

Auswirkungen des Proteaseninhibitors MDCO2010 auf die Gerinnungsdiagnostik während herzchirurgischer Eingriffe

Emilia Vanessa Straube

Dissertation



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

Direktor: Prof. Dr. med. Bernhard Zwißler

**Auswirkungen des Proteaseninhibitors MDCO2010 auf die
Gerinnungsdiagnostik während herzchirurgischer Eingriffe**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität
zu München

vorgelegt von
Emilia Vanessa Straube
aus
München

2017

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Michael Spannagl
Mitberichterstatter:	PD Dr. med. Christoph Bidlingmaier
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	_____
Dekan:	Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel
Tag der mündlichen Prüfung:	07.12.2017

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Gerinnungsveränderungen in der Herzchirurgie	1
1.2	Aprotinin	4
1.3	Tranexamsäure	7
1.4	MDCO2010.....	7
2	Problemstellung	9
3	Patienten und Methoden	10
3.1	Patientenkollektiv.....	10
3.2	Phasen der Studie	10
3.3	Zeitpunkte der Probenentnahmen	11
3.4	Prä- und intraoperative Daten.....	12
3.5	Methoden der Gerinnungsdiagnostik.....	13
3.5.1	ROTEM®	13
3.5.2	Prinzip der ACT (Activated Clotting Time) Messung.....	15
3.5.3	BGA- Analyse	16
3.5.4	Hepcon®HMS Plus™	17
3.5.5	Laborchemische Tests.....	20
3.6	MDCO2010 Pipettierung	20
3.7	Rh-tPA Pipettierung.....	21
3.8	Versuchsablauf und erhobene Messgrößen der Phase I.....	21
3.8.1	Messzeitpunkt 1 (T1)	21
3.8.2	Messzeitpunkt 2 (T2)	22
3.8.3	Messzeitpunkt 3 (T3)	22
3.8.4	Zentrifugation.....	23
3.9	Versuchsablauf und erhobene Messgrößen der Phase II.....	23
3.9.1	Messzeitpunkt 1 (T1)	24
3.9.2	Messzeitpunkt 2 (T2)	24
3.9.3	Messzeitpunkt 2.1 (T2.1)	24
3.9.4	Messzeitpunkt 3 (T3)	24
4	Statistische Auswertung.....	25
5	Ergebnisse	27
5.1	Phase I	27
5.1.1	Demographische Daten	27

5.1.2	Präoperative und intraoperative Daten	27
5.1.3	ACT-Medtronic.....	29
5.1.4	ACT- Hemochron.....	31
5.1.5	ROTEM- Analyse.....	38
5.1.6	Laborchemische Daten.....	43
5.2	Ergebnisse der Phase II	46
5.2.1	Demographische Daten	46
5.2.2	Prä- und intraoperative Daten.....	46
5.2.3	Heparin Empfindlichkeit und Heparin Plasma Spiegel (Hepcon-Analyse).....	46
6	Diskussion.....	52
6.1	Antifibrinolytische Wirkung von MDCO2010.....	52
6.2	Verlängerung der ACT unter MDCO2010.....	53
6.2.1	Bewertung der ACT Messung.....	57
6.3	Verlängerung der ROTEM CT unter MDCO2010	58
6.4	Verlängerung der aPTT unter MDCO2010	59
6.5	Hepcon Messung unter MDCO2010.....	60
6.6	Aprotinin und Tranexamsäure	62
6.7	Klinischer Ausblick.....	65
6.8	Limitationen der Arbeit.....	66
6.9	Zusammenfassung	67
7	Literaturverzeichnis	68
8	Abkürzungsverzeichnis	77
9	Tabellenverzeichnis	78
10	Abbildungsverzeichnis	79
11	Danksagung.....	80
12	Eidesstattliche Versicherung.....	80

1 Einleitung

1.1 Gerinnungsveränderungen in der Herzchirurgie

Am 06. Mai 1953 gelang dem Amerikaner John Gibbon erstmalig die erfolgreiche Durchführung einer Operation am offenen Herzen unter extrakorporaler Zirkulation (EKZ) mit Hilfe einer Herz- Lungenmaschine (HLM). Obwohl die Technik dieses Verfahrens seitdem stetig weiterentwickelt wurde, ist die EKZ noch heute ein Eingriff, der zu komplexen Veränderungen der körpereigenen Hämostase führt. Der Kontakt mit nicht-endothelialisierten Schläuchen, Pumpen und der Blut- Luft- Kontakt im Kardiotomiereservoir aktivieren die Gerinnung. Um einer Gerinnung in der HLM und im Patienten vorzubeugen, muss eine hochdosierte Antikoagulation durch die Gabe von unfraktioniertem Heparin erfolgen.

Während herzchirurgischer Eingriffe unter EKZ wird die Hämostase nach einem vereinfachten Gerinnungsmodell sowohl über den extrinsischen, als auch über den intrinsischen Weg massiv aktiviert (s. **Abb. 1**).

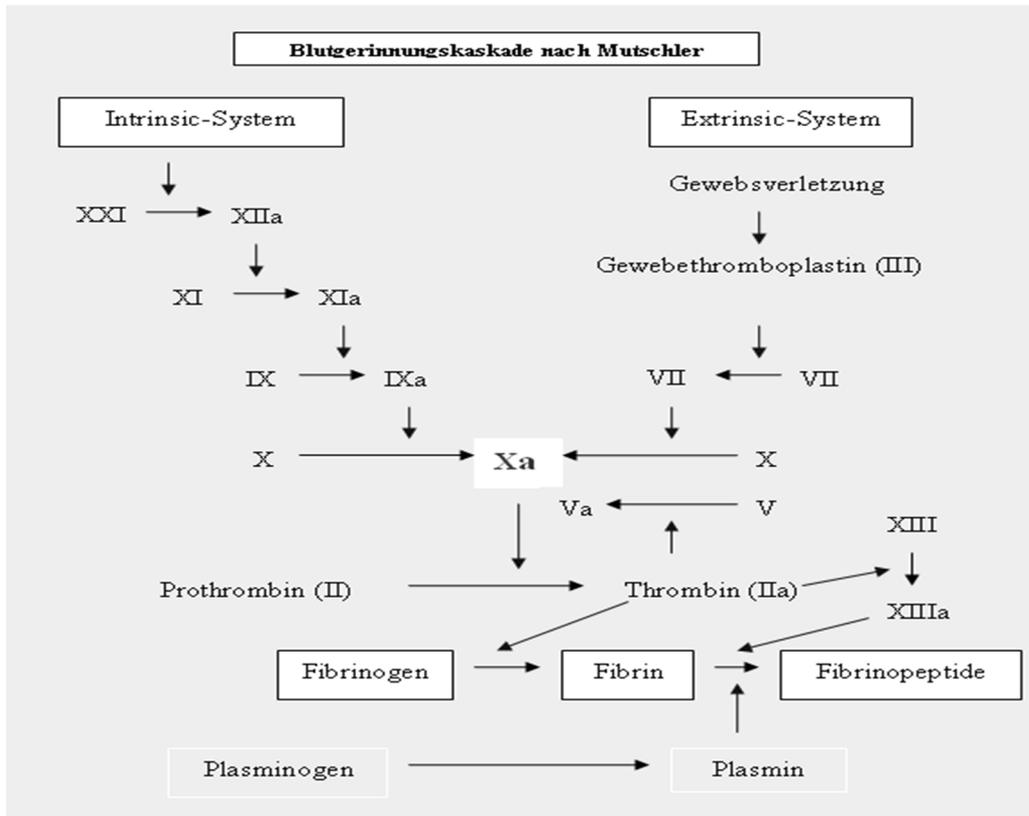


Abb. 1: Vereinfachtes Modell der Gerinnungsaktivierung

Die Endothelschädigung bei chirurgischen Eingriffen führt zur Freisetzung von Tissue Factor (TF), der durch Aktivierung von Faktor VII in Faktor VIIa die extrinsische Gerinnungskaskade einleitet. Gleichzeitig induziert der Kontakt zirkulierender Thrombozyten zur nicht-endothelialen Oberfläche der HLM die intrinsische Hämostase durch Überführung von Faktor XII in seine aktive Form Faktor XIIa[1, 2]. Ein moderneres Modell der Hämostase sieht im extrinsic und intrinsic Pathway nicht mehr zwei voneinander unabhängige Wege der Gerinnungskaskade. Vielmehr geht man heute von einem zellvermittelten Stufenmodell aus, das durch verschiedene Zellkomponenten reguliert wird. Initiiert wird die Gerinnungskaskade TF-vermittelt durch die Aktivierung von FVII, der die Aktivierung von FX katalysiert. FX interagiert mit dem Cofaktor V und führt zur Thrombinbildung. Der extrinsic und intrinsic Pathway werden hier als zwei miteinander interagierende Systeme verstanden. Während der extrinsic Pathway die TF-vermittelte Aktivierung der Gerinnungskaskade durch Bildung von kleinen Mengen von Thrombin darstellt, führt der intrinsic Pathway durch Interaktion mit Thrombozyten zur Potenzierung der Thrombinbildung, die zur Bildung eines stabilen Fibrinclots notwendig ist[3]. Da in der kardiochirurgischen Literatur noch meist

die alte Nomenklatur verwendet wird, wird sich auch in dieser Arbeit zumeist darauf bezogen.

Die Fibrinolyse, unter der man die enzymatische Spaltung von Fibrinpolymeren versteht, wird im Körper im Wesentlichen durch den gewebespezifischen Plasminogenaktivator und die Urokinase aktiviert. Die Aktivierung der Fibrinolyse ist weit weniger komplex als die Gerinnungsaktivierung und beinhaltet die Spaltung des Vorläuferproteins Plasminogen in seine aktive Form Plasmin durch die eben genannten Enzyme[3]. Die Plasminogenaktivierung kann physiologisch durch körpereigene Enzyme erfolgen oder medikamentös initiiert werden. Ein gängiger medikamentöser Initiator ist beispielsweise rh-tPA (recombinant human tissue-type Plasminogen Activator; Alteplase®).

Neben den Veränderungen der Hämostase kommt es während der EKZ durch Aktivierung des Komplementsystems auch zur Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren sowie zu erhöhten CRP-Werten und Leukozytenzahlen[4, 5]. Die als Folge der Inflamationsreaktion freigesetzten Zytokine wie TNF α und IL-1 α führen zu einer verstärkten TF-Expression und somit zu einer gesteigerten extrinsischen Gerinnungsaktivität[6, 7].

Gemeinsam mit durch Hämodilution verminderter Aktivität körpereigener Antikoagulanzen (Tissue Factor Pathway Inhibitor (TFPI), Antithrombin (AT) Protein C/S) entsteht durch die beschriebenen Veränderungen postoperativ ein prokoagulativer Status mit dem Risiko der Entstehung von thrombembolischen cerebralen und kardialen Ereignissen, der auch durch eine Vollheparinisierung des Patienten nicht vollständig verhindert werden kann[1, 8, 9].

Eine peri-/ und postoperative Blutungsneigung ist eine gefürchtete Konsequenz herzchirurgischer Eingriffe unter der EKZ. Postoperativ kann durch die abnorme Hämostaseaktivierung die Situation ähnlich einer Verbrauchskoagulopathie entstehen, die disseminierte Blutungen zur Folge haben kann[1]. Zusätzlich vermindert die Hämodilution die Anzahl der Gerinnungsfaktoren relativ, sodass es zu einer eingeschränkten Thrombinbildung kommt[10]. Gleichzeitig verminderte Thrombozytenzahlen reduzieren den Protease-Activated-Receptor 1 (PAR 1)

vermittelten Effekt des Thrombins auf die Rekrutierung und Aktivierung der Thrombozyten. Auch die Thrombinsubstrate Fibrinogen und Faktor XIII liegen durch die Hämodilution in verminderter Anzahl vor und führen zu einer mangelhaften Vernetzung der Fibrinmonomere und dadurch zu einer inadäquaten Gerinnselstabilität[8, 11]. Eine verminderte postoperative Fibrinogenkonzentration wird auch als Ursache verstärkter postoperativer Blutungsneigung angesehen[12]. Daneben liegt auch eine eingeschränkte Funktionsfähigkeit der Thrombozyten vor, die vor allem die Adhäsionsfähigkeit betrifft. Durch Down-Regulation des Glykoprotein Ib/IX- Rezeptors (von Willebrand Rezeptor) auf der Oberfläche der Thrombozyten wird die von Willebrand- Faktor (vWF)- vermittelte Adhäsion der Thrombozyten an das geschädigte Endothel behindert[13, 14]. Obwohl wir eine verstärkte Blutungsneigung finden, sieht man postoperativ eine Verschiebung des Gleichgewichtes der Hämostase zur prokoagulatorischen Seite[15, 16].

Um das Gerinnungsgleichgewicht zu verbessern und dadurch blutungsbedingte Komplikationen zu verhindern, werden therapeutisch Fresh Frozen Plasma (FFP), Faktorenkonzentrate und/ oder Thrombozytenkonzentrate transfundiert. Risiken einer Transfusion mit Blutprodukten sind bekannt[17]. Deshalb wurden und werden Anstrengungen unternommen, die perioperative Transfusionsrate zu senken[18, 19]. Zur Senkung der Transfusionsrate werden Medikamente eingesetzt, die die Fibrinolyse hemmen und damit den Blutverlust reduzieren. Zielenzym ist hierbei im Wesentlichen Plasminogen, dessen aktive Form Plasmin zu einer Fibrinspaltung führt. Die wesentlichen medikamentösen Vertreter sind Aprotinin und die Lysinanaloga Tranexamsäure/ Epsilonaminocaprinsäure. Aprotinin inhibiert die Transformation von Plasminogen in Plasmin, Tranexamsäure hemmt die Fibrinspaltung durch Bindung an den Lysinrezeptor des Plasmins/ Plasminogens.

1.2 Aprotinin

Bis 2007 wurde Aprotinin vor allem in der Herzchirurgie routinemäßig zur Verringerung des Blutungsrisikos und den damit verbundenen Transfusionsraten eingesetzt. Aprotinin ist ein natürlich vorkommender unspezifischer Proteaseinhibitor, der aus der Lunge des Hausrinds gewonnen wird. Durch Inhibition der proteolytischen Spaltung von Plasminogen in Plasmin wird die Fibrinolyse gehemmt. Als unspezifischer

Proteaseinhibitor werden dosisabhängig aber auch andere Serinproteasen wie Kallikrein und Trypsin durch Aprotinin reversibel gehemmt. Praktisch alle Studien aus der Herzchirurgie weisen eine signifikante Senkung der perioperativen Blutungsneigung unter Aprotinin nach[20]. Einige Studien konnten unter Aprotinin eine reduzierte Anzahl an thromboembolischen Ereignissen wie Schlaganfällen feststellen und vermuteten daher eine zusätzliche antithrombotische Wirkung des Aprotinins[21, 22]. Es gibt Hinweise, dass Aprotinin durch spezifische Blockade des proteolytischen Zentrums des PAR 1, der unter anderem auf Thrombozyten und Endothelzellen exprimiert wird, die Rekrutierung und Aktivierung von Thrombozyten inhibiert und über diesen Mechanismus das Thromboserisiko reduziert[22, 23]. Die oft beobachtete thrombozytenprotektive und antiinflammatorische Wirkung des Aprotinins nach EKZ[13, 24, 25] werden von einigen Autoren ebenfalls der spezifischen Blockade von PAR 1 zugeschrieben[23, 26].

Häufig wurde in diesen Studien eine Verlängerung der Activated Clotting Time (ACT) beschrieben, die routinemäßig vor der EKZ ermittelt wird, um eine ausreichende Heparinisierung sicherzustellen. Auch auf die aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT) wurde ein ähnlicher verlängernder Effekt beschrieben[27]. Diese Beobachtung hat in der Literatur zu heftigen Diskussionen darüber geführt, ob Aprotinin eine antikoagulatorische Wirkung hat oder ob es ein artifizielles Messergebnis ist, welches zu einer Unterheparinisierung während der EKZ führen könnte[28, 29]. Diese Wirkung ist bedingt durch den inhibierenden Effekt von Aprotinin auf die Kontaktphase der Hämostase[18, 19]. Vor allem bei der ACT Messung mit dem Aktivator Celite konnte eine Verlängerung der ACT beobachtet werden, die sich in der Kaolin-aktivierten ACT Messung durch Bindung von Aprotinin an Kaolin nicht reproduzieren ließ[28-30]. Dietrich et al.[27] gehen davon aus, dass die verlängerte ACT mit dem Aktivator Celite die reale Gerinnungssituation widerspiegelt und Aprotinin zu einer verbesserten Antikoagulation führt, während die Kaolin-aktivierte ACT Messung diesen Effekt durch Bindung von Aprotinin an Kaolin nicht zeigt.

