

**Medizinische Fakultät der
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg**

**In-vitro-Vergleich der gerinnungshemmenden Wirkung von
Danaparoid, unfraktioniertem und niedermolekularem Heparin
im Herzkatheter- und Herzklappenthrombose-Modell**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med.)

von Charlotte Horenburg, geb. Cremer

geboren am 11. August 1989 in Halle (Saale)

Betreuer: apl. Prof. Dr. med. A. Schlitt

Gutachter*innen: apl. Prof. Dr. med. A. Schlitt, Quedlinburg

Prof. Dr. med. G. Szabó

Prof. Dr. med. C. Weiß, Lüneburg

07.12.2021

31.05.2022

Referat

Danaparoid ist als Antikoagulans zur Prophylaxe und Therapie thrombembolischer Ereignisse bei Patienten mit einer Heparin-induzierten Thrombozytopenie (HIT) zugelassen. Derzeit wird jedoch für eine perkutane Koronarintervention (PCI) bei HIT-Patienten Bivalirudin zur Antikoagulation empfohlen. Für Patienten mit einem mechanischen Herzklappenersatz und einer koinzidenten HIT, welche eine chirurgische Therapie mit erhöhtem Blutungsrisiko benötigen, existieren aktuell keine evidenzbasierten Empfehlungen bezüglich einer perioperativen antithrombotischen Therapie. Danaparoid stellt für diese Patientengruppen eine mögliche Alternative dar.

Ziel der vorliegenden Arbeit war der Vergleich der Effektivität von Danaparoid bezüglich der Prävention der Thrombusgeneration mit den etablierten Substanzen unfractioniertes Heparin (UFH) und Enoxaparin. Zu diesem Zweck wurden zwei in-vitro-Modelle genutzt: ein Herzkatheterthrombose- sowie ein Herzklappenthrombose-Modell. Beide Modelle wurden für die Versuche mit Blut perfundiert, welches mit jeweils einem der drei Antikoagulanzen versetzt war. Endpunkte dieser Studie waren die Versuchslaufzeit (Zeit bis zur kompletten Katheter-/Klappenthrombose; maximal 60 min), die Menge des an der Katheterinnenfläche bzw. an der Klappenprothese adhärenen Thrombusmaterials sowie laborchemische Gerinnungsparameter. Zusätzlich erfolgte eine elektronenmikroskopische Analyse der Ablagerung von Thrombozyten, Erythrozyten und Fibrin auf der Katheterinnen- bzw. Herzklappenoberfläche. Verglichen mit UFH und Enoxaparin bildete sich unter Danaparoid im Herzkatheterthrombose-Modell deutlich mehr Thrombusmaterial. Im Herzklappenthrombose-Modell wurde hingegen unter Danaparoid ein geringeres Thrombusgewicht als mit UFH und Enoxaparin ermittelt.

Diese Ergebnisse zeigen somit eine geringere Effektivität von Danaparoid im Vergleich zu UFH und Enoxaparin bezüglich der antithrombotischen Wirkung im in-vitro-Herkatheterthrombose-Modell bei einer mindestens gleichwertigen Effektivität im Hinblick auf die Prävention einer Thrombusgeneration an mechanischen Herzklappen im Herzklappenthrombose-Modell. Vor diesem Hintergrund sollte Danaparoid im Rahmen einer PCI bei Vorliegen einer HIT nur mit Vorsicht eingesetzt werden, zumal mit Bivalirudin eine wirksame Alternative vorhanden ist. Bei guter Effektivität von Danaparoid im Herzklappenmodell erscheint es hingegen sinnvoll, die Wirksamkeit und Sicherheit dieser Substanz für die Indikation der perioperativen Antikoagulation bei Patienten mit mechanischem Herzklappenersatz zu prüfen.

Horenburg, Charlotte: In-vitro-Vergleich der gerinnungshemmenden Wirkung von Danaparoid, unfractioniertem und niedermolekularem Heparin im Herzkatheter- und Herzklappenthrombose-Modell. Halle (Saale), Univ., Med. Fak., Diss., 79 Seiten, 2021

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	
1 Einleitung	1
1.1 Koronare Herzkrankheit	1
1.2 Perkutane Koronarintervention (PCI)	3
1.3 Mechanischer Herzklappenersatz	5
1.3.1 Allgemeines	5
1.3.2 Mechanische Aortenklappenprothesen.....	6
1.3.3 Komplikationen und postoperativer Verlauf	7
1.4 Das menschliche Gerinnungssystem	10
1.4.1 Physiologie der Hämostase	10
1.4.2 Antikoagulanzen.....	15
2 Zielstellung	19
3 Material und Methodik	20
3.1 Verbrauchsmaterialien und Laborgeräte	20
3.2 Auswahl und Voruntersuchung der Probanden.....	22
3.3 Dosierung der Antikoagulanzen und Blutentnahme	23
3.4 Versuchsablauf und Präparation der Herzkatheter und der Herzklappen ...	25
3.4.1 Herzkatheterthrombose-Modell.....	25
3.4.2 Herzklappenthrombose-Modell – THIA II	29
3.5 Gerinnungsdiagnostik	34
3.5.1 Quick-Wert.....	34
3.5.2 INR (International Normalized Ratio)	34
3.5.3 Aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT)	35
3.5.4 Activated clotting time (ACT).....	35
3.5.5 Anti-Faktor-Xa-Bestimmung.....	36

3.5.6 D-Dimere	37
3.6 Statistische Auswertung	38
4 Ergebnisse.....	39
4.1 Herzkatheterthrombose-Modell	39
4.1.1 Vergleich des Thrombusgewichtes	39
4.1.2 Elektronenmikroskopische Auswertung	40
4.1.3 Laborparameter	43
4.2 Herzklappenthrombose-Modell	46
4.2.1 Vergleich des Thrombusgewichtes	46
4.2.2 Elektronenmikroskopische Auswertung	47
4.2.3 Laborparameter	50
5 Diskussion	54
5.1 Heparin-induzierte Thrombozytopenie (HIT)	54
5.2 Wesentliche Befunde der in-vitro-Untersuchungen	57
5.3 Danaparoid in der klinischen Routine.....	58
5.3.1 Kardiochirurgie.....	59
5.3.2 Schwangerschaft	60
5.3.3 Pädiatrie.....	60
5.4 Unterschiede in der Wirkungsweise der genutzten Antikoagulanzen	61
5.4.1 Unfraktioniertes Heparin	61
5.4.2 Niedermolekulare Heparine	61
5.4.3 Danaparoid	62
5.5 Unterschiede zwischen den Thrombosemodellen.....	63
5.6 Vergleich mit der Wirkung Nicht-Vitamin-K-abhängiger oraler Antikoagulanzen.....	65
5.7 Limitationen dieser Arbeit.....	69
6 Zusammenfassung	71

7 Literaturverzeichnis	72
8 Thesen	78
Anhang.....	
Danksagung.....	

Abkürzungsverzeichnis

ACS	Acute coronary syndrome; akutes Koronarsyndrom
ACT	Activated clotting time
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
APC	Aktiviertes Protein C
aPTT	Aktivierte partielle Thromboplastinzeit
aqua dest.	Destilliertes Wasser
ASS	Acetylsalicylsäure
AT	Antithrombin
ATP	Adenosintriphosphat
°C	Grad Celsius
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CCS	Canadian Cardiovascular Society
cGMP	Cyclisches Guanosinmonophosphat
CT	Computertomogramm
DES	Drug eluting stent; Stent mit Medikamentenfreisetzung
EKG	Elektrokardiogramm
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ESC	European Society of Cardiology
F	French = $\frac{1}{3}$ mm
g	Gramm
h	Stunde
GP	Glykoprotein
HDL	High density lipoprotein
HIT	Heparin-induzierte Thrombozytopenie
HMDS	Hexamethyldisilazan
IE	Internationale Einheit
INR	International normalized ratio
IQR	Interquartile range, Interquartilsabstand
ISI	International sensitivity index
ITP	Inositoltriphosphat
kDa	Kilodalton

KHK	Koronare Herzkrankheit
LDL	Low density lipoprotein
LMWH	Low molecular weight heparin; niedermolekulares Heparin
min	Minute
mg	Milligramm
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
ml	Milliliter
ms	Millisekunde
µg	Mikrogramm
µm	Mikrometer
MNPT	Mean normal prothrombin time
ng	Nanogramm
NOAK	Nicht-Vitamin-K-abhängige orale Antikoagulanzen
NSTEMI	Non-ST segment elevation myocardial infarction; Nicht-ST-Strecken-Hebungs-Myokardinfarkt
NYHA	New York Heart Association
p	Signifikanzwert
PAI-1	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor 1
PCI	Percutaneous coronary intervention; perkutane Koronarintervention
PF 4	Plättchenfaktor 4
PL	Phospholipide
s	Sekunde
SD	Standardabweichung
STEMI	ST segment elevation myocardial infarction; ST-Strecken-Hebungs-Myokardinfarkt
T0	Zeitpunkt zu Versuchsbeginn
T30	Zeitpunkt nach 30 Minuten Versuchslaufzeit
T60	Zeitpunkt nach 60 Minuten Versuchslaufzeit/Versuchsende
TAVI	Transcatheter aortic valve implantation; katheterbasierte Aortenklappenimplantation
TF	Tissue factor
THIA II	Thrombostester des Helmholtz-Instituts Aachen II
t-PA	Tissue plasminogen activator

TVT	Tiefe Venenthrombose
UFH	Unfraktioniertes Heparin
vWF	von-Willebrand-Faktor

1 Einleitung

1.1 Koronare Herzkrankheit

Die koronare Herzerkrankung (KHK) ist in den industrialisierten Ländern eine relevante Volkskrankheit. Folgeerkrankungen wie die chronisch-ischämische Herzkrankheit und der akute Myokardinfarkt stellen in Deutschland die Haupttodesursachen dar.¹ Die Lebenszeitprävalenz des akuten Myokardinfarktes ist bei 40- bis 79-jährigen Männern mit 7% deutlich höher als bei gleichaltrigen Frauen mit 2,5%.²

Für die Entwicklung einer KHK sind zahlreiche Risikofaktoren bekannt, deren Beeinflussung auf die Entstehungswahrscheinlichkeit und den Verlauf der Erkrankung einwirken kann. Zu diesen zählen unter anderem Tabakkonsum, arterielle Hypertonie, erhöhtes LDL-Cholesterin (low density lipoprotein-Cholesterin), Adipositas, körperliche Inaktivität und Diabetes mellitus.³ Um die Prognose und auch die Leistungsfähigkeit der Patienten mit einer KHK zu verbessern, sind neben der medikamentösen Therapie zur Optimierung oben genannter kardiovaskulärer Risikofaktoren auch nicht-medikamentöse präventive Maßnahmen und Therapiestrategien von zentraler Bedeutung. So wirken sich eine kalorienlimitierte, fettarme und ballaststoffreiche Ernährung, körperliche Aktivität und vor allem die Beendigung des Tabakrauchens positiv auf die Prognose von Patienten mit einer KHK aus. Letztlich können auch psychosoziale Faktoren Einfluss auf die Entstehung und den Verlauf dieser Erkrankung haben und sollten gegebenenfalls psychotherapeutisch bzw. medikamentös behandelt werden.⁴

Die KHK basiert auf einer vorliegenden Atherosklerose mit Stenosierung der Koronararterien. Pathophysiologisch entstehen Veränderungen der Gefäßwände, welche zur Verengung des Gefäßlumens der Herzkranzgefäße führen. Die koronare Reserve, welche die Fähigkeit der Koronarien zur Vasodilatation unter Belastung mit dem Ziel der Erhöhung des Blutflusses darstellt, ist aufgrund der Stenose und endothelialer Dysfunktion eingeschränkt.⁵ Eine bestehende KHK kann asymptomatisch oder symptomatisch verlaufen. Treten Beschwerden auf, so äußern sich diese meist in Form von Belastungsdyspnoe oder Angina-pectoris-Symptomatik. Diese wird nach der Canadian Cardiovascular Society (CCS) in Abhängigkeit von der Schwere der Symptomatik in verschiedene Stadien unterteilt (CCS 1-4).⁴ Aufgrund der fehlenden Symptome in den Frühstadien der Erkrankung wird die KHK zu diesem Zeitpunkt oft noch nicht diagnostiziert. Erst wenn es durch die luminale Einengung der Koronarien zu einem verminderten Blutfluss kommt, bestehen die typischen pectanginösen

Beschwerden. Ursächlich hierfür ist ein Missverhältnis des Sauerstoffbedarfs der Myokardzellen und des mit dem Blut transportierten Sauerstoffs, welcher aufgrund der hämodynamisch relevanten Stenosen nicht mehr ausreichend verfügbar ist.

Für die Diagnosestellung der chronischen KHK stehen sowohl invasive als auch nicht-invasive Methoden zur Verfügung. Das Ruhe-Elektrokardiogramm (EKG) ist, sofern kein Zustand nach Myokardinfarkt vorliegt, häufig unauffällig. Zur Ischämiediagnostik ist unter anderem die Durchführung eines Belastungs-EKGs möglich. Die aktuellen europäischen Leitlinien empfehlen zur Diagnostik einer KHK aufgrund der höheren Sensitivität jedoch die Durchführung bildgebender Verfahren.⁴ Zu diesen gehören zum Beispiel die Stress-Echokardiographie und die Myokardszintigraphie, in welchen sich regionale Wandbewegungs- bzw. Perfusionsstörungen im Ischämiegebiet nachweisen lassen. Kalzifizierungen der Koronarien können nicht-invasiv und mit hoher Auflösung auch im Computertomogramm dargestellt werden. Der Goldstandard in der KHK-Diagnostik ist die Herzkatheteruntersuchung. Anhand von Alter, Geschlecht und vorherrschender Symptomatik kann die Prätestwahrscheinlichkeit für das Vorliegen einer relevanten KHK bestimmt werden. Entsprechend der klinischen Wahrscheinlichkeit des Vorliegens relevanter Koronarstenosen erfolgt dann die weitere invasive oder nicht-invasive Diagnostik. Bei sehr hoher Prätestwahrscheinlichkeit und klinischer, trotz bestehender Medikation therapierefraktärer Symptomatik, oder wenn die nicht-invasive Ischämiediagnostik auf das Vorliegen einer KHK schließen lässt, ist eine invasive Diagnostik mittels Koronarangiographie indiziert.⁴

Das akute Koronarsyndrom (ACS) stellt die plötzlich einsetzende, klinische Manifestation der koronaren Herzkrankheit dar und umfasst Ereignisse ohne (instabile Angina pectoris und Nicht-ST-Hebungsinfarkt, NSTEMI) und mit ST-Streckenhebung (ST-Hebungsinfarkt, STEMI) im EKG.

Das Leitsymptom des Myokardinfarktes ist der akute thorakale Schmerz. Häufig strahlt dieser retrosternal betonte Schmerz in Arme, Kiefer, Nacken, Hals oder Oberbauch aus. Zusätzlich treten typischerweise vegetative Symptome wie Übelkeit, Kaltschweißigkeit und Dyspnoe auf. Jedoch sind, besonders bei sehr jungen oder sehr alten Patienten, bei Frauen und bei Diabetikern, atypische Verläufe mit vielfältiger oder auch maskierter Symptomatik möglich.⁶ Diagnostisch sollte bei akuten thorakalen Schmerzen immer sofort und bei jeder Schmerzepisode ein 12-Kanal-EKG geschrieben werden. EKG-Veränderungen bei einer instabilen Angina pectoris können auftreten, sind jedoch nicht die Regel.⁷ Um einen STEMI handelt es sich bei einer ST-Streckenhebung in mindestens zwei korrespondierenden Extremitätenableitungen, wobei die notwendige Höhe der ST-Streckenhebung von der jeweiligen Ableitung und

vom Patientenalter sowie -geschlecht abhängig ist. In einigen Fällen bestehen jedoch auch atypische EKG-Befunde, welche auf einen Myokardinfarkt hinweisen, wie ein neu aufgetretener Links- oder Rechtsschenkelblock mit infarkttypischer Symptomatik.⁸ Gegebenenfalls können für die Diagnosestellung die erweiterten links- bzw. rechtspräkordialen Ableitungen hilfreich sein.

Zur Behandlung bestehen bei der KHK sowohl konservative als auch interventionelle und chirurgische Therapieoptionen. Dabei steht die perkutane Koronarintervention (PCI) als interventionelle Methode sowohl im Rahmen der stabilen Angina pectoris als auch in der Akutsituation des ACS an erster Stelle.

1.2 Perkutane Koronarintervention (PCI)

Die perkutane kathetergestützte Darstellung der Koronargefäße mit Kontrastmittel unter Fluoroskopie (Koronarangiographie) ist eine invasive Methode zur Diagnostik einer KHK. Wird während der Herzkatheteruntersuchung eine relevante Stenose festgestellt, so kann in derselben Sitzung eine therapeutische Intervention erfolgen. Nach meist erforderlicher Vordilatation der Stenose werden in der Regel medikamentenbeschichtete Koronarstents (drug eluting stents, DES) implantiert. Die Stentimplantation senkt die Restenoserate im Vergleich zur alleinigen Ballondilatation und ist deshalb heute der Standard der Therapie.⁹ Bei stabiler KHK ist die Durchführung einer Koronarangiographie mit ggf. erforderlicher PCI unter anderem bei bestehender Niereninsuffizienz, Kontrastmittelallergie, aktiven Infektionen und schwerer Anämie relativ kontraindiziert. Für eine Notfall-PCI, insbesondere bei Vorliegen eines STEMI, existieren keine absoluten Kontraindikationen.

Während einer PCI ist zur Vermeidung thrombembolischer Ereignisse obligat eine antithrombotische medikamentöse Therapie notwendig. Zum einen kommt es zwangsläufig zu Endothelverletzungen, zum anderen sind insbesondere der intrakoronar liegende Führungsdraht sowie die implantierten Koronarstents als metallische Fremdkörper thrombogen. Als Standard wird unfraktioniertes Heparin (UFH) intravenös als Bolus in einer Dosierung von 70 bis 100 IE je Kilogramm Körpergewicht appliziert.⁹ Angestrebt wird eine activated clotting time (ACT) von 250 bis 350 s während einer PCI.¹⁰ Bei einer ACT unter 250 s steigt die Rate thrombembolischer Komplikationen, bei über 400 s die der blutungsbedingten Komplikationen.¹¹ Wird zusätzlich ein GPIIb/IIIa-Rezeptorantagonist verabreicht, ist eine Heparin-Dosierung von 50 bis 70 IE je Kilogramm Körpergewicht ausreichend.⁹ Die weitere antithrombotische Basistherapie besteht aus Acetylsalicylsäure (ASS) und einem P2Y₁₂-Inhibitor (Prasugrel, Ticagrelor oder Clopidogrel). Nicht mit ASS

vorbehandelte Patienten erhalten präinterventionell 150 bis 300 mg ASS oral oder 75 bis 250 mg ASS intravenös. Die Initialdosis von Prasugrel besteht aus 60 mg, jene von Ticagrelor aus 180 mg und die von Clopidogrel aus 600 mg oral.

Schwerwiegende Komplikationen treten während einer Koronarangiographie oder einer PCI nur selten auf. Gelegentlich kommt es während der Koronarangiographie zu bradykarden oder tachykarden Rhythmusstörungen, welche in der Regel mittels konservativer Maßnahmen wie parenteraler Volumensubstitution oder medikamentöser Therapie gut zu behandeln sind. Selten ist eine temporäre Schrittmacherstimulation bei komplettem atrioventrikulären Block notwendig,¹² bei Kammerflimmern entsprechend eine elektrische Defibrillation. Zudem ist das Auftreten von Schlaganfällen und Herzinfarkten möglich, wobei das Risiko während einer PCI höher ist als während einer Koronarangiographie ohne Intervention. Weitere mögliche Komplikationen, wie anaphylaktische Reaktionen, Kontrastmittelunverträglichkeit, Infektionen, vaskuläre Perforationen und Blutungen/Hämatombildung sind in den meisten Fällen, sofern sie überhaupt einer Therapie bedürfen, mithilfe medikamentöser oder gefäßchirurgischer Maßnahmen gut zu kontrollieren.¹²

Die Katheterthrombose ist eine schwerwiegende, wenn auch selten auftretende Komplikation während einer PCI. In der randomisierten, doppelblinden OASIS-5-Studie¹³ trat diese Komplikation mit einer Inzidenz von weniger als einem Prozent auf. Unter Verwendung verschiedener Antikoagulanzen waren relevante Unterschiede in der Häufigkeit der Katheterthrombose zu registrieren. Die Inzidenz der Katheterthrombosen unter Fondaparinux lag bei 0,9 %, unter alleiniger Enoxaparin-Therapie bei 0,4 % und bei Patienten, welche sechs Stunden nach einer Enoxaparin-Applikation zusätzlich Heparin erhielten bei 0,2 %.¹³ Im Gegensatz hierzu berichteten Dana et al. unter periprozeduraler Antikoagulation mit Enoxaparin bei 5 % der Patienten das Auftreten einer katheterassoziierten Thrombusformierung. Unter Applikation von UFH wurde hingegen keinerlei Thrombusgeneration festgestellt.¹⁴

Die Pathophysiologie der Thrombenentstehung trotz etablierter Antikoagulation ist bislang unzureichend verstanden,¹⁵ insbesondere auch hinsichtlich der verschiedenen eingesetzten Antikoagulanzen mit unterschiedlichen Wirkmechanismen. Das Auftreten katheterassoziiertes Thromben führt jedoch zur signifikanten Erhöhung ischämischer Komplikationen im Rahmen einer PCI einschließlich Myokardinfarkt, Schlaganfall und Tod,¹³ sodass eine Untersuchung zugrundeliegender Mechanismen unter Berücksichtigung der differentiellen Beeinflussung der Gerinnung durch Antikoagulanzen von klinischer Relevanz ist.

1.3 Mechanischer Herzklappenersatz

1.3.1 Allgemeines

Bei bestehenden Klappenvitien gibt es je nach Schweregrad, Symptomatik, Alter sowie Begleiterkrankungen des Patienten verschiedene Therapiemöglichkeiten. Ein operativer Klappenersatz ist indiziert bei Patienten mit symptomatischer hochgradiger Aortenklappeninsuffizienz oder -stenose, ebenso bei asymptomatischen Patienten, wenn zusätzlich eine eingeschränkte linksventrikuläre Funktion besteht oder ein weiterer kardiochirurgischer Eingriff notwendig ist. Bei bestehendem hochgradigem symptomatischem Mitralklappenvitium ist ebenfalls eine chirurgische Therapie indiziert. Hierbei sollte jedoch, wann immer möglich, eine Mitralklappenrekonstruktion dem operativen Mitralklappenersatz vorgezogen werden.¹⁶ Bestehende Trikuspidalklappenstenosen sowie -insuffizienzen sollten mittels operativem Klappenersatz therapiert werden, wenn diese hochgradig und symptomatisch sind. Bei asymptomatischen Patienten sollte bei geplantem Aorten- oder Mitralklappenersatz die Trikuspidalklappe mitbehandelt werden.¹⁶

Vor dem Hintergrund der Verfügbarkeit interventioneller Therapieoptionen - insbesondere dem transfemorale Klappenersatz in Aortenposition (TAVI) sowie der transfemorale Mitralklappentherapie mittels Mitra-Clip - ist von einer deutlichen Abnahme der Patientenzahl mit operativ implantierten Klappenprothesen auszugehen.

Wird bei einem Patienten mit höhergradigen Klappenvitien die Indikation zum operativen Klappenersatz gestellt, so kann zwischen verschiedenen Optionen des Herzklappenersatzes gewählt werden. Eine ideale Herzklappenprothese wäre nicht thrombogen, leicht zu implantieren, hätte eine lange Haltbarkeit, würde keinen transvalvulären Druckgradienten erzeugen und wäre nicht anfällig für eine Endokarditis. Da solch ein Herzklappenersatz nicht existiert, ist es wichtig, Vor- und Nachteile der verfügbaren Varianten sorgfältig abzuwägen. Hierzu zählen vor allem mechanische Herzklappenmodelle, Xenografts (Schweine- oder Rinder-Herzklappen), Allografts (menschliche Spender-Herzklappe) und Autografts (Versetzen einer Klappe von einer Position an eine andere, z.B. Operation nach Ross: Einsetzen der eigenen Pulmonalklappe in Aortenklappenposition¹⁷).¹⁸ Die beiden letztgenannten Möglichkeiten entsprechen am ehesten den physiologischen Bedingungen, sind damit am wenigsten anfällig für Thrombosen und Endokarditis und weisen sehr gute hämodynamische Eigenschaften auf. Zudem hat der pulmonale Autograft den Vorteil, dass die implantierte Klappe bei pädiatrischen Patienten mitwächst.¹⁹ Insgesamt werden Allografts und Autografts naturgemäß selten eingesetzt. Xenografts sind

dagegen deutlich besser verfügbar und haben gegenüber den mechanischen Herzklappen den Vorteil, dass sie keine lebenslange Antikoagulation erfordern. Sie unterliegen jedoch im Laufe der Zeit strukturellen degenerativen Veränderungen, sodass ihre Haltbarkeit begrenzt ist. Beim mechanischen Herzklappenersatz ist die strukturelle Schädigung mit den Jahren gering. Vor allem für jüngere Patienten, bei denen es tendenziell eher zu einer Degeneration biologischer Klappenprothesen kommt als bei älteren Patienten, ist dies ein großer Vorteil.²⁰ Nachteilig bei diesen mechanischen Prothesen ist ihre Thrombogenität aufgrund der Exposition einer Fremdoberfläche mit konsekutiver Aktivierung des Gerinnungssystems, welche eine lebenslange therapeutische orale Antikoagulation notwendig macht.

Die europäischen Leitlinien geben keine strikte Altersgrenze zur Implantation einer biologischen bzw. mechanischen Herzklappenprothese an. Vielmehr sollte bei jedem Patienten eine individuelle Entscheidung anhand des Patientenalters, der Risikofaktoren bezüglich Blutungen und Thrombembolien, der Komorbiditäten und des Patientenwunsches getroffen werden.¹⁶ So bieten sich biologische Modelle für Patienten an, welche eine lebenslange orale Antikoagulation ablehnen oder Kontraindikationen hierfür aufweisen. Hierzu zählen neben Patienten mit hohem Blutungsrisiko auch Frauen im gebärfähigen Alter mit Kinderwunsch.¹⁶ Patienten mit bereits bestehender absoluter Indikation für eine orale Antikoagulation (z.B. bei permanentem Vorhofflimmern, Hyperkoagulabilität oder einer anderen mechanischen Herzklappenprothese bereits in situ) können aufgrund der längeren Haltbarkeit eine mechanische Herzklappe erhalten.¹⁶ Auch bei Patienten mit Hyperparathyreoidismus sollte diese Form des Klappenersatzes erwogen werden, da diese Patienten ein signifikant erhöhtes Risiko für frühzeitige strukturelle Klappenschädigungen einer Bioprothese (Kalzifizierung) aufweisen.¹⁶

1.3.2 Mechanische Aortenklappenprothesen

Aortenklappenprothesen werden bereits seit den frühen 1960er Jahren implantiert. Bei den mechanischen Modellen lassen sich drei Bauweisen voneinander abgrenzen, die sich in ihren hämodynamischen Eigenschaften und den Komplikationsraten unterscheiden. Die erste mechanische Klappenprothese war die Starr-Edwards-Klappe, eine Kugelkäfigprothese.²¹ Im Verlauf erfolgte die Entwicklung von Kippscheibenprothesen und der aktuell überwiegend implantierten zweiflügeligen Klappenprothese.¹⁸ Zu letztgenannten gehören auch die in der vorliegenden Arbeit genutzten Aortenklappenprothesen (St. Jude Medical, Saint Paul, Minnesota, USA, **Abbildung 1**). Diese Doppelflügelprothesen bestehen aus pyrolytischem Karbon,

einem langlebigen und biokompatiblen Material.²² Durch ihre zwei Flügel, welche mittels Scharnieren am Klappenring befestigt sind, ermöglichen sie einen zentralen laminaren, kaum turbulenten Blutfluss.²¹



Abbildung 1: St. Jude Medical Aortenklappenprothese

1.3.3 Komplikationen und postoperativer Verlauf

Ein operativer Herzklappenersatz führt bei fast allen Patienten zur Symptomverbesserung und zum Erreichen eines guten funktionellen Status, wenngleich in der Regel keine physiologischen Bedingungen geschaffen werden können. So weisen nahezu alle Klappenprothesen funktionell einen gewissen Stenosegrad auf, sodass erhöhte transvalvuläre Druckgradienten nicht zwangsläufig einer Prothesendysfunktion entsprechen. Im Allgemeinen haben Kugelkäfigprothesen den höchsten transvalvulären Gradienten, gefolgt von Kippscheibenprothesen, gestenteten Bioprothesen, zweiflügeligen Klappenprothesen und stentlosen Bioprothesen, welche dem physiologischen Zustand am besten entsprechen und hämodynamisch kaum erhöhte Druckgradienten aufweisen. Ein gewisses Maß der Regurgitation (sog. Spüljets) ist zudem bei mechanischen Klappenprothesen normal und gewollt, da dies zur Vermeidung einer Thrombenbildung an der Klappenprothese beiträgt.¹⁸

Das Langzeit-Überleben nach prothetischem Herzklappenersatz ist stark abhängig von den bestehenden Komorbiditäten und dem funktionellen Status des Patienten. Die Mortalität des isolierten operativen Aortenklappenersatzes ist mit <4% gering.²² Sie steigt jedoch unter anderem bei höherem Patientenalter, präoperativ schlechter linksventrikulärer Funktion, begleitender KHK, schwerer präoperativer Niereninsuffizienz und aktiver Endokarditis an. Komplikationen des mechanischen Herzklappenersatzes umfassen vor allem die Endokarditis der Klappenprothese, Thrombembolien, Hämolyse und die Prothesenthrombose.

