

Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik
Abteilung Innere Medizin IV (Schwerpunkt Nephrologie und Allgemeinmedizin)
der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg im Breisgau

Elimination von Danaparoid mittels Filtration
- Bestimmung der Eliminationskinetik in physiologischer
Kochsalzlösung, Humanalbumin und humanem Vollblut

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung des Medizinischen Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät

der Albert-Ludwigs-Universität

Freiburg im Breisgau

vorgelegt 2004

von Katja Susanne Annika Schneider

geboren in Dortmund

Dekan:	Professor Dr. med. Josef Zentner
Erstgutachter:	Privatdozent Dr. med. Karl-Georg Fischer
Zweitgutachter:	Privatdozent Dr. med. Markus Nauck
Jahr der Promotion:	2004

INHALTSVERZEICHNIS

<u>1 EINLEITUNG</u>	0
<u>1.1 Gerinnungshemmung mit Heparin</u>	0
<u>1.2 Heparin-induzierte Thrombozytopenie</u>	1
<u>1.2.1 Pathophysiologie der HIT</u>	2
<u>1.2.2 Diagnosesicherung der HIT</u>	3
<u>1.2.3 Therapie der HIT</u>	5
<u>1.3 Danaparoid als Alternativantikoagulans</u>	6
<u>1.3.2 Wirkprinzip</u>	7
<u>1.3.3 Klinische Aspekte</u>	8
<u>1.3.4 Danaparoid bei Niereninsuffizienz</u>	11
<u>1.4 Zielsetzung</u>	11
<u>2 MATERIAL UND METHODEN</u>	13
<u>2.1 Materialien</u>	13
<u>2.1.1 Danaparoid (Orgaran®)</u>	13
<u>2.1.2 Trägerlösungen</u>	13
<u>2.1.3 Berichrom Heparin Assay</u>	14
<u>2.1.4 Hämodialysatoren</u>	14
<u>2.1.5 Geräte</u>	15
<u>2.2 Versuchsaufbau</u>	16
<u>2.3 Versuchsdurchführung</u>	18
<u>2.4 Probenaufarbeitung</u>	19
<u>2.5 Berechnung</u>	20
<u>2.5.1 Mittelwert und mittlerer Fehler des Mittelwertes</u>	20
<u>2.5.2 Berechnung des Siebkoeffizienten</u>	21
<u>2.5.3 Berechnung der Adsorption</u>	21

<u>2.5.4 Datenauswertung und graphische Darstellung der Daten</u>	22
<u>3 ERGEBNISSE</u>	24
<u>3.1 Filtration von Danaparoid</u>	24
<u>3.1.1 Filtration von Danaparoid durch High-Flux-Dialysatoren</u>	25
<u>3.1.2 Elimination von Danaparoid mit Plasmapheresefiltern</u>	32
<u>3.2 Adsorption von Danaparoid an Dialysemembranen</u>	34
<u>3.2.1 Adsorption von Danaparoid an PMMA-Membranen</u>	34
<u>3.2.2 Langzeitversuch</u>	35
<u>3.2.3 Adsorption an die Plasmapherese-Membran</u>	36
<u>4 DISKUSSION</u>	37
<u>5 ZUSAMMENFASSUNG</u>	46
<u>6 ABSTRACT</u>	47
<u>7 LITERATURVERZEICHNIS</u>	48
<u>8 VERÖFFENTLICHUNG UND POSTERPRÄSENTATION</u>	57
<u>9 DANKSAGUNG</u>	59
<u>10 LEBENS LAUF</u>	61

1 Einleitung

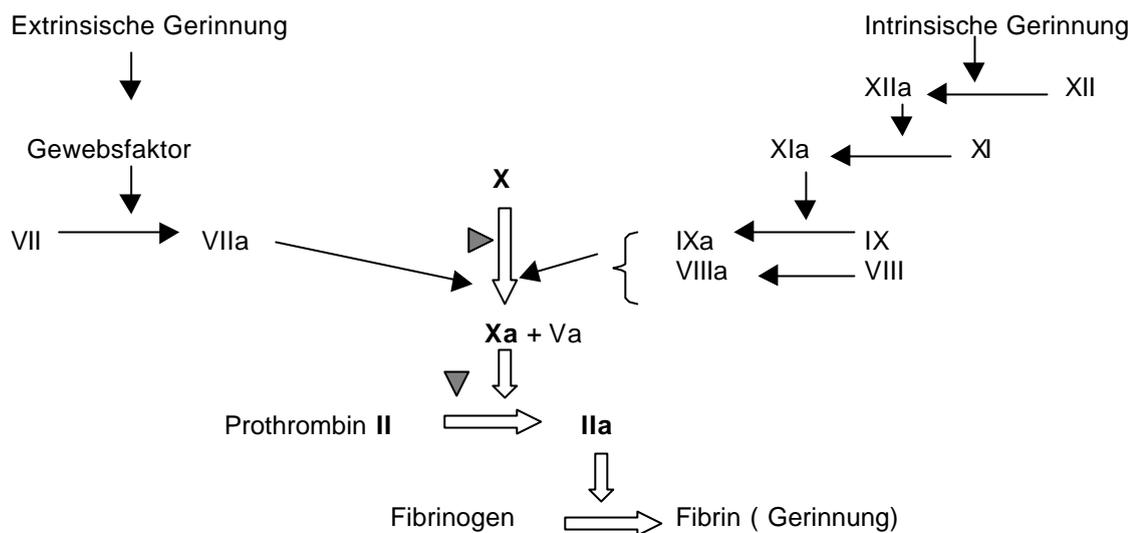
Thromboembolische Ereignisse und Lungenembolien gehören nach wie vor zu den häufigsten Todesursachen im Krankenhaus. Ein Schwerpunkt der therapeutischen Zielrichtung ist daher die Prophylaxe venöser Thrombosen sowie die Lyse entstandener Thromben.

1.1 Gerinnungshemmung mit Heparin

Im Mittelpunkt der Forschung standen viele Jahre der Wirkstoff Heparin und seine Analoga. Auch heute noch gehört Heparin zu den am häufigsten eingesetzten Medikamenten. Es beschleunigt die physiologische Hemmung von Gerinnungsfaktoren und greift an zentraler Stelle in die Gerinnungskaskade ein.

Heparin bedingt die Aktivierung des körpereigenen Proteins Antithrombin III (Antithrombin). Antithrombin ist der stärkste physiologische indirekte Inhibitor der Gerinnung. Dieses bindet irreversibel an die aktivierten Gerinnungsfaktoren X (Faktor Xa) und II (Faktor IIa), die im enzymatischen Zentrum die Aminosäure Serin enthalten [58]. Durch die Bindung an Antithrombin werden sie inaktiviert. Heparin beschleunigt die physiologisch langsam verlaufende Bindung von Antithrombin an die Gerinnungsfaktoren und inhibiert somit die Gerinnungskaskade an zentraler Stelle. Im Rahmen eines Antithrombin-Mangels kann Heparin seine antikoagulatorische Wirkung nicht entfalten.

Zur Veranschaulichung dient die nachfolgende vereinfachte Darstellung der Gerinnungskaskade. Die beiden Hauptangriffspunkte von Heparin sind durch Dreiecke markiert. Neben den hier gezeigten hat der Antithrombin-Heparin-Komplex zahlreiche weitere Angriffspunkte.



▼ Hauptangriffspunkte des Antithrombin-Heparin-Komplexes sowie von Danaparoid (siehe hierzu Seite 7)

Abbildung 1: vereinfachte Darstellung der Gerinnungskaskade und Einflussmöglichkeit von Heparin und Danaparoid

Bei der Therapie mit Heparin kann es allerdings zu unerwünschten Arzneimittelwirkungen kommen. Die häufigste Nebenwirkung von Heparin ist die Blutung. Es können zudem reversibler Haarausfall, Osteoporose und ein Transaminasenanstieg auftreten.

1.2 Heparin-induzierte Thrombozytopenie

Eine der schwerwiegendsten ungewollten Folgen ist die Auslösung einer Heparin-induzierten Thrombozytopenie (HIT). Eine HIT tritt bei etwa 1-5% der mit unfraktioniertem Heparin (UFH) behandelten Patienten auf. Unter einer Behandlung mit niedermolekularen Heparinen (low molecular weight heparin, LMWH) tritt sie seltener auf. Es kommt hierbei zu einem Abfall der Thrombozytenzahl unter

150.000/ l bzw. um mindestens 30% vom Ausgangswert vor Aufnahme der Heparin-Gabe [22,32,51].

Es sind zwei Formen der Heparin-induzierten Thrombozytopenie zu unterscheiden [44]. Sie beruhen auf verschiedenen Pathomechanismen. Im englischen Sprachraum wird zusätzlich das „HIT mit Thrombose“-Syndrom (HITTS) (auch bekannt als „white clot syndrome“) abgegrenzt. Durch Heparin ausgelöste paradoxe thromboembolische Komplikationen können tödlich enden.

1.2.1 Pathophysiologie der HIT

Eine HIT vom Typ I tritt in den ersten Tagen bei etwa 10% der mit UFH behandelten Patienten und bei 2% der mit LMWH behandelten Patienten auf. 2 bis 10 Tage nach der Heparin-Applikation kommt es zu einem dosisabhängigen Abfall des Thrombozytenwertes. Dieser sinkt meist nicht unter 100.000/ l bzw. um mehr als 30% des Ausgangswertes. Es gibt keinen Hinweis dafür, dass es sich hierbei um einen immunologischen Prozess handelt. Ursächlich scheint eine erhöhte proaggregatorische intrinsische Aktivität von Heparin zu sein [32]. Es kommt zu einer gesteigerten ADP-abhängigen Aktivierbarkeit von Thrombozyten und einem dadurch gesteigerten Verbrauch [44].

Eine Heparin-induzierte Thrombozytopenie vom Typ II als Komplikation der Heparin-Therapie tritt dosisunabhängig bei 3% unter UFH und bei etwa 1% unter LMWH auf. Die HIT II ist die häufigste Antikörper-induzierte Arzneimittelnebenwirkung. Es handelt sich um eine dosisunabhängige immunologisch bedingte Spätthrombozytopenie, die bei unsensibilisierten Patienten nach 6 bis 14 Tagen in Erscheinung tritt. Bei sensibilisierten Patienten tritt sie bereits früher auf. Zu beobachten ist dann ein Abfall der Thrombozytenzahl unter 100.000/ l bzw. ein Abfall des Ausgangswertes um mehr als 50%.

Pathophysiologisch kommt es zu einer Bildung stöchiometrischer Komplexe aus Plättchenfaktor 4 (PF4) und Heparin [19]. Antikörper, normalerweise der IgG-Klasse, interagieren mit diesem Komplex aus Heparin und PF4 [5,7,40,42]. Sie werden auch als HIT-Antikörper bezeichnet. Nachfolgend binden die aus dem Neuantigen Heparin-PF4 [7] und den HIT-Antikörpern gebildeten Immunkomplexe an

Thrombozyten [7,21,50] und Endothelzellen [9,22,42,67]. Es kommt dann zu einer Freisetzung von Thromboxan und prokoagulatorischen Mikropartikeln aus aktivierten Thrombozyten [21]. Die Heparin-induzierte Plättchen-Aktivierung wird durch den F_c-Rezeptor (F_c RIIa, CD32) [41,44] auf Thrombozyten vermittelt [9,17,50].

Statt PF4 können auch Komplexe aus dem verwandten Chemokinin Interleukin 8 und neutrophilen aktivierendes Peptid mit Heparin die Bildung von HIT-Antikörpern auslösen [6].

Das ursprünglich immunologische Geschehen führt auf diesem Weg zu thrombotischen Komplikationen. Gleichzeitig werden der thrombozytäre und der plasmatische Pfad der Gerinnung aktiviert. Nach einer Studie von Ganzer et al. kommt es bei 50% aller HIT II-Patienten sowohl zur Bildung von HIT-Antikörpern als auch zu thromboembolischen Komplikationen. Bei 15% der HIT II Patienten kommt es zur Thromboembolie, ohne dass sich HIT-Antikörper nachweisen lassen [34].

Um thromboembolische Komplikationen verhindern zu können, ist eine frühe Diagnose unerlässlich. Unzureichende Kenntnis der HIT II und die dementsprechend späte Diagnosestellung zogen früher eine hohe Mortalität nach sich [37]. Ohne eine alternative antikoagulative Therapie endet die HIT in bis zu 30% letal [32]. Der Kenntnisstand hat sich in den letzten Jahren jedoch verbessert und die Häufigkeit der Folgekomplikationen hat dadurch deutlich abgenommen [37]. Dazu hat wesentlich auch der Einsatz geeigneter alternativer Antikoagulanzen wie Danaparoid und Lepirudin beigetragen.

1.2.2 Diagnosesicherung der HIT

Um thromboembolischen Komplikationen vorbeugen zu können, ist eine frühe Diagnosestellung erforderlich. Die Diagnosestellung einer HIT vom Typ II basiert auf klinischen Zeichen und labordiagnostischen Testverfahren.

Zur klinischen Diagnose kann ein Score-System von Greinacher et al. herangezogen werden [38]. Dabei werden für das Auftreten klinischer Symptome oder Laborkonstellationen ein oder zwei Punkte vergeben. Bei bereits vorhandenen Sepsiszeichen zum Zeitpunkt der Diagnosestellung und bei Weiterbestehen der

Thromboembolien trotz Absetzens von Heparin wird jeweils ein Punkt abgezogen. Die Kriterien sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst. Ein totaler Score zwischen sechs und acht macht eine HIT als Diagnose sehr wahrscheinlich. Eine Summe zwischen vier und fünf macht die Diagnose HIT möglich. Ein Wert zwischen null und drei wiederum macht die HIT als Diagnose unwahrscheinlich.

<u>jeweils 2 Punkte</u>	<u>jeweils 1 Punkt</u>	<u>jeweils Abzug 1 Punktes</u> <u>(„minus 1 Punkt“)</u>
Absinken des Thrombozytenwertes unter 50% des Ausgangswertes	Abfallen der Thrombozytenzahl um 30-50%	Septische Erscheinungen zur Zeit der Diagnosestellung
Zeitraum vom Therapiebeginn bis zum Auftreten der HIT < 5 Tage bzw. < 4 Tage bei Reexposition mit Heparin	Entzündliche Hautreaktion an der Injektionsstelle	Weiterbestehende Thromboembolien trotz Absetzens von Heparin
Normalisierung des Thrombozytenwertes innerhalb von 10 Tagen nach Absetzen von Heparin		
Thromboembolische Komplikationen während Heparin-Therapie		

Tabelle 1: Diagnosekriterien der HIT nach Greinacher [38]

Neben dem klinischen Bild können schließlich Labortestverfahren herangezogen werden, um die Diagnose einer HIT zu sichern.

Die wichtigsten Verfahren sollen hier dargestellt werden.

Das ELISA-Verfahren (enzyme-linked immunosorbent assay) beruht auf dem Nachweis von Heparin-PF4-Komplexen [4,38]. Standardisiert sind weiterhin ein Plättchen-Aggregationstest sowie der Heparin-induzierte Plättchen-Aktivierungstest (HIPA) [4,25,38,42]. Die Assays beruhen auf dem Nachweis einer Kreuzreaktion mit

den HIT-Antikörpern. Es ist jedoch zu beachten, dass die Sensitivität dieser Assays keinesfalls 100% erreicht und so bei einem negativen Testergebnis eine HIT nicht automatisch ausgeschlossen werden darf.

Weitere Nachweismethoden beruhen schließlich auf dem Nachweis von Serotonin, welches durch die Heparin-abhängigen Antikörper aus Thrombozyten freigesetzt wird [18]. Mittels HPLC (Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie) läßt sich diese Serotonin-Freisetzung aus Spender-Thrombozyten in Gegenwart von Patientenserum und Heparin nachweisen. Ersten Studienergebnissen zufolge liegt die Spezifität für diesen Test bei 100% und die Sensitivität bei 94,7% [52].

Basierend auf den Erfahrungen von Lindhoff-Last [24] ergäbe die Bestimmung des D-Dimer-Spiegels zusätzliche Informationen. Bei HIT II-Patienten käme es aufgrund des präthrombotischen Zustandes zu einer Aktivierung der plasmatischen Gerinnung und einer Freisetzung von Thrombin. Folge sei ein D-Dimer-Anstieg. Ein negativer D-Dimer-Test mache somit das Vorliegen einer akuten HIT weniger wahrscheinlich [24].

1.2.3 Therapie der HIT

Im Falle einer HIT muss die Gabe von Heparin beendet und dieses durch ein Alternativ-Antikoagulans ersetzt werden. Ein mit den Heparin-Antikörpern kreuzreagierendes Antikoagulans kommt dabei nicht in Frage.

Früher wurden LMWH als Alternative eingesetzt. Untersuchungen zeigten jedoch eine Kreuzreaktion mit den HIT-Antikörpern. Sie wurde in vitro unter Anwendung von sensitiven Assays in 90% der Fälle nachgewiesen [19,41]. Ein Gebrauch von LMWH könnte auf diese Weise die HIT potenzieren. LMWH sind aus diesem Grund bei einer vorliegenden HIT kontraindiziert und werden deshalb nicht mehr verwendet.

Danaparoid zeigt demgegenüber in weniger als 10% eine Kreuzreaktivität [18,20]. Dadurch ist das Entstehen einer HIT wesentlich seltener. Danaparoid kann infolgedessen beim Vorliegen einer HIT vom Typ II eingesetzt werden.

Die HIT gehört zu den Hauptindikationen für Danaparoid.

1.3 Danaparoid als Alternativantikoagulans

1.3.1 Struktur von Danaparoid

Danaparoid-Natrium (Org 10172, Lomoparan) wurde 1976 synthetisiert und kam 1983 erstmals am Menschen im Rahmen einer HIT II zum Einsatz [46].

Danaparoid gehört zu der Gruppe der Heparin-ähnlichen Substanzen, den sogenannten Heparinoiden. Es wird wie Heparin aus Schweinemukosa gewonnen [46,58]. Reinigungsprozesse stellen sicher, dass es keine Verunreinigung mit Heparin gibt. Danaparoid ist somit frei von Heparin und Heparinbestandteilen. Nur deshalb kann der Wirkstoff als Alternativ-Antikoagulans bei der HIT eingesetzt werden. Dieser Tatsache verdankt Danaparoid seine heutige Bedeutung.

