

Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Innere Medizin III
des Universitätsklinikums Halle (Saale)
(Direktor Prof. Dr. med. K. Werdan)

***In-vitro*-Vergleich von unfraktioniertem und niedermolekularem
Heparin mit Fondaparinux zur Prävention von
Herzkatheterthrombosen**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

<Doktor der Medizin (Dr. med.)>

vorgelegt
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Iris Katharina Reindl

geboren am 16.02.1983 in München

Betreuer: OA PD Dr. med. habil A. Schlitt

Gutachter: 1) Prof. Dr. med. E. Silber
2) Prof. Dr. med. C. Espinola-Klein
3) OA PD Dr. med. habil A. Schlitt

03.11.2009

03.05.2010

Referat und bibliographische Beschreibung

Fondaparinux (Fonda) hemmt als Vertreter einer neuen Klasse von antithrombotischen Substanzen den Gerinnungsfaktor Xa selektiv. Obwohl in großen klinischen Studien nachgewiesen wurde, dass Fonda mindestens so effektiv und sicher wie unfraktioniertes Heparin (UFH) und niedermolekulares Heparin (NMH) ist, zeigte sich in diesen Studien ein signifikanter Anstieg in der Entstehung von Herzkatheterthrombosen während einer perkutanen Koronarintervention (PCI) unter Fonda im Vergleich zur Kontrollgruppe. Das Ziel dieser Promotionsarbeit war es, die in klinischen Studien gezeigte, mangelnde Effektivität von Fonda in der Prävention von Herzkatheterthrombosen in einem *in-vitro*-Modell zu untersuchen.

Für die Versuchsreihen wurde das Blut (je 45 ml) von zehn gesunden Männern verwendet. Alle Probanden nahmen zwei Stunden vor der Blutentnahme eine Dosis von 500 mg Acetylsalicylsäure (ASS) *per os* ein. Das Blut wurde direkt in 50 ml Röhrchen gefüllt, die mit einem Antikoagulant (Gruppe 1 UFH 0,8 U/ml, Gruppe 2 UFH + Eptifibatid 1,7 g/ml, Gruppe 3 Enoxaparin (NMH) 0,6 U/ml, Gruppe 4 Enoxaparin + Eptifibatid, Gruppe 5 Fonda 0,5 g/ml, Gruppe 6 Fonda + Eptifibatid, Gruppe 7 Fonda + UFH 0,5 U/ml, Gruppe 8 Fonda + Eptifibatid + UFH 0,5 U/ml) präpariert waren. Die Probanden waren ihre eigene Kontrollgruppe, jeder Teilnehmer spendete insgesamt achtmal Blut. Aus dem in einem Wasserbad (37 Celsius) stehenden Röhrchen zirkulierte das Blut angetrieben durch eine Rollerpumpe über einen Verbindungsschlauch durch einen Multipurpose 6F Führungskatheter (Cordis) zurück in das Röhrchen. Die Blutflussgeschwindigkeit lag bei 3 ml/min und die Versuchsdauer entsprach 60 Minuten. Um die Thromben zu quantifizieren wurde jeder Herzkatheter vor und nach dem Versuch gewogen. Die Zahl der Erythrozyten und die Fibrinentwicklung auf der Katheterinnenfläche wurden mittels elektronenmikroskopischer Analysen der Katheterspitze ermittelt. In allen Experimenten in denen ausschließlich Fonda (0,5 g/ml) zur Antikoagulation verwendet wurde kam es zu einem thrombotischen Verschluss der Herzkatheter nach maximal 45 Minuten. Selbst bei Erhöhung der Konzentration bis zu 2 g/ml, entsprechend einer viermal übertherapeutischen Dosierung, kam es zur Thrombosierung. Ähnliche Ergebnisse wurden bei den Versuchen mit der Kombination von Fonda und Eptifibatid beobachtet. Alle anderen Experimente, einschließlich der Versuchsreihen, in denen Fonda (0,5 g/ml) mit UFH (0,5 U/ml) kombiniert wurde, konnten bis zum Ende der 60 Minuten durchgeführt werden. Zusätzlich konnten ein signifikant erhöhtes Thrombusgewicht, im Rasterelektronenmikroskop eine signifikant erhöhte Erythrozytenzahl sowie Fibrinablagerung in den Gruppen 5 (Fonda) und 6 (Fonda + Eptifibatid) beobachtet werden.

Der Einsatz von Fonda, ebenso wie Fonda + Eptifibatid, war in dieser *in-vitro*-Studie nicht ausreichend, um die Entstehung von Herzkatheterthrombosen zu verhindern. Die Kombination von Fonda und UFH war dagegen genauso effektiv wie alle übrigen Behandlungsstrategien. Somit scheint Fondaparinux in der speziellen Situation der perkutanen Koronarintervention der Gabe der klassischen Antikoagulantien unterlegen.

Reindl, Iris Katharina: *In-vitro*-Vergleich von unfraktioniertem und niedermolekularem Heparin mit Fondaparinux zur Prävention von Herzkatheterthrombosen.
Halle (Saale), Univ.,Med. Fak.,Diss., 77 Seiten, 2009

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	1
1.1 Koronare Herzerkrankung	1
1.1.1 Allgemeines	1
1.1.2 Pathophysiologie der Atherosklerose	1
1.1.3 Akutes Koronarsyndrom (ACS)	3
1.2 Perkutane Koronarintervention (PCI)	5
1.3 Das Hämostasesystem des Menschen	7
1.3.1 Geschichte und allgemeine Aspekte der Hämostase	7
1.3.2 Zelluläres Gerinnungssystem	8
1.3.3 Plasmatisches Gerinnungssystem	9
1.3.4 Intrinsisches System.....	11
1.3.5 Extrinsisches System	11
1.3.6. Fibrinolytisches System.....	12
1.4 Antikoagulantien	13
1.4.1 Heparine	14
1.4.2 Fondaparinux.....	18
2. ZIELSTELLUNGEN	20
3. MATERIAL UND METHODIK	21
3.1 Laborgeräte und Verbrauchsmaterialien	21
3.2 Blutentnahme und Auswahl der Probanden	22
3.3 Antikoagulanziendosierung	23
3.4 Versuchsablauf und Präparation der Herzkatheter	24
3.5 Elektronenmikroskopische Untersuchung	27
3.5.1 Allgemeines zur Elektronenmikroskopie.....	27
3.5.2. Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)	28
3.5.3. Rasterelektronenmikroskopie (REM).....	29
3.6 Hämostaseologische Untersuchungsmethoden	31
3.6.1 Quick-Test	31
3.6.2 International Normalized Ratio	32
3.6.3 Aktivierte partielle Thromboplastinzeit.....	33
3.6.4. D-Dimer	33
3.6.5 Anti Xa-Bestimmung.....	34
3.6.6 Activated clotting time.....	34

4. ERGEBNISSE	36
4.1 Probandenbeschreibung und Vorversuche	36
4.2 Vergleich des Thrombusgewichtes	37
4.3 Vergleich der Laufzeiten	39
4.4 Elektronenmikroskopische Auswertung	41
4.4.1 Erythrozytenanzahl.....	42
4.4.2 Fibrinentwicklung.....	45
4.4.3 Korrelationen	46
4.5 Laborparameter	49
4.5.1 Thrombin-Antithrombin-Komplex (TAT).....	49
4.5.2 D-Dimer	49
5. DISKUSSION	52
5.1 Entwicklung der PTCA	52
5.2. Entwicklung der Thrombozytenaggregationshemmung.....	53
5.3 Gerinnungshemmende Therapie bei perkutaner Koronarintervention 55	55
5.3.1 Unfraktioniertes Heparin.....	55
5.3.2 Niedermolekulares Heparin	57
5.3.3 Hirudin und Bivalirudin.....	58
5.4 Aktuelle Studienlage zu Fondaparinux.....	59
5.5 Herzkatheterthrombosen	61
5.6 Gerinnungsaktivierung an Fremdoberflächen	64
5.7 Limitationen	67
6. ZUSAMMENFASSUNG	68
7. LITERATURVERZEICHNIS	69
8. THESEN.....	76
9. ANHANG	
9.1. Lebenslauf	
9.2 Selbstständigkeitserklärung	
9.3 Erklärung über frühere Promotionsversuche	
9.4 Danksagung	

Abkürzungsverzeichnis

ACS:	Akutes Koronarsyndrom
ACT:	Activated clotting time
ADP:	Adenosindiphosphat
aPTT:	Aktivierte partielle Thromboplastinzeit
ASS:	Acetylsalicylsäure
AT:	Antithrombin
BMS:	Bare metal stents
Ca ²⁺ :	Kalzium-Ionen
CK:	Kreatinkinase
CK-MB:	Kreatinkinase MB
CRT:	Cathode ray tube
DES:	Drug eluting stents
DTI:	Direkter Thrombininhibitor
EKG:	Elektrokardiogramm
EMA:	European Medicines Agency
ESC:	European Society for Cardiology
F/Fa:	Faktor/aktivierter Faktor
Fonda:	Fondaparinux
GP:	Glykoprotein
HIT:	Heparininduzierte Thrombozytopenie
HMDS:	Hexamethyldisialzane
HMWK:	High-molecular-weight-kininogen
i.v.:	Intravenös
IE:	Internationale Einheiten
INR:	International Normalized Ratio
ISI:	International Sensitivity Index
KHK:	Koronare Herzkrankheit
NMH:	Niedermolekulares Heparin
NO:	Stickstoffmonoxid
NSTEMI:	Nicht-ST-Hebungs Myokardinfarkt
PCI:	Perkutane Koronarintervention
PGI ₂ :	Prostazyklin I ₂
PR:	Prothrombin-Ratio
PTA:	Plasma Thromboplastin Antecedent
PTCA:	Perkutane transluminale Koronarangiographie
REM:	Rasterelektronenmikroskop

s.c.:	Subkutan
STEMI:	ST-Hebungs Myokardinfarkt
TAT:	Thrombin-Antithrombin-Komplex
TEM:	Transmissionselektronenmikroskop
TF:	Tissue factor
TXA2:	Thromboxan A2
UFH:	Unfraktioniertes Heparin
vWF:	von-Willebrand-Faktor
WHO:	Weltgesundheitsorganisation

1. Einleitung

1.1 Koronare Herzerkrankung

1.1.1 Allgemeines

Die Koronare Herzerkrankung (KHK) ist die Manifestation der Atherosklerose der Koronararterien und gehört zu den wichtigsten Volkskrankheiten in den Industrieländern. Die Entstehung stenosierender Veränderungen durch die Atherosklerose des Herzkranzgefäßsystems kann zu einer Reduktion des arteriellen Blutflusses und somit zu einem Missverhältnis zwischen Sauerstoffverbrauch und Sauerstoffangebot in den abhängigen Herzmuskelarealen führen (Myokardischämie). Die KHK und ihre Komplikationen wie Herzinsuffizienz, Myokardinfarkt und Herzrhythmusstörungen, gehören in Deutschland zu den häufigsten Todesursachen. In den Frühstadien der Erkrankung treten meist noch keine klinischen Symptome auf, der Verlauf ist jedoch insgesamt sehr variabel. Grundsätzlich ist eine Unterscheidung zwischen einer chronischen Verlaufsform mit stabiler Beschwerdesymptomatik und lebensbedrohlichen akuten Ereignissen (Akutes Koronarsyndrom) möglich. Die genaue Prävalenz der koronaren Herzerkrankung ist nicht bekannt. Um die Häufigkeit der symptomatisch stabilen KHK zu veranschaulichen, eignet sich die Anzahl der verordneten definierten Tagesdosen eines Nitrat-Präparates zur Behandlung des Leitsymptoms der KHK, der Angina pectoris. Im Jahr 2002 betrug diese in Deutschland 775 Millionen Tagesdosen. Durch Verhaltensmodifikation und medikamentöse Therapie können beeinflussbare von unbeeinflussbaren Risikofaktoren unterschieden werden. Zu den Erstgenannten gehören Nikotinabusus, Dyslipoproteinämie, Adipositas, Diabetes mellitus und arterielle Hypertonie. Nicht zu beeinflussende Ursachen sind Alter, männliches Geschlecht, verschiedene Umweltfaktoren und genetische Prädisposition. Das Risiko an einer KHK zu erkranken, steigt mit der Anzahl und dem Ausmaß der Risikofaktoren (AkdÄ, 2004; Donner-Banzhoff et al., 2006).

1.1.2 Pathophysiologie der Atherosklerose

Unter dem Zusammenspiel der oben genannten Risikofaktoren kommt es zu einer Schädigung der Endothelzellen der Gefäßintima, wodurch deren Gleichgewicht gestört wird. Dies bewirkt eine Freisetzung unterschiedlichster Botenstoffe (Zytokine, Chemokine), die Einfluss auf die Leukozyten des Blutes und die glatte Muskulatur der Gefäßwand haben. Dieses Umfeld, geprägt durch vermehrte Inflammation und Hyperkoagulabilität, begünstigt die Entstehung und Weiterentwicklung einer atherosklerotischen Plaque (Schlitt et al., 2007).

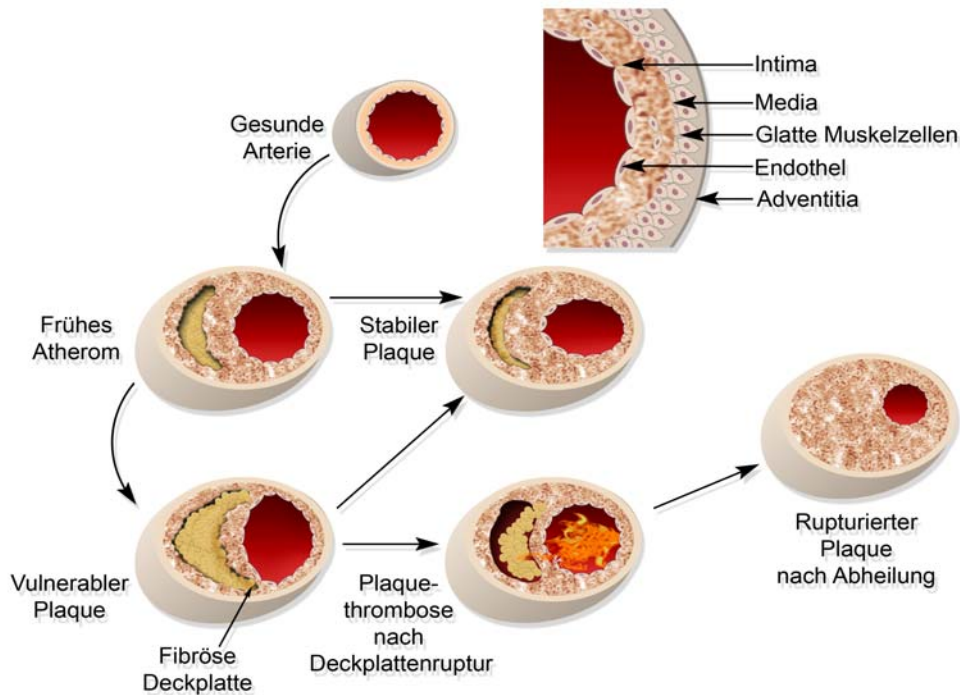


Abb. 1: Darstellung einer atherosklerotischen Plaque von einer gesunden Arterie hin zu einer vulnerablen Plaque. Modifiziert nach (Libby, 2002).

Durch Einwanderung von Entzündungszellen, insbesondere Monozyten, in die Gefäßintima und der Akkumulation von Lipiden in Makrophagen (Schaumzellen) entwickelt sich ein Frühstadium einer atherosklerotischen Plaque (frühes Atherom, „fatty streak“). Dieses Frühstadium kann sich komplett zurückbilden. Weit häufiger ist jedoch die über Jahrzehnte dauernde Fortentwicklung zu einer bindegewebigen (fibrösen) oder komplizierten (vulnerablen) Plaque. Die fibröse atherosklerotische Plaque besteht aus einer Deckplatte, die aus Bindegewebe und glatten Muskelzellen gebildet wird und den prokoagulatorischen, fett- und zellreichen Kern der Plaque vom Blutstrom trennt. Die klinische Manifestation bei Vorliegen dieser Plaques in einer Koronararterie ist in der Regel eine stabile KHK (stabile Angina pectoris). Verliert die atherosklerotische Läsion ihre Stabilität, kommt es also zu einem Zerreißen der Deckplatte, bewirkt das in dem Kern der Plaque befindliche Material eine Aktivierung des zellulären und plasmatischen Gerinnungssystems. Es kann zu einem partiellen oder kompletten Gefäßverschluss durch eine Plaquetrombose der Koronar- oder anderer Arterien kommen. Hier erfolgt der Übergang von einer stabilen in eine instabile/akute Situation, die als akutes Koronarsyndrom bezeichnet wird (Rubanyi, 1993; AkdÄ, 2004; Schlitt et al., 2007).

1.1.3 Akutes Koronarsyndrom (ACS)

Unter dem Begriff ACS werden die klinischen Manifestationsformen der KHK subsummiert, die unmittelbar lebensbedrohlich sind. Hierzu gehören die instabile Angina Pectoris (typische thorakale Beschwerden + Ischämiezeichen im 12-Kanal-EKG), der Nicht-ST-Hebungsinfarkt (NSTEMI, typische thorakale Beschwerden + pathologischer Troponin-Nachweis \pm Ischämiezeichen im 12-Kanal-EKG), der akute ST-Hebungsinfarkt (STEMI, typische thorakale Beschwerden + signifikante ST-Hebungen im 12-Kanal-EKG) und der plötzliche Herztod. Hintergrund für diese Einteilung ist die gemeinsame Pathophysiologie mit Ruptur einer vulnerablen Plaque (Schlitt et al., 2007).

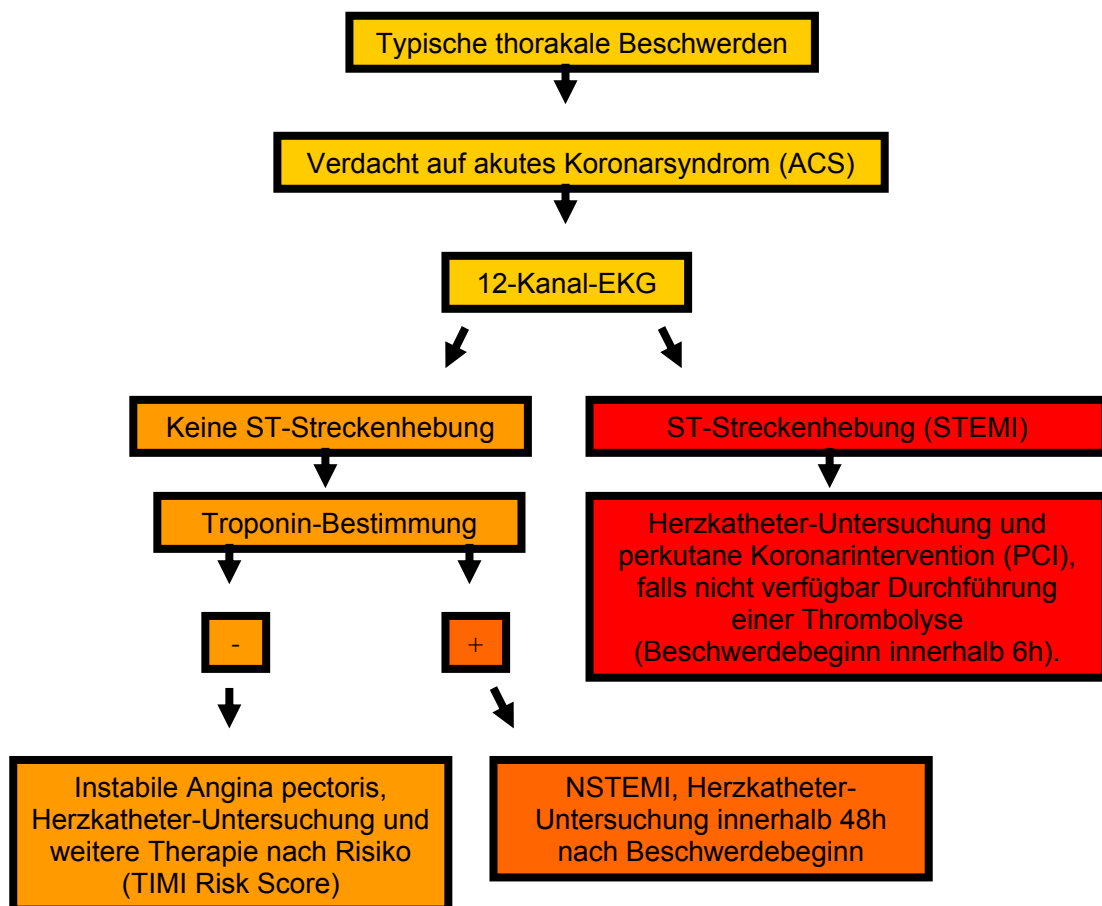


Abb. 2: Flow –Chart zur Diagnose und Therapie des akuten Koronarsyndroms (Schlitt et al., 2007).

Die klinischen Symptome einer instabilen Angina Pectoris, eines NSTEMI, oder eines STEMI gehen fließend ineinander über. Leitsymptom ist der retrosternal betonte Schmerz mit Ausstrahlung in die linke Thoraxhälfte, die linke Schulter oder/und den

linken Arm. Weiterhin können die Beschwerden in Nacken, Hals, Kiefer, rechten Arm oder Oberbauch lokalisiert sein (atypische Beschwerden). Oft kommen Dyspnoe, Schweißausbrüche und andere vegetative Zeichen, kombiniert mit einem Gefühl der Lebensbedrohung, hinzu. Typisch sind die länger als 20 Minuten anhaltenden „Ruhebeschwerden“ und eine Besserung der Symptomatik nach Verabreichung eines antiischämischen Medikaments, z.B. sublingual applizierte Nitrates, innerhalb von fünf Minuten. Bei älteren Patienten, Frauen und Diabetikern sind die Symptome häufig atypisch oder maskiert („stumme Myokardischämie“). Diagnose und Risikostratifizierung sind bei einem ACS von großer Bedeutung für die zeitnahe und optimale Versorgung des Patienten, um Komplikationen wie Myokardinfarkt oder Tod möglichst zu verhindern. Die Ableitung eines 12-Kanal-EKG nimmt eine zentrale Stellung bei der Diagnosefindung ein und sollte deshalb innerhalb von zehn Minuten nach Beginn der Schmerzperiode und darauf folgend nach sechs bis zwölf Stunden geschrieben werden. Eine ST-Strecken-Senkung bei instabiler Angina pectoris oder NSTEMI von $\geq 0,2$ mV in zwei oder mehreren Ableitungen deutet auf eine besonders schlechte Prognose hin. Ein scheinbar unauffälliges EKG reicht nicht zum Ausschluss eines ACS aus, unverzichtbar zur weiteren Diagnosefindung sind heutzutage biochemische Marker. Die Kreatinkinase (CK) und dessen Isoenzym CK-MB haben bei Erhöhung prognostische Aussagekraft, werden aber an Sensitivität und Spezifität von Troponin T und I übertroffen. In der heutigen Infarkt Diagnostik wird meist ein Troponin-Schnelltest durchgeführt. Erhöhte Troponinwerte finden sich frühestens drei bis vier Stunden nach dem Ischämieereignis. Nach einem Infarkt bleiben die Troponinwerte bis zu drei Wochen erhöht. Bei Postinfarkt-Angina, aber auch selten bei Patienten mit Niereninsuffizienz kann es also zu falsch positiven Werten kommen. Das Ergebnis des Troponintests sollte immer zusammen mit dem klinischen Bild und der EKG Auswertung interpretiert werden. Die Koronarangiographie ist derzeit der Goldstandard zur Diagnose und Beurteilung des Schweregrades einer KHK. Angiographische Befunde bilden die Basis für die Indikation einer perkutanen oder operativen Revaskularisierung. Zur Linderung des Beschwerdebildes der Patienten sollte eine antiischämische Therapie erfolgen. Hierzu stehen Medikamente wie Nitrates, Beta-Blocker und ggf. Kalziumantagonisten zur Verfügung. Alle Patienten sollten eine Sättigungsdosis (250 mg) Acetylsalicylsäure erhalten. Eine Prophylaxe mit 100 mg täglich ist lebenslang fortzuführen. Zusätzlich sollten Patienten mit ACS in der Akutphase plasmatische Gerinnungshemmer (Fondaparinux, UFH, NMH, Bivalirudin) sowie den thrombozytären ADP-Antagonisten Clopidogrel erhalten. Falls eine invasive Diagnostik indiziert ist, sollte bei Hochrisikopatienten in zeitlichem Zusammenhang zur perkutanen Koronarintervention (PCI) ein Glykoprotein IIb/IIIa-Antagonist verabreicht werden (Hamm, 2004a,b).

1.2 Perkutane Koronarintervention (PCI)

Bei Patienten mit instabiler Angina oder einem NSTEMI kann mit Hilfe des TIMI Risk-Scores die Prognose abgeschätzt werden. Sind bei einem Patienten drei oder mehr der Faktoren, die in Abbildung 3 aufgeführt sind, nachzuweisen, liegt bei ihm ein erhöhtes Risiko für weitere kardiogene Ereignisse bzw. Komplikationen vor. Jedem Patienten mit Risikofaktoren (siehe Abbildung 3) sollte umgehend eine der klinischen Situation des Patienten angemessene, medikamentöse und/oder interventionelle Therapie empfohlen werden (Schlitt et al., 2007).

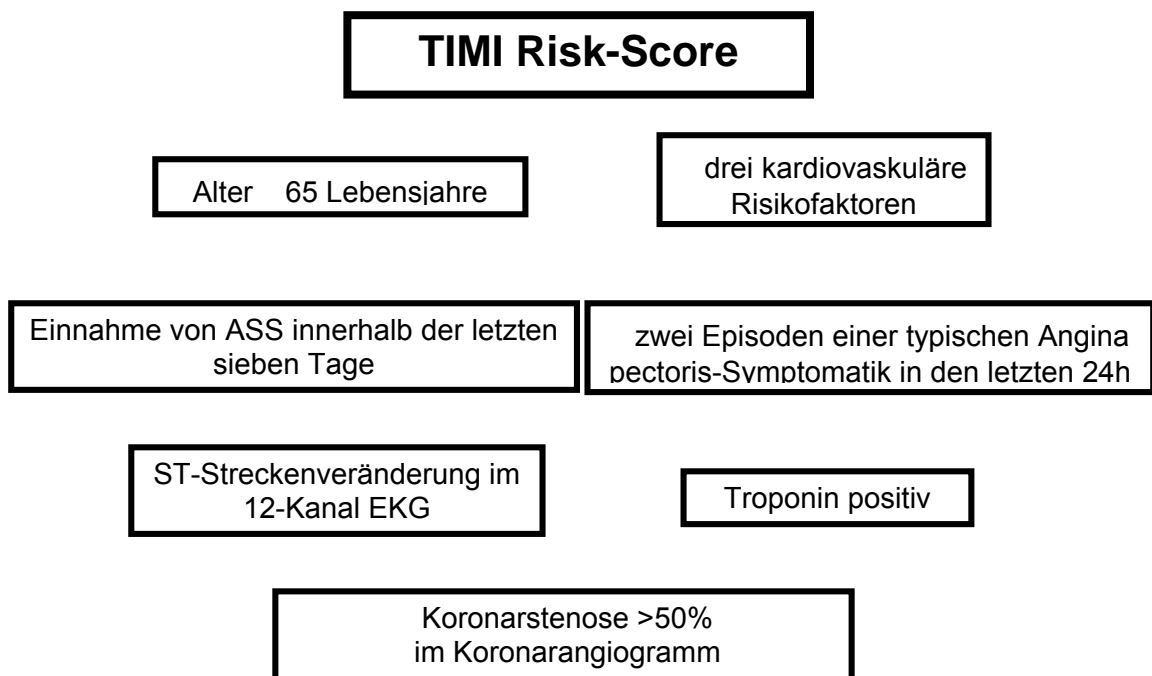


Abb. 3: TIMI Risk-Score zur Risikostratifizierung bei instabiler A. P. und NSTEMI (Schlitt et al., 2007).