Aufgrund des Fremdmaterials besteht bei allen Klappenprothesen das Risiko der Entstehung einer Endokarditis. Diese Komplikation tritt bei ca. 1-6% der Patienten auf²² und ist entsprechend mit einer Inzidenz von 0,1-0,9% pro Jahr eine seltene Komplikation,²³ die jedoch mit einer hohen Gesamtmortalität von 25-60% einhergeht.²² Insbesondere Patienten, die den Herzklappenersatz aufgrund einer bestehenden Endokarditis erhalten, haben ein erhöhtes Risiko der Entwicklung einer Prothesenendokarditis.²² Anhand des Zeitpunkts des Auftretens der Endokarditis unterscheidet man eine frühe von einer späten Prothesenendokarditis. Die frühe Form, welche innerhalb der ersten zwei postoperativen Monate auftritt, wird häufig durch Mikroorganismen der normalen Hautflora im Rahmen einer perioperativen Kontamination verursacht und geht mit einer sehr hohen Mortalität einher.²³ Die späte Form der Prothesenendokarditis wird meist durch extrakardiale Bakteriämien ausgelöst, zum Beispiel im Rahmen iatrogenen Eingriffe wie Zahnextraktionen oder Koloskopien.²² Eine zügige Diagnosestellung und unverzügliche Therapieeinleitung sind die wichtigsten Determinanten des Outcomes bei bestehender Prothesenendokarditis. Häufig ist eine antibiotische Therapie nicht ausreichend, um eine Klappenprothesen-Endokarditis suffizient zu therapieren und ein erneuter operativer Klappenersatz wird erforderlich. Insbesondere beim Auftreten von Komplikationen wie Herzinsuffizienz, Klappendysfunktionen und Abszessen sowie beim Nachweis von *Staphylococcus aureus* als verursachenden Erreger ist meist eine dringliche Operationsindikation gegeben.²³

Eine weitere mögliche Komplikation des Herzklappenersatzes ist das Auftreten einer Hämolyse. Während Bioprothesen in der Regel bei guter Funktion keine Hämolyse verursachen, ist dies bei mechanischen Modellen prinzipbedingt kaum zu vermeiden. Die entstehende Hämolyse ist jedoch im Normalfall nur gering und bedarf keiner Therapie. Bei Auftreten einer milden hämolytischen Anämie kann eine konservative Therapie mittels Eisensubstitution und medikamentöser Betablockade zur Reduktion des Scherstresses erfolgen. Aufgrund des hohen perioperativen Risikos sollte eine Re-Operation lediglich bei einer schweren hämolytischen Anämie erwogen werden.²³

Zur Vermeidung thrombembolischer Ereignisse ist nach der Implantation einer mechanischen Herzklappe obligat eine lebenslange orale Antikoagulation notwendig. Ohne diese bestünde je nach Klappentyp (Risiko Kugelkäfig- > Kippscheiben- > Doppelflügelprothese) und -position (Risiko Mitralposition > Aortenposition) ein Thrombembolie-Risiko von 8-11 % pro Jahr.²⁴ Unter laufender Cumarintherapie wird dieses Risiko auf 1-2 % pro Jahr gesenkt,²⁵ jedoch begleitet von einem 1-2 %igem Risiko für das Auftreten eines relevanten Blutungsereignisses²³. Der Zielbereich der

antithrombotischen Therapie ist abhängig vom Risikoprofil des Patienten sowie vom verwendeten Klappentyp und der -position. Bei Patienten ohne weitere Risikofaktoren für Thrombembolien (z.B. Vorhofflimmern, hochgradig eingeschränkte systolische linksventrikuläre Funktion, Vorliegen einer Mitralklappenstenose, bereits ein thrombembolisches Ereignis in der Anamnese) ist bei mechanischen Aortenklappenprothesen eine mittlere INR (international normalized ratio) von 2,5 ausreichend. Sowohl bei mechanischem Mitralklappenersatz als auch bei Vorliegen von Risikofaktoren oder stark thrombogener Klappenprothese werden höhere INR-Werte im Bereich von 3-4 angestrebt.¹⁶ Starke INR-Schwankungen sollten dabei möglichst vermieden werden. Sollte es dennoch zu thrombembolischen Ereignissen kommen, so kann die Therapie um ASS erweitert werden. Muss die orale Antikoagulation zum Beispiel aufgrund eines medizinischen Eingriffs unterbrochen werden, sollte eine vorübergehende Antikoagulation mittels unfraktioniertem oder niedermolekularen Heparinen erfolgen.¹⁶ Die aktuell zunehmend für viele Indikationen eingesetzten Nicht-Vitamin-K-abhängigen oralen Antikoagulanzen (NOAK) sind hingegen zur Thromboseprophylaxe bei mechanischen Herzklappen nicht geeignet²⁶ und somit nicht zugelassen.

Da Bioprothesen weniger thrombogen sind als mechanische Modelle, ist bei ihnen keine lebenslange orale Antikoagulation notwendig, sofern die Patienten kein anderweitig bedingtes hohes Risiko für Thrombembolien aufweisen. Postoperativ sollte nach Implantation einer Bioprothese in Mitralklappen- oder Trikuspidalklappenposition für drei Monate eine orale Antikoagulation durchgeführt werden. Nach Implantation einer biologischen Aortenklappenprothese sollte während des gleichen Zeitraums je nach Risikofaktoren des Patienten eine Thrombozytenaggregationshemmung mit ASS oder ebenso eine orale Antikoagulation erfolgen. Nach kathetergestützter Implantation einer Aortenklappenprothese (TAVI) wird eine lebenslange ASS-Therapie empfohlen, sofern keine anderweitige Indikation zur oralen Antikoagulation besteht.¹⁶

Schildern Patienten mit einer Klappenprothese Dyspnoe-Symptomatik oder kommt es trotz etablierter Antikoagulation zu thrombembolischen Ereignissen, sollte stets das Vorliegen einer Klappenthrombose ausgeschlossen werden, da auch neuere Prothesenmodelle thrombogen sind. Klappenthrombosen treten bei Bioprothesen mit einer Inzidenz von 0,03 % auf. Bei mechanischen Aorten- oder Mitralklappenprothesen ist die Inzidenz mit 0,5 - 8% hingegen deutlich höher.²⁵ Die Therapie der Klappenthrombose ist abhängig von klinischen und echokardiographischen Variablen wie hämodynamischer Stabilität des Patienten, Thrombuslast sowie Prothesenmodell und -position im Herz.²³ So wird bei biologischen Prothesen in der Regel zunächst eine

medikamentöse Therapie mit Antikoagulanzen empfohlen. Bei mechanischen Modellen ist eine Intensivierung der oralen Antikoagulation zur Therapie einer Prothesenthrombose häufig nicht ausreichend. Bei großen Thromben (>10 mm) sowie bei obstruktiven Thrombosen wird die operative Therapie favorisiert. Wenn eine Operation nicht möglich ist, so kann eine fibrinolytische Therapie erwogen werden.¹⁶ Beide Therapieoptionen sind jedoch mit zum Teil sehr hohen Risiken verbunden: die operative Therapie geht - abhängig vom Risikoprofil des Patienten - mit einer Mortalität von 17 - 40 % einher, bei der Fibrinolyse besteht die Gefahr des Auslösens schwerer Blutungen und systemischer Embolien.²³

1.4 Das menschliche Gerinnungssystem

1.4.1 Physiologie der Hämostase

Die Blutgerinnung ist ein komplexer Prozess mit dem Ziel der raschen Beendigung einer Blutung nach Gefäßverletzung. Eine Störung im Ablauf der Hämostase führt zu einem erhöhten Risiko für Thrombosen einerseits und hämorrhagischer Diathese andererseits. Beides sind häufige Komplikationen von Operationen und Traumata, aber auch von akuten oder chronischen Erkrankungen, was die Bedeutung des hämostatischen Systems und dessen Regulation verdeutlicht. Das hämostatische System besteht aus zahlreichen Komponenten, wobei das Gefäßendothel, die Thrombozyten, die Gerinnungskaskade und die an der Fibrinolyse beteiligten Faktoren eine zentrale Rolle einnehmen.

Das einschichtige Endothel dient als Barriere zwischen den hämostatischen Blutkomponenten und reaktiven, die Hämostase aktivierenden, subendothelialen Strukturen. Es regelt neben dem Gefäßtonus auch die Permeabilität der Gefäße.²⁷ Die Endothelzellen sezernieren bei intakter Zirkulation Mediatoren, welche das Auslösen der Gerinnungsreaktion verhindern. Hierzu gehören vor allem Prostaglandin I₂ und Stickstoffmonoxid, welche die Aggregation und Degranulation der Thrombozyten über einen Anstieg des intrazellulären cAMP (cyclisches Adenosinmonophosphat) und cGMP (cyclisches Guanosinmonophosphat) hemmen. Zudem sind beide Mediatoren potente Vasodilatoren. Weiterhin sind Endothelzellen durch eine oberflächengebundene ADPase befähigt, AMP zu bilden, welches ebenfalls die Thrombozytenaggregation inhibiert.²⁸

Die scheibenförmigen Thrombozyten entstehen im Knochenmark aus Megakaryozyten. Neben der primären Hämostase kommen ihnen die Funktion des Transports von prothrombotischen Proteinen und Wachstumsfaktoren sowie zusätzliche Funktionen

bei der Gewebereparatur zu.²⁷ Die enthaltenen alpha-Granula dienen der Speicherung von Gerinnungsfaktoren (Fibrinogen, Faktor V, Faktor VIII) sowie von Plättchenfaktor 4 und Membranproteinen, vor allem dem Glykoprotein GPIIb/IIIa, welches bei der Vernetzung der Thrombozyten während der primären Hämostase eine wichtige Rolle spielt. Eine andere Sorte von Granula, die „dense bodies“, enthält Adenosintriphosphat (ATP) als Energiequelle, Adenosindiphosphat (ADP), welches aggregationssteigernd wirkt, Calcium sowie Epinephrine und Serotonin, welche die Kontraktion der glatten Gefäßmuskelzellen verstärken.²⁹ Bei ungestörten Flussbedingungen und intaktem Gefäßendothel ist der Blutfluss laminar und das Endothel verhindert den Kontakt zu subendothelialen Strukturen.²⁸ Wird diese Barriere bei einer Gefäßverletzung zerstört, werden die Thrombozyten aktiviert (Kontaktaktivierung durch Exposition gegenüber Kollagen) und bilden in der Reaktion der primären Hämostase einen weißen Thrombus, der vor allem der schnellen Blutstillung dient.

Die primäre Hämostase wird in drei Phasen unterteilt – Adhäsion, Aktivierung und Aggregation. In der Phase der Adhäsion kommt es zur Bindung der Thrombozyten an das subendotheliale Gewebe an der Stelle der Gefäßverletzung. Durch Eröffnung des Endothels wird subendothelial befindlicher von-Willebrand-Faktor (vWF) exponiert. Der vWF wird vom Gefäßendothel gebildet und in die subendotheliale Matrix sowie das Blutplasma sezerniert. Die Interaktion mit Thrombozyten wird durch ein intaktes Gefäßendothel vermieden und führt bei Gefäßverletzung zur Bindung des vWF an den GPIIb α -Rezeptor auf der Oberfläche der Thrombozyten.²⁷ Diese erste Bindung zwischen den Thrombozyten und dem subendothelialen Gewebe ist noch sehr instabil und wird durch Bindung zweier Integrine, GPIIa und GPIIbIIIa, welche sich auf der Thrombozytenoberfläche befinden und direkt das freigelegte subendotheliale Kollagen binden, verstärkt.²⁸ Durch Aktivierung dieser Glykoproteinrezeptoren kommt es zu einer Hemmung der Adenylatcyclase, was zu einer Reduktion der intrazellulären cAMP-Konzentration führt. Dies wiederum führt zur Aktivierung der Phospholipase C, welche Phosphatidylinositoldiphosphat in Inositoltriphosphat (ITP) und Diacylglycerol überführt. ITP mobilisiert Calciumionen, woraufhin Calcium-abhängige Reaktionen wie die Sekretion der Granula-Inhalte ablaufen. Es kommt zur ausgeprägten Strukturveränderung der Thrombozyten mit Ausbildung von Pseudopodien („shape changing“).³⁰ Während der Phase der Aggregation haften, unter anderem mediiert durch die Sekretion der prothrombotischen Inhalte der thrombozytären Granula, zusätzliche Thrombozyten an den bereits aktivierten Plättchen, sodass ein sich selbst verstärkender Mechanismus entsteht. Auf diese Weise bilden die aggregierenden Thrombozyten rasch einen Plättchenthrombus an der Stelle der Gefäßverletzung.²⁷

Durch die Bildung von Fibrin mithilfe der plasmatischen Gerinnung entsteht im weiteren Verlauf ein stabiles Gerinnsel.

In der klassischen Vorstellung der plasmatischen Gerinnung werden ein exogener und ein endogener Aktivierungsweg (**Abbildung 2**) unterschieden. Dieses Modell ist didaktisch und für die in-vitro-Diagnostik sehr hilfreich. In-vivo ist diese scharfe Trennung von endogenem und exogenem System der Gerinnungskaskade aufgrund von Quervernetzungen der beiden Systeme nicht möglich.²⁷ Die Gerinnungsfaktoren (**Tabelle 1**) sind Glykoproteine. Zum überwiegenden Teil stellen sie Serinproteasen dar und können nachfolgende Gerinnungsfaktoren enzymatisch aktivieren. Sie werden in der Leber synthetisiert, wobei die Synthese der Faktoren II, VII, IX und X Vitamin-K-abhängig verläuft, und zirkulieren als inaktive Vorstufen (Zymogene) im Blut.³¹ Aktivierte Gerinnungsfaktoren werden durch ein „a“ gekennzeichnet.

Tabelle 1: Gerinnungsfaktoren (Inhalt nach²⁹)

Faktor	Name	Charakteristik/Funktion
I	Fibrinogen	- Fibrin-Vorstufe
II	Prothrombin	- Thrombin-Vorstufe - Serin-Protease - Synthese Vitamin-K-abhängig
III	Gewebethromboplastin, Tissue Factor, TF	- Kofaktor von FVIIa
IV	Ca ²⁺	- Kofaktor mehrerer Gerinnungsfaktoren
V	Accelerin	- Bestandteil des Prothrombinase-Komplexes
VII	Proconvertin	- Serin-Protease - Synthese Vitamin-K-abhängig
VIII	Antihämophiler Faktor	- Kofaktor
IX	Christmas-Faktor	- Serin-Protease - Synthese Vitamin-K-abhängig
X	Stuart-Prower-Faktor	- Serin-Protease - Bestandteil des Prothrombinase-Komplexes - Synthese Vitamin-K-abhängig
XI	Rosenthal-Faktor	- Serin-Protease
XII	Hagemann-Faktor	- Serin-Protease - Initialfaktor der Kontaktaktivierung
XIII	Fibrinstabilisierender Faktor	- Vernetzung von Fibrinmonomeren

Beide Schenkel der Gerinnungskaskade führen zur Bildung von Thrombin, welches in der Lage ist, Fibrinogen zu Fibrin zu spalten. Beim extrinsischen Weg aktiviert Gewebsthromboplastin (tissue factor, TF), welches bei einer Endothelverletzung freigelegt wird, Faktor VII zu Faktor VIIa. Faktor VIIa ist in Kombination mit Calcium und Phospholipiden in der Lage, Faktor X zu aktivieren. Der Komplex aus Faktor Xa, Faktor Va, Calcium und Phospholipiden, auch Prothrombinase-Komplex genannt, überführt letztlich Faktor II (Prothrombin) in Faktor IIa (Thrombin).³¹

Thrombin fungiert als Schlüsselenzym der Gerinnungskaskade. Unter anderem spaltet es unter Bildung von Fibrinmonomeren Fibrinopeptide vom Fibrinogen ab und aktiviert Faktor XIII. Aktivierter Faktor XIII stabilisiert den entstehenden Fibrinclot durch Bildung von Quervernetzungen, sodass ein stabiles Fibringerinnsel resultiert.²⁹ Der intrinsische Aktivierungsweg wird durch die Aktivierung des Faktors XII initiiert. Diese erfolgt durch die Kontaktaufnahme von Thrombozyten mit Phospholipiden, dem geschädigten Endothel und negativ geladenen Oberflächen. Die daraufhin folgenden Aktivierungen der Faktoren XI, IX und VIII führen letztlich zur Aktivierung des Faktors X und damit zum Beginn der gemeinsamen Endstrecke von endogenem und exogenem Aktivierungsweg der Gerinnungskaskade.³¹

Um die Entstehung des Fibringerinnsels auf die Stelle der Gefäßläsion zu begrenzen, findet zeitgleich mit den Gerinnungsvorgängen auch die Fibrinolyse statt. Ähnlich der Gerinnungskaskade läuft die Fibrinolyse mit einer Reihe enzymatischer Schritte ab.²⁷ Die Schlüsselrolle dieses Prozesses nimmt Plasmin ein. Seine inaktive Vorstufe Plasminogen wird von der Leber sezerniert. Plasmin ist eine Protease, welche durch Spaltung von Fibrin zur Auflösung von Gerinnseln führt. Die Überführung von Plasminogen zu Plasmin erfolgt durch t-PA (tissue plasminogen activator). Dieser wird von Endothelzellen synthetisiert und sezerniert. Der Abbau von Fibrin durch Plasmin führt zur Entstehung der Fibrinfragmente X und Y, welche ihrerseits Thrombin und die Fibrin-Polymerisation hemmen.²⁷ Außer Thrombin stellen auch die Faktoren Va, VIIIa und XIIIa Substrate des Plasmins dar. Eine überschießende Fibrinolyse wird durch Plasmin- und t-PA-Inhibitoren verhindert. Zu diesen gehören unter anderem der Plasminogen-Aktivator-Inhibitor 1 (PAI-1) und α 2-Antiplasmin.³⁰

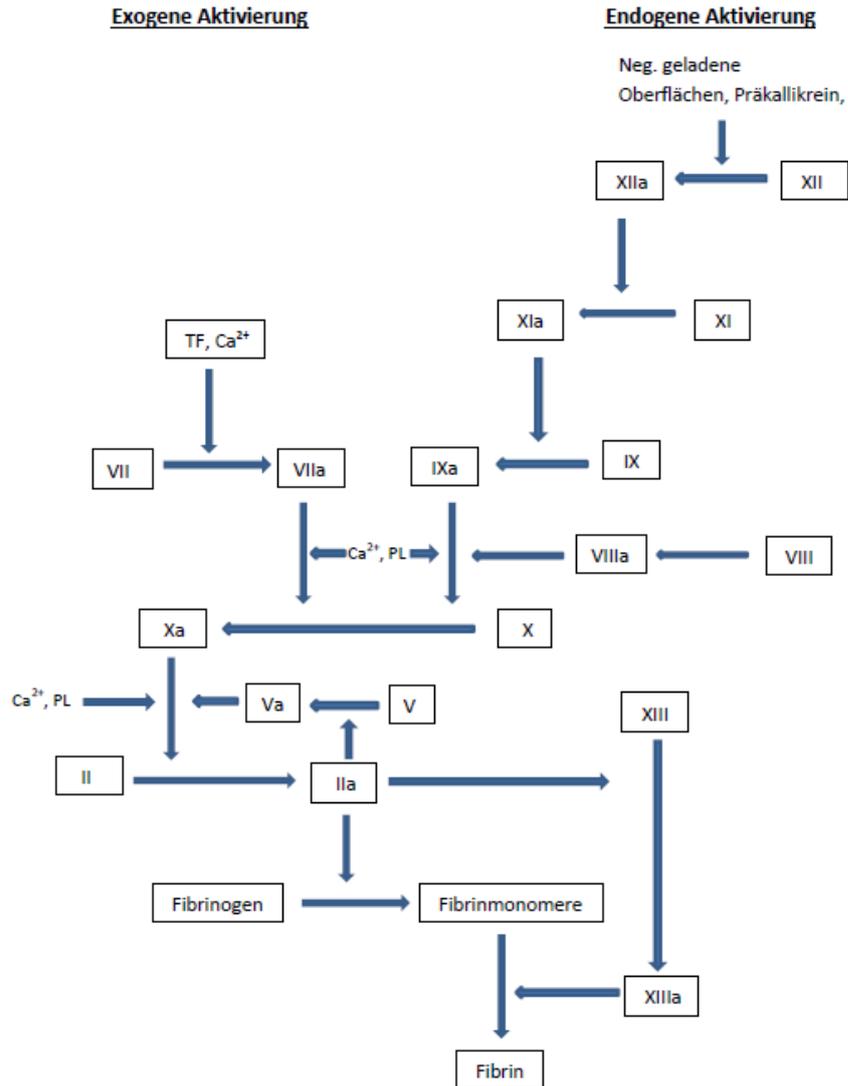


Abbildung 2: Ablauf der Gerinnungskaskade. Thrombin (Faktor IIa) nimmt eine Schlüsselrolle ein: Aktivierung der Faktoren VIII und XI (nicht dargestellt) sowie der Faktoren V und XIII und Spaltung des Fibrinogens. PL = Phospholipide. Inhalt adaptiert nach ³¹

Zur Verhinderung von Thrombosen besteht in-vivo ein Gleichgewicht zwischen pro- und antikoagulatorischen Mechanismen. Die meisten der natürlichen Antikoagulanzen sind Serpine (SERin-Protease-INhibitorEn). Unter ihnen haben Antithrombin (AT) und der Heparin-Kofaktor II die größte Bedeutung.²⁷ AT wird in der Leber gebildet und ist in der Lage, die Gerinnungsfaktoren IIa (Thrombin), IXa, Xa und XIa zu inhibieren.²⁸ Es stellt in vivo den Hauptinhibitor von Thrombin dar, seine enzymatische Aktivierung wird durch Heparin potenziert.²⁹ Heparin-Kofaktor II inhibiert in Anwesenheit von Heparin selektiv Thrombin. Ebenfalls gerinnungshemmend wirkt Protein C. Es wird hepatisch synthetisiert und durch Thrombin zum aktivierten Protein C (APC) umgewandelt. Mit Protein S als Kofaktor ist APC in der Lage, die Faktoren VIIIa und Va zu inhibieren.²⁹ Seine Aktivierung wird durch Thrombomodulin beschleunigt.²⁸

1.4.2 Antikoagulanzen

Der Einsatz von antithrombotischen Medikamenten dient der Prävention oder Therapie von Thrombembolien, woraus sich eine Vielzahl an Indikationen ergibt. Dabei ist zu unterscheiden, ob es sich um Thromben in Bereichen mit hohen (high flow) oder niedrigen (low flow) Flussraten handelt, da diese unterschiedliche Formen der Thrombogenese aufweisen. Die Virchow'sche Trias beschreibt Faktoren, welche ursächlich für eine Thrombenentstehung sind:

- Endothelschaden/-dysfunktion
- Flussverlangsamung/Stase
- Veränderte Blutzusammensetzung/Hyperkoagulabilität.³²

Im low-flow-Bereich, wozu das venöse System und auch das linke Vorhofrohr zählen, entstehen vornehmlich sogenannte rote Thromben, welche sich hauptsächlich aus Erythrozyten und Fibrin zusammensetzen. An ihrer Entstehung spielen insbesondere Strömungsverlangsamungen, venöse Stauungen und die nachfolgende Aktivierung des Gerinnungssystems eine Rolle.³³ Dementsprechend erfolgt die antithrombotische Prophylaxe und Therapie im Bereich dieses Systems mit Antikoagulanzen. Da Thrombozyten bei der Entstehung der roten Thromben kaum eine Rolle zu spielen scheinen, sind Thrombozytenaggregationshemmer in der Akuttherapie dieser nicht indiziert.³⁴

Für die Bildung weißer Thromben, welche zum Beispiel in den Koronararterien entstehen können, spielen hingegen Thrombozyten die entscheidende Rolle.³³ Deren Aktivierung wird durch die bestehenden high-flow-Bedingungen mit erhöhtem Scherstress begünstigt, sodass sie an Gefäßwanddefekten aggregieren. Da hierbei nicht die plasmatischen Gerinnungsfaktoren, sondern die Aktivierung und Aggregation der Thrombozyten im Vordergrund stehen, eignen sich Thrombozytenaggregationshemmer wie ASS oder P2Y₁₂-Inhibitoren zur Prävention und Therapie weißer Thromben.

Heparine

Heparine werden sowohl zur Therapie als auch zur Primär- und Sekundärprophylaxe thrombembolischer Ereignisse genutzt. Unfraktioniertes Heparin (UFH) ist physiologisch in Mastzellen enthalten und kann aus Schweinedarmmukosa gewonnen werden.³⁵ Seine antikoagulatorische Wirkung wird über eine Verstärkung der Antithrombin-Wirkung erreicht. Während einer Therapie mit UFH werden insbesondere die Faktoren Xa und IIa gehemmt. Für die Thrombinhemmung muss das

Heparinmolekül eine Größe von mindestens 18 Sacchariden aufweisen, da es anderenfalls nicht in der Lage ist, sowohl AT als auch Thrombin zu binden. Für die Hemmung des Faktors Xa ist die alleinige Bindung des AT ausreichend, sodass auch Heparinmoleküle mit einer Größe von unter 18 Sacchariden diesen Effekt aufweisen.³⁵ Da Heparine kaum enteral resorbiert werden, ist eine parenterale Applikation notwendig. UFH kann sowohl intravenös als auch subkutan verabreicht werden, jedoch ist die Bioverfügbarkeit nach subkutaner Applikation variabel und recht gering, weshalb die intravenöse Applikation bevorzugt wird.³⁶ Die Halbwertszeit des UFH ist interindividuell verschieden und zudem dosisabhängig, was ein engmaschiges laborchemisches Monitoring notwendig macht. Angestrebt wird meist eine zwei- bis dreifache Verlängerung der aktivierten partiellen Thromboplastinzeit (aPTT).

Unfraktioniertes Heparin ist weder plazenta- noch muttermilchgängig, weshalb es zur Antikoagulation auch während Schwangerschaft und Stillzeit zugelassen ist.³⁷ Kontraindiziert sind Heparine bei akuten Blutungen und Erkrankungen mit erhöhter Blutungsgefahr wie zum Beispiel aktiven Magen- oder Darmulzera. Blutungen sind die häufigste unerwünschte Wirkung der Heparintherapie, wobei mit steigender Dosis auch das Blutungsrisiko zunimmt. Im Falle einer bedrohlichen Blutung ist es möglich, die Heparinmoleküle mittels Protamin zu antagonisieren.³⁶ Aufgrund der Gefahr der Ausbildung von Heparin-Plättchenfaktor-4-Antikörpern und damit der Entstehung einer potentiell lebensgefährlichen Heparin-induzierten Thrombozytopenie (HIT) sollte vor und während einer Therapie mit UFH regelmäßig die Anzahl der Thrombozyten bestimmt werden, um diese Komplikation möglichst rasch zu erkennen. Zudem sind das Auftreten nekrotisierender Hautläsionen und bei Langzeit-Anwendung auch die Entstehung einer Osteoporose aufgrund einer Osteoklasten-Aktivierung möglich.³⁷

Niedermolekulare Heparine (low molecular weight heparin, LMWH) können durch enzymatische Spaltung ausunfraktioniertem Heparin gewonnen werden.³⁵ Aufgrund ihrer kurzen Glykosaminoglykansequenz wirken sie hauptsächlich über eine Faktor-Xa-Inhibition. Ihr großer Vorteil gegenüber dem unfraktionierten Heparin besteht in der höheren Bioverfügbarkeit (>90%) nach subkutaner Applikation und der längeren Halbwertszeit, was eine ein- bis zweimalige Anwendung pro Tag ausreichend macht.³⁶ Da auch die interindividuellen Schwankungen der Plasmakonzentrationen geringer ausgeprägt sind als bei UFH und ihre Wirkung damit besser vorhersagbar ist, ist ein Monitoring bei den meisten Patienten nicht notwendig. Eine Therapieüberwachung sollte jedoch bei schwangeren Patientinnen, bei Patienten mit Leber- oder Niereninsuffizienz sowie bei einem Körpergewicht unter 50 kg (Kinder/Untergewicht) oder über 100 kg durchgeführt werden.³⁶ Das Monitoring erfolgt durch Bestimmung der

anti-Xa-Aktivität im Blut. Dabei sollte darauf geachtet werden, dass diese Kontrolle zwei bis vier Stunden nach der subkutanen Applikation erfolgt, da in diesem Zeitraum der maximale Plasmaspiegel erreicht wird. Die unerwünschten Wirkungen der LMWH gleichen prinzipiell denen des UFH, jedoch treten insbesondere die HIT und die Osteoporose deutlich seltener auf als unter einer UFH-Therapie ³⁶.

Danaparoid

Danaparoid ist ein Heparinoid, welches sich aus Heparan-, Dermatan- und Chondroitinsulfat zusammensetzt. Die antikoagulatorische Wirkung erfolgt über eine Inhibierung des Faktors Xa und in weitaus geringerem Maße auch des Faktors IIa (Verhältnis ca. 30:1). Die Wirkung wird dabei nicht direkt, sondern in Abhängigkeit von Antithrombin und Heparin-Kofaktor II vermittelt.³⁸ Neben der intravenösen Applikation bietet sich bei Danaparoid die subkutane Gabe bei sehr guter Bioverfügbarkeit an. Aufgrund der Ausscheidung über die Nieren sollte auf die Nierenfunktion der Patienten geachtet werden, um eine Akkumulation des Antikoagulans zu vermeiden. Bei ausgeprägter Niereninsuffizienz mit einer glomerulären Filtrationsrate <30 ml/min sollten bei Anwendung von Danaparoid ein engmaschiges Monitoring mit Bestimmung des anti-Faktor-Xa-Spiegels sowie regelmäßigen Kontrollen der Thrombozytenzahl durchgeführt werden. Bei schwerer hämorrhagischer Diathese, bekannter Überempfindlichkeit oder aktiven Blutungen sollte Danaparoid nicht angewandt werden, insbesondere im Hinblick auf ein fehlendes direktes Antidot.³⁹

Danaparoid unterscheidet sich von Heparin in seiner Glykosaminoglykan-Struktur. Daher findet es bei zu erwartender geringer Interaktion mit HIT-II-Antikörpern insbesondere bei Patienten mit aktueller oder anamnestischer HIT Anwendung. Es ist zudem das einzige Antikoagulans, das bei Bestehen einer HIT die Plättchenaktivierung durch die zirkulierenden HIT-Antikörper inhibiert, indem es die Heparin-Plättchenfaktor-4-Komplexe zerstört.⁴⁰ Eine Kreuzreaktivität von Danaparoid mit den HIT-Antikörpern ist prinzipiell möglich. Die Angaben zur Häufigkeit der in-vitro-Kreuzreaktivität variieren stark (zwischen 5 und 50%).^{41,42} Sie tritt jedoch weniger häufig auf als unter Therapie mit niedermolekularen Heparinen, unter welchen sich die HIT-Antikörper zwar seltener entwickeln als unter UFH, eine Kreuzreaktivität mit bereits bestehenden Antikörpern jedoch die Regel ist.⁴³ Dies lässt sich durch die fehlenden Heparin-Fragmente und somit einer geringeren Affinität für Plättchenfaktor 4 erklären.⁴⁴ Die in-vitro-Kreuzreaktivität korreliert jedoch nicht immer mit der in-vivo-Kreuzreaktivität, welche deutlich seltener beobachtet wird.³⁹ Eine laborchemische Überprüfung der Kreuzreaktivität ist vor dem Therapiebeginn mit Danaparoid nicht notwendig. Jedoch

sollte während der Therapie ein Monitoring bezüglich der Thrombozytenzahl und des Auftretens von Thrombosen erfolgen.⁴¹

Cumarinderivate

Zu den Cumarinderivaten gehören unter anderem Warfarin und das im deutschsprachigen Raum bevorzugt eingesetzte Phenprocoumon. Diese Substanzen hemmen die Gerinnung durch Inhibition der Vitamin-K-Epoxid-Reduktase, was zur Synthese unvollständiger Vorstufen der Vitamin-K-abhängigen Gerinnungsfaktoren (F.II, VII, IX, X) führt. Da die zum Zeitpunkt des Therapiebeginns bereits gebildeten Gerinnungsfaktoren funktionsfähig sind, wird der volle antikoagulatorische Effekt erst nach einigen Tagen erreicht.⁴⁵ Ebenfalls Vitamin-K-abhängig synthetisiert werden auch die antikoagulatorisch wirkenden Proteine C und S, deren Bildung durch Cumarinderivate gleichermaßen gestört wird. So besteht initial eine prokoagulatorische Tendenz,⁴⁶ weshalb während dieses Zeitraums bis zur vollen Wirkung der Cumarintherapie zusätzlich Heparine verabreicht werden sollten.

Indiziert sind Cumarinderivate vor allem zur Prävention von Thrombembolien bei Patienten mit Vorhofflimmern oder mechanischem Herzklappenersatz. Die Cumarinderivate werden enteral gut resorbiert, weshalb sie peroral verabreicht werden. Ein starres Therapieschema ist bei der Anwendung dieser Antikoagulanzen nicht möglich. Insbesondere aufgrund mannigfaltiger Interaktionen mit anderen Medikamenten sowie zahlreichen Nahrungsmitteln sind während der Therapie regelmäßige Kontrollen des Quick-Wertes bzw. der INR und gegebenenfalls entsprechende Dosisanpassungen notwendig, um Über- und auch Unterdosierungen und ein damit assoziiertes Blutungs- und Thrombembolierisiko zu vermindern.⁴⁵ Die angestrebte INR ist abhängig von der Indikation für die Antikoagulation.

