Aus der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie

der Universität Hamburg

(Direktor: Prof. Dr. med. A. Goetz)

Einfluss des genetisch rekombinanten Antithrombin-III im Vergleich zu humanem Antithrombin-III auf die Hemmung der Blutgerinnung bei heparinresistenten Patienten

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung eines Doktor der Medizin

der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg vorgelegt von

Daniela Dube

aus Hamburg

Hamburg 2007

Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Hamburg am: 22.06.2007

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. G. von Knobelsdorff

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in: Prof. Dr. P. Kühnl

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in: PD Dr. M. Goerig

……..

Inhaltsverzeichnis

1. Studiengegenstand 4
2. Einleitung 4
3. Eigene Fragestellung 15
4. Material und Methoden 15
4.1 Auswahl der Patienten 15
4.2 Studienverblindung 16
4.3 Das anästhesiologische Vorgehen 16
4.4 Studiendurchführung 17
4.5 Überwachungsparameter 19
4.6 Datenerfassung und Auswertung 21
5. Ergebnisse 22
5.1 Demographische Daten 22
5.2 Begleiterkrankungen 23
5.3 Messung der ACT 24
5.4 Messung der Fibrin-Monomere 26
5.5 Messung der D-Dimere 27
5.6 Aktivität des Antithrombin-III 28
5.7 Sicherheit des genetisch rekombinanten Antithrombin-III 29
6. Diskussion 30
7. Zusammenfassung 38
8. Abkürzungsverzeichnis 39
9. Verzeichnis der Tabellen 41
10. Verzeichnis der Abbildungen 42
11. Quellennachweis 43
12. Literaturverzeichnis 44
13. Lebenslauf 50
14. Danksagung 51

1. Studiengegenstand

In dieser Studie wurde an heparinresistenten Patienten die Wirkung von genetisch rekombinantem Antithrombin-III untersucht. Als Heparinresistenz wurde das Unvermögen des Patienten definiert, nach initialer Heparingabe von 300 U/kg KG eine aktivierte Gerinnungszeit von größer 480 s zu erreichen. Im Rahmen aortocoronarer Bypass-Operationen unter Einsatz einer Herz-Lungen-Maschine wurde der Einfluss von genetisch rekombinantem Antithrombin-III auf die aktivierte Gerinnungszeit verglichen mit humanen Plasma-Antithrombin untersucht.

2. Einleitung

Operative Eingriffe am offenen Herzen oder an den Herzkranzgefäßen waren bis zur Mitte des zwanzigsten Jahrhunderts nur sehr begrenzt möglich. Hinderlich waren vor allem die Herzmuskelbewegung, welche die Anwendung mikrochirurgischer Techniken verhinderte, die Gefahr der massiven Luftemboli durch Eröffnung der Herzhöhlen und nicht zuletzt die Blutmengen, welche eine ausreichende Sicht auf das Operationsgebiet unmöglich machten (Boettcher et al., 2003a). Diese Hindernisse führten dazu, dass über Möglichkeiten, die Funktion des Herzens als Pumporgan und die Lunge als Ort des Gasaustausches passager zu ersetzen, nachgedacht wurde (Boettcher et al., 2003b). Es kam zur Entwicklung der Herz-Lungen-Maschine, welche genau diese Funktionen erfüllt (Boettcher et al., 2003a; Boettcher et al., 2003b).

Der erste erfolgreiche Eingriff am offenen Herzen erfolgte am 6. Mai 1953 durch John Heysham Gibbon jr. Dieser Operation ging von Seiten des Operateurs zwanzig Jahre Entwicklungszeit einer Herz-Lungen-Maschine voraus; die Grundidee eines extrakorporalen Kreislaufs (ECC) wurde bereits 1812 zum ersten Mal formuliert und geht auf den französischen Physiologen César Julien-Jean Le Gallois zurück, welcher in seiner Monographie "Expériences sur le principe de la vie" Experimente beschrieb, die die Zusammenhänge von Atmung, Nervensystem und Blutkreislauf untersuchten. Als früheste und einfachste Methode zur künstlichen Durchströmung von isolierten Organen diente seit Mitte des 19. Jahrhunderts die Schwerkraft, indem man das Reservoir mit dem Perfusat schlicht an die Raumdecke hängte. Problematisch zeigte sich hier vor allem die Länge der nötigen Schlauchsysteme, so dass als nächste Innovation das Reservoir unter Druck gesetzt wurde, um den Fluss des Perfusats zu verbessern. Damit konnten durch die Verkürzung des

Schlauchsystems bereits Perfusionen mit unverdünntem Blut vorgenommen werden (Boettcher et al., 2003b). Dieser Methode folgte 1885 die Erfindung des geschlossenen Kreislaufs durch Max von Frey und Max Gruber (Boettcher et al., 2003b; von Frey M, Gruber M, 1885), was den Einsatz von aktiven Pumpsystemen notwendig machte. Die erste Rollerpumpe wurde bereits 1855 patentiert und rasch weiterentwickelt, wie sie auch heute noch in ähnlicher Form in Herz-Lungen-Maschinen eingesetzt wird und den Vorteil besaß, ohne ein Ventil auszukommen (Patent von Eugene Allen am 21. Juni 1887). Diese Rollerpumpe war bereits für die Bluttransfusion konzipiert, auch wenn erfolgreiche Bluttransfusionen erst dreizehn Jahre später nach Beschreibung der drei Blutgruppen möglich wurden (Landsteiner K, 1900; Landsteiner K, 1901; von Decastello A, Sturli A, 2004). Im Verlauf wurde die Rollerpumpe weiter modifiziert, was die nötige Schlauchlänge noch weiter reduzierte (Truax C, 1899; Beck A, 1925). In Deutschland wurde die Rollerpumpe als Satrans III oder als Beck'sche Mühle bekannt (Boettcher et al., 2003b). Ein weiterer Vorteil bestand nun auch darin, das gepumpte Blutvolumen genau messen zu können (Boettcher et al., 2003b).

Als zweite Säule der ECC wurden Methoden entwickelt, wie man venösem Blut Sauerstoff zuführen und arterielles Blut erhalten konnte. Dabei war überhaupt erstmal die Einsicht notwendig, dass arterielles statt venöses Blut für eine Organperfusion besser geeignet ist. Diesen Nachweis konnten unter anderem James Phillips Kay (Kay JP, 1828) und Eduard Brown-Séquard (Brown-Séquard E, 1858) im 19. Jahrhundert anhand aus heutiger Sicht teils recht makaber anmutenden Experimenten an Tieren und hingerichteten Menschen erbringen. Dem folgten Versuche, venöses Blut in arterielles umzuwandeln, was zunächst durch den Kontakt mit Raumluft gelang (von Frey M, Gruber M, 1885). So entstanden die Bubbleoxygenatoren (Litwak, 2002), in denen das Blut durch den direkten Kontakt mit eingeblasenen Luftbläschen oxygeniert wurde. Dieses Verfahren wurde von Jacobj 1895 dahin gehend verbessert, dass in seinem „Hämatisator“ (Jacobj C, 1895) der direkte Kontakt von Luft und Blut durch die Verwendung einer Tierlunge zur Oxygenierung vermieden wurde und weniger Hämolyse auftrat. Dieser Weg musste wegen häufiger Komplikationen an der empfindlichen Tierlunge während des Eingriffs später wieder verlassen werden (Boettcher et al., 2003b; Butruille Y et al., 1976; Mustard WT, 1955). Die grundsätzlichen drei Prinzipien der Bubble- und Filmoxygenation sowie der Oxygenation durch eine exzidierte Lunge wurden in den fünfziger Jahren auch klinisch angewandt (Boettcher et al., 2003b). Diesen Methoden folgte der durch Frederick S. Cross gemeinsam mit Earle B. Kay in Cleveland im Jahre 1956 entwickelte Scheibenoxygenator, der in den fünziger Jahren als Kay-Cross-

Apparat in mehreren Modifikationen weltweite Verbreitung fand (Cross FS, 1957). Eine besondere Entdeckung machte 1943 Willem Johan Kolff, als er während des klinischen Einsatzes seiner Dialysatoren entdeckte, dass Sauerstoff durch eine Zellulose-Membran rasch vom Blut resorbiert wird (Kolff WJ, Berk HTJ, 1944). Diese Tatsache gilt als Grundstein der Entwicklung der späteren und heute gebräuchlichen Membranoxygenatoren. Anstelle der Zellulose trat eine Polyäthylenmembran, mit der Kolff 1955 den ersten Membranoxygenator präsentieren konnte (Kolff WJ, Balzer R, 1955). Mit dieser Methode konnte die Trennung von Blut- und Gasphase erreicht und somit die Eiweißdenaturierung und die Bildung von Fibrinemboli deutlich verringert werden (Boettcher et al., 2003b). Die ersten kommerziell gefertigten Membranoxygenatoren, zum Beispiel die Bramson-Membranlunge oder der Landé-Edwards-Membranoxygenator, der Kolobow-Spiral-Membranoxygenator und die Peirce-General-Electric-Dualung waren schließlich in den sechziger Jahren verfügbar (Boettcher et al., 2003b). Jedoch dauerte es noch etwa zehn weitere Jahre, bis Anfang 1970 semipermeable wie auch mikroporöse Membranen entwickelt worden waren, die den Leistungsanforderungen für einen Routineeinsatz entsprachen (Bock H, 2003). So folgte der Landé-Edwards-Membranoxygenator mit einer Siliconkautschukmembran, 1975 der erste mikroporöse Membranoxygenator von Travenol mit einer Membranfolie aus Teflon (Bock H, 2003). Im Jahr 1983 kam mit dem Terumo Capiox II der erste Kapillaroxygenator auf den Markt. Der Gasaustausch erfolgt über mikroporöse Kapillaren, Sauerstoff diffundiert ins Blut, im Gegenzug erfolgt der Rückstrom des Kohlendioxids in die Gasphase des Oxygenators. Diese Technik findet sich im Maxima-Kapillaroxygenator von Johnson & Johnson und wird in der heutigen Generation der Oxygenatoren verwendet (Bock H, 2003). Diese Verbesserungen führten schließlich dazu, dass die ECC und Oxygenierung heute eine routininierte Kardiochirurgie ermöglichen, und auch für den Patienten ein zunehmend sicheres Verfahren darstellen.

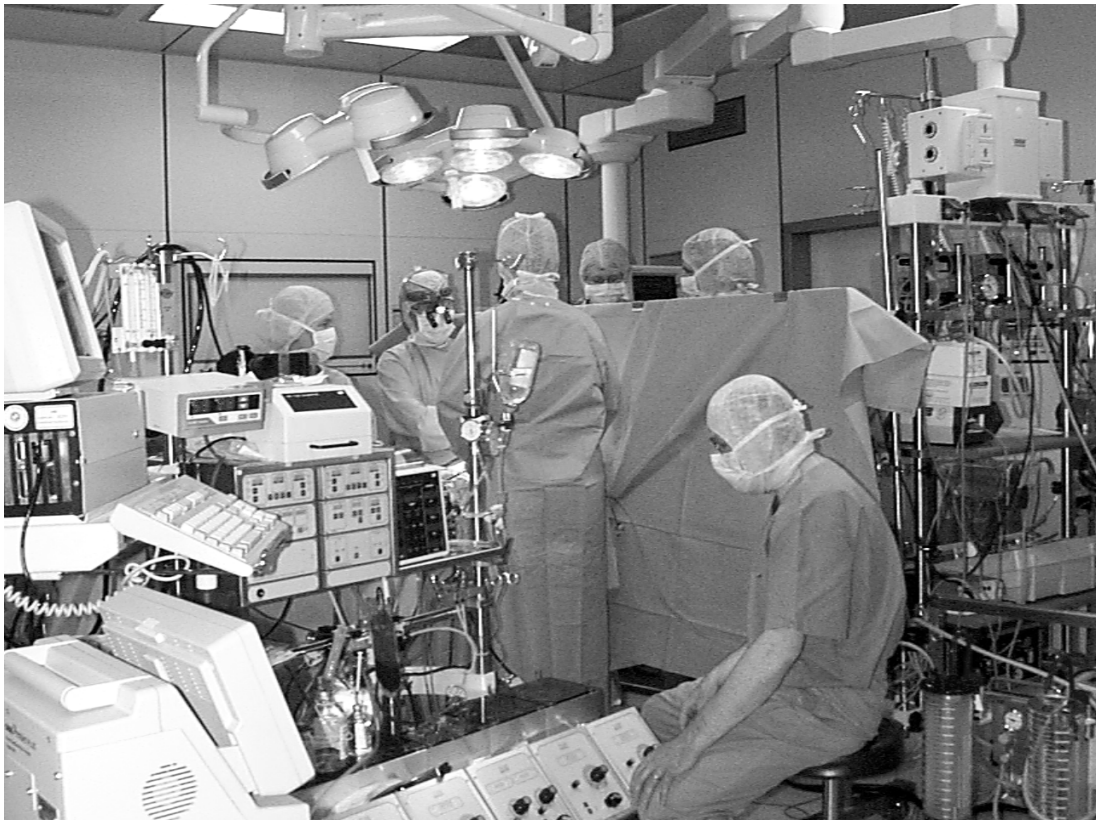


Abbildung 1:
Einblick in den heutigen Arbeitsalltag einer Herz-OP.

Während der Herz-Operation muss die Pumpfunktion des Herzens ausgesetzt werden, das schlagende Herz würde die mikrochirurgische Operation behindern. Sowohl hierfür als auch für den pulmonalen Gasaustausch wird der Einsatz der ECC erforderlich. Sie erfolgt mit einem „Hollow-Fiber"-Membranoxygenator, einem Roller-Pumpen-System, mit Wärmeaustauscher und einem Mikrofilter am Oxygenator-Ausgang. Das Blut wird in den verschiedenen Phasen über eine Doppelkanüle im rechten Vorhof und in der Vena cava inferior entnommen, durchläuft die ECC und wird über eine Kanüle in der Aorta ascendens dem Körperkreislauf zurückgegeben. Entsprechend dem metabolischen Bedarf, der anhand der zentralvenösen Sauerstoffsättigung ermittelt wird, wird ein nicht-pulsatiler Fluss (Q`) von 2 bis 3 l/min/m² aufrechterhalten. Eine primäre Füllung des Systems der ECC (Priming-Lösung) erfolgt mit einer kristalloiden Lösung (Tabelle 1). Während der Zeit der ECC wird ein Hämoglobingehalt (Hb) von 7 – 8,5 g/dl als optimal angesehen, um die Fließeigenschaft des Blutes unter Hypothermie zu verbessern. Gegebenenfalls müssen in

Tabelle 1: *Priming-Lösung der ECC.*

Ringer Laktat	1600 ml
Mannit 20%	100 ml
Natriumbikarbonat 8,4 %	50 ml
Trasylol ®	2 Mega-I.E.
Heparin	2500 I.E.
Glucose 40%	10 ml

Abhängigkeit vom berechneten Blutvolumen, vom Priming-Volumen und vom Hb vor ECC blutgruppenkompatible Erythrozytenkonzentrate transfundiert werden, um den angestrebten Hb-Wert zu erreichen. Die ECC wird via alpha-stat-Regulation des Säure-Base-Haushalts gesteuert. Angestrebter Zielwert ist für eine suffiziente Ventilation ein $PaCO_2$ von 36 bis 40 mm Hg. Ein mittlerer arterieller Druck (MAP) von über 40 mm Hg wird bei Bedarf durch eine Noradrenalin-Infusion stabilisiert. Zum Ende des operativen Eingriffs wird die Blutflussrate durch die ECC reduziert und unter Kontrolle der Herzkontraktilität und intensiver Kontrolle von Hämodynamik und Vitalparameter erfolgt die Entwöhnung von der ECC. Nach Entfernen der venösen Kanülen erfolgt dann die Neutralisierung der Heparin-Wirkung mit Protamin; über den aortalen Zugang kann bei Bedarf die Kreislauffüllung gesteuert werden.

