

Diplomarbeit

**Die antikoagulatorische Wirksamkeit von Nadroparin,
Enoxaparin und unfraktioniertem Heparin:
Ein Vergleich zwischen Neugeborenen und Erwachsenen**

eingereicht von

Nikolaus Heini

Mat.Nr.:0211685

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der gesamten Heilkunde

(Dr. med. univ.)

an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt am

Institut für Physiologische Chemie

unter der Anleitung von

Ass.-Prof. Mag. Dr. rer.nat. Gerhard Cvirn

Ort, Datum

(Unterschrift)

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Ort, Datum

(Unterschrift)

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei meinem Betreuer Ass.-Prof. Mag. Dr. rer. nat. Gerhard Cvirn für seine Unterstützung und kompetente Betreuung bei der Erstellung dieser Diplomarbeit bedanken. Frau Sandra Gütl danke ich für die freundliche und hilfsbereite Betreuung im Labor.

Darüber hinaus gebührt ein großer Dank meiner Familie, welche mich während meiner gesamten Studienzeit immer und in allen Belangen vorbehaltlos und umfassend unterstützt hat.

Zum Schluss möchte ich mich auch noch bei all jenen bedanken, welche durch ihre anregenden Gespräche und Diskussionen oder in anderer Art und Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Zusammenfassung

Hintergrund: Zur Zeit existieren nur wenige pharmakodynamische Studien über die Wirkung niedermolekularer Heparine (LMWHs) in Neugeborenen.

Zielsetzung: Ziel dieser Studie war es, die antikoagulatorische Wirksamkeit der zwei LMWH Nadroparin und Enoxaparin in Bezug auf die endogene Bildung von FXa und FIIa in Nabelschnurblutplasma mit jener in Erwachsenenplasma zu vergleichen. Die antithrombotische Referenzsubstanz war unfraktioniertes Heparin.

Methodik: Mittels einer Subsampling-Technik und chromogener Substrate wurden die Effekte von Nadroparin, Enoxaparin und UH in Bezug auf die endogene Bildung von FXa oder FIIa untersucht. Mittels TEM wurde die antikoagulatorische Wirksamkeit dieser Medikamente auch im Vollblut untersucht.

Ergebnisse: Die wesentlichen Erkenntnisse dieser Studie sind:

- Nadroparin ist im Bezug auf die Hemmung der endogenen Bildung von Faktor IIa und Faktor Xa genauso wirksam wie Enoxaparin.
- Nabelschnurblutplasma und -vollblut reagieren sensibler auf Zugabe von niedermolekularen/unfraktionierten Heparinen als Plasma und Vollblut von Erwachsenen.
- bei gleicher anti-FXa Aktivität ist die antikoagulatorische Wirksamkeit von unfraktioniertem Heparin in Plasmaproben und Vollblutproben signifikant stärker als jene von Nadroparin und Enoxaparin. Das gilt sowohl für Neugeborene als auch Erwachsene.

Schlussfolgerung: Um Blutungen zu vermeiden, sollten die LMWH Enoxaparin und Nadroparin aufgrund ihrer hohen antikoagulatorischen Wirksamkeit bei Neugeborenen vorsichtig verabreicht werden.

Schlagwörter: endogene FXa- und FIIa-Bildung, niedermolekulare Heparine, Thrombelastometrie, unfraktionierte Heparine.

Abstract

Background: To date only few pharmacodynamic studies on low molecular weight heparins (LMWHs) in neonates exist not allowing to formally assess efficacy of LMWHs in neonates.

Objective: To evaluate the anticoagulant effects of the two LMWHs nadroparin and enoxaparin on endogenous formation of FXa or FIIa in cord vs. adult platelet poor plasma (PPP) and on thrombelastometry (TEM) profiles in cord vs. adult whole blood (WB). Unfractionated heparin (UH) was the reference antithrombotic drug.

Methods: The effects of nadroparin, enoxaparin, or UH on endogenous formation of FXa or FIIa was investigated in tissue factor (TF)-activated PPP using a subsampling technique and chromogenic substrates. The anticoagulant efficacy of these drugs was also investigated in WB triggered by the physiological relevant activator collagen/endogenous thrombin using TEM.

Results: The major findings are i) nadroparin is as efficient as enoxaparin concerning inhibition of the endogenous formation of FXa and FIIa, ii) cord PPP and WB are significantly more susceptible to the addition of LMWHs or UH than adult PPP or WB, and iii) compared by equivalent anti-FXa activity, the anticoagulant action of UH is markedly higher than that of the LMWHs in PPP and WB of neonatal or adult origin.

Conclusions: Administration of LMWHs in neonates has to be performed carefully to avoid bleeding side-effects due to their high anticoagulant efficacy in cord PPP and WB.

Keywords

endogenous FXa and FIIa formation, low molecular weight heparin, thrombelastometry, unfractionated heparin.

Inhalt

1	EINLEITUNG	11
2	DAS HÄMOSTASESYSTEM	13
2.1	Primäre Hämostase	13
2.2	Sekundäre Hämostase	13
2.3	Fibrinbildung	15
2.4	Örtliche Begrenzung der Gerinnung	16
2.5	Fibrinolyse	17
3	UNTERSCHIEDE ZWISCHEN NEUGEBORENEN UND ERWACHSENEN	18
3.1	Entwicklung der prokoagulatorischen Faktoren	18
3.2	Entwicklung der Inhibitoren der Gerinnung	20
4	HEPARINE	21
4.1	Wirkungsprinzip von Heparinen	22
4.2	Unfraktionierte Heparine	23
4.2.1	Wirkmechanismus	23
4.2.2	Indikationen	23
4.2.3	Dosierung und Applikation	23
4.3	Niedermolekulare Heparine	24
4.3.1	Wirkmechanismus	24
4.3.2	Indikationen	25
4.3.3	Dosierung und Applikation	25
4.4	Nebenwirkungen von unfraktionierten und niedermolekularen Heparinen	26
4.4.1	Blutungen	26
4.4.2	Heparininduzierte Thrombozytopenie (HIT)	27
4.4.3	Osteoporose	28
4.4.4	Veränderung der Leberwerte	28
4.4.5	Hautreaktionen	28
4.4.6	Arzneimittelinteraktionen	28
5	METHODIK	29
5.1	Thrombinpotential (TP)	29
5.2	Thrombelastometrie (TEM)	30
6	ERGEBNISSE	32

7	DISKUSSION	36
8	LITERATURVERZEICHNIS	39
	ANHANG – DIAGRAMME	42
	LEBENS LAUF	50

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Grundstruktur des unfraktionierten Heparins [23].	21
Abbildung 2: Allgemeine Wirkungsweise von Heparinen [24].	22
Abbildung 3: Ablauf der Bestimmung des Thrombinpotentials.	29
Abbildung 4: Thrombinpotentialkurve	30
Abbildung 5: Charakteristisches Bild einer TEM - Messung [15].	31

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Entwicklung der Gerinnungsfaktoren [22].	19
Tabelle 2: Entwicklung der Gerinnungsinhibitoren [22].	20
Tabelle 3: Dosisanpassung bei aPTT – Therapie mit UH [23].	24
Tabelle 4: Dosisanpassung bei antiFXa - Therapie mit LMWH [23].	26

Abkürzungen

α_2 -M	Alpha2-Makroglobulin
α -angle	Alpha Winkel
ADP	Adenosindiphosphat
anti-FXa	anti FaktorXa
APC	aktiviertes Protein C
aPTT	aktivierte partielle Thromboplastinzeit
CaCl ₂	Calciumchlorid
CFT	Clot Formation Time
CT	Coagulation Time
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EPC-1	Endothelzell Protein C-Rezeptor
GGT	Gamma- Glutamyltranspeptidase
HCII	Heparin Cofactor II
HIT I+II	Heparin induzierte Thrombozytopenie I+II
HMW-K	High Molecular Weight Kininogen
IgG	Immunglobulin G
IU	International Unit

LMWH	low molecular weight heparin
MCF	Maximum Clot Firmness
mL	Milliliter
PAR	Protease aktivierender Rezeptor
PF4	Plättchenfaktor 4
PK	Präkallikrein
pNA	Paranitroanilin
PPP	Platelet Poor Plasma
PT	Prothrombinzeit
TEM	Thrombelastometrie
TF	Tissue Factor
TFPI	Tissue Factor Pathway Inhibitor
TM	Thrombomodulin
t-PA	Tissue Plasminogen Activator
UH	unfraktioniertes Heparin
uPA	Urokinase Plasminogen Activator
vWF	von Willebrand Faktor
WB	Whole Blood

1 Einleitung

Zur Behandlung und für die Prävention von Thrombosen haben niedermolekulare Heparine (LMWH) nicht nur bei Erwachsenen, sondern auch bei Kindern Vorteile gegenüber unfraktionierten Heparinen (UH) [1,2]. Unter Kindern haben Neugeborene und Kleinkinder im ersten Lebensjahr das größte Risiko thrombembolische Komplikationen zu erleiden [3]. Daher ist die Antikoagulation unter LMWH bei Neugeborenen von besonderem Interesse. Bislang existieren nur fünf pharmakokinetische Studien in Bezug auf die Wirksamkeit von LMWH bei Neugeborenen [4-8]. Diesen fünf Studien mangelt es deutlich an Aussagekraft über die pharmakokinetischen Eigenschaften von LMWH bei Neugeborenen.

Absicht dieser Studie war es daher, die antikoagulatorische Wirksamkeit der beiden LMWH Nadroparin und Enoxaparin auf die endogene Bildung von FXa und FIIa (Thrombin) in Tissue Factor aktiviertem Nabelschnur- und Erwachsenenplasma zu beurteilen. Da eine Injektion mit Nadroparin deutlich weniger Schmerz verursacht als mit Enoxaparin, können speziell Neugeborene von einer Therapie mit Nadroparin profitieren [9]. Bei allen Versuchen war UH das Bezugsmedikament. Plasmaproben von Routinetests, wie der aktivierten partiellen Thromboplastinzeit (aPTT) oder der Prothrombinzeit (PT), sind stark verdünnt und eine relativ große Menge an Thromboplastin wird eingesetzt, um die Gerinnung einzuleiten. Aus diesen Gründen kann auf die in vivo Situation kein eindeutiger Rückschluss gezogen werden. In unseren Versuchen wurde daher die Gerinnung in Plasmaproben durch die Hinzugabe einer Reaktionslösung, welche kleine Mengen an TF und Calciumchlorid enthält, ausgelöst. Diese Art der Aktivierung erlaubt einen sensiblen Nachweis der antikoagulatorischen Wirkung von Medikamenten [10-12].

Während Plasma die Mehrheit an Gerinnungsfaktoren beinhaltet, sind in Vollblut Phospholipid präsentierende Zellen und Plättchen vorhanden. Diese Faktoren haben eine wichtige unterstützende Funktion in der Gerinnung. Hierfür untersuchten wir zusätzlich die Wirkung von Nadroparin und Enoxaparin mittels Thrombelastometrie (TEM). Wieder war in allen Versuchen UH das Bezugsmedikament. Durch die Hinzugabe einer Reaktionslösung bestehend aus Kollagen, TF und Calciumchlorid wurden die Vollblutproben aktiviert. Plättchen werden durch diese Methode nicht nur

durch Kollagen, sondern auch durch endogen gebildetes Thrombin aktiviert. Diese Situation ist ähnlich einer wie sie in vivo bei einer Gefäßverletzung auftritt. Hier haften sich Plättchen an der Stelle der Gefäßverletzung an extrazelluläre Kollagenfasern und TF-präsentierende Zellen initiieren die Bildung von Thrombin [13,14].

2 Das Hämostasesystem

Um Blutverluste so gering wie nur möglich zu halten, braucht der menschliche Körper ein gut funktionierendes Hämostasesystem. Dieses System beruht auf Wechselwirkungen zwischen Gefäßendothel, Thrombozyten, plasmatischer Gerinnung und der Fibrinolyse. Thrombozyten haften innerhalb kürzester Zeit an der verletzten Stelle des Gefäßes und aggregieren dort zu einem Thrombozytenpfropf. Die plasmatische Gerinnung führt zu einer Stabilisierung durch Fibrin. Einmal gebildetes Fibrin kann durch die Fibrinolyse wieder aufgelöst werden.

