blutverlustes und der Transfusionswahrscheinlichkeit nicht durchgängig als vorteilhaft [3, 19]. Hoenicka et al. wiesen jedoch eine signifikante Reduktion des postoperativen Blutverlustes zwölf Stunden postoperativ nach [28]. Bei der Anwendung des PoC-Systems in der Pädiatrie scheinen die Vorteile laut aktueller Literatur deutlicher. Machovec et al. fanden in dieser Klientel eine signifikante Reduktion der Transfusionswahrscheinlichkeit [40].

Für die Berechnung der benötigten Dosierungen aus einer in vitro gemessenen Dosis-Wirkungskurve ist das Verteilungsvolumen des Medikaments erforderlich. Eine Methode zur genauen, patientenindividuellen Bestimmung dieses Parameters fehlt aktuell. Die Etablierung einer solchen Methode könnte jedoch ein wichtiger Schritt für eine genauere perioperative Steuerung der Hämostase sein.

Der aktuelle Standard, auch bei der Anwendung des Hämostase-Managementsystem HMS Plus, ist die Dosierung von Heparin und Protamin auf der Grundlage einer biometrischen Abschätzung des Blutvolumens nach Allen et al. [2, 45]. Dieser Ansatz berücksichtigt jedoch keine individuellen Varianzen dieses Parameters. Verschiedene Publikationen belegen eine klinisch relevante Ungenauigkeit bei der Anwendung dieser Methodik [26, 29, 38, 46, 63].

Fragestellung der vorliegenden Arbeit

In der vorliegenden Arbeit soll mittels einfach durchzuführender Verfahren zur Bestimmung der Albumin- und Gesamtproteinkonzentration im Serum das individuelle Blutplasmavolumen (BPV) im Rahmen der EKZ bestimmt werden. Die einfache Methodik (Photometrie) zielt auf eine spätere PoC-Nutzung in der Klinik

ab. Das Ziel dieser Arbeit ist die Beantwortung der Frage, welche der untersuchten Verfahren als PoC-Methode für die Bestimmung des BPV im Rahmen einer EKZ grundsätzlich geeignet sind.

2 Material und Methoden

2.1 Labormaterial

- **Steckplatine Datensammlung:** PCI Express 2x RS232, Produktnummer PCI2S550, StarTech.com Ltd., Siriusdreef 17-27, 2132 WT Hoofddorp, Niederlande
- **Spektrophotometer:** Ultrospec 3000, Modell 80-20106-20, Pharmacia Biotech AB, S-75182 Uppsala, Schweden
- **Küvetten:** Quarzglas, Füllvolumen 1000 µl, Halbmikro, Typ 108-QS, Hellma GmbH & Co. KG, Klosterrunsstraße 5, 79379 Müllheim
- **Reaktionsgefäße:** Polypropylen, Füllvolumen 500 µl, 1000 µl, 1500 µl, Eppendorf Tubes, Eppendorf AG, 22331 Hamburg
- **Versuchsreagenz BioRad:** Protein Assay Dye Reagent Concentrate, Bio-Rad Laboratories Inc., 1000 Alfred Nobel Drive Hercules, CA 94547 USA
- **Methylorange Indikatorlösung:** 0,1 % in Wasser, Carl Roth GmbH + Co. KG, Schoemperlenstraße 3-5, 76185 Karlsruhe
- **Bromkresolgrün Natriumsalz:** ACS, Carl Roth GmbH + Co. KG, Schoemperlenstraße 3-5, 76185 Karlsruhe
- **Ethanol:** >99,8 %, Carl Roth GmbH + Co. KG, Schoemperlenstraße 3-5, 76185 Karlsruhe
- **Jonosteril:** 1000 ml Infusionslösung, Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Else-Kröner-Str. 1, 61346 Bad Homburg
- **Mannitol 15%:** 330 ml Infusionslösung, Baxter Deutschland GmbH, Edisonstraße 4, 85716 Unterschleißheim
- **HAES-steril 6%:** Hydroxyethylstärke 200/0,5 Infusionslösung, Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Else-Kröner-Str. 1, 61346 Bad Homburg
- **Heparin:** Heparin-Natrium 5000 IE in 0,2 ml, PZN: 03170642, ratiopharm GmbH, Graf-Arco-Str. 3, 89079 Ulm

- **Citronensäure:** 99,5 %, wasserfrei, reinst, Carl Roth GmbH + Co. KG, Schoemperlenstraße 3-5, 76185 Karlsruhe
- **Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS):** (1 X), Gibco 14190250, Life Technologies Ltd., 3 Fountain Drive, Inchinnan Business Park, Paisley PA49RF, Scotland, United Kingdom
- **Software zur Datensammlung**: Datalyse, Version 3.4, Carl Hemmingsen, Borgmestervænget 22 3600 Frederikssund, Dänemark
- **Statistik-Software:** R 4.2.1, The R Foundation for Statistical Computing, Institute for Statistics and Mathematics, Wirtschaftsuniversität Wien, Welthandelsplatz 1, 1020 Vienna, Austria. Verwendete Pakete: BlandAltmanLeh 0.3.1, ggplot2 3.4.0, dplyr 1.0.10, haven 2.5.1, readr 2.1.2, psych 2.3.6, easyGgplot2 3.4.2, blandr 0.5.1
- **Statistik-Entwicklungsumgebung:** RStudio Desktop 2022.07.2+576, 250 Northern Ave, Boston, MA 02210, USA

2.2 Stammlösungen

Coomassie-Blau

Ansatz der Stammlösung aus dem Versuchsreagenz BioRad „Protein Assay Dye Reagent Concentrate" nach Herstellervorgaben. Hierzu wurden 140 ml des Reagenzes mit 560 ml destilliertem Wasser vermengt. Die Lagerung erfolgte bei Raumtemperatur.

Methylorange

Ansatz der Stammlösung nach Keyser [31]. Hierzu wurden 100 ml 1M NaOH-Lösung mit 400 ml destilliertem Wasser vermengt, um eine 0,2M NaOH-Lösung herzustellen. Daraufhin wurden in dieser Lösung 10,504 Gramm Citronensäure gelöst. Einstellen der Lösung auf einen pH-Wert von 3,5 mittels Titration mit 0,1M HCl-Lösung. Hierzu wurden 330 ml Volumen benötigt.

594 ml dieser Lösung werden mit 6 ml 0,1% Methylorange-Farbstoff gemischt. Die Lagerung erfolgte bei Raumtemperatur.

Bromkresolgrün

Ansatz der Stammlösung nach Rodkey [59]. Hierzu wurden 0,432 Gramm Bromkresolgrün-Natriumsalz in 1 Liter destilliertem Wasser gelöst. Als Puffer wurden 5,308 Gramm KH_2PO_4 und 8,66 Gramm Na_2HPO_4 in 1 Liter destilliertem Wasser gelöst. Die Stammlösung wurde erzeugt, indem 75 ml der Farblösung mit 500 ml der Pufferlösung gemischt und in einem Kolben mit destilliertem Wasser auf 1000 ml aufgefüllt wurde. Die Lagerung erfolgte bei Raumtemperatur.

Primingflüssigkeit

Ansatz der Primingflüssigkeit nach Standard der Klinik, wie bei Hönicka et al. publiziert [28]. Abweichend zur publizierten Variante wurde Jonosteril-Infusionslösung statt Ringer-Laktat-Infusionslösung verwendet, da sich in diesem Punkt der Standard verändert hatte. Hierzu wurden 100 ml 6%-Hydroxyethylstärke-Infusionslösung mit 100 ml Jonosteril-Infusionslösung und 50 ml 15%-Mannitol-Infusionslösung vermischt. Es erfolgte die Zugabe von 1000 internationalen Einheiten Heparin. Die Lagerung erfolgte bei Raumtemperatur.

2.3 Probenmaterial

Für die Experimente wurden 20 anonymisierte Blutserumproben von verschiedenen Blutspendern mit einem Volumen von je 10 bis 14 ml durch das Institut für klinische Transfusionsmedizin und Immungenetik des Universitätsklinikums Ulm (Helmholtzstraße 10, 89081 Ulm) zur Verfügung gestellt (Chargendokumentation siehe Anhang 7.2).

Die Versuchsseren lagen bei der Bereitstellung in sterilen Beuteln vor. Für die weitere Verwendung wurden die Proben unter kontrollierten Bedingungen unter einer Sterilbank in jeweils vier Aliquots zu 2 ml abgefüllt. Die jeweilige Restmenge

der Seren, 2 bis 6 ml je Probe, wurde gepoolt. Bei 20 Seren wurde so insgesamt ca. 72,5 ml Poolserum erzeugt.

In diesem Poolserum wurde der Referenzwert für die Albumin- und Totalproteinkonzentration im Zentrallabor der Universitätsklinik Ulm (System Cobas 8000, Test ALB2 [58] und TP2 [57], Roche, Grenzacherstraße 124, CH-4070 Basel, Schweiz) bestimmt. Die Lagerung der Seren erfolgte in einem Laborkühlschrank bei 4 °C.

2.4 Ethikvotum

Die Ethikkommission der Universität Ulm hat das Forschungsprojekt am 05.11.2018 zustimmend bewertet (Antrag 452/17).

2.5 Verwendete Messverfahren

Spektroskopie

Die Photometrie nutzt die Transmission von Licht, um die Konzentration von Zielmolekülen in Flüssigkeiten zu bestimmen. In einem Photometer wird Licht einer Wellenlänge durch eine mit der zu untersuchenden Flüssigkeit gefüllten Küvette mit bekannter Schichtdicke gestrahlt. Dabei wird die Intensität des durch die Flüssigkeit durchtretenden Lichts gemessen. Die Extinktion des Lichts wird logarithmisch aus dem Quotienten zwischen der Intensität des einfallenden Lichts und der Intensität des durch die Flüssigkeit hindurchtretenden Lichts ermittelt. Die Extinktion stellt damit das Maß der Abschwächung des Lichtes durch die untersuchte Flüssigkeit dar. Der Zusammenhang zwischen Extinktion, Schichtdicke und Konzentration der absorbierenden Substanz wird durch das Lambert-beersche Gesetz beschrieben [5, 36].

Die Spektroskopie ist eine Sonderform der Photometrie, bei der die Extinktion in einem Wellenlängenbereich anstatt bei einer einzigen Wellenlänge gemessen wird.

In vielen Fällen zeigt die zu untersuchende Probe keine ausreichende Extinktion im photometrisch messbaren Wellenlängenbereich. In diesen Fällen kann auf

Färbeverfahren basierend auf chemischen oder enzymgekoppelten Reaktionen zurückgegriffen werden.

Die Extinktion der Proben wurde in der vorliegenden Arbeit im ultravioletten (UV) und sichtbaren (Vis) Wellenlängenbereich (UV/Vis-Spektroskopie) gemessen. Die Proben wurden dazu in Halbmikro-Quarzküvetten mit einer Schichtdicke von 10 mm gegeben. Die Extinktion der Proben wurde im Spektralbereich von 200 nm bis 900 nm mit einer Auflösung von 1 nm bestimmt. Die Messungen innerhalb eines Versuchsansatzes erfolgten dabei immer unmittelbar hintereinander, um Abweichungen durch Unterschiede in der Ansatzdauer zu vermeiden.

Über eine Kalibrationskurve aus einer Verdünnungsreihe des Zielproteins mit bekannter Konzentration kann die Zielproteinkonzentration in einer Probe mit unbekannter Konzentration berechnet werden.

Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration mittels Coomassie-Blau

Das Verfahren zur Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration nach Bradford [8] basiert auf der Bindung des Farbstoffs Coomassie-Brilliant-Blau (Bradford Reagenz) an Proteine. Die Komplexbildung führt zu einer Verschiebung der maximalen Lichtabsorption von einer Wellenlänge von 465 nm zu einer Wellenlänge von 595 nm, die annähernd proportional zur Proteinkonzentration in der Probe ist. Im verwendeten Versuchsaufbau erfolgte die Messung der Extinktion bei einer Wellenlänge von 595 nm.

Protokoll

75 µl, 65 µl, 55 µl und 50 µl der Serumproben wurden in vier beschriftete Einmalreaktionsgefäße (Eppendorf) pipettiert. Anschließend wurden in dieselben Gefäße aufsteigende Volumina Priming-Flüssigkeit (0 µl, 10 µl, 20 µl und 25 µl) eingebracht und mit den Serumproben gemischt. Die so erzeugten Verdünnungsstufen (siehe Kapitel 2.5) hatten jeweils ein Endvolumen von 75 µl. In weiteren Gefäßen wurden zur weiteren Vorverdünnung je 10 µl der verdünnten Probe mit 990 µl Jonosteril gemischt. 1000 µl der vorbereiteten Reaktionslösung wurden in vier beschrifteten Reaktionsgefäßen vorgelegt. Zum Reaktionsstart

wurden in zügiger Abfolge 20 µl der verdünnten Proben der vier Verdünnungsstufen in die Gefäße mit der Reaktionslösung pipettiert und gemischt.

Nach einer Reaktionszeit von 15 Minuten wurde je 800 µl der Lösung in eine Quarzküvette umgefüllt. Mittels Photometer wurde die Extinktion gemessen. Jede Probe wurde dreimal neu angesetzt und gemessen. Für jede Serumprobe wurden Negativkontrollen mit denselben Schritten ohne Reaktionsflüssigkeit unter Volumenausgleich gemessen.

Direkte Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration mittels UV-Spektroskopie

Die UV-Spektroskopie nach Aitken und Ressler [1, 55] ist eine weitere Methode, die Proteinkonzentration in einer Probe zu bestimmen. Dieses Verfahren basiert auf der Absorption von UV-Licht der Wellenlänge 190 nm durch Proteinbindungen. Diese Absorption ist proportional zur Gesamtproteinkonzentration der Probe. Aufgrund von hohen Interferenzen und der geringen Leistung von Photometern in diesem Wellenlängenbereich, wird üblicherweise eine Extinktionsmessung bei einer Wellenlänge von 205 nm durchgeführt. Diese Wellenlänge wurde auch in der vorliegenden Arbeit verwendet.

Protokoll

75 µl, 65 µl, 55 µl und 50 µl der Serumproben wurden in vier beschriftete Einmalreaktionsgefäße (Eppendorf) pipettiert. Anschließend wurden in dieselben Gefäße aufsteigende Volumina Priming-Flüssigkeit (0 µl, 10 µl, 20 µl und 25 µl) eingebracht und mit den Serumproben gemischt. Die so erzeugten Verdünnungsstufen (siehe Kapitel 2.5) hatten jeweils ein Endvolumen von 75 µl. In weiteren Gefäßen wurden zu je 20 µl der verdünnten Probe 980 µl DPBS zugefügt (50-fache Verdünnung). Aus dieser Verdünnung wurden nochmals je 20 µl mit 980 µl DPBS in einem neuen Reaktionsgefäß gemischt (Verdünnung insgesamt 2500-fach).

Je 800 µl des Ansatzes wurden in eine Quarzküvette umgefüllt. Mittels Photometer wurde die Extinktion bei 205 nm gemessen. Jede Probe wurde dreimal neu angesetzt und gemessen. Für jede Probe wurden Blindproben gemessen.

Bestimmung der Albumin-Konzentration mittels gepuffertem Methylorange-Indikator

Diese Methode wurde erstmals von Bracken und Klotz [7] beschrieben und von Keyser [31] modifiziert. Das Messprinzip beruht auf der Eigenschaft von Methylorange als optischer pH-Indikator und der Beobachtung der Autoren, dass Albumin an kleine organische Anionen (z. B. Methylorange) bindet [32, 34].