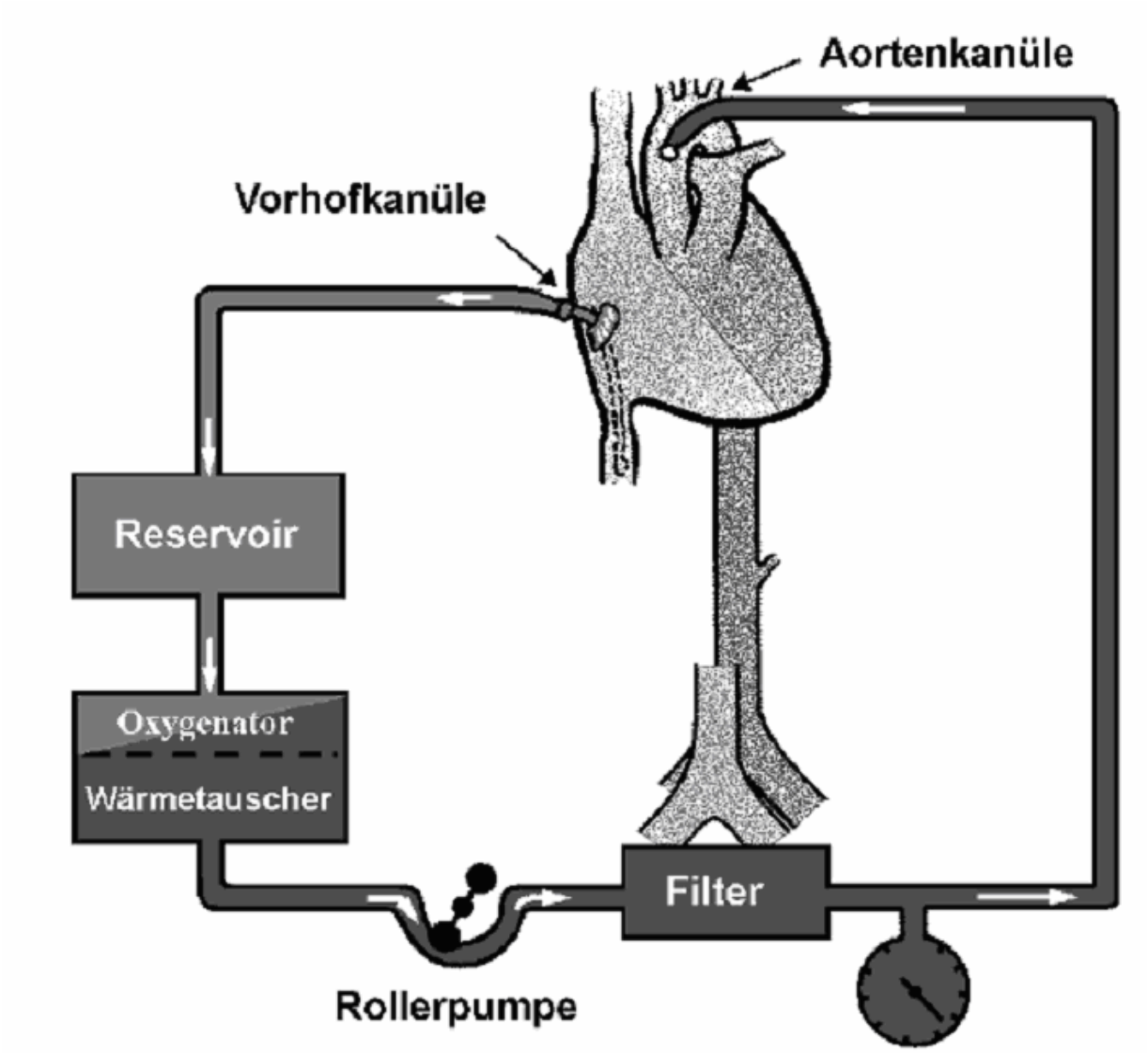


Abbildung 2:
Schematische Darstellung einer extrakorporalen Zirkulation. Blutentnahme aus der Vena cava inferior, Oxygenierung, Abkühlung oder Erwärmung und über einen Filter zurück in den Patientenkreislauf über die Aorta ascendens.

Seit Entwicklung der ECC stellt die Blutgerinnung mit der Bildung von Blutgerinnseln ein bis heute noch nicht optimal gelöstes Problem dar. Ein wesentlicher Schritt nach vorn wurde durch die Entdeckung 1916 von Heparin zur Gerinnungshemmung durch Jay McLean gemacht (McLean J, 1916). Heparin liegt physiologischer Weise in den Mastzellen des menschlichen Körpers vor. Zur adäquaten Gerinnungshemmung vor operativen Eingriffen mit Verwendung einer ECC ist aber eine zusätzliche Substitution von Heparin nötig. Parallel zum Heparin spielt das Antithrombin-III (AT-III) eine große Rolle, ohne das Heparin seine Wirkung nicht entfalten kann. Insbesondere konnte nachgewiesen werden, dass eine erniedrigte AT-III-Aktivität vor einer aortocoronaren Bypass-Operation (ACB-OP) unter Verwendung einer ECC intraoperativ zu einer ungenügenden Antikoagulation trotz Heparingabe führt (Dietrich et al., 2001). Ebenfalls konnte nachgewiesen werden, dass eine präoperative AT-III-Gabe in einem solchen Fall eine ausreichende AT-III-Aktivität wieder herstellt (Despotis GJ et al., 1997). AT-III liegt unter physiologischen Umständen mit 0,14 bis 0,39 g/l im Plasma vor und besitzt eine Aktivität von 70 bis 120% (Neumeister B et al., 2000). Heparin geht im Rahmen der Gerinnungsaktivierung mit AT-III eine Bindung ein, die als Komplex unter anderem die Umwandlung von Prothrombin zu Thrombin, als auch Fibrinogen in Fibrin-Monomere hemmt. Ohne AT-III ist Heparin wirkungslos. Es besteht eine deutlich erhöhte Embolisationsgefahr(Renz-Polster H, Braun J, 2001). Die Bedeutung der Gerinnungshemmung verdeutlichen zum Beispiel die Versuche von Pennington in den siebziger Jahren, eine Medtronic Zentrifugalpumpe ohne die Verwendung von Heparin zu betreiben, was systemische Embolisationen zur Folge hatte (Pennington et al., 1982). Da die Gabe von AT-III somit auch bei der Verwendung der ECC eine bedeutende Rolle spielt, liegt es nahe, sich mit Möglichkeiten der Gewinnung dieser Substanz für klinische Zwecke zu beschäftigen. Diese Arbeit untersucht die Wirksamkeit eines gentechnisch gewonnenen AT-III (rh-AT-III) gegenüber humanem Plasma-AT-III (hp-AT-III) an Patienten, die sich elektiv einer ACB-OP unter Verwendung einer ECC unterziehen. Zur Durchführung einer ACB-OP unter Einsatz der ECC bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit ist eine vollständige Antikoagulation erforderlich, um die Aktivierung der Blutgerinnung durch die Fremdoberflächen der ECC und ein Verstopfen des Oxygenators zu verhindern. Die vollständige Antikoagulation wird seit vielen Jahren mittels intravenöser Applikation von Heparin erreicht und bis zum Ende des Einsatzes der ECC durch erneute Bolusinjektionen von Heparin aufrechterhalten (Dietrich W et al., 1991). Nach Beendigung des Verfahrens und nach Wiedererlangung der eigenen Herzaktion kann die Antikoagulation durch das Heparin mit einem Antidot, dem Protamin, in wenigen Minuten antagonisiert und eine Normalisierung

der Blutgerinnung erreicht werden (Boldt et al., 1992). Bei einigen Patienten kann jedoch mit Heparin in der üblichen Dosierung von 300 U/kg KG keine zufriedenstellende Antikoagulation erreicht werden (Mabry et al., 1979). Eine aktivierte Gerinnungszeit (ACT, activatet clotting time) zwischen 300 s bis 400 s und kleiner 500 s wird für die Durchführung einer ACB-OP mit ECC vorausgesetzt, weil hierunter ein Minimum an intra- und extravasaler Gerinnung erreicht wird (Shore-Lesserson L, 1999; Young et al., 1978). Eine entsprechend hohe ACT von mindestens 480 s wurde für diese Studie als Maß einer akzeptablen Gerinnungshemmung festgesetzt (Bharadwaj et al., 2003). Die Antikoagulation durch Heparin kann mittels der ACT in wenigen Minuten direkt am Patienten gemessen und beurteilt werden. Hierbei wird Nativblut zu einem Oberflächenaktivator, welcher unter physiologischen Umständen auch im Gefäßsystem vorkommt, gegeben und dann die Gerinnungszeit gemessen. Genauere Labormethoden, wie die Bestimmung der partiellen Thromboplastinzeit (PTT) u.a. sind für den intraoperativen Einsatz ungeeignet, da die Ergebnisse nicht zeitgerecht erlangt werden können. In mehreren Studien wurde festgestellt, dass die ACT als indirekte Messmethode der Blutgerinnung am besten für den intraoperativen Einsatz geeignet ist (Hattersley P, 1966), da sie zeitnah im OP oder am Patientenbett durchgeführt werden kann (Despotis GJ et al., 1997). In der Studie wird eine Heparinresistenz bei dem individuellen Patienten angenommen, wenn die ACT nach Heparingabe den Zielwert von über 480 s nicht erreicht (van Cott EM, Lapoata M, 2001). Verschiedene Untersuchnungen (Despotis GJ et al., 1997; Dietrich et al., 1984; Hashimoto et al., 1994) weisen daraufhin, dass eine erniedrigte AT-III-Aktivität die häufigste Ursache der Heparinresistenz ist. Sie tritt bei übermäßigem Verbrauch der Gerinnungsfaktoren auf, zum Beispiel nach einem schweren hämorrhagischem Schock, wird aber auch bei Synthesestörungen im Rahmen von Lebererkrankungen beobachtet (Neumeister B et al., 2000). Auch wurden angeborene Störungen der AT-III-Synthese mit autosomal dominantem Erbgang beschrieben (Kuang et al., 2001). Eine Aktivitätsminderung von AT-III findet sich auch bei metabolischer oder respiratorischer Azidose und beim nephrotischen Syndrom. Bei Vitamin K Mangel oder Erhöhung der akute-Phase-Proteine kann die AT-III-Aktivität erhöht sein.

Unter physiologischen Umständen spielen viele verschiedene Blut- und Zellfaktoren in der komplexen Gerinnungskaskade eine Rolle. Hier werden vereinfacht die Grundlagen der Blutgerinnung dargestellt. Bei Kontakt des Blutes mit der ECC wird über den aktivierten Faktor XII in Verbindung mit Kollagenfasern und proteolytischen Enzymen und durch Gewebefaktoren gemeinsam der Faktor X aktiviert. Dieser aktiviert seinerseits mit

Plasmafaktor V und Calcium die Umwandlung von Prothrombin in Thrombin. Thrombin wiederum aktiviert Fibrinogen zu Fibrin-Monomere und weiterhin die Verbindung zum Fibrin durch Aktivierung des fibrinstabilisierenden Faktors XIII. Um eine Blutgerinnung über die lokale Reaktion hinaus zu verhindern, wird eine ausgleichende Gerinnungshemmung benötigt. Hier greift AT-III in Verbindung mit Heparin als Komplex ein und hemmt die Thrombinwirkung auf die Umwandlung von Fibrinogen in Fibrin, wobei Heparin als Katalysator mit 1000facher Beschleunigung fungiert, ohne AT-III ist Heparin wirkungslos. Weitere Bindungen erfolgen an die Gerinnungsfaktoren II, IX, X, XI und XII, die ihrerseits gehemmt werden. Unter physiologischen Umständen liegt im menschlichen Körper ein Gleichgewicht zwischen gerinnungsaktivierenden und gerinnungshemmenden Stoffen vor. Fibrin-Monomere sind im Blutplasma mit weniger als 10 nmol/l vorhanden. Sie werden mittels ELISA oder Affinitätschromatographie durch Bindung von Fibrinogen an Fibrin-Monomere gemessen. Eine Erhöhung der Konzentration liegt bei einem thrombembolischen Geschehen vor, wie zum Beispiel bei laufender Antikoagulationstherapie unter ECC und bei Verbrauchskoagulopathie. Bei einer Halbwertszeit von wenigen Minuten sind Messfehler schnell möglich, bei Vorliegen großer Wundflächen kommt es durch physiologische Erhöhung der Fibrin-Monomere ebenfalls zu fehlerhaften Messwerten (Silbernagl S, Despopoulos A, 1991). Auch D-Dimere dienen als Maß für die intravasale Gerinnungsaktivität. Sie entstehen als Fibrinspaltprodukte durch Plasmin und ligen unter physiologischen Umständen mit einer Konzentration von weniger als 0,4 mg/l im Blut vor. Ihre Messung erfolgt mittels ELISA oder einem Latex-D-Dimer-Schnelltest. Zu Messwerterhöhungen kommt es bei intrvasaler Gerinnung mit anschließender Fibrinolyse und Hyperfibrinolyse insbesondere bei Operationen mit ECC. Fehlermessungen treten auch bei diesem Parameter schnell auf, eine falsch hohe Messung tritt zum Beispiel bei Leberzirrhose, Tumorerkrankungen, größeren Wundflächen und nach Streptokinase- und Urokinasetherapie auf. Bei Gewebsschäden wird das Gerinnungsystem aktiviert (Silbernagl S, Despopoulos A, 1991) und damit die Thrombenbildung.

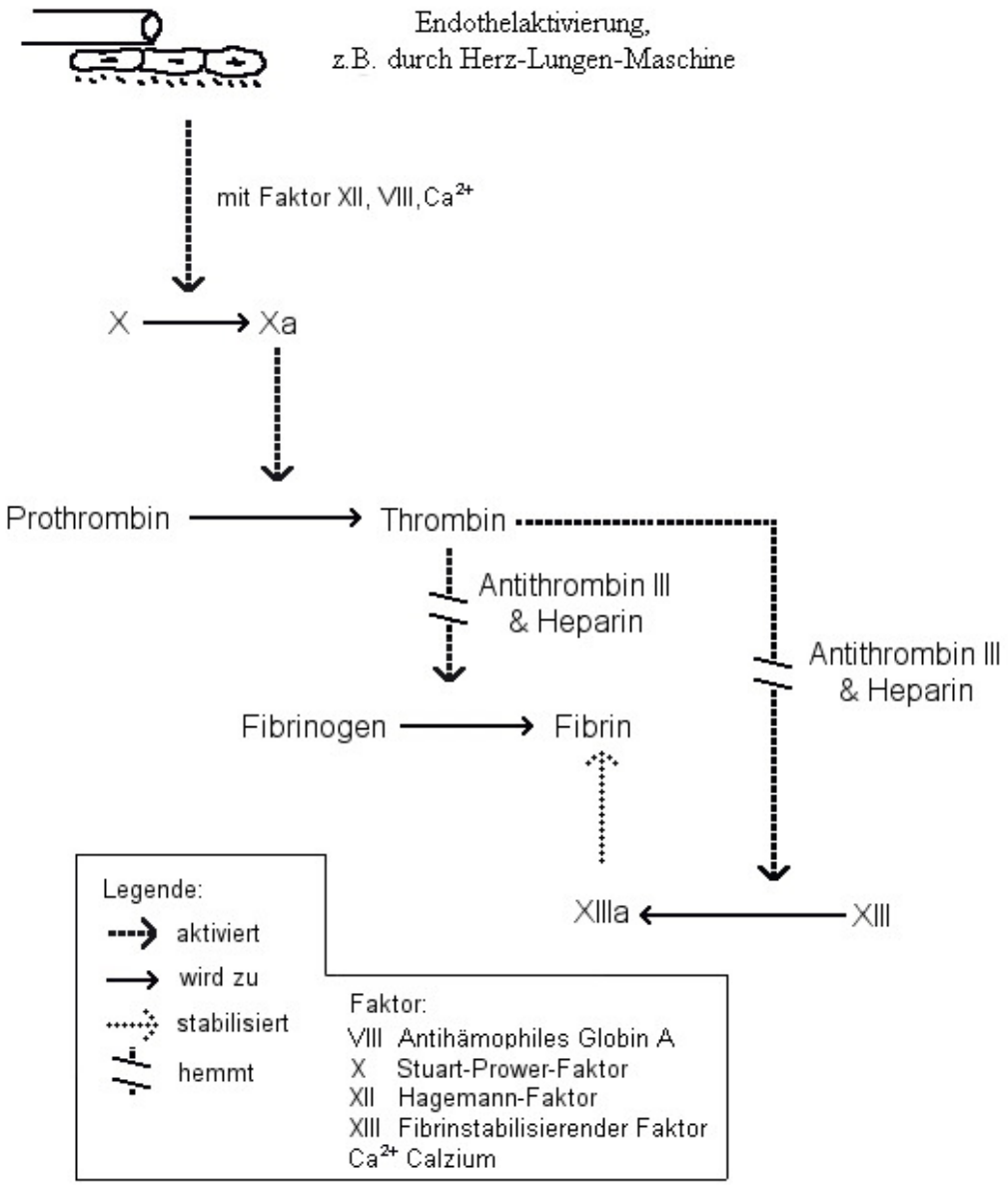


Abbildung 3:
Schematische Darstellung der Gerinnungskaskade (angelehnt an Schmidt, Thews, Physiologie des Menschen, Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 26. Auflage, 1995, Abb. 21-11).

