

Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Innere Medizin III  
**Universitätsklinikum der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg**  
Direktor Prof. Dr. med. K. Werdan

**Vergleich der niedermolekularen Heparine Enoxaparin,  
Certoparin und Dalteparin zur Verhinderung von Herzkatheter-  
Thrombosen in einem *in vitro*-Modell**

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades

<Doktor der Medizin (Dr. med.)>

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

von Marese Bußhardt

geboren am 06.06.1980 in Waldkirch

Betreuer: Prof. Dr. med. Axel Schlitt

Gutachter: Prof. Dr. med. Axel Schlitt, Paracelsus-Harz-Klinik Bad Suderode  
Prof. Dr. med. Rolf-Edgar Silber  
Prof. Dr. med. Harald Darius, Vivantes Klinikum Neukölln, Berlin

Eröffnungsdatum: 31.01.2012

Datum der Verteidigung: 05.10.2012

## Referat

Eine zwar seltene aber potentiell verheerende Komplikation bei der Durchführung einer perkutanen Koronarintervention (PCI) ist die Entstehung einer Herzkatheter-Thrombose. Unfraktioniertes Heparin und Enoxaparin sind die zur periinterventionellen Thromboseprophylaxe sowohl bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom und frühem invasivem Vorgehen als auch bei elektiven PCIs verwendeten Standard-Antikoagulantien. Enoxaparin ist ein Vertreter aus der Gruppe der niedermolekularen Heparine (NMH), die durch ihre zu unfraktioniertem Heparin unterschiedlichen pharmakodynamischen und –kinetischen Profile einige Vorteile aufweisen. In mehreren Studien wurden NMH in Bezug auf ihre Anwendbarkeit bei PCI mit zum Teil vielversprechenden Ergebnissen untersucht. In dieser Promotionsarbeit wurde die Wirksamkeit der NMH Certoparin und Dalteparin in der Verhinderung von Herzkatheter-assoziierten Thrombosen in einem *in vitro*-Modell mit derjenigen von Enoxaparin verglichen.

Blut von 10 gesunden männlichen Probanden wurde in ein 50 ml Röhrchen gegeben, das zuvor mit dem jeweiligen Antikoagulans aus einer der folgenden Versuchsgruppen präpariert wurde: 0,6 U/ml Enoxaparin, 0,6 U/ml Certoparin und 0,6 U/ml Dalteparin, jeweils mit und ohne 1,7 µg/ml Eptifibatid. Aus dem in einem 37° C warmen Wasserbad stehenden Röhrchen wurde das Blut mittels Rollerpumpe (Geschwindigkeit 3 ml/min, Dauer 60 min) über einen Verbindungsschlauch durch den daran befestigten Multipurpose 6F Herzkatheter (Cordis®) wieder zurück in das Röhrchen geleitet. Die entstandenen Herzkatheter-Thromben wurden durch die Messung von Durchlaufzeit und Thrombusgewicht sowie durch den elektronenmikroskopischen Nachweis von Erythrozyten, Thrombozyten und Fibrin an der inneren Katheter-Oberfläche quantifiziert.

In allen Versuchsgruppen ergaben sich hinsichtlich der vordefinierten Endpunkte keine signifikanten Unterschiede. Außerdem wurde in allen Gruppen durch eine einmalige Bolus-Gabe der jeweils in gleicher Konzentration verwendeten NMH eine im gewünschten Zielbereich liegende Anti-Xa-Aktivität erreicht. Die kombinierte Gabe mit dem GP IIb/IIIa-Hemmer Eptifibatid brachte für die antithrombotische Wirksamkeit in unserem Modell keinen Vorteil.

Unsere Daten zeigen, dass Certoparin und Dalteparin zur Antikoagulation bei perkutaner Koronarintervention geeignet zu sein scheinen, da sie in unserem *in vitro*-Modell eine Herzkatheter-Thrombose ebenso gut verhindern konnten wie Enoxaparin. Zunächst müssen jedoch Untersuchungen zur Anwendung der Substanzen bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom folgen, bevor Aussagen über die klinische Relevanz unserer Ergebnisse gemacht werden können.

Bußhardt, Marese: Vergleich der niedermolekularen Heparine Enoxaparin, Certoparin und Dalteparin zur Verhinderung von Herzkatheter-Thrombosen in einem *in vitro*-Modell. Halle (Saale), Univ., Med. Fak., Diss., 69 Seiten, 2012

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Die koronare Herzkrankheit</b>	<b>1</b>
1.1.1	Allgemeines	1
1.1.2	Klinik	2
1.1.3	Pathophysiologie	2
<b>1.2</b>	<b>Das akute Koronarsyndrom</b>	<b>4</b>
1.2.1	Allgemeines	4
1.2.2	Thrombozytenaggregationshemmung und Antikoagulation bei koronarer Herzkrankheit	5
1.2.3	Zelluläre und plasmatische Gerinnung	5
1.2.4	Inhibitoren der plasmatischen Gerinnung	9
1.2.5	Antikoagulantien	10
<b>1.3</b>	<b>Die Herzkatheteruntersuchung</b>	<b>14</b>
1.3.1	Allgemeines	14
1.3.2	Indikation beim akuten Koronarsyndrom	15
1.3.3	Periinterventionelle Therapie bei perkutaner Koronarintervention	15
<b>1.4</b>	<b>Die Herzkatheter-Thrombose</b>	<b>17</b>
<b>2</b>	<b>Zielstellung</b>	<b>19</b>
<b>3</b>	<b>Material und Methodik</b>	<b>20</b>
<b>3.1</b>	<b>Materialien</b>	<b>20</b>
<b>3.2</b>	<b>Experimentelle Modelle und Protokolle</b>	<b>21</b>
3.2.1	Auswahl und Aufklärung der Probanden	21
3.2.2	Versuchsablauf	22
3.2.3	Dosierung der Antithrombotika	25
<b>3.3</b>	<b>Analytische Methoden</b>	<b>25</b>
3.3.1	Elektronenmikroskopie	25
3.3.2	Anwendung der Elektronenmikroskopie in unserer Studie	27
3.3.3	Hämostaseologische Untersuchungsmethoden	28
3.3.4	Thrombozytenaggregationsmessung	29
<b>3.4</b>	<b>Statistik</b>	<b>30</b>
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>31</b>
<b>4.1</b>	<b>Thrombusgewicht</b>	<b>31</b>
<b>4.2</b>	<b>Durchlaufzeit</b>	<b>32</b>
<b>4.3</b>	<b>Elektronenmikroskopische Auswertung</b>	<b>33</b>
4.3.1	Erythrozytenanzahl	34
4.3.2	Thrombozytenanzahl	35
4.3.3	Fibrinbildung	36
<b>4.4</b>	<b>Laborparameter</b>	<b>37</b>
4.4.1	Anti-Xa-Aktivität	37
4.4.2	D-Dimere	37
4.4.3	Thrombin-Antithrombin-Komplex (TAT)	39
<b>4.5</b>	<b>Thrombozytenfunktion</b>	<b>39</b>
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>42</b>

<b>5.1</b>	<b>Studienlage und Hintergrund</b> .....	<b>42</b>
5.1.1	Unfraktioniertes Heparin bei perkutaner Koronarintervention.....	42
5.1.2	Die Substanzklasse der niedermolekularen Heparine.....	42
5.1.3	Niedermolekulare Heparine bei perkutaner Koronarintervention.....	43
<b>5.2</b>	<b>Fragestellung</b> .....	<b>47</b>
<b>5.3</b>	<b>Diskussion des <i>in vitro</i>-Modells</b> .....	<b>47</b>
5.3.1	Hintergrund des <i>in vitro</i> -Modells .....	47
5.3.2	Validität des <i>in vitro</i> -Modells .....	48
5.3.3	Einschränkungen des <i>in vitro</i> -Modells .....	48
<b>5.4</b>	<b>Diskussion der Ergebnisse</b> .....	<b>50</b>
5.4.1	Einfluss der NMH auf die Thrombogenese im <i>in vitro</i> -Modell .....	50
5.4.2	Bedeutung der plasmatischen Gerinnung bei Entstehung der Katheter-Thrombose.....	53
<b>5.5</b>	<b>Klinische Implikation und Ausblick</b> .....	<b>56</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>59</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>61</b>
<b>8</b>	<b>Thesen</b> .....	<b>68</b>
<b>9</b>	<b>Anhang</b>	
9.1	Lebenslauf	
9.2	Selbständigkeitserklärung	
9.3	Erklärung über frühere Promotionsversuche	
9.4	Danksagung	

## Abkürzungsverzeichnis

ACE:	Angiotensin converting enzyme
ACS:	Akutes Koronarsyndrom
ACT:	Activated clotting time
ADP:	Adenosindiphosphat
aPTT:	Aktivierete partielle Thromboplastinzeit
ASS:	Acetylsalicylsäure
AT:	Antithrombin III
BMI:	Body mass index
CD:	Cluster of differentiation
CRP:	C-reaktives Protein
CRT:	Cathode ray tube
EF:	Ejektionsfraktion
EKG:	Elektrokardiogramm
ELISA:	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
F/Fa:	Faktor/aktivierter Faktor
FPA/FPB:	Fibrinopeptid A/B
GP:	Glykoprotein
GpIIb/IIIa-IA:	Glykoprotein IIb/IIIa-Rezeptorblocker
HIT:	Heparin-induzierte Thrombozytopenie
HDL-Cholesterin:	High-Density-Lipoprotein-Cholesterin
HLA:	Humanes Leukozytenantigen
HMDS:	Hexamethyldisilazan
HMWK:	High-molecular-weight-kininogen
IL:	Interleukin
i.v.:	intravenös
KHK:	Koronare Herzkrankheit
LDL-Cholesterin:	Low-Density-Lipoprotein-Cholesterin
NMH:	Niedermolekulares Heparin
NO:	Stickstoffmonoxid
NSTEMI:	Nicht-ST-Hebungs-Myokardinfarkt
NYHA:	New York Heart Association
PCI:	Perkutane Koronarintervention
PF4:	Plättchenfaktor 4
PPP:	Platelet poor plasma
PRP:	Platelet rich plasma

PTCA:	Perkutane transluminale coronare Angioplastie
PTFE:	Polytetrafluorethylen
PVC:	Polyvinylchlorid
REM:	Rasterelektronenmikroskop
s.c.:	subkutan
STEMI:	ST-Hebungs-Myokardinfarkt
TAT:	Thrombin-Antithrombin-Komplex
TF:	Tissue factor
TFPI:	Tissue factor pathway inhibitor
TVT:	Tiefe Venenthrombose
TXA <sub>2</sub> :	Thromboxan A <sub>2</sub>
UFH:	Unfraktioniertes Heparin
vWF:	Von-Willebrand-Faktor

# **1. Einleitung**

## **1.1 Die koronare Herzkrankheit**

### **1.1.1 Allgemeines**

Die koronare Herzkrankheit (KHK) wird als Manifestation der Atherosklerose der Herzkranzarterien definiert. Sie stellt in der Bundesrepublik Deutschland die häufigste Todesursache dar und geht schon bei milderem Verlauf mit deutlichem Verlust der Leistungsfähigkeit und Minderung der Lebensqualität einher. Männer sind von dieser Erkrankung insgesamt häufiger betroffen als Frauen, bei Frauen beginnt die Erkrankung in der Regel erst in höherem Lebensalter. Dabei liegt die Prävalenz in der Altersgruppe von 55-64 Jahren für Frauen bei 8,4% und für Männer bei 13,1%. In der Altersgruppe von 65-74 Jahren sind schon 11,1% aller untersuchten Frauen und 17,7% aller untersuchten Männer erkrankt. Liegt das Lebensalter bei >75 Jahren, beträgt die Prävalenz der KHK bei Frauen 16,1% und bei Männern 18,6%. (Baer und Rosenkranz, 2009)

Durch mehrere epidemiologische Untersuchungen erhielt man wichtige Erkenntnisse über verschiedene Faktoren, die das Erkrankungsrisiko deutlich erhöhen können. Dabei ist bekannt, dass ein bestimmter Risikofaktor durch das gleichzeitige Vorhandensein anderer Risikofaktoren in seiner Wirksamkeit auf das Gefäßsystem verstärkt werden kann und sich somit das Erkrankungsrisiko durch das Zusammenwirken der Faktoren deutlich erhöht. Eine dieser Studien ist die PROCAM-Studie (PROCAM = Prospective Cardiovascular Münster Studie) der Universität Münster: Seit Studienbeginn im Jahr 1979 waren etwa 40.000 Versuchspersonen in die verschiedenen Untersuchungsschwerpunkte dieser Studie miteinbezogen worden und die Ergebnisse haben in internationalen Empfehlungen Berücksichtigung gefunden. Dabei konnte gezeigt werden, dass neben den schon bekannten Risikofaktoren - erhöhtes LDL-Cholesterin, erniedrigtes HDL-Cholesterin und erhöhte Triglyzeride - auch das Lipoprotein(a) als Bestandteil der Blutfettwerte eine bedeutende Rolle in der Entstehung einer KHK spielt. In diesem Zusammenhang ist es erwähnenswert, dass der Lipoprotein(a)-Wert bei Männern mit zunehmendem Lebensalter kontinuierlich langsam ansteigt, hingegen bei Frauen mit Beginn der Menopause deutlich zunimmt. Diese Tatsache kann mit als Ursache dafür angesehen werden, dass bei Frauen das Erkrankungsalter höher liegt als bei Männern. Weitere Risikofaktoren sind arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus, Rauchen, Adipositas und psychischer Stress sowie unbeeinflussbare Faktoren wie Alter, genetische Prädisposition und Umwelteinflüsse. Als Beitrag zum klinischen Nutzen der Studienergebnisse wurde mittels der zum Teil neuen Erkenntnisse ein interaktiver Risikorechner (PROCAM-Risiko-Rechner) und ein Punkte-Score zur Erkennung von Hochrisikopatienten für eine KHK entwickelt, mit deren Hilfe das individuelle Risiko eines Patienten, innerhalb der nächsten 10 Jahre einen Herzinfarkt zu

erleiden, ermittelt werden kann. (Schlächinger und Zeiher, 2004; [www.lifa-muenster.de/PROCAM-Studie.72.0.html?&L=0](http://www.lifa-muenster.de/PROCAM-Studie.72.0.html?&L=0))

### **1.1.2 Klinik**

Die atherosklerotischen Gefäßwandveränderungen der Koronararterien führen durch Gefäßverengung zu einem Missverhältnis zwischen Sauerstoffbedarf und Sauerstoffangebot im Herzmuskel und bergen somit das Risiko eines Herzinfarktes. Oft sind in den Frühstadien der Erkrankung noch keine klinischen Symptome vorhanden, so dass bereits existierende Störungen der Gefäßendothelfunktion und Lipideinlagerungen in der Gefäßwand zunächst unerkant bleiben können und sich erst klinisch zeigen, wenn eine Myokardischämie durch Sauerstoffmangel auftritt. Diese führt dann zu typischen Angina pectoris-Symptomen wie belastungsabhängige Schmerzen im Brustkorb, die häufig in die linke Schulter-Arm-Hand-Region ausstrahlen, Engegefühl und Atemnot. (Baer und Rosenkranz, 2009)

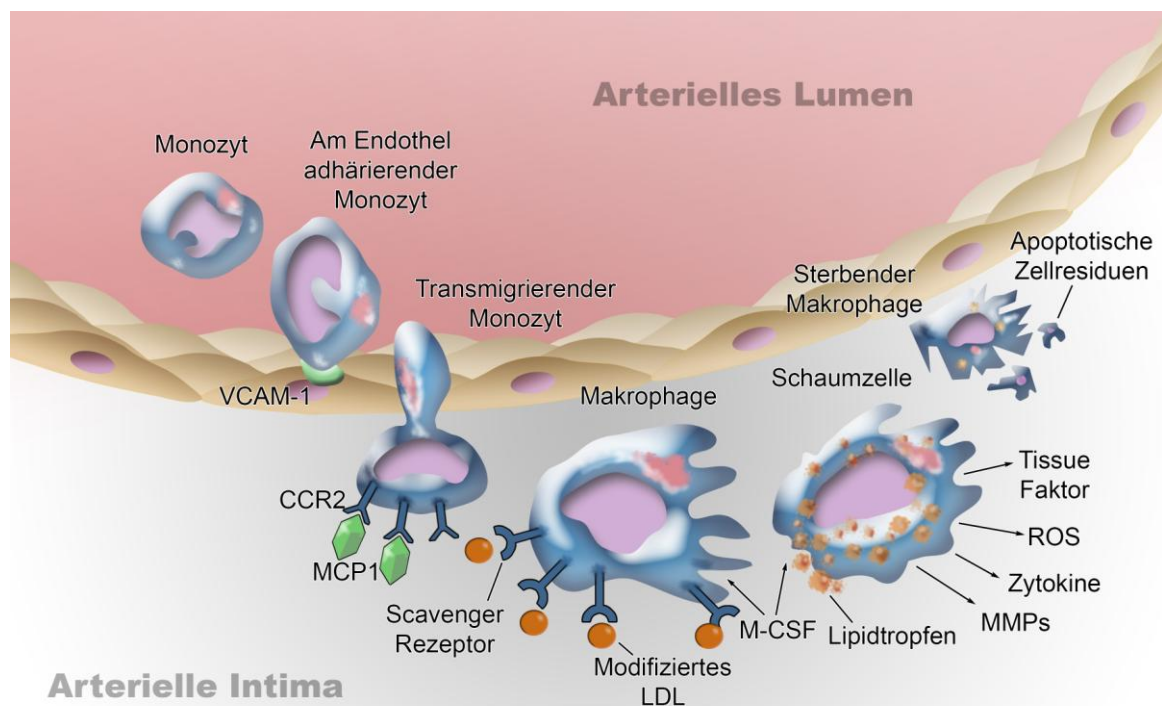
### **1.1.3 Pathophysiologie**

Pathophysiologisch handelt es sich bei der Atherosklerose um einen komplexen, lokal-entzündlichen Prozess, der mit einer systemischen Immunreaktion einhergeht. Zu Beginn steht die endotheliale Dysfunktion, die durch die Wirkung der verschiedenen Risikofaktoren auf die Endothelzellen ausgelöst wird. Diese Noxen schädigen die Endothelzellen derart, dass sie ihre grundlegenden Aufgaben wie Aufrechterhaltung des Gefäßtonus, Regulation von Blutplättchen- und Leukozytenadhäsion, Hemmung der Migration und Proliferation glatter Muskelzellen und das Eindringen von LDL-Cholesterin nicht mehr adäquat wahrnehmen können. Zusätzlich führt die Endothelzellschädigung zur Bildung proinflammatorischer Zytokine wie Interleukin-1 und Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$ . Des Weiteren kommt es zu einer vermehrten Freisetzung von Sauerstoffradikalen und damit zu oxidativem Stress. Dadurch wird LDL-Cholesterin oxidiert und führt so zur Hemmung der NO-Freisetzung aus den Endothelzellen und damit zu einer geringeren Gefäßdilatation. Außerdem kann oxidiertes LDL-Cholesterin leichter in Makrophagen aufgenommen werden als nicht oxidiertes. (Liao, 1998)

Über weitere Botenstoffe und die Akute-Phase-Reaktion in der Leber werden Adhäsionsmoleküle, Hitzeschockproteine und andere Mediatoren freigesetzt, die dazu führen, dass bestimmte Blutzellen, vornehmlich Monozyten, am Endothel anhaften und schließlich in die Intima einwandern. Im Zusammenhang mit dieser Reaktionskette wird diskutiert, inwiefern man die quantitative Messung einzelner beteiligter Faktoren, besonders des C-reaktiven Proteins (CRP), als Parameter für die Risikoabschätzung der KHK anwenden kann. (Koenig et al., 2003) In der Intima werden die eingewanderten Monozyten mit Lipiden beladen, die sich dort vermehrt angesammelt haben, und werden so zu den charakteristischen Schaumzellen. Weiterhin sind T-Lymphozyten und Mastzellen in die Pathogenese involviert, die, ebenso wie

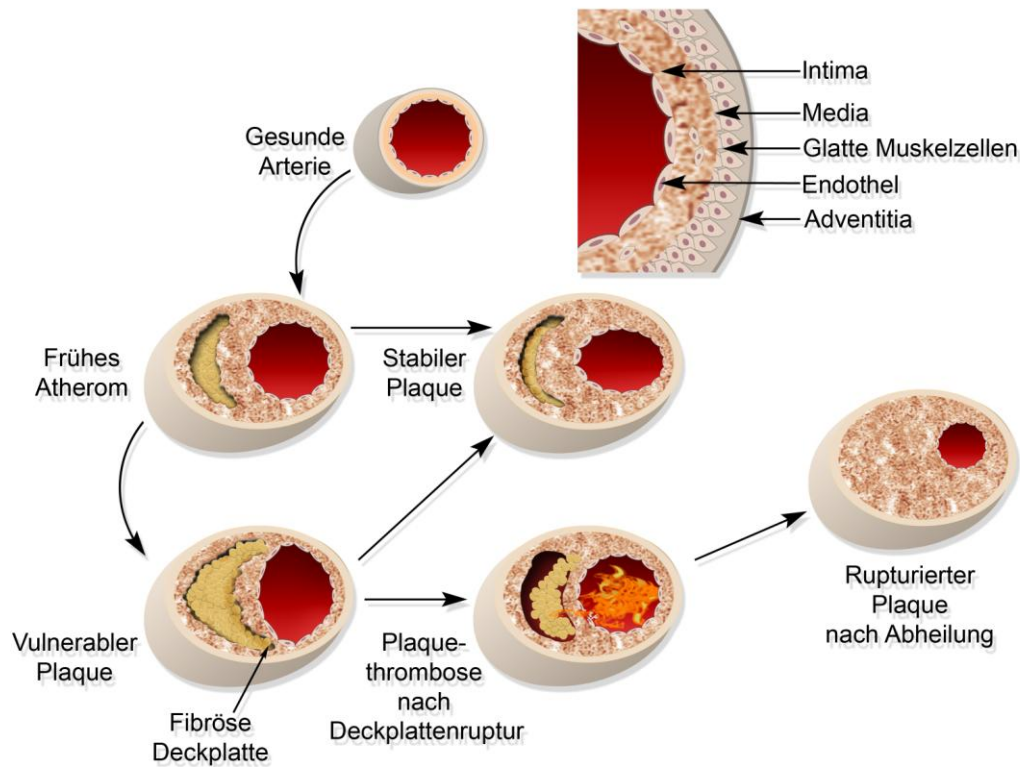


die verstärkte Proliferation von Gefäßmuskelzellen, zur Bildung der atherosklerotischen Plaque beitragen. (Nickenig und Böhm, 2004)



**Abbildung 1: Schematische Darstellung der Einwanderung von Monozyten in den subintimalen Raum und deren Transformation in Makrophagen und Schaumzellen im Rahmen der Entwicklung einer atherosklerotischen Plaque.** (Schlitt, 2006)

Durch die entstandene Plaque wird die Gefäßrelaxation erschwert und sowohl dadurch, als auch durch die Raumforderung der Plaque, wird der Blutfluss behindert und es kann schon jetzt zur Sauerstoffminderversorgung kommen. Zum Gefäßlumen hin ist die Plaque von einer fibrösen Kappe und von Endothelzellen bedeckt. Diese Deckschicht kann, bedingt durch Entzündungsprozesse im Inneren der Plaque, einreißen, was dazu führt, dass der Plaque-Inhalt mit dem zirkulierenden Blut in Kontakt kommt. Dieser Kontakt wirkt als Auslöser der Gerinnungskaskade und als Stimulus der Thrombozyten und führt somit zur Thrombosierung und damit meist zur kompletten Verstopfung des betroffenen Gefäßes. (Nickenig und Böhm, 2004)



**Abbildung 2: Darstellung der atherosklerotischen Stadien und der Entwicklung einer gesunden Arterie zu einer durch atherosklerotische Plaques erkrankten Arterie. (Schlitt, 2006)**

## 1.2 Das akute Koronarsyndrom

### 1.2.1 Allgemeines

Der Begriff *akutes Koronarsyndrom* (ACS) fasst die Phasen der koronaren Herzkrankheit zusammen, die durch die Thrombosierung eines oder mehrerer das Herz versorgender Gefäße eine unmittelbare Lebensbedrohung darstellen. Je nach Schweregrad und Dauer der Minderversorgung unterscheidet sich die Prognose der verschiedenen Manifestationsformen des ACS. Da klinisch die Übergänge der einzelnen Stadien ineinander fließend sind, wird zum besseren Therapiemanagement mittels EKG eingeteilt in die instabile Angina pectoris (typische thorakale Beschwerden, Ischämiezeichen im 12-Kanal-EKG), den akuten Myokardinfarkt ohne ST-Streckenhebung (NSTEMI, typische thorakale Beschwerden + pathologischer Troponin-Nachweis  $\pm$  Ischämiezeichen im 12-Kanal-EKG), den akuten Myokardinfarkt mit ST-Streckenhebung (STEMI, typische thorakale Beschwerden + signifikante ST-Hebungen im 12-Kanal-EKG) und den plötzlichen Herztod. (Hamm, 2004; Schlitt et al., 2007)

### **1.2.2 Thrombozytenaggregationshemmung und Antikoagulation bei koronarer Herzkrankheit**

Zur Prävention der Entstehung eines ACS als Folge der KHK wird eine lebenslange aggregationshemmende Medikation bei bekannter KHK empfohlen. Dabei gilt Acetylsalicylsäure (ASS) in einem Dosisbereich von 75-325 mg am Tag als Mittel der ersten Wahl. Bei Unverträglichkeit oder Kontraindikation kann auf Clopidogrel ausgewichen werden. Eine primäre Prävention zur Verhinderung einer KHK mittels ASS wird in Europa im Vergleich zu den USA eher zurückhaltend durchgeführt. Diese wird aufgrund der möglichen Nebenwirkungen wie schwere Blutungen nur für Hochrisikopatienten empfohlen und damit für Patienten mit einer Häufung von Risikofaktoren, positiver Familienanamnese oder bei Vorliegen eines Diabetes mellitus. Je nach individuellem Risiko-Score aufgrund bestehender Vorerkrankungen wird diese prophylaktische Therapie noch um die zusätzliche Gabe von HMG-CoA-Inhibitoren (Statine), Clopidogrel, ACE-Hemmer und Antikoagulantien erweitert. (Anderson et al., 2007; Graham et al., 2007)

### **1.2.3 Zelluläre und plasmatische Gerinnung**

Jede antithrombotische Therapie stellt einen Eingriff in das hämostatische System (hämo = Blut, stase = Stillstand) dar. Grundlegend beteiligt an diesem System sind hierbei die Blutgefäße mit Endothel und muskulärem Anteil als vaskuläre Komponente, die Thrombo-, Erythro- und Leukozyten als zelluläre Komponenten, die Gerinnungsfaktoren und ihre Inhibitoren als plasmatische Komponente und schließlich die Fibrinolyse und ihre Inhibitoren. Um dabei ein Gleichgewicht zwischen der Fließfähigkeit des Blutes im Gefäßsystem einerseits und der Gerinnbarkeit des Blutes und Reparatur der Gefäßwände bei Verletzungen andererseits zu bilden und zu erhalten, ist ein komplexes Zusammenspiel der einzelnen Komponenten nötig. (von Depka Prondzinski, 2002)

#### **Zelluläre Komponente**

Das Blut des Menschen enthält normalerweise zwischen 150.000 und 400.000 Thrombozyten pro Mikroliter. Sie besitzen einige zum Teil Thrombozyten-spezifische Rezeptoren und HLA-Eigenschaften und können außerdem zahlreiche Substanzen freisetzen, die die Blutgerinnung beeinflussen.

Beispiele dieser Substanzen sind der Von-Willebrand-Faktor (vWF), Fibrinogen, Plättchenfaktor 4 (PF4) und Plasminogen aus den  $\alpha$ -Granula, Serotonin,  $Ca^{2+}$  und Glykoprotein (GP) IIb/IIIa aus den dense bodies und saure Hydrolasen aus lysosomalen Granula.