Durch die unterschiedliche Protonierung des Methylorange-Moleküls bei unterschiedlichen pH-Werten kommt es zu einem Farbumschlag durch Verschiebung des Absorptionsmaximum von ca. 350 nm im sauren Bereich (pH < 3,1) bis zu 550 nm in Richtung des basischen Bereich (pH > 4,4) [60].

Die Indikatorlösung wird auf einen pH-Wert von 3,5 eingestellt, was dem pKs von Methylorange entspricht. Bei diesem pH-Wert liegt Methylorange als Puffersystem zu gleichen Teilen in seiner protonierten und deprotonierten Form vor. Bei Bindung von Albumin an das deprotonierte Methylorange-Anion wird zur Aufrechterhaltung des chemischen Gleichgewichts protoniertes Methylorange deprotoniert. Diese Konzentrationsänderung führt zu einem Farbumschlag. Die Intensität des Farbumschlags ist proportional zur Albumin-Konzentration in der Probe.

Die Messung der Extinktion erfolgte bei 550 nm. Bei dieser Wellenlänge sank die Extinktion mit steigender Proteinkonzentration.

Protokoll

75 µl, 65 µl, 55 µl und 50 µl der Serumproben wurden in vier beschriftete Einmalreaktionsgefäße (Eppendorf) pipettiert. Anschließend wurden in dieselben Gefäße aufsteigende Volumina Priming-Flüssigkeit (0 µl, 10 µl, 20 µl und 25 µl) eingebracht und mit den Serumproben gemischt. Die so erzeugten Verdünnungsstufen (siehe Kapitel 2.5) hatten jeweils ein Endvolumen von 75 µl. 1500 µl der vorbereiteten Reaktionslösung wurden in vier beschrifteten Reaktionsgefäßen vorgelegt. Zum Reaktionsstart wurden in zügiger Abfolge je 20 µl der Verdünnungsstufen in die vorbereiteten Gefäße mit der Reaktionslösung pipettiert und gemischt.

Je 800 µl der Ansätze wurden in eine Quarzküvette umgefüllt. Mittels Photometer wurde die Extinktion gemessen. Jede Probe wurde dreimal gemessen. Für jede Probe wurden Blindproben ohne Reaktionsflüssigkeit unter Volumenausgleich gemessen.

Bestimmung der Albumin-Konzentration mittels Bromkresolgrün-Indikator

Die Bestimmung der Albumin-Konzentration mittels Bromkresolgrün nach Rodkey [59] oder in modifizierten Varianten bei anderen pH-Werten [16] ist ein Standardverfahren. Das Messprinzip beruht wie die Bestimmung mit Methylorange auf der spezifischen Bindung des Bromkresolgrün-Anions an Albumin in einer gepufferten Lösung. Durch die Bindung an Albumin nimmt die Absorption bei 615 nm stark zu. Die Stärke dieser Absorptionsänderung ist annähernd proportional zur Albumin-Konzentration der Probe. Die Messung der Absorption erfolgte in der vorliegenden Untersuchung bei 600 nm. Die Extinktion sank mit steigender Proteinkonzentration.

Protokoll

75 µl, 65 µl, 55 µl und 50 µl der Serumproben wurden in vier beschriftete Einmalreaktionsgefäße (Eppendorf) pipettiert. Anschließend wurden in dieselben Gefäße aufsteigende Volumina Priming-Flüssigkeit (0 µl, 10 µl, 20 µl und 25 µl) eingebracht und mit den Serumproben gemischt. Die so erzeugten Verdünnungsstufen (siehe Kapitel 2.5) hatten jeweils ein Endvolumen von 75 µl. Jeweils 1000 µl der vorbereiteten Reaktionslösung wurden in vier beschrifteten Reaktionsgefäßen vorgelegt. Zum Reaktionsstart wurden in zügiger Abfolge je 10 µl der verdünnten Proben in eines der vorbereiteten Gefäße mit der Reaktionslösung pipettiert und gemischt.

800 µl der Lösung wurden in eine Quarzküvette umgefüllt. Mittels Photometer wurde die Extinktion gemessen. Jede Probe wurde dreimal gemessen. Für jede Probe wurden Blindproben ohne Reaktionsflüssigkeit unter Volumenausgleich gemessen.

2.6 Versuchsaufbau

Das Prinzip des Versuchsaufbaus beruht auf einer in vitro Nachbildung der Hämodilution, die in vivo zu Beginn der EKZ durch die Verdünnung des Blutes mit dem Priming-Volumen der HLM erfolgt. Hieraus resultiert ein Abfall der Proteinkonzentration im Blut. Aus dem Verhältnis der Ausgangskonzentration „C_1“ vor der Verdünnung und der Konzentration nach der Verdünnung „C_2“ und dem bekannten Volumen der zugegebenen Verdünnungsflüssigkeit kann über den Massenerhaltungssatz das ursprüngliche Volumen berechnet werden (Formel siehe Anhang 7.1). Im Rahmen der statistischen Auswertung wurden die Abweichungen zwischen den ermittelten und den simulierten Werten untersucht.

In Abbildung 3 der Arbeit von Hönicka et al. zur optimalen postoperativen Dosierung von Protamin zeigte sich beim Verhältnis von Heparin vs. Protamin ein Streubereich von 0,6 bis 0,8, um das Optimum von 0,7 [28]. In diesem Bereich lag der Großteil der INTEM-CT-Werte unterhalb von 200s, was mit einem sichtbar geringeren Blutverlust einherging. Diese Schwankungsbreite wird in der vorliegenden Arbeit als akzeptable Grenze für das 95 %-Konfidenzintervall der Abweichung des berechneten BPV vom simulierten BPV festgelegt, da eine geeignete Methode zuverlässig Protamin-Dosierungen innerhalb dieses Bereichs ermöglichen soll. Eine Methode wird in der vorliegenden Arbeit daher dann als geeignet erachtet, wenn ihre relative Standardabweichung nicht mehr als 15,2 % beträgt, um dem gemessenen akzeptablen Streubereich der Arbeit von Hönicka et al. zu entsprechen [28].

Als Probenmaterial wurde Serum gewählt, da die untersuchten Messverfahren für dieses Probenmaterial beschrieben wurden. Die gemessene Verdünnung wird bei der Berechnung des Blutplasmavolumens analog auf das Blutplasma übertragen, da die gleiche Verdünnungsrate aller Blutbestandteile angenommen wird.

Von jeder Serumprobe wurden vier Verdünnungsstufen nach einem vorher festgelegten Protokoll angefertigt. Der Faktor der Verdünnungsstufen betrug 0,933 (70 µl Probe + 5 µl Priming-Flüssigkeit), 0,867 (65 µl Probe + 10 µl Priming-Flüssigkeit), 0,733 (55 µl Probe + 20 µl Priming-Flüssigkeit) und 0,667 (50 µl Probe

+ 25 µl Priming-Flüssigkeit, siehe Kapitel 2.5). Die mit diesen Verdünnungen simulierten Volumina betragen in der Standardkonfiguration der HLM, mit 1500 ml Priming-Flüssigkeit, 20888 ml, 9778 ml, 4118 ml, sowie 3005 ml BPV. Bei der minimierten Konfiguration, mit 500 ml Priming-Flüssigkeit, entsprechen diese Verdünnungsschritte 6963 ml, 3259, 1373 und 1002 ml BPV. Dies ist auch in Abbildung 1 visualisiert. Der mathematische Zusammenhang auf Grundlage des Massenerhaltungssatz ist in Formel 2 im Anhang 7.1 dargestellt.

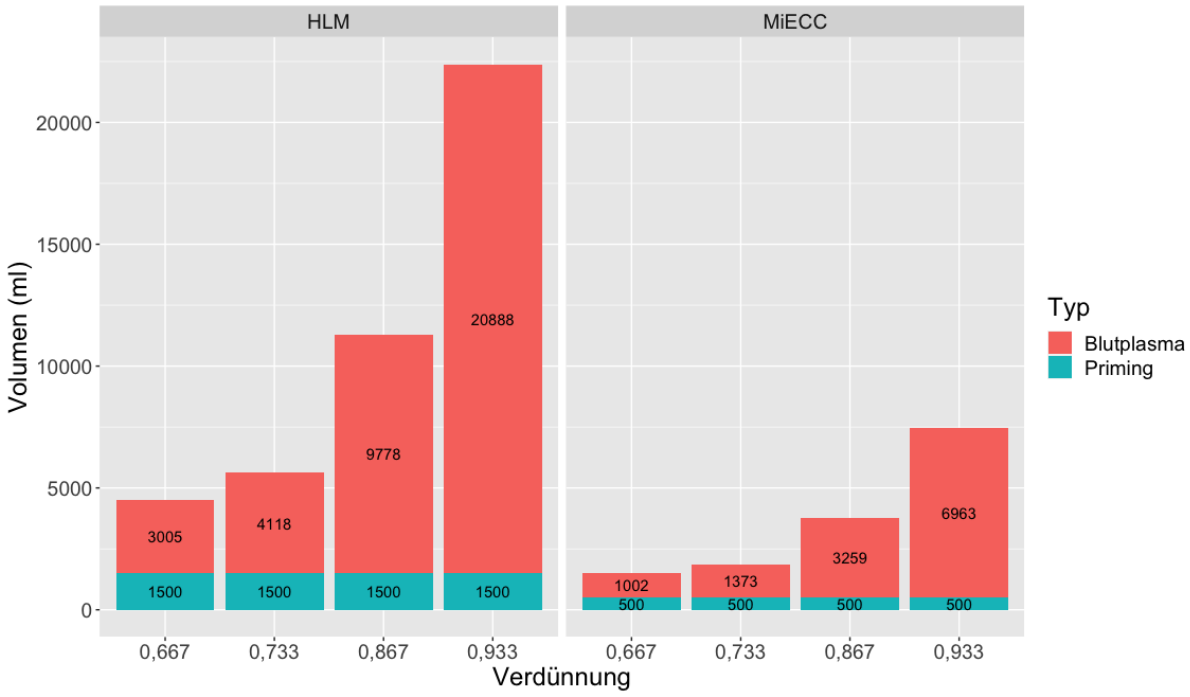


Abbildung 1: Darstellung der simulierten Blutplasmavolumina nach Verdünnung mit der jeweiligen Priming-Flüssigkeit. Berechnung mittels Anwendung des Massenerhaltungssatz. Die Flächen zeigen die anteilige Zusammensetzung aus dem simulierten ursprünglichen Blutplasmavolumen vor der Verdünnung und dem Volumen der Priming-Flüssigkeit, welche die Verdünnung erzeugt. Der Wert des Volumens wird innerhalb der zughörigen Fläche beziffert. Für jeden erzeugten Verdünnungsfaktor wurde ein Balkendiagramm erstellt. Links „HLM“: Standardkonfiguration der Herz-Lungen-Maschine mit 1500 ml Priming-Flüssigkeit. Rechts „MiECC“: Minimierte Konfiguration der Herz-Lungen-Maschine mit 500 ml

Für die Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration wurde das Verfahren mittels Coomassie-Blau nach Bradford und eine UV-Spektroskopie durchgeführt. Für die Messung der Albumin-Konzentration wurde die Färbung mit Methylorange bzw.

Bromkresolgrün photometrisch bestimmt (siehe Kapitel 2.5). Die Messungen wurden für jede Serumprobe und jedes Verfahren separat durchgeführt. Jede Verdünnungsreihe wurde dreimal unabhängig voneinander erzeugt und gemessen. Als Referenz wurde bei jeder Verdünnungsreihe die Probe auch unverdünnt gemessen. Zur Veranschaulichung wird der Ablauf der Arbeitsschritte in Abbildung 2 zusammenfassend dargestellt.

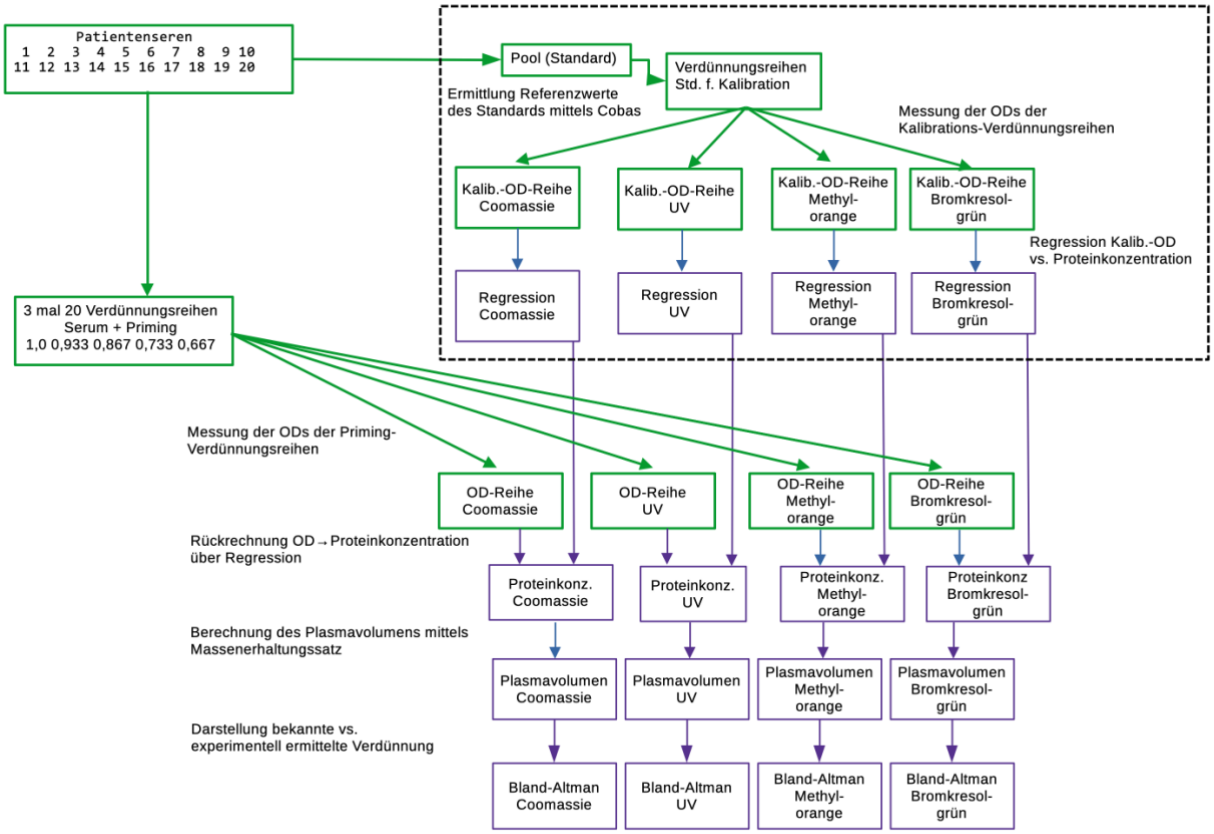


Abbildung 2: Versuchsaufbau der durchgeführten Arbeitsschritte vom Ausgangspunkt (oben links) bis hin zur Bland-Altman-Analyse (unten rechts)
Grüne Pfeile stellen Arbeitsschritte mit Probenmaterial dar, blaue Pfeile entsprechen rechnerischen Arbeitsschritten. Die Ergebnisse der Arbeitsschritte sind in der entsprechenden Farbe umrahmt. Der gepunktete schwarze Kasten beinhaltet die Schritte zur Kalibration der Messverfahren. OD = Optische Dichte, UV = Ultraviolett

Die weitere Vorverdünnung nach dem methodenspezifischen Versuchsprotokoll diente dazu den photometrischen Messbereich zu erreichen (siehe Kapitel 2.4).