Die häufigste unerwünschte Wirkung der Cumarintherapie sind Blutungen. Die Wirkung der Cumarinderivate kann durch die Gabe von Vitamin K antagonisiert werden. Die Wirkung setzt jedoch aufgrund der notwendigen Neusynthese der Vitamin-K-abhängigen Gerinnungsfaktoren verzögert ein. Aus diesem Grund kann es bei schweren Blutungskomplikationen notwendig sein, die entsprechenden Gerinnungsfaktoren in Form von Gerinnungskomplekonzentraten zu substituieren.⁴⁶ Während der Schwangerschaft sollte eine Gabe von Cumarinderivaten nur unter sorgfältiger Nutzen-Risiko-Abwägung erfolgen, da diese aufgrund der Placentagängigkeit zu Komplikationen wie z.B. fetalen Blutungen führen kann.⁴⁷

2 Zielstellung

Unfraktioniertes Heparin wird zur Prophylaxe und Therapie thrombembolischer Ereignisse häufig angewandt. So gehört es während einer perkutanen Koronarintervention zur Standardmedikation. Bei Patienten mit mechanischem Herzklappenersatz, welche eine lebenslange orale Antikoagulation benötigen, wird es zur perioperativen Antikoagulation bei notwendigen chirurgischen Eingriffen mit hohem Blutungsrisiko empfohlen. Die am meisten gefürchtete Komplikation während einer Therapie mit UFH, die Heparin-induzierte Thrombozytopenie, erfordert eine alternative Antikoagulation. Für die Antikoagulation im Rahmen einer PCI waren in den europäischen Leitlinien aus 2014⁴⁸ Bivalirudin, alternativ Argatroban und Danaparoid empfohlen. Für Patienten mit mechanischem Herzklappenersatz und koinzidenter Heparin-induzierter Thrombozytopenie existieren aktuell keinerlei Empfehlungen bezüglich der perioperativen oder periinterventionellen parenteralen Antikoagulation.

Da mit Danaparoid eine explizit für den Einsatz als Antikoagulans bei Vorliegen einer HIT empfohlene Substanz zur Verfügung steht, sollte diese hinsichtlich ihrer antithrombotischen Effektivität bezüglich der Prävention einer Thrombusgeneration in Herzkathetern sowie an mechanischen Herzklappen im Vergleich zu den etablierten Antikoagulanzen UFH und Enoxaparin untersucht werden. Hierfür wurden zwei in-vitro-Systeme, ein Herzkatheterthrombose- sowie ein Herzklappenthrombosemodell, genutzt.

Die prädefinierten Endpunkte dieser Studie waren die Versuchslaufzeit bis zur kompletten Katheter-/Klappenthrombose (maximal 60 min), die Menge des an der Katheterinnenfläche bzw. an der Klappenprothese adhärenen Thrombusmaterials sowie laborchemische Gerinnungsparameter. Zusätzlich erfolgte eine elektronenmikroskopische Analyse der Ablagerung von Thrombozyten, Erythrozyten und Fibrin auf der Katheterinnen- bzw. Herzklappenoberfläche.

3 Material und Methodik

3.1 Verbrauchsmaterialien und Laborgeräte

Verbrauchsmaterialien allgemein	
1. Discofix® Dreiwegehahn (Braun®)	2. HR-ACT-Kartuschen (Medtronic®)
3. S-Monovette 2,7 ml EDTA (Sarstedt®)	4. S-Monovette 2,7 ml Natriumcitrat (Sarstedt®)
5. Combi-Stopper-Verschlusskone (Braun®)	6. Sterican® Injektionskanüle 18G steril (Braun®)
7. Schlinggazetupfer, steril, Gr. 6 (Fuhrmann®)	8. Hautdesinfektionsmittel Softasept N (Braun®)
9. epT.I.P.S.® Pipettenspitzen 2-200 µl (Eppendorf®)	10. epT.I.P.S.® Pipettenspitzen 50-1000 µl (Eppendorf®)
Spezifische Verbrauchsmaterialien des Modells für Herzkatheterthrombose	
11. Herzkatheter 6F multipurpose, steril (Cordis®)	12. Safety-Multifly®-Set 0,8x20 mm (Sarstedt®)
13. Original-Perfusor®-Spritze 50 ml (Braun®)	14. Multi-Adapter für S-Monovette (Sarstedt®)
15. Rollerpumpenschlauch, Tygon R3603, steril (Masterflex®)	16. Multireaktionsgefäß mit Schraubdeckel, 50 ml, steril (Rotilabo®)
Spezifische Verbrauchsmaterialien des Modells für Herzklappenthrombose	
17. Sangofix® Transfusionsset für Blutbeutel, steril (Braun®)	18. Blutbeutel inklusive high-volume-Zugang, 500 ml, steril (Maco Pharma®)
19. Spritze ohne Kanüle, 2 ml, steril (Terumo®)	

Laborgeräte allgemein	
1. Zentrifuge Rotina 48 RC (Hettich®)	2. Abzug HBB 2472 (Laminair®)
3. Analysenwaage SBA 41 (Scaltec®)	4. ACT-Messgerät ACT plus (Medtronic®)
5. Pipette Eppendorf Reference® 2-200 µl (Eppendorf®)	6. Pipette Eppendorf Reference® 50-1000 µl (Eppendorf®)
7. Akkubetriebene Pipettierhilfe Rota-Filler 3000® (Heathrow Scientific®)	
Spezifische Laborgeräte für das Modell der Herzkatheterthrombose	
8. Rollerpumpe (Masterflex®)	9. Metallwasserbad HAAKE B3 mit Einhänge- und Umweltthermostat HAAKE Fisons C1 (HAAKE Technik®)
Spezifische Laborgeräte für das Modell der Herzklappenthrombose	
10. Thrombostester THIA II (Helmholtz – Institut für Biomedizinische Technologien Aachen)	11. Becherglas 50 ml, niedrige Form (Roth®)

Chemikalien	
1. Aqua dest., steril (Milliporer®)	2. 0,9%-ige Natrium-Chlorid-Lösung (Braun®)
3. Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄), 98%-ig, steril (Roth®)	4. Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄), 98%-ig, steril (Merck®)
5. Glutardialdehyd (C ₅ H ₈ O ₂), 25%-ig, steril (Merck®)	6. Aceton (C ₃ H ₆ O), 99,5%-ig, steril (Sigma-Aldrich®)
7. Hexamethyldisialzane (C ₆ H ₁₉ NSi ₂), 99%-ig, steril (Sigma-Aldrich®)	
Medikamente	
1. Unfraktioniertes Heparin (Heparin-Natrium Rotexmedica®)	2. Enoxaparin (Clexane® multidose, Sanofi Aventis®)
3. Danaparoid (Orgaran®, MSD®)	4. Acetylsalicylsäure (Aspirin®, Bayer®)

3.2 Auswahl und Voruntersuchung der Probanden

Für die vorliegende Studie wurden zehn kardiovaskulär gesunde, männliche Probanden ausgewählt. Zu Studienbeginn lag ihr Alter zwischen 20 und 30 Jahren mit einem Mittelwert von 24 Jahren.

Einschlusskriterien

- Alter zwischen 18 und 45 Jahren
- männliches Geschlecht
- schriftliches Einverständnis zur Studienteilnahme

Ausschlusskriterien:

- weibliches Geschlecht (potentieller Einflüsse der Hormonschwankungen während des Menstruationszyklus auf die Gerinnungsfunktion)
- Einnahme von gerinnungshemmender/-beeinflussender Medikation
- bekannter Alkohol-/Drogenabusus
- Kontraindikationen für die Einnahme von Acetylsalicylsäure

Bei jedem Probanden wurde eine Anamnese bezüglich Medikamenteneinnahme und des Vorliegens chronischer Erkrankungen erhoben sowie eine klinische Voruntersuchung durchgeführt. Die laborchemische Diagnostik beinhaltete eine Gerinnungsanalyse und die Anfertigung eines Blutbildes zum Ausschluss von Gerinnungsstörungen sowie einer Anämie und Thrombozytopenie. Zudem wurden die Probanden vor jeder Blutentnahme explizit nach der Einnahme gerinnungshemmender Substanzen befragt. Da für die Versuche im Herzkatheterthrombose-Modell zwei Stunden vor der Blutentnahme die orale Einnahme von 500 mg ASS notwendig war, wurde bei der Anamneseerhebung speziell nach Kontraindikationen für die ASS-Verabreichung (Allergie/Unverträglichkeit, gastrointestinale Ulcera) gefragt. Die Probanden wurden sowohl über die Inhalte und Zielstellungen der Studie als auch über den Ablauf der Blutentnahmen sowie über die Notwendigkeit der Einnahme von Acetylsalicylsäure aufgeklärt. Zusätzlich erhielten alle Probanden eine schriftliche Aufklärung über die potentiellen Risiken einer ASS-Einnahme sowie der Blutentnahme (lokale Komplikationen, Kreislaufdysregulation), die Kontaktdaten des zuständigen Prüfarztes und die Fachinformation von Acetylsalicylsäure 500 mg (Aspirin®, Bayer). Die Risiken für die Probanden waren während dieser Studie gering.

Für alle Probanden bestand zu jedem Zeitpunkt der Studie die Möglichkeit, ihre Teilnahme zu beenden. Kein Proband musste aufgrund der Screening-Untersuchung von der Teilnahme an der Studie ausgeschlossen werden. Keiner der Probanden beendete seine Studienteilnahme vorzeitig.

Die Durchführung der Studie erfolgte entsprechend eines positiven Votums der Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (Sitzungsnummer 174/23.08.06/2). Die Datenerhebung erfolgte zwischen Juli 2012 und Oktober 2013 im kardiovaskulären Forschungslabor der Klinik für Innere Medizin III des Universitätsklinikums Halle (Saale).

3.3 Dosierung der Antikoagulanzen und Blutentnahme

Um therapeutische Plasmaspiegel zu erreichen, wurde entsprechend der Erfahrungen aus Vorpublikationen unserer Arbeitsgruppe für Enoxaparin eine Konzentration von 0,6 IE/ml gewählt, um therapeutische anti-Xa-Aktivitäten zwischen 0,5 und 1,1 IE/ml im Vollblutpräparat zu erreichen. Für UFH wurde eine Konzentration von 0,9 IE/ml eingesetzt.⁴⁹⁻⁵³ Im Herzkatheterthrombose-Modell wurde entsprechend der für die PCI empfohlenen ACT-Zielbereiche eine ACT von 250 bis 350 s angestrebt.¹⁰ Für das Herzklappenthrombose-Modell lag der ACT-Zielwert ≥ 300 s.

Weder im Herzklappenthrombose-Modell noch im Herzkatheterthrombose-Modell wurden jedoch bisher Versuchsdurchläufe mit Danaparoid durchgeführt. Aus diesem Grund wurden vor Beginn der Experimente mit diesem Antikoagulanzen verschiedene Dosierungen getestet, um das gewünschte therapeutische Antikoagulationsniveau für Danaparoid (Zielwert: 0,5 – 0,8 anti-Faktor-Xa-Einheiten/ml) zu finden. Hierfür wurden drei Dosierungen (0,6 E/ml; 0,8 E/ml; 1,0 E/ml) in jeweils zehn 3-ml-Citrat-Monovetten gegeben, welche anschließend mit Probandenblut befüllt wurden. Im Anschluss wurde die anti-Faktor-Xa-Aktivität laborchemisch bestimmt. Bei der Dosierung von 0,8 anti-Faktor-Xa-Einheiten je ml Blut wurde der Bereich des therapeutischen Antikoagulationsniveaus von 0,5 bis 0,8 anti-Faktor-Xa-Einheiten/ml am sichersten erreicht. Diese Dosierung wurde konsekutiv für die Versuchsdurchläufe im Herzkatheterthrombose-Modell sowie im Herzklappenthrombose-Modell gewählt.

Die angegebenen Konzentrationen der Antikoagulanzen wurden sowohl für die Versuche im Herzkatheterthrombose-Modell als auch für die Versuche im Herzklappenthrombose-Modell verwendet.

Eine Übersicht über die Konzentrationen der eingesetzten Antikoagulanzen zeigt **Tabelle 2**.

Tabelle 2: Konzentrationen der zu testenden Antikoagulanzen

Antikoagulans	Konzentration
Unfraktioniertes Heparin	0,9 IE/ml
Enoxaparin	0,6 IE/ml
Danaparoid	0,8 E/ml

Jeder Proband spendete jeweils einmal Blut für jede Testreihe sowohl für Experimente des Herzkatheter- als auch des Herzklappenthrombose-Modells. Dabei lagen die insgesamt sechs Blutentnahmen desselben Probanden zeitlich jeweils mindestens zwei Wochen auseinander.

Die Blutentnahmen erfolgten unter sterilen Bedingungen. Es traten keine Komplikationen auf.

Für die Versuche im Herzkatheterthrombose-Modell wurde das Spenderblut (jeweils 49 ml) durch antekubitale Venenpunktion direkt in eine bereits mit dem entsprechenden Antikoagulans (1 ml Medikamentenlösung) befüllte Perfusorspritze entnommen und mit diesem durch vorsichtiges Schwenken vermischt.

Da für die Versuche im Herzklappenthrombose-Modell die Entnahme einer Blutmenge von 250 ml notwendig war, wurde diese in Kooperation mit der Einrichtung für Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Halle (Saale) durchgeführt. Hierbei erfolgte die Blutentnahme in einen ebenfalls bereits mit Medikamentenlösung (50 ml) versetzten Blutbeutel. Durch Nutzung eines Transfusionsgerätes mit konstanter Bewegung des Blutbeutels erfolgte eine sofortige Durchmischung des Spenderblutes mit dem Antikoagulans. Die Probanden wurden zuvor belehrt, dass sie nach der Blutentnahme noch zwei Stunden unter Aufsicht in dieser Einrichtung verbleiben sollen, um mögliche Komplikationen rasch erkennen und behandeln zu können.

Bei jeder Blutentnahme wurden zusätzlich zu der für den jeweiligen Versuchsdurchlauf notwendigen Blutmenge jeweils 5,4 ml Blut für die Anfertigung eines kleinen Blutbildes und zur Überprüfung des Gerinnungsstatus entnommen, um die Gerinnungsfunktion und die Thrombozytenzahl im Probandenblut prüfen zu können. Auf diese Weise

wurde vor jedem Versuch sichergestellt, dass bei dem verwendeten Blut von einer intakten Gerinnungsfunktion ausgegangen werden kann.

3.4 Versuchsablauf und Präparation der Herzkatheter und der Herzklappen

3.4.1 Herzkatheterthrombose-Modell

Die Evaluation der gerinnungshemmenden Wirkung der drei zu testenden Antikoagulanzen im Rahmen der Prävention einer katheterassoziierten Thrombose erfolgte unter Verwendung eines etablierten Modells der in-vitro-Herkatheterthrombose.^{49-51,53,54}

Für die Versuche im Herzkatheterthrombose-Modell wurde das Gemisch aus Probandenblut und dem jeweiligem Antikoagulans aus der Perfusorspritze direkt in ein 50 ml-Zentrifugenröhrchen überführt. Dieses befand sich zur Imitierung physiologischer Bedingungen in einem 37 °C warmen Wasserbad. Aus diesem Gemisch wurde wiederum noch vor Beginn der Blutzirkulation durch den Herzkatheter eine Blutprobe zur Bestimmung der Gerinnungsparameter entnommen (Zeitpunkt T0). Mithilfe einer Rollerpumpe wurde anschließend der 6F-Herkatheter (6 French multipurpose Führungskatheter, Cordis®) mit dem antikoagulierten Blut perfundiert. Nach vollständigem Durchfließen des Herzkatheters gelangte das Vollblut zurück in das Zentrifugenröhrchen, sodass ein Kreislauf entstand. Durch diesen zirkulierte das mit dem jeweiligen Antikoagulans versetzte Vollblut bei einer konstanten Flussrate von 3 ml/min über insgesamt 60 min oder bis zum vorzeitigen Verschluss des Herzkatheters durch thrombotisches Material. Nach 30 min (Zeitpunkt T30) sowie nach 60 min beziehungsweise im Moment eines vorzeitigen Katheterverschlusses (Zeitpunkt T60 / Ende des Durchlaufs) wurden jeweils erneut Blutproben zur Bestimmung des Gerinnungsstatus und des Blutbildes entnommen.

Der Versuchsaufbau des Herzkatheterthrombose-Modells ist schematisch in **Abbildung 3** dargestellt.

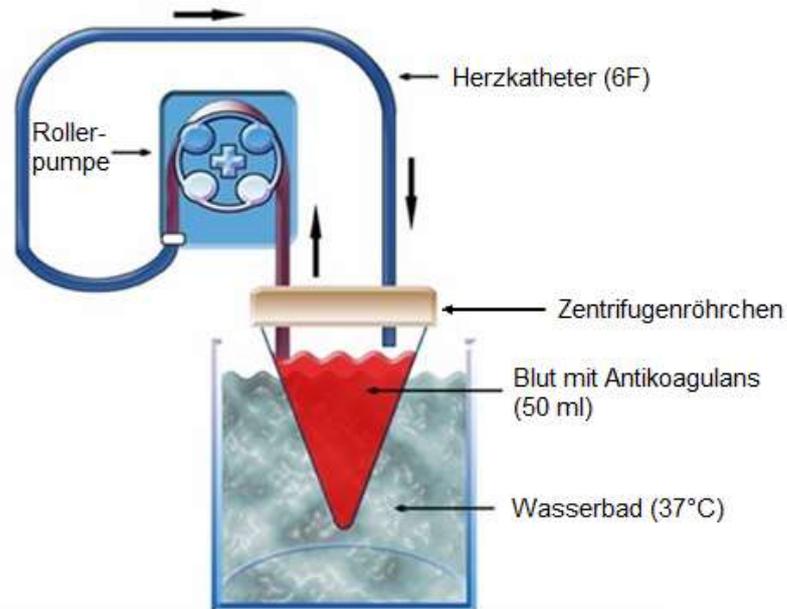


Abbildung 3: Aufbau des Herzkatheterthrombose-Modells. Adaptiert.⁵⁵

Nach Beendigung eines Experimentes schloss sich der mehrstufige Prozess der Katheterpräparation zur Vorbereitung der elektronenmikroskopischen Untersuchung an. Dieser Prozess umfasste mehrere Spülungs- und Fixierungsschritte (**Tabelle 3, S. 29**).

Zunächst erfolgte mithilfe der Rollerpumpe zweimal die Spülung mit Soerensen-Lösung für jeweils drei Minuten, um den Katheter von flüssigen Blutbestandteilen im Inneren zu befreien. Diese Soerensen-Lösung wurde durch Mischung der Stammlösung A (2,7 g Kaliumhydrogenphosphat gelöst in 200 ml aqua dest.) und Stammlösung B (7,1 g Dinatriumhydrogenphosphat gelöst in 500 ml aqua dest.) im Verhältnis 1:4 hergestellt. Im Anschluss an diesen ersten Spülvorgang erfolgte die Fixation des der inneren Oberfläche des Katheters auflagernden thrombotischen Materials durch Befüllen des Kreislaufs mit zunächst 25%igem und nachfolgend 2,5%igem Glutardialdehyd für jeweils zehn Minuten. Nach Abschluss der Fixation wurde der Katheter erneut mit zwei weiteren Spülvorgängen unter Nutzung von Soerensen-Lösung, mit welcher der Katheter über die Rollerpumpe perfundiert wurde, für jeweils 15 min gereinigt.

Zur Erfassung des Thrombusgewichtes wurde jeder Herzkatheter vor Versuchsbeginn (Gewicht G0) sowie nach Ende der Perfusion, erfolgter Spülung des Katheters und Fixierung des adhärenen thrombotischen Materials gewogen (Gewicht G60). Aus der Gewichts-differenz (GD) ergibt sich das Thrombusgewicht. Anschließend wurde die

Spitze des Katheters (etwa ein Zentimeter) abgetrennt und der Länge nach in zwei Hälften geteilt (**Abbildung 4**).

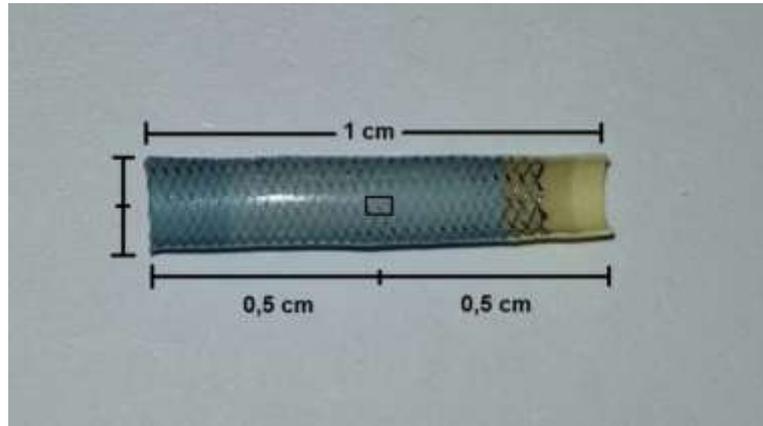


Abbildung 4: Hälfte eines distalen Führungskatheters mit Markierung des Areals für die elektronenmikroskopische Untersuchung im zentralen Bereich der eröffneten Katheterspitze

Die beiden Hälften der Katheterspitze durchliefen dann weitere Präparationsschritte (**Tabelle 3**). Zur Dehydrierung wurde Aceton in aufsteigender Konzentration (30% bis 99,5 %) verwendet. Hierbei wurden zur Herstellung der verschiedenen Aceton-Lösungen destilliertes Wasser und Aceton 99,5 % eingesetzt. Die Hälften der Katheterspitze verblieben für je zehn min in der entsprechenden Acetonlösung. Um eine völlige Entwässerung der Proben sicherzustellen, erfolgte vor Abschluss der Dehydrierung eine zweifache Behandlung der Hälften der Katheterspitze mit 99,5 %-igem Aceton. Zum Schutz der Katheterhälften vor Oxidation verblieben diese anschließend für 30 min zunächst in einem Gemisch aus 99,5 %-igem Aceton und 99 %-igem Hexamethyldisilazan (HMDS) (Mischungsverhältnis 1:1) und für weitere 30 min in 99 %-igem HMDS.

Abschließend wurden die Katheterspitzen über 15 Stunden unter dem Abzug luftgetrocknet, bevor sie zur elektronenmikroskopischen Untersuchung in das Bundeswehrzentral Krankenhaus nach Koblenz versandt wurden.

Die elektronenmikroskopische Untersuchung diente der quantitativen Analyse des der inneren Oberfläche anhaftenden thrombotischen Materials. Die Aufnahmen erfolgten dabei stets mit derselben Vergrößerung in einem standardisierten Bereich der Katheterinnenfläche. Dieser 100 x 150 µm große Abschnitt befindet sich in der Mitte der abgetrennten und axial eröffneten Katheterspitze (**Abbildung 4**). Mithilfe der elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurde die Anzahl der Erythrozyten und der Thrombozyten bestimmt sowie die Menge der Fibrinablagerungen anhand einer semiquantitativen Skala von 0 bis 4 beurteilt:

0: keine Fibrinablagerungen

1: minimale Fibrinablagerungen

2: geringe Fibrinablagerungen

3: moderate Fibrinablagerungen

4: starke Fibrinablagerungen.

Diese Analyse erfolgte getrennt für beide Hälften der jeweiligen Katheterspitze. Aus diesen beiden Werten wurde anschließend der Mittelwert für den jeweiligen Versuch gebildet.

Tabelle 3: Arbeitsschritte der Herzkatheter-Präparation

Arbeitsschritt	Chemikalie	Dauer
Spülung	Soerensen-Lösung	2 x 3 min
Fixation	Glutardialdehyd 25%	10 min
Fixation	Glutardialdehyd 2,5%	10 min
Spülung	Soerensen-Lösung	2 x 15 min
Dehydrierung	Aceton 30%	10 min
Dehydrierung	Aceton 50%	10 min
Dehydrierung	Aceton 70%	10 min
Dehydrierung	Aceton 80%	10 min
Dehydrierung	Aceton 90%	10 min
Dehydrierung	Aceton 96%	10 min
Dehydrierung	Aceton 99,5%	2 x 10 min
Oxidationsschutz	Aceton (99,5%)-HMDS (99%)-Gemisch (1:1)	30 min
Oxidationsschutz	HMDS (99%)	30 min
Lufttrocknen unter dem Abzug	---	900 min (15 h)

3.4.2 Herzklappenthrombose-Modell – THIA II

Die Wirksamkeit von UFH, Enoxaparin und Danaparoid zur Prävention einer Thrombusentstehung an mechanischen Herzklappenprothesen wurde unter Verwendung eines etablierten und bereits mehrfach publizierten Modells der in-vitro-Herzklappenthrombose, des Thrombostesters des Helmholtz-Instituts Aachen II (THIA II), evaluiert (**Abbildung 5**).^{52,56,57} Dieses System besteht aus zwei transparenten Testkammern aus Polymethylmethacrylat. Diese imitieren zum einen den linken Ventrikel mit linksventrikulärem Ausflusstrakt (upstream chamber) und zum anderen die Aortenwurzel (downstream chamber). Beide Kammern sind antegrad durch eine Herzklappenebene sowie retrograd durch einen Bypass miteinander verbunden, sodass nach Auswurf des Blutes aus dem linksventrikulären Äquivalent über die Klappenebene ein Rückfluss des Blutes aus dem Aortenäquivalent zurück in das linksventrikuläre Äquivalent erfolgen kann. Über diesen Bypass wird eine kontrollierte Rezirkulation des Blutes erreicht, welche manuell über eine Schraubzwinde in ihrer Intensität angepasst werden kann.

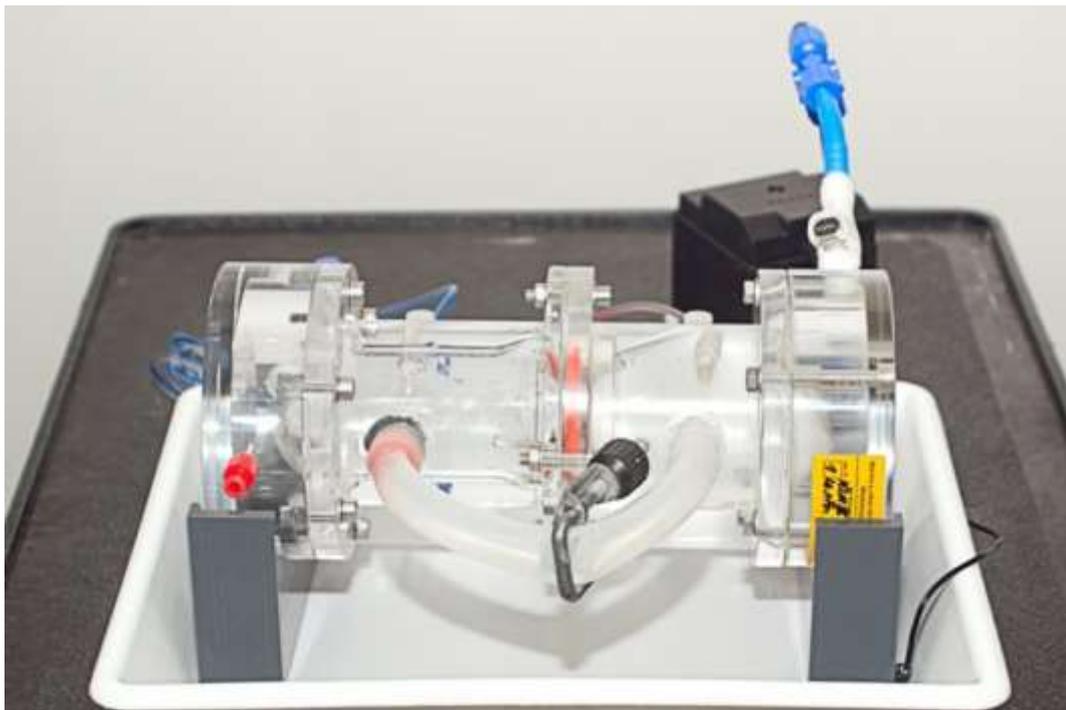


Abbildung 5: Thrombostester des Helmholtz-Instituts Aachen II (THIA II)

Die Geometrie der Innenflächen der beiden Testkammern ist in Größe und Form an die humane Physiologie angepasst. So weist das linksventrikuläre Imitat eine konische Form mit einer dem linksventrikulären Ausflusstrakt nachempfundenen Verjüngung hin

zur Klappenebene auf. Im röhrenförmigen Aortenäquivalent ist auch der Aortenbulbus mit seinen typischen Sinus aortae nachgebildet. Distal werden beide Kammern durch je eine auslenkbare Polyurethan-Membran von Druckluftkammern getrennt. Durch Anschluss an ein Druckgebersystem mit variabler Druckapplikation in die Luftkammern kommt es zu einer synchronen pulsatilen Auslenkung der Membranen und damit zum Entstehen eines antegraden Blutflusses durch die Testkammern.⁵⁸ Dieses Testsystem befindet sich zur Imitation physiologischer Temperaturverhältnisse in einem 37°C warmen Inkubator. **Abbildung 6** zeigt den schematischen Aufbau des in-vitro-Thrombostesters THIA II.

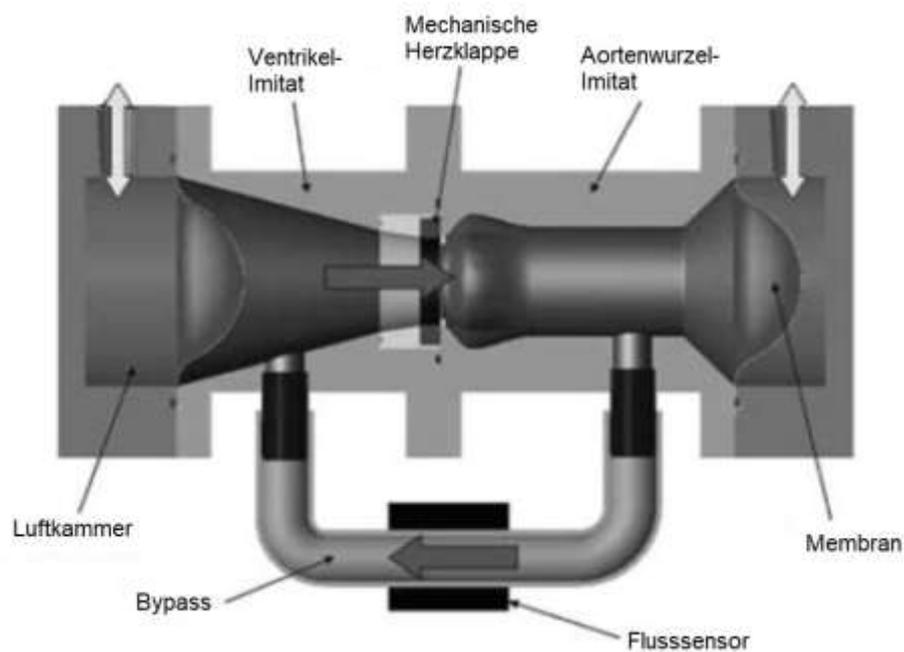


Abbildung 6: Schematischer Aufbau des in-vitro-Thrombostesters THIA II (Thrombostester Helmholtz-Institut Aachen II). Adaptiert.⁵²

Mittels einer externen Steuereinheit und des Druckgebersystems wird ein pulsatiler Blutfluss über die Herzklappenebene mit einer Frequenz von 60 Schlägen pro Minute über eine maximale Laufzeit von 60 min erzeugt. Zusätzlich kann mittels spezieller Sensoren eine kontinuierliche Messung des vorherrschenden Druckes in beiden Testkammern erfolgen. Diese Drücke wurden unter Nutzung einer Datenerfassungssoftware (DAQ) als Druckverlaufskurven auf einem Monitor dargestellt (**Abbildung 7**). Der mittlere Druck im Aortenäquivalent dieses in-vitro-Testsystems wurde entsprechend den physiologischen Druckverhältnissen in der humanen Aorta zwischen 90 und 100 mmHg eingestellt.