Hauptbestandteil des Glykosaminoglykans ist Heparansulfat (84%). Dieses hat eine hohe Affinität zu Antithrombin [58]. Weitere Bestandteile von Danaparoid sind Dermatansulfat (12%) und Chondroitinsulfat (4%) [1]. Die sich wiederholende Haupteinheit Heparansulfat besteht vorzugsweise aus Glukuronsäure, indessen UFH und LMWH hauptsächlich Iduronsäure-2-Sulfat enthalten [35]. Die chemische Struktur ist in Abbildung 2 dargestellt.

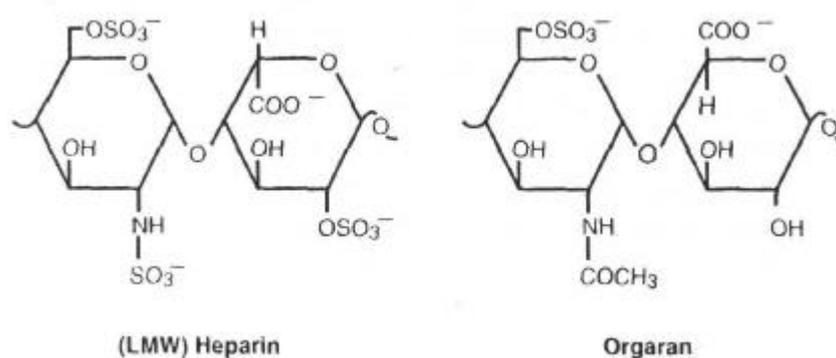


Abbildung 2: Die sich wiederholenden Disaccharideinheit besteht bei LMW-Heparin aus Glukosamino-N-Sulfat (links) und Iduronsäure (rechts); bei Danaparoid hingegen aus N-Acetyl-Glukosamin (links) und Glukuronsäure (rechts) [16].

Das mittlere Molekulargewicht von Danaparoid liegt bei 6000 Dalton [3]. Es enthält eine im Vergleich zu Heparinen geringe Ladungsdichte und einen niedrigeren Sulfatierungsgrad. Dieser liegt für Heparine bei 2,0-2,5, für Danaparoid bei 1,0-1,5 [16]. Dies beeinflusst das Ausmaß der Bindung an Plasmaproteine und Thrombozyten und trägt auf diese Weise zum pharmakologischen Profil von Danaparoid bei [12]. Danaparoid bindet nicht an Plasmaproteine oder Plättchen [16].

Der geringe Sulfatierungsgrad und das im Verhältnis zu UFH geringe Molekulargewicht von 6000 Dalton von Danaparoid erklären weiterhin die für die Therapie der HIT bedeutsame geringe Kreuzreaktivität mit den HIT-Antikörpern. Denn nach Kelton et al. führen beide Faktoren zu einer geringen Kreuzreaktivität [50].

Vor Beginn der Danaparoidtherapie sollte die in vitro Kreuzreaktivität ausgeschlossen werden, auch wenn eine in vitro nachgewiesene Kreuzreaktion keine sichere Aussage über das klinische Verhalten zulässt [70].

1.3.2 Wirkprinzip

Wie Heparin entfaltet Danaparoid seine Wirkung über Katalysierung von Serinprotease-Inhibitoren, sogenannten Serpinen, welche aktivierte Gerinnungsfaktoren hemmen [58]. Die antithrombotische Wirkung von Danaparoid wird über die durch Antithrombin III vermittelte Hemmung des Faktors Xa erreicht (vgl. Abbildung 1, Seite 2). Diese Anti-Xa-Aktivität wird auf die Wirkung von Heparansulfat zurückgeführt [47], welches eine hohe Affinität zu Antithrombin besitzt [58]. Dermatanansulfat wird für die Anti-IIa-Aktivität von Danaparoid verantwortlich gemacht [47]. Diese wird über Antithrombin III und Heparin-Kofaktor II vermittelt. Danaparoid inhibiert ferner die Generierung des Faktors IIa (IIaGI) [70] und die Produktion von Thromboxan B2 [18], die durch die Heparin-assoziierten Antikörper induziert wird. Sie ist unter anderem Ursache der thromboembolischen Komplikationen.

Das Verhältnis von Anti-Xa- zu Anti-IIa-Aktivität liegt bei ungefähr 20:1. Es liegt damit um den Faktor 20 höher als bei UFH (1:1) und etwa 10 mal höher als bei LMWH (2-4 : 1) [70]. Im Gegensatz zu Heparin hat Danaparoid auf die Thrombin-

Generierung somit nur moderaten Einfluss [58]. Die physiologische Thrombozytenfunktion wird im Gegensatz zu Heparin nicht beeinflusst [58].

Bisher ist keine Methode des direkten Nachweises von Danaparoid in der klinischen Routine verfügbar. Wie bei LMWH wird auch die antikoagulatorische Aktivität von Danaparoid anhand der Anti-Xa-Aktivität überwacht [32]. Zu beachten ist, dass die Eichkurve in diesem Fall mit Danaparoid selbst zu erstellen ist.

Für die Thrombozytenzahl, sowie die Blutungszeit und Plasma-Beta-Thromboglobulin ergeben sich keine Änderungen [13]. Gleiches gilt für die aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT), die Thrombinzeit, sowie die Prothrombinzeit [1,70]. Die Wirkungen auf das fibrinolytische System sind gering [10,70].

1.3.3 Klinische Aspekte

Die therapeutische Dosierung für die Antikoagulation umfasst eine zwei- bis dreimalige Gabe von 750 U s.c. bzw. 4800 U i.v. pro Tag.

Danhof et al. untersuchten die Bioverfügbarkeit bei subkutaner und intravenöser Applikation sowie die Halbwertszeiten der einzelnen antikoagulatorisch wirksamen Bestandteile von Danaparoid. Weiterhin wurde die Eliminationskinetik geprüft. Außerdem untersuchte Danhof Einflüsse der Parameter Alter, Körpergewicht und Geschlecht sowie die Interaktion mit anderen Medikamenten:

Nicht nur bei intravenöser Gabe, sondern auch bei subkutaner Applikation ist Danaparoid vollständig bioverfügbar [45,70]. Bei subkutaner Injektion wird das Maximum der Anti-Xa-Aktivität nach etwa 2 bis 5 Stunden erreicht [70]. Der Steady-State der Anti-Xa-Aktivität stellt sich dabei nach etwa 4 bis 5 Tagen ein [70].

Die intravenöse Applikation führt zu einem linearen Verhältnis zwischen der steigenden Danaparoid-Dosis und der messbaren Anti-Xa-Aktivität im Plasma. Dabei zeigt sich eine biexponentielle Pharmakokinetik für die Anti-Xa-Aktivität [62,70]. Die Kinetik der Anti-IIa-Aktivität ist demgegenüber monoexponentiell [70]. Das Verteilungsvolumen von Danaparoid beträgt 8,3 Liter [35].

Hinsichtlich der Halbwertszeit von Danaparoid und seinen Bestandteilen finden sich in der Literatur verschiedene Angaben. Die Halbwertszeit der Anti-Xa-Aktivität beträgt etwa 25 Stunden ($24,5 \pm 9,6$ Stunden), die der Anti-IIa-Aktivität etwa vier Stunden ($4,3 \pm 3,5$ Stunden) [23,30,58,70]. Die Halbwertszeit für die Hemmung der Thrombingenerierung wird mit drei Stunden angegeben [58]. Wegen dieser verschiedenen Halbwertszeiten ist eine optimale Dosierung unmöglich. Die Anti-Xa-Halbwertszeit von 25 Stunden als längste Wirkungsdauer legt eine einmal tägliche Applikation nahe. Im Gegensatz dazu spricht die kurze Halbwertszeit der Anti-IIa-Aktivität für eine häufigere Applikation. Dies führt jedoch wiederum zu einer Kumulation der Anti-Xa-Aktivität. Insgesamt hat sich klinisch eine zweimalige Gabe als bestmögliche Thromboseprophylaxe bewährt [23].

Danaparoid wird renal eliminiert. Hepatische Eliminationswege konnten durch Tierversuche ausgeschlossen werden. Die Bedeutung der renalen Elimination für die Anti-Xa-Aktivität wurde durch Versuche von Danhof bei Dialysepatienten mit chronischem Nierenversagen bestätigt [23]. Die Anti-Xa-Aktivität kann bei Einschränkung der Nierenfunktion stark verlängert sein. Nach Fischer lassen sich erhöhte Werte noch nach bis zu vier Tagen nachweisen [27]. Das Blutungsrisiko wird dadurch erhöht. Deshalb ist Danaparoid bei Patienten mit stark eingeschränkter Nierenfunktion kontraindiziert. Bei HIT-Patienten mit schwerer Niereninsuffizienz wird es gleichwohl unter engmaschiger Kontrolle der Anti-Xa-Aktivität erfolgreich eingesetzt.

Die Parameter Alter, Körpergewicht und Geschlecht haben nur geringen Einfluss auf die Wirkung von Danaparoid. Eine Anpassung der Dosierung ist daher nicht erforderlich.

Auch die gleichzeitige Gabe anderer Medikamente scheint keinen Einfluss auf die Metabolisierung von Danaparoid zu haben und erfordert daher keine Dosisänderung [70].

Danaparoid ist als einziges Medikament zur Therapie bei HIT II mit thromboembolischen Folgekomplikationen, zur prophylaktischen Antikoagulation im Allgemeinen und zur Prophylaxe bei der HIT II im Speziellen zugelassen. Erfolgreich wird es bereits nach Hüftoperationen eingesetzt. Es senkt hierbei das Risiko einer tiefen Beinvenenthrombose im Vergleich zu Placebo um 73%, ohne dabei das Blutungsrisiko zu erhöhen [14].

Im Rahmen eines weltweiten Compassionate-use-Programms wurde die Anwendung von Danaparoid bei 667 HIT II-Patienten beobachtet [70]. In 93% der Fälle wurde die Behandlung als erfolgreich angesehen. Bei 91% der Patienten bildete sich eine bestehende Thrombozytopenie zurück. Allerdings kam es bei 3,1% aller beteiligten Versuchspersonen zu Blutungskomplikationen. Die Gesamtmortalität lag bei 10,4% während der Behandlung sowie bei 7,8% während der Nachbeobachtungszeit von drei Monaten. Für 14 der 114 Todesfälle während der dreimonatigen Nachphase wird Danaparoid verantwortlich gemacht. In der Vergleichsgruppe von Patienten, die nicht mit Danaparoid behandelt wurde, lag die Mortalitätsrate bei 23,5% [70].

Darüber hinaus wird Danaparoid nach Schlaganfällen prophylaktisch eingesetzt. In der TOAST-Studie wurde der Effekt von Danaparoid nach ischämischen Insulten untersucht [2]. Es minimiert hier ebenfalls das Risiko einer tiefen Beinvenenthrombose [65]. Danaparoid wird schließlich wirksam in der Dialyse verwendet [48]. Weiterhin wird es zwar gelegentlich bei kardiopulmonalen Bypass-Operationen eingesetzt [69]. Dieser seltene Anwendungsfall wird aber kritisch beurteilt.

Auch in weiteren individuellen Fallstudien mit HIT-Patienten erwies sich eine Therapie mit Danaparoid als erfolgreich.

Untersuchungen von Greinacher et al. zur Gabe von Danaparoid während der Schwangerschaft zeigten keine Hinweise auf eine Plazentagängigkeit. Jedoch konnten indirekt die mütterlichen Antikörper gegen Heparin im Nabelschnur-Serum nachgewiesen werden [39]. Vom erfolgreichen Einsatz von Danaparoid bei Kindern wird ebenfalls berichtet [11,72,59].

1.3.4 Danaparoid bei Niereninsuffizienz

Indes ist auch der Einsatz von Danaparoid nicht risikolos möglich. Dies zeigt sich vor allem bei einer Überdosierung. Eine solche kann iatrogen herbeigeführt werden, im Sinne einer Überdosierung an sich. Eine andere Ursache ist eine verlangsamte Ausscheidungsfähigkeit des Patienten, sodass es trotz zunächst korrekter Dosierung zu einer Überdosierung kommt. Die Elimination von Danaparoid erfolgt renal. Eine Niereninsuffizienz führt zu einer verlangsamten Ausscheidung. Folge kann bei fehlender Dosisanpassung unter engmaschiger Kontrolle in der Niereninsuffizienz ein stark erhöhtes Blutungsrisiko des Patienten sein.

Eine kausale Therapie bei Überdosierung mit Danaparoid ist bisher nicht bekannt. Dies ist eine der Ursachen für den zurückhaltenden Einsatz von Danaparoid. Die Kenntnis einer Therapie bei Überdosierung mit Danaparoid ist jedoch erforderlich, um einen sicheren Einsatz zu ermöglichen. Bisherige Therapieempfehlungen umfassen eine supportive Gabe von Erythrozytenkonzentraten und Frischplasmen [43]. Demgegenüber wird eine Verabreichung von Thrombozytenkonzentraten kritisch beurteilt. Diese könnten eine HIT II potenzieren. Bei unkontrollierbarer Blutung wird eine Plasmapherese empfohlen [15]. Die aktuelle Datenlage zur erfolgreichen Plasmapherese und anderen extrakorporalen Eliminationsverfahren von Danaparoid ist bislang unvollständig.

1.4 Zielsetzung

Die folgende Arbeit ist Teil eines Gesamtprojektes. Inhalt ist die Elimination von Antikoagulanzen mittels extrakorporaler Verfahren. Die vorliegende Arbeit schließt an die frühere Untersuchung von Benz zum Thema Elimination von Hirudin mittels Hämofiltration [8] an. Die vorliegende Studie fokussiert die Elimination von Danaparoid mittels extrakorporaler Verfahren.

Um Danaparoid sicher im klinischen Alltag einsetzen zu können, ist die Kenntnis einer möglichen Elimination im Falle einer Überdosierung unerlässlich. Die bisherigen Kenntnisse dazu sind unvollständig.

Das Ziel der vorliegenden Studie war die Untersuchung von fünf häufig in der Klinik verwendeten High-Flux-Hämodialysatoren sowie eines Plasmapheresefilters

hinsichtlich der Filtrations- und Adsorptionseigenschaften im Bezug auf Danaparoid. Ziel war somit die Verbesserung der Pharmakosicherheit von Danaparoid.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Danaparoid (Orgaran®)

In der vorliegenden Arbeit wurde Orgaran® der Celltech Group (Celltech GmbH & Co KG, Essen) verwendet. Eine Ampulle Orgaran® (0,6 ml) enthält 750 Anti-Faktor-Xa-Einheiten Danaparoid-Natrium. Dies entspricht 1250 Anti-Xa-Einheiten/ml.

2.1.2 Trägerlösungen

Als Trägerlösungen wurden folgende Substanzen verwendet:

0,9% isotonische NaCl-Lösung Schiwa® Braun Schiwa, Glandorf

5% Human-Albumin Immuno

Baxter, Unterschleißheim

Kompositionelles Vollblut

(Plasma und Erythrozytenkonzentrate [EK] aus der Abteilung für Transfusionsmedizin der Universitätsklinik Freiburg sowie vom Roten Kreuz Baden-Baden).

Herstellung des kompositionellen Vollblutes:

Es wurden Eigenblutspenden nach Überschreiten ihrer Höchstlagerungsdauer verwendet. Die Abteilung für Transfusionsmedizin der Universität Freiburg stellte solche Konserven zur Verfügung. In Zusammenarbeit mit der Transfusionsmedizin wurden kompositionelle Vollblutkonserven hergestellt. EK und Blutgruppenkompatible Plasmen wurden ineinander überführt und gepoolt. Nach Durchmischen der Bestandteile wurden jeweils 500 ml Vollblut in geeignete Vorratsbeutel abgefüllt.

2.1.3 Berichrom Heparin Assay

Für die Messung der Anti-Xa-Aktivität wurde der Berichrom Heparin Assay der Firma Dade Bering, Marburg verwendet.

- Faktor Xa-Reagenz: lyophilisiert, Plasmafraktion (human) mit Zusatz von Tris (6 g/l) , Natriumchlorid (12 g/l) und EDTA (0,74 g/l)

- Dextransulfat-Reagenz: lyophilisiert, 0,02 g/l

- Antithrombin-Reagenz: human, lyophilisiert, 1 IU/ml; enthält Natriumazid (< 1 g/l)

- Substrat-Reagenz: Z-D-Leu-Gly-Arg-ANBA-methyl-amid, 4 mmol/l, lyophilisiert

- LMWH-Kalibrator
- Heparin-Kontrolle
- Standard-Humanplasma

Das Dextransulfat wurde mit 10 ml destilliertem Wasser versetzt und das Faktor Xa-Reagenz mit diesem eingelöst. Das Antithrombin-Reagenz wurde mit 1 ml, das Substrat-Reagenz mit 2 ml destilliertem Wasser gelöst. Bei Raumtemperatur inkubierten die Reagenzien für 30 min.

2.1.4 Hämodialysatoren

Die in dieser Arbeit verwendeten Dialysatoren waren High-Flux-Hämodialysatoren. Ihre Eigenschaften sind in der nachfolgenden Tabelle 2 zusammengestellt.

Neben diesen High-Flux-Filtern wurde ein Plasmapherese-Filter untersucht (Tabelle 3).