Für die Verdünnung wurde eine Priming-Lösung angesetzt, steril abgefüllt und bei 4 °C gelagert (siehe Kapitel 2.2). Durch dieses Vorgehen sollten möglichst realitätsnahe Bedingungen mit Einflussfaktoren aus der in vivo Situation geschaffen werden. Durch die Messung von Blindproben mit enthaltenem Analyten, jedoch ohne Reaktionsflüssigkeit sollten Messfehler durch Probenbestandteile, die nicht Ziel der Messung sind (z.B. Trübheit der Probe und Heparin als Protein in der Priming-Lösung) verringert werden. Damit sollte einem Probenblindwert nahegekommen werden, da die Extraktion der Zielproteine nicht realisierbar war.

Die Herstellung der Versuchsreagenzien für die jeweiligen Nachweisverfahren erfolgte nach Herstellerangabe und nach Vorgaben der Originalpublikation des jeweiligen Verfahrens. Die Stammlösung wurde steril abgefüllt und bei 4 °C gelagert.

Vorbereitung der Küvetten

Nach jeder Messung wurden die Proben und die Reaktionsgefäße in einem Behälter für biologische Abfälle verworfen. Für die Reinigung wurden die Küvetten dreimal mit destilliertem Wasser gespült, bis keine Färbung mehr sichtbar war. Danach wurden die Küvetten mit Ethanol gespült und mittels gereinigter Druckluft getrocknet.

Durch die Überwachung der Blindwerte wurde im Verlauf der Messungen sichergestellt, dass keine Reste früherer Versuche in den Küvetten verblieben waren und die Extinktionswerte beeinflussten.

2.7 Datenverarbeitung und statistische Auswertung

Datenerfassung

Die Übertragung der Messdaten erfolgte über die serielle Schnittstelle RS-232 an den Computer. Die Extinktionswerte mit einer Auflösung von 1 nm wurden mittels der Software Datalyse gesammelt. Die Daten pro Messung wurden jeweils in einer „.txt“-Datei gespeichert. Dabei wurde durch die systematische Bezeichnung und durch die Speicherung in einer eindeutigen Ordnerstruktur eine eindeutige

Zuordnung der Messdaten zu einer Messung sichergestellt. Nach Abschluss der Messreihen wurden die Dateien mit den Messdaten mittels Shellskript zu einen gemeinsamen Datensatz zur statistischen Auswertung zusammengeführt.

Die statistische Auswertung der Messwerte erfolgt mit dem Statistik-Programm R. Das vollständige Skript zur Auswertung wurde auf der Open Access Repositorium der Universität Ulm publiziert [47].

Berechnung des Blutplasmavolumens

Im Zuge der Datenverarbeitung wurden aus den gemessenen Extinktionswerten Signale berechnet. Hierfür wurde der gemessene Extinktionswert der Probe von dem jeweils gemessenen Extinktionswert der zugehörigen Blindproben subtrahiert.

Über die Messung der Pool-Lösung mit bekannten, im Zentrallabor bestimmten Konzentrationen des Totalproteins und Albumins wurde für jedes Verfahren eine Standardkurve erzeugt. Mittels dieser Standardkurve konnte die Konzentration der jeweiligen Probe berechnet werden. Jede Einzelmessung wurde als unabhängiger Messwert betrachtet, da alle Verdünnungsreihen dreimal unabhängig voneinander erzeugt wurden.

Aus den ermittelten Konzentrationen konnte durch Division durch die unverdünnte Ausgangskonzentration der Verdünnungsfaktor der Probe bestimmt werden. Über den Massenerhaltungssatz konnte anschließend das (fiktive) BPV der jeweiligen Verdünnungsstufe ermittelt werden (Formel zur Berechnung siehe Anhang 7.1). Angenommen wurde ein Priming-Volumen von 500 ml, da hier die meisten Verdünnungsstufen realistische Werte für das simulierte BPV zeigen.

Ausschluss aus der Auswertung

Unrealistisch erscheinende Werte wurden aus der weiteren Betrachtung exkludiert. Dazu zählten negative Werte für das BPV, gemessene Werte über 8000 ml und eine Abweichung vom simulierten BPV von mehr als 2000 ml. Außerdem wurden nur die Verdünnungsstufen mit einem realistischen simulierten BPV ausgewertet.

Dies betrifft nur die Stufen mit einem simulierten BPV von 1002 ml, 1373 ml und 3259 ml.

Statistische Auswertung

Für die Auswertung wurden die absoluten und relativen Differenzen zwischen den mittels Verdünnung vorgegebenen BPV und den ermittelten BPV der Proben verglichen. Für diese Differenzen wurden die Standardabweichungen berechnet.

Zur Darstellung der Differenzen über den gesamten Messbereich wurden Bland-Altman-Diagramme gewählt.

Aufgrund der vorgefundenen annähernden Normalverteilung wurde die Abweichung des rechnerisch ermittelten Blutplasmavolumens vom simulierten Blutplasmavolumen mit einem zweiseitigen Einstichproben-t-Test überprüft. Bei einem p-Wert von 0,05 oder höher wurde angenommen, dass keine signifikante Abweichung besteht.

Darstellung der Ergebnisse

Für den Vergleich wurden die relativen und absoluten Standardabweichungen der Verfahren in Tabellen nebeneinander aufgelistet.

In den Streudiagrammen wurde die unabhängige Einflussgröße auf der x-Achse und die abhängige Messgröße auf der y-Achse dargestellt. Die eingezeichneten schwarzen Bezugslinien wurden als Grundlage für die weiterführenden Berechnungen verwendet. Blaue Linien entsprachen Trendlinien, anhand derer die Güte der Adhärenz der eingezeichneten Punkte zur Bezugslinie visualisiert wurde. Die Trendlinien wurden automatisiert mittels der Funktion „geom_smooth(method="lm")“ des Pakets ggplot2 in R erstellt. Dieses Verfahren basiert auf einer linearen Regression. Der grau schattierte Bereich um die blaue Linie stellt das 95-%-Konfidenzintervall der Regression dar.

Für die vergleichende Gegenüberstellung der Struktur und Lage der Messdaten der untersuchten Verfahren wurden Box-Whisker-Plots verwendet. Die Box kennzeichnet dabei den Bereich zwischen dem ersten und dritten Quartil der Daten.

Die horizontale Linie innerhalb der Box zeigt die Lage des Median. Die Whisker markieren die Ausdehnung des in der Auswertung berücksichtigten Wertebereichs. Die Messwerte in den Gruppen wurden als rote Punkte eingetragen. Ausreißer wurden mit schwarzen Punkten markiert. Diese wurden nicht in der Auswertung berücksichtigt, da ihre Differenz zum oberen und unteren Quartil das Dreifache des Interquartilabstands überstieg. Wie bei den Streudiagrammen wurden auch in den Box-Whisker-Plots die rechnerischen Idealwerte als horizontale schwarze Linien eingefügt. Die Erstellung der Box-Whisker-Plots erfolgte automatisiert mit der Funktion „geom_boxplot“ des Pakets „ggplot2“ in R.

Die Bland-Altman-Diagramme wurden mit der Funktion „bland.altman.plot“ des Pakets „BlandAltmanLeh“ in R erstellt. Hierbei wurde die Lage der Differenzen über den Messbereich aufgetragen und als unterbrochene Linie die Lage der medianen Abweichung und der oberen und unteren Annahmegrenze dargestellt. Diese ergaben sich aus dem Bereich der 1,96-fachen Standardabweichung um den Median und kennzeichneten den Bereich in dem 95 % aller Datenpunkte der Differenz zwischen zwei Verfahren liegen. Eine Voraussetzung für eine Bland-Altman-Analyse ist eigentlich der Vergleich zweier Messverfahren über einen kontinuierlichen Messbereich. Versuchsbedingt konnte jedoch nur eine diskrete Anzahl an Verdünnungsstufen gemessen werden. Da dennoch alle relevanten Parameter zum Methodenvergleich zusammengefasst dargestellt werden können wurde diese Form der Darstellung gewählt. Diese ist jedoch aufgrund der einseitigen Diskontinuität nur eingeschränkt mit einem klassischen Bland-Altman-Diagramm vergleichbar.

3 Ergebnisse

Für die vorliegenden Versuche wurden im Labor insgesamt 720 Messungen durchgeführt. Nach Ausschluss grober Fehler (siehe Kapitel 2.6) wurden in der Auswertung 523 Messungen berücksichtigt (siehe Tabelle 1). Bei einer durchschnittlichen Anzahl von 131 Messungen pro Verfahren fällt eine Unterrepräsentation der Gesamtproteinbestimmung nach Bradford (Coomassie-Blau) auf. Hier wurden nur 86 Messungen (66 % des Mittelwerts) eingeschlossen.

Tabelle 1: Anzahl der in der Auswertung berücksichtigten Messungen – gruppierte Darstellung nach durchgeführtem Verfahren und im Versuch simulierten Blutplasmavolumina

		Messungen (Anzahl)			
		Coomassie-Blau	Nativ	Methylorange	Bromkresol-grün
Volumen (ml)	3259	31	42	55	44
	1373	35	52	59	45
	1002	20	54	41	45
	Gesamt-bereich	**86**	**148**	**155**	**134**

3.1 Extinktionswerte der Verdünnungsstufen in den vier Messverfahren

Die Werte, die sich aus den gemessenen Extinktionswerten abzüglich der Extinktionswerte einer Blindproben ergaben, sind in Abbildung 3 dargestellt. Die Methode mittels Coomassie-Blau nach Bradford und die native UV-Spektroskopie zeigten eine positive Korrelation zwischen den so korrigierten Extinktionswerten und dem Verdünnungsfaktor.

Bei den Methoden mittels Methylorange und Bromkresolgrün bestand eine negative Korrelation zwischen den korrigierten Extinktionswerten und dem Verdünnungsfaktor. Dieses Verhalten entspricht dem in der Literatur beschriebenen Verhalten der untersuchten Methoden.

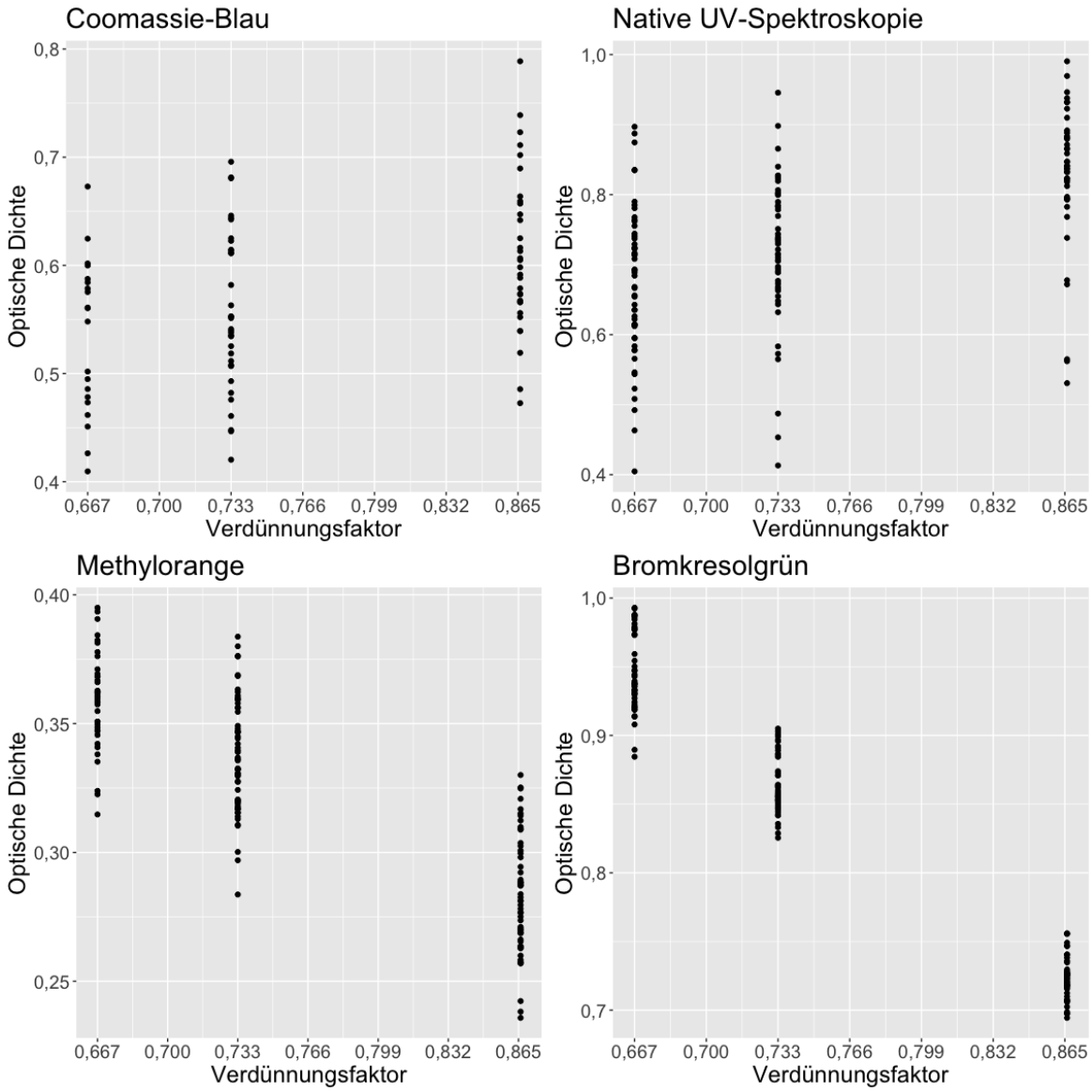


Abbildung 3: Photometrisch ermittelte optische Dichte (y-Achse, nach Korrektur mittels Blindwert) der experimentell eingestellten Verdünnung der Probe (x-Achse) in den vier untersuchten Verfahren.

3.2 Regressionsanalyse

Um einen Zusammenhang zwischen den bekannten Konzentrationen der Standardkurven und den ermittelten Signalen herzustellen, wurde eine Regressionsanalyse durchgeführt. Dies erfolgte automatisiert mittels der Funktion „lm“ in R. Zur Optimierung der Regression wurden für jedes Verfahren Polynomregressionen erster bis dritter Ordnung berechnet, wobei die Regression ausgewählt wurde, die für das Verfahren das höchste Bestimmtheitsmaß R^2 aufwies.

Die Regressionen wurden in Abbildung 4 zusammen mit den zugrundeliegenden Standards dargestellt. Außerdem wurden in jedem Plot die zugehörige Regressionsfunktion und das adjustierte Bestimmtheitsmaß eingetragen. Da bei den Versuchsreihen der Nativen UV-Spektroskopie und Bromkresolgrün der Standard nicht in unabhängigen Ansätzen wiederholt wurde sind die Mehrfachmessungen hier zusammengefasst dargestellt. Es zeigten sich jeweils gute Korrelationen mit R^2-Werten zwischen 0,92 bei der Coomassie-Blau-Methode und 0,988 bei der Methylorange-Methode. Für die native Spektroskopie zeigte die Regression erster Ordnung die beste Korrelation. Für die anderen Verfahren wurde eine optimale Regression bei einem Polynom zweiter Ordnung nachgewiesen.

In Abbildung 5 sind die aus dieser Regression berechneten BPV dargestellt. Die schwarze Linie kennzeichnet jeweils die „Ideallinie“, bei der das ermittelte und das simulierte Volumen genau übereinstimmen. Die blaue Linie zeigt eine Trendkurve, die mittels linearer Regression aller Datenpunkte ermittelt wurde. Der hier angekommene lineare Zusammenhang ergibt sich aus dem Versuchsaufbau. Die schwarze Ideallinie verläuft über den gesamten Bereich eng an der blauen Regressionslinie und fast ausschließlich im grauen Bereich, welcher das 95-%-Konfidenzintervall dieser berechneten Regressionslinie darstellt. Dieser adhärente Verlauf der Ideallinie belegt die gute Adhärenz der Mittelpunkte der Daten an diesen idealen Zusammenhang. Es fällt jedoch auch auf, dass die Messwerte selbst eine große Streuung aufweisen, welche mit zunehmendem Wert größer wird. In Rot eingetragen ist jeweils das mittels t-Test berechnete 95%-Konfidenzintervall der Mittelwerte der lokalen Datenpunkte.