Beim akuten ST-Hebungs Myokardinfarkt (STEMI) ist das primäre Ziel des invasiven Vorgehens die Diagnosesicherung. In mehr als 90% der Fälle kann ein thrombotischer Verschluss einer Koronararterie festgestellt werden. Nach angiographischer Darstellung der Koronararterien wird mittels eines Führungsdrahtes versucht, die verschlossene Stelle zu passieren und mittels einer Ballondilatation und in der Regel anschließender Stentimplantation den Blutfluss wiederherzustellen. Alternativ kann in Krankenhäusern, in denen keine primäre PCI zu Verfügung steht, innerhalb des Symptombeginns nach 6 (-12) Stunden eine fibrinolytische Therapie durchgeführt werden. In den letzten Jahren wurde die Überlegenheit der primären PCI als Reperfusionstrategie gegenüber der

Fibrinolyse nachgewiesen. Eine Metaanalyse aus mehreren, randomisierten Studien zeigt eine Reduktion der Infarktsterblichkeit von 25% unter der PCI gegenüber der Fibrinolyse. Im Vergleich sinkt zusätzlich das Risiko für einen Schlaganfall um absolute 1% und das Reinfarktisiko um mehr als die Hälfte (Nationale Versorgungsleitlinien, 2006). Die Möglichkeit zur Versorgung in einem Herzkatheterlabor und somit die Durchführung einer primären PCI ist im Moment bei weniger als 20% der Krankenhäuser in Deutschland gegeben. Da diese Methode von der lokalen Verfügbarkeit abhängig ist, muss die optimale Behandlungsstrategie individuell entschieden werden. Die verschiedenen Reperfusionsmöglichkeiten sind in Tabelle 1 in empfohlener Reihenfolge dargestellt. Die Primär-Dilatation sollte von einem erfahrenen Untersucher an einer Klinik mit mindestens 40 Infarkt-Interventionen pro Jahr und guter intrahospitaler Logistik durchgeführt werden. Ist die PCI nicht innerhalb eines Zeitintervalls von 90 Minuten möglich, ist die Fibrinolysetherapie vorzuziehen (Hamm, 2004b).

Tab. 1: Stufenempfehlung für die Therapie des akuten Herzinfarkts (Schmerzbeginn < 12 h) (Hamm, 2004b).

Rang	Maßnahme	Evidenz	Empfehlungsstärke/Evidenz
1	Primäre PCI innerhalb von 1,5 h	Mehrere randomisierte Studien	I-A
2	Prästationäre Lyse mit anschließender Verbringung in ein Krankenhaus mit PCI	Eine randomisierte Studie	I-B
3	Prästationäre Lyse und anschließender stationärer Aufenthalt in einem Krankenhaus ohne PCI	Mehrere randomisierte Studien	I-A
4	Stationäre Lyse	Viele randomisierte Studien	I-A

Die Hemmung der Blutgerinnung ist bei dem Vorliegen eines ACS und einer eventuell anstehenden Herzkatheteruntersuchung von entscheidender Bedeutung, um den vollständigen Verschluss und/oder das Anwachsen des Thrombus in der betroffenen Arterie zu verhindern. Hierzu steht heutzutage eine große Auswahl verschiedener Medikamente zur Verfügung. Kapitel 1.4 beschäftigt sich sowohl mit den klassischen als auch mit den neueren Substanzen zur Hemmung der Blutgerinnungsfaktoren.

1.3 Das Hämostasesystem des Menschen

1.3.1 Geschichte und allgemeine Aspekte der Hämostase

Seit der Antike erklärte man sich die Bildung von Thromben als Metastasen der schwarzen Galle. Diese Theorie beruhte auf der Viersäftelehre des Empedokles (490-430 v.Chr.), einer Weiterentwicklung der Hippokratischen Schrift „Über die Natur des Menschen“ (um 400 v.Chr.). Ab dem 17.Jahrhundert wurde mit der Untersuchung der physiologischen und molekularen Mechanismen begonnen. Alexander Schmidt (1831-1894) veröffentlichte 1876 ein Gerinnungskonzept, das auf miteinander wechselwirkenden Proteinen basierte. Auch die Rolle des Kalziums wurde in dieser Theorie bereits beschrieben. Lange Zeit wurde diskutiert, welche Stoffe an der Gerinnung wirklich beteiligt sind und wie sie im Detail abläuft. Im Jahr 1904 stellte Paul Morawitz das System schon fast so dar, wie es heute bekannt ist. Er prägte den Begriff der plasmatischen Gerinnung und beschrieb die folgenden zwei Phasen:

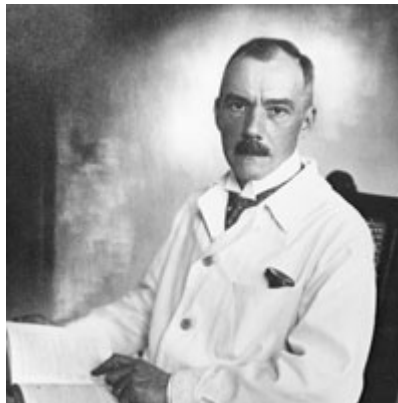
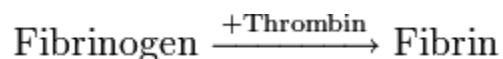


Abb. 4: Paul Morawitz (Bauer und Mall, 1995)

Die molekularen Mechanismen der Blutgerinnung wurden zum größten Teil erst im Laufe des 20.Jahrhunderts entdeckt, wobei Paul Owren (1905-1990) mit der Entdeckung des Proaccelerin (Faktor V) einen großen Beitrag leistete.

Unter Hämostase (hämo = Blut, stase = stehen, Bedeutung: Blutstillung) versteht man die physiologischen Vorgänge, die dazu dienen, größere Blutverluste bei Verletzungen zu verhindern und das Blut im Gefäßsystem unter Aufrechterhaltung der Fluidität und

Zirkulation zu halten. Sie ist ein lebenswichtiger Mechanismus. Kommt es zu Fehlern oder Ausfällen in diesem System, führt dies entweder zu einer Thromboseneigung (Thrombophilie) oder zu einer Blutungsneigung (Hämophilie).

Der komplexe Prozess der Blutgerinnung wird durch das Zusammenspiel von Endothelzellen, Thrombozyten, plasmatischen Gerinnungsfaktoren und Gerinnungsinhibitoren gewährleistet. Zwischen den Systemen der zellulären und plasmatischen Hämostase bestehen enge funktionelle und zeitliche Beziehungen. Eine scharfe Grenzziehung zwischen den beiden Systemen ist überwiegend von didaktischem Nutzen. *In vivo* sind diese Vorgänge eng miteinander verknüpft und lassen sich nicht derart scharf unterteilen (Bauer und Mall 1995).

1.3.2 Zelluläres Gerinnungssystem

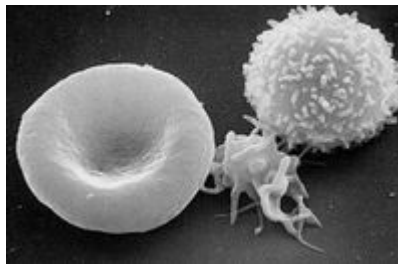


Abb. 5: Erythrozyt, Thrombozyt, Leukozyt (Luxembourg et al., 2007)

Im menschlichen Blut sind im Normalfall zwischen 150.000 und 400.000 Thrombozyten pro Mikroliter enthalten. Ist das Gefäßsystem unverletzt, liegen die Blutplättchen in einem inaktiven Zustand vor. Entsteht eine Verletzung des Gefäßendothels, kommt Blut mit extravasalem Gewebe in Kontakt und es wird unter anderem subendotheliales Kollagen freigelegt. Thrombozyten treten über den von-Willebrand-Faktor (vWF), einem Adhäsionsprotein, mit dem Subendothelium in Kontakt. Dies führt zu einer Adhäsion der Thrombozyten an das Endothel, vermittelt durch den vWF, der sowohl an die freiliegenden Kollagenfasern, als auch über bestimmte Oberflächenrezeptoren (Glykoprotein Ib/IX und IIb/IIIa) an die Thrombozyten bindet. Während dieses Vorgangs erfolgt eine Aktivierung der Blutplättchen, die sie zur Exozytose ihrer Granula veranlasst. Zusätzlicher vWF, aber auch andere parakrin wirkende Mediatoren wie z.B. ADP, Thromboxan A₂, Katecholamine und Serotonin werden freigesetzt. Hierdurch werden weitere Thrombozyten aktiviert.

Die Thrombozytenaggregation besteht aus einer Umorganisation der Zellmembran und einer Formveränderung mit Hilfe des Zytoskeletts. Die aktivierten Blutplättchen nehmen

Stachelform an und bilden Pseudopodien aus, mit deren Hilfe sie sich untereinander verzahnen. Innerhalb kürzester Zeit (1-3 min) entsteht ein Thrombozytenthrombus, der einen vorläufigen Gefäßwandverschluss bewirkt (weißer Thrombus). Prostazyklin (PGI₂) und Stickstoffmonoxid (NO), beide aus Endothelzellen freigesetzt, verhindern eine überschießende Thrombozytenaktivierung. TXA₂ und andere Botenstoffe führen zusätzlich zu einer Kontraktion der Gefäße und hierdurch zur Verlangsamung des Blutflusses. Diesen Vorgang bezeichnet man auch als primäre Hämostase.

Da sich der Gefäßpfropf nach wenigen Minuten wieder auflösen würde und es so erneut zur Blutung käme, schließt sich eine Stabilisation durch das plasmatische Gerinnungssystem an (sekundäre Hämostase) (Schmidt und Lang, 2004; Luxembourg et al., 2007).

1.3.3 Plasmatisches Gerinnungssystem

An der sekundären Hämostase sind Gerinnungsfaktoren, Kalzium-Ionen (Ca²⁺) und negativ geladene Phospholipide aus der Thrombozytenmembran beteiligt. Die negativ geladenen Phospholipide bilden die Matrix der ebenfalls negativ geladenen Gerinnungsfaktoren, wobei das Kalzium deren Bindeglied darstellt. Die Gerinnungsfaktoren sind Proteine und gehören zum Großteil in die Familie der Serinproteasen mit Serin in ihrem aktiven Zentrum. Sie liegen als inaktive Vorstufen im Blutplasma vor (Zymogene) und werden durch limitierte Proteolyse aktiviert. Der aktivierte Faktor ist in der Lage, seine enzymatischen Eigenschaften auszuführen und weitere Faktoren zu stimulieren. Er wird in der Literatur durch Zufügung eines „a“ gekennzeichnet. Alle Aktivierungen und Umsetzungen finden nicht frei im Plasma, sondern an Oberflächen gebunden statt. Ziel ist es, den primären Verschluss des Gefäßlecks durch Einlagerung von Fibrin zu festigen. Der endgültige Thrombus besteht aus einem Maschenwerk mechanisch festen Fibrins, in das neben Thrombozytenaggregaten Leukozyten und Erythrozyten eingelagert werden (roter Thrombus). Das Schlüsselenzym des plasmatischen Gerinnungssystems ist das Thrombin. Sowohl das extrinsische als auch das intrinsische System münden in die Umwandlung von Prothrombin zu Thrombin, das die Bildung von Fibrinogen zu Fibrin katalysiert (Prondzinski, 2002; Luxembourg et al., 2007).

Tab. 2: Gerinnungsfaktoren und ihre Funktionen.
Modifiziert nach (Prondzinski, 2002).

Nummer	Name(n)	Funktion
I	Fibrinogen	Bildet das Fibrinnetz
II	Prothrombin	Die aktive Form Thrombin (IIa) ist beteiligt an der Aktivierung der Faktoren I, V, VII und XIII.
III	Thromboplastin, Tissue factor (TF), Gewebefaktor	Initiator der <i>in-vivo</i> -Gerinnung.
IV	Kalzium	Viele Faktoren benötigen das Kalzium-Kation, um an die negativ geladenen Phospholipide der Plasmamembranen zu binden.
V	Proaccelerin	Kofaktor des Faktors X, mit dem es den Prothrombinase-Komplex bildet.
VII	Proconvertin	Aktiviert IX und X, wird durch Kontakt mit TF aktiviert.
VIII	Antihämophiles Globulin A	Kofaktor des Faktors IX, mit dem es einen Komplex bildet.
IX	Christmas-Faktor, Antihämophiles Globulin B	Aktiviert X, bildet einen Komplex mit VIII.
X	Stuart-Prower-Faktor	Aktiviert Prothrombin, bildet einen Komplex mit VII.
XI	Rosenthal-Faktor, Plasma Thromboplasmin Antecedent (PTA)	Aktiviert XII und IX.
XII	Hageman-Faktor	Aktiviert die Fibrinolyse.
XIII	Fibrinstabilisierender Faktor	Stabilisiert Fibrin durch Bildung von Quervernetzungen.

1.3.4 Intrinsisches System

Bei dem intrinsischen = endogenen System handelt es sich am ehesten um ein *in-vitro*-Phänomen, was dadurch belegt wird, dass Patienten mit Faktor XII Mangel, dem Initiator des intrinsischen Systems, keinerlei Blutungssymptome aufweisen. Von Bedeutung ist dieser Aktivierungsweg aber für die Diagnostik, da sich die Messung der aPTT die Fähigkeit des Faktors XII, durch unphysiologische Fremdoberflächen aktivierbar zu sein, zu Nutze macht.

Der endogene Gerinnungsablauf beginnt mit der Aktivierung des Faktors XII durch negativ geladene Oberflächen, *in vitro* z.B. Kieselerde, oder Celit. Es kommt zur Kontaktaktivierung. FXIIa aktiviert nun FXI, der wiederum FIX aktiviert. FIXa bildet zusammen mit FVIIIa, Kalziumionen und dem Tissue Factor den sogenannten Tenase-Komplex. Dieser katalysiert die Umsetzung von FX zu FXa. Der aktivierte Faktor Xa bildet zusammen mit FVa, Kalzium und Phospholipiden den „Prothrombinaktivator-Komplex“, der dann Prothrombin (FII) zu Thrombin (FIIa) spaltet. Dieser Vorgang gehört bereits zur gemeinsamen Endstrecke des extrinsischen und intrinsischen Aktivierungsweges.

Thrombin hat diverse Wirkungen. Eine davon ist die Umwandlung von Fibrinogen (FI) zu Fibrin (FIa) unter Abspaltung der Fibrinopeptide A und B. Schon kleine Mengen Thrombin können enorme Mengen Fibrinogen zu Fibrin umwandeln. Nach Abspaltung der Fibrinopeptide A und B entstehen durch spontane Polymerisation Fibrinprotofibrillen, die noch wenig stabil, aber im Plasma nicht mehr löslich sind. Erst durch FXIII, der durch Thrombin zu FXIIIa aktiviert wird, entstehen zwischen benachbarten D-Domänen der Fibrinfibrillen kovalente, feste Bindungen (Peptidbindungen).

Thrombin katalysiert außerdem die Umsetzung von FV zu FVa und FVIII zu FVIIIa, was bei beiden die Folge einer positiven Rückkopplung hat. Faktor Va und FVIIa besitzen keine enzymatische Aktivität, sondern dienen der Reaktionsbeschleunigung. Zugleich ist Thrombin ein potenter Plättchenaktivator (Prondzinski, 2002; Schmidt und Lang, 2004; Luxembourg et al., 2007).

1.3.5 Extrinsisches System

Das exogene System wird durch eine Schädigung von Gewebszellen in Gang gesetzt. Der bei einer Verletzung der Endothelzellen freigesetzte Tissue Factor aktiviert den im Plasma vorliegenden FVII zu FVIIa. Der Gewebefaktor bildet zusammen mit Phospholipiden das Gewebsthromboplastin. Im exogenen Gerinnungssystem besteht der Faktor-X-Aktivator folglich aus FVIIa, Gewebsthromboplastin und Kalziumionen. Es folgt die Umsetzung von Prothrombin zu Thrombin.

Die Besonderheit des extrinsischen Systems liegt darin, dass bereits geringe Mengen Faktor VII im Plasma vorliegen müssen, um die Gerinnungskaskade in Gang zu setzen. Sobald jedoch der Faktor X aktiviert wird, verstärkt sich das System selbst (Prondzinski, 2002; Schmidt und Lang, 2004).

1.3.6. Fibrinolytisches System

Als Gegenspieler des Gerinnungssystems verhindern Plasmin, Antithrombin III und das Protein C-System eine überschießende Blutgerinnung und begünstigen die Wiederöffnung des Gefäßes. Ähnlich dem plasmatischen Gerinnungssystem kommt es auch bei der Fibrinolyse zu kaskadenartigen Aktivierungen von Enzymen, die letztlich zur proteolytischen Umsetzung von Plasminogen zu Plasmin führen. Plasmin spaltet diverse Gerinnungsfaktoren sowie Fibrin und führt so zu einer Auflösung des Gerinnsels. Antithrombin III ist ein Proteinase-Hemmer und kann so die Wirkung verschiedener aktivierter Faktoren inhibieren. Protein C verhindert den Verstärkungseffekt von FVa und FVIIIa, indem es diese beiden Faktoren hemmt und auf diesem Wege die Bildung des Prothrombinasekomplexes blockiert. Zwischen dem System der Blutgerinnung und dem System der Fibrinolyse bestehen abgestimmte Gleichgewichte. Störungen können zu schweren Blutungen oder zur Thrombenbildung an Orten ohne Verletzung führen (Prondzinski, 2002; Schmidt und Lang, 2004).

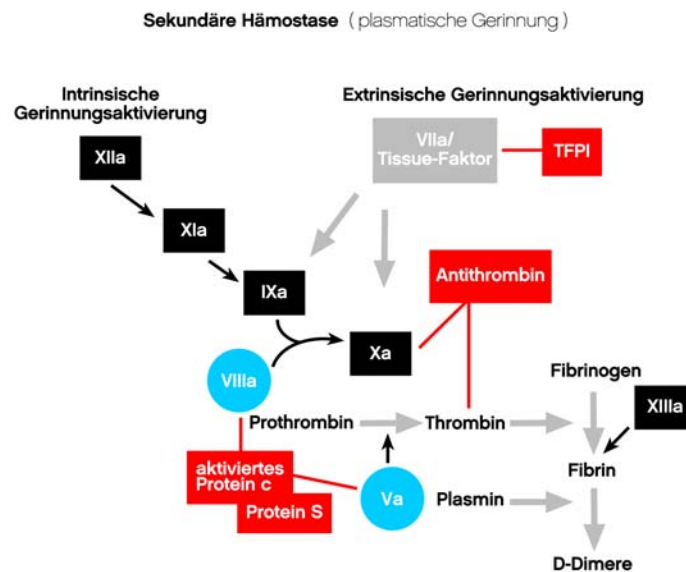


Abb. 6: Schematische Darstellung der sekundären Hämostase. Modifiziert nach (Bonner-Danzhoff et al., 2006)

1.4 Antikoagulantien

Die Hemmung des Gerinnungssystems ist in einer Vielzahl von Situationen erforderlich. Es stehen unterschiedlichste Angriffspunkte für den Einsatz von Medikamenten zur Verfügung. Über Jahrzehnte beschränkte sich die Auswahl der Hemmstoffe des Gerinnungssystems auf zwei unterschiedliche Substanzklassen: Vitamin-K-Antagonisten und unfraktioniertes Heparin. Seit Mitte des 20. Jahrhunderts werden beide routinemäßig angewandt. Inzwischen hat die Medizin den Nutzen einer effizienten medikamentösen Antikoagulation erkannt und sucht intensiv nach Möglichkeiten, diese zu optimieren. Die Zulassung innovativer Arzneistoffe rückte dieses Thema ganz aktuell ins allgemeine Interesse und gab Anlass für zahlreiche Studien. Im folgenden Kapitel werden einige klassische, aber auch moderne Medikamente zur plasmatischen Gerinnungshemmung aufgeführt (Alban, 2007).

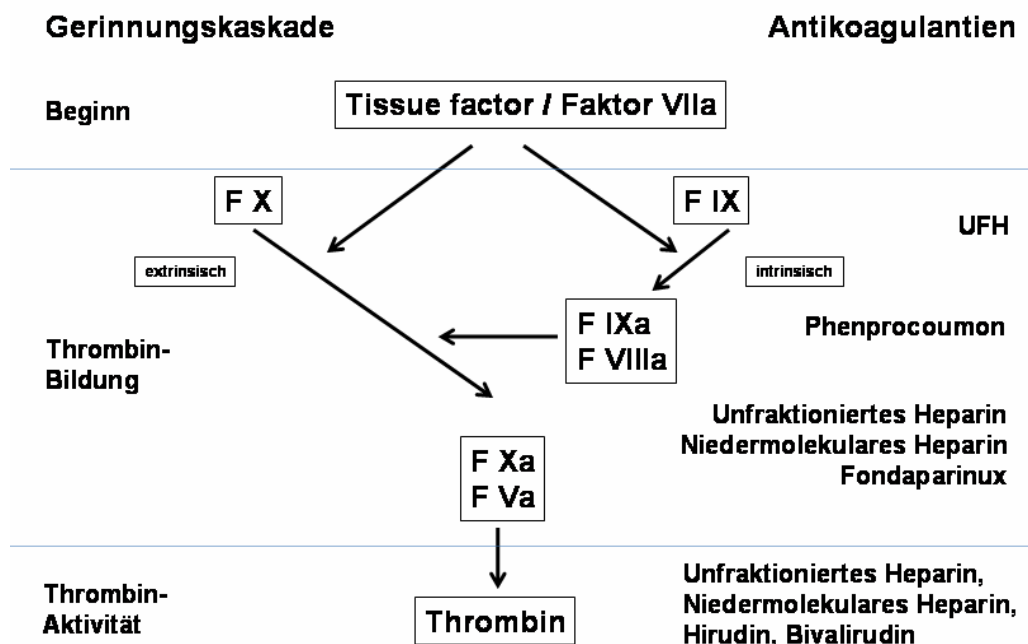


Abb. 7: Die Gerinnungskaskade und die Wirkung der unterschiedlichen Blutgerinnungshemmer (Schlitt et al., 2007).

1.4.1 Heparine

Heparine sind Arzneistoffe bei denen es sich nicht um chemisch definierte Moleküle handelt, sondern um komplexe Mischungen heterogener Glukosaminoglykane. Sie bestehen aus jeweils abwechselnden Folgen von D-Glucosamin und einer Uronsäure. Mit einer Kettenlänge von bereits fünf Monosacchariden sind sie gerinnungshemmend. Ihren Kettenbausteinen entsprechend besitzen sie viele negative Ladungen, über die sie auch mit Antithrombin III in Kontakt treten. Stoffe mit einer Kettenlänge von über 18 Molekülen werden als unfraktioniertes Heparin bezeichnet (Alban, 2007).

Unfraktioniertes Heparin

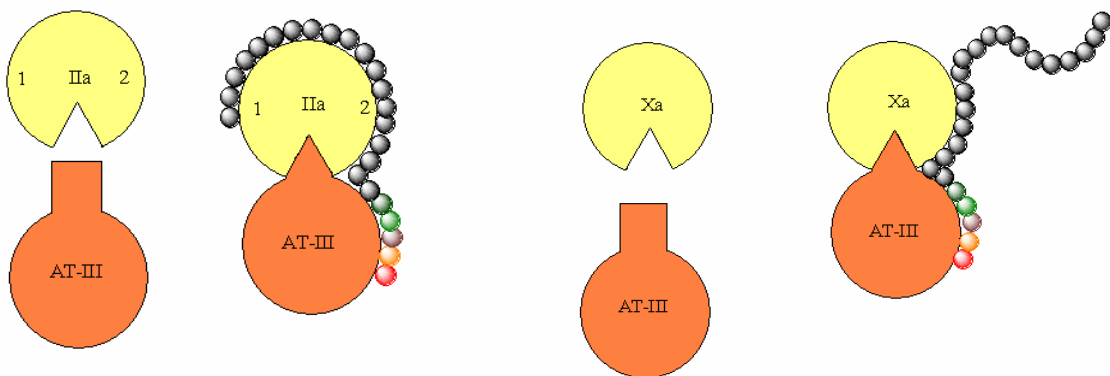


Abb. 8: Schematische Darstellung der Wirkung des UFH auf Prothrombin und Faktor Xa (Schlitt et al., 2007).

Natürliche Heparine werden aus Dünndarmmukosa vom Schwein oder aus Rinderlungen extrahiert und unterliegen als Naturstoffextrakte stets gewissen Schwankungen. Auch gerinnungsfördernde Wirkmechanismen (paradoxe Wirkungen), z.B. Plättchenaktivierung, sind bekannt. Da Heparin nicht im Magen-Darm-Trakt resorbiert werden kann, muss es parenteral appliziert werden. Die Injektion kann subkutan oder intravenös erfolgen. Die Dosis zur Erzielung eines therapeutischen Wirkspiegels ist individuell sehr verschieden und verändert sich im Laufe der dauerhaften Anwendung, unter anderem aufgrund der Bildung von Antikörpern. Dies macht, bei längerer intravenöser Anwendung, die tägliche Kontrolle der Wirksamkeit mit Hilfe der sogenannten aktivierten partiellen Thromboplastinzeit (aPTT) notwendig. Bei therapeutischer Antikoagulation sollte diese auf das Doppelte des Ausgangswertes erhöht sein, was laut Literatur 50-70 Sekunden entspricht. Eine alternative Methode zur Messung des Wirkspiegels von UFH ist die „activated clotting time“ (ACT). Dieser

Schnelltest ist in der Regel in Herzkatheterlaboren oder in Operationssälen der Herz-Thorax-Chirurgie verfügbar. Bei einer PCI sollte eine ACT von 250-350 Sekunden erzielt werden, um das Risiko für akute thrombotische Komplikationen im Anschluss an die Intervention zu reduzieren. Bei kombinierter Gabe mit einem Glykoprotein IIb/IIIa-Hemmer wird eine niedrigere ACT von 200-300 Sekunden empfohlen. Mit einer einmaligen Gabe von 100 IE Heparin pro kg Körpergewicht und einer Reduktion der Dosis auf 50-60 IE bei zusätzlicher Applikation von GPIIb/IIIa-Hemmern ist dies gewöhnlich zu erreichen. Vor und während einer rein diagnostischen Koronarangiographie gibt es unterschiedliche Empfehlungen zur Gabe von Heparin. Das Spülen der Katheter und Schleusen mit heparinierter Kochsalzlösung wird als ausreichend angesehen. Ein weiterer wichtiger Aspekt in diesem Zusammenhang ist, dass arterielle Schleusen nach PCI erst bei einer ACT von unter 150 Sekunden entfernt werden sollten (Schlitt et al., 2007).

Die antikoagulatorische Aktivität des Heparins beruht vor allem auf der Verstärkung der Wirkung der „Gerinnungsbremse“, des Antithrombin (AT) III. Heparin bindet an AT III und induziert somit eine Konformationsänderung, das zu einer Beschleunigung der von diesem Enzym katalysierten Reaktionen um etwa das 1.000fache führt. Zur Antagonisierung steht Protamin zur Verfügung, wobei pro Einheit Heparin eine Einheit Protamin benötigt wird.

Als unerwünschte Nebenwirkung der Gabe von unfraktioniertem Heparin kann eine überschießende Blutungsneigung auftreten. Risikogruppe hierfür sind vor allem Frauen mit niedrigem Gewicht und Patienten mit eingeschränkter Nierenfunktion. Insbesondere in Kombination mit GPIIb/IIIa-Hemmern kann es nach einer Herzkatheteruntersuchung zu schwerwiegenden Blutungen kommen.

Die GPIIb/IIIa-Hemmern inhibieren den Fibrinogenrezeptor der Thrombozytenoberfläche, wodurch die Blutplättchen-Fibrinogen-Vernetzung im Blut blockiert wird. Die verfügbaren Präparate unterscheiden sich in ihren Eigenschaften. Abciximab (ReoPro) ist ein gentechnisch hergestelltes Antikörperfragment, das nur am GPIIb/IIIa-Rezeptor bindet und diesen irreversibel hemmt. Die anderen verfügbaren Substanzen, Eptifibatid (Integrilin) und Tirofiban (Aggrastat), sind synthetisch hergestellte, kleinmolekulare Stoffe mit deutlich kürzerer Halbwertszeit und Wirkdauer. Die Indikationen für diese Medikamente sind die PCI beim nicht lysierten STEMI, beim NSTEMI, bei der instabilen Angina pectoris mit hohem Risiko für einen Infarkt, sowie im Allgemeinen die Hochrisiko-PCI.

Heparin hat weitere Nebenwirkungen. Hämatome sind häufig, es können aber auch gastrointestinale- oder Hirnblutungen auftreten. Bei längerer Anwendung wurden auch Fälle von Haarausfall oder Osteoporose beobachtet (Alban, 2007; Schlitt et al., 2007).

Eine seltene, aber weitere Komplikation ist die „heparininduzierte“ Thrombozytopenie (HIT), wobei es zwei Unterformen gibt. Die HIT Typ I manifestiert sich in den ersten Tagen nach Beginn der Heparinbehandlung. Es kommt zu einem mäßigen Abfall der Blutplättchenzahl, der sich in der Regel nach wenigen Tagen spontan zurückbildet. Ursache hierfür ist eine direkte Aktivierung der Thrombozyten durch das Medikament. Eine Therapie wird nicht benötigt.