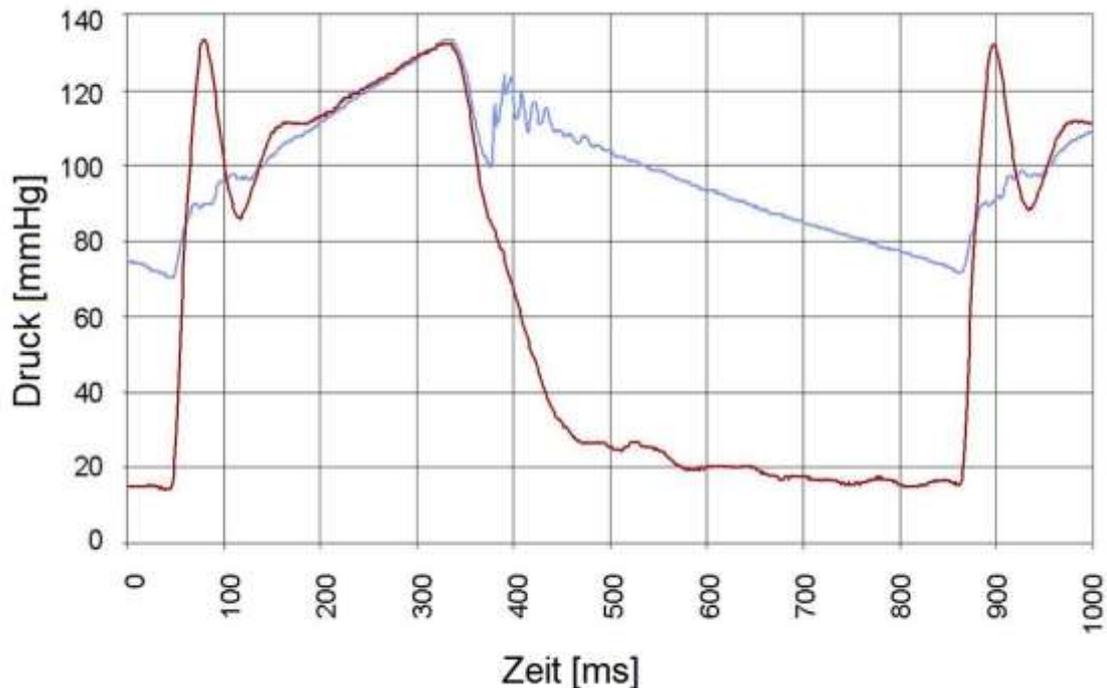


Abbildung 7: Druckkurvenverlauf im Thrombolysetester THIA II. Rote Kurve: upstream chamber, entspricht dem Druckverlauf im linksventrikulären Ausflusstrakt; blaue Kurve: downstream chamber, entspricht dem Druckverlauf in der Aortenwurzel. Adaptiert.⁵²

In die Herzklappenebene des THIA II wurden in dieser Studie St. Jude Medical Aortenklappenprothesen (27 mm Doppelflügelprothesen) eingesetzt. Vor dem Platzieren der mechanischen Aortenklappe im Thrombolysetester wurde ihr Reingewicht bestimmt, um später die Menge des anhaftenden thrombotischen Materials ermitteln zu können. Das Testsystem wurde für jeden Versuch mit einem Gesamtvolumen von 300 ml, bestehend aus 250 ml Probandenblut und 50 ml Medikamentenlösung (zu testendes Antikoagulans), befüllt.

Nach vollständiger und luftblasenfreier Befüllung des Testsystems, welche unter Verwendung eines Transfusionssets erfolgte, wurde noch vor Beginn der simulierten Herzaktionen eine Blutprobe zur Bestimmung der Gerinnungsparameter entnommen (Zeitpunkt T0). Weitere Proben wurden analog zu den Versuchen im Herzkatheterthrombose-Modell nach 30 min (Zeitpunkt T30) sowie nach einer maximalen Laufzeit von 60 min (Zeitpunkt T60) entnommen. Nach Ablauf der maximalen Zirkulationsdauer von 60 min wurde das Testsystem von den Drucksensoren und Druckgeberanschlüssen getrennt und komplett aus dem Inkubator entnommen. Es erfolgte unverzüglich die Entleerung aller flüssigen Blutbestandteile aus dem Testsystem. Die Klappenprothese wurde anschließend vorsichtig aus ihrer Halterung in der Klappenebene entnommen und in Vorbereitung der

elektronenmikroskopischen Analyse entsprechend des Ablaufschemas in **Tabelle 4** gewaschen, fixiert und dehydriert.

Tabelle 4: Arbeitsschritte der Herzklappen-Präparation

Arbeitsschritt	Chemikalie	Dauer
Spülung	Soerensen-Lösung	2 x 3 min
Fixation	Glutardialdehyd 25%	10 min
Fixation	Glutardialdehyd 25% /Soerensen-Lösung (1:1)	10 min
Spülung	Soerensen-Lösung	2 x 3 min
Dehydrierung	Aceton 30%	10 min
Dehydrierung	Aceton 50%	10 min
Dehydrierung	Aceton 70%	10 min
Dehydrierung	Aceton 80%	10 min
Dehydrierung	Aceton 90%	10 min
Dehydrierung	Aceton 99,5%	10 min
Oxidationsschutz	Aceton (99,5%)-HMDS (99%)- Gemisch (1:1)	30 min
Oxidationsschutz	HMDS (99%)	30 min
Lufttrocknen (Abzug)	-	900 min (15 h)

Zur Entfernung der nicht an der Klappenprothese anhaftenden Blutbestandteile wurde diese zweimal für jeweils 3 min mittels Soerensen-Lösung gereinigt. Die Fixierung des an der Klappe haftenden thrombotischen Materials erfolgte zunächst für 10 min mittels 25%igem Glutardialdehyd, danach für weitere 10 min mit einem Gemisch aus 25%igem Glutardialdehyd und Soerensen-Lösung im Verhältnis 1:1. Anschließend wurde die Klappe mithilfe von Soerensen-Lösung von der Fixierlösung befreit. Die Dehydrierung des der Klappe anhaftenden Biomaterials erfolgte mithilfe einer aufsteigenden Aceton-Reihe. Die Konzentration des Acetons wurde stufenweise von 30%igem Aceton bis hin zu 99,5%igem Aceton gesteigert. Die Klappenprothese verblieb für jeweils 10 min im entsprechenden Aceton-Gemisch. Um einen Oxidationsschutz zu erreichen, wurde die Aortenklappenprothese im Anschluss zunächst für 30 min mit einem Gemisch aus 99,5%igem Aceton und HMDS und nachfolgend für ebenfalls 30 min in 99%igem HMDS behandelt.

Nach Durchführung der oben genannten Präparationsschritte wurde die Aortenklappenprothese über 15 h unter dem Abzug luftgetrocknet. Daraufhin erfolgte die finale Bestimmung des Klappengewichtes. Die Differenz aus dem Gewicht der getrockneten Klappe nach dem Versuch und dem Reingewicht der Klappe vor Versuchsbeginn entspricht hierbei der Masse des thrombotischen Materials, welches sich während des Versuchsdurchlaufs auf der Herzklappenprothese abgesetzt hat. Im Anschluss wurde die Herzklappenprothese - analog den Katheterspitzen der Versuche mit dem Herzkatheterthrombose-Modell - in das Bundeswehrzentral Krankenhaus nach Koblenz zur elektronenmikroskopischen Analyse verschickt.

Die elektronenmikroskopische Untersuchung der Klappenflügel wurde nach demselben Standard wie bei der Untersuchung der Herzkatheterspitzen durchgeführt (Kapitel 3.4.1). Analysiert wurde hierbei eine definierte Region in der Mitte der Klappenflügel. Dieser Ausschnitt ist - analog dem Bildausschnitt bei den Untersuchungen der Katheterspitzen - 100 x 150 µm groß und befindet sich fünf Millimeter vom inneren Rand des Klappenflügels entfernt (**Abbildung 8**).

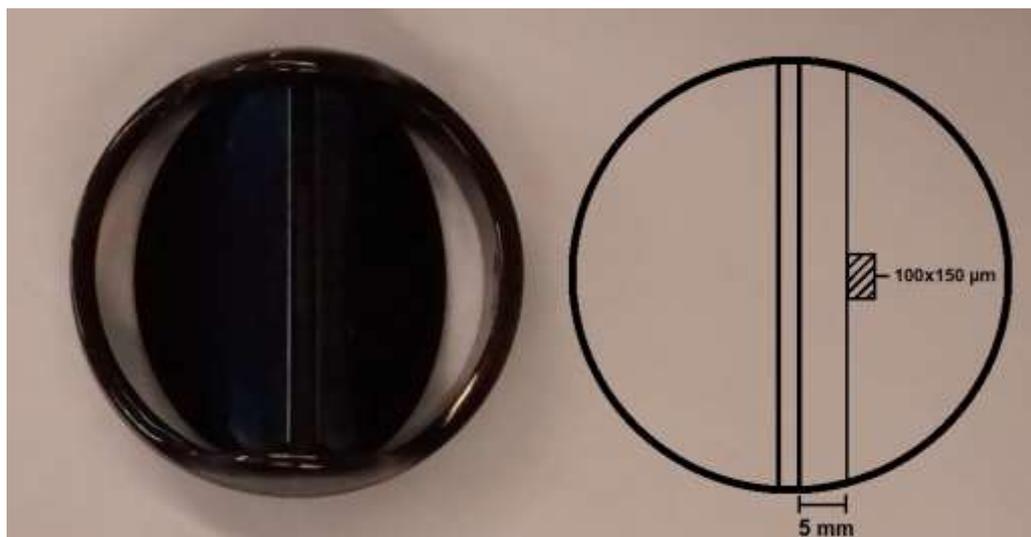


Abbildung 8: Mechanische Aortenklappenprothese und schematische Darstellung der Klappenflügel mit Markierung des Bereichs für die elektronenmikroskopische Untersuchung (schraffierte Fläche)

Erfasst wurde die Anzahl der auf der Klappenflügel-Oberfläche abgelagerten Erythrozyten und Thrombozyten. Die Quantifizierung der Fibrinablagerungen erfolgte ebenfalls anhand einer semiquantitativen Skala von 0 bis 4 (vgl. Kapitel 3.4.1).

3.5 Gerinnungsdiagnostik

3.5.1 Quick-Wert

Bei der Bestimmung des - im klinischen Alltag mittlerweile historischen - Quick-Wertes wird die Thromboplastinzeit (TPZ) gemessen und damit vor allem die Aktivität der Gerinnungsfaktoren II, VII und X kontrolliert. Auf diese Weise wird in erster Linie die Funktion des exogenen Gerinnungssystems geprüft. Der Quick-Wert dient daher primär der Kontrolle der oralen Antikoagulation mit Vitamin-K-Antagonisten, welche die Bildung der Vitamin-K-abhängig in der Leber synthetisierten Gerinnungsfaktoren II, VII, IX und X sowie von Protein C und S hemmen. Zur Bestimmung der Thromboplastinzeit nach Quick werden der Blutplasmaprobe des Patienten Gewebsthorboplastin (Faktor III), Calcium-Ionen und Phospholipide hinzugegeben und damit die Bildung von Fibrin ausgelöst. Die benötigte Zeit bis zur Gerinnungsbildung wird gemessen und zu der eines Referenzplasmas in das Verhältnis gesetzt.⁴⁵ Die normale Gerinnungszeit beträgt etwa 20 Sekunden und entspricht einem Quick-Wert von 100 Prozent. Je niedriger der Quick-Wert, desto länger dauern die Gerinnungsabläufe und dementsprechend höher ist das Blutungsrisiko. Ein erniedrigter Quick-Wert kann sowohl durch eine verminderte hepatische Synthese der Gerinnungsfaktoren II, VII, IX und X bedingt sein - sei es iatrogen durch die orale Antikoagulation mit Phenprocoumon oder aufgrund einer gestörten Leberproteinsynthese im Rahmen hepatischer Erkrankungen (Synthesestörung) - als auch durch einen Vitamin-K-Mangel (Substratmangel).

3.5.2 INR (International Normalized Ratio)

Da verschiedene Laboratorien unterschiedliche Thromboplastine zur Bestimmung des Quick-Wertes verwenden, sind diese nur eingeschränkt miteinander vergleichbar und die Resultate der Analysen an einer und derselben Probe können von Labor zu Labor um ein Mehrfaches voneinander differieren. Aus diesem Grund führte die Weltgesundheitsorganisation 1983 zur Standardisierung die INR (International Normalized Ratio) ein.⁴⁵

Auch bei der Bestimmung der INR wird die Thromboplastinzeit gemessen. Jedoch werden hierfür die genutzten Thromboplastine gegen ein internationales Referenzpräparat kalibriert. Auf diese Weise wird der ISI-Wert (International Sensivity Index) des jeweiligen Thromboplastins ermittelt, mit dessen Hilfe die bestimmte Thromboplastinzeit in die INR umgerechnet werden kann. Hierfür wird der Quotient aus Thromboplastinzeit und der mittleren normalen Gerinnungszeit (mean normal prothrombin time, MNPT) mit dem ISI-Wert potenziert.⁴⁵

- $INR = (TPZ / MNPT)^{ISI}$

Angegeben wird die INR als jener Faktor, um welchen die Gerinnungszeit der Probe im Vergleich zu Normalplasma verlängert ist. Demnach bedeutet eine INR von 2 eine auf das Doppelte verlängerte Gerinnungszeit und entspricht einem Quick-Wert von 50 %. Genutzt wird die INR insbesondere zur Verlaufskontrolle einer Therapie mit Cumarinderivaten.

3.5.3 Aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT)

Für die Überprüfung des endogenen Aktivierungsweges der plasmatischen Gerinnung ist die Bestimmung des Quick- oder INR-Wertes ungeeignet. Hierfür wird eine Messung der aktivierten partiellen Thromboplastinzeit (aPTT) durchgeführt. Um diese zu bestimmen, werden der Citratplasmaprobe Phospholipide, oberflächenaktive Substanzen und Calcium-Ionen hinzugegeben und die Zeit bis zur Bildung von Fibringerinnseln gemessen. Als Oberflächenaktivatoren eignen sich unter anderem Kaolin und Siliciumdioxid.⁵⁹ Die aPTT ist vor allem von den Konzentrationen der Gerinnungsfaktoren XII, XI, X, IX, VIII, II und I abhängig, sodass abgesehen vom endogenen Aktivierungsweg auch die gemeinsame Endstrecke der Gerinnungskaskade überprüft wird.⁶⁰ Ein Mangel der Faktoren VIII, IX, XI und XII sowie deren Defekte werden durch eine Verlängerung der aPTT relativ sensitiv angezeigt. Die aPTT variiert interindividuell sowie in Abhängigkeit von den eingesetzten Reagenzien, sodass kein universeller Referenzbereich existiert. Indiziert ist die Bestimmung der aPTT präoperativ zur Überprüfung des Gerinnungsstatus (endogener Aktivierungsweg und gemeinsame Endstrecke der Gerinnung), als Suchtest auf hämorrhagische Diathesen, welche den endogenen Aktivierungsweg betreffen, sowie zur Überwachung einer Therapie mit unfraktioniertem Heparin.⁶¹ Eine verlängerte aPTT kann entsprechend durch eine Heparintherapie, aber auch durch verschiedene angeborene oder erworbene Gerinnungsstörungen verursacht werden. Dazu gehören neben den Hämophilien A und B (Faktor VIII) auch die Verbrauchskoagulopathie und das von-Willebrand-Jürgens-Syndrom. Eine simultane Verlängerung von aPTT und INR weist hingegen auf einen Defekt der gemeinsamen Endstrecke der Gerinnungskaskade hin (Faktoren I, II, V und X).⁶⁰

3.5.4 Activated clotting time (ACT)

Die activated clotting time dient in erster Linie der Überwachung einer Therapie mit UFH. Die Bestimmung der ACT ist schnell und einfach durchzuführen, weshalb sie sich als Bedside-Test unter anderem während kardiochirurgischer Eingriffe unter Nutzung

der Herz-Lungen-Maschine oder während einer PCI zur Überprüfung der Gerinnung unter Heparinzufuhr eignet.⁶² Mithilfe des ACT-Messsystems wird die Zeit bestimmt, welche bis zur kompletten Aktivierung des Gerinnungssystems benötigt wird. Hierfür wird die entsprechende Blutprobe in eine ACT-Kartusche gegeben. Diese enthält neben einem kleinen Magneten einen Kontaktaktivator, welcher den Gerinnungsprozess auslöst. Als Kontaktaktivatoren eignen sich insbesondere Kaolin, Celit und Glas.⁶³ Um ein gutes Vermischen der Substanzen mit der Blutprobe zu erreichen, sollte die befüllte Kartusche vor dem Platzieren im ACT-Messgerät leicht geschüttelt werden. Anschließend wird sie im Messgerät in Rotation versetzt. Durch Aktivierung der Gerinnungskaskade bildet sich ein Thrombus, welcher den Magneten fixiert, was zum automatischen Stoppen der Zeit führt. Angegeben wird die ACT als jene Zeit in Sekunden, welche von der Zugabe des Kontaktaktivators zum Blut bis zur Gerinnungsbildung benötigt wird. Physiologischerweise variiert diese Zeit zwischen 70 bis 180 s.⁵⁹ Je nach Indikation der Heparintherapie wird eine unterschiedliche Verlängerung der ACT angestrebt. Während für eine PCI eine ACT zwischen 250 und 350 s ausreichend ist, sollte während des Einsatzes einer Herz-Lungen-Maschine ein Wert zwischen 400 und 500 s erreicht werden.⁵⁹

3.5.5 Anti-Faktor-Xa-Bestimmung

Die Bestimmung der anti-Faktor-Xa-Aktivität dient sowohl der Überwachung der Therapie mit niedermolekularen Heparinen als auch der Therapie mit Heparinoiden wie Danaparoid. Unterschieden wird eine Clot-basierte Methode von der chromogenen Substratmethode.⁶⁴ Letztgenannte wurde für die Untersuchungen der Blutproben der vorliegenden Arbeit genutzt. Das Testprinzip beruht dabei auf der Eigenschaft der niedermolekularen Heparine und des Danaparoids, über eine Wirkungsverstärkung von Antithrombin den Faktor Xa zu hemmen. Der zu untersuchenden Plasmaprobe wird eine definierte Menge an Faktor Xa zugegeben. Entsprechend der Konzentration des Heparins beziehungsweise Heparinoids in der Probe wird ein Teil der Faktor-Xa-Moleküle gehemmt. Die Zugabe einer chromogenen Substanz, welche ein selektives Faktor-Xa-Substrat darstellt, ermöglicht die Bestimmung der Menge der nicht gehemmteten Faktor-Xa-Moleküle. Diese führen zur enzymatischen Spaltung des chromogenen Substrates, was zum Farbumschlag führt. Je mehr ungehemmte Faktor-Xa-Moleküle sich in der Plasmaprobe befinden, desto stärker fällt der Farbumschlag aus. Dementsprechend kann aus der Stärke der Lichtabsorption der Probe auf die Restaktivität des Faktors Xa in der Probe geschlossen werden. Kalibrierkurven erlauben letztlich die exakte Bestimmung der anti-Faktor-Xa-Aktivität in der untersuchten Probe.⁵⁹ Dabei ist zu beachten, dass die anti-Xa-Einheiten des

Danaparoids nicht mit jenen der niedermolekularen Heparine gleichgesetzt werden können. Deshalb sind unterschiedliche Kalibrierkurven mit Standards bekannter Konzentrationen von Danaparoid beziehungsweise niedermolekularem Heparin notwendig.

Damit eine zu geringe Konzentration von Antithrombin die Reaktion nicht limitiert, wird der zu untersuchenden Probe bei einigen Tests eine definierte Menge an AT zugesetzt. Dadurch wird gewährleistet, dass das in der Probe enthaltene Antikoagulans seine volle Wirkung entfalten kann. Hierbei besteht jedoch im klinischen Einsatz die Gefahr, dass ein Antithrombin-Mangel verschleiert und eine falsch hohe anti-Faktor-Xa-Aktivität bestimmt wird.⁶⁴

3.5.6 D-Dimere

Vorhandene Gerinnsel werden im Körper mithilfe der reaktiven Fibrinolyse abgebaut. Durch Plasmin-vermittelte Spaltung der durch Faktor XIII quervernetzten Fibrinmoleküle entstehen D-Dimere. Ihr Vorhandensein spiegelt die gleichzeitige Aktivierung von Gerinnung und Fibrinolyse wider.⁶⁵ Durch die Spaltung der Fibrinmoleküle bilden sich Neoepitope aus, welche genutzt werden, um monoklonale, fibrinspezifische Antikörper herzustellen.⁶⁶ Diese Antikörper können mithilfe verschiedener immunologischer Tests genutzt werden, um das Vorhandensein von D-Dimeren nachzuweisen.

Im ELISA-Verfahren wird die Blutprobe mit dem D-Dimer-Antigen mit den Antikörpern inkubiert. Diese Antikörper binden die D-Dimere. Anschließend wird ein zweiter Antikörper hinzugegeben, welcher enzymkonjugiert ist. Dieser bindet an freie Fibrin-Epitope. Im nächsten Schritt erfolgt nach Zugabe einer Substratlösung für die enzymkonjugierten Antikörper die photometrische Bestimmung der Enzymaktivität. Mithilfe einer Referenzkurve kann von der Änderung der optischen Dichte auf die Konzentration der D-Dimere in der Blutprobe geschlossen werden.⁶⁵ Eine weitere Methode zum Nachweis von D-Dimeren ist der Latex-basierte Trübungstest. Dieser wurde im Zentrallabor des Universitätsklinikums Halle, welches die Blutproben für die vorliegende Arbeit untersuchte, angewandt. Dabei werden Latexpartikel genutzt, welche mit den fibrinspezifischen Antikörpern beschichtet werden und deren Durchmesser geringer ist als die Wellenlänge (540 nm) des für die Photometrie genutzten Lichtstrahls. Durch die geringe Größe der Latex-Mikropartikel wird nur ein kleiner Anteil des Lichtes absorbiert. Sind in der zugegebenen Blutprobe D-Dimere vorhanden, so kommt es zur Agglutination dieser mit den Antikörper-beschichteten Latexpartikeln. Dies führt zur Bildung von Aggregaten mit einem Durchmesser, der die

Wellenlänge des die Probe durchdringenden Lichtstrahls überschreitet. Die resultierende Trübung wird photometrisch erfasst. Hieraus kann anschließend auf die Menge der vorhandenen D-Dimere geschlossen werden.⁶⁷

Indiziert ist die Bestimmung der D-Dimere zur Diagnostik von Prozessen, bei welchen quervernetztes Fibrin gebildet und anschließend mittels Fibrinolyse abgebaut wird. Hierzu gehören unter anderem die Diagnostik der tiefen Venenthrombose, der Lungenarterienembolie und der disseminierten intravasalen Gerinnung. Der physiologische Wert der D-Dimer-Konzentration ist altersabhängig und steigt mit zunehmendem Lebensalter an. Bei einem D-Dimer-Wert von weniger als 0,5 µg/ml ist das Vorliegen einer Thrombembolie unwahrscheinlich. Die Verfahren zur D-Dimer-Bestimmung weisen eine sehr hohe Sensitivität auf. Aufgrund der Vielzahl der möglichen Ursachen für eine Gerinnungsaktivierung mit anschließender Fibrinolyse ist die Spezifität jedoch gering.⁶⁵

3.6 Statistische Auswertung

Nach Erhebung der Daten erfolgte deren Auswertung mit dem Programm IBM SPSS Statistics 25.0 für Windows.

Da die Normalverteilungs-Annahme nicht generell erfüllt war, wurde für die Analyse der Daten der Kruskal-Wallis-Test angewandt. Aufgrund des explorativen Charakters der vorliegenden Arbeit wurden die p-Werte entsprechend interpretiert.

Für eine übersichtlichere graphische Abbildung wurde in den Boxplots auf eine Darstellung der Ausreißer und Extremwerte verzichtet.

4 Ergebnisse

4.1 Herzkatheterthrombose-Modell

4.1.1 Vergleich des Thrombusgewichtes

Bei keinem der Versuchsdurchläufe kam es zu einem vorzeitigen Katheterverschluss durch thrombotisches Material, sodass die Bestimmung des Thrombusgewichtes immer nach der maximalen Versuchslaufzeit von 60 min erfolgte. Die durchgeführte Analyse der während der Versuche auf den Katheterinnenflächen entstandenen Thrombenablagerungen ergab relevante Unterschiede zwischen den getesteten Antikoagulanzen. So betrug das Gewicht des während der Versuche mit Danaparoid entstandenen thrombotischen Materials im Mittel $211,4 \pm 67,9$ mg (Medianwert: 178 mg, Interquartilsabstand: IQR = 109). Mit UFH als Antikoagulans bildeten sich im Mittel $131,4 \pm 15,2$ mg thrombotisches Material (Median 130,5 mg; IQR = 25). Unter Nutzung von Enoxaparin zur Gerinnungshemmung entstand im Mittel $152,2$ mg \pm 30,3 mg Thrombusmaterial (Median 150 mg; IQR = 49).

Die entstandenen Thrombusgewichte sind in **Abbildung 9** graphisch dargestellt.

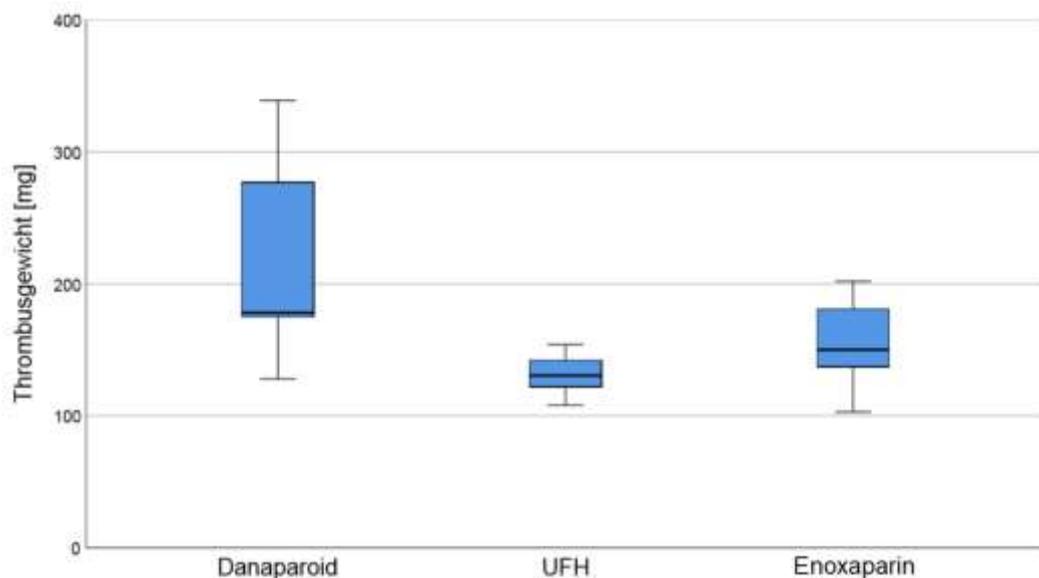


Abbildung 9: Vergleich der Thrombusgewichte in mg (Boxplot) für die drei untersuchten Antikoagulanzen nach 60 min Versuchslaufzeit im Herzkatheterthrombose-Modell ($p = 0,002$; Subgruppenanalysen: Danaparoid-UFH: $p = 0,001$ / Danaparoid-Enoxaparin: $p = 0,180$ / UFH-Enoxaparin: $p = 0,273$)

Ein relevanter Unterschied zeigte sich somit zwischen Danaparoid und UFH, wobei sich unter Antikoagulation mit Danaparoid deutlich mehr thrombotisches Material abgelagerte

als unter Nutzung von UFH. Geringere, nicht relevante Unterschiede zeigten sich zwischen Danaparoid und Enoxaparin (mit tendenziell mehr thrombotischen Ablagerungen unter Danaparoid) sowie zwischen Enoxaparin und UFH.

4.1.2 Elektronenmikroskopische Auswertung

Die Ablagerungen von Erythrozyten, Thrombozyten und Fibrin auf den Katheterinnenflächen wurden rasterelektronenmikroskopisch erfasst. Ein Beispielbild einer elektronenmikroskopischen Aufnahme zeigt **Abbildung 10**.

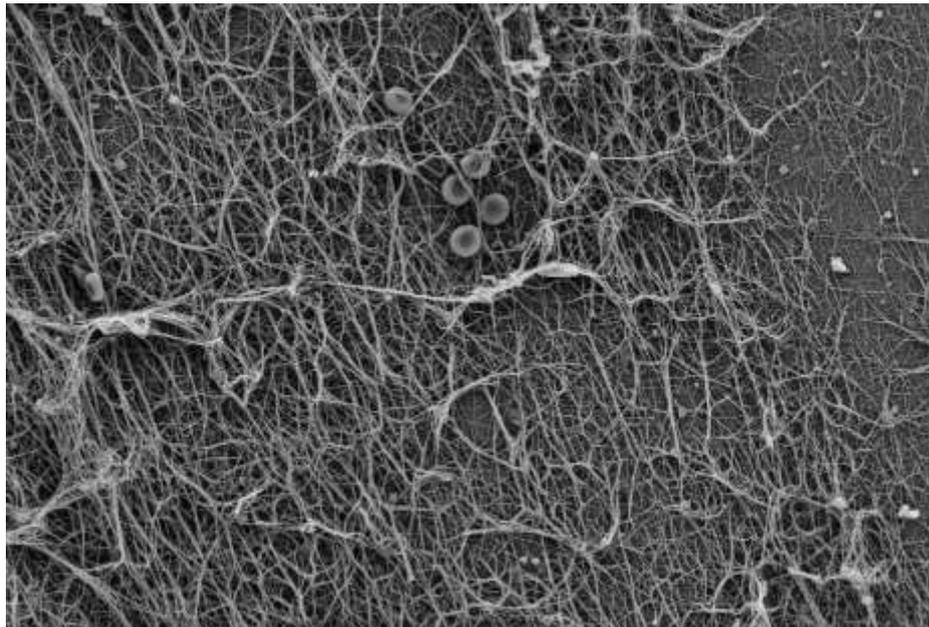


Abbildung 10: Beispiel einer elektronenmikroskopischen Aufnahme der Katheterinnenfläche nach einem Versuchsdurchlauf mit Enoxaparin; standardisierter Abschnitt (Größe: 100 x 150 μm) mit netzartigen Fibrinablagerungen sowie wenigen Erythrozyten und Thrombozyten

Fibrinablagerungen

Die auf einer arbiträren Skala erfasste Menge des auf den Katheterinnenflächen entstandenen Fibrins ist in **Abbildung 11** dargestellt.

Unter Danaparoid wurde ein Mittelwert von $0,73 \pm 1,02$ (Median 0,25; IQR = 1,56) erreicht, unter UFH ein Mittelwert von $0,43 \pm 0,37$ (Median 0,38; IQR = 0,75) und unter Enoxaparin lag dieser bei $1,2 \pm 1,02$ (Median 1,12; IQR = 1,94). Zwischen den drei getesteten Antikoagulanzen konnte insgesamt kein relevanter Unterschied bezüglich der semiquantitativ erfassten Menge von Fibrinablagerungen an den Katheterinnenflächen festgestellt werden.