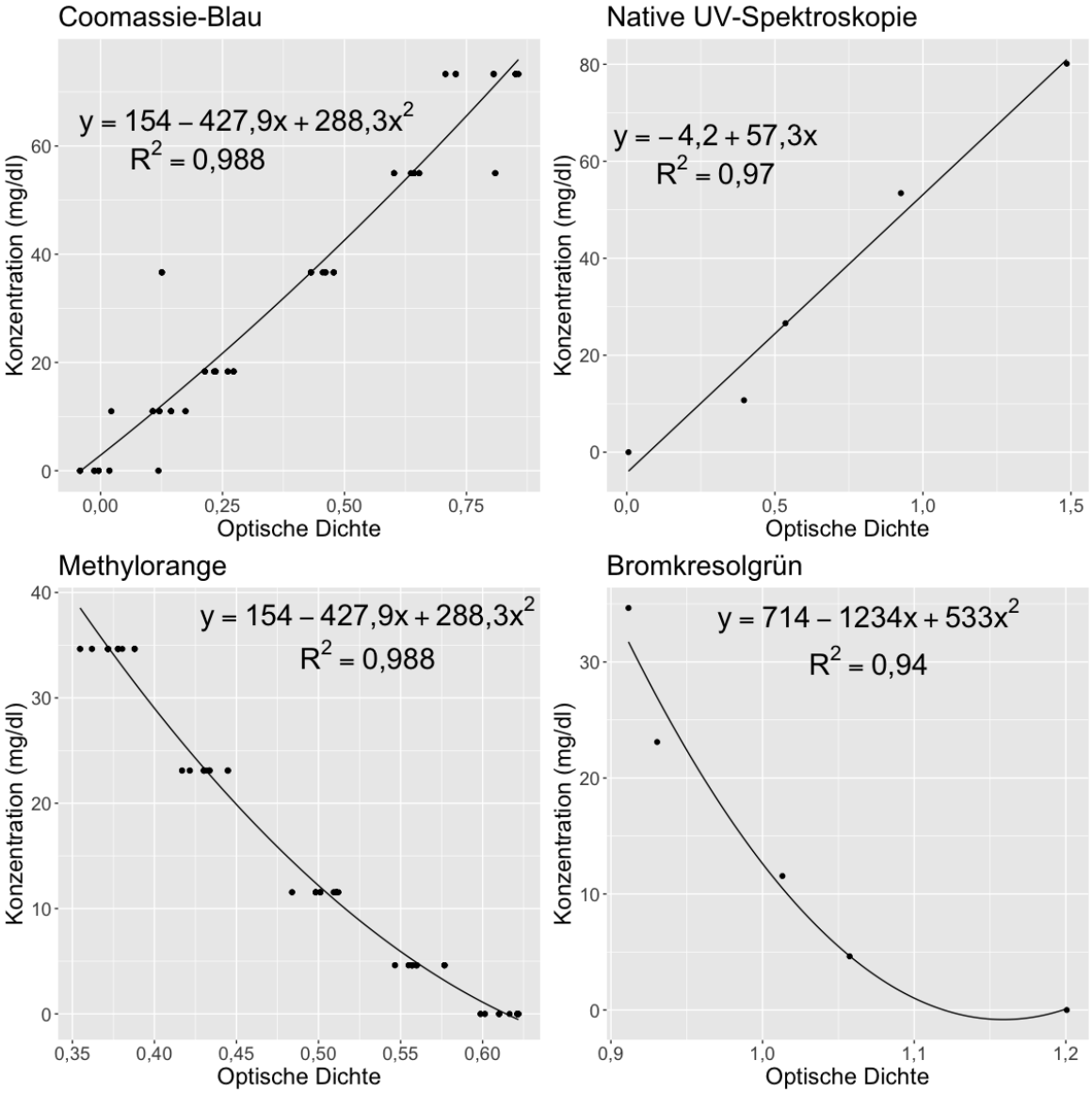


Abbildung 4: Regressionsanalyse – Beziehung zwischen der bekannten Konzentration des Standards und des gemessenen Signals (Punkte) in den vier Verfahren. Dargestellt sind neben den Regressionsgraphen (schwarze Linie) die zugehörige Regressionsformel des Verfahrens und das adjustierte Bestimmtheitsmaß (R^2) der jeweiligen Regression.

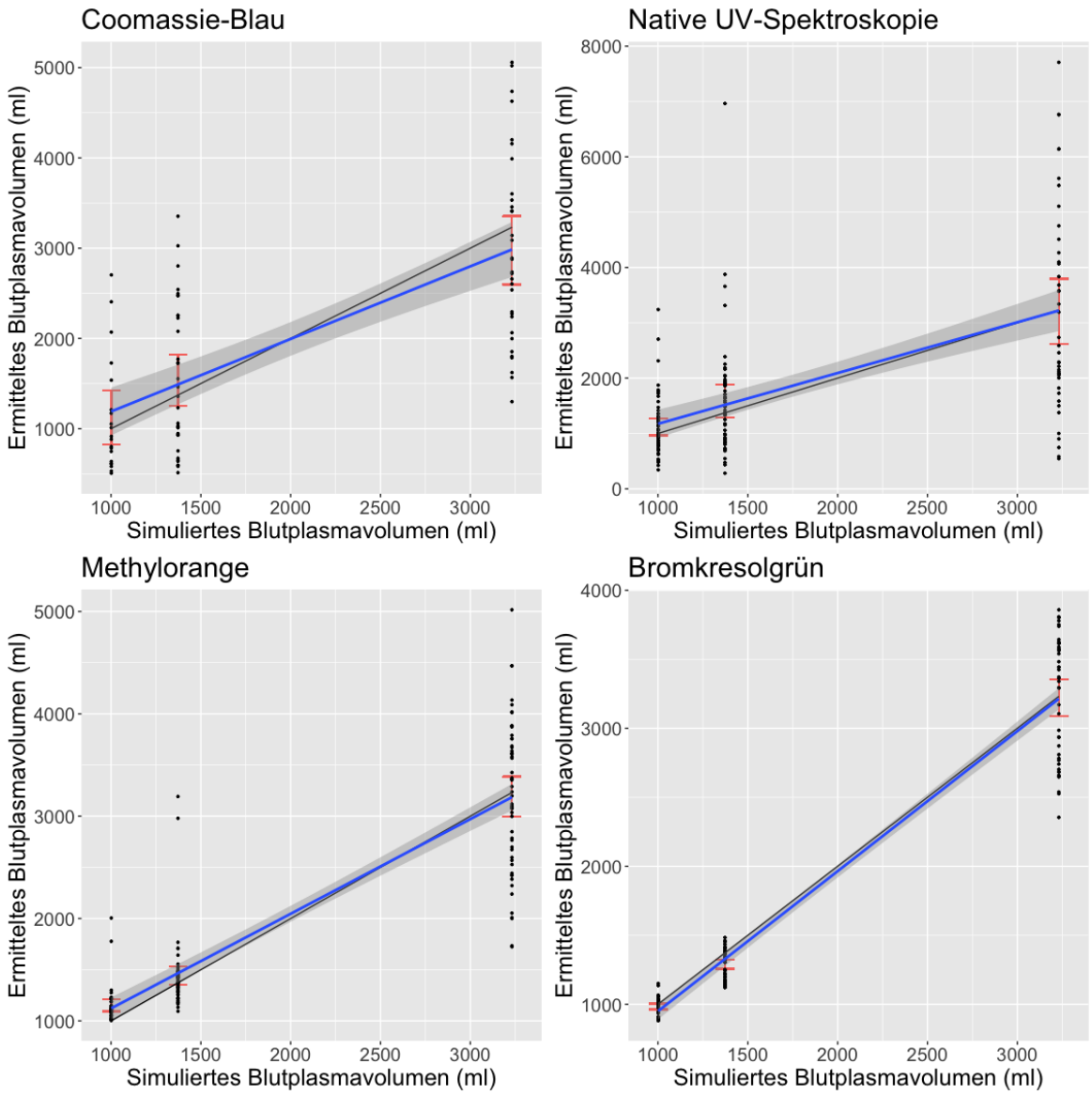


Abbildung 5: Zusammenhang zwischen dem mit dem jeweiligen Verfahren ermittelten Blutplasmavolumen in Bezug zum erwartenden Messwert (simuliertes Blutplasmavolumen). Die eingezeichnete Gerade (y=x) stellt die ideale Korrelation dar. Der Abstand der Punkte zur Geraden entspricht der Differenz zum erwarteten Messwert. Blau eingezeichnet ist eine gewichtete Trendlinie (lineare Regression) mit grau hinterlegtem 95-%-Konfidenzintervall für diese Linie. Die in Rot eingezeichneten Intervalle geben jeweils den Bereich an, in dem mit 95%iger Wahrscheinlichkeit die tatsächlichen Mittelwerte der an dieser Stelle eingezeichneten Datenpunkte liegen.

3.3 Ermittelte Blutplasmavolumina (BPV)

In den Abbildungen 6 bis 8 wurden die ermittelten BPV der verschiedenen Verdünnungsstufen in den vier untersuchten Verfahren nebeneinander dargestellt. Die roten Punkte entsprachen einzelnen Messwerten. Die Datenstruktur wurde anhand eines Box-Whisker-Plots veranschaulicht.

Auffällig war die deutliche breitere Streuung der Messwerte in der nativen Spektroskopie und beim Verfahren mit Coomassie-Blau nach Bradford in allen Verdünnungsstufen. Außerdem nahm die Streuung in allen Verfahren bei zunehmendem BPV zu.

Bei der Bromkresolgrün-Methode lag der Median bei allen Verdünnungsstufen deutlich im oberen Bereich der Box.

Alle Medianwerte der Verfahren zeigten eine Adhärenz zum vorgegebenen BPV (schwarze Linie). Wobei bei einem simulierten Volumen von 3259 ml der Median in der nativen Spektroskopie deutlich nach unten abwich (siehe Abbildung 8).

Für kein Verfahren war eine auffällige Segmentierung oder Gruppierung der Werte über den gesamten Datenbereich erkennbar.

Der zweiseitige Einstichproben-t-Test der ermittelten Volumina zeigte, außer in zwei Fällen, keine signifikante Abweichung der ermittelten von den simulierten Blutplasmavolumina (Siehe Tabelle 2). Die Signifikanz der Abweichung wurde angenommen, wenn der p-Wert kleiner als 0,05 war. Dies war für das Verfahren mit Bromkresolgrün bei dem simulierten Volumen von 1373 ml der Fall und für das Verfahren mit Methylorange bei dem simulierten Volumen von 1002 ml. Der Grund für die Signifikanz der Abweichung ist hier in der geringen Streuung zu sehen (Siehe auch Abbildung 6 und 7). Klinisch relevant ist die Abweichung nicht, da es sich um kleine absolute Abweichungen handelt (Siehe dazu auch Tabelle 3). Es zeigt sich weiterhin erwartungsgemäß, dass die Zielwerte, außer in den beschriebenen zwei Fällen, stets vom 95-%-Konfidenzintervall umfasst sind.

Tabelle 2: Durchschnittswerte und zugehörige 95-%-Konfidenzintervalle der ermittelten Volumina und p-Werte bei Testung gegen das simulierte Volumen mit zweiseitigem Einstichproben-t-Test – gruppierte Darstellung nach durchgeführtem Verfahren und im Versuch simulierten Blutplasmavolumina. **: p < 0,05

		Durchschnitt in ml (95%-Konfidenzintervall), p-Wert			
		Coomassie-Blau	Nativ	Methylorange	Bromkresolgrün
Volumen (ml)	3259	2976 (2598 – 3355), p=0,18	3325 (2702 – 3948), p=0,76	3190 (2993 – 3386), p=0,67	3220 (3087 – 3354), p=0,87
	1373	1536 (1253 – 1819), p=0,25	1589 (1291 – 1886), p=0,15	1443 (1354 – 1532), p=0,12	1291 (1258 – 1324), p<0,001 **
	1002	1125 (824 – 1436), p=0,4	1118 (969 – 1268), p=0,13	1150 (1091 – 1210), p<0,001 **	983 (963 – 1004), p=0,08

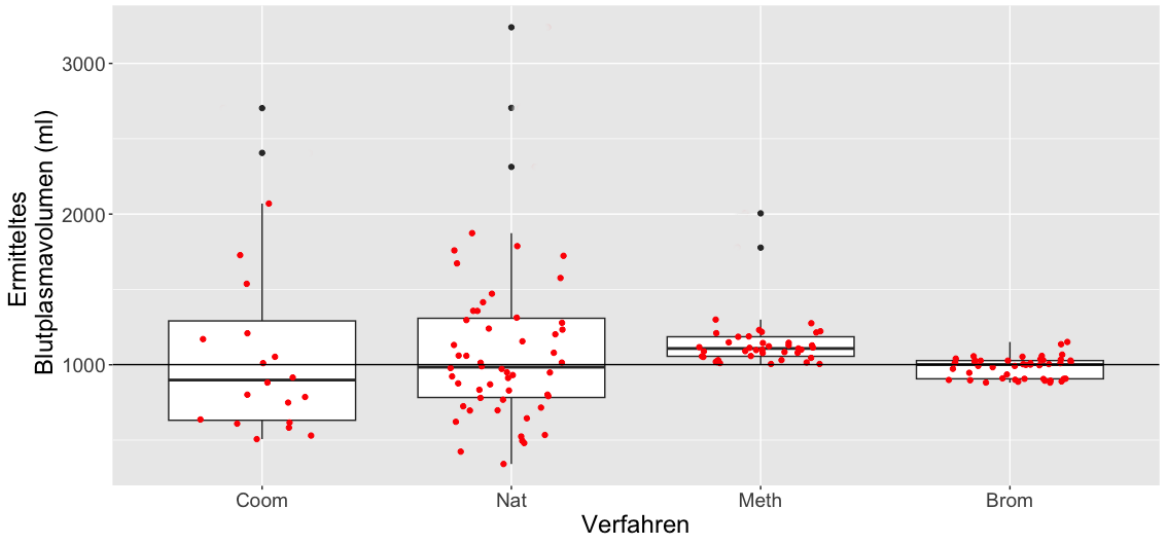


Abbildung 6: Ermittelte Blutplasmavolumina in Abhängigkeit vom eingesetzten Verfahren bei einem simulierten Blutplasmavolumen von 1002 ml (horizontale Linie). Box-Whisker-Plots in schwarz. Eventuelle Ausreißer, die in der Auswertung nicht berücksichtigt wurden, sind als schwarze Punkte gekennzeichnet. Zusätzlich sind die Einzelwerte als Punktwolke in Rot dargestellt. Coom = Coomassie-Blau, Brom = Bromkresolgrün, Meth = Methylorange, Nat = native Spektroskopie