Bei intakten Gefäßen verhindert unter anderem eine Glykokalix auf den Endothelzellen eine Anlagerung von Thrombozyten. Durch eine Gefäßverletzung wird das Endothel mit seiner Funktion als Barriere zwischen Blut und extrazellulärer Matrix zerstört. Das führt zur

Aktivierung und damit zur Adhäsion der Thrombozyten an subendotheliales Gewebe. Hauptinitiator ist dabei der vWF, der das Bindeglied zwischen den Glykoproteinen Ib/IX und IIb/IIIa auf der Thrombozyten-Oberfläche und den freiliegenden Kollagenfasern des Subendothels darstellt. Unter physiologischen Bedingungen befinden sich die vWF-Multimere in globulärer Form im Blutplasma. Bei Vorliegen hoher Strömungsgeschwindigkeiten und durch Bindung an die verschiedenen Komponenten der subendothelialen Matrix kommt es zur Entfaltung der vWF-Multimere und somit zur Offenlegung sowohl der Bindungsdomänen für den GP Ib/IX-Komplex als auch weiterer thrombozytärer Glykoproteine des vWF-Moleküls. Im Zuge dieser nun möglichen Adhäsion verändert sich die Form der Thrombozyten: Sie verlieren ihre flache scheibenartige (discoide) Form und nehmen eine kugelförmige (sphärische) Gestalt an. Zudem bilden sie Pseudopodien aus, was einerseits zu einer mehrfachen Oberflächenvergrößerung führt und ihnen andererseits die Fähigkeit verleiht, aneinander anzuhafte und einen Primär-Thrombus, bestehend aus Thrombozyten, zu bilden (primäre Hämostase). Dieser Vorgang der Formveränderung wird als „shape change“ bezeichnet. Die weitere Freisetzung von vWF, Adenosindiphosphat (ADP), Katecholaminen und anderen Mediatoren aus den verschiedenen Organellen der Thrombozyten führt zur Unterhaltung dieses Anhaftungs-Prozesses und zur Verstärkung der Gefäßverengung. Auf der Thrombozyten-Oberfläche werden weiterhin Phospholipide freigesetzt, die die Gerinnungskaskade in Gang setzen. Auf diese Weise entsteht über Thrombin Fibrin, das die Thrombozyten untereinander vernetzt und so den Primär-Thrombus stabilisiert. (von Depka Prondzinski, 2002; Schmidt et al., 2004)

### **Plasmatische Komponente**

Ziel der plasmatischen Gerinnung (sekundäre Hämostase) ist die Umwandlung des inaktiven Fibrinogens in Fibrin, das mittels Bildung von unlöslichen Fibrinpolymeren beim Aufbau eines Gerinnsels unerlässlich ist. Es sorgt für die nötigen physikalischen Eigenschaften eines Thrombus: große mechanische Stabilität bei erhaltener Elastizität. Durch die plasmatische Gerinnung wird also der Primär- in einen Sekundär-Thrombus umgebaut.

Die Gerinnungsaktivierung läuft in Form einer Kaskade sich gegenseitig aktivierender Gerinnungsfaktoren ab, die im unverletzten Gefäß als inaktive Vorstufen vorliegen. Es handelt sich größtenteils um Enzyme, die Serin in ihrem aktiven Zentrum aufweisen und deshalb als Serinproteasen bezeichnet werden (mit Ausnahme der Faktoren V, VIII und XIII). Die Aktivierung der inaktiven Vorstufen geschieht durch Abspaltung eines Peptids, was den nun aktiven Gerinnungsfaktor befähigt, wiederum weitere Faktoren zu aktivieren. Um eine unkontrollierte Thrombosierung zu verhindern ist es von großer Bedeutung, diesen Ablauf durch gleichzeitige Hemmungsmechanismen zu regulieren. Diese Mechanismen werden zusammen mit der Gerinnungskaskade aktiviert und wirken sowohl durch direkte

Neutralisierung der enzymatisch aktiven Gerinnungsfaktoren als auch durch Inaktivierung von Co-Faktoren. Dadurch wird außerdem erreicht, dass sich die Blutgerinnung nur am Ort der Verletzung abspielt und nicht, durch Transport von aktiven Gerinnungsfaktoren und Thrombozyten mit dem Blutfluss, im unbeschädigten Gefäßsystem.

Es gibt zwei Systeme, die die Gerinnungskaskade aktivieren: das intrinsische und das extrinsische Gerinnungssystem.

Das extrinsische System wird durch den Kontakt von Faktor VII (FVII) mit Gewebethromboplastin (tissue factor, TF) ausgelöst. TF ist ein Transmembran-Protein mit hochaffiner Bindungsstelle für FVII. Da TF nur von Zellen und Geweben gebildet wird, die bei gesundem Gefäßsystem nicht mit dem Gefäßlumen kommunizieren, kann er für die Blutgerinnung nur Bedeutung gewinnen, wenn die Barriere der intakten Gefäßwand gestört wird. Ist dies der Fall, wird die Kaskade, wie in Abbildung 3 dargestellt, aktiviert. Die inaktivierende Wirkung des im Plasma vorkommenden TFPI (tissue factor pathway inhibitor) verhindert dabei eine unkontrollierte Gerinnungsaktivierung.

Auf der Oberfläche von negativ geladenen Phospholipiden bildet sich nun der so genannte Prothrombinasekomplex, bestehend aus FII (Prothrombin), dem Co-Faktor FVa und dem FXa, der hier als aktivierendes Enzym fungiert. Dieser als „Initiation“ bezeichnete Schritt führt damit Calcium-abhängig zur Bildung von Thrombin (FIIa) aus seiner inaktiven Vorstufe Prothrombin. Da die beschriebenen Enzymkomplexe abhängig von negativ geladenen Phospholipiden sind und diese sich gehäuft auf der Membran-Oberfläche von Thrombozyten und im subendothelialen Gewebe befinden, wird eine Lokalisierung des Gerinnungsprozesses am Ort der Gefäßschädigung erreicht und einer unkontrollierten systemischen Gerinnungsaktivierung vorgebeugt. Calcium dient dabei als Bindeglied zwischen den negativen Phospholipiden und den ebenfalls negativen Gerinnungsfaktoren.

Ein Teil der Gerinnungsfaktoren (II, VII, IX, X, Protein C und Protein S) wird Vitamin-K-abhängig synthetisiert. Fehlt Vitamin K, können die Faktoren nicht an Phospholipide binden. Das hat eine Blockierung der Gerinnungskaskade zur Folge und erklärt die Blutungsneigung bei Vitamin-K-Mangel und den gerinnungshemmenden Effekt von Vitamin-K-Antagonisten vom Cumarin-Typ.

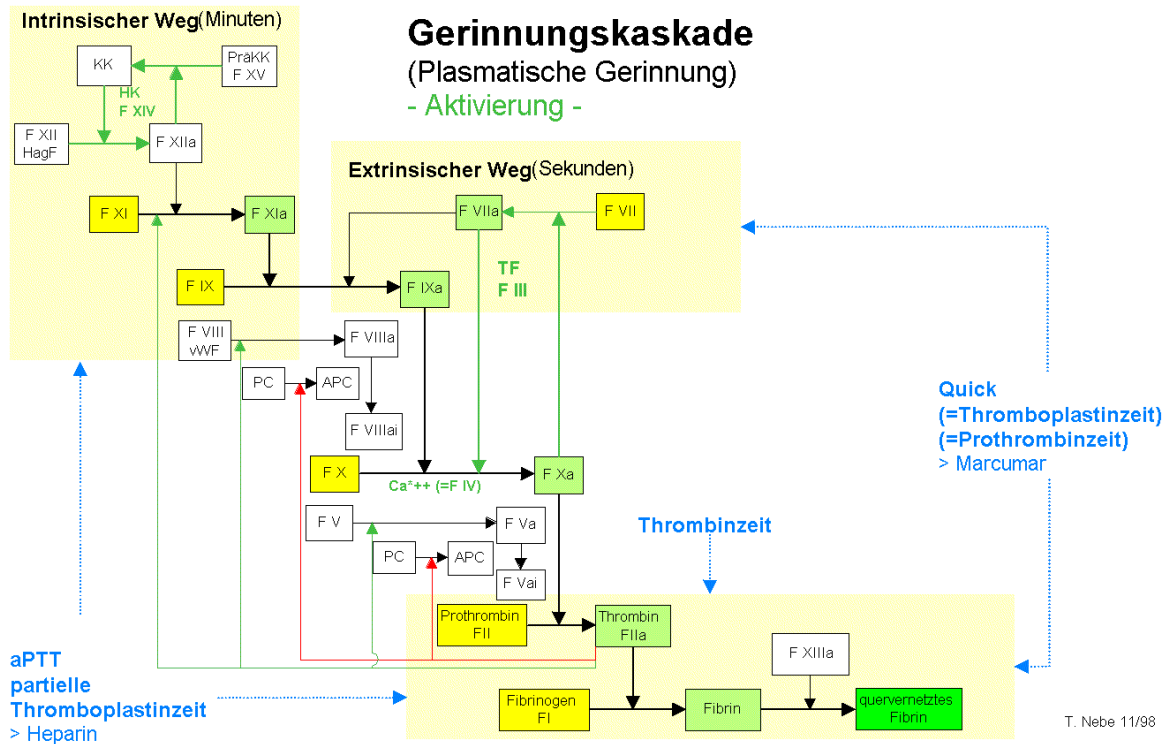
Für das intrinsische System wirken Fremdoberflächen wie negativ geladene subendotheliale Strukturen (Basalmembran oder Kollagen), die bei einer Gefäßverletzung in Kontakt mit dem Blutstrom treten, als Auslöser der Gerinnungskaskade. Diese Eigenschaft der Kontaktaktivierung macht man sich in der Diagnostik bei der Testung der aPTT (aktivierte partielle Thromboplastinzeit) zunutze, indem man Patientenblut mit Kaolin, Silica, Glas, Elagsäure oder Celit als negativ geladene Oberflächen in Kontakt bringt und so die individuell benötigte Zeit bis zur Gerinnungsbildung messen kann.

Die Kontaktaktivierung führt zunächst zur Umwandlung des oberflächensensiblen FXII in FXIIa, der wiederum dazu in der Lage ist, aus Präkallikrein Kallikrein zu bilden. Kallikrein wirkt nun zusammen mit dem hochmolekularen Kininogen (high molecular weight kininogen, HMWK) als Aktivierungsverstärker im Sinne einer so genannten Verstärkerschleife (amplifier loop), wodurch weitere FXII zu FXIIa aktiviert werden. FXIIa aktiviert seinerseits FXI, dieser wiederum Calcium-abhängig FIX. Bei der durch FIXa ausgelösten Aktivierung von FX werden wie auch bei der extrinsischen Aktivierung Calcium und Phospholipid benötigt. Außerdem dient hier FVIIIa als Reaktionsbeschleuniger. Die erwähnten Faktoren und Cofaktoren, die an der Bildung von FXa beteiligt sind, werden dabei als Tenase-Komplex bezeichnet (Ten = Zehn, -ase = spezifische Endung für Enzym). Nun kommt es wieder zu dem schon beim extrinsischen System beschriebenen Prothrombinase-Komplex bestehend aus FII, FVa und FXa, der zur Thrombinbildung führt.

Obwohl man den extrinsischen und den intrinsischen Weg unabhängig voneinander beschreiben kann, lassen sich beide in ihrem Ablauf nicht strikt voneinander trennen. Zum einen liegt das darin begründet, dass die Verletzung eines Blutgefäßes immer dazu führt, dass das Blutplasma sowohl in Kontakt mit TF-exprimierenden Zellen als auch mit subendothelial gelegenen negativen Oberflächen tritt. Zum anderen interagieren beide Systemen an verschiedenen Stellen miteinander.

In der gemeinsamen Endstrecke von extrinsischem und intrinsischem System kommt es nun zur enzymatischen Aktivierung von Fibrinogen zu Fibrin. Das in der Leber synthetisierte Fibrinogen besteht aus einer  $\alpha$ -, einer  $\beta$ - und einer  $\gamma$ -Peptidkette. Thrombin spaltet nun die Fibrinopeptide A und B (FPA und FPB) von der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette ab, wodurch aus dem Fibrinogenmolekül ein noch wasserlösliches Fibrinmonomer entsteht. Aufgrund spontaner Polymerisation lagern sich Fibrinmonomere zu Fibrinpolymeren zusammen und bilden so im Plasma nicht mehr lösliche aber noch wenig stabile Fibrinprotofibrillen. Diagnostisch kann nun durch immunologische Messung des im Plasma vorliegenden FPA als direkten Marker für die enzymatische Aktivität von Thrombin getestet werden, ob dieser Schritt der Gerinnungskaskade gestört ist oder nicht. Um durch Quervernetzung der Fibrinprotofibrillen mittels kovalenter Bindungen einzelner Domänen eine Stabilisierung des Materials und damit eine Stabilisierung des Gerinnsels zu erreichen, wird der Gerinnungsfaktor XIIIa als Katalysator benötigt. Die Aktivierung dieses Faktors erfolgt ebenfalls durch Thrombin. FXIIIa führt zusätzlich durch Quervernetzung des Fibrins mit Kollagen, Fibronectin, Vitronectin und vWF zu einer stabilen Verankerung des Gerinnsels an der extrazellulären Matrix. Fibrinogen ist weiterhin dazu in der Lage, mit Endothelzellen, Erythrozyten, Makrophagen, Fibroblasten und Thrombozyten zu interagieren. Auf der Thrombozyten-Oberfläche steht dafür der Fibrinrezeptor GP IIb/IIIa zur

Verfügung, der durch die antithrombotisch wirksame Medikamenten-Gruppe der GP IIb/IIIa-Hemmer blockiert werden kann. (Kemkes-Matthes und Oehler, 1998; Pröttsch, 2002; von Depka Prondzinski, 2002)



**Abbildung 3: Die Gerinnungskaskade der plasmatischen Gerinnung mit extrinsischer und intrinsischer Aktivierung.** (<http://www.ma.uni-heidelberg.de/inst/ikc/gerinnungskaskade.html>)

### 1.2.4 Inhibitoren der plasmatischen Gerinnung

Um sicherzustellen, dass das plasmatische Gerinnungssystem nicht unkontrolliert zur Entstehung einer Thrombose führt, gibt es verschiedene Inhibitoren, die den überschießenden Ablauf der Kaskade am Verletzungsort und eine Gerinnselbildung in unverletzten Gefäßarealen verhindern. Diese Regulierung beginnt schon mit Einsetzen der Blutgerinnung entweder in Form von Neutralisierung bereits aktivierter Gerinnungsfaktoren oder durch Hemmung geschwindigkeitsbestimmender Co-Faktoren. Zwei dieser Inhibitoren werden in ihrer Wirkung durch Heparin verstärkt:

**Antithrombin III (AT)** ist ein Hemmer der Serinproteasen und damit der Faktoren IIa, VIIa, IXa, Xa, XIa und XIIa, wobei die Wirkung am stärksten bei Thrombin (FIIa) und FXa ausgeprägt ist. Die relativ langsam ablaufende inhibitorische Reaktion, nämlich die Bindung von AT an den jeweiligen Gerinnungsfaktor, kann durch Heparin um ein Tausendfaches beschleunigt werden. Dabei bildet sich zunächst ein Komplex aus AT und Heparin, wodurch AT seine Konformation ändert und leichter an Gerinnungsfaktoren binden kann. Der auch als

hereditäre Thrombophilie bezeichnete Mangel an AT führt demnach zu einer erhöhten Thromboseneigung und muss gegebenenfalls perioperativ oder peripartal durch Substitution mit AT-Konzentrat vorübergehend therapiert werden.

**Tissue factor pathway inhibitor (TFPI)** ist ein Hemmer des extrinsischen Aktivierungskomplexes aus TF und FVIIa. Dies erfordert die Bindung an FXa, was durch Anwesenheit von Heparin (um den Faktor 40) beschleunigt abläuft. Dieser TFPI-FXa-Komplex ist nun in der Lage, durch Bindung an den TF-FVIIa-Komplex dessen Aktivität zu neutralisieren. (Kemkes-Matthes und Oehler, 1998; Pröttsch, 2002; von Depka Prondzinski, 2002)

### **1.2.5 Antikoagulantien**

Liegt ein akutes Koronarsyndrom vor, ist die schnellstmögliche effektive Hemmung der Blutgerinnung (Thrombozytenaggregationshemmung und Antikoagulation) von größter Bedeutung, um den eintretenden Gewebeschaden durch den Gefäßverschluss möglichst gering zu halten. Aufgrund der Erkenntnisse zahlreicher Studien der letzten Jahre wird im Allgemeinen die kombinierte Gabe von Thrombozytenaggregationshemmern (Clopidogrel und ASS) beim ACS empfohlen. Hochrisiko-Patienten profitieren von der Gabe eines GP IIb/IIIa-Antagonisten (Abciximab, Tirofiban, Eptifibatid) während und nach einer perkutanen Koronarintervention.

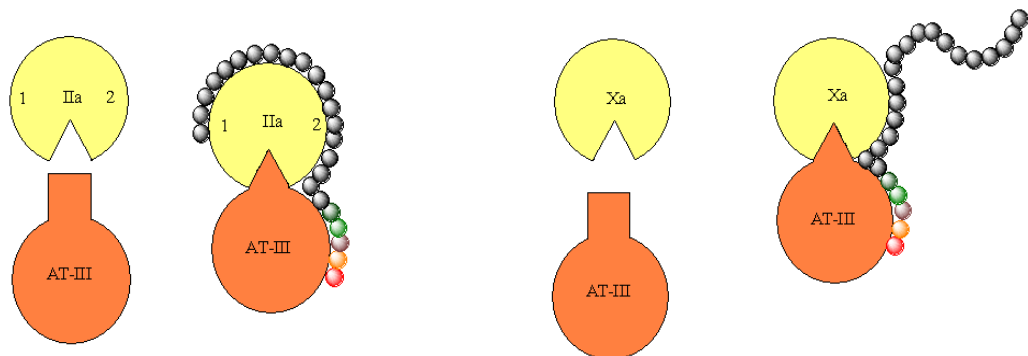
Neben der Hemmung der Thrombozytenfunktion ist die Hemmung der plasmatischen Gerinnung von kurz- und langfristigem prognostischem Nutzen. Es konnte in den 80er Jahren in einer Metaanalyse mehrerer Studien gezeigt werden, dass durch die zusätzliche Gabe von unfraktioniertem Heparin (UFH) sowohl die klinische Symptomatik als auch ein kombinierter Endpunkt aus Tod und Myokardinfarkt signifikant reduziert werden konnte (allerdings bei gleichzeitiger Zunahme relevanter Blutungskomplikationen). Unter den niedermolekularen Heparinen (NMH) mit ihren pharmakologischen und pharmakokinetischen Vorteilen gegenüber UFH ist in Deutschland weiterhin Enoxaparin bei der Therapie des ACS zugelassen. Dieses niedermolekulare Heparin war UFH in einer Metaanalyse der Studien ESSENCE und TIMI-11B hinsichtlich weicher Endpunkte und der Verhinderung des kombinierten Endpunktes aus Tod und Myokardinfarkt überlegen, jedoch zeigte es im SYNERGY-Trial keine Vorteile gegenüber UFH. (Ferguson et al., 2004; Schlitt, 2007)



## Unfraktioniertes Heparin (UFH)

Bei unfraktioniertem Heparin handelt es sich um ein aus der Darmschleimhaut des Schweins gewonnenes Mucopolysaccharid. Es ist aufgebaut aus unterschiedlich langen Molekülketten mit einem Molekulargewicht zwischen 3.000 und 30.000 Dalton. Die antithrombotische Wirkung von UFH wird durch Aktivierung von Antithrombin III mittels Bindung über eine Pentasaccharidstruktur hervorgerufen. Das auf diese Art aktivierte AT bewirkt somit eine Hemmung von Thrombin und weiteren Serin-Proteasen, die als Gerinnungsfaktoren Teil der Gerinnungskaskade sind. Besonders empfindlich reagieren dabei FIIa (Thrombin) sowie FXa, wodurch mittels low-dose-Therapie eine Thromboseprophylaxe möglich wird.

Die mittlere Halbwertszeit liegt bei 90-120 min, wobei sie bei höherer Dosierung ansteigt und damit dosisabhängig ist. Außerdem wird sie beeinflusst durch die Funktion von Leber und Nieren und durch eventuell vorhandene Begleiterkrankungen. Im Blut liegt eine hohe Plasmaprotein-Bindung vor, das Verteilungsvolumen beträgt bei Erwachsenen etwa 0,07 l/kg bei einer Bioverfügbarkeit von 100% nach intravenöser (i.v.) Gabe. Die Eliminierung erfolgt nach Spaltung in der Leber renal durch glomeruläre Filtration und tubuläre Sekretion.



**Abbildung 4: Schematische Darstellung der Wirkung des UFH auf FIIa (Thrombin) und FXa. Durch die Bindung des Pentasaccharidanteils der UFH-Ketten kommt es zur Konformationsänderung des AT und Hemmung von FIIa und FXa. (Schlitt et al., 2007)**

Aufgrund der Inaktivierung von UFH im sauren Milieu des Magens, muss es parenteral zugeführt werden. Dabei ist sowohl eine subkutane (s.c.) als auch eine i.v. Applikation möglich, wobei die Blutplasmaspiegel nach subkutaner Injektion starke Schwankungen aufzeigen. Deshalb wird empfohlen, die intravenöse Gabe der subkutanen vorzuziehen. Hierbei ist sowohl die oben genannte interindividuelle Variabilität bezüglich der Dosis zur Erzielung eines therapeutischen Wirkspiegels als auch eine mögliche Bildung von Antikörpern zu beachten und zu überwachen. Aus diesem Grund wird bei einer dauerhaften intravenösen Gabe eine zweimal tägliche Wirksamkeitskontrolle mittels aPTT bzw. ACT (Activated clotting time) empfohlen.

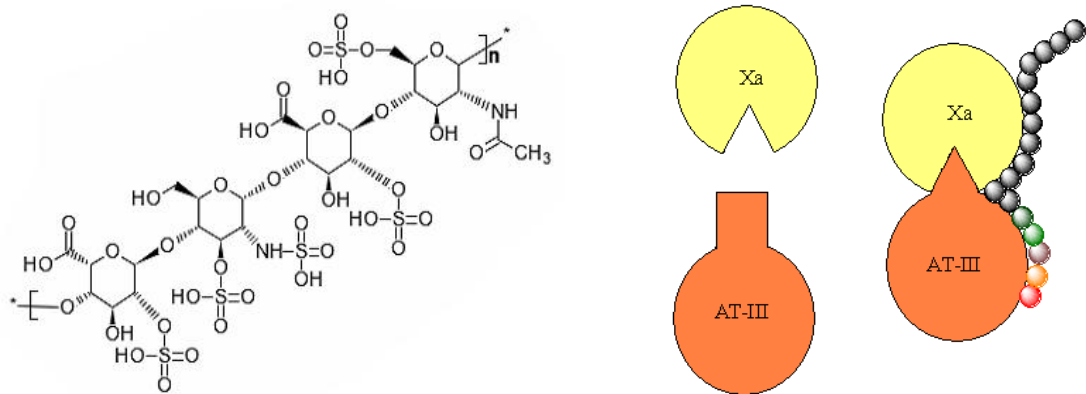
Eine Heparinapplikation führt dem gewünschten Wirkungsmechanismus entsprechend zu einer Hemmung der Blutgerinnung und damit zu einer erhöhten Blutungsneigung, wobei auch

paradoxe gerinnungsfördernde Wirkungen wie z.B. eine Aktivierung der Thrombozyten beobachtet wurden. Blutungskomplikationen treten vor allem bei Frauen mit niedrigem Body-Mass-Index (BMI) und Patienten mit eingeschränkter Nierenfunktion auf. Dabei können häufig Hämatome beobachtet werden, die aber in aller Regel nicht lebensgefährlich sind. Zwar seltener, dafür aber umso schwerwiegender, kommen intrakranielle oder gastrointestinale Blutungen vor. Weiterhin kann es durch eine längere UFH-Gabe zu Alopezie und Osteoporose kommen. Die gefährlichste Komplikation der Antikoagulation mittels Heparin, die Heparin-induzierte Thrombozytopenie (HIT) Typ II, entsteht durch Antikörperbildung gegen den Plättchenfaktor4-Heparin-Komplex. PF4 ist ein positiv geladenes Protein, das aus Thrombozyten freigesetzt wird. Der gebildete Antikörper bindet sowohl an den PF4-Heparin-Komplex als auch an die Thrombozytenoberfläche, was zu einer Aktivierung der Thrombozyten und einer Verstärkung der Thrombinbildung führt. Es kommt zu Thrombozytenaggregation und dadurch zu Thrombozytopenie mit einem Thrombozyten-Abfall von mehr als 50%. Daraus resultieren sowohl thrombotische venöse und arterielle Gefäßverschlüsse als auch schwere Blutungen. Als therapeutische Konsequenz sollte Heparin bei Verdacht auf HIT Typ II sofort abgesetzt werden. Des Weiteren ist eine alternative Antikoagulation unbedingt notwendig, um das Entstehen einer Thrombose oder das Hinzukommen weiterer Thrombosen zu verhindern. Das Thromboserisiko liegt bei diesen Patienten bei bis zu 75%, die Mortalität bei bis zu 20%. Als alternative Antikoagulantien sind Orgaran<sup>®</sup>, Hirudin und Argatroban zugelassen. Außerdem wirksam sind Medikamente wie Arixtra<sup>®</sup> und Angiox<sup>®</sup>. (Fachinformation Heparin; Kemkes-Matthes, 1999; Greinacher et al., 2003; Greinacher, 2004; Retzlaff und Mesters, 2004; Warkentin et al., 2006; Schlitt et al., 2007)

### **Niedermolekulare Heparine (NMH)**

Bei den niedermolekularen Heparinen (NMH) handelt es sich um eine Gruppe verschiedener Wirkstoffe, die zwar wie unfraktioniertes Heparin über AT-Aktivierung wirken, jedoch vorwiegend lediglich den Gerinnungsfaktor Xa hemmen. Ihr Molekulargewicht liegt in einem Bereich von 5.000 bis 30.000 Dalton. Somit ist die Kettenlänge im Vergleich zu UFH deutlich geringer. Weiterhin ist der Pentasaccharid-Anteil erhöht, wodurch der gerinnungshemmende Effekt im Vergleich zu UFH besser abgeschätzt werden kann.

Im Vergleich zu UFH wird bei NMH in erheblich kürzerer Zeit ein therapeutischer Wirkspiegel erreicht, der durch eine einmal tägliche, subkutane Injektion aufrecht erhalten werden kann. Dies liegt in einer längeren Halbwertszeit und einer besseren Kalkulierbarkeit der Dosis begründet. Eine Überwachung der NMH-Gabe mittels Bestimmung der Anti-Xa-Aktivität ist normalerweise nicht erforderlich. Zur Behandlung von Patienten mit tiefer Beinvenenthrombose, Lungenembolie oder ACS kann ein NMH auch zweimal täglich in therapeutischer Dosierung gegeben werden.



**Abbildung 5: Schematische Darstellung der Wirkung der NMH auf FXa. Durch die Bindung des Pentasaccharidanteils kommt es zur Konformationsänderung des AT und zur überwiegenden Hemmung des FXa. Exemplarisch für die Gruppe ist die Strukturformel von Enoxaparin gezeigt. (Schlitt et al., 2007)**

Auch für NMH gilt als Kontraindikation eine bekannte HIT Typ II, obwohl hier durch die geringere Molekülgröße das (erstmalige) Auftreten einer solchen Thrombozytopenie unwahrscheinlicher ist. Die Elimination verläuft nach fast vollständiger hepatischer Metabolisierung überwiegend renal. Aus diesem Grund muss die Dosis von NMH in allen Stadien der Niereninsuffizienz angepasst werden.

Für **Enoxaparin** gilt, dass bei leichter bzw. mäßiger Einschränkung der Nierenfunktion (Kreatinin-Clearance 30-80 ml/min) keine Dosisanpassung notwendig ist. Liegt eine stark eingeschränkte Nierenfunktion vor (Kreatinin-Clearance < 30 ml/min), sollte laut Empfehlung eine Verabreichung von 1 mg/kg Körpergewicht s.c. einmal täglich oder 0,5 mg/kg Körpergewicht zweimal täglich erfolgen. Bei Patienten mit einer Kreatinin-Clearance unter 30 ml/min und damit einer stark eingeschränkten Nierenfunktion, sollte die Therapie durch Anti-Xa-Kontrollen überwacht werden. Dabei sollte nach Gabe therapeutischer Dosierungen der vier Stunden nach subkutaner Applikation gemessene Anti-Xa-Spitzenpiegel zwischen 0,4 und 1,1 IE anti-Xa/ml liegen. (Schlitt et al., 2007)

Neben der bereits erwähnten therapeutischen Gabe bei Vorliegen einer KHK (instabile Angina pectoris oder Nicht-Q-Wellen-Myokardinfarkt), wird Enoxaparin zur peri- und postoperativen Primärprophylaxe tiefer Venenthrombosen (TVT) bei Patienten mit niedrigem, mittlerem oder hohem thromboembolischem Risiko angewendet; außerdem zur Primärprophylaxe der TVT bei nicht-chirurgischen Patienten mit mittlerem oder hohem thromboembolischem Risiko bei akuten schweren internistischen Erkrankungen mit der Folge einer weitgehenden Immobilisation (z.B. Herzinsuffizienz NYHA III/IV, Infektionen, respiratorische Erkrankungen). Weitere Indikationen sind die Therapie der TVT mit und ohne Lungenembolie sowie die

Thromboseprophylaxe und Gerinnungshemmung bei extrakorporalem Kreislauf während der Hämodialyse.

Die Eliminationshalbwertszeit von Enoxaparin liegt nach einmaliger subkutaner Verabreichung bei 4,4 h, nach wiederholter Gabe bei etwa 7 h. Es ist erhältlich unter dem Handelsnamen Clexane® (sanofi aventis) als Fertigspritze in verschiedenen Größen. (Fachinformation Clexane® multidose)

Die beiden anderen im Rahmen dieser Arbeit verwendeten niedermolekularen Heparine Certoparin und Dalteparin unterscheiden sich aufgrund ihrer unterschiedlichen Kettenlänge in Pharmakodynamik und –kinetik von Enoxaparin.