Die HIT Typ II beruht auf einer Antikörperbildung gegen Heparin/Protein-Komplexe. Dies entspricht einer Allergie-ähnlichen Reaktion, die zu einer lebensbedrohlichen Thrombozytopenie führt. Aufgrund der negativen Ladung der Heparine binden sie an zahlreiche Proteine, unter anderem an den Plättchenfaktor IV, der stark positiv geladen ist. Auf dem Medikament/Protein-Komplex bilden sich Antigene, gegen die einige Patienten Antikörper ausbilden. Diese Antikörper binden sowohl an den Komplex, als auch mit ihrem Fc-Teil an einen Rezeptor auf Thrombozyten. Die Blutplättchen agglutinieren hierdurch und es kommt zu einer Aktivierung, was zu Thrombosen im arteriellen und venösen System führen kann. Erste Antikörper sind zwischen sechs und zwanzig Tagen nach der ersten Heparinabgabe messbar. Das Risiko, eine HIT Typ II zu entwickeln, liegt zwischen 0,5 und 5% ab einer Verabreichungsdauer von fünf Tagen. Bei dem Nachweis einer HIT Typ II muss Heparin sofort abgesetzt werden und darf dem Patienten lebenslang nicht mehr verabreicht werden. Um die Behandlung der Grunderkrankung weiter zu gewährleisten, muss die Therapie mit einem anderen Gerinnungshemmer fortgeführt werden. Hierfür stehen Danaparinoid, Hirudin und Argatroban zu Verfügung. Wirksam sind auch Medikamente wie Bivalirudin und Fondaparinux (siehe unten).

Im Unterschied zu vielen anderen Hemmern der Blutgerinnung kann Heparin in der Schwangerschaft und Stillzeit eingesetzt werden. Bei eingeschränkter Nierenfunktion ist die Gabe ebenfalls möglich, jedoch zeigten verschiedene Studien eine erhöhte Komplikationsrate bei hohen Dosierungen.

Aufgrund der unterschiedlichen Limitationen des Heparins sollte erwartet werden, dass unfraktioniertes Heparin im Vergleich zu neueren Medikamenten eine schlechtere Wirkung mit vermehrten Blutungskomplikationen erzielt. Dies war der Grund für viele klinische Studien, wobei hier vor allem die niedermolekularen Heparine (NMH) im Vordergrund stehen (Greinacher et al., 2003; Schlitt et al., 2007).

Niedermolekulare Heparine

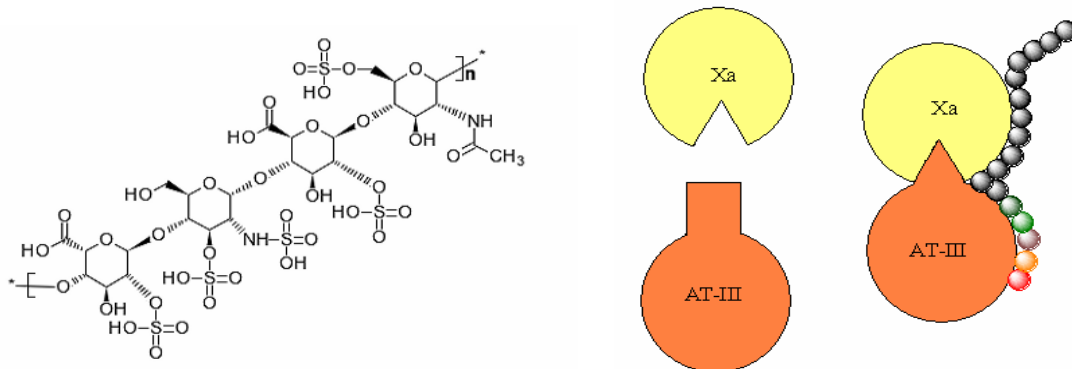


Abb. 9: Strukturformel und schematische Darstellung der Wirkung von niedermolekularem Heparin auf den Faktor Xa (Schlitt et al., 2007).

Der Wirkstoffname dieser Substanzen endet immer mit *-parin*, z.B. Enoxaparin (Clexane) oder Dalteparin (Fragmin). Diese große Gruppe von Medikamenten wird aus unfraktioniertem Heparin durch partielle Degradation hergestellt (Kettenlänge 5-17). Ihr Haupteinsatzgebiet ist die Thromboseprophylaxe mit einer einmal täglichen, subkutanen Injektion. Aufgrund der kürzeren Kettenlänge hemmen sie im Komplex mit Antithrombin vor allem den aktivierten Faktor Xa und weniger das Thrombin. Vorteile der NMH sind die höhere Bioverfügbarkeit nach subkutaner Applikation und die längere Halbwertszeit. Auch ist die Wahrscheinlichkeit für eine HIT wesentlich geringer, NMH sind jedoch bei bekannter HIT ebenfalls kontraindiziert. Da sie die Plazentaschranke nicht passieren, können sie in der Schwangerschaft und Stillzeit eingesetzt werden. NMH wird wie UFH renal eliminiert. Bei Schwäche dieses Eliminationssystems muss eine Dosisanpassung erfolgen. Bei Patienten mit stark eingeschränkter Nierenfunktion kann die Behandlung mit Enoxaparin durch Kontrolle des Anti-Xa-Spitzenpiegels überwacht werden.

Zur Antagonisierung steht Protamin nur eingeschränkt zur Verfügung, da es die gerinnungshemmende Wirkung von NMH nur zu maximal 60% inhibieren kann.

NMH sollte wegen der vielfältigen Vorteile dem UFH im klinischen Alltag, insbesondere bei akutem Koronarsyndrom überlegen sein. Dies war Grundlage zahlreicher Studien der letzten Jahre. Insgesamt konnte keine eindeutige Überlegenheit der NMH gegenüber UFH bei der koronaren Herzerkrankung nachgewiesen werden. Metaanalysen zeigten jedoch einen Wirkvorteil bei Patienten, die ausschließlich mit

Enoxaparin behandelt wurden, gegenüber den Patienten, die eine Therapie mit UFH erhielten. Insbesondere beim Wechsel der Medikamente waren Blutungskomplikationen aufgetreten, was für den klinischen Alltag bedeutet, dass die im Notarztwagen begonnene Blutverdünnung beibehalten werden soll (Alban, 2007; Schlitt et al., 2007).

1.4.2 Fondaparinux

Die Heparin induzierte Thrombozytopenie Typ II war unter anderem ein Grund für die klinische Entwicklung des Gerinnungshemmers Fondaparinux (Arixtra).

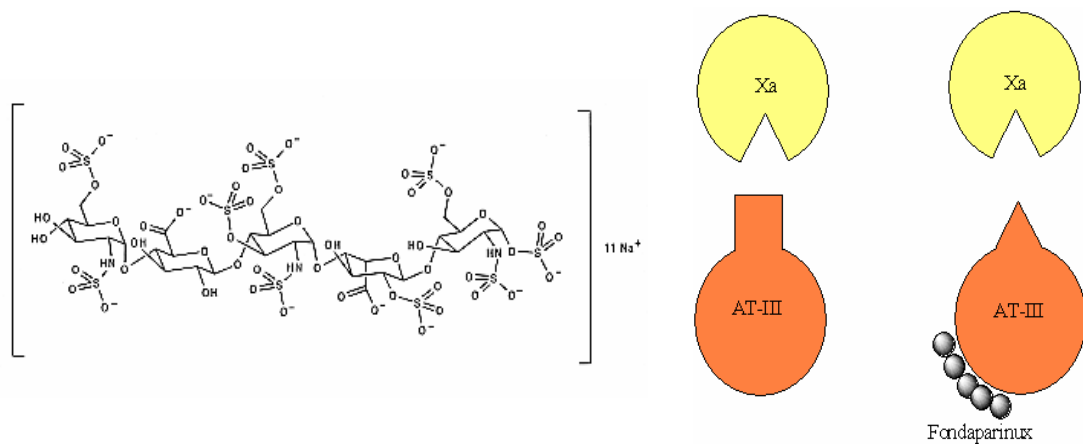


Abb. 10: Strukturformel und schematische Darstellung der Wirkung von Fondaparinux auf den Faktor Xa (Schlitt et al., 2007).

Als erster Vertreter einer neuen Substanzklasse repräsentiert es sozusagen die „Quintessenz“ des Heparins. Es bindet spezifisch mit hoher Affinität an Antithrombin und führt durch die Induktion einer Konformationsänderung zu einer 340mal schnelleren, selektiven Hemmung des Gerinnungsfaktors Xa. Es verhindert die Thrombusbildung und das Thrombuswachstum, hat aber keinen Einfluss auf das Thrombin und die Thrombozytenfunktion.

Fondaparinux wird synthetisch hergestellt und besteht aus einer sulfatierten Pentasaccharidsequenz mit einem definierten Molekulargewicht von 1.728 Dalton. Die ausschließliche Bindung an AT ist auch für das lineare pharmakokinetische Profil und das daraus resultierende einfache Dosierungsschema verantwortlich. Zur Thrombose-Prophylaxe erfolgt eine subkutane Gabe von 2,5 mg einmal täglich, zu therapeutischen Zwecken (z.B. zur Behandlung einer Lungenembolie oder einer tiefen Beinvenenthrombose) werden bei normgewichtigen Patienten 7,5 mg verabreicht. Weder Gerinnungsmonitoring noch die bei Heparinungen vorgeschriebene Kontrolle der Thrombozyten sind erforderlich. Fondaparinux wird schnell und vollständig

resorbiert, nicht metabolisiert und unverändert zu ca. 70% über die Nieren ausgeschieden. Die Eliminationshalbwertszeit beträgt etwa 17 Stunden bei jungen, circa 21 Stunden bei älteren gesunden Patienten, wobei bei Einschränkung der Nierenfunktion die Halbwertszeit verlängert sein kann. Seine Bioverfügbarkeit beträgt nach subkutaner Gabe 100%. (Göhring, 2004; Bauer, 2006)

Aktuell ist dieses Medikament zur Vorbeugung venöser thromboembolischer Ereignisse bei Patienten der Orthopädie zugelassen, bei denen größere Eingriffe an den unteren Extremitäten geplant sind. In höheren Dosen (5-10 mg) war die Gabe bei Patienten mit Lungenembolien oder tiefen Beinvenenthrombosen ebenso effektiv wie die Standardtherapie. Für Patienten mit KHK ist Fondaparinux in der prophylaktischen Dosierung von 2,5 mg/d zugelassen. Grundlage hierfür waren die OASIS-5 und OASIS-6 Studien (OASIS=Organisation to Assess Strategies for Ischaemic Syndromes). Diese multizentrischen Megastudien ergaben, dass Fondaparinux im Vergleich zu Enoxaparin (OASIS-5, Einschlusskriterium ACS) oder Standardtherapie (OASIS-6, Einschlusskriterium STEMI) erneute koronare Ereignisse ebenso effektiv wie die jeweilige Vergleichsmedikation verhindert. Gleichzeitig war Fondaparinux in Hinblick auf Blutungskomplikationen überlegen, was nach 30 Tagen und nach sechs Monaten zu einer Reduktion der Mortalität führte. Die Kombination von Fondaparinux und GPIIb/IIIa-Hemmern war in den vorliegenden Studien unproblematisch.

Obwohl in OASIS-5 und -6 nachgewiesen wurde, dass Fonda mindestens so effektiv und sicher wie unfraktioniertes Heparin und niedermolekulares Heparin ist, zeigte sich in diesen Studien ein signifikanter Anstieg in der Entstehung von Herzkatheterthrombosen, einer seltenen, aber häufig fatalen Komplikation, während einer perkutanen Koronarintervention (PCI) unter Fonda im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe. (Bauer, 2006; Alban, 2007; Schlitt et al., 2007).

2. Zielstellungen

Die Wahrscheinlichkeit für thrombotische Verschlüsse eines Herzkatheters während einer perkutanen Koronarintervention war bei Verwendung des neuen Antikoagulanz Fondaparinux im Vergleich zu Enoxaparin oder unfraktioniertem Heparin in den großen klinischen Studien der letzten Jahre signifikant erhöht. Andere mit der Grunderkrankung oder der Koronarintervention assoziierten Komplikationen waren jedoch unter Fondaparinux seltener. Eine Erklärung für diese Beobachtung fehlt *bis dato*, hypothetisch wurde jedoch ein Dosiseffekt angenommen. Diese Konstellation gab den Anlass für die vorliegende Arbeit. Ziel war es, in einem *in-vitro*-Modell zu überprüfen, ob die Entstehung von Thromben in Herzkathetern unter Fondaparinux dosisabhängig ist, und in einem kontrollierten Versuchsrahmen diesen Effekt mit den anderen, bei der Koronarintervention verwendeten Substanzen zu vergleichen. In acht Versuchsreihen wurden niedermolekulares Heparin, unfraktioniertes Heparin, Fondaparinux sowie die Kombination von Fondaparinux und UFH allein und bei zusätzlicher Gabe eines thrombozytären GPIIb/IIIa-Hemmers (Eptifibatid) verglichen. Die Endpunkte dieser Studie waren das Gewicht des sich im Herzkatheter entwickelnden Thrombus, die Differenz der Gerinnungsparameter vor und nach Versuchsablauf und die quantitative Auswertung von elektronenmikroskopischen Bildern der Herzkatheter (Anzahl der Erythrozyten, Quantifizierung der Fibrinentwicklung).

3. Material und Methodik

3.1 Laborgeräte und Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien

1. BD Value-Set 0,8x20 mm (Braun)
2. Perfusorspritze 50 ml (Braun)
3. Combi-Stopper (Braun)
4. Kanülen (Braun)
5. Multi Adapter (Sarstedt)
6. S-Monovette 3 ml 9NC
7. ACT-Küvetten (Medtronic)
8. Masterflex Verbindungsschlauch
9. Multireaktionsgefäß 50 ml
10. Discofix (Braun)
11. Herzkatheter 6F multipurpose (Cordis)

Laborgeräte

1. Zentrifuge Rotina 48 RC (Hettich)
2. Analysenwaage (Scaltec)
3. ACT Plus (Medtronic)
4. Masterflex Rollerpumpe

Chemikalien

1. Aqua dest. (Milliporer)
2. Na₂PO₄ (Merck)
3. KH₂PO₄ (Merck)
4. Aceton (VWR)
5. Hexamethyldisialzane (Sigma)

Medikamente

1. Acetylsalicylsäure (ASS 500)
2. Enoxaparin (Clexane)
3. Unfraktioniertes Heparin (Liquemin)
4. Fondaparinux (Arixtra)
5. Eptifibatid (Integrilin)

3.2 Blutentnahme und Auswahl der Probanden

Im Rahmen dieser Studie wurden zehn männlichen, gesunden Probanden nach Einnahme von 500 mg Acetylsalicylsäure *per os* jeweils 45 ml Blut entnommen. Die Einnahme der Tablette erfolgte zwei Stunden vor Versuchsbeginn. Der Abstand zwischen den einzelnen Versuchstagen der Probanden betrug zwei bis drei Wochen. Jeder Proband spendete insgesamt achtmal Blut, das heißt für jede Versuchsreihe je einmal.

Es gab folgende Ausschlusskriterien:

- Fehlende Einwilligung
- Mangelnde Kooperationsbereitschaft
- Regelmäßige Einnahme von Medikamenten
- Bekannter Drogen oder Alkoholmissbrauch
- Bekannte chronische Erkrankungen

Die Einschlusskriterien waren:

- Männliches Geschlecht
- Alter zwischen 18 und 50 Jahren

Es erfolgte eine einmalige Abnahme der Gerinnungsparameter bei jedem Probanden vor Studienbeginn zum Ausschluss von Störungen des Gerinnungssystems.

Jeder Spender erhielt vor Beginn der Studie ein Aufklärungsformular, das Informationen über die Hintergründe der Studie und deren genauen Ablauf enthielt. Auf Anraten der Ethikkommission der Martin-Luther-Universität Halle wurde eine Fachinformation zu Aspirin 500 beigelegt. Die Risiken für die Teilnehmer dieser Studie waren als gering einzuschätzen. Trotzdem wurden die Probanden auf unten genannte Punkte persönlich hingewiesen und es stand zu jeder Zeit ein Arzt für Fragen zur Verfügung.

1. Im Rahmen der Blutentnahme kann es in seltensten Fällen zu Nervenverletzungen oder zur Entwicklung von relevanten Blutergüssen kommen.
2. Es könnten Magenbeschwerden oder eine Unverträglichkeitsreaktion unter ASS auftreten.
3. Eine Infektion oder ein Abfall des Hämoglobins sind nach sachgerechter Blutentnahme auch bei einer Menge von bis zu 470 ml nicht zu erwarten, jedoch potentiell möglich.

Es kam zu keinen Komplikationen im Rahmen der Blutspende bei den Probanden. Es gab zu jedem Zeitpunkt die Möglichkeit, die Studienteilnahme zu beenden.

Diese Studie wurde der Ethikkommission der Martin-Luther-Universität Halle zur Begutachtung vorgelegt, die eine positive Stellungnahme abgegeben hat. Die internationalen Richtlinien für die Durchführung von Studien wurden streng eingehalten.

3.3 Antikoagulanzdosierung

Zunächst wurden Vorversuche zur Optimierung des Versuchs- und Arbeitsablaufes mit destilliertem Wasser anstelle von Blut durchgeführt. Anschließend wurde mit den Versuchsreihen begonnen. Das Blut der Versuchsteilnehmer wurde direkt in eine mit dem jeweiligen Antikoagulant in therapeutischer Dosis präparierte Perfusorspritze abgenommen.

Tab. 3: Dosierung der Antikoagulantien in den jeweiligen Gruppen

	Antikoagulant	Konzentration
Gruppe 1	UFH	0,8 U/ml
Gruppe 2	UFH + Eptifibatid	0,8 U/ml+1,7 g/ml
Gruppe 3	Enoxaparin (NMH)	0,6 U/ml
Gruppe 4	Enoxaparin + Eptifibatid	0,6 U/ml+1,7 g/ml
Gruppe 5	Fonda	0,5 g/ml
Gruppe 6	Fonda + Eptifibatid	0,5 g/ml+1,7 g/ml
Gruppe 7	Fonda + UFH	0,5 g/ml+0,5 U/ml
Gruppe 8	Fonda + UFH + Eptifibatid	0,5 g/ml+0,5 U/ml +1,7 g/ml

Analog zu bisherigen Publikationen wurden die jeweiligen Medikamente auftitriert, um die optimale Dosierung mit einer therapeutischen Konzentration zu erreichen. Dadurch konnte in den Gruppen mit UFH eine ACT (activated clotting time) zwischen 200 und 300 Sekunden und in den Gruppen mit Enoxaparin und Fondaparinux eine Anti-Xa-Aktivität zwischen 0,6 und 1,1 U/ml erzielt werden. Diese Wirkspiegel entsprechen einer therapeutischen Antikoagulation. Zur Überprüfung der Gerinnungsaktivität

wurden vor, während und nach Beendigung des Versuches Gerinnungsmarker bestimmt (Schlitt et al., 2007).

3.4 Versuchsablauf und Präparation der Herzkatheter

In insgesamt 80 Experimenten wurden vier Antikoagulanzenstrategien verglichen; UFH, NMH, Fondaparinux und die Kombination von Fondaparinux mit UFH. In einem zweiten Durchlauf wurden die verwendeten Antikoagulantien zusätzlich mit einem GPIIb/IIIa-Hemmer kombiniert.

40 ml des Blutes wurden ohne Zeitverzögerung aus der Perfusorspritze in ein Zentrifugenröhrchen gegeben, das in einem auf 37 Grad erwärmten Wasserbad im Versuchsaufbau stand. Von diesem Röhrchen aus wurde das Blut für einen Zeitraum von 60 Minuten über einen Verbindungsschlauch durch den Herzkatheter (6F-Multipurpose Führungskatheter, Cordis GmbH, Deutschland) geleitet, angetrieben von einer Multiflex -Rollerpumpe. Die restlichen fünf Milliliter Blut wurden in Citrat-Monovetten aufgezogen und dienten zur Kontrolle der Gerinnungsparameter. Nach genau einer Stunde wurde die Rollerpumpe angehalten. Von dem durch den Versuchsaufbau zirkuliertem Blut wurden fünf Milliliter in Citrat-Monovetten abgefüllt, was später ebenfalls zur Analyse der Gerinnungsparameter genutzt wurde.

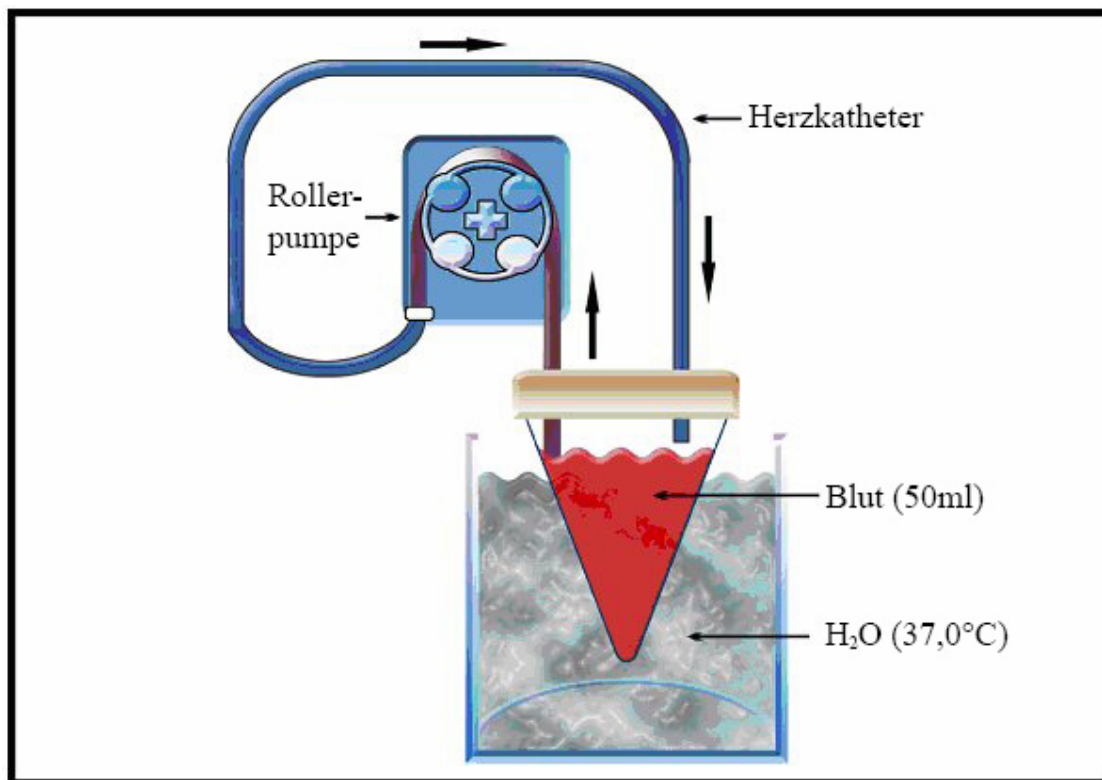


Abb. 11: Schematischer Versuchsaufbau

Zur Entfernung des anhaftenden Blutes wurde der Katheter zwei mal drei Minuten mit Soerensen Gebrauchslösung gespült. Die verwendete Lösung bestand aus einer Mischung von 20 ml der Stammlösung A (Lösung A: 2,7 g KH_2PO_4 in 200 ml Aqua dest.) und 80 ml der Stammlösung B (Lösung B: 7,1 g Na_2HPO_4 in 500 ml Aqua dest.).

Die Stammlösungen besitzen eine Halbwertszeit von circa zwei Wochen und wurden dementsprechend regelmäßig neu angesetzt. Die Lagerung erfolgte bei vier bis acht Grad Celsius. Anschließend wurde der Katheter zur Fixation der Thromben mit 25% Glutardialdehydlösung und mit 2,5% Glutardialdehydlösung für je zehn Minuten behandelt. Auf die abgeschlossene Fixierung folgten zwei Spüldurchgänge für je fünfzehn Minuten mit Soerensen-Gebrauchslösung.

Zu diesem Zeitpunkt (G1) und auch vor jedem Versuchsbeginn (G0) wurden die Katheter gewogen, um die Gewichtsentwicklung des thrombotischen Materials zu quantifizieren. Der erste Zentimeter der Katheterspitze wurde abgetrennt und der Länge nach aufgeschnitten. Danach wurden die beiden Katheterhälften mittels einer aufsteigenden Aceton-Reihe dehydriert. Zur Herstellung der verschiedenen Konzentrationen der Verdünnungsreihe wurde destilliertes Wasser und absolutes Aceton verwendet. In den verschiedenen Lösungen von 30% bis 100% Aceton wurden die Proben für je zehn Minuten geschwenkt. Der Ablauf mit 100% Aceton wurde zur Sicherstellung der vollständigen Entwässerung zweimal durchgeführt.

Um die Katheterstücke vor Oxidation zu schützen, wurden sie unter dem Abzug erst 30 Minuten in einem Gemisch aus 100% Aceton und HMDS (Verhältnis 1:1) und anschließend 30 Minuten in reinem HMDS geschwenkt. Unter laufendem Abzug wurden die Katheterhälften in einem Aluminiumschiffchen über Nacht getrocknet und luftdicht verpackt. Zuletzt wurden die Proben zur elektronenmikroskopischen Untersuchung in das Bundeswehrzentral Krankenhaus nach Koblenz verschickt.

Tab. 4: Schematische Darstellung der Herzkatheterpräparation

Präparationsschritt	benötigte Zeit
2x Spülung mit Soerensen-Gebrauchslösung	6 min
Schwenkung in 25% Glutardialdehydlösung	10 min
Schwenkung in 2,5% Glutardialdehydlösung	10 min
Schwenkung in 30% Acetonlösung	10 min
Schwenkung in 50% Acetonlösung	10 min
Schwenkung in 70% Acetonlösung	10 min
Schwenkung in 80% Acetonlösung	10 min
Schwenkung in 90% Acetonlösung	10 min
Schwenkung in 96% Acetonlösung	10 min
2x Schwenkung in 100% Aceton	20 min
Schwenkung in 100% Aceton/HMDS-Gemisch	30 min
Schwenkung in HMDS	30 min
Lufttrocknen der Katheterstücke unter dem Abzug	900 min (=15 h)
Gesamtzeit	1066 min

3.5 Elektronenmikroskopische Untersuchung

Um eine Standardisierung bei der Anfertigung und der Auswertung der elektronenmikroskopischen Bilder zu erreichen, wurden von den Katheterstücken pro Hälfte je ein Bild immer an identischer Stelle mit jeweils identischer Vergrößerung (10⁴ m = 1cm) angefertigt.

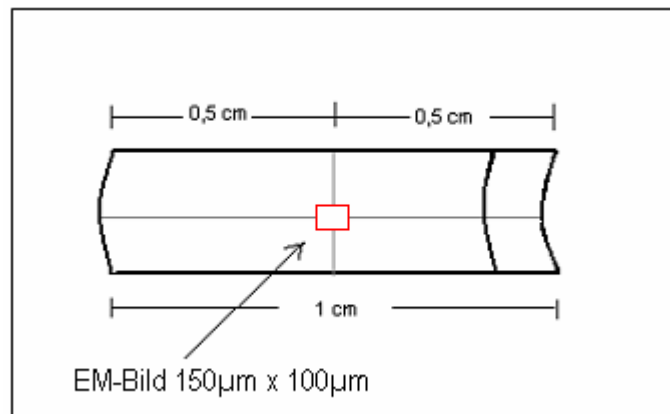


Abb. 12: Schematische Darstellung einer Katheterspitzenhälfte

3.5.1 Allgemeines zur Elektronenmikroskopie

Bei Mikroskopen unterscheidet man das Lichtmikroskop vom Elektronenmikroskop. Letzteres verwendet anstelle von Licht einen Elektronenstrahl zur Abbildung von Objekten. Der Vorteil bei der Verwendung von Elektronen liegt darin begründet, dass man mit ihnen aufgrund ihrer kürzeren Wellenlänge im Vergleich zu Licht ein tausendfach höheres Auflösungsvermögen erreichen kann. Zum Vergleich: Das Auflösungsvermögen eines Lichtmikroskops beträgt 200 nm, das des Elektronenmikroskops ca. 1 nm. Die Anwendungsmöglichkeiten sind vielfältig. In der Medizin findet es Verwendung bei der Identifikation von Bakterien und Viren oder zum Sichtbarmachen von Zellstrukturen (z.B. DNA). Es existieren zwei Grundtypen von Elektronenmikroskopen, das Transmissionselektronenmikroskop (TEM) und das Rasterelektronenmikroskop (REM), die im Folgenden noch näher erörtert werden. Bei beiden Techniken ist die Arbeit unter Hochvakuumbedingungen erforderlich. Verglichen mit der Lichtmikroskopie bedarf es einer relativ aufwendigen Vorbereitung der zu betrachtenden Proben. Die geeignete Methode und die sorgfältige Durchführung der Präparation sind entscheidend für die Bildqualität und Erhebung der Ergebnisse (Flegler, 1970).

