

Aus der Klinik für Anästhesiologie  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Zwißler

aus der Abteilung für Transfusionsmedizin und Hämostaseologie  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Leiter: Prof. Dr. med. Reinhard Henschler

# **Hämostaseologisches Monitoring unter Thrombinhemmung durch Argatroban bei kritisch kranken Patienten**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Ana-Maria Nydegger, geborene Tichy

Aus Bukarest/Rumänien

2013

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

<b>Berichterstatter:</b>	Prof. Dr. med. M. Spannagl
<b>Mitberichterstatter:</b>	Priv. Doz. Dr. Christoph Knothe
<b>Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:</b>	Dr. M. Irlbeck
<b>Dekan:</b>	Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR
<b>Tag der mündlichen Prüfung:</b>	07.11.2013

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung .....</b>	<b>5</b>
1.1. Hinführung und Fragestellung .....	5
1.2. Heparin induzierte Thrombozytopenie .....	7
1.2.1. Typen .....	7
1.2.2. Pathophysiologie.....	7
1.2.3. Epidemiologie.....	9
1.2.4. Klinik .....	9
1.2.5. Diagnostik.....	10
1.2.6. Therapie .....	11
1.3. Der direkte Thrombininhibitor Argatroban .....	12
1.3.1. Thrombinhemmung .....	12
1.3.2. Argatroban, Substanz und Eigenschaften .....	15
<b>2. Material und Methodik.....</b>	<b>18</b>
2.1. Allgemeines .....	18
2.2. Instrumente .....	21
2.3. Reagenzien und Gerinnungsanalytik .....	21
2.3.1. Argatroban .....	21
2.3.2. Kalibrationsplasma .....	22
2.3.3. Prothrombinase induced clotting time .....	22
2.3.4. Activated Clotting Time .....	25
<b>3. Ergebnisse.....</b>	<b>26</b>
3.1. Patientenkollektiv .....	26
3.1.1. Patientenmerkmale .....	26
3.1.2. Ursachen für einen Intensivstationsaufenthalt.....	26
3.1.3. Beschreibung der aufgetretenen hämostaseologischen Komplikationen unter Argatroban-Therapie.....	27
3.2. Patienten Fallzahl.....	27
3.3. Argatrobandosierung .....	28
3.4. PTT Monitoring .....	30
3.5. Leberparameter der Intensivpatienten .....	32
3.5.1. Quick.....	32
3.5.2. Bilirubin.....	34

3.5.3.	GPT.....	36
3.5.4.	Alkalische Phosphatase .....	38
3.5.5.	Gamma-GT .....	40
3.6.	Argatroban Plasmakonzentration.....	42
3.6.1.	Ermittlung der Argatroban Plasmakonzentration über die PiCT Verdünnungsreihe ....	42
3.6.2.	Korrelation der Argatroban-Plasmakonzentration mit der Dosierung.....	44
3.6.3.	Korrelation der Argatroban-Plasmakonzentration mit der PTT .....	45
3.6.4.	Korrelation der PTT mit der PiCT.....	46
3.7.	ACT Ergebnisse der Argatroban Verdünnungsreihe der Vollblutproben von Intensivpatienten und Kalibrationsplasma.....	48
<b>4.</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>50</b>
4.1.	Anmerkungen zur Patienten Fallzahl.....	50
4.2.	Argatroban-Dosierung allgemein .....	50
4.3.	Argatrobandosierung und Leberfunktion .....	51
4.4.	Patienten und hämostaseologische Komplikationen .....	55
4.5.	PTT Monitoring .....	56
4.6.	Korrelationen der Argatroban-Plasmakonzentration mit der Dosierung, Bilirubin und PTT .....	57
4.7.	ACT .....	58
4.8.	PICT.....	59
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>61</b>
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>63</b>
<b>7.</b>	<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>65</b>
<b>8.</b>	<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>66</b>
<b>9.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>67</b>
<b>10.</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>69</b>
<b>11.</b>	<b>Lebenslauf und Eidesstattliche Versicherung .....</b>	<b>70</b>

# 1. Einleitung

## 1.1. Hinführung und Fragestellung

In der Intensivmedizin spielt die Blutgerinnung eine zentrale Rolle. Antikoagulanzen werden zur Thromboseprophylaxe- und Therapie sowie zur Gerinnungshemmung bei Verwendung extrakorporaler Zirkulationssysteme verwendet. Bei schwerstkranken Patienten besteht, beispielsweise bedingt durch auftretende Einschränkung der Leber- und Nierenfunktion, ein erhöhtes Blutungsrisiko. Aus diesem Grund haben Antikoagulanzen auf der Intensivstation eine schmale therapeutische Breite. Das Monitoring dieser Substanzen gewinnt somit an Bedeutsamkeit. Die in der Intensivmedizin am häufigsten verwendete Substanz ist das unfraktionierte Heparin (UFH). UFH ist sehr gut steuerbar, zum einen durch die geringe Halbwertszeit und zum anderen durch die Therapiekontrolle mit der partiellen Thromboplastinzeit (PTT). Ein weiterer Vorteil ist die Möglichkeit der einfachen Antagonisierung mit Protamin und die geringen Kosten. Trotz aller Vorteile ist die Anwendung jedoch gleichzeitig mit einer potentiell lebensbedrohlichen Arzneimittelnebenwirkung verbunden: der Heparin induzierten Thrombozytopenie (HIT). Zur den therapeutischen Optionen bei HIT zählt seit 2005 Argatroban, ein direkter Thrombininhibitor, der laut Fachinformation und in der klinischen Praxis wie Heparin mit der PTT gesteuert und überwacht werden kann. In den letzten Jahren wurden die zum Monitoring direkter Thrombininhibitoren verwendeten Gerinnungstests ausgiebig untersucht. Dennoch existieren kaum in vivo gewonnene Daten von schwerstkranken Intensivpatienten. Der klinische Stellenwert der Standard-Gerinnungstests ist besonders bei diesen speziellen Patientenkollektiven deshalb unklar.

Das Ziel dieser Arbeit war es, Daten über die tatsächlich notwendige Dosierung und deren Monitoring von Argatroban bei Schwerstkranken zu sammeln und hinsichtlich möglicher Einflussfaktoren zu analysieren.

In der klinischen Anwendung von Argatroban bei Intensivpatienten entstand der Eindruck, dass bei diesem Patientenkollektiv deutlich niedrigere Dosierungen erforderlich sind als in der Fachinformation für Patienten mit normaler und selbst mit eingeschränkter Leberfunktion angegeben. Dies birgt das Risiko einer Überdosierung und kann zu einer potentiell lebensbedrohlichen Blutungsneigung führen.

Ein Ziel der Arbeit war es, durch systematische prospektive Datenerfassung diese Vermutung zu überprüfen und herauszufinden, welche tatsächlichen Dosierungen bei schwerst kranken Intensivpatienten erforderlich sind um die, ebenfalls systematisch dokumentierten, Ziel-PTT-Werte zu erreichen.

Da Argatroban rein hepatisch metabolisiert wird, galt es herauszufinden, ob und falls ja, welche Leberfunktionsstörungen oder Leber(labor)parameter verantwortlich für die notwendige Dosis(reduktion) sind. Untersucht werden sollte, ob es einen Leberparameter gibt, anhand dessen eine notwendige Dosisanpassung vorab einzuschätzen wäre.

Es stellte sich desweiteren die Frage, ob und inwiefern Leberfunktionsstörungen nicht nur die Dosierungspraxis, sondern auch die Argatroban-Plasmakonzentration beeinflussen. In dieser Arbeit wurde dieser Frage am Beispiel des Bilirubins nachgegangen. Denkbar wäre, dass bei Leberfunktionseinschränkung bei kritisch Kranken die Argatroban-Plasmakonzentration kumuliert, ohne dass sich dies in den klinisch eingesetzten Gerinnungstests widerspiegelt.

Die Therapie von Argatroban wird laut Fachinformation mit der PTT überwacht. Da jedoch kritisch Kranke häufig eine spontan verlängerte PTT aufweisen, wurde vermutet, dass die PTT bei diesem Patientenkollektiv nicht den idealen Parameter zum Monitoring des antikoagulatorischen Effekts von Argatroban darstellt. Es galt einerseits diese Annahme zu überprüfen und andererseits die Korrelation der Argatrobankonzentration im Plasma mit der PTT zu untersuchen.

Zudem sollte diese Arbeit einen Beitrag dazu leisten, einen adäquaten in-vitro Gerinnungstest ausfindig zu machen, der den antikoagulatorischen Status Schwerstkranker unter Argatroban widerspiegelt. In der Studie wurde hierfür die Activated Clotting Time (ACT) untersucht. Die hierbei gewonnenen Daten sollten Aufschluss über die Rolle der Veränderungen im Plasma schwerstkranker Patienten im Vergleich zu Gesunden geben.

## 1.2. Heparin induzierte Thrombozytopenie

### 1.2.1. Typen

Es werden zwei Typen der Heparin-induzierten Thrombozytopenie unterschieden:

Die HIT I ist eine milde, nicht-immunvermittelte Form, die keine HIT-Antikörper aufweist, wohingegen die HIT II durch Antikörper gegen den Plättchenfaktor 4 (PF 4) / Heparin Komplex gekennzeichnet ist. Diese beiden Typen unterscheiden sich nicht nur ätiologisch sondern haben auch unterschiedliche klinische Merkmale [1].

Der in dieser Arbeit verwendete Begriff der „HIT“ bezieht sich auf die Entität der HIT II.

### 1.2.2. Pathophysiologie

PF 4 ist ein aus 70 Aminosäuren bestehendes Protein, das in Granula von Thrombozyten gespeichert ist und bei deren Aktivierung freigesetzt wird. PF 4 lagert sich zu Tetrameren zusammen, die von einem Ring positiv geladener Aminosäuren umgeben sind. Dieser Ring erlaubt Interaktionen mit stark negativ geladenen Glykosaminoglykanen, wie dem Heparin. Heparin führt zu einer Konformationsänderung in dem PF4-Tetramer [2].

Die unterschiedliche Inzidenz der HIT bei verschiedenen Heparinen wird mit der Fähigkeit zur Konformationsänderung erklärt, die von der Kettenlänge und Sulfatierung der Heparine abhängt. So entstehen beispielsweise bei der Behandlung mit einem Heparin mit hohem eigenem Molekulargewicht, wie dem UFH, größere Heparin-PF4 Komplexe. Je grösser der Komplex desto eher kommt es zu einer immunologischen Reaktion [1].

Die Verbindung aus PF4 und Heparin bindet auf der Oberfläche der Thrombozyten. Bei Vorhandensein von HIT-Antikörpern binden diese an die Neoepitope der Tetramere. Somit bilden sich auf der Thrombozytenoberfläche HIT-IgG / PF4 / Heparin-Komplexe, die schlussendlich auf die Thrombozyten aktivierend wirken. Es kommt zur Freisetzung von weiterem PF4 im Sinne eines Circulus vitiosus und über Ausschüttung von Initiatoren zur Aktivierung der plasmatischen Gerinnung an deren Ende Thrombin steht [3].

Zusätzlich bindet PF4 an der heparansulfathaltigen Glykokalix der Endothelzellen. Auch hier lagert sich Heparin an. Durch nachfolgende Bindung von HIT-Antikörpern an die Heparin / PF4-Komplexe kommt es über die Schädigung des Endothels zu einem weiteren Faktor für die Entstehung von Thrombosen. Dies führt zu einem Verbrauch von Thrombozyten mit klinisch sichtbarer Thrombozytopenie. Es bilden sich vernetzte Heparin / PF4 / Thrombozyten-Komplexe. Durch Thrombin vermittelte Fibrinpolymerisation kommt es zur Stabilisierung der Komplexe und so zum Gefäßverschluss [1].

Diese Vorgänge prägen das klinische Bild der HIT.

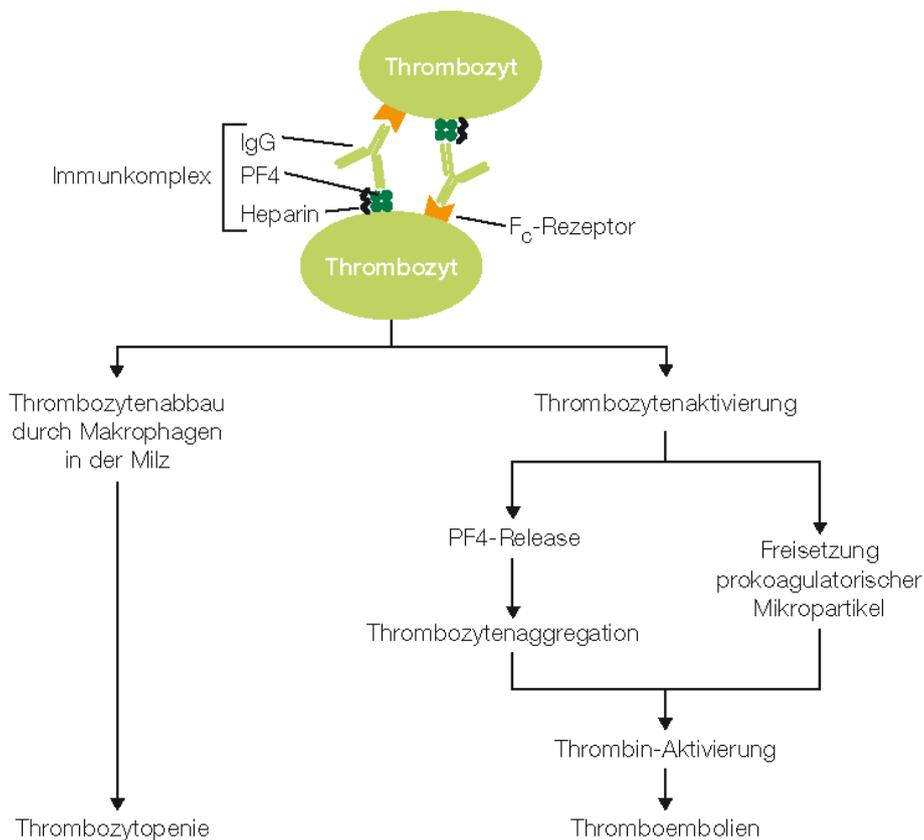


Abbildung 1: Pathomechanismus der HIT II (nach [4])

### 1.2.3. Epidemiologie

Die Häufigkeit der HIT hängt zum einen von der Dosis und zum anderen von der Art des Heparins und des Eingriffs ab. So liegt die Inzidenz bei der Anwendung von UFH bei bis zu 5 %, wohingegen niedermolekulares Heparin in nur 0,1-1 % der Fälle eine HIT auslöst. Bei Intensivpatienten tritt bei etwa 0,5 % eine HIT auf.

Typischerweise tritt eine HIT zwischen dem 5. und 14. Tag einer Heparintherapie auf. Bei Patienten, die schon früher Heparin erhalten haben, kann eine HIT auch in den ersten 48 Stunden nach Heparinanwendung auftreten. In diesem Fall wird von einer „Early-Onset-HIT“ gesprochen. Es wurden aber andererseits auch Fälle beschrieben bei denen sich eine HIT erst nach Einstellen der Heparintherapie manifestiert hat [1].

### 1.2.4. Klinik

Eine HIT wird differentialdiagnostisch in Betracht gezogen, wenn trotz antikoagulatorischer Therapie mit Heparin thrombembolische Komplikationen und ein Thrombozytenabfall beobachtet werden. Die absolute Zahl der Thrombozyten spielt dabei eine untergeordnete Rolle. Entscheidend ist, ob der Abfall über 50 % des Ausgangswerts beträgt. Sollten bei Einstellen der Heparintherapie und Beginn einer alternativen Antikoagulation als Folge die Thrombozytenzahlen wieder ansteigen, spricht dies für das Vorhandensein einer HIT.

Blutungen hingegen kommen bei einer manifesten HIT nur sehr selten vor. Der Grund hierfür liegt in der massiven systemischen Gerinnungsaktivierung.

Das Auftreten eines thrombembolischen Ereignisses trotz Antikoagulation ist ein weiteres Schlüsselsymptom, das 20-50% der Patienten mit HIT betrifft. Das venöse System ist hierbei am häufigsten betroffen. Neben dem Risiko der Neubildung eines Thrombus ist auch das Risiko für die Progression eines bestehenden Thrombus erhöht. Typisch ist das Vorkommen einer thrombembolischer Komplikation in mehreren Gefäßabschnitten gleichzeitig. Als charakteristische Komplikationen sind tiefe Beinvenenthrombosen, Lungenembolien, arteriellen Thrombosen in den Extremitäten, Hirn- und Myokardinfarkte zu nennen. Weniger häufig werden Nebenniereninfarkte oder Thrombosen in den Mesenterialgefäßen beschrieben [1].

Bei manchen Patienten sind zusätzliche Symptome wie Dyspnoe, Fieber, Hypertension oder Tachykardie observierbar [5]. Ebenso sollten allergische Hautreaktionen oder ein generalisiertes Exanthem nach subkutaner Heparin - Applikation als Indiz für eine potentielle HIT gewertet werden [1].

#### 1.2.5. Diagnostik

Die Abgrenzung einer HIT zu anderen Entitäten mit Thrombozytopenie stellt im klinischen Alltag eine Herausforderung für den behandelnden Arzt dar.

Zur primären Abschätzung des Risikos wurde 2005 von Warkentin et al. ein Punkte- System entwickelt das bis dato von mehreren Arbeitsgruppen überarbeitet wurde [6]. Mit dessen Hilfe lässt sich die Wahrscheinlichkeit einer HIT bei Patienten mit Thrombozytopenie einstufen, noch bevor eine labordiagnostische Überprüfung veranlasst wird [7].

Der sog. „4T-Score“ schließt folgende 4 Kriterien ein und vergibt je nach Merkmalsausprägung 0 bis 2 Punkte.