Klinisch kommt **Certoparin** für die peri- und postoperativen Primärprophylaxe tiefer Venenthrombosen bei Patienten mit mittlerem oder hohem thromboembolischen Risiko, bei nicht-chirurgischen Patienten mit einem erhöhten Risiko für venöse Thrombosen und bei Immobilisation aufgrund einer akuten Erkrankung sowie bei Patienten mit akutem ischämischen Schlaganfall zur Anwendung. Es wird weiterhin zur Therapie der tiefen Venenthrombose eingesetzt. Die Gabe erfolgt wie bei Enoxaparin einmal täglich s.c., in der Regel in die Bauchfalte. Die Halbwertszeit der Hemmung des FXa liegt bei 4,3 h. (Fachinformation Mono-Embolex®)

Die Anwendungsgebiete von **Dalteparin** in der Thromboseprophylaxe gleichen denen von Enoxaparin. Es wird außerdem verwendet für die Therapie akuter tiefer Venenthrombosen und Lungenembolien bei Patienten, bei denen keine thrombolytische oder chirurgische Therapie indiziert ist, sowie zur Rezidivprophylaxe venöser Thromboembolien bei onkologischen Patienten. Auch dieses Medikament wird einmal täglich s.c. appliziert. Die biologische Halbwertszeit beträgt nach subkutaner Gabe  $228 \pm 40$  min, nach intravenöser Injektion 120 min, unabhängig von der Dosis. (Fachinformation Fragmin® P)

## 1.3 Die Herzkatheteruntersuchung

### 1.3.1 Allgemeines

Das Ziel einer perkutanen Koronarintervention ist es, eine bestehende hämodynamisch wirksame Stenose der Koronararterien zu beseitigen und dabei zu verhindern, dass es zu einer Myokardschädigung oder zum Verschluss von Seiten- oder Endästen kommt. Nach angiographischer Darstellung wird versucht, mit Hilfe eines Führungsdrahtes die verschlossene Stelle zu passieren. In 10-20% der Fälle wird daraufhin lediglich mittels Ballon dilatiert und kein Stent eingesetzt, in 80-90% der Fälle ist die PCI mit einer Stentimplantation verbunden. Dabei können Stents direkt, also ohne Vordilatation, auch in relativ enge, nicht verkalkte Stenosen eingebracht werden. Ist ein direktes Stenting nicht möglich, muss vor Platzierung des

Stents mittels Ballon vordilatiert werden. Das direkte Stenting ist das ökonomischere Verfahren, vermindert aber nicht die Restenoserate. (Bonzel et al., 2008; Bonzel und Hamm, 2009)

### **1.3.2 Indikation beim akuten Koronarsyndrom**

Therapiegrundlage bei Vorliegen eines STEMI (ST-Hebungs-Myokardinfarkt) ist eine sofortige Reperfusionstherapie, wenn möglich mit einer Primär-PCI, wenn diese innerhalb von höchstens 90-120 Minuten nach der Diagnosestellung durchgeführt werden kann. Im Jahr 2006 wurden bei insgesamt 38.836 Fällen mit einer solchen Primär-PCI innerhalb der ersten 24 Stunden mit der Indikation ACS mit ST-Hebung in 93,18% der Fälle die wesentlichen Interventionsziele erreicht. (Boy et al., 2006)

In der CAPTIM- und der PRAGUE-2-Studie gab es Hinweise darauf, dass innerhalb der ersten drei Stunden nach Beginn des Schmerzereignisses eine thrombolytische Therapie ebenso effektiv die Infarktgröße und die Mortalität reduziert, wie eine PCI. Vorteil der PCI ist die niedrigere Schlaganfall-Gefahr als bei Thrombolyse. In einer Metaanalyse der beiden Studien konnte jedoch ein Vorteil der PCI auch bei kurzem zeitlichem Abstand zum Schmerzbeginn (< 3 Stunden) nachgewiesen werden. Generell sollte einer erfolgreichen Thrombolyse immer eine baldige Koronarangiographie und ggf. eine PCI folgen. (Boy et al., 2006; Bonzel et al., 2008)

Auch bei Patienten mit einem NSTEMI (Nicht-ST-Hebungs-Myokardinfarkt) kann die Prognose mittels Koronarintervention deutlich verbessert werden. Dabei orientiert man sich bei der Entscheidung für oder gegen eine invasive Therapie mittels Einteilung in definierte Risikogruppen. Demnach sollen Patienten mit therapierefraktärer Angina, ggf. mit ausgeprägten EKG-Veränderungen, oder hämodynamisch bzw. Rhythmus-instabile Patienten direkt bzw. notfallmäßig oder innerhalb von 72 Stunden einer Herzkatheteruntersuchung unterzogen und ggf. revaskularisiert werden. Kommen weitere Risikomerkmale wie erhöhtes Troponin, Diabetes mellitus, eingeschränkte linksventrikuläre Funktion (EF < 40%) u. a. hinzu, gelten die Patienten als Risikopatienten für Tod/Myokardinfarkt innerhalb von 30 Tagen und profitieren von einer invasiven Diagnostik innerhalb von 72 Stunden. (Bonzel et al., 2008)

### **1.3.3 Periinterventionelle Therapie bei perkutaner Koronarintervention**

Die periinterventionelle Behandlungsstrategie mit Antithrombotika wurde im Laufe der Zeit auf der Grundlage zahlreicher Studien und unter Einbezug neuer Medikamente in das Behandlungsregime vielfach geändert und optimiert. Die Empfehlungen der aktuellen europäischen Leitlinien mit den jeweiligen Dosierungen aus den Fachinformationen sind den Tabellen 1 und 2 zu entnehmen.

**Tabelle 1: Antithrombotische Therapie bei PCI** (Bonzel et al.,2008; Hamm et al., 2011)

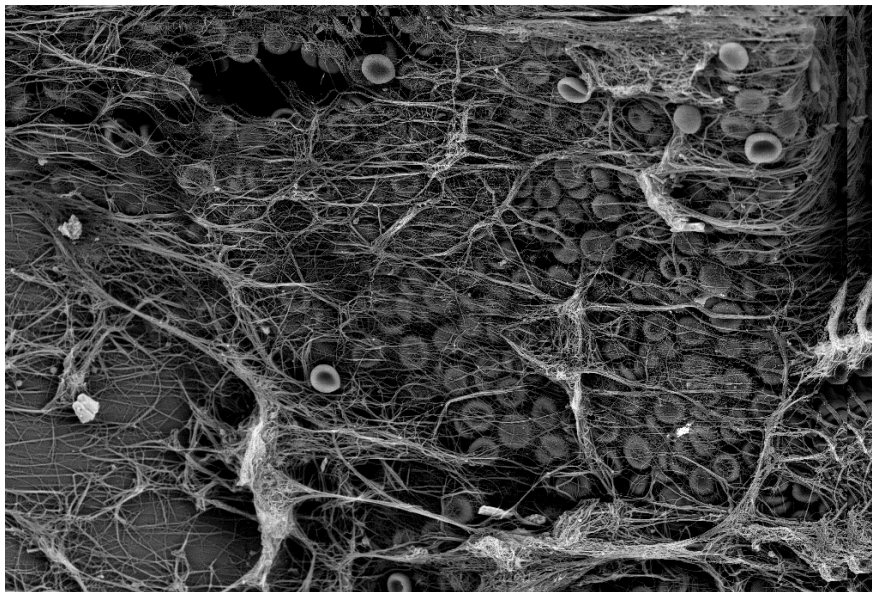
<b>Sofort PCI nach diagnostischer Koronarangiographie</b> (nicht vorbehandelte Patienten)	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Heparin</li> <li>• ASS i.v.</li> <li>• P2Y<sub>12</sub>-Inhibitoren (Clopidogrel, Prasugrel, Ticagrelor)</li> </ul>	
<b>Elektive PCI</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Vorbehandlung mit P2Y<sub>12</sub>-Inhibitor zur PCI + Heparin</li> <li>• Alternativ Bivalirudin (unabhängig von Vorbehandlung mit P2Y<sub>12</sub>-Inhibitor)</li> <li>• „Bail-out“ GP IIb/IIIa-Rezeptorblockade</li> </ul>	
<b>Dringliche PCI</b>	
Instabile Angina ohne Markerproteinerhöhung	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• wie elektive PCI</li> </ul>	
Myokardinfarkt ohne ST-Hebung	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Vorbehandlung mit P2Y<sub>12</sub>-Inhibitor + GpIIb/IIIa-I mit Heparin</li> <li>• bei PCI innerhalb von 24 h: Abciximab im Katheterlabor</li> <li>• bei längerer Wartezeit (&gt; 24 h): sequentielle Therapie mit Tirofiban oder Eptifibatid</li> <li>• alternativ Bivalirudin (unabhängig von Vorbehandlung mit Thienopyridin) mit „Bail-out“ GpIIb/IIIa-I</li> <li>• alternativ Fondaparinux bei hohem Blutungsrisiko mit Heparin-Bolus</li> </ul>	
Myokardinfarkt mit ST-Hebung	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• frühzeitige Behandlung mit P2Y<sub>12</sub>-Inhibitor</li> <li>• Abciximab mit Heparin</li> <li>• Bivalirudin mit provisionaler GpIIb/IIIa-I</li> </ul>	

**Tabelle 2: Dosierung im Rahmen einer PCI** (Bonzel et al.,2008; Hamm et al., 2011)

<b>ASS</b>	
Aufsättigungsdosis	bei nicht vorbehandelten Patienten 250-500 mg i.v. oder möglichst $\geq 3$ h vorher oral
Erhaltungsdosis	100 mg/d
<b>Clopidogrel</b>	
Aufsättigungsdosis	bei nicht vorbehandelten Patienten 300 mg oral (relevante Wirkung nach 6 h) 600 mg oral (relevante Wirkung nach 2 h)
Erhaltungsdosis	75 mg/d bei Unverträglichkeit Ticlopidin 2 x 250 mg/d (Blutbildkontrollen!)

<b>Prasugrel</b>	
Aufsättigungsdosis	60 mg
Standarddosis	10 mg/d
	Einnahme nur in Kombination mit ASS 75-325 mg/d.
<b>Ticagrelor</b>	
Aufsättigungsdosis	180 mg
Standarddosis	2 x 90 mg/d
	Einnahme nur in Kombination mit ASS 75-150 mg/d (nach ASS-Aufsättigungsdosis).
<b>Heparin</b>	
	70-100 IE/kgKG i.v.
	50-70 IE bei GpIIbIIIa-I i.v.

## 1.4 Die Herzkatheter-Thrombose



**Abbildung 6: Elektronenmikroskopische Darstellung eines an der inneren Katheteroberfläche anhaftenden Thrombus nach Versuchsdurchlauf.**

Da in vielen klinischen Studien die schwere Komplikation der Herzkatheter-Thrombose nicht erwähnt wird, ist die genaue Inzidenz unbekannt. Auch Ätiologie und Pathophysiologie sind bisher kaum verstanden. Beim alleinigen Einführen eines Katheters oder Führungsdrahtes dürfte es sich um einen wenig traumatischen Vorgang handeln, so dass dieser, im Vergleich zu einer Angioplastie oder einem Stenting, nur eine geringe thrombotische Reaktion hervorrufen sollte. Verschiedene Faktoren wirken aber schon ohne direkte Manipulation an den Gefäßen fördernd

auf die Entstehung einer Thrombose: Kathetermaterial und –größe, Oberflächenbeschaffenheit des Equipments, Flussbedingungen des zirkulierenden Blutes, Dauer des Eingriffs und die plättchenhemmenden und antikoagulierenden Medikamente, die während der Durchführung verabreicht werden, führen unter anderem zu zellulären Interaktionen, die zur Aktivierung von TF-sezernierenden Zellen und Thrombozyten beitragen.

Die bisher während einer PCI angewandte gerinnungshemmende Strategie reduzierte zwar das Vorkommen ischämischer Komplikationen, konnte sie aber nicht gänzlich verhindern. (Chan et al., 2009)

Die beiden großen randomisierten doppelblinden Studien OASIS-5 und OASIS-6 lenkten die Aufmerksamkeit auf die Problematik der Herzkatheter-Thrombose. Hier wurde gezeigt, dass Fondaparinux als selektiver FXa-Inhibitor zwar sowohl UFH als auch Enoxaparin im Therapiemanagement bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom ohne PCI überlegen ist, dass aber bei PCI mit Fondaparinux als alleinigem Antikoagulans gehäuft Katheterthromben auftraten. Diese Thromben wurden nach Gabe von 60 IE/kgKG UFH ohne eine dadurch hervorgerufene Erhöhung der Blutungsrate nicht mehr beobachtet. Es zeigte sich bei der Gabe von UFH während und von Fondaparinux in einem Zeitraum von einer Woche nach PCI eine Reduktion des Risikos sowohl von Katheterthromben als auch von weiteren Komplikationen. (Yusuf et al., 2006; Metha et al., 2007)



## **2. Zielstellung**

Im Rahmen der prophylaktischen antithrombotischen Therapie bei perkutaner Koronarintervention bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom stellt unfractioniertes Heparin den Klassiker unter den gerinnungshemmenden Medikamenten dar. Pharmakodynamische und –kinetische Eigenschaften wie schnellere Erreichbarkeit eines therapeutischen Wirkspiegels oder längere Halbwertszeit und bessere Steuerbarkeit machen niedermolekulare Heparine zu einer interessanten Alternative. Gefürchtete unerwünschte Wirkungen wie Plättchenaktivierung oder Heparininduzierte Thrombozytopenie treten unter Anwendung niedermolekularer Heparine deutlich seltener und milder auf als nach Gabe von UFH. Enoxaparin ist bisher der einzige Vertreter der niedermolekularen Heparine, der zur Antikoagulation bei perkutaner Koronarintervention zugelassen ist. Sowohl unter Einsatz von UFH als auch unter Antikoagulation mittels Enoxaparin wird jedoch bei der Durchführung einer PCI die gefährliche Komplikation der Herzkatheter-Thrombose beobachtet. Da diese mit schwerwiegenden Konsequenzen einhergehen kann und die PCI eine große therapeutische Bedeutung im Rahmen der Behandlung des ACS hat, sollten alle dafür eingesetzten oder getesteten Antikoagulantien und Thrombozytenaggregationshemmer ebenso die Bildung einer Katheterthrombose effektiv verhindern.

Neben Enoxaparin gibt es weitere Vertreter der Gruppe der niedermolekularen Heparine, die sich aufgrund ihrer Größe und Struktur in ihrem Wirkungsprofil voneinander unterscheiden. Dementsprechend könnten andere Wirkstoffe dieser Substanzklasse möglicherweise eine effektivere Antikoagulation während einer perkutanen Koronarintervention bewirken.

Unserer Studie liegt die Hypothese zugrunde, dass die beiden niedermolekularen Heparine Certoparin und Dalteparin dem etablierten Antikoagulans Enoxaparin in der Verhinderung der Katheterthromboseentstehung überlegen sind. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde unter Zuhilfenahme eines in unserer Arbeitsgruppe etablierten *in vitro*-Modells die antithrombotische Wirksamkeit der genannten Antikoagulantien komparativ charakterisiert.

### **3. Material und Methodik**

#### **3.1 Materialien**

Die für die Durchführung der Versuche benötigten Materialien sind in den Tabellen 3 bis 6 aufgeführt.

**Tabelle 3: Verbrauchsmaterialien**

<b>Bezeichnung/Name</b>	<b>Hersteller/Bezugsquelle</b>
BD Value-Set 0,8x20 mm	B. Braun Melsungen AG, Deutschland
Perfusorspritze 50 ml	B. Braun Melsungen AG, Deutschland
Combi-Stopper	B. Braun Melsungen AG, Deutschland
Kanülen	B. Braun Melsungen AG, Deutschland
Multi Adapter	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
S-Monovette 3 ml 9NC	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Dutschland
Masterflex Verbindungsschlauch	Masterflex AG, Gelsenkirchen, Deutschland
Multireaktionsgefäß 50 ml	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Discofix C Dreiwegehähne	B. Braun Melsungen AG, Deutschland
Herzkatheter 6F multipurpose	Cordis Johnson-Johnson
Küvetten Micro mit Mixer 1,0 x 4,0	Rolf Greiner BioChemica GmbH, Flacht, Deutschland

**Tabelle 4: Laborgeräte**

<b>Bezeichnung/Name</b>	<b>Hersteller/Bezugsquelle</b>
Zentrifuge Rotina 48 RC	Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen, Deutschland
Analysenwaage	Scaltec Instruments GmbH, Göttingen, Deutschland
Masterflex Rollerpumpe	Masterflex AG, Gelsenkirchen, Deutschland
APACT 4 Koagulometer	Rolf Greiner BioChemica, Flacht, Deutschland

**Tabelle 5: Chemikalien**

Bezeichnung/Name	Hersteller/Bezugsquelle
Aqua dest	Millipore GmbH, Schwalbach, Deutschland
Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland
Aceton	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Hexamethyldisialzane	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Ethanol pur	Mallinckrodt Baker, Griesheim, Deutschland
NaCl	Herstellung in unserem Forschungslabor
ADP-Reagenz	Rolf Greiner BioChemica GmbH, Flacht, Deutschland

**Tabelle 6: Medikamente**

Wirkstoff/Handelsname	Hersteller/Bezugsquelle
Acetylsalicylsäure (ASS 500 <sup>®</sup> )	Ratiopharm GmbH
Enoxaparin-Natrium (Clexane <sup>®</sup> )	Aventis Pharma Deutschland GmbH
Certoparin-Natrium (Mono-Embolex <sup>®</sup> )	Novartis Pharma
Dalteparin-Natrium (Fragmin <sup>®</sup> )	Pharmacia
Eptifibatid (Integrilin <sup>®</sup> )	Glaxo Smithkline

## 3.2 Experimentelle Modelle und Protokolle

### 3.2.1 Auswahl und Aufklärung der Probanden

Zur Durchführung der Versuche waren zehn männliche gesunde Probanden im Alter zwischen 19 und 32 Jahren in die Studie eingeschlossen worden. Wegen des Einflusses des weiblichen Zyklus auf die Gerinnungsaktivität sahen wir davon ab, auch Frauen als Probanden zuzulassen. Ausschlusskriterien waren fehlende Einwilligung und Kooperationsbereitschaft, chronische Erkrankungen, Alkohol- bzw. Drogenmissbrauch und regelmäßige Medikamenten-Einnahme. Nach Begutachtung und Befürwortung der Studie durch die Ethikkommission der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg erhielten die Probanden eine ausführliche Aufklärung über den Versuchsablauf und den Hintergrund der Untersuchung sowie über die als gering einzuschätzenden Risiken bei der Blutentnahme und der Einnahme von 500 mg ASS. Dafür wurde jedem Probanden neben einer Fachinformation über ASS ein Informationsformular über die Studie mit einer Einverständniserklärung ausgehändigt, die von allen Probanden unterschrieben wurde. Mit dieser Unterschrift versicherten die Probanden, dass bei ihnen zum Zeitpunkt der Versuche keine bekannten akuten oder chronischen Erkrankungen vorlagen und

dass sie über den gesamten Zeitraum neben der von uns verabreichten ASS keine Medikamente einnahmen. Drei der zehn Probanden waren Raucher.

Als mögliche Komplikationen im Rahmen der Blutentnahmen kann es sehr selten zu Nervenverletzungen oder zur Entwicklung von relevanten Blutergüssen kommen. Sowohl das Auftreten einer Infektion als auch ein bedeutender Abfall des Hämoglobins sind nach wiederholter sachgerechter Durchführung der Blutentnahme von jeweils 50 ml Blut zwar potentiell möglich, aber nicht zu erwarten. Die Einnahme von ASS kann zu Unverträglichkeitsreaktionen, Allergien oder Magenbeschwerden führen. Da keiner der Probanden regelmäßig Medikamente einnahm und zwischen den einzelnen Versuchen immer mindestens zwei Wochen lagen, war die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten einer Magenschleimhautreizung gering.

Der Versuchsablauf wurde für jedes verwendete Medikament mit allen zehn Probanden durchgeführt, so dass die Probanden in den verschiedenen Durchläufen ihre eigene Kontrollgruppe waren.

Es bestand für die Probanden im gesamten Zeitraum der Studie die Möglichkeit, bei Fragen oder Problemen sofort einen Arzt zu Rate zu ziehen. Außerdem konnte das bereits gegebene Einverständnis zur Teilnahme an der Studie zu jedem Zeitpunkt zurückgezogen werden.

Die international geltenden Richtlinien für die Durchführung von Studien wurden durchweg streng eingehalten.

### **3.2.2 Versuchsablauf**

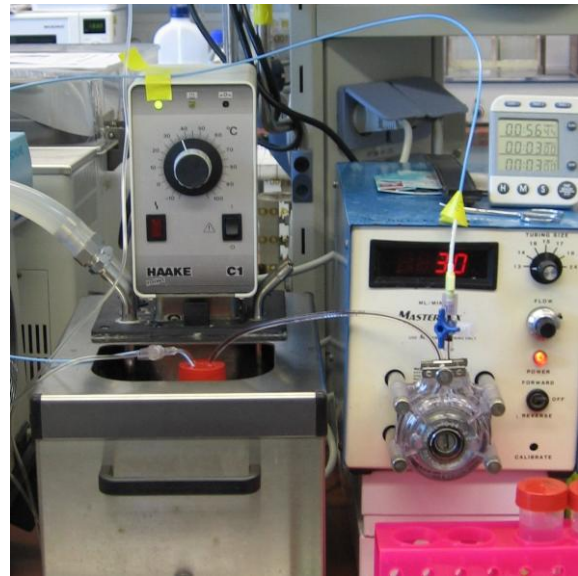
Der Versuchsaufbau wurde aus der vorangehenden Studie unserer Arbeitsgruppe „*In vitro*-Vergleich von unfraktioniertem und niedermolekularem Heparin mit Fondaparinux zur Prävention von Herzkatheter-Thrombosen“ übernommen.

In der aktuell vorliegenden Studie wurden in insgesamt 73 Experimenten folgende antithrombotischen Strategien miteinander verglichen: Enoxaparin, Certoparin und Dalteparin jeweils in einem Durchlauf als alleiniges Antikoagulans und in einem zweiten in Kombination mit dem GP IIb/IIIa-Hemmer Eptifibatid. In Bezug auf den Endpunkt Thrombusgewicht gab es außerdem eine unbehandelte Kontrollgruppe (n=3) sowie eine Gruppe UFH mit (n=5) und ohne (n=5) Eptifibatid.

Für jeden Probanden wurde zunächst einmalig ein Gerinnungsstatus bestimmt, um eventuelle Gerinnungsstörungen ausschließen und somit bei allen Probanden von einer physiologisch ablaufenden Blutgerinnung ausgehen zu können.

Drei Stunden vor jedem Experiment nahmen die Probanden 500 mg ASS ein, entsprechend der in Kapitel 1.2.2.1 aufgeführten empfohlenen Medikation für Patienten mit stabiler KHK und fehlender chronischer Vorbehandlung.

Zu Beginn der Versuchsdurchführung wurde jedem Probanden 50 ml Blut in eine Perfusorspritze abgenommen. Für die Messung der Thrombozytenaggregation (Zeitpunkt T0) wurde zusätzlich eine Citrat-Monovette mit Probandenblut aus der Vene gefüllt. Die Perfusorspritze war zuvor mit dem jeweiligen Medikament in therapeutischer Dosis präpariert worden. 45 ml des Blutes wurden sofort in ein Zentrifugenröhrchen gegeben, welches in einem auf 37° C erwärmten Wasserbad stand. Aus diesem Blut-Reservoir wurde das Blut mittels Rollerpumpe über einen



**Abbildung 7: Versuchsaufbau**

Verbindungsschlauch durch den daran befestigten Herzkatheter wieder zurück in das Zentrifugenröhrchen geleitet, wodurch eine Art Körperkreislauf im Kleinen nachgebildet wurde. Der Katheter wurde vor Einbringen in die Apparatur erstmalig gewogen (Zeitpunkt G0), um eine Gewichtsänderung nach Versuchsdurchlauf quantifizieren zu können. Die restlichen 5 ml wurden in Citrat-Monovetten aufgezogen zur Kontrolle der Gerinnungsparameter und zur Durchführung der Thrombozytenaggregationsmessung (Zeitpunkt T1). Sofern der Blutfluss in der Apparatur nicht schon vorzeitig durch Thrombenbildung unterbrochen wurde und sich der Versuchsablauf somit nicht selbst limitierte, wurde der Durchlauf nach 60 Minuten Laufzeit beendet. Zur abermaligen Bestimmung der Gerinnungsparameter und zur Durchführung der Thrombozytenaggregationsmessung (Zeitpunkt T2) wurden erneut Citrat-Monovetten aufgezogen.

Die weiteren Arbeitsschritte dienten nun der Reinigung des Katheterlumens und der Fixierung von anhaftenden Zellen und Fibrin. Dazu wurde der Katheter zunächst zweimal drei Minuten mit Soerensen-Gebrauchslösung, bestehend aus Stammlösung A (2,7 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  in 200 ml Aqua dest.) und Stammlösung B (7,1 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  in 500 ml Aqua dest.) im Verhältnis 1:4, gespült. Da die Stammlösungen eine Halbwertszeit von ca. zwei Wochen haben, wurden sie regelmäßig neu hergestellt und entsprechend den Empfehlungen bei 4-8° Celsius gelagert.

Die Fixierung der entstandenen Thromben erfolgte mit 25%-Glutardialdehydlösung und mit 2,5%-Glutardialdehydlösung für jeweils 10 Minuten. Im Anschluss daran wurde erneut zweimal für jeweils 15 Minuten mit Soerensen-Gebrauchslösung gespült.

Zur Ermittlung der Gewichtsänderung, die durch die Anhaftung von Blutzellen und Fibrin im Katheterlumen zustande gekommen ist, wurde der Katheter nun erneut gewogen (Zeitpunkt G1). Um die Katheterspitze zur elektronenmikroskopischen Untersuchung und damit zur

Darstellung der anhaftenden Zellen und des Fibrins zu präparieren, wurde der erste Zentimeter abgetrennt, der Länge nach in zwei Hälften aufgeschnitten und im Anschluss daran mittels einer aufsteigenden Aceton-Reihe dehydriert. Dafür wurde eine Verdünnungsreihe aus reinem Aceton und destilliertem Wasser hergestellt. Die beiden Hälften der Katheterspitze wurden dann jeweils 10 Minuten in jeder dieser Lösungen geschwenkt, wobei dieser Vorgang zuletzt zweimal in 100%igem Aceton durchgeführt wurde. Zum Schutz vor Oxidation wurden sie anschließend zuerst 30 Minuten in einer 1:1-Mischung aus reinem Aceton und HMDS (Hexamethyldisilazan), als nächstes 30 Minuten in reinem HMDS unter dem Abzug geschwenkt.

Nachdem die Katheterspitzen über Nacht unter dem Abzug getrocknet wurden, wurden sie luftdicht verpackt, beschriftet und schließlich nach Koblenz in das Bundeswehrzentral Krankenhaus zur elektronenmikroskopischen Fotografie geschickt.

**Tabelle 7: Präparation der Katheterspitzen**

<b>Bearbeitungsschritt der Katheterpräparation</b>	<b>Durchführungsdauer</b>
Spülung mit Soerensen-Gebrauchslösung	2 x 3 min
Schwenkung in 25%-Glutardialdehydlösung	10 min
Schwenkung in 2,5%-Glutardialdehydlösung	10 min
Schwenkung in 30%-Acetonlösung	10 min
Schwenkung in 50%-Acetonlösung	10 min
Schwenkung in 70%-Acetonlösung	10 min
Schwenkung in 80%-Acetonlösung	10 min
Schwenkung in 90%-Acetonlösung	10 min
Schwenkung in 96%-Acetonlösung	10 min
Schwenkung in 100%-Acetonlösung	2 x 10 min
Schwenkung in 1:1 Aceton/HMDS	30 min
Schwenkung in reinem HMDS	30 min
Trocknen unter dem Abzug über Nacht	900 min (= 15 h)
<b>Gesamtdauer</b>	<b>1066 min</b>

### 3.2.3 Dosierung der Antithrombotika

Um die Antithrombotika in den Versuchsreihen in therapeutischer Dosierung einzusetzen, wurden die einzelnen Medikamente entsprechend der für sie bestehenden Dosierungsempfehlungen für die Versuche auftitriert. Dabei lag der Zielbereich der Anti-Xa-Aktivität für die niedermolekularen Heparine bei 0,6-1,1 U/ml, der Zielbereich der ACT (Activated clotting time) für UFH bei 200-300 sec.