Tab. 5: Vergleich ausgewählter Daten über Lichtmikroskopie und Elektronenmikroskopie (Flegler, 1970).

Merkmal	Lichtmikroskop	TEM	REM
allgemeiner Einsatzbereich	Oberflächenmorphologie und Schnitte	Schnitte (40 - 150 nm) oder kleine Partikel auf dünnen	Oberflächenmorphologie
Lichtquelle	sichtbares Licht	hochbeschleunigte Elektronen	hochbeschleunigte Elektronen
Beste Auflösung	Ca. 200 nm	Ca. 0,2 nm	ca.3 - 6 nm
Vergrößerungsbereich	10 - 1.000 x	500 – 500.000 x	20 – 150.000 x
Schärfentiefe	0,002 - 0,05 nm	0,004 - 0,006 nm	0,003 - 1 nm
Linsentyp	Glas	elektromagnetisch	elektromagnetisch
Ort der Bildentstehung	im Auge durch Linsen	Auf einem phosphoreszierenden Schirm durch Linsen	an der Kathodenröhre durch Rastereinrichtung

3.5.2 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Das TEM besteht aus hintereinander geschalteten und vergrößernden Linsen, es ist also im Aufbau mit einem Lichtmikroskop zu vergleichen. Beide liefern Daten über die Struktur der inneren Bestandteile der Probe. Es kann eine Vergrößerung bis zum 500.000fachen der abzubildenden Probe erzielt werden mit einem Auflösungsvermögen von etwa 0,2 nm.

Um einen Elektronenstrahl zu erhalten, verwendet man eine Haarnadelkathode (i.d.R. aus Wolframdraht). Im glühenden Zustand erzeugt diese Elektronen, die durch einen sogenannten Wehnelt-Zylinder gebündelt und in Richtung Anode mit hoher Geschwindigkeit beschleunigt werden. Als nächstes passiert der Elektronenstrahl die Kondensorlinse, durch die er verdichtet und auf die Probenebene projiziert wird. Die Objektivaperturblende der Objektivlinse kann zur Kontraststeigerung so eingestellt werden, dass die nicht gestreuten und der größte Anteil der unelastisch gestreuten Elektronen passieren können. Die Vergrößerung des Endbildes im TEM ist das Produkt der Vergrößerungen aller Linsen (Objektivlinse, Beugungslinse,

Zwischenlinse, Projektivlinse). Das Endbild wird auf eine Fotoplatte oder einen Leuchtschirm abgebildet.

Ein Nachteil der TEM ist die sehr aufwendige Probenvorbereitung. Nach den verschiedenen Präparationsschritten müssen mittels eines Diamantmessers Ultradünnschnitte der Proben hergestellt werden. Ist die Probe nicht dünn genug, kann sie nicht durchstrahlt werden (Flegler, 1970).

3.5.3. Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Bei der Rasterelektronenmikroskopie muss ebenfalls eine Präparation erfolgen, die eine Fixierung, Dehydratation und einen Oxidationsschutz beinhaltet, der Vorgang des Ultradünnschnittes entfällt jedoch. Das REM kann mit einer Lupe verglichen werden. Es ist besonders geeignet, um Oberflächen von Gegenständen plastisch und dreidimensional abzubilden. Im Gegensatz zur TEM erzeugt es kein Durchlichtelektronenbild. Diese Eigenschaft machte diese Methode für unsere Studie geeignet. Die Vergrößerung der Oberfläche der Katheterstücke gab uns die Möglichkeit, die Oberflächenmorphologie, also die Beschaffenheit der sich bildenden Thromben, bis ins Detail zu betrachten und analysieren zu können. Die meisten Proben, so auch unsere Katheterstücke, müssen elektrisch leitbar gemacht werden, was mit Hilfe von Bedampfung mit Gold erreicht werden kann.

Das REM verfügt über ein Vergrößerungsvermögen bis auf das 150.000fache und besitzt ein Auflösungsvermögen zwischen 3 und 6 nm (Flegler, 1970; Reimer, 1999).

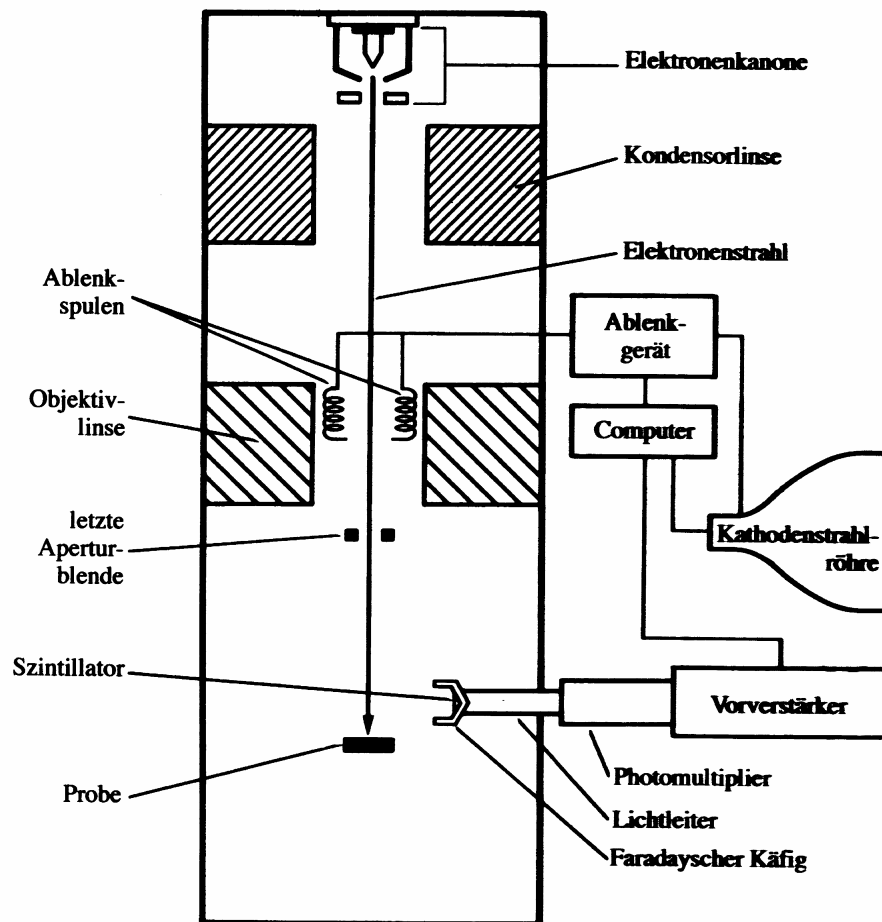


Abb. 13: Schematische Darstellung eines Rasterelektronenmikroskops (Flegler, 1970).

Der Elektronenstrahl wird wie bereits oben bei der TEM beschrieben erzeugt und gleichzeitig durch die Anode angezogen. Gebündelt durch die Kondensorlinse wird er mit Hilfe einer Objektivlinse als sehr kleiner Punkt auf die Probenoberfläche fokussiert. Die Probe wird bei dieser Methode nicht durchstrahlt, sondern ihre Oberfläche durch Ablenkspulen Punkt für Punkt und Zeile für Zeile vom gebündelten Elektronenstrahl abgetastet („abgerastert“). Beim Elektronenaufprall auf die Oberfläche werden die Elektronen zurückgeworfen oder aus dem bestrahlten Material Sekundärelektronen herausgeschleudert, die durch sehr komplexe Wechselwirkungen entstehen. Sekundärelektronen werden von einem Detektor gesammelt, in eine Spannung umgewandelt und verstärkt. Die Spannung wird an das CRT (cathode ray tube) weitergeführt. Die Anzahl der detektierten Elektronen bestimmt die Intensität der Lichtpunkte auf dem Bildschirm. Aus erhabenen Punkten der Probenoberfläche werden viele Sekundärelektronen ausgelöst, was zu einer großen Spannung und

letztendlich zu einem hellen Punkt auf der CRT führt. Umgekehrt erzeugt der Elektronenaufprall auf eine Vertiefung in der Probenoberfläche einen dunkleren Punkt. Das Bild der REM setzt sich aus Tausenden von Punkten unterschiedlicher Helligkeit und Intensität zusammen und entspricht einem topografischen Abdruck der Probe. Die entstandenen Bilder zeichnen sich durch große Tiefenschärfe aus. Die Schärfentiefe und die Auflösung müssen bei jeder Probe aufeinander abgestimmt werden. Durch Kippung des Objekts ist eine räumliche Orientierung möglich. Die meisten heute gebauten Rasterelektronenmikroskope sind nicht analog, sondern digital. Einer der entscheidenden Vorteile besteht darin, dass Bilder mit schlechter Qualität digital bearbeitet werden können und schnell zu Auswertungen verfügbar sind. Ein Nachteil ist, dass die Auflösung der Fotos verringert ist. Bei einer Größe im Mikrometerbereich, wie es bei Erythrozyten und Thrombozyten der Fall ist, spielt dies aber eine zu vernachlässigende Rolle (Flegler, 1970; Reimer, 1999).

3.6 Hämostaseologische Untersuchungsmethoden

Für unsere Versuche wurde die Gerinnungsaktivität vor und nach den Versuchen in den Blutproben gemessen. Im Folgenden werden die dafür verwendeten laborchemischen Untersuchungsmethoden im Einzelnen erörtert. Um eine exakte Diagnostik zu gewährleisten, ist es von Bedeutung, Einflussgrößen und Störfaktoren auf das Messergebnis zu kennen. Ein zu starker Sog sowie eine zu lange Stauung der Vene bei der Blutentnahme sind zu vermeiden. Die standardisierten Citratröhrchen müssen bis zur Markierung gefüllt und sofort vorsichtig gemischt werden. Die Bestimmung der Gerinnungsparameter muss in einem Zeitfenster von vier Stunden nach Entnahme erfolgen.

3.6.1 Quick-Test

Im Jahr 1935 wurde erstmals von dem Biochemiker und Arzt A. J. Quick ein Labortest zur Gerinnungskontrolle beschrieben. Auch heute noch verwendet man den Quick-Test, der auch unter dem Synonym Thromboplastinzeit bekannt ist.

Durch die Zugabe von Gewebethromboplastin und Kalzium wird das extrinsische Gerinnungssystem aktiviert und die Zeit von der Reagenzzugabe bis zur Fibrinpolymerisation gemessen. Die Geschwindigkeit der Fibrinbildung ist dabei von den Konzentrationen der Faktoren II, VII und X abhängig. Diese gehören zu den vier Faktoren, die in der Leber nur unter Anwesenheit von Vitamin-K gebildet werden können. Aus diesem Grund eignet sich der Quick-Test sehr gut zur Kontrolle einer Cumarintherapie, von Lebersynthesestörungen oder Vitamin K-Mangel, also Mangelzuständen der oben genannten. Die ermittelten Sekunden werden als Prozent

einer definierten Norm angegeben. Der Referenzbereich liegt zwischen 70-120%. Dies ist eine der Schwachstellen dieses Verfahrens. Als 100% wird die gemessene Gerinnungszeit im Quick-Test aus einem „Normalplasmapool“ definiert. Hierfür benötigt man mindestens 40 Plasmaproben von Probanden, die für gesund gehalten werden. Die gemessene Zeit dieses Pools variiert allerdings bei mehrmaligen Herstellungen oder in verschiedenen Laboratorien. Einen noch größeren Einfluss besitzen die verwendeten Thromboplastine. Diese werden auf unterschiedlichste Weise hergestellt. Die verschiedenen Reagenzien führen aufgrund ihrer unterschiedlichen Empfindlichkeit bei ein und demselben Patienten zu abweichenden Quick-Werten. Die in verschiedenen Labors bestimmten Quick-Werte sind folglich nur begrenzt miteinander vergleichbar und werden heute durch die INR (International Normalized Ratio) ersetzt. Diese methodenunabhängige Größe bezieht sich auf einen Standard der Weltgesundheitsorganisation WHO und wurde 1983 eingeführt. Im Gegensatz zum Quick-Wert sind die INR-Werte verschiedener Labore daher vergleichbar (Kemkes-Matthes, 2001; Prötsch, 2002).

3.6.2 International Normalized Ratio

Der INR-Wert basiert auf der Angabe des Verhältnisses zwischen der Gerinnungszeit des Patientenplasmas und der Gerinnungszeit eines sogenannten Normalplasmas unter der Berücksichtigung des sogenannten Empfindlichkeitsfaktors. Dies entspricht der Prothrombin-Ratio (PR).

$$\text{PR} = \frac{\text{Gerinnungszeit des Patientenplasmas in sec}}{\text{Gerinnungszeit des Normalplasmapools in sec}}$$

Jeder Hersteller ist verpflichtet, sein verwendetes Thromboplastin mit einem angegebenen Referenzthromboplastin zu eichen. Beim Eichvorgang wird die Abweichung der jeweiligen Handelscharge gegenüber dem WHO-Referenz-Präparat ermittelt. Die eruierte Abweichung wird als ISI (International Sensitivity Index) bezeichnet. Thromboplastine mit einem Empfindlichkeitsindex (ISI) von nahezu eins sind vorzuziehen. Die Formel zur Berechnung der INR lautet: $\text{INR} = \text{PR} \times \text{ISI}$. Die Größenordnungen von INR-Werten und Quick-Prozenten verhalten sich indirekt proportional zueinander. Je größer der Prozentwert im Quick-Test, desto kleiner der zugehörige INR. Die INR ist heute der Goldstandard für die Überwachung einer kontinuierlichen Therapie mit oralen Antikoagulantien (Kemkes-Matthes, 2001; Prötsch, 2002).

3.6.3 Aktivierte partielle Thromboplastinzeit

Die aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT) ist der Globaltest für die intrinsische Gerinnung. Sie misst die Zeitspanne (in Sekunden), die bis zur Bildung eines Fibringerinnsels im Reagenzglas benötigt wird, wenn das Reagenz zu einem bereits vorinkubierten Plasma-Kalziumionengemisch gegeben wird. Bei Verminderung der Gerinnungsfaktoren II, V, VIII, X, XI, XII, sowie Fibrinogen, Präkallikrein und HMWK wird eine verlängerte Zeit gemessen. Eine Verminderung der Faktoren VII und XIII wird durch die aPTT nicht erfasst. Partielle Thromboplastine enthalten im Gegensatz zu Thromboplastinen keinen Proteinanteil. Chemisch gesehen sind sie Phospholipide und können an ihrer negativ geladenen Oberfläche Gerinnungsfaktoren der sogenannten Vorphase anlagern. Dieser Mechanismus ermöglicht den Gerinnungsablauf *in vitro*. Ähnlich wie bei dem Quick-Test weichen auch die bei der aPTT gemessenen Gerinnungszeiten unter Verwendung unterschiedlicher Reagenzien bei ein und derselben Probe voneinander ab. Die angegebenen Referenzbereiche der verschiedenen Laboratorien gelten also nur als Richtwerte, um von der Norm abweichende Ergebnisse aufzudecken. Pathologische Veränderungen der aPTT findet man bei Mangelzuständen von Faktoren des intrinsischen Systems und unter Heparintherapie. Der im Zentral-Labor des Universitätsklinikums der Martin Luther-Universität verwendete Referenzbereich liegt bei 28-42 Sekunden. (Kemkes-Matthes, 2001; Prötsch, 2002).

3.6.4. D-Dimer

Im klinischen Alltag stellt sich oft die prognostisch wichtige Frage, ob der Patient aufgrund einer verstärkten Gerinnungsaktivierung vermehrt Fibrin bildet bzw. gebildet hat. Durch den Faktor XIII quervernetztes Fibrin als Endprodukt der Gerinnung wird durch das fibrinolytische Enzym Plasmin abgebaut. Bei diesem Vorgang entstehen im terminalen Schritt Fibrinfragmente, die sogenannten D-Dimere. Diese sind also nur dann nachweisbar, wenn vorher eine Gerinnungsaktivierung stattgefunden hat. In Verbindung mit dem klinischen Kontext und weiteren diagnostischen Maßnahmen sind sie eine wertvolle Hilfe zur Aufdeckung und Überwachung verschiedener Krankheitsbildern, die durch eine Hyperkoagulabilität verursacht werden. Die Bestimmung der D-Dimere wird vor allem zum Ausschluss einer tiefen Beinvenenthrombose oder einer Lungenembolie angewendet. Bei einem negativen Testergebnis können beide Diagnosen weitestgehend ausgeschlossen werden. Eine Erhöhung der D-Dimer-Konzentration hat hingegen nur eine begrenzte Aussagekraft. Es sind eine Vielzahl von Ursachen für eine unspezifische Erhöhung bekannt (Malignome,

postoperativ, Sepsis, Schwangerschaft). Die Referenzbereiche sind abhängig von Alter, Geschlecht und Referenzpopulation (Fritscher, 2007).

3.6.5 Anti Xa-Bestimmung

Niedermolekulare Heparine und Heparinoide haben eine Pentasaccharid-Sequenz gemeinsam, welche spezifisch an Antithrombin bindet. Der Komplex aus Antikoagulanz und Antithrombin neutralisiert sehr effektiv alle Serinproteasen der Gerinnungskaskade. Hierbei steht vor allem die Hemmung der Faktoren IIa und Xa im Vordergrund. Aufgrund ihrer Wirkung kann die Therapie mit den oben genannten Substanzen mit der Anti-Faktor-Xa-Messmethode überwacht werden. Im Testsystem wird eine definierte Menge Faktor Xa vorgegeben. Je nach Menge der im Plasma vorhandenen Anti-Xa wirksamen Aktivität kommt es zu einer entsprechenden Hemmung des Substratumsatzes. Das Messsignal ist aufgrund der unterschiedlich ausgeprägten Anti-Xa-Wirksamkeit der Medikamente sehr verschieden. Dies macht eine Kalibrierung des Testes mit der entsprechenden Referenzsubstanz erforderlich (NMH, Fondaparinux). Um einen für eine therapeutische Antikoagulation ausreichend hohen Plasmapiegel zu bekommen, müssen z.B. für NMH Werte zwischen 0,4 und 1,0 U/ml erreicht werden. Zu Störfaktoren zählen langfristige Probenlagerung sowie stark lipämisches, ikterisches oder hämolytisches Plasma. Die Anti-Xa-Wirkspiegel sind stark zeitabhängig, weshalb die Abnahmezeiten in unseren Experimenten standardisiert wurden.

Im klinischen Alltag ist die Kontrolle des Anti-Xa-Spiegels i.d.R. nicht erforderlich. Ausnahmen bestehen bei Patienten mit außergewöhnlich hohem Risiko, z.B. bei Vorliegen einer Niereninsuffizienz, Schwangeren oder Kindern (Prötsch, 2002; Göhring, 2004).

3.6.6 Activated clotting time

Bei der Gabe von Antikoagulantien z.B. während eines interventionellen Eingriffes wie einer Herzkatheteruntersuchung ist die Kontrolle der Gerinnungsparameter von entscheidender Bedeutung. Die Response-Zeiten für Gerinnungsanalysen im Notfalllabor betragen in der Regel allerdings zwischen 45 und 90 Minuten, oftmals zu lang für eine rechtzeitige Reaktion. Mit Einführung sogenannter Bedside-tests, zum Beispiel das Monitoring mit Hilfe der activated clotting time (ACT), ergab sich erstmals die Möglichkeit einer schnellen Verfügbarkeit der Ergebnisse und einer sofortigen zielgerichteten therapeutischen Intervention. Dieses Verfahren zur Erfassung der plasmatischen Gerinnung ist gerade bei dringlichen Analysen von Vorteil, da es patientennah ohne Probenvorbereitung von Personal auch ohne umfassende

Ausbildung in Labortätigkeiten direkt vor Ort angewandt werden kann. Die ACT wurde 1966 von Hattersley eingeführt. Das frisch abgenommene Blut wird in ein mit Kaolin oder Celit vorgefülltes Röhrchen eingegeben. Hier kommt es zu einer Aktivierung der Kontaktphase und somit zur Gerinnung der Probe über das intrinsische System. Man erhält das Ergebnis in Sekunden gemessen. Die ACT wird vor allem zur Steuerung des Heparinmanagements in der Hämodialyse und anderen Verfahren mit extrakorporaler Zirkulation eingesetzt. Für die Anwendung besteht mittlerweile eine recht große Erfahrungsbasis. Bei einer PCI sollte eine ACT von 250-350 Sekunden erzielt werden, um das Risiko für akute thrombotische Komplikationen im Anschluss an die Intervention zu reduzieren. Bei kombinierter Gabe mit einem Glykoprotein IIb/IIIa-Hemmer wird eine niedrigere ACT von 200-300 Sekunden empfohlen. Einige Limitationen sind jedoch bekannt: Die Präzision ist nicht allzu gut, die Standardisierung der kommerziell erhältlichen Systeme (Medtronic HemoTec , Hemochron) ist nicht optimal und die Sensitivität im unteren Bereich ist gering. Außerdem ist dieses Verfahren nur eingeschränkt für das Monitoring des Hirudins und anderer direkter Thrombininhibitoren geeignet. Trotz dieser Einschränkungen ist das Monitoring der Heparintherapie heutzutage aus dem klinischen Alltag z.B. in Herzkatheterlaboren nicht mehr wegzudenken (Spannagl and Calatzis, 2002).

4. Ergebnisse

4.1 Probandenbeschreibung und Vorversuche

Für die Versuche dieser Promotionsarbeit wurde ausschließlich das Blut von Männern verwendet. Weibliche Probandinnen wurden ausgeschlossen, da man bei ihnen zusätzlich die Zyklusabhängigkeit der Gerinnungsaktivität mit in die Untersuchungen hätte einbeziehen müssen. Die Blutspender waren zwischen 25 und 39 Jahren alt. Unter ihnen waren vier Raucher und sechs Nichtraucher. Alle Probanden waren gesund, das heißt, bei keinem der Teilnehmer war zum Zeitpunkt der Versuchsdurchführung eine akute oder chronische Erkrankung bekannt, keiner der Probanden nahm regelmäßig Medikamente ein.

Vor Beginn der Versuche wurden einmalig bei jedem Probanden die Gerinnungswerte kontrolliert um Störungen des Gerinnungssystems auszuschließen. Mit der Unterschrift der Probandeninformation sicherten alle Probanden zu, bis zum Zeitpunkt der letzten Blutentnahme keine Medikamente mit blutverdünnendem Effekt einzunehmen, bzw. falls dies doch der Fall sein sollte, dies mitzuteilen.

Zu Beginn unserer experimentellen Arbeit führten wir mehrere Kontrollversuche durch. Zur Etablierung des Versuchsaufbaus und um einen reibungslosen Ablauf der verschiedenen Arbeitsschritte zu gewährleisten, erfolgten einige Durchläufe mit isotoner Kochsalzlösung (NaCl 0,9%, Braun Melsungen, Deutschland). Des Weiteren führten wir Versuche mit humanem Vollblut ohne zusätzliche Applikation eines Antikoagulanz durch. Nach vier bis sechs Minuten kam es zur kompletten Thrombosierung der Herzkatheter, was das Ende des jeweiligen Versuchs zur Folge hatte. Im Mittel lag das Gewicht des sich entwickelnden Thrombus in diesen Versuchen bei 3,6 g. Es erfolgten drei dieser Kontrollversuche.

Ursprünglich war als ein Endpunkt der Arbeit die Gesamtlaufzeit bis zum vollständigen Verschluss des Katheters durch einen Thrombus angedacht. Unter therapeutischer Antikoagulation (Fondaparinux, Enoxaparin, unfraktioniertes Heparin) sollte die Zeit bis zum Eintritt dieses Ereignisses ohne vorzeitigen Abbruch der Experimente gemessen werden. Von diesem Vorhaben musste abgewichen werden, da sich bei mehreren Durchläufen mit unfraktioniertem Heparin herausstellte, dass es zu keiner Clotbildung kam. Die Versuche wurden nach Laufzeiten von über 14 Stunden ohne Anzeichen einer Verlangsamung des Blutflusses abgebrochen.

Die Vorversuche wurden zur Entwicklung der Methodik genutzt. Zusätzlich dienten sie der Prüfung einer optimalen Präparationstechnik und zur Etablierung des elektronenmikroskopischen Verfahrens. Es wurden verschiedene Präparationstechniken getestet. Letztlich entschieden wir uns für die im Methodikteil ausführlich

beschriebenen Arbeitsschritte. Zur Entfernung des anhaftenden Blutes an den Katheterhälften wurde eine Soerensen Gebrauchslösung, zur Dehydratation eine Verdünnungsreihe mit Aceton hergestellt. Glutaraldehyd wurde zur Fixation und HMDS zum Oxidationsschutz der Thromben verwendet. Mit diesem Verfahren zur Vorbereitung der Katheterhälften und der Verwendung von Gold bei der Anfertigung der elektronenmikroskopischen Bilder erlangten wir für die Analyse hervorragende Ergebnisse.

4.2 Vergleich des Thrombusgewichtes

Vor und nach jedem Versuchsdurchlauf wurde der jeweilige Katheter in allen Medikamentengruppen zur Quantifizierung des sich entwickelnden Thrombus gewogen. Das mittlere Thrombusgewicht für alle Versuche in der Gruppe 1 betrug 235 ± 59 mg (\pm Standardabweichung), in Gruppe 2 184 ± 51 mg. Dies wurde mit einer Dosierung von 0,8 U/ml UFH in Gruppe 1 und in Gruppe 2 bei zusätzlicher Applikation von 1,7 g/ml Eptifibatid erreicht (+ 0,8 U/ml UFH). Die mittlere ACT lag bei den Versuchen mit unfraktioniertem Heparin bei 257 ± 23 Sekunden, bei der Versuchsreihe mit UFH und Eptifibatid bei 226 ± 23 Sekunden.

Bei der Durchführung der Versuche mit Enoxaparin in Gruppe 3 betrug das mittlere Thrombusgewicht 219 ± 45 mg und bei der Kombination von Enoxaparin mit Eptifibatid in Gruppe 4 194 ± 48 mg. Bei einer Medikamentendosierung von 0,6 U/ml Vollblut Enoxaparin ergab sich eine mittlere Anti-Xa-Aktivität von $0,87 \pm 0,07$ U/ml Blut. In Gruppe 4 wurden weiterhin zusätzlich zu 0,6 U/ml Enoxaparin 1,7 g/ml Eptifibatid zugegeben. In dieser Gruppe wurde eine mittlere Anti-Xa-Aktivität von $0,84 \pm 0,04$ U/ml Blut gemessen. Bei der Applikation von bis zu maximal 2,0 g Fondaparinux pro ml Blut entwickelte sich in der Versuchsgruppe 5 ein mittleres Thrombusgewicht von 388 ± 150 mg, in Gruppe 6 ergab sich bei Zusatz von 0,5 g Fondaparinux und 1,7 μ g Eptifibatid pro ml Blut ein Mittelwert von 341 ± 117 mg. Die mittlere AntiXa-Aktivität lag hier in Gruppe 5 bei $1,76 \pm 0,47$, in Gruppe 6 bei $0,73 \pm 0,06$ U/ml Blut.

In Gruppe 7 und 8 wurden 0,5 U unfraktioniertes Heparin und 0,5 g Fondaparinux pro ml Blut kombiniert. Bei den Versuchen in Gruppe 8 erfolgte eine zusätzliche Applikation von Eptifibatid mit einer Dosierung von 1,7 g/ml Blut. Bei einer mittleren ACT von 192 ± 17 Sekunden und einer mittleren Anti-Xa-Aktivität von $1,12 \pm 0,11$ U/ml Blut in Gruppe 7 ergab sich ein mittleres Thrombusgewicht von 193 ± 55 mg. In Gruppe 8 ergaben die Messungen ein mittleres Gewicht des Thrombus von 200 ± 34 mg bei einer mittleren ACT von 194 ± 19 Sekunden und einer mittleren Anti-Xa-Aktivität von $1,08 \pm 0,19$ U/ml Blut. In der ersten Boxplot-Grafik (Abbildung 14) sind

sich die verschiedenen Medikamentengruppen bezüglich des Thrombusgewichtes gegenübergestellt. Auf der X-Achse sind die verwendeten Antikoagulantien, auf der Y-Achse die Gewichts­differenz der Herzkatheter vor und nach Versuchsdurchlauf aufgetragen. Aus Gründen der besseren Darstellung wurden in dieser Arbeit bei allen Boxplot-Grafiken die Ausreißer bzw. Extreme ausgeblendet.