<u>Handelsname</u>	<u>Material der Dialysatormembran</u>	<u>Hersteller</u>	<u>Membranoberfläche in m²</u>	<u>Ultrafiltrationskoeffizient in ml/h*mmHg (Kuf)</u>
F 50 S	Polysulfon	Fresenius, Bad Homburg	1,0	30
Filtral 8	AN69 (Polyacrylonitril)	Hospal, Planegg-Martinsried	0,75	32
F 11 S	Polyamid	Gambro, Hechingen	1,1	53
Arylane H1	PAES (Polyarylethersulfon)	Hospal, Planegg-Martinsried	1,04	58
Filtryzer BK-1.3 F	PMMA (Polymethylmethacrylat)	Toray, Neu-Isenburg	1,3	16

Tabelle 2: High-Flux-Hämodialysatoren

<u>Handelsname</u>	<u>Material der Dialysatormembran</u>	<u>Hersteller</u>	<u>Membranoberfläche in m²</u>	<u>Ultrafiltrationskoeffizient in ml/h*mmHg</u>
Plasmaflux P 2 S	Polypropylen	Fresenius, Bad Homburg	0,5	-

Tabelle 3: Plasmapherese-Filter

2.1.5 Geräte

Konventionelle Rollerpumpen	MTS Medizintechnische Systeme, Schweinfurt
Arterielle Schlauchsysteme	Meise Medizintechnik, Schalksmühle
Venöse Schlauchsysteme	Meise Medizintechnik, Schalksmühle
Diverse Adapter	Achim Schulz-Lauterbach, Iserlohn
Spritzen, Nadeln und Probenröhrchen	Braun Schiwa, Glandorf
BCS-Analyser	Dade Behring, Schwalbach

2.2 Versuchsaufbau

Das in vitro-Hämodialysationsmodell wurde gemäß dem Schema in Abbildung 3 aufgebaut. Handelsübliche Dialyseschlauchsysteme wurden über Konnektoren verbunden und durch zwei konventionelle Pumpeinheiten geführt.

Das Modell entspricht den in Euronorm 1283 festgelegten Richtlinien zur Determination des Ultrafiltrationskoeffizienten in Hämodialysatoren [26].

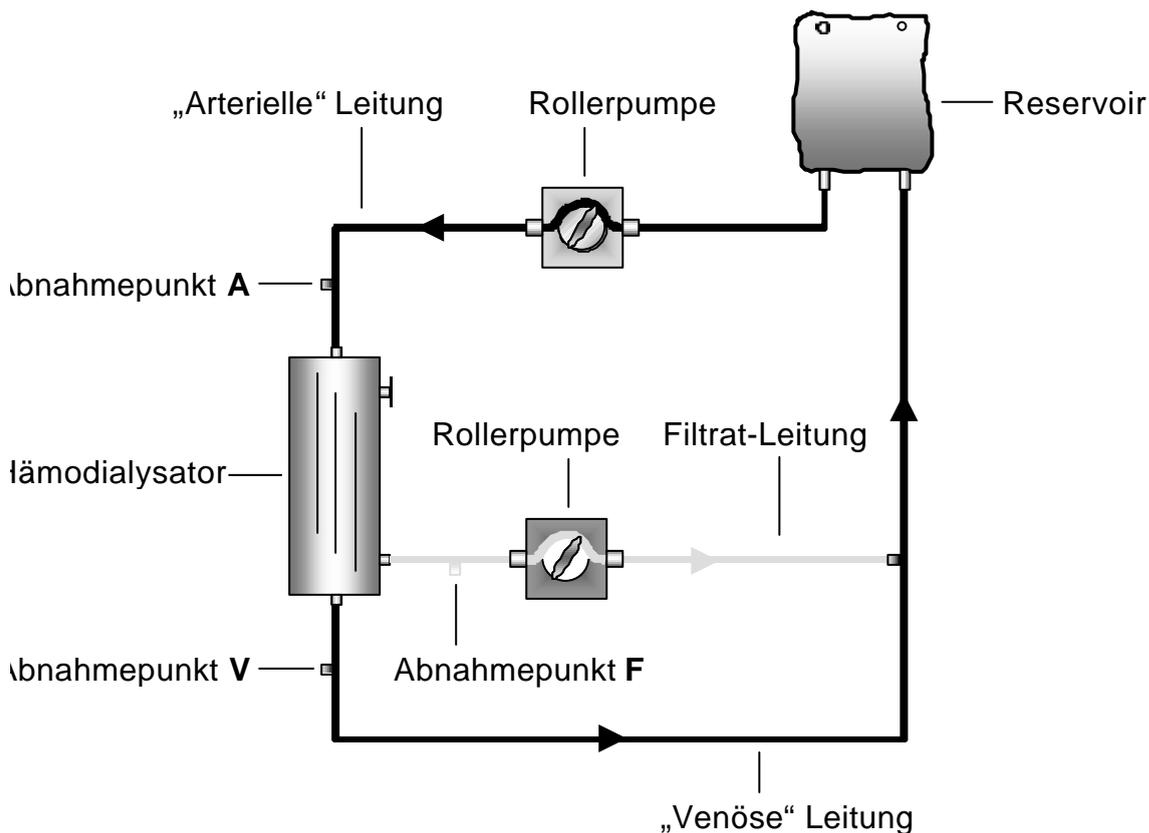


Abbildung 3: In vitro-Filtrationskreislauf. (Modell nicht maßstabsgerecht) [29]

Um die Eigenschaften der einzelnen Filtermembranen unter verschiedenen Bedingungen untersuchen sowie den Einfluss von Proteinen und anderer Blutbestandteile differenzieren zu können, wurden getrennte Versuche für 0,9%iges NaCl, 5%iges Albumin und für kompositionelles Vollblut durchgeführt.

Die Trägerlösungen wurden mit einer festgelegten Menge Danaparoid versetzt, der Zielwert der Anti-Xa-Aktivität sollte dabei 0,6 - 0,8 U/ml betragen.

Die Trägerlösung gelangte aus dem Vorratsbeutel über das arterielle Schlauchsystem (Leitung zwischen Reservoir und Hämodialysator) in den Hämodialysator. Über das venöse Schlauchsystem (Leitung zwischen Hämodialysator und Reservoir) floss die Flüssigkeit zum Vorratsbeutel zurück.

NaCl- und Albuminversuche

Dieser äußere Kreislauf wurde zunächst mit isotoner Kochsalzlösung mit 300 ml/min für 10 min durchgespült, um eine gleichmäßige Benetzung der Schlauchinnenwände zu gewährleisten und somit konstante Danaparoidkonzentrationen während des Versuches voraussetzen zu können.

Nach diesem Spülvorgang wurde der Versuch durch Öffnen der Filtratleitung begonnen und zugleich die Zeitmessung gestartet.

Vollblutversuche

500 ml kompositionelles Vollblut, bestehend aus EK und Plasma, wurde in einen Adapter-kompatiblen Vorratsbeutel umgefüllt und mit Danaparoid versetzt. Die Anti-Xa-Aktivität sollte bei 0,4-0,6 U/ml liegen.

Auch hier wurde der äußere Kreislauf zunächst für 10 Minuten mit isotoner NaCl-Lösung bei einer Flussgeschwindigkeit von 300 ml/min durchgespült, um die Schlauchinnenwände zu benetzen. Einer andernfalls auftretenden Aktivierung der Gerinnung und nachfolgenden Thrombosierung des Blutes in den Schläuchen konnte damit vorgebeugt werden.

Der Vorratsbeutel wurde nun an das arterielle Schlauchsystem angeschlossen, und das mit Danaparoid versetzte Blut mit 200 ml/min in das System gebracht. Durch das Eintreten des Blutes wurde die Kochsalzlösung verdrängt. Diese wurde aufgefangen und verworfen. Es sollte so viel NaCl wie möglich verworfen werden, bevor der venöse Schlauch an den Blutvorratsbeutel angeschlossen wurde. Durch die Durchspülung mit NaCl ergab sich ein nur geringer und deshalb zu vernachlässigender Verdünnungseffekt. Zu Beginn und nach Beendigung eines Versuches wurde Blut zur Bestimmung des Hämatokritwertes entnommen. Dieser lag bei durchschnittlich 31% bzw. 34%.

2.3 Versuchsdurchführung

Die Filtratleitung wurde mit Beginn der Versuchszeit geöffnet. Die über die Dialysatormembran abgepresste Flüssigkeit floss über ein Verbindungsstück in den venösen Schenkel und somit in den äußeren Kreislauf zurück. Diese Rezirkulation erlaubte, mögliche Fehlerquellen bei einer sonst notwendigen Substitution auszuschließen. Die Pumpengeschwindigkeit in der Filtratleitung betrug 50 ml/min bei NaCl- und Albumin-Versuchen bzw. 40 ml/min bei Vollblutversuchen.

Die Pumpengeschwindigkeit im äußeren Kreislauf betrug 300 ml/min bei NaCl- und Albumin-Versuchen bzw. 200 ml/min bei Vollblutexperimenten. Die niedrigere Flussgeschwindigkeit bei Vollblutexperimenten war erforderlich, um eine Hämolyse zu verhindern.

Das entstehende Verhältnis der Flussgeschwindigkeiten im äußeren Kreislauf zu derjenigen der Filtratleitung wurde während der gesamten Versuchszeit aufrecht erhalten.

Die unterschiedlichen Flussgeschwindigkeiten im äußeren Kreislauf und in der Filtratleitung waren erforderlich, weil im klinischen Alltag eine maximale Filtration von etwa einem Drittel des Plasmawassers bei Patienten zugelassen ist. Diese Anforderung war für beide Versuchsdurchführungen erfüllt.

Durch die vorgenommene Veränderung der Flussgeschwindigkeiten bei den Vollblutversuchen ist keine Beeinflussung der Siebkoeffizienten zu erwarten, da dieser unabhängig von Blut- und Filtratflüssen ist [53].

Die Versuchsdauer betrug zwei Stunden. Die Messergebnisse der während der ersten Versuchsstunde entnommenen Proben wichen von denen der zweiten Stunde nicht wesentlich ab. Weitere Versuche waren daher auf eine Versuchsdauer von jeweils einer Stunde angelegt. Während der ersten Stunde wurden alle 10 min, in der zweiten Stunde alle 15 min an der arteriellen, venösen und der zur Filtratleitung gehörigen Abnahmestelle jeweils 1,5 ml Lösung entnommen. Zu den festgelegten Zeitpunkten wurden somit jeweils drei Proben entnommen. Anhand dieser Wertetriplets konnte die Konzentrationsänderung von Danaparoid in den einzelnen Kreislaufabschnitten im Zeitverlauf nachvollzogen werden.

2.4 Probenaufarbeitung

Probenvorbereitung:

Die Messung der Anti-Xa-Aktivität in den Proben wurde unmittelbar nach der Filtration oder innerhalb von 24 Stunden durchgeführt. Bis zur Messung wurden NaCl- und Albumin-Proben bei 4°C gelagert. Die Blutproben wurden zentrifugiert (5000 U/min; 15 min) und das Plasma bis zur Analyse bei – 20°C aufbewahrt.

Alle Proben wurden unmittelbar vor der Messung erneut durchmischt.

Anti-Xa-Messung:

Zur Bestimmung der Anti-Xa-Aktivität wurde der chromogene Berichrom Heparin Assay verwendet.

Die Probe wurde dafür mit Dextransulfat versetzt, welches durch Störfaktoren gebundenes Heparin (bzw. Danaparoid) wieder freisetzt und der Bestimmung zugänglich macht. Der Faktor Xa wurde als definierte Menge, Antithrombin im Überschuss beigegeben. Während der Inkubationsphase wird der Faktor Xa durch Antithrombin mittels Komplexbildung inaktiviert. Heparin wie Danaparoid beschleunigen diesen Vorgang. Der verbliebene Rest an Faktor Xa wurde in einem kinetischen Test über die Extinktionszunahme bei 405 nm mittels eines chromogenen Substrates bestimmt.

Die Auswertung erfolgte automatisch an einem BCS-Analyzer anhand einer Referenzkurve. Die Heparin- bzw. Danaparoidkonzentration in U/ml ergibt sich durch den Vergleich der Extinktionswerte mit der Bezugskurve. Vor Beginn jeder Messung wurde eine definierte Danaparoid-Kontrolle gemessen. Erst bei einem entsprechenden Messwert von $\pm 10\%$ zur angegebenen Danaparoid-Kontrolle wurde mit der Messung der eigenen Proben begonnen. Bei stärkerer Abweichung wurde mit dem Kalibrationsprogramm des BCS-Analyzers eine neue Referenzkurve erstellt.

Das lineare Verhältnis von nachweisbarer Anti-Xa-Aktivität und der Danaparoidkonzentration wurde in Eichversuchen vor Beginn der Filteruntersuchungen verifiziert.

2.5 Berechnung

2.5.1 Mittelwert und mittlerer Fehler des Mittelwertes

Mittelwert (\bar{x}):
$$\bar{x} = \frac{\sum x}{n}$$

Standardabweichung (s): $s = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$

Mittlerer Fehler des Mittelwerts (SEM): $SEM = \frac{s}{\sqrt{n}}$

2.5.2 Berechnung des Siebkoeffizienten

Um die Filtrationseigenschaften verschiedener Dialysatoren vergleichen zu können, wird im allgemeinen der Siebkoeffizient als Parameter herangezogen. Dieser ist ein Maß für die Durchlässigkeit einer Hämodialysatormembran und damit für das Ausmaß, eine Substanz filtrieren und somit eliminieren zu können. Der Siebkoeffizient berechnet sich nach folgender Formel:

Siebkoeffizient (SK): $SK = \frac{2 * \text{Filtratkonzentration}}{\text{arterielle Konzentration} + \text{venöse Konzentration}}$

Bei den in dieser Studie durchgeführten Versuchen lagen die Filtratkonzentrationen fast ausnahmslos unter der Nachweisbaregrenze. Infolgedessen ergibt sich bei der Rechnung eine Multiplikation mit null. Die Siebkoeffizienten der High-Flux-Dialysatoren waren somit, mit Ausnahme der Membran aus Polyarylethersulfon (PAES), null.

2.5.3 Berechnung der Adsorption

Entsprechend dem Siebkoeffizienten als Vergleichsparameter läßt sich die Adsorption einer Substanz an eine Membran berechnen.

Die Adsorption an Membranen kann nicht unmittelbar nachgewiesen werden. Durch Berechnung der Abnahme von Danaparoid im Filtrationskreislauf kann auf die Adsorption geschlossen werden.

Dafür wird die Kenntnis der Volumenverteilung in dem in vitro-Kreislauf vorausgesetzt. Im arteriellen Schenkel fanden sich etwa 435 ml, wobei für die Rechnung der Vorratsbeutel miteinbezogen wird. Der venöse Schlauchabschnitt umfasste 15 ml, das Schlauchsystem der Filtratseite enthielt 50 ml der Trägerlösung.

Die Danaparoid-Gesamtmenge D im Kreislauf zum Zeitpunkt t berechnet sich nach folgender Formel:

$$D_t = (385 \text{ ml} \cdot A_t) + (15 \text{ ml} \cdot V_t) + (50 \text{ ml} \cdot F_t)$$

wobei: D_t : gesamte Danaparoid-Menge im Kreislauf in U

A_t : Danaparoidkonzentration im arteriellen Schlauchsystem in U/ml

V_t : Danaparoidkonzentration im venösen Schlauchsystem in U/ml

F_t : Danaparoidkonzentration im Filtratabschnitt in U/ml

Um die Adsorption an eine Membran berechnen zu können, ist die Kenntnis der Konzentrationen im entsprechenden Schlauchsystem zu Beginn (t_{10}) eines Versuches und nach zwei Stunden am Ende (t_{120}) eines Versuches erforderlich. Es wurden hierfür sämtliche Danaparoidkonzentrationen bzw. Anti-Xa-Aktivitäten der Versuche einer Versuchsreihe berücksichtigt.

Die Adsorption (in %) berechnet sich mit nachfolgender Formel:

$$\text{Adsorption} = 1 - \frac{D_{120}}{D_{10}}$$

2.5.4 Datenauswertung und graphische Darstellung der Daten

Wie oben beschrieben wurden während eines Versuches aus jeweils allen drei Schlauchsystemen zu festgesetzten Zeitpunkten Proben entnommen. Damit ergaben sich für einen Versuch von zwei Stunden Dauer 30 Proben. Die Anti-Xa-Aktivitäten wurden bestimmt.

Für Anti-Xa-Aktivitäten der Versuche einer Versuchsreihe wurde der Mittelwert und der mittlere Fehler des Mittelwertes nach obenstehender Formel errechnet. Es ergab sich für jeden Filter eine repräsentative Anti-Xa-Aktivität für den arteriellen und den venösen sowie den Filtratseitenabschnitt. Diese mittleren Anti-Xa-Konzentrationen stehen im linearen Verhältnis zur Konzentration von Danaparoid. Die antikoagulatorischen Aktivitäten werden im folgenden graphisch dargestellt.

3 Ergebnisse

3.1 Filtration von Danaparoid

Abbildung 4 zeigt einen repräsentativen Versuch. Aufgetragen sind Anti-Xa-Aktivitäten im arteriellen, venösen und Filtratanteil gegen die Zeit. Wie erwartet ergaben sich für die venösen Proben höhere Werte als für die arteriellen. Diese beruhen auf einer relativen Aktivitätszunahme durch Abfiltration von „danaparoidfreiem“ Filtrat. Die filtratseitigen Anti-Xa-Konzentrationen lagen ausnahmslos bei $<0,05$ U/ml. Dies entspricht einer nicht-nachweisbaren Konzentration von Danaparoid.

Weiterhin ist zu beobachten, dass die arteriellen und venösen Anti-Xa-Konzentrationen im Verlauf des Versuches relativ konstant blieben.

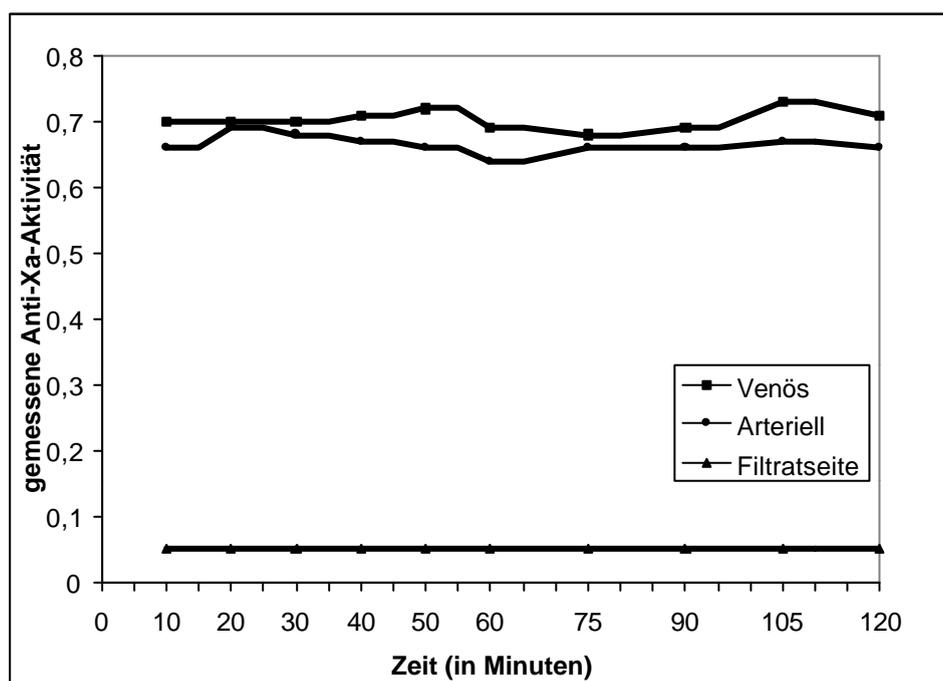


Abbildung 4: Repräsentatives Originalexperiment.