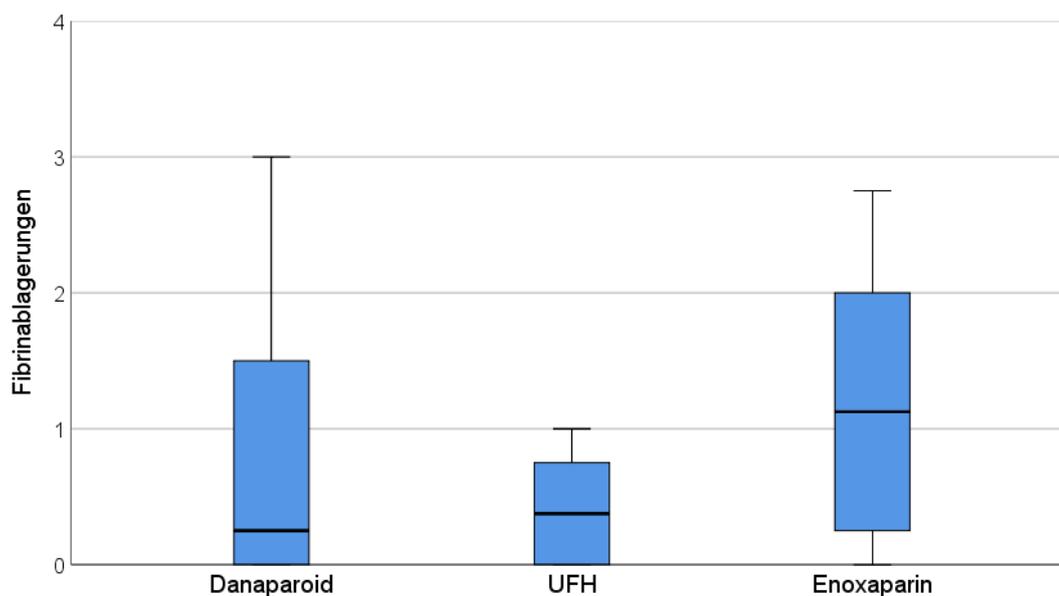


Abbildung 11: Vergleich der Menge der Fibrinablagerungen (Boxplot, arbiträre Skala) an den Katheterinnenseiten auf einer Fläche von 100 x 150 μm für die drei untersuchten Antikoagulanzen ($p = 0,251$)

Erythrozyten

In der quantitativen Analyse der Erythrozytenablagerungen auf den Katheterinnenflächen konnten ebenfalls keine relevanten Unterschiede zwischen den getesteten Antikoagulanzen ermittelt werden.

Tendenziell war die Erythrozytenablagerung unter UFH am geringsten. Im Mittel fanden sich 20 ± 28 (Median 6,5; IQR = 34,8) Erythrozyten pro Bildausschnitt unter Danaparoid, 2 ± 3 (Median 0,75; IQR = 5) Erythrozyten unter UFH und 16 ± 38 (Median 1,75; IQR = 9,5) Erythrozyten unter Enoxaparin (**Abbildung 12**).

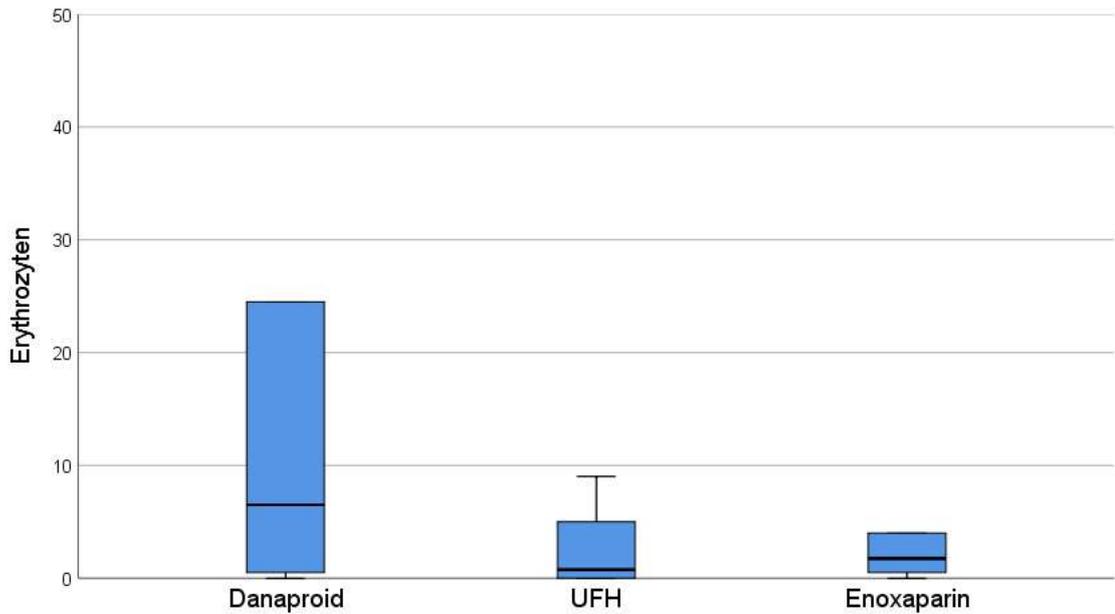


Abbildung 12: Vergleich der Menge der Erythrozytenablagerungen (Boxplot) an den Katheterinnenseiten auf einer Fläche von 100 x 150 µm für die drei untersuchten Antikoagulanzen ($p = 0,304$)

Thrombozyten

Auch die Analyse der Menge der während der Versuche abgelagerten Thrombozyten ergab keine relevanten Unterschiede zwischen Danaparoid, UFH und Enoxaparin. Unter Nutzung von Danaparoid als Antikoagulans lagerten sich im standardisierten Bildausschnitt im Mittel 63 ± 59 Thrombozyten ab (Median 57,5; IQR = 126), unter UFH 216 ± 191 (Median 165,25; IQR = 254,5) und unter Enoxaparin 314 ± 469 (Median 63,75; IQR = 547,1). Die Menge der abgelagerten Thrombozyten ist in **Abbildung 13** graphisch dargestellt.

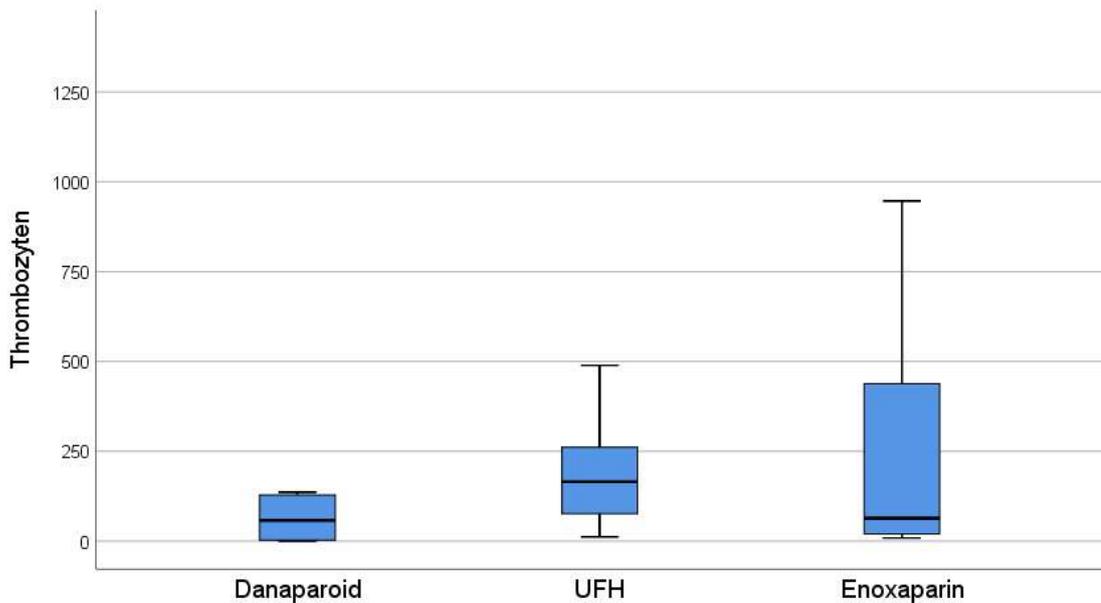


Abbildung 13: Vergleich der Menge der Thrombozytenablagerungen (Boxplot) an den Katheterinnenseiten auf einer Fläche von 100 x 150 µm für die drei untersuchten Antikoagulanzen ($p = 0,076$)

4.1.3 Laborparameter

Anti-Faktor-Xa-Aktivität

Zur Validierung eines suffizienten Antikoagulationsniveaus wurde für Enoxaparin zu Versuchsbeginn (Zeitpunkt T0), nach 30 min Versuchslaufzeit (Zeitpunkt T30) sowie nach 60 min Versuchslaufzeit (Zeitpunkt T60, Versuchsende) die anti-Faktor-Xa-Aktivität bestimmt. Hierbei konnte zu jedem Messzeitpunkt das Erreichen des therapeutischen Antikoagulationsniveaus (Ziel 0,4 bis 1,1 IE/ml) nachgewiesen werden. **Tabelle 5** und **Abbildung 14** geben einen Überblick über die Mittelwerte der anti-Faktor-Xa-Aktivitäten.

Während der Versuchsdurchläufe mit Danaparoid wurde ebenfalls zu den Zeitpunkten T0, T30 und T60 die anti-Faktor-Xa-Aktivität bestimmt. Der therapeutische Zielbereich für Danaparoid liegt bei 0,5 bis 0,8 anti-Faktor-Xa-Einheiten/ml. Die Mittelwerte der Messergebnisse lagen durchgehend im hochtherapeutischen Bereich und sind ebenfalls in **Tabelle 5** zusammengefasst und in **Abbildung 14** graphisch dargestellt.

Tabelle 5: Mittelwerte und Standardabweichungen der anti-Faktor-Xa-Aktivitäten für Enoxaparin und Danaparoid zu Versuchsbeginn (Zeitpunkt T0), nach 30 min (Zeitpunkt T30) sowie nach 60 min (Zeitpunkt T60) Versuchslaufzeit im Herzkatheterthrombose-Modell

Antikoagulans	Anti-Xa-Aktivität T0 ± SD	Anti-Xa-Aktivität T30 ± SD	Anti-Xa-Aktivität T60 ± SD
Enoxaparin (IE/ml)	0,86 ± 0,14	0,85 ± 0,14	0,85 ± 0,14
Danaparoid (E/ml)	0,81 ± 0,29	0,79 ± 0,31	0,81 ± 0,30

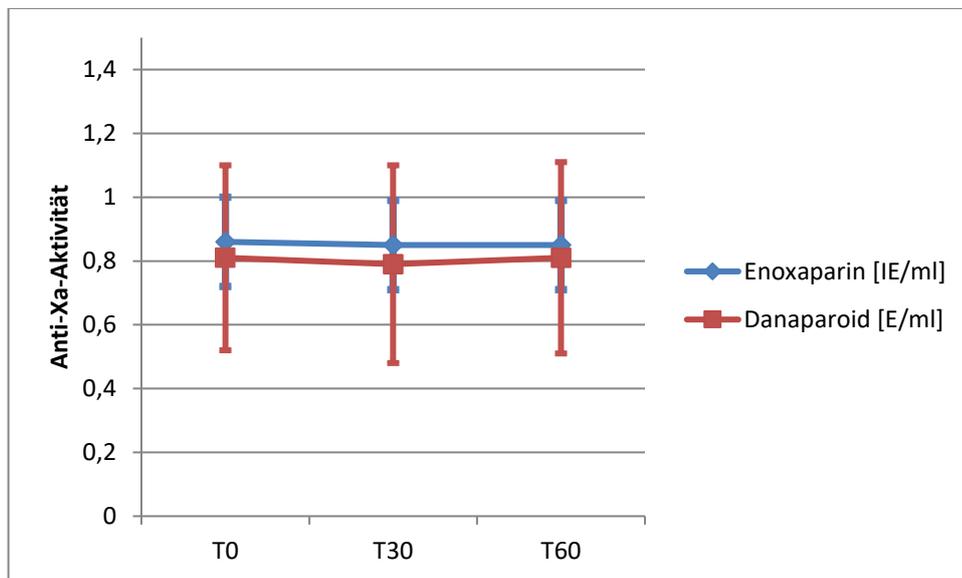


Abbildung 14: Darstellung der anti-Faktor-Xa-Aktivität für Enoxaparin und Danaparoid zu Versuchsbeginn (T0), nach 30 min (T30) sowie nach 60 min (T60) Versuchslaufzeit im Herzkatheterthrombose-Modell

Activated Clotting Time (ACT)

Zur Prüfung des Antikoagulationsniveaus während der Versuchsdurchläufe mit UFH wurde die activated clotting time (ACT) bestimmt. Analog zu den Versuchen mit Danaparoid und Enoxaparin erfolgte die Gerinnungskontrolle zu den Zeitpunkten T0, T30 und T60. Die Mittelwerte und Standardabweichungen der ACT zu den Messzeitpunkten sind in **Tabelle 6** aufgeführt und in **Abbildung 15** graphisch dargestellt. Die gemessenen ACT-Werte befanden sich zu allen Messzeitpunkten im gewünschten Zielbereich von 250 bis 350 Sekunden.

Tabelle 6: Mittelwerte und Standardabweichungen der activated clotting time [s] bei Einsatz von UFH zu Versuchsbeginn (Zeitpunkt T0), nach 30 min (Zeitpunkt T30) sowie nach 60 min (Zeitpunkt T60) Versuchslaufzeit

Antikoagulans	ACT [s] ± SD T0	ACT [s] ± SD T30	ACT [s] ± SD T60
UFH	278 ± 37	291 ± 30	293 ± 31

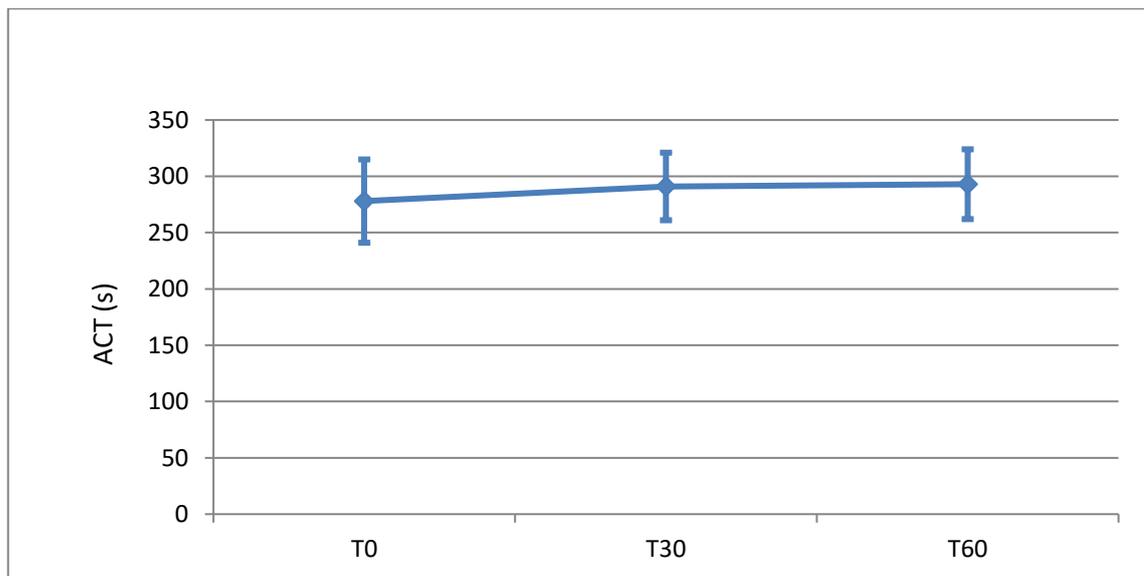


Abbildung 15: Darstellung der activated clotting time für UFH zu Versuchsbeginn (T0), nach 30 min (T30) sowie nach 60 min (T60) Versuchslaufzeit im Herzkatheterthrombose-Modell

D-Dimere

Die Analyse bezüglich der Menge der gebildeten D-Dimere ergab zu keinem der Messzeitpunkte relevante Unterschiede zwischen den getesteten Antikoagulanzen. Nach 60 min Versuchslaufzeit konnten unter Antikoagulation mit Danaparoid im Mittel $0,51 \pm 0,27 \mu\text{g/ml}$ (Median $0,39 \mu\text{g/ml}$; IQR = $0,31$), unter UFH $0,29 \pm 0,12 \mu\text{g/ml}$ (Median $0,26 \mu\text{g/ml}$; IQR = $0,1$) und unter Enoxparin $0,45 \pm 0,30 \mu\text{g/ml}$ (Median $0,32 \mu\text{g/ml}$; IQR = $0,46$) gemessen werden

Abbildung 16 gibt eine Übersicht über die Medianwerte der nach 60 min Versuchslaufzeit gebildeten D-Dimere.

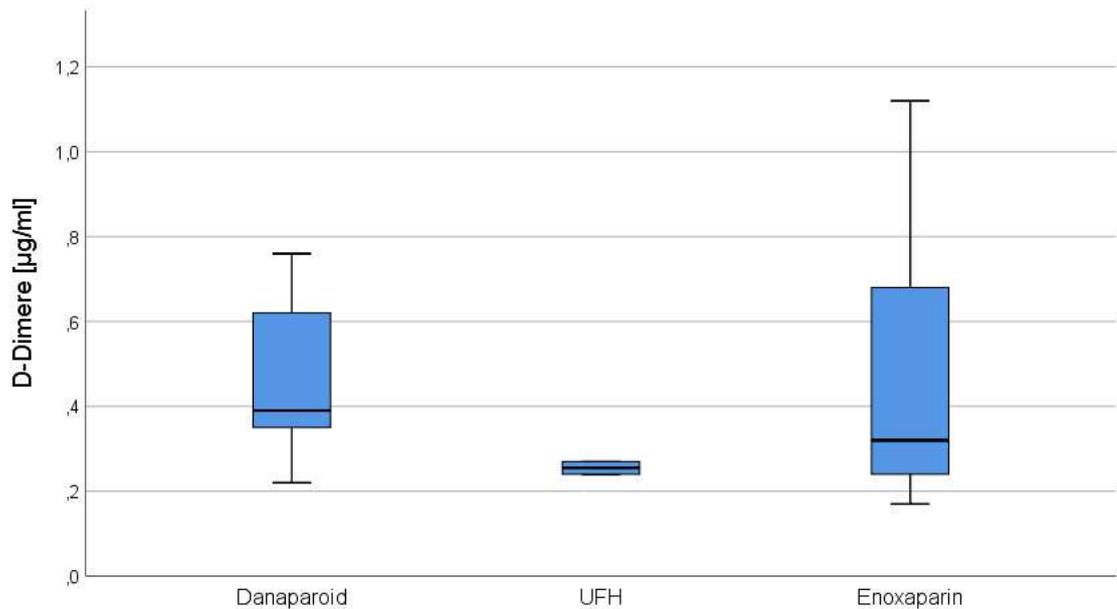


Abbildung 16: Vergleich der D-Dimer-Spiegel (Boxplot) für die drei untersuchten Antikoagulanzen nach 60 min Versuchslaufzeit im Herzkatheterthrombose-Modell ($p = 0,056$)

4.2 Herzklappenthrombose-Modell

4.2.1 Vergleich des Thrombusgewichtes

Bei keinem der Versuchsdurchläufe kam es zum vorzeitigen thrombotischen Verschluss des in-vitro-Modells, sodass das Thrombusgewicht nach der maximalen Versuchslaufzeit von 60 min bestimmt wurde. Die Menge des auf den Klappenflügeln entstandenen thrombotischen Materials ist in **Abbildung 17** graphisch dargestellt. Es ergaben sich relevante Unterschiede zwischen den getesteten Antikoagulanzen. So entstanden während der Versuchsdurchläufe mit Danaparoid im Mittel lediglich $3,1 \pm 3,4$ mg (Median 2 mg; IQR = 3) thrombotisches Material. Bei Einsatz von UFH als Antikoagulans lagerte sich mit $153 \pm 126,1$ mg erheblich mehr Thrombusmaterial an den Klappenflügeln ab (Median 106 mg; IQR = 200), bei Enoxaparin waren es 295 ± 181 mg (Median 305 mg; IQR = 264).

Somit entstanden während der Versuchsdurchläufe mit Danaparoid deutlich geringere Mengen thrombotischen Materials an den Klappenflügeln als unter Einsatz von UFH und Enoxaparin. Das unter Anwendung von UFH entstandene Thrombusgewicht war zudem tendenziell geringer als jenes, welches unter Antikoagulation mit Enoxaparin entstand. In der statistischen Auswertung konnte jedoch im Herzklappenthrombose-Modell kein relevanter Unterschied zwischen UFH und Enoxaparin als Antikoagulans festgestellt werden.

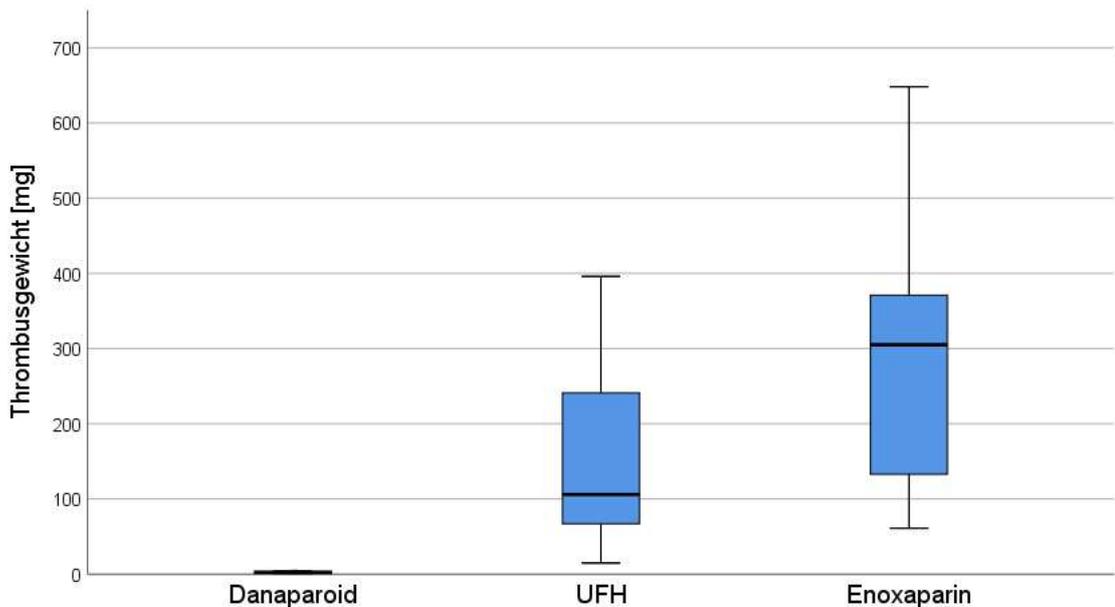


Abbildung 17: Vergleich der Thrombusgewichte in mg (Boxplot) für die drei untersuchten Antikoagulanzen nach 60 min Versuchslaufzeit im Herzklappenthrombose-Modell ($p < 0,001$; Subgruppenanalysen: Danaparoid-UFH: $p = 0,004$ / Danaparoid-Enoxaparin: $p < 0,001$ / UFH-Enoxaparin: $p = 0,610$)

4.2.2 Elektronenmikroskopische Auswertung

Die Auswertung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen der Klappenflügel ergab Unterschiede in der Ablagerung von Thrombozyten und Erythrozyten sowie der Bildung von Fibrin an den mechanischen Herzklappen. Ein Beispielbild einer elektronenmikroskopischen Aufnahme zeigt **Abbildung 18**.

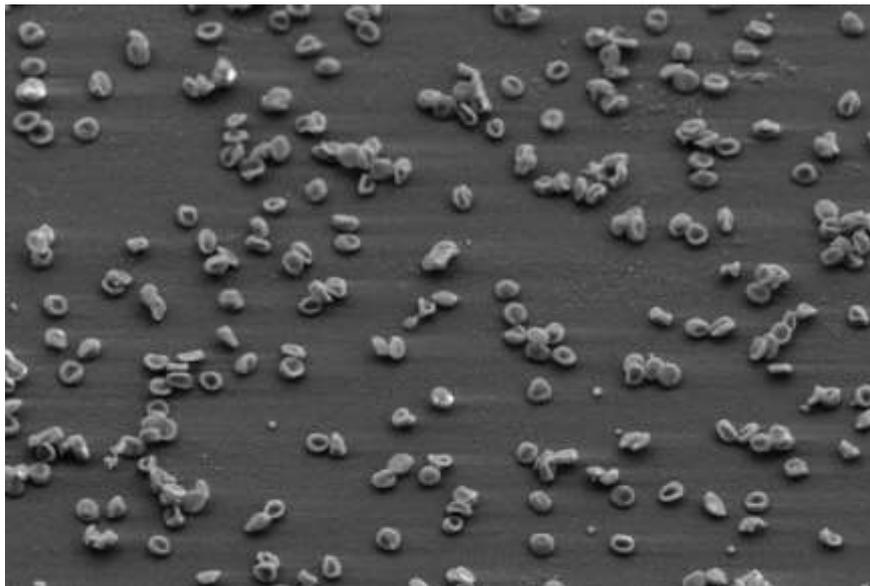


Abbildung 18: Beispiel einer elektronenmikroskopischen Aufnahme eines Klappenflügels nach einem Versuchsdurchlauf mit Danaparoid; standardisierter Abschnitt ($100 \times 150 \mu\text{m}$) mit Erythrozyten-Ablagerungen und wenigen Thrombozyten

Fibrinablagerungen

Die elektronenmikroskopische Analyse der Fibrinablagerungen auf den Klappenflügeln ergab relevante Unterschiede in der Menge des abgelagerten Fibrins zwischen den getesteten Antikoagulanzen.

Unter Nutzung von Danaparoid zur Antikoagulation wurde ein Mittelwert von $0,05 \pm 0,16$ (Median 0; IQR = 0) erfasst, unter UFH ein Mittelwert von $0,55 \pm 0,72$ (Median 0,25; IQR = 1,1) und unter Enoxaparin ein Mittelwert von $1,1 \pm 0,15$ (Median 1,1; IQR = 1,8).

In den durchgeführten post-hoc-Tests zeigten sich relevante Unterschiede bezüglich der Fibrinbildung lediglich zwischen Danaparoid und Enoxaparin mit geringeren Fibrinablagerungen unter Danaparoid. Keine Unterschiede ergaben sich zwischen Danaparoid und UFH sowie zwischen UFH und Enoxaparin. **Abbildung 19** gibt einen Überblick über die Menge der Fibrinablagerungen.

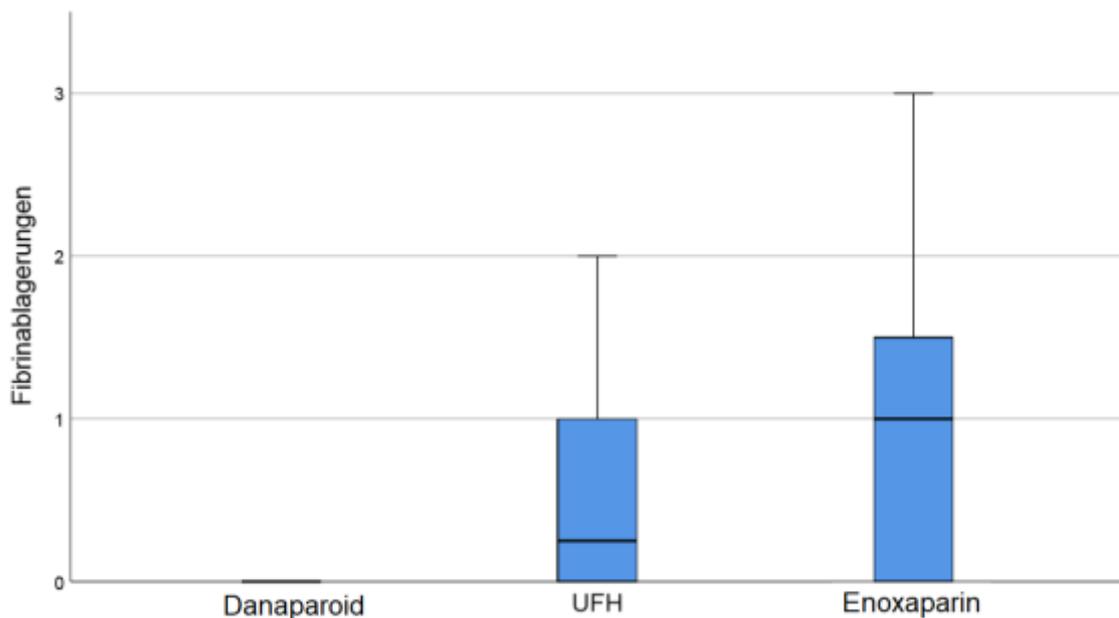


Abbildung 19: Vergleich der Menge der Fibrinablagerungen (Boxplot, arbiträre Skala) an den Klappenflügeln auf einer Fläche von $100 \times 150 \mu\text{m}$ für die drei untersuchten Antikoagulanzen ($p = 0,014$; Subgruppenanalysen: Danaparoid-UFH: $p = 0,266$ / Danaparoid-Enoxaparin: $p = 0,011$ / UFH-Enoxaparin: $p = 0,695$)

Erythrozyten

Die Analyse der während der Versuche auf den Klappenflügeln abgelagerten Erythrozyten ergab ebenfalls deutliche Unterschiede zwischen den getesteten Antikoagulanzen.

Tendenziell zeigte sich die geringste Ablagerung von Erythrozyten unter Antikoagulation mit UFH. In der Auswertung der elektronenmikroskopischen Bilder lagerten sich unter Danaparoid im Mittel 265 ± 237 (Median 195,5; IQR = 216) Erythrozyten je Bildausschnitt ab. Bei Einsatz von UFH fanden sich im Mittel 80 ± 228 Erythrozyten (Median 0; IQR = 26) und unter Enoxaparin 89 ± 138 (Median 30,5; IQR = 139) Erythrozyten je Bildausschnitt.

Somit war die Erythrozyten-Ablagerung unter UFH geringer als unter Danaparoid. Zwischen Danaparoid und Enoxaparin sowie zwischen UFH und Enoxaparin konnte kein relevanter Unterschied festgestellt werden.

Die Menge der abgelagerten Erythrozyten sind in **Abbildung 20** dargestellt.