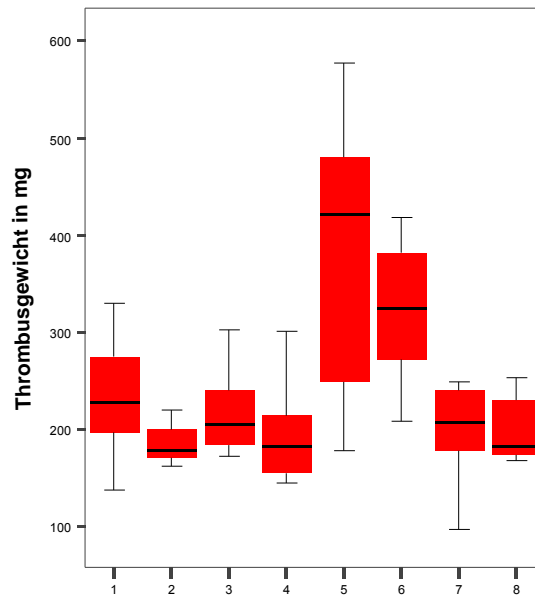


Abb. 14: Boxplot-Grafik zum Vergleich des Thrombusgewichtes in den verschiedenen Versuchsgruppen (1: Unfraktioniertes Heparin, 2: UFH + Eptifibatid, 3: Enoxaparin, 4: Enoxaparin + Eptifibatid, 5: Fondaparinux, 6: Fondaparinux + Eptifibatid, 7: UFH + Fondaparinux, 8: UFH + Fondaparinux + Eptifibatid)

Im statistischen Vergleich der einzelnen Versuchsgruppen mittels ANOVA (post-hoc Analyse) zeigte sich, dass die Thrombusentwicklung in Gruppe 5 (Fondaparinux) und Gruppe 6 (Fondaparinux + Eptifibatid) signifikant höher war als in den übrigen Gruppen mit anderen Behandlungsstrategien. Alle p-Werte der Gruppen 5 und 6 verglichen mit den anderen lagen auf einem Signifikanzniveau von 0,002 oder 0,001, wie man aus Tabelle 6 entnehmen kann.

Tab. 6: Statistischer Vergleich des Thrombusgewichtes

Gruppe	1	2	3	4	5	6	7
2	p=0,124	---	---	---	---	---	---
3	p=0,622	p=0,292	---	---	---	---	---
4	p=0,218	p=0,755	p=0,457	---	---	---	---
5	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	---	---	---
6	p=0,002	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p=0,224	---	---
7	p=0,209	p=0,774	p=0,443	p=0,981	p<0,001	p<0,001	---
8	p=0,292	p=0,622	p=0,574	p=0,856	p<0,001	p<0,001	p=0,837

(1: Unfraktioniertes Heparin, 2: UFH + Eptifibatid, 3: Enoxaparin, 4: Enoxaparin + Eptifibatid, 5: Fondaparinux, 6: Fondaparinux + Eptifibatid, 7: UFH + Fondaparinux, 8: UFH + Fondaparinux + Eptifibatid)

4.3 Vergleich der Laufzeiten

Als ein weiterer Endpunkt wurde in dieser Arbeit die Zirkulationszeit ausgewählt. Die Zeit wurde von dem Zeitpunkt des Anschaltens der Rollerpumpe bis zum vollständigen Verschluss des Herzkatheters durch einen Thrombus gemessen, das heißt entweder bis zum Abbruch des kontinuierlichen Blutflusses oder bis Ablauf der als maximale Versuchsdauer definierten 60 Minuten. In Gruppe 5, bei der die Antikoagulation mit Fondaparinux (bis 2 µg/ml) erfolgte, lag der Mittelwert \pm Standardabweichung bei 30 ± 20 Minuten. Bei der Kombination von Fondaparinux (0,5 µg/ml) mit Eptifibatid (1,7 µg/ml) in Gruppe 6 maßen wir 28 ± 9 Minuten. In fast allen anderen Versuchsgruppen, auch unter der Kombination von Fondaparinux (0,5 µg/ml) mit unfraktioniertem Heparin (0,5 U/ml), konnten die 60 Minuten Versuchszeit durchgeführt werden. Es gab zwei Ausnahmen: In Gruppe 3 (Enoxaparin) betrug die Laufzeit bei Proband 8 nur 52 Minuten und in Gruppe 7 (UFH + Eptifibatid) bei Proband 3 lediglich 57 Minuten. Die Blutabnahmezeit dauerte verglichen mit anderen Versuchen sehr lang, was hypothetisch eine Voraktivierung der Thrombozyten zur Folge hatte.

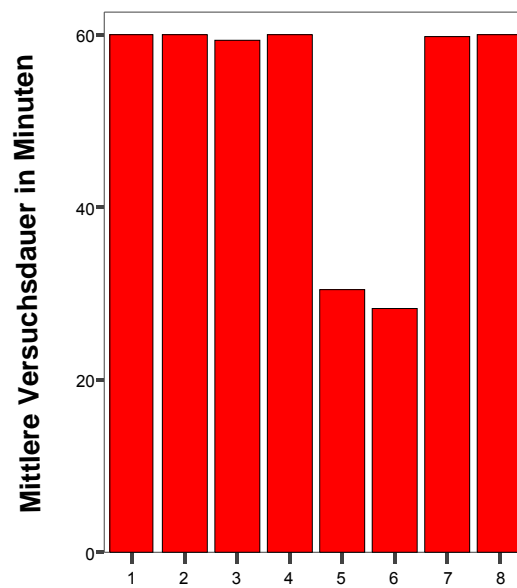


Abb. 15: Vergleich der mittleren Zirkulationsdauer in den verschiedenen Versuchsgruppen (1: Unfraktioniertes Heparin, 2: UFH + Eptifibatid, 3: Enoxaparin, 4: Enoxaparin + Eptifibatid, 5: Fondaparinux, 6: Fondaparinux + Eptifibatid, 7: UFH + Fondaparinux, 8: UFH + Fondaparinux + Eptifibatid)

Mittels post hoc Analysen konnte gezeigt werden, dass die Zeitdauer des kontinuierlichen Blutflusses unter einer Antikoagulation allein mit Fondaparinux und auch bei der zusätzlichen Gabe von Eptifibatid signifikant kürzer war als in allen anderen Versuchsgruppen, bei denen andere Strategien zur Antikoagulation angewandt wurden. (siehe Tabelle 7).

Tab. 7: Statistischer Vergleich der Zirkulationszeit

Gruppe	1	2	3	4	5	6	7
2	p=1,0	---	---	---	---	---	---
3	p=0,784	p=0,784	---	---	---	---	---
4	p=1,0	p=1,0	p=0,784	---	---	---	---
5	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	---	---	---
6	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p=0,547	---	---
7	p=0,918	p=0,918	p=0,864	p=0,918	p<0,001	p<0,001	---
8	p=1,0	p=1,0	p=0,784	p=1,0	p<0,001	p<0,001	p=0,918

(1: Unfraktioniertes Heparin, 2: UFH + Eptifibatid, 3: Enoxaparin, 4: Enoxaparin + Eptifibatid, 5: Fondaparinux, 6: Fondaparinux + Eptifibatid, 7: UFH + Fondaparinux, 8: UFH + Fondaparinux + Eptifibatid)

4.4 Elektronenmikroskopische Auswertung

Bei der elektronenmikroskopischen Auswertung analysierten wir eine standardisierte Region (100 x 150 μ m) in der Mitte der zuvor präparierten Katheterhälften (siehe Abbildung 12). Die Auswertung der Bilder erfolgte verblindet. Die auf der Katheteroberfläche anhaftenden Erythrozyten wurden ausgezählt, die Fibrinentwicklung quantifiziert. In Abbildung 16 wurde repräsentativ für jede Versuchsreihe ein elektronenmikroskopisches Bild ausgewählt, das postexperimentell angefertigt wurde. Es zeigt sich ein deutlich sichtbarer Unterschied bezüglich der Zell- und Fibrinablagerung in Gruppe 5 (Fondaparinux) und 6 (Fondaparinux + Eptifibatid) verglichen mit den Bildern der anderen Versuchsreihen.

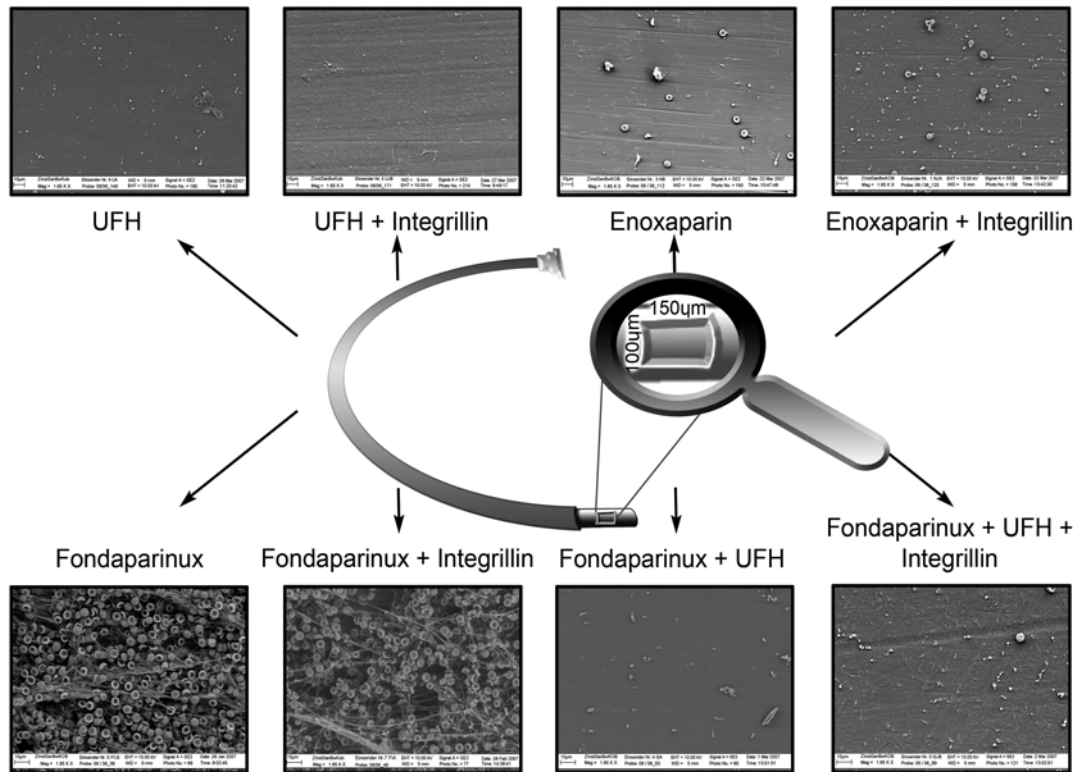


Abb. 16: Repräsentativ ausgewählte postexperimentelle Bilder der einzelnen Versuchsgruppen. Um eine Standardisierung bei der Anfertigung zu erreichen, wurden die elektronenmikroskopischen Bilder immer an der gleichen Stelle der Katheterspitzeninnenseite und mit der selben Vergrößerung (100 m = 1cm) angefertigt.

4.4.1. Erythrozytenanzahl

Die Erythrozytenanzahl auf den Katheteroberflächen betrug im Mittel (\pm Standardabweichung) $6,4 \pm 7,9$ in Gruppe 1, $1,6 \pm 3,1$ in Gruppe 2, $33,3 \pm 51,7$ in Gruppe 3 und $8,9 \pm 8,7$ in Gruppe 4. In Gruppe 5 lag der Mittelwert bei $647,7 \pm 383,3$, in Gruppe 6 bei $129,8 \pm 210,8$, in Gruppe 7 bei $4,6 \pm 12,0$ und in Gruppe 8 bei $2,1 \pm 3,4$. In der folgenden Abbildung werden diese Daten zur besseren Veranschaulichung zusätzlich graphisch dargestellt.

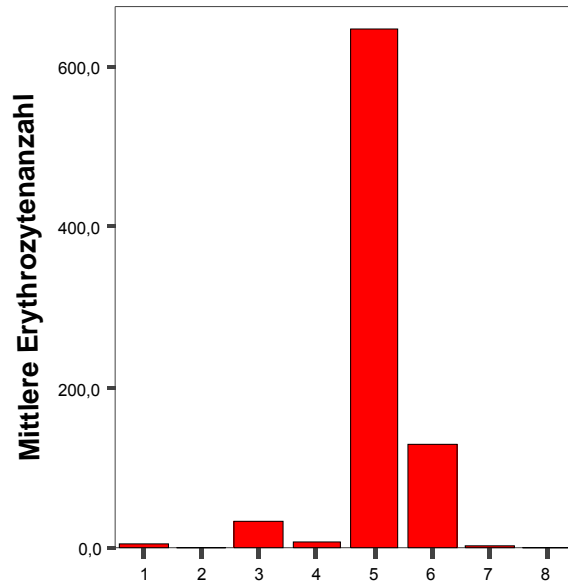


Abb. 17: Grafik der mittleren Erythrozytenanzahl in den einzelnen Versuchsgruppen (1:Unfraktioniertes Heparin, 2: UFH + Eptifibatid, 3: Enoxaparin, 4: Enoxaparin + Eptifibatid, 5: Fondaparinux, 6: Fondaparinux + Eptifibatid, 7: UFH + Fondaparinux, 8: UFH + Fondaparinux + Eptifibatid)

In der Versuchsgruppe mit Fondaparinux (Gruppe 5) und Fondaparinux + Eptifibatid (Gruppe 6) zeigte sich in der Auswertung eine signifikant höhere Anlagerung von Erythrozyten verglichen mit den anderen Versuchsreihen. Der Vergleich dieser Werte zeigte sich bei den Gruppen 5 und 6 signifikant gegenüber den andern Gruppen erhöht mit Ausnahme des Vergleichs der Gruppen 6 und 3 ($p=0,084$).

Tab. 8: Statistischer Vergleich der mittleren Erythrozytenzahl

Gruppe	1	2	3	4	5	6	7
2	p=0,93	---	---	---	---	---	---
3	p=0,627	p=0,566	---	---	---	---	---
4	p=0,964	p=0,894	p=0,659	---	---	---	---
5	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	---	---	---
6	p=0,028	p=0,023	p=0,084	p=0,032	p<0,001	---	---
7	p=0,974	p=0,956	p=0,604	p=0,938	p<0,001	p=0,026	---
8	p=0,938	p=0,992	p=0,573	p=0,902	p<0,001	p=0,023	p=0,964

(1: Unfraktioniertes Heparin, 2: UFH + Eptifibatid, 3: Enoxaparin, 4: Enoxaparin + Eptifibatid, 5: Fondaparinux, 6: Fondaparinux + Eptifibatid, 7: UFH + Fondaparinux, 8: UFH + Fondaparinux + Eptifibatid)

4.4.2 Fibrinentwicklung

Um die Fibrinentwicklung quantifizieren zu können definierten wir eine numerische Einteilung von Null bis Vier (0 = kein, 1 = wenig, 2 = mittel, 3 = viel und 4 = sehr viel Fibrinentwicklung).

Als Mittelwert (\pm Standardabweichung) ergab sich ein Wert von $0,95 \pm 0,64$ für Gruppe 1, $1,0 \pm 0,24$ für Gruppe 2, $2,0 \pm 1,33$ in Gruppe 3, $1,85 \pm 0,82$ in Gruppe 4, $3,7 \pm 0,67$ in Gruppe 5, $2,5 \pm 0,76$ in Gruppe 6, $1,5 \pm 0,85$ in Gruppe 7 und $0,9 \pm 0,32$ in Gruppe 8.

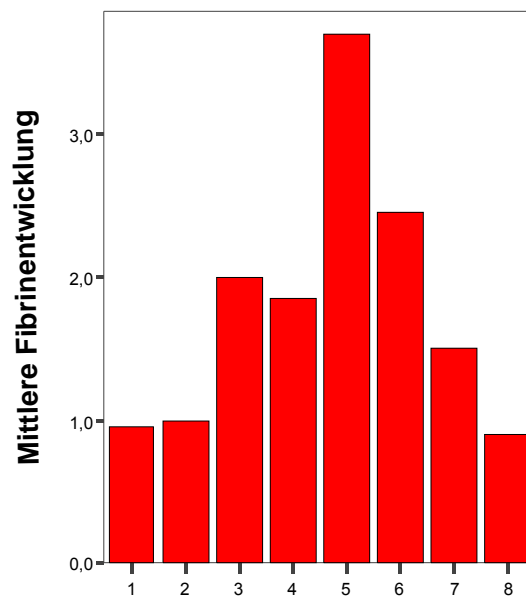


Abb. 18: Grafische Darstellung der mittleren Fibrinentwicklung in den einzelnen Versuchsgruppen (1: Unfraktioniertes Heparin, 2: UFH + Eptifibatid, 3: Enoxaparin, 4: Enoxaparin + Eptifibatid, 5: Fondaparinux, 6: Fondaparinux + Eptifibatid, 7: UFH + Fondaparinux, 8: UFH + Fondaparinux + Eptifibatid)

Wie auch bei den Erythrozyten zeigte sich eine signifikant höhere Fibrinentwicklung in den Versuchsgruppen mit Fondaparinux allein und in Kombination mit Eptifibatid (Gruppe 5 und 6) im Vergleich zu den anderen Versuchsgruppen mit Ausnahme des Vergleichs der Gruppe 6 mit den Gruppen 3 ($p=0,201$) und 4 ($p=0,09$) (Tabelle 9).

Tab. 9: Statistischer Vergleich der mittleren Fibrinentwicklung

Gruppe	1	2	3	4	5	6	7
2	p=0,886	---	---	---	---	---	---
3	p=0,004	p=0,005	---	---	---	---	---
4	p=0,012	p=0,017	p=0,668	---	---	---	---
5	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	---	---	---
6	p<0,001	p<0,001	p=0,201	p=0,09	p=0,005	---	---
7	p=0,119	p=0,156	p=0,156	p=0,319	p<0,001	p=0,008	---
8	p=0,886	p=0,775	p=0,002	p=0,008	p<0,001	p<0,001	p=0,09

(1: Unfraktioniertes Heparin, 2: UFH + Eptifibatid, 3: Enoxaparin, 4: Enoxaparin + Eptifibatid, 5: Fondaparinux, 6: Fondaparinux + Eptifibatid, 7: UFH + Fondaparinux, 8: UFH + Fondaparinux + Eptifibatid)

4.4.3 Korrelationen

Mithilfe von Pearsons Korrelationskoeffizienten analysierten wir die Assoziationen der verschiedenen Komponenten des sich anhaftenden Thrombus untereinander und zwischen den zusammengehörigen Katheterhälften.

Es zeigte sich ein Zusammenhang zwischen der Anzahl der sich insgesamt anhaftenden Erythrozyten und der Fibrinentwicklung auf den Katheteroberflächen. Eine hohe Erythrozytenablagerung korrelierte auf einem Signifikanzniveau von $p=0,01$ mit einer hohen Menge an Fibrin ($r=0,529$). Betrachtet man diese Zusammenhänge in den einzelnen Untergruppen, trifft das Ergebnis einer guten Korrelation zwischen Erythrozyten und Fibrinablagerung in den Gruppen 3 und 6 zu. In den Versuchsreihen 4, 7 und 8 lag eine moderate und in den Gruppen 1, 2 und 5 keine Korrelation vor.

Tab. 10: Korrelationen der Erythrozyten mit der Fibrinablagerung in den Versuchsgruppen

Gruppe	Gesamt	1	2	3	4	5	6	7	8
	<i>Fib</i>	<i>Fib</i>	<i>Fib</i>	<i>Fib</i>	<i>Fib</i>	<i>Fib</i>	<i>Fib</i>	<i>Fib</i>	<i>Fib</i>
<i>Ery</i>	0,529	-0,363	0	0,588	0,262	-0,368	0,480	0,205	0,269

(1: Unfraktioniertes Heparin, 2: UFH + Eptifibatid, 3: Enoxaparin, 4: Enoxaparin + Eptifibatid, 5: Fondaparinux, 6: Fondaparinux + Eptifibatid, 7: UFH + Fondaparinux, 8: UFH + Fondaparinux + Eptifibatid)

Zwischen den Katheterhälften (Hälfte A zu B) bestand in der Gesamtauswertung bei der Erythrozytenanzahl und der Fibrinentwicklung eine signifikante Korrelation auf dem Level $p=0,01$. Die statistischen Ergebnisse lagen bei den Erythrozyten bei $r=0,91$, bei Fibrin bei $r=0,80$. Bei der Analyse in den einzelnen Versuchsgruppen bezogen auf die Erythrozyten konnte man in den Gruppen 3, 5, 6 und 7 wie bei der Gesamtanalyse sehr gute Korrelationen, in Gruppe 1 eine relevante erkennen. In den Versuchsreihen 2, 4 und 8 bestand keine Korrelation der Erythrozytenanzahl zwischen den Katheterhälften. Bei der Fibrinentwicklung ergab sich in Gruppe 2 eine relevante und in Gruppe 8 keine Beziehung. In allen übrigen Gruppen (1, 3, 4, 5, 6, 7) bestand eine sehr gute Korrelation. Die einzelnen Werte der Korrelationen finden sich in Tabelle 11.

Tab. 11: Korrelationen der Ablagerungen auf den Katheterhälften in den einzelnen Versuchsgruppen

<i>Gruppe</i>		<i>Ery a</i>	<i>Ery b</i>	<i>Fib a</i>
Gesamt	<i>Ery b</i>	0,91	---	---
	<i>Fib a</i>	0,42	0,52	---
	<i>Fib b</i>	0,53	0,57	0,8
1	<i>Ery b</i>	0,32	---	---
	<i>Fib a</i>	0,55	0,43	---
	<i>Fib b</i>	-0,44	0,21	0,75
2	<i>Ery b</i>	-0,15	---	---
	<i>Fib a</i>	0,11	0,15	---
	<i>Fib b</i>	-0,11	-0,15	0,11
3	<i>Ery b</i>	0,93	---	---
	<i>Fib a</i>	0,42	0,51	---
	<i>Fib b</i>	0,60	0,67	0,79
4	<i>Ery b</i>	-0,31	---	---
	<i>Fib a</i>	-0,01	0,26	---
	<i>Fib b</i>	0,11	0,37	0,51
5	<i>Ery b</i>	0,65	---	---
	<i>Fib a</i>	-0,71	0,02	---
	<i>Fib b</i>	-0,71	0,02	1,0
6	<i>Ery b</i>	0,93	---	---
	<i>Fib a</i>	0,45	0,79	---
	<i>Fib b</i>	0,64	0,72	0,92
7	<i>Ery b</i>	0,90	---	---
	<i>Fib a</i>	-0,17	-0,03	---
	<i>Fib b</i>	0,61	0,62	0,55
8	<i>Ery b</i>	-0,10	---	---
	<i>Fib a</i>	0,10	0,14	---
	<i>Fib b</i>	0,22	0,02	-0,06

(1: Unfraktioniertes Heparin, 2: UFH + Eptifibatid, 3: Enoxaparin, 4: Enoxaparin + Eptifibatid, 5: Fondaparinux, 6: Fondaparinux + Eptifibatid, 7: UFH + Fondaparinux, 8: UFH + Fondaparinux + Eptifibatid)

4.5 Laborparameter

4.5.1 Thrombin-Antithrombin-Komplex (TAT)

Die Mittelwerte (\pm Standardabweichung) für die TAT lagen in Gruppe 1 bei $54,9 \pm 16,0$ und in Gruppe 2 bei $33,5 \pm 20,5$. In allen anderen Gruppen (3, 4, 5, 6, 7, 8) ergab sich methodenbedingt ein mittlerer Wert von $60,0 \pm 0$, ein statistischer Vergleich der Untergruppen war somit nicht sinnvoll durchführbar.

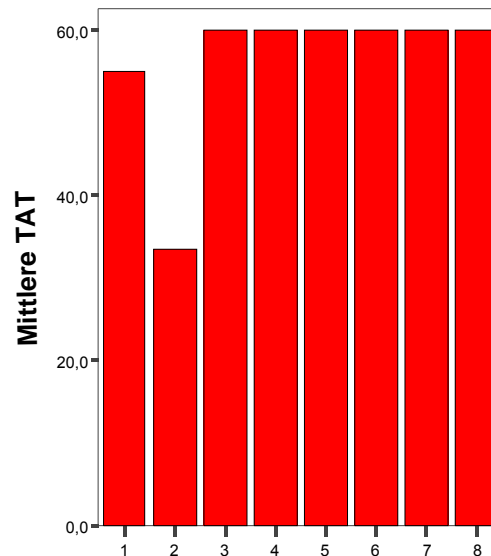


Abb. 19: Grafik der mittleren postexperimentellen TAT-Werte (1: Unfraktioniertes Heparin, 2: UFH + Eptifibatid, 3: Enoxaparin, 4: Enoxaparin + Eptifibatid, 5: Fondaparinux, 6: Fondaparinux + Eptifibatid, 7: UFH + Fondaparinux, 8: UFH + Fondaparinux + Eptifibatid)

4.5.2 D-Dimer

Die mittlere D-Dimer-Konzentration in mg/dl nach Versuchsende lag in Gruppe 1 bei $160,4 \pm 72,6$, in Gruppe 2 bei $168,4 \pm 82,5$, in Gruppe 3 bei $163,1 \pm 83,1$ und in Gruppe 4 bei $150,9 \pm 67,0$. In Gruppe 5 wurde eine mittlere Konzentration in mg/dl von $226,0 \pm 91,1$, in Gruppe 6 von $183,8 \pm 86,7$, in Gruppe 7 von $195,5 \pm 95,4$ und in Gruppe 8 von $199,8 \pm 80,2$ ermittelt.

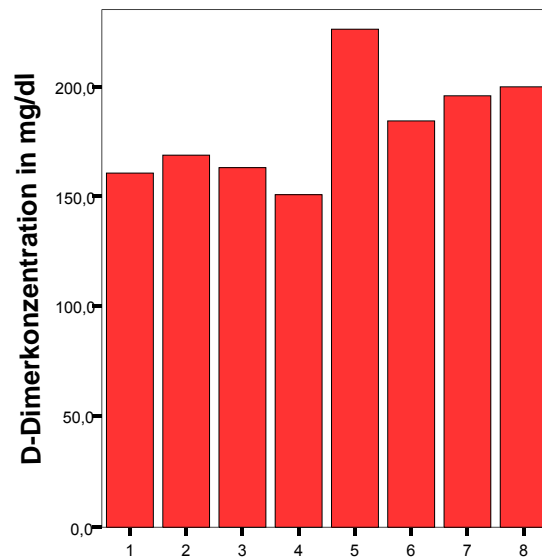


Abb. 20: Grafik der mittleren postexperimentellen D-Dimer-Konzentrationen (1: Unfraktioniertes Heparin, 2: UFH + Eptifibatid, 3: Enoxaparin, 4: Enoxaparin + Eptifibatid, 5: Fondaparinux, 6: Fondaparinux + Eptifibatid, 7: UFH + Fondaparinux, 8: UFH + Fondaparinux + Eptifibatid)

Diese Ergebnisse zeigen eine Tendenz, dass es in Gruppen mit Fondaparinux (5, 6, 7, 8) zu einer höheren Bildung von D-Dimer kommt. Dies spiegelte sich jedoch nicht im statistischen Vergleich der Gruppen wieder, da alle p-Werte $> 0,05$ waren und somit kein signifikanter Unterschied gegenüber den Versuchsgruppen mit anderen Strategien zur Antikoagulation nachzuweisen war. Die einzelnen p-Werte der statistischen Auswertung können in Tabelle 12 nachvollzogen werden.