**Tabelle 8: Dosierung der Antithrombotika**

	<b>Wirkstoff</b>	<b>Konzentration</b>
Gruppe 1	UFH	0,8 U/ml
Gruppe 2	UFH + Eptifibatid	0,8 U/ml + 1,7 µg/ml
Gruppe 3	Enoxaparin	0,6 U/ml
Gruppe 4	Enoxaparin + Eptifibatid	0,6 U/ml + 1,7 µg/ml
Gruppe 5	Certoparin	0,6 U/ml
Gruppe 6	Certoparin + Eptifibatid	0,6 U/ml + 1,7 µg/ml
Gruppe 7	Dalteparin	0,6 U/ml
Gruppe 8	Dalteparin + Eptifibatid	0,6 U/ml + 1,7 µg/ml

## 3.3 Analytische Methoden

### 3.3.1 Elektronenmikroskopie

Als „eine der bedeutendsten Erfindungen dieses Jahrhunderts“ wurde das Elektronenmikroskop bezeichnet, als im Jahr 1986 ein gemeinsamer Nobelpreis für Physik an Ernst Ruska, Gerd Binnig und Heinrich Rohrer vergeben wurde für ihre Beiträge zu dessen Entwicklung. Sie fanden darin eine Möglichkeit, Elektronenstrahlen zur vergrößerten Darstellung von Objekten zu nutzen, wodurch im Vergleich zur Lichtmikroskopie ein tausendfach höheres Auflösungsvermögen und damit eine detailgetreuere Darstellung der Objekte erreicht werden konnte. Dadurch konnten und können z. B. in der Biologie und der Medizin wichtige Erkenntnisse über die Morphologie und Entwicklung von Organismen, Gewebe und Zellen erzielt werden und bisher für den Menschen unsichtbare Strukturen der Zellen, wie z. B. die DNA, Enzyme und Proteine dargestellt werden. Dies liegt in der deutlich kleineren Wellenlänge von Elektronen als Energiequelle begründet. Ein modernes Lichtmikroskop kann dabei eine Auflösung von bis zu 200 nm leisten. Mit einem Rasterelektronenmikroskop (REM) erreicht man dagegen ein Auflösungsvermögen von bis zu 3 nm. Es dient vor allem zur Darstellung der Oberflächenmorphologie durch zeilenweises „Abtasten“ der Probe mit dem Resultat einer Abbildung mit sehr hoher Tiefenschärfe. Somit können dicke, reliefartige, nicht durchleuchtbare

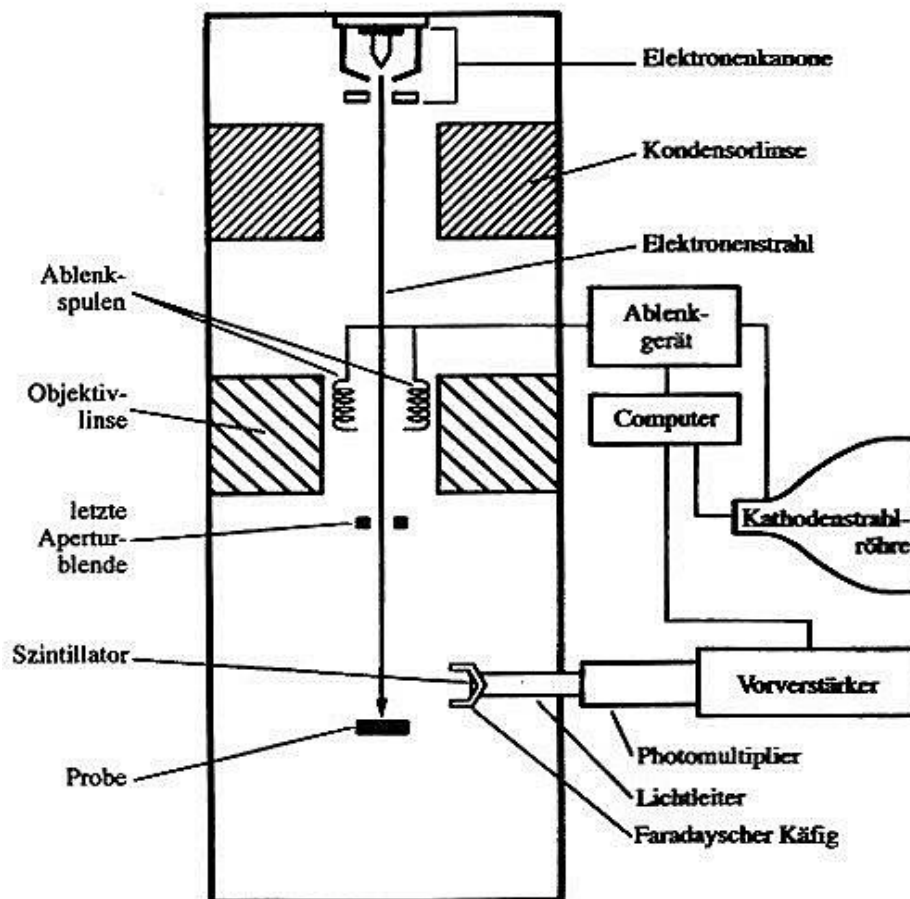
Objektoberflächen in einem extrem breiten Vergrößerungsbereich zwischen 10 und 100.000facher Vergrößerung plastisch und dreidimensional dargestellt werden.

Da Gasmoleküle die Elektronen beim Durchgang durch die Säule behindern, was zu einer Streuung des Strahls und damit einer Verschlechterung des Bildkontrastes führt, wird unter Hochvakuumbedingungen gearbeitet. Auch von unseren zu untersuchenden Proben gehen Gasmoleküle aus, weshalb auf eine sorgfältige Präparation zu achten ist.

Der Elektronenstrahl wird durch die Elektronenkanone gebildet, von der Anode angezogen, durch die Kondensorlinse gebündelt und letztlich durch Bündelung in der Objektivlinse als sehr kleiner Punkt auf die Probenoberfläche fokussiert. Durch in der Objektivlinse befindliche Ablenkspulen, die vom Ablenkgerät mit Spannung versorgt werden, wird ein Magnetfeld erzeugt, das den Elektronenstrahl zum „Abtasten“ der Objektoberfläche in einem kontrollierten Muster (Raster) lenkt. Dieses Muster wird gleichzeitig über das mit den Ablenkspulen verbundene Ablenkgerät mit Hilfe eines Lichtpunktes auf der Kathodenstrahlröhre (cathode ray tube, CRT) abgebildet. Das Auftreffen des Elektronenstrahls auf der Probenoberfläche führt zur Bildung von Sekundärelektronen aus der Probe. Diese Sekundärelektronen werden von einem Detektor gesammelt, in Spannung umgewandelt und verstärkt und letztlich an die CRT geleitet. Hier wirkt die eintreffende Spannung verändernd auf die Intensität des Lichtpunktes ein, sodass hellere und weniger helle Lichtpunkte gebildet werden. Strukturen, die Erhöhungen der Objektoberfläche bilden, führen dabei zur Entstehung einer großen Anzahl an Sekundärelektronen, wodurch ein heller Lichtpunkt auf der Oberfläche der CRT entsteht.

Analog bewirken Absenkungen der Objektoberfläche eine geringe Spannungserzeugung im Detektor und somit einen dunkleren Lichtpunkt. Betrachtet man die vielen so entstehenden Lichtpunkte unterschiedlicher Intensität nun als Gesamtbild erhält man einen topografischen Abdruck der Probenoberfläche. Heutzutage werden fast ausschließlich digitale Rasterelektronenmikroskope gebaut, die viele Vorteile gegenüber der analogen Ausführung haben. Dabei ist hervorzuheben, dass die Bilder digital nachbearbeitet werden können und schnell zur Auswertung zur Verfügung stehen. Als Nachteil ist die geringere Auflösung als bei analogen Geräten zu nennen. (Flegler et al., 1995)





**Abbildung 8: Schematische Darstellung eines Rasterelektronenmikroskops.** (Flegler et al., 1995)

### 3.3.2 Anwendung der Elektronenmikroskopie in unserer Studie

Die genannten Eigenschaften eines REM machen verständlich, dass es für die Darstellung der Thromben in den Herzkathetern und die Quantifizierung der sich dort anlagernden Zellen und des Fibrins bei unseren Versuchen die geeignete Methode war. Die elektronenmikroskopische Analyse der Katheterspitzen wurde im Bundeswehrzentral Krankenhaus Koblenz durchgeführt. Erythro- und Thrombozyten wurden ausgezählt, bezüglich der Fibrinentwicklung orientierten wir uns an folgender Skala: 0 = keine, 1 = wenig, 2 = mittelmäßige, 3 = viel und 4 = sehr viel Fibrinbildung. Die Auswertung der Bilder erfolgte von zwei unabhängigen Untersuchern verblindet zur jeweils angewandten Substanz. Um eine standardisierte Auswertung der elektronenmikroskopischen Bilder zu gewährleisten, wurde von beiden Hälften der jeweiligen Katheterspitze ein Bild an immer der gleichen Stelle mit der gleichen Vergrößerung ( $10\ \mu\text{m} = 1\ \text{cm}$ ) erzeugt.

### 3.3.3 Hämostaseologische Untersuchungsmethoden

Die in den Untersuchungen angewendeten hämostaseologischen Global- oder Gruppenteste werden im Folgenden vorgestellt.

Bei der **aktivierten partielle Thromboplastinzeit (aPTT)** handelt es sich um einen globalen Test, der die Gerinnungsfaktoren des intrinsischen und die gemeinsame Endstrecke des extrinsischen und intrinsischen Gerinnungssystems erfasst. Hierbei handelt es sich um die Gerinnungsfaktoren II (Prothrombin), V, VIII, IX, X, XI und XII sowie Fibrinogen, HMWK und Präkallikrein. In der Klinik dient dieser Test zur Überwachung einer Therapie mit oralen Antikoagulantien oder als Suchtest von angeborenen Hämostasestörungen (insbesondere Hämophilie A und B).

Durch Zugabe von negativ geladenen Oberflächen für die Kontaktaktivierung sowie von gerinnungsaktiven Phospholipiden (partielle Thromboplastine) und Calcium-Ionen zum Plasma kommt es zur Aktivierung der Enzymkaskade des intrinsischen Systems und der Kallikreinschleife. Somit entsteht über die Wirkung von Thrombin Fibrin, dessen Bildung nun mittels Koagulometern, und damit mechanisch, oder optisch gemessen werden kann. Gemessen wird nun die Dauer in Sekunden von der Zugabe der Calcium-Ionen zum vorinkubierten Plasma bis zur fassbaren Bildung von Fibrin.

Die aPTT wird stark von den verwendeten Reagenzien und Geräten beeinflusst, so dass es bisher noch nicht gelungen ist, eine laborunabhängige Standardisierung zu erreichen. Deshalb haben die verschiedenen Labore unterschiedliche Referenzbereiche. Der Referenzbereich des Zentrallabors des Universitätsklinikums Halle (Saale) liegt bei 28-42 Sekunden.

Bei der Durchführung ist im Besonderen darauf zu achten, dass die Citrat-Röhrchen exakt bis zur Markierung mit Blut gefüllt werden, da bei falschem Plasma-Citrat-Verhältnis pathologische aPTT-Werte vorgetäuscht werden können. (Pröttsch, 2002; Barthels und von Depka Prondzinski, 2003)

Die **anti-Xa-Bestimmung** dient in der Klinik zur Überwachung einer Therapie mit NMH, dem Heparinoid Danaparoid oder selektiven FXa-Inhibitoren wie z.B. Fondaparinux. Zu einer Plasmaprobe mit der zu bestimmenden Menge an Antikoagulans wird eine bekannte Menge an FXa gegeben. Da FXa durch Antithrombin inaktiviert wird, welches selbst in einem proportionalen Verhältnis zur Konzentration von Heparin steht, kann man aus der verbleibenden Menge an aktivem FXa auf die im Plasma vorhandene Heparin-Konzentration schließen. Dabei wird ein Farbumschlag gemessen, der durch die FXa-abhängige Hydrolyse eines chromogenen Substrates entsteht. (Pröttsch, 2002; von Depka Prondzinski, 2002)

Die Messung der **Activated clotting time (ACT)** wird in der Klinik als Bedside-Test zur Überwachung der Heparin-Therapie bei Operationen mit extrakorporalem Kreislauf oder im Herzkatheterlabor angewendet. Dabei wird eine mit Nativblut und einem Oberflächenaktivator versehene Küvette in das ACT-Messgerät gegeben, das innerhalb weniger Minuten die Gerinnungszeit in Sekunden bestimmt. (Barthels und von Depka Prondzinski, 2003). Der Normalbereich der ACT liegt bei  $110 \pm 15$  Sekunden.

**D-Dimere** entstehen, wenn quervernetztes Fibrin durch Plasmin lysiert wird und gilt damit als Marker für das Vorhandensein eines oder mehrerer Thromben unabhängig von deren Entstehungsursache. Im praktischen Alltag werden D-Dimere meist zum Ausschluss einer tiefen Venenthrombose oder einer Lungenembolie bestimmt. Dabei ist die Konzentration an nachweisbarem D-Dimer proportional zur Menge an lysiertem Fibrin.

Zur Bestimmung und Quantifizierung von D-Dimer werden ein Primär- und ein markierter Sekundär-Antikörper benötigt. (Prötzsch, 2002)

Da die Wirkung von AT unter anderem durch dessen Bindung an Thrombin zustande kommt, kann durch die Messung des **Thrombin-Antithrombin-Komplexes (TAT)** ein Rückschluss auf die Thrombinbildung und damit auf die Gerinnungsaktivität gezogen werden. Ist diese erhöht, kann schon vor Verschiebung des Hämostase-Gleichgewichts mehr TAT im Plasma nachgewiesen werden. Klinische Beispiele dafür sind venöse Thrombosen, Lungenembolien, akuter Herzinfarkt oder septischer Schock. Die TAT-Messung wird mittels ELISA durchgeführt, der Referenzbereich liegt zwischen 1,0 und 4,1  $\mu\text{g/l}$ . (Neumann, 2007)

### **3.3.4 Thrombozytenaggregationsmessung**

Der Verdacht auf thrombozytär bedingte Hämostasestörungen (z.B. ein ADP-Speicher-Defekt oder das Willebrand-Jürgens-Syndrom), die Anwendung von Verfahren, bei denen Blut extrakorporal mit Fremdfächen in Kontakt kommt (z.B. Herz-Lungen-Maschine oder Dialyse) oder die Überwachung einer Therapie mit Thrombozytenfunktionshemmern sind klinische Indikationen zur Durchführung einer Thrombozytenaggregationsmessung. In unseren Versuchen wollten wir neben den durch verschiedene hämostaseologische Untersuchungsmethoden geprüften Anteilen des Gerinnungssystems den Einfluss der verschiedenen Antikoagulantien auf die Aktivierbarkeit der Thrombozyten betrachten. Wir führten dazu eine quantitative Bestimmung der Thrombozytenaggregation mit Hilfe von der von BORN entwickelten Methode durch. Dabei testeten wir zunächst die Thrombozytenfunktion jedes Probanden einmalig ohne Zugabe eines Medikamentes um sicherzustellen, dass nicht von vornherein eine Thrombozytenaggregationsstörung vorliegt. Des Weiteren wurde bei jedem Versuchsdurchlauf zu drei verschiedenen Zeitpunkten die Thrombozytenaggregation gemessen:

- Zeitpunkt T0: Blut aus der Vene des Probanden nach Einnahme von ASS
- Zeitpunkt T1: Blut direkt nach Zugabe des Antikoagulans
- Zeitpunkt T2: Blut direkt nach Durchlauf im Thrombosemodell

Dabei wird zunächst aus einer citratkoagulierten Vollblutprobe durch eine erste Zentrifugation bei 1.000 rpm für eine Dauer von 10 Minuten ein plättchenreiches Plasma (platelet rich plasma = PRP) hergestellt, das durch die hohe Thrombozytenkonzentration trüb und damit nur gering lichtdurchlässig ist. Nachdem das Plasma komplett abpipettiert wurde, erfolgte eine erneute Zentrifugation desselben Röhrchens bei 2.000 rpm für 10 Minuten, was zu einer Bildung von plättchenarmem Plasma (platelet poor plasma = PPP) führte. Dieses PPP, das langwelliges Licht praktisch ungehindert durchlässt, dient im Aggregometer als Vergleichsprobe. Im PRP bewirkt nun die Zugabe von ADP (in unseren Versuchen 10 µl ADP der Konzentration 10 µmol/l) die Präsentation des GP IIb/IIIa auf der Thrombozytenoberfläche und somit die Aktivierung der Thrombozyten. Fibrin kann nun durch Bindung an GP IIb/IIIa die Thrombozyten miteinander vernetzen, was zur Aggregation der Thrombozyten führt. Diese entstandenen Thrombozytenaggregate sinken ab und es resultiert eine Zunahme der Lichtdurchlässigkeit, die sich proportional zur Thrombozytenaktivierung verhält. Somit dient die prozentuale Lichtdurchlässigkeit von PRP bezogen auf PPP als Maß für die Aggregation.

(APACT 4 – Bedienungsanleitung; Prötzsch, 2002)

### **3.4 Statistik**

Die statistische Auswertung der erhobenen Daten wurde mit der Software „SPSS 15.0 for Windows“ (SPSS GmbH Software, an IBM Company, Chicago, IL, USA) mittels One-Way ANOVA, post-hoc Analyse durchgeführt.

Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$  ( $p < 5\%$ ) wurde als signifikant angenommen.

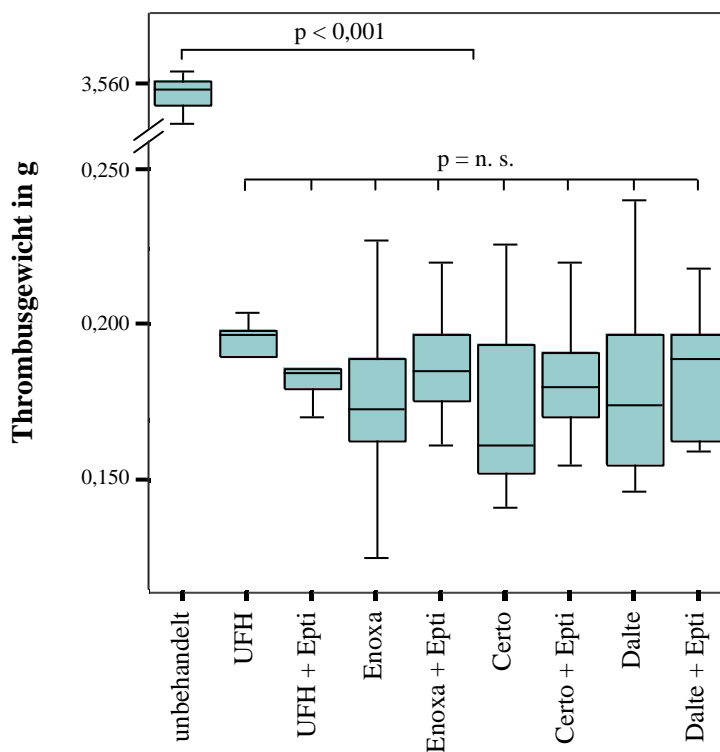
Die Datendarstellung erfolgte in der Form Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Thrombusgewicht

Zur Quantifizierung der Thrombusentstehung in den Herzkathetern wurde vor und nach jedem Durchlauf der Herzkatheter aus dem Versuchsaufbau gewogen. Die Differenz ergab dabei das während des Versuchsdurchlaufes entstandene Thrombusgewicht. Es lag in der unbehandelten Gruppe bei  $3,558 \pm 0,003$  g (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung), bei UFH bei  $0,185 \pm 0,027$  g und bei UFH + Eptifibatid bei  $0,189 \pm 0,019$  g. In den Gruppen mit niedermolekularen Heparinen wurde bei Enoxaparin ein Thrombusgewicht von  $0,177 \pm 0,030$  g, bei Enoxaparin + Eptifibatid von  $0,190 \pm 0,024$  g, bei Certoparin von  $0,172 \pm 0,027$  g, bei Certoparin + Eptifibatid von  $0,185 \pm 0,021$  g, bei Dalteparin von  $0,180 \pm 0,029$  g und bei Dalteparin + Eptifibatid von  $0,187 \pm 0,020$  g ermittelt.

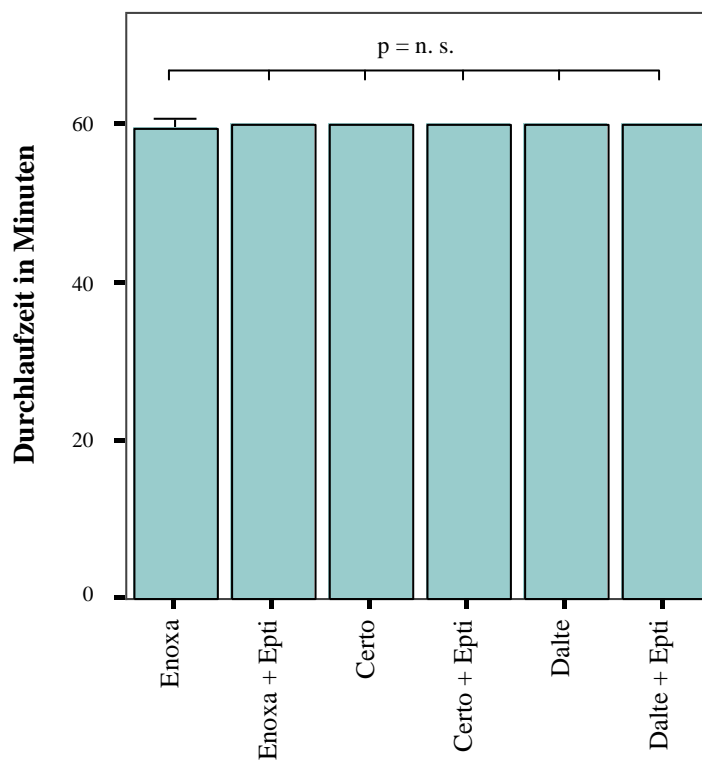
Zwischen den einzelnen Medikamenten-Gruppen zeigte sich kein signifikanter Unterschied, in der unbehandelten Gruppe lag das Thrombusgewicht signifikant höher als in allen anderen Gruppen (Signifikanzniveau:  $p < 0,001$ ).



**Abbildung 9: Boxplot-Diagramm zum Vergleich des Thrombusgewichtes in den verschiedenen Versuchsgruppen: Unbehandelt, UFH, UFH + Eptifibatid, Enoxaparin, Enoxaparin + Eptifibatid, Certoparin, Certoparin + Eptifibatid, Dalteparin, Dalteparin + Eptifibatid.**

## 4.2 Durchlaufzeit

Ein weiterer Endpunkt in unserer Studie zum Vergleich der antithrombotischen Wirkung der einzelnen gerinnungshemmenden Substanzen war die Messung der Durchlaufzeit des antikoagulierten Blutes in den jeweiligen Gruppen im Versuchsaufbau. Jeder einzelne Durchlauf war auf 60 Minuten angelegt. Fand schon zu einem früheren Zeitpunkt eine zu starke Clot-Bildung im Herzkatheter statt, konnte das Blut nicht mehr weiterzirkulieren und der Durchlauf sistierte. Dabei ergab sich für die Antikoagulation mit Enoxaparin eine mittlere Durchlaufzeit von  $59 \pm 2$  Minuten ( $\pm$  Standardabweichung). Hier verstopfte der Herzkatheter in einem Fall vorzeitig, sodass der Durchlauf nach 54 Minuten abgebrochen werden musste. In allen anderen Gruppen betrug die Durchlaufzeit bei allen Probanden 60 Minuten.

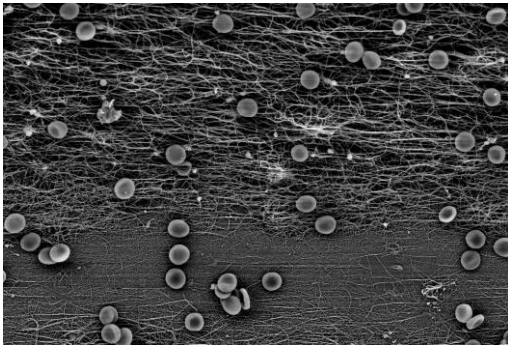


**Abbildung 10: Fehlerbalken-Diagramm zum Vergleich der Durchlaufzeit in den verschiedenen Versuchsgruppen: Enoxaparin, Enoxaparin + Eptifibatid, Certoparin, Certoparin + Eptifibatid, Dalteparin, Dalteparin + Eptifibatid.**

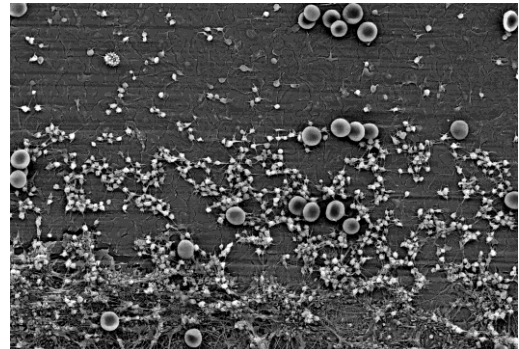
### 4.3 Elektronenmikroskopische Auswertung

Bei der Auswertung der elektronenmikroskopischen Bilder wurden die auf der Katheteroberfläche anhaftenden Erythrozyten und Thrombozyten gezählt und das gebildete Fibrin quantifiziert.

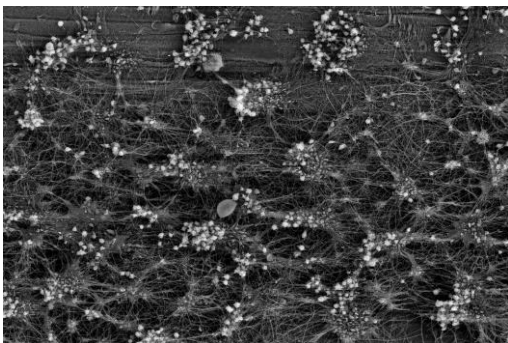
In Abbildung 11 ist aus jeder Versuchsgruppe ein elektronenmikroskopisches Bild exemplarisch aufgeführt.



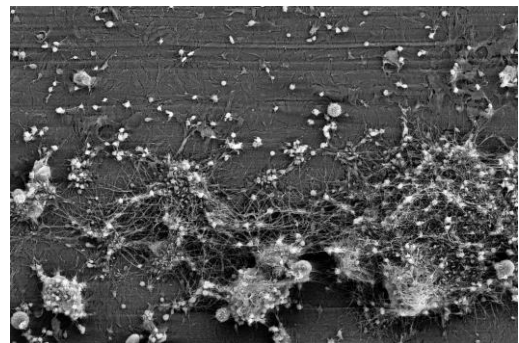
**Enoxaparin**



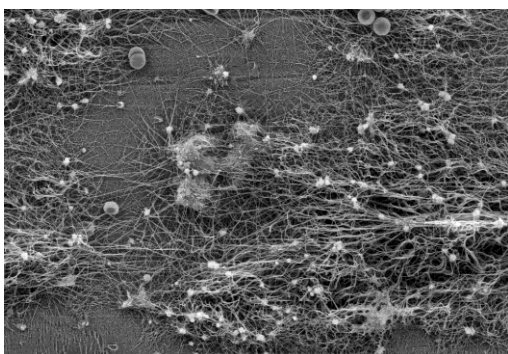
**Enoxaparin + Eptifibatid**



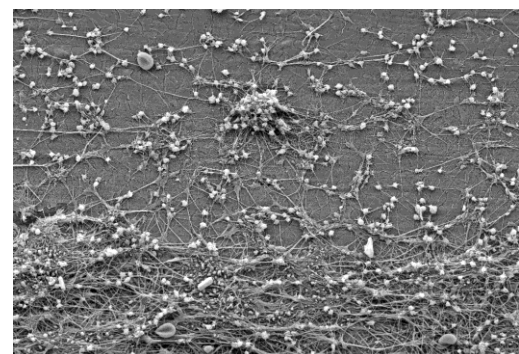
**Certoparin**



**Certoparin + Eptifibatid**



**Dalteparin**



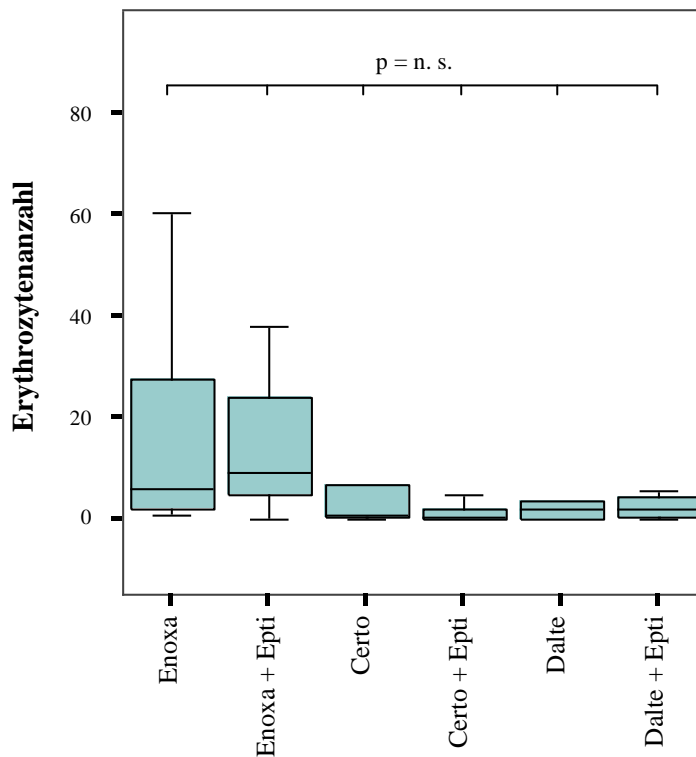
**Dalteparin + Eptifibatid**

**Abbildung 11: Exemplarische Darstellung der elektronenmikroskopischen Auswertung in den einzelnen Versuchsgruppen.**

### 4.3.1 Erythrozytenanzahl

Die mittlere Erythrozytenanzahl mit Enoxaparin betrug  $50 \pm 114$  Zellen, mit Enoxaparin + Eptifibatid  $21 \pm 32$ , mit Certoparin  $8 \pm 17$ , mit Certoparin + Eptifibatid  $2 \pm 3$ , mit Dalteparin  $5 \pm 7$  und mit Dalteparin + Eptifibatid  $3 \pm 3$  Zellen.