<b>4 T's</b>	<b>2 Punkte</b>	<b>1 Punkt</b>	<b>0 Punkte</b>
Thrombozytopenie	Abfall der Thrombozytenzahlen um > 50 % auf einen Nadir $\geq 20.000/\mu\text{l}$	Abfall der Thrombozytenzahlen um 30 - 50 % auf einen Nadir $10.000-19.000/\mu\text{l}$	Abfall der Thrombozytenzahlen um < 30 % auf einen Nadir $\leq 10.000/\mu\text{l}$
Zeit seit Abfall der Thrombozyten	5-10 Tage oder $\leq 1$ Tag bei früherer Heparintherapie (innerhalb der letzten 30 Tage)	> 10 Tage oder < 1 Tage bei Heparintherapie innerhalb der letzten 31-100 Tage	< 4 Tage (keine frühere Heparintherapie)
Thrombose	Neue Thrombose; Hautnekrose; akute Systemische Reaktion nach Heparinbolus	Progressive oder wiederholte Thrombose; erythematöse Hautläsionen; Thromboseverdacht aber nicht bestätigt	keine Thrombose / Komplikationen
Andere Ursachen für eine Thrombozytopenie	keine andere Ursache für einen Thrombozytenabfall	mögliche andere Ursache nachweisbar	andere Ursache nachgewiesen

**Tabelle 1: 4 T-Score für die Diagnosefindung der HIT (modifiziert nach [1])**

Je nach erreichtem Punktestand gibt es zum heutigen Zeitpunkt zwei empfohlene Vorgehensweisen: Das Erreichen eines Scores zwischen 0 und 3 Punkten macht das Vorhandensein einer HIT unwahrscheinlich, somit sind keine weiteren speziellen Testverfahren im Labor erforderlich. Vielmehr sollte der Fokus auf die verschiedensten Differentialdiagnosen gelegt werden. Bei einem Punktestand von 4 bis 8 Punkten sind eine weitere Abklärung und ein hämostaseologisches Konsil unabdingbar. Die Heparintherapie ist unverzüglich einzustellen und die Antikoagulation mit einer alternativen Stoffklasse durchzuführen [8].

Laborchemisch steht an erster Stelle die Bestimmung von Thrombozytenzahl und von Parametern der Gerinnungsaktivierung, wie zum Beispiel das D-Dimer.

Um die Diagnose einer HIT zu bestätigen stehen weitere spezifischere Verfahren zur Auswahl, die zwei grundlegend unterschiedliche Ansätze verfolgen. Dies sind zum einen immunologische Tests zur Erfassung von PF4-Heparin-Antikörpern, und zum anderen funktionelle Tests, die eine Heparin-induzierte Thrombozytenaktivierung nachweisen.

Im klinischen Alltag spielen die Tests nur eine untergeordnete Rolle. Besteht ein Verdacht auf eine HIT, so sind sowohl die funktionellen als auch die immunologischen Tests zwar in der Lage diesen zu erhärten, es ist aber nicht möglich eine HIT mit Sicherheit auszuschließen [1].

#### 1.2.6. Therapie

Schon beim klinischen Verdacht auf eine HIT sollte das Heparin unverzüglich abgesetzt und eine alternative Antikoagulation begonnen werden, da eine HIT immer mit einer ausgeprägten Gerinnungsaktivierung verbunden ist [1].

Als in Deutschland zugelassene Alternativen zum Heparin stehen zum einen das Heparinoid Danaparoid und zum anderen die Substanzen Argatroban und Lepirudin, aus der Gruppe der direkten Thrombininhibitoren (DTI), zur Verfügung.

Danaparoid ist ein Heparinoid, d.h. eine Heparin-ähnliche Substanz, und inaktiviert vorrangig Faktor Xa. Aufgrund seiner Applikationsform (subkutane Injektion) und seiner langen Halbwertszeit von 25 h es jedoch schlecht steuerbar und wird somit schwerstkranken Patienten auf der Intensivstation nur selten verabreicht [9].

Argatroban, ebenfalls ein parenteral applizierbarer Vertreter der DTI, ist als Antikoagulans zur Prophylaxe oder zur Behandlung von Thrombosen bei Patienten mit HIT zugelassen. Während sich sowohl Lepirudin und Argatroban in der Behandlung von HIT-Patienten mit Thrombosen bewähren,

ist nur Argatroban auch zur Behandlung von HIT Patienten mit isolierter Thrombozytopenie zugelassen [10]. Die Halbwertszeit ist zudem kurz und macht somit Argatroban zum derzeitigen alternativen Antikoagulans der Wahl bei HIT.

### 1.3. Der direkte Thrombininhibitor Argatroban

#### 1.3.1. Thrombinhemmung

Thrombin spielt als Schlüsselenzym der Hämostase durch seine pro- aber auch antikoagulatorischen Eigenschaften eine zentrale Rolle.

Zum einen fungiert Thrombin als stärkster Aktivator der Thrombozytenaggregation.

Weiterhin fördert es die Gerinnselfbildung durch Aktivierung verschiedenster Faktoren. So erfolgt im Sinne eines positiven Feedbackmechanismus durch die Aktivierung der Faktoren V und VIII die Freisetzung weiteren Thrombins oder durch die Aktivierung von Faktor XI die Aufrechterhaltung des intrinsischen Gerinnungswegs. Thrombin spaltet Fibrinogen zu Fibrin und unterstützt dessen Quervernetzung durch seine aktivierende Wirkung auf Faktor XIII.

So besitzt Thrombin aber auch antikoagulatorische Eigenschaften wie die Aktivierung von Protein C durch die Bindung an das Oberflächenprotein Thrombomodulin. Protein C wiederum wirkt durch die Hemmung der prokoagulatorischen Faktoren Va und VIIIa. Am Gefäßendothel erhöht Thrombin zudem die Freisetzung von Tissue-Plasminogenaktivator (t-PA) und besitzt dadurch auch eine fibrinolytische Komponente.

Die enzymatische Funktion des Thrombin selbst wird durch bestimmte Inhibitoren wie dem Antithrombin, dem  $\beta$ 2-Makroglobulin und dem Heparin Cofaktor II kontrolliert [11].

Thrombin besitzt neben der Bindungsstelle für seine katalytische Funktion noch zwei weitere, Exosite-1 und Exosite-2. An Exosite 1 binden Substrate wie Fibrin, Exosite-2 dient als Heparin-Bindungsstelle.

Die Funktion des Moleküls kann auf verschiedenste Arten gehemmt werden.

Heparine hemmen beispielsweise Thrombin indirekt, da diese Substanzklasse die Wirkung von Antithrombin verstärkt. In einem Komplex bestehend aus Heparin, Thrombin und Antithrombin dockt Heparin gleichzeitig an Antithrombin und an Exosite-2 des Thrombins.

Zusätzlich kann Heparin zu einer Vernetzung von Thrombin und Fibrin beitragen, indem es gleichzeitig an Fibrin und Exosite-2 bindet. Da dieser Fibrin-Heparin-Komplex nun beide

Bindungsstellen des Thrombins besetzt, ist das Molekül vor einer Inaktivierung mit einem Antithrombin-Heparin Komplex geschützt. Dieses Phänomen ist ein Nachteil in der Verwendung des Heparins, da an Fibrin gebundenes Thrombin nicht mehr durch Heparin inhibiert werden kann und freies Thrombin weiterhin gerinnungsfördernd wirkt.

DTI weisen im Vergleich zu den Heparinen dieses Problem nicht auf, da sie unabhängig von Antithrombin oder anderen Faktoren wirken.

Univalente DTI, wie Argatroban oder Melagatran, docken lediglich am aktiven Zentrum des Thrombinmoleküls an.

Bivalente DTI, wie Hirudin oder Bivalirudin, binden hingegen sowohl am aktiven Zentrum als auch an der Exosite-1. Natürliches und rekombinantes<sup>1</sup> Hirudin (Lepirudin und Desirudin) bilden einen irreversiblen 1:1 stöchiometrischen Komplex mit Thrombin. Im Gegensatz dazu bindet Bivalirudin, ein synthetisch hergestelltes Hirudin, zwar an das aktive Zentrum und an Exosite-1, wird aber unmittelbar von Thrombin gespalten und stellt somit nur eine vorübergehende Hemmung von Thrombin dar.

Desweiteren üben DTI indirekt auch eine Wirkung auf die Thrombozyten aus, da sie die Thrombin vermittelte Aktivierung und Aggregation verringern.

DTI binden im Vergleich zu UFH nicht an Plasmaproteine, besitzen somit eine kalkulierbarere Wirkung und ein geringeres Überdosierungs- und damit Blutungsrisiko.

Zudem sind DTI in ihrer Wirkung effektiver als niedermolekulare Heparine da sie ebenfalls an Fibrin gebundenes Thrombin hemmen [12].

---

<sup>1</sup> aus Hefezellen gewonnenes

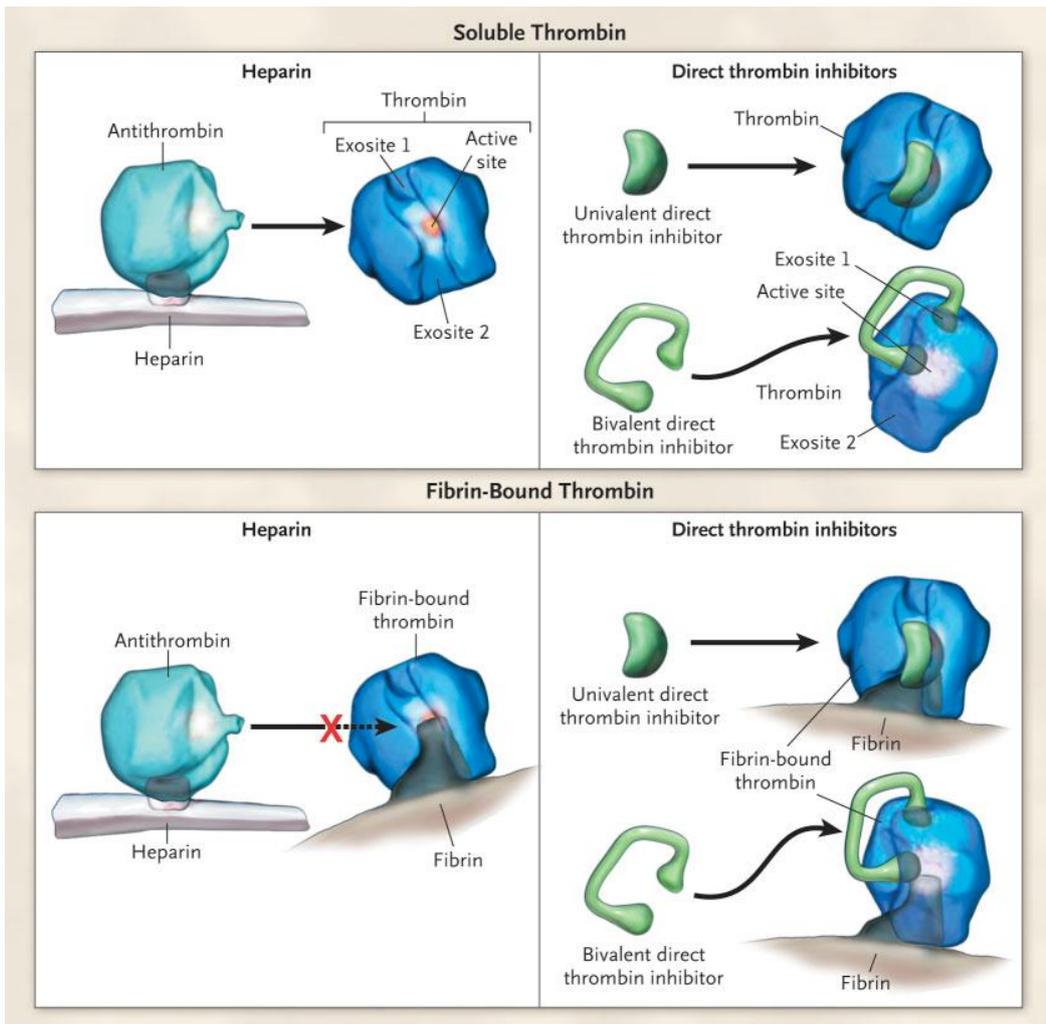


Abbildung 2: Die Wirkung von DTI im Vergleich zu Heparin (nach [12])

### 1.3.2. Argatroban, Substanz und Eigenschaften

Argatroban ist ein hochselektiver direkter Thrombin Inhibitor. Als synthetisches Derivat der Aminosäure L-Arginin besitzt es ein Molekulargewicht von 527 Dalton [5].

2005 erfolgte die Zulassung in Deutschland zur Behandlung von Patienten mit akuter oder früherer HIT mit und ohne thrombembolischer Komplikation [4].

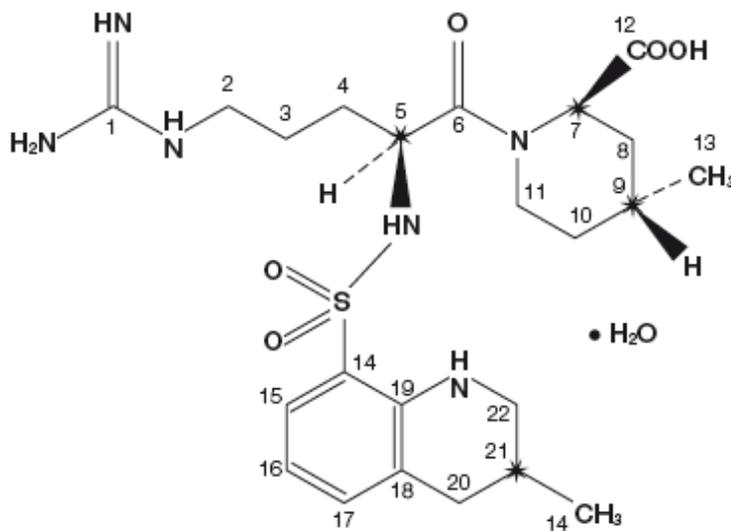


Abbildung 3: Strukturformel von Argatroban (nach [4])

#### Chemische Bezeichnung

1-[5-[(Amino-imino-methyl)amino]-1-oxo-2-[[[(1,2,3,4-tetrahydro-3-methyl-8-quinoliny]sulfonyl]amino]pentyl]-4-methyl-2-piperidin-carboxylsäure, Monohydrat

#### Summenformel

$C_{23}H_{36}N_6O_5S \times H_2O$

#### Wirkungsmechanismus

Die Affinität zum Thrombinmolekül ist mit einer Inhibitionskonstante ( $K_i$ ) von 39 nM eher moderat. Kreuzreaktionen mit Heparin-PF4-Antikörpern existieren nicht.

Im Gegensatz zu den bivalenten DTI, die sowohl an die katalytische Bindungsstelle des Thrombins als auch an die Fibrinogen-Bindungsstelle (Exosite 1) binden, ist Argatroban ein monovalenter DTI, der selektiv an die katalytische Bindungsstelle des Thrombins bindet. Daher ist Argatroban in der

Lage, die Wirkung von frei zirkulierendem als auch fibrin gebundenem Thrombin zu hemmen. Dies ist von Bedeutung, da das Thrombin innerhalb eines Blutgerinnsels weiter aktiv ist und zum weiteren Wachstum des Gerinnsels beitragen kann.

Die antikoagulatorische Wirkung beruht auf der reversiblen Hemmung sämtlicher Wirkungen des Thrombins einschließlich der Fibrinbildung, der Aktivierung der Koagulationsfaktoren V, VIII, XIII sowie der Thrombozytenaktivierung und –aggregation. Es hemmt zudem die Aktivierung des Protein C durch Thrombin.

Durch die, im Vergleich zu den anderen DTI, recht kurze Eliminationshalbwertszeit von Argatroban ( $52 \pm 16$  min) und durch die reversible Bindung an Thrombin ist die Substanz im klinischen Alltag gut zu steuern und beispielsweise auch bei Schwerstkranken oder als perioperatives Antikoagulans einsetzbar. Präoperativ soll Argatroban für 3-4 Stunden, bei Patienten mit hepatischer Dysfunktion für 5-6 Stunden abgesetzt werden.

#### Pharmakokinetik

Das Verteilungsvolumen von Argatroban ist relativ gering  $391 \pm 155$  ml/kg (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung), was darauf hinweist, dass es hauptsächlich in der extrazellulären Flüssigkeit verteilt ist. Etwa 20 – 54 % des Argatroban sind reversibel an Serumproteine gebunden, eine signifikante Interferenz mit der Proteinbindung anderer Medikamente ist somit unwahrscheinlich. Die Metabolisierung von Argatroban ist bisher nicht vollständig charakterisiert worden. Die Bildung der identifizierten Metaboliten (M-1, M-2, M-3) erfolgt hauptsächlich in der Leber über die Hydroxylierung und Aromatisierung des 3-Methyltetrahydroquinolon-Rings [4].

In Vitro Studien haben eine katalytische Beteiligung durch Cytochrom P450 Enzyme CYP3A4/5 nahegelegt. Da aber Erythromycin, als Inhibitor des Cytochrom P450, auf die Pharmakokinetik keinen Einfluss zu haben scheint, spielt dieser Weg in vivo eine untergeordnete Rolle beim Abbau von Argatroban [10].

Argatroban und seine Metaboliten werden zum größten Teil über die Fäzes ( $65,4 \pm 7,1\%$ ) und den Urin ( $21,8 \pm 5,8 \%$ ) ausgeschieden [4].

Die Rolle von Geschlecht und Alter auf die Pharmakodynamik und – Kinetik von Argatroban wurde 2000 von Swan und Hursting untersucht. Die Ergebnisse zeigten jedoch keinen statistisch signifikanten Einfluss von Alter und Geschlecht auf die Pharmakodynamik und – Kinetik von Argatroban[10].

Zum Monitoring wird die partielle Thromboplastinzeit (PTT - Partial Thromboplastin Time) verwendet, angestrebt sind Werte um das 1,5 bis 2,5-fache des oberen Normalbereich-Grenzwertes. Argatroban beeinflusst ebenso die aktivierte Gerinnungszeit (ACT - Activated Clotting Time), Thrombinzeit (TT – Thrombin Time), Ecarinzeit (ECT – Ecarin Clotting Time) oder die Prothrombinzeit (PT – Prothrombin Time zB. ausgedrückt als INR – International Normalized Ratio). Die therapeutische Breite dieser Tests ist jedoch nicht definiert.

Laut Fachinformation wird Argatroban bei Erwachsenen als kontinuierliche Infusion mit einer Dosierung von 2 µg/kg/min verabreicht. Hierbei zeigt sich typischerweise nach 1-3 Stunden ein Steady State im Plasmaspiegel.

Bei Patienten mit hepatischer Dysfunktion ist laut Fachinformation eine Dosisanpassung erforderlich. Empfohlen werden eine reduzierte Initialdosis von 0,5 µg/kg/min und eine strenge Kontrolle der PTT [4].