AT-III ist ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 58 000 Dalton, das in der Leber synthetisiert wird. Es besteht aus 432 Aminosäuren, drei Disulfidbrücken sowie Kohlenhydratseitenketten, die ca. 15% des Gesamtanteils ausmachen. AT-III wirkt als Serin-Protease-Inhibitor. Bei einem gesunden Menschen liegt ein Plasmaspiegel von 14 bis 20 mg/dl AT-III vor.

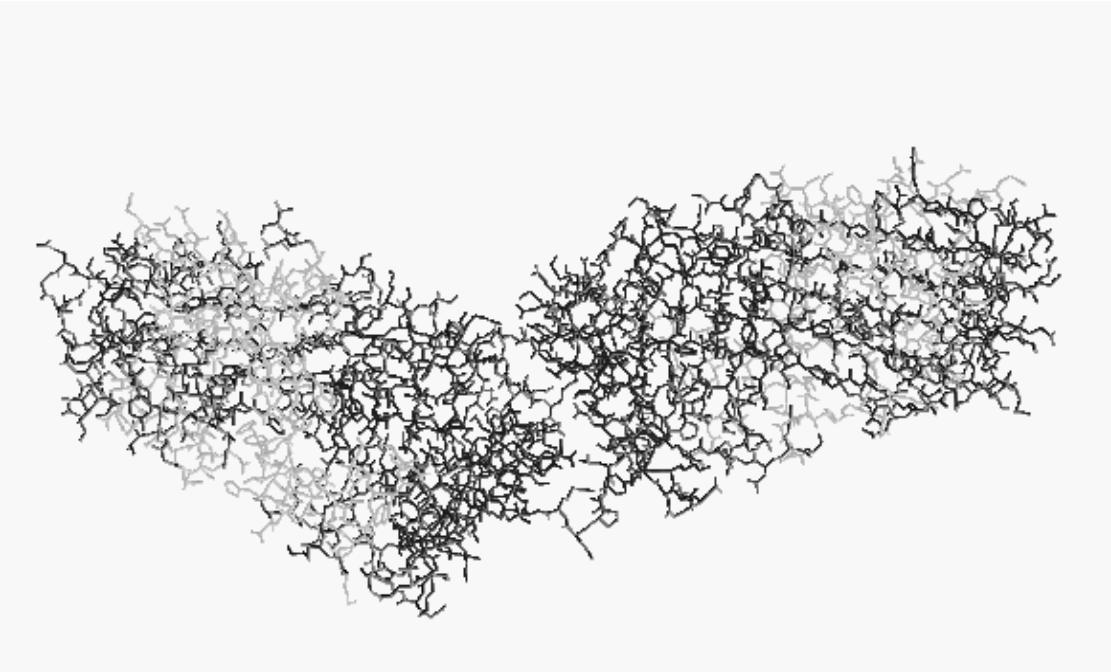


Abbildung 4:
Modell des Antithrombin-III.

Die Substitution von AT-III beispielsweise in Form von „fresh-frozen-plasma“ (FFP) oder als hp-AT-III-Konzentrat normalisiert die AT-III-Aktivität und verbessert konsekutiv die Heparinwirkung. Bisher wird hp-AT-III im Fall einer Heparinresistenz substituiert; hp-AT-III birgt aber trotz aller Vorsichtsmaßnahmen bei der Gewinnung ein Infektionsrisiko, insbesondere Infektionen mit dem humanen Immundefizit-Virus (HIV) und Hepatitisinfektionen, Hepatitis B und Hepatitis C sind wiederholt aufgetreten. Auch ist das Gewinnungsverfahren von hp-AT-III kostenintensiv und es werden humane Blutspender benötigt. Bereits seit mehreren Jahren sucht man mittels Genmanipulation an Tieren nach einer Möglichkeit, Medikamente für den menschlichen Bedarf zu entwickeln. Diese Entwicklung soll eine kostengünstigere Produktion ermöglichen, größere Mengen des entsprechenden Produktes produzieren, aber auch mehr Sicherheit des Produktes in Bezug auf Infektionsrisiken. Bereits seit einigen Jahren befindet sich ein neues Antithrombinkonzentrat im Zulassungsverfahren nach dem Arzneimittelgesetz. Es wird aus genetisch veränderter Ziegenmilch produziert (Denman et al., 1991). Ziegen sind eine Tierart, die leicht zu halten ist und sich aufgrund einer kurzen Gestationszeit und langer geschlechtlicher Reifezeit komplikationslos fortpflanzen kann. Mit einem Milchzyklus von mehr als zehn Monaten im Jahr und einer durchschnittlichen Milchmenge von etwa 2,5 l pro Tag mit 1 g Rohprotein pro l Milch stellen die weiblichen Milchdrüsen der Ziegen einen sehr potenten Bioreaktor dar. Es besteht die Möglichkeit, im Vergleich zu bisherigen Zellkulturen statt der 0,2 bis 1,0 g/l sogar 2,0 bis 10,0 g/l rekombinantes Eiweiß aus dem Kulturmedium zu gewinnen. Gentechnisch

wurde während der frühen Embryonalphase der Ziege das entsprechende Gen des Proteins, ein ß-Casein, mit samt seinem Promotor aus der Desoxyribonucleinsäure-Kette (DNS) herausgeschnitten und über eine Polymerasekettenreaktion (PCR) und einen Plasmidring mit dem humanen AT-III-Gen zusammengefügt. Die entstandene Ziegen-ß-Casein-AT-III-Desoxyribonucleinsäure (ATcDNS) wurde zwischen dem 2. und dem 7. Exon wieder in die Ziegen-DNS eingebaut (Ebert KM et al., 1991; Ebert KM et al., 1994; Roberts et al., 1992; Edmunds T, 1998). Im weiteren Verlauf wurden die Genträger der ersten Generation mittels Genanalyse aus Ohrgewebe und Blutuntersuchungen identifiziert (F0-Generation). Die männlichen Genträger wurden mit normalen Weibchen gepaart und die Milch der gentragenden Töchter (F1-Generation) gepoolt (Ebert KM et al., 1991; Ebert KM et al., 1994). Über ein komplexes chemisches Reinigungsverfahren wurde das AT-III aus den Milchproteinen isoliert. In umfangreichen Analysen wurde bereits festgestellt, dass sich hp-AT-III und rh-AT-III in ihren chemischen und strukturellen Eigenschaften stark ähneln (Edmunds T, 1998; Ebert KM et al., 1991; Ebert KM et al., 1994). Geringfügige Unterschiede lassen sich in der Glykosylierung der Oligomannosestrukturen der Heparinbindungsstellen finden (Edmunds T, 1998), was zu einer gesteigerten Bindungskapazität an Heparin und Thrombin führt. Es sind bereits mehrere In-vitro-Studien zu rh-AT-III durchgeführt worden (Schwartz et al., 1989). Eine dieser Studien ergab bei 20 gesunden freiwilligen männlichen Probanden, dass eine Dosis von 8 bis 171 U/kg rh-AT-III einem Anstieg des AT-III von über 500% vom Ausgangswert unter guter Verträglichkeit erzielen kann (Lu et al., 2000; Dietrich et al., 1984). In einer weiteren Studie ergab sich bei guter Verträglichkeit ein sicherer Anstieg der AT-III-Aktivität vom Ausgangswert bei Gaben von 75 U/kg rh-AT-III für die Eingriffsdauer einer ACB-OP (Avidan et al., 2005; Levy et al., 2002). In placebokontrollierten Studien konnten nur diejenigen Patienten, die das rh-AT-III erhalten hatten, einen signifikanten Anstieg der ACT über 480 s verzeichnen. Bei allen übrigen Testpersonen, die als Placebo stattdessen die gleiche Menge Infusionslösung erhalten hatten, kam es zu einem signifikanten Abfall der AT-III-Aktivität. Zusammenfassend stellte sich heraus, dass Dosierungen zwischen 75 und 125 U/kg KG rh-AT-III eine effektive Hemmung des Thrombins und der Fibrinolyse erreichen können (Roberts et al., 1992; Avidan et al., 2005; Rogalski et al., 1998).

3. Eigene Fragestellung

Ziel dieser Studie ist die Untersuchung des Einflusses von additivem rh-AT-III bei Heparinresistenz auf die ACT bei Patienten mit elektiver ACB-OP unter Einsatz einer ECC im Vergleich mit hp-AT-III.
Als zweiter Endpunkt wurde der Vergleich zweier unterschiedlicher AT-III-Dosierungen auf die Antithrombin-Aktivität gesetzt.

4. Material und Methoden

4.1 Auswahl der Patienten

Nach Zustimmung der Ethikkommissionen wurden 47 Patienten mit koronarer Herzkrankheit und Heparinresistenz in die Untersuchung eingeschlossen, die sich einer elektiver ACB-OP unter Einsatz einer ECC unterziehen mussten. Die Studie war Teil einer Multi-Center-Studie in der Zeit von November 1998 bis Juni 1999 an insgesamt zehn Zentren in Europa und den U.S.A. nach Zulassung durch die zuständigen Ethikkommissionen European Independent Ethics Committee (IEC), Institutional Review Board (IRB), Food and Drug Administration (FDA) und International Conference on Harmonization (ICH).
Nach Aufklärung über Studienziele sowie über mögliche Nebenwirkungen und besondere Verhaltensweisen willigten die Patienten schriftlich in die Teilnahme an der Studie ein. Die Patienten wurden einer ausführlichen Anamnese und körperlichen Untersuchung unterzogen, um alle Kriterien zu erfassen, die dem Einschluss in die Studie hätten entgegenstehen können. Grundvoraussetzung für eine Teilnahme stellte die intravenöse Heparin-Therapie innerhalb der letzten sechs Stunden vor Beginn des operativen Eingriffs mit nachfolgender Heparinresistenz dar. Andere gerinnungshemmende Substanzen durften präoperativ nicht verabreicht werden. In den folgenden Tabellen 2 und 3 sind die Ein- und Ausschlusskriterien aufgeführt.

Tabelle 2: *Einschlusskriterien.*

- Alter zwischen 18 und 85 Jahren
- Männliche oder nicht schwangere weibliche Patienten
- Elektive aortocoronare Bypass-Operation unter extrakorporaler Zirkulation
- Intravenöse Heparin-Therapie innerhalb der letzten sechs Stunden präoperativ
- Vom Patienten unterschriebene Einwilligungserklärung nach den Vorgaben der zuständigen Ethikkommission
- ACT von unter 480 s nach initialer Heparingabe von 300 U/kg KG

Tabelle 3: *Ausschlusskriterien.*

- Antifibrinolytische Therapie (Tranexamsäure, Aprotinin, epsilon-Aminokapronsäure)
- Instabile Angina pectoris auch unter Therapie
- Infektion mit humanen Immundefizit-Virus (HIV) oder Hepatitis-Viren
- Allergie gegen Ziegenmilch oder Ziegenprodukte
- Vorbekannte Gerinnungsstörungen z. B. von Willebrand-Krankheit etc.
- Patienten, die innerhalb der letzten 48 Stunden gerinnungshemmende Substanzen, Fibrinolytika wie zum Beispiel Streptokinase oder tPA erhielten oder noch erhalten, Cumarinderivate wie zum Beispiel Warfarin in den letzten 3 Tagen oder Thrombozytenaggregationshemmer, zum Beispiel Abciximab in der letzen Woche erhielten.

Die auf diese Weise ausgewählten Patienten wurden randomisiert in eine von drei Gruppen eingeteilt, die sich in Bezug des verabreichten Antithrombins unterschieden:

- Die Gruppe I erhielt humanes Plasma-Antithrombin-III (15 U/kg KG)
- Die Gruppe II erhielt genetisch rekombinantes Antithrombin-III (15 U/kg KG)
- Die Gruppe III erhielt genetisch rekombinantes Antithrombin-III (75 U/kg KG)

4.2 Studienverblindung

Bereits vor Studienbeginn wurde durch die Firma Genzyme ein Verteilungsprotokoll erstellt. Nur eine im Voraus bestimmte Person im Studienteam erhielt dieses Verteilungsprotokoll und war für die Einhaltung der Studienverblindung verantwortlich. Die Antithrombineinheiten wurden vordosiert an die teilnehmende Klinik geliefert und mussten unmittelbar vor Verabreichung auf ein Gesamtvolumen von 60 ml verdünnt werden. Die Studienmedikation wurde als Einmalbolusgabe intravenös verabreicht.

4.3 Das anästhesiologische Vorgehen

Der operative Eingriff wurde unter Vollnarkose und unter Einsatz einer ECC durchgeführt. Am Vorabend des operativen Eingriffs erfolgte eine Prämedikation mit dem Benzodiazepin Flurazepam (0,1 mg/kg KG) und 60 Minuten vor Beginn der Anästhesie mit dem Alpha-2-Adrenorezeptor-Agonisten Clonidin (2 µg/kg KG). Nach drei- bis fünfminütiger Präoxygenierung wurde die Narkose mit dem Opioid Sufentanil (0,5 µg/kg KG) zur Analgesie und dem Hypnotikum Etomidat (0,2 mg/kg KG) eingeleitet, zur vollständigen Muskelrelaxierung erhielten die Patienten Pancuronium (0,1 mg/kg KG). Unter

laryngoskopischer Kontrolle wurde eine Magensonde gelegt, um gegebenenfalls Mageninhalt abzusaugen und eine Aspiration zu vermeiden. Im Anschluss wurden die Patienten orotracheal intubiert und kontrolliert beatmet. Zur invasiven Druckmessung und Blutgasanalyse wurden die Patienten vor Beginn der Narkoseeinleitung mit einem arteriellen Zugang in der Arteria radialis versorgt. Weitere Überwachung der Herz-Kreislaufsituation erfolgte mittels elektrokardiographischer Kontrolle, sowie Pulsoxymetrie zur peripheren Kontrolle der Sauerstoffsättigung. Unter sterilen Bedingungen wurde ein zentralvenöser Zugang zur kontinuierlichen Messung des zentralen Venendrucks sowie zentralvenöser Blutgasanalysen gelegt. Über eine Schleuse und einen Führungsdraht wurde per Seldingertechnik ein dreilumiger Katheter in die Vena jugularis interna oder externa eingeführt und fixiert. Eine regelrechte renale Ausscheidung wurde durch Anlage eines Blasendauerkatheters kontrolliert.
Die Narkose wurde durch kontinuierliche Infusion mit Propofol (2 mg/kg/h) und Sufentanil (0,2 µg/kg/h) aufrechterhalten. Vor Beginn des operativen Eingriffs wurde eine sorgfältige Lagerung zur Vermeidung von Nervenschäden und Durchblutungsschäden vorgenommen.

4.4 Studiendurchführung

Nach abgeschlossener Einleitung der Narkose wurde die ACB-OP begonnen. Die Durchführung des operativen Eingriffs erfolgte nach Klinikstandard. Vor Anschluss an die ECC erfolgte die Heparinapplikation von 300 U/kg KG. Nach fünf Minuten wurde eine Messung der ACT durchgeführt. Wenn die ACT über 480 s betrug, konnte der jeweilige Patient endgültig randomisiert in eine der drei Gruppen eingeteilt werden. Bei ACT-Werten über 480 s schied der Patient aus der Untersuchung aus. Anschließend erfolgte doppelblind die Studienmedikation als intravenöser Bolus von 60 ml Flüssigkeit. Fünf Minuten nach Applikation der Studienmedikation wurde erneut die ACT gemessen (Zeitpunkt 5 Minuten nach Studienmedikation). Anschließend wurde der Patient an die ECC angeschlossen und die ACB-OP wie geplant fortgesetzt. Eine weitere ACT-Messung erfolgte 30 Minuten nach Beginn der ECC (Zeitpunkt 30 Minuten ECC). Während der gesamten Zeit an der ECC wurde die Heparin-Therapie anhand der ACT gesteuert. Eine letzte ACT-Messung (Zeitpunkt Vor Protamin) erfolgte dann nach dem erfolgreichen Abgang von der ECC unmittelbar vor der Verabreichung des Protamins zur Neutralisierung der Heparinwirkung. Erst wenn der Patient hämodynamisch und von Seiten des Kreislaufs stabil war, konnte die ACB-OP beendet werden. Noch in Narkose erfolgte die Verlegung auf eine Intensiveinheit. Dort wurde bis zur Stabilisierung des Zustandes des Patienten die Narkose fortgeführt und anschließend beendet.