Die Erythrozytenzahl unterschied sich in den einzelnen Versuchsgruppen nicht signifikant voneinander.



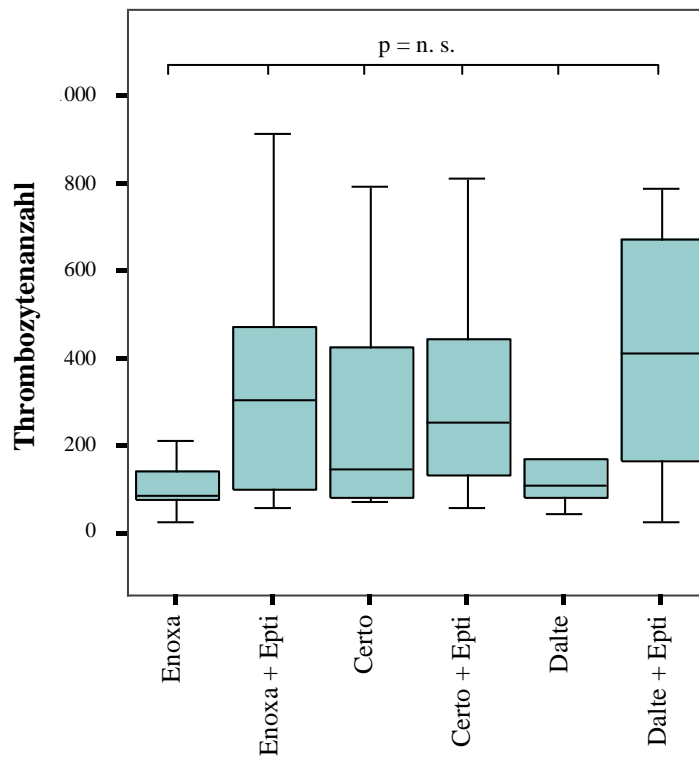
**Abbildung 12: Boxplot-Diagramm zum Vergleich der Erythrozytenanzahl in den verschiedenen Versuchsgruppen: Enoxaparin, Enoxaparin + Eptifibatid, Certoparin, Certoparin + Eptifibatid, Dalteparin, Dalteparin + Eptifibatid.**



### 4.3.2 Thrombozytenanzahl

Die Auszählung der in den Clots sichtbaren Thrombozyten ergab für Enoxaparin eine mittlere Thrombozytenanzahl von  $121 \pm 86$ , für Enoxaparin + Eptifibatid von  $341 \pm 267$ , für Certoparin von  $257 \pm 236$ , für Certoparin + Eptifibatid von  $311 \pm 224$ , für Dalteparin von  $192 \pm 191$  und für Dalteparin + Eptifibatid von  $437 \pm 277$ .

Dabei zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Thrombozytenanzahl bei allen angewandten Medikationen.



**Abbildung 13: Boxplot-Diagramm zum Vergleich der Thrombozytenanzahl in den verschiedenen Versuchsgruppen: Enoxaparin, Enoxaparin + Eptifibatid, Certoparin, Certoparin + Eptifibatid, Dalteparin, Dalteparin + Eptifibatid.**

### 4.3.3 Fibrinbildung

Als dritten Aspekt zur Quantifizierung des Ausmaßes der Thrombusbildung betrachteten wir die Fibrinbildung. Mittels Anwendung der beschriebenen Skala von 0 bis 4 ergab sich dabei für Enoxaparin eine mittlere Fibrinbildung von  $2,2 \pm 1,6$ , für Enoxaparin + Eptifibatid von  $1,8 \pm 1,0$ , für Certoparin von  $0,7 \pm 0,9$ , für Certoparin + Eptifibatid von  $1,5 \pm 1,1$ , für Dalteparin von  $2,9 \pm 0,9$  und für Dalteparin + Eptifibatid von  $2,3 \pm 1,6$ .

Die Anwendung der verschiedenen niedermolekularen Heparine sowie die Kombination mit Eptifibatid erbrachte in Bezug auf die Fibrinablagerung keinen signifikanten Unterschied.

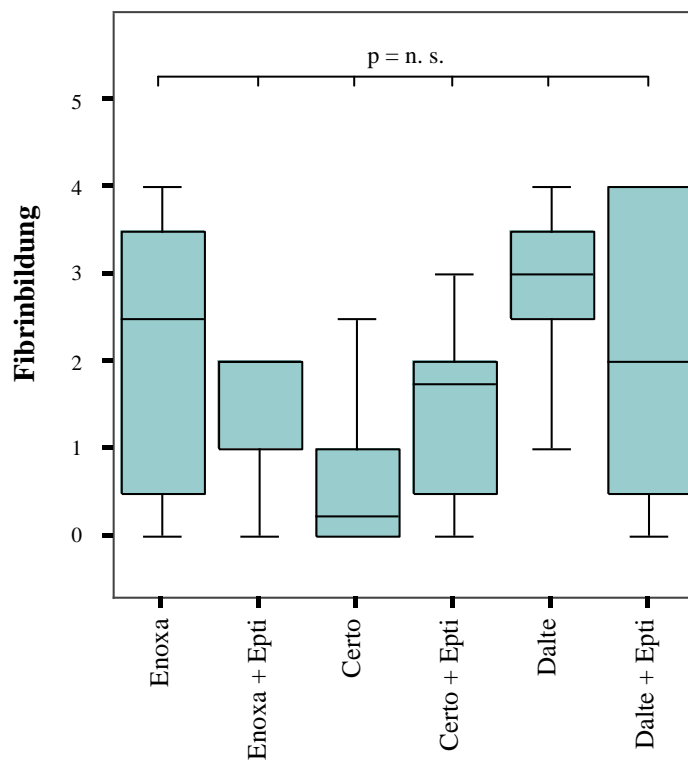


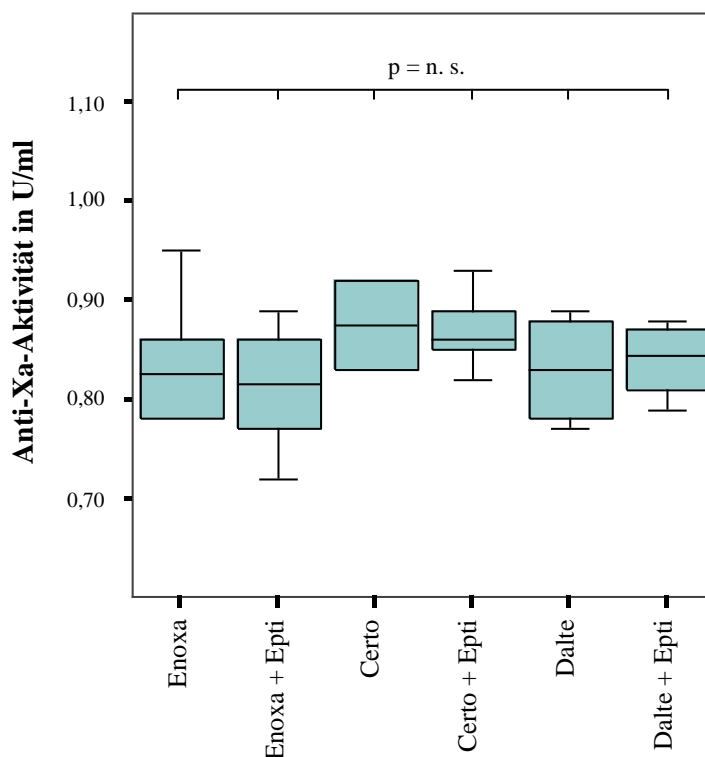
Abbildung 14: Boxplot-Diagramm zum Vergleich der Fibrinbildung in den verschiedenen Versuchsgruppen: Enoxaparin, Enoxaparin + Eptifibatid, Certoparin, Certoparin + Eptifibatid, Dalteparin, Dalteparin + Eptifibatid.

## 4.4 Laborparameter

### 4.4.1 Anti-Xa-Aktivität

Als Marker des Wirkspiegels wurde bei den einzelnen niedermolekularen Heparinen die Anti-Xa-Aktivität bestimmt. Unter Enoxaparin wurde eine mittlere Anti-Xa-Aktivität von  $0,77 \pm 0,18$  U/ml, unter Enoxaparin + Eptifibatid von  $0,81 \pm 0,06$  U/ml, unter Certoparin von  $0,92 \pm 0,13$  U/ml, unter Certoparin + Eptifibatid von  $0,87 \pm 0,03$  U/ml, unter Dalteparin von  $0,83 \pm 0,05$  U/ml und unter Dalteparin + Eptifibatid von  $0,84 \pm 0,03$  U/ml gemessen.

Es ergab sich dabei kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen.



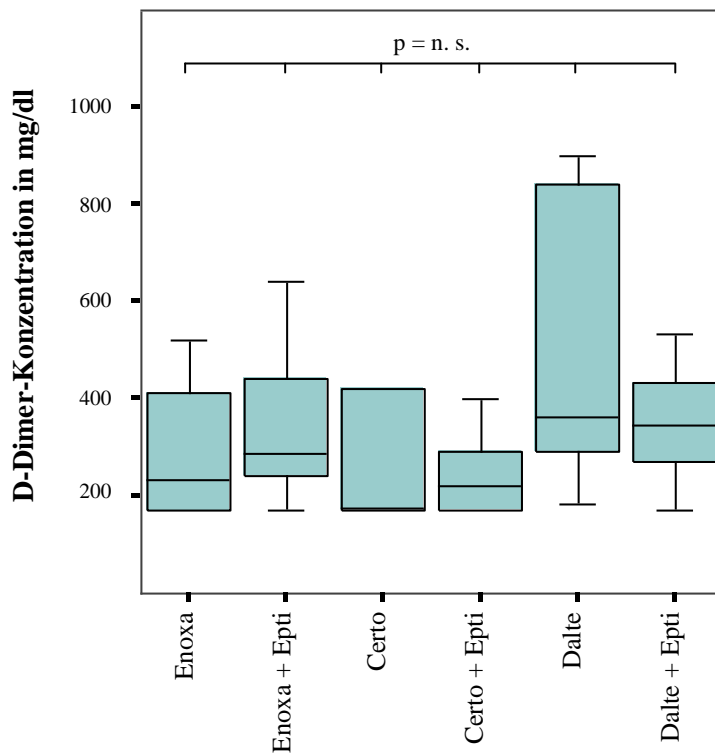
**Abbildung 15: Boxplot-Diagramm zum Vergleich der Anti-Xa-Aktivität in den verschiedenen Versuchsgruppen: Enoxaparin, Enoxaparin + Eptifibatid, Certoparin, Certoparin + Eptifibatid, Dalteparin, Dalteparin + Eptifibatid.**

### 4.4.2 D-Dimere

Da eine erhöhte D-Dimer-Konzentration Folge einer Fibrinolyse und damit Zeichen einer stattgefundenen Clot-Bildung ist, eignet sie sich für unsere Studie als Marker für die Thrombosierung im Herzkatheter. In unseren Versuchen lag die mittlere D-Dimer-Konzentration nach Versuchsdurchlauf mit Enoxaparin bei  $352 \pm 293$  mg/dl, mit Enoxaparin + Eptifibatid bei  $350 \pm 166$  mg/dl, mit Certoparin bei  $353 \pm 304$  mg/dl, mit Certoparin +

Eptifibatid bei  $262 \pm 122$  mg/dl, mit Dalteparin bei  $736 \pm 955$  mg/dl und mit Dalteparin + Eptifibatid bei  $411 \pm 285$  mg/dl.

Es wurde in den verschiedenen Gruppen bezüglich der D-Dimer-Konzentration kein signifikanter Unterschied festgestellt.

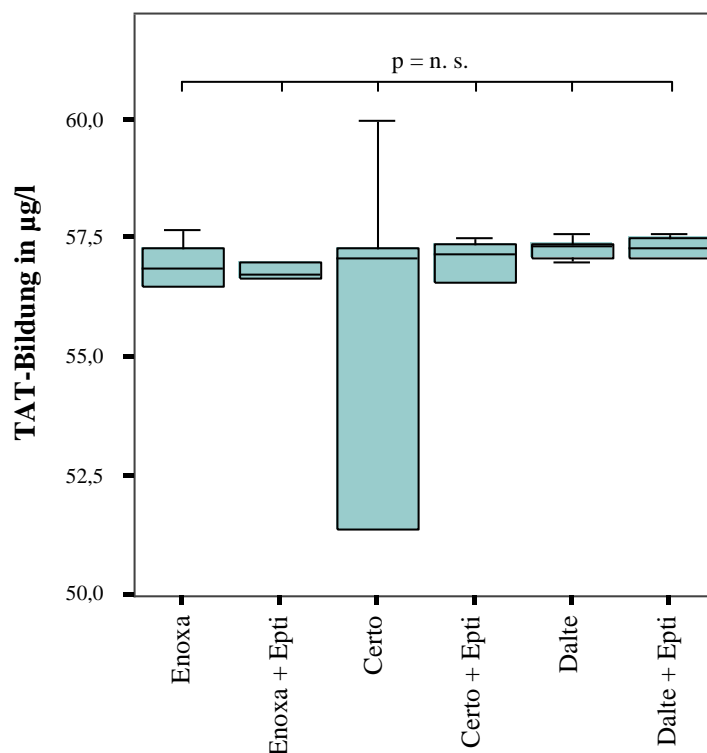


**Abbildung 16: Boxplot-Diagramm zum Vergleich der D-Dimer-Konzentration nach Versuchsdurchlauf in den verschiedenen Versuchsgruppen: Enoxaparin, Enoxaparin + Eptifibatid, Certoparin, Certoparin + Eptifibatid, Dalteparin, Dalteparin + Eptifibatid.**

#### 4.4.3 Thrombin-Antithrombin-Komplex (TAT)

Während des Versuchsdurchlaufes war die Konzentration des Thrombin-Antithrombin-Komplexes (TAT) unter Verwendung von Enoxaparin um  $56,66 \pm 0,93 \mu\text{g/l}$ , von Enoxaparin + Eptifibatid um  $56,80 \pm 0,56 \mu\text{g/l}$ , von Certoparin um  $47,26 \pm 20,41 \mu\text{g/l}$ , von Certoparin + Eptifibatid um  $55,01 \pm 6,65 \mu\text{g/l}$ , von Dalteparin um  $57,31 \pm 0,21 \mu\text{g/l}$  und von Dalteparin + Eptifibatid um  $57,24 \pm 0,41 \mu\text{g/l}$  gestiegen.

Dabei unterschieden sich die Mittelwerte für die TAT-Bildung in den einzelnen untersuchten Gruppen nicht signifikant voneinander.



**Abbildung 17: Boxplot-Diagramm zum Vergleich der TAT-Bildung während des Versuchsdurchlaufes in den verschiedenen Versuchsgruppen: Enoxaparin, Enoxaparin + Eptifibatid, Certoparin, Certoparin + Eptifibatid, Dalteparin, Dalteparin + Eptifibatid.**

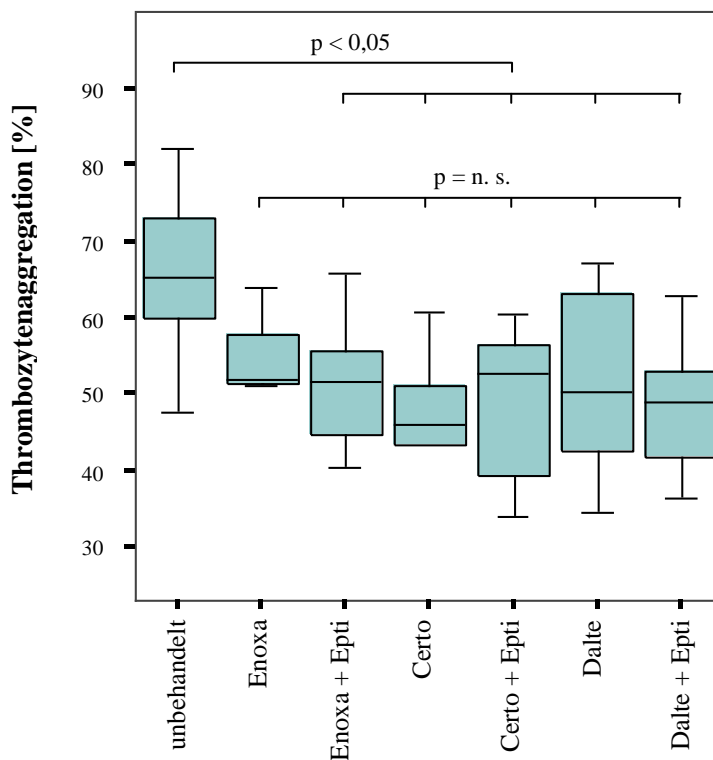
#### 4.5 Thrombozytenfunktion

Für jede Gruppe wurde zu verschiedenen festgelegten Zeitpunkten während der Versuchsdurchführung die Thrombozytenaggregationsmessung nach BORN durchgeführt.

Einmalig vor Anwendung der gerinnungshemmenden Substanzen untersuchten wir bei jedem Probanden die Thrombozytenaggregation des unbehandelten Blutes. In Abbildung 18 ist der Mittelwert dieses einmalig gemessenen Referenzwertes der Thrombozytenaggregation jedes

Probanden ohne Zugabe eines Medikamentes verglichen mit den Mittelwerten in den einzelnen Versuchsgruppen jeweils nach ASS-Einnahme aber vor Zugabe der niedermolekularen Heparine +/- Eptifibatid.

Dabei zeigte sich in der unbehandelten Gruppe eine mittlere Thrombozytenaggregation von  $64,20 \pm 13,05\%$ . Nach ASS-Gabe lag die mittlere Thrombozytenaggregation vor Versuchsdurchführung mit Enoxaparin bei  $55,70 \pm 7,20\%$ , mit Enoxaparin + Eptifibatid bei  $50,03 \pm 11,82\%$ , mit Certoparin bei  $45,11 \pm 9,91\%$ , mit Certoparin + Eptifibatid bei  $48,57 \pm 10,31\%$ , mit Dalteparin bei  $51,32 \pm 11,00\%$  und mit Dalteparin + Eptifibatid bei  $48,59 \pm 8,12\%$ . Unter den einzelnen Medikamenten-Gruppen ergaben sich dabei keine signifikanten Unterschiede. Nach ASS-Gabe wurde in allen Gruppen außer der Enoxaparin-Gruppe ein signifikant niedrigerer Wert für die Thrombozytenaggregation gemessen als in der unbehandelten Gruppe (Signifikanzniveau:  $p < 0,05$ ).

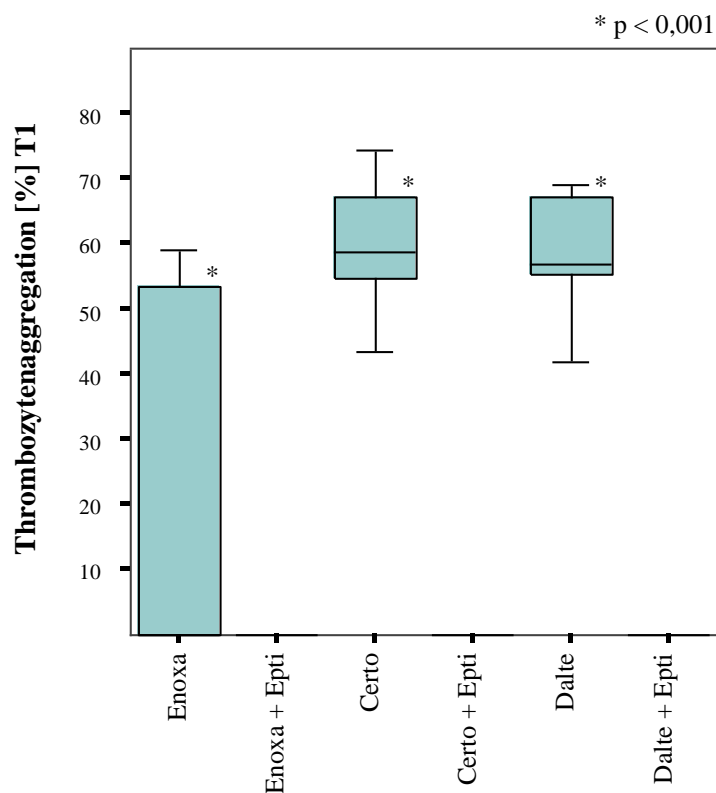


**Abbildung 18: Boxplot-Diagramm zum Vergleich der Thrombozytenaggregation ohne Gabe eines gerinnungshemmenden Medikamentes mit der Thrombozytenaggregation zum Zeitpunkt T0 (nach ASS-Gabe) in den verschiedenen Versuchsgruppen: Unbehandelt, Enoxaparin, Enoxaparin + Eptifibatid, Certoparin, Certoparin + Eptifibatid, Dalteparin, Dalteparin + Eptifibatid.**

Die Thrombozytenaggregationsmessung direkt nach Zugabe des jeweiligen Gerinnungshemmers noch vor Beginn des Versuchsdurchlaufes (Zeitpunkt T1) ergab eine

mittlere Thrombozytenaggregation von  $55,97 \pm 2,93\%$  mit Enoxaparin, von  $0,16 \pm 0,51\%$  mit Enoxaparin + Eptifibatid, von  $59,11 \pm 9,67\%$  mit Certoparin und von  $58,41 \pm 8,96\%$  mit Dalteparin. In den Gruppen Certoparin + Eptifibatid und Dalteparin + Eptifibatid lag der gemessene Wert bei 0%.

In allen Gruppen ohne Kombination mit Eptifibatid zeigte sich eine signifikant höhere Thrombozytenaggregation als in den Gruppen mit zusätzlicher Gabe von Eptifibatid (Signifikanzniveau:  $p < 0,001$ ).



**Abbildung 19: Boxplot-Diagramm zum Vergleich der Thrombozytenaggregation zum Zeitpunkt T1 in den verschiedenen Versuchsgruppen: Enoxaparin, Enoxaparin + Eptifibatid, Certoparin, Certoparin + Eptifibatid, Dalteparin, Dalteparin + Eptifibatid.**

Bei der Thrombozytenaggregationsmessung zum Zeitpunkt T2, also nach Ende des Versuchsdurchlaufes, fielen keine signifikanten Unterschiede zu den Gruppen Enoxaparin, Certoparin und Dalteparin zum Zeitpunkt T1 auf. Analog zum Zeitpunkt T1 ergab sich verglichen mit den Gruppen mit NMH und Eptifibatid eine signifikant höhere Thrombozytenaggregation in den Gruppen mit NMH ohne Kombination mit Eptifibatid.

## **5. Diskussion**

### **5.1 Studienlage und Hintergrund**

#### **5.1.1 Unfraktioniertes Heparin bei perkutaner Koronarintervention**

Ein Großteil der Patienten mit akutem Koronarsyndrom muss sich einer perkutanen Koronarintervention unterziehen. Dabei besteht die Gefahr der unter Umständen schwerwiegenden Komplikation der Herzkatheter-Thrombose, die zu einer Embolie, einem akuten Verschluss einer Koronararterie mit der Folge eines Myokardinfarktes oder sogar zum Tod führen kann. Obwohl bereits zahlreiche Untersuchungen zu den verschiedensten gerinnungshemmenden Strategien im Rahmen der Durchführung einer perkutanen Koronarintervention existieren, gilt unfraktioniertes Heparin trotz der verschiedenen Nachteile und Risiken noch immer als periinterventionelles Standard-Antikoagulans.

Einer der Nachteile ist der interindividuelle Unterschied der Pharmakokinetik von UFH. Ogilby et al. beschrieben in ihrer 1989 veröffentlichten Studie über die Antikoagulation mit unfraktioniertem Heparin während einer PCI die Notwendigkeit eines periinterventionellen Monitorings mittels ACT, um das Risiko einer Thrombose unter der PCI zu senken. (Ogilby et al., 1989)

Die gleiche Problematik wird bei einem 1991 veröffentlichten Fallbericht deutlich. Trotz der üblichen präinterventionellen Heparin-Bolus-Gabe entwickelte sich während einer intravaskulären Ultraschalluntersuchung innerhalb von 5 min ein bedeutender Thrombus am Führungsdraht. Die daraufhin bestimmte ACT lag – wahrscheinlich aufgrund einer Heparin-Resistenz – bei nur 191 Sekunden, also weit unter der empfohlenen Mindesthöhe von 300 Sekunden. Die Thrombusentwicklung hätte durch eine höhere oder eine zusätzliche Dosis verhindert werden müssen. (Grayburn et al., 1991)

#### **5.1.2 Die neue Substanzklasse der niedermolekularen Heparine**

Mit der Entwicklung der Substanzklasse der niedermolekularen Heparine wurden Heparin-Abkömmlinge geschaffen, die aufgrund ihrer geringeren Kettenlänge und ihres höheren Pentasaccharid-Anteils über deutlich günstigere pharmakodynamische und –kinetische Eigenschaften verfügen als unfraktioniertes Heparin. Bei Vorliegen einer längeren Halbwertszeit und einer höheren Bioverfügbarkeit kann nach subkutaner Gabe schnell der therapeutische Wirkspiegel erreicht werden, der aufgrund der besseren Kalkulierbarkeit der Dosis in der Regel nicht überwacht werden muss. Ein weiterer Vorteil gegenüber UFH ist das geringere Risiko, eine Heparininduzierte Thrombozytopenie hervorzurufen. In mehreren Studien wurde gezeigt, dass im Vergleich zu UFH unter der Anwendung von niedermolekularen Heparinen deutlich weniger Blutungskomplikationen auftreten:



Die bereits 1997 veröffentlichten Daten der ESSENCE-Studie zeigten die Überlegenheit von Enoxaparin gegenüber UFH (jeweils mit zusätzlicher Gabe von ASS) bei Patienten mit instabiler Angina pectoris oder nicht-transmuralem Myokardinfarkt in der Verhinderung von Myokardischämien unter gleichzeitig geringerem Aufkommen großer Blutungen. Kleine Blutungen wurden häufiger in der Gruppe mit Enoxaparin beobachtet, wobei hierzu auch Ekchymosen an der Injektionsstelle zählten. (Cohen et al., 1997) Vergleichbare Vorteile von Enoxaparin gegenüber UFH wurden auch in der TIMI 11B-Studie beobachtet, wobei in dieser Untersuchung große Blutungen häufiger unter Enoxaparin auftraten als unter UFH. (Antman et al., 1999)

Analog dazu zeigten Gibson et al. in einer prospektiven Analyse der Studie EXTRACT-TIMI 25, dass Enoxaparin bei Patienten mit ST-Hebungsinfarkt nach ASS- und Lysetherapie, sowohl ohne als auch mit anschließender PCI, signifikant effektiver das Eintreten eines Myokardinfarktes, einer großen Blutung oder des Todes verhinderte als UFH. Dieses Ergebnis wurde bei Patienten mit kontinuierlicher aber auch bei Patienten mit Bolus-Gaben von Enoxaparin beobachtet. Es wird diskutiert, dass die bessere antithrombotische Wirksamkeit von Enoxaparin auf den höheren anti-Xa/anti-IIa-Quotienten zurückzuführen ist, dass aber außerdem der nach Beenden der UFH-Gabe vorkommende *Rebound* thrombotischer Ereignisse zum schlechteren Abschneiden der UFH-Gruppe beitragen kann. (Gibson et al., 2007)

Der Vergleich von Enoxaparin und UFH bei Hochrisikopatienten, die sich bei Vorliegen eines ACS einer frühen perkutanen Koronarintervention unterziehen mussten, ergab im Rahmen der SYNERGY-Studie eine ähnliche Wirksamkeit beider Substanzen jedoch unter größerem Blutungsaufkommen nach Enoxaparin-Gabe. (White et al., 2006)

In der STEEPLE-Studie trat dagegen zwischen Enoxaparin und UFH bei perkutaner Koronarintervention kein signifikanter Unterschied in der Häufigkeit lebensverkürzender Ereignisse innerhalb eines postinterventionellen Zeitraumes von einem Jahr auf. Ischämische Ereignisse und große Blutungen waren dabei die häufigsten Todesursachen. (Montalescot et al., 2009)

### **5.1.3 Niedermolekulare Heparine bei perkutaner Koronarintervention**

Die beschriebenen Vorteile machten niedermolekulare Heparine neben zahlreichen anderen Indikationen auch für die periinterventionelle gerinnungshemmende Therapie zur Verhinderung einer Herzkatheter-Thrombose interessant.