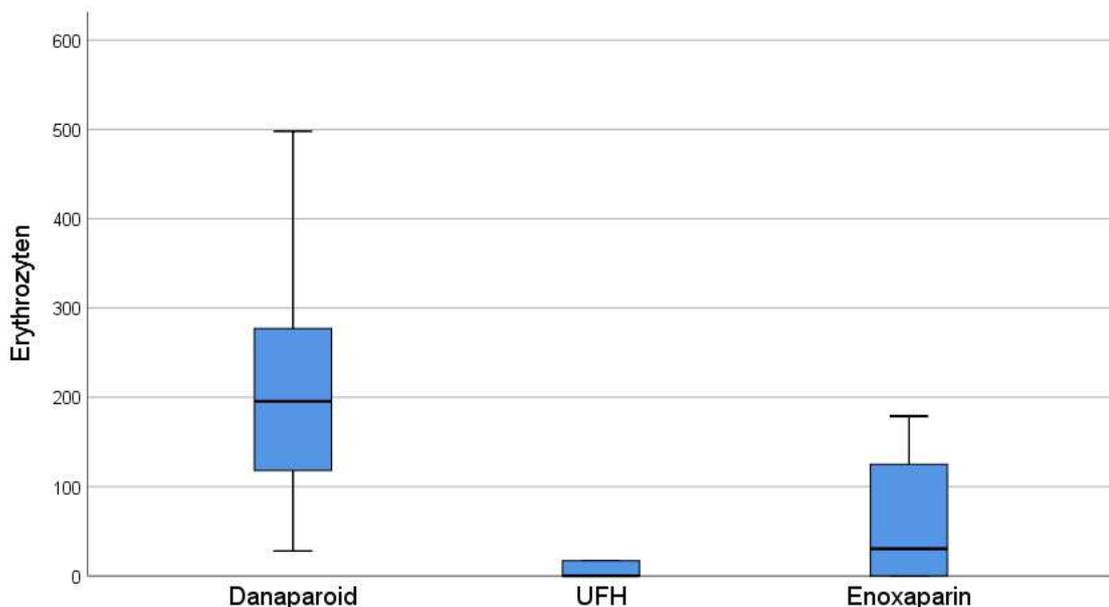


Abbildung 20: Vergleich der Menge der abgelagerten Erythrozyten (Boxplot) an den Klappenflügeln auf einer Fläche von $100 \times 150 \mu\text{m}$ für die drei untersuchten Antikoagulanzen ($p = 0,002$; Subgruppenanalysen: Danaparoid-UFH: $p = 0,002$ / Danaparoid-Enoxaparin: $p = 0,061$ / UFH-Enoxaparin: $p = 0,839$)

Thrombozyten

Zwischen den drei getesteten Antikoagulanzen kam es zu Unterschieden in der Menge der auf den Klappenflügeln abgelagerten Thrombozyten. Die Zahl der im erfassten

Bildausschnitt abgelagerten Thrombozyten betrug unter Antikoagulation mit Danaparoid im Mittel 23 ± 47 (Median 6; IQR = 19), unter UFH 411 ± 306 (Median 342; IQR = 525) und unter Enoxaparin 566 ± 202 (Median 650,5; IQR = 266).

Somit kam es unter Danaparoid zu wesentlich weniger abgelagerten Thrombozyten als unter Anwendung von UFH und Enoxaparin. Zwischen UFH und Enoxaparin konnte kein relevanter Unterschied bezüglich der Menge der abgelagerten Thrombozyten festgestellt werden. **Abbildung 21** gibt einen graphischen Überblick über die Menge der abgelagerten Thrombozyten.

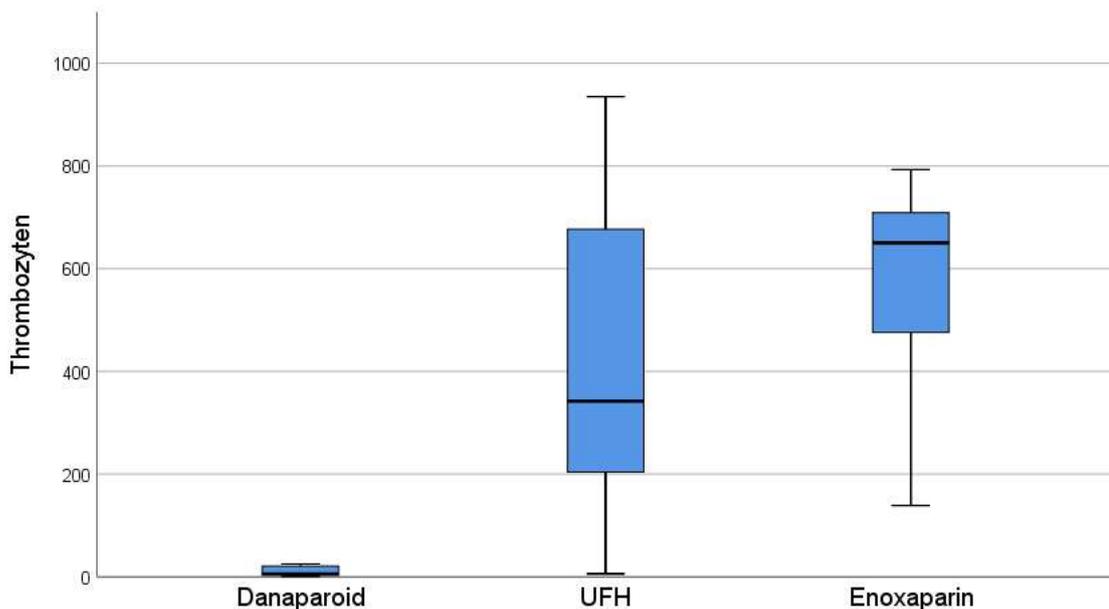


Abbildung 21: Vergleich der Menge der abgelagerten Thrombozyten (Boxplot) an den Klappenflügeln auf einer Fläche von $100 \times 150 \mu\text{m}$ für die drei untersuchten Antikoagulanzen ($p < 0,001$; Subgruppenanalysen: Danaparoid-UFH: $p = 0,006$ / Danaparoid-Enoxaparin: $p < 0,001$ / UFH-Enoxaparin: $p = 1,0$)

4.2.3 Laborparameter

Anti-Faktor-Xa-Aktivität

Analog zu den durchgeführten Versuchen im Herzkatheterthrombose-Modell wurden auch während der Versuche mit dem Herzklappenthrombose-Modell zu den Zeitpunkten T0, T30 und T60 Proben zur Bestimmung des Antikoagulationsniveaus entnommen. Für Enoxaparin wurde hierzu die anti-Faktor-Xa-Aktivität für niedermolekulare Heparine bestimmt. Die Mittelwerte und Standardabweichungen der anti-Faktor-Xa-Aktivitäten zu den jeweiligen Zeitpunkten sind in **Tabelle 7** aufgeführt und in **Abbildung 22** graphisch dargestellt. Zu jedem Messzeitpunkt wurde unter Antikoagulation mit Enoxaparin das therapeutische Antikoagulationsniveau erreicht (Ziel: 0,4 bis 1,1 IE/ml).

Tabelle 7: Mittelwerte und Standardabweichungen der anti-Faktor-Xa-Aktivitäten für Enoxaparin [IE/ml] und Danaparoid [E/ml] zu Versuchsbeginn (T0), nach 30 min (T30) sowie nach 60 min (T60) Versuchslaufzeit im Herzklappenthrombose-Modell

Antikoagulans	Anti-Xa-Aktivität T0 ± SD	Anti-Xa-Aktivität T30 ± SD	Anti-Xa-Aktivität T60 ± SD
Enoxaparin [IE/ml]	0,77 ± 0,08	0,81 ± 0,06	0,81 ± 0,07
Danaparoid [E/ml]	0,57 ± 0,15	0,53 ± 0,16	0,53 ± 0,14

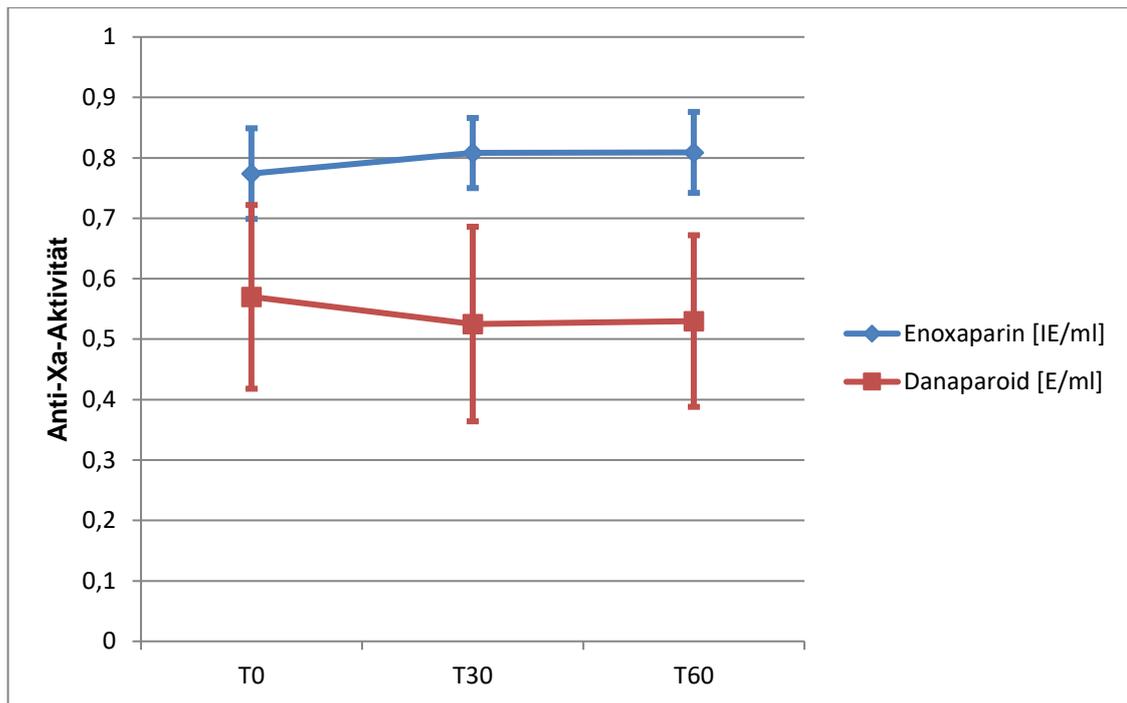


Abbildung 22: Darstellung der anti-Faktor-Xa-Aktivität für Enoxaparin und Danaparoid zu Versuchsbeginn (T0), nach 30 min (T30) sowie nach 60 min (T60) Versuchslaufzeit im Herzklappenthrombose-Modell

Während der Versuchsdurchläufe mit Danaparoid wurden ebenfalls zu den Zeitpunkten T0, T30 und T60 Proben zur Bestimmung der entsprechenden anti-Faktor-Xa-Aktivität genommen. Die Mittelwerte und Standardabweichungen hierfür sind in **Tabelle 7** aufgeführt. Der Zielbereich für eine therapeutische Antikoagulation mit Danaparoid liegt zwischen 0,5 und 0,8 anti-Faktor-Xa-Einheiten/ml. Zu jedem Messzeitpunkt wurde das therapeutische Antikoagulationsniveau erreicht.

Activated Clotting Time (ACT)

Die Bestimmung der activated clotting time zur Überprüfung des Antikoagulationsniveaus während der Versuchsdurchläufe mit UFH erfolgte ebenfalls

zu Versuchsbeginn (T0) sowie nach 30 min (T30) und 60 min (T60) Versuchslaufzeit. Die entsprechenden Mittelwerte und Standardabweichungen sind in **Tabelle 8** aufgeführt. Zu jedem der Messzeitpunkte wurde das gewünschte therapeutische Antikoagulationsniveau von ≥ 300 Sekunden erreicht. In **Abbildung 23** sind die Mittelwerte graphisch dargestellt.

Tabelle 8: Mittelwerte und Standardabweichungen der activated clotting time zu Versuchsbeginn (T0), nach 30 min (T30) sowie nach 60 min (T60) Versuchslaufzeit im Herzklappenthrombose-Modell

Antikoagulans	ACT [s] \pm SD T0	ACT [s] \pm SD T30	ACT [s] \pm SD T60
UFH	302 \pm 31	312 \pm 27	315 \pm 36

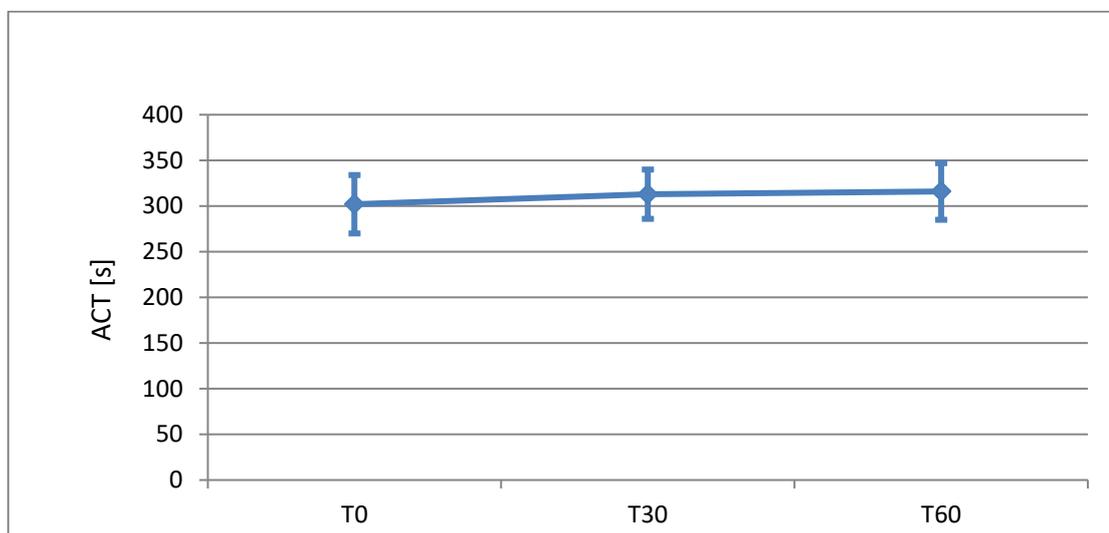


Abbildung 23: Darstellung der activated clotting time für UFH zu Versuchsbeginn (T0), nach 30 min (T30) sowie nach 60 min (T60) Versuchslaufzeit im Herzklappenthrombose-Modell

D-Dimere

Nach 60 min Versuchslaufzeit kam es tendenziell zur vermehrten Bildung von D-Dimeren unter Anwendung von UFH als Antikoagulans. In der Analyse ergab sich jedoch kein relevanter Unterschied in der Menge der entstandenen D-Dimere zwischen den getesteten Antikoagulanzen. Unter Antikoagulation mit Danaparoid entstanden im Mittel $0,219 \pm 0,090$ $\mu\text{g/ml}$ (Median $0,19$ $\mu\text{g/ml}$; IQR = $0,05$), unter UFH $1,166 \pm 2,817$ $\mu\text{g/ml}$ (Median $0,24$ $\mu\text{g/ml}$; IQR = $0,22$) und unter Enoxaparin $0,570 \pm 0,52$ $\mu\text{g/ml}$ (Median $0,35$ $\mu\text{g/ml}$; IQR = $0,62$) D-Dimere.

Abbildung 24 gibt eine Übersicht über die nach 60 min Versuchslaufzeit gebildeten D-Dimere.

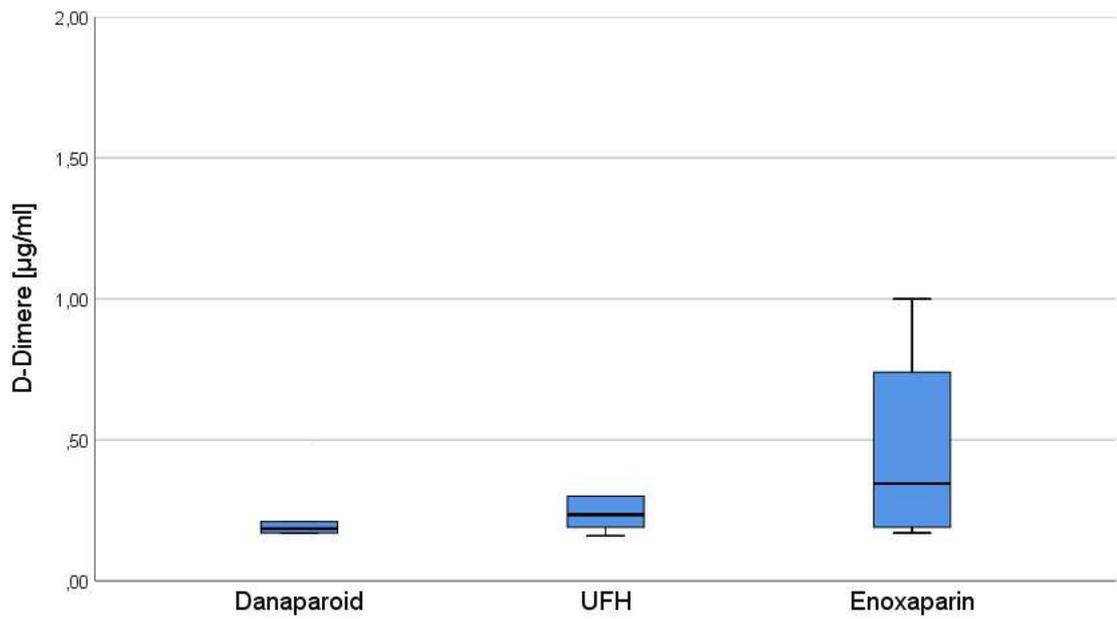


Abbildung 24: Vergleich der D-Dimer-Spiegel (Boxplot) für die drei untersuchten Antikoagulanzen nach 60 min Versuchslaufzeit im Herzklappenthrombose-Modell ($p = 0,097$)

5 Diskussion

Die häufigste Indikation für den Einsatz von Danaparoid als Antikoagulans im klinischen Alltag ist das Vorliegen einer HIT bei Patienten, welche eine parenterale Antikoagulation benötigen, z.B. im Rahmen einer perkutanen Koronarintervention oder im perioperativen Management bei Patienten mit mechanischem Herzklappenersatz.

Ziel der vorliegenden Arbeit war deshalb ein Vergleich der antithrombotischen Wirkung von Danaparoid mit den etablierten Antikoagulanzen unfraktioniertes Heparin (UFH) und Enoxaparin anhand eines Herzkatheter- sowie eines Herzklappenthrombose-Modells.

5.1 Heparin-induzierte Thrombozytopenie (HIT)

Die HIT stellt die am meisten gefürchtete Komplikation der Heparintherapie dar, da sie zu einem potentiell lebensbedrohlichen Abfall der Thrombozytenzahl im Blut führt. Man unterscheidet dabei nach Verlauf und Pathogenese zwei Formen der HIT.

Die Heparin-induzierte Thrombozytopenie Typ I ist nicht-immunologisch bedingt, tritt bei etwa 10 bis 30% der mit Heparin behandelten Patienten auf und ist damit die Häufigere der beiden HIT-Formen. Sie tritt typischerweise bereits innerhalb weniger Tage nach Beginn der Heparintherapie auf.⁶⁸ Diese Form der HIT führt zu einer milden und transienten Thrombozytopenie, wobei die Thrombozytenzahl nur selten auf Werte unter 100.000/ μ l sinkt. Ursächlich ist hierbei eine vermehrte Aktivierbarkeit der Thrombozyten vor allem bei hochdosierter Gabe von Heparin. Vermittelt durch eine direkte Interaktion zwischen Heparin und den zirkulierenden Thrombozyten kommt es zur vermehrten Thrombozytenaggregation. Dieser Subtyp der HIT verläuft asymptomatisch und selbstlimitierend. Weder das Blutungsrisiko noch das Risiko für die Entstehung von thrombotischen Komplikationen ist erhöht. Daher ist ein Absetzen der Heparintherapie nicht notwendig.⁴³

Die Heparin-induzierte Thrombozytopenie Typ II (HIT) erfordert hingegen ein sofortiges Beenden der Heparintherapie. Ursächlich ist hier die Bildung von Antikörpern, welche zur Thrombozytenaktivierung führen, was zum einen den Verbrauch von Blutplättchen und damit ein vermehrtes Blutungsrisiko bedingt und zum anderen die Bildung venöser und arterieller Thrombosen hervorruft. Das Risiko der Bildung von Heparin-Plättchenfaktor-4-Antikörpern (HIT-Antikörpern) ist unter anderem abhängig vom verwendeten Heparin, der Dauer der Heparintherapie und der zugrunde liegenden Indikation zur Antikoagulation.⁴³ So tritt eine HIT wesentlich häufiger bei der Therapie

mit UFH als mit niedermolekularem Heparin und unter Verwendung von Rinder-Heparin häufiger als bei Schweine-Heparin auf.⁴³ Das Risiko steigt zudem mit zunehmender Dauer der Heparintherapie.⁶⁹ Die Inzidenz der Bildung von HIT-Antikörpern ist mit etwa 8 % der mit Heparin behandelten Patienten relativ hoch⁷⁰, jedoch tritt nur bei 0,2 – 3 % der Patienten unter Heparintherapie klinisch tatsächlich eine HIT auf.⁷¹ Von diesen Patienten entwickelt etwa ein Drittel venöse oder arterielle Thrombosen.⁷⁰

Meist tritt die HIT erst fünf bis zehn Tage nach Beginn der Therapie mit Heparin auf.⁶⁹ Bei Patienten, welche bereits zuvor Heparin erhalten haben, kann es bei einer Re-Exposition jedoch auch innerhalb von Stunden zu einer HIT mit massivem Abfall der Thrombozyten, meist auf Werte zwischen 40.000 und 60.000/ μ l, kommen. Parallel zum ausgeprägten Abfall der Thrombozytenzahl mit konsekutiv potentiell erhöhtem Blutungsrisiko kommt es bei der HIT zu einer Hyperkoagulabilität, welche multifaktoriell bedingt ist. Es kommt zur Entstehung von Immunkomplexen, massiver Thrombinbildung, Aktivierung des Gewebefaktors sowie zur Neutralisation der gerinnungshemmenden Wirkung von Heparin.⁷² Die Heparinmoleküle, negativ geladene Mucopolysaccharide, binden an den positiv geladenen Plättchenfaktor 4 (PF 4). PF 4 ist ein kleines Protein, welches in den α -Granula der Thrombozyten gespeichert und bei deren Aktivierung freigesetzt wird. Diese Bindung führt zur Neutralisation des antikoagulatorischen Effektes von Heparin.⁷² Die Affinität des Heparins zum PF 4 ist abhängig vom Molekulargewicht, der Kettenlänge und dem Sulfatierungsgrad des Heparins, was die unterschiedliche Inzidenz der HIT bei Anwendung verschiedener Heparin-Formen erklärt.⁴³ Die Bindung des Heparins an den PF 4 führt zu dessen Konformationsänderung - durch die nun exponierten Epitope wirkt er immunogen, was die Bildung von Antikörpern induziert.⁷³ Diese binden mit ihrem F_{ab}-Teil an den Heparin/PF4-Komplex und anschließend mit ihrem F_c-Teil an die F_c-Rezeptoren der Thrombozyten. Dies führt zur starken Aktivierung der Blutplättchen, zu enormer Fibrinbildung und der intensivierten Bildung des Gewebefaktors.⁷² Diese Vorgänge münden in einer Hyperkoagulation mit Bildung von Thrombozytenaggregaten. Trotz der entstehenden Thrombozytopenie sind schwerwiegende Blutungskomplikationen selten, jedoch ist die HIT stark assoziiert mit thrombembolischen Komplikationen.⁴³ Hierbei sind venöse Thrombosen viermal häufiger als arterielle, wobei jedoch insbesondere die arteriellen Thrombosen eine hohe Mortalitätsrate (30%) aufweisen.⁷⁴ Mögliche schwere und die Patienten nachhaltig beeinträchtigende Komplikationen der HIT sind neben der tiefen Venenthrombose und arteriellen Verschlüssen von Extremitätengefäßen vor allem die

Lungenarterienembolie, der akute Myokardinfarkt und der thrombembolische Schlaganfall.⁴³

Aufgrund der hohen Mortalität sind beim Auftreten der HIT eine schnelle Diagnostik und Therapie erforderlich. Die Verdachtsdiagnose wird vor allem klinisch gestellt und kann durch den laborchemischen Nachweis der HIT-Antikörper gestützt werden. In der Akutsituation sollte allerdings nicht der Antikörper-Nachweis abgewartet, sondern sofort mit der Therapie begonnen werden.⁷⁵ Als Kriterien für die Diagnosestellung der HIT können verschiedene Faktoren herangezogen werden. So sollte bei dem Auftreten einer Thrombozytopenie oder von Thrombosen während oder kurz nach einer Heparintherapie stets an eine HIT gedacht werden.⁷³ Typisch ist ein absoluter ($<150.000/\mu\text{l}$) oder relativer ($>50\%$) Abfall der Thrombozytenzahl, die vor Beginn einer Heparintherapie immer bestimmt werden sollte. Nach Absetzen der Heparintherapie dauert es meist zwei bis drei Tage bis zum Wiederanstieg der Thrombozytenzahl⁴³ und etwa fünf bis zehn Tage bis zu deren Normalisierung.⁷³

Die ‚4 Ts‘ nach Warkentin (**Tabelle 9**) dienen der Abschätzung der klinischen Wahrscheinlichkeit einer HIT und weisen einen hohen negativen prädiktiven Wert auf.⁷⁴ Wird eine HIT diagnostiziert, sollte die Heparinzufuhr sofort unterbrochen und eine alternative Antikoagulation begonnen werden. Niedermolekulare Heparine und die alleinige Gabe von Cumarinen sind für diese Indikation ungeeignet. Bei niedermolekularen Heparinen besteht das Risiko der Kreuzreaktivität der HIT-Antikörper und damit eines Voranschreitens der Erkrankung.⁴³ Die alleinige Gabe von Cumarinen steigert das Risiko für die venöse Extremitätengangrän⁷³ und kann zudem bereits bestehende Thrombosen aggravieren und Hautnekrosen verursachen.⁴³ Aus diesem Grund sollte die Cumarintherapie möglichst erst begonnen werden, wenn sich die Thrombozytenzahl wieder normalisiert hat oder sich mindestens bei $>100.000/\mu\text{l}$ befindet.⁷³

Zur alternativen Antikoagulation bei einer HIT sind der direkte Thrombininhibitor Argatroban und der Faktor-Xa-Inhibitor Danaparoid zugelassen. Ist bei Patienten mit einer HIT eine Koronarintervention erforderlich, wird in den aktuellen europäischen Leitlinien der Einsatz von Bivalirudin empfohlen.⁹

Bei allen Patienten mit einer HIT sollte ein Monitoring für thrombembolische Ereignisse erfolgen und die Thrombozytenzahl regelmäßig kontrolliert werden, bis diese sich wieder normalisiert hat. Transfusionen von Thrombozytenkonzentraten sollten wegen der hyperkoagulatorischen Neigung und damit der Gefahr der Entstehung weiterer Thrombosen vermieden und nur bei schwerwiegenden Blutungskomplikationen

erwogen werden.⁴³ Um das Auftreten einer HIT zu vermeiden, sollten anstelle von UFH, wenn möglich, niedermolekulare Heparine Anwendung finden, da bei diesen das absolute Risiko der HIT-Entstehung geringer ist.⁷⁴ Zudem ist die Heparintherapie auf so kurze Zeit wie möglich zu limitieren. Nach einer HIT sollte lebenslang eine Re-Exposition mit Heparinen vermieden und eine alternative Antikoagulation gewählt werden.⁴³

Tabelle 9: ‚4 Ts‘ nach Warkentin. Adaptiert.⁷⁴

Wahrscheinlichkeit für eine HIT: 6-8 Punkte: hoch; 4-5 Punkte: mittel; 0-3 Punkte: gering

Kategorie	2 Punkte	1 Punkt	0 Punkte
Thrombozytopenie	Abfall der Thrombozytenzahl >50% und Nadir $\geq 20.000/\mu\text{l}$	Abfall der Thrombozytenzahl um 30-50% oder Nadir zwischen 10.000 und 19.000/ μl	Abfall der Thrombozytenzahl um <30% oder Nadir <10.000/ μl
Zeit (Timing) des Thrombozytenabfalls	Beginn an Tag 5-10 nach Heparin-gabe oder ≤ 1 Tag bei Heparinexposition in den letzten 30 Tagen	stetiger, aber unklarer Abfall der Thrombozytenzahl zwischen Tag 5 und 10 nach Heparin-gabe (z.B. fehlende Messungen) oder Beginn nach Tag 10 oder ≤ 1 Tag bei Heparinexposition in letzten 30-100 Tagen	Plättchenabfall ≤ 4 Tage nach Beginn der Heparintherapie
Thrombosen oder andere HIT-Folgen	bestätigte Thrombose, Hautnekrose oder akute systemische Reaktion nach Heparin-gabe	vermutete Thrombose oder fortschreitende Thrombose oder erythematöse, nicht nekrotische Hautläsion nach Heparin-gabe	Keine
Andere mögliche Gründe der Thrombozytopenie	Keine	andere Ursache möglich	andere Ursache sicher

5.2 Wesentliche Befunde der in-vitro-Untersuchungen

Zwischen den beiden Modellen - dem Herzkatheterthrombose-Modell im Sinne eines low-flow-Modells und dem Herzklappenthrombose-Modell als high-flow-Modell mit erhöhtem Scherstress - konnten relevante Unterschiede bezüglich der Effektivität der getesteten Substanzen in Hinsicht auf die Prävention einer Thrombusgeneration gezeigt werden. So fand sich im Herzkatheterthrombose-Modell eine deutlich stärkere intraluminale Thrombusbildung bei Einsatz von Danaparoid sowohl im Vergleich zu

UFH als auch zu Enoxaparin, während zwischen UFH und Enoxaparin kein relevanter Unterschied gefunden werden konnte.

Im Gegensatz dazu zeichnete sich Danaparoid im Herzklappenthrombose-Modell durch eine geringere Bildung thrombotischen Materials und weniger Ablagerung von Thrombozyten, Erythrozyten und Fibrin an der Klappenprothese im Vergleich zu den beiden anderen Antikoagulanzen aus. Bezüglich des Thrombusgewichtes konnte auch zwischen UFH und Enoxaparin ein deutlicher Unterschied gesehen werden: unter Antikoagulation mit UFH bildete sich weniger thrombotisches Material als unter Enoxaparin.

Im Folgenden sollen die Ergebnisse sowie mögliche Ursachen der verminderten antithrombotischen Effektivität der Substanz Danaparoid im Herzkatheterthrombose-Modell bei guter Effektivität im Herzklappenthrombose-Modell diskutiert werden.

5.3 Danaparoid in der klinischen Routine

Danaparoid ist aktuell vor allem in europäischen Ländern sowie Kanada und Australien als Antikoagulans zugelassen. Seine antikoagulatorische Wirksamkeit konnte in Studien in den frühen 1980er Jahren belegt werden. So berichteten Meuleman et al. 1982 über Danaparoid als ein neues effektives antithrombotisches Medikament mit geringen Blutungskomplikationen, welches sie an Thrombose- und Blutungsmodellen in Ratten getestet hatten. Aufgrund der ausgeprägten anti-Faktor-Xa-Aktivität bei deutlich geringerer anti-Thrombin-Aktivität erwies sich die aPTT als ungeeignetes Messinstrument zur Therapiekontrolle. Danaparoid zeigte bei einer gleichwertigen antithrombotischen Aktivität im Vergleich zu UFH eine deutlich geringere Induktion relevanter Blutungen, was auf einen fehlenden Einfluss des Danaparoids auf die physiologische Thrombozytenfunktion zurückgeführt wurde.⁷⁶

Kasuistisch wurde 1983 von Harenberg et al. über die erfolgreiche Therapie mit Danaparoid bei einem Patienten berichtet, der aufgrund einer Lungenarterienembolie Heparin erhielt und daraufhin eine HIT mit Thrombosen entwickelte. Nach Absetzen des Heparins und alternativer Antikoagulation mit Danaparoid normalisierte sich die Thrombozytenzahl innerhalb von zwei Wochen.⁷⁷

Nach anfänglicher Euphorie über das neue Antikoagulans gab es in den kommenden Jahren Berichte über erneute Thrombosen bei Patienten mit einer HIT, bei welchen Heparin durch Danaparoid zur Antikoagulation ersetzt wurde. Tatsächlich ist die chemische Zusammensetzung Danaparoids den Heparinfragmenten sehr ähnlich.