2.1 Primäre Hämostase

Unter physiologischen Bedingungen haften Thrombozyten nicht an Endothelzellen. Verantwortlich dafür sind Eigenschaften der Glykokalix ihrer Zellmembran. Wenn es nun zu einer Verletzung des Gefäßes kommt, werden subendotheliale Kollagenfasern freigelegt. An ihnen bleiben Thrombozyten mit Hilfe von vWF haften. Von Willebrand Faktor ist ein großes polymeres Molekül und nimmt in der Thrombozytenadhäsion eine Schlüsselrolle ein. Es findet sich sowohl als subendotheliale Matrixkomponente (in Weibel-Palade-Körperchen), als auch als zirkulierendes Plasmaprotein und in den α -Granula der Thrombozyten wieder. Plasmatischer vWF führt zur Vermittlung der frühen Adhäsion, indem es Thrombozyten aus der Blutströmung abbremst und ein Anhaften an Kollagenfasern ermöglicht. Die Bindung an den GP-Ib α -Rezeptor regt Plättchen an ADP auszuschütten. Dies bewirkt eine Formveränderung (Ausbildung von Pseudopodien) und ein Klebrigwerden der Thrombozyten- die Grundlage der Thrombozytenadhäsion [15,16].

2.2 Sekundäre Hämostase

Um die plasmatische Gerinnung so verständlich und exakt wie möglich darzustellen, scheint das Zell-basierte Modell nach Maureane Hoffmann et al., „A Cell-based Model of Hemostasis“ [17], am besten geeignet zu sein.

Ältere Modelle, wie das Wasserfallmodell [18] und das Kaskadenmodell [19] betrachten den Gerinnungsprozess als eine Art „der Reihe nach ablaufenden proteolytischen Reaktionen“. Für das Verständnis der in vivo Prozesse sind sie nicht besonders hilfreich, jedoch spielen sie eine wichtige Rolle im Verständnis der beiden Laborscreeningstest, der aPPT und der PT.

Das Zell-basierte Modell fokussiert sich auf die Rolle von Zelloberflächen in der Regulierung der Hämostase. Hier ereignen sich alle Schritte in drei sich überlappenden Phasen:

1. der Initiation
2. der Amplifikation
3. der Propagation

Initiation

Der physiologische Hauptinitiator der Hämostase ist TF (tissue factor). Erkannt hat man dies schon vor circa 100 Jahren. Seinen schwer zu verstehenden Eigenschaften kam man aber erst in den letzten 20 Jahren näher. Tissue factor ist ein transmembranes Glykoprotein und bildet in der Hämostase einen Enzymkomplex mit Faktor VII bzw. VIIa aus. Unabhängig von seiner Funktion im Laufe der Gerinnung spielt TF auch bei Entzündungsprozessen (Exprimierung auf Monozyten innerhalb der Blutbahn und auf Endothelzellen), Tumormetastasierung und in der Neubildung von Gefäßen (Angiogenese) eine wichtige Rolle [17,20]. Unter physiologischen Bedingungen wird TF von einer Vielzahl an extravaskulären Zellen präsentiert.

Wenn nun eine Läsion an der Gefäßwand entsteht, kommt Plasma in Kontakt mit extravasalen Zellen (z.B. Fibroblasten), welche TF an der Oberfläche exprimieren. Faktor VII, der sich im Plasma befindet, bindet nun an den zellulären TF. Es entsteht ein FVIIa/TF-Komplex. Dieser aktiviert sowohl Faktor X als auch Faktor IX. Aktivierter Faktor X (FXa) kann den Plasmfaktor V aktivieren. Verlässt nun der durch den FVIIa/TF-Komplex aktivierte FXa das geschützte Milieu der Zelloberfläche, wird seine Wirkung rasch durch TFPI (tissue factor pathway inhibitor) oder durch AT (Antithrombin) blockiert. Der an der Zelloberfläche verbleibende Anteil an FXa kann jetzt mit FVa einen Enzymkomplex ausbilden und dadurch kleine Mengen an Thrombin bilden. Dies spielt eine wichtige Rolle in der anschließenden Amplifikationsphase [17].

Amplifikation

Eine Läsion an der Gefäßwand ermöglicht sowohl Thrombozyten als auch Plasma mit extravaskulärem Gewebe (subendothelialen Kollagenfasern) in Kontakt zu treten. Von Willebrand Faktor (vWF) bildet zusammen mit Fibronectin und Laminin eine molekulare Brücke zwischen Kollagenfasern und dem GPIb/IX- Rezeptorkomplex der Thrombozyten aus. Daraus resultiert eine partielle Aktivierung (Pseudopodienausbildung) der Thrombozyten [16]. Eine vollständige Aktivierung der Thrombozyten erfolgt durch das zuvor in der Initiationsphase bereit gestellte Thrombin. Dieses aktiviert nun auch die Faktoren V, VIII und XI.

Über seinen Protease aktivierenden Rezeptor (PAR) ist Thrombin ein starker Plättchenaktivator. Während der Aktivierung geben Thrombozyten FV aus ihren α -Granula an die Oberfläche frei. Faktor V wird dann durch Thrombin oder durch Faktor Xa aktiviert.

Thrombin kann sich aber auch an nicht- PAR Rezeptoren binden und andere Gerinnungsfaktoren an der Thrombozytenoberfläche aktivieren.

Der vWF/FVIII- Komplex bindet sich an die Plättchenoberfläche, auf welcher er von Thrombin gespalten wird. FVIII ist nun aktiv und bleibt genauso wie FV an die Oberfläche gebunden. Jetzt kann die Bildung von prokoagulatorischen Komplexen und großen Mengen an Thrombin beginnen [17].

Propagation

Thrombozytenoberflächen haben nun Bindungsstellen mit hoher Affinität zu den Faktoren IX(a), X(a), XI(a). FVIIIa und FIXa bilden den so genannten „Tenasekomplex“. Dieser aktiviert FX zu FXa. Zusätzlich kann sich ein durch Thrombin aktivierter Faktor XI (FXIa) an die Plättchenoberfläche binden und FIX aktivieren. Faktor Va und Faktor Xa bilden die so genannte „Prothrombinase“, welche Prothrombin in Thrombin überführt (FII→ FIIa). Nun kann eine für ein Blutgerinnsel notwendige Menge an Thrombin produziert werden [17].

2.3 Fibrinbildung

Durch kovalente Bindungen zwischen Fibrinmonomeren wird das Blutgerinnsel stabilisiert. Thrombin bewirkt eine Abspaltung der Fibrinopeptide A und B von Fibrinogen. Es entstehen Fibrinmonomere, welche sich über nicht- kovalente

Bindungen (z.B.: Wasserstoffbrücken) zu einem Fibrinpolymer zusammen lagern. Zu dieser Zeit ist der Thrombus noch sehr instabil. Erst durch die Einwirkung des Faktors XIII (fibrinstabilisierender Faktor) wird ihm die notwendige Stabilität gegeben. Faktor XIIIa bewirkt eine Quervernetzung (crosslinking) der Fibrinmonomere. Diese werden über kovalente Bindungen aneinander gekoppelt. Außerdem bindet er zusätzlich für die Regulation der Fibrinolyse den Inhibitor α_2 -Antiplasmin und andere Moleküle in das Fibrinnetz ein. Faktor XIII wird durch Thrombin aktiviert (FXIIIa) [15, 16].

2.4 Örtliche Begrenzung der Gerinnung

Während TF-präsentierende Zellen und Plättchen eine prokoagulatorische Funktion besitzen, haben Endothelzellen Funktionen, die der Gerinnung entgegen wirken. Sie haben vor allem die Fähigkeit, die Gerinnung örtlich einzuschränken. Um nicht in die systemische Zirkulation zu geraten, muss Thrombin, das dem Ort der Verletzung entkommt, deaktiviert werden. Dies passiert entweder im Plasma durch AT (Antithrombin) oder durch eine Bindung an TM (Thrombomodulin), welches sich auf intakten Endothelzellen befindet. Letzteres wird vor allem im hohen Maße von Endothelzellen der Mikrozirkulation exprimiert. Dort bindet es Thrombin, welches im Anschluss nicht nur seine prokoagulatorische Wirksamkeit verliert, sondern durch Aktivierung von Protein C antikoagulatorisch wirkt. Aktiviertes Protein C (APC) bildet einen Komplex mit Protein S. Der APC/Protein S-Komplex spaltet und inaktiviert Faktor Va und Faktor VIIIa.

Endothelzellen besitzen an ihrer Oberfläche noch andere wichtige antithrombotische Eigenschaften bzw. Mechanismen. Sie steigern die Inaktivierung von Gerinnungsfaktoren durch Antithrombin (AT), Tissue Factor Pathway Inhibitor (TFPI) und ADPase [17].

AT bindet und inaktiviert vor allem Thrombin (FIIa) und Faktor Xa [16,24]. Proteoglykane an der Oberfläche von Endothelzellen präsentieren Heparinsulfate. Diese binden Antithrombin und verstärken dadurch seine gerinnungshemmende Wirkung [17]. Diesen Mechanismus macht man sich auch in der Medizin zu Nutze. Durch den Einsatz von Heparin als Medikament (unfraktionierte und niedermolekulare Heparine) kann man die Wirkung von Antithrombin bis auf das 1.000fache erhöhen [25].

TFPI bindet den TF/Faktor VIIa- Komplex und Faktor Xa und inaktiviert sie [15].

Die ADPase metabolisiert ADP, welches von aktivierten, sich in der Nähe von gesunden Endothelzellen befindlichen Plättchen frei gelassen wird. Dieser Prozess verhindert eine Thrombozytenaggregation [17].

Demzufolge sind Endothelzellen unter normalen, physiologisch ablaufenden Bedingungen darauf spezialisiert antithrombotisch aktiv zu sein. Unter gewissen Umständen kann es aber auch zu einer Umrüstung ihrer Rezeptoren kommen. Verletzungs- oder Entzündungszytokine können Endothelzellen dazu veranlassen, ihre Expression von Thrombomodulin zu verringern, um gleichzeitig die Expression von Tissue Factor und Adhäsionsmolekülen zu steigern. Dieser (adaptive) Mechanismus erleichtert vermutlich eine Gerinnung am Ort der Verletzung. Er kann aber auch, wie z.B. bei Arteriosklerose, Thrombophlebitis und Vaskulitis zu thrombotischen Komplikationen führen [17].

2.5 Fibrinolyse

Dem Prozess der Blutgerinnung steht ein System gegenüber, welches in der Lage ist einmal gebildetes Fibrin wieder aufzulösen: die Fibrinolyse.

Es handelt sich um ein Enzymsystem, welches die Blutgerinnungsbildung und Abheilung einer Gefäßläsion auf den Ort der Verletzung begrenzt. Das Hauptenzym der Fibrinolyse ist Plasmin. Es entsteht aus Plasminogen und hat die Fähigkeit Fibrin zu spalten und dadurch zu lysieren. So genannte Plasminogenaktivatoren aktivieren Plasminogen zu Plasmin. Die zwei wichtigsten Aktivatoren sind t-Pa (tissue plasminogen activator) und uPa (Urokinase). T-Pa wird aus Endothelzellen freigesetzt und hilft bei der lokalen Beseitigung von Fibrin. Die Urokinase wird von den Epithelien der ableitenden Harnwege gebildet und sezerniert. Plasminogen, aber auch Plasminogenaktivatoren haben eine sehr hohe Affinität zu polymerisiertem Fibrin.

Andere Auslöser der Fibrinolyse bzw. Aktivatoren von Plasmin können Faktor XIIIa und Thrombin sein [15,16].

3 Unterschiede zwischen Neugeborenen und Erwachsenen

Das Gerinnungssystem in der postnatalen Periode des Lebens ist ein einzigartiges, sich schnell entwickelndes System. Es unterscheidet sich bedeutsam von dem Erwachsener. Routinemethoden zeigen, dass die Balance zwischen prokoagulatorischen Faktoren und Inhibitoren in Richtung einer verminderten Fähigkeit zur Thrombinbildung weist [21].

Eine Studie von Maureen Andrew et al. [22] untersuchte die postnatale Entwicklung des menschlichen Gerinnungssystems anhand gesunder Säuglinge.

Absicht dieser Studie war, Normalwerte für die Mehrzahl an Gerinnungsfaktoren und Gerinnungsinhibitoren während der ersten sechs Lebensmonate Neugeborener zu fünf verschiedenen Zeitpunkten (1. Tag, 5. Tag, 30. Tag, 90. Tag, 180. Tag) zu bestimmen. Man entdeckte, dass Gerinnungstests in Zusammenhang mit dem Alter eines Säuglings abweichen können, dass die verschiedenen Gerinnungsfaktoren verschiedene Muster in ihrer Entwicklung besitzen und dass nach sechs Monaten Werte nahe denen Erwachsener erreicht werden.