Tab. 12: Statistischer Vergleich der mittleren D-Dimer-Konzentration

<i>Gruppe</i>	1	2	3	4	5	6	7
2	p=0,828	---	---	---	---	---	---
3	p=0,942	p=0,886	---	---	---	---	---
4	p=0,797	p=0,635	p=0,741	---	---	---	---
5	p=0,149	p=0,205	p=0,167	p=0,100	---	---	---
6	p=0,526	p=0,676	p=0,575	p=0,374	p=0,352	---	---
7	p=0,343	p=0,463	p=0,381	p=0,229	p=0,500	p=0,751	---
8	p=0,287	p=0,396	p=0,321	p=0,188	p=0,562	p=0,665	p=0,907

(1: Unfraktioniertes Heparin, 2: UFH + Eptifibatid, 3: Enoxaparin, 4: Enoxaparin + Eptifibatid, 5: Fondaparinux, 6: Fondaparinux + Eptifibatid, 7: UFH + Fondaparinux, 8: UFH + Fondaparinux + Eptifibatid)

5. Diskussion

Die gerinnungshemmende Behandlung von Patienten, bei denen eine perkutane Koronarintervention (PCI) bei Koronarer Herzerkrankung durchgeführt wird, ist heutzutage trotz zahlreicher Studien und Publikationen immer noch eine Herausforderung für den behandelnden Arzt. Das Ziel dieser Therapie muss sein, thromboembolische Komplikationen zu verhindern, ohne jedoch die Wahrscheinlichkeit für Blutungsereignisse zu erhöhen.

5.1 Entwicklung der PTCA

Im September 1977 wurde in Zürich die erste perkutane transluminale Koronarangiographie (PTCA) am Menschen von Andreas Grüntzig durchgeführt. Zum damaligen Zeitpunkt wurde die PTCA allein in Form einer Ballon-Angioplastie zur Wiedereröffnung proximaler und umschriebener Koronarstenosen angewandt. Bei den ersten 50 Patienten lag die primäre Erfolgsrate bei 64%. Präklinische Studien an Tiermodellen lieferten die Grundlagen für diesen medizinischen Durchbruch. Die Weiterentwicklung der Methodik und Materialverbesserungen, sowie die wachsende Erfahrung des interventionellen Kardiologen, hatten zur Folge, dass heute nahezu jeder Abschnitt des Koronargefäßsystems erreicht werden kann und hierdurch ein wesentlich größeres Patientenkollektiv profitiert (Arjomand et al., 2003; Holmes and Williams, 2008). In mehreren Multizenter-Studien konnte gezeigt werden, dass sich mit der PTCA bei akutem ST-Hebungsinfarkt die Mortalität, Re-Infarktrate und das Auftreten von cerebrovaskulären Insulten deutlich und ausgeprägter als mit der Fibrinolyse vermindern lässt (Zijlstra et al., 1999). Die anfängliche Durchführung war mit einer signifikanten Inzidenz von periprozeduralen Komplikationen assoziiert (Tod, Myokardinfarkt, Gefäßverschluss, schwere Blutungen und Notoperation), die nicht zuletzt mit der Unsicherheit bzgl. der gerinnungshemmenden Medikation während des Eingriffs verbunden war. Das Hauptproblem der Ballon-Angioplastie stellte jedoch die Entstehung von Restenosen dar, einer Reaktion der Gefäßwand auf erfolgte Verletzung. Nobuyoshi und seine Kollegen zeigten in einer Studie an 229 Patienten, dass die Restenoserate nach erfolgreicher PTCA von 12,7% im ersten Monat auf 52,2% nach einem Jahr ansteigt (Nobuyoshi et al., 1988). Dieses Problem konnte in den 80er Jahren des letzten Jahrhunderts neben der Behandlung von Dissektionen zumindest zum Teil mit der Einführung der Stents gelöst werden.

Die ersten koronaren Stents wurden im Jahr 1986 von Jacques Puel in Frankreich und Ulrich Sigwart in der Schweiz implantiert. Zwei wegweisende klinische Studien (STRESS, BENESTENT) zeigten eine signifikante Reduktion der Restenoseraten

durch Stentimplantation verglichen mit alleiniger Ballon-Angioplastie (40% vs. 19%) (Fischmann et al., 1994; Serruyis, 1994). Mittlerweile gehören Stents zum Versorgungsstandard, jedoch waren auf ihrem Entwicklungsweg einige Hürden zu überwinden. Obwohl der Einsatz von Stents die absolute Häufigkeit von Restenosen stark reduzierte, wurden sie nicht vollständig eliminiert. In der folgenden Zeit wurde ein neues Problem, nämlich die In-Stent-Restenosen, die durch eine Intimaproliferation mit subintimaler Einwanderung von glatten Muskelzellen charakterisiert ist, entdeckt. Studien zur systemischen, medikamentösen Therapie in diesem Zusammenhang schlugen fehl.

In den folgenden Jahren wurden auf der Basis des Prinzips, dass die Abschwächung der reaktiven Intimaproliferation die Inzidenz der In-Stent Restenosen reduziert, die bisher verwendeten bare metal stents (BMS) mit antiproliferativen Substanzen beschichtet. Als Resultat des Einsatzes dieser sogenannten drug-eluting stents (DES) traten Restenosen und somit Re-Interventionen in ca. 5-10% der Fälle auf (Lüscher und Steffel, 2008).

Bereits bei der Anwendung von BMS beobachtete man Stenttrombosen als eine Komplikation mit hoher Mortalität. Diese traten trotz der Behandlung mit Acetylsalicylsäure und Vitamin-K-Antagonisten auf, was zum damaligen Zeitpunkt die antikoagulatorische Standardtherapie nach Stentimplantation darstellte. Im Unterschied zur Entwicklung einer Restenose konnte die Stentthrombosenrate durch den Einsatz von DES im Vergleich zu den BMS nicht reduziert werden. Es zeigte sich, dass Stents als metallische Fremdkörper im Gefäßbett, die Thrombozytenaggregation und die Aktivierung der Gerinnungskaskade induzieren. Stentthrombosen treten am häufigsten in den ersten Wochen nach Implantation auf, in seltenen Fällen können sie aber auch noch Jahre später entstehen (Steffel et al., 2008). Diese Konstellation gab Anlass für intensive Forschung auf dem Gebiet der Thrombozytenaggregations- und plasmatischen Gerinnungshemmung.

5.2. Entwicklung der Thrombozytenaggregationshemmung

Die Hemmung von Thrombozyten durch die Kombination von ASS und einem ADP-Rezeptor-Antagonisten (Ticlopidin, später Clopidogrel) stellte sich als wirkungsvolle Prophylaxe der akuten und subakuten Stentthrombose heraus. Die Überlegenheit dieser Therapie gegenüber alleiniger Verabreichung von Acetylsalicylsäure oder der Kombination von Acetylsalicylsäure mit einem Vitamin-K-Antagonisten wurde in der Vergangenheit mit einer großen Anzahl von Studien belegt (Schühlen et al., 1997; Urban et al., 1998; Kadakia and Ferguson, 2003; Bertrand et al., 2008).

In der CURE-Studie wurden insgesamt 12.562 Patienten mit ACS in drei verschiedene Acetylsalicylsäure-Dosierungsregimes eingeteilt (100 mg, 101-199 mg, >200 mg). In allen drei Gruppen kam es durch die zusätzliche Gabe von Clopidogrel zu einer Reduktion des primären Endpunktes, bestehend aus kardiovaskulärem Tod, Myokardinfarkt oder Schlaganfall. Bei 2.662 dieser Patienten wurde eine PCI durchgeführt. In einer Subanalyse dieses Patientenkollektivs (PCI-CURE) konnte ebenfalls eine signifikante Risikoreduktion durch eine duale Thrombozytenaggregation gezeigt werden (Mehta, 2003). Standardtherapie ist derzeit die Gabe einer Aufsättigungsdosis von 250 mg ASS, die im Allgemeinen mit einer Dauertherapie von 100 mg ASS weitergeführt wird. Zusätzlich erhalten die Patienten eine loading dose von 300 mg (bis 600 mg) Clopidogrel vor perkutaner Koronarintervention und eine anschließende tägliche Gabe von 75 mg. Die Häufigkeit einer Stentthrombose bei stabilen Patienten konnte mit dem Einsatz dieser dualen Thrombozyten-aggregationshemmung auf unter 1% gesenkt werden. Der Preis für diesen Erfolg ist wie bei jeder gerinnungshemmenden Therapie ein erhöhtes Blutungsrisiko für die Patienten (Goodman et al., 2008).

Da die Akutbehandlung des ACS mit einem lokal inflammatorischen Geschehen und einer dementsprechenden Gerinnungsaktivierung einhergeht, kam die PTCA zu Beginn in dieser Situation nicht zum Einsatz. Erst die Einführung wirksamer gerinnungshemmender Medikamente hatte zur Folge, dass die Akutintervention beim ACS heutzutage zu den wichtigsten Anwendungen der PTCA gehört.

Die Verwendung von Glykoprotein IIb/IIIa-Antagonisten repräsentieren eine weitere sehr effektive Strategie zur Thrombozytenaggregationshemmung und ist im Allgemeinen bei der Hochrisiko-PTCA indiziert. Aktuell werden drei verschiedene GPIIb/IIIa-Antagonisten mit unterschiedlichen biochemischen Charakteristika vertrieben: Abciximab, Eptifibatid und Tirofiban. Der GPIIb/IIIa-Antagonist Abciximab wurde in sieben randomisierten, Placebo kontrollierten Studien untersucht, die insgesamt annähernd 4000 Patienten einschlossen, bei denen eine PTCA durchgeführt wurde. Am Tag 30 zeigte sich eine deutliche Risikoreduktion für den primären Endpunkt bestehend aus Herzinfarkt, Tod und Reintervention am Zielgefäß, allerdings mit einer erhöhten Blutungsrate. Auch die Therapie mit Eptifibatid bei Stentimplantation erwies sich als effektiv und ist mit einem geringeren Auftreten von ischämischen Komplikationen assoziiert. Für Tirofiban ergaben sich vergleichbare Ergebnisse wie bei der Therapie mit Abciximab (Popma et al., 2004; Goodman et al., 2008).

5.3 Gerinnungshemmende Therapie bei PCI

5.3.1 Unfraktioniertes Heparin

Bis vor kurzer Zeit basierten die pharmakologischen Möglichkeiten zur gerinnungshemmenden Therapie während der PTCA auf zwei verschiedenen Antikoagulantien, dem unfraktionierten Heparin (UFH) und den niedermolekularen Heparinen (NMH). Beide Untergruppen der Heparine greifen an mehreren Ansatzpunkten in die Gerinnungskaskade ein, insbesondere an den Gerinnungsfaktoren Xa und IIa. Während UFH im Verhältnis 1:1 diese beiden Gerinnungsfaktoren inhibiert, ist die Ratio dieses Verhältnis bei den NMH $\geq 1,5$.

Die Gabe von intravenösem UFH ist die derzeit am häufigsten verwendete Form der periprozeduralen, antikoagulatorischen Therapie während der PTCA. Hierdurch wird das Risiko für einen akuten koronaren Gefäßverschluss signifikant reduziert. Der Wirkspiegel von UFH wird im Herzkatheterlabor in einem Bedside-Verfahren, der sogenannten activated clotting time (ACT) kontrolliert, wobei der Normwert bei ca. 80-120 Sekunden liegt. In den Anfängen der PTCA lag die verabreichte Heparindosis bei 10.000 IE und einer angestrebten ACT von über 300 Sekunden. In der Vergangenheit gab es einige retrospektive Studien, die zeigten, dass ein Zusammenhang zwischen der Höhe der ACT und ischämischen Ereignissen bzw. Blutungskomplikationen besteht. Aktuell liegt die Standarddosierung von UFH gewichtsadaptiert bei 100 IE/kg, mit einer Ziel ACT von 250-350 Sekunden. Bei zusätzlicher Gabe von GPIIb/IIIa-Hemmern wird die Heparindosis auf 50-60 IE/kg reduziert, die angestrebte ACT liegt dann im Bereich von 200-300 Sekunden. Der Trend zu niedrigeren Heparindosen und zu einer niedrigeren ACT beruht vor allem auf besseren postinterventionellen koronaren Flußraten (Stents) und geringerem Risiko für Herzkatheter assoziierte Thrombosen. Nach mehreren Studien, die aufzeigten, dass längere Heparininfusionen keinen Vorteil in Bezug auf ischämische Komplikationen bringen und zudem mit höheren Blutungskomplikationen assoziiert sind, gilt die routinemäßige Anwendung von UFH nach der PTCA als überholt. Fortlaufende Heparininfusionen sind lediglich bei Vorliegen von thrombotischem Material oder nicht optimalem Resultat nach PTCA indiziert. Auch wenn UFH vom American College of Cardiology, der American Heart Association und der European Society of Cardiology bei PTCA empfohlen wird, weist dieses Medikament einige Schwächen auf. Die Notwendigkeit des kontinuierlichen Monitorings und das damit verbundene oft schwierige Management sowie ein enges therapeutisches Fenster, eine mögliche Induktion der Plättchenaktivierung und die Gefahr der Heparin-induzierten Thrombozytopenie gaben Anlass für die Suche nach besser geeigneten Alternativen (Kadakia and Ferguson 2003; Goodman et al., 2008).

Wie bereits in der Einleitung dieser Promotionsarbeit erwähnt, ist die heparininduzierte Thrombozytopenie Typ II (HIT) eine seltene, dafür aber umso schwerwiegendere Komplikation bei der Therapie mit Heparinen. Bei Diagnosestellung ist das sofortige Absetzen zu veranlassen, und sowohl unfractioniertes, als auch niedermolekulare Heparine sind lebenslang kontraindiziert. Vitamin-K-Antagonisten stellen hierbei keine Alternative zur Therapie der Grunderkrankung dar. Bei einer diagnostizierten HIT können sie paradoxerweise die Situation sogar verschlimmern und zu einer Extremitätengangrän oder einer kutanen Nekrose führen (Cruz-Gonzales et al., 2007). Als Ersatztherapien für die notwendige Antikoagulation stehen entweder direkte Thrombininhibitoren (Lepirudin, Argatroban, Bivalirudin) oder Heparinoide (Danaparoid, Fondaparinux) zur Verfügung. Bislang liegen keine Studien vor, welche die Effektivität und Sicherheit dieser alternativen Therapieverfahren vergleichen. Die Wahl eines Gerinnungshemmers basiert auf der Erfahrung des behandelnden Arztes mit dem jeweilig verfügbaren Medikament und den individuellen klinischen Umständen des Patienten. Ob Fondaparinux für die Therapie eines Patienten mit einer HIT geeignet ist, wird derzeit kontrovers diskutiert. Aktuell liegen nur begrenzte Erfahrungen vor. Ältere Daten zeigten, dass das Risiko für die HIT assoziierte Antigenproduktion von der Länge und dem Molekulargewicht eines Polysaccharides abhängt (2,4 >kDa und >10 Saccharideinheiten). Fondaparinux bindet nicht an den Plättchenfaktor 4 und ist auf Grund seiner Struktureigenschaften zu kurz um eine Antikörperantwort zu induzieren. Bislang liegt kein dokumentierter Fall vor, der das Auftreten einer HIT nach Fondaparinux Therapie beschreibt, obwohl Anti-Heparin-PF4-Antikörper in einzelnen Fällen entdeckt wurden. Es zeigte sich aber keine Kreuzreaktivität von Fondaparinux mit Seren von Patienten mit HIT. Warkentin und Kollegen veröffentlichten unlängst ein Fallbeispiel über den erfolgreichen Einsatz von Fondaparinux bei einer Patientin mit diagnostizierter HIT. Es traten keine Blutungskomplikationen oder thromboembolischen Ereignisse auf (Warkentin, 2006; Spyropoulos et al., 2008). Um konkretere Aussagen über die Verwendung von Fondaparinux und anderen alternativen Gerinnungshemmern zur Therapie der heparininduzierten Thrombozytopenie treffen zu können, werden in Zukunft noch mehr Informationen benötigt (Warkentin, 2006; Cruz-Gonzales et al., 2008).

5.3.2 Niedermolekulares Heparin

Niedermolekulare Heparine (NMH) haben einige nachgewiesene Vorteile gegenüber unfractioniertem Heparin. Neben einer höheren Bioverfügbarkeit und längeren Halbwertszeiten nach subkutaner Applikation ist auch das Risiko des Auftretens einer heparininduzierten Thrombozytopenie wesentlich geringer. Durch einen höheren Pentasaccharid-Anteil ist eine bessere Vorhersagbarkeit des gerinnungshemmenden Effekts im Vergleich zu UFH möglich (Montalescot et al., 2006). Aufgrund der pharmakologischen und pharmakokinetischen Vorteile sollte NMH dem UFH in der Therapie des ACS überlegen sein. Dies war der Anlass für verschiedene Studien. In der FRIC (Dalteparin)- und in der FRAX I.S (Nadroparin)-Studie konnte die Überlegenheit zu UFH nicht gezeigt werden (Klein et al., 1997; FRAX.I.S study group, 1999). Anders gestalteten sich die Untersuchungen mit Enoxaparin. Nach den ESSENCE- und der TIMI 11B-Studien wurde dieses NMH populär. Beide Studien zeigten die Überlegenheit in der Risikoprävention von Reinfarkt, Tod oder Wiederauftretender Angina von Enoxaparin verglichen mit UFH im klinischen Management der instabilen Angina und des Nicht-ST-Hebungsinfarkts. Auch die Kombination von Enoxaparin mit GPIIb/IIIa-Antagonisten während der PTCA bei Patienten mit NSTEMI ist vorteilhaft (Cohen et al., 1997; Antman et al., 1999).

Blazing et al. und die SYNERGY-Studie verglichen Enoxaparin in einer Dosierung von 1 mg/kg Körpergewicht mit UFH in therapeutischer, mittels aPTT kontrollierter Dosierung bei Patienten mit ACS. Die Resultate beider Studien ergaben, dass Enoxaparin bei Patienten mit früher invasiver Behandlungsstrategie in der Risikoprävention sicher, dem UFH aber nicht überlegen ist, wobei insbesondere der Wechsel von einem Medikament auf ein anderes von Nachteil war (Blazing et al., 2004; Ferguson et al., 2004). Die Nichtunterlegenheit von Enoxaparin gegenüber UFH konnten in der STEEPLE-Studie bestätigt werden. Jedoch zeigte sich in der Verwendung einer niedrigeren Dosis in den Enoxaparin-Gruppen mit einer Dosierung von 0,5 mg/kg Körpergewicht eine geringere Inzidenz von Blutungskomplikationen verglichen mit der UFH-Gruppe (Montalescot et al., 2006).

Die Bedeutung dieser Ergebnisse für den klinischen Alltag ist, dass eine einmal begonnene Vorbehandlung (Notaufnahme, Notarztwagen) für das Herzkatheter-Labor die weitere Antikoagulation bestimmt. Enoxaparin ist bei intravenöser Gabe in einer Dosierung von 0,3 mg/kg Körpergewicht eine gute Alternative zu UFH im klinischen Setting der PTCA (Medina and Bhatt, 2007).

5.3.3 Hirudin und Bivalirudin

Die direkten Thrombininhibitoren Hirudin und Bivalirudin können ebenfalls bei der PTCA angewendet werden. Relevante Vorteile der DTI gegenüber dem UFH beinhalten das Fehlen der Plättchenaktivierung, unabhängige Aktivität von Antithrombin III und keine HIT-Gefahr. In der Vergangenheit wurde die Verwendung von Hirudin in großen klinischen Studien zur medikamentösen Therapie beim ACS untersucht. Die GUSTO IIB und die OASIS-2 Studie zeigten einen Vorteil bezogen auf kurzzeitige akute Komplikationen von Hirudin verglichen mit UFH, allerdings auf Kosten einer signifikant höheren Blutungsrate (GUSTO IIB Investigators, 1996; OASIS-2 Investigators, 1999). Diese beiden Therapieregimen wurden weiterhin in der HELVETICA-Studie bei Patienten mit PTCA verglichen. Der primäre Endpunkt dieser Studie war das Überleben ohne aufgetretene Komplikation bis zum siebten Monat. Es zeigte sich eine signifikante Reduktion (39%) des Kurzzeit-Outcomes. Nach sechs Monaten konnte aber bereits kein Vorteil mehr beobachtet werden. Auf Grund des höheren Risikos für Blutungskomplikationen kann Hirudin zur Therapie des ACS nur bei Vorliegen einer HIT-II angewendet werden (Serruyis et al., 1995).

Der direkte Thrombininhibitor Bivalirudin stellt eine weitere Alternative zur antikoagulatorischen Therapie in der invasiven Kardiologie dar. Die erste Veröffentlichung über den erfolgreichen Einsatz bei PTCA erschien 1993. Bivalirudin ist eine synthetisch hergestellte Weiterentwicklung des Hirudin. Im Vergleich überzeugt seine nur reversible Bindung an Thrombin sowie seine Fähigkeit, auch fibringebundenes Thrombin zu inaktivieren. Eine Bindung an andere Plasmaproteine ist nicht bekannt. Obwohl eine Gerinnungswertkontrolle nicht notwendig ist, besteht mit Hilfe der Messung der ACT die Möglichkeit, die Wirksamkeit von Bivalirudin während der PTCA zu überprüfen. Nach der Hirulog Angioplasty Studie (HAS) erhielt Bivalirudin erstmals seine Zulassung zur antikoagulatorischen Therapie bei PTCA (Warkentin et al., 2008). Mit Hilfe der nachfolgenden CACHET-Studie wurde das heute als Standard geltende Dosisregime gefunden (Bolus: 0,75mg/kg und anschließende Infusion von 1,75 mg/kg/h für die Dauer der Intervention) (Lincoff et al., 2002). In den folgenden Jahren wurden zwei große randomisierte Studien (REPLACE-1,-2) durchgeführt. Beide Studien verglichen Bivalirudin mit UFH als antikoagulatorische Therapie bei Patienten, bei denen eine elektive oder dringliche PTCA durchgeführt wurde. Gemessen an dem primären Endpunkt bestehend aus Tod, Myokardinfarkt, Reintervention oder relevanter Blutung zeigte sich, dass Bivalirudin in Effektivität und Sicherheit dem UFH nicht unterlegen war (REPLACE-2: 9,2% vs.10%). Die zusätzliche Administration von Clopidogrel oder GPIIb/IIIa-Antagonisten war problemlos möglich (Lincoff et al., 2003; Lincoff et al., 2004). In der erst kürzlich veröffentlichten ACUITY-Studie konnte gezeigt

werden, dass die alleinige Gabe von Bivalirudin bei Patienten mit ACS mit vergleichbaren ischämischen Ereignisraten bei signifikant geringeren Blutungskomplikationen gegenüber der kombinierten Gabe von UFH und GPIIb/IIIa-Inhibitoren assoziiert war (Stone et al., 2006). Zusätzlich hervorzuheben ist die Zulassung von Bivalirudin während der PTCA auch bei Patienten mit neu diagnostizierter oder bekannter HIT. In der ATBAT-Studie trat bei keinem der Patienten mit HIT während oder nach der PTCA ein akuter Gefäßverschluss oder eine Thrombose auf. Nur ein Patient benötigte eine Bluttransfusion, ein Patient verstarb 48 Stunden nach Intervention an Herzversagen (Mahaffey et al., 2003).

5.4 Aktuelle Studienlage zu Fondaparinux

In den letzten Jahren wurden einige neue Medikamente entwickelt, welche die Strategie der selektiven Hemmung eines spezifischen Gerinnungsfaktors verfolgen. Der Faktor Xa der Gerinnungskaskade ist ein attraktives Ziel für ein derartiges Design, da er eine zentrale Rolle in der gemeinsamen Endstrecke des intrinsischen und extrinsischen Gerinnungssystems darstellt.

Die antikoagulatorische Wirkung von Fondaparinux kommt durch die Bindung an Antithrombin zustande, was eine indirekte aber selektive Inhibition des Faktor Xa zur Folge hat. Von seinem natürlichen Pendant unterscheidet sich Fondaparinux durch eine zusätzliche Methylgruppe, die unspezifische Bindungen an Plasmaproteine verhindert und für die hohe Affinität zu Antithrombin sorgt. Im Unterschied zu direkten Thrombininhibitoren verbleiben Spuren von Thrombin im verletzten Gebiet, wodurch die basale Hämostase gewährleistet bleibt. Dieser Zusammenhang ist womöglich eine Erklärung für das verbesserte Blutungsprofil von Fondaparinux. Wegen der eher geringen intraindividuellen Variabilität der Pharmakokinetik ist die einmal tägliche subkutane Verabreichung ohne Laborkontrollen möglich. Dieses synthetisch hergestellte Pentasaccharid ist der erste Vertreter einer neuen Klasse von Antikoagulantien, die mittlerweile bei verschiedensten Krankheitsbildern zum Einsatz kommen (Bauer, 2006).

In einer retrospektiven Studie zur Analyse der Kosten, Effektivität und Sicherheit injizierbarer Antikoagulantien (Fondaparinux, Dalteparin, Enoxaparin, unfraktioniertes Heparin) wurde festgestellt, dass der mittlere finanzielle Aufwand im Vergleich für Fondaparinux pro Patient am niedrigsten ist (Shorr et al., 2007).

Die Erstzulassung erfolgte für Fondaparinux im März 2002 zur Prophylaxe venöser thromboembolischer Ereignisse bei Patienten, die sich größeren orthopädischen Eingriffen an den unteren Extremitäten unterziehen müssen. Die Effektivität und Sicherheit wurde in vier großen multizentrischen, randomisierten Phase-III-Studien

überprüft (PENTHATLON, PENTAMAKS, EPHEBUS, PENTHIRFA) (Eriksson et al., 2001; Lassen et al., 2002; Turpie et al., 2002; Bauer et al., 2006). In einer Metaanalyse dieser vier Studien konnte eine signifikante Risikoreduktion verglichen mit Enoxaparin nachgewiesen werden. Im Folgenden wurde mit der PEGASUS-Studie die Anwendung von Fondaparinux bei Hochrisikopatienten mit abdomineller Operation untersucht. In der Gesamtpopulation zeigte sich lediglich ein Trend zu weniger venösen Thromboembolien, während in einer Subgruppenanalyse die Rate bei Karzinompatienten signifikant erniedrigt war (Agnelli et al., 2005). Durch die MATISSE-DVT- und der MATISSE-PE-Studien erhielt Fondaparinux seine Zulassung für die Behandlung von tiefen Venenthrombosen und Lungenembolien (Büller et al., 2003; Büller et al., 2004).

In der Therapie des akuten Koronarsyndroms spielt die Antikoagulation eine zentrale Rolle. Ältere Studien zu Patienten mit akutem Koronarsyndrom (Boneu et al., 1995; Simoons et al., 2004) bzw. zu Patienten nach einer perkutanen Koronarintervention (Coussement et al., 2001) ließen vermuten, dass Fondaparinux ebenso effektiv wie Enoxaparin, eventuell sogar sicherer als unfraktioniertes Heparin in der Behandlung des ACS sei.

In der PENTUA-Studie verglich man vier verschiedene Dosierungen von Fondaparinux (2,5 mg, 4 mg, 8 mg, 12 mg, einmal täglich) mit Enoxaparin (1 mg/kg Körpergewicht zweimal täglich) bei Patienten mit ACS. Bis zum neunten Tag konnten keine dosisabhängigen Unterschiede bezogen auf ischämische Ereignisse oder relevante Blutungskomplikationen festgestellt werden. Die niedrigste Ereignisrate der Kombination von Tod, Herzinfarkt und refraktärer Ischämie fand sich in der 2,5 mg Fondaparinux-Gruppe (30%), was eine signifikante Reduktion im Auftreten dieser negativen Ereignisse verglichen mit Enoxaparin darstellte (40,2%). Auf Grund dieser Ergebnisse wurde in den folgenden Studien zu Patienten mit ACS eine Dosis von 2,5 mg verwendet (Simoons et al., 2004).

Die OASIS-5-Studie verglich die Effektivität und Sicherheit von Fondaparinux in einer prophylaktischen Dosis von 2,5 mg s.c. mit Enoxaparin in einer therapeutischen Dosis von 1 mg/kg Körpergewicht in über 20.000 Hochrisikopatienten mit instabiler Angina pectoris oder Nicht-ST-Hebungsinfarkt (NSTEMI). Nach neun Tagen zeigte sich eine annähernd gleiche Effektivität von Fondaparinux gegenüber Enoxaparin bzgl. ischämischer Ereignisse (5,8% vs. 5,7%), die Häufigkeit von relevanten Blutungen war in der Fondaparinux-Gruppe jedoch signifikant geringer (2,2% vs. 4,1%). Auch in der Langzeit-Mortalität und -Morbidität konnte eine Reduktion unter Fondaparinux sowohl am Tag neun (2,9% vs. 3,3%, $p < 0,02$), als auch im Follow-up nach 6 Monaten (5,6% vs. 6,3%, $p = 0,037$) beobachtet werden (Yusuf et al., 2006a).