Diese chemische Verwandtschaft führt zu einer potentiellen Kreuzreaktivität Danaparoids mit den HIT-Antikörpern.⁷⁸ Die Angaben zur Häufigkeit des Auftretens dieser Kreuzreaktivität unter in-vitro-Bedingungen variieren von 10-15%⁷⁸ bis hin zu 50% in einer aktuellen Untersuchung aus 2017.⁴² Im Gegensatz dazu scheint das Auftreten einer Kreuzreaktivität von Danaparoid mit HIT-Antikörpern in-vivo mit ca. 3% sehr selten zu sein.⁷⁸

Dennoch existieren Berichte über Patienten mit einer HIT, welche unter einer Therapie mit Danaparoid arterielle oder venöse Thrombosen erlitten.⁷⁸ Als mögliche Ursache wurde das Nichterreichen einer therapeutischen Dosis von Danaparoid diskutiert. Zudem sollten auch Patienten, bei denen das initiale Screening auf Antikörper negativ ausfiel, unter Danaparoid-Therapie engmaschig klinische und laborchemische Kontrollen erfahren. Bei neu auftretenden Thrombosen und/oder einem fehlenden Anstieg der Thrombozyten sollte sicherheitshalber auf ein anderes Antikoagulans gewechselt werden. Unter Beachtung dieser Limitationen ist Danaparoid ein sicheres und effizientes Antikoagulans für Patienten mit einer HIT.

In einer Studie mit 42 Patienten und nachgewiesener HIT unter Heparintherapie konnte Danaparoid auch bei kritisch Kranken, welche ja *per se* eine aktivierte Gerinnung aufweisen, erfolgreich eingesetzt werden. Bei den beobachteten Patienten traten unter Antikoagulation mit Danaparoid keine neuen thrombotischen Ereignisse auf, weder unter prophylaktischer noch unter therapeutischer Dosierung.⁴⁴

5.3.1 Kardiochirurgie

Eine besondere Patientengruppe stellen herzchirurgische Patienten dar, da diese - bedingt durch den Einsatz hoher Heparin-Dosierungen im Rahmen der extrakorporalen Zirkulation - ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung von HIT-Antikörpern haben.

Foroughinia et al. berichten, dass 25 bis 50 % der herzchirurgischen Patienten bis zehn Tage postoperativ HIT-Antikörper entwickeln.⁷⁹ Selleng et Selleng⁸⁰ berichten sogar von bis zu 75 %. Die klinische Inzidenz einer HIT liegt dennoch postoperativ bei nur etwa einem Prozent,⁸⁰ ist jedoch mit einem 50%igem Anstieg der Mortalitätsrate verbunden.⁴²

Magnani et Gallus untersuchten die Wirkung von Danaparoid bei chirurgischen Patienten und berichteten über eine hohe, dosisabhängige Blutungsrate bei Patienten nach kardiochirurgischen Eingriffen. Bei allen anderen untersuchten OP-Arten konnte Danaparoid hingegen sicher eingesetzt werden.⁸¹

In einer kleinen Studie wurde Danaparoid bei 15 herzchirurgischen Patienten mit einer HIT als alternatives Antikoagulans eingesetzt.⁷⁹ 14 dieser Patienten konnten damit erfolgreich therapiert werden, bei einem Patienten persistierte die Thrombozytopenie. Gründe für das Versagen Danaparoids sahen die Autoren unter anderem im Verbrauch des für die Danaparoid-Wirkung notwendigen Antithrombins, welches in solchen Situationen ggf. substituiert werden sollte. Außerdem sind zu niedrige Dosierungen und damit verbundene subtherapeutische Spiegel von Danaparoid zu vermeiden und eine Kreuzreaktivität mit den HIT-Antikörpern auszuschließen.⁷⁹

5.3.2 Schwangerschaft

Eine besondere Herausforderung bei der Antikoagulation stellen schwangere Patientinnen dar, da bei ihnen die meisten Antikoagulanzen aufgrund einer Plazentagängigkeit mit entsprechendem Blutungsrisiko bei den Feten oder aufgrund einer teratogenen Wirkung kontraindiziert sind. Lindhoff-Last et al. untersuchten die Effektivität und Sicherheit von Danaparoid bei 49 schwangeren Patientinnen, welche UFH aufgrund einer HIT oder UFH-Unverträglichkeit nicht weiter erhalten konnten. In 72% der Fälle konnten bei Danaparoid-Verabreichung bis zur Entbindung gesunde Kinder entwickelt werden. Bei vier Patientinnen traten während der Therapie neue Thrombosen auf, welche mittels Erhöhung der Danaparoid-Dosis oder Umstellung auf eine andere Antikoagulation behandelt wurden. Abgesehen von Fällen mit akzidenteller Überdosierung des Antikoagulans war die Inzidenz von Spontanblutungen gering.⁸² Gerhardt et al. berichteten über zwei Patientinnen, welche jeweils nach mechanischem Herzkappenersatz während der Schwangerschaft Danaparoid zur Antikoagulation erhielten. Während bei einer Patientin keinerlei Blutungskomplikationen auftraten, entwickelte die zweite Patientin ein Plazenta-Hämatom, welches sich aber im Verlauf größenkonstant zeigte. Während der Sectio traten auch bei dieser Patientin keinerlei Blutungskomplikationen auf.⁸³ Insgesamt scheint Danaparoid auch bei schwangeren Patientinnen - unter regelmäßigen klinischen und laborchemischen Kontrollen - sicher angewandt werden zu können.

5.3.3 Pädiatrie

Auch für die Anwendung von Danaparoid bei pädiatrischen Patienten existieren Berichte.

In einer kleineren Studie konnte bei 34 Kindern im Alter von 2 Wochen bis 17 Jahren mit Vorliegen einer HIT gezeigt werden, dass Danaparoid auch bei pädiatrischen Patienten ein effektives und sicheres Antikoagulans ist.⁸⁴ Die Mortalität lag unter Therapie mit Danaparoid nicht höher als die Gesamtmortalität der HIT-Patienten mit

anderen Antikoagulations-Strategien. Lediglich bei Fällen, in denen operative Eingriffe unter Nutzung einer Herz-Lungen-Maschine notwendig waren, fiel eine erhöhte Mortalitätsrate auf, sodass der Einsatz von Danaparoid in diesen Fällen nicht zu empfehlen ist.⁸⁴ Die Dosierung sollte sich bei Kindern am erreichten Plasma-anti-Xa-Spiegel orientieren (Ziel 0,5-0,8 E/ml).⁸⁵ Hierbei scheinen Kinder unter zwei Jahren eine höhere Dosierung je Kilogramm Körpergewicht zu benötigen als ältere Kinder und Erwachsene.⁸⁴

Zusammengefasst ist Danaparoid anhand der bisherigen Studienlage bei exakter Dosierung und ggf. deren Anpassung anhand des anti-Faktor-Xa-Spiegels sowie bei Beachtung der Kontraindikationen (z.B. fortgeschrittene Leber- oder Niereninsuffizienz und hämorrhagische Diathese) ein effektives und sicheres Antikoagulans, welches sogar bei kritisch kranken Patienten und während der Schwangerschaft eingesetzt werden kann.

5.4 Unterschiede in der Wirkungsweise der genutzten Antikoagulanzen

Obwohl alle drei getesteten Substanzen ihre antikoagulatorische Wirkung über eine Hemmung der aktivierten Gerinnungsfaktoren X und II entfalten, gibt es Unterschiede in den Wirkungsweisen sowie dem Verhältnis der Inhibition der einzelnen Gerinnungsfaktoren.

5.4.1 Unfraktioniertes Heparin

Unfraktioniertes Heparin besteht aus einer Mischung aus Glykosaminoglykanen mit einer mittleren Molekulargröße von 15 kDa.⁸⁶ Es führt über eine Antithrombin-vermittelte Inhibition zu einer etwa gleichwertigen Hemmung der aktivierten Gerinnungsfaktoren II und X.³⁹ Dabei verstärkt es die Antithrombin-Aktivität um den Faktor 1000 bis 4000. Antithrombin inaktiviert vor allem die Faktoren IIa (Thrombin) und Xa, in deutlich geringerem Maße auch die Faktoren IXa, XIa und XIIa. Die Wirkung des UFH gegen die Faktoren IIa und Xa ist geringer, wenn diese Fibrin-gebunden, in einem Thrombus oder an aktivierte Thrombozyten gebunden sind.⁸⁶ Da das Ausmaß der Gerinnungshemmung als Antwort auf eine fixe Dosis des unfraktionierten Heparins interindividuell variiert, ist ein regelmäßiges laborchemisches Monitoring notwendig, um eine therapeutische Antikoagulation sicherzustellen.⁸⁷

5.4.2 Niedermolekulare Heparine

Auch niedermolekulare Heparine (LMWH) wie Enoxaparin bestehen aus einer Mischung anionischer Glykosaminoglykane, jedoch ist die Molekulargröße mit 4 bis 8 kDa geringer als bei UFH.⁸⁶ LMWH werden durch chemische oder enzymatische

Depolymerisation aus unfraktioniertem Heparin gewonnen.⁸⁷ Sie binden ebenfalls Antithrombin, haben jedoch aufgrund ihrer kurzen Kettenlänge eine geringere Affinität zu Thrombin.⁸⁶ Da der überwiegende Teil der LMWH-Ketten zu kurz ist, um sowohl Antithrombin als auch Thrombin zu binden, ist eine Thrombininaktivierung durch diese Ketten nicht möglich. Die anti-Xa-Wirkung bleibt bestehen, da hierfür die Antithrombin-Bindung ausreichend ist.⁸⁷ Das Verhältnis der Hemmung der Faktoren Xa und IIa liegt mit ca. 14:1 entsprechend deutlich über dem des unfraktionierten Heparins (1:1).³⁹ Der antithrombotische Effekt der niedermolekularen Heparine korreliert bei normaler Nierenfunktion mit dem Körpergewicht, sodass feste gewichtsadaptierte Dosierungen angewandt werden können und regulär keine laborchemischen Kontrolluntersuchungen notwendig sind. Bei Nierenfunktionsstörungen muss jedoch eine entsprechende Dosisanpassung erfolgen - gegebenenfalls auch anhand des Monitorings der anti-Xa-Aktivität im Blut.⁸⁶

5.4.3 Danaparoid

Danaparoid ist ein Heparinoid, welches aus Schweinedarmmukosa gewonnen wird und sich aus einer Mischung aus Heparan- (84%), Dermatan- (12%) und Chondroitinsulfat (4%) zusammensetzt.⁸⁸ Mit etwa 5,6 kDa hat es - analog den LMWH - ein geringeres Molekulargewicht als UFH.⁸⁶ Auch wenn es sich in seiner Glykosaminoglykanstruktur weitgehend von den Heparinen unterscheidet, so enthält doch eine Teilfraktion des Heparansulfats die gleiche Pentasaccharid-Sequenz wie UFH und die niedermolekularen Heparine, welche eine hohe Affinität zu Antithrombin hat und damit zur AT-vermittelten Inhibierung des Gerinnungsfaktors Xa führt. Hierdurch wird die Fibrin- und Thrombingenerierung gehemmt. Die Dermatansulfat-Komponente des Danaparoids aktiviert den Thrombin inhibierenden Heparin-Kofaktor II.⁸⁸ Die Hemmung des aktivierten Faktors X gegenüber dem Faktor IIa überwiegt dabei deutlich.⁸⁹ Danaparoid ist damit ein selektiverer Faktor-Xa-Inhibitor als UFH und Enoxaparin. Ein laborchemisches Monitoring ist entsprechend über die Bestimmung der anti-Xa-Aktivität möglich.

Zusammengefasst unterscheiden sich die drei untersuchten Antikoagulanzen zum einen im Molekulargewicht – UFH hat mit 15 kDa das doppelte bis dreifache Molekulargewicht im Vergleich zu LMWH und Danaparoid - zum anderen durch das Verhältnis der Hemmung von Faktor Xa zu Faktor IIa. Während dieses bei UFH mit 1:1 ausgeglichen ist, wird Faktor Xa durch LMWH bereits deutlich stärker (14:1) als Faktor IIa inhibiert. Danaparoid ist in diesem Vergleich mit 28:1 als überwiegender Faktor-Xa-Inhibitor zu betrachten.

5.5 Unterschiede zwischen den Thrombosemodellen

Wo immer Blut durch ein Gefäß fließt, entstehen Scherkräfte. Diese führen zu Scherstress am Endothel, wodurch eine Mechanotransduktion induziert wird. Hierbei erfolgt die Konversion des mechanischen Stresses in eine biochemische Antwort. Die Endothelzellen sezernieren Proteine, welche den Gefäßtonus und die Gefäßstruktur verändern können.⁹⁰ Durch Scherkräfte aktivierte Endothelzellen sezernieren zudem tissue factor, welcher ein Initiator der Blutgerinnung ist.⁹¹ Ruggeri et al.⁹² konnten zeigen, dass auch die Thrombozytenadhäsion und -aggregation durch Scherkräfte relevant beeinflusst wird. Eine Dehnung adhärenter und aggregierter Thrombozyten führt zu Formveränderungen, welche eine weitere Thrombozytenadhäsion und -aggregation begünstigen. Werden Thrombozyten hohen Scherkräften ausgesetzt, so können diese entsprechend aktiviert und der Gerinnungsprozess ausgelöst werden.⁹³ Der Scherstress ist stark abhängig von den lokalen Gegebenheiten. So ist er direkt proportional zur Geschwindigkeit des Blutflusses und indirekt proportional zum Gefäßradius. Zudem ändert er sich bei Strömungshindernissen wie z.B. arteriellen Plaques oder implantierten Devices.⁹⁰ Entsprechend unterscheiden sich die beiden eingesetzten Thrombosemodelle, das Herzkatheter- sowie das Herzklappenthrombose-Modell, deutlich hinsichtlich ihrer Flusseigenschaften und des resultierenden Scherstress von einander, was Einfluss auf die gerinnungshemmende Wirkung der untersuchten Antikoagulanzen hat.

Im Herzkatheterthrombose-Modell, welches an die Bedingungen einer perkutanen Koronarintervention angelehnt ist, herrschen bei einem laminaren Fluss mit einer Flussrate von 3 ml/min low-flow-Bedingungen. Aufgrund der geringen Flussgeschwindigkeit ist nicht von einem relevanten Scherstress für die Thrombozyten auszugehen. Bei diesem Modell sind Kontaktaktivierung über die innere Oberfläche des Katheters sowie Stase die wesentlichen Komponenten, welche zur Aktivierung des Gerinnungssystems führen.

Im Gegensatz dazu handelt es sich bei dem Herzklappenthrombose-Modell um ein high-flow-Modell mit schnellem pulsatilem Fluss und entsprechend großen Scherkräften, insbesondere an der mit hoher Geschwindigkeit perfundierten mechanischen Herzklappe. Wie beim Herzkatheterthrombose-Modell ist auch beim Herzklappenthrombose-Modell von einer relevanten Kontaktaktivierung der Gerinnung auszugehen. Zusätzlich wirken die ausgeprägten Scherkräfte in diesem Modell prokoagulatorisch, wohingegen die Stase hierbei keine Bedeutung hat. Insgesamt ist demnach von einer unterschiedlichen Gerinnungsaktivierung in den genutzten Modellen auszugehen.

Wie unten folgend zu den NOAKs diskutiert, sind Substanzen mit direkter Wirkung an den Faktoren IIa (Dabigatran) bzw. Faktor Xa (Edoxaban, Rivaroxaban, Apixaban) sehr effektiv bei der Thrombembolieprophylaxe und -therapie bei Patienten mit Vorhofflimmern, tiefer Venenthrombose (TVT) und Lungenembolie, konnten aber bisher keine sichere Antikoagulation bei Patienten mit künstlichen Herzklappen - sei es mechanisch²⁶ oder biologisch (TAVI)⁹⁴ - gewährleisten. Auch bei diesen Substanzen wurde analog zu den Untersuchungen dieser Arbeit eine gute antikoagulatorische Wirksamkeit von Faktor Xa- bzw. IIa-beeinflussenden Antikoagulanzen bei der Thrombusgenese im Rahmen einer low-flow/low-shear-stress-Konstellation (TVT, Thrombusbildung im Vorhofohr) konstatiert - im Gegensatz zu einer nicht ausreichenden antikoagulatorischen Wirksamkeit bei einer high-flow/high-shear-stress-Konstellation (mechanischer Klappenersatz).

Betrachtet man vor dem Hintergrund der Unterschiede der drei untersuchten Antikoagulanzen sowie der differentiellen Gerinnungsaktivierung in den Thrombosemodellen die Ergebnisse der antikoagulatorischen Wirkung, so zeigt sich im Herzkatheterthrombosemodell unter low-flow-Bedingungen mit 211 ± 68 mg unter Danaparoid ein im Vergleich zu den beiden anderen Substanzen (Enoxaparin 152 ± 30 mg und UFH 131 ± 15 mg) höheres Thrombusgewicht. Die Menge des abgelagerten Fibrins war hingegen ohne relevanten Unterschied, ebenso die Zahl der abgelagerten Erythrozyten und Thrombozyten. Bei nachgewiesener therapeutischer anti-Xa-Aktivität unter Einsatz von Danaparoid und Enoxaparin (**Tabellen 5 und 7**) könnte also im Hinblick auf die geringere antikoagulatorische Aktivität von Danaparoid im Vergleich zu Enoxaparin das Verhältnis der Hemmung von Faktor Xa und IIa relevant sein. Da Danaparoid bei einer Ratio von 28:1 (Enoxaparin: 14:1) nur eine geringe Wirkung auf den Faktor IIa aufweist, scheint im low-flow-Modell die zusätzliche Beeinflussung des Faktors IIa bei gleicher Hemmung des Faktors Xa von Bedeutung zu sein. Dieses Ergebnis ist dahingehend überraschend, als dass die NOAKs - sowohl bei Beeinflussung des Faktors IIa (Dabigatran) als auch des Faktors Xa (Apixaban, Edoxaban, Rivaroxaban) - in der Prophylaxe und Therapie low-flow-initiiertes Thrombosen effektiv sind.

Im Gegensatz dazu zeigen die Ergebnisse der antikoagulatorischen Wirkung der drei Substanzen im high-flow-Thrombosemodell eine Überlegenheit von Danaparoid. Unerwartet war vor allem, dass für das in der klinischen Routine für Patienten mit mechanischem Herzklappenersatz zur Antikoagulation zugelassene Heparin mit 153 ± 126 mg ein deutlich höheres Thrombusgewicht ermittelt werden konnte als bei Einsatz von Danaparoid mit 3 ± 3 mg. Unter Enoxaparin, welches in der Klinik

insbesondere bei mechanischem Herzklappenersatz nicht zur Antikoagulation zugelassen ist, aber breite Anwendung findet, fand sich das höchste Thrombusgewicht (295 ± 181 mg). Bei aufgrund der großen Standardabweichung nicht sicher verwertbarer Quantifizierung der Erythrozytenablagerungen zeigte sich weiterhin unter Danaparoid im high-flow-Modell eine deutliche Reduktion der abgelagerten Thrombozyten im Vergleich zu den beiden anderen getesteten Antikoagulanzen.

So könnte bezüglich der Vermeidung einer Thrombusgenese unter high-flow/high-shear-stress-Bedingungen die Beeinflussung von Faktor IIa oder Xa relevant sein: während Dabigatran mit überwiegender Hemmung des Faktors IIa für eine effektive Antikoagulation bei mechanischen Klappenprothesen nicht geeignet ist,²⁶ konnte zumindest in einer aktuellen tierexperimentellen Studie für den Faktor Xa-Hemmer Apixaban - wie auch für Danaparoid in der vorliegenden Studie - eine adäquate antikoagulatorische Wirksamkeit bei Klappenprothesen gezeigt werden.⁹⁵

Bis zum Vorliegen weiterer Studien erscheint Danaparoid anhand der vorliegenden Befunde gut zur Antikoagulation bei high-flow/high-shear-stress bedingter Thrombusbildung geeignet zu sein, wohingegen unter low-flow- und Stase-Bedingungen Heparine effektiver sind.

5.6 Vergleich mit der Wirkung Nicht-Vitamin-K-abhängiger oraler Antikoagulanzen

Thromben auf medizinischen Implantaten, welche Kontakt zum Blut haben, setzen sich im Wesentlichen aus Thrombozytenaggregaten und Fibrin zusammen. Die Thrombenbildung wird dabei durch Protein-Adsorption, Zellablagerungen und Aktivierung des Faktors XII (und damit der Initiierung des endogenen Aktivierungswegs der Gerinnungskaskade) begünstigt. Zur Vermeidung solcher Device-assoziierten Thrombosen werden synthetische Biomaterialien erforscht, die in der Lage sind, die Thrombogenität blutstromexponierter Implantate zu reduzieren bzw. idealerweise zu verhindern. So führt zum Beispiel die Beschichtung von Fremdoberflächen mit pyrolytischem Kohlenstoff zu einer Verminderung der Thrombozytenadhäsion.⁹⁶ Nichtsdestotrotz ist weiterhin die systemische Gabe von Thrombozytenaggregationshemmern oder Antikoagulanzen notwendig, um die Bildung von Thromben sowie deren Embolisation bei Patienten mit solchen Devices sicher zu verhindern. Da keine oralen Faktor XII- bzw. Faktor XI-Inhibitoren verfügbar sind, könnten Faktor Xa-Inhibitoren eine mögliche Therapieoption sein.⁹⁷

Auch die Nicht-Vitamin-K-abhängigen oralen Antikoagulanzen (NOAKs) entfalten ihre Wirkung über eine Inhibition der aktivierten Gerinnungsfaktoren X (Rivaroxaban, Apixaban und Edoxaban) bzw. II (Dabigatran). Die Einnahme erfolgt ein- bis zweimal täglich. Mit einer substanzabhängigen typischen Kinetik ist bei normaler Nierenfunktion kein regelmäßiges laborchemisches Monitoring notwendig.

Mehrere klinische Studien konnten in den letzten Jahren belegen, dass die NOAKs den Vitamin-K-Antagonisten bezüglich der Effektivität und Sicherheit bei der Prophylaxe thrombembolischer Ereignisse bei Patienten mit Vorhofflimmern nicht unterlegen bzw. sogar überlegen sind.⁹⁸⁻¹⁰¹ Eine Metaanalyse der vier großen Zulassungsstudien ergab unter Therapie mit den NOAKs im Vergleich zu den Vitamin-K-Antagonisten eine Risikoreduktion um 19% bezogen auf das Auftreten von Schlaganfällen und systemischen Embolien. Insbesondere die Inzidenz hämorrhagischer Insulte konnte hierbei gesenkt werden.¹⁰² Unter Therapie mit den NOAKs zeigten sich in allen vier Studien überwiegend gleiche oder sogar geringere Raten an klinisch relevanten Blutungskomplikationen im Vergleich zu den Vitamin-K-Antagonisten.⁹⁸⁻¹⁰¹ Ausgenommen sind hiervon gastrointestinale Blutungsereignisse, welche unter den NOAKs etwas häufiger gesehen wurden.¹⁰²

Aufgrund dieser Daten sowie der einfachen Handhabbarkeit ohne die Notwendigkeit regelmäßiger laborchemischer Gerinnungskontrollen haben sich die NOAKs rasch im klinischen Alltag fest etabliert. Zugelassen sind sie aktuell zur Prophylaxe von Schlaganfällen und systemischen Embolien bei erwachsenen Patienten mit nicht-valvulärem Vorhofflimmern und einem oder mehreren Risikofaktoren,¹⁰³ zur Prophylaxe von rezidivierenden tiefen Venenthrombosen (TVT) und Lungenembolien sowie zu deren Therapie.³⁴

Patienten mit mechanischem Herzklappenersatz benötigen zur Vermeidung thrombembolischer Komplikationen zwingend eine therapeutische Antikoagulation. Aufgrund der guten Erfahrungen mit den NOAKs bei den oben genannten Indikationen erfolgen auch Studien zum Einsatz dieser Antikoagulanzen nach künstlichem Herzklappenersatz, in der Hoffnung, hier eine potente und sichere Alternative zu den Vitamin-K-Antagonisten zu finden.

In der RE-ALIGN-Studie wurde der direkte Thrombin-Inhibitor Dabigatran bei Patienten mit mechanischem Herzklappenersatz im Vergleich zur etablierten oralen Antikoagulation mit Vitamin-K-Antagonisten untersucht. Die Studie wurde jedoch aufgrund der deutlich erhöhten Thrombembolie- und Blutungsraten in der Dabigatran-Gruppe vorzeitig beendet und alle Teilnehmer auf Vitamin-K-Antagonisten eingestellt.²⁶

Ursächlich für die erhöhte Thrombembolierate sahen die Autoren vor allem die unterschiedlichen Aktionsmechanismen der Antikoagulanzen sowie die unterschiedliche Thrombusgenese bei Vorhofflimmern respektive mechanischen Herzklappen. Bei Vorhofflimmern entstehen Thromben im Vorhofrohr vor allem durch eine Stase des Blutes und eine endotheliale Dysfunktion unter den vorherrschenden Bedingungen mit langsamem Blutfluss und niedrigen Scherkräften. Nach einem mechanischen Herzklappenersatz werden die Gerinnung und Thrombinbildung bereits während der Operation durch Freisetzung von tissue factor aus dem zerstörten Gewebe aktiviert. Die Thrombinbildung wird weiterhin durch die Exposition der Blutbestandteile gegenüber der Fremdoberfläche der mechanischen Herzklappe verstärkt. Der Hauptteil der Thromben scheint am Klappenring zu entstehen, welcher in den ersten Wochen nach der Operation noch nicht endothelialisiert ist. Die intensive Kontaktaktivierung der Gerinnung führt vermutlich zu einer zu hohen Thrombinmenge für die lokalen Plasma-Dabigatranspiegel.²⁶ Die Autoren führen aus, dass zur Thrombembolieprophylaxe nach mechanischem Herzklappenersatz möglicherweise höhere Dabigatran-Plasmaspiegel notwendig sind als bei Vorhofflimmern. Da jedoch mit höherer Dosierung auch ein Anstieg der in der RE-ALIGN-Studie ohnehin schon erhöhten Blutungskomplikationen zu erwarten ist, kann Dabigatran zur Thrombembolieprophylaxe bei mechanischem Herzklappenersatz nicht empfohlen werden.

Auch nach einem transfemorale Aortenklappenersatz (TAVI) besteht für mehrere Monate ein erhöhtes Risiko thrombembolischer Komplikationen. Aufgrund erhöhter Raten thrombembolischer Ereignisse im Vergleich zu einer Plättchenhemmer-basierter Strategie bzw. einer Antikoagulation mit Vitamin-K-Antagonisten sollten NOAKs jedoch nach Implantation einer TAVI nicht eingesetzt werden.^{94,104}

Tierexperimentelle Studien zur Antikoagulation bei mechanischem Herzklappenersatz erfolgten sowohl für Apixaban als auch für Rivaroxaban, welche im Gegensatz zu Dabigatran primär über die Hemmung des Faktors Xa wirken. So konnten für Apixaban vielversprechende Ergebnisse erzielt werden.⁹⁵ In einer kleinen Studie an 16 Schweinen mit alloplastischem Aortenklappenersatz wurde die antikoagulatorische Wirksamkeit von Apixaban gegen eine konventionelle INR-gesteuerte orale Antikoagulation mit Warfarin und gegen keine Antikoagulation getestet. 30 Tage nach dem mechanischen Aortenklappenersatz wurde post mortem das Thrombusgewicht an der Klappenprothese ermittelt: in der Kontrollgruppe ohne Antikoagulation mit 1423 mg, unter Apixaban oral 357,5 mg, unter Warfarin mit einer Ziel-INR von 2 bis 3 (der aktuellen Standardtherapie entsprechend) 247 mg und unter Apixaban intravenös

lediglich 61 mg. Dabei zeigte sich keine Zunahme von Blutungsereignissen unter dem NOAK, sodass Apixaban möglicherweise bei Einsatz suffizienter therapeutischer Spiegel ohne Anstieg der Blutungsrate doch zur Antikoagulation bei mechanischem Klappenersatz geeignet sein könnte. Auch hier wäre anhand der deutlichen Unterschiede der Thrombusgewichte zwischen der oralen und der intravenösen Applikation von Apixaban die Notwendigkeit höherer Plasmaspiegel beim Einsatz als Antikoagulans bei mechanischem Klappenersatz zu diskutieren.

Auch wenn ein Vergleich dieser tierexperimentellen Daten mit denen der vorliegenden Untersuchung (in vivo vs. in vitro, Versuchsdauer 30 Tage vs. 60 min) nur sehr begrenzt sinnvoll erscheint, zeigt sich zwischen den beiden Studien eine Parallele. Sowohl unter intravenöser Applikation von Apixaban als auch unter Zugabe von Danaparoid zum Probandenblut mit dokumentiert therapeutischem anti-Xa-Spiegel wurde jeweils das an den Klappenflügeln abgelagerte Thrombusgewicht ermittelt. Beide Faktor-Xa-Antagonisten zeigten bei parenteraler Gabe gute Ergebnisse bezüglich der Antikoagulation bei mechanischem Herzklappenersatz.

Zu ähnlichen Ergebnissen gelangten Greiten et al.: in einer tierexperimentellen Studie an Schweinen untersuchten sie die Wirkung des peroral verabreichten Faktor-Xa-Inhibitors Rivaroxaban bezüglich der Thrombusvermeidung an mechanischen Herzklappen im Vergleich zu subcutan verabreichtem Enoxaparin. Nach 30 Tagen fand sich unter Antikoagulation mit dem NOAK in therapeutischer Dosierung ein deutlich geringeres Thrombusgewicht als unter Antikoagulation mit Enoxaparin.¹⁰⁵

Auch die Arbeitsgruppe Schlitt et al. hat sowohl für das Herzkatheterthrombose-Modell als auch für das Herzklappenthrombose-Modell zahlreiche Daten zu Faktor-IIa- und Faktor-Xa-Inhibitoren publiziert. So konnte für Rivaroxaban im Herzklappenthrombose-Modell ein dosisabhängiger antithrombotischer Effekt nachgewiesen werden. Während sich das NOAK bei einer Dosierung von 300 ng/ml bezüglich der Thrombusvermeidung an mechanischen Herzklappen genauso effektiv wie UFH und Enoxaparin zeigte, wurden unter niedriger Dosierung (30 ng/ml) deutlich erhöhte Thrombusgewichte registriert.⁵²

Analog zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit bezüglich der antithrombotischen Wirkung von Danaparoid war auch Fondaparinux, ein synthetischer Faktor Xa-Inhibitor, bei der Vermeidung von Katheterthrombosen den Antikoagulanzen UFH und Enoxaparin in mehreren Studien unterlegen.^{50,96} Insgesamt scheint die alleinige Hemmung des Faktors Xa zur effektiven Vermeidung von Katheterthrombosen nicht ausreichend zu sein. UFH konnte in diesen Studien mittels Hemmung mehrerer

Gerinnungsfaktoren eine bessere antithrombotische Wirkung erzielen. Auch die niedermolekularen Heparine weisen teilweise Kettenlängen auf, die für die Hemmung mehreren Gerinnungsfaktoren ausreichen, sodass auch diese Antikoagulanzen Katheterthrombosen effektiver vermeiden konnten als ausschließliche Faktor-Xa-Inhibitoren. Die Arbeitsgruppe Schlitt et al. konnte zudem für die kombinierte Hemmung von Faktor IIa und Faktor Xa die gleiche Effektivität wie für UFH bezüglich der Vermeidung von Katheterthrombosen zeigen.⁵⁵ Auch der direkte Thrombininhibitor Argatroban konnte Katheterthrombosen effektiv vermeiden.⁵⁴

Vor dem Hintergrund dieser Daten zu den oralen direkten Antikoagulanzen mit ihrer typischen Kinetik könnte Danaparoid mit einer relativ stabilen anti-Faktor-Xa-Aktivität bei Patienten mit mechanischem Herzklappenersatz eine mögliche Alternative zur Antikoagulation darstellen, während zur effektiven Vermeidung von Katheterthrombosen die alleinige Hemmung des Faktors Xa nicht ausreichend zu sein scheint.