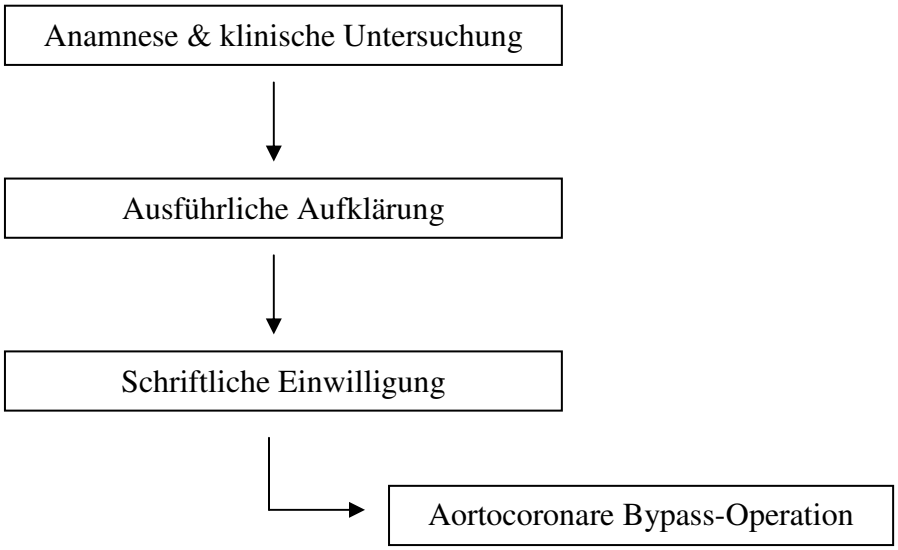


Abbildung 5:
Schematische Darstellung des Studienablaufes.

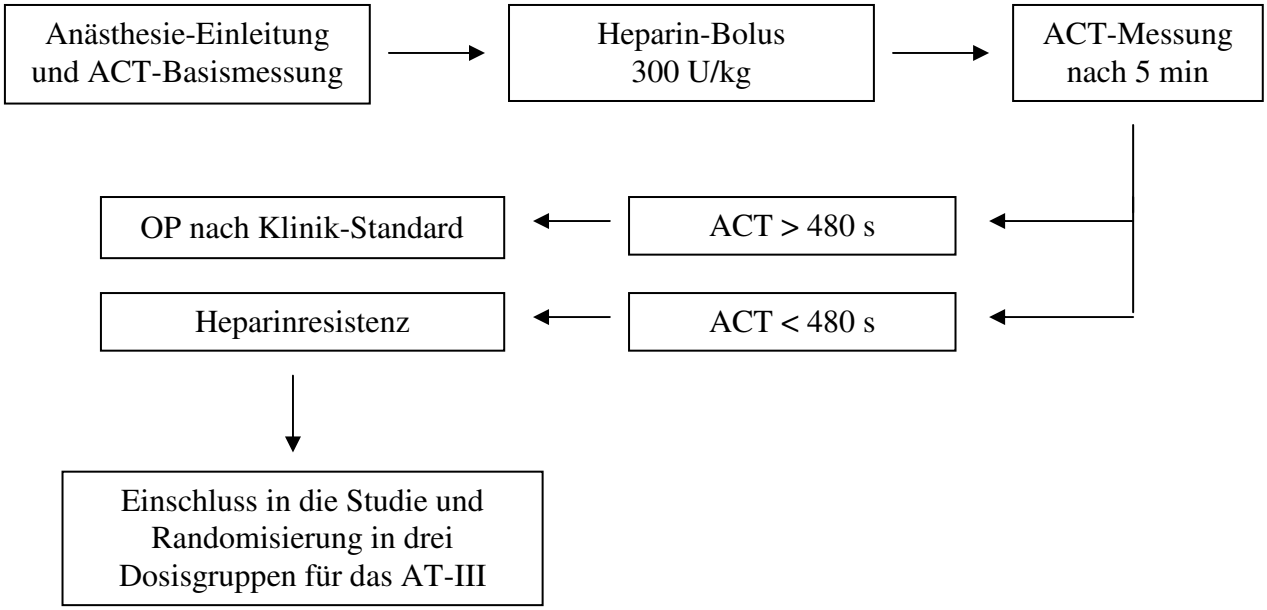
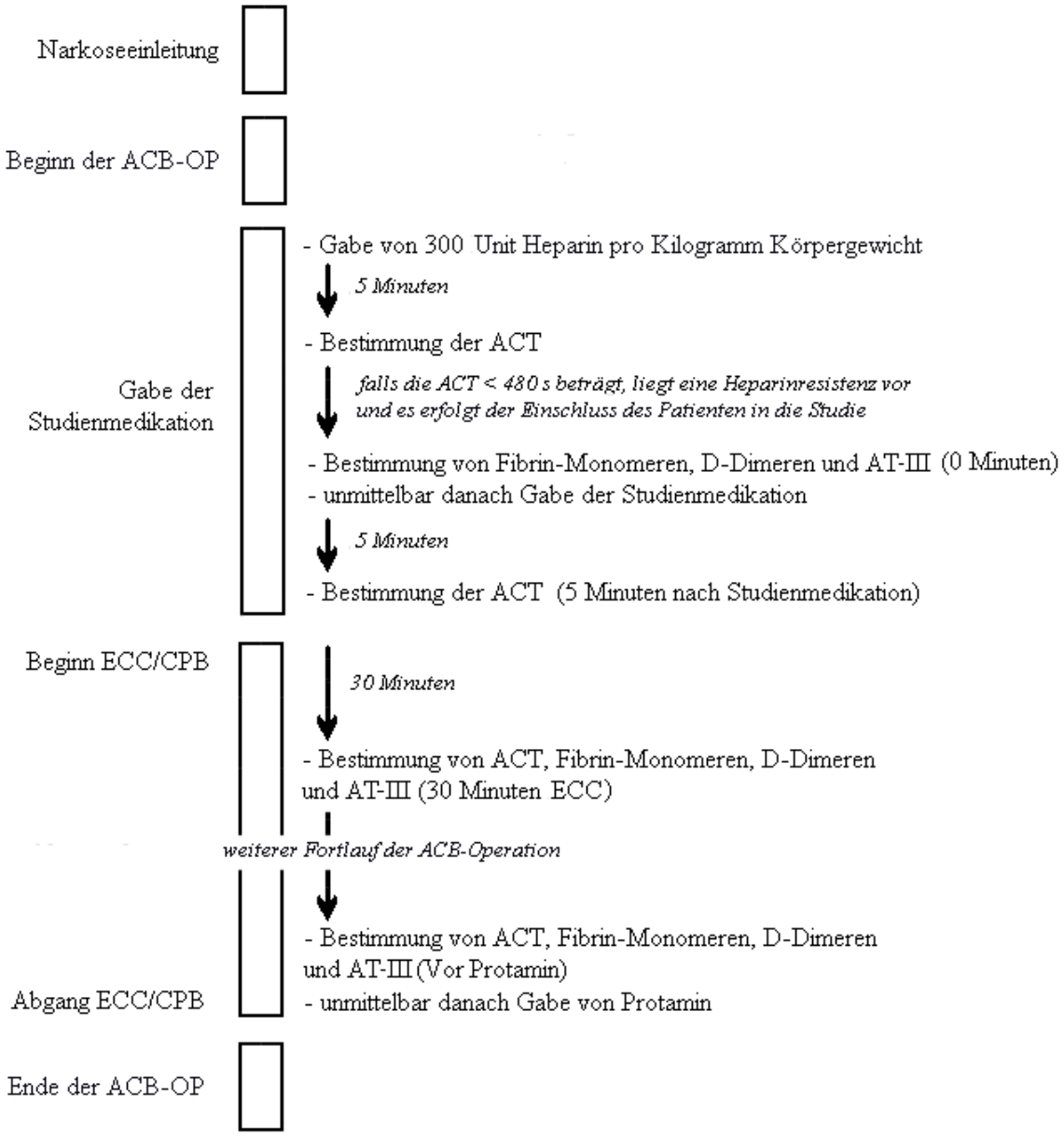


Abbildung 6:
Schematische Darstellung des Studieneinschlusses.

4.5 Überwachungsparameter

Die teilnehmenden Patienten wurden während der Studie gemäß den Vorgaben der guten klinischen Praxis therapiert und überwacht. Vitalparameter inklusive kontinuierlichem invasiven hämodynamischen Monitoring und Elektrokardiographie sowie klinischer Laborparameter wurden erfasst. Zusätzlich zu den Messungen der aktivierten Gerinnungszeit wurden parallel die Veränderungen von Fibrin-Monomere und D-Dimere mittels ELISA gemessen als Maß für die Wirkung des AT-III. Die Messungen erfolgten direkt vor Gabe der Studienmedikation sowie 30 Minuten nach Anschluss an die ECC und direkt vor Protamingabe. Die Messungen korrelieren mit der Thrombinaktivität, da Fibrinopeptide und Fibrin-Monomere als Abspaltungsprodukte aus der Wirkung von Thrombin auf Fibrinogen entstehen.

Tabelle 4: *Zusammenfassung der erfassten Studienparameter und Messzeitpunkte.*



4.6 Datenerfassung und Auswertung

Die Erstellung der Datenbanken, alle Berechnungen und statistische Tests wurden mit dem Programm Microsoft Excel 2002 und Stat View® Software 2000 vorgenommen. Die in der Auswertung dargestellten Gruppenvergleiche wurden mit dem unverbundenen t-Test unter Annahme verschiedener Varianzen durchgeführt. Im Folgenden wird als p das errechnete maximale Niveau bezeichnet, bei dem der Test die Nullhypothese noch ablehnt. Von einem statistisch signifikanten Gruppenunterschied wird gesprochen, wenn rechnerisch das Signifikanzniveau von $\alpha = 0{,}05$ unterschritten wird. Bei nicht signifikanten Ergebnissen der Teststatistik wird auf die Angabe von p verzichtet, und das Ergebnis als nicht signifikant bezeichnet.

5. Ergebnisse

5.1 Demographische Daten

An der Studie haben insgesamt 47 Patienten teilgenommen. Die Tabelle 5 zeigt die demographischen Daten der drei Patientengruppen. Bezüglich des Alters und des Gewichts bestehen keine Unterschiede zwischen den drei Gruppen. In der Geschlechtsverteilung überwiegen in allen drei Gruppen die männlichen Probanden, aber auch hier bestehen zwischen den einzelnen Gruppen keine Unterschiede.

	Gruppe 1 15 U/kg humanes AT-III	**Gruppe 2** 15 U/kg rekombinantes AT-III	**Gruppe 3** 75 U/kg rekombinantes AT-III
Patienten (n)	14	15	18
Alter (Jahre)	64 ± 10	57 ± 11	60 ± 8
Geschlecht (m/w)	11 / 3	11 / 4	17 / 1
Gewicht (kg)	68 ± 10	79 ± 14	86 ± 20

Tabelle 5:
Demographische Merkmale der Patienten in den drei verschiedenen Gruppen; n: Anzahl der Patienten; Alter als Mittelwert in Jahren ± Standardabweichung; Geschlecht m: männlich, w: weiblich; Gewicht als Mittelwert in kg ± Standardabweichung; AT-III: Antithrombin-III in U/kg.

5.2 Begleiterkrankungen

Die Tabelle 6 zeigt die relevanten Begleiterkrankungen der Patienten in den drei Gruppen. Zusätzlich zu den bei allen Patienten bestehenden kardiovaskulären Erkrankungen lässt sich ein gehäuftes Auftreten an metabolischen und endokrinen Erkrankungen beobachten, aber auch hier finden sich keine Unterschiede zwischen den drei Gruppen.

Begleiterkrankungen	**Gruppe 1** 15 U/kg humanes AT-III	**Gruppe 2** 15 U/kg rekombinantes AT-III	**Gruppe 3** 75 U/kg rekombinantes AT-III
Patienten (n)	14	15	18
COPD	2	3	7
Kardiovaskulär	14	15	18
Ulcus- und Refluxerkrankungen	0	1	2
Niereninsuffizienz	1	0	2
Metabolisch und endokrin	9	11	10

Tabelle 6:
Begleiterkrankungen der Patienten in den einzelnen Gruppen; n: Anzahl der Patienten; AT-III: Antithrombin-III in U/kg; COPD: chronisch obstruktive Lungenerkrankung; da ein Patient mehrere Vorerkrankungen haben konnte, kann die Summe der Erkrankungen größer als die Zahl der Patienten in der jeweiligen Behandlungsgruppe sein.

5.3 Messung der ACT

Die ACT wurde als Index für den Wirkungsgrad des Antithrombins auf die Gerinnung gemessen. Die Abbildung 7 gibt die gemessenen ACT-Werte wieder. Ein Vergleich der ACT-Werte der einzelnen Gruppen zu den Messzeitpunkten zeigt, dass die ACT in Gruppe 3 (75 U/kg rh-AT-III) zum Zeitpunkt 5 Minuten nach Studienmedikation höher ist als in Gruppe 1 (15 U/kg hp-AT-III). Die anderen ACT-Werte der drei Gruppen zu den übrigen Zeitpunkten unterscheiden sich nicht. In allen drei Gruppen stieg die ACT vom Beginn der ECC bis zum Zeitpunkt 30 Minuten ECC an, in der Gruppe 1 um 64%, in der Gruppe 2 um 73% und in der Gruppe 3 um 44%. Zum Zeitpunkt 3 vor Protamingabe fiel die ACT wieder leicht ab, in Gruppe 1 um 23%, in Gruppe 2 um 20% und in Gruppe 3 um 18%.

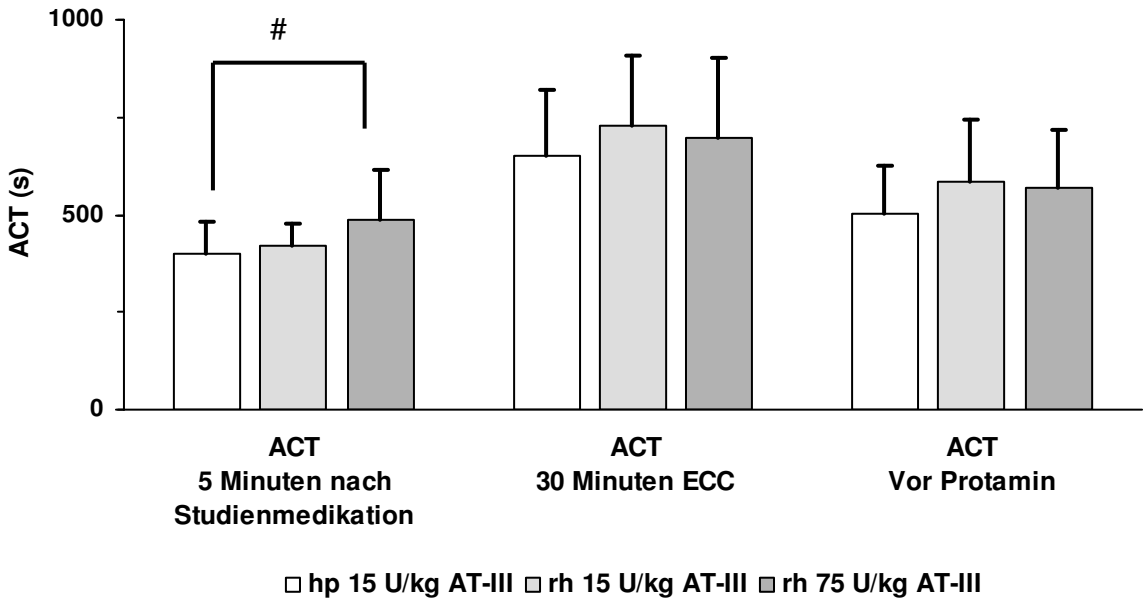


Abbildung 7:
Darstellung der ACT-Werte zu den drei Messzeitpunkten in den drei Behandlungsgruppen; Darstellung der Daten als Mittelwert und ± Standardabweichung; Ordinate: Aktivierte Gerinnungszeit (ACT) in s; Abszisse: einzelne Messzeitpunkte; 30 Minuten ECC: 30 Minuten nach Beginn der extrakorporalen Zirkulation; vor Protamin: direkt vor Protamingabe; rh-AT-III: rekombinantes Antithrombin-III in U/kg; hp-AT-III: humanes Plasma-Antithrombin-III in U/kg; #:p<0,05 zwischen den Gruppen hp 15 U/kg AT-III und rh 75 U/kg AT-III signifikant zum Zeitpunkt fünf Minuten nach Studienmedikation.