Danaparoidfiltration des Polysulfon-Dialysators mit Albumin als Trägerlösung. Arterielle, venöse und filtratseitige Anti-Xa-Konzentrationen bei zweistündiger Versuchsdauer.

3.1.1 Filtration von Danaparoid durch High-Flux-Dialysatoren

Um den Einfluss von Eiweißen und anderen Blutbestandteilen auf das Filtrationsverhalten von Danaparoid beurteilen zu können, wurden verschiedene Trägerlösungen in drei unabhängigen Versuchsreihen untersucht.

Kochsalz-Versuche:

In einer ersten Versuchsreihe wurde das Filtrationsverhalten der High-Flux-Dialysatoren mit 0,9% NaCl-Lösung als Trägerlösung untersucht, um die Membraneigenschaften bei Abwesenheit von Proteinen zu charakterisieren. Die Ergebnisse dieser Experimente waren außerordentlich heterogen, sehr wahrscheinlich durch das Fehlen einer Proteinmatrix. Sie wurden entsprechend nicht weiterverfolgt.

Albuminversuche:

In einer zweiten Versuchsreihe wurde 5% Albumin als Trägerlösung verwendet und somit der Einfluss von Proteinen auf die Filtrationseigenschaft näher untersucht. Dabei ergaben sich folgende Messwerte:

	Polysulfon (n=7)	AN69 (n=5)	Polyamid (n=4)	PAES (n=6)	PMMA (n=6)
Arteriell	0,68 ± 0,03	0,48 ± 0,02	0,87 ± 0,09	0,52 ± 0,05	0,14 ± 0,03
Venös	0,73 ± 0,03	0,52 ± 0,02	0,95 ± 0,09	0,53 ± 0,05	0,17 ± 0,03
Filtrat	<0,05 ± 0	<0,05 ± 0	<0,05 ± 0	0,4 ± 0,05	<0,05 ± 0
Siebkoefizient	0	0	0	0,78 ± 0,03	0

Tabelle 4: Mittlere Anti-Xa-Konzentrationen der einzelnen Filter in U/ml mit Albumin als Trägerlösung. Jeweils 10 Einzelmessungen (t_{10} - t_{120}) in n unabhängigen Versuchen.

Insgesamt zeigten sich erhebliche vom Dialysator abhängige Änderungen für die mittleren arteriellen Anti-Xa-Aktivitäten. Während beim Polyamidfilter die messbare Anti-Xa-Aktivität bei $0,87 \pm 0,09$ U/ml lag, fand sich für den AN69-Dialysator ein Wert von $0,48 \pm 0,02$ U/ml und für den Polymethylmethacrylat-Filter (PMMA-Filter) eine Aktivität von $0,14 \pm 0,03$ U/ml.

In den Versuchen zeigte sich mit Ausnahme des PAES-Filter bei keinem Dialysator eine Filtration von Danaparoid. Die Anti-Xa-Aktivität in den Filtratseitenproben lag für die Filter aus Polysulfon, AN69, Polyamid und PMMA im Bereich der unteren Nachweisgrenze ($<0,05$ U/ml). Danaparoid wurde nicht filtriert.

Im Gegensatz dazu filtrierte die PAES-Membran Danaparoid mit Albumin als Trägerlösung. Die mittlere Anti-Xa-Aktivität lag hier auf der Filtratseite bei $0,4 \pm 0,05$ U/ml (Abbildung 8, Tabelle 4). Es ergibt sich ein Siebkoeffizient für den PAES-Filter unter Albuminbedingungen von 0,76.

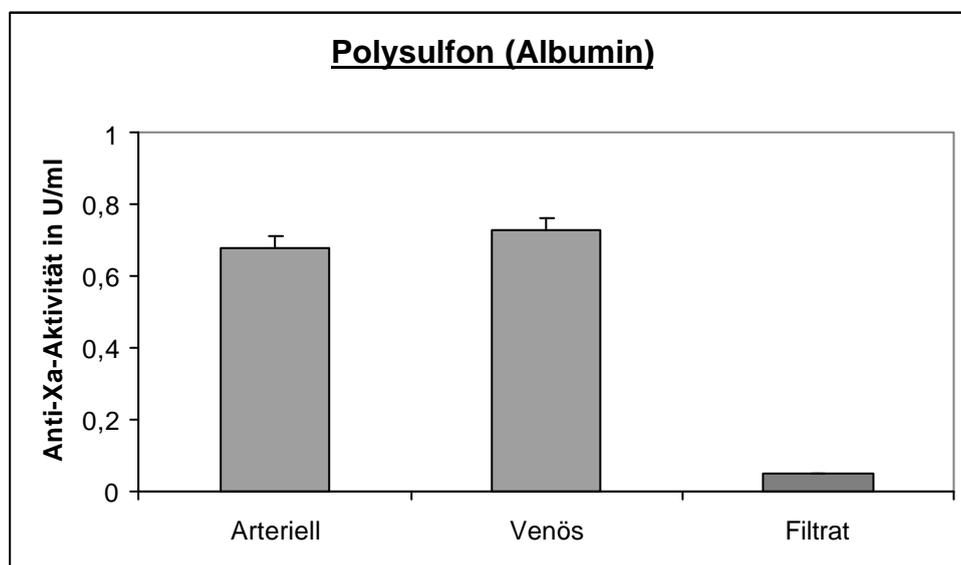


Abbildung 5: Danaparoidfiltration des Polysulfon-Filters mit Humanalbumin als Trägerlösung. Mittlere Anti-Xa-Konzentrationen im arteriellen, venösen und Filtratseitenabschnitt. (Mittelwerte \pm SEM aus 7 Versuchen, davon 3 Versuche über eine Dauer von jeweils 2 h mit jeweils 10 Abnahmezeitpunkten und 4 Versuche über jeweils 1 h mit jeweils 6 Abnahmezeitpunkten)

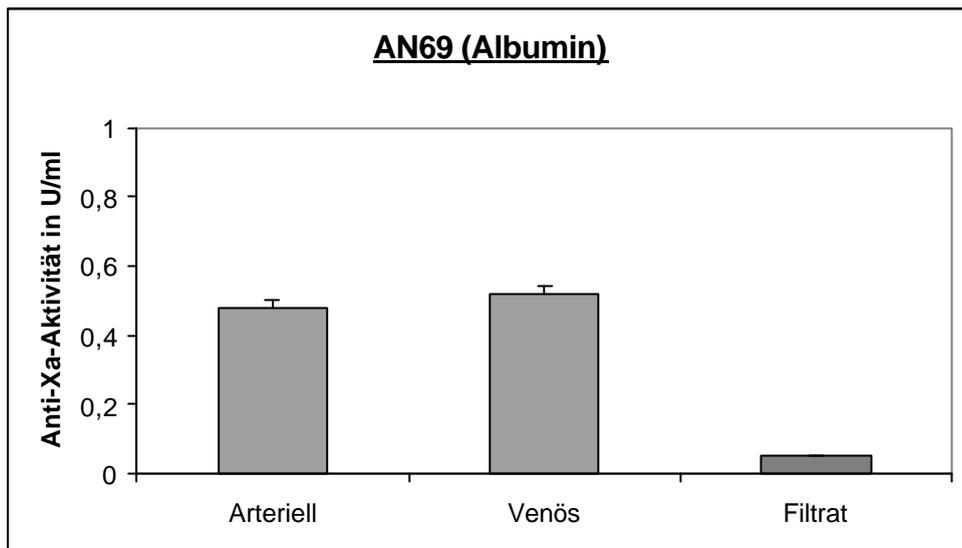


Abbildung 6: Danaparoidfiltration des AN69-Filters mit Humanalbumin als Trägerlösung. Mittlere Anti-Xa-Konzentrationen im arteriellen, venösen und Filtratseitenabschnitt. (Mittelwerte \pm SEM aus 5 Versuchen, davon 3 Versuche über eine Dauer von jeweils 2h mit jeweils 10 Abnahmezeitpunkten und 2 Versuche über jeweils 1 h mit jeweils 6 Abnahmezeitpunkten)

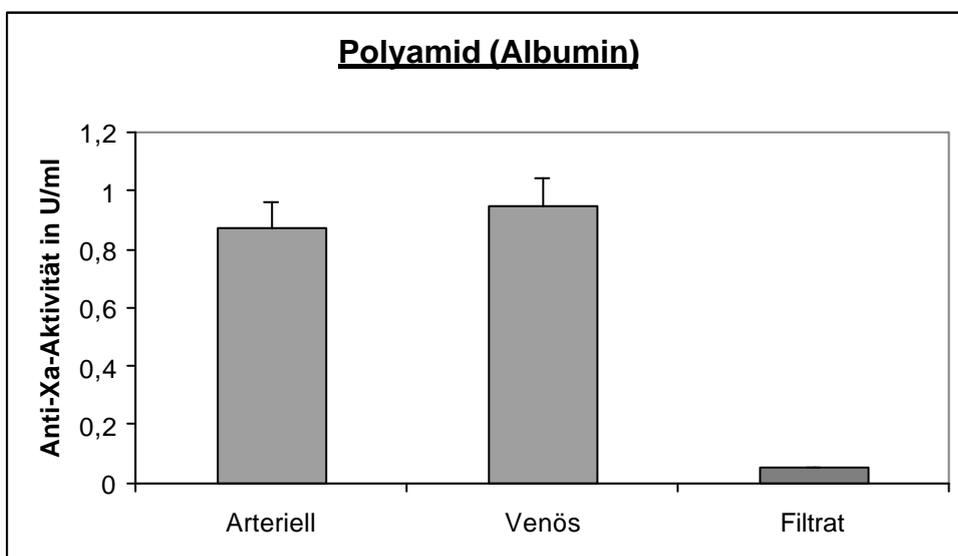


Abbildung 7: Danaparoidfiltration des Polyamid-Filters mit Humanalbumin als Trägerlösung. Mittlere Anti-Xa-Konzentrationen im arteriellen, venösen und Filtratseitenabschnitt. (Mittelwerte \pm SEM aus 4 Versuchen, davon 3 Versuche über eine Dauer von jeweils 2 h mit jeweils 10 Abnahmezeitpunkten und 1 Versuch über 1 h mit 6 Abnahmezeitpunkten)

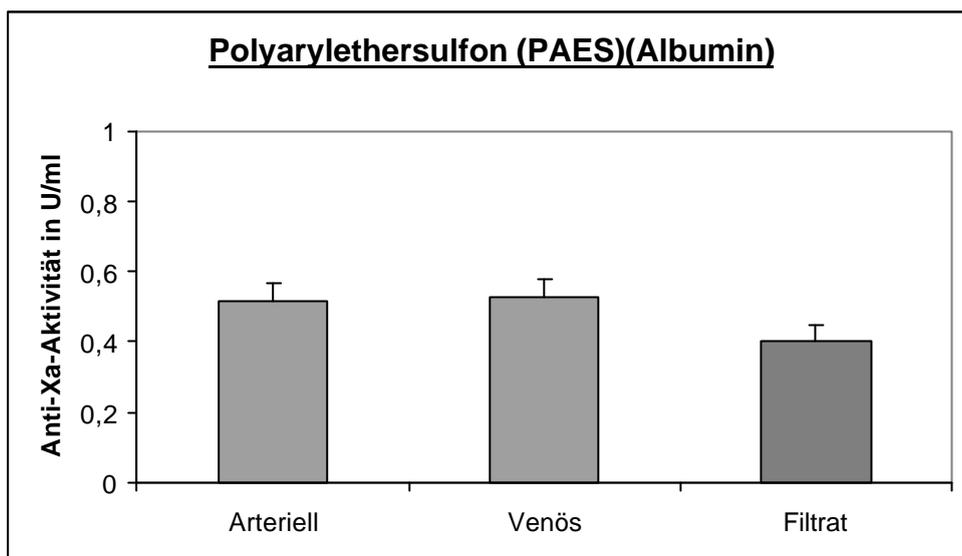


Abbildung 8: Danaparoidfiltration des PAES-Filters mit Humanalbumin als Trägerlösung. Mittlere Anti-Xa-Konzentrationen im arteriellen, venösen und Filtratseitenabschnitt. (Mittelwerte \pm SEM aus 6 Versuchen, davon 3 Versuche über eine Dauer von jeweils 2 h mit jeweils 10 Abnahmezeitpunkten und 3 Versuche über jeweils 1h mit jeweils 6 Abnahmezeitpunkten)

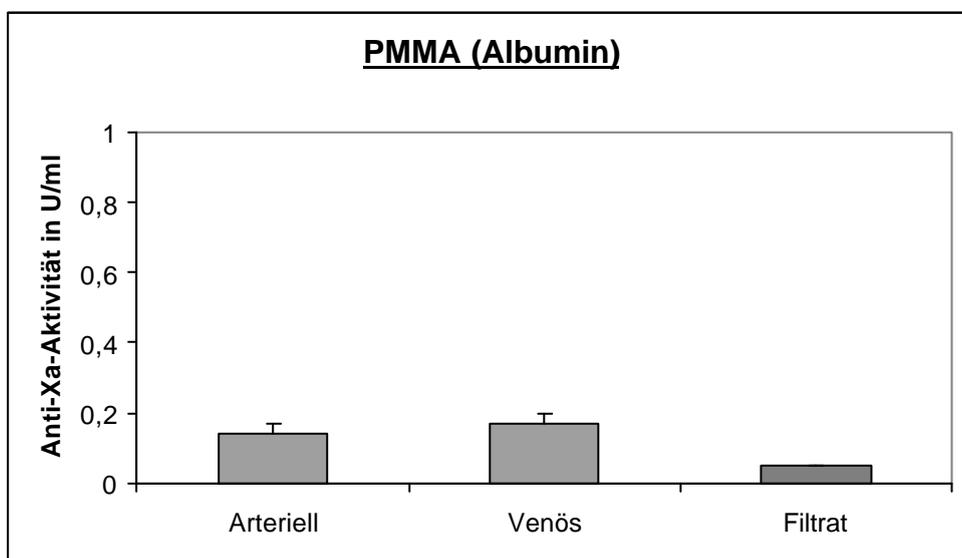


Abbildung 9: Danaparoidfiltration des PMMA-Filters mit Humanalbumin als Trägerlösung. Mittlere Anti-Xa-Konzentrationen im arteriellen, venösen und Filtratseitenabschnitt. (Mittelwerte \pm SEM aus 6 Versuchen von jeweils 2h Dauer mit jeweils 10 Abnahmezeitpunkten)

Vollblutversuche:

In der dritten Versuchsreihe wurde kompositionelles humanes Vollblut mit Danaparoid versetzt und als Trägerflüssigkeit verwendet. Dabei sollte eine in vivo-Umgebung so gut wie möglich nachgebildet werden.

Es ergaben sich folgende Messwerte:

	Polysulfon (n=3)	AN69 (n=3)	Polyamid (n=3)	PAES (n=5)	PMMA (n=3)
arteriell	0,52 ± 0,07	0,51 ± 0,03	0,58 ± 0,03	0,69 ± 0,12	0,31 ± 0,02
venös	0,84 ± 0,12	0,78 ± 0,06	0,84 ± 0,04	0,98 ± 0,1	0,43 ± 0,04
Filtrat	<0,05 ± 0	<0,05 ± 0	<0,05 ± 0	<0,05 ± 0	<0,05 ± 0
Siebkoefizient	0	0	0	0	0

Tabelle 5: Mittlere Anti-Xa-Konzentrationen der einzelnen Filter in U/ml mit Vollblut als Trägerlösung. Jeweils 10 Einzelmessungen (t_{10} - t_{120}) in n unabhängigen Versuchen.

Wie für die Albuminversuche lag die nachgewiesene Anti-Xa-Aktivität in den Proben der Filtratseite stets unter der Nachweisgrenze von 0,05 U/ml.

Danaparoid wurde unter Vollblutbedingungen von keinem der verwendeten Hämodialysatoren filtriert. Bei den Albuminversuchen wurde mit Ausnahme des PAES-Filters nicht filtriert.

Der PAES-Filter zeigte in den Vollblutversuchen nicht mehr die in den Albuminversuchen gezeigte Filtration. In den Filtratseitenproben des PAES-Filters konnte kein Danaparoid nachgewiesen werden (Abbildungen 10-14).