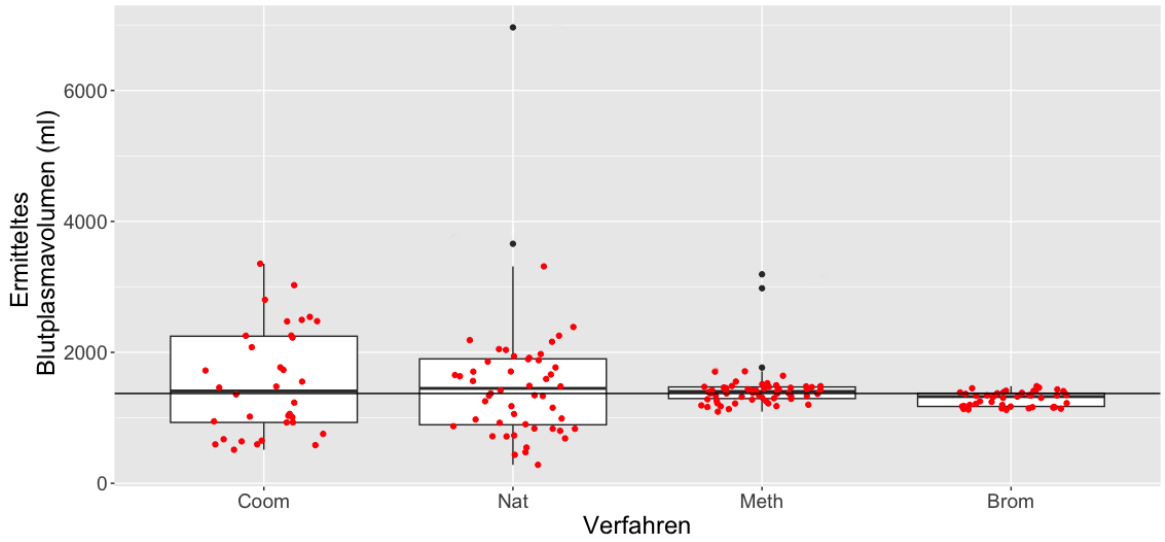


Abbildung 7: Ermittelte Blutplasmavolumina in Abhängigkeit vom eingesetzten Verfahren bei einem simulierten Blutplasmavolumen von 1373 ml (horizontale Linie). Eventuelle Ausreißer, die in der Auswertung nicht berücksichtigt wurden, sind als schwarze Punkte gekennzeichnet. Zusätzlich sind die Einzelwerte als Punktwolke in Rot dargestellt. Nicht berücksichtigte Datenpunkte sind schwarz dargestellt. Coom = Coomassie-Blau, Brom = Bromkresolgrün, Meth = Methylorange, Nat = native Spektroskopie

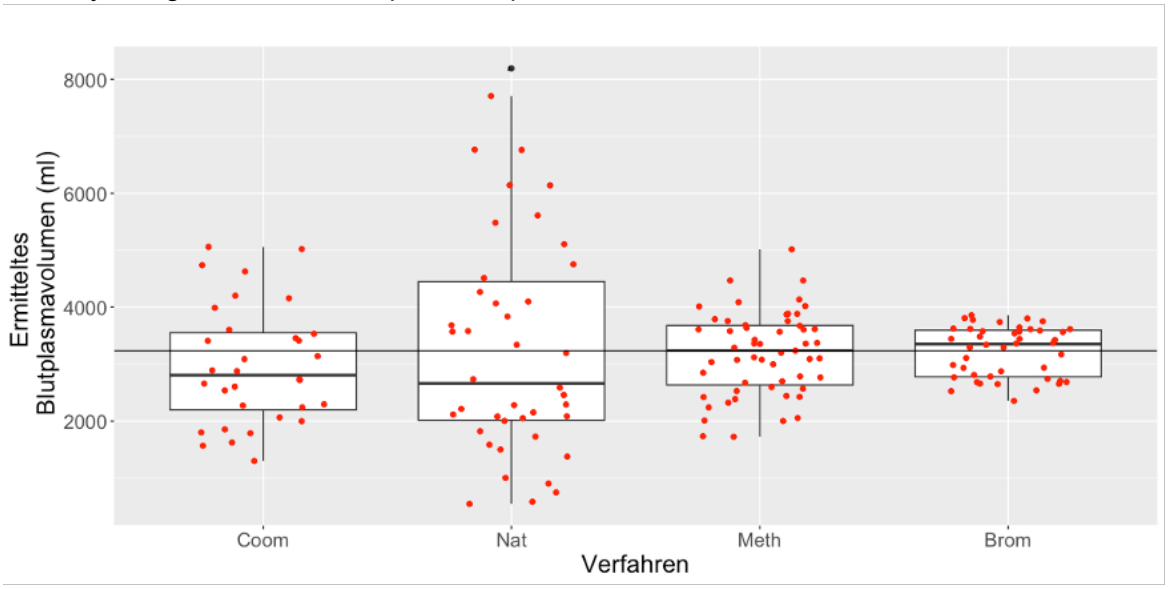


Abbildung 8: Ermittelte Blutplasmavolumina in Abhängigkeit vom eingesetzten Verfahren bei einem simulierten Blutplasmavolumen von 3259 ml (horizontale Linie). Eventuelle Ausreißer, die in der Auswertung nicht berücksichtigt wurden, sind als schwarze Punkte gekennzeichnet. Zusätzlich sind die Einzelwerte als Punktwolke in Rot dargestellt. Coom = Coomassie-Blau, Brom = Bromkresolgrün, Meth = Methylorange, Nat = native Spektroskopie

3.4 Bland-Altman-Analyse der Differenzen der Blutplasmavolumina

Eine Voraussetzung ist das Vorliegen einer Normalverteilung der Differenzen der untersuchten Messverfahren. Zur Einschätzung der Verteilung wurden diese Differenzen mittels Histogramms dargestellt (siehe Abbildung 9).

Es zeigte sich für alle Verfahren eine annähernde Normalverteilung der Differenzen der Messwerte mit einem Häufigkeitsgipfel um eine Differenz von 0 ml. Beim Verfahren mit Coomassie-Blau war ein zweiter kleiner Häufigkeitsgipfel bei einer Differenz um -1000 ml erkennbar.

In den Bland-Altman-Diagrammen (siehe Abbildung 10) wurden die Differenzen zwischen den experimentell bestimmten und simulierten BPV (y-Achse) in Abhängigkeit von den Mittelwerten zwischen den experimentell bestimmten und simulierten BPV (x-Achse) dargestellt. Weiter wurde die Lage der medianen Abweichung und der 1,96-fachen Standardabweichung um die mediane Abweichung herum markiert, was dem Bereich entspricht, in dem 95 % der Differenzen zu erwarten sind. Hierbei ist insbesondere die Breite der Verteilung über den Messbereich und deren Ausrichtung innerhalb des Diagramms von Interesse.

Die Punktewolken präsentieren sich als Ausdruck der diskreten simulierten BPV linienförmig. Bei allen Verfahren nahm die Streuung mit zunehmendem BPV zu, was sich in einer größeren Ausdehnung der Punktewolke von links nach rechts widerspiegelt. Alle Verfahren wiesen daher einen ausgeprägten relativen Zufallsfehler auf.

Bei allen Verfahren trat eine Verlagerung des Schwerpunktes der Daten von unten links nach oben rechts auf. Dies führte zu einer linksrotierten Ausrichtung des Fehlertrichters. Diese Beobachtungen weisen auf einen ausgeprägten systematischen relativen Fehler hin, der grundsätzlich einer Beseitigung durch Kalibration zugänglich ist. Besonders ausgeprägt erwies sich diese Rotation bei der nativen UV-Spektroskopie.

Die Verfahren zeigten keine relevanten Unterschiede bei der Lage des medianen Fehlers. Kein Verfahren wies einen relevanten absoluten systematischen Fehler auf.

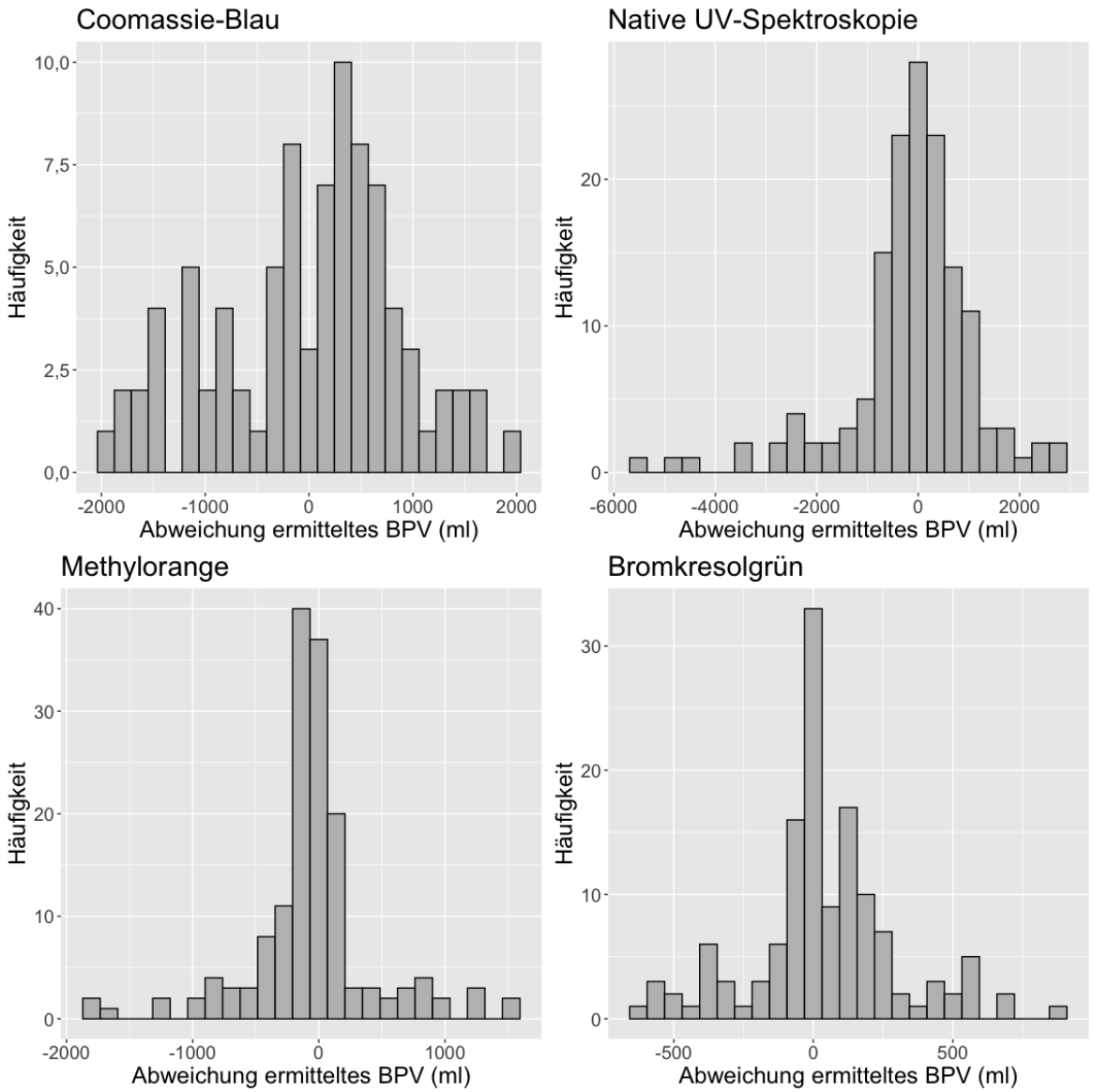


Abbildung 9: Häufigkeitsverteilung der Abweichungen zwischen den gemessenen Blutplasmavolumina und den simulierten Blutplasmavolumina (BPV) bei den vier untersuchten Verfahren (Nachweis der Normalverteilung)

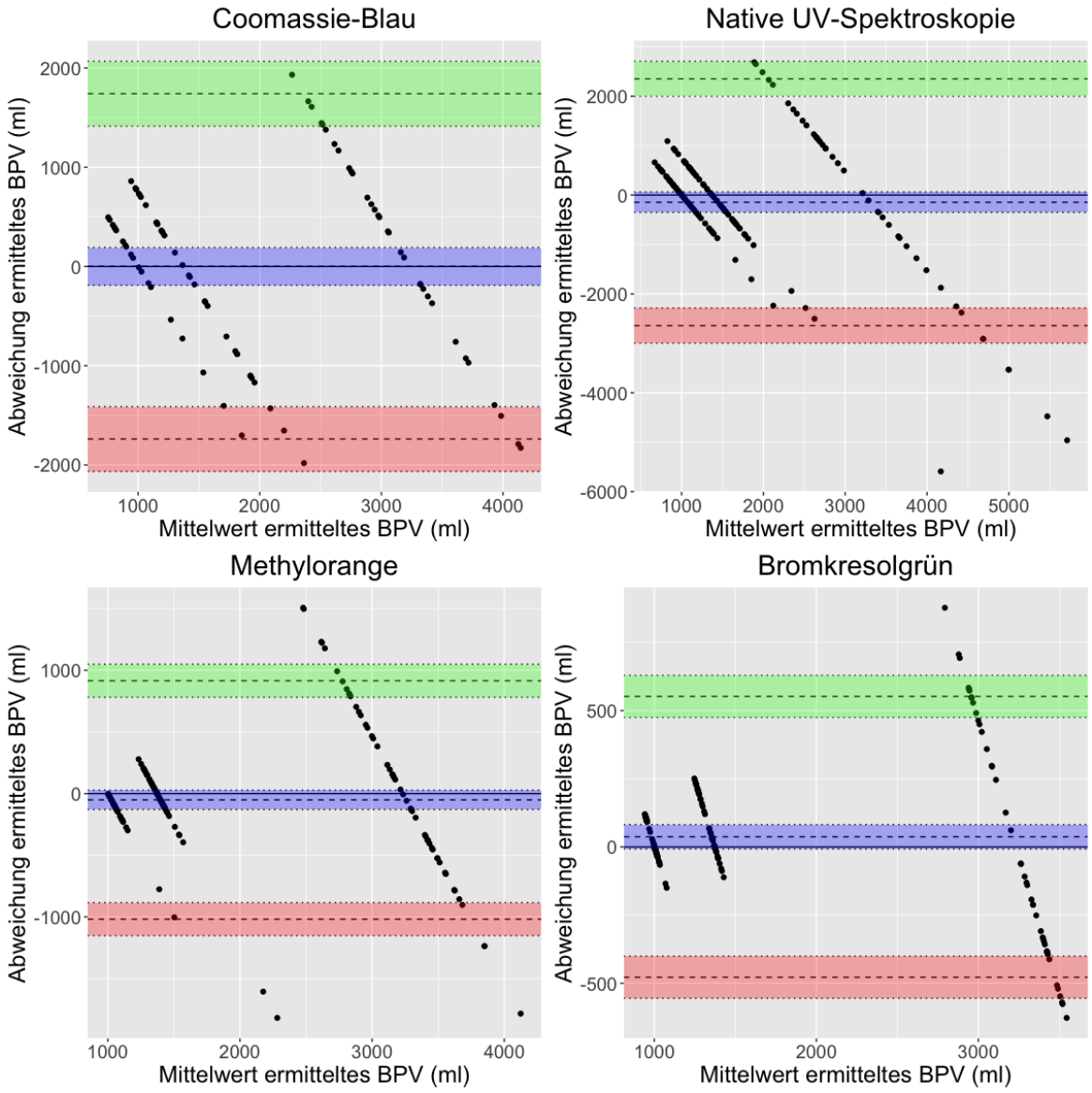


Abbildung 10: Bland-Altman-Plots der der Messabweichung zwischen dem ermittelten und dem zu erwartenden Messwert für das virtuelle Blutplasmavolumen (BPV) in Bezug zum jeweiligen Mittelwert aus erwartetem und gemessenem BPV bei den untersuchten Methoden
Die gestrichelten Linien stellen von oben nach unten die obere Annahmegrenze (Mittelwert + 1,96-fache Standardabweichung), den Mittelwert der Differenzen und die unter Annahmegrenze (Mittelwert - 1,96-fache Standardabweichung) dar. Die farbigen Bereiche stellen das jeweilige 95%-Konfidenzintervall um diese Grenzen und den Mittelwert dar.