In Tabelle 7 wird das Verhältnis der Patienten, die eine ACT von über 480 s erreichten, zur Gesamtzahl der Patienten in der jeweiligen Gruppe dargestellt. In Gruppe 1 und 2 konnte jeweils bei einem Patienten, in Gruppe 3 bei 8 Patienten die angestrebte ACT gemessen werden.

	Gruppe 1 15 U/kg humanes AT-III	**Gruppe 2** 15 U/kg rekombinantes AT-III	**Gruppe 3** 75 U/kg rekombinantes AT-III
Gesamte Patientenanzahl	14	15	18
Zahl der Patienten, bei denen eine ACT > 480 s erreicht wurde	1 (7%)	1 (7%)	8 (44%)*

Tabelle 7:
*Anteil der Patienten in den einzelnen Gruppen, die die angestrebte aktivierte Gerinnungszeit erreichten, im Vergleich zur Gesamtpatientenzahl der jeweiligen Behandlungsgruppe als absolute Zahl und in %; ACT: Aktivierte Gerinnungszeit in s; AT-III: Antithrombin-III; *:p<0,05 im Vergleich der ACT-Werte zu Gruppe 1 humanes Plasma-Antithrombin-III.*

5.4 Messung der Fibrin-Monomere

Die Konzentration der Fibrin-Monomere wurde als Index für den Grad der intravasalen Gerinnungsaktivität gemessen. Die Messung erfolgte jeweils parallel zur Messung der D-Dimere und der AT-III-Aktivität. In der Abbildung 8 sind die entsprechenden Werte vor Beginn, während und am Ende der ECC dargestellt. Der Vergleich der drei Gruppen untereinander ergab hinsichtlich der Fibrin-Monomere weder im Verlauf noch zwischen den Gruppen Unterschiede.

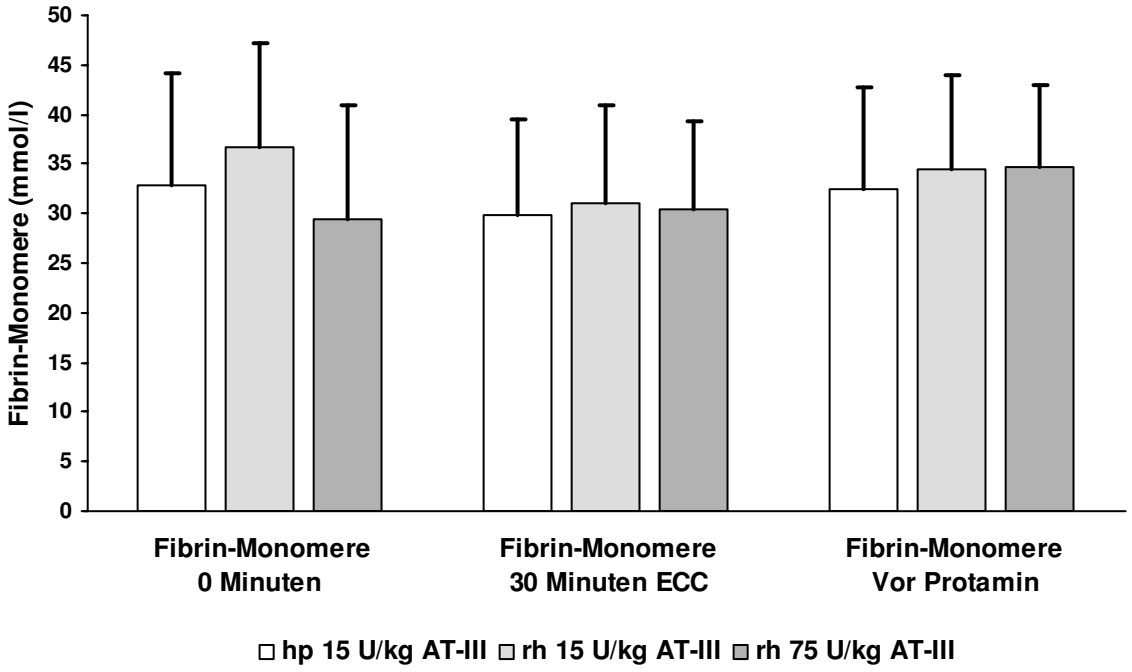


Abbildung 8:
Verlauf der durchschnittlichen Konzentration der Fibrin-Monomere zu den drei Messzeitpunkten in den drei Behandlungsgruppen; Darstellung der Daten als Mittelwert und ± Standardabweichung; Ordinate: Fibrin-Monomere in mmol/l; Abszisse: einzelne Messzeitpunkte (0 Minuten: direkt vor Gabe der Studienmedikation, 30 Minuten ECC: 30 Minuten nach Beginn der ECC, vor Protamin: direkt vor Protamingabe); hp-AT-III: humanes Plasma-Antithrombin-III in U/kg; rh-AT-III: rekombinantes Antithrombin-III in U/kg.

5.5 Messung der D-Dimere

D-Dimere als Spaltprodukte aus Fibrin und Fibrinogen dient ebenfalls als Index für eine erhöhte Gerinnungsaktivität bei Verwendung einer ECC. Die Ergebnisse dieser Messungen sind in Abbildung 9 verdeutlicht. Der Vergleich der drei Gruppen zu den einzelnen Zeiten untereinander ergab keine Unterschiede. Die D-Dimere stiegen zum Zeitpunkt 30 Minuten nach Beginn der ECC und weiter zum Zeitpunkt vor Protamin in allen Gruppen an. Zum zweiten Messzeitpunkt kam es zu einem Anstieg von 755% in Gruppe 1, 222% in Gruppe 2 und 422% in Gruppe 3. Zum dritten Messzeitpunkt kam es zum weiteren Anstieg von 117% in Gruppe 1, 370% in Gruppe 2 und 147% in Gruppe 3.

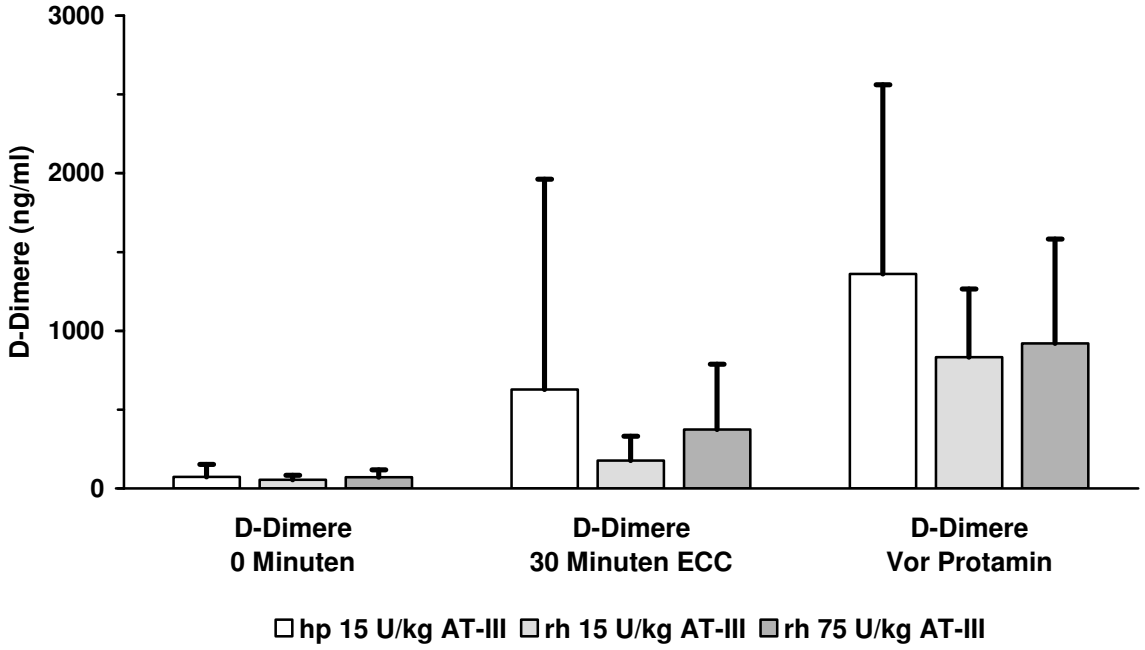


Abbildung 9:
Konzentration der D-Dimere zu den drei Messzeitpunkten in den drei Behandlungsgruppen; Darstellung der Daten als Mittelwert und ± Standardabweichung; Ordinate: D-Dimere in ng/ml; Abszisse: einzelne Messzeitpunkte (0 Minuten: direkt vor Gabe der Studienmedikation, 30 Minuten ECC: 30 Minuten nach Beginn der ECC, Vor Protamin: direkt vor Protamingabe); hp-AT-III: humanes Plasma-Antithrombin-III in U/kg; rh-AT-III: rekombinantes Antithrombin-III in U/kg.

5.6 *Aktivität des Antithrombin-III*

Die Abbildung 10 gibt die Messwerte für die Aktivität des AT-III wieder. In Abbildung 11 sind die Unterschiede im Zeitverlauf als Änderung vom Ausgangswert dargestellt. Zum Zeitpunkt 0 Minuten bestanden keine Gruppenunterschiede; dieser Zeitpunkt wird daher in der zweiten Abbildung ausgelassen. Im Verlauf stieg die AT-III–Aktivität in Gruppe 3 zum Messzeitpunkt 30 Minuten ECC um 33% an und blieb zum Messeitpunkt vor Protamingabe 22% höher als der Ausgangswert. In den Gruppen 1 und 2 fiel die AT-III-Aktivität zum Messzeitpunkt 30 Minuten nach Beginn der ECC um 22% bzw 17% ab und blieb dann unverändert erniedrigt.

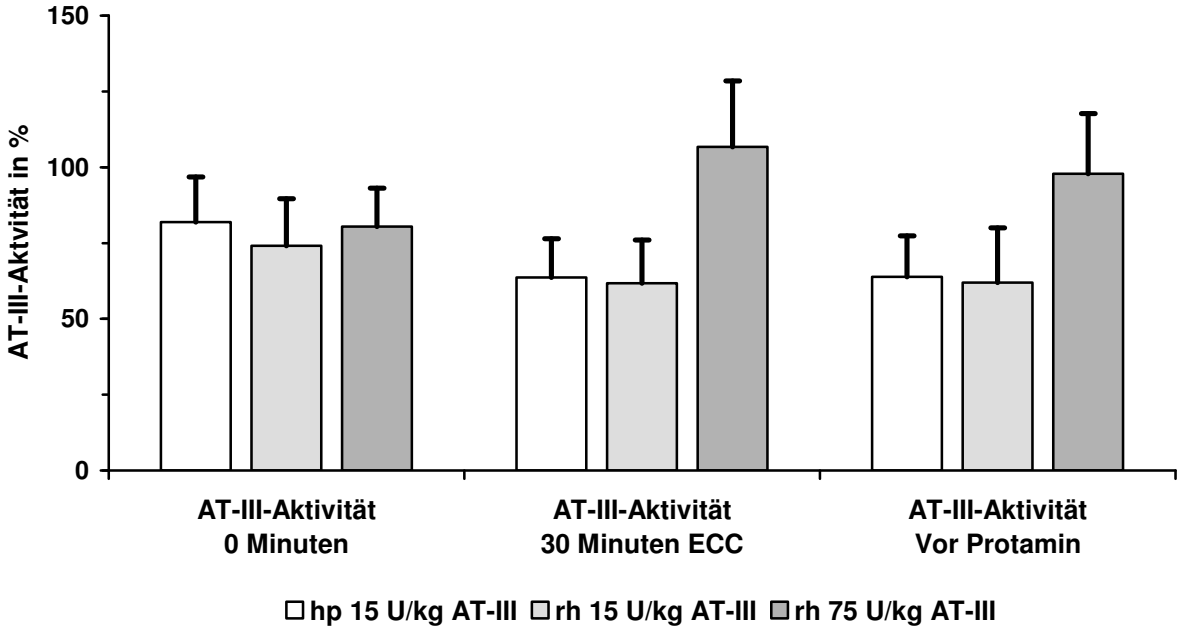


Abbildung 10:
Verlauf der Aktivität von AT-III zu den drei Messzeitpunkten in den drei Behandlungsgruppen; Darstellung der Daten als Mittelwert und ± Standardabweichung; Ordinate: Antithrombin-III-Aktivität in %; Abszisse: einzelne Messzeitpunkte (0 Minuten: direkt vor Gabe der Studienmedikation, 30 Minuten ECC: 30 Minuten nach Beginn der extrakorporalen Zirkulation, Vor Protamin: direkt vor Protamingabe); hp-AT-III: humanes Plasma-Antithrombin-III in U/kg; rh-AT-III: rekombinantes Antithrombin-III in U/kg.

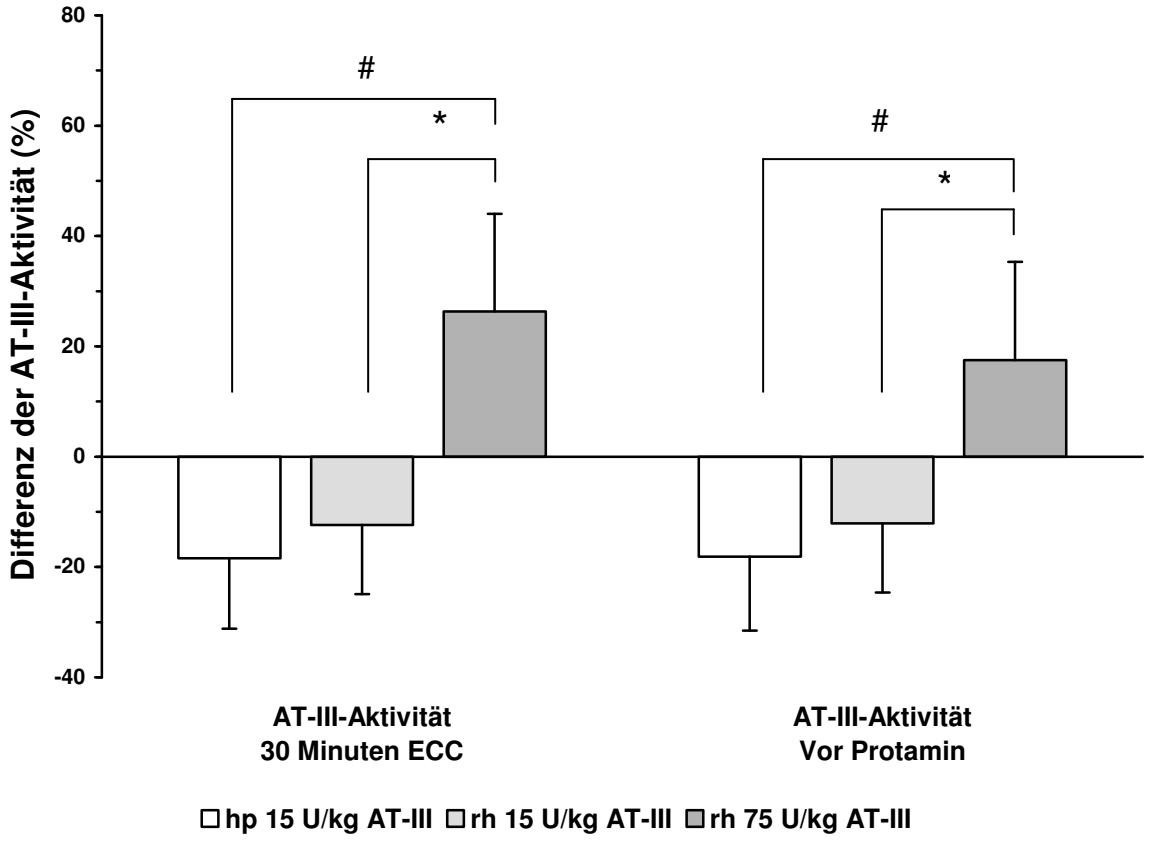


Abbildung 11:
*Signifikante Differenz der Aktivität von AT-III zu den zwei Messzeiten zum Ausganswert 0 Minuten in den drei Behandlungsgruppen; Ordinate: Differenz der Antithrombin-Aktivität in %; Abszisse: Messzeitpunkte (30 Minuten ECC: 30 Minuten nach Beginn der extrakorporalen Zirkulation, Vor Protamin: direkt vor Protamingabe); rh-AT-III: rekombinantes Antithrombin-III in U/kg; hp-AT-III: humanes Plasma-Antithrombin-III in U/kg; #:p<0,05 hp-AT-III versus 75U/kg rh-AT-III und *:p<0,05 15U/kg rh-AT-III versus 75U/kg rh-AT-III zu beiden Zeitpunkten.*

5.7 Sicherheit des genetisch rekombinanten Antithrombin-III

In keiner der drei Behandlungsgruppen kam es im Verlauf der Untersuchung zu Vorkommnissen, die als mögliche Nebenwirkungen der AT-III-Gabe gewertet wurden, alle körperlichen und psychischen Veränderungen nach Gabe der Studienmedikation bis vier Wochen postoperativ wurden auf andere Ursachen zurückgeführt. Alle Patienten wurden einem Virusscreening auf tierische Viren unterzogen. In allen vorliegenden Blutproben ließen sich keine tierischen Erreger nachweisen; die Blutproben wurden zu Sicherheit für zwei Jahre tiefgefroren zurückbehalten für eine mögliche spätere Nachuntersuchung. Letztendlich wurde bei keinem der Patienten, die rh-AT-III erhielten, eine nachteilige Wirkung festgestellt.