In der OASIS-6-Studie ergaben sich ähnliche Resultate. In dieser randomisiert und doppelblind angelegten Studie wurden 12.092 Patienten mit ST-Hebungsinfarkt (STEMI) bezüglich der prophylaktischen Gabe von 2,5 mg s.c. Fondaparinux mit der Standardtherapie (unfraktioniertes Heparin) oder einer Placebo-Gruppe verglichen. Am Tag 30 konnte eine Reduktion der Herzinfarktrate um 14% festgestellt werden (9,7% vs. 11,2%, $p < 0,0008$). Es zeigte sich eine Tendenz zum selteneren Auftreten von relevanten Blutungen unter Fondaparinux, wobei ein signifikanter Unterschied nicht festgestellt wurde ($p=0,13$) (Yusuf et al., 2006b).

Zusammenfassend kann man sagen, dass Fondaparinux gegenüber Heparinen in den Indikationen Thromboseprophylaxe und Therapie tiefer Venenthrombosen/ Lungenembolien ein vergleichbares Sicherheitsprofil aufweist. Auch in der Therapie des ACS hat dieses Medikament durch die jüngsten Diagnose- und Behandlungsrichtlinien der amerikanischen und europäischen Herzgesellschaften einen festen Platz eingenommen.

Überraschenderweise trat in beiden Studien ein unvorhergesehenes Problem auf. Sowohl in der OASIS-5-Studie, als auch in der OASIS-6-Studie beobachtete man eine erhöhte Inzidenz von Herzkatheterthrombosen unter Fondaparinux.

5.5 Herzkatheterthrombosen

Bei den im klinischen Alltag verwendeten Biomaterialien spielt häufig eine unzureichende Hämokompatibilität eine entscheidende Rolle. Grundsätzlich kommt es bei jedem Kontakt von Blut mit Fremdoberflächen zu Wechselwirkungen, die im weiteren Verlauf zur Bildung von Thromben führen können. Verantwortlich hierfür sind Adsorptionsvorgänge, die unter Erniedrigung der Oberflächenspannung stattfinden. Faktoren, welche die Adsorption von Proteinen und Zellen an eine künstliche Oberfläche beeinflussen, sind unter anderem die mechanische Beschaffenheit und die Spannung der Oberfläche, Strömungsbedingungen, der pH-Wert und die Proteinzusammensetzung des Blutes. Im Zuge der Adsorption von Proteinen kommt es zu ihrer Aktivierung und die verschiedenen Kaskadensysteme (Gerinnungs-, Komplementsystem, sowie Kinin- und Fibrinolyse-system) werden in Gang gesetzt (Bambauer, 1997).

Die Aktivierung der Gerinnungskaskade und die daraus resultierende Ablagerung von thrombotischen Material an einem Herzkatheter während einer perkutanen Koronarintervention wird als Herzkatheterthrombosen bezeichnet. Sie stellt eine potentiell lebensbedrohliche Komplikation durch die mögliche Verschleppung von Blutgerinnseln in die Koronararterien mit konsekutivem Myokardinfarkt dar.

Die Gesamtinzidenz dieser schwerwiegenden Komplikation ist weitgehend unbekannt. Ursächlich hierfür sind zum einen die unzureichenden Angaben in klinischen Studien zur perkutanen Koronarintervention, zum anderen fungieren die bei der PCI verwendeten arteriellen Schleusen mit selbstabdichtenden Membranen quasi als Einwegventil. Thrombotisches Material, dass sich auf der Katheteraußenseite bildet wird vermutlich beim Herausziehen des Herzkatheters durch die Membran abgestreift (Weitz et al., 2009). Bereits im Jahre 1970 konnte in einer Studie zur Entwicklung von Herzkatheterthrombosen von Formanek und Kollegen bei 50% der untersuchten Patienten eine Thrombusbildung auf der äußeren Oberfläche des endovaskulär liegenden Katheters nachgewiesen werden. Verifiziert wurde dies durch vor der Entfernung der Herzkatheters angefertigte Arteriogramme (FRAX.I.S study group, 1999). Die Ätiologie und Patophysiologie der Herzkatheterthrombose sind noch weitgehend unbekannt. Neben Faktoren wie dem Kathetermaterial, dessen Oberflächeneigenschaften oder die Fließeigenschaften scheinen während einer PCI auch die Dauer der Intervention oder die verabreichte Thrombozytanaggregationshemmung und Antikoagulation von Bedeutung zu sein.

Unter physiologischen Bedingungen kommt Blut nur mit unbeschädigtem Gefäßendothel in Kontakt. Herzkatheter, Führungsdrähte oder andere Apparaturen die während einer PCI eingebracht werden haben als körperfremdes Material wie bereits erwähnt prothrombotische Eigenschaften. Bei Einbringen in das Herzkreislaufsystem kommt es zu Endothelschäden was ein gerinnungsaktivierendes Milieu zusätzlich begünstigt (Weitz et al., 2009).

Die Antikoagulation mit UFH ist mit einer sehr niedrigen Inzidenz von Herzkatheterthrombosen assoziiert, was mit einer Vielzahl von Studien belegt werden kann (Weitz et al., 2009). Auch unter Enoxaparin wurde nur vereinzelt von Herzkatheterthrombosen berichtet (Chen et al., 2006; Zalc et al., 2006). In vielen Studien fehlen die Angaben zu dieser Komplikation vollständig.

Bereits in der ASPIRE-Studie konnte ein erhöhtes Auftreten von Thromben in Herzkathetern während einer PCI unter Fondaparinux verglichen mit UFH beobachtet werden (1 vs. 6). Auch die Erhöhung der Dosis von 2,5 auf 5 mg änderte nichts an diesem Ergebnis (1 vs. 5) (Mehta et al., 2005).

In der OASIS-5-Studie war das Risiko für eine Herzkatheterthrombose in der Fondaparinux-Gruppe signifikant erhöht (0,4% vs. 0,9%, $p=0,001$), obwohl andere PCI-assoziierte Komplikationen seltener auftraten. Auch in der OASIS-6-Studie entwickelten mehr Patienten unter Fondaparinux Thrombosen im Führungskatheter während einer PCI verglichen mit den anderen Behandlungsgruppen (22 vs. 0, $p=0,001$). Bei Patienten, die vor der Intervention zusätzlich Heparin erhalten hatten, zeigte sich keine höhere

Ereignisrate von Herzkatheterthrombosen. Ob diese Beobachtung ausschließlich mit der Behandlung durch Fondaparinux in Beziehung steht oder mögliche Confounder eine Rolle spielen, wurde nicht näher untersucht (Yusuf et al., 2006a,b).

Die Beobachtung der höheren Herzkatheterthromboserate unter Fondaparinux Therapie in den OASIS-Studien 5 und 6 gab Anlass für die vorliegende Arbeit. In dieser Promotionsarbeit wurde ein *in-vitro*-Modell verwendet, um verschiedene Antikoagulationsstrategien zur Prävention von Herzkatheterthrombosen unter standardisierten Bedingungen zu untersuchen. Die Ergebnisse zeigten, dass Fondaparinux mit und ohne Kombination mit Eptifibatide nicht effektiv in der Prävention von Herzkatheterthrombosen war. Jedoch bei zusätzlicher Gabe einer niedrigen Dosis UFH (0,5 U pro Milliliter Blut) ergaben sich vergleichbare Ergebnisse mit den anderen, in diesem Modell geprüften Antikoagulationsstrategien (UFH und Enoxaparin mit und ohne Kombination mit Eptifibatid).

Diese Ergebnisse wurden von verschiedenen Parametern gestützt, wie der Dauer der Katheterdurchgängigkeit, der elektronenmikroskopisch nachgewiesenen Erythrozyten- und Fibrin-Adhärenz an der Katheterinnenfläche und der qualitativen Thrombusentwicklung nach einer Stunde Laufzeit. Desweiteren fanden wir in allen Fondaparinux-Gruppen eine Tendenz zu einer höheren D-Dimer-Konzentrationen postexperimentell, die statistische Auswertung ergab jedoch keinen signifikanten Unterschied für diesen Parameter (siehe Abschnitt Resultate).

Ein Ansatz zur Erklärung der erhöhten Inzidenz von Herzkatheterthrombosen in den OASIS-Studien 5 und 6 ist, dass in diesen Studien unterschiedliche Intensitäten der Antikoagulationsregime verwendet wurden (prophylaktisch in der Fondaparinux-Gruppe vs. therapeutisch in der Enoxaparin-Gruppe) (Yusuf et al., 2006a,b). Dies trifft jedoch nicht für die in dieser Dissertationsarbeit präsentierten Daten zu. Auch höhere Dosen von Fondaparinux von bis zu 2 g/ml Blut, was einer übertherapeutischen Dosis von >10mg/Tag s.c. entsprechen würde, waren in unserem Modell den anderen Behandlungsstrategien unterlegen, es kam vor Ablauf der 60-minütigen Versuchszeit zum kompletten Verschluss der verwendeten Herzkatheter. Der zu Grunde liegende Mechanismus für die höhere Inzidenz von Herzkatheterthrombosen in unserem *in-vitro*-Modell ist zum jetzigen Zeitpunkt nicht bekannt. Eine mögliche Erklärung könnte auf die ausschließliche und indirekte Hemmung der Anti-Xa-Aktivität durch Fondaparinux zurückzuführen sein (siehe Abschnitt 5.6).

5.6 Gerinnungsaktivierung an Fremdoberflächen

Das vor allem für Lehrzwecke eingesetzte traditionelle Modell der Gerinnungskaskade berücksichtigt nicht ausreichend Thrombozyten oder andere zelluläre Elemente in seinem Gesamtkonzept. HMWK, Präkallikrein oder die Autoaktivierung des Faktor XII werden nicht erwähnt. Gerade bei der Gerinnungsaktivierung an Fremdoberflächen scheinen aber alternativen Aktivierungswegen eine besondere Bedeutung zu haben.

Eine *in-vitro*-Studie von Gerotziafas et al., die Fondaparinux und Enoxaparin (beide in einer Dosierung mit gleichen Anti-Xa-Aktivitäten) in Bezug auf die Thrombinentwicklung während einer *in-vitro*-Gerinnung von Vollblut und Plättchenreichem Plasma verglich, verdeutlichte eine tiefere Inhibition von Thrombin durch Enoxaparin. Die Autoren interpretierten dies als einen Effekt der zusätzlichen Hemmung des Faktors II der Gerinnungskaskade durch Enoxaparin (Gerotziafas et al., 2004).

Für eine Thrombenbildung entscheidend ist vor allem die Adhäsion von Thrombozyten, die vermehrt an rauen Oberflächen beobachtet wird. Der Thrombozytenadhäsion folgt deren Aktivierung und im weiteren Verlauf deren Aggregation (Lee and Lee, 1998). Auch Erythrozyten können an Fremdoberflächen adhären. Dabei kann es im Kontakt mit Unebenheiten zur Hämolyse kommen. Es wird Adenosindiphosphat freigesetzt, was seinerseits wiederum die Thrombozytenaggregation begünstigt (Alkhamis et al., 1999). Angesichts des intensiven Kontakts mit körperfremdem Material (Herzkatheter) während einer PCI kann es zu einer Aktivierung und zum mechanischen Umbau von Thrombozyten und Leukozyten kommen, was zu einer Initiierung der Gerinnungskaskade führt.

In älteren Studien wurde bereits nachgewiesen, dass Fondaparinux nahezu keinen Einfluss auf die Thrombozytenfunktion hat (Messmore et al., 1989; Koshida et al., 1999). Dies ist jedoch in den hier vorgestellten Daten kein plausibler Mechanismus, da durch die vorherige Einnahme von ASS bei den Probanden und zusätzlich durch die Gabe von Eptifibatid eine ausreichende Hemmung der Thrombozytenaktivität erreicht wurde. Somit ist der fehlende Einfluss auf die Thrombozytenfunktion keine Erklärung für die ineffektive Inhibition der Thrombusbildung auf den Herzkatheteroberflächen in dem hier präsentierten Modell.

Eine entscheidende Rolle bei der selektiven Hemmung des Faktors Xa könnte Kallikrein spielen. Diese Serinprotease entsteht durch limitierte Proteolyse aus seiner Vorstufe (Präkallikrein), indem sie in einem katalytischen Prozess durch den Faktor XIIa aktiviert wird. Sowohl in der intrinsischen Gerinnungskaskade, im Kallikrein-Kinin-System als auch bei der Fibrinolyse und entzündlichen Prozessen ist Kallikrein von Bedeutung. Stief et al. konnte in einem *in-vitro*-Modell nachweisen, dass nach Kontakt

mit künstlichen Oberflächen, wie zum Beispiel einem Herzkatheter, Kallikrein in der Lage ist, die Umwandlung von Prothrombin (Faktor II) zu Thrombin (FIIa) zu katalysieren (Stief, 2008).

Mehrere Publikationen der letzten Jahre legten überzeugend dar, dass der Faktor FXII keine Rolle in der physiologischen Hämostase spielt und Patienten ohne FXII keine Blutungskomplikationen aufweisen (Rojkjaer et al., 1998; Blat and Seiffert, 2008). Unlängst veröffentlichte Untersuchungen zur Thromboseinduktion in Faktor-XII-Knockout-Mäusen zeigen, dass diese Tiere vor cerebraler Ischämie nach der Entwicklung eines obstruktiven Clots geschützt sind (Kleinschnitz et al., 2006). Insbesondere kann der Faktor XII durch aus Thrombozyten freigesetzten Polyphosphaten oder durch freie RNA aus beschädigten Zellen aktiviert werden. Dies sind beides Vorgänge die während der Ruptur einer atherosklerotischen Plaque auftreten können.

Die durch Fremdmaterial vermittelten Kontaktaktivierung des Gerinnungssystems könnte theoretisch wie folgt ablaufen (Abbildung 21).

Faktor XII bindet sich an eine Fremdoberfläche. Durch Autoaktivierung entsteht aus FXII der Faktor XIIa. In Anwesenheit von HMWK ist FXIIa nun in der Lage die Umwandlung von Präkallikrein in Kallikrein zu katalysieren. Zusätzlich kommt es zu einer Aktivierung des FXI und der C1-Esterase durch FXIIa. Die beschriebenen Vorgänge sind vermutlich *in vivo* wesentlich komplexer, zeigen aber, dass alternative Aktivierungswege zur Gerinnungsinitiierung existieren (Weitz et al., 2009).

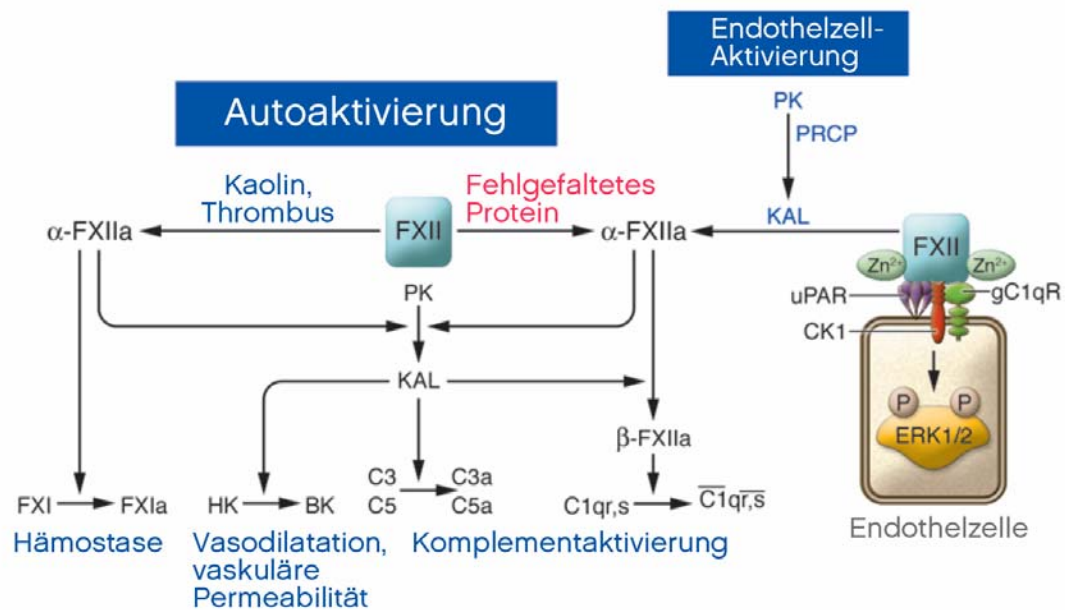


Abb. 21: Mechanismen der Faktor XII Aktivierung. Modifiziert nach (Schmaier, 2008).

Vor diesem Hintergrund scheint die Inhibition des Faktors XII eine sehr attraktive Strategie für die Prävention von Thromboseentstehung und pathologischer Gerinnungsaktivierung an Fremdoberflächen zu sein (Thrall et al., 2007; Schousboe, 2008). Weiterhin stellt dies einen alternativen Mechanismus dar, der Faktor Xa-unabhängig die Entstehung von Thrombin ermöglicht und somit den Grundstein für die Entstehung eines Thrombus auf Fremdoberflächen legen kann. Auf Grund dieser Tatsache formulieren wir die Hypothese, dass die Gabe von Fondaparinux und somit die selektive Hemmung des Faktors Xa zur Prävention einer Gerinnungsaktivierung während des Kontaktes mit körperfremdem Material (z.B. einem Herzkatheter) nicht suffizient ist.

Im August 2007 erhielt Fondaparinux in einer Dosierung von 2,5 mg pro Tag s.c. die EMEA-Zulassung (European Medicines Agency) zur Behandlung bei ACS. Die Zulassung entspricht der kürzlich publizierten Leitlinie der europäischen Gesellschaft für Kardiologie (ESC). Eine bedeutende Einschränkung ist der Einsatz von Fondaparinux bei dringlicher PCI. Hier ist es nur in Kombination mit UFH empfohlen.

5.7 Limitationen

Mit dem in dieser Dissertation verwendeten *in-vitro*-Modell wurde die Thrombusentwicklung während eines kontinuierlichen Blutkreislaufes für 60 Minuten durch einen Herzkatheter untersucht. Dieser Versuchsaufbau ist der klinischen PCI-Situation ähnlich, kann aber die *in-vivo*-Situation nur eingeschränkt imitieren. Weiterhin wurden die an den Versuchen teilnehmenden Probanden ausschließlich mit Acetylsalicylsäure in einer Dosierung von 500mg vorbehandelt und nicht, wie im klinischen Alltag der PCI üblich, mit einer Kombination aus den Thrombozytenaggregationshemmern ASS und Clopidogrel. Dies bringt die Überlegung mit sich, dass die absolute Thrombogenität der Herzkatheter durch eine zusätzliche Gabe eines weiteren Thrombozytenaggregationshemmers vermutlich abgeschwächt wäre. Das relative Risiko für die Entwicklung einer Herzkatheterthrombose unter den verschiedenen Antikoagulationsregimes sollte aber ähnliche Resultate ergeben. Um ein Beispiel zu nennen: in der Fondaparinux-Gruppe wäre immer noch die stärkste Thrombusentwicklung im Vergleich zu den anderen, gerinnungshemmenden Therapieschemata zu erwarten. Im Gegensatz zu unseren jungen, gesunden Probanden ist das Gerinnungssystem in Patienten mit akutem Koronarsystem aktiviert. Die Gerinnungskaskade ist unter *in-vitro*-Bedingungen ebenfalls aktiviert. Eine Aussage darüber, inwieweit diese beiden Gegebenheiten miteinander vergleichbar sind, kann leider nicht getroffen werden.

6. Zusammenfassung

Die vergangenen 30 Jahre, die mit der Pionierleistung von Andreas Grüntzig begannen, gleichen einer Revolution in der Kardiologie. Zum heutigen Zeitpunkt werden jährlich über zwei Millionen perkutane Koronarinterventionen weltweit durchgeführt. Die Erfolgsrate liegt bei etwa 97%, lediglich 0,5% der Patienten versterben oder benötigen eine Notfall-Bypassoperation.

Ziel der heutigen Studien im Bereich antikoagulatorischer Medikamente ist es, nicht nur die Effektivität einer neuen Substanz nachzuweisen, sondern auch die positive Beeinflussung von relevanten klinischen Gesichtspunkten wie embolisch ischämische Ereignisse oder schwere Blutungskomplikationen mit einzubeziehen. Neuere Medikamente müssen sich erst als Alternative bezüglich Effektivität und Sicherheit beweisen, um sich gegen etablierte Substanzen wie UFH oder NMH im klinischen Management der perkutanen Koronarintervention durchzusetzen.

Mit der Entwicklung des Pentasaccharids Fondaparinux ist die Palette der Antikoagulantien um ein Stück reicher geworden. Sowohl in der Prophylaxe von venösen thrombotischen Ereignissen als auch in der Behandlung des akuten Koronarsyndroms hat sich dieser indirekte selektive Anti-Xa-Inhibitor anderen Gerinnungshemmern als ebenbürtig und teilweise sogar als überlegen erwiesen.

Die Gesamtergebnisse dieser Dissertation zeigen allerdings, dass Fondaparinux sowie auch seine Kombination mit einem Eptifibatid in unserem *in-vitro*-Modell nicht effektiv in der Prävention einer Herzkatheterthrombose waren, ein Umstand, der zuvor in klinischen Studien aufgezeigt wurde. Bei zusätzlicher Applikation von unfraktioniertem Heparin ergaben sich vergleichbare Ergebnisse mit den übrigen Behandlungsstrategien. Da Herzkatheter-assoziierte Thrombosen eine ernstzunehmende Gefahr für Patienten darstellen, sollte Fondaparinux folglich während einer perkutanen Koronarintervention ausschließlich in Kombination mit unfraktioniertem Heparin eingesetzt werden.

Bisher liegen keine großen multizentrischen Studien mit anderen, neuen Anti-Xa-Inhibitoren wie Idraparinux, Rivaroxaban oder Apixaban unter der Fragestellung der Katheterthrombose vor. Es gibt dementsprechend noch viele ungeklärte Fragen über diese neue Antikoagulantengruppe, die hoffentlich in naher Zukunft geklärt werden können.

7. Literaturverzeichnis

Agnelli G, Bergqvist D, Cohen AT, Gallus AS, Gent M (PEGASUS investigators) (2005) Randomized clinical trial of postoperative fondaparinux versus perioperative dalteparin for prevention of venous thromboembolism in high-risk abdominal surgery. *Br J Surg* 92: 1212-1220

Alban S (2007) Der steinige Weg zur Innovation. *Pharm Ztg* 23: 1-10

Alkhamis TM, Beissinger RL, Chediak JR (1990) Artificial surface effect on red blood cells and platelets in laminar shear flow. *Blood* 75: 1568-1575

Antman EM, McCabe CH, Gurfinkel EP, Turpie AG, Bernink PJ, Salein D, Bayes De Luna A, Fox K, Lablanche JM, Radley D, Premmreur J, Braunwald E (1999) Enoxaparin prevents death and cardiac ischemic events in unstable angina/non-Q-wave myocardial infarction. Results of the TIMI 11B trial. *Circulation* 100: 1593-1601

Arjomand H, Turi ZG, McCormick D, Goldberg S (2003) Percutaneous coronary intervention: historical perspectives, current status, and future directions. *Am Heart J* 146: 787-796

Arzneimittelkommission der deutschen Ärzteschaft (AkdÄ): Therapieempfehlung Koronare Herzkrankheit. 1. Aufl. AVP, Köln, 2004, S. 1-32

Bambauer R: Wechselwirkungen zwischen körperfremden Oberflächen und Blut. In *Therapeutischer Plasmaaustausch und verwandte Plasmaseparationsverfahren*. 2. Aufl. Pabst Science Publisher, Lengerich, 1997, S. 330-340

Bauer AW, Mall K (1995) Historische Konzepte zur Physiologie und Pathologie der Blutgerinnung. *Hämostaseologie* 15: 92-99

Bauer KA, Eriksson BI, Lassen MR, Turpie AG (2001) Fondaparinux compared with enoxaparin for the prevention of venous thromboembolism after elective major knee surgery. *N Eng J Med* 345: 1305-1310

Bauer KA (2006) New Anticoagulants. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 450-456

Bertrand ME, Rupprecht HJ, Urban P, Gershlick AH (2000) Double-blind study of the safety of clopidogrel with and without a loading dose in combination with aspirin compared with ticlopidine in combination with aspirin after coronary stenting: the clopidogrel aspirin stent international cooperative study (CLASSICS). *Circulation* 102: 624-629

Blat Y, Seiffert D (2008) A renaissance for the contact system in blood coagulation? *Thromb Haemost* 99: 457-460

Blazing MA, de Lemos JA, White HD, Fox KA, Verheugt VW, Ardissino D, DiBattiste PM, Palmisano J, Bilheimer DW, Snapinn SM, Ramsey KE, Gardner LH, Hasselblad V, Pfeffer MA, Lewis EF, Braunwald E, Califf RM (2004) Safety and efficacy of enoxaparin versus unfractionated heparin in patients with non-ST-segment elevation acute coronary syndroms who receive tirofiban and aspirin: a randomised controlled trial. *JAMA* 292: 55-64

- Boneu B, Necciari J, Cariou R, Sie P, Ganaig AM, Kieffer G, Dickinsn J, Lamond G, Moelker H, Mant T (1995) Pharmacokinetics and tolerance of the natural pentasaccharide (SR 90107/ORG 31540) with high affinity to antithrombin III in man. *Thromb Haemost* 74: 1468-1473
- Büller HR, Davidson BL, Decousus H, Gallus A, Gent M, Piovella F, Prins MH, Raskob G, Segers AE, Cariou R, Leeuwenkamp O, Lensing AW (2003) Subcutaneous fondaparinux versus intravenous unfractionated heparin in the initial treatment of pulmonary embolism. *N Engl J Med* 349: 1695-1702
- Büller HR, Davidson BL, Decousus H, Gallus A, Gent M, Piovella F, Prins MH, Raskob G, Segers AE, Cariou R, Leeuwenkamp O, Lensing AW (2004) Fondaparinux or enoxaparin for the initial treatment of symptomatic deep venous thrombosis. *Ann Intern Med* 140: 867-873
- Chen Q, Hou K, Zhang ZX, Zhu YQ, Song TY (2006) Acute occlusion of the left subclavian artery with artery dissection. *Chin Med J* 119: 255-258
- Cohen M, Demers C, Gurfinkel EP, Turpie AG, Formell GJ, Goodman S, Langer A, Califf RM, Fox KA, Premmereur J, Bigonzi F (1997) A comparison of low-molecular-weight heparin with unfractionated heparin for unstable coronary artery disease. Efficacy and safety of subcutaneous enoxaparin in non Q-wave coronary events study group. *N Engl J Med* 337: 447-452
- Coussement PK, Bassard JP, Convens C, Vrolix M, Boland J, Grollier G, Michels R, Vahanian A, Vanderheyden M, Rupprecht HJ, van de Werf F (2001) A synthetic factor Xa-inhibitor (ORG 31540/SR 9017A) as an adjunct to fibrinolysis in acute myocardial infarction. The PENTALYSE study. *Eur Heart J* 22: 1716-1724
- Cruz-Gonzales I, Sanchez-Ledesma M, Sanchez PL, Jang IK (2007) Heparin-induced-thrombocytopenia. *Rev Esp Cardiol* 60: 1071-1082
- Donner-Banzhoff N, Held K, Laufs U, Trappe HJ, Werdan K, Zerkofski HR (2006) Nationale Versorgungsleitlinien, Chronische KHK, Version 1.2, www.khk.versorgungsleitlinien.de, Aufruf: Dezember 2008
- Eriksson BI, Bauer KA, Lassen MR, Turpie AG (2001) Fondaparinux compared with enoxaparin for the prevention of venous thromboembolism after hip-fracture surgery. *N Engl J Med* 345: 1298-1304
- Ferguson JJ, Califf M, Antmann EM, Cohen M, Grines CL, Goodman S, Kereiakes DJ, Langer A, Mahaffey KW, Nessel CC, Armstrong PW, Avezum A, Aylward P, Becker RC, Biasucci L, Borzak S, Col J, Frey MJ, Fry E, Gulba DC, Guneri S, Gurfinkel E, Harrington R, Hochman JS, Kleiman NS, Leon MB, Lopez-Sendon JL, Pepine CJ, Ruzyllo W, Steinhubl SR, Teirstein PS, Toro-Figueroa L, White H (2004) Enoxaparin versus unfractionated heparin in high-risk patients with non-ST-segment elevation acute coronary syndroms managed with an intended early invasive strategy: primary results of the SYNERGY randomized trial. *JAMA* 292: 45-54
- Fischmann DL, Leon MB, Baim DC, Schatz RA, Savage MP, Penn I, Detre K, Rake R, Goldberg S (1994) A randomized comparison of coronary stent placement and balloon angioplasty in the treatment of coronary artery disease. The Stent Restenosis Study Investigators. *N Engl J Med* 331: 495-501
- Flegler S: *Elektronenmikroskopie: Grundlagen, Methoden, Anwendungen*. 1.Aufl. Akademischer Verlag, Heidelberg, 1995, S. 77-104