3.5 Standardabweichungen

In Tabelle 3 wurden die Standardabweichungen der gemessenen BPV von den im Versuchsaufbau vorgegebenen BPV dargestellt. Die Darstellung erfolgte getrennt nach untersuchtem Verfahren und vorgegebenen Volumina.

Das Bromkresolgrün-Verfahren zeigte mit 69 ml bis 439 ml die geringsten Standardabweichungen. Bei der nativen Spektroskopie waren die Standardabweichungen mit Werten zwischen 548 ml bis 2000 ml am stärksten ausgeprägt.

Es bestand eine deutliche positive Abhängigkeit der Standardabweichung vom simulierten BPV. Auch in der Bland-Altman-Analyse zeigte sich hierbei schon ein starker relativer Fehler. Daher wurden die Standardabweichungen zusätzlich relativ, bezogen auf das vorgegebene Volumen, dargestellt. Die relative Standardabweichung war über den Messbereich deutlich konstanter, was die Annahme eines relativen Zufallsfehlers weiter unterstützt.

Tabelle 3: Standardabweichung der Differenz der ermittelten und simulierten Blutplasmavolumina – gruppierte Darstellung nach durchgeführtem Verfahren und simuliertem Blutplasmavolumen. In Klammern der relative Wert, außerhalb der absolute Wert in ml.

		Standardabweichung (ml)			
		Coomassie-Blau	Nativ	Methyl-orange	Bromkresol-grün
Volumen (ml)	3259	1070 (33 %)	2000 (62 %)	726 (23 %)	439 (14 %)
	1373	841 (61 %)	1068 (78 %)	341 (25 %)	109 (8 %)
	1002	648 (65 %)	548 (55 %)	188 (19 %)	69 (7 %)
	Gesamt-bereich	**893** (**54 %**)	**1274** (**65 %**)	**493** (**23 %**)	**263** (**10 %**)

3.6 Fehlerberechnung weitere Methoden

Die Bestimmung des Verdünnungsfaktors ist mit weiteren als den hier dargestellten Methoden denkbar. Hierzu muss im Grunde nur eine im Blut messbare Konzentration eines geeigneten Markers erfolgen. Denkbar, und in anderen Arbeiten verfolgt, ist zum Beispiel die Nutzung des Hämatokriten. Um die hier bestimmten Standardabweichungen vergleichend einordnen zu können wurde daher die hier verwendete mathematische Methode auch auf weitere denkbare Methoden zu der Bestimmung eines solchen Markers angewendet. Um eine Standardabweichung des Blutplasmavolumens zu berechnen, wurden die in der Literatur verfügbaren Standardabweichungen (Siehe 4.2) zugrunde gelegt und diese in der hier verwendeten Formel im Sinne einer Fehlerfortpflanzung hochgerechnet (Siehe Anhang 7.1). Dies wurde mit zwei verschiedenen Ausgangssituationen berechnet. Eine Berechnung wurde mit einem Primingvolumen von 500 ml und die andere Berechnung mit einem Primingvolumen von 1500 ml durchgeführt, um die minimierte und die Standardkonfiguration der HLM abzubilden. Es wurden Ausgangswerte für das BPV von 3667 und 3672 ml festgelegt, um den Effekt im Grenzbereich der hier untersuchten Verfahren darzustellen.

Die betrachteten Verfahren sind die Bestimmung der Totalproteinkonzentration mittels des Tests „cobas TP2“ von Roche, die Bestimmung der Albumin-Konzentration im Serum mit dem Test „cobas ALB2“ von Roche, sowie die Messung des Hämatokrits mit dem Blutgasanalyse-Gerät „ABL 825“ von Radiometer.

Die relativen Standardabweichungen für Messwiederholungen sind für die cobas-Systeme in der Herstellerbeschreibung einzusehen [57, 58]. Die erwartbaren Fehler bei der Bestimmung des Hämatokriten von gängigen BGA-Geräten wurde in herzchirurgischer PoC-Anwendung von Basciani et al. untersucht [4]

Die berechneten Standardabweichungen (Siehe Tabellen 4 und 5) reichen von 123 ml, bzw. 3,3%, (ALB2, Standard-HLM) bis zu 5833 ml, bzw. 159%, (BGA, minimierte HLM). Diese Standardabweichungen zeigen eine deutlich größere Schwankungsbreite als die Standardabweichungen, die sich im Rahmen der hier durchgeführten Versuche gezeigt haben (Siehe Tabelle 3).

Tabelle 4: Standardabweichungen anderer Methoden nach Fehlerfortpflanzung – minimiertes Priming-Volumen. TP2: Totalproteinkonzentration im Serum mit dem Test „cobas TP2“ von Roche, ALB2: Albumin-Konzentration im Serum mit dem Test „cobas ALB2“ von Roche, HKT: Messung des Hämatokrits mit dem Blutgasanalyse-Gerät „ABL 825“ von Radiometer. Fixwerte bei der Berechnung: Primingvolumen Vp = 500 ml, Verdünnungsfaktor Q = 0,88, Annahme: Ausgangs-Hämatokrit 40 %. Δ_1: Fehler für die Messung von c_1 (Literatur), Δ_q: Berechneter Fehler für die Messung von c_q.

	Δ_1	Δ_q	$V \pm \Delta_v$ absolut (ml)	$V \pm \Delta_v$ relativ (ml)
TP2	1 %	2 %	$3667\ ^{+735}_{-539}$	$3667\ ^{+20\,\%}_{-14{,}7\,\%}$
ALB2	0,5 %	1 %	$3667\ ^{+338}_{-591}$	$3667\ ^{+9{,}2\,\%}_{-7{,}9\,\%}$
HKT	4 %	8 %	$3667\ ^{+5833}_{-1535}$	$3667\ ^{+159\,\%}_{-42\,\%}$

Tabelle 5: Standardabweichungen anderer Methoden nach Fehlerfortpflanzung. TP2: Totalproteinkonzentration im Serum mit dem Test „cobas TP2“ von Roche, ALB2: Albumin-Konzentration im Serum mit dem Test „cobas ALB2“ von Roche, HKT: Messung des Hämatokrits mit dem Blutgasanalyse-Gerät „ABL 825“ von Radiometer. Fixwerte bei der Berechnung: Primingvolumen Vp = 1500 ml, Verdünnungsfaktor Q = 0,71, Annahme: Ausgangs-Hämatokrit 40 %. Δ_1: Fehler für die Messung von c_1 (Literatur), Δ_q: Berechneter Fehler für die Messung von c_q.

	Δ_1	Δ_q	$V \pm \Delta_v$ absolut (ml)	$V \pm \Delta_v$ relativ (ml)
TP2	1 %	2 %	$3672\ ^{+267}_{-242}$	$3672\ ^{+7{,}3\,\%}_{-6{,}6\,\%}$
ALB2	0,5 %	1 %	$3672\ ^{+130}_{-123}$	$3672\ ^{+3{,}5\,\%}_{-3{,}3\,\%}$
HKT	4 %	8 %	$3672\ ^{+1260}_{-846}$	$3672^{+34\,\%}_{-23\,\%}$

4 Diskussion

In der vorliegenden Analyse sollte mittels einfach durchzuführender Verfahren zur Bestimmung der Änderung der Albumin- und Gesamtproteinkonzentration im Serum das individuelle BPV im Rahmen der EKZ bestimmt werden.

Hierzu wurden vier Ansätze zur BPV-Bestimmung untersucht. Ziel dabei war die Beantwortung der Frage, welches der Verfahren für die Anwendung im Rahmen einer EKZ grundsätzlich geeignet ist.

Es konnte gezeigt werden, dass die Ermittlung des Blutvolumens ohne signifikante Abweichung von den simulierten Volumina mit den untersuchten Verfahren mittels Dilution möglich ist (Siehe Tabelle 2).

Auf der Basis der Arbeit von Hönicka et al. wurden jedoch 15,2 % als akzeptable Grenze der Standardabweichung für ein Verfahren in der klinischen Anwendung festgelegt [28]. Diese Vorgabe konnte in der durchgeführten Untersuchung über den untersuchten Bereich nur das Verfahren mit Bromkresolgrün einhalten (Tabelle 3).

Aufgrund des in der Bland-Altman-Analyse gezeigten systematischen relativen Fehlers ist anzunehmen, dass durch einen Versuchsaufbau mit einer Kalibration die Genauigkeit bei allen Verfahren verbessert werden kann. Das größte Verbesserungspotential war bei der nativen Spektroskopie erkennbar.

4.1 Bewertung der untersuchten Protein-Nachweismethoden

Coomassie-Blau

Die Vorteile der Methode mit Coomassie-Blau nach Bradford sind ihre hohe Empfindlichkeit sowie ihre einfache und schnelle Durchführbarkeit. Im Vergleich zu anderen Methoden der Gesamtproteinbestimmung beruht die Methode mit Coomassie-Blau nach Bradford jedoch auf einer wenig spezifischen Bindung, was bei unterschiedlichen Proteingrößen zu unterschiedlichen Extinktionswerten bei gleicher Konzentration führt [14]. Daher wird als Standardverfahren bei der Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration die Biuret-Methode eingesetzt, die für diesen Fehler unempfindlich ist [56].

Da in dem vorliegenden Versuchsaufbau vergleichbare Proteingemische in unterschiedlichen Verdünnungen gemessen wurden, führt diese Einschränkung im hier beschriebenen Anwendungsfall nicht zu einer Verzerrung der bestimmten BPV-Werte. Vielmehr spricht die Einfachheit und Robustheit der Methode für eine perspektivische PoC-Anwendung. Die absoluten gemessenen Konzentrationen der Proben weichen jedoch aufgrund des oben beschriebenen Fehlers von der Referenzmethode ab, weshalb von weiteren klinischen Schlüssen aus dem einzelnen Messwert abgesehen werden sollte.

UV-Spektroskopie

Die Stärke dieser Methode ist, dass sie nicht auf einer chemischen Reaktion beruht. Daher werden die Messergebnisse nicht durch mögliche Abweichungen bei den Färbezeiten beeinflusst. Da die Proben nicht verändert werden, können sie weiterprozessiert und in anderen Verfahren weiter untersucht werden.

Ein entscheidender Nachteil der UV-Spektroskopie ist, dass unter anderem auch Phenole im untersuchten Wellenlängenbereich eine Absorption aufweisen und entsprechend zu Fehlmessungen führen können. Vielen Medikamenten gehören zur Gruppe der Phenole. Im Kontext der Herzchirurgie spielen hier vor allem das Narkosemittel Propofol und die Salicylsäure eine Rolle. Aber auch Levodopa, Dopamin und Estradiol fallen in diese Gruppe.

Methylorange

Ein Vorteil der Methode ist ihre schnelle und einfache Durchführbarkeit. Nachteilig ist die Lichtinstabilität des Farbstoffs Methylorange, was je nach Lagerung im zeitlichen Verlauf zu Änderungen im Färbeverhalten führt.

Methylorange zeigt im Vergleich zu Bromkresolgrün eine schwächere Farbreaktion sowie eine schwächere Korrelation der Bindungskapazität mit der Albuminkonzentration bei physiologischen pH-Werten [13, 37]. Durch Verdrängungseffekte zwischen Methylorange und anderen anionischen

Verbindungen sowie Fettsäuren bei der Bindung an Albumin kann die Albumin-Konzentration unterschätzt werden [12, 33].

Deshalb hat sich das Verfahren mit Methylorange anders als der Nachweis mit Bromkresolgrün nicht als Standardverfahren in der klinischen Chemie etabliert [15].

Bromkresolgrün

Aufgrund der hohen Spezifität der Bindung von Bromkresolgrün an Albumin im Serum und der schnellen Durchführbarkeit der Messung hat sich diese Methode weltweit etabliert [11].

Ein Nachteil der Methode ist, dass bei einer zu langsamen Durchführung (ab 30 Sekunden nach Ansatz) der Farbstoff auch an Immunglobuline bindet, was zu einer Verfälschung der Messwerte führt. Durch eine automatisierte Probenverarbeitung kann dieser Einflussfaktor kontrolliert werden.

Eine weitere Fehlerquelle, die bei einer klinischen Anwendung an Plasmaproben, mit den enthaltenen Gerinnungsfaktoren, zu einer Überschätzung der Albumin-Konzentration führen kann, ist ein Signal im relevanten Wellenlängenbereich durch Fibrinogen [30]. Eine mögliche Verzerrung durch Heparin beruht auf demselben Mechanismus. Diese Fehlerquelle war auch im vorliegenden Anwendungsfall relevant. Durch eine bichromatische Messung wird dieser Effekt jedoch eliminiert, sodass in handelsüblichen Testkits (z. B. Roche ALB2) auch eine Messung in Heparin-Blut möglich ist [58].

Die Genauigkeit im vorliegenden Versuchsaufbau ist aufgrund der Zugabe von Heparin und der monochromatischen Messung nicht vergleichbar. Eine bichromatische Messung hätte die Bestimmung des bichromatischen Faktors mittels heparinisiertem Fibrinogen erfordert [21]. Ein solches Vorgehen ist bei einer PoC-Anwendung nicht realisierbar, sodass hier ein monochromatischer Versuchsaufbau gewählt wurde. Ein Abstützen auf diese Methode unter Anwendung eines kalibrierten Testsystems in einem Zentrallabor erscheint jedoch sinnvoll und für die weitere Forschung erfolgsversprechend. Insbesondere der

geringe Wiederholungsfehler von 0,5 % [58] macht die bichromatische Variante bezogen auf die gezeigte Fehlerfortpflanzung interessant (siehe Tabelle 4 und 5).

Aufgrund einer direkten Interaktion zwischen Albumin und Heparin kommt es durch die Bindungskonkurrenz bei hohen Heparin-Konzentrationen darüber hinaus zu einer Unterschätzung der Albumin-Konzentration [6]. Nach Hardy und Bjuström [24] beträgt die systematische Abweichung zwischen den Messwerten vor und nach Start der EKZ bei den hier vorliegenden Konzentrationen (bis 10 IE/ml [23]) nur ca. 2 %. Diese Abweichung kann aber einen relevanten Fehler im Rahmen der Fehlerfortpflanzung (siehe Formel 3 und 4 Anhang 7.1) erzeugen. Da es sich jedoch um eine systematische Abweichung handelt, kann sie möglicherweise durch eine Kalibration mit Messung der Heparin-Konzentration rechnerisch ausgeglichen werden. Auch durch eine Neutralisation von Heparin mit Protamin vor der Messung ließe sich der Effekt möglicherweise umgehen [48].

4.2 Weitere Methoden zur Bestimmung des Verdünnungsfaktors

Der Verdünnungsfaktor Q könnte auch mit anderen, in der vorliegenden Untersuchung nicht betrachteten Verfahren zur Konzentrationsbestimmung von Blutbestandteilen bestimmt werden.

In klinischen Laboratorien werden zur Bestimmung der hier untersuchten Größen (Totalprotein- und Albumin-Konzentration im Serum) kommerziell erhältliche Testsysteme eingesetzt. An der Universitätsklinik Ulm wird für die Totalprotein-Bestimmung der Test „cobas TP2“ der Firma Roche und für die Albumin-Bestimmung der Test „cobas ALB2“ der Firma Roche verwendet. Diese Verfahren zeigen laut Informationen des Herstellers für die Messwiederholung eine Standardabweichung von 1 % (cobas TP2 [57]), bzw. 0,5 % (cobas ALB2 [58]).

In anderen Untersuchungen wurde das Blutvolumen im Rahmen der EKZ durch die Messung des Hämatokrits mit einem Blutgasanalyse-(BGA)-Gerät bestimmt [26, 27, 38, 46]. Klinische Untersuchungen im Bereich der Herzchirurgie zeigen jedoch Standardabweichungen von 4 % bei dieser Methodik [4].