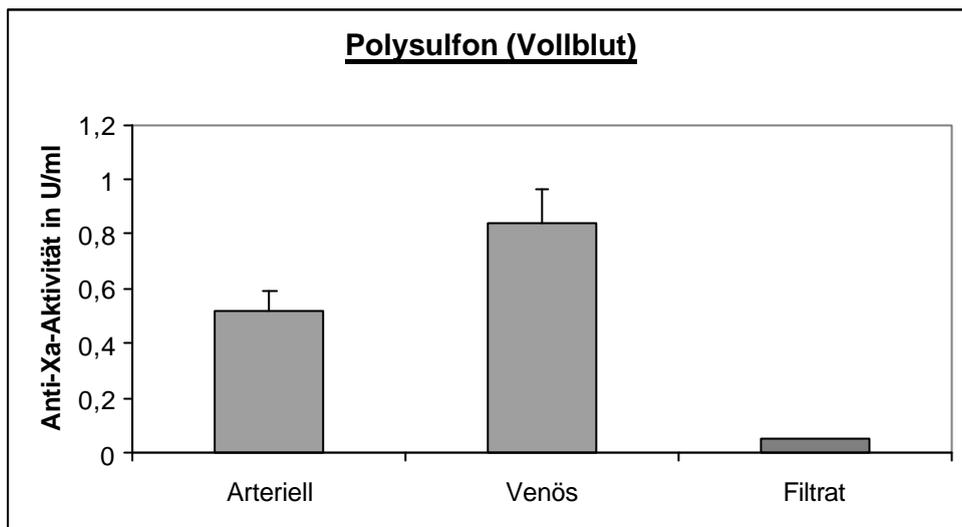


Abbildung 10: Danaparoidfiltration mit dem Polysulfon-High-Flux-Hämodialysator mit Vollblut als Trägerlösung. Mittlere Anti-Xa-Konzentrationen im arteriellen, venösen und Filtratseitenabschnitt. (Mittelwerte \pm SEM aus 3 Versuchen von jeweils 2 h Dauer mit jeweils 10 Abnahmezeitpunkten)

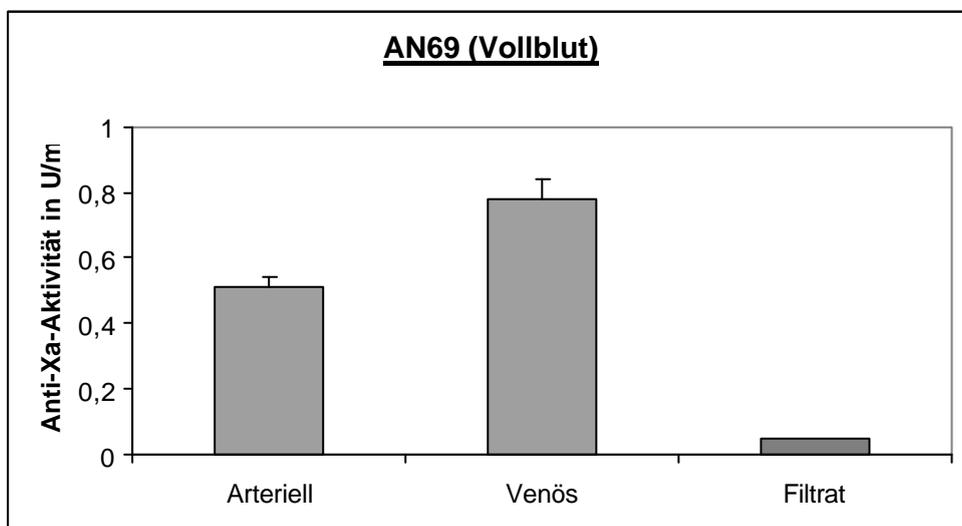


Abbildung 11: Danaparoidfiltration mit dem AN69-High-Flux-Hämodialysator mit Vollblut als Trägerlösung. Mittlere Anti-Xa-Konzentrationen im arteriellen, venösen und Filtratseitenabschnitt. (Mittelwerte \pm SEM aus 3 Versuchen von jeweils 2 h Dauer mit jeweils 10 Abnahmezeitpunkten)

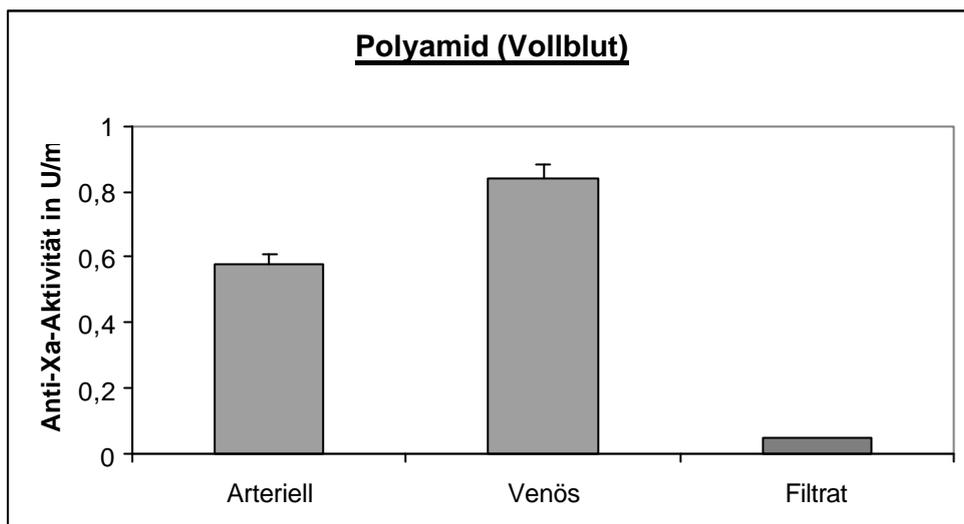


Abbildung 12: Danaparoidfiltration mit dem Polyamid-High-Flux-Hämodialysator mit Vollblut als Trägerlösung. Mittlere Anti-Xa-Konzentrationen im arteriellen, venösen und Filtratseitenabschnitt. (Mittelwerte \pm SEM aus 3 Versuchen von jeweils 2 h Dauer mit jeweils 10 Abnahmezeitpunkten)

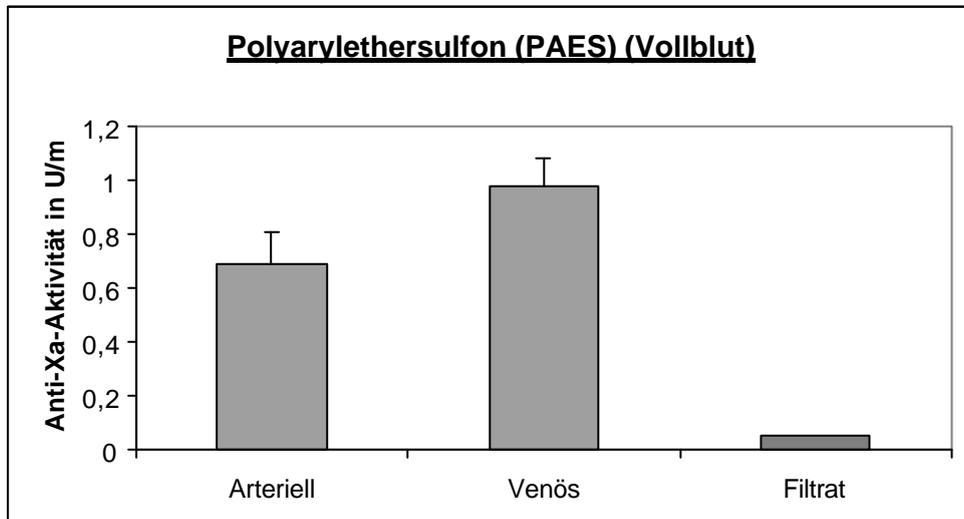


Abbildung 13: Danaparoidfiltration mit dem Polyarylethersulfon (PAES)-High-Flux-Hämodialysator mit Vollblut als Trägerlösung. Mittlere Anti-Xa-Konzentrationen im arteriellen, venösen und Filtratseitenabschnitt. (Mittelwerte \pm SEM aus 5 Versuchen von jeweils 2 h Dauer mit jeweils 10 Abnahmezeitpunkten)

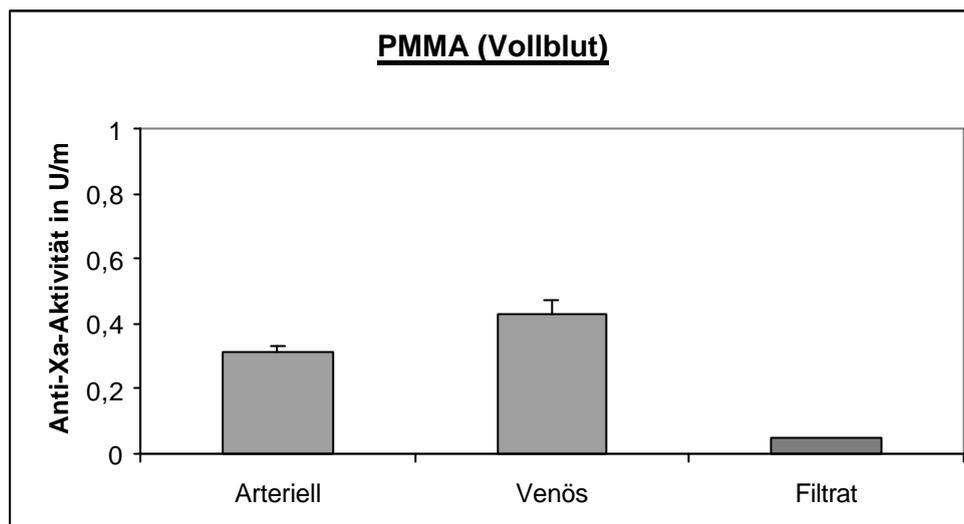


Abbildung 14: Danaparoidfiltration mit dem Polymethylmethacrylat (PMMA)-High-Flux-Hämodialysator mit Vollblut als Trägerlösung. Mittlere Anti-Xa-Konzentrationen im arteriellen, venösen und Filtratseitenabschnitt. (Mittelwerte \pm SEM aus 3 Versuchen von jeweils 2 h Dauer mit jeweils 10 Abnahmezeitpunkten)

3.1.2 Elimination von Danaparoid mit Plasmapheresefiltern

In einer weiteren Versuchsreihe wurde die Eigenschaft von Plasmapheresefiltern in humanem Vollblut untersucht. Es wurden keine Albuminversuche durchgeführt. Bei der Plasmaseparation mit Plasmapheresefiltern zeigte sich erstmals eine Elimination von Danaparoid. Diese war nahezu komplett. Die Anti-Xa-Aktivitäten näherten sich im arteriellen, venösen und Filtratschenkel an den gleichen Wert an (Abbildung 15). Daraus lässt sich auf eine völlige Durchlässigkeit der Plasmapherese membran für Danaparoid schließen.

Der mittlere Wert auf der venösen Seite betrug $0,15 \pm 0,02$ U/ml. Auf der Filtratseite ergab sich ein mittlerer Wert von $0,18 \pm 0,02$ U/ml. Der mittlere Wert lag auf der arteriellen Seite bei $0,15 \pm 0,01$ U/ml. Angesichts der eingesetzten Danaparoid-Konzentration impliziert dies zusätzliche adsorptive Eigenschaften der Plasmapherese membran.

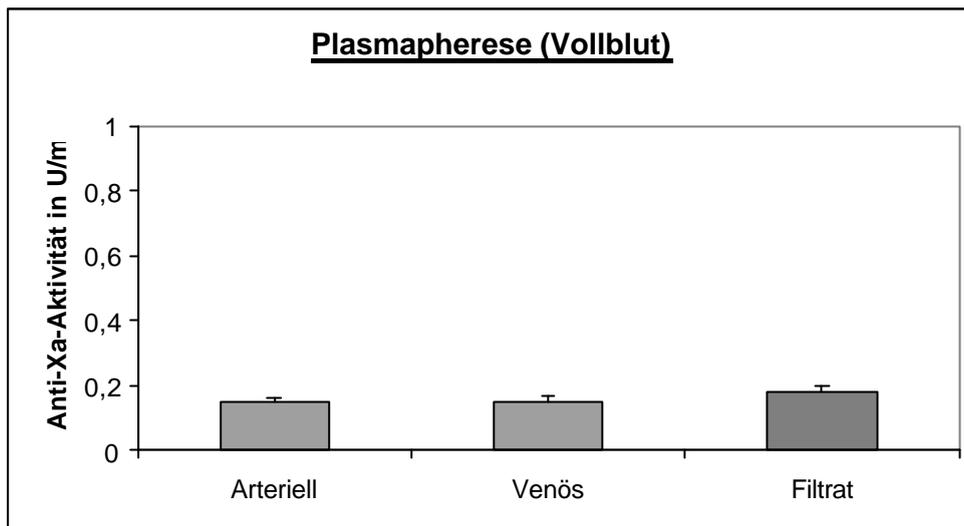


Abbildung 15: Plasmapherese von Danaparoid mit Vollblut als Trägerlösung. Mittlere Anti-Xa-Konzentrationen im arteriellen, venösen und Filtratseitenabschnitt. (Mittelwerte \pm SEM aus 3 Versuchen von jeweils 2 h Dauer mit jeweils 10 Abnahmezeitpunkten)

3.2 Adsorption von Danaparoid an Dialysemembranen

Nach oben beschriebener Formel wurde die Adsorption an die einzelnen Filtertypen berechnet. Die PMMA-Membran zeigte ausgeprägte adsorptive Eigenschaften.

3.2.1 Adsorption von Danaparoid an PMMA-Membranen

Bei den Untersuchungen des PMMA-Dialysators mit Albumin als Trägerlösung zeigte sich eine Adsorption von Danaparoid an die Filtermembranen. Im Vergleich mit den Anti-Xa-Aktivitäten der anderen Filter ergaben sich beim PMMA-Dialysator deutlich reduzierte Werte im arteriellen und venösen Schlauchsystemen (Abbildung 9). Bereits ab dem ersten Wertetriplet lagen die Anti-Xa-Aktivitäten unter den entsprechenden Werten anderer Filter. Mittlere arterielle Werte lagen für den Polysulfon-Filter in der ersten Abnahmeprobe zum Zeitpunkt t_{10} bei $0,71 \pm 0,04$ U/ml. Die entsprechende mittlere Anti-Xa-Aktivität für den PMMA-Filter lag bei $0,2 \pm 0,03$ U/ml. Dies entspricht einer Reduktion um etwa 72%.

Zusätzlich sank die Anti-Xa-Aktivität während der Versuchsdauer mit dem PMMA-Filter stärker als bei anderen Filtern. Insgesamt nahmen die mittleren arteriellen Anti-Xa-Konzentrationen bei Albumin als Trägerlösung um 40% im Sinne der Adsorption ab.

Bei den anschließenden Versuchen mit Vollblut als Trägerlösung zeigte die PMMA-Membran ebenfalls adsorptive Eigenschaften (Abbildung 14). Die Adsorption lag unter Vollblutbedingungen bei 38%. Der PMMA-Dialysator zeigte mit den Trägerlösungen Albumin und Vollblut diesbezüglich einheitliche Ergebnisse.

Die mittleren arteriellen Anti-Xa-Aktivitäten lagen unter Vollblutbedingungen für den PMMA-Filter bei $0,31 \pm 0,02$ U/ml. Entsprechende Werte lagen für den Polysulfon-Filter bei $0,52 \pm 0,07$ U/ml und für die PAES-Membran bei $0,69 \pm 0,12$ U/ml.

Wie bei den Versuchen mit Albumin nahm die Anti-Xa-Aktivität beim PMMA-Dialysator unter Vollblutbedingungen im Verlauf der Versuchzeit ab. Deswegen

wurden zusätzliche Versuche durchgeführt, um die Langzeitwirkung des Filters zu untersuchen.

3.2.2 Langzeitversuch

Um die Adsorptionsfähigkeit des Dialysators im Zeitverlauf zu untersuchen, wurde die Versuchsdauer von zwei Stunden auf drei Stunden verlängert. Es wurde nur Vollblut als Trägerlösung verwendet.

Dabei zeigte sich, dass der PMMA-Dialysator eine überproportional hohe Adsorptionseigenschaft zu Beginn der Messungen aufwies. Im Verlauf des Versuchs ging diese Fähigkeit stark zurück. Bei der Adsorption handelt es sich somit nur um einen anfänglichen Effekt (Abbildung 16).

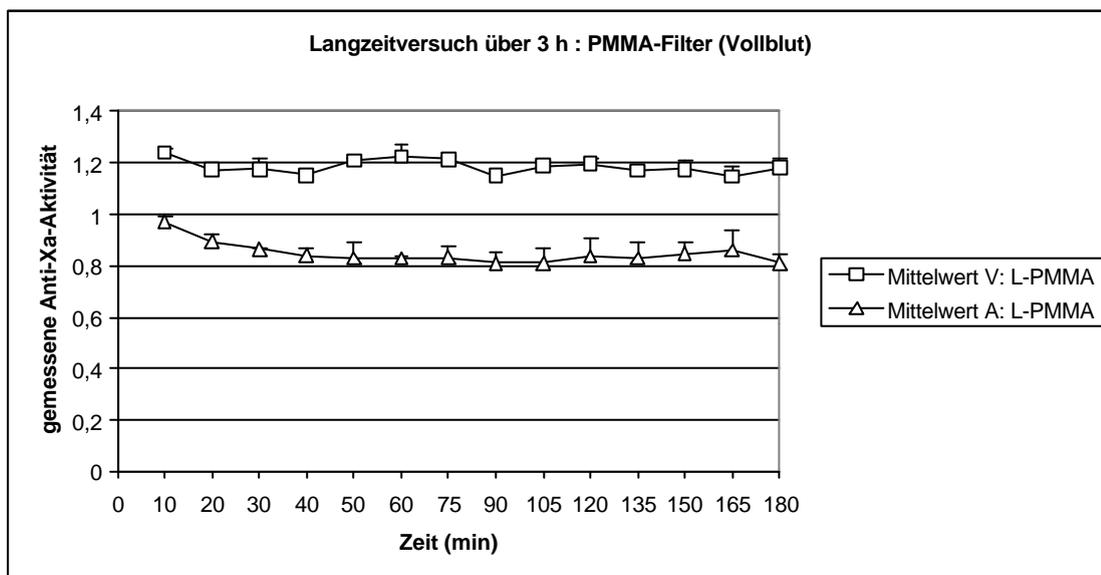


Abbildung 16: PMMA-Langzeitversuch. Mittlere Anti-Xa-Konzentrationen im arteriellen und venösen Schlauchabschnitt. (Mittelwerte \pm SEM aus 3 Versuchen)

3.2.3 Adsorption an die Plasmapherese-Membran

Die Plasmapherese-Membran zeigte neben der uneingeschränkten Durchlässigkeit für Danaparoid adsorptive Eigenschaften. Der mittlere Wert der Anti-Xa-Aktivität lag auf der arteriellen Seite bei $0,15 \pm 0,01$ U/ml (Abbildung 9). Der vergleichbare Wert lag für den PAES-Dialysator bei $0,69 \pm 0,12$ U/ml. Dies entspricht einer Reduktion von 78%.