Als bovines Protein besteht das theoretische Risiko einer Prioneninfektion sowie ein allergenes Potential von Aprotinin. Seit 1963 wurden 124 Hypersensibilitätsreaktionen

nach Aprotinin beschrieben[17]. Dieses Risiko ist besonders groß nach Reexposition mit Aprotinin innerhalb eines kurzen Zeitintervalls[31, 32]. Beierlein et al.[17] schätzen das Risiko einer Anaphylaxie auf 2,8% nach Aprotinin- Reexposition. Dietrich et al.[31] untersuchten den Zusammenhang zwischen Anaphylaxie nach Aprotinin-Reexposition und erhöhten Spiegeln von Immunglobulin IgG und IgE Antikörpern gegen Aprotinin und fanden ein erhöhtes Anaphylaxierisiko bei Patienten mit erhöhten Antiaprotinin IgG Werten.

1994 untersuchten Lemmer et al.[33] in einer multizentrischen, randomisierten, doppelblinden und placebokontrollierten Studie Aprotinin hinsichtlich der Sicherheit und Effektivität in der Reduktion perioperativer Blutverluste während herzchirurgischer Bypass-Operationen. Die Ergebnisse zeigten einen signifikant geringeren Blutverlust und eine signifikant geringere Transfusionsrate in der Aprotinigruppe. Die Komplikationsrate war in der Aprotinigruppe nicht erhöht. In der Studie von Levy et al.[34] 1995 konnte ebenfalls ein signifikant geringerer Blutverlust gezeigt werden. Diese Ergebnisse wurden in vielen Studien bestätigt[20].

Cosgrove et al.[35] äußerten dahingegen bereits 1992 den Verdacht, dass Aprotinin das thrombotische Risiko erhöht, nachdem sie in ihrer Studie eine vermehrte Anzahl an Myokardinfarkten und venösen Bypassverschlüssen in der Aprotinigruppe beobachtet hatten. Mangano et al.[36] verglichen 2006 in einer retrospektiven Studie verschiedene antifibrinolytische Therapien (Aprotinin, Tranexamsäure, Aminocaprinsäure) miteinander und beschrieben eine vermehrte Anzahl von postoperativem Nierenversagen, Myokardinfarkten und Schlaganfällen in der Aprotinigruppe. Diese Studienergebnisse wurden daraufhin von einigen Autoren methodisch scharf dahingehend kritisiert, dass keine Vergleichbarkeit innerhalb der Gruppen vorläge und daher die Ergebnisse stark verzerrt werden würden[37, 38].

Nach Veröffentlichung der großangelegten kanadischen BART- Studie 2007[39], die Aprotinin mit einer erhöhten postoperativen Mortalitätsrate in Verbindung brachte, wurde es weltweit vom Markt genommen und stand nur noch unter strenger Indikationsstellung zur Verfügung. Nachdem es Kritik an der Methodik der BART-Studie gab, ist nach der neuesten EMA Verlautbarung vom 17.02.2012 Aprotinin mittlerweile wieder in Europa zugelassen[40].

1.3 Tranexamsäure

Tranexamsäure ist, ebenso wie die Epsilonaminocaprinsäure, ein synthetisches Lysinanalogon, das reversibel den Lysinrezeptor des Plasmin/Plasminogens besetzt und somit die Fibrinspaltung verhindert. Im Unterschied zu Aprotinin ist Tranexamsäure ein spezifisches Antifibrinolytikum.

Es wird unter anderem in der Herzchirurgie eingesetzt, um den peri-/ und postoperativen Blutverlust und die Transfusionsraten zu minimieren[41, 42]. In Trauma- Patienten reduziert Tranexamsäure die Mortalitätsrate in Verbindung mit signifikanten Blutungen[43]. Daneben kommt es auch in der Orthopädie und in der Gynäkologie bei Blutungskomplikationen zum Einsatz[44].

Zwei große Studien beschrieben unter Tranexamsäure eine weniger effektive Verringerung des Blutverlustes als unter Aprotinin[41, 45]. In vier weiteren Studien waren Tranexamsäure und Aprotinin gleich effektiv[39, 46-48], davon ging in zwei Studien jedoch der Trend Richtung Aprotinin[39, 48]. Auch eine Cochrane Analyse von 2007 fand einen Benefit von Aprotinin gegenüber den Lysinanaloga bei großen herzchirurgischen Eingriffen[20].

Es gibt Hinweise, dass unter Tranexamsäure dosisabhängig das Risiko postoperativer, generalisiert tonisch- klonischer Anfälle erhöht ist[49-52]. Tranexamsäure gleicht strukturell dem inhibitorischen Neurotransmitter Glyzin. Da eine verringerte Funktion von Glyzinrezeptoren epileptische Anfälle auslösen kann, stellten Lecker et al.[53] die Hypothese auf, dass Tranexamsäure den Glyzinrezeptor inhibiert und über diesen Mechanismus ein prokonvulsiver Status entstehen kann. In ihrer Studie konnten sie zeigen, dass Tranexamsäure kompetitiv den Glyzinrezeptor inhibiert und über diesen Mechanismus eventuell epileptische Anfälle ausgelöst werden können.

1.4 MDCO2010

MDCO2010 ist ein synthetischer Serinproteaseninhibitor in der klinischen Entwicklung, der das aktive Zentrum des Plasmins blockiert und somit auch die Fibrinolyse inhibiert. Es zeigt eine rasche Clearance nach intravenöser Gabe mit einer Halbwertszeit von etwa zwanzig Minuten, was es gut steuerbar macht[54]. Erste Studienergebnisse zeigen eine mit Aprotinin vergleichbare Plasmininhibition und eine potentere Plasma-Kallikrein- Inhibition. Im Unterschied zu Aprotinin hemmt MDCO2010 das Plasma-Kallikrein schon bei antifibrinolytischen Konzentrationen. Die aPTT und die Gerinnungszeit im ROTEM inTEM sind unter MDCO2010 verlängert, da MDCO2010 ähnlich wie Aprotinin die Gerinnungsfaktoren Xa und XIa inhibiert[55]. Diese Hemmung liegt ebenfalls schon bei antifibrinolytischen Konzentrationen vor. Das inhibitorische Potential auf Xa, XIa und Thrombin scheint im Vergleich zu Aprotinin größer zu sein. Die Gerinnsel-Stärke wird in der ROTEM-Messung nicht beeinflusst[55]. Im Tierversuch konnte eine signifikante Reduktion des Blutverlustes in der MDCO2010- Gruppe festgestellt werden[54]. In der ersten klinischen Arbeit wurde eine dosisabhängige Verlängerung der ACT und Rotem-Messungen bestätigt [56]. Die Transfusionsrate von Erythrozytenkonzentraten war signifikant geringer in der MDCO2010- Gruppe[56].

2 Problemstellung

Wie bereits dargelegt, beinhalten alle bisher eingesetzten Antifibrinolytika teilweise ernst zu nehmende Risiken. Eine befriedigende Alternative gibt es bisher nicht. Es gibt Hinweise, dass Tranexamsäure durch kompetitive Hemmung des Glyzinrezeptors epileptogen wirkt[53]. Aprotinin ist tierischen Ursprungs und besitzt daher allergenes Potential[17, 31] und birgt das theoretische Risiko einer Prioneninfektion. Weiterhin zeigte sich in vielen Studien eine Verlängerung von Gerinnungszeiten unter der Gabe von Aprotinin. Diese Beobachtung führte zu einer heftigen, aber bis heute nicht endgültig geklärten Diskussion darüber, ob es sich hierbei um eine reale Antikoagulation handelt oder ob eine künstliche Verzerrung der Gerinnungswerte unter Aprotinin vorliegt, die während der EKZ zu Unterheparinisierung führt und deshalb für mögliche Komplikationen verantwortlich zu machen ist.

Da MDCO2010 eine ähnliche Funktionsweise aufweist[55] und in ersten Studien schon ein Einfluss auf eine Verlängerung von Gerinnungszeiten gezeigt werden konnte[56-58], könnte es eventuell eine im Vergleich zu den bisher verwendeten Antifibrinolytika risikoärmere Alternative darstellen. Wir führten vorliegende in vitro Untersuchung mit dem Ziel durch, den Einfluss von MDCO2010 auf unterschiedliche Gerinnungsmessungen zu untersuchen. Die Ergebnisse dieser Untersuchung könnten auch wesentliche Informationen zur Funktionsweise anderer Antifibrinolytika geben. Es soll geklärt werden, ob es sich bei den Veränderungen um einen realen, klinisch relevanten antikoagulatorischen Effekt oder um ein in vitro Artefakt handelt. In einem weiteren Schritt soll untersucht werden, wie MDCO2010 die intraoperative Messung der Heparinspiegel beeinflusst. Um möglichst realitätsnah die Gerinnungsveränderungen herzchirurgischer Operationen zu erfassen, werden die Untersuchungen im ex vivo entnommenen Blut kardiochirurgischer Patienten durchgeführt.

3 Patienten und Methoden

3.1 Patientenkollektiv

Nach Autorisierung durch die Ethikkommission der Ludwig-Maximilians-Universität München erfolgte im Rahmen der präoperativen anästhesiologischen Visite die mündliche und schriftliche Aufklärung der Patienten.

Nach schriftlichem Einverständnis wurden Patienten beider Geschlechter, die sich einer elektiven koronaren Bypassoperation und/ oder einfacher Klappenoperation mit Hilfe der EKZ im Klinikum Augustinum in München unterzogen, in die Studie eingeschlossen

Ausschlusskriterien wurden wie folgt definiert:

- Notfalleingriff
- Komplexe Aorten Chirurgie
- 3- Klappenrekonstruktion/ –ersatz oder 2- Klappeneingriff mit ACVB
- Präoperative Leberfunktionsstörung (Transaminasen mehr um das 2fache des Normwertes erhöht)
- Dialysepflichtige Nierenfunktionsstörung
- Vorliegen einer signifikanten Koagulopathie (Behandlung mit Marcumar, Heparin oder orale Antithrombotika,) anhand präoperativer Laborwerte (INR > 1,5; pTT > 45 sec; Fibrinogen < 100mg/dl oder AT3 < 70%)
- Präoperative Anämie (Hb < 12,0g/dl)

Die Einnahme von Thrombozytenaggregationshemmern wie ASS oder Clopidogrel stellte kein Ausschlusskriterium dar. Betreffendes Präparat sowie letzter Einnahmetag wurden jedoch den Akten entnommen und im Case Report des Patienten dokumentiert.

Ein Ausschluss von der Studienteilnahme erfolgte, wenn eines oder mehrere der oben genannten Kriterien zutrafen.

3.2 Phasen der Studie

Im ersten Teil der Studie wurde ex-vivo untersucht, wie sich MDCO2010 dosisabhängig auf die Gerinnungsparameter auswirkt. Dafür wurde die ACT mit zwei verschiedenen Messverfahren ermittelt, sowie eine ROTEM-Analyse angefertigt. Daneben wurden auch die aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT) und der Quick-Wert ermittelt. Im zweiten Teil der Studie wurde untersucht, ob MDCO2010 die Messung der Heparinkonzentration im Plasma beeinflusst. Diese Messungen wurden mit dem Hepcon® HMS- Plus™ durchgeführt. Alle Untersuchungen wurden ex vivo mit entnommenem Patientenblut durchgeführt. Die Patienten selbst wurden nicht mit MDCO2010 behandelt.

3.3 Zeitpunkte der Probenentnahmen

Für die ex vivo Untersuchungen wurden zu verschiedenen definierten Zeitpunkten Patientenblut entnommen. Die erste Blutentnahme erfolgte während der Einleitung vor der Heparinabgabe (Messzeitpunkt T1). Dabei wurden insgesamt 21 Milliliter Blut entnommen (4x Nativmonovette, 1x Zitratmonovette). Die zweite Blutentnahme (T2) erfolgte während der EKZ, dabei wurden wieder insgesamt 21 Milliliter Blut entnommen (4x Nativmonovette, 1x Zitratmonovette). Die letzte Blutentnahme (T3) erfolgte nach Beendigung der EKZ 10 Minuten nach Protamingabe. Insgesamt wurden im ersten Teil der Studie 72 Milliliter Blut pro Patient entnommen. Die Entnahmezeitpunkte der Phase 2 glichen denen des ersten Teils. Eine zusätzliche Blutentnahme erfolgte während der EKZ (T2.1), hierfür wurden zusätzlich 12 Milliliter Blut entnommen.

Zu jedem Blutentnahmezeitpunkt wurden folgende Daten erfasst: Hämoglobin (g/dl), Hämatokrit (%), Temperatur (°C) und Hemochron- Kaolin- ACT (sec). Zur Blutentnahme wurden Nativmonovetten (Saarstedt; à 4,5ml), Zitratmonovetten (Saarstedt; à 3ml) und Spritzen (Hepcon HMS Plus®; à 3ml) verwendet. Mit den Nativmonovetten erfolgten die ACT- Messungen (ACT Hemochron®, ACT Medtronic®), mit den Zitratmonovetten wurden die ROTEM®- Messungen durchgeführt und die Spritzen wurden für die Hepcon- Messungen verwendet. Alle Messungen wurden im Bereich des OPs durchgeführt.

3.4 Prä- und intraoperative Daten

Von jedem Studienteilnehmer wurden folgende präoperative demographische und klinische Daten erhoben: Geburtsdatum, Geschlecht, Größe (cm), Gewicht (kg), Art des Eingriffs, präoperatives Routinelabor, letzter Einnahmetag gerinnungsbeeinflussender Medikamente wie ASS 100, Clopidogrel oder Heparin, sowie Dauer der EKZ und Aortenabklemmzeit. An technischen Daten wurden in der zweiten Studienphase das Füllvolumen der Herzlungenmaschine in Millilitern, durch das Hepcon errechnetes Patientenblutvolumen in Millilitern und daraus resultierendes Gesamtvolumen (Patient plus HLM) in Millilitern erfasst .

3.5 Methoden der Gerinnungsdiagnostik

3.5.1 ROTEM®

Das ROTEM® (Rotationsthrombelastometrie) analysiert die Gerinnungskinetik im Vollblut und erfasst neben der Gerinnungszeit (CT= Clotting Time) die Zeit bis zur Gerinnelbildung (CFT= Clot Formation Time) sowie Gerinnselfestigkeit (MCF= Maximum Clot Firmness) und Gerinnel-Lyse (ML= Maximum Lysis). Die Analyseergebnisse werden durch das ROTEM® tabellarisch und graphisch dargestellt. Das Prinzip entspricht der Funktionsweise der Thrombelastographie[59].

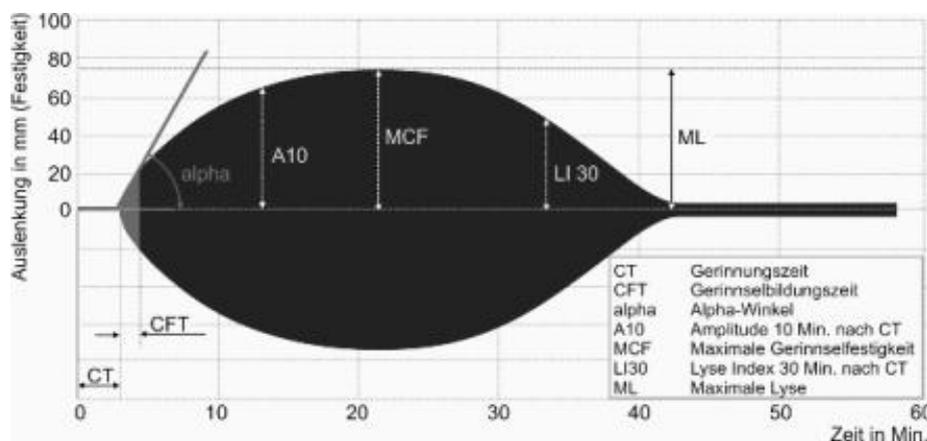


Abb. 2: ROTEM Analyse: Darstellung unter massiver Hyperfibrinolyse

<u>ROTEM® Parameter</u>	<u>Definition</u>	<u>Information</u>
Clotting Time CT (sec)	Zeit von Beginn der Messung bis zur Gerinnelbildung	Beginn der Gerinnel- / Thrombinbildung; Beginn der Clot- Polymerisation
Clot Formation Time CFT (sec)	Zeit von Beginn der Gerinnelbildung bis zu einer Amplitude von 20mm	Fibrin- Polymerisation, Gerinnelstabilisierung mit Thrombozyten und F XIII
Maximum Clot Firmness MCF (mm)	Gerinnelstabilität und -festigkeit	Zunahme der Gerinnelstabilität durch polymerisiertes Fibrin, Thrombozyten und F XIII
LI30/ 60 (%)	Lyse-Index 30/ 60 Minuten nach der CT in % der MCF	Fibrinolyse, Hyperfibrinolyse
Lysis Onset Time LOT (sec)	Zeit, in der die MCF auf 15% ihres Wertes abgenommen hat	Fibrinolyse, Hyperfibrinolyse

<http://www.rotem.de/>

Für die ROTEM® Messungen wird Zitratblut benötigt. Eine Reihe von unterschiedlichen Testansätzen (inTEM, exTEM, hepTEM, fibTEM, apTEM)

ermöglicht die Betrachtung einzelner Abschnitte/Bestandteile der Gerinnungskaskade. Durch Zugabe verschiedener Reagenzien wird die Blutgerinnung aktiviert, sodass die Reaktionen schneller ablaufen. Hierbei können durch extrinsische oder intrinsische Aktivierung partiell einzelne Faktoren der Hämostase untersucht werden (I, II, V, VII, X, Fibrinolyse). In der vorliegenden Arbeit wird mit exTEM, inTEM und hepTEM gearbeitet.