3.1 Entwicklung der prokoagulatorischen Faktoren

Generell kann man sagen, dass Kontakt- bzw. Vitamin K abhängige Faktoren gegenüber Erwachsenen eine deutliche Verminderung im Plasma zeigen, während Werte der Faktoren V, VIII, XIII und Fibrinogen nahezu denen Erwachsener entsprechen [21].

Jeder einzelne der Vitamin K abhängigen Faktoren (II, VII, IX, X) durchläuft ein unterschiedliches Muster in seiner postnatalen Entwicklung. Werte von Faktor VII erreichten schon nach dem 5. postnatalen Tag nahezu Werte Erwachsener. Die Faktoren II, IX und X zeigten hingegen einen relativ verzögerten Anstieg. Trotz alledem waren nach sechs Monaten alle Vitamin K abhängigen Faktoren schließlich im Erwachsenenbereich [22].

Die Werte der Kontaktgerinnungsfaktoren (XII, XI, PK, HMW-K) waren am Tag der Geburt ebenfalls erniedrigt. HMW-K (high- molecular- weight kininogen) stieg nach einem Monat rapide auf Werte im Erwachsenenbereich an, während die Faktoren XI, XII und PK (Präkallikrein) stufenweise einen Anstieg innerhalb der ersten 6 Monate zeigten [22].

Der Durchschnittswert für Faktor V war zur Geburt im Erwachsenenbereich. Faktor VIII und vWF zeigten hier einen anderen Verlauf.

Der Mittelwert von Faktor VIII war zur Geburt derselbe wie bei Erwachsenen. Die Werte von vWF waren verglichen mit denen von Adulten hingegen erhöht. Sowohl Faktor VIII, als auch vWF nahmen schrittweise in den ersten sechs Monaten ab. Faktor XIII (XIIIa, XIIIb) erreichte schon nach fünf Tagen Werte Erwachsener. Plasminogen entsprach zur Geburt etwa zwei Drittel der Werte von Erwachsenen und erreichte diese schließlich annähernd nach sechs Monaten [22].

Tabelle 1: Entwicklung der Gerinnungsfaktoren [22].

Referenzwerte der Gerinnungsfaktoren von Säuglingen während der ersten 6 Lebensmonate

Test	Tag 1	Tag 5	Tag 30	Tag 90	Tag 180	Erwachsener
Fibrinogen (g/L)	2,83	3,12	2,70	2,43	2,51	2,78
FII (U/mL)	0,48	0,63	0,68	0,75	0,88	1,08
FV (U/mL)	0,72	0,95	0,98	0,90	0,91	1,06
FVII (U/mL)	0,66	0,89	0,90	0,91	0,87	1,05
FVIII (U/mL)	1,00	0,88	0,91	0,79	0,73	0,99
vWF (U/mL)	1,53	1,40	1,28	1,18	1,07	0,92
FIX (U/mL)	0,53	0,53	0,51	0,67	0,86	1,09
FX (U/mL)	0,40	0,49	0,59	0,71	0,78	1,06
FXI (U/mL)	0,38	0,55	0,53	0,69	0,86	0,97
FXII (U/mL)	0,53	0,47	0,49	0,67	0,77	1,08
PK (U/mL)	0,37	0,48	0,57	0,73	0,86	1,12
HMW-K (U/mL)	0,54	0,74	0,77	0,82	0,82	0,92
FXIIIa (U/mL)	0,79	0,94	0,93	1,04	1,04	1,05
FXIIIb (U/mL)	0,76	1,06	1,11	1,16	1,10	0,97
Plasminogen (CTA, U/mL)	1,95	2,17	1,98	2,48	3,02	3,36

3.2 Entwicklung der Inhibitoren der Gerinnung

AT, HCII, Protein C und Protein S hatten zur Zeit der Geburt niedrige Werte. Der Durchschnittswert für AT war nach 90 Tagen ähnlich dem von Erwachsenen. Hingegen war der Mittelwert für HCII höher.

Werte von α_2 -Makroglobulin waren im Vergleich zu Erwachsenen zur Zeit der Geburt höher und zeigten sogar im Laufe der postnatalen Periode einen kontinuierlichen Anstieg. Als Kontrast dazu waren die Werte von α_2 -Antiplasmin bei der Geburt im niedrigeren Bereich, erreichten aber nach fünf Tagen Erwachsenenwerte und blieben dann konstant.

Werte von α_1 -Antitrypsin entsprachen zur Geburt denen von Erwachsenen. Innerhalb der ersten drei Monate fielen sie ab und fingen dann wieder an zu steigen [22].

Tabelle 2: Entwicklung der Gerinnungsinhibitoren [22].

Referenzwerte der Gerinnungsinhibitoren von Säuglingen während der ersten 6 Lebensmonate

Inhibitoren	Tag 1	Tag 5	Tag 30	Tag 90	Tag 180	Erwachsener
AT	0,63	0,67	0,78	0,97	1,04	1,05
α_2 -M	1,39	1,48	1,50	1,76	1,91	0,86
α_2 -AP	0,85	1,00	1,00	1,08	1,11	1,02
α_1 -AT	0,93	0,89	0,62	0,72	0,77	0,93
HCII	0,43	0,48	0,47	0,72	1,20	0,96
Protein C	0,35	0,42	0,43	0,54	0,59	0,96
Protein S	0,36	0,50	0,63	0,86	0,87	0,92

4 Heparine

Die ursprüngliche Bezeichnung stammt dem griechischen Wort „hepar“ (Leber) ab und wurde erstmals von Mc Lean aus der Leber von Hunden gewonnen. Nach verschiedenen Tierversuchen wurde es erstmals 1928 beim Menschen als Antikoagulanz angewendet [8]. Aufgeklärt wurde der genaue Mechanismus aber erst Ende der 1970er Jahre. Heutzutage wird Heparin aus Leber, Lunge und Darm von Schweinen oder Rindern gewonnen [23-25].

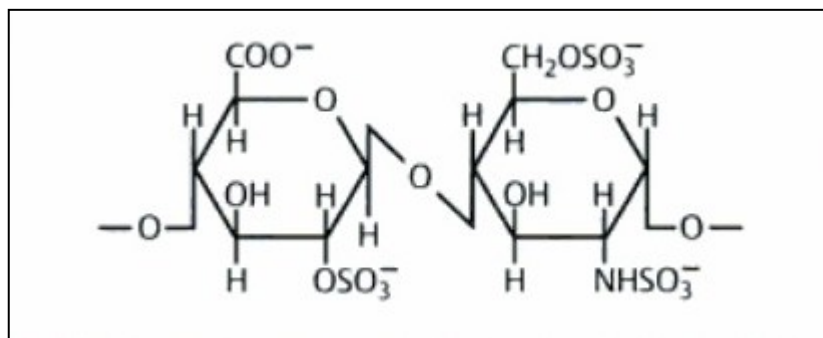


Abbildung 1: Grundstruktur des unfraktionierten Heparins [23].

Heparin ist ein Glykosaminoglykan und besteht aus heterogenen und unterschiedlich langen Molekülketten. Grundbaustein ist ein Disaccharid, das aus mehrfacher Wiederholung und Vernetzung unterschiedlich großer Moleküle (Heparinmoleküle) gebildet wird. Aufgrund der Größe unterscheidet man zwischen unfraktionierten und fraktionierten (niedermolekulare) Heparinen. Unfraktionierte (körpereigene) Heparine haben ein durchschnittliches Molgewicht von ungefähr 12.000 Dalton (6.000- 30.000 Dalton). Niedermolekulare Heparine hingegen wiegen nur zwischen 4.000 und 8.000 Dalton. Die Bildung natürlicher, im menschlichen Körper vorkommender Heparine findet in Mastzellen statt. Gespeichert werden sie zusätzlich in basophilen Granulozyten. Die höchste Dichte an heparinenthaltenden Zellen ist in Leber, Lunge und Bauchfell anzutreffen [23-26].

4.1 Wirkungsprinzip von Heparinen

Der gerinnungshemmende Effekt von Heparin beruht auf einer Verstärkung der Antithrombinwirkung. Die Bindung an Antithrombin und die damit einhergehende Komplexbildung verursacht eine Konformationsänderung des Antithrombinmoleküls. Nun wird aus dem normalerweise eher langsam wirkenden natürlichen Gerinnungshemmer ein 700 bis 1.000fach schneller wirkender Inhibitor, welcher insbesondere die Faktoren IIa (Thrombin) und Xa hemmt [23-26].

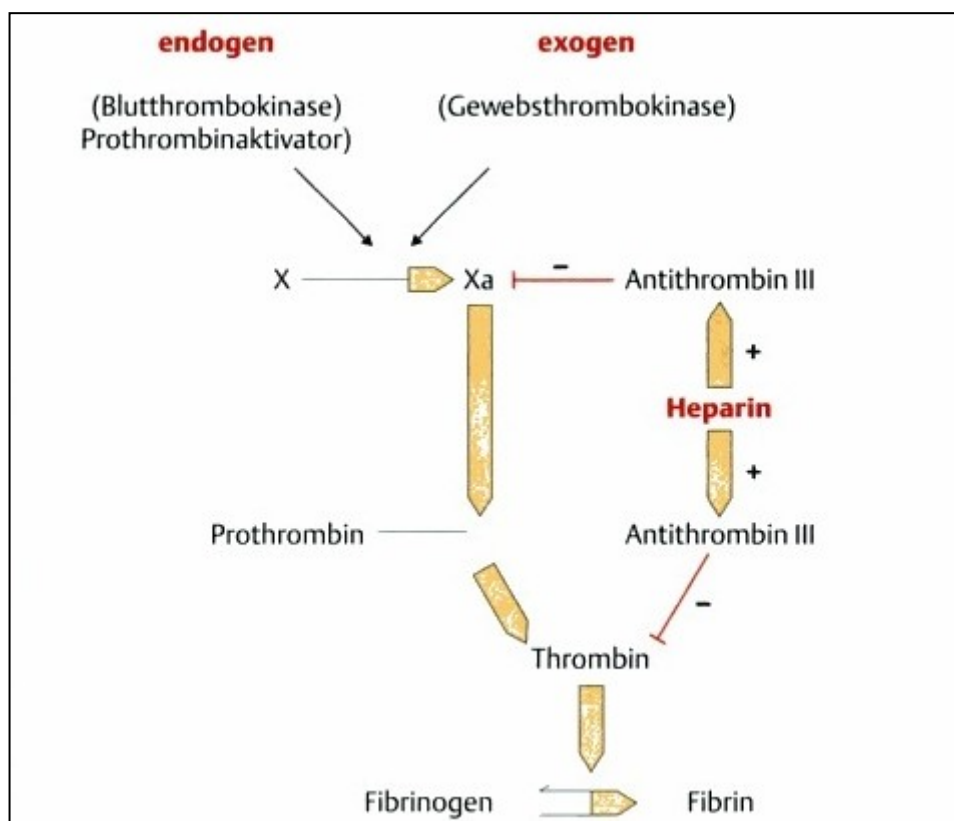


Abbildung 2: allgemeine Wirkungsweise von Heparinen [24].

Effekte von Heparin, die Antithrombin unabhängig sind, finden am Gefäßendothel statt. Dort wird die sogenannte Lipoproteinlipase aktiviert, welche enzymatisch Blutfette spaltet und somit Fettsäuren ins Plasma abgegeben werden. Darüber hinaus bewirkt es eine Aggregation der Thrombozyten [26].

4.2 Unfraktionierte Heparine

4.2.1 Wirkmechanismus

Unfraktioniertes Heparin (UH) verändert aufgrund der stark wirkenden negativen Ladung bestimmte Komplexe von Proteinen. Hauptsächlich trifft diese Veränderung auf das Antithrombin zu, was eine Verstärkung der katalytischen Wirkung zur Folge hat. Durch die Komplexbildung mit Heparin wird Antithrombin circa 700 bis 1000 fach aktiviert, was eine anschließende Hemmung der Gerinnungsfaktoren XIIa, XIa, Xa, VIIa und IIa zur Folge hat. Im Vordergrund der antikoagulatorischen Wirksamkeit steht aber vor allem die Hemmung der Faktoren IIa (Thrombin) und Xa. Die hemmende Wirkung auf das Gerinnungssystem ist abhängig von sich im Plasma befindenden Konzentrationen an Antithrombin. Eine zusätzliche antikoagulatorische Aktivität konnte über eine Freisetzung von TFPI aus Gefäßendothelzellen (tissue factor pathway inhibitor) beobachtet werden [23,25].

4.2.2 Indikationen

Durch die vorhandene Möglichkeit der vollständigen Neutralisation durch Protamin und durch einfaches Monitoring des Patienten ist UH das Mittel der Wahl bei extrakorporalen Zirkulationsverfahren wie der Hämodialyse, der Herz-Lungen-Maschine, oder interventionell kardiologischen Eingriffen [23,25].