## 2. Material und Methodik

### 2.1. Allgemeines

Die Studie wurde von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Ludwig Maximilians Universität München genehmigt. Die Patienten wurden nach ausführlicher schriftlicher und mündlicher Aufklärung und ihrer Einverständniserklärung (bzw. die der gesetzlichen Betreuer bei nicht einwilligungsfähigen Patienten) in die Studie aufgenommen.

Eingeschlossen wurden 22 Patienten, die auf den anästhesiologischen Intensivstationen H2 und F0/I3 im Klinikum Großhadern mit Argatroban behandelt wurden. Argatroban wurde den Patienten verabreicht sobald der klinische Verdacht einer HIT bestand. Ein positiver Labortest zur Bestätigung war nicht zwingend erforderlich. Die Dosierung erfolgte unter Kontrolle der PTT, wobei üblicherweise ein Zielwert zwischen 40 und 45 Sekunden angestrebt wurde. Es existierten keinerlei Abbruchkriterien für die Studie, da die Anwendung und Dosierung von Argatroban auf rein klinischen Indikationen beruhte. Die Untersuchung war eine reine Beobachtungsstudie, studienbedingt wurden keine Dosisänderungen vorgenommen. Um den Datenschutz zu gewährleisten, wurden sämtliche in der Studie verwendeten Patientendaten anonymisiert.

Alle 22 Patienten wurden in ein Access-Datenbankmodul aufgenommen um diverse klinische sowie laborchemische Parameter, wie Dosierung, PTT und Leber(labor)parameter, zu verfolgen und miteinander zu korrelieren.

Zu vier Messzeitpunkten wurden folgende Parameter erhoben:

Messzeitpunkt	1	2	3	4
Tage nach Beginn der Argatrobantherapie	3	7	14	28

<b>Allgemeine Patienteninformationen</b>
Alter Größe Gewicht Geschlecht
<b>HIT Diagnostik</b>
Dauer der Heparintherapie Bestätigung des HIT II Verdachts im Labor
<b>Dokumentation der Argatroban Therapie</b>
Dauer der Therapie durchschnittliche Dosierung über den Tag Blutungskomplikationen
<b>Routinelabor Parameter</b>
Quick PTT Gesamt-Bilirubin GPT Gamma-GT Alkalische Phosphatase-AP
<b>Spezifische Intensivmedizinische Daten</b>
Nierenersatzverfahren Katecholamintherapie Patientenbeatmung

**Tabelle 2: Erhobene Daten und Parameter der Studienpatienten**

Zusätzlich wurden die PTT und das Gesamt-Bilirubin täglich bestimmt. Die oben aufgeführten Laborwerte wurden der täglichen intensivmedizinischen Routine entnommen, studienbedingt erfolgten keine zusätzlichen Laborbestimmungen.

Sämtliche Routinelaborparameter wurden vom Institut für Klinische Chemie im Zentrallabor des Klinikum Großhadern erhoben. Die Messverfahren sind allgemein in der Labordiagnostik angewendete und bekannte Verfahren und werden deshalb nicht näher ausgeführt.

Um Rückschlüsse auf die entsprechende Argatrobanplasmakonzentration zu ziehen, und die direkte Messung im Plasma aus technischen Gründen nicht möglich war, wurde eine in-vitro durchgeführte Verdünnungsreihe mit Argatroban (0 bis 10 µg/ml) angelegt und die Prothrombinase induced Clotting Time (PICT) bestimmt. Bei den Studienpatienten wurde in einer Blutprobe ebenfalls die PiCT gemessen. Die Durchführung der Bestimmung der PiCT erfolgte bei Vorliegen sämtlicher Proben en Block aus tiefgekühltem Citratplasma.

Anhand der Ergebnisse der in-vitro Verdünnungsreihe konnte nun rückwirkend auf die Argatrobankonzentration im Patientenplasma geschlossen werden.

Zur Untersuchung des Einflusses von Argatroban auf die ACT wurde fünf zufällig ausgewählten Studienpatienten, die zum Untersuchungszeitpunkt kein Argatroban erhielten (beispielsweise aufgrund eines bevorstehenden Eingriffs), eine Vollblutprobe entnommen. Um eine Argatroban Verdünnungsreihe von 0,1 µg/ml bis 1,2 µg/ml (0,1 µg/ml Schritte) herzustellen, wurden die Blutproben mit der entsprechenden Menge der Substanz versetzt und anschließend die ACT bestimmt. Zum Vergleich zu Gesunden wurde Normalplasma ebenfalls mit entsprechenden Konzentrationen versetzt und eine Messreihe durchgeführt.

## 2.2. Instrumente

- Dade-Behring Blood Coagulation System (Deerfield, Illinois).  
In dieser Arbeit wurden mit diesem Gerät die PiCT bestimmt.
- Hemochron 401 Blood Coagulation System (International Technidyne Corp., Edison, NY,USA)  
Die ACT Bestimmung erfolgte mit dem Hemochron 401 Blood Coagulation System.
- ACT-Messkartuschen der Firma Medtronic (LR-ACT-Kartusche, Katalog Nr. 402-01)  
Die „Low-Range“-ACT Kartusche ist zur Beobachtung der Wirkung therapeutisch verabreichten Heparins anhand der aktivierten Gerinnungszeit von frisch entnommenem Vollblut vorgesehen. Aufgrund der erhöhten Empfindlichkeit dieses Kartuschentyps auf Heparin gestattet sie eine bessere Überwachung der durch Heparin bedingten Gerinnungshemmung bei therapeutisch wirksamen Heparinkonzentrationen.
- Zentrifuge ROTANTA 46 R (Hettich Zentrifugen, Tuttlingen)  
Da für die Gerinnungsanalysen thrombozytenarmes Plasma benötigt wurde, wurden die Vollblutproben nach der Abnahme unverzüglich für 20 min bei  $1500 \times g$  zentrifugiert.
- Blutabnahmeröhrchen der Firma Sarstedt (Sarstedt AG, Nürnbergrecht)

## 2.3. Reagenzien und Gerinnungsanalytik

### 2.3.1. Argatroban

In dieser Arbeit wurde sowohl für die Behandlung der Intensivpatienten als auch bei den in-vitro Versuchen Argatra® (Mitsubishi Pharma) verwendet.

Eine Ampulle Argatra® enthält 2,5 ml à 100 mg/ml Argatroban. 0,1 ml dieser Lösung wurden in 100 ml 0,9% NaCl aufgelöst, so dass eine Argatroban-Stammlösung mit einer Konzentration von 100 µg/ml vorlag. Mit dieser wurden dann die für Gerinnungstests notwendigen Verdünnungsstufen von 0,1 µg/ml bis 1,2 µg/ml hergestellt.

### 2.3.2. Kalibrationsplasma

Für die in-vitro Argatroban Verdünnungsreihen der PiCT und der ACT wurde das Kalibrationsplasma HemosIL™ 0020003700 (Instrumentation Laboratory Company, Lexington, MA, USA) verwendet. Es wird aus einem plasmapheriertem Human Citrat Plasmapool hergestellt und hat die Eigenschaften eines Normal-Plasma-Pools.

### 2.3.3. Prothrombinase induced clotting time

Die PiCT ist ein Monitoringverfahren, mit dem direkte und indirekte Faktor FX- und Thrombinhemmer bestimmt werden können.

Indikationen: Monitoring einer Therapie mit direkten oder indirekten Faktor X – und Thrombininhibitoren

Durch das Gift der „Russels-Viper“ (RVV) kommt es zur Aktivierung des Faktor V. Diese bewirkt die Bildung des „Prothrombinasekomplexes“ (FV-FX-Calcium-Phospholipid-Komplex), und damit die Umwandlung von Prothrombin in Thrombin. Nach Neutralisation des entstandenen Thrombins durch die indirekten oder direkten Thrombinhemmer, kann das restliche Thrombin den Gerinnungsprozess auslösen. Die Verlängerung der PiCT ist deswegen proportional zu der Konzentration des jeweiligen Thrombinhemmers. Die Messgröße ist die Gerinnungszeit und wird in Sekunden angegeben.

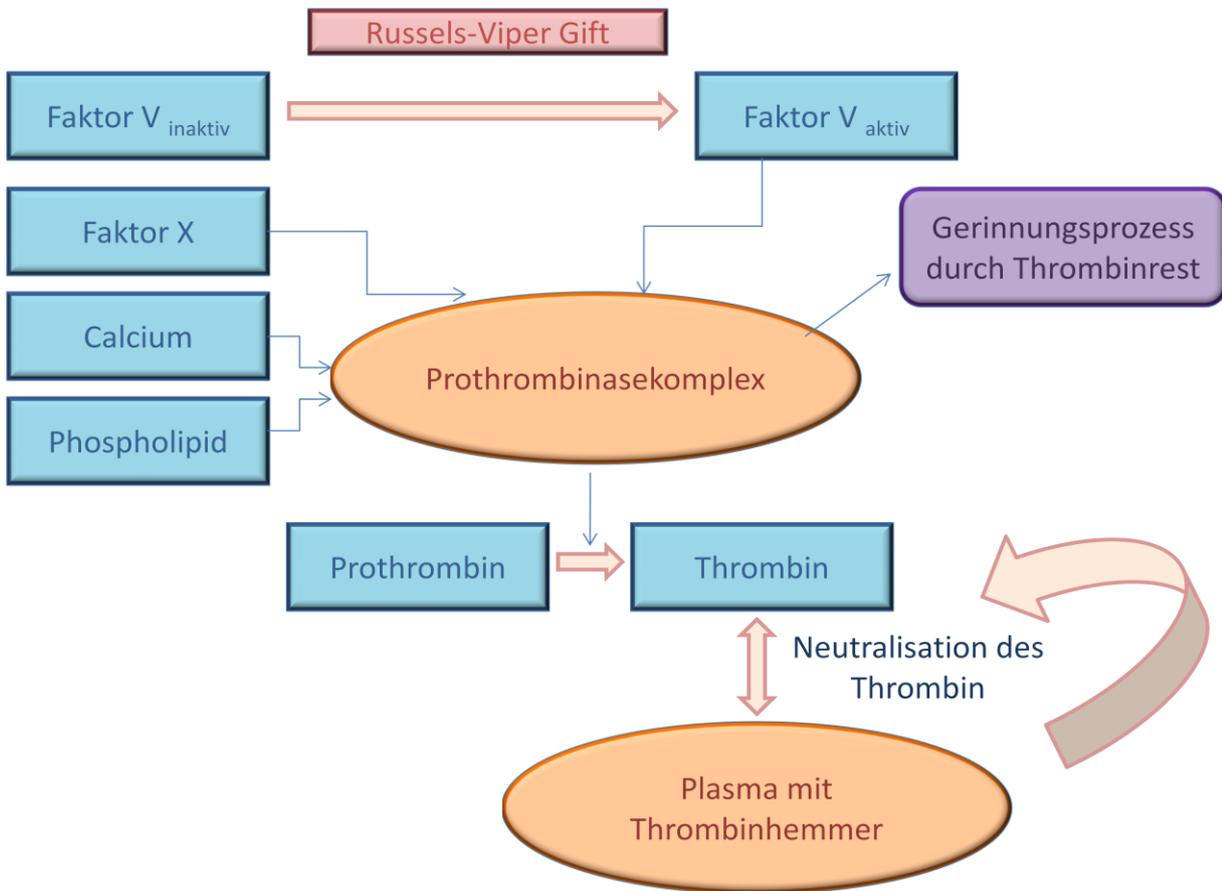


Abbildung 4: Das Prinzip der PiCT Bestimmung

PiCT-Reagenzien (IL Test PiCT ®, Pentapharm LDT, Basel)

Reagenz 1: Aktivator (Lyophilisat)

- FXa
- RVV-V
- synthetische Phospholipide
- Puffer
- Mannit

Reagenz 2: Start Reagent

- Calciumchlorid (0,025 Mol/L)

Vorbereitung der Reagenzien:

- Dem Aktivator-Reagenz wurde zur Rekonstitution 2 ml entionisiertes Wasser zugesetzt. Anschliessend wurde es für 15 min inkubiert und vor Gebrauch schonend durchgemischt.
- Die Calciumchlorid-Lösung wurde auf 37 ° C vorgewärmt.
- Die gefrorenen Blutplasma Proben wurden in einem 37° C Wasserbad aufgetaut.

Die Testdurchführung erfolgte am Dade-Behring Blood Coagulation System (Deerfield, Illinois).

Pipettierschema: Messung der Patientenblutproben

- Patientenplasma 50 µl
- Aktivator-Reagenz 50 µl
- Inkubation
- Start Reagent 50 µl
- Messung der Gerinnungszeit in Sekunden

Messung der Verdünnungsreihe mit Referenzplasma

- Kalibrationsplasma 50 µl mit jeweiliger Argatrobankonzentration (12 Verdünnungsstufen: 0,1 µg/ml bis 1,2 µg/ml)
- Aktivator-Reagenz 50 µl/
- Inkubation
- Start Reagent 50 µl
- Messung der Gerinnungszeit in Sekunden

#### 2.3.4. Activated Clotting Time

Die Testdurchführung erfolgte am Hemochron 401 Blood Coagulation System.

Nach Zugabe von frischem Vollblut in ein Teströhrchen, welches einen Aktivator enthält (Celite®, Glaspartikel oder Kaolin), wird das Teströhrchen in das Gerät eingelegt. Das mechanische Feststellen eines Fibrinropfens in der Blutprobe beendet den Test automatisch und veranlasst den digitalen Timer, die Koagulationszeit in Sekunden anzuzeigen.

Pipettierschema: Messung am Intensivpatienten:

- entsprechende Argatrobanlösung 20 µl (12 Verdünnungsstufen: 0,1 µg/ml bis 1,2 µg/ml)
- Patientenvollblut 180 µl

Messung der Verdünnungsreihe mit Referenzplasma

- entsprechende Argatrobanlösung 20 µl (12 Verdünnungsstufen: 0,1 µg/ml bis 1,2 µg/ml)
- Calciumchlorid 50 µl (0,025 Mol/L)
- 130 µl Referenzplasma

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Patientenkollektiv

##### 3.1.1. Patientenmerkmale

Patientenanzahl, n	22
Alter, Jahre (Mittelwert $\pm$ SD)	48 $\pm$ 14
Männlich, n (%)	13 (59,1)
Größe, cm (Mittelwert $\pm$ SD)	173 $\pm$ 9
Gewicht, kg (Mittelwert $\pm$ SD)	73 $\pm$ 19
Verstorben, n (%)	5 (22,7)
○ Innerhalb 28 Tage ARG-Therapie, n (%)	0 (0)
Dauer der Heparintherapie <sup>2</sup> (Mittelwert $\pm$ SD)	11 $\pm$ 8
Bestätigung des HIT II Verdachts im Labor, n (%)	7 (31,8)
Dauer der Argatrobantherapie (Mittelwert $\pm$ SD)	35 $\pm$ 27
Komplikationen unter Argatroban, n (%)	4 (18,1)
○ Blutungen, n (%)	3 (13,6)
○ Thrombosen, n (%)	2 (9,1)

**Tabelle 3: Patientenmerkmale**

##### 3.1.2. Ursachen für einen Intensivstationsaufenthalt

Post-Transplantation, n (%)	12 (54,5)
○ Lungen-Transplantation, n (%)	5 (22,7)
○ Herz-Lungen-Transplantation, n (%)	2 (9,1)
○ Leber-Transplantation, n (%)	5 (22,7)
Allgemeine postoperative Komplikationen, n (%)	2 (9,1)
ARDS, n (%)	6 (27,3)
Andere lebensbedrohliche Zustände, n (%)	2 (9,1)

**Tabelle 4: Ursachen für einen Intensivaufenthalt**

---

<sup>2</sup> Vor Beendigung wegen HIT Verdacht

### 3.1.3. Beschreibung der aufgetretenen hämostaseologischen Komplikationen unter Argatroban-Therapie

Patient	Komplikation
6	Thrombose linke Vena Cephalica Blutung Nasen-Rachenraum
7	Thrombose rechte Vena Jugularis interna
12	Rezidivierende obere/untere GI-Blutung
21	Obere GI-Blutung

**Tabelle 5: Hämostaseologische Komplikationen unter Argatroban-Therapie**

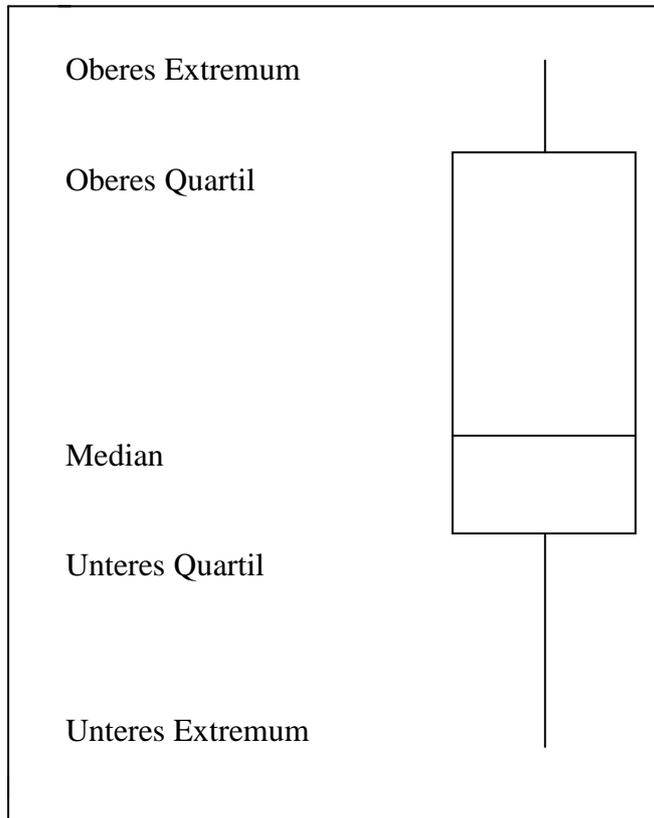
### 3.2. Patienten Fallzahl

Messzeitpunkt	1	2	3	4
Tage nach Beginn der Argatrobantherapie	3	7	14	28
Fallzahl n	22	20	16	14

**Tabelle 6: Patienten Fallzahl**

### 3.3. Argatrobandosierung

Folgende Patientendaten wurden als Boxplots dargestellt:



**Abbildung 5: Legende Boxplot**

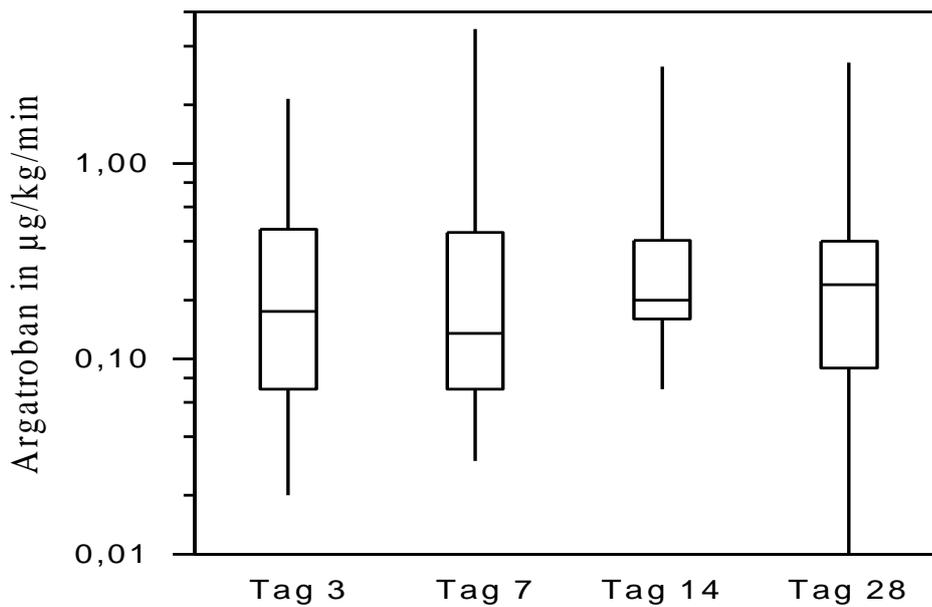


Abbildung 6: Argatroban-Dosierung am Tag 3, 7, 14, 28 nach Therapiebeginn

Messzeitpunkt	Mittelwert	Median	Unteres Quartil	Oberes Quartil	Unteres Extremum	Oberes Extremum
Tag 3	0.33	0.18	0.07	0.47	0.02	2.16
Tag 7	0.59	0.14	0.07	0.45	0.03	4.9
Tag 14	0.56	0.20	0.16	0.42	0.07	3.16
Tag 28	0.55	0.24	0.09	0.41	0.01	3.3
Durchschnitt	0.51	0.19	0.10	0.44	0.03	3.38

Tabelle 7: Argatroban-Dosierung am Tag 3, 7, 14, 28 nach Therapiebeginn

Abbildung 6 zeigt die Dosierung von Argatroban bei den Schwerkranken am 3., 7., 14., und 28. Tag nach Beginn der Therapie.