Die hier aufgetretene Adsorption von Danaparoid an die Plasmapherese-Membran erfolgte sehr schnell. Bereits ab der ersten Probeentnahme lagen die Werte der Anti-Xa-Aktivität im Bereich von 0,15 U/ml. Die Anti-Xa-Aktivitäten blieben im Verlauf des Versuches konstant (Abbildung 17).

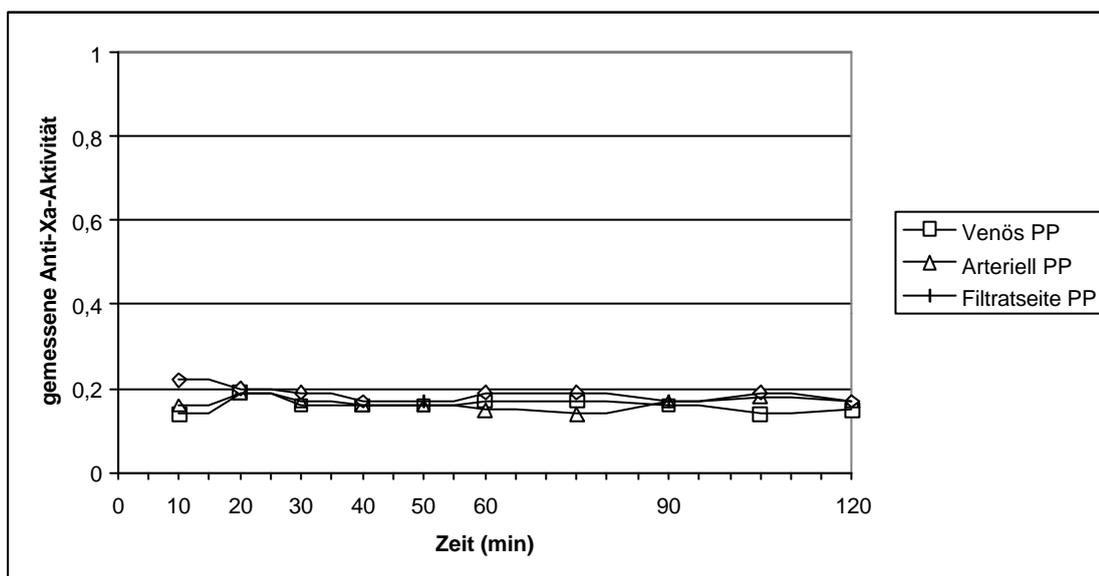


Abbildung 17: Repräsentativer Plasmapherese-Versuch. Mittlere Anti-Xa-Konzentrationen im arteriellen, venösen, Filtratseiten-Schlauchabschnitt bei zweistündiger Versuchsdauer

4 Diskussion

Heparin wirkt gerinnungshemmend. Es entfaltet seine Wirkung vor allem über die Antithrombin-vermittelte Hemmung der aktivierten Gerinnungsfaktoren X und II.

Bei der Therapie mit Heparin kann es zu unerwünschten Arzneimittelwirkungen und Komplikationen kommen. Eine mögliche Nebenwirkung von Heparin ist die Heparin-induzierte Thrombozytopenie. Zwei auf verschiedenen Pathomechanismen beruhende Formen der HIT werden unterschieden. Die dosisunabhängige HIT vom Typ II tritt bei bis zu 3% der mit UFH behandelten Patienten auf. Es kommt zu einer Bildung von Antikörpern gegen den Komplex aus Heparin und dem Plättchen-Faktor 4 [5,40,42]. Diese induzieren eine Aktivierung von Thrombozyten [7,50] und Endothelzellen [9,22]. Im Gegensatz zur ursprünglichen Wirkung von Heparin kommt es somit zu einer Freisetzung von prokoagulatorischen Partikeln [21].

Thromboembolische Ereignisse sind mögliche Folgen [44]. Weismann und Tobin berichteten 1958 erstmals vom paradoxen Phänomen der thromboembolischen Komplikation während der systemischen Heparin-Therapie [68].

Die HIT ist ein schwerwiegendes Krankheitsbild, das in bis zu 30% letale Folgen hat [32]. Eine schnelle und sichere Diagnose einer HIT ist daher unerlässlich. Nach Diagnosestellung ist die weitere Gabe von Heparin kontraindiziert. Die antikoagulatorische Therapie muss dennoch fortgesetzt werden. In einem solchen Fall ist ein alternatives Antikoagulans erforderlich.

LMWH zeigen in 90% eine Kreuzreaktion mit den HIT-Antikörpern [19,41]. Da ein Gebrauch von LMWH auf diese Weise die HIT potenzieren könnte, sind LMWH bei einer vorliegenden HIT kontraindiziert.

Eine mögliche Alternative bei vorliegender HIT ist Danaparoid. Danaparoid gehört zur Gruppe der Heparinoide und wirkt wie Heparin über die Inhibition der Faktoren Xa und IIa gerinnungshemmend. Das Verhältnis der Anti-Xa- zur Anti-IIa-Aktivität liegt bei etwa 20:1 [70]. In klinischen Vergleichsstudien erwies sich Danaparoid gegenüber UFH sowie LMWH als effizientes Antikoagulans. In Tiermodellen zeigte sich Danaparoid als Thromboseprophylaxe in gleicher Weise effektiv wie LMWH. Bei gleicher antithrombotischer Aktivität kam es unter einer Danaparoid-Therapie zu

weniger Blutungszwischenfällen sowie einem selteneren Auftreten von Thrombosen[14,47,58]. Dies beruht auf der geringeren Kreuzreaktivität von Danaparoid mit den Heparin-induzierten Antikörpern [51,70]. Das hieraus folgende geringere Risiko, eine HIT II zu entwickeln kann als einer der Hauptvorteile von Danaparoid angesehen werden. Danaparoid ist offiziell zur Antikoagulation bei HIT zugelassen, zur Thromboseprophylaxe im Allgemeinen und im Speziellen bei HIT.

Ein Nachteil von Danaproid ist seine schlechte Steuerbarkeit. Diese beruht auf der langen Halbwertszeit von etwa 25 Stunden [23,30,58]. Danaparoid wird renal eliminiert. Die Halbwertszeit hängt somit von der Nierenfunktion des Patienten ab. Eine eingeschränkte Nierenfunktion kann die Halbwertszeit noch weiter erhöhen. Nach Fischer können noch bis zu vier Tage nach letzter Applikation erhöhte Anti-Xa-Aktivitäten nachgewiesen werden[27]. Mögliche Folge ist eine Akkumulation von Danaparoid. Dies birgt ein erhöhtes Blutungsrisiko.

Im Falle der Überdosierung mit Heparin ist eine Gegenbehandlung durch Gabe des Antidot Protamin zur Neutralisierung des überschüssigen Heparins möglich. Protamin neutralisiert die Wirkung von Danaparoid hingegen nicht [60,63] und kann daher bei Blutungskomplikationen nicht eingesetzt werden.

Bisher ist keine wirksame Therapie für diese Situation einer Überdosierung von Danaparoid bekannt. Eine direkte Verminderung des Blutungsrisikos erfolgt durch Entfernung des überschüssigen Danaparoid aus dem Körper des Patienten. Dies ist intrakorporal und extrakorporal möglich. Eine intrakorporale Beseitigung wäre theoretisch durch die Gabe von neutralisierenden Danaparoid-Antikörpern möglich. Klinisch einsetzbare, geprüfte Antikörperpräparate sind aber derzeit nicht verfügbar. Dadurch gewinnt die mögliche extrakorporale Danaparoid-Elimination an Bedeutung. Hämofiltration könnte als mögliche Eliminationsmethode dienen.

Die bisherige Datenlage über die extrakorporale Elimination von Danaparoid ist unvollständig. Es liegt bislang nur ein einzelner Fallbericht über eine erfolgreich eingesetzte Plasmapherese vor [61].

Ziel dieser Studie war es daher, fünf in der Klinik häufig verwendete High-Flux-Hämodialysatoren sowie einen Plasmapheresefilter bezüglich der Danaparoid-Filtration zu charakterisieren und die therapeutische Möglichkeit einer extrakorporalen Elimination zu untersuchen.

Das geringe Molekulargewicht von 6 kD [3], das Verteilungsvolumen von 8,3 Litern [35] sowie die vernachlässigbare Plasmaproteinbindung [12] sind pharmakologische Eigenschaften, die für eine erfolgreiche Hämofiltration sprechen. Bisher wurden jedoch keine Studien über eine solche Elimination mittels Hämofiltration von Danaparoid veröffentlicht.

Anhand eines in vitro-Filtrationsmodells sollten die Dialysator-Eigenschaften studiert werden. Dabei wies der Versuchsaufbau einige Besonderheiten auf. Erstens war der Kreislauf als Rezirkulationskreislauf aufgebaut. Das abgepresste Filtrat floss über ein Verbindungsstück in den blutseitigen Kreislauf zurück. Diese Rückführung hatte den Vorteil, dass die vor dem Hämodialysator im blutseitigen Kreislauf gemessene Konzentration des Antikoagulans konstant blieb. Schwankungen durch sonst notwendige Substitution wurden damit ausgeschlossen.

Ein Vorteil des Versuchsaufbaus lag zweitens in der Verwendung von Rollenpumpen, die eine konstante Flussgeschwindigkeit arteriell und filtratseitig ermöglichten. Die Menge der abgepressten Filtratflüssigkeit war somit konstant. Dies ist Voraussetzung für eine Charakterisierung von Filtereigenschaften und für eine gute Vergleichbarkeit von verschiedenen Dialysatoren.

Um Einflüsse von Proteinen und anderen Blutbestandteilen auf die Filtrierbarkeit von Danaparoid erfassen zu können, wurden drittens Experimente mit verschiedenen Transportmedien durchgeführt. NaCl, Albumin und kompositionelles Vollblut dienten als Trägerlösungen. Es ist offensichtlich, dass sich unter Vollblutbedingungen die Verhältnisse am Patienten am besten nachvollziehen lassen.

Eine Besonderheit der Studie lag viertens in der großen Menge der Daten. Durch Probenentnahme alle 10 bzw. 15 Minuten an jeweils allen drei Schlauchsystemen ergaben sich für einen zweistündigen Versuch 30 Werte, die den Konzentrationsverlauf über die Zeit gut repräsentierten.

Mit dem hier verwendeten Versuchsaufbau wurden bereits zuverlässige Ergebnisse über Elimination von Hirudin gewonnen [8]. Das Modell darf als präzise und aussagekräftig gewertet werden.

Gute Filtration ist abhängig von der Porengröße, den Flussgeschwindigkeiten und den Membraneigenschaften der Filter. Die Membranbeschaffenheit beeinflusst nicht zuletzt auch das Vorhandensein und das Ausmaß von Adsorption. Auch die Eigenschaften der Trägerlösung und der zu eliminierenden Substanz nehmen Einfluss auf das Ausmaß der Filtration.

Die Porengröße der hier eingesetzten Dialysatoren ließen zwar eine Danaparoidfiltration erwarten. Entgegen der bekannten pharmakologischen Eigenschaften von Danaparoid wurde es aber von keinem der hier getesteten High-Flux-Dialysatoren mit Vollblut als Trägerlösung filtriert.

Angesichts des Molekulargewichts von Danaparoid ist eine Elimination mittels niedrigdurchlässiger Low-Flux-Dialysatoren nicht zu erwarten. Es wurden in dieser Studie daher keine Versuche mit Low-Flux-Dialysatoren durchgeführt. Nach den vorliegenden Ergebnissen der High-Flux-Dialysatoren, die Danaparoid nicht filtrieren, liegt die Vermutung nah, dass auch Low-Flux-Filter Danaparoid nicht filtrieren werden.

Bezüglich der Membraneigenschaft war die Danaparoidfiltration durch die PAES unter Albuminbedingungen bemerkenswert. Diese ließ sich unter Vollblutbedingungen nicht verifizieren. Eine mögliche Ursache dafür liegt in veränderten Ladungsverhältnissen, die durch Blutbestandteile an der PAES-Membran ausgelöst werden. Möglicherweise wird die unter Albuminbedingungen erfolgte Danaparoidfiltration dadurch verhindert.

Bei den übrigen getesteten Dialysatoren aus Polysulfon, Polyamid, AN69 und PMMA trat dieses Phänomen nicht auf. Daraus läßt sich schließen, dass es sich hierbei um eine spezielle Eigenschaft der PAES-Membran handelt.

Die Membranbestandteile beeinflussen neben der Filtration an sich auch das Ausmaß der Adsorption. Bedeutsam war die Adsorption von Danaparoid an die

PMMA-Membran. Sie trat unter Albumin- wie unter Vollblutbedingungen in gleicher Ausprägung auf und lag im Bereich von 38-40%. Adsorptive Eigenschaften der PMMA-Membran sind bekannt.

Aus Überlegungen, hieraus eine therapeutische Konsequenz abzuleiten, wurden Langzeitversuche durchgeführt. Es zeigte sich jedoch, dass es sich bei dieser Adsorption um einen nur anfänglichen Effekt handelt. Im Falle einer Überdosierung brächte daher eine Hämofiltration mit dem PMMA-Filter keine ausreichende Reduktion des Danaparoidspiegels. Sie kann deshalb als alleinige Maßnahme nicht empfohlen werden.

Im Anschluss an die Versuche zur Filtration mit Hämodialysatoren wurden in einem weiteren Schritt die Eliminationseigenschaften von Danaparoid während einer Plasmapherese untersucht. Dabei zeigten sich bereits ab der ersten Probenentnahme gleiche Messwerte in allen drei Schlauchsystemen. Dies impliziert eine uneingeschränkte Durchlässigkeit von Plasmapheresefiltern für Danaparoid.

Zusätzlich zu dieser Filtration adsorbierte der Plasmapheresefilter Danaparoid. Dabei lagen die Werte der Anti-Xa-Aktivität bereits ab der ersten Probenentnahme deutlich unter vergleichbaren Werten anderer Dialysatoren. Dies ist bemerkenswert. Das Ausmaß der Adsorption läßt sich deshalb auch nicht nach der üblichen Adsorptionsformel berechnen. Denn diese vergleicht Werte der ersten Messung mit denen der letzten Messung am Versuchsende. Die adsorptiven Eigenschaften ergeben sich hier vielmehr aus dem Vergleich mit den Werten anderer Dialysatoren. Verglichen mit dem PAES-Filter kam es trotz gleicher Menge eingesetzten Danaparoids zu einer um 78% reduzierten nachweisbaren Anti-Xa-Aktivität. Dies impliziert eine Adsorption von Danaparoid an die Membranen des Plasmapheresefilters.

Diese Adsorption sowie die uneingeschränkte Durchlässigkeit der Membran machen die Plasmapherese zu dem am besten geeigneten Verfahren einer extrakorporalen Elimination von Danaparoid. Es konnten hiermit die Ergebnisse von Schmahl et al. [61] bestätigt werden. Diese berichtete von einer exzessiven postoperativen Blutung bei einem HITII-Patienten, die während der Therapie mit Danaparoid auftrat.

Mit Hilfe der Plasmapherese konnte die Danaparoidkonzentration gesenkt werden und die Blutung sistierte.

Zusammenfassend war das Ziel dieser Studie, Eliminationsverfahren zu finden, die eine schnelle Elimination von Danaparoid aus dem Blut bei kritischer Überdosierung von Danaparoid oder Danaparoid-assoziiertes Blutungen erlauben. Ergebnis der Studie ist, dass die Danaparoidkonzentration im Falle einer Überdosierung mittels Plasmapherese erfolgreich reduziert werden kann. Die Hämofiltration über konventionelle Dialysefilter ist kein geeignetes Eliminationsverfahren, denn keiner der hier getesteten High-Flux-Dialysatoren filtrierte Danaparoid unter Vollblutbedingungen.

Kritisch betrachtet ist die Plasmapherese jedoch kein Verfahren der täglichen klinischen Routine. Auch diese kann mit unerwünschten Nebenwirkungen assoziiert sein. Nachteile der hier empfohlenen Plasmapherese sind unter anderem das Risiko für Infektionen, die Notwendigkeit großer doppellumiger Katheter und auch der nicht zu vernachlässigende Kostenaufwand.

Es bleibt daher in Zukunft zu untersuchen, ob durch eine intrakorporale Elimination eine erfolgreiche Reduktion der Danaparoidkonzentration erreicht werden kann. Gemeint ist die Neutralisation mit einem Antidot oder spezifischen Antikörpern. Schick et al. berichteten von der Entwicklung von Peptiden, welche die Anti-Thrombin-Aktivität von Danaparoid in vitro neutralisieren [60]. Es ist allerdings nicht zu erwarten, dass in näherer Zukunft einsetzbare Antikörperpräparate oder eine andere Form von Antidot verfügbar werden, welche Danaparoid vollständig neutralisieren. Aufgrund der Tatsache, dass Danaparoid aus drei Hauptkomponenten besteht, wäre eine Entwicklung solcher Antikörpern schwierig und sehr kostenaufwändig.

Neben der Erforschung extra- und intrakorporaler Eliminationsverfahren für Danaparoid bleibt schließlich der Einsatz weiterer Alternativen einer Antikoagulation

zu erwägen. Neben Danaparoid sind Lepirudin und Argatroban für die Thromboseprophylaxe bei der Heparin-induzierten Thrombozytopenie zugelassen.

Das rekombinante Hirudin (r-Hirudin), Lepirudin, ist der stärkste bekannte selektive Thrombininhibitor. Die Gerinnungshemmung erfolgt direkt und nicht Antithrombin-vermittelt wie bei Heparin oder Danaparoid. Heparin wie Danaparoid können ihre gerinnungshemmende Wirkung bei einem Mangel an Antithrombin nicht entfalten. Der Thrombininhibitor r-Hirudin wirkt direkt. Die antikoagulatorische Aktivität bleibt daher bei einem Antithrombin-Mangel unbeeinflusst.

Die gerinnungshemmende Wirkung von r-Hirudin wird anhand der aktivierten partiellen Thromboplastinzeit (aPTT) oder der „Ecarin Clotting Time“ (ECT) überwacht [28,31,32]. Die aPTT ist eine in der klinischen Routine verfügbare Nachweismethode, im Gegensatz zur Bestimmung der Anti-Xa-Aktivität, welche zur Therapiekontrolle von Danaparoid nötig ist. Dies ist einer der Vorteile von Hirudin gegenüber Danaparoid.