4.2.3 Dosierung und Applikation

Unfraktionierte Heparine werden enteral nicht aufgenommen und erreichen deshalb keine systemisch wirksamen Konzentrationsbereiche. Aus diesem Grund ist eine parenterale Anwendung notwendig. Die Substanz kann intravenös oder subkutan verabreicht werden. Die intramuskuläre Applikation ist aufgrund erhöhter hämorrhagischer Risiken kontraindiziert. Die intravenöse Gabe von unfraktioniertem Heparin wird kontrolliert mit Hilfe eines Perfusors durchgeführt. Diese Art der kontinuierlichen Applikation ist vor allem bei intensivmedizinischen Patienten von Vorteil. Der Effekt nach intravenöser Verabreichung setzt umgehend ein, nach subkutaner Gabe im Mittel innerhalb der ersten 20 bis 30 Minuten.

Im Zuge einer hochdosierten Heparintherapie (Vollheparinisierung) ist eine Kontrolle der Behandlung in der Regel mit Hilfe der aPTT (aktivierte partielle Thromboplastinzeit) notwendig. Hierbei sollte eine Verlängerung um das 1,5 bis 2,5fache der Norm angestrebt werden [23,25].

Tabelle 3: Dosinsanpassung bei aPTT – Therapie mit UH [23].

gemessene APTT	Änderung der aktuellen Dosierung	erneute Kontrolle (APTT)
keine Verlängerung	Steigerung um 200 IE/h	nach 4h
1,2 bis 1,5fache Verlängerung	Steigerung um 100 bis 200 IE/h	nach 4h
1,5 bis 2,5fache Verlängerung	keine Veränderung	am nächsten Tag, später wöchentlich
2,5 bis 3,0fache Verlängerung	Reduktion um 100 bis 200 IE/h	nach 4h
> 3,0fache Verlängerung	4h Pause, dann Reduktion um 200 bis 400 IE/h	nach 4h

4.3 Niedermolekulare Heparine

Durch eine Verbesserung bzw. Weiterentwicklung der unfraktionierten Heparine kamen die niedermolekularen Heparine (low molecular weight heparine, LMWH) auf den Markt. Zuckerketten werden durch Spaltung der unfraktionierten Heparine verkürzt. Dieser Vorgang wird enzymatisch mittels Heparinase oder chemisch durch Isoamylnitrit katalysiert, bis ein mittleres Gewicht des Moleküls von 4000 bis 8000 Dalton erreicht wird [23-25].

4.3.1 Wirkmechanismus

Der gerinnungshemmende Effekt von niedermolekularen Heparinen stützt sich auf einer stärkeren Inhibierung des Faktors Xa als es auf Thrombin (Faktor IIa) zutrifft. Verantwortlich dafür sind die kürzer nötigen Molekülketten um Faktor Xa zu inhibieren. Die Hemmung von Thrombin durch die verstärkte Antithrombinaktivität ergibt sich durch eine Brückenbildung zwischen Antithrombin und Thrombin, welche durch den Restanteil an längerkettigen Molekülen, sprich den Restfragmenten an hochmolekularem Heparin, bestimmt wird.

Gerade wegen dieser Beschaffenheit setzt man einen prophylaktischen Effekt im Bezug auf thrombotische Ereignisse- mit einer zur selben Zeit Verminderung der Gefahr einer Blutung voraus. Ebenso wie unfraktionierte Heparine haben

niedermolekulare Heparine wichtige Effekte im Bereich der Gefäßwand (Freisetzung von tissue factor pathway inhibitor). Weiters wird das Enzym Lipoproteinlipase nicht in demselben Ausmaß aktiviert, wie es unfraktionierte Heparine verursachen. Im Bezug auf den Einfluss auf die Plättchenaggregation und die damit verbundene Gefahr einer heparininduzierten Thrombozytopenie verhalten sie sich hierbei um circa ein Drittel günstiger als ihre Vorgänger [23,24].

4.3.2 Indikationen

Zugelassene Indikationen von niedermolekulare Heparinen sind die Vorbeugung von Thrombosen im peri- und postoperativen Patientenmanagement, Prophylaxe bei nicht chirurgischen Patienten, bei welchen Gefahr besteht ein thrombembolisches Ereignis zu erfahren und bei der Therapie der tiefen Beinvenenthrombose. Eine Indikation in Zusammenhang eines extrakorporalen Kreislaufs oder der Hämodialyse wird diskutiert, da niedermolekulare Heparine nicht vollständig durch Protamin zu neutralisieren sind [24,25].

4.3.3 Dosierung und Applikation

Niedermolekulare Heparine können subkutan oder intravenös verabreicht werden. Gegenüber unfraktionierten Heparinen besitzen sie eine signifikant längere Halbwertszeit. Daher ist zur Thrombosevorbeugung nur eine Applikation am Tag notwendig. Wegen der Unterschiede, bezogen auf die chemische Zusammensetzung und der damit auch verbundenen unterschiedlichen Wirkung und Kinetik der einzelnen Medikamente, kann hier kein einheitliches Schema für Dosierungen angegeben werden. Außerdem braucht der Effekt von niedermolekularem Heparin nicht wie bei Unfraktioniertem über die aPTT oder Thrombinzeit monitorisiert werden, da sich, durch die große Bioverfügbarkeit von 80% bis 90% und durch limitierende Aufhebung durch Plasmaproteine, signifikant weniger Fluktuationen im Plasmaspiegel vorfinden als bei unfraktionierten Heparinen. Bei subkutaner Gabe ist deshalb ein Monitoring nicht unbedingt erforderlich. Falls doch, dann ist mit der anti-FXa-Einheiten Bestimmung ein hierfür geeignetes Monitoring vorhanden [23-25].

Tabelle 4: Dosisanpassung bei antiFXa - Therapie mit LMWH [23].

gemessener aFXa – Spiegel (aFXa – IE/mL)	Änderung der aktuellen Dosierung	erneute Kontrolle (aFXa – Spiegel)
< 0,35	Steigerung um 25%	nach 4h
0,35 bis 0,49	Steigerung um 10%	nach 4h
0,5 bis 1,0	keine Veränderung	am nächsten Tag, später wöchentlich
1,1 bis 1,5	Reduktion um 20%	vor der nächsten Gabe
1,6 bis 2,0	Reduktion um 30%	vor der nächsten Gabe
> 2,0	abwarten bis der Spiegel unter 0,5 liegt, dann Reduktion um 50%	täglich

4.4 Nebenwirkungen von unfraktionierten und niedermolekularen Heparinen

Die am schwerwiegendsten Nebenwirkungen von allen Heparinen sind die Blutung und die heparininduzierte Thrombozytopenie [25].

4.4.1 Blutungen

Blutungen sind die am meisten auftretenden Nebenwirkungen (größere Blutungszwischenfälle zwischen 1% und 5%; tödlich ausgehende unter 1%). Bei Patienten mit Nierenerkrankungen kann das Arzneimittel, vor allem niedermolekulare Heparine, kumulieren und so einen ungewollt hohen Plasmaspiegel erreichen. Vor allem unter therapeutischem Einsatz treten Blutungen häufiger auf als bei vorbeugender Applikation. Blutungen können aber auch ein Zeichen für eine zu hohe Dosierung sein.

Blutungskomplikationen sind bei der Behandlung mit unfraktionierten Heparinen leichter zu behandeln, da man mit Protamin ein Medikament hat, das die gerinnungshemmende Wirkung vollständig neutralisieren kann, im Gegensatz zu niedermolekularen Heparinen, bei welchen dies nur partiell möglich ist [23-25].

4.4.2 Heparininduzierte Thrombozytopenie (HIT)

Sie kommt bei niedermolekularen Heparinen deutlich weniger gehäuft vor als bei unfraktionierten und man kann sie in zwei Typen unterteilen:

- HIT I
- HIT II

Die leichte Form der heparininduzierten Thrombozytopenie (HIT I) ist gekennzeichnet durch einen Abfall der Thrombozyten in den unteren Normbereich. Ursache dafür ist eine direkte, reversible, zu einer anschließenden Aggregation führenden Reaktion von Heparin mit den Thrombozyten. Selten werden dabei Werte unterhalb von 100.000 / μ l festgestellt. Dieses Phänomen tritt meist unmittelbar bei Therapiebeginn oder innerhalb der ersten drei Behandlungstage ein. Sie limitiert sich von selbst und Thrombozytenwerte erreichen ihre Normwerte auch unter Weitergabe von Heparin. Der geringe Abfall der Thrombozyten zieht keine Komplikationen mit sich und ist daher von keiner klinischen Relevanz [23,25,27].

Im Fall der HIT II besteht eine Thrombozytopenie, die auf einer immunologischen Reaktion des Körpers beruht. Es kommt dabei zu einer Komplexbildung von Heparin mit dem frei zirkulierenden Plättchenfaktor 4 (PF4). Dieser Komplex wird von spezifischen IgG- Antikörpern erkannt und gebunden. In weiterer Folge werden die Thrombozyten über das Fc- Fragment aktiviert und es kommt zu einer Aggregation [25,28].

Eine HIT II tritt bei 0,5% bis 3% der Patienten unter einer Heparintherapie auf und ist charakterisiert durch einen abrupten Thrombozytenabfall auf teilweise unter 50.000/ μ l. Meist wird sie zwischen dem 5. und 14. Therapietag beobachtet.

Sie ist weder gebunden an Geschlecht, Blutgruppe, Alter, noch der Art des verwendeten Heparins und seiner angewandten Dosierung und Applikationsart. Allerdings besteht auch hier ein gehäuftes Auftreten bei unfraktionierten Heparinen [25,27,28].

4.4.3 Osteoporose

Die Gefahr eine Osteoporose zu entwickeln, hängt von der Dauer der Therapie mit Heparinen ab. Es ist dabei ungeklärt, wie lange oder wie hoch dosiert es eine Ursache haben kann [23,25].

4.4.4 Veränderung der Leberwerte

Nach Verabreichung von Heparin kann es zu einem Anstieg der Lebertransaminasen und der GGT (gamma-Glutamyltranspeptidase) kommen. Diese Veränderungen bilden sich allerdings bei Fortsetzung oder nach Beendigung der Therapie wieder zurück. Niedermolekulare Heparine verursachen eine geringere Erhöhung der eben genannten Werte [25].

4.4.5 Hautreaktionen

Neben Überempfindlichkeitsreaktionen an der Einstichstelle der Haut, können zusätzlich noch andere Arten von Reaktionen der Kutis auftreten. Unter Umständen kann eine so genannte toxische epidermale Nekrolyse verursacht werden. Diese kann sowohl an der Applikationsstelle, als auch an jeder beliebig anderen Region des Körpers beobachtet werden [23,25].

4.4.6 Arzneimittelinteraktionen

Eine zusätzliche Gabe von bestimmten Medikamenten darf nur unter strikter Indikationsstellung durchgeführt werden. Vor allem bei der Gabe von Thrombozytenaggregationshemmern muss vorsichtig vorgegangen werden, da hier die Gefahr eines erhöhten Blutungsrisikos besteht [25].

5 Methodik

5.1 Thrombinpotential (TP)

Die Methode zur Bestimmung des Thrombinpotentials wurde in den 1980er Jahren von C. Hemker und S. Beguin entwickelt. Sie bestimmt die Gesamtmenge an Thrombin von seiner Aktivierung bis hin zu seiner Inaktivierung. Das TP spiegelt die Fähigkeit des Plasmas wider, Thrombin zu bilden. Mittels TP-Messungen lassen sich pro- und antikoagulatorische Effekte von Wirksubstanzen abschätzen.

Durch die Hinzugabe eines Aktivators (Tissue factor und CaCl_2) wird die Plasmprobe aktiviert. Nach einer bestimmten „lag-phase“ wird Thrombin gebildet. Der zeitliche Verlauf der Thrombinaktivierung wird mittels Subsampling-Methode unter Zuhilfenahme eines chromogenen Substrates verfolgt. Von der gemessenen Kurve wird der biologisch inaktive Teil (= Thrombin-alpha-2-Makroglobulin-Komplex) subtrahiert. Durch Integration der verbleibenden Kurve „freies Thrombin“ erhält man das TP [15].