6. Diskussion

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass die additive Infusion von rh-AT-III (75 U/kg KG) bei 44% der Patienten mit Heparinresistenz eine ACT über 480 s erreichen. Im Gegensatz hierzu führte die Dosierung von 15 U/kg KG unabhängig ob rh-AT-III oder hp-AT-III in nur 7% zu dem gewünschten Effekt. Hier zeigt sich offenbar ein Dosiseffekt. Der Effekt der hohen Dosierung von 75 U/kg KG des rh-AT-III zeigte sich neben der ACT-Elevation auch in der AT-III-Aktivität: diese stieg nach der Infusion an und blieb bis zum Ende der ECC um 22% über dem Ausgangswert. Im Gegensatz hierzu nimmt die AT-III-Aktivität in den beiden Gruppen mit der niedrigen Dosierung mit Beginn der ECC im Vergleich zum Ausgangswert ab. Dieses Phänomen beruht sehr wahrscheinlich auf der Hämodilution durch das Priming-Volumen zu Beginn der ECC. Offenbar reicht nur die hohe AT-III-Dosierung aus, die AT-III-Aktivität soweit zu steigern, dass diese auch nach einer Hämodilution von etwa 30% noch erhöht bleibt. Die Auswirkung des Verdünnungseffektes durch das Priming-Volumen der Herz-Lungen-Maschine von 1,5 bis 2 l auf die Blutbestandteile wurde schon früher beobachtet. Linden und Gibbs beschrieben, dass die AT-III-Aktivität parallel zum Hämoglobin auf bis zu 50% vom Ausgangswert absinkt, sobald die Patienten an eine ECC im Rahmen von Herz-Operationen angeschlossen wurden (Linden et al., 2004a). Im Gegensatz zur AT-III-Aktivität steigt die ACT als Index für die Gerinnung mit Beginn der ECC offenbar aufgrund der Hämodilution in allen Gruppen deutlich an. Dieses Phänomen konnte auch in den Untersuchungen von Levy et al., Avidan et al. und van Aken et al. beobachtet werden. Für die Verwendung der ECC ist eine effektive Antikoagulation eine unabdingbare Vorraussetzung, da die Fremdoberfläche eine starke Aktivierung der körpereigenen Gerinnung auslösen und die so entstehenden Thromben sowohl den Durchfluss durch die Herz-Lungen-Maschine, insbesondere des Oxygenators und des Mikrofilters behindern, als auch im menschlichen Körper die Organperfusion aufgrund der Thromben im höchsten Maße gefährden würden. Zur Antikoagulation wird in der Kardiochirurgie hauptsächlich das gut steuerbare Heparin eingesetzt. Heparin beeinflusst vor allem die physiologische Wirkung des AT-III. AT-III ist der wichtigste Inhibitor der plasmatischen Gerinnung. Es inaktiviert vor allem die Faktoren IIa (Thrombin) und Xa durch irreversible Komplexbildung. In geringerem Maße werden auch die Faktoren IXa, XIIa und Plasmin inaktiviert. Die Reaktionsgeschwindigkeit der Komplexbildung ist sehr langsam, wird jedoch durch Heparin um das tausendfache beschleunigt.

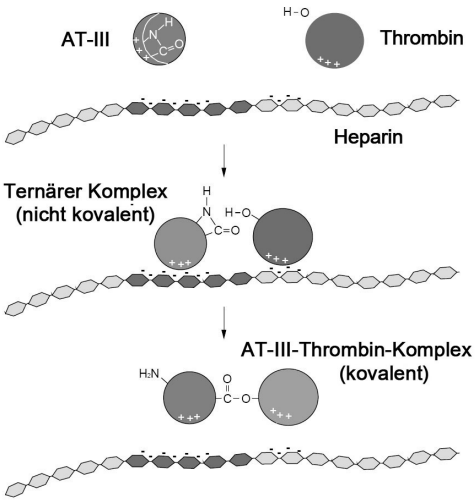


Abbildung 12:
Schematische Darstellung der beschleunigenden Wirkung des Heparins auf den AT-III-Thrombin-Komplex nach Lackner, Peetz 2004.

Durch die von Heparin beschleunigte Bildung des AT-III-Thrombin-Komplexes kann das Thrombin nicht mehr die Fibrinopeptide A vom Fibrinogen abspalten, so dass die Umwandlung von Fibrinogen zu Fibrin direkt gehemmt wird. Im Blut vorhandenes Fibrin vermindert die Gerinnungshemmung von Heparin. Bereits an Fibrin gebundenes Thrombin reagiert nicht mehr mit Heparin und AT-III. Ebenso reagiert das an die Gefäßwand gebundene Thrombin nicht mehr mit Heparin und entzieht sich so der Heparin-Wirkung (Hirsh et al., 2001; Shanberge et al., 1987; Vuylsteke et al., 2000). Heparin beeinflusst aber auch noch andere Faktoren der Blutgerinnung. Die Thrombozyten, die in inaktiver Form im Blut zirkulieren, werden durch Kontakt zu Endothelverletzungen aktiviert, verkleben miteinander und bilden den ersten Wundverschluss. In ihrer nun aktivierten Form setzen sie den Plättchenfaktor 4 (PF 4) frei. Heparin bindet an aktivierte Thrombozyten und erhöht damit die Freisetzung von PF 4. Dieser Faktor wiederum inaktiviert Heparin. Eine bereits präoperativ erhöhte Thrombozytenzahl kann auf diese Weise zu einer Verminderung der Wirkung von Heparin führen. Neben den Thrombozyten bewirken auch frische Wunden und Fremdoberflächen wie bei der ECC eine vermehrte Freisetzung von PF 4. Das Heparin wird durch diese Vorgänge gebunden und inaktiviert und kann dem AT-III nicht mehr als Katalysator dienen. Weiterhin steigen bei operativen Eingriffen und bei Kontakt mit Fremdoberflächen die Akute-Phase-Proteine an, zu denen auch das Fibrinogen zählt. Diese gehen mit Heparin eine Bindung ein und inaktivieren es (Preissner, Muller-Berghaus, 1987; Teoh et al., 1993; Wu et al., 1995; Young et al., 1992). Durch diese Mechanismen nimmt ein Teil der Heparin-Aktivität ab und kann die AT-III-Wirkung nicht mehr beschleunigen. Eine abnehmende Wirkung des Heparins wird als Heparinresistenz bezeichnet. Die dargestellten

Mechanismen können zumindest teilweise das sehr komplexe Phänomen der Heparinresistenz erklären. In der klinischen Praxis wird eine Heparinresistenz angenommen, wenn durch die einmalige Bolusinjektion von Heparin (300 U/kg KG) keine ACT von über 480 s erreicht wird. Es handelt sich hierbei um eine rein klinische Definition. Eine wissenschaftlich fundierte Definition wurde bisher nicht festgelegt. Die hier geforderte ACT von mindestens 480 s ist ein hoch angesetzter unterer Grenzwert. Beim gesunden Patienten ohne Antikoagulation betragen die ACT-Werte zwischen 70 – 180 s. Für kardiologische Interventionen werden ACT-Werte nach Heparininjektion von über 350 s angestrebt. Für kardiochirurgische Eingriffe unter Einsatz der ECC wurde ein optimaler ACT-Wert zwischen 400 s und 480 s festgelegt (van Cott EM, Lapoata M, 2001). Verschiedene Autoren konnten zeigen, dass es bei einer ACT unter 400 s zu einem Anstieg der Fibrin-Monomere und damit zum erhöhten Risiko einer Gerinnselbildung kommt (Shore-Lesserson L, 1999). Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass die in der vorliegenden sowie in mehreren Vergleichsstudien geforderte ACT von über 480 s einen klinisch praktikablen Wert mit einem gewissen Sicherheitsbereich nach unten darstellt. Dass eine leicht erniedrigte AT-III-Aktivität mit einer Heparinresistenz einhergehen kann, zeigt sich in Untersuchungen von Lemmer et al. (Lemmer, Jr., Despotis, 2002). Bei einigen Patienten mit zunächst präoperativ normaler AT-III-Aktivität fand sich nach Applikation von Heparin eine Heparinresistenz, und es zeigte sich, dass die AT-III-Aktivität im Verlauf der ECC unter den Normalwert abgesunken war. Allerdings wiesen auch einige Patienten eine Heparinresistenz auf, bei denen zu keinem Zeitpunkt niedrige AT-III-Spiegel bestanden hatten (Esposito et al., 1983; Linden et al., 2004b). In mehreren Untersuchungen wurde festgestellt, dass die präoperative kontinuierliche Heparintherapie das Risiko einer Heparinresistenz erhöhen und auch zu einer Verminderung der Antithrombin-Aktivität führen kann (Williams et al., 2000; Sabbagh et al., 1984; Linden et al., 2004b). Die Patienten der hier vorliegenden Untersuchung erhielten alle vor der Operation eine kontinuierliche Heparintherapie.

Eine kontinuierliche Heparintherapie kann die AT-III-Aktivität beeinflussen: Heparin agiert als AT-III-Agonist und beschleunigt dessen Bindung an Thrombin, so dass unter fortlaufender Heparininfusion die AT-III-Aktivität im Blut sinkt (Shore-Lesserson L, 1999). Eine metabolische oder respiratorische Azidose während der Zeit an der ECC oder ein massiver Verbrauch an Gerinnungsfaktoren als Ursache einer Heparinresistenz (Mammen et al., 1985) können durch fortlaufende Blutgasanalysen zur Steuerung der ECC und den Verlauf der Fibirn-Monomere und D-Dimere in den vorliegenden Untersuchungen ausgeschlossen werden.

Avidan et al. verglichen in einer ähnlich aufgebauten Untersuchung bei insgesamt 54 Patienten mit Heparinresistenz jedoch ohne kontinuierliche präoerative Heparintherapie die Wirkung von rh-AT-III mit 75 U/kg KG auf die ACT mit der einer Placebo-Infusion. Die Ergebnisse dieser Studie zeigten, dass das rh-AT-III in dieser hohen Dosierung in 81% der Fälle einen Anstieg der ACT auf über 480 s bewirkte. Bei den übrigen Patienten der AT-III-Gruppe (19%) musste zusätzlich FFP transfundiert werden, um die gewünschte ACT zu erreichen. Im Vergleich hierzu benötigten in der Placebo-Gruppe 81% der Patienten zusätzlich FFP und auch additive Dosen an Heparin zum Erlangen einer ausreichenden ACT. Auch van Aken et al. (van Aken H et al., 2000) und Levy et al. (Levy et al., 2002) fanden bei kardiochirurgischen Patienten mit Heparinresistenz, dass die einmalige Infusion von 75 U/kg KG rh-AT-III bei 79% der Patienten zu einer adäquaten ACT führte. Niedrigere AT-III-Dosierungen als Vergleich wurden in diesem Kontext weder von van Aken et al. noch von Avidan et al. untersucht (Avidan et al., 2005; van Aken H et al., 2000). Ähnlich wie bei unseren Untersuchungen erfolgte auch bei Levy et al. präoperativ eine kontinuierliche Heparintherapie. Insgesamt 36 Patienten mit Heparinresistenz wurden nach Heparingabe in Gruppen von je 3 Probanden rh-AT-III in Dosierungen von 10, 25, 50, 75 100, 125, oder 200 U/kg substituiert, eine Gruppe von 6 Patienten erhielt ein Placebo. Es kam ab einer Dosierung von 75 U/kg zu einer Normalisierung der AT-III-Aktivität, die auch bis zum Ende der ECC nicht mehr abfiel. Unter der höchsten Dosierung von 200 U/kg kam es zu einem Anstieg der AT-III-Aktivität bis auf 600 U/dl. Aber nicht nur die Wirkung auf die AT-III-Aktivität ließ sich dokumentieren, sondern auch ein Anstieg der ACT. In der AT-III-Gruppe stieg die ACT deutlich höher an, als in der Placebo-Gruppe. Im Gegensatz zu unseren Patienten waren die Patienten in den zitierten Untersuchungen von van Aken et al. und von Avidan et al. nicht alle vor dem operativen Eingriff kontinuierlich mit Heparin therapiert worden. Dieser Unterschied könnte die schwächere Reaktion, nur 44% der Patienten reagierten mit dem gewünschten Anstieg der ACT auf die AT-III-Substitution, erklären.

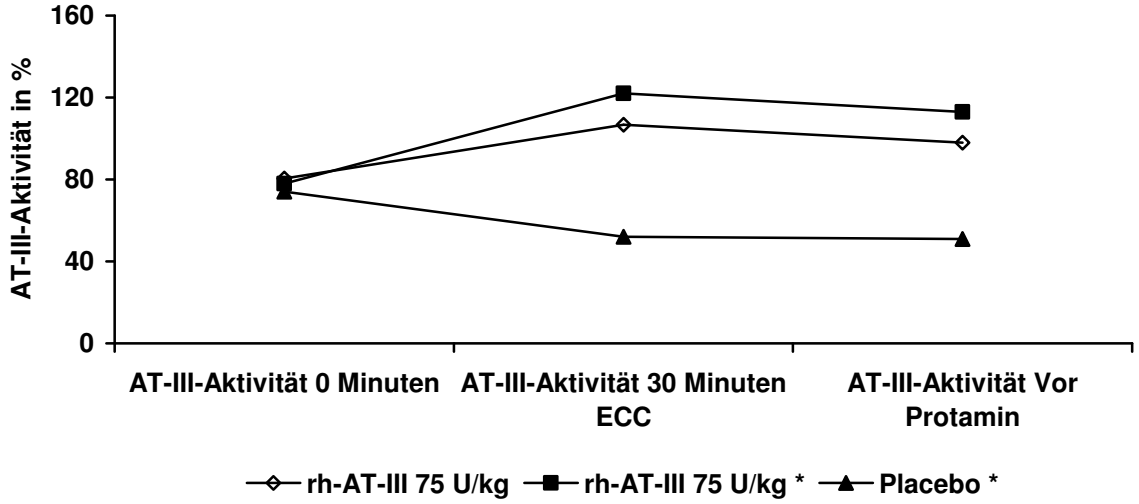


Abbildung 13:
Verlauf der Antithrombin-III-Aktivität (AT-III) vor, während und nach der extrakorporalen Zirkulation (ECC). Die geschlossenen Symbole repräsentieren die beiden Gruppen aus der Studie von Avidan et al., die offenen Symbole repräsentieren die Gruppe 3 der vorliegenden Studie. Ordinate: AT-III-Aktivität in %; Abszisse: einzelne Messzeitpunkte (0 Minuten: direkt vor Gabe der Studienmedikation, 30 Minuten ECC: 30 Minuten nach Beginn der extrakorporalen Zirkulation, Vor Protamin: direkt vor Gabe von Protamin); rh-AT-III: rekombinantes AT-III in U/kg.