Am 3. Tag nach Beginn der Therapie mit Argatroban erhielten 22 Patienten das Medikament, am 7. Tag 20 Patienten, am 14. Tag 16 Patienten und am 28. Tag noch 14 Patienten.

Die Dosierung hat sich im Therapieverlauf nicht signifikant geändert.

Zudem ist eine große interindividuelle Streuung der Argatrobadosierungen ersichtlich.

### 3.4. PTT Monitoring

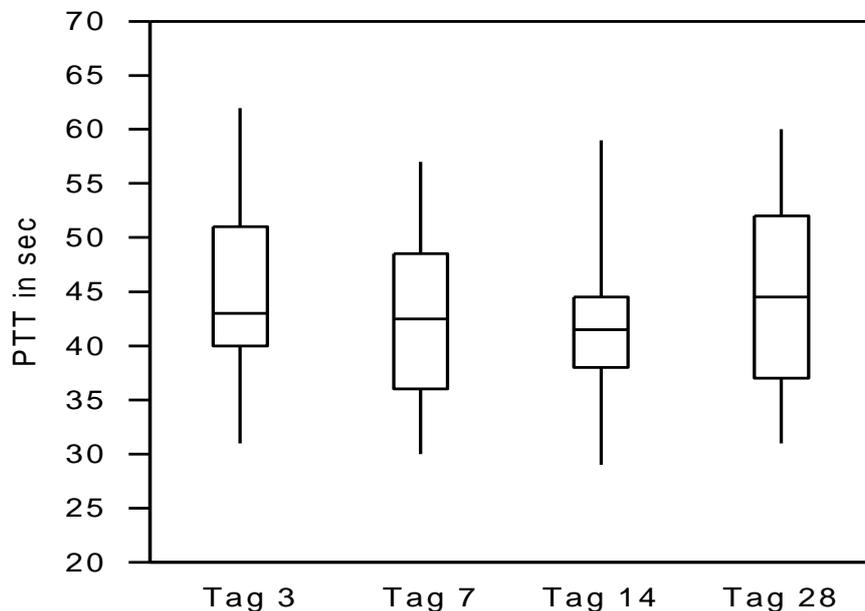
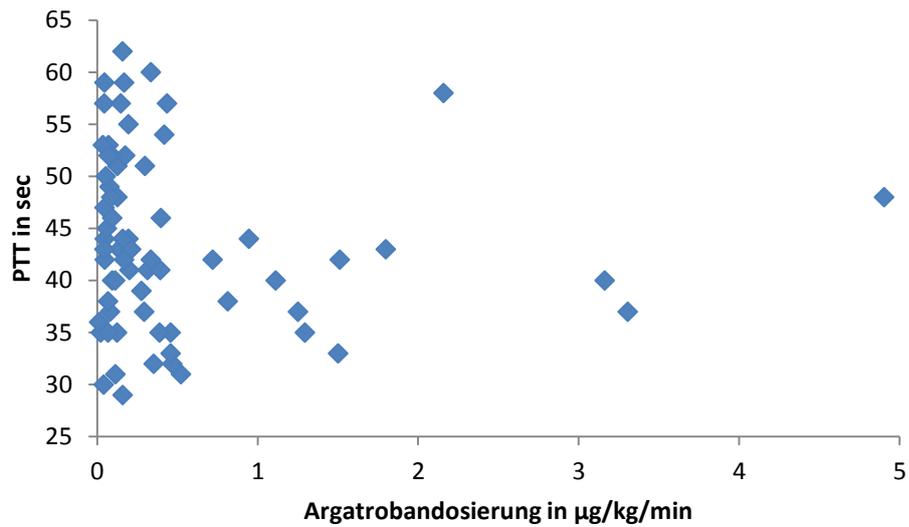


Abbildung 7: PTT in Sekunden am Tag 3, 7, 14 und 28 nach Beginn der Argatrobantherapie

Messzeitpunkt	Mittelwert	Median	Unteres Quartil	Oberes Quartil	Unteres Extremum	Oberes Extremum
Tag 3	44.6	43	40	52	31	62
Tag 7	43.1	42.5	36	48.5	30	57
Tag 14	42	41.5	38	44.5	29	59
Tag 28	44.7	44.5	37	52	31	60

Tabelle 8: PTT in Sekunden am Tag 3, 7, 14 und 28 nach Beginn der Argatrobantherapie

Die PTT Werte unterscheiden sich nicht signifikant zwischen den Messzeitpunkten.



**Abbildung 8: PTT Werte bei entsprechender Argatrobandosierung**

Es konnte keine statistisch aussagekräftige Korrelation zwischen der PTT und der Argatrobandosierung festgestellt werden.

Einige Patienten weisen bereits bei sehr niedrigen Dosierungen hohe PTT-Werte auf. Bei anderen Patienten ist auch bei höherer Argatroban-Dosierung kein PTT-Anstieg zu verzeichnen.

### 3.5. Leberparameter der Intensivpatienten

#### 3.5.1. Quick

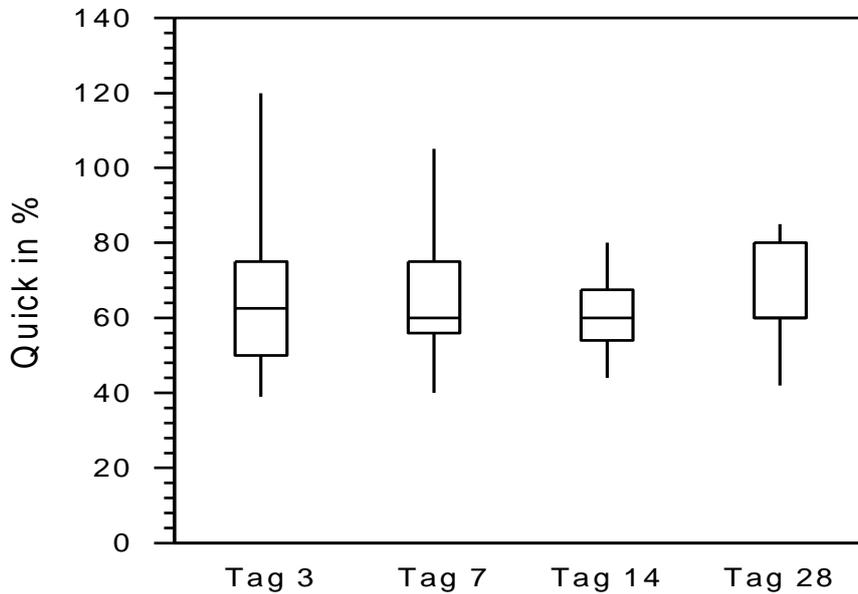


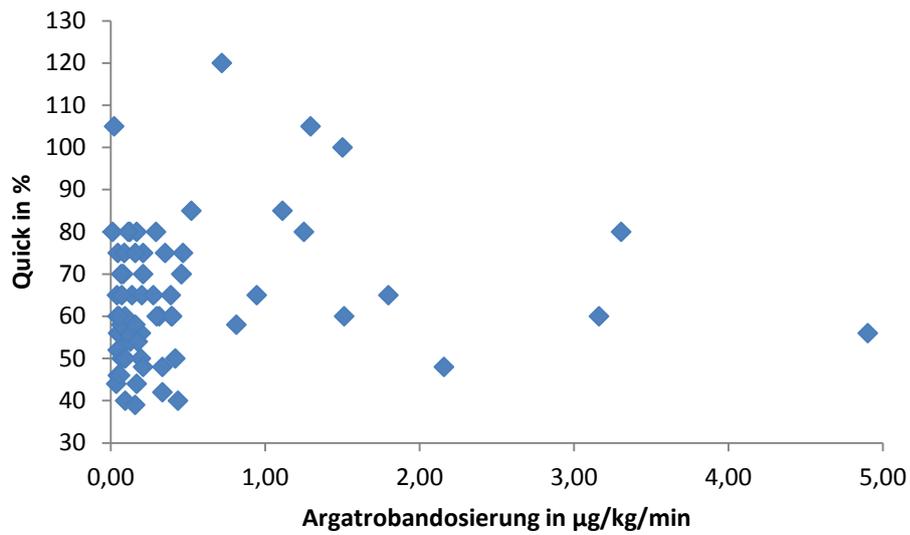
Abbildung 9: Quick in % am Tag 3, 7, 14 und 28 nach Beginn der Argatrobantherapie

Messzeitpunkt	Mittelwert	Median	Unteres Quartil	Oberes Quartil	Unteres Extremum	Oberes Extremum
Tag 3	65	62.5	50	75	39	120
Tag 7	65	60	56	75	40	105
Tag 14	60.5	60	54	67.5	44	80
Tag 28	65	60	60	80	42	85

Tabelle 9: Quick in % am Tag 3, 7, 14 und 28 nach Beginn der Argatrobantherapie

Abbildung 9 zeigt die Quick Werte bei den Schwerkranken am 3., 7., 14., und 28. Tag nach Beginn der Therapie mit Argatroban.

Es bestand keine signifikante Differenz zwischen den Quick-Werten an den vier Messzeitpunkten.



**Abbildung 10: Quick Werte bei entsprechender Argatrobandosierung**

Es konnte keine statistisch aussagekräftige Korrelation zwischen dem Quick und der Argatrobandosierung festgestellt werden.

### 3.5.2. Bilirubin

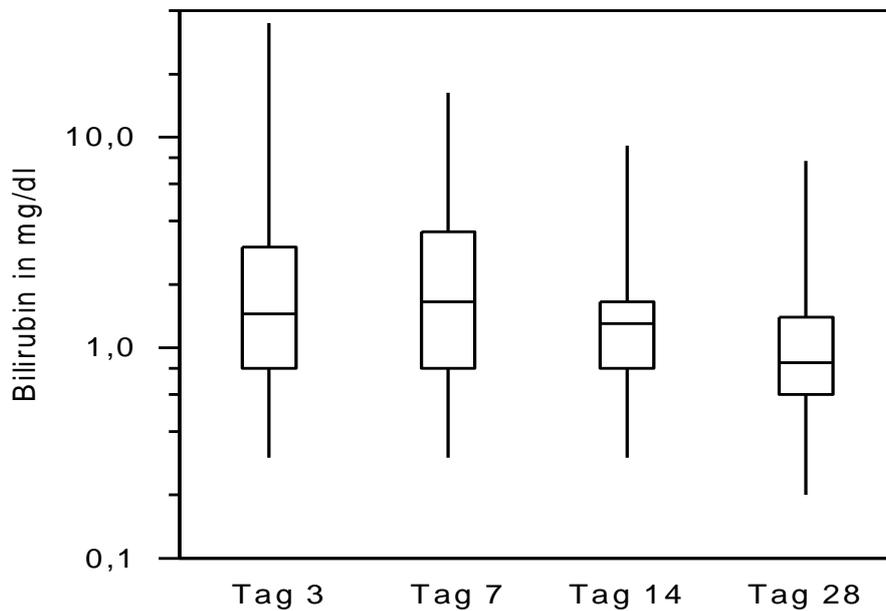
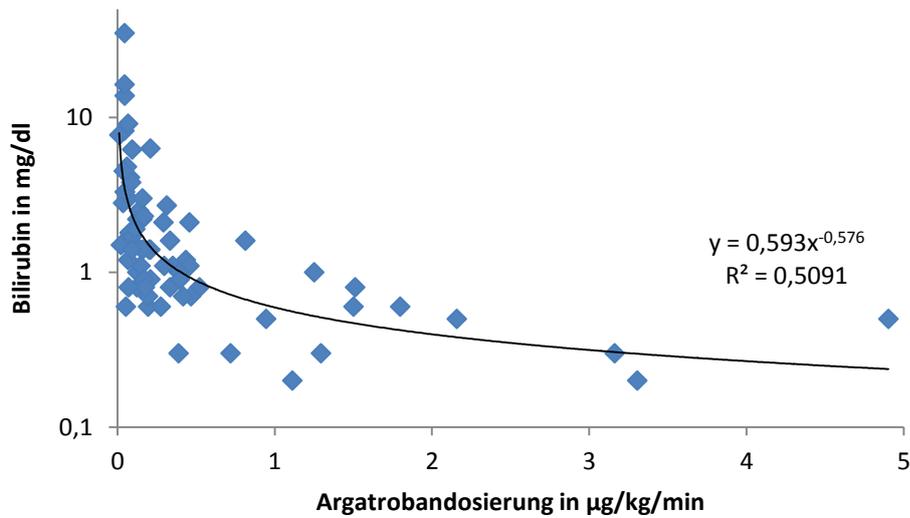


Abbildung 11: Bilirubin in mg/dl am Tag 3, 7, 14 und 28 nach Beginn der Argatrobantherapie

Messzeitpunkt	Mittelwert	Median	Unteres Quartil	Oberes Quartil	Unteres Extremum	Oberes Extremum
Tag 3	4.05	1.45	0.8	3.15	0.3	35
Tag 7	2.75	1.65	0.8	3.55	0.3	16.3
Tag 14	1.8	1.3	0.8	1.7	0.3	9.1
Tag 28	1.75	0.85	0.6	1.45	0.2	7.7

Tabelle 10: Bilirubin in mg/dl am Tag 3, 7, 14 und 28 nach Beginn der Argatrobantherapie

Die Bilirubinwerte der Intensivpatienten haben sich im Therapieverlauf nicht signifikant geändert.



**Abbildung 12: Bilirubin Werte bei entsprechender Argatrobandosierung**

Bilirubinwerte von  $\geq 1.0$  mg/dl waren durchschnittlich mit erheblich reduzierten Argatrobandosierungen von  $0.19 \pm 0.22$   $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$  (Mittelwert  $\pm$  SD) assoziiert. Maximal wurde bei diesen über die Norm erhöhten Bilirubinwerten eine Argatrobandosierung von ca. 1  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$  angewendet.