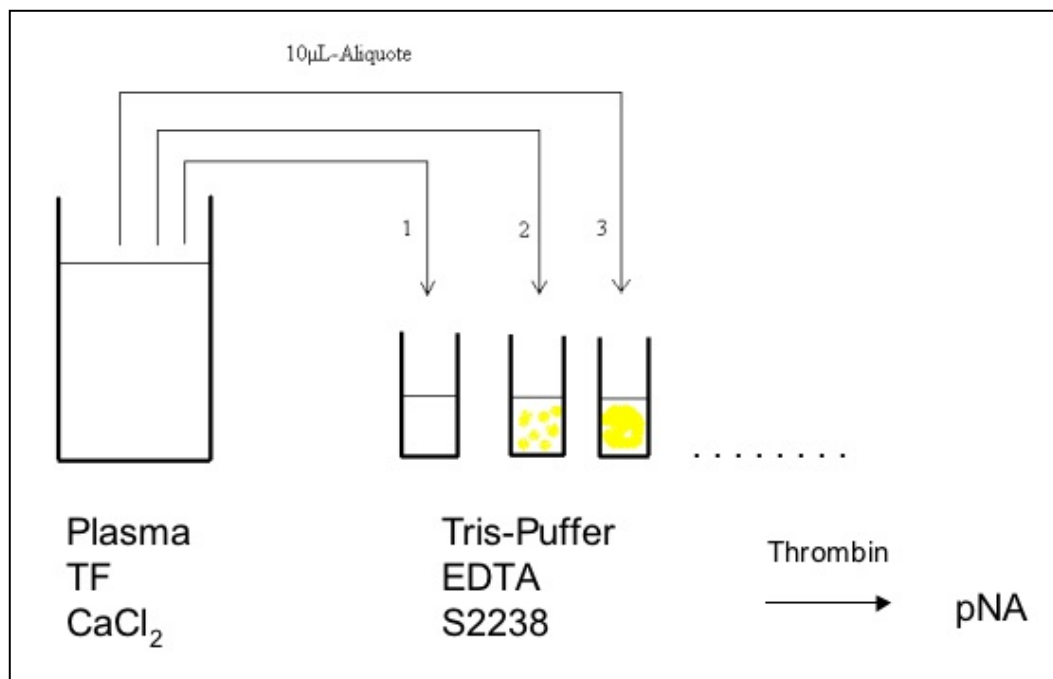


Abbildung 3: Ablauf der Bestimmung des Thrombinpotentials.

In bestimmten Zeitabständen wird aktiviertes Plasma in eine Färbelösung gegeben. Die Farbintensität ergibt sich aus dem Grad der Thrombinbildung.

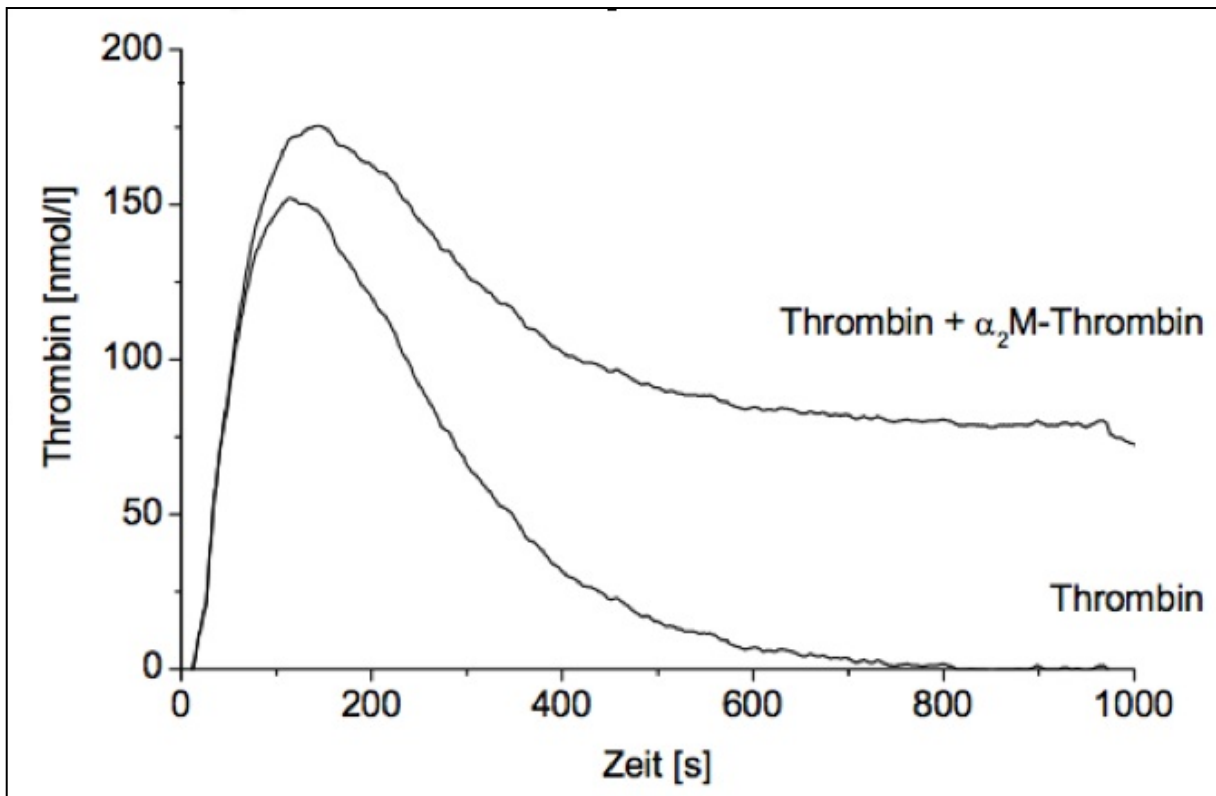


Abbildung 4: Thrombinpotentialkurve

Die obere Kurve schließt den Gerinnungsinhibitor α_2 -Makroglobulin mit ein. Nach dessen Subtraktion erhält man das eigentliche Thrombinpotential

5.2 Thrombelastometrie (TEM)

Es handelt sich dabei um einen Hämostasetest, der einen universellen Überblick von der Thrombusbildung bis hin zu einer überschießenden Fibrinolyse erlaubt. Bei dieser Methode der Gerinnungsbestimmung wird im Allgemeinen Vollblut verwendet. Es kann aber auch in Citratplasma durchgeführt werden. Es wird die Thrombusfestigkeit von seiner Entstehung bis hin zur Fibrinolyse (Gerinnungszeit, Dynamik der Thrombusbildung, maximale Thrombusfestigkeit, Thrombusstabilität bzw. Fibrinolyse) im Globalen festgehalten. Daher besitzt die TEM einen entscheidenden Vorteil gegenüber allgemeinen plasmatischen Gerinnungstests, welche nur die Initialisierung der Hämostase festhalten und nicht eine globale Information über das Gerinnungsverhalten im Vollblut zeigen (funktionelles Fibrinogenkontingent und eine Hyperfibrinolyse können mit einem Test erfasst

werden). Die Zähigkeit der Probe wird mittels eines Sensors gemessen, wobei durch die Verklebung dessen ein für die Thrombelastographie charakteristisches Bild entsteht [15].

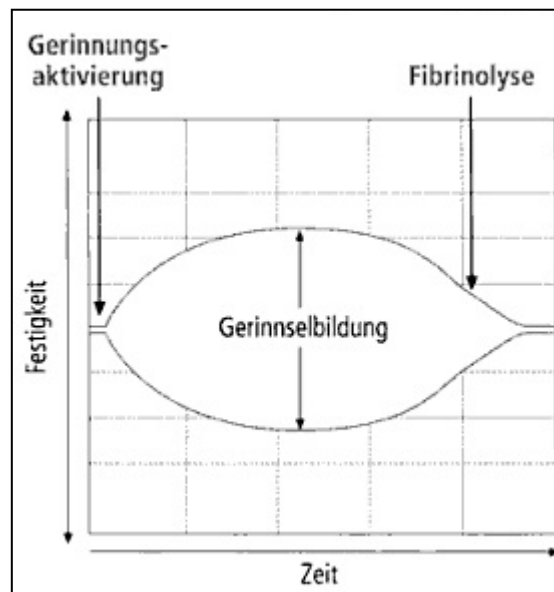


Abbildung 5: Charakteristisches Bild einer TEM - Messung [15].

In dieser Studie wurden folgende TEM-Parameter bestimmt:

- Koagulationszeit (CT, coagulation time): Zeitspanne von Testbeginn bis zur initialen Fibrinbildung
- Gerinnelbildungszeit (CFT, clot formation time): Zeit von Beginn der Fibrinbildung bis die Amplitude der TEM 20 mm erreicht hat.
- maximale Gerinnselfestigkeit (MCF, maximum clot firmness): gibt die maximale Stärke des endgültigen Thrombus in mm an.
- Alphawinkel (α -angle): Gibt die Kinetik und Quervernetzung des Fibrins wieder.

6 Ergebnisse

Inhibition der FXa-Generation durch Nadroparin in Neugeborenen und Erwachsenen

Sowohl in Nabelschnur- wie auch in Erwachsenenplasma zeigt sich eine dosisabhängige Inhibierung der FXa-Generation durch Nadroparin (Figure 1, Panel A). Allerdings war die Inhibierung der FXa-Generation durch Nadroparin in Nabelschnurplasma signifikant höher als in Erwachsenenplasma.

Zwei repräsentative Versuche sind in Figure 2 gezeigt. Eine Hinzugabe von 0,2 anti-FXa IU/ml Nadroparin verursachte eine 68%ige Reduktion des FXa-Peaks in den Nabelschnurplasmaproben (Figure 2, Panel A) und eine 46%ige Reduktion des FXa-Peaks in Erwachsenenplasma (Figure 2, Panel B). Generell wurde in Nabelschnurplasma weniger FXa generiert als in Erwachsenenplasma.

Inhibition der FIIa-Generation durch Nadroparin in Neugeborenen und Erwachsenen

Der Einfluss von Nadroparin auf die Inhibierung von FIIa (Thrombin) war ähnlich jenem auf die FXa-Bildung. Die Hemmung von Thrombin ist, sowohl im Plasma von Nabelschnurblut, als auch in Plasma von Erwachsenen, in Anwesenheit ansteigender Konzentrationen von Nadroparin erhöht (Figure 1, Panel B). Der inhibitorische Effekt von Nadroparin war auch diesmal signifikant höher im Nabelschnurplasma als in dem von Erwachsenen. Die Hinzugabe von 0.2 anti-FXa IU/ml Nadroparin verursachte eine 69%ige Reduktion des Thrombinpotentials in Nabelschnurplasmaproben (Figure 2, Panel C) und eine 51%ige Inhibition des Thrombinpotenzials in Erwachsenenplasma (Figure 2, Panel D). Generell wurde in Nabelschnurplasma weniger FIIa generiert als in Erwachsenenplasma.

Inhibition der FXa-Generation durch Enoxaparin in Neugeborenen und Erwachsenen

Sowohl in Nabelschnur- wie auch in Erwachsenenplasma zeigt sich eine dosisabhängige Inhibierung der FXa-Generation durch Enoxaparin (Figure 3, Panel A). Allerdings war die Inhibierung der FXa-Generation durch Enoxaparin in Nabelschnurplasma signifikant höher als in Erwachsenenplasma.

Die Hinzugabe von 0.2 anti-FXa IU/ml Enoxaparin verursachte eine 69%ige Reduktion des FXa-Peaks in den Proben von Neugeborenenplasma und eine 50%ige Reduktion im Erwachsenenplasma.

Inhibition der FIIa-Generation durch Enoxaparin in Neugeborenen und Erwachsenen

Die Hemmung von Thrombin ist, sowohl in Neugeborenenplasma als auch in Erwachsenenplasma in Anwesenheit ansteigender Konzentrationen von Enoxaparin erhöht (Figure 3, Panel B). Der inhibitorische Effekt von Enoxaparin war signifikant höher in Neugeborenen- als in Erwachsenenplasma. Die Hinzugabe von 0.2 anti-FXa IU/ml Enoxaparin verursachte eine 66%ige Reduktion des Thrombinpotentials im Nabelschnurplasma und eine 48%ige Inhibition des Thrombinpotentials im Erwachsenenplasma.

Inhibition der FXa-Generation durch unfraktioniertes Heparin in Neugeborenen und Erwachsenen

Sowohl in Nabelschnur- wie auch in Erwachsenenplasma zeigt sich eine dosisabhängige Inhibierung der FXa-Generation durch UH (Figure 4, Panel A). Allerdings war die Inhibierung der FXa-Generation durch UH in Nabelschnurplasma signifikant höher als in Erwachsenenplasma. Die Hinzugabe von 0.025 IU/ml UH verursachte eine 39%ige Reduktion des FXa Gipfels in Nabelschnurblutproben und eine 13%ige Reduktion im Erwachsenen Plasma.