Im exTEM wird die extrinsische Gerinnung und die gemeinsame Endstrecke beurteilt. Zur Gerinnungsaktivierung wird rekombinantes Gewebethromboplasmin verwendet. Zusätzlich enthält exTEM auch Heparinase zur Heparinneutralisation und kann daher auch während der EKZ verwendet werden. Pathologische Werte im exTEM sind zu erwarten bei Faktorenmangel der extrinsischen Gerinnung (Faktor VII) und der gemeinsamen Endstrecke (Faktoren I, II,V,X,XIII).

Im inTEM werden die Faktoren der intrinsischen Hämostase (Faktor XII, XI, IX, VIII) sowie die gemeinsame Endstrecke betrachtet. Aktivator in diesem Ansatz ist das partielle Thromboplastin. Diese Testung ist besonders sensitiv für Faktorenmängel der intrinsischen Gerinnung. Pathologische Werte sind zu erwarten bei angeborenen oder erworbenen Gerinnungsfaktordefekten der intrinsischen Gerinnung und bei Antikoagulation mit Heparin.

Das hepTEM erfasst heparinbedingte Gerinnungsstörungen. Aktivator ist wiederum das partielle Thromboplastin. Durch Zugabe von Heparinase wird eventuell vorhandenes Heparin im Blut des Patienten inaktiviert. Bei CT- Auffälligkeiten im inTEM kann durch das hepTEM ein Heparineinfluss identifiziert werden: ist die Clotting Time im inTEM prolongiert, im hepTEM jedoch normwertig, liegt ein Heparineinfluss vor.

Zur Aktivierung der Fibrinolyse wurde in dieser Arbeit rh-tPA (Alteplase®) verwendet. Die genaue Methodik wird weiter unten beschrieben.

3.5.2 Prinzip der ACT (Activated Clotting Time) Messung

Die ACT- Messung ist eine Methode des Gerinnungsmonitorings, mit der die Heparintherapie überwacht werden kann[[60, 61]. Dabei wird Vollblut in eine Küvette mit einem Gerinnungsaktivator gegeben. Als Aktivatoren der plasmatischen Gerinnung stehen verschiedene Stoffe wie Kaolin (Porzellanerde/ Aluminiumsilikat), Siliziumdioxid, Celite (Kieselgur) und Glaspartikel zur Verfügung. Kaolin eignet sich besonders gut bei niedrigen Heparinkonzentrationen oder nach Aprotiningabe, Celite ist besonders sensitiv bei mittleren bis höheren Heparinkonzentrationen. Glaspartikel als Gerinnungsaktivatoren finden vor allem bei dialysepflichtigen Patienten Anwendung. Temperatur und Stase haben Einfluss auf die Hämostase, daher muss die Probe auf Körpertemperatur inkubiert und regelmäßig bewegt werden, um standardisierte Ergebnisse zu erreichen. Die Zeit von der Zugabe des Blutes bis zur Gerinnungsbildung wird als ACT bezeichnet. Der Zeitpunkt der Gerinnungsbildung kann durch verschiedene Methoden bestimmt werden und variiert je nach Messgerät.

3.5.2.1 Medtronic ACT Plus®



Abb. 3: Medtronic ACT Plus

Das Medtronic ACT Plus® verwendet Kaolin als Gerinnungsaktivator. Die Testkartuschen sind Zweikanal-Kartuschen zu je 0,4ml und bestehen aus je einer Reagenzkammer, einer Reaktionskammer und einem Kolben.

Das Prinzip der Gerinnungserkennung beruht auf der Bildung von Fibrinfäden, die die Kolbenbewegung verlangsamen. Der Kontakt zum Aktivator findet erst mit Messbeginn statt.

Ein foto-optisches System registriert die Abnahme der Kolben- Senkgeschwindigkeit durch das Fibrinnetz und beendet die Zeitmessung.

Das Gerät erfasst einen Verarbeitungszeitraum von 25-999 Sekunden. Bei Überschreitung des oberen Zeitwertes wird die Messung automatisch bei 999 Sekunden beendet.

Für die Messungen stehen verschiedene Kartuschentypen zur Verfügung (low range, high range). Je nach Grad der Heparinisierung werden verschiedene Kartuschen verwendet.

3.5.2.2 Hemochron®401

Das Hemochron® misst ebenfalls die Zeit bis zur Gerinnelbildung in durch einen Aktivator aktiviertem Vollblut. Für das Hemochron®401 stehen als Gerinnungsaktivatoren Kaolin, Celite, Siliziumdioxid oder Glaspartikel zur Verfügung. In vorliegender Arbeit wurden die Messungen mit Kaolin und Celite durchgeführt.



Abb. 4: Hemochron 401

Für die ACT-Testung wird den Hemochron®- Röhren, die den Aktivator beinhalten, zwei Milliliter Vollblut zugefügt und in den Testschacht eingeführt. Im Schacht wird das Teströhren mit konstanter Geschwindigkeit gedreht und bei 37°C inkubiert.

Der Beginn der Fibrinbildung führt zur Dislokation eines in den Röhren befindlichen Magneten. Die Position des Magneten wird kontinuierlich von zwei Magnetdetektoren im Testschacht überwacht. Die Verschiebung des Magneten bei Fibrinbildung in eine bestimmte Position beendet die Zählung und die vom Beginn des Testes bis zum Gerinnungsendpunkt verstrichene Zeit wird als Gerinnungszeit in Sekunden angezeigt.

3.5.3 BGA- Analyse

Die BGA- Analysen wurden in der vorliegenden Studie mit Rapidlab 1265®, Siemens durchgeführt und dienen der Ermittlung des aktuellen Hämatokrits.

3.5.4 Hepcon®HMS Plus™

Das Hepcon®HMS Plus™ (Medtronic GmbH, 40670 Meerbusch) errechnet für jeden Patienten eine Dosis- Wirkung- Kurve für Heparin anhand einer ACT Messung mit unterschiedlichen Heparinkonzentrationen.



Abb. 5: Hepcon HMS Plus

Das Gerät ermittelt für eine vorgegebene Ziel- ACT eine Heparin-Konzentration, mit der diese Ziel- ACT erreicht werden soll, und gibt die Menge an Heparin in IE an, die für das Erreichen dieser Konzentration nötig ist. Wird der Ziel- Spiegel nicht erreicht, errechnet das Hepcon die nötige Menge an Heparin, um die Ziel- ACT zu erreichen. Zudem errechnet das Gerät

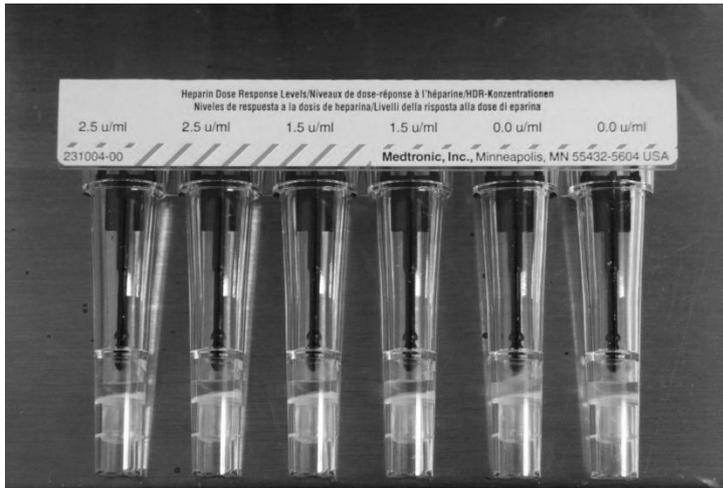
die Protamindosis, die am Ende der Operation zur Antagonisierung des Heparins notwendig ist. Das Messprinzip des Gerätes setzt eine lineare Dosis-Wirkungsbeziehung von Heparin Plasma Spiegel und ACT sowie eine Berechnung des zirkulierenden Blutvolumens des Patienten voraus.

Im Laufe einer Operation fällt die im Blut befindliche Heparinkonzentration des Patienten durch Metabolisierung und Verbrauch ab, sodass zum Erhalt einer suffizienten Antikoagulation und Gewährleistung des antithrombotischen Schutzes die Nachgabe von Heparin erforderlich ist. Aus diesem Grund ist auch keine 1:1 Antagonisierung durch Protamin zum EKZ Ende indiziert, da die Menge des im Blut zirkulierenden wirksamen Heparins im Laufe des Eingriffs deutlich abfällt.

Zur Errechnung der individuellen Heparin- Zielkonzentration werden vor Beginn der Operation Geschlecht, Größe und Gewicht sowie Füllvolumen der HLM eingegeben. Aus den angegebenen Patientendaten errechnet das Gerät das Blutvolumen des Patienten, addiert das in der HLM befindliche Primingvolumen dazu und errechnet so das zirkulierende Gesamtblutvolumen. Insgesamt können fünf Patienten parallel gemessen werden.

Die erste Messung kalkuliert anhand von ACT- Messungen mit steigenden Heparinkonzentrationen in den Messkartuschen die Heparinmenge, die nötig ist, um die erforderliche Ziel- ACT (in unserer Studie 480 Sekunden) während der EKZ zu erreichen.

In dieser Arbeit wurde die Messung in der Einleitung durchgeführt.



Diese Abbildung zeigt die Hepcon-Kartusche für die erste Messung zur Heparin- Dosisfindung. Die einzelnen Kolben beinhalten verschiedene Heparinkonzentrationen (von links):
 2,5u/ml (Kolben 1+2)
 1,5u/ml (Kolben 3+4)
 0,0u/ml (Kolben 5+6)

Abb. 6: Hepcon- Kartusche für die erste Messung zur Heparin- Dosisfindung

T1 (III) ohne		T1 (III) mit	
HMS PLUS S/N 9000086 CPB-Pumpe Enter		HMS PLUS S/N 9000086 CPB-Pumpe Enter	
2010-07-26 Zeit: 10:56 Blocktemp.: 36.9 °C		2010-07-26 Zeit: 11:06 Blocktemp.: 36.8 °C	
Patientennummer: 3 Pat.ID: 111 Geschl.: Männlich Größe: 165 cm Gewicht: 82.0 kg 180 Pfd		Patientennummer: 4 Pat.ID: 111 Geschl.: Männlich Größe: 165 cm Gewicht: 82.0 kg 180 Pfd	
Blutvolumen Patienten: 5533 ml Pumpenvol.: 1600 ml Gesamtvol.: 7133 ml		Blutvolumen Patienten: 5533 ml Pumpenvol.: 1600 ml Gesamtvol.: 7133 ml	
HEPARINDOSISREAKTION Kart.-Charge: 1111111111 Kart. verf.: 2011-11-11 Vorgesehene Heparinkonz: 4.8 E/ml Hep.konz.eingeben: --- E/ml		HEPARINDOSISREAKTION Kart.-Charge: 1111111111 Kart. verf.: 2011-11-11 Vorgesehene Heparinkonz: 3.8 E/ml Hep.konz.eingeben: --- E/ml	
ACT-Basiszeit: 137 Sek		ACT-Basiszeit: 171 Sek	
Heparinbolus Patient: 33882 Einh. Pump: 100 Einh. Total: 33982 Einh.		Heparinbolus Patient: 21300 Einh. Pump: 100 Einh. Total: 21400 Einh.	
ACT-Zielzeit: 480 Sek Steigung: 72 Sek/Einheit/ml		ACT-Zielzeit: 480 Sek Steigung: 103 Sek/Einheit/ml	
Gerinnungszeiten: Durchschnitte Ka 1&2: 340 Sek Ka 3&4: 267 Sek Ka 5&6: 197 Sek Ka 1: 336 Sek Ka 2: 350 Sek Ka 3: 270 Sek Ka 4: 265 Sek Ka 5: 133 Sek Ka 6: 141 Sek		Gerinnungszeiten: Durchschnitte Ka 1&2: 452 Sek Ka 3&4: 340 Sek Ka 5&6: 171 Sek Ka 1: 481 Sek Ka 2: 444 Sek Ka 3: 323 Sek Ka 4: 357 Sek Ka 5: 168 Sek Ka 6: 175 Sek	

Abb. 7: Beispiel eines Hepcon- Ausdrucks nach der ersten Hepconmessung

Die weiteren Messungen während der Operation kalkulieren den Heparinspiegel im Patientenblut nach dem Prinzip der Heparin-/ Protamin- Titration (HPT). Die Kartuschenkanäle für diese Messung enthalten Protamin in steigenden Konzentrationen sowie eine konstante Menge an Thromboplastin zur Aktivierung des Tests. Der Kanal, in dem es zu einer Clotbildung kommt, enthält die Protaminmenge, die am ehesten das Heparin im Blut des Patienten neutralisiert. Aus diesen Daten kalkuliert das Hepcon sowohl den Protaminbolus, der zur Antagonisierung nötig wäre, als auch den Heparinbolus, der nötig ist, um die Zielkonzentration an Heparin zu erreichen, wenn diese unter den kalkulierten Wert gesunken ist.

Es stehen Kartuschen für niedrige, mittlere und hohe Heparinkonzentrationen zur Verfügung. Die Heparinkonzentrationen werden hierbei in Abständen von 0,7E/ml beziehungsweise 0,6E/ml (s. **Abb. 8**) angegeben.



Abb. 8: HPT- Kartuschen für verschiedene Heparinkonzentrationen

In der vorliegenden Studie wurde diese Messung zu zwei Zeitpunkten durchgeführt. Die

erste Messung erfolgte 10 Minuten nach Beginn der EKZ, die zweite ca. 15 Minuten vor Ende der EKZ.

Die letzte Messung kontrolliert, ob Heparin vollständig antagonisiert ist. Sie erfolgte 15 Minuten nach Gabe der errechneten Protaminmenge.

In vorliegender Untersuchung soll durch ex vivo Zugabe unterschiedlicher MDCO2010 Dosen der Einfluss von MDCO2010 auf den Heparinbedarf während EKZ ermittelt werden.

3.5.5 Laborchemische Tests

Um den Einfluss von MDCO2010 auf die laborchemische Gerinnungsdiagnostik zu ermitteln wurden die Gerinnungsparameter Quick und aPTT durch das Kliniklabor nach üblichem Standard bestimmt.

Aus dem Überstand der Nativmonovetten der ACT Hemochron Kaolin und Celite Messung mit 600nM MDCO2010 zum Zeitpunkt T2 wurde der MDCO2010- Spiegel bestimmt. Zur Kontrolle, ob die Zielkonzentrationen von 100nM, 300nM und 600nM MDCO2010 auch erreicht wurden, wurden aus dem Überstand der Zitratmonovetten mit unterschiedlichen MDCO2010- Konzentrationen für die ROTEM® Messungen die MDCO2010- Spiegel bestimmt. Diese Messungen wurden nach dem Auftauen der bei -80°Celsius gelagerten Proben nach Beendigung der Studie in einem auswärtigen Labor durchgeführt. Zur Methodik siehe[62].

3.6 MDCO2010 Pipettierung

Um den Einfluss von MDCO2010 auf die Messungen zu untersuchen, wurde den Proben nach den Blutentnahmen MDCO2010 zupipettiert. Hierdurch sollte eine vordefinierte MDCO2010- Konzentration im Messsystem erreicht werden. Die Menge des zupipettierten MDCO2010 errechnete sich aus dem Plasmavolumen, das jeweils aus dem aktuellen Hämatokrit und dem Fassungsvermögen des jeweiligen Abnahmesystems (Nativmonovetten 4,5ml, Zitratmonovetten 3,0ml, Spritzen 3,0ml) errechnet wurde:

Blutprobe (ml)* (1-Hct) = Plasmavolumen (ml).

Die vollständige Formel zur Errechnung der notwendigen MDCO2010 Menge lautete dementsprechend:

Plasmavolumen (ml)* gewünschte MDCO 2010 Konzentration (nM)/ 1000.