### 3.5.3. GPT

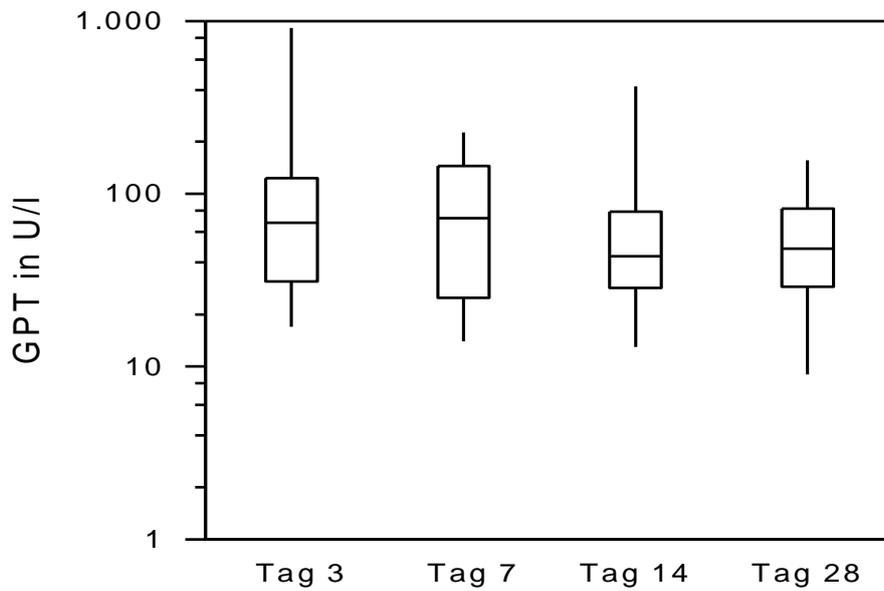


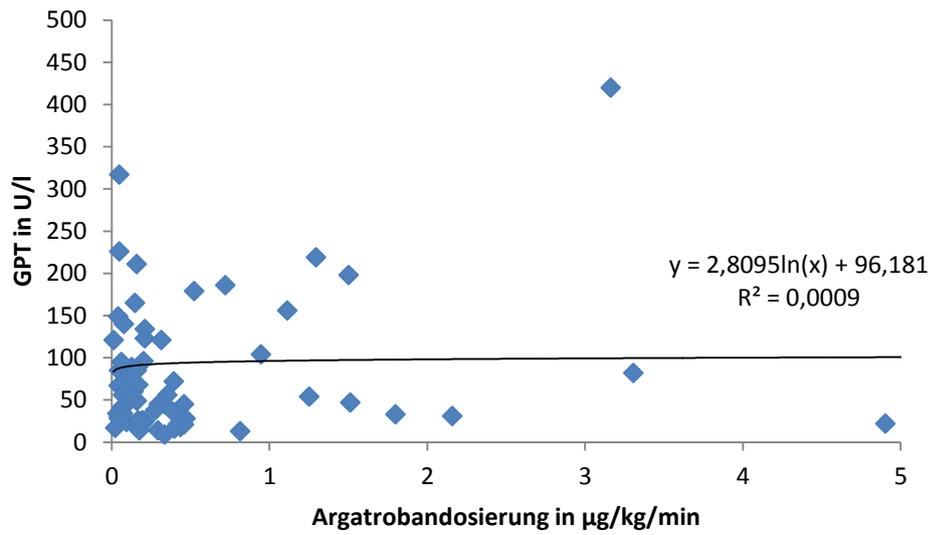
Abbildung 13: GPT in U/l am Tag 3, 7, 14 und 28 nach Beginn der Argatrobantherapie

Messzeitpunkt	Mittelwert	Median	Unteres Quartil	Oberes Quartil	Unteres Extremum	Oberes Extremum
Tag 3	128	68	30.5	120	17	914
Tag 7	89.5	72	25	144.5	14	226
Tag 14	74	43.5	28.5	78.5	13	420
Tag 28	60.5	48	28.5	83	9	156

Tabelle 11: GPT in U/l am Tag 3, 7, 14 und 28 nach Beginn der Argatrobantherapie

Abbildung 13 zeigt die GPT Werte bei den Schwerkranken am 3., 7., 14., und 28. Tag nach Beginn der Therapie mit Argatroban.

Die GPT Werte der Intensivpatienten haben sich im Therapieverlauf nicht signifikant geändert.



**Abbildung 14: GPT Werte bei entsprechender Argatrobandosierung**

Es konnte keine statistisch aussagekräftige Korrelation zwischen der GPT und der Argatrobandosierung festgestellt werden.

### 3.5.4. Alkalische Phosphatase

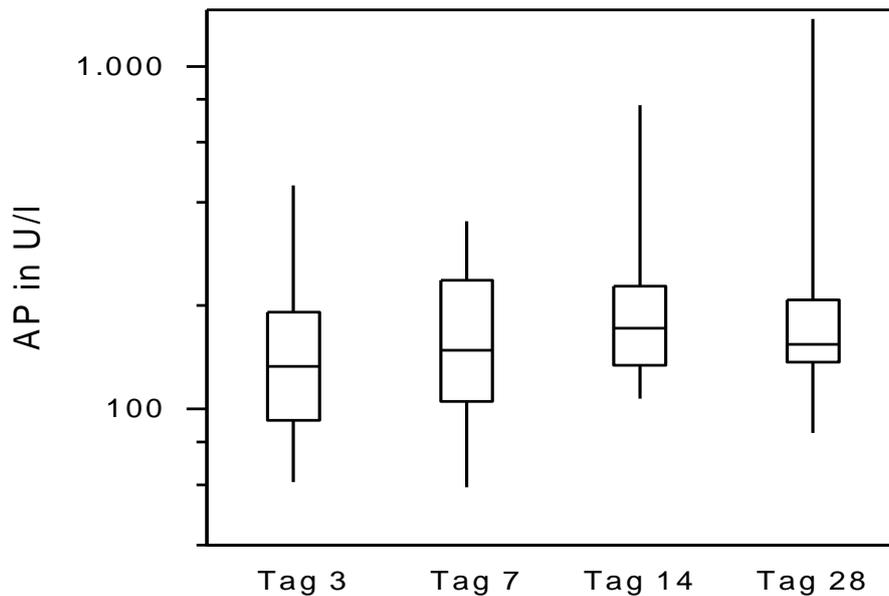


Abbildung 15: AP in U/l am Tag 3, 7, 14 und 28 nach Beginn der Argatrobantherapie

Messzeitpunkt	Mittelwert	Median	Unteres Quartil	Oberes Quartil	Unteres Extremum	Oberes Extremum
Tag 3	169	133	92.5	191.5	61	449
Tag 7	169	148	105	237	59	353
Tag 14	218	172	124	230	107	769
Tag 28	307	154	134	209	85	1377

Tabelle 12: AP in U/l am Tag 3, 7, 14 und 28 nach Beginn der Argatrobantherapie

Abbildung 15 zeigt die AP Werte bei den Schwerkranken am 3., 7., 14., und 28. Tag nach Beginn der Therapie mit Argatroban.

Eine signifikante Differenz der AP zwischen den einzelnen Messzeitpunkten konnte nicht gefunden werden.

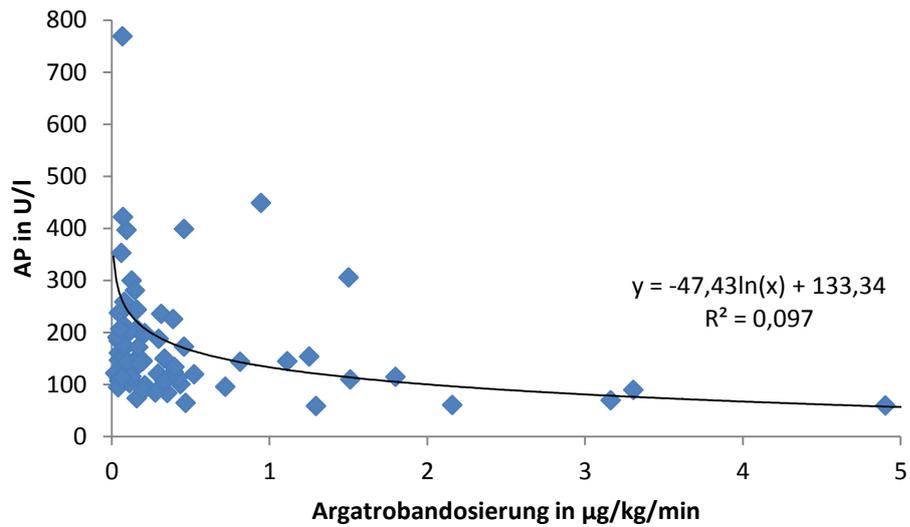


Abbildung 16: AP Werte bei entsprechender Argatrobandosierung

AP-Werte von  $\geq 135$  U/l waren durchschnittlich mit erheblich reduzierten Argatrobandosierungen von  $0.44 \pm 1.11$  µg/kg/min (Mittelwert  $\pm$  SD) assoziiert. Maximal wurde bei diesen über die Norm erhöhten AP-Werten eine Argatrobandosierung von ca. 1.5 µg/kg/min angewendet.

### 3.5.5. Gamma-GT

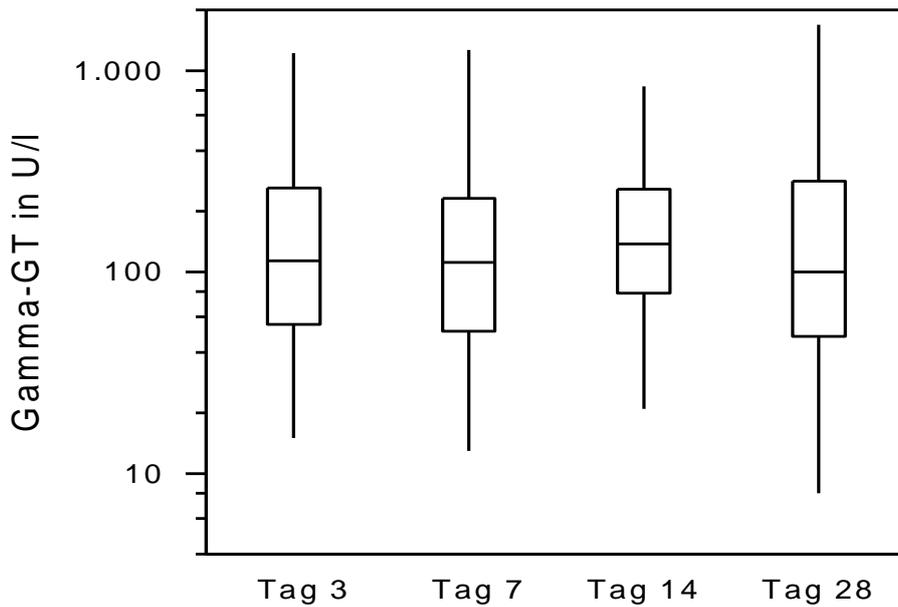


Abbildung 17: Gamma-GT in U/l am Tag 3, 7, 14 und 28 nach Beginn der Argatrobantherapie

Messzeitpunkt	Mittelwert	Median	Unteres Quartil	Oberes Quartil	Unteres Extremum	Oberes Extremum
Tag 3	217	113.5	52.5	277	15	1221
Tag 7	210.5	111.5	51	232	13	1267
Tag 14	225.5	137.5	78.5	257.5	21	837
Tag 28	323	100	48	306	8	1694

Tabelle 13: Gamma-GT in U/l am Tag 3, 7, 14 und 28 nach Beginn der Argatrobantherapie

Abbildung 17 zeigt die Gamma-GT Werte bei den Schwerkranken am 3., 7., 14., und 28. Tag nach Beginn der Therapie mit Argatroban.

Eine signifikante Änderung der Gamma-GT zwischen den einzelnen Messzeitpunkten konnte nicht gefunden werden.

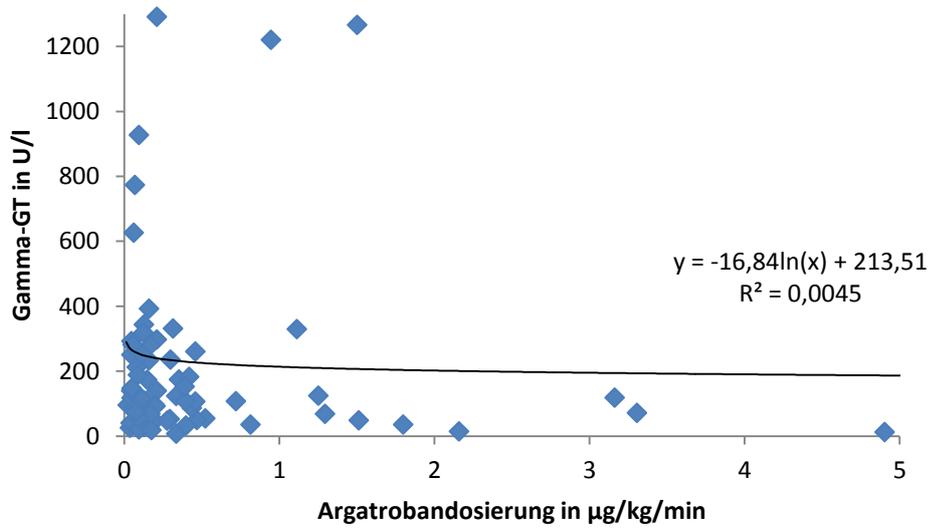


Abbildung 18: Gamma-GT Werte bei entsprechender Argatrobandosierung

Gamma-GT-Werte von  $\geq 130$  U/l waren durchschnittlich mit erheblich reduzierten Argatrobandosierungen von  $0,48 \pm 1,25$  µg/kg/min (Mittelwert  $\pm$  SD) assoziiert. Maximal wurde bei diesen über die Norm erhöhten Gamma-GT-Werten eine Argatrobandosierung von ca. 1,5 µg/kg/min angewendet.

### 3.6. Argatroban Plasmakonzentration

#### 3.6.1. Ermittlung der Argatroban Plasmakonzentration über die PiCT Verdünnungsreihe

Über eine Argatroban-Verdünnungsreihe und Bestimmung der zugehörigen PiCT-Werte wurde indirekt die Argatrobankonzentration im Plasma gemessen.

Die Kalibratoren wurden hergestellt indem gepooltes Humanplasma mit Argatroban versetzt wurde (Verdünnungsstufen von 0 bis 10 µg/ml). Über eine polynomische Funktion im *Microsoft Office Excel* © wurde die folgende Gleichung ermittelt, die als Eichkurve für unsere Bestimmungen der Argatrobankonzentration in den Patientenblutproben diente:

$$y=62,387x^{0,3554}$$

y= PiCT in sec

x= Argatrobankonzentration in µg/ml

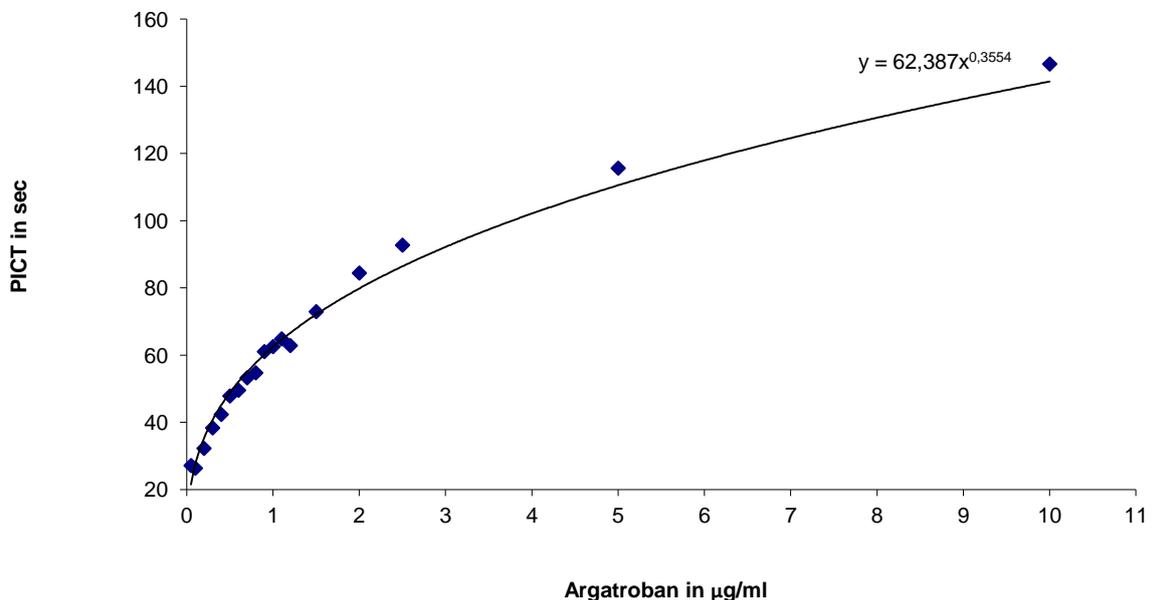


Abbildung 19: PiCT-Dosis-Wirkungskurve

Argatroban in µg/ml	0.05	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9
PiCT in sec	27.1	26.3	32.2	38.3	42.3	47.8	49.5	53.2	54.7	61

Argatroban in µg/ml	1	1.1	1.2	1.5	2	2.5	5	10
PiCT in sec	62.5	64.8	62.8	72.9	84.4	92.7	115.6	146.6

**Tabelle 14: PiCT Dosis-Wirkungskurve, Mittelwerte**

### 3.6.2. Korrelation der Argatroban-Plasmakonzentration mit der Dosierung

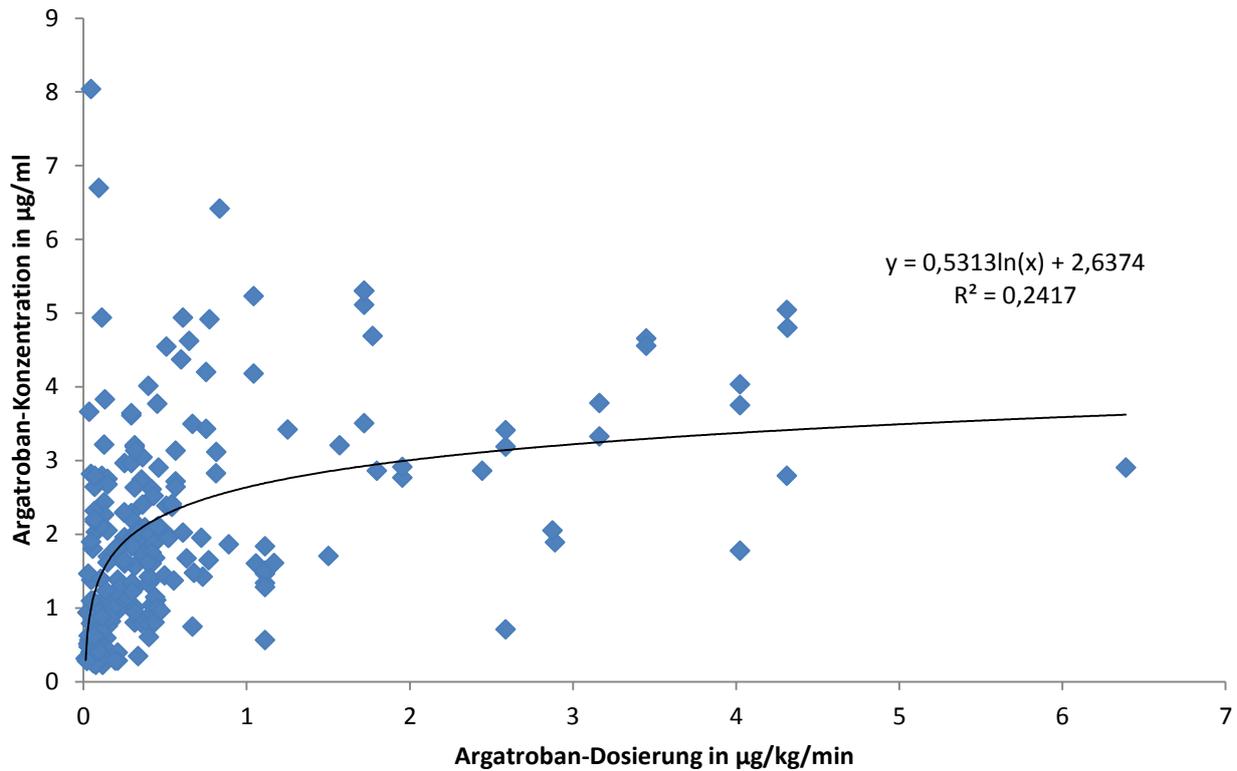


Abbildung 20: Korrelation der Argatrobandosierung /Plasmakonzentration

Abbildung 20 zeigt die Argatroban-Plasmakonzentrationen in Relation zur verabreichten Dosierung. Es bestand keine Korrelation zwischen der Argatrobandosierung und der ermittelten Argatrobanplasmakonzentration.