Auf Basis gleicher anti-FXa Aktivität zeigte UH eine signifikant höhere Fähigkeit FXa zu hemmen als Nadroparin oder Enoxaparin.

Inhibition der FIIa-Generation durch unfraktioniertes Heparin in Neugeborenen und Erwachsenen

Die Effekte von unfraktioniertem Heparin auf die Hemmung von Thrombin waren ähnlich jenen auf die Hemmung von FXa. Sowohl in Nabelschnur- wie auch in Erwachsenenplasma zeigt sich eine dosisabhängige Inhibierung der FIIa-Generation durch UH (Figure 4, Panel B). Allerdings war die Inhibierung der FIIa-Generation durch UH in Nabelschnurplasma signifikant höher als in Erwachsenenplasma. Die Hinzugabe von 0.025 IU/ml UH verursachte eine 33%ige Reduktion des Thrombinpotentials im Nabelschnurblutplasma und eine 11%ige Reduktion im Erwachsenenplasma. Auf Basis gleicher anti-FXa Aktivität zeigte UH eine signifikant höhere Fähigkeit FIIa zu hemmen als Nadroparin oder Enoxaparin

Inhibierung der FXa-Generation durch Nadroparin vs. Enoxaparin

Nadroparin hemmte die FXa-Generation im selben Ausmaß wie Enoxaparin, sowohl in Nabelschnur- als auch in Erwachsenenplasma (Figure 1, Panel A vs. Figure 3, Panel A).

Inhibierung der FIIa-Generation durch Nadroparin vs. Enoxaparin

Nadroparin hemmte die FIIa-Generation im selben Ausmaß wie Enoxaparin, sowohl in Nabelschnur- als auch in Erwachsenenplasma (Figure 1, Panel B vs. Figure 3, Panel B).

Inhibition von FXa vs. FIIa durch Nadroparin und Enoxaparin

Nadroparin inhibierte sowohl im Nabelschnurblutplasma als auch im Erwachsenenplasma die Generation von Faktor Xa im gleichen Maße wie von Faktor IIa (Tabelle 1).

Effekte steigender Mengen von Nadroparin auf TEM-Parameter in Neugeborenen und Erwachsenen

Aus der Hinzugabe von Nadroparin (0 – 1.0 anti-FXa IU/ml) resultierte eine dosisabhängige Verlängerung der Koagulationszeit und der CFT (clot formation time) und eine dosisabhängige Abnahme der MCF und des Alphawinkel (Figure 5). Die Effekte waren im Nabelschnurvollblut signifikant stärker als im Erwachsenenervollblut.

Effekte steigender Mengen von Enoxaparin auf TEM-Parameter in Neugeborenen und Erwachsenen

Ähnlich wie bei Nadroparin führte die Hinzugabe von Enoxaparin (0 – 1.0 anti-FXa IU/ml) zu einer dosisabhängige Verlängerung der Koagulationszeit und der CFT (clot formation time) und einer dosisabhängige Abnahme der MCF und des Alphawinkel (Figure 6). Die Effekte waren im Nabelschnurvollblut signifikant stärker als im Erwachsenenervollblut.

Effekte steigender Mengen von UH auf TEM-Parameter in Neugeborenen und Erwachsenen

Aus der Hinzugabe von UH (0 – 0.3 anti-FXa IU/ml) resultierte eine dosisabhängige Verlängerung der Koagulationszeit und der CFT (clot formation time) und eine dosisabhängige Abnahme der MCF und des Alphawinkel (Figure 7). Die Effekte waren im Nabelschnurvollblut signifikant stärker als im Erwachsenenervollblut.

7 Diskussion

In dieser Studie wurden die pharmakodynamischen Eigenschaften der zwei niedermolekularen Heparine Nadroparin und Enoxaparin in Plasma- und Vollblutproben von Neugeborenen mit jenen von Erwachsenen verglichen. Als Referenzsubstanz diente unfraktioniertes Heparin. Im Bezug auf die Behandlung und Prävention der Thrombose haben niedermolekulare Heparine wesentliche Vorteile gegenüber unfraktionierten Heparinen und oralen Antikoagulantien.

Es hat sich in der klinischen Praxis herausgestellt, dass die im Plasma gemessenen anti-FXa-Spiegel nur schlecht mit der antikoagulatorischen Aktivität von Heparinen korreliert. Deshalb wurde in dieser Arbeit versucht, die antikoagulatorische Aktivität der Heparine auf einem anderen Weg zu messen. Es wurde die Fähigkeit der Heparine verfolgt, die FXa- und die FIIa-Generation in TF-aktivierten Plasmaproben zu unterdrücken. Es wurde bereits gezeigt, dass dies die in-vivo-Situation besser widerspiegelt als die starke Aktivierung der Routinemethoden. In einer vor kurzem erschienenen Studie, ausgeführt mit adultem Plasma, wurde gezeigt, dass Nadroparin genauso effizient wie Enoxaparin in der Hemmung der endogenen Bildung von Thrombin und FXa ist. Diese Ergebnisse wurden in der gegenwärtigen Studie reproduziert. Weiters konnte gezeigt werden, dass die antikoagulatorische Aktivität von LMWH und UH in Neugeborenen signifikant größer ist als in Erwachsenen. Es wird vermutet, dass die basal niedrigen Mengen an Thrombin und FXa im Plasma der Neugeborenen durch niedrigmolekulare Heparine effizienter gehemmt werden können als die relativ hohen Mengen an Thrombin und FXa in Plasmaproben von Erwachsenen. Ferner zeigte die vorausgegangene, mit adultem Plasma durchgeführte Studie, dass die Generation von FXa annähernd in demselben Ausmaß wie Thrombin gehemmt wurde durch die Zugabe von Nadroparin oder Enoxaparin. Diese Resultate wurden in der gegenwärtigen Studie mit dem aus Nabelschnurblut gewonnenen Plasma reproduziert. Es wird angenommen, dass die unerwartet starke Unterdrückung der Thrombingeneration durch die beiden LMWH einerseits ihrer Fähigkeit, die Thrombingeneration direkt zu hemmen, zugeschrieben werden kann, als auch ihrer Fähigkeit, die Prothrombinaktivierung zu unterdrücken.

Die hier vorliegenden Daten zeigen, dass auf Basis gleicher anti-FXa-Spiegel UH viel stärker in der Lage ist FXa- und FIIa-Generation zu unterdrücken als die beiden

LMWH Nadroparin und Enoxaparin, und zwar sowohl in Nabelschnurplasma als auch in Erwachsenenplasma.

Wie bereits in der vorangegangenen Studie mit adulten Plasmaproben gezeigt, waren auch in der hier vorliegenden Studie ausgeführt in Nabelschnurplasma, signifikant kleinere Mengen an UH benötigt als an LMWH, um die Bildung von FXa oder FIIa (Thrombin) effizient zu hemmen. Die effiziente Hemmung der Thrombinbildung in Gegenwart von UH ist offenbar der gut bekannten höheren Antithrombin Aktivität von UH verglichen mit Nadroparin oder Enoxaparin zuzuschreiben. Dennoch sind die niedrigen Werte von FXa in der Gegenwart von UH nicht leicht zu verstehen. Eine Erklärung könnte sein, dass durch die effiziente Hemmung von Thrombin in weiterer Folge die Aktivierung von FVIII und die anschließende Aktivierung von FX hintangehalten werden.

Plasma enthält zwar die Mehrzahl der Gerinnungsfaktoren, aber keine phospholipidhaltigen Zellen und Plättchen wie Vollblut. Daher wurde im Rahmen der hier vorliegenden Studie die antikoagulatorische Aktivität von LMWH und UH auch in Vollblut mittels TEM ermittelt. Die Ergebnisse stimmen gut mit jenen aus den Plasmaversuchen überein. Nadroparin und Enoxaparin zeigten dieselbe Fähigkeit, die Gerinnungszeit und CFT (clot formation time) zu verlängern und die MCF (maximum clot firmness) und den Alphawinkel zu reduzieren sowohl in Vollblut von Neugeborenen wie in jenem von Erwachsenen. Der Einfluss von UH auf die Parameter der Thrombelastometrie, verglichen auf Basis äquivalenter anti-FXa Spiegel, war signifikant höher als jener von Nadroparin und Enoxaparin. Wiederum waren die Vollblutproben aus Nabelschnurblut mehr beeinflussbar im Bezug auf die Zugabe von Nadroparin, Enoxaparin, oder UH.

Allerdings muss angeführt werden, dass die Messungen in Abwesenheit von Endothelium durchgeführt wurden. Deshalb ist in den vorliegenden Messungen nicht berücksichtigt, dass Heparine aus Endothelzellen TFPI (tissue factor pathway inhibitor) freisetzen können. Es ist bekannt, dass TFPI das TEM- Profil verändert.

Ferner wurden aus ethischen Gründen Nabelschnurblut und nicht Vollblut direkt aus dem Kreislauf Neugeborener verwendet. Allerdings ist Nabelschnurblut der beste verfügbare Ersatz für das Blut von Neugeborenen.

Es wurde vorgeschlagen, dass Neugeborene eine höhere Dosierung niedermolekularer Heparine, bedingt durch eine gesteigerte extravaskuläre Clearance, benötigen als Erwachsene. Unsere Ergebnisse weisen darauf hin, dass

bei der Steigerung der Heparin - Dosen sehr vorsichtig vorgegangen werden muss. Da Nadroparin hinsichtlich der Antikoagulation genauso wirksam ist wie Enoxaparin, aber weniger Schmerz bei der Injektion verursacht, sollte Nadroparin bei der Antikoagulation von Neugeborenen gegenüber Enoxaparin der Vorzug gegeben werden.

8 Literaturverzeichnis

1. Hofman S, Knoefler R, Lorenz N, Siegert G, Wendisch J, Kueller D, Taut-Sack H, Dinger J, Kabus M. Clinicalexperiences with low-molecular weight heparins in pediatric patients. *Thromb Res* 2001; 103: 345-53.
2. Nowak-Göttl U, Bidlingmaier C, Krümpel A, Göttl L, Kenet G. Pharmacokinetics, efficacy, and safety of LMWHs in venous thrombosis and stroke in neonates, infants, and children. *Brit J Pharmacol* 2008; 153: 1120-7.
3. Chan AK, Deveber G, Monagle P, Brooker LA, Massicotte PM. Venous thrombosis in children. *J Thromb Haemost* 2003; 1: 1443-5.
4. Massicotte P, Adams M, Marzinotto V, Brooker LA, Andrew M. Low-molecular-weight heparin in pediatric patients with thrombotic disease: a dose-finding study. *J Pediatr* 1996; 128: 313-8.
5. Punzalan RC, Hillery CA, Montgomery RR, Scott CA, Gill JC. Low-molecular-weight heparin in thrombotic disease in children and adolescents. *J Pediatr Hematol Oncol* 2000; 22: 137-42.
6. Massicotte P, Julian JA, Marzinotto V, Gent M, Shields K, Chan AK, Szechtman B, Kohne S, Shepherd S, Bacher P, Andrew M. Dose-finding and pharmacokinetic profiles of prophylactic doses of a low molecular weight heparin (reviparin-sodium) in pediatric patients. *Thromb Res* 2003; 109: 93-9.
7. Lapote S, Mismetti P, Pique P, Doubine S, Touchot A, Decousus H. Population pharmacokinetic of nadroparin calcium (Fraxiparin) in children hospitalised for open heart surgery. *J Pharm Sci* 1999; 8: 119-25.
8. Kuhle S, Massicotte P, Dinyari M, Vegh P, Mitchell D, Marzinotto V, Chan A, Pieniaszek H, Mitchell LG. Dose-finding and pharmacokinetics of therapeutic doses of tinzaparin in pediatric patients with thromboembolic events. *Thromb Haemost* 2005; 94: 1164-71.
9. Billon N, Gloaguen F, Funck-Brentano C, Jaillon P. Clinical evaluation of pain during subcutaneous injections of low molecular weight heparins in healthy volunteers. *Br J Clin Pharmacol* 1994; 37: 395-7.
10. Davie EW, Fujikawa K, Kisiel W. The coagulation cascade: initiation, maintenance and regulation. *Biochemistry* 1991; 30: 10363-70.