Jedoch birgt r-Hirudin im Vergleich zu Danaparoid bezüglich der Blutungskomplikationen ein erhöhtes Risiko [36]. Vergleichsstudien haben gezeigt, dass es bei gleicher antikoagulatorischer Wirkung unter Hirudin zu einem vermehrten Auftreten von Blutungen kommt. Während bei Danaparoid-Behandlung in 7,3% der Fälle eine starke Blutung auftrat [36], wurde eine solche bei Lepirudin-Gabe in 15% der Fälle gemeldet [36,55].

Die Halbwertszeit von r-Hirudin ist mit 50-120 min bei Nierengesunden relativ kurz, was eine gute Steuerbarkeit ermöglicht [30,57]. Dem gegenüber lässt sich Danaparoid wegen seiner lange Halbwertszeit von etwa 25 Stunden relativ schlecht steuern.

Beide Substanzen werden renal eliminiert. Bei Niereninsuffizienz wird die Halbwertszeit erhöht. Nach Bolusgabe von Danaparoid lässt sich bei terminal niereninsuffizienten Patienten noch nach vier Tagen eine Anti-Xa-Aktivität im Plasma messen [27]. Für Hirudin ermittelten Vanholder et al. eine Halbwertszeit von durchschnittlich 51,8 h in einem Kollektiv niereninsuffizienter Patienten. Im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen entspricht dies einer Verlängerung um den Faktor 30 [77]. Lubenow spricht von Halbwertszeiten von Hirudin von bis zu 200 Stunden bei niereninsuffizienten Patienten [55].

Eine verlängerte Halbwertszeit führt zu einer weiteren Erhöhung des Risikos unerwünschter Arzneimittelwirkungen wie beispielsweise Blutungen. Angesichts dieser erhöhten Blutungsrisiken ist die Möglichkeit einer Elimination von Hirudin ebenso von Bedeutung. Wie für Danaparoid ist auch für Hirudin kein Antidot bekannt. Benz führte Untersuchungen zum Eliminationsverhalten von Hirudin durch. Danaparoid und r-Hirudin weisen pharmakologische Gemeinsamkeiten auf. Es wäre daher eine vergleichbare Eliminationskinetik zu erwarten. Gemeinsamkeiten des Proteins Hirudin und des Polysaccharids Danaparoid sind das Molekulargewicht von etwa 6 kD und die vernachlässigbare Proteinbindung. Die Plasmaproteinbindung wird für Hirudin mit kleiner 10% angegeben.

Wie aus der hier vorliegenden Untersuchung von extrakorporalen Eliminationsverfahren hervorgeht, wird Danaparoid von keinem der getesteten High-Flux-Dialysatoren eliminiert. Indes zeigt Hirudin eine gute Eliminierbarkeit durch Hämofiltration [8,33,71]. Benz wies in Vollblutexperimenten einen Siebkoeffizienten von 0,97 unter Verwendung des Polysulfon-Dialysators nach. Auch die übrigen High-Flux-Dialysemembranen aus Polyamid, PAES und PMMA filtrierten Hirudin. Filtrationsversuche mit Low-Flux-Dialysatoren aus Cuprophan, Hämophan, Polysulfon und Polymethylmethacrylat ergaben keine relevante Hirudinfiltration [8].

Es bleibt jedoch, auf die Immunogenität von Hirudin hinzuweisen. Früher wurde Hirudin als gering immunogene Substanz angesehen [50,56]. Neure Studien zeigten jedoch bei bis zu 74% der länger als 5 Tage mit Hirudin behandelten HIT Typ II-Patienten Anti-Hirudin-Antikörper [54]. Diese Antikörper verlangsamten die Elimination von Hirudin und verlängern somit die Halbwertszeit [54]. Eine solche Verlängerung der Halbwertszeit von Hirudin geht wiederum mit einer verlängerten antikoagulatorischen Aktivität und einem damit erhöhtem Blutungsrisiko einher.

Zusammenfassend wird deutlich, dass die antikoagulatorische Therapie bei niereninsuffizienten Patienten sowohl mit Danaparoid als auch mit Hirudin ein Risiko der Kumulation birgt. Beide Substanzen werden renal eliminiert und die Halbwertszeiten erhöhen sich daher bei eingeschränkter Nierenfunktion für beide Substanzen.

Eine weitere Alternative ist der direkte Thrombininhibitor Argatroban. Argatroban (MD805) ist ein von Arginin abgeleiteter direkter Thrombininaktivator, der im Gegensatz zu Danaparoid und Lepirudin hepatisch metabolisiert wird und von einer eingeschränkten Nierenfunktion unbeeinflusst bleibt [28, 11]. Eine Dosisadjustierung bei Niereninsuffizienz ist daher nicht nötig [11]. Dies ist ein wesentlicher Vorteil von Argatroban und vereinfacht die antikoagulatorische Dosierung bei niereninsuffizienten Patienten.

Es bleibt allerdings zu bedenken, dass Argatroban, da es hepatisch metabolisiert wird, bei einer Leberinsuffizienz verlangsamt abgebaut wird. Eine Kumulation von Argatroban birgt dann das erhöhte Risiko einer Blutung. Aus diesem Grund sollte Argatroban bei Patienten mit eingeschränkter Leberfunktion nur zurückhaltend eingesetzt werden [64].

Argatroban zeichnet sich durch einen schnellen Wirkeintritt und eine kurze Halbwertszeit aus. Dies erlaubt ein gutes Monitoring. Die antikoagulatorische Aktivität von Argatroban kann anhand der aPTT und der ECT überwacht werden [11].

Ein großer Vorteil ist weiterhin die fehlende Antikörperentwicklung [11].

In den USA und Kanada ist Argatroban zur Prophylaxe und Behandlung von Thrombosen bei Patienten mit Heparin-induzierter Thrombozytopenie zugelassen. In den USA ist die Antikoagulation während perkutaner Koronarangiographien bei Patienten mit HIT eine weitere Indikation [49]. Es bleibt abzuwarten, ob Argatroban in Zukunft weitere Indikationen erhält und somit weitere Verbreitung findet.

5 Zusammenfassung

Danaparoid gehört zur Gruppe der Heparinoide. Bei diesen handelt es sich um Heparin-ähnliche Substanzen. Wie Heparin wirkt Danaparoid gerinnungshemmend. Das antithrombotische Wirkprinzip von Danaparoid beruht vorwiegend auf der Antithrombin-induzierten Hemmung des aktivierten Faktors X. Durch den Einsatz bei der Heparin-induzierten Thrombozytopenie gewann Danaparoid seine besondere Bedeutung.

Danaparoid wird renal eliminiert. Bei Patienten mit eingeschränkter Nierenfunktion ist die Halbwertszeit verlängert und das Blutungsrisiko daher erhöht. Bisher ist kein effizientes Antidot für den Fall der erhöhten antikoagulatorischen Aktivität verfügbar. In diesem Zusammenhang kommt extrakorporalen Eliminationsverfahren eine besondere Bedeutung zu. Die bisherigen Daten hierzu sind lückenhaft.

In der vorliegenden Studie wurde mit einem Rezirkulationsmodell das Filtrationsverhalten von Danaparoid bei fünf häufig in der Klinik verwendeten High-Flux-Dialysatoren sowie einem Plasmapheresefilter untersucht.

Keiner der hier untersuchten Hämodialysatoren aus Polysulfon, Polyacrylonitril (AN69), Polyamid, PAES und PMMA filtrierte Danaparoid bei Vollblut als Trägerlösung. Als Besonderheit zeigte die PMMA-Membran sowohl mit Albumin als auch mit Vollblut als Trägerlösung eine Adsorptionswirkung von 35-40%. Bei näherer Untersuchung konnte in einem Langzeitversuch jedoch gezeigt werden, dass es sich hierbei um einen nur anfänglichen Effekt handelte.

Plasmapherese erwies sich als ein effizientes Eliminationsverfahren. Die Membran war uneingeschränkt permeabel für Danaparoid. Zusätzlich konnte eine adsorptive Wirkung nachgewiesen werden. Die antikoagulatorische Aktivität wurde um 78% reduziert.

Um im Falle einer Überdosierung von Danaparoid das Blutungsrisiko zu minimieren, ist die Hämofiltration mittels konventioneller Hämodialysatoren nicht das geeignete Verfahren. Neben dem sofortigen Absetzen von Danaparoid sollte eine Plasmapherese erfolgen, welche sich in dieser Untersuchung als das am besten geeignete Verfahren zur raschen Elimination von Danaparoid erwies.

6 Abstract

The low molecular weight heparinoid danaparoid is frequently used for alternative anticoagulation especially in case of immune-mediated heparin-induced thrombocytopenia, a potentially life-threatening complication of heparin treatment. As danaparoid is mainly eliminated by renal excretion, patients with severe renal insufficiency are at an increased risk of drug accumulation and bleeding. An agent which is capable of rapidly reversing the anticoagulant effect of danaparoid currently is not available. Here, the role of extracorporeal blood purification procedures for danaparoid elimination awaits clarification.

This study is the first systematic analysis of danaparoid sieving properties of different commercially available hemodialyzer and plasmapheresis membranes. Within a standardized in vitro recirculation set-up, five different high-flux hemodialyzer membranes (polysulfone, polyamide, polyacrylonitrile, polyarylethersulfone, polymethylmethacrylate) did not allow for danaparoid sieving in whole blood as carrier solution (sieving coefficient [SC] = 0 for each membrane type tested in 3-5 independent experiments with separate new devices). By contrast, one polypropylene plasmapheresis membrane showed significant danaparoid sieving under the same conditions (SC = 1.2 ± 0.03 , n=3). The polymethylmethacrylate hemodialyzer membrane and the plasmapheresis membrane exhibited danaparoid adsorption characteristics.

We conclude from these data that only plasmapheresis is capable of effectively reducing danaparoid plasma levels. Plasmapheresis is recommended if rapid reduction of danaparoid blood concentration is needed such as in case of marked danaparoid overdose or danaparoid-associated bleeding especially in severe renal failure.

7 Literaturverzeichnis

- 1 Acostamadiedo JM, Iyer UG, Owen J (2000) Danaparoid sodium. *Expert Opin Pharmacother* 1(4): 803-814
- 2 Adams HP Jr, Woolson RF, Clarke WR, Davis PH, Bendixen BH, Love BB, Wasek PA, Grimsman KJ (1997) Design of the Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment (TOAST). *Control Clin Trials* 18(4): 358-377
- 3 Alban S, Greinacher A (2000) Role of sulfated polysaccharides in the pathogenesis of heparin-induced thrombocytopenia. In: Warkentin TE, Greinacher A (eds.) *Heparin-induced thrombocytopenia*. Plenum Press, New York, pp. 154-174
- 4 Amiral J, Bridey F, Dreyfus M, et al (1992) Platelet factor 4 complexed to heparin is the target for antibodies generated in heparin-induced thrombocytopenia. *Thromb Haemost* 68: 95-96
- 5 Amiral J, Bridey F, Wolf M, Boyer-Neumann C, Fressinaud E, Vissac AM et al (1995) Antibodies to macromolecular platelet factor 4-heparin complexes in heparin-induced thrombocytopenia: a study of 44 cases. *Thromb Haemost* 73: 21-28
- 6 Amiral J, Marfaing-Koka A, Wolf M, Alessi MC, Tardy B, Boyer-Neumann C, Vissac AM, Fressinaud E, Poncz M, Meyer D (1996) Presence of autoantibodies to interleukin-8 or neutrophil-activating peptide-2 in patients with heparin-associated thrombocytopenia. *Blood* 88: 410-416
- 7 Amiral J, Wolf M, Fischer A, Boyer-Neumann C, Vissac A, Meyer D (1996) Pathogenicity of IgA and/or IgM antibodies to heparin-PF-4 complexes in patients with heparin-induced thrombocytopenia. *Br J Haematol* 92: 954-959

- 8 Benz K (2001) In vitro-Untersuchungen zur Adsorption und Filtration von rekombinantem Hirudin: Vergleich unterschiedlicher Hämodialysatoren. Dissertation (unveröffentlicht)
- 9 Blank M, Shoenfeld Y, Tavor S, Praprotnik S, Boffa MC, Weksler B, Walenga MJ, Amiral J, Eldor A (2002) Anti-platelet factor 4/heparin antibodies from patients with heparin-induced thrombocytopenia provoke direct activation of micrvascular endothelial cells. *Int. Immunol* 14(2): 121
- 10 de Boer A, Kluft C, Dooijewarard G, Kaspar FJ, Kroon JM, Breimer DD, Stiekema JC, Cohen AF (1992) Influence of heparin and a low molecular weight heparinoid on specific endogenous and exogenous fibrinolytic factors during rest and exercise. *Thromb Haemost* 68(5):550-555
- 11 Breddin HK (2002) Experimental and clinical results with the thrombin inhibitor Argatroban. *Hamostaseologie* 22(3): 55-59
- 12 Casu B (1991) Structural features of chondroitin sulphates, dermatan sulphate and heparan sulphate. *Semin Thromb Haemost* 17 (Suppl. 1): 9-14
- 13 ten Cate H, Henny CP, ten Cate JW, Buller HR, Mooy MC, Surachno S, Wilmink JM (1985) Anticoagulant effects of a low molecular weight heparinoid (Org 10172) in human volunteers and haemodialysis patients. *Thromb Res* 39(2): 211-222
- 14 ten Cate JW (1992) Prevention of deep vein thrombosis following total hip replacement surgery by orgaran. *Haemostasis* 22: 109-111
- 15 Cell Tech GmbH & Co KG (1999) Orgaran® : Danaparoid-Natrium, wissenschaftliche Information

- 16 Chong BH (2000) Danaparoid for the treatment of heparin-induced Thrombocytopenia. In: Warkentin TE, Greinacher A (eds.) Heparin-induced thrombocytopenia. Plenum Press, New York, pp. 291-311
- 17 Chong BH, Fawaz I, Chesterman CN, Berndt MC (1989) Heparin-induced thrombocytopenia : mechanism of interaction of heparin-dependent antibody with platelets. *Br J Haemat* 73: 235-240
- 18 Chong BH, Ismail F, Cade J, et al (1989) Heparin-induced thrombocytopenia: studies with a new low molecular weight heparinoid, Org 10172. *Blood* 73: 1592-1596
- 19 Chong BH, Ismail F, Cade J, et al (1991) Heparin-induced thrombocytopenia. *Prog Hemost Thromb* 10: 1-34
- 20 Chong BH, Magnani HN (1992) Orgaran in heparin-induced thrombocytopenia. *Haemostasis* 22(2): 85-91
- 21 Chong BH, Pitney WR, Castaldi (1982) Heparin-induced thrombocytopenia: association of thrombotic complications with heparin-dependent IgG antibody that induces thromboxane synthesis and platelet aggregation. *Lancet* 2: 1246-1249
- 22 Cines DB, Tomaski A, Tannenbaum S (1987) Immune endothelial-cell injury in heparin-associated thrombocytopenia. *N Engl J Med* 316: 581-589
- 23 Danhof M, de Boer A, Magnani HN, Stiekema JC (1992) Pharmacokinetic considerations on Orgaran (Org 10172) therapy. *Haemostasis* 22(2): 73-84
- 24 Diskussion im Plenum (2002) Aktuelle Probleme bei der alternativen Antikoagulation von HIT-II-Patienten. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzthe* 24-25

- 25 Eichler P, Budde U, Haas S, Kroll H, Loreth RM, Meyer O, Pachmann U, Potzsch B, Schabel A, Albrecht D, Greinacher A (1999) First workshop for detection of heparin-induced platelet-activation test (HIPA) in comparison with a PF4/heparin ELISA. *Thromb Haemost* 81(4): 625-629
- 26 European Committee for Standardization (1996) European Standard 1283: Haemodialysers, haemodiafilters, haemofilters, haemoconcentrators and their extracorporeal circuits.
- 27 Fischer KG (2000) Hemodialysis in heparin-induced thrombocytopenia. In: Warkentin TE, Greinacher A (eds.) Heparin-induced thrombocytopenia. Plenum Press, New York, pp.339- 354
- 28 Fischer KG (2002) Hirudin in renal insufficiency. *Semin Thromb Hemost* 28 (5): 467-482
- 29 Fischer KG (2001) Elimination von Danaparoid mittels Filtration: Bestimmung der Eliminationskinetik in physiologischer Kochsalzlösung, Humanalbumin und humanem Vollblut. Vorläufiges Studienprotokoll (unveröffentlicht)
- 30 Fischer KG (1999) Erfolgreiche Lysetherapie einer Vena-Cava-inferior- und Ilio-femoral-Venenthrombose bei Heparin-induzierter Thrombozytopenie Typ II. *Dtsch Med Wschr* 124: 32-34
- 31 Fischer KG, van de Loo A, Böhler J (1999) Recombinant hirudin (lepirudin) as anticoagulant in intensive care patients treated with continuous hemodialysis. *Kidney Int* 56; Suppl. 72: 46-50
- 32 Fischer KG, Schollmeyer (1998) Adequate management of heparin-associated thrombocytopenia. *Nephron* 78: 112-113
- 33 Frank RD, Farber H, Stefanidis I, Lanzmich R, Kierdorf HP (1999) Hirudin elimination by hemofiltration: a comparative in vitro study of different membranes. *Kidney Int Suppl* 72: 41-45