Bei einigen Patienten ist trotz höherer Dosierung kein Anstieg in der Argatroban-Plasmakonzentration zu verzeichnen. Andere weisen schon bei niedrigen Dosierungen hohe Argatroban-Plasmakonzentrationen auf.

### 3.6.3. Korrelation der Argatroban-Plasmakonzentration mit der PTT

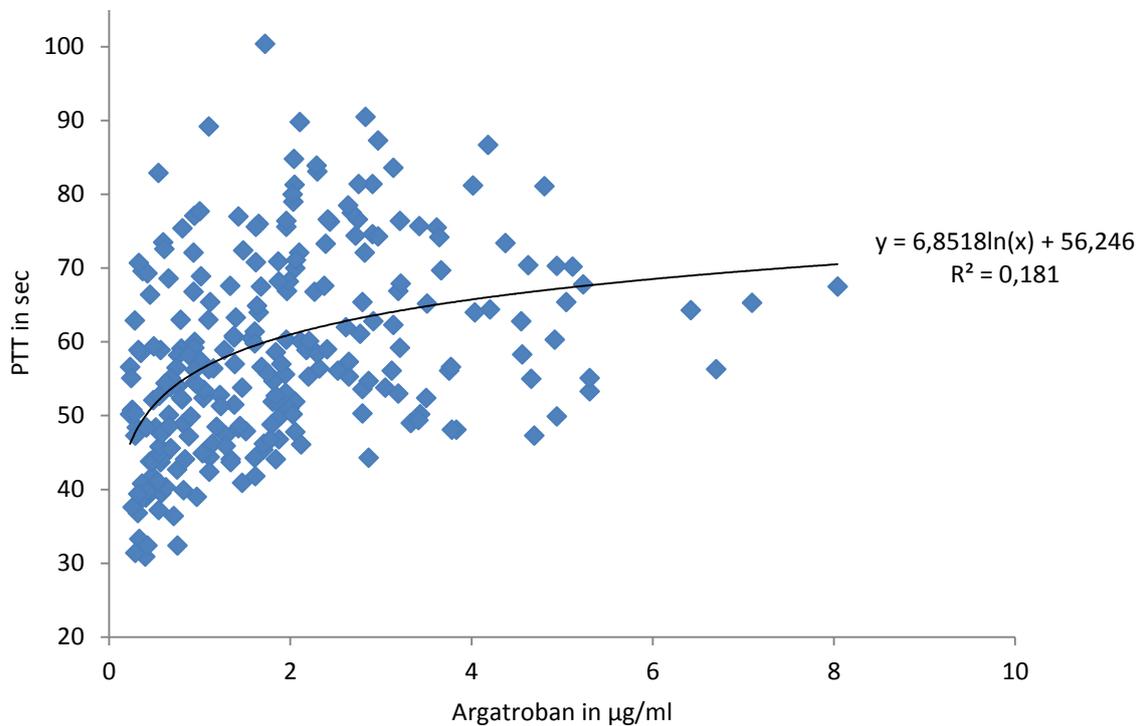


Abbildung 21: Korrelation Argatroban-Plasmakonzentration / PTT

$R^2$ =Bestimmtheitsmaß

Abbildung 21 zeigt die Resultate der Patientenblut-Proben. Die rechnerisch über die PiCT Bestimmung ermittelte Argatroban Konzentration wurde den im Labor gemessenen PTT Werten zugeordnet.

PTT Werte < 40 Sekunden gehen ausnahmslos mit Argatrobanplasmakonzentrationen < 1 µg/ml einher.

Desweiteren sind PTT Werte > 40 Sekunden sowohl mit niedrigen als auch hohen Plasmaspiegeln assoziiert.

Zwischen der PTT und der Argatrobanplasmakonzentration wurde keine Korrelation gefunden.

### 3.6.4. Korrelation der PTT mit der PiCT

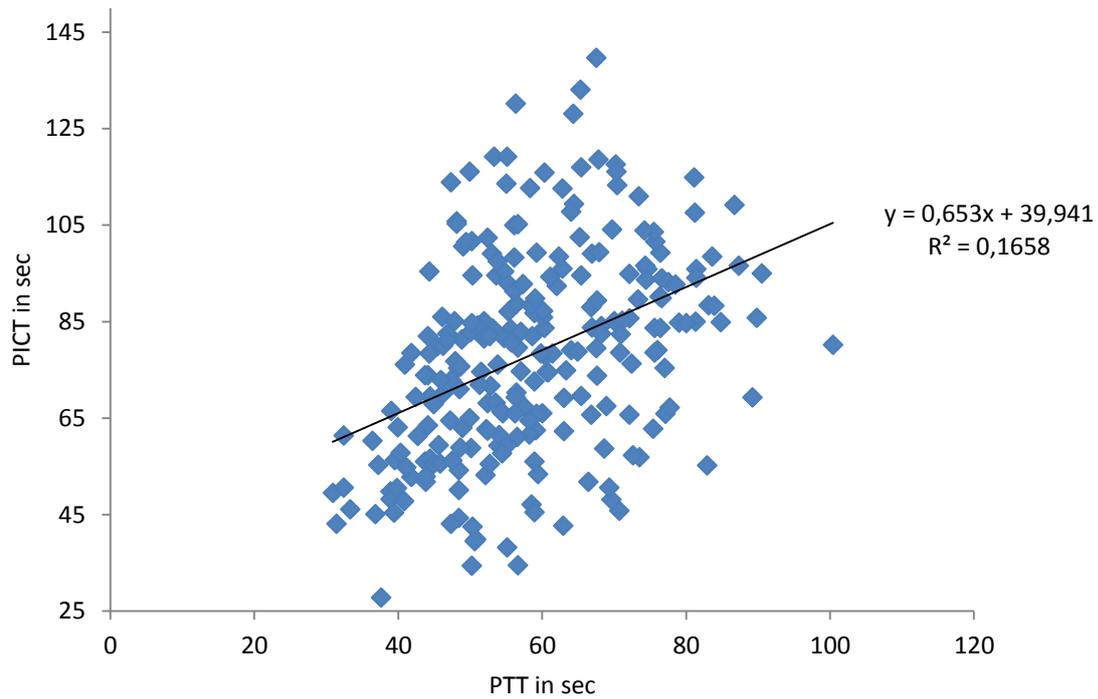


Abbildung 22: Korrelation PTT/PiCT

$R^2$ =Bestimmtheitsmaß

Abbildung 22 zeigt die Resultate der Patientenblut-Proben. Die gemessenen PiCT Werte wurden gegen die PTT Werte aufgetragen.

Analog zur Korrelation der PTT und der Plasmakonzentration, wurden bei PTT Werten < 40 Sekunden nur PiCT Werte < 65 Sekunden gemessen.

### 3.6.5. Korrelation der Argatroban-Plasmakonzentration mit Bilirubin

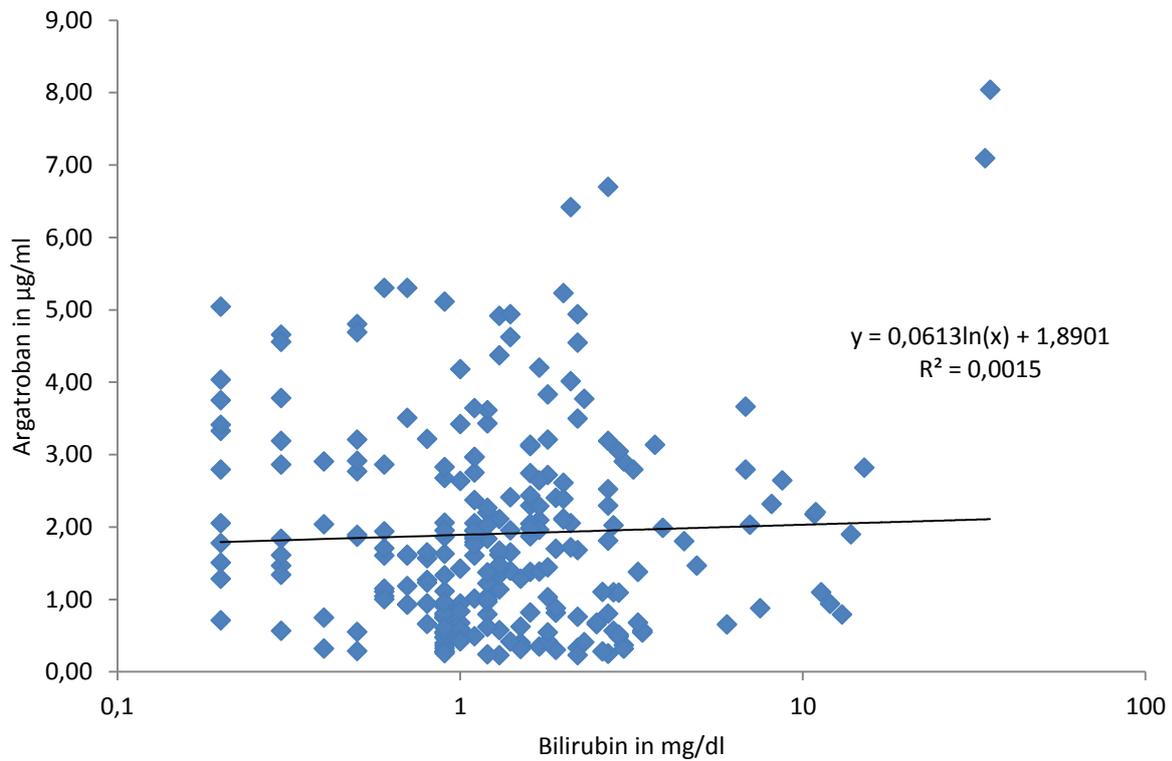


Abbildung 23: Korrelation der Argatroban-Plasmakonzentration / Bilirubin

Abbildung 23 zeigt die Resultate der Patientenblut-Proben. Die rechnerisch ermittelte Argatroban Konzentration wurde den im Labor gemessenen Bilirubin Werten zugeordnet.

Es konnte keine Korrelation zwischen den Bilirubin-Werten und der Argatrobanplasmakonzentration festgestellt werden.

3.7. ACT Ergebnisse der Argatroban Verdünnungsreihe der Vollblutproben von Intensivpatienten und Kalibrationsplasma

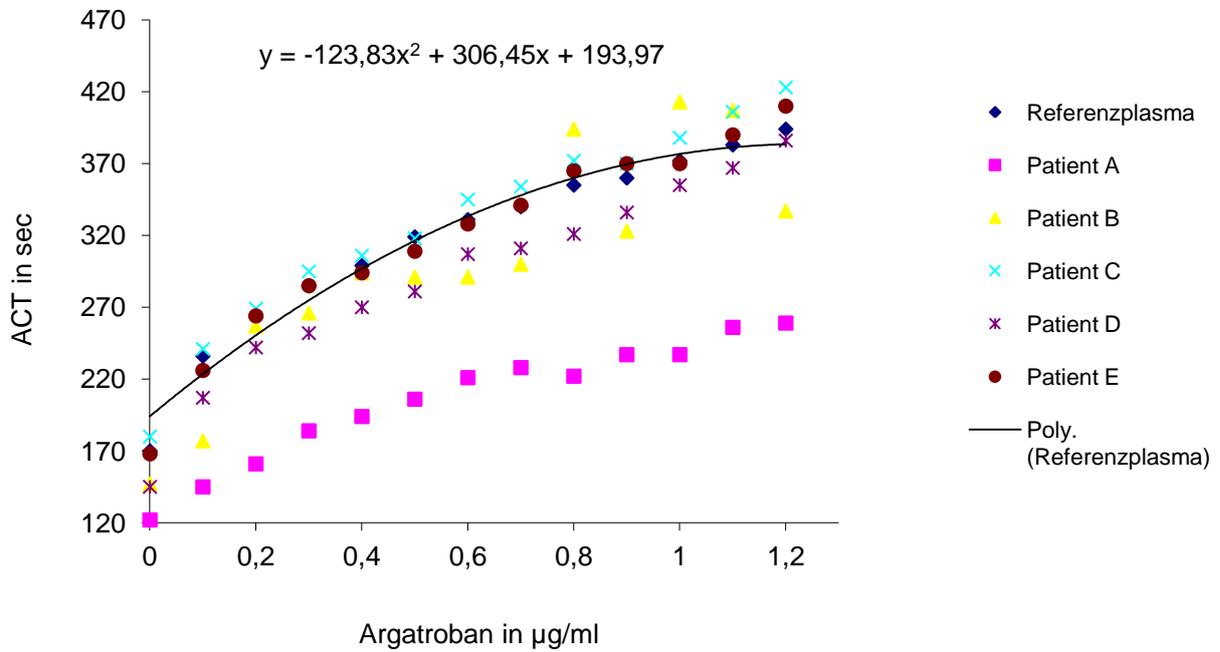


Abbildung 24: ACT- Dosis-Wirkungskurve

Alle fünf Patienten zeichneten sich durch eine deutlich eingeschränkte Leberfunktion mit Bilirubin Werten  $\geq 1.4$  mg/dl aus.

Die Trendlinie repräsentiert eine polynome Funktion der Mittelwerte des Referenzplasmas mit  $y = -123,83x^2 + 306,45x + 193,97$ .

Argatroban in µg/ml	Referenzplasma	Patient A	Patient B	Patient C	Patient D	Patient E
0	170	122	147	180	145	168
0,1	236	145	177	241	207	226
0,2	263	161	257	269	242	264
0,3	285	184	266	295	252	285
0,4	299	194	294	306	270	294
0,5	319	206	291	318	281	309
0,6	331	221	291	345	307	328
0,7	340	228	300	354	311	341
0,8	355	222	394	372	321	365
0,9	360	237	323	370	336	370
1	372	237	413	388	355	370
1,1	383	256	407	406	367	390
1,2	394	259	337	423	386	410

**Tabelle 15: ACT- Dosis-Wirkungskurve, Mittelwerte**

Abbildung 24 zeigt die Resultate der ACT-Messungen.

Die ACT Werte aller fünf Patienten steigen in gleicher Weise an wie die Werte des Referenzplasmas. Je nach Ausgangswert erreichen die ACT Messwerte unterschiedliche Maxima. Der ACT Bereich des Referenzplasmas war der Gleiche wie der schwerstkranker Patienten.

## 4. Diskussion

### 4.1. Anmerkungen zur Patienten Fallzahl

In dem von dieser Studie untersuchten Zeitraum von 28 Tagen ab Beginn der Argatrobantherapie ist eine Abnahme der Patienten-Fallzahl von Tag 3 (n=22) bis Tag 28 (n=14) zu verzeichnen. Dies war bedingt entweder durch die Verlegung der Patienten oder das Umstellen der intravenösen Argatrobantherapie auf eine orale Antikoagulation mit Phenprocoumon.

### 4.2. Argatroban-Dosierung allgemein

Die vorliegende Studie zeigt, dass bei schwerstkranken Intensivpatienten im Vergleich zur üblichen vom Hersteller empfohlenen Dosierung von 2 µg/kg/min eine deutliche – im Durchschnitt um den Faktor -10 - verminderte Argatrobandosierung notwendig ist, um die Ziel-PTT von 40 bis 45 Sekunden zu erreichen.

Über eine notwendige Dosisanpassung bei Schwerstkranken wurde bereits in anderen Arbeiten, wie in den Fallberichten von Bengelman et al und Smythe et al, berichtet. Zwar wurde Argatroban in einer niedrigeren Dosierung als in der Fachinformation angegeben verabreicht, jedoch lag die Dosierung von 1.14 µg/kg/min bzw. 0.82 µg/kg/min (Mittelwerte) noch deutlich über der von uns verabreichten Dosierung von 0,21 µg/kg/min [13, 14]. Als mögliche Ursache für die niedrigeren, in unserer Studie verabreichten Dosierungen, ist das von uns untersuchte Intensivpatientenkollektiv durch besonders schwere Krankheitsverläufe mit Einzel- oder Multiorganversagen gekennzeichnet. Beiderlinden et al stellten –ähnlich zu unserem Studienergebnis- 2007 fest, dass bei schwerkranken Patienten mit Multiorgan dysfunktion und HIT eine zehnfach niedrigere Anfangsdosis ausreichend und sicher ist [15].

Desweiteren konnten Bengelman et al in ihrer Untersuchung bei Schwerstkranken auf der Intensivstation nachweisen, dass die Argatroban Dosierung umso niedriger ist, je mehr Organsysteme kritisch beeinträchtigt sind [13]. Das untersuchte Patientenkollektiv unserer Studie weist ebenfalls schwerste, teilweise multiple, Organdysfunktionen auf. So wurden 54.5% der Patienten aufgrund einer durchgeführten Transplantation, 27.3% wegen eines ARDS und jeweils 9.1% wegen allgemeinen postoperativen Komplikationen und anderen lebensbedrohlichen Zuständen auf die Intensivstation aufgenommen.

Insbesondere waren dies Patienten mit kardiovaskulärer Instabilität, Inflammationsreaktionen, Sepsis und klinisch mehr oder weniger fassbarer Leberinsuffizienz. Zudem waren überwiegend die pulmonale und die renale Funktion beeinträchtigt.

Im Rahmen dieser schweren Erkrankungen verstarben 22.7% der Patienten, jedoch keiner innerhalb des von uns untersuchten Zeitraums von 28 Tagen ab Beginn der Argatrobantherapie.

Bedingt durch die oben genannten Organinsuffizienzen sind eine Reihe von Veränderungen denkbar, die sowohl die Pharmakokinetik, als auch die Pharmakodynamik von Argatroban bei Schwerstkranken beeinflussen können.

So können hier zum Beispiel die Akkumulation von Metaboliten bestimmter Medikamente oder die Interaktion der vielfach auf der Intensivstation verabreichten Medikamente, wie Antibiotika oder Immunsuppressiva eine Rolle spielen.