11. Mann KG, Brummel K, Butenas S. What is all that Thrombin for? *J Thromb Haemost* 2003; 1: 1785-90.
12. Cvirn G, Gallistl S, Leschnik B, Jürgens G, Muntean W. Elevated thrombin-forming capacity of tissue-activated cord compared to adult plasma. *J Thromb Haemost* 2003; 1: 1785-90.
13. Cvirn G, Gallistl S, Kutschera J, Wagner T, Ferstl U, Jurgens G, Koestenberger M. Collagen/endogenous thrombin-induced platelet aggregation in whole blood samples. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2007; 18: 585-8.
14. Monroe DM, Hoffman M, What does it take to make the perfect clot? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26: 31-8.
15. Hans D Bruhn, Viola Hach-Wunderle, Christian M Schambeck, Rüdiger E Scharf. *Hämostaseologie für die Praxis*. 2.Auflage. Stuttgart: Schattauer Verlag; 2007.
16. R Klinke, H-C Pape, St Silbernagl. *Physiologie*. 5.Auflage. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2005.
17. Hoffman M, Monroe DM, 3rd. A cell-based model of hemostasis. *Thromb Haemost*. 2001 Jun; 85(6): 958-65.
18. Davie EW, Ratnoff OD. Waterfall Sequence for Intrinsic Blood Clotting. *Science*. 1964 Sept; 145: 1310-2.
19. Macfarlane RG. An Enzyme Cascade in the Blood Clotting Mechanism, and Its Function as a Biochemical Amplifier. *Nature*. 1964 May 2; 202: 498-9.
20. Bernd Pöttsch, Meinrad Gawaz, Katharina Madlener. *Hämostaseologie*. 2. Auflage. Berlin-Heidelberg: Springer Verlag; 2010.
21. Andrew M, Schmidt B, Mitchell L, Paes B, Ofosu F. Thrombin Generation in Newborn Plasma is Critically Dependent on the Concentration of Prothrombin. *Thromb Haemost*. 1990; 63(1): 27-30.
22. Andrew M, Paes B, Milner R, Johnston M, Mitchell L, Tollefsen D M, Powers P. The development of the human coagulation system in fullterm infant. *Blood* 1987; 70: 165-72.
23. Pöttsch B, Madlener K. *Gerinnungskonsil: rationelle Diagnostik und Therapie von Gerinnungsstörungen*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2002.
24. Kemkes-Matthes B, Oehler G. *Blutgerinnung und Thrombose*. 3. Auflage. Stuttgart: Thieme Verlag; 2001.

25. Haas S, Amann S. Antithrombotika. Eschborn: Govi Verlag Pharmazeutischer Verlag GmbH; 2004.
26. Burgis E. Intensivkurs allgemeine und spezielle Pharmakologie. 4. Auflage. München. Urban und Fischer Verlag; 2008.
27. List W F, Osswald P M, Hornke I. Komplikationen und Gefahren in der Anästhesie. 4. Auflage. Berlin Heidelberg New York: Springer Verlag; 2003.
28. Kitchen S, Olson J D, Preston F E. Quality in Laboratory Hemostasis and Thrombosis. 1st edition. Blackwell Publishing; 2009.

Anhang – Diagramme

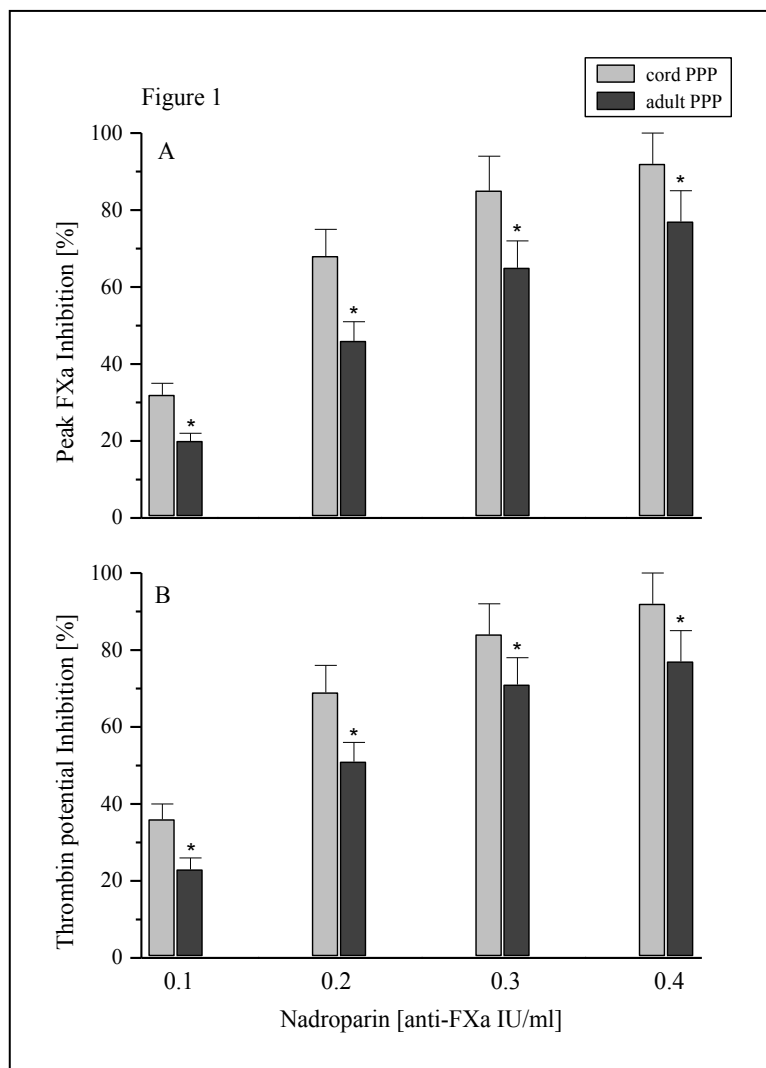


Figure 1: Inhibierung der FXa- und FIIa-Generation durch Nadroparin. Effekt steigender Mengen an Nadroparin (0.1-0.4 anti-FXa IU/ml) auf die Inhibierung von FXa (Panel A) und FIIa (Panel B) in Nabelschnur vs. Erwachsenenplasma.

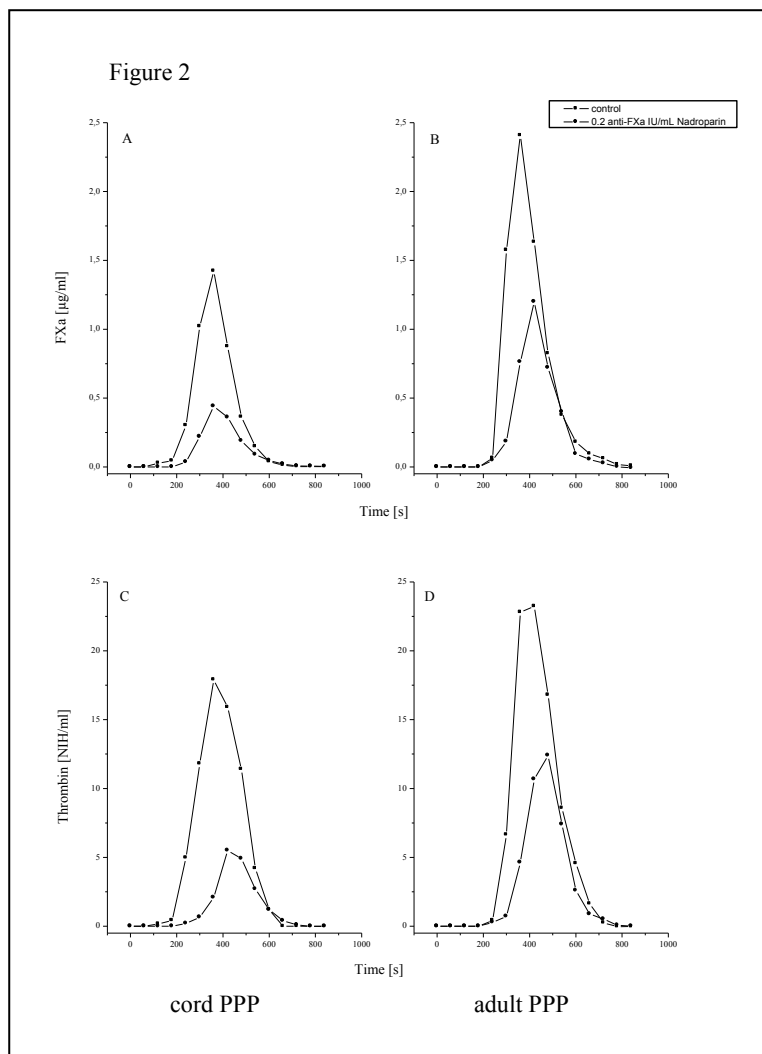


Figure 2: Inhibierende Wirkung von 0.2 anti-FXa IU/mL Nadroparin (typische Experimente). Effekt von 0.2 anti-FXa IU/ml Nadroparin auf die FXa-Bildung (obere Panele) und auf die FIIa-Bildung (untere Panele) in Nabelschnurplasma (linke Panele) und Erwachsenenplasma (rechte Panele).

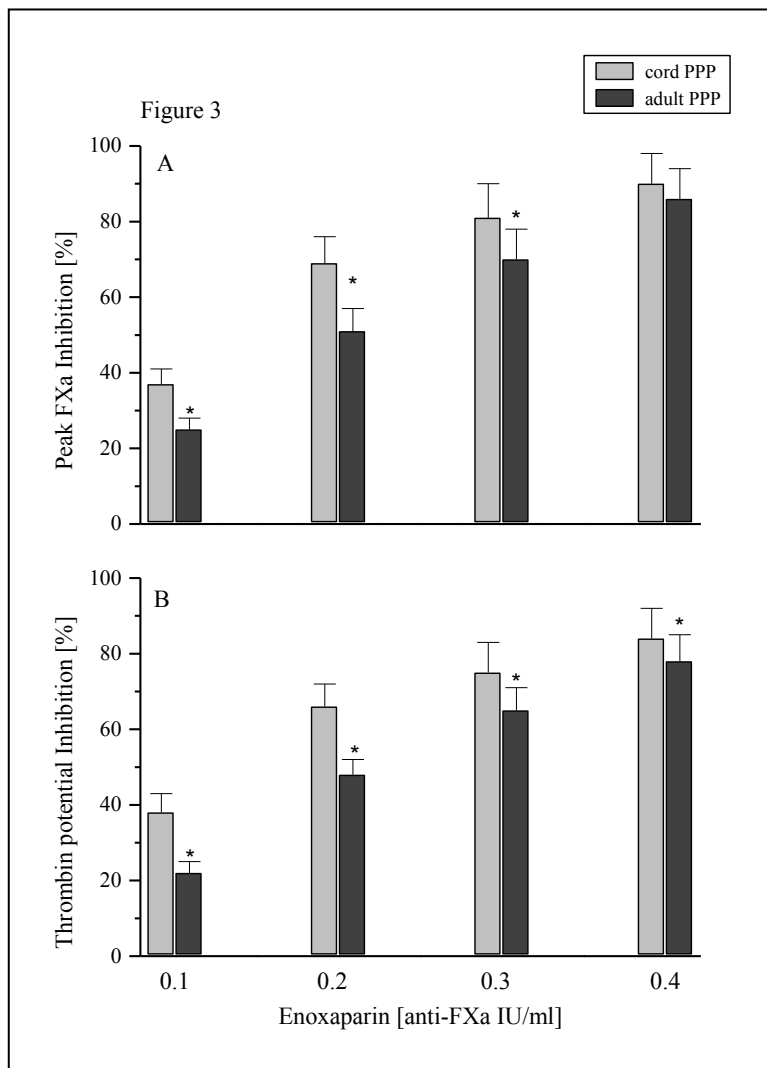


Figure 3: Inhibierung der FXa- und FIIa-Generation durch Nadroparin. Effekt steigender Mengen an Nadroparin (0.1-0.4 anti-FXa IU/ml) auf die Inhibierung von FXa (Panel A) und FIIa (Panel B) in Nabelschnur vs. Erwachsenenplasma.