3.7 Rh-tPA Pipettierung

Für die ROTEM Untersuchungen wurde die Fibrinolyse in vitro mit rekombinantem humanem Tissue- type Plasminogen Activator (rh- tPA) aktiviert. Tissue- type Plasminogen Activator (tPA) ist ein körpereigenes Enzym zur Aktivierung der Fibrinolyse, das aus den Endothelzellen der Gefäßwand freigesetzt wird. Durch diese verstärkte Fibrinolyse sollte die antifibrinolytische Potenz von MDCO2010 bestimmt werden[55].

Für die exTEM- Messungen in T1 wurde den ROTEM Küvetten zwischen 10 und 20 Microlitern rh-tPA zupipettiert. Ziel war es, einen Lyseindex von 75% nach 45 Minuten (LI45) beziehungsweise von 100% nach 60 Minuten (LI60) in der Messung mit 0nM MDCO2010 zu erreichen. In T3 wurden 40 Microliter rh-tPA zupipettiert. Diese Dosierungen wurden entsprechend der Ergebnisse früherer Studien [55] gewählt.

3.8 Versuchsablauf und erhobene Messgrößen der Phase I

3.8.1 Messzeitpunkt 1 (T1)

In T1 wurde die ACT mit ACT Hemochron Kaolin mit den MDCO2010- Konzentrationen von 0nM, 100nM, 300nM, 600nM ermittelt. Diese Konzentrationen entsprachen in etwa den in der klinischen Anwendung zu erwartenden Plasmaspiegeln. Die ACT mit ACT Hemochron Celite wurde für die Konzentrationen 0nM und 600nM gemessen. Die ACT Medtronic Messungen wurden mit den Konzentrationen 0nM, 100nM, 300nM und 600nM MDCO2010 durchgeführt.

Am ROTEM® erfolgte eine Messung ohne Zugabe von MDCO2010. Durchgeführt wurde eine exTEM, inTEM und hepTEM Messung. Die Messung wurde nach Erhalt des A30 Wertes (nach 30 Minuten) beendet. Anschließend wurde ein weiteres exTEM durchgeführt mit jeweils den MDCO2010- Konzentrationen von 100nM, 300nM und 600nM. Bei dieser Messung wurde rh-tPA zugegeben, um die antifibrinolytische Wirkung von MDCO2010 zu demaskieren. Nach Messung des LI60 wurde die Messung beendet.

Übersicht T1:

ACT Hemochron Kaolin: 0nM, 100nM, 300nM, 600nM MDCO2010

ACT Hemochron Celite: 0nM, 600nM MDCO2010

ACT Medtronic: 0nM, 100nM, 300nM, 600nM MDCO2010

ROTEM exTEM, inTEM, hepTEM: ohne MDCO2010

exTEM (mit rh-tPA): 100nM, 300nM, 600nM MDCO2010

3.8.2 Messzeitpunkt 2 (T2)

In T2 erfolgten die ACT Messungen mit ACT Hemochron und Medtronic. Die ACT Hemochron Kaolin Messungen wurden mit den MDCO2010- Konzentrationen 0nM, 100nM, 300nM und 600nM durchgeführt. Die ACT Hemochron Celite wurde mit 0nM und 600nM gemessen. Die ACT Medtronic Messungen erfolgten mit den Konzentrationen 0nM, 100nM, 300nM und 600nM.

Aus den Küvetten der 600nM ACT Messungen für Kaolin und Celite wurde der Überstand abpipettiert, zentrifugiert und für die MDCO2010- Spiegelbestimmung sofort bei -80°Celsius eingefroren. Das Blut der Zitratmonovette wurde zentrifugiert und für die anti- Xa Bestimmung eingefroren.

Übersicht T2:

ACT Hemochron Kaolin: 0nM, 100nM, 300nM, 600nM MDCO2010

ACT Hemochron Celite: 0nM, 600nM MDCO2010

ACT Medtronic: 0nM, 100nM, 300nM, 600nM MDCO2010

3.8.3 Messzeitpunkt 3 (T3)

In T3 wurden die ACT Hemochron Kaolin Messungen für die Konzentrationen 0nM, 100nM, 300nM und 600nM durchgeführt. Die ACT Hemochron Celite Messungen wurden für die Konzentrationen 0nM und 600nM durchgeführt. Die ACT Medtronic Messungen erfolgten mit den Konzentrationen 0nM, 100nM, 300nM und 600nM.

In der ROTEM- Messung wurde ein exTEM, inTEM und hepTEM mit den Konzentrationen 0nM, 100nM, 300nM und 600nM durchgeführt. Die Messungen wurden nach Erhalt der A30 beendet. Eine weitere exTEM Messung erfolgte mit den Konzentrationen 0nM, 100n M, 300nM und 600nM unter Zugabe von rh-tPA. Diese Messung wurde nach Erhalt des LI60 beendet. Die Überstände der Zitratmonovetten wurden abpipettiert, zentrifugiert und sofort bei -80°Celsius für die MDCO2010-Spiegelbestimmung sowie die Quick und aPTT Bestimmung eingefroren.

Übersicht T3:

ACT Hemochron Kaolin: 0nM, 100nM, 300nM, 600nM MDCO2010

ACT Hemochron Celite: 0nM, 600nM MDCO2010

ACT Medtronic: 0nM, 100nM, 300nM, 600nM MDCO2010

ROTEM exTEM, inTEM, hepTEM: 0nM, 100nM, 300nM, 600nM MDCO2010

exTEM (mit rh-tPA): 0nM, 100nM, 300nM, 600nM MDCO2010

3.8.4 Zentrifugation

Die Zentrifugation erfolgte bei 4000 Umdrehungen/ Minute für 20 Minuten. Zentrifugiert wurden:

T2: 1x Kaolin 600nM Küvette, 1x Celite 600nM Küvette => MDCO2010- Spiegel
1x Zitratmonovette => anti-Xa Bestimmung

T3: 4x Zitratmonovette 0nM, 100nM, 300nM, 600nM MDCO 2010 => MDCO2010 Spiegel, Quick, aPTT

3.9 Versuchsablauf und erhobene Messgrößen der Phase II

In der zweiten Phase der Studie wurde untersucht, ob MDCO2010 die Hepconmessungen beeinflusst, oder ob mit dem Hepcon®HMSPlus® der Heparinspiegel auch unter MDCO2010 zuverlässig bestimmt werden kann.

3.9.1 Messzeitpunkt 1 (T1)

In T1 wurde die erste Hepcon- Messung zur Heparin Dosisfindung ohne Zusatz von MDCO2010 durchgeführt. Danach erfolgte eine zweite Messung mit Zusatz von 600nM MDCO2010.

Übersicht T1:

Hepcon Heparin- Dosisfindung: 0nM MDCO2010

Hepcon Heparin- Dosisfindung: 600nM MDCO2010

3.9.2 Messzeitpunkt 2 (T2)

In T2 erfolgte eine Heparinspiegelbestimmung ohne MDCO2010 und unter Zusatz von 600nM MDCO2010, um den Einfluss des Medikamentes auf Heparinbedarf und Heparinkonzentration zu bestimmen.

Übersicht T2:

Hepcon Heparinspiegelmessung: 0nM MDCO2010=> Vergleich T1 ohne MDCO2010

Hepcon Heparinspiegelmessung: 600nM MDCO2010 => Vergleich T1 mit 600nM
MDCO2010

Hepcon Heparinspiegelmessung: 600nM MDCO2010 => Vergleich T1 ohne
MDCO2010

3.9.3 Messzeitpunkt 2.1 (T2.1)

Die in T2.1 erfolgten Messungen entsprechen denen in T2.

3.9.4 Messzeitpunkt 3 (T3)

In T3 erfolgten die Messungen entsprechend T2 und T2.1. Zusätzlich erfolgte eine Hepcon ACT Messung mit und ohne Zugabe von MDCO2010.

4 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit Unterstützung des Instituts für medizinische Informatik, Biometrie und Epidemiologie (IBE) der LMU München.

Die erhobenen Daten wurden mit dem Statistikprogramm R ausgewertet.

Es wurden Mittelwerte und Standardabweichungen, sowie Minimum und Maximum angegeben.

Bei allen Vergleichen und Tests bezüglich signifikanter Unterschiede zwischen einzelnen Gruppen oder Messungen wurde ein Zweistichproben t- Test für abhängige verbundene Stichproben durchgeführt. Da sämtliche Messungen an denselben Patienten vorgenommen wurden, können die einzelnen Variablen (=Stichproben) nicht als unabhängig betrachtet werden. Der Zweistichproben t- Test auf verbundene Stichproben ist äquivalent zu einem Einstichproben t- Test auf die Differenz. Daher wurden zu sämtlichen interessierenden Vergleichen die Differenzvariablen gebildet und mittels Einstichproben t-Test untersucht.

Da der t-Test ein normalverteiltes Merkmal voraussetzt, wurde grundsätzlich ein Shapiro- Wilk- Test auf Normalverteilung durchgeführt. Wurde die Annahme der Normalverteilung abgelehnt, wurde zusätzlich ein Wilcoxon- Vorzeichen- Rangtest analog zum t-Test durchgeführt.

Da auf Unterschiede getestet wurde und vorher keine plausiblen Annahmen über die Richtung des Effekts getroffen wurden, wurden sämtliche Tests zweiseitig durchgeführt.

Ein p-Wert $< 0,05$ wurde als signifikant betrachtet.

ACT Messungen:

Da sich die maximale Zähldauer der beiden verwendeten ACT- Geräte unterscheidet (ACT Hemochron: 1500 sec; ACT Medtronic: 999 sec) und Werte über dem Maximum der Messskala möglicherweise auf Messfehler ex vivo zurückzuführen sind, wurden

die Auswertungen sowohl ohne, als auch mit den entsprechenden Maximalwerten durchgeführt. Sollte sich das Ergebnis der Berechnungen unterscheiden, so wird im Folgenden darauf hingewiesen.

Ausgehend von den geschätzten Unterschieden der Mittelwerte und Varianzen können Schätzungen vorgenommen werden, wie viele Individuen getestet werden müssen, um signifikante Ergebnisse zu erhalten, falls die wahren Werte tatsächlich den geschätzten Werten aus der Stichprobe entsprechen.

Basierend auf den Daten früherer Studien waren die getesteten 25 Individuen im ersten Teil der Studie ausreichend, um signifikante Ergebnisse zu erhalten. Die Power der Tests wurde dabei auf 0,8 festgelegt.

Im zweiten Teil der Studie waren 21 getestete Individuen ausreichend, um auf einen Unterschied schließen zu können.

5 Ergebnisse

5.1 Phase I

5.1.1 Demographische Daten

Blutproben von 25 kardiochirurgischen Patienten- 20 männlichen und 5 weiblichen- wurden in der vorliegenden Studie untersucht. Die demographischen Daten sind in Tabelle 1 wiedergegeben. Alle Patienten erhielten 2g Tranexamsäure (TA) als Bolus nach Narkoseeinleitung und 2g Tranexamsäure wurden während der Operation in den Oxygenator gegeben.

Tab. 1: Demographische Daten Patienten der Phase 1

	Alter (Jahre)	Größe (cm)	Gewicht (kg)	Hgb (g/L)	Hct (%)	Quick (%)	aPTT (sec)	Kreatinin (mg/dl)
Mittelwert±SD	67±7,9	175±7,7	83±18,5	139±17,3	41±5,1	101±15,5	29±6,5	3,8±4,4
Min./Max.	45/81	162/193	64/163	94/170	28/51	45/129	24/56	0,7/6,9 ^x

Legende: Hgb: Hämoglobin, Hct: Hämatocrit, aPTT: aktivierte Thromboplastinzeit, SD: Standardabweichung

^x Ein Patient zeigte einen sehr hohen Kreatininwert von 6,9mg/dl; eine Dialysepflichtigkeit bestand zu diesem Zeitpunkt jedoch nicht.

5.1.2 Präoperative und intraoperative Daten

Die operativen Daten sind in Tabelle 2 dargestellt.

Tab. 2: Übersicht über die Art und Häufigkeit der OPs in Phase 1

	n	n%
AKE ^a	3	12
AKE ^a , CABG ^b	1	4
AKE ^a , MKE ^c	1	4
CABG ^b	15	60
MKE ^c	1	4
MKE ^c , CABG ^c	1	4
Myxomexstirpation	1	4
AKE ^a , Myektomie	2	8
Gesamt	25	100

a. AKE- Aortenklappenersatz

b. CABG- Coronary Artery Bypass Graft

c. MKE- Mitralklappenersatz

Die intraoperativen Daten sind in Tabelle 3 dargestellt. Erhoben wurden die initiale Heparindosis, die zur Antagonisierung verabreichte Protamindosis, die Dauer der EKZ sowie die Aortenabklemmzeit.

Tab. 3: *Intraoperative Daten*

	Heparindosis (IU)	Protamindosis (IU)	EKZ (min)	Aortenabklemmzeit (min)
Mittelwert	37200±11280,5	46000±12500,0	110±50,6	75±28,5
Min./Max.	25000/80000	35000/100000	58/315	36/160

Legende: International Units (IU)

Abbildung 9 stellt die verabreichten Heparin- und Protaminmengen graphisch dar. Die unteren Werte stellen hierbei die initiale Heparindosis dar. Die während der EKZ nachgegebenen Heparinmengen wurden in der Abbildung nicht berücksichtigt.

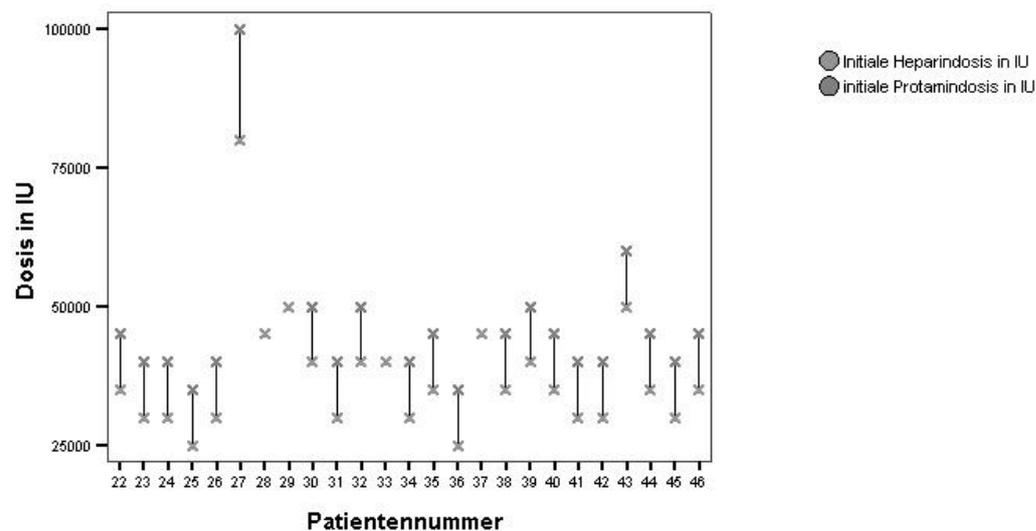


Abb. 9: Gesamt-Heparin- und Protamindosen (der untere Wert stellt jeweils die Protamindosis dar)

Pat.27 wurde für eine zweite EKZ reheparinisiert. Für die Studie wurden die Daten der ersten Heparinisierung verwendet.

5.1.3 ACT-Medtronic

Die Messergebnisse für die ACT Messung (Medtronic) sind in Tabelle 4 dargestellt. Die ACT- Verlängerung war zu allen Messzeitpunkten bereits ab einer MDCO2010 Konzentration von 100nM statistisch signifikant.

Tab. 4: ACT Medtronic. Übersicht über die Ergebnisse der Messzeitpunkte T1- T3 in allen Gruppen

	Gruppe	Mittelwert±SD	Min./Max.
T1 Medtronic	control	135±10	116/152
	100 nmol	143±11	123/171
	300 nmol	159±13	128/185
	600 nmol	176±15	144/204
T2 Medtronic	control	644±142	410/999
	100 nmol	708±145	470/999
	300 nmol	811±140	548/999
	600 nmol	898±114	652/999
T3 Medtronic	control	120±13	79/146
	100 nmol	130±16	85/161
	300 nmol	150±21	89/187
	600 nmol	173±26	99/220

In Abbildung 10 sind die Daten der ACT Medtronic Messung zu den Zeitpunkten T1-3 graphisch dargestellt. Die roten Kreuze kennzeichnen signifikante Ergebnisse.