In einer prospektiven multizentrischen *open-label* Studie verglichen Montalescot et al. das Auftreten einer großen Blutung sowie das Erreichen des gewünschten Wirkspiegels bei der Gabe von unfraktioniertem Heparin versus Enoxaparin im Rahmen einer elektiven perkutanen Koronarintervention. Sie zeigten, dass unter der Bolus-Gabe von 0,5 mg/kgKG Enoxaparin, nicht aber bei 0,75 mg/kgKG, signifikant weniger große Blutungen auftraten als unter

einmaliger Gabe von UFH. Der Wirkspiegel konnte in der Gruppe mit Enoxaparin deutlich sicherer erreicht werden als in der Gruppe mit UFH. (Montalescort et al., 2009)

Chen et al. kamen durch den periinterventionellen Vergleich von Enoxaparin und UFH zu dem Ergebnis, dass eine mindestens zweimalige subkutane Gabe von Enoxaparin vor Beginn der Katheterintervention zur Verhinderung der Thromboseentstehung ausreichend ist und dass die Schleuse, anders als unter Anwendung von UFH, direkt nach Ende der Intervention entfernt werden kann. Außerdem wurde in der Gruppe Enoxaparin eine deutlich geringere Hämatombildung beobachtet. In verschiedenen bereits vorliegenden Studien wurden ähnliche Ergebnisse aufgezeigt. (Collet et al., 2001; Choussat et al., 2002; Chen et al., 2006)

Eine Meta-Analyse verfügbarer Studien zum Vergleich von niedermolekularem Heparin und UFH bei Patienten mit ST-Hebungsinfarkt und primärer PCI oder PCI nach Thrombolyse führte zu der Schlussfolgerung, dass niedermolekulare Heparine – meist wurde Enoxaparin verwendet – für die genannte Patientengruppe und Indikation effektiver und sicherer sind als UFH. Dabei profitierten vor allem Patienten mit höherem Risikoprofil von der Anwendung niedermolekularer Heparine. (Navarese et al., 2011)

Auch bei dringender PCI ohne vorherige Gabe eines Thrombozytenaggregationshemmers oder Antikoagulans scheinen NMH ebenso sicher und effektiv wie UFH mittels intravenöser Gabe ischämische Ereignisse zu verhindern ohne mehr große Blutungen zu verursachen. (Borentain et al., 2005)

Die aktuell gängige gerinnungshemmende Therapie besteht in der Regel aus der Gabe der Thrombozytenaggregationshemmer ASS und Clopidogrel, Prasugrel oder Ticagrelor – eventuell in Kombination mit einem GP IIb/IIIa-Antagonisten – sowie aus der Gabe entweder von UFH oder dem niedermolekularen Heparin Enoxaparin zur Hemmung der plasmatischen Gerinnung. Enoxaparin wird dabei mittlerweile als etablierte Alternative zu UFH eingesetzt. Die Wirksamkeit anderer NMH wie Certoparin und Dalteparin in Bezug auf die Verhinderung der Entwicklung einer Herzkatheter-Thrombose wurde noch nicht ausreichend untersucht. Aus den beschriebenen Unterschieden in Bioverfügbarkeit, Plasmaclearance und Halbwertszeit der NMH resultieren nach Gabe einer prophylaktischen oder therapeutischen Dosis bis zu 2 bis 3fach variierende Spitzenwerte der anti-Xa- und anti-IIa-Aktivität im Plasma. Für die Hemmung der FXa-Aktivität wird mindestens die „high affinity“-Sequenz des Heparins mit fünf Saccharid-Molekülen benötigt, für die Hemmung des Gerinnungsfaktors IIa (Thrombin) ist eine Kettenlänge von mindestens 16 bis 20 Saccharideinheiten erforderlich. Je länger also die Polysaccharidkette, umso stärker die Hemmung von Thrombin. Zur Darstellung der unterschiedlich starken Wirkung der einzelnen niedermolekularen Heparine auf die Faktoren Xa und IIa wird die anti-FXa/anti-FIIa-Ratio verwendet. Für die in unseren Untersuchungen

angewandten NMH liegt dieser Wert bei 3,3-5,3 für Enoxaparin, bei 1,9-3,2 für Dalteparin und bei 1,5-2,5 für Certoparin.

Aufgrund der beschriebenen Unterschiede ist davon auszugehen, dass NMH nicht bedenkenlos in der antikoagulatorischen Medikation während einer PCI gegeneinander ausgetauscht werden können. (Bombeli, 1998; Samama und Gerotziafas, 2000; Bittl et al., 2001; Raaz et al., 2009)

Zeitgleich mit den ersten Veröffentlichungen zum Vergleich von Enoxaparin und UFH zur Antikoagulation bei akutem Koronarsyndrom erschienen auch erste Forschungsbeiträge zum Einsatz von Dalteparin bei gleicher Indikation. Die Ergebnisse der 1997 veröffentlichten FRIC-Studie zeigten, dass die zweimal tägliche subkutane Gabe von Dalteparin zur akuten Behandlung des instabilen ACS oder des nicht-transmurales Myokardinfarktes ebenso geeignet zu sein scheint wie der intravenöse Einsatz von UFH. (Klein et al., 1997) In der ersten FRISC-Studie konnte die zweimal tägliche subkutane Dalteparin-Gabe im Vergleich zu Placebo das Eintreten des kombinierten Endpunktes aus Tod oder Myokardinfarkt innerhalb der ersten sechs Tage signifikant senken. Die anschließende Langzeitbehandlung mittels einer täglichen Gabe brachte ebenfalls eine, jedoch nicht signifikante ( $p = 0,07$ ), Reduktion der Ereignisse. (Wallentin et al., 1997)

Im Rahmen der FRISC II-Studie zeigte sich beim Vergleich zwischen frühzeitig durchgeführter PCI und konservativer medikamentöser Therapie im ereignisfreien Überleben nach fünf Jahren ein anhaltender Vorteil des invasiven Vorgehens bei Patienten mit NST-Hebungs-ACS. Vor Randomisierung erhielten alle Patienten für drei Tage ASS und Dalteparin. Nach Randomisierung wurden alle Patienten der konservativen Gruppe mittels Ergometrie erneut randomisiert bezüglich Langzeitbehandlung mit Dalteparin oder Placebo. 45 Tage nach Randomisierung war der kombinierte Endpunkt aus Tod oder Myokardinfarkt unter Dalteparin-Gabe signifikant seltener eingetreten. Nach 90 Tagen zeigte sich dieser Vorteil nur noch tendentiell. Vergleicht man alle Gruppen in dieser Studie miteinander, findet man eine Reduktion der Ereignisse in der invasiven Dalteparin-Gruppe. Einschränkend muss zu dieser Studie gesagt werden, dass auch in der konservativen Gruppe bei Vorliegen medizinischer Notwendigkeit eine Koronarintervention durchgeführt wurde. Dadurch werden die Ergebnisse zugunsten der konservativen Gruppe verschoben. (Husted et al., 2002; Lagerqvist et al., 2006)

Bei einer Studie zum Vergleich der Wirkung von Dalteparin und UFH – jeweils mit dem GP IIb/IIIa-Hemmer Abciximab – auf verschiedene Aspekte der Thrombogenese bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom und PCI ergaben sich keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der klinischen Endpunkte zwischen Dalteparin und UFH. Außerdem schien die kombinierte Gabe von Dalteparin und Abciximab sicher zu sein. UFH rief jedoch, im Gegensatz zu Dalteparin, bei Patienten mit instabiler Angina pectoris eine Degranulation der Thrombozyten

hervor und führte damit zur Freisetzung aggregationsfördernder Substanzen. (Furman et al., 2001)

Natarajan et al. verglichen in ihrer 2006 veröffentlichten Pilotstudie den Einsatz von Dalteparin und unfraktioniertem Heparin jeweils als einmalige intraarterielle Bolus-Gabe direkt vor Beginn einer PCI. Die Intervention war in beiden Gruppen in mehr als 90% der Fälle erfolgreich, Komplikationen traten ähnlich häufig auf (UFH 2,5% versus Dalteparin 3,8%) und in Bezug auf den zusammengesetzten Endpunkt aus Tod, Myokardinfarkt, Revaskularisierung oder einer notfallmäßigen Gabe eines GP IIb/IIIa-Hemmers bei Krankenhausentlassung ergaben sich keine signifikanten Unterschiede. (Natarajan et al., 2006) Eine weitere Studie zur Wirksamkeit und Sicherheit von Dalteparin im Vergleich zu UFH bei perkutaner Koronarintervention kam zu ähnlichen Ergebnissen: Eine einmalige Bolusgabe direkt nach Diagnosestellung gefolgt von einer zweiten Gabe kurz vor Beginn der PCI konnten akute oder subakute Thrombosen während und nach PCI verhindern unter signifikant seltenerem Vorkommen von Blutungsereignissen. Außerdem wurde bei 96,1% der Patienten der gewünschte Anti-Xa-Zielbereich erreicht und die Schleusen der Katheter konnten, nach Anwendung von Dalteparin, direkt nach Beendigung der PCI gezogen werden. (Ke et al., 2009) Anhand der Ergebnisse dieser Studien scheint Dalteparin ein weiterer Vertreter aus der Gruppe der niedermolekularen Heparine zu sein, der alternativ zu UFH zur Thromboseprophylaxe im Rahmen einer PCI gegeben werden kann.

Zum Einsatz von Certoparin zur Verhinderung einer Thromboseentstehung im Rahmen einer perkutanen Koronarintervention gibt es bisher keine großen Studien. Es liegen lediglich einzelne Veröffentlichungen z. B. zur Anwendung bei akutem Koronarsyndrom oder zur Verhinderung venöser thromboembolischer Ereignisse bei chirurgischen oder älteren multimorbiden Patienten vor.

In einer 2008 veröffentlichten Studie wurde festgestellt, dass Certoparin mittels zweimal täglicher vom Körpergewicht unabhängiger Gabe zur kurzfristigen Antikoagulation bei Patienten mit Vorhofflimmern vor Kardioversion geeignet zu sein scheint. (Tebbe et al., 2008)

Ein Vergleich der Thromboseprophylaxe mit Certoparin versus UFH bei akut erkrankten Patienten zeigte, dass die einmal tägliche Gabe von Certoparin in der Altersgruppe von mindestens 40 Jahren eine Thromboseentstehung ebenso sicher und effektiv verhindern konnte wie die zweimal tägliche Gabe von UFH. (Schellong et al., 2010)

Ähnliche Ergebnisse brachte eine Subgruppen-Analyse der CERTIFY-Studie. Bei dieser Untersuchung konnten Certoparin und UFH gleich effektiv und sicher venöse thromboembolische Ereignisse bei älteren multimorbiden Patienten verhindern. Das höhere Risiko für das Auftreten einer venösen Thromboembolie bei älteren Patienten (> 80 Jahre) im Vergleich zu jüngeren konnte in dieser Analyse bestätigt werden, eine größere Blutungsneigung lag in dieser Gruppe jedoch nicht vor. Certoparin verursachte in der Gruppe der über 80

jährigen weniger kleine Blutungen als UFH. (Schellong et al., 2011) Eine weitere Subgruppen-Analyse der CERTIFY-Studie verglich die Effektivität und Sicherheit von Certoparin und UFH bei Patienten mit schwerer Niereninsuffizienz zur Prophylaxe venöser Thromboembolien. Certoparin führte dabei bei gleicher Wirksamkeit seltener zu Blutungskomplikationen als UFH. (Bauersachs et al., 2011)

## **5.2 Fragestellung**

Enoxaparin ist aktuell der einzige Vertreter aus der Gruppe der niedermolekularen Heparine, der als Alternative zu unfraktioniertem Heparin zur Antikoagulation bei perkutaner Koronarintervention zugelassen ist. Die bessere Steuerbarkeit oder das geringere Risiko einer Heparininduzierten Thrombozytopenie sind zwei der Vorteile, die die Anwendung von Enoxaparin gegenüber UFH mit sich bringt.

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung folgender Hypothese in einem *in vitro*-Modell: Zeigen die niedermolekularen Heparine Certoparin und Dalteparin im Vergleich zu Enoxaparin in der Verhinderung von Herzkatheter-Thrombosen eine ähnliche Effektivität?

## **5.3 Diskussion des *in vitro*-Modells**

### **5.3.1 Hintergrund des *in vitro*-Modells**

Um eine erste Orientierung bezüglich der Einsetzbarkeit von Medikamenten für bestimmte Indikationen zu erhalten, werden nach Etablierung im Zellmodell in der Regel Tierversuche durchgeführt. Anschließend wird in der so genannten Phase I-Studie das betreffende Medikament erstmalig gesunden menschlichen Probanden verabreicht, um die Pharmakokinetik im menschlichen Organismus zu beurteilen. Die folgenden Phasen sollen Erkenntnisse über Sicherheit und Verträglichkeit sowie über die Wirksamkeit des neu entwickelten Medikamentes bringen.

Soll bei einem bereits zugelassenen Medikament das Indikations-Spektrum erweitert werden, bietet sich zur ersten Testung ein *in vitro*-Modell an, an dem herkömmlich verwendete Präparate mit dem zu untersuchenden verglichen werden können.

Aufgrund des Interesses unserer Arbeitsgruppe an der Verwendung alternativer Antikoagulantien zur Verhinderung von Herzkatheter-Thrombosen entwickelten wir ein *in vitro*-Modell, das die Situation einer perkutanen Koronarintervention möglichst realistisch darstellen sollte.

### **5.3.2 Validität des *in vitro*-Modells**

In den ersten Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe an diesem *in vitro*-Modell wurde gezeigt, dass der selektive FXa-Hemmer Fondaparinux, der in Bezug auf die medikamentöse Behandlung des akuten Koronarsyndroms als ebenso effektiv und sicher gilt wie UFH und Enoxaparin, sowohl bei alleiniger Gabe als auch in Kombination mit Eptifibatid nicht ausreichte, um der Entwicklung einer Herzkatheter-Thrombose vorzubeugen. (Schlitt et al., 2008) Diese Beobachtung entspricht den Ergebnissen der beiden großen multizentrischen Studien OASIS-5 und OASIS-6, in denen Fondaparinux zwar ebenso effektiv und sicher erneute koronare Ereignisse nach akutem Koronarsyndrom bzw. ST-Hebungsinfarkt verhindern konnte wie Enoxaparin bzw. UFH, aber zu einem signifikanten Anstieg der Häufigkeit von Herzkatheter-Thrombosen führte. (Yusuf et al., 2006; Metha et al., 2007) Im Gegensatz dazu verhinderte die Anwendung des direkten Thrombininhibitors Bivalirudin in unserem Modell zwar nicht als Bolusgabe, jedoch als kontinuierliche Infusion die Bildung eines thrombotischen Katheter-Verschlusses. (Maegdefessel et al., 2008) Analog dazu wird als Dosierung von Bivalirudin bei perkutaner Koronarintervention eine Bolus-Gabe mit anschließender Infusion empfohlen, wofür die CACHET-Studie die grundlegenden Daten lieferte. (Lincoff et al., 2002) Das gängige Behandlungsregime bei perkutaner Koronarintervention mittels UFH führte in unserem *in vitro*-Modell bei keinem der Durchläufe zu einer Thrombosierung des Herzkatheters, was der Effektivität des Medikamentes in der klinischen Anwendung bei PCI entspricht.

Anhand dieser beschriebenen Ergebnisse und Beobachtungen scheint unser Modell ausreichend valide zu sein, um auch gerinnungshemmende Strategien zu testen, für die noch keine großen Studien oder Erfahrungen vorliegen.

### **5.3.3 Einschränkungen des *in vitro*-Modells**

Trotzdem bleibt unser Versuchsaufbau nur ein modellhafter Nachbau der klinischen Gegebenheiten am und im Patienten, der verschiedene, die Blutgerinnung betreffende, Aspekte nicht mit einbeziehen kann.

Für unsere Versuche stellten sich gesunde männliche Probanden im Alter zwischen 19 und 32 Jahren als Blutspender zur Verfügung. Die klinische Durchführung einer perkutanen Koronarintervention wird meist bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom durchgeführt. Bei diesem Krankheitsbild werden vermehrt endogene neurohumorale Faktoren – wie z. B. CRP, IL-6 oder CD40 Ligand – ausgeschüttet, die eine Entzündungsreaktion hervorrufen und die Entstehung einer Thrombose begünstigen. Außerdem führen verengte Koronargefäße – wie sie im Rahmen eines ACS auftreten – zu einer Beschleunigung des Blutflusses und durch die so entstandene größere Scherspannung zu prokoagulatorischen Auswirkungen auf die Blutgerinnung. Ruggeri et al. untersuchten die Wirkung verschieden starker Scherkräfte auf die

Plättchenadhäsion und –aggregation. Über die Ausbildung von Oberflächenkontakten zwischen den Thrombozyten über gedehnte Membransegmente, Form-Veränderungen der vWF-Moleküle mit daraus resultierender Bindung an die Thrombozytenmembran und weiterer Plättchenrekrutierung erhöht sich der Flusswiderstand. Als Folge davon werden die adherierten und aggregierten Thrombozyten gedehnt und es entstehen längliche Strukturen, die wiederum förderlich auf weitere Thrombozytenanhaftung und –aggregation über vWF wirken. Die beschriebenen Prozesse ereignen sich unabhängig der extrinsischen und intrinsischen Gerinnungskaskade und des Aktivierungszustandes von GP IIb/IIIa. (Ruggeri et al., 2006)

Die Blutproben unserer Versuche wiesen aufgrund der jungen gesunden Spender kein vergleichbar prokoagulatorisches Milieu auf, in dem die gerinnungshemmenden Substanzen bei klinischem Einsatz ihre Wirkung entfalten müssen. Auch die beschriebenen Gefäßverengungen mit deren Auswirkungen auf die Blutgerinnung kommen in unserem *in vitro*-Modell nicht zum Tragen. Die Blutentnahme bei den Probanden könnte jedoch wegen des Sogs bei deren Durchführung erhöhte Scherkräfte und daraus resultierend eine Thrombozytenaktivierung in den verwendeten Blutproben verursacht haben, obwohl darauf geachtet wurde, die Blutentnahme mittels gängiger Butterfly-Kanüle möglichst langsam durchzuführen.

Der Vorgang der Thrombusbildung kann bei einem Katheter nicht nur an der inneren sondern auch an der äußeren Oberfläche ablaufen. So fanden Formanek et al. in einer Studie mit 93 Patienten, die eine diagnostische Angiographie erhielten, bei 50% der Patienten eine Thrombusbildung an der äußeren Oberfläche des Katheters. Die dort entstandenen Thromben können beim Herausziehen des Katheters nach Beendigung der Intervention abgelöst werden und so zu ischämischen Ereignissen führen. (Chan et al., 2009) In unserem Versuchsaufbau wird der Herzkatheter im Gegensatz zum realen Gebrauch jedoch nur an seiner inneren, nicht aber an seiner äußeren Oberfläche mit dem Blutstrom in Kontakt gebracht. Wir konnten damit nur den Einfluss der verwendeten Gerinnungshemmer auf die Entstehung der Herzkatheter-Thrombose im Katheter-Lumen untersuchen, die Beurteilung der Wirksamkeit gegen eine Thrombosentwicklung an der Katheter-Außenfläche war in diesem Modell nicht möglich.

Nach den aktuellen klinischen Empfehlungen werden die meisten elektiven PCIs unter der vorzeitig begonnenen dualen plättchenhemmenden Therapie mit ASS und Clopidogrel durchgeführt. Da wir unsere Probanden ausschließlich mit ASS vorbehandelten, entsprechen unsere Versuchsbedingungen bezüglich der medikamentösen Einflüsse eher einer dringenden PCI im Rahmen eines ACS ohne aktive Metabolite von Clopidogrel als einer elektiven perkutanen Koronarintervention.

## **5.4 Diskussion der Ergebnisse**

### **5.4.1 Einfluss der NMH auf die Thrombogenese im *in vitro*-Modell**

#### **a) Durchlaufzeit und Thrombusgewicht**

Als objektive Größe zur Beurteilung der Thrombusentstehung im Herzkatheter diene in unserem Versuchsaufbau die Durchlaufzeit. Die Versuche waren auf eine Dauer von 60 Minuten angelegt. Erste Durchläufe in unserem Modell mit Blutproben einer unbehandelten Versuchsgruppe mussten wegen Sistieren des Blutflusses aufgrund von ausgeprägter Clot-Bildung im Herzkatheter bereits nach wenigen Minuten abgebrochen werden. Zur weiteren Prüfung des Modells sowie als Vergleichsgruppe zu den folgenden Versuchen mit den eingesetzten niedermolekularen Heparinen wurden anschließend mit UFH behandelte Blutproben verwendet. Sowohl in dieser Versuchsgruppe als auch in allen Gruppen mit niedermolekularen Heparinen lag – mit einer Ausnahme in der Gruppe Enoxaparin – keine verkürzte Durchlaufzeit vor. Diese Beobachtungen unterstützen zum einen die These, dass unser Modell zur Testung der Antikoagulantien geeignet ist, da UFH und NMH im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe eine Verstopfung des Katheters durch Thrombosebildung verhindern konnten. Zum anderen gaben sie einen ersten Hinweis darauf, dass Certoparin und Dalteparin in unserem Modell ähnlich effektiv zu sein scheinen wie Enoxaparin.

Entsprechend der kurzen Durchlaufzeit wurde in der unbehandelten Versuchsgruppe ein deutlich höheres Thrombusgewicht gemessen als in allen anderen Gruppen. Zwischen UFH und den einzelnen niedermolekularen Heparinen ergab sich dagegen kein signifikanter Unterschied. Außerdem brachte die Kombination mit Eptifibatid in keiner Gruppe eine signifikante Verringerung des Thrombusgewichtes.

#### **b) Thrombin-Antithrombin-Komplex (TAT)**

Als indirekter Marker der Thrombusgenerierung ist der Thrombin-Antithrombin-Komplex (TAT) ein sehr aussagekräftiger Parameter für die Potenz der gerinnungshemmenden Substanzen, die Thrombusentstehung im Herzkatheter zu hemmen. Thrombin wird gebildet, wenn die Gerinnungskaskade abläuft. Wird das verhindert, ist weniger Thrombin verfügbar, das an Antithrombin III gebunden werden kann. Somit liegt bei guter Wirksamkeit der verwendeten Antithrombotika weniger TAT vor als bei schlechter.

Die im Rahmen dieser Promotion vorgestellten Daten zeigen in Bezug auf die TAT-Bildung keinen signifikanten Unterschied zwischen den einzelnen Versuchsgruppen auf. Damit scheint die unterschiedliche anti-FXa/anti-FIIa-Ratio der von uns untersuchten NMH in unserem Modell keine nennenswerte Auswirkung auf die Thrombusgenerierung zu haben. Auf ein vergleichbares Ergebnis kamen Harenberg et al. beim Vergleich der antithrombotischen Wirksamkeit von direkten Thrombininhibitoren mit den niedermolekularen Heparinen Enoxaparin, Certoparin und Dalteparin in einem *in vitro*-Modell. Auch in dieser Studie wurde



UFH als Kontrolle verwendet. Es zeigte sich in keiner Gruppe eine signifikant unterschiedlich gemessene TAT-Konzentration. (Harenberg et al., 2002)

### **c) Elektronenmikroskopische Auswertung**

Zur Differenzierung des Einflusses der von uns verwendeten gerinnungshemmenden Substanzen auf die optisch wahrnehmbaren und unterscheidbaren Bestandteile eines Thrombus an einer Fremdoberfläche wurde die Technik der Elektronenmikroskopie angewendet. Das Ziel dieser Analysen war die Beantwortung der Frage, ob sich der an der inneren Herzkatheter-Oberfläche entstandene Thrombus nach der Anwendung von Enoxaparin, Certoparin und Dalteparin in seiner Zusammensetzung unterscheidet. Die Quantifizierung ergab jedoch für Erythrozyten, Thrombozyten und Fibrin bei allen NMH keinen signifikanten Unterschied. In Bezug auf die Rolle der Erythrozyten bei der Thrombusbildung zeigten Vallés et al. in mehreren Studien, dass Zell-Zell-Interaktionen zwischen aktivierten Plättchen und Erythrozyten sowohl die Plättchenaktivierung als auch die proaggregatorische Kapazität der freigesetzten Substanzen erhöht. Die von aktivierten Thrombozyten freigesetzten Stoffe Thromboxan A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) und Arachidonsäure bewirken in den umgebenden Erythrozyten einen zytosolischen Calcium-Anstieg, was zur Freilegung von Phosphatidylserinen führt. Daraus resultiert ein Anstieg der prokoagulatorischen Aktivität der Erythrozyten-Membran mit verstärkter Haftfähigkeit an das Endothel und eine Verminderung der Verformbarkeit der Erythrozyten. Durch Aktivierung der GP IIb/IIIa-Rezeptoren und gesteigerte Expression von P-Selektin auf den Thrombozyten fördern Erythrozyten die Plättchenaggregation mit Bildung von größeren und stabileren Aggregaten in einem sich entwickelnden Thrombus. Die verschiedenen Thrombozyten-stimulierenden Faktoren beeinflussen damit die Aktivierung der Erythrozyten. (Vallés et al., 2002)

Überraschenderweise führte die Kombination der einzelnen NMH mit Eptifibatid bei unseren Versuchen nicht zu einer signifikant niedrigeren Menge anhaftender Thrombozyten und Erythrozyten, obwohl die Anhaftung der Thrombozyten an das oberflächengebundene Fibrin über den GP IIb/IIIa-Rezeptor stattfindet und die gebundenen und damit aktivierten Thrombozyten eine Steigerung der prokoagulatorischen Aktivität der Erythrozyten-Membran hervorrufen.

### **d) Anti-Xa-Aktivität**

Mit der Messung der Anti-Xa-Aktivität lässt sich der Wirkspiegel der niedermolekularen Heparine im Blut überwachen. Wir gaben bei unseren Versuchen jedes niedermolekulare Heparin in der gleichen Dosierung zu den jeweiligen Blutproben und fanden erwartungsgemäß keinen signifikanten Unterschied in der Höhe der Anti-Xa-Aktivität zwischen den einzelnen Gruppen. Bezüglich der anderen Endpunkte in unserer Untersuchung wurde ebenfalls kein

signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen mit den verschiedenen NMH beobachtet. Zur Verhinderung einer Herzkatheter-Thrombose in unserem *in vitro*-Modell waren damit alle eingesetzten NMH gleich wirksam. Das könnte nun bedeuten, dass für die Wirksamkeit hier primär das Erreichen der gewünschten Anti-Xa-Aktivität ausschlaggebend ist, unabhängig vom verwendeten NMH. Aufgrund der besseren Kalkulierbarkeit der NMH im Vergleich zu UFH ist davon auszugehen, dass der gewünschte Anti-Xa-Spiegel durch erstere sicherer erreicht werden kann, weshalb diese besser für unsere Indikation geeignet zu sein scheinen.

#### **e) D-Dimere**

Die D-Dimer-Konzentration wird in der Klinik primär als Parameter der Fibrinolyse herangezogen, jedoch können Erhöhungen der D-Dimer-Konzentration in situ auch durch zahlreiche andere Ursachen ausgelöst werden. Beispiele dafür sind Entzündungen, Tumore oder Operationen. Deshalb handelt es sich um einen eher unspezifischen Laborparameter, der in Bezug auf unsere spezielle Fragestellung keine sehr zuverlässige Aussagekraft hat. Unsere Ergebnisse zeigten analog zu den bisher beschriebenen Endpunkten keinen signifikanten Unterschied in den einzelnen Versuchsgruppen.