Die AT-III-Aktivität bei unseren Patienten nach Infusion von 75 U/kg KG rh-AT-III zeigt einen übereinstimmenden Verlauf auch im Vergleich zu den Ergebnissen von Avidan et al. mit einem Anstieg zu Beginn der ECC nach Hämodilution und einem leichten Abfall nach Ende der ECC. In der Placebo-Gruppe bei von Avidan et al. kam es zu einem Abfall der AT-III-Aktivität durch die Hämodilution auf 50%. In unserer Untersuchung hingegen sank die AT-III-Aktivität unter der niedrigen Dosierung von 15 IE/kg KG AT-III nur um 17% - 22% ab. Eine Dosierung von nur 15 U/kg KG reichte folglich nicht aus, die AT-III-Aktivität stabil anzuheben. Möglicherweise sind auch höhere rh-AT-III-Dosierungen als 75 U/kg sinnvoll, wie bei Levy et al. gezeigt, um die AT-III-Aktivität auch über einen längeren Zeitraum der ECC sicher im Normalbereich zu halten. Den Patienten, die nach der AT-III-Infusion keine ausreichende ACT erreichten, wurde bei Avidan et al. zusätzlich FFP transfundiert, um mögliche andere Gerinnungsstörungen auszugleichen, die eine Heparinresistenz verursachen können. Bei vorliegender Heparinresistenz werden oft additive hochdosierte Heparin-Injektionen durchgeführt, um die verminderte Heparinwirkung zu durchbrechen. Hohe Heparin-Dosen erhöhen jedoch das Risiko der postoperativen Nachblutung (Despotis et al., 1995). Das zur Aufhebung der Antikoagulation nach der ECC applizierte Protamin bindet freies Heparin und inaktiviert es. Jedoch besitzt Protamin nur eine kurze Halbwertszeit. Ein Heparinüberhang bei ultrahohen Dosen kann eine erneute Aktivierung von Heparin-AT-III-

Komplexen auslösen. Bei van Aken wurden keine Unterschiede in Bezug auf abnormale Blutung zwischen der AT-III-Gruppe und der FFP-Gruppe festgestellt. In den Untersuchungen von Levy et al. kam es in einigen Fällen zu Nachblutungen, Unterschiede zwischen der AT-III-Gruppe und der Placebogruppe fanden sich nicht und die Blutungen wurden als nicht signifikant gewertet. Auch ließen sich keine Unterschiede in den Bluttransfusionsmengen dokumentieren. Ebenso wie in unseren Untersuchungen wurden von Avidan et al. Nachblutungen ebenfalls als nicht signifikant dargestellt.

Fibrin-Monomere sind ein Index für den Grad der intravasalen Gerinnungsaktivität. Bei der Fibrinbildung spaltet Thrombin enzymatisch die Fibrinopeptide A von der Fibrinvorstufe Fibrinogen ab. Die so entstandenen Fibrin-Monomere werden faserförmig aneinandergelegt und durch Abspaltung der Fibrinopeptide B und durch Einfluss des aktivierten Faktor XIII über kovalente Bindungen (D-D) zum Fibrinpolymer quervernetzt (Neumeister B et al., 2000). Bei großen Wunden, operativen Eingriffen, Verbrauchskoagulopathie und bei Aktivierung des Gerinnungssystems durch die Fremdoberfläche der ECC kommt es zu einer Erhöhung der Fibrinbildung. Der Heparin-AT-III-Komplex hemmt die Thrombinwirkung und damit die Aktivierung der Fibrinbildung.

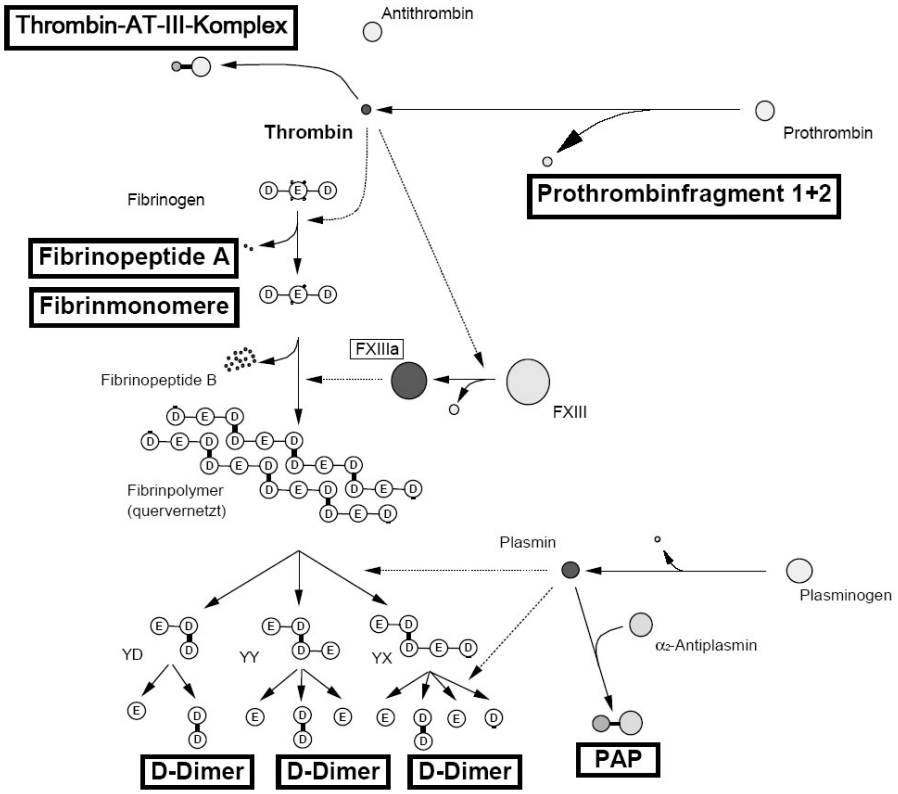


Abbildung 14:
Physiologie der Fibrinbildung und der Fibrinolyse nach Lackner, Peetz 2004.

Gleichzeitig mit Aktivierung der Blutgerinnung wird auch die Wiederauflösung der Blutgerinnsel, die Fibrinolyse aktiviert. Dieses ist ein physiologischer Vorgang, der eine unkontrollierte Ausbreitung der Blutgerinnung vermeiden soll (Neumeister B et al., 2000). Das aus Plasminogen entstehende Plasmin ist eine unspezifische Protease. Es baut Fibrinpolymere, Fibrin und Fibrinogen zu Fibrindegradationsprodukten ab. Es entstehen Y-, YD, YX-Fragmente, die nach weiterer Proteolyse in D- und E-Bruchstücken gespalten werden. Da die Faktor XIII vermittelte kovalente D-D-Bindung vom Plasmin nicht gespalten werden kann, treten nur nach der Preotolyse des Fibrinpolymers D-Dimere auf (siehe Abbildung). Ein Anstieg der D-Dimere ist daher ein Index für eine ablaufende Fibrinolyse. Die Fibrin-Monomere im Blut stiegen in der vorliegenden Untersuchung im Verlauf des operativen Engriffs in keiner der drei Gruppen an. Es ist daher zu vermuten, dass eine wesentliche intravasale Gerinnung während der ECC sowohl in der Gruppe mit hochdosiertem AT-III als auch in den beiden Gruppen mit niedrig dosiertem AT-III nicht auftrat, obwohl die angestrebte ACT von über 480 s in diesen beiden Gruppen kaum erreicht wurde. Vergleichbar hierzu fanden auch van Aken et al. in Bezug auf die Fibrin-Monomere zwischen der AT-III-Gruppe und der Placebo-Gruppe keine Unterschiede im Verlauf der

ECC. Im Gegensatz hierzu beobachteten Levy et al. im Verlauf der ECC nach Applikation von AT-III (10 bis 200 U/kg KG) in allen Gruppen einen zunehmenden Anstieg der ACT. Je höher die AT-III-Dosierung in den einzelnen Gruppen initial war, desto stärker war im Verlauf der ECC der Abfall der Fibrin-Monomere und der D-Dimere im Sinne einer Hemmung der Thrombin-Aktivität und der Fibrinolyse. In unserer Studie lässt sich dies nur eingeschränkt nachvollziehen. Die Auswertung der D-Dimere ergab in allen Behandlungsgruppen einen Anstieg der Plasmaspiegel im Verlauf des operativen Eingriffs. Fibrinpolymere wurden gebildet und wieder abgebaut als Zeichen für eine vorhandene erhöhte Fibrinolyse. Der Anstieg eines einzelnen Parameters ist jedoch kein Hinweis auf einen generellen Fibrinolyseprozess. In der rh-AT-III-Gruppe mit 75 U/kg KG kommt es zum niedrigsten und in der hp-AT-III-Gruppe mit 15 U/kg KG zum höchsten Anstieg der D-Dimere im Verlauf der ECC. Hier ist eine dosisabhängige Reaktion möglich.

Schlussfolgernd lässt sich aus unseren Ergebnissen sagen, dass mindestens eine Dosierung von 75 U/kg KG rh-AT-III notwendig ist, um eine Normalisierung der AT-III-Aktivität bei 44% der Patienten mit Heparinresistenz unter Einsatz einer ECC bei elektiven ACB-OP und die gewünschte ACT von über 480 s zu erreichen. Eine entsprechende Schlussfolgerung für eine Hemmung der Fibrinolyse lässt sich, wie anhand der Bildung von D-Dimeren gezeigt werden konnte, nicht ziehen. Eine Normalisierung der AT-III-Aktivität und eine Anhebung der ACT über 480 s sind nicht gleichzusetzten mit einer Unterdrückung der Gerinnselbildung unter ECC.

7. Zusammenfassung

Diese Studie untersucht die Wirkung von genetisch rekombinantem Antithrombin-III im Vergleich zu humanen Plasma-Antithrombin-III bei heparinresistenten Patienten, die sich einer elektiver aortocoronarer Bypass-Operation unter Einsatz einer Herz-Lungen-Maschine unterziehen mussten. Ein bestehender Antithrombin-III-Mangel mindert die lebensnotwendige Antikoagulation mit Heparin während der extrakorporalen Zirkulation und es kann zu einer überschießenden Aktivierung des körpereigenen Gerinnungssystems mit Gerinnselbildung kommen. In eine randomisierte doppelblinde Studie wurden insgesamt 47 Patienten mit Heparinresistenz eingeschlossen. Eine Heparinresistenz wurde als Unvermögen definiert, nach präoperativer Heparin-Bolusgabe von 300 U/kg Körpergewicht die zum Anschluss an die Herz-Lungen-Maschine erforderliche aktivierte Gerinnungszeit von über 480 s zu erreichen. Die Patienten wurden in drei Gruppen eingeteilt und erhielten jeweils 15 U/kg Körpergewicht genetisch rekombinantes Antithrombin-III oder humanes Plasma-Antithrombin-III oder 75 U/kg Körpergewicht rekombinantes Antithrombin-III. Gemessen wurde im Verlauf der extrakorporalen Zirkulation der Verlauf der aktivierten Gerinnungszeit, der Antithrombin-Aktivität, Fibin-Monomere und der D-Dimere als Parameter der Fibrinolyseaktivität. 44 % der Patienten, die 75 U/kg Körpergewicht rekombinantes Antithrombin-III erhalten hatten, erreichten die erforderliche aktivierte Gerinnungszeit von über 480 s. Unter den niedrigeren Dosierungen erreichten nur 7% der Patienten die erforderliche aktivierte Gerinnungszeit. Ein Anstieg der Antithrombin-III-Aktivität wurde ebenfalls nur in der hochdosierten Antithrombin-Gruppe verzeichnet. In keiner der drei Gruppen kam es zu einem Anstieg der Fibrin-Monomere. Die D-Dimere stiegen in allen drei Gruppen im Verlauf der extrakorporalen Zirkulation an, jedoch am geringsten in der hochdosierten Antithrombin-III-Gruppe.

Genetisch rekombinantes Antithrombin-III mit 75 U/kg Körpergewicht führt zu einem Anstieg der Antithrombin-III-Aktivität und zu einer signifikanten Erhöhung der aktivierten Gerinnungszeit. Eine vollständige Unterdrückung der Fibrinolyseaktivität lässt sich jedoch nicht erreichen.

8. Abkürzungsverzeichnis

ACT	Activated Clotting Time
ACB	Aortocoronarer Bypass
AT-III	Antithrombin-III
ATcDNS	Ziegen-ß-Casein-Antithrombin-III-Desoxyribonucleinsäure
Ca^{2+}	Calcium
dl	Deziliter
ECC	extrakorporaler Kreislauf
EKG	Elektrokardiogramm
ELISA	Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay
et al	et alii
FDA	Food and Drug Administration
FFP	fresh frozen plasma / humanes Blutplasma
Hb	Hämoglobin
HIV	Humanes Immundefizit-Virus
hp-AT-III	humanes Plasma-Antithrombin-III
ICH	International Conference on Harmonization
IEC	European Independent Ethics Committee
IRB	Institutional Review Board
kg	Kilogramm
l	Liter
MAP	mittlerer arterieller Druck
mg	Milligramm
Min	Minuten
µ	Micro
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
MW	Mittelwert
OP	Operation
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PDP	Protein Data Bank
PF4	Plättchenfaktor 4

PPSB	Prothrombin-Proconvertin-Stuart-Prower-Faktor-antihämophiles-Globulin-B
PTT	partielle Thromboplastinzeit
RCSB	Research Collaboratory for Structural Bioinformatics
rh-AT-III	genetisch rekombinantes Antithrombin-III
s	Sekunden
SD	Standardabweichung
tPA	Tissue Plasminogen Activator
U	Unit
U.S.A	United States of America

9. Verzeichnis der Tabellen

Tabelle 1 Priming-Lösung der ECC

Tabelle 2 Einschlusskriterien

Tabelle 3 Ausschlusskriterien

Tabelle 4 Zusammenfassung der erfassten Studienparameter und Messzeitpunkte

Tabelle 5 Demographische Merkmale der Patienten in den drei verschiedenen Gruppen

Tabelle 6 Begleiterkrankungen der Patienten in den einzelnen Gruppen

Tabelle 7 Anteil der Patienten, bei denen eine ACT > 480 s gemessen werden konnte

10. Verzeichnis der Abbildungen

Abbildung 1 Einblick in den heutigen Arbeitsalltag einer Herz-OP

Abbildung 2 Schematische Darstellung einer extrakorporalen Zirkulation

Abbildung 3 Schematische Darstellung der Gerinnungskaskade

Abbildung 4 Modell des Antithrombin-III

Abbildung 5 Schematische Darstellung des Studienablaufes

Abbildung 6 Schematische Darstellung des Studieneinschlusses

Abbildung 7 Darstellung der ACT-Werte zu den drei Messzeitpunkten in den drei Behandlungsgruppen

Abbildung 8 Verlauf der durchschnittlichen Konzentration der Fibrin-Monomere zu den drei Messzeitpunkten in den drei Behandlungsgruppen

Abbildung 9 Konzentration der D-Dimere zu den drei Messzeitpunkten in den drei Behandlungsgruppen

Abbildung 10 Verlauf der Plasmaaktivität von AT-III zu den drei Messzeitpunkten in den drei Behandlungsgruppen

Abbildung 11 Signifikante Differenz der Plasmaaktivität von AT-III zu den zwei Messzeiten zum Ausganswert 0 Minuten in den drei Behandlungsgruppen

Abbildung 12 Schematische Darstellung der beschleunigenden Wirkung des Heparins auf den AT-III-Thrombin-Komplex

Abbildung 13 Verlauf der Antithrombin-III-Aktivität vor, während und nach der extrakorporalen Zirkulation

Abbildung 14 Physiologie der Fibrinbildung und der Fibrinolyse

11. Quellennachweis

Abbildung 4: Modell des Antithrombin-III mit Bindungsstellen zur Darstellung der Serin-Protease-Interaktion, Research Collaboratory for Structural Bioinformatics, Protein Data Bank (RCSB PDP), (http://www.rcsb.org/), Grafik erstellt mit MolScript (http://www.avatar.se/molscript)).