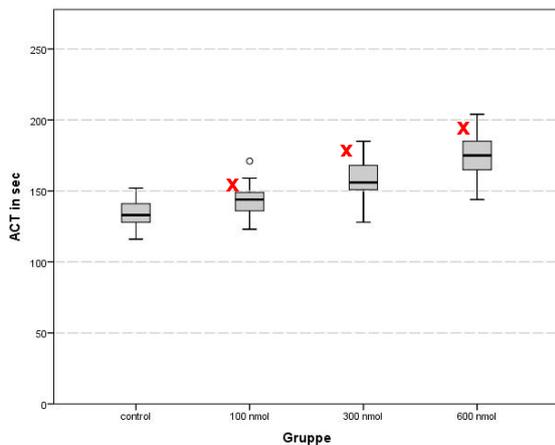


Abb. 10a: T1 ACT Medtronic
**p < 0,05 vs. control*

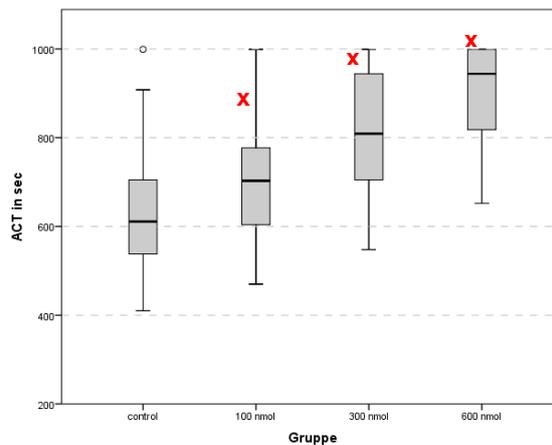


Abb. 10b: T2 ACT Medtronic
**p < 0,05 vs. control*

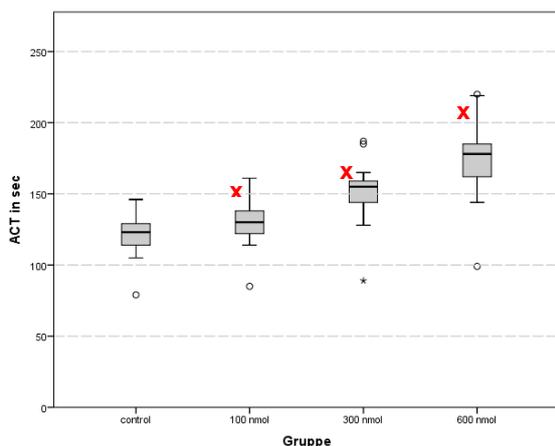


Abb. 10c: T3 ACT Medtronic
**p < 0,05 vs. control*

Abb. 10: ACT Medtronic T1 - T3

Darstellung des konzentrationsabhängigen ACT- Anstiegs. Die Abszisse zeigt die ansteigende MDCO2010- Konzentrationen in den Proben.

Die roten Kreuze kennzeichnen signifikante Ergebnisse.

In Abbildung 11 sind die Daten der ACT Medtronic Messung zu den Zeitpunkten T1-3 in Einzelwerten dargestellt.

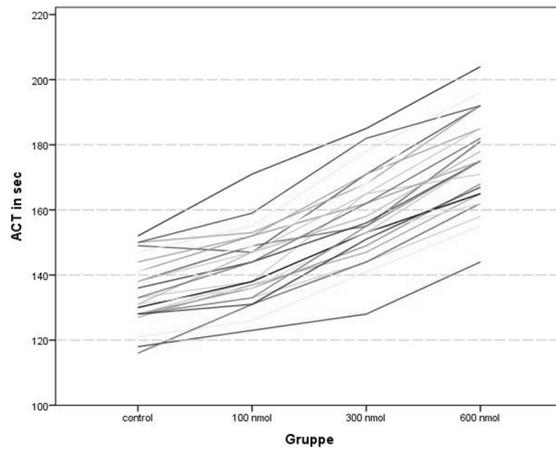


Abb. 11a

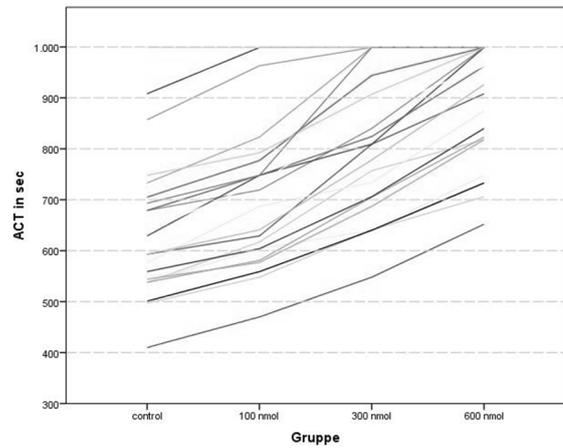


Abb. 11b

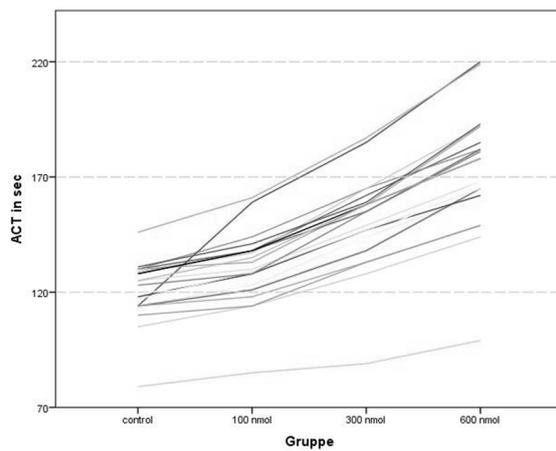


Abb. 11c

Abb. 11: ACT Medtronic T1 - T3 in Einzeldarstellung

Abbildungen a - c zeigen den konzentrationsabhängigen Anstieg der ACT. Die Abszisse zeigt die ansteigende MDCO2010- Konzentrationen in den Proben.

5.1.4 ACT- Hemochron

Die Ergebnisse der ACT Hemochron Messungen sind in Tabelle 5 und 6 dargestellt. Die Ergebnisse der Hemochron Messungen mit den Aktivatoren Kaolin und Celite zu den Zeitpunkten T1 und T3 in den Gruppen „control“ und „3“ (600nM) unterschieden sich signifikant.

Tab. 5: ACT Hemochron Kaolin. Übersicht über die Ergebnisse der Messzeitpunkte T1- T3 in allen Gruppen

	Gruppe	Mittelwert	Min./Max.
T1 Hemochron Kaolin	control	139±11	117/165
	100 nmol	145±10	124/166
	300 nmol	150±9	133/174
	600 nmol	166±16	141/200
T2 Hemochron Kaolin	control	784±282	484/1500*
	100 nmol	835±301	502/1500*
	300 nmol	972±312	562/1500*
	600 nmol	1042±283	592/1500*
T3 Hemochron Kaolin	control	135±11	121/167
	100 nmol	137±11	115/156
	300 nmol	153±12	131/177
	600 nmol	173±17	142/210

**Das Hemochron ACT Gerät stoppt die Messung bei 1500 Sekunden. Dieser Wert wurde in der Auswertung verwendet.*

In Abbildung 12 sind die Ergebnisse der ACT Hemochron Messung zu den Zeitpunkten T1-3 graphisch als Medianwert dargestellt. Die roten Kreuze kennzeichnen zum Ausgangswert signifikante Ergebnisse.

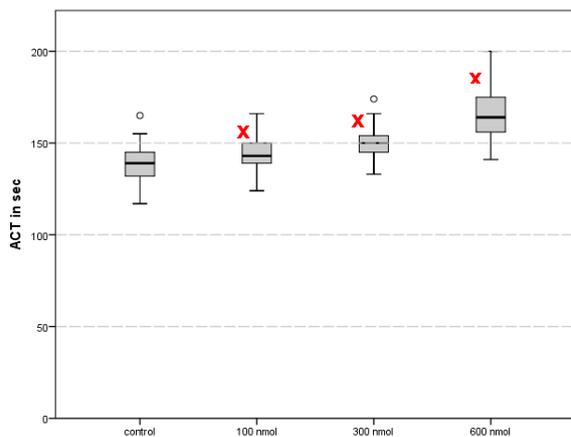


Abb. 12a: T1 ACT Hemochron Kaolin
* $p < 0,05$ vs. control

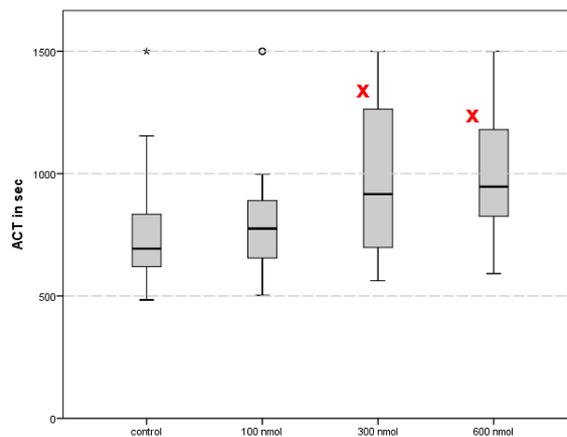


Abb. 12b: T2 ACT Hemochron Kaolin
* $p < 0,05$ vs. control

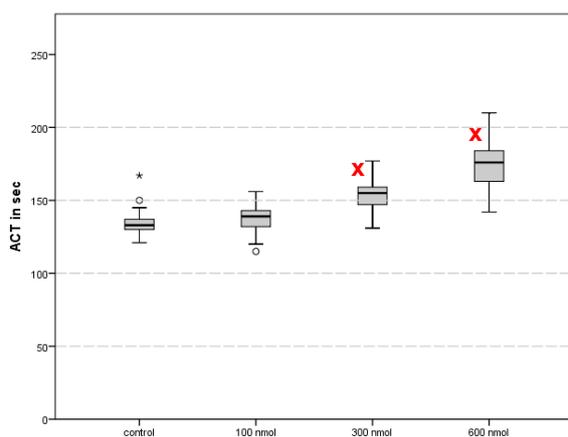


Abb. 12c: T3 ACT Hemochron Kaolin
* $p < 0,05$ vs. control

Abb. 12: ACT Hemochron Kaolin T1 – T3
Anstieg der ACT mit steigenden MDCO2010- Konzentrationen. Es ist zu berücksichtigen, dass das Hemochron Gerät die ACT bis 1500 Sekunden bestimmt, während das Medtronic Gerät eine Obergrenze von 999 Sekunden hat. Die roten Kreuze kennzeichnen signifikante Ergebnisse.

In Abbildung 13 sind die Ergebnisse der ACT Hemochron Messung zu den Zeitpunkten T1-3 als Einzelwerte dargestellt.

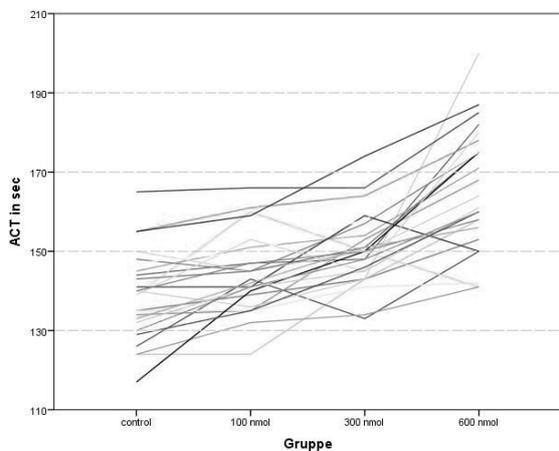


Abb. 13a

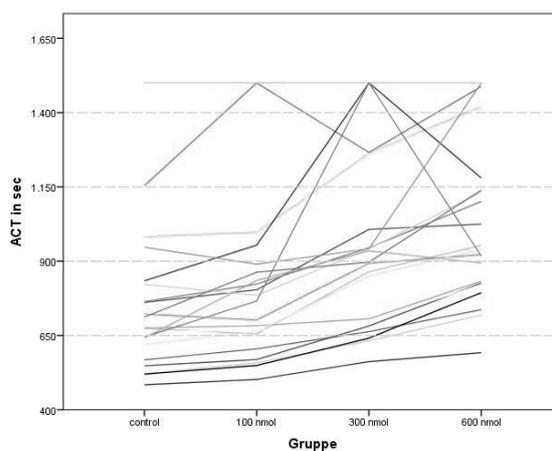


Abb. 13b

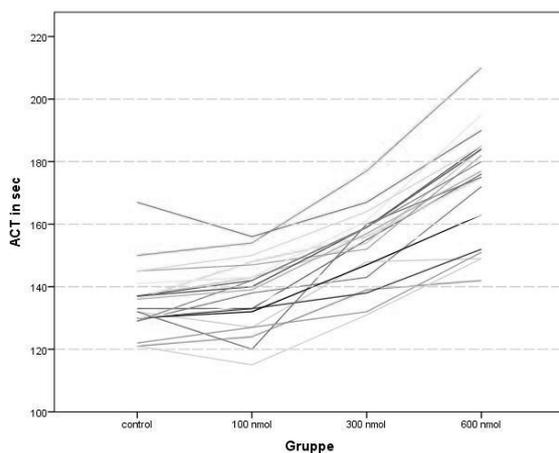


Abb. 13c

**Abb. 13: Hemochron Kaolin T1-3 in Einzeldarstellung
Konzentrationsabhängiger Anstieg der ACT**

In Abbildung 14 ist graphisch die Korrelation zwischen den Hemochron Kaolin Messungen ohne und mit Zugabe von 600nM MDCO2010 zu den Zeitpunkten T1 und T2 dargestellt.

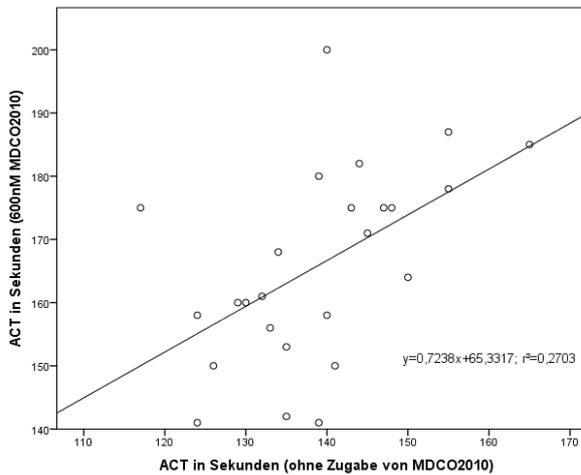


Abb. 14a: T1 Hemochron Kaolin

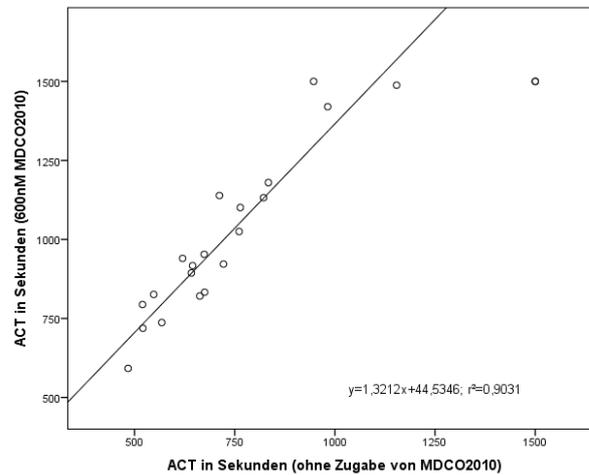


Abb. 14b: T2 Hemochron Kaolin

Abb. 14: Korrelation ACT Hemochron Kaolin zu T1 und T2 ohne Zugabe von MDCO2010 und mit 600nM MDCO2010

Abbildung 15 und 16 stellen die Korrelationen zwischen den Hemochron Kaolin Messungen und den Medtronic Kaolin Messungen ohne und mit Zugabe von 600nM MDCO2010 zu den Zeitpunkten T1 und T2 dar.

Hier sei nochmal darauf hingewiesen, dass sich die maximale Zählzeit der beiden Geräte unterscheidet (ACT Hemochron 1500 sec, ACT Medtronic 999 sec).

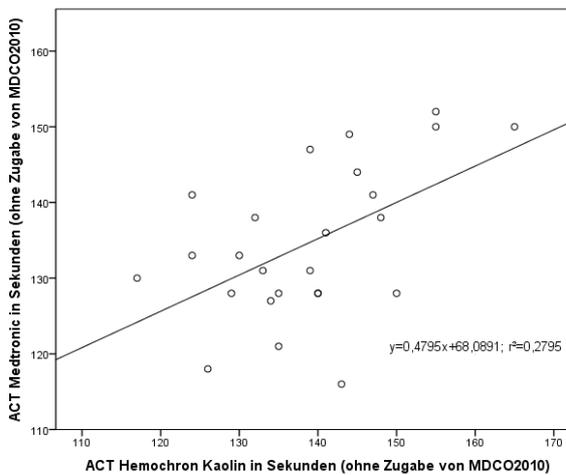


Abb. 15a: T1 ACT Hemochron Kaolin und ACT Medtronic ohne Zugabe von MDCO2010

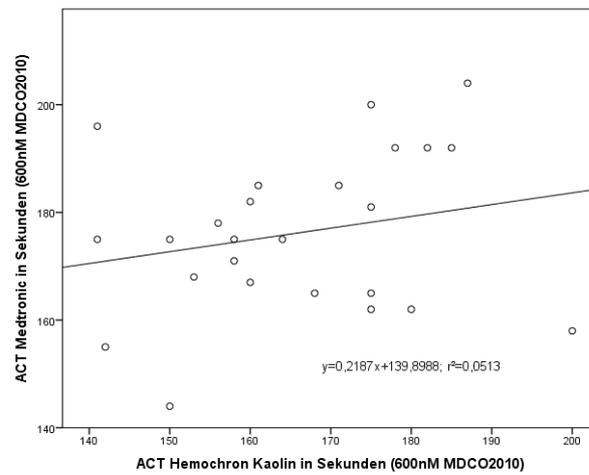


Abb. 15b: T1 ACT Hemochron Kaolin und ACT Medtronic mit 600nM MDCO2010

Abb. 15: Korrelation T1 ACT Hemochron Kaolin und ACT Medtronic ohne Zugabe von MDCO2010 und mit 600nM MDCO2010 (CAVE: unterschiedliche obere Grenzwerte!)