#### 4.3. Argatrobandosierung und Leberfunktion

Argatroban wird primär in der Leber metabolisiert, daher ist eine Anpassung der Dosierung bei Leberfunktionsstörungen die logische Konsequenz.

Laut Herstellerinformation ist bei Patienten mit eingeschränkter Leberfunktion eine deutliche Reduzierung der Argatrobandosierung notwendig, da bei diesen Patienten die Pharmakokinetik verändert, also die Clearance von Argatroban vermindert und seine Eliminationshalbwertszeit verlängert, ist. Bei einer mäßigen Leberfunktionsstörung (Child-Pugh-Score Class B) wird eine Dosierung von 0.5 µg/kg/min empfohlen [4].

Unsere Studie zeigt jedoch ganz klar für schwerstkranken Intensivpatienten bereits auch ohne erkennbare Leberfunktionsstörung eine ähnlich niedrige Dosierung wie in der Fachinformation für Patienten mit eingeschränkter Leberfunktion angegeben.

Erhöhte Leberwerte – insbesondere Bilirubinwerte von  $\geq 1.0$  mg/dl - waren bei unseren Patienten darüber hinaus mit sehr niedrigen Argatrobandosierungen assoziiert. Bei erhöhten Bilirubinwerten über 1.0 mg/dl war lediglich  $0.19 \pm 0.22$  µg/kg/min (Mittelwert  $\pm$  SD) erforderlich, was einer weiteren Dosisreduktion, im Durchschnitt um den Faktor 2-3 gegenüber der entsprechenden Empfehlung in der Fachinformation, entspricht.

Ein Ziel unserer Arbeit war es, unter anderem aufgrund der hepatischen Metabolisierung von Argatroban nach einem Leberparameter zu suchen, der in der Klinik dabei hilft, das Ausmaß der Dosisreduktion abschätzen zu können. Anhand der untersuchten Routinelaborparameter Bilirubin, Quick, GPT, Gamma-GT und der Alkalischen Phosphatase war die Vorhersage der absoluten Argatrobandosierung nicht möglich. Es konnte jedoch eindeutig gezeigt werden, dass bei einer Erhöhung der Cholestaseparameter (Bilirubin, AP und Gamma-GT) über den Normwertebereich hinaus bei unseren Intensivpatienten eine Argatrobandosierung von 0.5 µg/kg/min praktisch nie überschritten wurde um den Ziel-aPTT Bereich zu erreichen. Im Mittel waren bei diesen Patienten sogar deutlich niedrigere Dosierungen erforderlich.

Somit ist in der Klinik bei schwerkranken Intensivpatienten ab einem erhöhten Bilirubinwert ( $\geq 1$  mg/dl) und bei erhöhter AP und/oder Gamma-GT eine erhebliche Dosisreduktion und eine individuelle Dosisanpassung notwendig.

Unsere Studienergebnisse zeigen, neben einer allgemeinen Reduzierung der notwendigen Argatrobandosierung, zusätzlich eine starke Schwankung der interindividuellen Dosierung von Patient zu Patient auf.

In der Studie von Levine et al. wurde bei Patienten mit einer Leberfunktionsstörung ebenfalls von einer Dosisreduktion berichtet. Ab einem Bilirubinwert von  $>1.5$ mg/dl verabreichten sie ihren Patienten Argatroban mit  $0.8 \pm 0.6$  µg/kg/min [16]. Die in dieser Studie untersuchten Patienten zeichneten sich jedoch durch weniger komplexe Krankheitsbilder aus als die Patienten unserer Studie.

Schwerstkranke sind häufig von Leberdysfunktionen betroffen. Eine Vielzahl Plasmaproteine, und somit für die Blutgerinnung wichtige Faktoren, werden zum größten Teil in der Leber synthetisiert. Eine Leberzellschädigung geht somit mit einer verminderten Synthese und Bildung abnormer Gerinnungsproteine, einem gesteigerten Verbrauch von Gerinnungsfaktoren und einer gestörten Clearance von zirkulierenden Aktivierungsprodukten einher. Das Ausmaß der Gerinnungsstörung ist abhängig vom Schweregrad der gestörten Zellfunktion und von der Ätiologie der Hepatopathie [17]. Hier spielt insbesondere eine systemische Inflammationsreaktion eine wichtige Rolle.

Eine Inflammationsreaktion bzw. Sepsis beeinflusst die Blutgerinnung ebenfalls maßgeblich. Einerseits wird durch die akute Phase Reaktion die Bildung von akute Phase Proteinen gefördert,

u.a. Fibrinogen und Plasminogen, und andererseits die Serumkonzentration anderer Proteine erniedrigt (Anti-akute Phase Proteine), beispielsweise Antithrombin. Diese Veränderungen der Plasmaprotein Zusammensetzung allein können schon das sensible Gleichgewicht der Blutgerinnung empfindlich stören.

Aktuelle Studien bestätigen das enge Zusammenspiel zwischen dem Immunsystem und der Blutgerinnung. Die Gerinnungskaskade wird durch Immunzellen und bestimmte pro-entzündliche Botenstoffe beeinflusst. Auf der anderen Seite führen Faktoren der Blutgerinnung zu einer Entzündungsantwort.

Bei Patienten mit Sepsis bestehen meist eine Gerinnungsaktivierung mit intravasaler Fibrinbildung und gleichzeitig eine Verminderung des Fibrinabbaus. Ein vermindertes Hämostase- und Inhibitorpotenzial kann zu Blutungen im Rahmen einer Verbrauchskoagulopathie führen. Der Mangel an Gerinnungsfaktoren- und Inhibitoren ist einerseits durch den Verbrauch der Faktoren bedingt, von Bedeutung sind aber auch Plasmaverlust und eine eingeschränkte Leberfunktion. Die bisherigen Erkenntnisse deuten darauf hin, dass für die Verbindung von Immunsystem und Blutgerinnung die Tissue Factor-vermittelte Thrombingenerierung, Antithrombin und aktiviertes Protein C (APC) eine Schlüsselrolle spielen [18, 19].

Auslöser der Gerinnungsaktivierung ist meist die durch Interleukin-6 induzierte Expression des Tissue Factors auf aktivierten mononukleären und endothelialen Zellen. Die daraus folgende Thrombinbildung stimuliert die Thrombozytenaktivierung. Tissue Factor wird auch in den Thrombozyten selbst gespeichert und bei Bedarf freigesetzt.

Zudem ist bei Patienten mit Sepsis das Protein C System auf verschiedensten Ebenen gestört. Normalerweise fördert aktiviertes Protein C (APC) die Fibrinolyse und inhibiert die Entzündungsreaktion und die Blutgerinnung.

Bei einer systemischen Inflammation ist einerseits die Plasmakonzentration des Zymogens des Protein C sehr erniedrigt. Dies ist durch die gestörte Synthese, den Verbrauch und durch den Abbau von proteolytischen Enzymen, wie die neutrophile Elastase, bedingt.

Weiterhin führt eine signifikante Downregulation von Thrombomodulin zu einer verminderten Protein C Aktivierung. Niedrige Plasmakonzentrationen von freiem Protein S, als Kofaktor des Protein C, führen ebenfalls zu einer Störung des Protein C Systems. Zuletzt ist bei Sepsis der APC Rezeptor herunter reguliert, was sich ebenfalls negativ auf das APC System auswirkt.

Neben diesen Effekten kann bei Sepsis eine Resistenz gegenüber APC auftreten. Zum Teil wird die Resistenz durch einen starken Anstieg der Faktor VIII Plasmakonzentration erklärt, aber es spielen auch andere, bisher unbekannte Mechanismen, eine Rolle [18, 19].

Die anti-inflammatorische Eigenschaften des Antithrombins (AT) scheinen laut den neusten Studien unabhängig von der antikoagulatorischen Aktivität zu bestehen. Am bedeutsamsten scheint hierbei die Freisetzung von Prostacyclinen aus Endothelzellen durch das AT zu sein. Prostacyclin inhibiert die Thrombozytenaktivierung und deren Aggregation. Desweiteren hemmt Prostacyclin unter anderem die Bindung Neutrophiler an die Blutgefäße und vermindert die Produktion verschiedenster Cytokine und Chemokine [18, 19].

Diese Erkenntnisse legen nahe, dass verschiedenste Faktoren bei der Dosisreduktion von Argatroban bei Intensivpatienten eine Rolle spielen.

#### 4.4. Patienten und hämostaseologische Komplikationen

Eine wichtige mögliche Nebenwirkung der Therapie mit Argatroban ist eine überschießende oder eine ineffektive Antikoagulation. Gerade beim Einsatz extrakorporaler Verfahren auf der Intensivstation, beispielsweise zum Lungen- oder Nierenersatz, kann es hierbei zu schwerwiegenden Komplikationen kommen.

Bei dem von uns untersuchten Patientenkollektiv sind bei insgesamt 4 von 22 Patienten (18%) Komplikationen im Sinne von Blutungen (3 Patienten, 13%) oder thrombembolischen Ereignissen (2 Patienten, 9%) aufgetreten<sup>3</sup>.

Ähnliche Ergebnisse konnten auch Bengelman et al 2008 nachweisen [13]. Sie untersuchten 65 erwachsene Intensivpatienten und berichteten bei 13,8% über eine Blutung und bei 16,9% über eine thrombembolische Komplikation.

2009 beschrieben auch Smythe et al Komplikationen bei der Argatrobantherapie bei 38 Schwerstkranken. Bei 11% der Patienten wurden Blutungen und bei 16% thrombembolische Komplikationen beobachtet [14].

Beide Studien verabreichten den Patienten ebenfalls deutlich reduzierte Argatroban-Dosierungen. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie unterscheiden sich somit nicht signifikant von den Daten der beiden anderen Studien.

Daraus lässt sich schließen, dass die reduzierten Argatrobandosierungen unseres Patientenkollektivs zu keiner signifikant veränderten Komplikationsrate geführt haben.

---

<sup>3</sup> Ein Patient erlitt sowohl eine Blutung als auch eine thrombembolische Komplikation.

#### 4.5. PTT Monitoring

Die Therapie mit Argatroban wird laut Hersteller mit der PTT gesteuert und überwacht.

Die von uns untersuchten Intensivpatienten wiesen starke interindividuelle Schwankungen in den gemessenen PTT Werten auf, die nicht sicher spezifiziert werden konnten.

Es ist davon auszugehen, dass pharmakokinetische Einflüsse eine entscheidende Rolle spielen, wie beispielsweise Organdysfunktionen, Sepsis oder Co-Medikationen.

Das Monitoring mit der PTT im Allgemeinen stellt einige Schwierigkeiten dar, da die PTT leicht dem Einfluss von Störgrößen unterliegt.

Die Hauptkritikpunkte an diesem Verfahren sind zum einen die schlechte Linearität und Reliabilität durch die Abhängigkeit von zahlreichen Faktoren des Gerinnungssystems.

Bei diesem Testverfahren wird das Gerinnungssystem auf einer hohen Stufe aktiviert, die Faktoren XII, VIII, V und II, sowie das gesamte intrinsische System spielen hier eine wichtige Rolle. Somit stellt die PTT als Globaltest wenig spezifisch die Einflüsse von direkten Thrombin Inhibitoren auf das Gerinnungssystem dar.

Zum anderen weist die PTT eine starke Variabilität bei Verwendung unterschiedlicher Testinstrumente, Reagenzien und auch verschiedener Chargen des gleichen Reagens auf [20].

Diese Zusammenhänge können bei gleicher Medikamentendosierung für die starken interindividuellen Schwankungen bei der PTT mitverantwortlich sein.

Zudem konnten wir in unserer Untersuchung beobachten, dass ein Teil der Patienten auch ohne jegliche Antikoagulation (beispielweise vor einem bevorstehenden Eingriff) eine spontan verlängerte PTT aufwies.

Eine Ursache hierfür könnten niedrige Prothrombin Werte sein, die beispielsweise mit einer disseminierten intravasalen Gerinnung oder einer eingeschränkten Leberfunktion assoziiert sind [21].

Bei diesen Patienten ist die PTT somit nicht das Verfahren der Wahl zum Monitoring der Argatrobantherapie.

#### 4.6. Korrelationen der Argatroban-Plasmakonzentration mit der Dosierung, Bilirubin und PTT

Laut Herstellerinformation ist bei Argatrobanplasmakonzentrationen ab 1 µg/ml ein Plateau in der PTT Kurve zu beobachten. Somit stellt die PTT in diesen Bereichen ebenfalls kein adäquates Monitoringverfahren dar.

Siegmund et al. beschrieben 2008 bei der Überwachung der Argatrobantherapie mit der PTT ebenfalls nach einem zunächst linearen Anstieg einen Plateau Effekt. Sie zeigten unter anderem, dass Patienten mit einer Leberdysfunktion einen ähnlichen Kurvenverlauf aufzeigen, nur mit allgemein erhöhten Werten [22].

In unserer Arbeit wurde ebenfalls die Korrelation zwischen der Argatrobanplasmakonzentration und der PTT untersucht. Unter der Annahme, dass die aus der PICT Eichkurve berechneten Plasmaspiegel denen Schwerstkranker entsprechen, bestand keine Korrelation. Die von Siegmund et al. beschriebene Kurve gilt somit nicht für die Patienten dieser Studie.

Dies zeigt einerseits, dass die PTT bei den Patienten bereits intrinsisch variabel ist, also die Variabilität nicht durch Argatroban bedingt ist. Es ist davon auszugehen, dass verschiedene pharmakokinetische Einflüsse, wie Organdysfunktionen, Sepsis oder Co-Medikationen, und spontane PTT Veränderungen (s.o.) hierfür verantwortlich sind.

Weiterhin bedeutet dies, dass Argatroban im untersuchten Patientenkollektiv unter dem Monitoring mit der PTT nicht unbemerkt kumuliert.

Desweiteren zeigte unsere Studie auch keine Korrelation zwischen der Argatrobanplasmakonzentration und der Dosierung. Durch die hepatische Metabolisierung von Argatroban entstehen bei gleicher Dosierung abhängig von der Leberfunktion eines jeden Patienten unterschiedliche Plasmakonzentrationen.

Die fehlende Korrelation zwischen der Argatrobanplasmakonzentration und dem Gesamt-Bilirubin beweist, dass auch bei schlechter Leberfunktion mit hohen Bilirubin-Werten eine Steuerung der Argatrobantherapie gut möglich war.

Um den Zusammenhang zwischen Argatrobanplasmakonzentration und diversen Laborparametern näher zu untersuchen sind weitere Studien, gegebenenfalls mit direkter Messung des Argatrobanplasmaspiegels, erforderlich.

#### 4.7. ACT

Unsere Studie untersuchte die ACT als geeignetes Messverfahren für das Monitoring der Argatrobantherapie.

In der Argatrobanverdünnungsreihe (0 bis 1.2 µg/ml) ließ sich bei Messung der ACT bei den verschiedenen Konzentrationen, nach einem zunächst fast linearen Anstieg der Kurve, ab einer Konzentration von 0.8 µg/ml ein eher abgeflachter Verlauf verzeichnen.

Für die Praxis bedeutet dies, dass eine ACT Bestimmung ab einer Argatrobanplasmakonzentration von 0.8 µg/ml keine verwertbare Information mehr liefert.

Iqbal et al. kamen in ihrer Studie ebenfalls zu dem Ergebnis, dass der Effekt der Argatrobankonzentration bei geringeren Dosierungen (< 2 µg/ml) durch die ACT sensitiver dargestellt wird als bei höheren Dosierungen. Die am Vollblut gesunder Probanden durchgeführte ACT Messung erfolgte in einem Argatroban-Plasmakonzentrationsbereich von 0 bis 10 µg/ml [23].

In unserer Studie war der Verlauf der ACT Kurven der Intensivpatienten und der des Referenzplasmas ähnlich. Je nach Ausgangswert erreichten die Kurven ihr jeweiliges individuelles Maximum.

Dies zeigt, dass der Gerinnungsstatus jedes Patienten mit den individuellen pharmakokinetischen und –dynamischen Einflüssen die Basis des ACT Anstiegs darstellt.

In einer Studie von Hursting et al. wurde unter anderem die ACT gesunder Probanden mit der von Patienten mit Leberfunktionsstörungen miteinander verglichen. Sie fanden heraus, dass die ACT Werte beider Gruppen in gleicher Weise anstiegen. Die Patienten mit der Leberfunktionsstörung jedoch wiesen im Allgemeinen höhere Werte auf als die gesunden Probanden [10].

Somit lässt sich die ACT in der Klinik nicht absolut bewerten, vielmehr stellt sie einen für jeden Patienten individuellen Verlaufsparemeter dar, der bei niedrigen Plasmakonzentrationen am sensitivsten ist.

#### 4.8. PiCT

Das Monitoring der Therapie direkter Thrombin Inhibitoren durch die PiCT wurde bereits in anderen Studien untersucht [20, 24].

In unserer Studie wurde bei einer Argatrobanverdünnungsreihe (Konzentrationen von 0.05 µg/ml bis 10 µg/ml) die PiCT bestimmt. Die Ergebnisse konnten bis zu einer Konzentration von 5 µg/ml eine gute Linearität nachweisen und verzeichneten im weiteren Verlauf der Kurve eine Abflachung.

Die Argatrobantherapie mit der PiCT wurde von Fenyvesi et al ebenfalls in einer in vitro Verdünnungsreihe untersucht. Sie kamen zu dem Ergebnis, dass die PiCT Kurve zunächst steil anstieg und dann über einen weiten Bereich einen linearen Zusammenhang zeigte. Der hierbei untersuchte Argatrobanplasmakonzentrations-Bereich erstreckte sich jedoch nur bis zu 3 µg/ml. Basierend auf einem Normalwertbereich von etwa 30 Sekunden bei Gesunden, sprachen sie die Empfehlung aus, für das Erreichen des therapeutischen Bereichs PiCT Werte zwischen 60 und 105 Sekunden anzustreben [20].

Die von uns gemessene PiCT wies somit einen ähnlichen Kurvenverlauf mit insgesamt niedrigeren Werten auf. Unsere Studie schloss allerdings im Vergleich zum Patientengut von Fenyvesi et al nur Schwerstkranke ein, die multiplen pharmakokinetischen Einflüssen unterliegen.

Ob unsere niedrigeren Werte mit den schwerstkranken Patienten in Zusammenhang zu bringen sind, muss in weiteren klinischen Studien bei Patienten auf der Intensivstation untersucht werden.