#### **f) Thrombozytenaggregation**

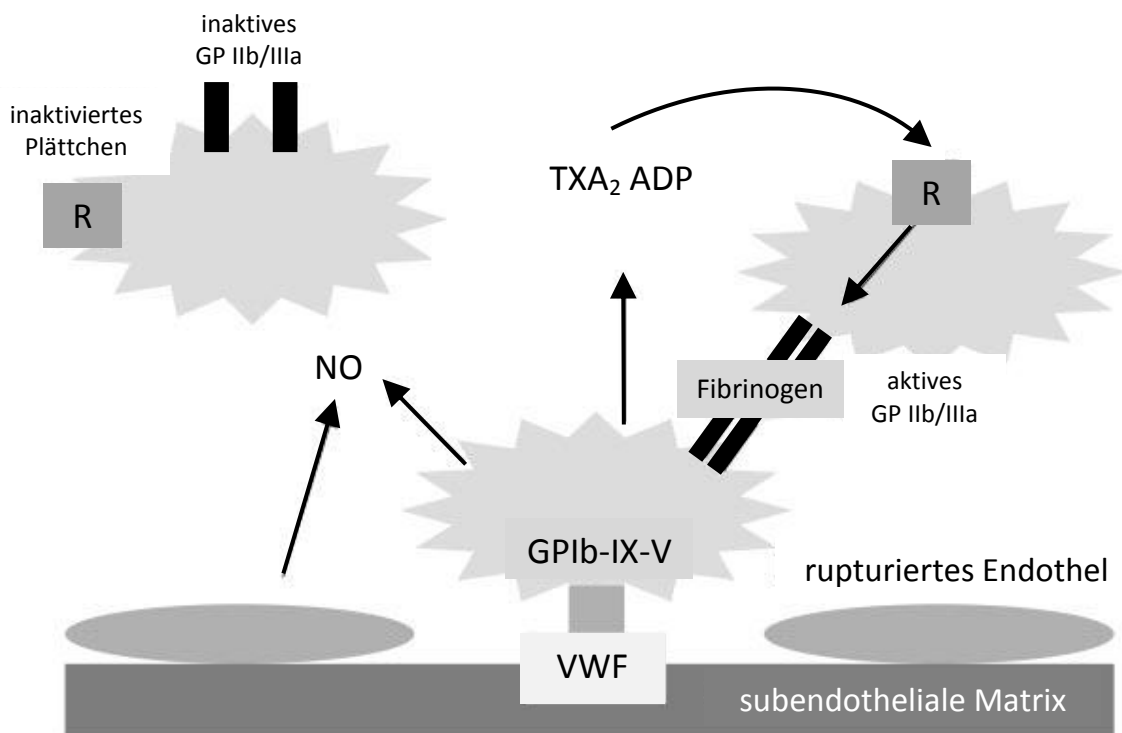
Die ADP-abhängige Aktivierung ihrer GP IIb/IIIa-Rezeptoren – z. B. im Rahmen einer Gefäßwand-Verletzung – ist für Thrombozyten ein Trigger zur Aggregation. Da auch die Bindung der Thrombozyten an fremdoberflächengebundenes Fibrin über diese Rezeptoren erfolgt, ist deren Hemmung für die gerinnungshemmende Strategie im Rahmen einer PCI interessant. Zu verschiedenen Zeitpunkten unserer Versuchsdurchläufe entnahmen wir Blutproben zur Testung der Thrombozytenaggregation, um die Aggregationsbereitschaft der Thrombozyten im zeitlichen Verlauf nach Gabe der jeweiligen Substanz beobachten zu können. Der Vergleich der Thrombozytenaggregation nach ASS-Gabe in den einzelnen Versuchsgruppen mit der Thrombozytenaggregation ohne Zugabe eines Medikamentes ergab entsprechend der aggregationshemmenden Wirkung von Acetylsalicylsäure eine signifikant schwächere Aggregation in den damit behandelten Gruppen. Die niedermolekularen Heparine hatten keine signifikante Auswirkung auf die Thrombozytenaggregation. Wie nicht anders zu erwarten, blieb in allen Gruppen, in denen das jeweilige NMH mit dem Thrombozytenaggregationshemmer Eptifibatid kombiniert wurde, die Thrombozytenaktivierbarkeit aus, es erfolgte keine Aggregation. Auf ein vergleichbares Ergebnis kamen Lev et al. in einer Studie zum Effekt von Eptifibatid auf Plättchenfunktion und Thrombusbildung bei Patienten mit ACS: Eptifibatid führte nach Zugabe zu Enoxaparin bzw.

UFH zu einer hochsignifikant verminderten Thrombozytenaggregation im Vergleich zu beiden Gruppen ohne Eptifibatid. (Lev et al., 2004)

Trotzdem hatte die Zugabe von Eptifibatid bezüglich aller untersuchten Endpunkte keine signifikant unterschiedlichen Ergebnisse zur Folge, so dass sich die beobachtete Hemmung der Thrombozytenaktivierbarkeit durch den GP IIb/IIIa-Hemmer – zumindest in unserem Modell – nicht auf die Verhinderung der Herzkatheter-Thrombose auswirkte.

#### 5.4.2 Bedeutung der plasmatischen Gerinnung bei Entstehung der Katheter-Thrombose

Als Ursache für die Thrombusbildung bei Kontakt von Blut mit künstlichen Oberflächen wird eine Adsorption von Plasma-Proteinen an das Fremdmaterial gesehen, die nach ihrem Erstbeschreiber als „Vroman-Layer“ bezeichnet wird. Unter den sich anlagernden Proteinen führen hauptsächlich Fibrinogen und vWF – schon in kleinsten Mengen – zur Aktivierung der intrinsischen Gerinnungskaskade und zur Adhäsion und Aktivierung von Thrombozyten. Aber auch andere Proteine wie Fibronectin und Vitronectin können, wenn sie in großer Anzahl an der Oberfläche anhaften, über aktivierte Integrine (GP IIb/IIIa) eine Plättchenadhäsion hervorrufen. (Raaz et al., 2009)



**Abbildung 20: Aktivierung der intrinsischen Gerinnungskaskade sowie Adhäsion und Aktivierung von Thrombozyten hervorgerufen durch vWF.** (Modifiziert nach Freedman, 2005)

Die Aktivierung der Thrombozyten sowie deren Verknüpfung mit Fibrinogen erfolgen ebenfalls über das Integrin GP IIb/IIIa, das zwischen 50.000 und 80.000mal in jedem zirkulierenden Thrombozyten – meist an dessen Oberfläche – vorkommt. Nach seiner Aktivierung, z. B. über Thrombin, ADP, eine veränderte Blutflussgeschwindigkeit oder wie bereits erwähnt durch an Fremdmaterial gebundene Proteine, kann der GP IIb/IIIa-Rezeptor neben Fibrinogen auch vWF und weitere Liganden binden. Die Aktivierung des Rezeptors trägt außerdem über eine intrazelluläre Signalkaskade zusätzlich zur Stabilisierung des entstehenden Thrombus bei. (Freedman, 2005)

Die Hemmung dieser Rezeptoren führt nach der PRIDE-Studie (Platelet aggregation and Receptor occupancy with Integrilin Dynamic Evaluation) zur dosis- und konzentrationsabhängigen Hemmung der Thrombozytenaggregation und damit zur Hemmung der Thrombusentstehung. Im Rahmen der Anwendung von GP IIb/IIIa-Hemmern bei PCIs wurde in der ESPRIT-Studie die Anwendung von Eptifibatid bei Patienten vor geplanter Stent-Implantation im Vergleich zu Placebo-Gabe untersucht. Es zeigte sich sowohl während der PCI als auch nach sechs bzw. zwölf Monaten eine Reduktion der ischämischen Komplikationen. (Auer et al., 2003) Aufgrund schon vorliegender Daten über die Möglichkeit, mit dem GP IIb/IIIa-Antagonisten Abciximab *in vivo* existierende Thromben aufzulösen, untersuchten Moser et al. das Potential der GP IIb/IIIa-Hemmer Abciximab, Eptifibatid und Tirofiban, aneinander haftende Plättchen *in vitro* zu disaggregieren. Alle drei Substanzen führten zu einem positiven Ergebnis, wobei Eptifibatid und Tirofiban – möglicherweise wegen ihrer kleineren Größe – eine stärkere Disaggregation bewirkten. (Moser et al., 2003) In ihrer Studie zum Effekt von Eptifibatid auf Plättchenfunktion und Thrombusbildung bei Patienten mit ACS beobachteten Lev et al. neben einer deutlichen Reduktion der Thrombusbildung eine Abnahme der Fibrinablagerung nach Zugabe von Eptifibatid sowohl bei einer mit Enoxaparin als auch bei einer mit UFH vorbehandelten Gruppe. Dieser Effekt lässt sich dadurch erklären, dass aufgrund der Hemmung der Plättchenaggregation, die durch Eptifibatid hervorgerufen wird, weniger aktivierte Plättchen zur Thrombinbildung zur Verfügung stehen. Aus mehreren Gründen ist dagegen eine direkte Wirkung von Eptifibatid auf Thrombin nicht anzunehmen: In früheren Untersuchungen führte der Einsatz von Eptifibatid weder zu einer Reduzierung der Thrombin- oder TAT-Bildung noch zu einer ACT-Verlängerung. (Lev et al., 2004)

Anhand dieser Ergebnisse und zahlreicher weiterer Studien gilt der Einsatz eines GP IIb/IIIa-Blockers bei Hochrisikopatienten mit ACS, die sich einer PCI unterziehen müssen, als Standardtherapie. Infolge von Subgruppenanalysen scheint jedoch die zusätzliche Gabe eines GP IIb/IIIa-Hemmers nur bei Patienten mit erhöhten Troponinwerten, die eine frühe perkutane Revaskularisation erhalten, eine relevante Risikoreduktion zu bewirken. (Fachinformation Integrilin®) Trotz der beschriebenen starken inhibitorischen Wirkung des GP IIb/IIIa-Hemmers Eptifibatid auf verschiedene Schritte der Thrombusbildung brachte der Einsatz dieser Substanz

in den im Rahmen dieser Promotionsarbeit durchgeführten Experimenten keinen positiven Effekt in Bezug auf die Verhinderung einer Herzkatheter-Thrombose. Die Ursache könnte darin liegen, dass Blutproben von gesunden Probanden verwendet wurden. Heeschen et al. zeigten, dass Patienten mit ACS und erhöhten Serumkonzentrationen von CD40 Ligand besonders von einer aggregationshemmenden Therapie mit dem GP IIb/IIIa-Antagonisten Abciximab profitieren. (Heeschen et al., 2003; Trepels et al., 2004) Ähnliche Beobachtungen machten André et al. in einer Studie über die Rolle von CD40 Ligand bei der Entstehung arterieller Thromben. (André et al., 2002)

Der Kontakt von Blut mit Fremdoberflächen führt neben der durch adhäsiertes Fibrinogen und andere Proteine hervorgerufenen Aktivierung und Bindung von Thrombozyten über weitere Mechanismen zu Thrombinbildung. Hong et al. zeigten in einer Studie zur Kontaktaktivierung der Blutgerinnung an PVC, dass Erythrozyten und Leukozyten bei Oberflächen-Kontakt eine initiale geringe Thrombinmenge hervorrufen, die dann durch Plättchenaktivierung im Sinne eines positiven Feedback zu einer Potenzierung des entstehenden Thrombins führt. (Hong et al., 2001) Dieser Aktivierungsweg der Thrombozyten kann auch nach Hemmung der GP IIb/IIIa-Rezeptoren ablaufen.

Die Beschichtung der inneren Oberfläche der verwendeten Herzkatheter besteht aus Polytetrafluorethylen (PTFE). Dabei handelt es sich um eine hydrophobe Beschichtung, die unter anderem der Verbesserung der Gleitfähigkeit in Führungskathetern dienen soll. In physiologischem Zustand weisen Blutgefäße und Thrombozyten eine elektronegative Ladung auf, weshalb sie sich gegenseitig abstoßen. Wird eine Gefäßwand verletzt, wird dessen Ladung positiver und es kommt zur Adhäsion von Thrombozyten. Ein großer Nachteil von PTFE ist nun, dass durch dessen hydrophobe Eigenschaft die innere Oberfläche ebenfalls geringer elektronegativ geladen ist, weshalb sie, besonders unter niedriger Blutflussgeschwindigkeit, anfällig für eine Thrombusbildung ist. Diese Eigenschaft kann durch die Bindung kovalenter Gruppen an die Oberfläche abgeschwächt werden, was z. B. durch eine Heparin-Beschichtung erreicht werden kann. (Chan et al., 2009)

Eine Untersuchung zu Fibrinadsorption, Plättchenadhäsion und Thrombinbildung an heparinisierten Oberflächen kam zu dem Ergebnis, dass nicht die Reduzierung der Fibrinogen-abhängigen Plättchenadhäsion sondern vielmehr die durch Heparin verursachte Neutralisierung von Thrombin als Ursache für die anti-thrombogene Eigenschaft von Heparin-beschichteten Oberflächen anzusehen ist. Diese Aussage widerspricht dem aktuellen Verständnis der Thrombusbildung an künstlichen Oberflächen, das in der Adsorption v.a. von Fibrinogen und vWF und der daraus resultierenden Plättchenadhäsion und -aggregation den Auslöser der Material-induzierten Thrombose sieht, passt jedoch zu unseren Ergebnissen. (Keuren et al., 2002; Raaz et al., 2009)

So scheint die Hemmung der plasmatischen Gerinnung und der Thrombinbildung im Herzkatheter-Thrombose-Modell die günstigere Strategie zur Verhinderung der durch Fremdmaterial hervorgerufenen Thrombose zu sein. (Raaz et al., 2009)

## **5.5 Klinische Implikation und Ausblick**

Ziel dieser Arbeit war zu untersuchen, ob Certoparin und Dalteprin in unserem *in vitro*-Modell dem niedermolekularen Heparin Enoxaparin in der Prävention einer Herzkatheter-Thrombose vergleichbar sind. In Betrachtung unserer Endpunkte konnte zwischen den eingesetzten niedermolekularen Heparinen trotz der pharmakokinetischen und –dynamischen Verschiedenheiten kein signifikanter Unterschied in der Potenz der einzelnen Substanzen, eine Thrombosebildung an der inneren Katheter-Oberfläche zu verhindern, gefunden werden. Das verwendete *in vitro*-Modell, das zu diesen Ergebnissen führte, erwies sich bereits in früheren Untersuchungen – verglichen mit durch andere Forschungsgruppen veröffentlichten Daten – als geeignet zur Testung gerinnungshemmender Medikamente bezüglich der Verhinderung von Herzkatheter-Thrombosen. Da Enoxaparin in unserem Modell ebenso günstige Ergebnisse brachte wie unfraktioniertes Heparin, sprechen unsere Daten dafür, dass Certoparin und Dalteprin zur periinterventionellen Antikoagulation im Rahmen einer PCI ebenso als Alternative zu unfraktioniertem Heparin einsetzbar sind wie Enoxaparin.

Die Kombination der NMH mit dem GP IIb/IIIa-Hemmer Eptifibatid zeigte bei unseren Versuchen keinen vorteilhaften Effekt. Damit scheint die plasmatische Gerinnung der geeigneteren Angriffspunkt zu sein, eine durch Kontakt mit Fremdoberflächen hervorgerufene Thrombose zu verhindern. Um die Gefahr von Nebenwirkungen wie Blutungen oder Unverträglichkeitsreaktionen zu minimieren, ist das Interesse groß, die Hemmung der Gerinnungskaskade auf möglichst wenige Faktoren, idealerweise nur einen, zu begrenzen. Sowohl in unserer Arbeitsgruppe als auch in den großen multizentrischen Studien OASIS-5 und OASIS-6 erwies sich der selektive Faktor-Xa-Hemmer Fondaparinux als nicht geeignet zur Verhinderung einer Herzkatheter-Thrombose. (Yusuf et al., 2006; Metha et al., 2007; Schlitt et al., 2008)

Bivalirudin ist aktuell als einziger Vertreter der direkten Thrombininhibitoren zur periinterventionellen Gerinnungshemmung bei perkutaner Koronarintervention zugelassen. Thrombin, der Angriffspunkt der direkten Thrombininhibitoren in der Gerinnungskaskade, aktiviert nicht nur Fibrinogen zu Fibrin sondern macht Fibrin zusätzlich resistent gegenüber der Fibrinolyse. Außerdem wirkt Thrombin durch einen positiven Feedback-Mechanismus verstärkend auf die weitere Thrombingenerierung, lockt Plättchen zum Ort der Gefäßschädigung und fördert deren Aggregation. (Weitz, 2007) Diese Eigenschaften machen Thrombin zu einem attraktiven Ziel in der Hemmung der plasmatischen Gerinnung.

Es existieren bereits zahlreiche Studien zum Einsatz weiterer Substanzen aus der Gruppe der direkten Thrombininhibitoren, wie z. B. Argatroban, im Rahmen einer PCI. Deren Fähigkeit, bereits in Thromben eingebautes Thrombin zu binden und damit zu inaktivieren, könnte für die Verhinderung der Herzkatheter-Thrombose und der postinterventionellen Restenose eine günstige Eigenschaft sein. Ein klarer Vorteil dieser Substanzklasse liegt in der Tatsache, dass sie nicht mit Heparin-induzierten Antikörpern interagiert und eine Bildung von Antikörpern gegen diese Medikamentengruppe selbst auch nach mehrmaliger Gabe bisher nicht beobachtet werden konnte. (Ahrens und Bode, 2005) Erste Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe mit dem direkten Thrombininhibitor Argatroban im Herzkatheter-Thrombosemodell zeigten ein mit Enoxaparin und UFH vergleichbares Potential, einer Herzkatheter-Thrombose vorzubeugen. (Raaz et al., 2010)

Der initiierte Faktor der intrinsischen Gerinnungskaskade, der sich bei Kontakt mit negativen Oberflächen selbst und anschließend FXI aktiviert, ist Faktor XII. In Anwesenheit von HMWK ist FXIIa außerdem dazu in der Lage, Präkallikrein in Kallikrein umzuwandeln, das im Sinne eines positiven Feedbacks weitere FXII aktiviert. Stief et al. beobachteten, dass Kallikrein darüber hinaus als direkter Aktivator von Prothrombin wirkt. Auf diese Weise kann Thrombin mit all seinen Wirkungen in Umgehung der Gerinnungskaskade gebildet werden. Somit kann Fremdmaterial trotz Hemmung einzelner Gerinnungsfaktoren wie FXa eine Thrombose verursachen. (Stief, 2008)

Montalescot et al. untersuchten in einer Studie den unterschiedlichen Effekt von Enoxaparin, Dalteparin, UFH und dem direkten Thrombininhibitor PEG-Hirudin auf die Freisetzung von vWF. Enoxaparin und PEG-Hirudin bewirkten dabei die deutlichste Hemmung der vWF-Ausschüttung. vWF führt – sowohl bei Gefäßschäden als auch bei Kontakt mit Fremdmaterial – nicht nur über den GP Ib/IX-Rezeptor zu Plättchenadhäsion und über GP IIb/IIIa zu Plättchenaggregation, er aktiviert die Thrombozyten auch zur Sekretion aggregationsfördernder Substanzen wie ADP, PF4, TXA<sub>2</sub> oder weitere vWF-Moleküle und schützt den Gerinnungsfaktor VIII vor Inaktivierung. Aus diesen Gründen kann er als Marker der Plättchenstimulation und damit, neben Thrombin, als einer der Hauptstimulatoren der Thrombozytenadhäsion und –aggregation angesehen werden. Die Freisetzung des vWF hat somit prognostischen Wert für das Outcome von Patienten mit akuten koronaren Situationen wie Myokardinfarkt, instabile Angina pectoris und koronare Angioplastie. (Montalescot et al., 2000)

Die beschriebenen Untersuchungen verdeutlichen die Vielfalt der in der Auslösung und Unterhaltung einer durch Kontakt mit Fremdoberflächen entstehenden Thrombose beteiligten Komponenten, die zahlreiche mögliche Angriffspunkte zur Verhinderung einer Herzkatheter-Thrombose bieten. Auch die Berücksichtigung der zeitlichen Abfolge der einzelnen Mechanismen wie Anlagerung und Aktivierung von Koagulations-Proteinen, Material-

induzierte Plättchenaktivierung sowie Aktivierung von Leukozyten und des inflammatorischen Systems, die zur Oberflächenaktivierung der Blutgerinnung beitragen, könnte bei der Vorgehensweise von Bedeutung sein. (Chan et al., 2009)

Es darf jedoch auf der Suche nach neuen geeigneten gerinnungshemmenden Strategien nie vergessen werden, das Verhältnis zwischen Nutzen und Risiko abzuwägen.

Enoxaparin hat sich als periinterventionelles Antikoagulans bei perkutaner Koronarintervention als ebenso sicher und effektiv erwiesen wie unfraktioniertes Heparin. Nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit an einem *in vitro*-Modell scheinen die niedermolekularen Heparine Certoparin und Dalteparin für diese Indikation ebenso aber nicht besser geeignet zu sein. Bevor eine Aussage über die klinische Bedeutung unserer Resultate getroffen werden kann, müssen im nächsten Schritt Untersuchungen zur Prophylaxe einer Herzkatheter-Thrombose mittels Certoparin und Dalteparin im Rahmen einer elektiven oder dringenden PCI bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom folgen.



## **6. Zusammenfassung**

Die Herzkatheteruntersuchung stellt im Rahmen der Behandlung der koronaren Herzkrankheit das wichtigste diagnostische und therapeutische Verfahren dar. In den meisten Fällen kann bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom eine primäre perkutane Koronarintervention eine Gewebeschädigung des Myokards oder einen Verschluss von Seiten- oder Endästen verhindern. Sowohl die veränderten hämodynamischen und koagulatorischen Bedingungen, die ein ACS hervorrufen kann, als auch die Manipulation an den Gefäßwänden und der Kontakt des Blutes mit Fremdmaterial bei der Durchführung einer PCI machen dabei eine suffiziente gerinnungshemmende Therapie unabdingbar. In diesem Zusammenhang haben die Studien der letzten Jahre gezeigt, dass die eingesetzten antikoagulatorischen Medikamente nicht nur effektiv genug sein müssen, um das Eintreten embolischer ischämischer Ereignisse oder schwerer Blutungen erfolgreich zu verhindern, sondern dass das Augenmerk außerdem auf die seltene aber potentiell lebensgefährliche Komplikation der Herzkatheter-Thrombose gerichtet werden muss. Unfraktioniertes Heparin und Enoxaparin sind die derzeit empfohlenen Standard-Antikoagulantien im Rahmen einer PCI. Enoxaparin gehört der Substanzklasse der niedermolekularen Heparine an, die aufgrund ihrer pharmakodynamischen und –kinetischen Unterschiede zu unfraktioniertem Heparin in Bezug auf Anwendung und Nebenwirkungen deutliche Vorteile aufweisen. In verschiedenen klinischen Studien wurden die Wirksamkeit und Sicherheit verschiedener NMH in der periinterventionellen Thromboseprophylaxe mit vielversprechenden Ergebnissen untersucht. Das verwendete *in vitro*-Modell hat sich bereits in früheren Untersuchungen mit ähnlicher Fragestellung bewährt. Im Rahmen dieser Promotionsarbeit waren die beiden niedermolekularen Heparine Certoparin und Dalteparin mit Enoxaparin anhand mehrerer Endpunkte bezüglich ihrer Wirksamkeit in der Verhinderung einer Herzkatheter-Thrombose verglichen worden.

Den Ergebnissen dieser Dissertation zufolge sind Certoparin und Dalteparin sowohl mit als auch ohne Kombination mit dem GP IIb/IIIa-Hemmer Eptifibatid *in vitro* ebenso geeignet zur Verhinderung von Herzkatheter-Thrombosen wie Enoxaparin und unfraktioniertes Heparin. Eine Überlegenheit der Wirkung von Certoparin und Dalteparin gegenüber Enoxaparin konnte jedoch nicht beobachtet werden. Die unterschiedlichen pharmakologischen Profile hatten damit keinen ungünstigen Effekt auf die gewünschte Wirkung. Bei allen NMH lag nach einmaliger Bolus-Gabe in gleicher Konzentration die Anti-Xa-Aktivität im gewünschten Zielbereich, was möglicherweise ausschlaggebend für die vergleichbare Wirksamkeit war. Die Kombination mit dem GP IIb/IIIa-Hemmer Eptifibatid brachte unter Verwendung von Blutproben gesunder Probanden in allen Gruppen keinen Vorteil. Da in mehreren Studien vor allem Patienten mit akutem Koronarsyndrom von der Gabe eines GP IIb/IIIa-Hemmers profitierten, ist diese

Beobachtung auf die Wirksamkeit dieser Substanzen auf die Verhinderung Katheter-assoziiertes Thrombosen bei klinischer Durchführung einer PCI nicht ohne weiteres übertragbar.

## **7. Literaturverzeichnis**

Ahrens I., Bode C.: Direkte Thrombinhemmung. Ein neues Therapieprinzip bei Vorhofflimmern und akutem Koronarsyndrom? *Herz* 2005;30:197-203.

Anderson J.L., Adams C.D., Antman E.M., Bridges C.R., Califf R.M., Casey D.E., Chavey W.E., Fesmire F.M., Hochman J.S., Levin T.L., Lincoff A.M., Peterson E.D., Theroux P., Wenger N.K., Wright R.S.: ACC/AHA 2007 guidelines for the management of patients with unstable angina/non-ST-elevation myocardial infarction. A report of the American College of Cardiology/American Heart Association task force on practice guidelines (Writing committee to revise the 2002 guidelines for the management of patients with unstable angina/non-ST-elevation myocardial infarction): Developed in collaboration with the American College of Emergency Physicians, American College of Physicians, Society for Academic Emergency Medicine, Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, and Society of Thoracic Surgeons. *J Am Coll Cardiol* 2007;50(7):e1-e157.

André P., Prasad K.S., Denis C.V., He M., Papalia J.M., Hynes R.O., Phillips D.R., Wagner D.D.: CD40L stabilizes arterial thrombi by a beta3 integrin-dependent mechanism. *Nat Med* 2002;8:247-52.

Antman E.M., McCabe C.H., Gurfinkel E.P., Turpie A.G., Bernink P.J., Salein D., Bayes de Luna A., Fox K., Lablanche J.M., Radley D., Premmereur J., Braunwald E.; for the TIMI 11B Investigators: Enoxaparin prevents death and cardiac ischemic events in unstable angina/non-Qwave myocardial infarction. Results of the TIMI 11B trial. *Circulation* 1999;100:1593-601.

Auer J., Berent R., Laßnig E., Weber T., Maurer E., Eber B.: Thrombozytäre Glykoprotein-IIb/IIIa-Rezeptor-Blocker in der Behandlung der koronaren Herzkrankheit. *Herz* 2003;28:393-403.

Baer F.M., Rosenkranz S.: Koronare Herzkrankheit und akutes Koronarsyndrom. In: *Klinische Kardiologie. Krankheiten des Herzens, des Kreislaufs und der herznahen Gefäße*. Hrsg.: Erland Erdmann. 7., vollständig überarbeitete und aktualisierte Auflage, Springer Berlin Heidelberg 2009, S. 14-42.

Barthels M., von Depka Prondzinski M.: *Das Gerinnungskompodium: Schnellorientierung, Befundinterpretation, klinische Konsequenzen*. Stuttgart. Thieme 2003.

Bauersachs R., Schellong S.M., Haas S., Tebbe U., Gerlach H.E., Abletshauer C., Sieder C., Melzer N., Bramlage P., Riess H.: CERTIFY: Prophylaxis of venous thromboembolism in patients with severe renal insufficiency. *Thromb Haemost* 2011;105(6):981-8.

Bittl J.A., Chaitman B.R., Feit F., Kimball W., Topol E.J., on behalf of the Bivalirudin Angioplasty Study Investigators: Bivalirudin versus heparin during coronary angioplasty for unstable or postinfarction angina: Final report reanalysis of the Bivalirudin Angioplasty Study. *Am Heart J* 2001;142:952-9.

Bombeli T.: Niedermolekulare Heparine. In: *Pharma-Kritik*, 20/No. 04, 1998.

Bonzel T., Hamm C.W.: *Leitfaden Herzkatheter*. Steinkopff Verlag 2009.

Bonzel T., Erbel R., Hamm C.W., Levenson B., Neumann F.-J., Rupprecht H.-J., Zahn R.: Leitlinie Perkutane Koronarintervention (PCI). *Clin Res Cardiol* 2008;97:513-47.

Borentain M., Montalescot G., Bouzamondo A., Choussat R., Hulot J.S., Lechat P.: Low-molecular-weight heparin vs. unfractionated heparin in percutaneous coronary intervention: A combined analysis. *Catheter Cardiovasc Intervent* 2005;65:212–21.

Boy O., Hahn S. et al.: Koronarangiografie und Perkutane Koronarintervention (PCI). BQS-Qualitätsreport 2006, S. 120-5.

Chan M.Y., Weitz J.I., Merhi Y., Harrington R.A., Becker R.C.: Catheter thrombosis and percutaneous coronary intervention: Fundamental perspectives on blood, artificial surfaces and antithrombotic drugs. *J Thromb Thrombolysis* 2009;28:366-80.

Chen Ji-lin, Chen Jue, Qiao S., Guo Y., Wu Y., Dai J., Yuan J., Qin X., Yang Y., Goa R.: A randomized comparative study of using enoxaparin instead of unfractionated heparin in the intervention treatment of coronary heart disease. *Chin Med J* 2006;119(5):355-9.

Choussat R., Montalescot G., Collet J.P., Vocaut E., Ankri A., Gallois V., Drobinski G., Sotirov I., Thomas D.: A unique, low dose of intravenous enoxaparin in elective percutaneous coronary intervention. *J Am Coll Cardiol* 2002;40:1943-50.

Cohen M., Demers C., Gurfinkel E.P., Turpie A.G.G., Fromell G.J., Goodman S., Langer A., Califf R.M., Fox K.A.A., Premmureur J., Bigonzi F. for the Efficacy and Safety of Subcutaneous Enoxaparin in Non-Q-Wave Coronary Events Study Group: A comparison of low-molecular-weight heparin with unfractionated heparin for unstable coronary artery disease. *N Engl J Med* 1997;337:447-52.

Collet J.Ph., Montalescot G., Lison L., Choussat R., Ankri A., Drobinski G., Sotirov I., Thomas D.: Percutaneous coronary interventions after subcutaneous enoxaparin pretreatment in patients with unstable angina pectoris. *Circulation* 2001;103:658-63.

Ferguson J.J., Califf R.M., Antman E.M., Cohen M., Grines C.L., Goodman S., Kereiakes D.J., Langer A., Mahaffey K.W., Nessel C.C., Armstrong P.W., Avezum A., Aylward P., Becker R.C., Biasucci L., Borzak S., Col J., Frey M.J., Fry E., Gulba D.C., Guneri S., Gurfinkel E., Harrington R., Hochman J.S., Kleiman N.S., Leon M.B., Lopez-Sendon J.L., Pepine C.J., Ruzyllo W., Steinhubl S.R., Teirstein P.S., Toro-Figueroa L., White H.; SYNERGY Trial Investigators: Enoxaparin vs unfractionated heparin in high-risk patients with non-ST-segment elevation acute coronary syndromes managed with an intended early invasive strategy: Primary results of the SYNERGY randomized trial. *JAMA* 2004;292(1):45-54.