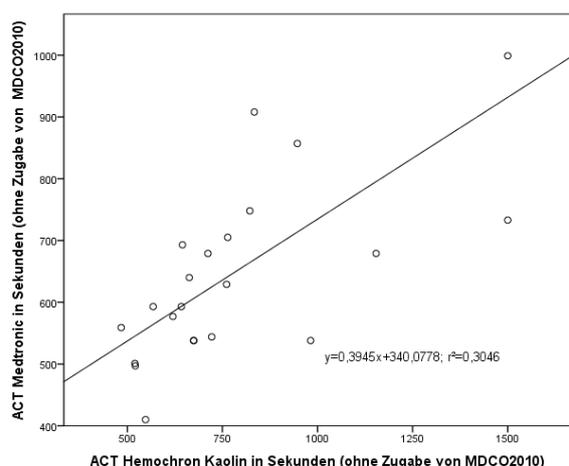


Abb. 16a: T2 ACT Hemochron Kaolin und ACT Medtronic ohne Zugabe von MDCO2010

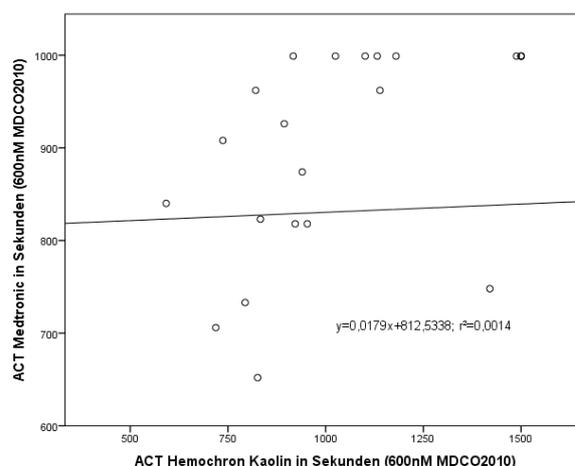


Abb. 16b: T2 ACT Hemochron Kaolin und ACT Medtronic mit 600nM MDCO2010

Abb. 16: Korrelation T2 ACT Hemochron Kaolin und ACT Medtronic ohne Zugabe von MDCO2010 und mit 600nM MDCO2010

Tabelle 6 zeigt die Daten der Hemochron Celite Messungen zu den Zeitpunkten T1-3. Unter Zugabe von 600nM MDCO2010 zeigte sich zu jedem Messzeitpunkt ein signifikanter Anstieg der ACT.

Tab. 6: ACT Hemochron Celite. Übersicht über die Ergebnisse der Messzeitpunkte T1-T3 in allen Gruppen

*T1: $p < 0,05$ control vs Gruppe 3 (600nM)

*T2: $p < 0,05$ control vs. Gruppe 3 (600nM)

*T3: $p < 0,05$ control vs. Gruppe 3 (600nM)

	Gruppe	Mittelwert	Min./Max.
T1 Hemochron Celite	control	140±12	111/166
	600 nmol	171±15	140/196
T2 Hemochron Celite	control	726±273	391/1500
	600 nmol	926±258	537/1500
T3 Hemochron Celite	control	139±16	101/176
	600 nmol	175±21	147/221

In Abbildung 17 sind die Korrelationen zwischen der Hemochron Kaolin und der Hemochron Celite Messung ohne und mit Zugabe von 600nM MDCO2010 zu Zeitpunkt T1 dargestellt.

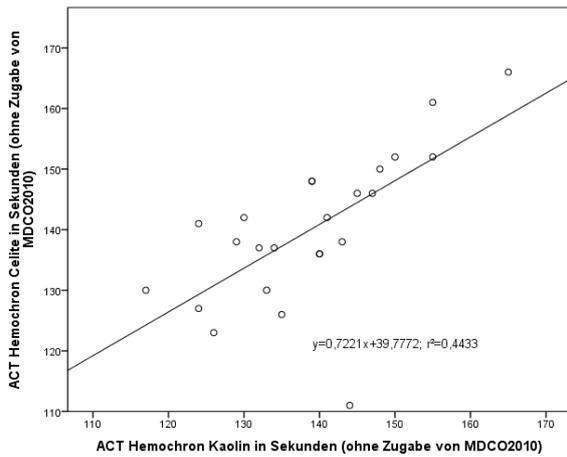


Abb. 17a: T1 ACT Hemochron Kaolin und ACT Hemochron Celite ohne Zugabe von MDCO2010

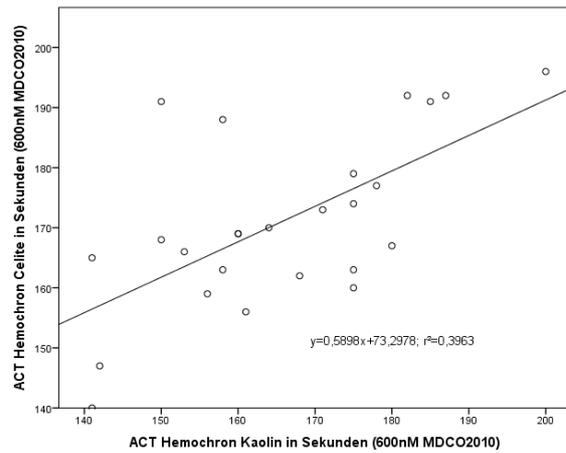


Abb.17b: T1 ACT Hemochron Kaolin und ACT Hemochron Celite mit 600nM MDCO2010

Abb. 17: Korrelation T1 ACT Hemochron Kaolin und ACT Hemochron Celite ohne Zugabe von MDCO2010 und mit 600nM MDCO2010

Abbildung 18 zeigt analog zu Abbildung 17 die Korrelation zwischen der ACT Hemochron Kaolin und ACT Hemochron Celite Messung ohne und mit Zugabe von MDCO2010 zu Zeitpunkt T2.

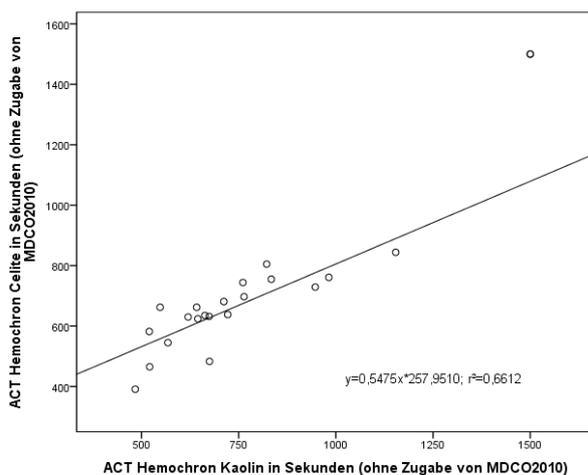


Abb. 18a: T2 ACT Hemochron Kaolin und ACT Hemochron Celite ohne Zugabe von MDCO2010

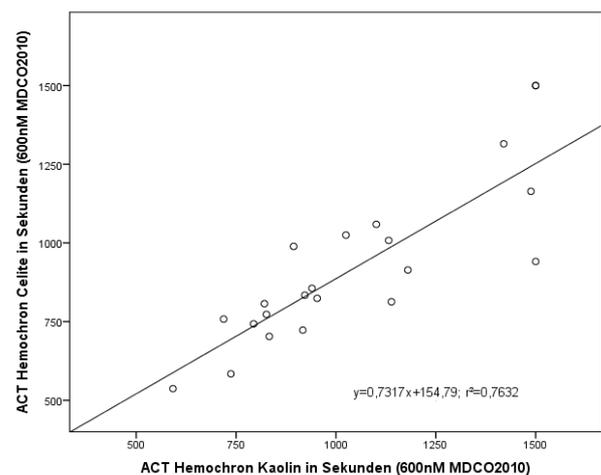


Abb. 18b: T2 ACT Hemochron Kaolin und ACT Hemochron Celite mit 600nM MDCO2010

Abb. 18: Korrelation T2 ACT Hemochron Kaolin und ACT Hemochron Celite ohne Zugabe von MDCO2010 und mit 600nM MDCO2010

5.1.5 ROTEM- Analyse

5.1.5.1 CT- und rh-tPA Wirkungsanalyse

Im ROTEM zeigte sich zu Zeitpunkt T3 im exTEM und inTEM ein signifikanter Anstieg der CT unter MDCO2010 in allen Gruppen (Tab.7).

Tab. 7: ROTEM Analyse. Konzentrationsabhängiger Anstieg der CT im exTEM, inTEM und hepTEM zu Zeitpunkt T3

	Gruppe	Mittelwert	Min./Max.
T3 Extem CT	control	65±7,8	54/83
	100 nM	72±9,9	54/95
	300 nM	80±9,4	63/101
	600 nM	83±19,6	17/111
T3 Intem CT	control	192±26,1	152/258
	100 nM	213±25,5	172/264
	300 nM	248±31,5	204/328
	600 nM	284±42,3	215/416
T3 Heptem CT	control	219±49,5	0/332
	100nM	253±53,1	100/394
	300nM	331±269,0	216/1958
	600nM	363±252,5	228/1852

Die Abbildungen 19-21 stellen graphisch den konzentrationsabhängigen Anstieg der CT unter MDCO2010 zu Zeitpunkt T3 als Medianwert dar. Dargestellt sind die Ergebnisse der exTEM, inTEM und hepTEM Messung. Die roten Kreuze kennzeichnen signifikante Ergebnisse.

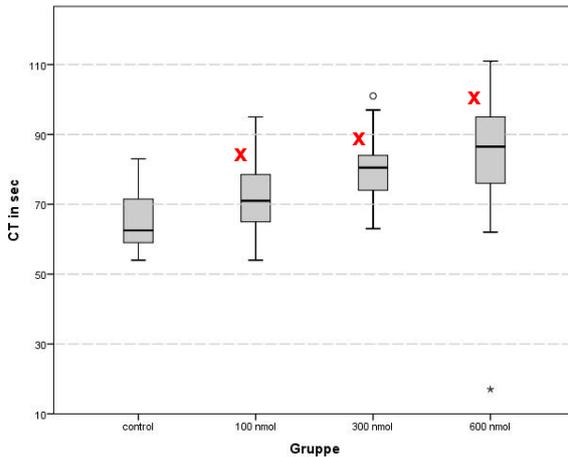


Abb. 19: T3 exTEM
Anstieg der CT mit steigenden MDCO2010-Konzentrationen
* $p < 0,05$ vs. control

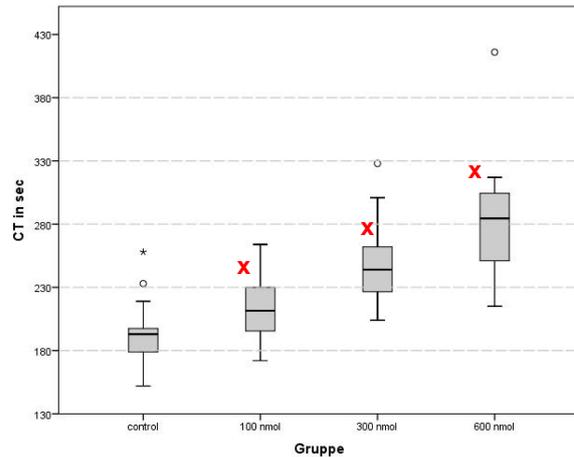


Abb. 20: T3 inTEM
Anstieg der CT mit steigenden MDCO2010-Konzentrationen
* $p < 0,05$ vs. control

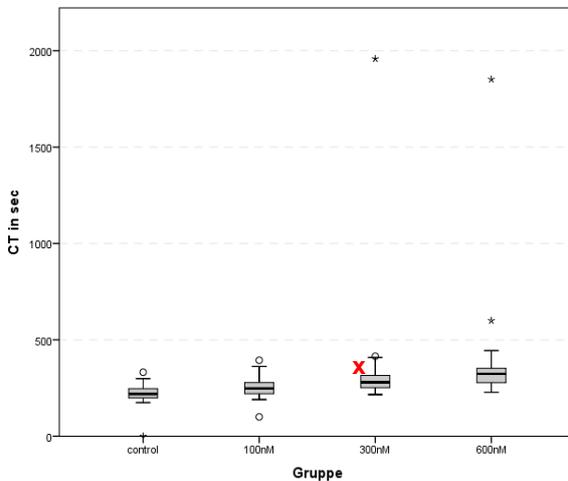


Abb. 21: T3 hepTEM
Anstieg der CT mit steigenden MDCO2010-Konzentrationen
* $p < 0,05$ vs. control

× Die roten Kreuze kennzeichnen zum Ausgangspunkt signifikante Ergebnisse.

Um die Fibrinolyse zu stimulieren und dadurch die antifibrinolytische Wirksamkeit von MDCO2010 testen zu können, wurde den Blutproben neben MDCO2010 eine definierte Menge rh- tPA zugefügt (s. 3.7).

Der Anstieg des LI60 in T1 war in jeder Gruppe signifikant, in T3 war der Anstieg der LI60 nicht signifikant (Tab.8). Hierbei ist zu berücksichtigen, dass alle Patienten intraoperativ mit dem Antifibrinolytikum TA behandelt wurden.

**Tab. 8: T1 LI60: Konzentrationsabhängiger Anstieg des LI60 unter rh- tPA.
T3 LI60: kein konzentrationsabhängiger Anstieg des LI60 unter rh- tPA**

	Gruppe	Mittelwert	Min./Max.
T1 rh-tPA LI60 (%)	control	15±24,6	0/91
	100 nM	26±28,9	0/90
	300 nM	42±28,2	3/88
	600 nM	72±13,1	44/89
T3 rh-tPA LI60 (%)	control	92±2,3	87/96
	100 nM	92±2,5	89/97
	300 nM	92±3,2	86/96
	600 nM	93±2,4	89/97

Tabelle 9 zeigt zu Zeitpunkt T1 die konzentrationsabhängige Verlängerung der LOT unter Zugabe von rh- tPA:

Tab. 9: Dosisabhängige Verlängerung der Lysis Onset Time (LOT)

	Gruppe	Mittelwert	Min./Max.
T1 rh-tPA LOT (sec)	control	1517±297,4	1147/2200
	100 nM	1996±463,2	1218/3333
	300 nM	2394±314,3	1876/2962
	600 nM	2883±275,7	2348/3424

Abbildung 22 stellt graphisch die exTEM Messung in T1 unter Zugabe von rh-tPA dar. Die roten Kreuze kennzeichnen zum Ausgangspunkt signifikante Ergebnisse. Mit steigenden MDCO2010- Konzentrationen ist hier eine signifikante Abnahme der Gerinnselyse zu sehen. Zu Zeitpunkt T3 konnte selbst unter Zugabe von höheren rh-tPA Konzentrationen keine Lyse mehr erzielt werden.

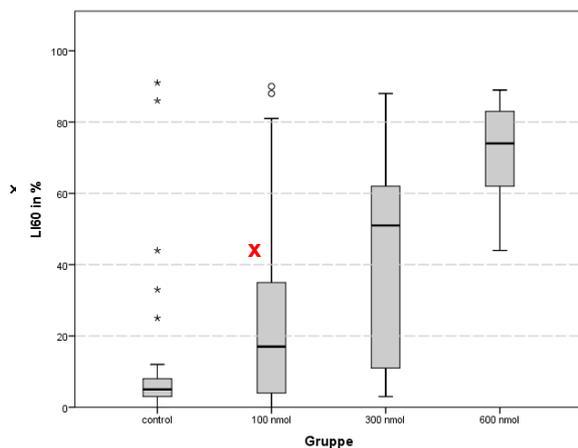


Abb. 22: T1: Anstieg der LI60 unter steigenden MDCO2010 Konzentrationen unter Zugabe von rh-tPA

*** $p < 0,05$ vs. control**

Die roten Kreuze markieren signifikante Ergebnisse.