Das Monitoring mit einem spezifischen Gerinnungstest, wie der PiCT, weist im Gegensatz zu Globaltests, wie der ACT oder PTT, eine weit größere Linearität und Reliabilität auf. Dies liegt darin begründet, dass, für die dem Testverfahren zugrunde liegende Aktivierung des Prothrombinase-Komplexes, Faktor Va hinzugegeben wird. Dadurch erfolgt die Gerinnungsaktivierung 30.000-mal schneller als durch Faktor Xa allein und immer noch um den Faktor 1.000 schneller als die Kombination von F Xa, Calcium und Phospholipiden. Die stark erhöhte Geschwindigkeit der Komplex-Aktivierung minimiert auf diese Weise Störeinflüsse. Außerdem trägt die Aktivierung des Gerinnungssystems auf einer niedrigen Stufe dazu bei, die Einflüsse von Rückkopplungsmechanismen der Thrombinaktivierung und Fluktuationen der Konzentrationen der Gerinnungsfaktoren im Plasma zu reduzieren [20].

Ein weiterer Vorteil der Messung der Argatrobanplasmakonzentration mit der PiCT im Vergleich zur PTT ist das spätere Abflachen der Kurve (PiCT ab 5 µg/ml vers. PTT 1 µg/ml). Somit stellt die PiCT über weitere Konzentrationsbereiche eine aussagekräftigere Messmethode dar.

Die PiCT stellt möglicherweise aufgrund all dieser Eigenschaften eine Option dar, die Argatrobantherapie bei Intensivpatienten zu überwachen. Hierzu sind jedoch weitere Studien notwendig. Für den klinischen Alltag ist lediglich von Nachteil, dass die PiCT nicht in allen Laboren verfügbar ist.

## 5. Zusammenfassung

Bei schwerstkranken Patienten, die intensivmedizinisch betreut werden, spielt das Management der Blutgerinnung eine zentrale Rolle. Häufig besteht ein erhöhtes Blutungsrisiko, beispielsweise bedingt durch auftretende Einschränkungen der Leber- und Nierenfunktion. Das Monitoring von Antikoagulanzen gewinnt aufgrund der schmalen therapeutischen Breite an Bedeutsamkeit.

Die am häufigsten verwendete Substanz ist das unfraktionierte Heparin (UFH), dessen Anwendung gleichzeitig mit einer potentiell lebensbedrohlichen Arzneimittelnebenwirkung verbunden ist: der Heparin induzierten Thrombozytopenie (HIT).

Zur den therapeutischen Optionen bei HIT zählt Argatroban, ein direkter Thrombininhibitor, der laut Fachinformation und in der klinischen Praxis wie Heparin mit der PTT gesteuert und überwacht werden kann.

In der klinischen Anwendung von Argatroban bei Intensivpatienten entstand der Eindruck, dass bei diesem Patientenkollektiv deutlich niedrigere Dosierungen erforderlich sind als in der Fachinformation für Patienten angegeben.

Das Ziel der Arbeit war es, durch systematische prospektive Datenerfassung diese Vermutung zu überprüfen und herauszufinden, welche tatsächlichen Dosierungen bei schwerstkranken Intensivpatienten erforderlich sind.

Aufgrund der rein hepatischen Metabolisierung von Argatroban, wurde zudem untersucht, ob es einen Leberparameter gibt, anhand dessen eine notwendige Dosisanpassung vorab einzuschätzen wäre. Es stellte sich desweiteren die Frage, ob und inwiefern Leberfunktionsstörungen auch auf die Argatroban-Plasmakonzentration Einfluss nehmen.

Gegenstand der Studie war es ebenso, zu überprüfen, ob die PTT bei kritisch Kranken den idealen Parameter zum Monitoring des antikoagulatorischen Effekts von Argatroban darstellt, da bei diesen Patienten häufig eine spontan verlängerte PTT zu verzeichnen ist.

Weiterhin sollte diese Arbeit einen Beitrag dazu leisten, einen adäquaten in-vitro Gerinnungstest ausfindig zu machen, der den antikoagulatorischen Status Schwerstkranker unter Argatroban widerspiegelt. In der Studie wurde hierfür die Activated Clotting Time (ACT) untersucht.

Die vorliegende Studie zeigt, dass bei schwerstkranken Intensivpatienten im Vergleich zur üblichen vom Hersteller empfohlenen Dosierung eine deutliche – im Durchschnitt um den Faktor -10- verminderte Argatrobandosierung notwendig ist. Bei Patienten mit eingeschränkter Leberfunktion

unterscheidet sich die tatsächlich verabreichte Dosierung von der in der Fachinformation Angegebenen um den Faktor 2-3.

Die untersuchten Routinelaborparameter der Leber konnten zur Argatrobandosisfindung keinen Beitrag leisten.

Bei der Untersuchung der PTT als geeignetes Monitoringverfahren fielen nicht sicher spezifizierbare, starke interindividuelle Schwankungen bei den gemessenen Werten auf. Zusätzlich bestand mit der Argatroban-Plasmakonzentration weder bei der PTT noch beim Gesamt-Bilirubin eine Korrelation. Daraus ließ sich schließen, dass die Variabilität der PTT bei den Patienten nicht durch Argatroban bedingt ist und stattdessen multiple pharmakokinetische Einflüsse, wie Organdysfunktionen, Sepsis oder Co-Medikationen, hierfür verantwortlich sind. Weiterhin konnte eine unbemerkte Kumulierung von Argatroban unter dem Monitoring mit der PTT ausgeschlossen werden.

Aus den Ergebnissen der ACT Bestimmungen konnte man folgern, dass ab einer Argatrobanplasmakonzentration von 0.8 µg/ml die ACT kein geeignetes Verfahren zur Überwachung der Argatrobantherapie mehr darstellt. Im klinischen Alltag lässt sich die ACT zudem nicht absolut bewerten, sie stellt vielmehr einen für jeden Patienten individuellen Verlaufparameter dar, der bei niedrigen Plasmakonzentrationen am sensitivsten ist.

Zur Überwachung der Argatrobantherapie bei Schwerstkranken stellt möglicherweise die PiCT als Monitoringverfahren eine gute Option dar. Dies gilt es jedoch in weiteren Studien zu evaluieren und zu überprüfen.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Beck, G.C.a.D., C. E. , When is a HIT a HIT? *Anaesthesiologie & Intensivmedizin*, 2008(49): p. 456-467.
2. Horsewood, P., et al., The epitope specificity of heparin-induced thrombocytopenia. *Br J Haematol*, 1996. 95(1): p. 161-7.
3. Keeling, D., S. Davidson, and H. Watson, The management of heparin-induced thrombocytopenia. *Br J Haematol*, 2006. 133(3): p. 259-69.
4. Argatra ® (Argatroban) Produktmonografie, M.P.D. GmbH, Editor. 2006.
5. Warkentin, T.E., Heparin-induced thrombocytopenia. *Hematol Oncol Clin North Am*, 2007. 21(4): p. 589-607, v.
6. Warkentin, T.E., New approaches to the diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia. *Chest*, 2005. 127(2 Suppl): p. 35S-45S.
7. Hassan, Y., et al., Heparin-induced thrombocytopenia and recent advances in its therapy. *J Clin Pharm Ther*, 2007. 32(6): p. 535-44.
8. Lo, G.K., et al., Evaluation of pretest clinical score (4 T's) for the diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia in two clinical settings. *J Thromb Haemost*, 2006. 4(4): p. 759-65.
9. Lubenow, N., et al., Results of a systematic evaluation of treatment outcomes for heparin-induced thrombocytopenia in patients receiving danaparoid, ancrod, and/or coumarin explain the rapid shift in clinical practice during the 1990s. *Thromb Res*, 2006. 117(5): p. 507-15.
10. Swan, S.K. and M.J. Hursting, The pharmacokinetics and pharmacodynamics of argatroban: effects of age, gender, and hepatic or renal dysfunction. *Pharmacotherapy*, 2000. 20(3): p. 318-29.
11. Preissner, K.T., [Biochemistry and physiology of blood coagulation and fibrinolysis]. *Hamostaseologie*, 2004. 24(2): p. 84-93.
12. Di Nisio, M., S. Middeldorp, and H.R. Buller, Direct thrombin inhibitors. *N Engl J Med*, 2005. 353(10): p. 1028-40.
13. Begelman, S.M., et al., Argatroban anticoagulation in intensive care patients: effects of heart failure and multiple organ system failure. *J Intensive Care Med*, 2008. 23(5): p. 313-20.
14. Smythe, M.A., et al., Argatroban dosage requirements and outcomes in intensive care versus non-intensive care patients. *Pharmacotherapy*, 2009. 29(9): p. 1073-81.

15. Beiderlinden, M., et al., Argatroban anticoagulation in critically ill patients. *Ann Pharmacother*, 2007. 41(5): p. 749-54.
16. Levine, R.L., M.J. Hursting, and D. McCollum, Argatroban therapy in heparin-induced thrombocytopenia with hepatic dysfunction. *Chest*, 2006. 129(5): p. 1167-75.
17. Scharrer, I., [Liver cirrhosis and coagulopathy]. *Hamostaseologie*, 2005. 25(2): p. 205-8.
18. Levi, M., The coagulant response in sepsis and inflammation. *Hamostaseologie*, 2010. 30(1): p. 10-2, 14-6.
19. Lipinski, S., et al., Coagulation and inflammation. Molecular insights and diagnostic implications. *Hamostaseologie*, 2011. 31(2): p. 94-102, 104.
20. Fenyvesi, T., I. Jorg, and J. Harenberg, Effect of phenprocoumon on monitoring of lepirudin, argatroban, melagatran and unfractionated heparin with the PiCT method. *Pathophysiol Haemost Thromb*, 2002. 32(4): p. 174-9.
21. Selleng, K., T.E. Warkentin, and A. Greinacher, Heparin-induced thrombocytopenia in intensive care patients. *Crit Care Med*, 2007. 35(4): p. 1165-76.
22. Siegmund, R., et al., Influence of direct thrombin inhibitor argatroban on coagulation assays in healthy individuals, patients under oral anticoagulation therapy and patients with liver dysfunction. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 2008. 19(4): p. 288-93.
23. Iqbal, O.A., Cafer; Lewis Bruce E.; Cunanan Josephine ; Fareed, Jawed Argatroban for percutaneous coronary interventions. *Seminars in Thrombosis & Hemostasis*, 2008. 34(Supplement 1): p. 62-80.
24. Calatzis, A., et al., Prothrombinase-induced clotting time assay for determination of the anticoagulant effects of unfractionated and low-molecular-weight heparins, fondaparinux, and thrombin inhibitors. *Am J Clin Pathol*, 2008. 130(3): p. 446-54.

## 7. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: 4 T-Score für die Diagnosefindung der HIT (modifiziert nach [1]) .....	10
Tabelle 2: Erhobene Daten und Parameter der Studienpatienten .....	19
Tabelle 3: Patientenmerkmale.....	26
Tabelle 4: Ursachen für einen Intensivaufenthalt .....	26
Tabelle 5: Hämostaseologische Komplikationen unter Argatroban-Therapie.....	27
Tabelle 6: Patienten Fallzahl.....	27
Tabelle 7: Argatroban-Dosierung am Tag 3, 7, 14, 28 nach Therapiebeginn.....	29
Tabelle 8: PTT in Sekunden am Tag 3, 7, 14 und 28 nach Beginn der Argatrobantherapie .....	30
Tabelle 9: Quick in % am Tag 3, 7, 14 und 28 nach Beginn der Argatrobantherapie .....	32
Tabelle 10: Bilirubin in mg/dl am Tag 3, 7, 14 und 28 nach Beginn der Argatrobantherapie .....	34
Tabelle 11: GPT in U/l am Tag 3, 7, 14 und 28 nach Beginn der Argatrobantherapie .....	36
Tabelle 12: AP in U/l am Tag 3, 7, 14 und 28 nach Beginn der Argatrobantherapie.....	38
Tabelle 13: Gamma-GT in U/l am Tag 3, 7, 14 und 28 nach Beginn der Argatrobantherapie.....	40
Tabelle 14: PiCT Dosis-Wirkungskurve, Mittelwerte .....	43
Tabelle 15: ACT- Dosis-Wirkungskurve, Mittelwerte .....	49

## 8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Pathomechanismus der HIT II (nach [4]) .....	8
Abbildung 2: Die Wirkung von DTI im Vergleich zu Heparin (nach [12]) .....	14
Abbildung 3: Strukturformel von Argatroban (nach [4]).....	15
Abbildung 4: Das Prinzip der PiCT Bestimmung .....	23
Abbildung 5: Legende Boxplot.....	28
Abbildung 6: Argatroban-Dosierung am Tag 3, 7, 14, 28 nach Therapiebeginn .....	29
Abbildung 7: PTT in Sekunden am Tag 3, 7, 14 und 28 nach Beginn der Argatrobantherapie .....	30
Abbildung 8: PTT Werte bei entsprechender Argatrobandosierung .....	31
Abbildung 9: Quick in % am Tag 3, 7, 14 und 28 nach Beginn der Argatrobantherapie.....	32
Abbildung 10: Quick Werte bei entsprechender Argatrobandosierung .....	33
Abbildung 11: Bilirubin in mg/dl am Tag 3, 7, 14 und 28 nach Beginn der Argatrobantherapie .....	34
Abbildung 12: Bilirubin Werte bei entsprechender Argatrobandosierung .....	35
Abbildung 13: GPT in U/l am Tag 3, 7, 14 und 28 nach Beginn der Argatrobantherapie .....	36
Abbildung 14: GPT Werte bei entsprechender Argatrobandosierung .....	37
Abbildung 15: AP in U/l am Tag 3, 7, 14 und 28 nach Beginn der Argatrobantherapie.....	38
Abbildung 16: AP Werte bei entsprechender Argatrobandosierung .....	39
Abbildung 17: Gamma-GT in U/l am Tag 3, 7, 14 und 28 nach Beginn der Argatrobantherapie .....	40
Abbildung 18: Gamma-GT Werte bei entsprechender Argatrobandosierung .....	41
Abbildung 19: PiCT-Dosis-Wirkungskurve .....	42
Abbildung 20: Korrelation der Argatrobandosierung /Plasmakonzentration .....	44
Abbildung 21: Korrelation Argatroban-Plasmakonzentration / PTT.....	45
Abbildung 22: Korrelation PTT/PiCT .....	46
Abbildung 23: Korrelation der Argatroban-Plasmakonzentration / Bilirubin .....	47
Abbildung 24: ACT- Dosis-Wirkungskurve.....	48

## 9. Abkürzungsverzeichnis

a	aktiviert
ACT	Activated clotting time
AP	Alkalische Phosphatase
APC	aktiviertes Protein C
ARDS	Acute Respiratory Distress Syndrom
ARG	Argatroban
AT	Antithrombin
DTI	Direkte Thrombin Inhibitoren
ECT	Ecarin Clotting Time
Faktor II	Faktor II (Thrombin)
Faktor V	Faktor V (Proaccelerin)
Faktor VIII	Faktor VIII (antihämophiles Globulin A)
Faktor X	Faktor X (Stuart-Prower-Faktor)
Faktor XI	Faktor XI (Plasma Thromboplastin-Antecedent)
Faktor XII	Faktor II (Hagemann-Faktor)
Faktor XIII	Faktor XIII (Laki-Lorand-Faktor)
g	Erdbeschleunigung
GI	Gastrointestinal
GPT	Alanin-Aminotransferase
h	Stunde
HIT	Heparin induzierte Thrombozytopenie
ICG PDR	Indocyanine green plasma disappearance rate
IgG	Immunglobulin G
INR	International Normalized Ratio
Ki	Inhibitionskonstante
LR	Low Range
min	Minute
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
PF 4	Plättchenfaktor 4
PiCT	Prothrombinase induced clotting time

PT	Prothrombin Time
PTT	partielle Thromboplastinzeit
R <sup>2</sup>	Bestimmtheitsmaß
RVV	Russel´s viper venom, spezifischer Faktor V-Aktivator
SD	Standardabweichung
t-PA	Tissue-Plasminogenaktivator
TT	Thrombin Time
UFH	unfraktioniertes Heparin
ZVK	Zentralvenöser Katheter
γ-GT	γ-Glutamyltransferase

## **10. Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. M. Spannagl für die Überlassung dieses interessanten Themas und seine Bereitschaft mich bei der wissenschaftlichen Erarbeitung und Fertigstellung der Dissertation zu begleiten bedanken.

Des Weiteren möchte ich meinem Betreuer Herrn Dr. M. Irlbeck für die gute Zusammenarbeit und seine tatkräftige Unterstützung in allen Belangen über die gesamte Dauer meiner Promotion danken.

Von ganzem Herzen danke ich meiner Familie, insbesondere meinem Mann Mirko Nydegger für die moralische Unterstützung in jeder Phase dieser Arbeit und meinen Eltern, Monika Tichy und Radu Stancu, die immer an mich geglaubt, an meiner Seite gestanden und mir mein Studium ermöglicht haben!

## 11. Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name	Ana-Maria Nydegger, geborene Tichy
Geburtsdatum- und Ort	12.10.1983 in Bukarest/Rumänien
Staatsangehörigkeit	Deutsch
Familienstand	verheiratet

### Schulbildung

09/1989 - 07/1993	Grundschule Taufkirchen bei München
09/ 1993 – 07/2002	Gymnasium Unterhaching bei München Abschluss mit dem Erreichen der „Allgemeinen Hochschulreife“

### Hochschulbildung

08/2002 - 05/2003	Studium an der University of Massachusetts Lowell, U.S.A. mit Hauptfach Psychologie
10/2003 - 06/2010	Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München
06/2010	Approbation als Ärztin

### Praktisches Jahr

12/2008 – 11/2009	Anästhesiologie im Klinikum Großhadern, München Chirurgie im St. Clara Spital, Basel Innere Medizin im Concord Hospital Sydney, Australien Innere Medizin im Wellington Hospital, Neuseeland
-------------------	---

### Berufliche Tätigkeit

Seit 08/2010	Assistenzärztin an der Universitätsklinik für Anästhesiologie und Schmerztherapie, Bern Direktor: Prof. Dr. med. F. Stüber
--------------	--

# Eidesstattliche Versicherung

---

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,  
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

---

Ort, Datum

---

Unterschrift Doktorandin/Doktorand