Abbildung 12: Schematische Darstellung der beschleunigenden Wirkung des Heparins auf den AT-III-Thrombin-Komplex: mit freundlicher Genehmigung aus dem „Gerinnungspraktikum-Skript Wintersemester 2004“ von Prof. Dr. K. Lackner und Dr. Peetz, Zentrallabor der Universität Mainz.

Abbildung 14, Physiologie der Fibrinbildung und der Fibrinolyse: mit freundlicher Genehmigung aus dem „Gerinnungspraktikum-Skript Wintersemester 2004“ von Prof. Dr. K. Lackner und Dr. Peetz, Zentrallabor der Universität Mainz.

12. Literaturverzeichnis

Avidan M, Levy J, Scholz J, et al (2005) A phase III, double-blind, placebo-controlled, multicenter study on the efficacy of recombinant human antithrombin in heparin-resistant patients scheduled to undergo cardiac surgery necessitating cardiopulmonary bypass. Anesthesiology 102:276-284

Beck A (1925) Über Bluttransfusion. Münchner Medizinische Wochenschrift 72:1232-1236

Bharadwaj J, Jayaraman C, and Shrivastava R (2003) Heparin resistance. Lab Hematol 9:125-131

Bock H (2003) 45 Jahre erlebte extrakorporale Zirkulation. Kardiotechnik, Sonderausgabe 50 Jahre Herz-Lungen-Maschine 1:

Boettcher W, Merkle F, and Weitkemper H (2003a) History of extracorporeal circulation: the conceptional and developmental period. J Extra Corpor Technol 35:172-183

Boettcher W, Merkle F, and Weitkemper H (2003b) History of extracorporeal circulation: the invention and modification of blood pumps. J Extra Corpor Technol 35:184-191

Boldt J, Zickmann B, Herold C, et al (1992) Heparin management during cardiac surgery with respect to various blood-conservation techniques. Surgery 111:260-265

Brown-Séquard E (1858) Recherches expérimentales sur les propriétés physiologiques et les usages du sang rouge et du sang noir et de leurs principaux éléments gazeux, l'oxygène et l'acide carbonique. de la Physiologie de l'Homme et des Animaux 1:95, 353, 729-122, 367, 735

Butruille Y, Chevallet J, Granger A et al (1976) Rhone-Poulenc oxygenator and associated pumping system. In: Zapol WM QJ (Hrsg) Artificial Lungs for Acute Respiratory Failure, Theory and Practice, Academic Press, New York, S 223-233

Cross FS KE (1957) Direct vision repair of intracardiac defects utilizing a rotating disc reservoir-oxygenator. Surgery, Gynecology and Obstetrics 104:711-716

Denman J, Hayes M, O'Day C, et al (1991) Transgenic expression of a variant of human tissue-type plasminogen activator in goat milk: purification and characterization of the recombinant enzyme. Biotechnology (N.Y.) 9:839-843

Despotis GJ, Levine V, Joist JH, et al (1997) Antithrombin III during cardiac surgery: effect on response of activated clotting time to heparin and relationship to markers of hemostatic activation. Anesth Analg 85:498-506

Despotis G, Joist J, Hogue C, Jr., et al (1995) The impact of heparin concentration and activated clotting time monitoring on blood conservation. A prospective, randomized evaluation in patients undergoing cardiac operation. J Thorac Cardiovasc Surg 110:46-54

Dietrich W, Spannagl M, Schramm W, et al (1991) The influence of preoperative anticoagulation on heparin response during cardiopulmonary bypass. J Thorac Cardiovasc Surg 102:505-514

Dietrich W, Braun S, Spannagl M, et al (2001) Low preoperative antithrombin activity causes reduced response to heparin in adult but not in infant cardiac-surgical patients. Anesth Analg 92:66-71

Dietrich W, Schroll A, Gob E, et al (1984) Antithrombin III substitution for optimization of the heparin effect during extracorporeal circulation in heart surgery. Anaesthesist 33:422-427

Ebert KM, DiTullio P, Barry CA, et al (1994) Induction of human tissue plasminogen activator in the mammary gland of transgenic goats. Biotechnology (N.Y.) 12:699-702

Ebert KM, Selgrath JP, DiTullio P, et al (1991) Transgenic production of a variant of human tissue-type plasminogen activator in goat milk: generation of transgenic goats and analysis of expression. Biotechnology (N.Y.) 9:835-538

Edmunds T (1998) Transgenically Produced Human Antithrombin. Blood 91:4567-4571

Esposito RA, Culliford AT, Colvin SB, et al (1983) Heparin resistance during cardiopulmonary bypass. The role of heparin pretreatment. J Thorac Cardiovasc Surg 85:346-353

Hashimoto K, Yamagishi M, Sasaki T, et al (1994) Heparin and antithrombin III levels during cardiopulmonary bypass: correlation with subclinical plasma coagulation. Ann Thorac Surg 58:799-804

Hattersley P (1966) Activated Coagulation Time of Whole Blood. JAMA 5:436-440

Hirsh J, Anand SS, Halperin JL, et al (2001) AHA Scientific Statement: Guide to anticoagulant therapy: heparin: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association. Arterioscler Thromb Vasc Biol 21:E9-9

Jacobj C (1895) Ein Beitrag zur Technik der künstlichen Durchblutung überlebender Organe. Archiv für Experimentelle Pathologie und Pharmakologie 31:330-348

Kay JP (1828) Physiological experiments and observations on the cessation of the contractility of the heart and muscles in the asphyxia of warm-blooded animals. The Edinburgh Medical and Surgical Journal 29:37-66

Kolff WJ, Balzer R (1955) The artificial coil lung. Trans Am Soc Artif Intern Organs 1:42

Kolff WJ, Berk HTJ (1944) The artificial kidney: a dialyser with a great area. Acta Medica Scandinavica 117:121-134

Kuang S, Hasham S, Phillips M, et al (2001) Characterization of a novel autosomal dominant bleeding disorder in a large kindred from east Texas. Blood 97:1549-554

Landsteiner K (1900) Zur Kenntnis der antifermentativen, lytischen und agglutinierenden Wirkungen des Blutserums und der Lymphe. Centralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten. Medizinisch-hygienische Bakteriologie und tierische Parasitenkunde 27:357-362

Landsteiner K (1901) Ueber Agglutinationserscheinungen normalen menschlichen Blutes. Wiener Klinische Wochenschrift 14:1132-1134

Lemmer J, Jr., Despotis G (2002) Antithrombin III concentrate to treat heparin resistance in patients undergoing cardiac surgery. J Thorac Cardiovasc Surg 123:213-217

Levy J, Despotis G, Szlam F, et al (2002) Recombinant human transgenic antithrombin in cardiac surgery: a dose-finding study. Anesthesiology 96:1095-1102

Linden MD, Gibbs NM, Bremner M, et al (2004a) The effect of haemodilution on antithrombin concentration during cardiac surgery. Anaesth Intensive Care 32:219-223

Linden MD, Schneider M, Baker S, et al (2004b) Decreased concentration of antithrombin after preoperative therapeutic heparin does not cause heparin resistance during cardiopulmonary bypass. J Cardiothorac Vasc Anesth 18:131-135

Litwak R (2002) Leland C. Clark and Frank Gollan: bubble oxygenators and perfusion hypothermia. Ann Thorac Surg 74:612-614

Lu W, Mant T, Levy J, et al (2000) Pharmacokinetics of recombinant transgenic antithrombin in volunteers. Anesth Analg 90:531-534

Mabry C, Read R, Thompson B, et al (1979) Identification of heparin resistance during cardiac and vascular surgery. Arch Surg 114:129-134

Mammen E, Miyakawa T, Phillips T, et al (1985) Human antithrombin concentrates and experimental disseminated intravascular coagulation. Semin Thromb Hemost 11:373-383

McLean J (1916) The thromboplastic action of cephalin. Am J Physiol 41:250-257

Mustard WT (1955) Clinical and experimental experience with homologous and heterologous lung perfusion. Trans Am Soc Artif Intern Organs 1:94-95

Neumeister B, Besenthal I, Liebich H (2000) Klinikleitfaden Labordiagnostik, 2. Aufl., München, Jena, Urban&Fischer, S 553-555

Pennington D, Merjavy J, Swartz M, et al (1982) Clinical experience with a centrifugal pump ventricular assist device. Trans Am Soc Artif Intern Organs 28:93-99

Preissner KT, Muller-Berghaus G (1987) Neutralization and binding of heparin by S protein/vitronectin in the inhibition of factor Xa by antithrombin III. Involvement of an inducible heparin-binding domain of S protein/vitronectin. J Biol Chem 262:12247-1253

Renz-Polster H, Braun J (2001) Basislehrbuch Innere Medizin, München, Jena, Urban&Fischer, S 305-323

Roberts B, DiTullio P, Vitale J, et al (1992) Cloning of the goat beta-casein-encoding gene and expression in transgenic mice. Gene 121:255-262

Rogalski J, Dawidowicz A, Wiater A, et al (1998) The preparation of specific sorbents with polyclonal antibodies as a ligand for purification of human antithrombin III. Acta Microbiol Pol 47:153-165

Sabbagh AH, Chung GK, Shuttleworth P, et al (1984) Fresh frozen plasma: a solution to heparin resistance during cardiopulmonary bypass. Ann Thorac Surg 37:466-468

Schwartz R, Bauer K, Rosenberg R, et al (1989) Clinical experience with antithrombin III concentrate in treatment of congenital and acquired deficiency of antithrombin. The Antithrombin III Study Group. Am J Med 87:53S-60S

Shanberge JN, Quattrociocchi-Longe TM, and Martens MH (1987) Interrelationship of protamine and platelet factor 4 in the neutralization of heparin. Thromb Res 46:89-100

Shore-Lesserson L (1999) Coagulation Monitoring. In: Kaplan JA, Reich DL, Konstadt SN (Hrsg) Cardiac Anaesthesia, WB Saunders Co, Philadelphia, S 507-533

Silbernagl S, Despopoulos A (1991) Taschenatlas der Physiologie, 4. Aufl., Thieme, Stuttgart, New York, S 74-77

Teoh KH, Young E, Bradley CA, et al (1993) Heparin binding proteins. Contribution to heparin rebound after cardiopulmonary bypass. Circulation 88:II420-II425

Truax C (1899) The mechanics of surgery, C. Truax & Co., Chicago, S 203-204

van Aken H, Große Hartlage M, Martin E et al.: Recombinant human AT III (rh AT III) improves anticoagulation in heparin resistant patients undergoing cardiopulmonary bypass. 2000. European Association of Cardiothoracic Anaesthesiologists Annual Meeting. 2000.

van Cott EM, Laposata M (2001) Coagulation. In: Jacobs DS (Hrsg) The Laboratory Test Handbook, 5. Aufl., Lexi-Comp, Cleveland, S 327-358

von Decastello A, Sturli A (2004) Die Isoagglutinine im Serum gesunder und kranker Menschen. Münchener Medizinische Wochenschrift 49:1090-1095

von Frey M, Gruber M (1885) Untersuchungen über den Stoffwechsel isolierter Organe. Ein Respirationsapparat für isolierte Organe. Archiv für Anatomie und Physiologie (Fortsetzung des von Reil, Reil u. Autenrieth, J. F. Meckel, Joh. Müller, Reichert u. Du Bois-Reymond herausgegebenen Archives), 9. Aufl., Leipzig,

Vuylsteke A, Mills RJ, Crosbie AE, et al (2000) Increased pre-operative platelet counts are a possible predictor for reduced sensitivity to heparin. Br J Anaesth 85:896-898

Williams MR, D'Ambra AB, Beck JR, et al (2000) A randomized trial of antithrombin concentrate for treatment of heparin resistance. Ann Thorac Surg 70:873-877

Wu HF, Lundblad RL, and Church FC (1995) Neutralization of heparin activity by neutrophil lactoferrin. Blood 85:421-428

Young E, Prins M, Levine MN, et al (1992) Heparin binding to plasma proteins, an important mechanism for heparin resistance. Thromb Haemost 67:639-643

Young J, Kisker C, and Doty D (1978) Adequate anticoagulation during cardiopulmonary bypass determined by activated clotting time and the appearance of fibrin monomer. Ann Thorac Surg 26:231-240

13. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Daniela Dube
Adresse	Eckdahl 92, 21614 Buxtehude
Geburtsdatum	09.09.1972
Geburtsort	Hamburg
Familienstand:	verheiratet

Schulausbildung

August 1979-Juli 1983	Grundschule
August 1983-Juli 1992	Gymnasium Meiendorf, Hamburg
Juli 1992	Allgemeine Hochschulreife

Berufsausbildung

August 1992-August 1994	Ausbildung Arzthelferin, Internistische und Gastroenterologische Praxis Dres. med. Dörner / Prof. Bützow

Studium

Oktober 1994-Mai 2001	Studium der Humanmedizin an der Universität Hamburg
14.03.1997	Bestehen der Ärztlichen Vorprüfung
24.03.1998	Bestehen des Ersten Abschnitts der Ärztlichen Prüfung
21.03.2000	Bestehen des Zweiten Abschnitts der Ärztlichen Prüfung
09.05.2001	Bestehen des Dritten Abschnitts der Ärztlichen Prüfung

Praktisches Jahr

April 2000-August 2000	Anästhesie, Krankenhaus Reinbek, St. Adolph Stift
August 2000-Dezember 2000	Chirurgie, Krankenhaus Reinbek, St. Adolph Stift
Dezember 2000-März 2001	Innere, Krankenhaus Reinbek, St. Adolph Stift

Beruflicher Werdegang

Juni 20001-Dezember 2002	Ärztin im Praktikum Klinik für Innere Medizin, Elbeklinikum Stade
Seit Januar 2003	Assistenzärztin Klinik für Innere Medizin, Elbeklinikum Stade

Dissertation

Januar 1999-Februar 2007	Betreut von: Prof. Dr. med. G. von Knobelsdorff (Chefarzt der Klinik für Anästhesie, Intensivmedizin und Schmerztherapie St. Bernwart Krankenhaus Hildesheim) Prof. Dr. med. Scholz (Chefarzt der Klinik für Anästhesiologie und Operative Intensivmedizin der Universität Schleswig Holstein, Campus Kiel)

14. Danksagung

Ein ganz herzliches Dankeschön gilt Herrn Prof. Dr. med. G. von Knobelsdorff, der die vorliegende Arbeit mit viel Zeitaufwand und großer Geduld betreute und trotz eigenem Klinikbetrieb und Familie immer Zeit für Fragen und Probleme hatte. An dieser Stelle möchte ich auch Herrn Prof. Dr. med. J. Scholz danken, der ebenso stets Interesse und Zeit für die Durchführung der Untersuchungen hatte. Ebenfalls möchte ich mich bei der Firma Genzyme bedanken, die im Rahmen des Studienprotokolls einen Teil der laborchemischen Untersuchungen vorgenommen hat. Insbesondere gilt der Dank Frau Judy Bonfiglio und Herrn Johan Frieling, die mir in einigen Detailfragen der Analysen mit Rat zur Seite gestanden haben.

Ein ganz besonderer Dank gilt den Patienten, die an den Untersuchungen teilgenommen haben und ohne deren Bereitschaft und Offenheit gegenüber Zulassungsverfahren neu entwickelter Medikamente diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Großen Dank schulde ich auch den Kardiotechnikern und der Abteilung für Kardiochirurgie des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf, die mit viel Geduld auf die durch die Studie verursachten Zeitverzögerungen während der operativen Eingriffe reagierten.

Ebenfalls gilt der Dank den Stationen der Kardiochirurgie und insbesondere den Stationsärzten, die mich bei der Erfassung der Patientendaten stets tatkräftig unterstützten.

Ferner möchte ich mich bei Prof. Dr. med. Tonner für die zahlreichen Korrekturvorschläge bedanken.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie, die mich während meines Studiums und während der Doktorarbeit mit viel Geduld unterstützt hat, insbesondere meinem Ehemann, der auch die orthographischen Korrekturen vorgenommen hat und mich bei der Behebung technischer Probleme am Computer unterstützt hat.

EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG:

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.
Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift: .....