Die Abbildungen 23 und 24 zeigen exemplarisch Screenshots der in T1 und T3 durchgeführten exTEM- Messungen unter

rh-tPA.

In T1 (Abb. 23) ist eine deutliche Abnahme ($p < 0,05$) der Hyperfibrinolyse mit steigenden MDCO2010- Konzentrationen zu sehen.

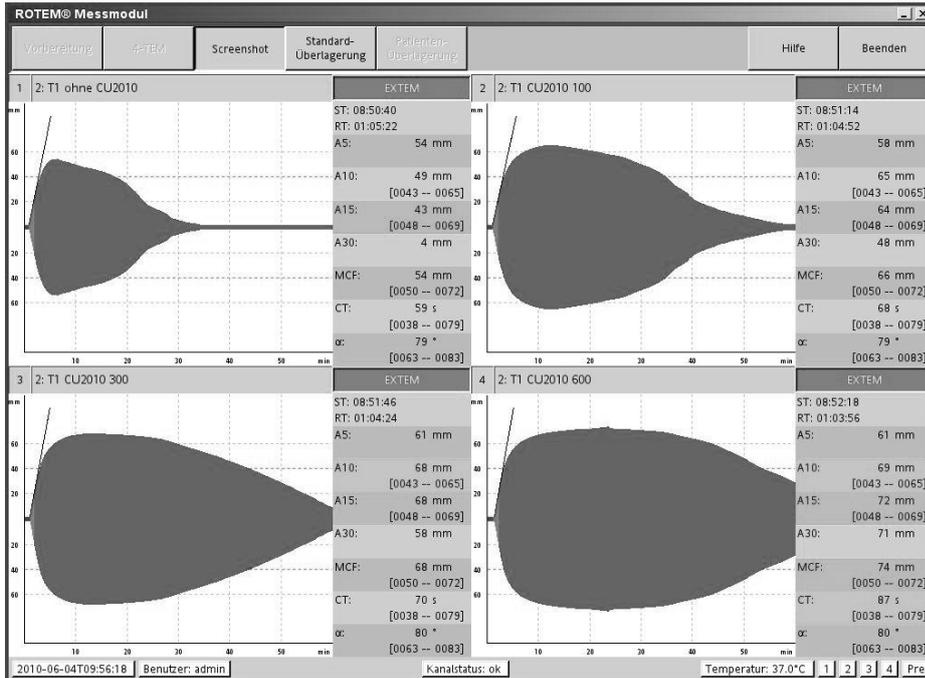


Abb. 23: T1 exTEM mit rh-tPA mit steigenden MDCO2010 Konzentrationen ist eine deutliche Abnahme der Hyperfibrinolyse erkennbar.

In T3 (Abb. 24) ist auch mit hohen rh-tPA- Dosen (40mcl) keine Hyperfibrinolyse mehr initierbar. Dieser Effekt ist den hohen Dosen an Tranexamsäure, die alle Patienten erhielten, zuzuschreiben.

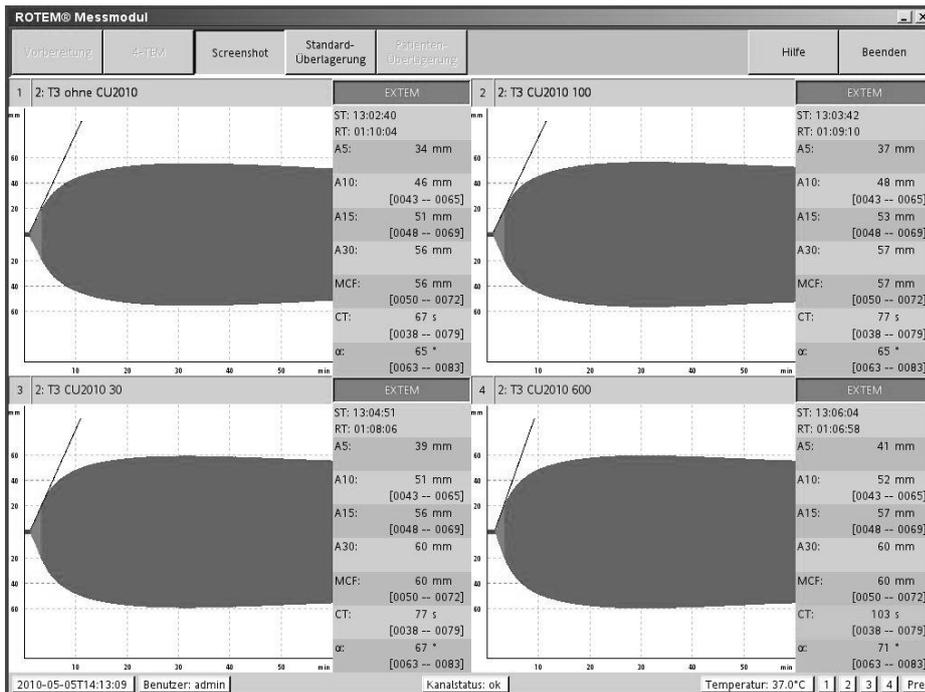


Abb. 24: T3 exTEM mit rh-tPA

Unter hohen rh-tPA Konzentrationen (40mcl) ist selbst ohne Zugabe von MDCO2010 keine Hyperfibrinolyse mehr initiierbar. Dies ist offenbar die TA- Wirkung zurückzuführen.

5.1.6 Laborchemische Daten

Die aPTT Werte zum Zeitpunkt T3, also postoperativ, sind in Tabelle 10 dargestellt. Es zeigte sich ein konzentrationsabhängiger Anstieg der aPTT.

Tab. 10: Anstieg der aPTT (sec) mit steigenden MDCO2010- Konzentrationen zu Zeitpunkt T3

	aPTT 0nM	aPTT 100nM	aPTT 300nM	aPTT 600nM
Mittelwert	37,3±4,70	44,1±7,21	51,3±7,60	64,7±10,16
Min./Max.	30,8/45,5	32,8/57,6	39,6/66,8	50,7/87,6

Abbildung 25 stellt graphisch die Verlängerung der aPTT mit steigenden MDCO2010-Konzentrationen dar. Die roten Kreuze markieren zum Ausgangspunkt signifikante Ergebnisse.

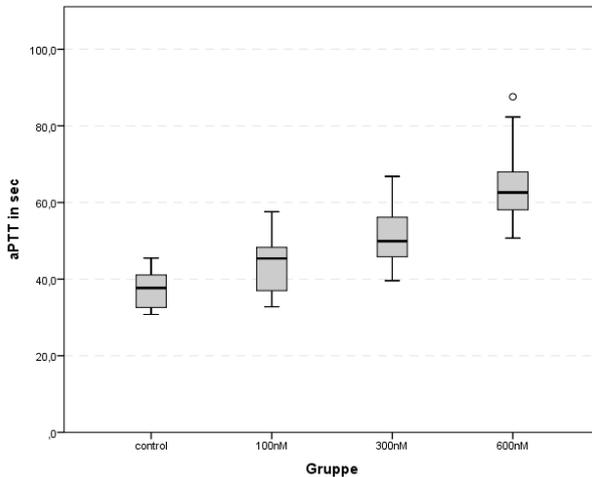


Abb. 25: Konzentrationsabhängiger Anstieg der aPTT zu Zeitpunkt T3
 $\times p < 0,05$ vs. Control
Die roten Kreuze kennzeichnen signifikante Ergebnisse.

Die in den Überständen der Zitratmonovetten gemessenen MDCO2010- Spiegel zum Zeitpunkt T3 liegen im Bereich der erwünschten Zielkonzentration (Tab.11).

Abbildung 26 stellt graphisch die Streuung der Einzelwerte um die erwünschte MDCO2010- Konzentration dar. Insgesamt konnte die gewünschte Zielkonzentration durch Berechnung mittels des aktuellen Hämatokrits (s. 3.6) sehr gut erreicht werden.

Tab. 11: MDCO2010- Spiegel zu Zeitpunkt T3.

Die Ergebnisse liegen im Bereich der erwünschten Zielkonzentration

	100nM	300nM	600nM
Mittelwert	108±18,0	268±28,3	546±57,8
Min./Max.	82/156	206/324	428/648

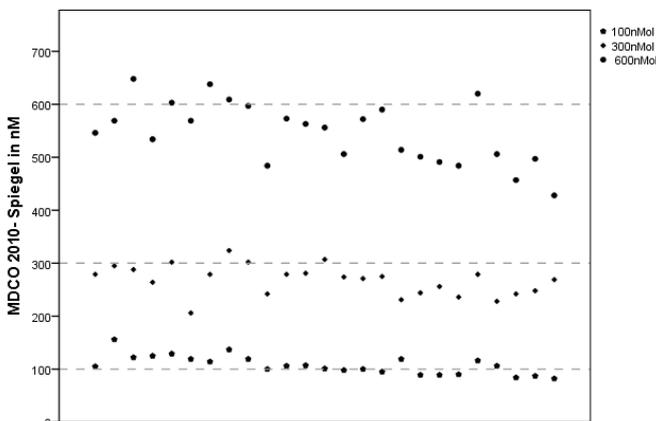


Abb. 26: Streuung der gemessenen MDCO2010- Spiegel um die erwünschte Zielkonzentration (Teilstriche)

Tabelle 12 enthält die Daten der MDCO2010- Überstände gemessen im Überstand der ACT Röhrchen mit 600nM MDCO2010 zu Zeitpunkt T2. Diese Messung wurde zum

Ausschluss einer Interaktion zwischen MDCO2010 und einem der Gerinnungsaktivatoren (Kaolin, Celite) wie er bei Aprotinin beschrieben wurde[27]. Im Unterschied hierzu erfolgten die MDCO2010- Spiegelmessungen im Citratblut, um zu überprüfen, ob die tatsächliche MDCO2010- Konzentration der erwarteten entspricht.

Tab. 12: MDCO2010- Spiegel(nM) im Überstand der Hemochron-Messungen nach einer Zugabe von 600nM MDCO2010. Die Überstände unterscheiden sich signifikant voneinander. $p < 0,05$ Celite vs. Kaolin

	MDCO2010(Kaolin)	MDCO2010(Celite)
Mittelwert	408±72,9	479±62,8
Min./Max.	189/622	325/640

Abbildung 27 zeigt in einer Einzeldarstellung, dass die gemessenen MDCO2010- Spiegel im Celite-Überstand (dunkelgrau) signifikant höher liegen, als im Kaolin-Überstand (hellgrau). Für die Messung wurden die ACT Röhren zentrifugiert und die Überstände anschließend abpipettiert, um daraus den MDCO2010- Spiegel zu bestimmen (s. Methodenteil).

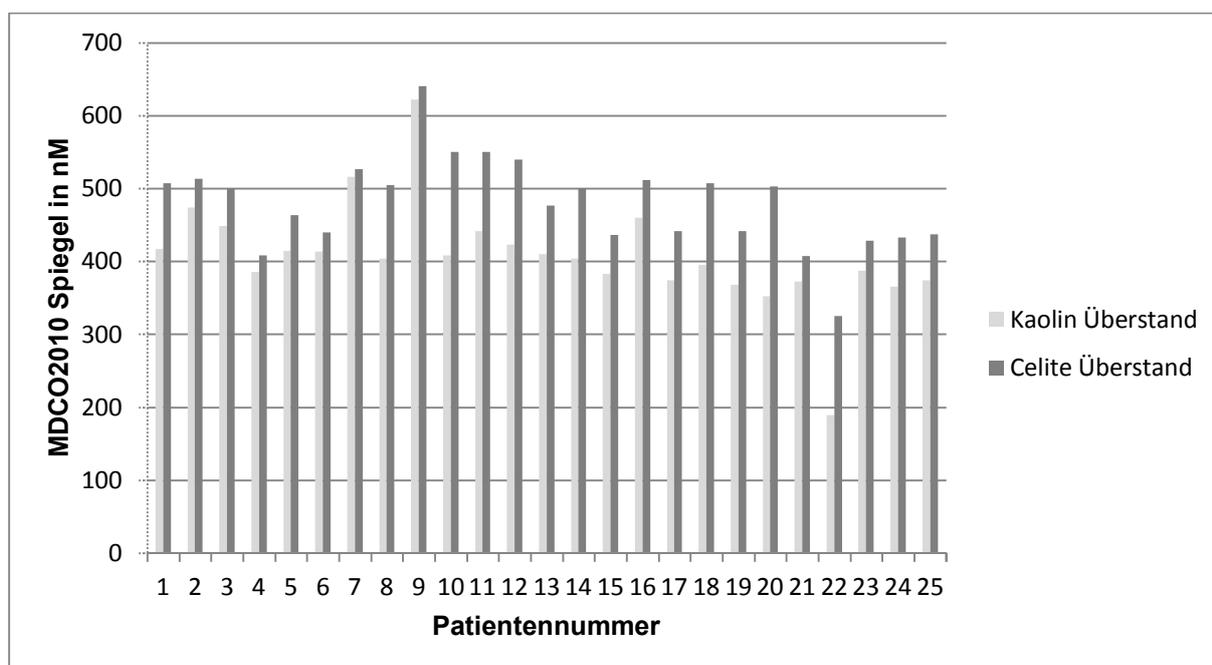


Abb. 27: MDCO2010- Spiegel im Kaolin/ Celite- Überstand in der Einzeldarstellung. Im Celite-Überstand wurden signifikant höhere MDCO2010- Spiegel gemessen

5.2 Ergebnisse der Phase II

5.2.1 Demographische Daten

In die Phase II der Studie wurden Plasmaproben von weiteren 21 Patienten untersucht (13m/8 w). Die demographischen Daten sind Tab. 13 zu entnehmen.

Tab. 13: *Demographische Daten der Phase II der Studie*

	Alter	Größe in cm	Gewicht in kg
Mittelwert	69±10,0	168±8,7	74±16,4
Min./Max.	52/86	150/188	49/108

5.2.2 Prä- und intraoperative Daten

Tabelle 14 zeigt eine Übersicht über die durchgeführten Eingriffe.

Tab. 14: *Übersicht über Art und Anzahl der durchgeführten Eingriffe*

	n	n%
AKE ^a	11	52,4
CABG ^b	6	28,6
CABG, AKE	2	9,5
AKE, MKE ^c	1	4,8
Myxomexstirpation	1	4,8
Gesamt	21	100,0

a. AKE- Aortenklappenersatz

b. CABG- Coronary Artery Bypass Graft

c. MKE- Mitralklappenersatz

5.2.3 Heparin Empfindlichkeit und Heparin Plasma Spiegel (Hepcon-Analyse)

5.2.3.1 T1

Mit Hilfe des Hepcon® wurden die Heparinempfindlichkeit mit und ohne MDCO2010-Zugabe, die Heparinplasmaspiegel sowie die zur Heparinantagonisierung notwendige Protamindosis bestimmt. ACT Werte sind in Tabelle 15 dargestellt. Bei dieser Untersuchung wurde nur eine MDCO2010- Konzentration (600nM) gegen die Kontrolle verglichen.

Sowohl der mit Hilfe des Hepcon® errechnete Heparinbolus, als auch die für die Ziel-ACT notwendige errechnete Plasmakonzentration liegen bei Zugabe von MDCO2010 signifikant unter den Werten der Kontrollgruppe. Es sei aber nochmals darauf hingewiesen, dass es sich hier um ex vivo Daten handelt, die Patienten also nach den Hepcon Daten ohne MDCO2010- Zugabe heparinisiert wurden.

Der errechnete Plasmaspiegel betrug in der Kontrollgruppe $4,5 \pm 0,84$ E/ml. Der errechnete Plasmaspiegel nach Zugabe von 600nM MDCO2010 betrug $2,4 \pm 0,53$ E/ml. Der errechnete Heparinbolus betrug in der Kontrollgruppe 28733 ± 7951 IU und in der MDCO2010- Gruppe 15914 ± 6293 IU ($p > 0,05$).

Tab.15: T1 Hepcon: Ergebnisse der ACT- Messung zur Heparin-Dosisfindung. Hierbei wird die zum Erreichen der Ziel ACT von 480sec notwendige Heparinmenge sowie der für die Ziel ACT notwendige Plasmaspiegel kalkuliert. Die Nummerierungen 1-6 bezeichnen die verschiedenen Kanäle. Prinzip der Messung ist eine einfache ACT Messung. Kanal 5+6 enthalten kein Heparin, die Kanäle 1+2/ 3+4 enthalten unterschiedliche Heparinkonzentrationen und kalkulieren die Heparinmenge, die für das Erreichen einer ACT von 480sec nötig ist. Die ACT- Messungen in der Medikamentengruppe ergaben signifikant höhere Werte als in der Kontrollgruppe.