Formanek G, Frech RS, Amplatz K (1970) Arterial thrombus formation during clinical percutaneous catheterization. *Circulation* 41: 833-839

FRAX.I.S Study Group (1999) Comparison of two treatment durations of a low-molecular-weight heparin with a six day treatment of unfractionated heparin in the initial management of unstable angina or non-Q-wave myocardial infarction. *Eur Heart J* 20: 1553-1562

Fritscher C (2007) Bedeutung der D-Dimer Untersuchung in der Diagnostik der tiefen Beinvenenthrombose. *Bioscientia* 7: 1-8

Gerotziafas GT, Chakroun T, Samama MM, Elalamy I (2004) In vitro comparison of the effect of fondaparinux and enoxaparin on whole blood tissue factor-triggered thromboelastography profile. *Thromb Haemost* 92: 1296-1302

Goodman SG, Menon V, Cannon CP, Steg G, Ohman EM, Harrington RA (2008) Acute ST-segment myocardial infarction: american college of chest physicians evidenced-based clinical practice. Guidelines (8th Edition) *Chest* 133: 708-775

Göhring P (2004) Das Anti-Faktor-Xa-Messprinzip zur Überwachung der Antikoagulation mit verschiedenen Arten von Heparinen und Heparinoiden. *Labor aktuell* 25: 2-4

Greinacher A, Lubenow N, Hinz P (2003) Heparininduzierte Thrombozytopenie. *Deutsches Ärzteblatt* 100: 1753-1759

GUSTO (The Global Use of Strategies to Open Occluded Coronary Arterys) IIb Investigators (1996) A comparison of recombinant hirudin with heparin for the treatment of acute coronary syndromes. *N Engl J Med* 355: 775-782

Hamm CW. Leitlinien (2004) Akutes Koronarsyndrom (ACS) Teil 1: ACS ohne persistierende ST-Hebung. *Z Kardiol* 93: 72-90

Hamm CW Leitlinien (2004) Akutes Koronarsyndrom (ACS) Teil 2: ACS mit persistierender ST-Hebung. *Z Kardiol* 93: 324-341

Holmes DR, Williams DO (2008) Catheter-based treatment of coronary artery disease: past, present and future. *Circ Cardiovasc Intervent* 1: 60-73

Kadakia RA, Ferguson JJ (2003) Optimal antithrombotic treatment for percutaneous coronary intervention. *Minerva Cardioangiol* 53: 15-42

Kemkes-Matthes B: Blutgerinnung und Thrombose. 3.Aufl. Thieme, Stuttgart, 2001, S. 22-78

Klein W, Buchwald A, Hillis SE, Monrad S, Sanz G, Turpie AG, van der Meer J, Olaisson E, Undeland S, Ludwig K (1997) Comparison of low-molecular-weight heparin with unfractionated heparin acutely and with placebo for 6 weeks in management of unstable coronary artery disease. Fragmin in unstable coronary artery disease study (FRIC). *Circulation* 96: 61-68

Kleinschnitz C, Stoll G, Bendszus M, Schuh K, Pauer HU, Burfeind P, Renné C, Gailani D, Nieswandt B, Renné T (2006) Targeting coagulation factor XII provides protection from pathological thrombosis in cerebral ischemia without interfering with hemostasis. *J Exp Med* 203: 513-518

- Koshida S, Suda Y, Sobel M, Ormsby J, Kusumoto S (1999) Synthesis of heparin partial structures and their binding activities to platelets. *Bioorg Med Chem Lett* 9: 3127–3132
- Lassen MR, Bauer KA, Eriksson BI, Turpie AG (2002) Postoperative fondaparinux versus preoperative enoxaparin for the prevention of venous thromboembolism in elective hip- replacement surgery. *Lancet* 359: 1715-1720
- Lee JH, Lee HB (1998) Platelet adhesion onto wettability gradient surfaces in the absence and presence of plasma proteins. *J Biomed Mater Res* 41: 304-311
- Libby P (2002) Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 420: 868-874
- Lincoff AM, Kleiman NS, Kottke-Marchant K, Maierson ES, Maresh K, Wolski KE, Topol EJ (2002) Bivalirudin with planned or provisional abciximab versus low-dose-heparin and abciximab during percutaneous coronary revascularisation: results of CACHET. *Am Heart J* 143: 847-853
- Lincoff AM, Bittl JA, Harrington RA, Feit F, Kleiman NS, Jackman JD, Sarembock IJ, Cohen DJ, Spriggs D, Ebrahimi R, Keren G, Carr J, Cohen EA, Betriu A, Desmet W, Kereiakes DJ, Rutsch W, Wilcox RG, de Feyter PJ, Vahanian A, Topol EJ (2003) Bivalirudin and provisional glycoprotein IIb/IIIa blockade compared with heparin and planned glycoprotein IIb/IIIa blockade during percutaneous coronary intervention: REPLACE-2 trial. *JAMA* 289: 853-863
- Lincoff AM, Bittl JA, Kleiman NS, Sarembock IJ, Jackman JD, Mehta S, Tannenbaum MA, Niederman AL, Bachinsky WB, Tift-Mann J 3rd, Parker HG, Kereiakes DJ, Harrington RA, Feit F, Maierson ES, Chew DP, Topol EJ (2004) Comparison of bivalirudin versus heparin during percutaneous coronary intervention: REPLACE-1 trial. *Am J Cardiol* 93: 1092-1096
- Lüscher TF, Steffel J (2008) Drug-Eluting-Stents: Segen oder Zeitbombe? *Schweiz Med For* 8: 11-14
- Luxembourg B, Krause M, Lindhoff-Last E (2007) Basiswissen Gerinnungslabor. *Deutsches Ärzteblatt* 104: 1489-1498
- Mahaffey KW, Lewis BE, Wildermann NM, Berkowitz SD, Oliverio RM, Turco MA, Shalev Y, Ver Lee P, Traverse JH, Rodriguez AR, Ohman EM, Harrington RA, Califf RM (2003) The Anticoagulant therapy with with bivalirudin to assist in the performance of percutaneous coronary intervention in patients with heparin induced thrombocytopenia: ATBAT. *J Invasive Cardiol* 15: 611-616
- Medina HM, Bhatt DL (2007) Evolution of anticoagulant and antiplatelet therapie: benefits and risks of contemporary pharmacologic agents and their implications for myonecrosis and bleeding in percutaneous coronary intervention. *Clin Cardiol* 30: 114-115
- Mehta SR (2003) Aspirin and Clopidogrel in patients with ACS undergoing percutaneous coronary intervention. *J Invasive Cardiol* 15: 17-21
- Mehta SR, Steg PG, Granger CB, Bassand JP, Faxon DP, Weitz JI, Afzal R, Rush B, Peters RJ, Natarajan MK (2005) Randomized, blinded trial comparing fondaparinux with unfractionated heparin in patients undergoing contemporary percutaneous coronary intervention: arixtra study in percutaneous coronary intervention: a randomized evaluation (ASPIRE) pilot trial. *Circulation* 22: 1390-1397

- Messmore HL, Griffin B, Fareed J, Coyne E, Seghatchian J (1989) In vitro studies of the interaction of heparin, low molecular weight heparin and heparinoids with platelets. *Ann NY Acad Sci* 556: 217–232
- Montalescot G, White HD, Gallo R, Cohen M, Steg G, Aylward EG, Bode C, Chiariello M, King B, Harrington RA, Desmet JW, Macaya C, Steinhubl SR (2006) Enoxaparin versus unfractionated heparin in elective percutaneous intervention. *N Engl J Med* 355: 1006-1017
- Nobuyoshi M, Kimura T, Nosaka H, Mioaka S, Ueno K, Yokoi H, Hamasaki N, Horiuchi H, Ohishi H (1988) Restenosis after successful percutaneous transluminal coronary angioplasty. *J Am Coll Cardiol* 12: 616-623
- Organisation to Assess Strategies for Ischemic Syndromes (OASIS-2) Investigators (1999) Effects of recombinant hirudin compared with heparin on death, myocardial infarction, refractory angina, revascularisation procedures in patients with acute myocardial ischaemia without ST elevation. *Lancet* 353: 429-438
- Popma JJ, Berger P, Ohman EM, Harrington RA, Grines C, Weitz JI (2004) Antithrombotic therapie during percutaneous coronary intervention. *Chest* 126: 576-599
- Prondzinski D: Aktuelle Aspekte der Physiologie, Pathophysiologie, Klinik, Diagnostik, Prophylaxe und Therapie. 1.Aufl. UNI-MED, Bremen, London, Boston, 2002
- Pröttsch B: Gerinnungskonsil. Rationelle Diagnostik und Therapie von Gerinnungsstörungen. 1.Aufl. Thieme, Stuttgart, 2002, S. 57-112
- Reimer L: Rasterelektronenmikroskopie. 2.Aufl. Springer, Berlin, 1999, S. 198-234
- Rojkjaer R, Hasan AA, Schmaier AH, Motta G, Shousboe I (1998) Factor XII does not initiate praekallikein activation on endothelial cells. *Thromb Haemost* 80: 74-81
- Rubanyi GM (1993) The role of endothelium in cardiovascular homeostasis and diseases. *J Cardiovasc Pharmacol* 22: 1-14
- Schlitt A, Schubert S, Buerke M, Müller-Werdan U, Werdan K (2007) Moderne und etablierte Konzepte in der Gerinnungshemmung bei akuten Koronarsyndroms. *AMT* 25. Jahrgang 9: 330-337
- Schmaier AH (2008) The exclusive physiologic role od factor XII. *J Clinical Invest* 9: 3006-3009
- Schmidt R, Lang G: Physiologie des Menschen. 29.Aufl. Springer, Berlin, 2004, S. 524
- Schousboe I (2008) Pharmacological regulation of facor XII activation may be a new taregt to control pathological coagulation. *Biochem Pharmacol* 75: 1007-1013
- Schühlen H, Hadamitzky M, Walter H, Ulm K, Schömig A (1997) Major benefit from antiplatelet therapy for patients at high risk for adverse cardiac events after coronary Palmaz– Schatz stent placement. ISAR trial. *Circulation* 95: 2015–2021

Serruys PW, de Jaegere P, Kiemeneji F, Macaya C, Rutsch W, Heyndrickz G, Emanuelsson H, Marco J, Legrand V, Materne P, Delcan J, Morel MA: The Benestent Study Group. (1994) A comparison of balloon-expandable-stent implantation with balloon angioplasty in patients with coronary artery disease. *N Engl J Med* 331: 489-495
Serruys PW, Hermann JP, Simon R, Rutsch W, Bode C, Laarman GJ, van Dijk R, van den Bos AA, Umans VA, Fox KA (1995) A comparison of hirudin with heparin in the prevention of restenosis after coronary angioplasty. *HELVETICA Investigators. N Engl J Med* 333: 757-763

Shorr AF, Sarnes MW, Peebles PJ, Stanford RH, Happe LE, Farrelly E (2007) Comparison of cost, effectiveness, and safety of injectable anticoagulants used for thromboprophylaxis after orthopedic surgery. *Am J Health Syst Pharm* 64: 2349-2355

Simoons ML, Bobbink IW, Boland J, Gardien M, Klootwijk P, Lensing AW, Ruzylo W, Umans VA, Vahanian A, Van De Werf F, Zeymer U (2004) A dose-finding study of fondaparinux in patients with non-ST-segment elevation acute coronary syndromes: the pentasaccharide in unstable angina (PENTUA) study. *J Am Coll Cardiol* 43: 2183-2190

Spannagl M, Calatzis A (2002) Point-of-care analysis of the hemostatic system. *J Lab Med* 26: 68-76

Spyropoulos AC, Magnuson S, Koh SK (2008) The use of fondaparinux for the treatment of venous thromboembolism in a patient with heparin induced-thrombozytopenia and thrombosis caused by heparin flushes. *Ther Clin Risk Manag* 4: 653-657

Stabile E, Nammias W, Salemme L, Sorropago G, Cioppa A, Tesorio T, Ambrosini V, Campopiano E, Popusoi G, Biondi Zoccai G, Rubino P (2008) The CIAO (coronary interventions antiplatelet-based only) study: a randomized study comparing standard anticoagulation regimen to absence of anticoagulation for elective percutaneous coronary intervention. *J Am Coll Cardiol* 52: 1293-1298

Steffel J, Franz R, Eberli FR, Tanner FC, Lüscher TF (2006) Drug-eluting Stent-Thrombosen-unterschätztes Problem oder übertriebene Angst? *Kardiovask Med* 9: 413-417

Stief TW (2008) Kallikrein activates prothrombin. *Clin Appl Thromb Hemost* 14: 97-98

Stone GW, McLaurin BT, Cox DA, Bertrand ME, Lincoff AM, Moses JW, White HD, Pocock SJ, Ware JH, Feit F, Colombo A, Aylward PE, Cequier AR, Darius H, Desmet W, Ebrahimi R, Hamon M, Rasmussen LH, Rupprecht HJ, Hoekstra J, Mehran R, Ohman EM, ACUITY investigators (2006) Bivalirudin for patients with acute coronary syndromes. *N Engl J Med* 355: 2203-2216

Thrall G, Lane D, Lip GY, Carroll D (2007) A systematic review of the effects of acute psychological stress and physical activity on haemorrhology, coagulation, fibrinolysis and platelet reactivity: Implication for the pathogenesis of acute coronary syndromes. *Thromb Res* 120: 819-847

Turpie AG, Bauer KA, Eriksson BI, Lassen MR (2002) Postoperative fondaparinux versus postoperative enoxaparin for the prevention of venous thromboembolism in elective hip-replacement surgery. *Lancet* 359: 1721-1726

Urban P, Macaya C, Rupprecht HJ, Kiemeneij F, Emanuelson H, Fontanelli A, Pieper M, Wesseling T, Sagnard L (1998) Randomized evaluation of anticoagulation versus antiplatelet therapy after coronary stent implantation in high-risk patients (MATISSE). *Circulation* 98: 2126–2132

Warkentin TE (2006) Think of HIT. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 408-414

Warkentin TE, Greinacher A, Koster A (2008) Bivalirudin. *Thromb Haemost* 99: 830-839

Weitz JI, Chan MY, Merhi Y, Harrington RA, Becker RC (2009) Catheter thrombosis and percutaneous coronary intervention: fundamental perspectives on blood, artificial surfaces and antithrombotic drugs. *J Thromb Thrombolysis* 10.1007: 1-15

Yusuf S, Mehta SR, Chrolavicius S, Afzal R, Pogue J, Granger CB, Budaj A, Peters RJ, Bassand JP, Wallentin L, Joyner C, Fox KA (2006) Comparison of fondaparinux and enoxaparin in acute coronary syndromes. Fifth organization to assess strategies in acute ischemic syndromes investigators. *N Engl J Med* 354: 1464-1476

Yusuf S, Mehta SR, Chrolavicius S, Afzal R, Pogue J, Granger CB, Budaj A, Peters RJ, Bassand JP, Wallentin L, Joyner C, Fox KA (2006) Effects of fondaparinux on mortality and reinfarction in patients with acute ST-segment elevation myocardial infarction: the OASIS-6 randomized trial. *JAMA* 295: 1519-1530

Zalc S, Lemos PA, Esteves A, Ribeiro EE, Horta P, Nicolau JC, Ramires JA, Cohen M, Martinez EE (2006) Early ambulation and variability in anticoagulation during elective coronary stenting with a single intravenous bolus of low-dose, low-molecular weight heparin enoxaparin. *J Invasive Cardiol* 18: 45-48

Zijlstra F, Hoorntje JC, de Boer MJ, Reiffers S, Miedema K, Ottervanger JP, Suryapranata H (1999) Long-term benefit of primary angioplasty as compared with thrombolytic therapy for acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 341: 1413-1419

8. Thesen

1. Im Laufe der letzten Jahre wurden neue Medikamente entwickelt, welche die Strategie der selektiven Hemmung eines spezifischen Gerinnungsfaktors verfolgen. Der Faktor Xa der Gerinnungskaskade ist ein attraktives Ziel für ein derartiges Design, da er eine zentrale Rolle in der gemeinsamen Endstrecke des intrinsischen und extrinsischen Gerinnungssystems darstellt. Fondaparinux ist ein Vertreter dieser neuen Klasse von antithrombotischen Substanzen. Es bindet spezifisch und mit hoher Affinität an Antithrombin und führt durch Induktion einer Konformationsänderung zu einer schnellen und vor allem selektiven Hemmung des Gerinnungsfaktors Xa.

2. In der Therapie des akuten Koronarsyndroms, insbesondere bei Durchführung einer Herzkatheteruntersuchung, spielt die Antikoagulation eine zentrale Rolle. Ältere Studien zu Patienten mit akutem Koronarsyndrom (ACS) bzw. zu Patienten nach einer perkutanen Koronarintervention (PCI) ließen vermuten, dass Fondaparinux ebenso effektiv wie Enoxaparin, eventuell sogar sicherer als unfraktioniertes Heparin in der Behandlung des ACS sei.

3. Die OASIS-5 und OASIS-6 Studien, zwei multizentrische Megastudien, ergaben, dass Fondaparinux im Vergleich zu Enoxaparin (OASIS-5, Einschlusskriterium ACS) oder Standardtherapie (OASIS-6, Einschlusskriterium ST-Hebungsmykardinfarkt =STEMI) erneute koronare Ereignisse ebenso effektiv verhindert. Gleichzeitig war Fondaparinux in Hinblick auf Blutungskomplikationen überlegen, was nach 30 Tagen und nach sechs Monaten zu einer Reduktion der Mortalität führte. In einer Subgruppenanalyse zeigte sich jedoch ein unvorhergesehenes Problem: Unter Fondaparinux wurde im Vergleich zur Kontrollgruppe ein signifikanter Anstieg in der Entstehung von Herzkatheterthrombosen während einer perkutanen Koronarintervention beobachtet.

4. Ziel dieser Dissertationsarbeit war es, die in klinischen Studien mangelnde Effektivität von Fondaparinux in der Prävention von Herzkatheterthrombosen unter standardisierten Bedingungen in einem *in-vitro*-Modell zu untersuchen und die Frage eines Dosiseffektes zu klären.

5. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten eine signifikant höhere Entwicklung von Herzkatheterthrombosen unter Fondaparinux. Ähnliche Ergebnisse wurden bei der Kombination von Fondaparinux mit einem GpIIb/IIIa-Inhibitor (Eptifibatid) beobachtet. Diese Resultate wurden von verschiedenen Parametern, wie der Dauer der Katheterdurchgängigkeit, der elektronenmikroskopisch nachgewiesenen Erythrozyten- und Fibrin-Adhärenz an der Katheterinnenfläche und der qualitativen Thrombusentwicklung nach einer Stunde Versuchslaufzeit, gestützt. Fondaparinux allein und auch in Kombination mit Eptifibatid waren in unserem *in-vitro*-Modell nicht effektiv zur Prävention von Herzkatheterthrombosen. Bei zusätzlicher, niedrig dosierter UFH-Gabe ergaben sich jedoch vergleichbare Ergebnisse mit den anderen, in diesem Modell geprüften Antikoagulationsstrategien (UFH und Enoxaparin mit und ohne Kombination mit Eptifibatid).

6. Auch bei Erhöhung der Fondaparinux-Konzentration bis zu 2 g/ml Blut, entsprechend einer viermal übertherapeutischen Dosierung, kam es zur Thrombosierung im Herzkatheter. Ein Dosiseffekt ist also keine Erklärung für die mangelnde Effektivität.

7. Die Aktivierung der Gerinnungskaskade und die daraus resultierende Ablagerung von thrombotischem Material an einem Herzkatheter während einer perkutanen Koronarintervention wird als Herzkatheterthrombose bezeichnet. Sie stellt eine potentiell lebensbedrohliche Komplikation durch die mögliche Verschleppung von Blutgerinnseln in die Koronararterien mit konsekutivem Myokardinfarkt dar. Die Gesamtinzidenz dieser schwerwiegenden Komplikation ist weitgehend unbekannt. Ursächlich hierfür sind zum einen die unzureichenden Angaben in klinischen Studien zur perkutanen Koronarintervention, zum anderen fungieren die bei der PCI verwendeten arteriellen Schleusen mit selbstabdichtenden Membranen quasi als Einwegventil.

8. Das vor allem für Lehrzwecke eingesetzte traditionelle Modell der Gerinnungskaskade berücksichtigt nicht ausreichend Thrombozyten oder andere zelluläre Elemente in seinem Gesamtkonzept. HMWK, Präkallikrein oder die Autoaktivierung von Faktor XII werden nicht erwähnt. Gerade bei der Gerinnungsaktivierung an Fremdoberflächen scheinen aber alternativen Aktivierungswegen eine besondere Bedeutung zu haben.

9. Ein Ansatz zur Erklärung der höheren Inzidenz von Herzkatheterthrombosen unter Fondaparinux liegt in der ausschließlichen und indirekten Hemmung des Gerinnungsfaktors Xa. Eine entscheidende Rolle hierbei scheint Kallikrein zu spielen. Stief et al. konnte in einem *in-vitro*-Modell nachweisen, dass nach Kontakt mit künstlichen Oberflächen, wie zum Beispiel einem Herzkatheter, Kallikrein in der Lage ist, die Umwandlung von Prothrombin (Faktor II) zu Thrombin (FIIa) zu katalysieren. Dies würde erklären, weshalb die alleinige Hemmung des Faktors Xa in der Prävention der Thrombusentstehung an Fremdoberflächen nicht so effektiv wie andere antikoagulatorische Strategien (UFH, NMH) ist, die mindestens zwei Faktoren inhibieren.

10. Mehrere Publikationen der letzten Jahre legten überzeugend dar, dass der Faktor XII keine Rolle in der physiologischen Hämostase spielt. Unlängst veröffentlichte Untersuchungen zur Thromboseinduktion in Faktor-XII-Knockout-Mäusen dagegen zeigen, dass diese Tiere vor cerebraler Ischämie nach der Entwicklung eines obstruktiven Clots geschützt sind. Insbesondere kann der Faktor XII durch aus Thrombozyten freigesetzten Polyphosphaten oder durch freie RNA aus beschädigten Zellen aktiviert werden. Dies sind beides Vorgänge die während der Ruptur einer atherosklerotischen Plaque auftreten können. Vor diesem Hintergrund scheint die Inhibition des Faktors XII eine sehr attraktive Strategie für die Prävention von Thromboseentstehung und pathologischer Gerinnungsaktivierung an Fremdoberflächen zu sein. Außerdem stellt sie einen weiteren alternativen Mechanismus dar, der Faktor Xa-unabhängig die Entstehung von Thrombin ermöglicht und somit den Grundstein für die Entstehung eines Thrombus auf Fremdoberflächen legen kann.

11. Die durch Fremdmaterial vermittelten Kontaktaktivierung des Gerinnungssystems könnte theoretisch wie folgt ablaufen: Faktor XII bindet sich an eine Fremdoberfläche. Durch Autoaktivierung entsteht aus FXII der Faktor XIIa. In Anwesenheit von HMWK ist FXIIa nun in der Lage, die Umwandlung von Präkallikrein in Kallikrein zu katalysieren. Zusätzlich kommt es zu einer Aktivierung des FXI und der C1-Esterase durch FXIIa. Die beschriebenen Vorgänge sind vermutlich *in vivo* wesentlich komplexer, zeigen aber, dass alternative Aktivierungswege zur Gerinnungsiniziation existieren.

12. Auf Grund dieser Tatsache formulieren wir die Hypothese, dass die Gabe von Fondaparinux und somit die selektive Hemmung des Faktors Xa zur Prävention einer Gerinnungsaktivierung während des Kontaktes mit körperfremdem Material (z.B. einem Herzkatheter) nicht suffizient ist.

9. Anhang

9.1 Lebenslauf

PERSÖNLICHE DATEN

Name: Iris Katharina Reindl
Geburtsdatum: 16.02.1983
Geburtsort: München
Nationalität: deutsch
Adresse: Burgstraße 43, 06114 Halle (Saale)
Telefon: 0345-44591369; 0176-20643141
E-Mail: iris.reindl@web.de
Familienstand: ledig

SCHULBILDUNG

1989-1993 Ignaz-Günther Grundschule, Altmannstein
1993-2002 Katharinen-Gymnasium, Ingolstadt
Abitur mit Leistungskursen Biologie und
Mathematik, Note: 2,2

HOCHSCHULBILDUNG

2003-2005 **Medizinstudium an der Georg-August-Universität, Göttingen**
März 2005: Physikum, Note: 2,66

Seit 2005 **Medizinstudium an der Martin-Luther-Universität, Halle**
Juni 2009: Staatsexamen, Note 2,5

FAMULATUREN

März 2006 Kardiologie, Universitätsklinikum Halle (Saale)
Aug. 2006 Anästhesiologie, Kreiskrankenhaus Kösching
März 2007 Dermatologie, Universitätsklinikum Halle (Saale)
Aug. 2007 Allgemeinarzt Praxis, Halle (Saale)

PRAKTISCHES JAHR

Feb. 2008 – Jun. 2008	Dermatologie und Venerologie Universitätsklinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie, Halle (Saale)
Jun. 2008 – Sep. 2008	Allgemeine Chirurgie Eric Williams Medical Sciences Complex University of West Indies, Trinidad
Okt. 2008 – Jan. 2009	Innere Medizin Universitätsklinik und Poliklinik für Innere Medizin II, Halle (Saale)

ARBEITSSTELLEN

Seit Sept. 2009	Assistenzärztin an der Universitätsklinik und Poliklinik für Innere Medizin III, Halle (Saale)
-----------------	--

VERÖFFENTLICHUNGEN

Schlitt A, Rupprecht HJ, **Reindl I**, Schubert S, Hauroeder B, Carter JM, Peetz D, Kropff SS, Maegdefessel L, Russ M, Schmidt H, Ebel H, Werdan K, Buerke M. In-vitro comparison of fondaparinux, unfractionated heparin, and enoxaparin in preventing cardiac catheter-associated thrombus. *Coron Artery Dis.* 2008;19:279-84.

Maegdefessel M, Buerke M, Schubert S, **Reindl I**, Michel T, Hauroeder B, Justin M Carter JM, Peetz D, Werdan K, Schlitt A. Comparison of bivalirudin, enoxaparin, and unfractionated heparin in preventing cardiac catheter thrombosis, results of an *in vitro* study. *Thromb Haem.* 2008;100:693-8.

QUALIFIKATIONEN

Sprachen:	Deutsch: Muttersprache
Englisch:	fließend in Wort und Schrift
Spanisch:	Grundkenntnisse

EDV-Kenntnisse: MS Word, Excel, Powerpoint, Spss

Ort, Datum

Unterschrift

9.2 Selbstständigkeitserklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Ich versichere, dass ich für die inhaltliche Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- und Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen habe. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Es ist mir bekannt, dass ich den Dokortitel nicht führen kann, bevor mir die Promotionsurkunde bzw. eine vorläufige Bescheinigung gemäß § 15 der Promotionsordnung ausgehändigt wurde.

Ort, Datum

Unterschrift

9.3 Erklärung über frühere Promotionsversuche

Ich erkläre hiermit, dass es keine früheren Promotionsversuche gegeben hat. Die vorliegende Arbeit ist der erste Promotionsversuch, der von mir unternommen wird.

Ort, Datum

Unterschrift

9.4 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich den an dieser Arbeit beteiligten Personen sehr herzlich danken. Allen voraus PD Dr. med. habil. Axel Schlitt, der mich über den gesamten Zeitraum dieser Dissertation betreute und mir jederzeit tatkräftig zur Seite stand. Desweiteren Prof. Dr. med. Karl Werdan, der mir die Möglichkeit zur Dissertation gegeben hat.

Frau Manuela Schlitt für die Unterstützung und das Versenden der Herzkatheter. Außerdem PD Dr. med. Peetz und seinem Laborteam für die Durchführung der laborchemischen Untersuchungen und Frau OÄ Dr. med. Annegret Heider und ihren Mitarbeitern für die gute Kooperation im Rahmen der Blutentnahmen.

Frau Dr. med. Hauroeder für die elektronenmikroskopische Darstellung der Herzkatheter. Frau Schulz und Herrn Schubert für die freundliche und stets heitere Atmosphäre im Labor, die das Arbeiten dort zu einer Freude machten. Herrn Christoph Shadow für die gelungenen graphischen Darstellungen.

Ein riesengroßer Dank gilt meinen Eltern und Geschwistern sowie meinem Lebensgefährten Alexander Vogt für die Motivation und niemals endende Geduld.