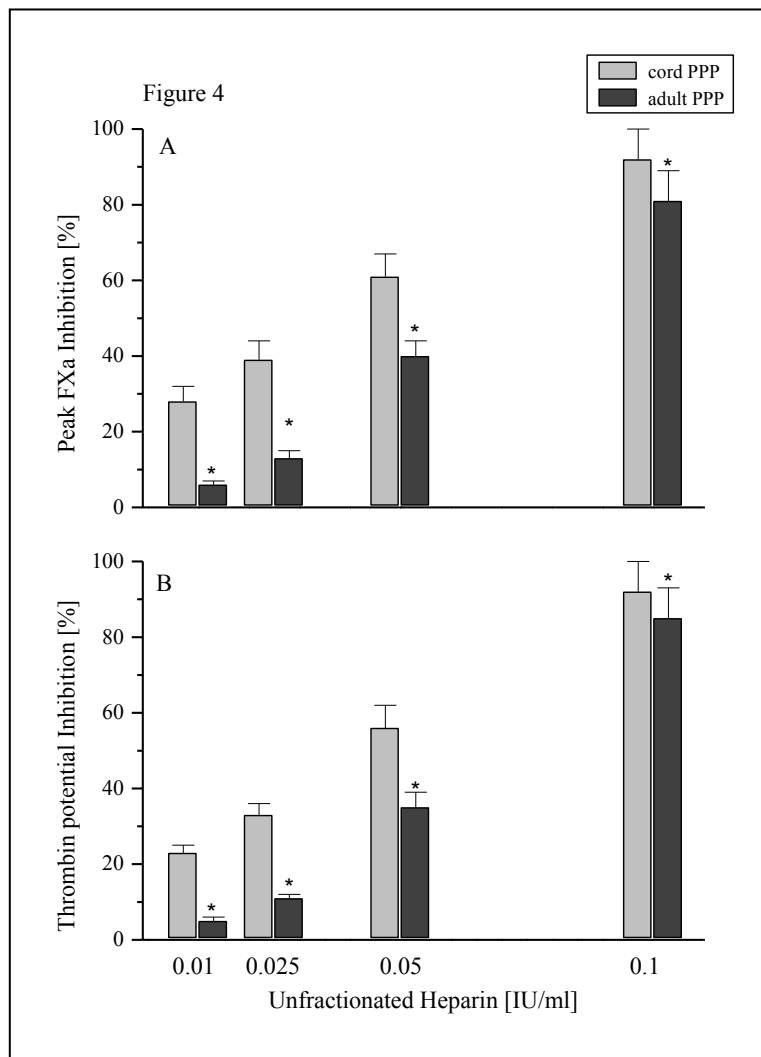


Figure 4: Inhibierung der FXa- und FIIa-Generation durch UH. Effekt steigender Mengen an UH (0.01-0.1 anti-FXa IU/ml) auf die Inhibierung von FXa (Panel A) und FIIa (Panel B) in Nabelschnur vs. Erwachsenenplasma.

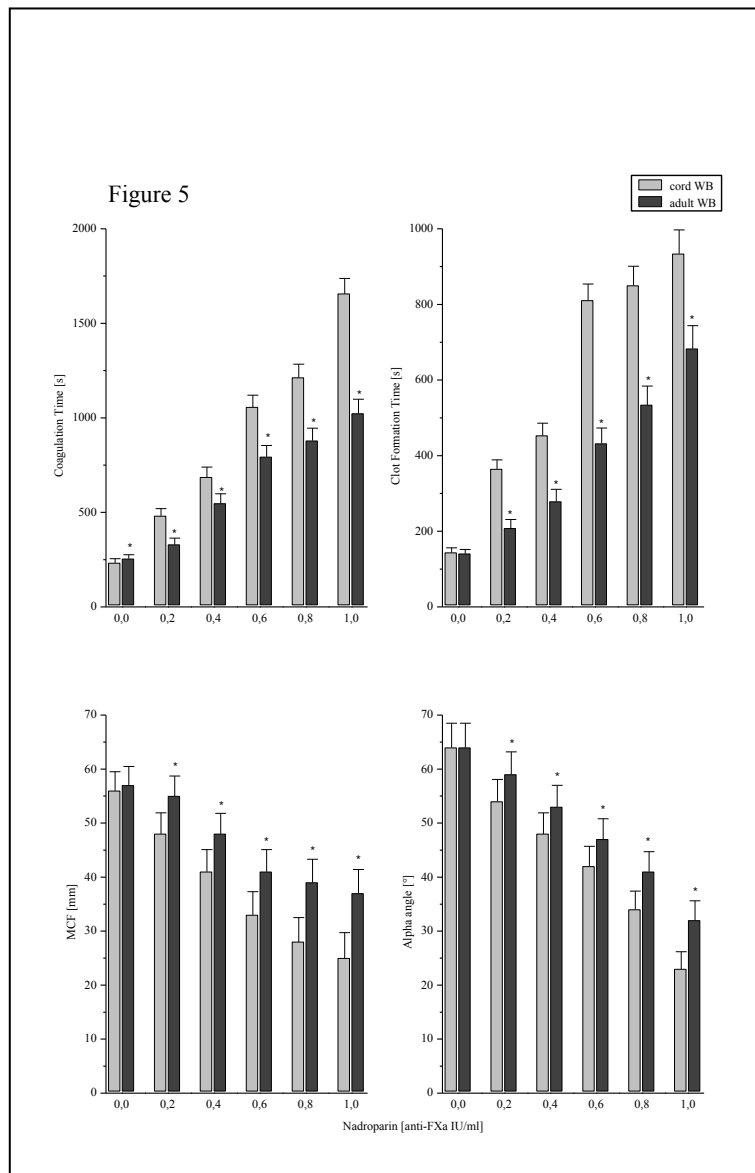


Figure 5: Effekt von Nadroparin auf die TEM-Parameter. TEM-Parameter in Gegenwart steigender Mengen an Nadroparin (0-1.0 anti-FXa IU/ml) in Nabelschnur- vs. Erwachsenenplasma. *P<0.001.

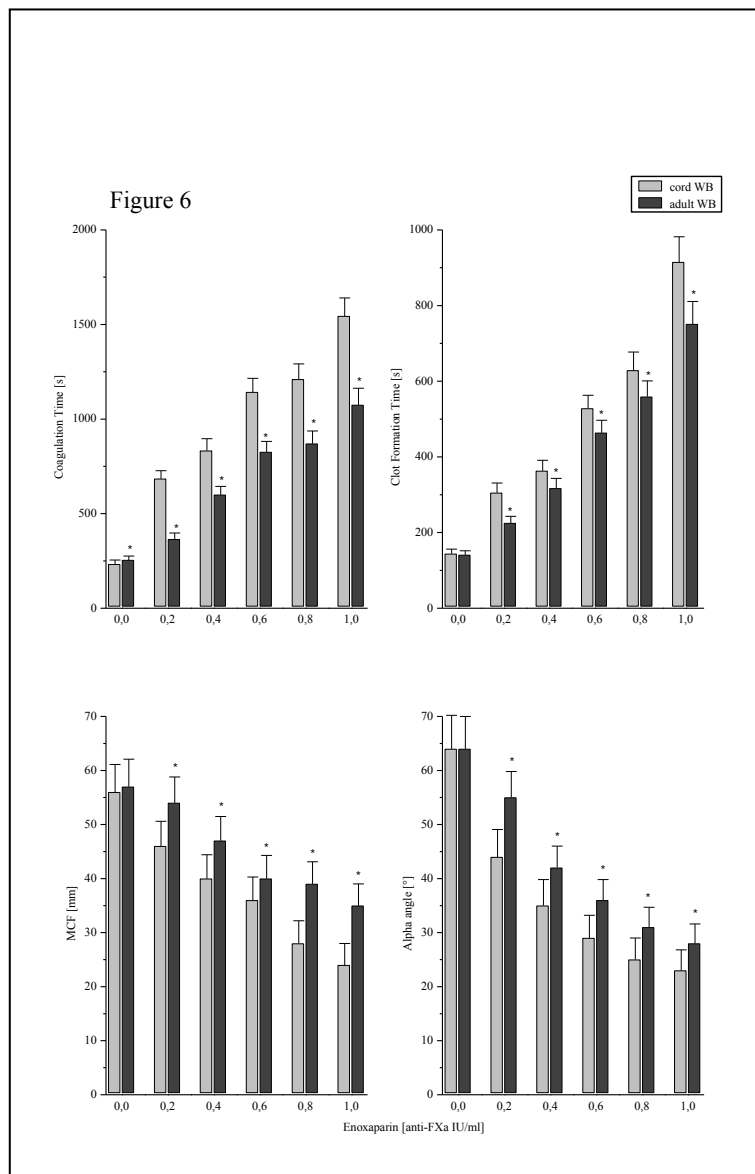


Figure 6: Effekt von Enoxaparin auf die TEM-Parameter. TEM-Parameter in Gegenwart steigender Mengen an Enoxaparin (0-1.0 anti-FXa IU/ml) in Nabelschnur- vs. Erwachsenenplasma. *P<0.001.

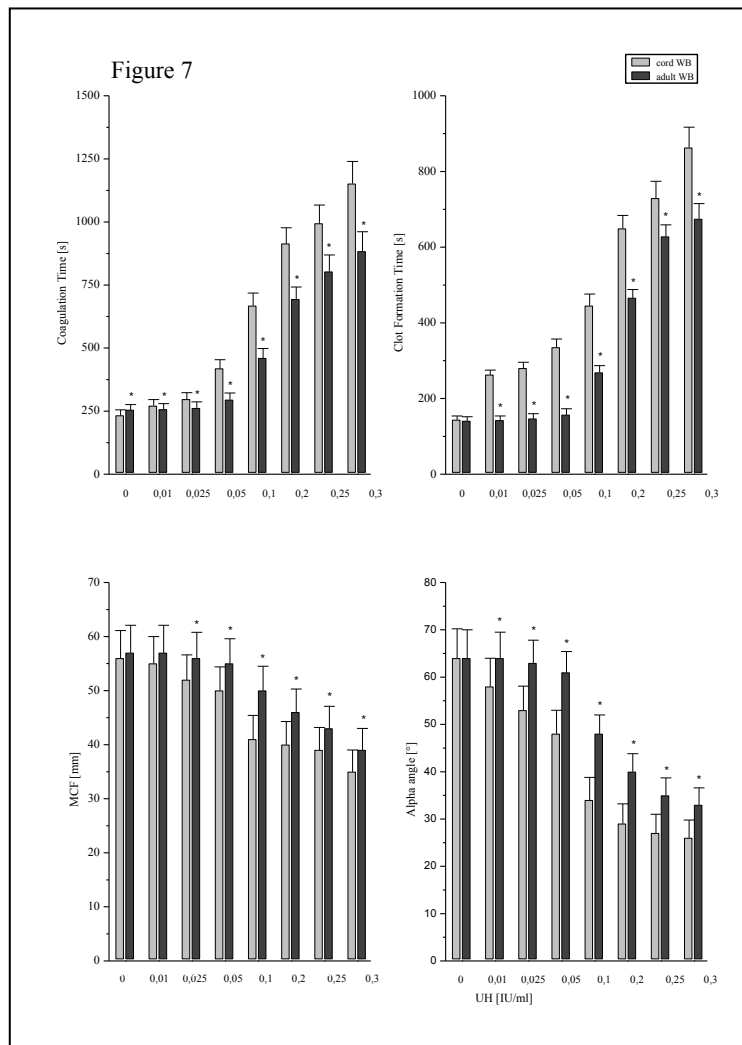


Figure 7: Effekt von UH auf die TEM-Parameter. TEM-Parameter in Gegenwart steigender Mengen an UH (0.01-1.0 anti-FXa IU/ml) in Nabelschnur- vs. Erwachsenenplasma. *P<0.001.

	Inhibition FXa [%]		Inhibition FIIa [%]	
	cord	adult	cord	adult
0.2 anti-FXa IU/mL nadroparin	68 ± 7	46 ± 5	69 ± 7	51 ± 6
0.2 anti-FXa IU/mL enoxaparin	69 ± 7	50 ± 5	66 ± 6	48 ± 4

Tabelle 1: Inhibierung der FXa- und FIIa-Generation durch 0.2 anti-FXa IU/ml Nadroparin vs. 0.2 anti-FXa IU/ml Enoxaparin.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Nikolaus Georg Bernhard Heini
Geburtsort : Klagenfurt
Geburtsdatum : 06. März 1983
Eltern: Dr. Klaus Heini und Dr. Renata Heini
Familienstand: Ledig

Schulbildung

1990-1994	Volksschule Klagenfurt Ursulinen
1994-1998	BG Tanzenberg, Maria Saal
1998-2001	BG Lerchenfeldstraße, Klagenfurt
2001	Matura
2002	Grundwehrdienst, Med. Abteilung der Stellungskommission Windischkaserne, Klagenfurt

Akademische Ausbildung

Medizinstudium seit WS 2002 an der
Medizinischen Universität Graz
Abschluss des 2. Abschnittes am 24. 11. 2009

Praktika

4 Wochen Unfallchirurgie am UKH Klagenfurt
6 Wochen Innere Medizin am LKH Klagenfurt
4 Wochen Innere Medizin am Krankenhaus der
Barmherzigen Brüder Graz Eggenberg
2 Wochen Radiologie am LKH Graz
7 Wochen Gastroenterologie und Hepatologie an
der Charité Virchow Berlin

Sprachkenntnisse

Deutsch Muttersprache

Englisch sehr gut in Wort und Schrift

Italienisch Grundkenntnisse