Um den Einfluss eines solchen Fehlers auf das ermittelte Blutvolumen zu evaluieren, wurde die Fehlerfortpflanzung berechnet (Formel 3 und 4, Anhang 7.1).

Die Ergebnisse dieser Berechnungen sind in Tabelle 4 für eine minimierte HLM-Konfiguration mit 500 ml Priming-Volumen und in Tabelle 5 für eine Standard-HLM mit 1500 ml Priming-Volumen dargestellt.

Die geringste Ungenauigkeit zeigt der Test cobas ALB2. Die Überlegenheit der Albumin-Bestimmung mittels Bromkresolgrün war auch in der vorliegenden Untersuchung erkennbar. Nur dieses Verfahren konnte die geforderte Genauigkeit einer Standardabweichung von unter 15 % bezogen auf das berechnete BPV sowohl bei einem konventionellen Priming-Volumen von 1500 ml als auch in einem minimierten Setup mit 500 ml Priming-Volumen einhalten.

Die Genauigkeit der Bestimmung des Verdünnungsfaktors über die Messung des Hämatokrits mit einem BGA-Gerät scheint für diesen Anwendungsfall völlig ungeeignet zu sein. In der durchgeführten Fehlerrechnung waren relative Standardabweichungen bis 159 % erkennbar.

Die Vorteile einer BPV-Bestimmung in einem Zentrallabor sind eine standardisierte Probenverarbeitung unter kontrollierten Bedingungen und die kontinuierliche Qualitätskontrolle mit Ringversuchen. Die dadurch erzielte Genauigkeit kann durch einfachere PoC-Tests nicht erreicht werden. Diese Genauigkeit ist aufgrund der in Tabelle 4 und 5 dargestellten Fehlerfortpflanzung jedoch entscheidend für den betrachteten Anwendungsfall.

4.3 Einordnung

Zur Dosisberechnung von Heparin und Protamin im Rahmen von Operationen mit EKZ hat sich als Standard die Bestimmung des BPV mittels der Allen-Formel etabliert [2]. Da diese Formel das BPV im Grenzbereich falsch einschätzt, wurden durch unterschiedliche Ansätze angepasste Formeln entwickelt, die eine genauere Abschätzung des Blutvolumens erlauben [27, 38, 46]. Diese Entwicklungen haben jedoch die Allen-Formel als etablierten Standard in der Breite nicht abgelöst.

Neuere Modelle zur Abschätzung des BPV wurden mit dem Ziel entwickelt, den Abfall des Hämatokrit durch die Hämodilution zu Beginn der EKZ und die damit verbundene Notwendigkeit der Gabe von Blutersatzprodukten abzuschätzen. Zu den entwickelten Ansätzen zählt die indirekte Berechnung des BPV aus dem

Hämatokrit-Wert vor und nach Start der EKZ über den Massenerhaltungssatz [26, 27, 38, 65]. Für dieses virtuelle Volumen wurden biometrische Prädiktoren (Alter, Geschlecht, Größe) identifiziert und in ein Modell implementiert. Mit diesem Modell wurde retrospektiv mit demselben Datensatz geprüft, wie gut die vorhergesagten Hämatokrit-Werte mit den gemessenen Werten korrelierten. Das Hauptproblem dieses Modells ist der Volumeneffekt der Priming-Lösung. Zahlreiche Untersuchungen belegen, dass verschiedene Infusionslösungen unterschiedliche Volumeneffekte aufzeigen [54]. Ein großer Teil der intravasal applizierten Flüssigkeit verlässt in kurzer Zeit das Gefäßsystem und trägt nicht mehr zum Verdünnungseffekt bei. Die Geschwindigkeit dieses Vorgangs hängt in hohem Maße von der klinischen Kondition des Patienten ab. In diesem Kontext spielen beispielsweise der Flüssigkeitsstatus, der Infektstatus, die Kreislaufsituation und die Stoffwechselsituation eine Rolle. Variationen dieser Faktoren erhöhen den Fehler bei der BPV-Bestimmung in der klinischen Anwendung.

Die BPV-Bestimmung mit dem Farbstoff Indocyaningrün liefert daher exaktere Werte. Bei diesem Verfahren werden nach der Injektion einer definierten Indocyaningrün-Menge nach einem festen Protokoll in definierten zeitlichen Abständen Blutproben entnommen und die abfallende Konzentration des Farbstoffs bestimmt. Die Messwerte werden geplottet und die Kurve bis zum Zeitpunkt der Injektion extrapoliert. Aus diesem Wert lässt sich über den Massenerhaltungssatz das Verteilungsvolumen des Indocyaningrüns bestimmen, das mit dem BPV übereinstimmt [9, 42, 44, 62].

Ähnliche Ansätze gibt es auch mit radioaktiven Isotopen (BVA 100) [41]. Außerdem wurden Verfahren mittels Kohlenmonoxid-(CO)-Inhalation und anschließender Bestimmung der Carboxyhämoglobin-(COHb)-Konzentration entwickelt [18]. Aktuellere Versuche basieren auf der BPV-Bestimmung über eine Injektion von Ferumoxytol und anschließender Analyse mittels Magnetresonanztomographie [51]. Bisher zeichnen sich jedoch alle Methoden, die das BPV exakter bestimmen, dadurch aus, dass sie technisch und zeitlich aufwändig sind.

Einen äußerst interessanten Ansatz präsentierten 2021 Kron et al. [35], indem sie mittels kontinuierlicher Ultraschallmessung während der Dialyse die Änderung der Bluteigenschaften maßen, um das relative BPV zu bestimmen. Ähnlich dem in der

vorliegenden Arbeit verfolgten Ansatz, lässt sich aus der Änderung des relativen BPV und der bekannten Menge des infundierten Dialysats das absolute BPV berechnen. Eine Übertragung dieser Messtechnik auf eine HLM erscheint denkbar und ermöglicht eine BPV-Bestimmung ohne Laborverfahren.

4.4 Limitierungen

Durch die begrenzte Menge an Probenmaterial (ca. 10 ml Serum pro Probe) mussten die Versuche mit geringen Mengen an Serum durchgeführt werden. Durch mögliche manuelle Ungenauigkeiten beim Pipettieren waren die Fehler in der vorliegenden Untersuchung möglicherweise größer als sie es in einem automatisierten Prozess wären. Außerdem waren über die Spender keine biometrischen und medizinischen Daten bekannt, die eine gruppierte Auswertung nach diesen Eigenschaften ermöglicht hätte. Die Anzahl von Spenderseren (n=20) war zudem für eine Subgruppenbildung zu gering.

Die in dem Versuchsaufbau implementierte Verdünnungsreihe sollte den Beginn der EKZ simulieren. Dieses in vitro Modell weist jedoch einige Limitierungen hinsichtlich der Übertragung auf die klinische Situation auf. Um die Extravasation bei einem möglichen Transfer der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Ansätze zu berücksichtigen, sollte zumindest bei der Kalibrierung der Methode ein Korrekturfaktor über eine Regressionskurve ermittelt werden (Siehe Kapitel 4.3). Zu beachten ist, dass diese Kalibrierung bei jeder Änderung der Zusammensetzung der Priming-Flüssigkeit neu durchgeführt werden muss.

Aktuelle Bestrebungen zielen darauf ab, die verwendeten Priming-Volumina möglichst noch weiter zu reduzieren. Diese Entwicklung macht die untersuchten Ansätze empfindlicher für eine Fehlerfortpflanzung der Messmethode. Diese Problematik wird exemplarisch in Tabelle 4 und 5 dieser Arbeit gezeigt [66].

4.5 Schlussfolgerungen

Für eine ausreichend genaue BPV-Berechnung aus der Konzentrationsänderung eines Blutbestandteiles bei dem in der vorliegenden Arbeit untersuchten

Anwendungsfall ist eine hohe Genauigkeit erforderlich. Von den untersuchten Verfahren erscheint die Bestimmung der Albumin-Konzentration mittels Bromkresolgrün am ehesten geeignet. Zur weiteren Überprüfung dieses Ansatzes sollte die klinische Tauglichkeit der Bestimmung der Albumin-Konzentration mittels Bromkresolgrün in einem Zentrallabor geprüft werden, da dieses Vorgehen geeignet ist, Messfehler zu minimieren. Methodische Limitierungen, wie die Extravasation der Priming-Lösung und der Einfluss von Heparin auf die Bestimmung der Albumin-Konzentration mittels Bromkresolgrün müssen bei der Weiterentwicklung dieses Ansatzes berücksichtigt werden. Auf der Grundlage der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Berechnungen erscheint die Hämatokrit-Bestimmung zur BPV-Messung als zu ungenau, um damit die Dosierung von Protamin und Heparin sinnvoll zu steuern. Dagegen lassen sich andere innovative Verfahren, wie ultraschallgestützte Methoden, möglicherweise auf die BPV-Bestimmung bei Eingriffen mit einer HLM übertragen [35]

5 Zusammenfassung

Fragestellung: Die individuelle Bestimmung des Blutplasmavolumens während der extrakorporalen Zirkulation könnte der Schlüssel zu einer zielgerichteten perioperativen Hämostase-Therapie bei herzchirurgischen Patienten sein. Die vorliegende Arbeit untersucht die Eignung einfacher photometrischer Messungen des Totalproteins und Albumins im Serum für diese Fragestellung.

Methoden: Die Hämodilution im Rahmen der extrakorporalen Zirkulation wurde mittels einer Verdünnungsreihe von Patientenseren (n=20) simuliert. Der daraus folgende Abfall der Totalproteinkonzentration wurde im Labor photometrisch mit der Methode mit Coomassie-Blau nach Bradford und nativer Ultraviolett-Spektroskopie gemessen. Der Abfall der Albumin-Konzentration wurde photometrisch mittels Methylorange und Bromkresolgrün bestimmt. Die Grenze für eine akzeptable relative Standardabweichung des bestimmten Blutplasmavolumens von dem tatsächlichen Volumen wurde auf 15,2 % festgelegt. Dieser Grenzwert leitet sich aus einer publizierten Studie zur postoperativen Dosierung von Protamin ab. Im Anschluss wurden die Abweichungen der simulierten Blutplasmavolumina mittels Bland-Altman-Analyse verglichen.

Ergebnisse: Alle Verfahren zeigten sowohl einen relativen Zufallsfehler als auch einen unterschiedlich ausgeprägten relativen systematischen Fehler. Die Verfahren zur Albumin-Bestimmung erwiesen sich im Vergleich zu den Methoden der Totalproteinbestimmung als überlegen. Das Verfahren mit Bromkresolgrün zeigte die höchste relative Genauigkeit; die Standardabweichung des bestimmten vom vorgegebenen Blutplasmavolumen betrug im Mittel 10 %.

Diskussion: Die Albumin-Bestimmung mit Bromkresolgrün war das einzige Verfahren, dessen relative Standardabweichung in allen Messungen unter der festgelegten Grenze von 15,2 % lag. Der in der Bland-Altman-Analyse gezeigte relative systematische Fehler kann durch Kalibration der Methoden verringert werden. Der methodische Ansatz wird durch die patientenindividuelle Extravasation der infundierten Flüssigkeit begrenzt. Außerdem beeinflusst Heparin die Messwerte. Diese Faktoren müssen bei einem Transfer in die Klinik berücksichtigt

werden. Laut der durchgeführten Fehlerrechnung ist der in manchen Arbeiten verfolgte Ansatz der Bestimmung des Blutplasmavolumens mittels Hämatokrit-Messung in einem Blutgasanalyse-Gerät für den betrachteten Anwendungsfall zu ungenau. Ein auf Bromkresolgrün basierendes Laborverfahren erwies sich bei der Fehlerrechnung jedoch als vielversprechend.

Schlussfolgerung: Die Genauigkeit des Messverfahrens ist für die Minimierung des Fehlers bei der Bestimmung von Blutplasmavolumina im Rahmen eines Eingriffs mit extrakorporaler Zirkulation von großer Bedeutung. Vor diesem Hintergrund sollte die Nutzung etablierter Labormethoden überprüft werden. Auch alternative Ansätze, wie eine kontinuierliche Messung des relativen Blutplasmavolumens mittels Ultraschallsonde, scheinen geeignet.

6 Literaturverzeichnis

1. Aitken A, Learmonth M: Protein Determination by UV Absorption. In: Walker J M (Hrsg) Protein Protocols Handbook, Humana Press, Totowa, S. 3-6 (2008)

2. Allen T H, Peng M T, Chen K P, Huang T F, Chang C, Fang H S: Prediction of blood volume and adiposity in man from body weight and cube of height. Metabolism, Clinical and Experimental Medicine 5: 328-345 (1956)

3. Aziz K A A, Masood O, Hoschtitzky J A, Ronald A: Does use of the Hepcon(R) point-of-care coagulation monitor to optimise heparin and protamine dosage for cardiopulmonary bypass decrease bleeding and blood and blood product requirements in adult patients undergoing cardiac surgery? Interactive Cardiovascular and Thoracic Surgery 5: 469-482 (2006)

4. Basciani R, Consiglio J, Amiet F, Erdös G: Hämatokritbestimmung mittels Leitfähigkeitsmessung unterschätzt den Hämatokrit im transfusionsrelevanten Bereich bei kardiochirurgischen Patienten. Anästhesiologie & Intensivmedizin 51: 331 (2010)

5. Beer: Bestimmung der Absorption des rothen Lichts in farbigen Flüssigkeiten. Annalen der Physik 162: 78-88 (1852)

6. Bonvicini P, Ceriotti G, Plebani M, Volpe G: Heparin interferes with albumin determination by dye-binding methods. Clinical Chemistry (Baltimore, Md.) 25: 1459-1460 (1979)

7. Bracken J S, Klotz I M: A Simple Method for the Rapid Determination of Serum Albumin. American Journal of Clinical Pathology 23: 1055-1058 (1953)

8. Bradford M M: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72: 248-254 (1976)

9. Bradley E C, Barr J W: Determination of blood volume using indocyanine green (Cardio-Green®) dye. Life Sciences 7: 1001-1007 (1968)

10. Bull B S, Huse W M, Brauer F S, Korpman R A: Heparin therapy during extracorporeal circulation. II. The use of a dose-response curve to individualize heparin and protamine dosage. The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery 69: 685-689 (1975)

11. Buzanovskii V: Determination of proteins in blood. Part 1: Determination of total protein and albumin. Review Journal of Chemistry 7: 79-124 (2017)

12. Cogin G E, Davis B D: Competition in the Binding of Long Chain Fatty Acids and Methyl Orange to Bovine Serum Albumin 1. Journal of the American Chemical Society 73: 3135-3138 (1951)

13. Colvin J R: The pH dependence of the adsorption isotherm and absorption spectrum of methyl orange bound to human and bovine serum albumin. Canadian Journal of Chemistry 31: 734-745 (1953)

14. Compton S J, Jones C G: Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. Analytical Biochemistry 151: 369-374 (1985)

15. Doumas B T, Ard Watson W, Biggs H G: Albumin standards and the measurement of serum albumin with bromcresol green. Clinica Chimica Acta 258: 21-30 (1997)

16. Doumas B T, Peters T: Origins of Dye-Binding Methods for Measuring Serum Albumin. Clinical chemistry (Baltimore, Md.) 55: 583-584 (2009)

17. Dreizler T, Trinkwitz M, Konetzka A, Klein M, Falk V, Starck C T: Auswirkungen der Heparindosierung auf ACT-Werte, Nachblutungsmengen und Fremdblutverbrauch. Kardiotechnik 22: 19-22 (2013)

18. Garvican L A, Burge C M, Cox A J, Clark S A, Martin D T, Gore C J: Carbon monoxide uptake kinetics of arterial, venous and capillary blood during CO rebreathing. Experimental Physiology 95: 1156-1166 (2010)