Flegler S.L., Heckmann J.W., Klomparens K.L.: *Elektronenmikroskopie: Grundlagen – Methoden – Anwendungen*. Heidelberg, Berlin, Oxford: Spektrum, Akad. Verl. 1995, S. 1-87.

Freedman J.E.: Molecular regulation of platelet-dependent thrombosis. *Circulation* 2005;112:2725-34.

Furman M.I., Kereiakes D.J., Krueger L.A., Mueller M.N., Pieper K., Broderick T.M., Schneider J.F., Howard W.L., Fox M.L., Barnard M.R., Frelinger A.L., Michelson A.D.: Leukocyte-platelet aggregation, platelet surface P-selectin, and platelet surface glycoprotein IIIa after percutaneous coronary intervention: Effects of dalteparin or unfractionated heparin in combination with abciximab. *Am Heart J* 2001;142(5):790-8.

Gibson C.M., Murphy S.A., Montalescot G., Morrow D.A., Ardissina D., Cohen M., Gulba D.C., Kracoff O.H., Lewis B.S., Roquin N., Antman E.M., Braunwald E., ExTRACT-TIMI 25 Investigators: Percutaneous coronary intervention in patients receiving enoxaparin or unfractionated heparin after fibrinolytic therapy for ST-segment elevation myocardial infarction in the ExTRACT-TIMI 25 trial. *J Am Coll Cardiol* 2007;49(23):2238-46.

Graham I., Atar D., Borch-Johnsen K., Boysen G., Burell G., Cifkova R., Dallongeville J., de Backer G., Ebrahim S., Gjelsvik B., Herrmann-Lingen C., Hoes A., Humphries S., Knapton M., Perk J., Priori S.G., Pyorala K., Reiner Z., Ruilope L., Sans-Menendez S., Scholte op Reimer W., Weissberg P., Wood D., Yarnell J., Zamorano J.L.: European guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice: Executive summary. Fourth joint task force of the European Society of Cardiology and other societies on cardiovascular disease prevention in clinical practice (constituted by representatives of nine societies and by invited experts). *Eur Heart J* 2007;28:2375-414.

Grayburn P.A., Willard J.E., Brickner M.E., Eichhorn E.J.: In vivo thrombus formation on a guidewire during intravascular ultrasound imaging: Evidence for inadequate heparinization. *Cathet Cardiovasc Diagn* 1991;23:141-3.

Greinacher A.: HIT – an overview on clinical presentation, pathogenesis and treatments. *Thromb Haemost* 2004;22:22-30.

Greinacher A., Lubenow N., Hinz P., Ekkernkamp A.: Heparininduzierte Thrombozytopenie. *Dtsch Arztebl* 2003;100(34-35):A-2220.

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

Hamm C.W.: Leitlinien: Akutes Koronarsyndrom (ACS). Teil 2: ACS mit persistierender ST-Hebung. *Z Kardiol* 2004;93:324-91.

Hamm C.W., Bassand J.P., Agewall S., Bax J., Boersma E., Bueno H., Caso P., Dudek D., Gielen S., Huber K., Ohman M., Petrie M.C., Sonntag F., Uva M.S., Storey R.F., Wijns W., Zahger D.; ESC Committee for Practice Guidelines: Bax J.J., Auricchio A., Baumgartner H., Ceconi C., Dean V., Deaton C., Fagard R., Funck-Brentano C., Hasdai D., Hoes A., Knuuti J., Kolh P., McDonagh T., Moulin C., Poldermans D., Popescu B.A., Reiner Z., Sechtem U., Sirnes P.A., Torbicki A., Vahanian A., Windecker S.; Document Reviewers: Windecker S., Achenbach S., Badimon L., Bertrand M., Bøtker H.E., Collet J.P., Crea F., Danchin N., Falk E., Goudevenos J., Gulba D., Hambrecht R., Herrmann J., Kastrati A., Kjeldsen K., Kristensen S.D., Lancellotti P., Mehilli J., Merkely B., Montalescot G., Neumann F.J., Neyses L., Perk J., Roffi M., Romeo F., Ruda M., Swahn E., Valgimigli M., Vrints C.J., Widimsky P.: ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation: The Task Force for the management of acute coronary syndromes (ACS) in patients presenting without persistent ST-segment elevation of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J* 2011;doi:10.1093/eurheartj/ehr236.

Harenberg J., Zokai K., Piazzolo L., Fenyvesi T., Jörg I.: Comparative antithrombotic potencies of direct thrombin inhibitors and low-molecular-weight heparins in an ex vivo human experimental thrombosis model. *Semin Thromb Hemost* 2002;28(4):379-82.

Heeschen C., Dimmeler S., Hamm C.W. et al.: Soluble CD40 ligand in acute coronary syndromes. *N Engl J Med* 2003;348:1104-11.

Hong J., Larsson A., Ekdahl K.N., Elge G., Larsson R., Nilsson B.: Contact between a polymer and whole blood: Sequence of events leading to thrombin generation. *J Lab Clin Med* 2001;138(2):139-45.

Husted S.E., Wallentin L., Lagerqvist B., Kontny F., Ståhle E., Swahn E.: Benefits of extended treatment with dalteparin in patients with unstable coronary artery disease eligible for revascularization. *Eur Heart J* 2002;23:1213-8.

Ke X., Yu H., Wang Q.: Safety and efficacy of dalteparin in percutaneous coronary intervention in Chinese patients with non-ST-elevation acute coronary artery syndromes: Comparison with unfractionated heparin. *J Geriatr Cardiol* 2009;6:95-98.

Kemkes-Matthes B., Oehler G.: *Blutgerinnung und Thrombose. 2., völlig neubearbeitete Aufl.*, Georg Thieme Verlag. Stuttgart/New York 1998, S. 3 ff.

Keuren J.F., Wielders S.J., Willems G.M., Morra M., Lindhout T.: Fibrinogen adsorption, platelet adhesion and thrombin generation at heparinized surfaces exposed to flowing blood. *Thromb Haemost* 2002;87:742-7.

Klein W., Buchwald A., Hillis S.E., Monrad S., Sanz G., Turpie A.G.G., van der Meer J., Olaisson E., Undeland S., Ludwig K.; for the FRIC Investigators: Comparison of low-molecular-weight heparin with unfractionated heparin acutely and with placebo for 6 weeks in the management of unstable coronary artery disease. Fragmin in unstable coronary artery disease study (FRIC). *Circulation* 1997;96:61-8.

Koenig W. et al.: Atherosklerose als inflammatorischer Prozess. *Dtsch Arztebl* 2003;100(23):A-1622.

Lagerqvist B., Husted S., Kontny F., Ståhle E., Swahn E., Wallentin L.; Fast revascularisation during instability in coronary artery disease (FRISC-II) investigators: 5-year outcomes in the FRISC-II randomised trial of an invasive versus a non-invasive strategy in non-ST-elevation acute coronary syndrome: A follow-up study. *Lancet* 2006;368(9540):998-1004.

Lev E.I., Hasdai D., Scapa E., Tobar A., Assali A., Lahav J., Battler A., Badimon J.J., Kornowski R.: Administration of Eptifibatid to Acute Coronary Syndrome Patients Receiving Enoxaparin or Unfractionated Heparin. Effect on Platelet Function and Thrombus Formation. *J Am Coll Cardiol* 2004;43:966-71.

Liao J.K.: Endothelium and acute coronary syndromes. *Clin Chem* 1998;44:1799-808.

Lincoff A.M., Kleiman N.S., Kottke-Marchant K., Maierson E.S., Maresh K., Wolski K.E., Topol E.J.: Bivalirudin with planned or provisional abciximab versus low-dose-heparin and abciximab during percutaneous coronary revascularisation: Results of CACHET. *Am Heart J* 2002;143:847-53.

Maegdefessel L., Buerke M., Schubert S., Reindl I., Michel T., Hauroeder B., Carter J.M., Peetz D., Werdan K., Schlitt A.: Comparison of bivalirudin, enoxaparin, and unfractionated heparin in preventing cardiac catheter thrombosis. Results of an in-vitro study. *Thromb Haemost* 2008; 100(4):693-8.

Metha S.R., Granger C.B., Eikelboom J.W., Bassand J.-P., Wallentin L., Faxon D.P., Peters R.J.G., Budaj A., Afzal R., Chrolavicius S., Fox K.A.A., Yusuf S.: 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;50:1742-51.

Montalescot G., Collet J.P., Lison L., Choussat R., Ankri A., Vicaut E., Perlemuter K., Philippe F., Drobinski G., Thomas D.: Effects of Various Anticoagulant Treatments on von Willebrand Factor Release in Unstable Angina. *J Am Coll Cardiol* 2000;36:110-4.

Montalescot G., Gallo R., White H.D., Cohen M., Steg G., Aylward P.E.G., Bode C., Chiariello M., King 3<sup>rd</sup> S.B., Harrington R.A., Desmet W.J., Macaya C., Steinhubl S.R., for the STEEPLE Investigators: Enoxaparin versus unfractionated heparin in elective percutaneous coronary

interventions. 1-year results from the STEEPLE (SafeTy and Efficacy of Enoxaparin in Percutaneous coronary intervention patients, an international randomized Evaluation) trial. *J Am Coll Cardiol Intv* 2009;2(11):1083-91.

Moser M., Bertram U., Peter K., Bode C., Ruef J.: Abciximab, Eptifibatide and Tirofiban Exhibit Dose-dependent Potencies to Dissolve Platelet Aggregates. *J Cardiovasc Pharmacol* 2003;41(4):586-92.

Natarajan M.K., Velianou J.L., Turpie A.G., Mehta S.R., Raco D., Goodhart D.M. et al.: A randomized pilot study of dalteparin versus unfractionated heparin during percutaneous coronary interventions. *Am Heart J* 2006;151:75.

Navarese E.P., de Luca G., Castriota F., Kozinski M., Gurbel P., Gibson C.M., Andreotti F., Buffon A., Siller-Matula J.M., Sukiennik A., de Servi S., Kubica J.: Low-molecular-weight heparins versus unfractionated heparin in the setting of percutaneous coronary intervention for ST-elevation myocardial infarction: A meta-analysis. *J Thromb Haemost* 2011;doi:10.1111/j.1538-7836.2011.04445.x.

Nickenig G., Böhm M.: Atherosklerose. In: *Innere Medizin*. Hrsg.: Classen et al., 5. Auflage, Urban & Fischer Verlag München/Jena, 2004, S. 221 ff.

Ogilby J.D., Kopelman H.A., Klein L.W., Agarwal J.B.: Adequate heparinization during PTCA: Assessment using activated clotting times. *Cathet Cardiovasc Diagn* 1989;18(4):206-9.

Pröttsch B.: *Gerinnungskonsil. Rationelle Diagnostik und Therapie von Gerinnungsstörungen*. Lehrbuch Thieme Verlag, Stuttgart, Deutschland 2002, 1. Auflage, Seiten 57-112, 192 ff.

Raaz U., Buerke M., Busshardt M., Maegdefessel L., Plehn A., Huroeder B., Werdan K., Schlitt A.: Efficacy of enoxaparin, certoparin and dalteparin in preventing cardiac catheter thrombosis: An in vitro approach. *J Thromb Thrombolysis* 2009;doi:10.1007/s11239-009-0355-x.

Raaz U., Kaeberich A., Maegdefessel L., Buerke M., Busshardt M., Schubert S., Russ M., Plehn A., Ebel H., Werdan K., Schlitt A.: The direct thrombin inhibitor argatroban effectively prevents cardiac catheter thrombosis in vitro. *Thromb Haemost* 2010;103(4):808-14.

Retzlaff S., Mesters R.M.: Hämostasestörungen. In: *Innere Medizin*. Hrsg.: Classen et al., 5. Auflage, Urban & Fischer Verlag München/Jena 2004, S. 800 ff.

Ruggeri Z.M., Orje J.N., Habermann R., Federici A.B., Reininger A.J.: Activation-independent platelet adhesion and aggregation under elevated shear stress. *Blood* 2006;108:1903-10.

Samama M.M., Gerotziafas G.T.: Comparative Pharmacokinetics of LMWHs. *Semin Thromb Hemost* 2000;26 Suppl 1:31-8.

Schellong S.M., Haas S., Greinacher A., Schwanebeck U., Sieder C., Abletshauer C., Bramlage P., Riess H.: An open-label comparison of the efficacy and safety of certoparin versus unfractionated heparin for the prevention of thromboembolic complications in acutely ill medical patients: CERTAIN. *Expert Opin Pharmacother* 2010;11(18):2953-61.

Schellong S.M., Gerlach H.E., Tebbe U., Haas S., Melzer N., Abletshauer C., Sieder C., Bramlage P., Riess H., Bauersachs R.: Certoparin versus UFH to prevent venous thromboembolic events in the very elderly patient: An analysis of the CERTIFY study. *Thromb Res* 2011;doi:10.1016/j.thromres.2011.05.002.

Schlächinger V., Zeiher A.M.: Koronare Herzerkrankung. In: Innere Medizin. Hrsg.: Classen et al., 5. Auflage, Urban & Fischer Verlag München/Jena 2004, S. 227 ff.

Schlitt A. Dr. med.: Habilitation zum Thema „Bedeutung des Phospholipid-Transferproteins (PLTP) im Krankheitsbild der Atherosklerose“. Halle, Universität, Medizinische Fak., Diss., 88 Seiten, 2006.

Schlitt A., Rupprecht H.J., Reindl I., Schubert S., Hauroeder B., Carter J.M. et al.: In-vitro comparison of fondaparinux, unfractionated heparin, and enoxaparin in preventing cardiac catheter-associated thrombus. *Coron Artery Dis* 2008;19:279-84.

Schlitt A., Schubert S., Buerke M., Müller-Werdan U.: Gerinnungshemmung bei akutem Koronarsyndrom. *Moderne und etablierte Konzepte. Arzneimitteltherapie* 2007;25:330-7.

Schmidt R.F., Lang F., Thews G.: Physiologie des Menschen. 29. Auflage. Springer, Berlin 2004, S. 524.

Stief T.W.: Kallikrein Activates Prothrombin. *Clin Appl Thromb Hemost* 2008;14:97-8.

Tebbe U., Oeckinghaus R., Appel K.-F., Heuer H., Haake H., Eggers E., Seidel K., Adams J., Harenberg J.: AFFECT: A prospective, open-label, multicenter trial to evaluate the feasibility and safety of a short-term treatment with subcutaneous certoparin in patients with persistent non-valvular atrial fibrillation. *Clin Res Cardiol* 2008;97:389-96.

Trepels T., Zeiher A.M., Fichtlscherer S.: Akutes Koronarsyndrom und Entzündung. Biomarker zur Diagnostik und Risikostratifizierung. *Herz* 2004;29:769-76.

Vallés J., Santos M.T., Aznar J., Martínez M., Moscardó A., Piñón M., Broekman M.J., Marcus A.J.: Platelet-erythrocyte interactions enhance  $\alpha_{IIb}\beta_3$  integrin receptor activation and P-selectin expression during platelet recruitment: Down-regulation by aspirin ex vivo. *Blood* 2002;99:3978-84.

von Depka Prondzinski M.: Blutgerinnung – Aktuelle Aspekte der Physiologie, Pathophysiologie, Klinik, Diagnostik, Prophylaxe und Therapie. 1. Auflage, Bremen: UNI-MED 2002, S.18 ff.

Wallentin L., Swahn E.; for the FRISC Study Group: Low-molecular-weight heparin (Fragmin) during instability in coronary artery disease (FRISC). *Am J Cardiol* 1997;25-9.

Warkentin T.E., Sheppard J.A., Sigouin C.S., Kohlmann T., Eichler P., Greinacher A.: Gender imbalance and risk factor interactions in heparin-induced thrombozytopenia. *Blood* 2006;108:2937-41.

Weitz J.I.: Factor Xa or thrombin: Is thrombin a better target? *J Thromb Haemost* 2007;5(1):65-7.

White H.D., Kleiman N.S., Mahaffey K.W., Lokhnygina Y., Pieper K.S., Chiswell K., Cohen M., Harrington R.A., Chew D.P., Peterson J.L., Berdan L.G., Aylward P.E., Nessel C.C., Ferguson J.J. 3<sup>rd</sup>, Califf R.M.: Efficacy and safety of enoxaparin compared with unfractionated heparin in high-risk patients with non-ST-segment elevation acute coronary syndrome undergoing percutaneous coronary intervention in the Superior Yield of the New Strategy of Enoxaparin Revascularisation and Glycoprotein IIb/IIIa Inhibitors (SYNERGY) trial. *Am Heart J* 2006;152(6):1042-50.

Yusuf S., Mehta S.R., Chrolavicius S., Afzal R., Pogue J., Granger C.B., Budaj A., Peters R.J., Bassand J.P., Wallentin L., Joyner C., Fox K.A.: Effects of fondaparinux on mortality and



reinfarction in patients with acute ST-segment elevation myocardial infarction: The OASIS-6 randomized trial. JAMA 2006;295:1519-30.

## **8. Thesen**

1. Die perkutane Koronarintervention wird als bedeutendes Verfahren in Diagnostik und Therapie bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom angewandt. Voraussetzung für eine sichere und effektive Durchführung ist eine geeignete gerinnungshemmende Strategie, die eine Thromboseentstehung unter der Prozedur verhindern kann ohne das Blutungsrisiko zu erhöhen.
2. Eine zwar seltene aber bedrohliche Komplikation der perkutanen Koronarintervention ist die Herzkatheter-Thrombose. Die antithrombotische Therapie muss damit eine nicht nur durch die Gefäßtraumatisierung sondern auch durch Kontakt mit Fremdoberflächen hervorgerufene Thrombusbildung verhindern.
3. Trotz intensiver Forschung im Bereich der Antikoagulantien gilt unfraktioniertes Heparin noch immer als periinterventionelles Standard-Antikoagulans bei perkutaner Koronarintervention. Alternativ wird das niedermolekulare Heparin Enoxaparin erfolgreich eingesetzt.
4. Die Substanzklasse der niedermolekularen Heparine bringt aufgrund seiner günstigeren pharmakodynamischen und –kinetischen Eigenschaften einige Vorteile wie höhere Bioverfügbarkeit nach subkutaner Gabe oder bessere Kalkulierbarkeit der Dosis gegenüber unfraktioniertem Heparin mit sich. Aufgrund ihrer unterschiedlichen Größe und Struktur unterscheiden sich die einzelnen Vertreter der niedermolekularen Heparine deutlich in ihrem Wirkungsprofil, so dass sie nicht bedenkenlos gegeneinander ausgetauscht werden können.
5. In einigen Studien wurden verschiedene andere niedermolekulare Heparine mit Enoxaparin oder unfraktioniertem Heparin in der periinterventionellen Anwendung verglichen. Dalteparin stellte sich dabei anhand vielversprechender Ergebnisse als mögliche Alternative zu Enoxaparin und unfraktioniertem Heparin heraus. (Natarajan et al., 2006; Ke et al., 2009)
6. Ziel dieser Dissertationsarbeit war es, in einem *in vitro*-Modell zu untersuchen, ob die niedermolekularen Heparine Certoparin und Dalteparin ähnlich wirksam in der Verhinderung einer Herzkatheter-Thrombose im Vergleich zu Enoxaparin sind.
7. Die Ergebnisse zeigten zwischen den einzelnen Substanzen keinen signifikanten Unterschied in der Verhinderung der Herzkatheter-Thrombose in dem verwendeten *in vitro*-Modell. Die Wirksamkeit der Substanzen wurde anhand der Endpunkte Durchlaufzeit, entstandenes Thrombusgewicht und elektronenmikroskopisch nachgewiesene Menge von Erythrozyten, Thrombozyten und Fibrin an der inneren Katheter-Oberfläche beurteilt. Den auf diese Weise

gewonnenen Daten zufolge scheinen die niedermolekularen Heparine Certoparin und Dalteparin zur Verhinderung der Katheter-assoziierten Thrombose ebenso geeignet zu sein wie Enoxaparin.

8. Mittels Messung der Anti-Xa-Aktivität konnte festgestellt werden, dass durch einmalige Gabe des jeweiligen niedermolekularen Heparins in gleicher Konzentration trotz der Unterschiede des jeweiligen pharmakologischen Profils in jeder Versuchsgruppe der gewünschte Zielbereich der Dosis erreicht wurde. Damit scheint – zumindest in dem untersuchten Modell – das Erreichen des gewünschten Anti-Xa-Zielbereichs und nicht unbedingt die Wahl der Substanz für die suffiziente Verhinderung einer Herzkatheter-Thrombose ausschlaggebend zu sein.
9. Die Kombination der niedermolekularen Heparine mit dem GP IIb/IIIa-Hemmer Eptifibatid ergab keinen signifikanten Effekt auf die Thromboseverhinderung. In mehreren Studien wurde ein besonderer Nutzen von GP IIb/IIIa-Hemmern bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom beschrieben. Da unsere Blutproben jedoch von gesunden Spendern stammten, ist unsere Beobachtung nicht ohne weiteres auf die klinische Anwendung des GP IIb/IIIa-Hemmers bei perkutanem Koronarsyndrom übertragbar.
10. Die Aktivierung der Gerinnungskaskade durch Kontakt mit Fremdoberflächen wird hauptsächlich über den Gerinnungsfaktor XII initiiert. In Anwesenheit von HMWK ist FXIIa außerdem dazu in der Lage, Präkallikrein in Kallikrein umzuwandeln, das als direkter Aktivator von Prothrombin wirkt. Thrombin kann auf diesem Weg in Umgehung der Gerinnungskaskade gebildet werden, weshalb die Hemmung einzelner Faktoren der Kaskade in diesem Fall wirkungslos ist. Faktor XII dürfte damit in der Verhinderung einer Fremdoberflächen-assoziierten Thrombose ein erfolgversprechender Angriffspunkt sein.
11. vWF ist ein weiteres Agens, das sowohl bei Gefäßschäden als auch bei Kontakt mit Fremdmaterial vor allem über Plättchenadhäsion, Plättchenaggregation und Förderung der Sekretion aggregationsfördernder Substanzen aus Thrombozyten eine bedeutende prothrombotische Wirkung hat. Deshalb könnte auch hier ein möglicher neuer Therapieansatz in der periinterventionellen Thromboseprophylaxe zu finden sein.
12. Nach Abschluss der Untersuchungen kann die Hypothese formuliert werden, dass die niedermolekularen Heparine Certoparin und Dalteparin eine im Vergleich zu Enoxaparin ähnliche Wirksamkeit auf die Verhinderung von Herzkatheter-Thrombosen besitzen.

## **9. Anhang**

### **9.1 Lebenslauf**

#### **Persönliche Daten**

Name, Vorname: Bußhardt, Marese  
Geburtsdatum: 06. Juni 1980  
Geburtsort: Waldkirch  
Nationalität: deutsch  
Adresse: Georg-Cantor-Straße 16, 06108 Halle/Saale  
E-Mail: marese@gmx.de  
Konfession: römisch-katholisch  
Familienstand: ledig

#### **Schulbildung**

1986 – 1990 Schwarzenberg Grundschule Waldkirch  
1990 – 1999 Geschwister-Scholl-Gymnasium Waldkirch

#### **Studium**

2000 – 2002 Studium der Musikwissenschaft und Germanistik (MA) mit abgelegter  
Zwischenprüfung, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg  
2002 – 2003 Studium der Klinischen Linguistik (Bachelor), Universität Bielefeld  
2003 – 2010 Studium der Humanmedizin, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
01.06.2010 Ärztliche Prüfung  
24.06.2010 Approbation als Ärztin

#### **Famulaturen**

02/2006 – 03/2006 Gastroenterologie, Klinikum Neukölln, Berlin  
08/2006 – 09/2006 Pädiatrie, Klinikum links der Weser, Bremen  
09/2006 – 10/2006 Kardiologische Intensivstation, Universitätsklinikum Halle  
08/2007 Gynäkologie/Geburtshilfe, Hospital Carlos Andrade Marín Quito,  
Ecuador  
09/2007 Praxis für Allgemeinmedizin, Waldkirch  
02/2008 Praxis für Gynäkologie, Wismar  
03/2008 Gynäkologie/Geburtshilfe, Städtisches Krankenhaus Martha-Maria  
Halle-Dörlau

#### **Nebentätigkeiten**

12/2004 – 09/2005 Aushilfskraft für Notfall-Einsätze im Pflegebereich im  
Universitätsklinikum Halle  
04/2008 – 07/2008 Praktikumsbetreuung als wissenschaftliche Hilfskraft am Julius-  
Bernstein-Institut für Physiologie der Martin-Luther-Universität Halle-  
Wittenberg

## **Zusatzqualifikationen**

WS 2007/2008                      Knüpf-Naht-Kurs innerhalb des Blockpraktikums Chirurgie  
11./12.11.2011                      Prüfarztkurs „Grundlagen und Praxis klinischer Prüfungen

## **Praktisches Jahr**

08/2008 – 12/2008                      Pädiatrie/Pädiatrische Kardiologie, Universitätsklinikum Halle  
12/2008 – 03/2009                      Chirurgie, King Edward Hospital, University of Kwazulu-Natal Durban,  
Südafrika  
03/2009 – 07/2009                      Innere Medizin, Inselspital Bern, Schweiz

## **Arbeitsstellen**

09/2010 – 01/2012                      Assistenzärztin an der Universitätsklinik und Poliklinik für Kinder- und  
Jugendmedizin, Halle/Saale  
Seit 02/2012                              Assistenzärztin an der Universitätsklinik und Poliklinik für Pädiatrische  
Kardiologie, Halle/Saale

## **Weitere Fähigkeiten**

### **Sprachkenntnisse**

Englisch:                                  fließend in Wort und Schrift  
Französisch:                              Schulkenntnisse in Wort und Schrift  
Spanisch:                                  Grundkenntnisse in Wort und Schrift (UNICERT-Stufe I)

### **EDV-Kenntnisse**

Kenntnisse im MS Office, Excel, Powerpoint, SPSS

---

Ort, Datum

---

Unterschrift

## **9.2 Selbständigkeitserklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe Dritter oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Daten und Inhalte, die direkt oder indirekt in die Arbeit übernommen wurden, sind als solche kenntlich gemacht.

Ich versichere, für die inhaltliche Erstellung der vorliegenden Arbeit weder die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- und Beratungsdiensten in Anspruch genommen zu haben noch geldwertige Leistungen an Dritte für Arbeiten getätigt zu haben, die in Zusammenhang mit dem Inhalt dieser Dissertation stehen. Die vorgelegte Arbeit wurde in gleicher oder ähnlicher Form bisher keiner im In- oder Ausland befindlichen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Es ist mir bekannt, dass ich erst berechtigt bin, den Dokortitel zu führen, wenn mir die Promotionsurkunde bzw. eine vorläufige Bescheinigung gemäß § 15 der Promotionsordnung ausgehändigt wurde.

---

Ort, Datum

---

Unterschrift

## **9.3 Erklärung über frühere Promotionsversuche**

Ich erkläre hiermit, dass die vorliegende Arbeit der erste Promotionsversuch ist, der von mir unternommen wird.

---

Ort, Datum

---

Unterschrift

## 9.4 Danksagung

Ich möchte mich bei allen Personen, die in irgendeiner Weise an dieser Arbeit beteiligt waren, sehr herzlich bedanken.

An erster Stelle gilt mein Dank OA PD Dr. med. habil. Axel Schlitt für die Betreuung dieser Dissertation und seine tatkräftige Hilfe bei allen Fragen, die bei der Entstehung dieser Arbeit aufkamen. Des Weiteren bin ich Dr. med. Uwe Raaz außerordentlich dankbar für sein Engagement und seine unkomplizierte Bereitwilligkeit, mir bei der Verschriftlichung der Dissertation jederzeit unterstützend zur Seite zu stehen und meiner Fragen nie überdrüssig zu werden.

Frau Manuela Schlitt danke ich sehr für die organisatorische Hilfe und das Versenden der Herzkatheter, PD Dr. med. Peetz und seinem Laborteam für die Durchführung der laborchemischen Untersuchungen und Frau Dr. med. Hauroeder für die elektronenmikroskopische Darstellung der Herzkatheter-Oberflächen.

Bei der Durchführung der Versuche erhielt ich im Labor von Frau Schulz und Herrn Schubert stets hilfreiche Ratschläge, guten Zuspruch und immer ein offenes Ohr. Dafür und für die sehr angenehme und freundliche Atmosphäre möchte ich mich herzlich bedanken.

Frau Dr. med. Iris Reindl danke ich sehr für ihre Anleitung beim Umgang mit dem *in vitro*-Modell und für ihre immer währende Bereitschaft, mir für Rückfragen zur Verfügung zu stehen. Durch ihre ausgesprochene Zuverlässigkeit ermöglichten mir meine Probanden eine gute Zeitplanung bei der Versuchsdurchführung und eine effektive Laborarbeit. Dafür bin ich ihnen sehr dankbar.

Zu guter Letzt danke ich meinen Eltern und meinen Freunden sehr herzlich für ihre uneingeschränkte Hilfsbereitschaft, die vielen aufmunternden Worte und ihre niemals endende Geduld.