- 34 Ganzer D, Gutezeit A, Mayer G, Greinacher A, Eichler P (1997) Prevention of thromboembolism as a cause of thromboembolic complications. A study of the incidence of heparin-induced thrombocytopenia type II. *Orthop Ihre Grenzgeb* 135(6): 543-549
- 35 Gordon DL, Linhardt R, Adams HP (1990) Low-molecular-weight heparins and heparinoids and their use in acute or progressing ischemic stroke. *Clin Neuropharmacol* 13: 522-543
- 36 Greinacher A (2000) Recombinant hirudin for the treatment of heparin-induced thrombocytopenia. In: Warkentin TE, Greinacher A (eds.) *Heparin-induced thrombocytopenia*. Plenum Press, New York, pp. 313-338
- 37 Greinacher A (2002) Heparin-induzierte Thrombozytopenie. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzthe* 1-2
- 38 Greinacher A, Amiral J, Dummel V, et al (1994) Laboratory diagnosis of heparin-associated thrombocytopenia and comparison of platelet aggregation test, heparin-induced platelet activation test, and platelet factor 4/heparin enzyme-linked immunosorbent assay. *Transfusion* 34: 381-385
- 39 Greinacher A, Eckhardt T, Mussmann J, et al (1993) Pregnancy complicated by heparin associated thrombocytopenia: management by a prospectively in vitro selected heparinoid (Org 10172). *Thromb Res* 71: 123-126
- 40 Greinacher A, Eichler P, Lubenow N, Kiefel V (2001) Drug-induced and drug-induced immune thrombocytopenias. *Rev Clin Exp Hematol* 5(3): 166-200
- 41 Greinacher A, Michels I, Mueller-Eckhardt C (1992) Heparin-associated thrombocytopenia: the antibody is not heparin specific. *Thromb Haemost* 67: 545-549

- 42 Greinacher A, Pötzsch B, Amiral J, Dummel V, Eicher A, Müller-Eckhardt C (1994) Heparin-associated thrombocytopenia: isolation of the antibody and characterization of a multimolecular PF4-heparin complex as the major antigen. *Thromb Haemost* 71: 247-251
- 43 Greinacher A, Warkentin TE (2000) Treatment of heparin-induced thrombocytopenia: an overview. In: Warkentin TE, Greinacher A (eds.) *Heparin-induced thrombocytopenia*. Plenum Press, New York, pp. 261-290
- 44 Gruel Y (1997) Thrombopenia induced by heparin. From pathophysiology to treatment. *Ann Med Interne* 148(2): 136-141
- 45 Harenberg J (2002) Management von HIT-II-Patienten mit Hirudin-Antikörpern nach erster Therapie. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther* 8-11
- 46 Harenberg J, Zimmermann R, Schwarz F, Kübler W (1983) Treatment of heparin-induced thrombocytopenia with thrombolytic therapy by new heparinoid. *Lancet* 1: 986-987
- 47 Hirsh J (1992) Orgaran. Summary and conclusions. *Haemostasis* 22: 112
- 48 Ireland H, Lane DA, Flynn A, et al (1986) The anticoagulant effect of heparinoid Org 10172 during hemodialysis: an objective assessment. *Thromb Haemost* 55: 271- 275
- 49 Kathiresan S, Shiomura J, Jang IK (2002) Argatroban. *Thromb Thrombolysis* 13(1): 41-47
- 50 Kelton JG, Smith JW, Warkentin TE, Hayward CP, Denomme GA, Horsewood P (1994) Immunglobulin G from patients with heparin-induced thrombocytopenia binds to a complex of heparin and platelet factor 4. *Blood* 83: 3232-3239

- 51 King DE, Kelton JG (1984) Heparin-induced thrombocytopenia. *Ann intern Med* 100: 535-540
- 52 Koch S, Harenberg J, Odel M, Schmidt-Gayk H, Walch S, Budde U (2002) Development of a high-pressure liquid chromatography method for diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia. *Am J Clin Pathol* 117(6): 900-904
- 53 Lau AH, Kronfol NO, Barakat M (1987) Effect of blood and ultrafiltration flow rates on drug sieving during continuous hemofiltration. *Trans Am Soc Artif Intern Organs* 32: 297-299
- 54 Liebe V, Bruckmann M, Fischer KG, Haase KK, Borggreffe M, Huhle G (2002) Biological relevance of anti-recombinant hirudin antibodies - results from in vitro and in vivo studies. *Semin Thromb Hemost* 28(5): 483-490
- 55 Lubenow N, Greinacher A (2002) Hirudin in heparin-induced thrombocytopenia. *Semin Thromb Hemost* 28(5): 431-38
- 56 Markwardt F (1994) The development of hirudin as an antithrombotic drug. *Thromb Res* 74: 1-23
- 57 Markwardt F, Nowak G, Stürzebecher J, Vogel G (1988) Clinico-pharmacological studies with recombinant hirudin. *Thromb Res* 52: 393-400
- 58 Meuleman DG (1992) Organon (ORG 10172): its pharmacological profile in experimental models. *Haemostasis* 22: 58-65
- 59 Saxon BR, Black MD, Edgell D, Noel D, Leaker MT (1999) Pediatric heparin-induced thrombocytopenia: management with Danaparoid (organon). *Ann Thorac Surg* 68(3): 1076-1078

- 60 Schick BP, Gradowski JF, San Antonio JD, Martinez J (2001) Novel design of peptides to reverse the anticoagulant activities of heparin and other glycosaminoglycans. *Thromb Haemost* 85(3): 482-487
- 61 Schmahl KS, Ganjoo AK, Harloff MG (1997) Orgaran (10172) for cardiopulmonary bypass in heparin-induced thrombocytopenia: role of adjunctive plasmapheresis. *J Cardiothorac Vasc Anesth* (2): 262-263.
- 62 Stiekema JC, Van Griensven JM, Van Dinther TG, Cohen AF (1993) A cross-over comparison of the anti-clotting effects of three low molecular weight heparins and glycosaminoglycuronan. *Br J Clin Pharmacol* 36(1): 51-56
- 63 Stiekema JC, Wijnand HP, ten Cate H et al (1991) Partial in vivo neutralisation of plasma anticoagulant effects of Lomoparan (Org 10172) by protamine chloride. *Thromb Res* 63: 157-67
- 64 Swan SK, Hursting MJ (2000) The pharmacokinetics and pharmacodynamics of argatroban: effects of age, gender, and hepatic or renal dysfunction. *Pharmacotherapy* 20(3): 318-329
- 65 Turpie AGG (1992) Orgaran in the prevention of deep vein thrombosis in stroke patients. *Haemostasis* 22: 92-98
- 66 Vanholder R, Camez A, Veys N, Van Loo A, Dhondt AM, Ringoir S (1997) Pharmacokinetics of recombinant hirudin in hemodialyzed end-stage renal failure patients. *Thromb Haemost* 77: 650-655
- 67 Visentin GP, Ford SE, Scott JP, Aster RH (1994) Antibodies from patients with heparin-induced thrombocytopenia/ thrombosis are specific for platelet factor 4 complexed with heparin or bound to endothelial cells. *J Clin Invest* 93: 81-88
- 68 Weismann RE, Tobin RW (1958) Arterial embolism occurring during systemic heparin therapy. *Arch Surg* 76: 219-227

- 69 Westphal K, Martens S, Strouhal U, Matheis G, Lindhoff-Last E, Wimmer-Greinecker G, Lischke V (1997) Heparin-induced thrombocytopenia type II: perioperative management using danaparoid in a coronary artery bypass patient with renal failure. *Thorac Cardiovasc Surg* 45(6):318-320
- 70 Wilde MI, Markham A (1997) Danaparoid. A review of its pharmacology and clinical use in the management of heparin-induced thrombocytopenia. *Drugs* 54: 903-924
- 71 Willey ML, de Denus S, Spinler SA (2002) Removal of lepirudin, a recombinant hirudin, by hemodialysis, by hemofiltration, or by plasmapheresis. *Pharmacotherapy* 22(4): 492-99
- 72 Zohrer B, Zenz W, Rettenbacher A, Covi P, Kurnik K, Kroll H, Grubbauer HM, Muntean W (2001) Danaparoid sodium (Orgaran) in four children with heparin-induced thrombocytopenia type II. *Acta Paediatr* 90(7): 765-771

8 Veröffentlichung und Posterpräsentation

Teile dieser Doktorarbeit wurden als wissenschaftlicher Beitrag in einer Zeitschrift veröffentlicht und zusätzlich als Posterbeitrag auf dem Jahreskongress der trinationalen Gesellschaft für Nephrologie im September 2004 in Basel präsentiert.

Only Plasmapheresis Allows for Danaparoid Elimination from Blood



University Hospital Freiburg, ¹Department of Nephrology and General Medicine, ²Department of Clinical Chemistry,
 Hugstetter Str. 55, D-79106 Freiburg, Germany; ³University Hospital Greifswald, Department of Clinical Chemistry
 and Laboratory Medicine, Sauerbruchstrasse, D-17487 Greifswald, Germany

Introduction

The low molecular weight heparinoid danaparoid is frequently used for alternative anticoagulation especially in case of immune-mediated heparin-induced thrombocytopenia, a potentially life-threatening complication of heparin treatment. As danaparoid is mainly eliminated by renal excretion, patients with severe renal insufficiency are at an increased risk of drug accumulation and bleeding. An agent which is capable of rapidly reversing the anticoagulant effect of danaparoid is currently not available. Thus, the role of extracorporeal blood purification procedures for danaparoid elimination awaits clarification.

Methods

A standardized in vitro recirculation set-up was used to test five different high-flux hemodialyzer membranes and a plasmapheresis membrane (Table 1). The set-up met the requirements of Euronorm EN1283, which regulates the determination of sieving coefficients for hemodialyzers.

5% human albumin and compositional human whole blood (produced from packed red blood cells and blood group-identical fresh frozen plasma) were used as carrier solutions. Danaparoid was added to a final concentration of 0.6-0.8 anti-factor Xa (aXa) units/mL as measured by a chromogenic assay.

Controlled ultrafiltration was performed over a time period of 2h. At defined time points, samples were drawn from the pre filter line, the post filter line, and the filtrate line (10 determinations of aXa activity in n=4-7 separate experiments, i.e. mean ± SEM of 40-70 determinations, per filter type each with a new hemodialyzer membrane in a new in vitro set-up).

Danaparoid was monitored by determining aXa activity on a BCS analyzer. Values below the lower detection limit (0.05 aXa units/mL) were set as zero.

Calculation of sieving coefficients

Calculation of sieving coefficients (SC) was performed at each time point according to the equation: $SC = (2 \times \text{aXa activity in the filtrate}) / \text{aXa activity in the pre filter compartment} + \text{aXa activity in the post filter compartment}$. By definition, sieving coefficient was zero if danaparoid was not detected in the filtrate.

Table

Membrane Polymer	Abbrev.	Type	Distributor	Membrane Surface Area (m ²)	Ultrafiltration Coefficient (mL/h/mmHg) [*]
Hemodialyzer membrane					
Polysulfone	PS	F50S	Fresenius	1.0	30
Polyacrylonitrile (AN69)	PAN	Filtral S	Hospal	0.75	32
Polyamida	PA	F11S	Gambro	1.1	53
Polyarylethersulfone	PAES	Arylane H1	Hospal	1.04	58
Polymethyl-metacrylate	PMMA	Filtrizer BK-1.3 F	Toray	1.3	16
Plasmapheresis membrane					
Polypropylene	PP	Plasmaflux	Fresenius	0.5	--

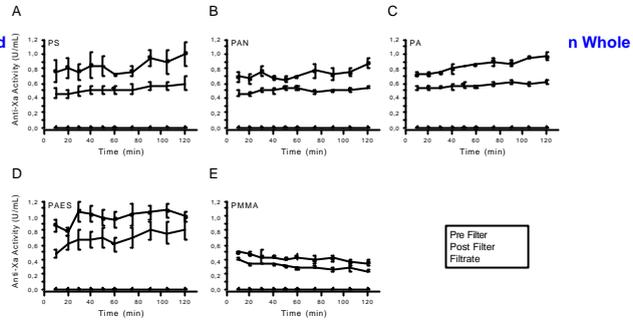
^{*} Data given as specified by the distributor

Acknowledgement

This study was supported by a grant from Celltech Pharma, Essen, Germany

Results

Danaparoid Blood



Danaparoid-primed compositional human whole blood was subjected to controlled ultrafiltration via different high-flux hemodialyzer membranes. Time course of aXa activities in the pre filter, the post filter and the filtrate compartment (mean ± SEM of n=3 [PAES; n=5] independent experiments with each hemodialyzer type; each determination at each time point was run in duplicate). No danaparoid sieving was observed.

Table

	PS (n=3)	PAN (n=3)	PA (n=3)	PAES (n=5)	PMMA (n=3)
aXa Activity (U/mL)					
Pre Filter	0.52 ± 0.07	0.51 ± 0.03	0.58 ± 0.03	0.69 ± 0.12	0.31 ± 0.02
Post Filter	0.84 ± 0.12	0.78 ± 0.06	0.84 ± 0.03	0.98 ± 0.1	0.43 ± 0.04
Filtrate	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Sieving	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Mean anti-Xa activities (U/mL) within the different compartments (10 determinations in n separate experiments, i.e. mean ± SEM of 30-70 determinations of aXa activity per filter type; each determination at each time point was run in duplicate). Sieving coefficients were calculated according to the standard formula. n.d. = not detectable

Danaparoid Sieving Characteristics of a Plasmapheresis Membrane in Whole Blood

Figure 2

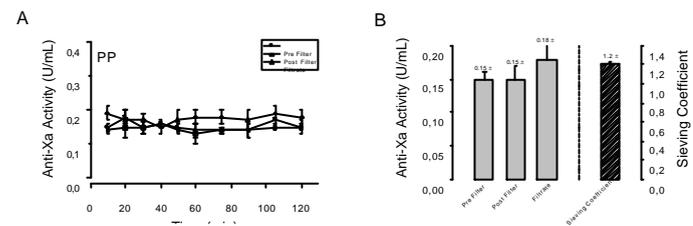


Figure 2A Danaparoid-primed compositional human whole blood was subjected to controlled ultrafiltration over a polypropylene (PP) plasmapheresis membrane. Time course of aXa activities in the pre filter, the post filter and the filtrate compartment (mean ± SEM of n=3 independent experiments).

Figure 2B Summary of the experiments. Mean ± SEM of n=30 determinations of aXa activities and sieving coefficient.

Conclusion

- Only plasmapheresis is capable of effectively reducing danaparoid plasma levels.
- Plasmapheresis is recommended if rapid reduction of danaparoid blood concentration is needed such as in case of marked danaparoid overdose or danaparoid-associated bleeding especially in severe renal failure.

9 Danksagung

Die hier vorgelegte Arbeit entstand in der Zeit vom Wintersemester 2001/2002 bis zum Wintersemester 2002/2003.

Für das praktisch bedeutsame Thema, für seine fortlaufende Unterstützung, für Rat und Hilfe, für Gesprächsbereitschaft und seine große Geduld danke ich meinem Doktorvater Herrn Privatdozent Dr. med. Karl-Georg Fischer. Er hat mich in das wissenschaftliche Arbeiten eingeführt und die Begeisterung für das behandelte Thema geweckt.

Ich danke dem Zweitreferenten Herrn Privatdozent Dr. med. Markus Nauck für die zügige Korrektur dieser Dissertation und die überaus freundliche Unterstützung bei Fragen und Problemen sowie Herrn Professor Dr. med. Matthias Nauck für weitergehende Anregungen.

Weiterhin danke ich Frau Christiane Perrot-Bareither und dem ganzen Dialyseteam, das mich immer herzlich empfangen hat und mir bei Fragen stets eine Hilfe war. Dem Dialysetechniker Herrn Reinhold Mörder danke ich herzlich für das Ausbauen und das Überlassen der Dialysepumpen, ohne die meine Versuche nicht möglich gewesen wären.

Mein herzlicher Dank gilt Frau Nina Markovic und Frau Brigitte Mark sowie allen Mitarbeitern des Zentrallabors für die Einarbeitung zur Messung am BCS-Analyzer sowie die sehr freundliche und geduldige Betreuung während der Messungen.

Ich danke Herrn Dr. med. Christian Schultz-Huotari und der Abteilung für Transfusionsmedizin für das Bereitstellen von Blut- und Plasmaproben und für die Einarbeitung in das Abfüllen der kompositionellen Blutkonserven.

Weiterhin danke ich der Cell Tech Group für die Überlassung des Materials, um die Laboruntersuchungen vornehmen zu können.

Für das Durchsehen der Korrekturfahnen danke ich Herrn Dr. jur. Johann Dieckmann, Dr. jur. Matthias Eggert, Herrn Jan Peters, Herrn Joachim Schönberger und Herrn Tobias Wolf.

Gewidmet ist die Arbeit meinen Eltern Professor Dr. jur. Uwe H. Schneider und Dr. med. Barbara Schneider. Ich danke ihnen für ihre immerwährende Unterstützung meines Studiums und besonders während der Zeit dieser Dissertation. Ganz besonders herzlicher Dank gilt meinem Bruder Sven H. Schneider, LL.M. (Berkeley) für seine ausdauernde Bereitschaft zur Diskussion und seine Geduld und Hilfestellung während des Entstehens der Arbeit.

10 Lebenslauf

Katja Susanne Annika Schneider

Geburtsdatum: 20. November 1978
Geburtsort: Dortmund
Eltern: Professor Dr. jur. Uwe H. Schneider und Dr. med. Barbara Schneider, Fachärztin für Neurologie

Ausbildung

1985 -1989 Grundschole in Darmstadt
1989 -1998 Gymnasium Edith-Stein-Schole in Darmstadt
1995 Phillips Academy, Andover, MA, USA
1998 Abitur
1998 - voraussichtlich 2004 Studium der Humanmedizin an der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg
2000 Physikum (1. Ärztliche Zwischenprüfung)
2001 1. Staatsexamen
2003 2. Staatsexamen
2003 - 2004 Praktisches Jahr in Freiburg, London und Luzern

Famulaturen und Krankenhauspraktika

1998 5 Wochen Universitätsklinikum Poitiers, Frankreich (Chirurgie)
1999 5 Wochen Klinikum Pitié-Salpêtrière, Paris (Chirurgie)
2001 5 Wochen Universitätsklinikum Hamburg (Innere Medizin und Neurologie)
4 Wochen Duke University, Durham, NC, USA (Innere Medizin)
2002 3 Wochen AKH, Universitätsklinik Wien (Pädiatrie)

	5 Wochen Universitätsklinik Innsbruck (Unfallchirurgie)
2003 – 2004	16 Wochen Universitätsklinik Freiburg (Innere Medizin)
2004	16 Wochen Queen Square, National Hospital for Neurology and Neurosurgery, London (Neurologie)
2004	12 Wochen Kantonsspital Luzern (Chirurgie und Neurochirurgie)