19. Garvin S, Fitzgerald D C, Despotis G, Shekar P, Body S C: Heparin Concentration—Based Anticoagulation for Cardiac Surgery Fails to Reliably Predict Heparin Bolus Dose Requirements. Anesthesia and Analgesia 111: 849-855 (2010)

20. Gruenwald C E, Manlhiot C, Chan A K, Crawford-Lean L, Foreman C, Holtby H M, Van Arsdell G S, Richards R, Moriarty H: Randomized, Controlled Trial of Individualized Heparin and Protamine Management in Infants Undergoing Cardiac Surgery With Cardiopulmonary Bypass. Journal of the American College of Cardiology 56: 1794-1802 (2010)

21. Hallbach J: Klinische Chemie und Hämatologie. 4. Aufl., Thieme, Stuttgart: 75-76 (2019)

22. Hancock M, Pantin E J: Fundamentals of Cardiopulmonary Bypass Machine Equipment and Technique. Cardiac Anesthesia, Springer International Publishing, Cham, S. 263-284

23. Hardy J, Bélisle S, Robitaille D, Perrault J, Roy M, Gagnon L: Measurement of heparin concentration in whole blood with the Hepcon/HMS device does not agree with laboratory determination of plasma heparin concentration using a chromogenic substrate for activated factor X. The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery 112: 154-161 (1995)

24. Hardy M J, Bjurström C H: Effect of Heparin on Determination of Plasma Albumin by Beckman Astra 8 (BCG) and Du Pont ACA II (BCP) Autoanalysers. Annals of Clinical Biochemistry 21: 387-388 (1984)

25. Hecht P, Besser M, Falter F: Are We Able to Dose Protamine Accurately Yet? A Review of the Protamine Conundrum. The Journal of Extra-Corporeal Technology 52: 63-70 (2020)

26. Hilberath J, Smith T, Jara C, Thomas M, FitzGerald D, Muehlschlegel J: Blood volumes in cardiac surgery with cardiopulmonary bypass. Perfusion 30: 395-399 (2015)

27. Hilberath J, Thomas M, Smith T, Jara C, Fitzgerald D, Wilusz K, Liu X, Muehlschlegel J: Blood volume measurement by hemodilution: association with valve disease and re-evaluation of the Allen Formula. Perfusion 30: 305-311 (2015)

28. Hoenicka M, Rupp P, Müller-Eising K, Deininger S, Kunert A, Liebold A, Gorki H: Anticoagulation management during multivessel coronary artery bypass grafting: a randomized trial comparing individualized heparin management and conventional hemostasis management. Journal of Thrombosis and Haemostasis 13: 1196-1206 (2015)

29. Jobes D R, Aitken G L, Shaffer G W: Increased accuracy and precision of heparin and protamine dosing reduces blood loss and transfusion in patients undergoing primary cardiac operations. The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery 110: 36-45 (1995)

30. Johnson A M, Whicher J T, Ledue T B, Carlström A, Itoh Y, Petersen P H: Effect of a New International Reference Preparation for Proteins in Human Serum (Certified Reference Material 470) on Results of the College of American Pathologists Surveys for Plasma Proteins. Archives of Pathology & Laboratory Medicine (1976) 124: 1496-1501 (2000)

31. Keyser J W: Rapid estimation of albumin and total protein in small amounts of blood serum. Clinica Chimica Acta 6: 445-447 (1961)

32. Klotz I M: Spectrophotometric Investigations of the Interactions of Proteins with Organic Anions. Journal of the American Chemical Society 68: 2299-2304 (1946)

33. Klotz I M, Triwush H, Walker F M: The Binding of Organic Ions by Proteins. Competition Phenomena and Denaturation Effects. Journal of the American Chemical Society 70: 2935-2941 (1948)

34. Klotz I M, Urquhart J M: The Binding of Organic Ions by Proteins. Comparison of Native and of Modified Proteins. Advances in Protein Chemistry 15: 1597-1603 (1945)

35. Kron S, Schneditz D, Keane D F, Leimbach T, Kron J: An improved method to estimate absolute blood volume based on dialysate dilution. Artificial Organs 45: 359-363 (2021)

36. Lambert J H: Photometria, sive De mensura et gradibus luminus, colorum et umbrae. Klett, Augsburg (1760)

37. Lee Rodkey F: Binding of phenol red by human serum albumin. Archives of Biochemistry and Biophysics 94: 526-531 (1961)

38. Lee M, Gisnarian C J, Shann K G: Improved Estimation of Total Blood Volume Can Provide a Reliable Prediction of Dilutional Hematocrit and Oxygen Delivery during Cardiopulmonary Bypass. Journal of Extra-Corpororal Technology 51: 67-72 (2019)

39. Lee, Welsby, Bute, Ortel, Arepally: High Incidence of Antibodies to Protamine and Protamine/Heparin Complexes in Patients Undergoing Cardiopulmonary Bypass. Blood 120: 3344 (2012)

40. Machovec K A, Jooste E H, Walczak R J, Homi H M, Jaquiss R D B, Lodge A J, Ames W A: A change in anticoagulation monitoring improves safety, reduces transfusion, and reduces costs in infants on cardiopulmonary bypass. Pediatric Anesthesia 25: 580-586 (2015)

41. Manzone T A, Dam H Q, Soltis D, Sagar V V: Blood Volume Analysis: A New Technique and New Clinical Interest Reinvigorate a Classic Study. Journal of Nuclear Medicine Technology 35: 55-63 (2007)

42. Matthias Jacob, Peter Conzen, Udilo Finsterer, Alexander Krafft, Bernhard F. Becker, Markus Rehm: Technical and physiological background of plasma volume measurement with indocyanine green: a clarification of misunderstandings. Journal of Applied Physiology 102: 1235-1242 (2007)

43. MEDA Pharma: Fachinformation Protamin ME 5.000 I.E./ml. MEDA Pharma GmbH & Co. KG, Bad Homburg (2013)

44. Menth-Meier S, Imoberdorf R, Regli B, Kipfer B, Turvay M, Ballmer P: Determination of plasma volume by indocyanine green – validation of the method and use in patients after cardiopulmonary bypass. Intensive Care Medicine 27: 925–929 (2001)

45. Metronic: HMS PLUS Benutzerhandbuch, Gerät zur Hämostasebehandlung. Medtronic, Inc., Minneapolis (2005)

46. Muraki R, Hiraoka A, Nagata K, Nakajima K, Oshita T, Arimichi M, Chikazawa G, Yoshitaka H, Sakaguchi T: Novel method for estimating the total blood volume: the importance of adjustment using the ideal body weight and age for the accurate prediction of haemodilution during cardiopulmonary bypass. Interactive Cardiovascuar and Thoracic Surgery 27: 802-807 (2018)

47. Nannen G: Erratum zu: Skript zur Datenauswertung mit der Statistik-Software R, entwickelt und verwendet im Rahmen der Dissertation „Intraoperative Bestimmung des Blutvolumens von herzchirurgischen Patienten zur Steuerung der Antikoagulation: Untersuchung neuer Ansätze und Methodenvergleich“. Open Access Repositorium der Universität Ulm und Technischen Hochschule Ulm. DOI: 10.18725/OPARU-52898 (2024)

48. Niall M M, Owen J A: Heparin as a source of error in the determination of plasma albumin on a basis of selective dye-binding. Clinica Chimica Acta 7: 155-158 (1962)

49. Nilsson, Appelblad, Svenmarker: Can We Rely on the Activated Clotting Time to Measure Heparin Anticoagulation? A Clinical Evaluation of Two ACT Monitors. The Journal of Extra-Corporeal Technology 52: 212-217 (2020)

50. Proetzel K: Umfrage zum Thema Primingder Herz-Lungen-Maschine in der Erwachsenenherzchirurgie. Kardiotechnik 27: 3-5 (2018)

51. Ramasawmy R, Rogers T, Alcantar M A, McGuirt D R, Khan J M, Kellman P, Xue H, Faranesh A Z, Campbell-Washburn A E, Lederman R J, Herzka D A: Blood volume measurement using cardiovascular magnetic resonance and ferumoxytol: preclinical validation. Journal of Cardiovascular Magnetic Resonance 20: 62 (2018)

52. Rasoli S, Zeinah M, Athanasiou T, Kourliouros A: Optimal intraoperative anticoagulation strategy in patients undergoing off-pump coronary artery bypass. Interactive Cardiovascular and Thoracic Surgery 14: 629-633 (2012)

53. Raymond P D, Ray M J, Callen S N, Marsh N A: Heparin monitoring during cardiac surgery. Part 1: validation of whole-blood heparin concentration and activated clotting time. Perfusion 18: 269-276 (2003)

54. Rehm M, Hulde N, Kammerer T, Meidert A S, Hofmann-Kiefer K: Stand der Wissenschaft in der Flüssigkeits- und Volumentherapie. Anaesthesist 66: 153-167 (2017)

55. Ressler N, Gashkoff M, Fischinger A: Improved method for determining serum protein concentrations in the far ultraviolet. Clinical Chemistry 22: 1355-1360 (1976)

56. Robinson H W, Hogden C G: The biuret reaction in the determination of serum proteins. Journal of Biological Chemistry 135: 727-731 (1940)

57. Roche: Roche Total Protein 2, Order information. Roche Diagnostics GmbH, Mannheim (2017)

58. Roche: Roche Albumin 2, Bestellinformation Roche Diagnostics GmbH, Mannheim (2015)

59. Rodkey F L: Direct Spectrophotometric Determination of Albumin in Human Serum. Clinical Chemistry 11: 478 (1965)

60. Sandberg R G, Henderson G H, White R D, Eyring E M: Kinetics of acid dissociation-ion recombination of aqueous methyl orange. Journal of Physical Chemistry 76: 4023-4025 (1972)

61. Schmid C, Philipp A: Leitfaden extrakorporale Zirkulation. 1. Aufl., Springer, Berlin (2011)

62. Sekimoto M, Fukui M, Fujita K: Plasma volume estimation using indocyanine green with biexponential regression analysis of the decay curves. Anaesthesia 52: 1166-1172 (1997)

63. Taylor J R: An introduction to error analysis. 2. Aufl., University Science Books, Sausalito, 52 (1997)

64. De Simone F, Nardelli P, Licheri M, Frau G, Redaelli MB, Monaco F, Zangrillo A, Landoni G: Less is more: We are administering too much protamine in cardiac surgery. Annals of Cardiac Anaesthesia 24: 178-182 (2021)

65. Trowbridge C, Stammers A, Klayman M, Brindisi N: A novel calculation to estimate blood volume and hematocrit during bypass. The Journal of Extra-Corporeal Technology 40: 61-64 (2008)

66. Wang L, Chen Q, Qiu Y Q, Ye J X, Du J Z, Lv X C, Hou Y T, Chen L W: Effects of cardiopulmonary bypass with low-priming volume on clinical outcomes in children undergoing congenital heart disease surgery. Journal of Cardiothoracic Surgery 15: 118 (2020)

7 Anhang

7.1 Berechnung des Blutplasmavolumens (BPV)

Bei Start der EKZ erfolgt eine Hämodilution mit dem Priming-Volumen der eingesetzten HLM. Hieraus resultiert ein Abfall der Proteinkonzentration im Blut, da die absolute Proteinmasse (P) konstant bleibt, während sich das Volumen durch die Dilution vergrößert. Aus der Bestimmung der Ausgangsplasmakonzentration C_1 vor der Verdünnung und der Plasmakonzentration nach Verdünnung C_2 kann der Faktor (Q), um den sich die gemessene Plasmaprotein-Konzentration verringert hat berechnet werden:

$$C_1 * Q = C_2$$

Formel 1: Berechnung des Verdünnungsfaktor aus der Ausgangskonzentration und der Konzentration nach Verdünnung. Q: Verdünnungsfaktor, C_1: Ausgangskonzentration, C_2: Konzentration nach Verdünnung

Bei bekanntem Priming-Volumen kann nun mithilfe des Massenerhaltungssatz das ursprüngliche BPV berechnet werden [26, 46]:

$$c1 = \frac{P}{V_{BP}} \qquad c2 = \frac{P}{V_{BP} + V_P}$$

$$c1 * V_{BP} = c2 * (V_{BP} + V_P)$$

$$\cancel{c1} * V_{BP} = Q * \cancel{c1} * (V_{BP} + V_P)$$

$$V_{BP} = Q * V_{BP} + Q * V_P$$

$$V_{BP} - Q * V_{BP} = Q * V_P$$

$$(1 - Q) * V_{BP} = Q * V_P$$

$$V_{BP} = \frac{V_P * Q}{1 - Q}$$

Formel 2: Berechnung des Blutplasmavolumens (BPV) bei Hämodilution. P: absolute Proteinmasse, V_{BP}: Blutplasmavolumen, V_p: Priming-Volumen, Q: Verdünnungsfaktor

Zur Berechnung der Fehlerfortpflanzung bei bekannter Standardabweichung als Fehlergrenze eines Messverfahrens von c_1 beziehungsweise c_2 gilt mittels allgemeiner Lösung der Fehlerfortpflanzung nach Gauß folgender Zusammenhang für die Fehlergrenze Δ_q des Verdünnungsfaktor Q (Formel 3) [63]:

$$\frac{C_2 \pm \Delta_2}{C_1 \pm \Delta_1} = Q \pm \Delta_q$$

$$\Delta_q = \Delta_1 + \Delta_2$$

$$\Delta_q = \Delta_1 + \Delta_1 = 2 \times \Delta_1$$

Formel 3: Fehlerfortpflanzung aus der Ungenauigkeit in der Bestimmung von c_1 und c_2 bei der Berechnung des Verdünnungsquotienten Q. Allgemeine Lösung des Fehlerfortpflanzung für die Division. Q: Verdünnungsfaktor, C_1: Ausgangskonzentration, C_2: Konzentration nach Verdünnung, Δ_1: Fehlergrenze für die Messung von c_1, Δ_2: Fehlergrenze für die Messung von c_2, Δ_q: Fehlergrenze für die Berechnung von Q

Damit kann gilt für die Fehlergrenze des berechneten Blutplasmavolumen folgender Zusammenhang (Formel 4). Die Berechnung der Fehlerbreite bei einem jeweils bekannten Wert für V_P und Q kann jeweils als Grenzfallbetrachtung für den Fall Q **+** Δ_q und Q **-** Δ_q erfolgen.

$$V_{BP} \pm \Delta_v = \frac{V_P \times (Q \pm \Delta_q)}{1 - (Q \pm \Delta_q)}$$

Formel 4: Berechnung des Blutplasmavolumen bei Hämodilution unter Berücksichtigung von Fehlergrenzen für Q. P: absolute Proteinmasse, V_{BP}: Blutplasmavolumen, V_p: Primingvolumen, Q: Verdünnungsfaktor, Δ_q: Fehlergrenze des Verdünnungsfaktor Q

7.2 Chargennummern der Serumproben

Nummer	Charge	Volumen (ml)
1	702 169 50361	11,25
2	702 159 56318	10,6
3	702 169 51246	10,4
4	702 169 53559	10,0
5	701 169 51109	11,5
6	702 169 50712	11,0
7	702 159 55829	13,5
8	702 169 53551	12,55
9	702 159 58343	11,25
10	702 169 51111	10,5
11	702 159 58299	12,6
12	702 169 52708	10,45
13	702 169 51105	12,05
14	702 159 58347	14,0
15	702 159 57539	12,75
16	702 159 55331	11,7
17	702 169 51067	13,25
18	702 169 52548	11,9
19	702 159 56660	11,2
20	702 159 56153	10,0

8 Danksagung

Die Danksagung wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.

9 Lebenslauf

Der Lebenslauf wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.