5.7 Limitationen dieser Arbeit

Bei der Beurteilung der Ergebnisse dieser Studie gilt es, einige Limitationen zu beachten. Limitierend ist zunächst die geringe Fallzahl der vorliegenden Studie, durch welche Unterschiede zwischen den Gruppen ggf. nicht erfasst werden können.

Zudem wurden alle Versuche ausschließlich an in-vitro-Modellen durchgeführt. Das Herzklappenthrombose-Modell stellt hierbei eine reine Nachahmung der physiologischen Form des linken Ventrikels sowie des linksventrikulären Ausflusstraktes dar. Bei den Versuchsdurchläufen wurde zudem darauf geachtet, physiologische Bedingungen bezüglich der Temperatur (37°C), des pulsatilem Blutflusses sowie der vorherrschenden Druckverhältnisse zu schaffen. Limitierend ist jedoch, dass bezüglich der Oberfläche aus Polymethylacrylat, welche sich vom Endokard deutlich unterscheidet, keine physiologischen Verhältnisse geschaffen werden können, sodass ein gewisses Maß der Kontaktaktivierung der Gerinnungskaskade nicht ausgeschlossen werden kann.

Bei den Versuchen im Herzkatheterthrombose-Modell wurden ebenfalls weitgehend Bedingungen geschaffen, welche denen während einer PCI nahekommen. Da die Versuchsreihen jedoch nicht am Patienten durchgeführt wurden, waren komplett physiologische Bedingungen während der Experimente nicht möglich. So bestand während der Versuchsdurchläufe im Modell ein kontinuierlicher Fluss, während bei einer Koronarangiographie bzw. Koronarintervention durch die Gabe von Kontrastmittel

Boli verabreicht werden, welche eine Thrombenbildung zusätzlich zur bestehenden Antikoagulation verhindern können. Zudem besteht während einer PCI teilweise eine längere Stase zwischen den Injektionen, welche im Herzkatheterthrombose-Modell ebenfalls keine Abbildung findet.

Die Beurteilung der elektronenmikroskopischen Analysen ist methodisch bedingt sowohl beim Herzkatheterthrombose-Modell als auch beim Herzklappenthrombose-Modell durch die Auswertung lediglich eines kleinen Ausschnittes der Katheter- bzw. Herzklappenoberfläche limitiert. Aus diesem Grund ist es möglich, dass sich in nicht beurteilten Bereichen der Herzkatheter und Herzklappen mehr oder weniger Zellen als im ausgewerteten Ausschnitt abgelagert haben, sodass die Auswertung der Elektronenmikroskopie immer nur im Zusammenhang mit dem ermittelten Thrombusgewicht betrachtet und interpretiert werden sollte.

6 Zusammenfassung

Danaparoid ist ein Heparinoid, welches in Deutschland zur Antikoagulation bei Patienten mit einer Heparin-induzierten Thrombozytopenie zugelassen ist, jedoch in den aktuellen Leitlinien weder während einer perkutanen Koronarintervention noch bei Patienten mit mechanischem Herzklappenersatz als Mittel der Wahl bei bestehender HIT angeführt wird. In der vorliegenden Arbeit wurde die antithrombotische Wirkung von Danaparoid mit den etablierten Antikoagulanzen unfragmentiertes Heparin (UFH) und Enoxaparin anhand zweier in-vitro-Modelle verglichen. Dabei bestanden im Herzkatheterthrombose-Modell mit einer kontinuierlichen Flussrate low-flow-Bedingungen mit geringem Scherstress, während das Herzklappenthrombose-Modell ein high-flow-Modell mit pulsatilem Fluss und erhöhten Scherkräften darstellt.

Zwischen diesen beiden Modellen konnten relevante Unterschiede zwischen den getesteten Antikoagulanzen hinsichtlich der Prävention einer Thrombusgeneration gesehen werden. So zeigte sich unter Danaparoid als Antikoagulans im Herzkatheterthrombose-Modell eine erhöhte intraluminale Thrombusbildung, sowohl im Vergleich zu UFH als auch zu Enoxaparin, während zwischen UFH und Enoxaparin kein relevanter Unterschied gefunden werden konnte.

Im Herzklappenthrombose-Modell zeichnete sich Danaparoid hingegen durch eine geringere Bildung thrombotischen Materials und weniger Ablagerung von Thrombozyten, Erythrozyten und Fibrin an der Klappenprothese im Vergleich zu den beiden anderen Antikoagulanzen aus. Bezüglich des Thrombusgewichtes konnte auch zwischen UFH und Enoxaparin ein deutlicher Unterschied gesehen werden: unter Antikoagulation mit UFH bildete sich weniger thrombotisches Material als unter Enoxaparin.

Anhand der Befunde der vorliegenden Arbeit erscheint Danaparoid gut zur Antikoagulation bei high-flow/high-shear-stress bedingter Thrombusbildung geeignet zu sein, wohingegen unter low-flow- und Stase-Bedingungen Heparine effektiver sind. Schlussfolgernd sollte Danaparoid im Rahmen einer PCI bei Patienten mit einer HIT nur mit Vorsicht angewandt bzw. auf ein anderes Antikoagulans ausgewichen werden. Eine weitere Prüfung der Effektivität und Sicherheit von Danaparoid zur Antikoagulation bei Patienten mit mechanischem Herzklappenersatz und gleichzeitigem Vorliegen einer HIT erscheint hingegen sinnvoll.

7 Literaturverzeichnis

1. Statistisches, Bundesamt. Häufigste Todesursachen 2017. 2019; https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/_inhalt.html. Accessed 29.04.2020.
2. Gosswald A, Schienkiewitz A, Nowossadeck E, Busch MA. [Prevalence of myocardial infarction and coronary heart disease in adults aged 40-79 years in Germany: results of the German Health Interview and Examination Survey for Adults (DEGS1)]. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*. 2013;56(5-6):650-655.
3. Malakar AK, Choudhury D, Halder B, Paul P, Uddin A, Chakraborty S. A review on coronary artery disease, its risk factors, and therapeutics. *J Cell Physiol*. 2019;234(10):16812-16823.
4. Knuuti J, Wijns W, Saraste A, et al. 2019 ESC Guidelines for the diagnosis and management of chronic coronary syndromes. *Eur Heart J*. 2020;41(3):407-477.
5. Montalescot G, Sechtem U, Achenbach S, et al. 2013 ESC guidelines on the management of stable coronary artery disease: the Task Force on the management of stable coronary artery disease of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J*. 2013;34(38):2949-3003.
6. Roffi M, Patrono C, Collet JP, et al. 2015 ESC Guidelines for the Management of Acute Coronary Syndromes in Patients Presenting Without Persistent ST-segment Elevation. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)*. 2015;68(12):1125.
7. Hamm CW, Albrecht A, Bonzel T, et al. [Diagnostic heart catheterization]. *Clin Res Cardiol*. 2008;97(8):475-512.
8. Ibanez B, James S, Agewall S, et al. 2017 ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)*. 2017;70(12):1082.
9. Neumann FJ, Sousa-Uva M, Ahlsson A, et al. 2018 ESC/EACTS Guidelines on myocardial revascularization. *Eur Heart J*. 2019;40(2):87-165.
10. Soleimannejad M, Aslanabadi N, Sohrabi B, et al. Activated clotting time level with weight based heparin dosing during percutaneous coronary intervention and its determinant factors. *J Cardiovasc Thorac Res*. 2014;6(2):97-100.
11. Bonzel T, Erbel R, Hamm CW, et al. [Percutaneous coronary interventions (PCI)]. *Clin Res Cardiol*. 2008;97(8):513-547.
12. Tavakol M, Ashraf S, Brener SJ. Risks and complications of coronary angiography: a comprehensive review. *Glob J Health Sci*. 2012;4(1):65-93.
13. Mehta SR, Granger CB, Eikelboom JW, et al. Efficacy and safety of fondaparinux versus enoxaparin in patients with acute coronary syndromes undergoing percutaneous coronary intervention: results from the OASIS-5 trial. *J Am Coll Cardiol*. 2007;50(18):1742-1751.
14. Dana A, Nguyen CM, Cloutier S, Barbeau GR. Macroscopic thrombus formation on angioplasty equipment following antithrombin therapy with enoxaparin. *Catheter Cardiovasc Interv*. 2007;70(6):847-853.
15. Schiele F. Fondaparinux and acute coronary syndromes: update on the OASIS 5-6 studies. *Vasc Health Risk Manag*. 2010;6:179-187.
16. Vahanian A, Beyersdorf F, Praz F, et al. 2021 ESC/EACTS Guidelines for the management of valvular heart disease. *Eur Heart J*. 2021.

17. ROSS DN. Homograft replacement of the aortic valve. *Lancet*. 1962;2(7254):487.
18. Longnecker CR, Lim MJ. Prosthetic heart valves. *Cardiol Clin*. 2011;29(2):229-236.
19. Tokunaga S, Tominaga R. Current status of the mechanical valve and bioprosthesis in Japan. *J Artif Organs*. 2008;11(2):53-59.
20. Rosu C, Soltesz EG. Selection of Valve Prostheses. *Semin Thorac Cardiovasc Surg*. 2015;27(2):152-158.
21. Sun JC, Davidson MJ, Lamy A, Eikelboom JW. Antithrombotic management of patients with prosthetic heart valves: current evidence and future trends. *Lancet*. 2009;374(9689):565-576.
22. Schoen FJ, Gotlieb AI. Heart valve health, disease, replacement, and repair: a 25-year cardiovascular pathology perspective. *Cardiovasc Pathol*. 2016;25(4):341-352.
23. Mankad S. Management of prosthetic heart valve complications. *Curr Treat Options Cardiovasc Med*. 2012;14(6):608-621.
24. Sanaani A, Yandrapalli S, Harburger JM. Antithrombotic Management of Patients With Prosthetic Heart Valves. *Cardiol Rev*. 2018;26(4):177-186.
25. Gursoy MO, Kalcik M, Yesin M, et al. A global perspective on mechanical prosthetic heart valve thrombosis: Diagnostic and therapeutic challenges. *Anatol J Cardiol*. 2016;16(12):980-989.
26. Eikelboom JW, Connolly SJ, Brueckmann M, et al. Dabigatran versus warfarin in patients with mechanical heart valves. *N Engl J Med*. 2013;369(13):1206-1214.
27. Austin SK. Haemostasis. *Medicine*. 2008;37(6):133-136.
28. Batty P, Smith JG. Haemostasis. In. *Surgery*. Vol 282010:530-535.
29. Palta S, Saroa R, Palta A. Overview of the coagulation system. *Indian J Anaesth*. 2014;58(5):515-523.
30. Allford SL, S.J. M. Haemostasis. *Surgery*. 2007;25(6):241-244.
31. Chaudhry R, Babiker HM. Physiology, Coagulation Pathways. 2020.
32. Watson T, Shantsila E, Lip GY. Mechanisms of thrombogenesis in atrial fibrillation: Virchow's triad revisited. *Lancet*. 2009;373(9658):155-166.
33. Fogelson AL, Neeves KB. Fluid Mechanics of Blood Clot Formation. *Annu Rev Fluid Mech*. 2015;47:377-403.
34. Konstantinides SV, Meyer G, Becattini C, et al. 2019 ESC Guidelines for the diagnosis and management of acute pulmonary embolism developed in collaboration with the European Respiratory Society (ERS). *Eur Heart J*. 2020;41(4):543-603.
35. Oduah EI, Linhardt RJ, Sharfstein ST. Heparin: Past, Present, and Future. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2016;9(3).
36. Alquwaizani M, Buckley L, Adams C, Fanikos J. Anticoagulants: A Review of the Pharmacology, Dosing, and Complications. *Curr Emerg Hosp Med Rep*. 2013;1(2):83-97.
37. Mulloy B, Hogwood J, Gray E, Lever R, Page CP. Pharmacology of Heparin and Related Drugs. *Pharmacol Rev*. 2016;68(1):76-141.
38. Hassan Y, Awaisu A, Al-Meman AA, Aziz NA. The Pharmacotherapy of Heparin-Induced Thrombocytopenia (HIT) : A Review of Contemporary Therapeutic Challenges in Clinical Practice. *Malays J Med Sci*. 2008;15(2):3-13.

39. Acostamadiedo JM, Iyer UG, Owen J. Danaparoid sodium. *Expert Opin Pharmacother*. 2000;1(4):803-814.
40. Warkentin TE. How I diagnose and manage HIT. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2011;2011:143-149.
41. Chong BH, Isaacs A. Heparin-induced thrombocytopenia: what clinicians need to know. *Thromb Haemost*. 2009;101(2):279-283.
42. Ronchard T, Salaun E, Theron A, et al. Cross-Reactivity Between Heparin and Danaparoid Antibodies in Cardiac Surgery. *Ann Thorac Surg*. 2017;103(1):e9-e10.
43. Ahmed I, Majeed A, Powell R. Heparin induced thrombocytopenia: diagnosis and management update. *Postgrad Med J*. 2007;83(983):575-582.
44. Tardy-Poncet B, Tardy B, Reynaud J, et al. Efficacy and safety of danaparoid sodium (ORG 10172) in critically ill patients with heparin-associated thrombocytopenia. *Chest*. 1999;115(6):1616-1620.
45. De CR, Husted S, Wallentin L, et al. Vitamin K antagonists in heart disease: current status and perspectives (Section III). Position paper of the ESC Working Group on Thrombosis--Task Force on Anticoagulants in Heart Disease. *Thromb Haemost*. 2013;110(6):1087-1107.
46. Harter K, Levine M, Henderson SO. Anticoagulation drug therapy: a review. *West J Emerg Med*. 2015;16(1):11-17.
47. McLintock C. Anticoagulant options in pregnancy for women with mechanical valves. *BJOG*. 2017;124(9):1421.
48. Windecker S, Kolh P, Alfonso F, et al. 2014 ESC/EACTS Guidelines on myocardial revascularization: The Task Force on Myocardial Revascularization of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS) Developed with the special contribution of the European Association of Percutaneous Cardiovascular Interventions (EAPCI). *Eur Heart J*. 2014;35(37):2541-2619.
49. Maegdefessel L, Buerke M, Schubert S, et al. Comparison of bivalirudin, enoxaparin, and unfractionated heparin in preventing cardiac catheter thrombosis. Results of an in-vitro study. *Thromb Haemost*. 2008;100(4):693-698.
50. Schlitt A, Rupprecht HJ, Reindl I, et al. In-vitro comparison of fondaparinux, unfractionated heparin, and enoxaparin in preventing cardiac catheter-associated thrombus. *Coron Artery Dis*. 2008;19(4):279-284.
51. Raaz U, Buerke M, Busshardt M, et al. Efficacy of enoxaparin, certoparin and dalteparin in preventing cardiac catheter thrombosis: an in vitro approach. *J Thromb Thrombolysis*. 2010;29(3):265-270.
52. Kaeberich A, Reindl I, Raaz U, et al. Comparison of unfractionated heparin, low-molecular-weight heparin, low-dose and high-dose rivaroxaban in preventing thrombus formation on mechanical heart valves: results of an in vitro study. *J Thromb Thrombolysis*. 2011;32(4):417-425.
53. Kaeberich A, Raaz U, Vogt A, et al. In vitro comparison of the novel, dual-acting FIIa/FXa-inhibitor EP217609C101, unfractionated heparin, enoxaparin, and fondaparinux in preventing cardiac catheter thrombosis. *J Thromb Thrombolysis*. 2014;37(2):118-130.

54. Raaz U, Kaeberich A, Maegdefessel L, et al. The direct thrombin inhibitor argatroban effectively prevents cardiac catheter thrombosis in vitro. *Thromb Haemost.* 2010;103(4):808-814.
55. Kaeberich A, Raaz U, Vogt A, et al. In vitro comparison of the novel, dual-acting FIIa/FXa-inhibitor EP217609C101, unfractionated heparin, enoxaparin, and fondaparinux in preventing cardiac catheter thrombosis. *J Thromb Thrombolysis.* 2014;37(2):118-130.
56. Maegdefessel L, Linde T, Michel T, et al. Argatroban and bivalirudin compared to unfractionated heparin in preventing thrombus formation on mechanical heart valves. Results of an in-vitro study. *Thromb Haemost.* 2009;101(6):1163-1169.
57. Maegdefessel L, Linde T, Krapiec F, et al. In vitro comparison of dabigatran, unfractionated heparin, and low-molecular-weight heparin in preventing thrombus formation on mechanical heart valves. *Thromb Res.* 2010;126(3):e196-e200.
58. Linde T, Hamilton KF, Timms DL, Schmitz-Rode T, Steinseifer U. A low-volume tester for the thrombogenic potential of mechanical heart valve prostheses. *J Heart Valve Dis.* 2011;20(5):510-517.
59. Bates SM, Weitz JI. Coagulation assays. *Circulation.* 2005;112(4):e53-e60.
60. Loizou E, Mayhew DJ, Martlew V, Murthy BVS. Implications of deranged activated partial thromboplastin time for anaesthesia and surgery. *Anaesthesia.* 2018;73(12):1557-1563.
61. Levy JH, Szlam F, Wolberg AS, Winkler A. Clinical use of the activated partial thromboplastin time and prothrombin time for screening: a review of the literature and current guidelines for testing. *Clin Lab Med.* 2014;34(3):453-477.
62. Falter F, Razzaq N, John M, et al. Clinical Evaluation of Measuring the ACT during Elective Cardiac Surgery with Two Different Devices. *J Extra Corpor Technol.* 2018;50(1):38-43.
63. Horton S, Augustin S. Activated clotting time (ACT). *Methods Mol Biol.* 2013;992:155-167.
64. Vera-Aguilera J, Yousef H, Beltran-Melgarejo D, et al. Clinical Scenarios for Discordant Anti-Xa. *Adv Hematol.* 2016;2016:4054806.
65. Favresse J, Lippi G, Roy PM, et al. D-dimer: Preanalytical, analytical, postanalytical variables, and clinical applications. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2018;55(8):548-577.
66. Dempfle CE. D-dimer testing and venous thromboembolism: four view points. *J Thromb Haemost.* 2005;3(2):377-379.
67. Riley RS, Gilbert AR, Dalton JB, Pai S, McPherson RA. Widely Used Types and Clinical Applications of D-Dimer Assay. *Lab Med.* 2016;47(2):90-102.
68. Yoon JH, Jang IK. Heparin-induced thrombocytopenia in cardiovascular patients: pathophysiology, diagnosis, and treatment. *Cardiol Rev.* 2011;19(3):143-153.
69. Bakchoul T, Greinacher A. Recent advances in the diagnosis and treatment of heparin-induced thrombocytopenia. *Ther Adv Hematol.* 2012;3(4):237-251.
70. Fathi M. Heparin-induced thrombocytopenia (HIT): Identification and treatment pathways. *Glob Cardiol Sci Pract.* 2018;2018(2):15.
71. Arepally GM. Heparin-induced thrombocytopenia. *Blood.* 2017;129(21):2864-2872.
72. Shaikh N. Heparin-induced thrombocytopenia. *J Emerg Trauma Shock.* 2011;4(1):97-102.

73. Kouides PA, Fricke W. Diagnosis and management of heparin-induced thrombocytopenia. *Expert Rev Cardiovasc Ther.* 2005;3(2):335-345.
74. Chaudhary RK, Khanal N, Giri S, Pathak R, Bhatt VR. Emerging therapy options in heparin-induced thrombocytopenia. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem.* 2014;12(1):50-58.
75. Warkentin TE. Think of HIT. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2006:408-414.
76. Meuleman DG, Hobbelen PM, van Dedem G, Moelker HC. A novel anti-thrombotic heparinoid (Org 10172) devoid of bleeding inducing capacity: a survey of its pharmacological properties in experimental animal models. *Thromb Res.* 1982;27(3):353-363.
77. Harenberg J, Zimmermann R, Schwarz F, Kubler W. Treatment of heparin-induced thrombocytopenia with thrombosis by new heparinoid. *Lancet.* 1983;1(8331):986-987.
78. Tardy-Poncet B, Wolf M, Lasne D, et al. Danaparoid cross-reactivity with heparin-induced thrombocytopenia antibodies: report of 12 cases. *Intensive Care Med.* 2009;35(8):1449-1453.
79. Foroughinia F, Farsad F, Gholami K, Ahmadi S. Usefulness of Danaparoid sodium in patients with Heparin-induced thrombocytopenia after cardiac surgery. *J Res Pharm Pract.* 2015;4(2):73-78.
80. Selleng S, Selleng K. Heparin-induced thrombocytopenia in cardiac surgery and critically ill patients. *Thromb Haemost.* 2016;116(5):843-851.
81. Magnani HN, Gallus A. Heparin-induced thrombocytopenia (HIT). A report of 1,478 clinical outcomes of patients treated with danaparoid (Orgaran) from 1982 to mid-2004. *Thromb Haemost.* 2006;95(6):967-981.
82. Lindhoff-Last E, Kreutzenbeck HJ, Magnani HN. Treatment of 51 pregnancies with danaparoid because of heparin intolerance. *Thromb Haemost.* 2005;93(1):63-69.
83. Gerhardt A, Scharf RE, Zotz RB. Successful use of danaparoid in two pregnant women with heart valve prosthesis and heparin-induced thrombocytopenia Type II (HIT). *Clin Appl Thromb Hemost.* 2009;15(4):461-464.
84. Bidlingmaier C, Magnani HN, Girisch M, Kurnik K. Safety and efficacy of danaparoid (Orgaran) use in children. *Acta Haematol.* 2006;115(3-4):237-247.
85. Risch L, Fischer JE, Herklotz R, Huber AR. Heparin-induced thrombocytopenia in paediatrics: clinical characteristics, therapy and outcomes. *Intensive Care Med.* 2004;30(8):1615-1624.
86. Fischer KG. Essentials of anticoagulation in hemodialysis. *Hemodial Int.* 2007;11(2):178-189.
87. Linkins LA, Julian JA, Rischke J, Hirsh J, Weitz JI. In vitro comparison of the effect of heparin, enoxaparin and fondaparinux on tests of coagulation. *Thromb Res.* 2002;107(5):241-244.
88. de Valk HW, Banga JD, Wester JW, et al. Comparing subcutaneous danaparoid with intravenous unfractionated heparin for the treatment of venous thromboembolism. A randomized controlled trial. *Ann Intern Med.* 1995;123(1):1-9.
89. Ignjatovic V, Summerhayes R, Yip YY, Monagle P. The in vitro anticoagulant effects of danaparoid, fondaparinux, and lepirudin in children compared to adults. *Thromb Res.* 2008;122(5):709-714.

90. Davies PF. Hemodynamic shear stress and the endothelium in cardiovascular pathophysiology. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*. 2009;6(1):16-26.
91. Yin W, Shanmugavelayudam SK, Rubenstein DA. The effect of physiologically relevant dynamic shear stress on platelet and endothelial cell activation. *Thromb Res*. 2011;127(3):235-241.
92. Ruggeri ZM, Orje JN, Habermann R, Federici AB, Reininger AJ. Activation-independent platelet adhesion and aggregation under elevated shear stress. *Blood*. 2006;108(6):1903-1910.
93. Lu Q, Hofferbert BV, Koo G, Malinauskas RA. In vitro shear stress-induced platelet activation: sensitivity of human and bovine blood. *Artif Organs*. 2013;37(10):894-903.
94. Dangas GD, Tijssen JGP, Wohrle J, et al. A Controlled Trial of Rivaroxaban after Transcatheter Aortic-Valve Replacement. *N Engl J Med*. 2020;382(2):120-129.
95. Lester PA, Coleman DM, Diaz JA, et al. Apixaban Versus Warfarin for Mechanical Heart Valve Thromboprophylaxis in a Swine Aortic Heterotopic Valve Model. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2017;37(5):942-948.
96. Jaffer IH, Fredenburgh JC, Hirsh J, Weitz JI. Medical device-induced thrombosis: what causes it and how can we prevent it? *J Thromb Haemost*. 2015;13 Suppl 1:S72-81.
97. Chan NC, Weitz JI, Eikelboom JW. Anticoagulation for Mechanical Heart Valves: Will Oral Factor Xa Inhibitors Be Effective? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2017;37(5):743-745.
98. Connolly SJ, Ezekowitz MD, Yusuf S, et al. Dabigatran versus warfarin in patients with atrial fibrillation. *N Engl J Med*. 2009;361(12):1139-1151.
99. Granger CB, Alexander JH, McMurray JJ, et al. Apixaban versus warfarin in patients with atrial fibrillation. *N Engl J Med*. 2011;365(11):981-992.
100. Patel MR, Mahaffey KW, Garg J, et al. Rivaroxaban versus warfarin in nonvalvular atrial fibrillation. *N Engl J Med*. 2011;365(10):883-891.
101. Giugliano RP, Ruff CT, Braunwald E, et al. Edoxaban versus warfarin in patients with atrial fibrillation. *N Engl J Med*. 2013;369(22):2093-2104.
102. Ruff CT, Giugliano RP, Braunwald E, et al. Comparison of the efficacy and safety of new oral anticoagulants with warfarin in patients with atrial fibrillation: a meta-analysis of randomised trials. *Lancet*. 2014;383(9921):955-962.
103. Kirchhof P, Benussi S, Kotecha D, et al. 2016 ESC Guidelines for the management of atrial fibrillation developed in collaboration with EACTS. *Eur Heart J*. 2016;37(38):2893-2962.
104. Liang H, He Q, Zhang Q, et al. Efficacy and safety outcomes in novel oral anticoagulants versus vitamin-K antagonist on post-TAVI patients: a meta-analysis. *BMC Cardiovasc Disord*. 2020;20(1):307.
105. Greiten LE, McKellar SH, Rysavy J, Schaff HV. Effectiveness of rivaroxaban for thromboprophylaxis of prosthetic heart valves in a porcine heterotopic valve model. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2014;45(5):914-919.

8 Thesen

- 1) Bei Patienten mit Heparin-induzierter Thrombozytopenie existieren aktuell weder für die periprocedurale Antikoagulation bei einer Koronarintervention noch für die perioperative Antikoagulation bei Patienten mit mechanischem Herzklappenersatz evidenzbasierte Empfehlungen bezüglich einer alternativen Antikoagulation zu Heparin. Danaparoid könnte eine mögliche Alternative bei diesen Patientengruppen darstellen.
- 2) Das Herzkatheterthrombose-Modell eignet sich als in-vitro-System für die Untersuchung der Effektivität verschiedener Antikoagulanzen unter den prokoagulatorischen Bedingungen Stase und Kontaktaktivierung im Sinne eines low-flow-Modells.
- 3) Bei Einsatz von Danaparoid als Antikoagulans kam es im Herzkatheterthrombose-Modell zu einer deutlich stärkeren intraluminalen Thrombusbildung sowohl im Vergleich zu UFH als auch zu Enoxaparin, während zwischen UFH und Enoxaparin kein relevanter Unterschied gefunden werden konnte.
- 4) Elektronenmikroskopisch ergaben sich im Herzkatheterthrombose-Modell keine relevanten Unterschiede zwischen den drei untersuchten Antikoagulanzen hinsichtlich Fibrin-, Erythrozyten- und Thrombozytenablagerungen an den Katheterinnenflächen.
- 5) Danaparoid sollte den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit entsprechend zur Antikoagulation während einer perkutanen Koronarintervention nur mit Vorsicht eingesetzt und die Anwendung alternativer Antikoagulanzen erwogen werden.
- 6) Das Herzklappenthrombose-Modell ist ein etabliertes in-vitro-System zur Simulation des Blutflusses an mechanischen Herzklappen mit high-flow-/high-shear-stress-Bedingungen und ist geeignet, die Effektivität verschiedener Antikoagulanzen anhand der Ablagerung thrombotischen Materials auf der Oberfläche mechanischer Herzklappen zu untersuchen.
- 7) Unter Antikoagulation mit Danaparoid wurde im Herzklappenthrombose-Modell ein geringeres Thrombusgewicht als mit UFH und Enoxaparin gefunden. Zudem bildete sich unter Antikoagulation mit UFH sich weniger thrombotisches Material als unter Enoxaparin.

- 8) In der elektronenmikroskopischen Auswertung der Untersuchungen im Herzklappenthrombose-Modell zeigten sich unter Danaparoid weniger Fibrin- und Thrombozytenablagerungen an den Klappenflügeln, wohingegen unter UFH die geringste Anzahl Erythrozyten zu finden war.
- 9) Danaparoid ist entsprechend den vorliegenden Ergebnissen den beiden etablierten Antikoagulanzen UFH und Enoxaparin bezüglich der Prävention der Thrombusgeneration an mechanischen Herzklappen nicht unterlegen.
- 10) Eine mögliche Ursache der unterschiedlichen Wirksamkeit der untersuchten Antikoagulanzen bei den getesteten Thrombosemodellen könnte das jeweils substanzspezifische Verhältnis der Antagonisierung der Faktoren IIa und Xa sowie die unterschiedlichen Flussbedingungen in den Modellen sein.
- 11) Anhand der Befunde der vorliegenden Arbeit scheint Danaparoid gut zur Antikoagulation bei high-flow/high-shear-stress bedingter Thrombusbildung geeignet zu sein, wohingegen unter low-flow- und Stase-Bedingungen Heparine wirksamer sind. Eine weitere Prüfung der Effektivität und Sicherheit von Danaparoid zur Antikoagulation bei Patienten mit mechanischem Herzklappenersatz und gleichzeitigem Vorliegen einer HIT erscheint sinnvoll.

Anhang

Selbständigkeitserklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne unzulässige Hilfe Dritter verfasst habe. Es wurden keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt. Wörtlich oder inhaltlich übernommene Stellen wurden unter Angabe der entsprechenden Quellen kenntlich gemacht.

Ich erkläre, dass die vorliegende Arbeit bisher weder im In- noch im Ausland einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt wurde.

Ort, Datum

Unterschrift

Erklärung über frühere Promotionsversuche

Ich erkläre hiermit, dass die vorliegende Arbeit mein erster Promotionsversuch ist und ich mich an keiner anderen Hochschule einem Promotionsverfahren unterzogen bzw. eine Promotion begonnen habe.

Ort, Datum

Unterschrift

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, welche zum Gelingen der vorliegenden Arbeit beigetragen haben.

Insbesondere danke ich Prof. Dr. med. Axel Schlitt, welcher die Arbeit betreute und stets für Fragen und Probleme zur Verfügung stand, sowie bei Prof. Dr. med. Karl Werdan für die Möglichkeit der Dissertation in der Klinik für Innere Medizin III des Universitätsklinikums Halle (Saale) und bei Prof. Dr. Andreas Wienke für die statistische Beratung.

Desweiteren möchte ich mich bei Frau Anja Käberich bedanken, welche mich in die Laborarbeit einführte und mich bei Problemen sowie der Datenauswertung stets unterstützte.

Ein großer Dank geht an Prof. Dr. med. Konstantin Heinroth, welcher sich für ein Lektorat bereit erklärte und durch seine Kommentare und Vorschläge maßgeblich zur Vollendung der Arbeit beigetragen hat.

Besonders möchte ich mich bei meinem Ehemann Marcus für seine unermüdliche Geduld, die aufbauenden Worte und Ratschläge sowie das kritische Lektorat bedanken.

Zudem danke ich meiner Familie und meinen Freunden für ihre Unterstützung, Ermutigung und das Geben von Hinweisen bei der Entstehung der Arbeit.

Ich bedanke mich abschließend bei allen Probanden, den beteiligten Mitarbeitern im Zentrallabor sowie dem Institut für Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Halle (Saale) und bei Fr. Hauröder aus dem Bundeswehrzentral Krankenhaus Koblenz, welche die elektronenmikroskopischen Bilder anfertigte.