		Mittelwert	Min./Max.
T1 ohne MDCO2010	ACT 1+2	$406 \pm 106,5$	274/761
	ACT 3+4	$292 \pm 47,4$	226/448
	ACT 5+6	$131 \pm 14,4$	89/154
	Heparin (E/ml)	$4,5 \pm 0,84$	3,7/6,9
	Heparin (IU)	$28732,9 \pm 7951,$	18961/46020
T1 mit MDCO2010 (600nM)	ACT 1+2	$548 \pm 81,6$	414/741
	ACT 3+4	$397 \pm 45,3$	326/496
	ACT 5+6	$171 \pm 16,6$	140/197
	Heparin (E/ml)	$2,4 \pm 0,53$	1,6/3,7
	Heparin (IU)	$15913,9 \pm 6292,$	7817/29322

Abbildung 28 stellt graphisch die ACT Ergebnisse der einzelnen Hepcon- Kanäle in der Kontrollgruppe und in der MDCO2010- Gruppe dar. Die ACT Werte der MDCO2010- Gruppe sind signifikant höher als in der Kontrollgruppe.

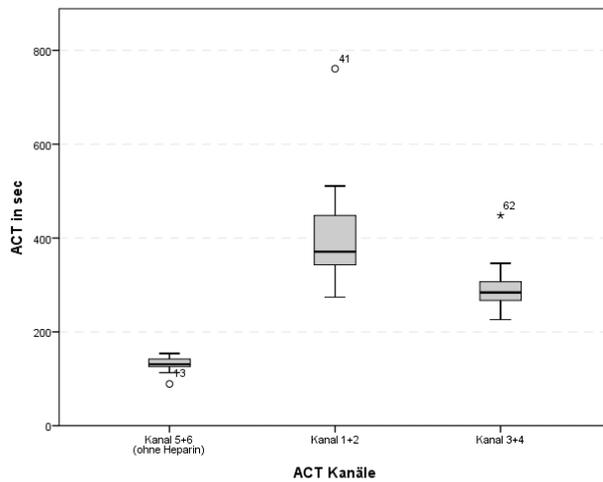


Abb. 28a: T1 Hepcon ohne MDCO2010

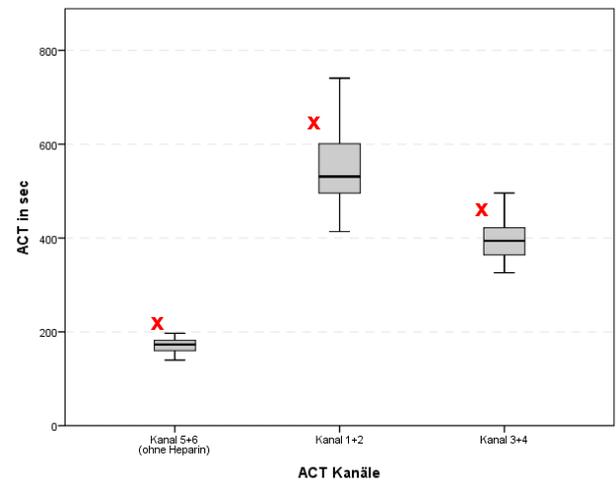


Abb. 28b: T1 Hepcon mit 600nM MDCO2010

Abb. 28: T1 Hepcon: ACT Ergebnisse der verschiedenen Kanäle ohne und mit Zugabe von MDCO2010
Die Ergebnisse der MDCO2010- Gruppe waren signifikant höher als die der Kontrollgruppe
 $\times p < 0,05$ vs. control
Die roten Kreuze kennzeichnen signifikante Ergebnisse.

Abbildung 29 stellt graphisch in Einzelwerten die auf Basis der ACT-Messungen kalkulierte Heparinmenge in der Kontrollgruppe und in der MDCO2010- Gruppe dar. Da die ACT Ergebnisse der MDCO2010- Messungen signifikant höher liegen, als die der Kontrollgruppe, kalkuliert das Hepcon signifikant weniger Heparin in der MDCO2010- Gruppe, um die geforderte ACT von 480 Sekunden zu überschreiten.

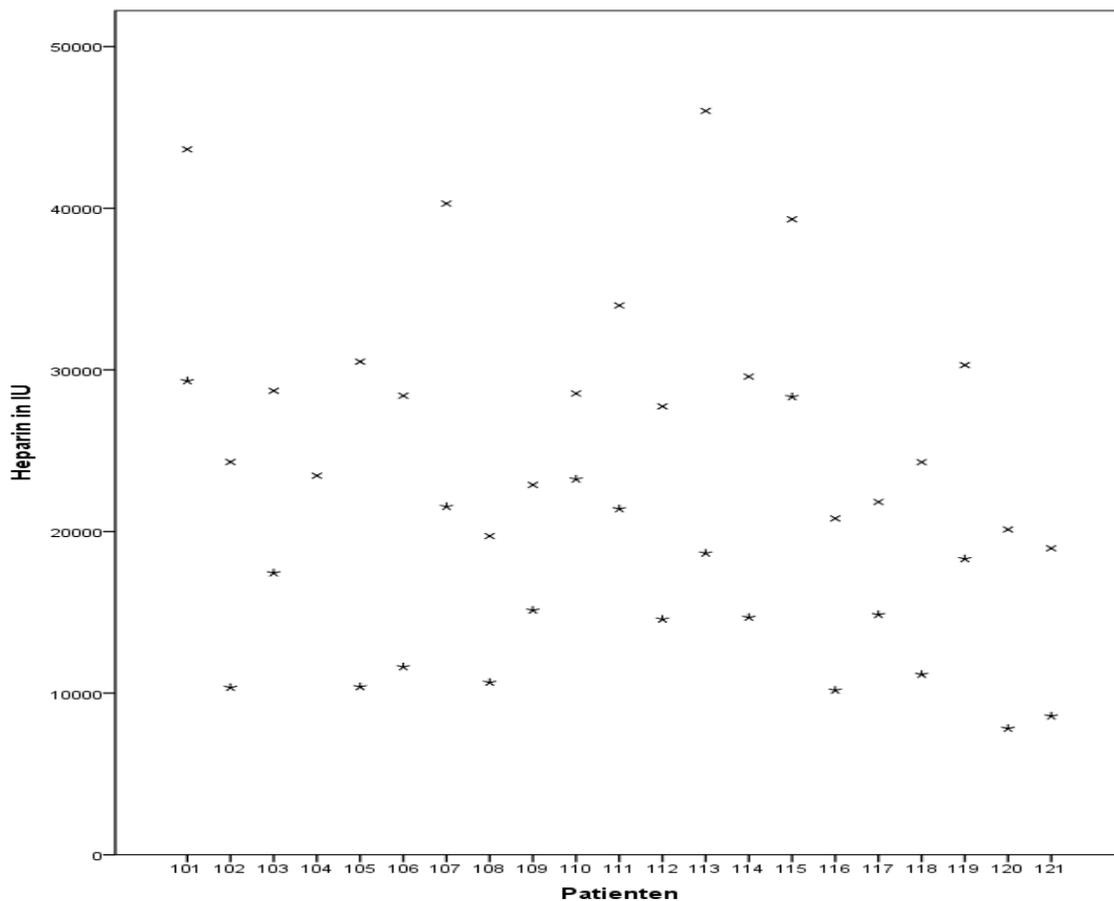


Abb. 29: Heparin in IU ohne MDCO2010 (Kreuz) und mit MDCO2010 (Stern)
Die kalkulierte Heparinmenge war unter 600nM MDCO2010 signifikant geringer als in der Kontrollgruppe. Es wurden also unter Zugabe von MDCO2010 immer niedrigere Heparinzieldosen errechnet.

5.2.3.2 T2 und T2.1

In T2 während der EKZ betragen die Heparinspiegel in der Kontrollgruppe $3,6 \pm 0,91\text{E/ml}$ mit einem Minimum von $2,0\text{E/ml}$ und einem Maximum von $5,4\text{E/ml}$, in der MDCO2010- Gruppe betragen die Heparinspiegel $3,4 \pm 3,4\text{E/ml}$ mit einem Minimum

von 2,0E/ml und einem Maximum von 4,8E/ml. Die Ergebnisse unterschieden sich signifikant voneinander.

In T2.1 betragen die im Hepcon bestimmten Heparinspiegel in der Kontrollgruppe $4,3 \pm 0,96$ E/ml mit einem Minimum von 3,4E/ml und einem Maximum von 6 E/ml, in der MDCO2010- Gruppe betragen sie $3,8 \pm 0,91$ E/ml mit einem Minimum von 2,7E/ml und einem Maximum von 5,4E/ml. Auch hier waren die Unterschiede signifikant.

Es ist aber anzumerken, dass die Heparinspiegelbestimmung durch das Hepcon nicht durch ein direktes Messverfahren, sondern anhand der sich in den einzelnen Kanälen befindlichen Protaminmenge nach dem Prinzip der Heparin- Protamin- Titration erfolgt. Die Heparinspiegelbestimmung erfolgt daher nicht linear, sondern in Intervallen von 0,6E/ml oder 0,7E/ml. Die gemessenen Unterschiede in den Heparinspiegeln differieren daher häufig um diese Intervalle (s. 3.5.4 Hepcon HMS Plus). Während der EKZ wurde mehrfach Heparin nachinjiziert, weswegen insgesamt in T2.1 häufig höhere Heparinspiegel gemessen wurden als in T2 (s. Tab.16).

Der anhand der Heparin- Protamin- Titration kalkulierte Protaminbolus zur Neutralisierung des Heparins betrug zu Zeitpunkt T2 in der Kontrollgruppe 32595 ± 10522 IU und in der MDCO2010- Gruppe 29505 ± 8713 IU. Zu T2.1 betrug der kalkulierte Protaminbolus in der Kontrollgruppe 34725 ± 10850 IU und in der MDCO2010- Gruppe 32129 ± 11357 IU. Die Ergebnisse unterschieden sich zu beiden Messzeitpunkten signifikant voneinander ($p < 0,05$).

Tab. 16: T2 und T2.1 Hepcon: Die Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und der MDCO2010- Gruppe waren sowohl bei der Heparinspiegelbestimmung (E/ml), als auch bei der Bestimmung des Heparin- und Protaminbolus (IU) signifikant ($p < 0,05$).

		T2 control	T2 MDCO2010	T2.1 control	T2.1 MDCO2010
Mittelwert	Heparin (E/ml)	$3,8 \pm 0,9$	$3,4 \pm 0,8$	$4,3 \pm 1,0$	$3,8 \pm 0,9$
	Heparin (IU)	5331 ± 3926	814 ± 1810	2308 ± 2577	764 ± 2206
	Protamin (IU)	32595 ± 10522	29505 ± 8713	34725 ± 10850	32129 ± 11357

5.2.3.3**5.2.3.4 T3**

Nach Protaminisierung (T3) betrug die Medtronic-ACT in der Kontrollgruppe $131 \pm 15,4$ sec, mit Zugabe von MDCO2010 dagegen $188 \pm 29,0$ sec mit einem Minimum von 151sec und einem Maximum von 251sec ($p < 0,05$). Bei einem Patienten war eine ACT unter MDCO2010 von 251sec gemessen worden bei nicht nachweisbarer Heparinplasmakonzentration.

6 Diskussion

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen, dass die Zugabe von MDCO2010 eine konzentrationsabhängige Verlängerung der extrinsischen und intrinsischen Gerinnungsmessungen zur Folge hat. Die ACT Messung wurde mit zwei unterschiedlichen handelsüblichen Geräten mit zwei verschiedenen Aktivatoren durchgeführt. Im Unterschied zu den ACT Messungen unter Aprotinin Behandlung [28-30] zeigen unsere ex vivo Experimente eine dosisabhängige Verlängerung der ACT, die unabhängig vom verwendeten Aktivator und ACT- Gerät ist. Auch die Messungen mittels ROTEM führten unabhängig vom Testansatz (exTEM, inTEM, hepTEM) zu einer dosisabhängigen, reproduzierbaren Verlängerung der CT.

Da MDCO2010 die ACT Messung beeinflusst, auf welcher die Heparinkalkulation des Hepcons beruht, verändern sich unter Zugabe von MDCO2010 die Ergebnisse der Heparinkalkulation. Der zweite Teil der Studie zeigt, dass die Berechnung des Heparinbedarfs mit diesem Gerät unter MDCO2010 niedrigere Werte als ohne MDCO2010 ergibt. Die Bestimmung des Heparinbedarfs vor der Gabe von MDCO2010 dagegen ergibt verlässliche Werte. Aufgrund des Studiendesigns kann jedoch nicht gesagt werden, ob es sich um eine reale Inhibierung der Gerinnung oder um ein ex vivo Artefakt handelt.

6.1 Antifibrinolytische Wirkung von MDCO2010

In der vorliegenden Studie aktivierten wir die Fibrinolyse durch die Zugabe von rh-tPA, um die antifibrinolytische Aktivität von MDCO2010 im ROTEM zu quantifizieren. Rh-tPA ist ein gentechnologisch hergestelltes Enzym, das die Fibrinolyse aktiviert. Als Medikament ist es unter dem Namen Alteplase (Actilyse® Boehringer Ingelheim) erhältlich und ist zur Behandlung von Myokardinfarkten, Schlaganfällen sowie in geringerer Dosis bei der tiefen Beinvenenthrombose indiziert[63-65]. Rh-tPA spaltet Plasminogen in das aktive Plasmin, welches Fibrin aufspaltet und so zur Gerinnungsförderung führt. MDCO2010 bindet dagegen an das aktive Zentrum des Plasmins und hemmt seine fibrinolytische Aktivität[55]. MDCO2010 und rh-tPA wirken in diesem Fall als Agonist und Antagonist.

In der vorliegenden Untersuchung wurde die Fibrinolyse in vitro durch rh-tPA induziert. Mit der von uns gewählten Dosis von rh-tPA wurde eine im ROTEM gut darstellbare und reproduzierbare Fibrinolyse induziert, wie die Ergebnisse in den ROTEM-Analysen zu Messzeitpunkt T1 zeigen. Diese wurde durch MDCO2010 suffizient und signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe gehemmt (s. Abb. 23). Der LI60 nahm dosisabhängig signifikant zu (s. Tab.8).

Zu Messzeitpunkt T3 konnte selbst unter 40ml rh-tPA auch in der Kontrollgruppe keine wesentliche Lyse mehr erreicht werden. Es gab keinen signifikanten Unterschied der LI60 zwischen den einzelnen MDCO2010- Konzentrationen (s. Abb. 24 und Tab.8). Die Ergebnisse in T3 sind auf die hohen Dosen Tranexamsäure zurückzuführen, die die Patienten zur Verringerung des postoperativen Blutverlustes erhielten, sodass selbst mit 40 ml rh-tPA keine Lyse mehr initiiert werden konnte.

Auch Englberger et al.[66] fanden in ihrer Phase II Studie zu MDCO2010 einen dosisabhängigen, antifibrinolytischen Effekt mit einer signifikanten D-Dimer Suppression sowie - wie in unserer Studie - einer signifikanten Hemmung der rh-tPA induzierten Lyse in der ROTEM Analyse (s. Tab.9). Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch Erdoes et al.[56], die unter MDCO2010 eine Verlängerung der LOT im ROTEM fanden.

6.2 Verlängerung der ACT unter MDCO2010

Die ACT ist der Standardparameter für das Gerinnungsmanagement mit Heparin während herzchirurgischer Operationen. Die ACT ist ein Vollblutgerinnungstest mit Aktivator, der die Zeit bis zur Gerinnung misst. Dabei wird von einer linearen Beziehung zwischen Heparinplasmaspiegel und Gerinnung im Patienten ausgegangen[60].

Herzchirurgische Eingriffe mit HLM erfordern vor Beginn der EKZ eine Vollheparinisierung des Patienten. Die ACT sollte dabei zwischen 300 und 480 Sekunden liegen[67, 68]. Zur Vermeidung größerer Blutverluste wird in vorliegender Studie protokollgemäß ein Antifibrinolytikum bereits in der Narkoseeinleitung und

anschließend kontinuierlich während des Eingriffs verabreicht. Anschließend erfolgt die Heparin-gabe unter regelmäßiger Kontrolle der ACT. Bei einer in vitro Interaktion des Antifibrinolytikums mit dem Gerinnungsaktivator der ACT- Messung und somit artifizieller Verlängerung der ACT, wie es von manchen Autoren unter Aprotinin vermutet wird[30, 69], bestünde die Gefahr der Unterheparinisierung des Patienten mit den Folgen thrombembolischer Ereignisse.

MDCO2010 ist ein synthetischer Serinproteaseninhibitor, der durch Blockierung des aktiven Zentrums von Plasmin zu einer Inhibition der Fibrinolyse führt[55]. Wie Aprotinin besitzt MDCO2010 die Fähigkeit die Gerinnungsfaktoren Xa und XIa zu inhibieren, was sich laborchemisch durch eine verlängerte aPTT und CT in der inTEM Messung des Rotems zeigt[55]. Seine gute Steuerbarkeit ist durch die relativ kurze Halbwertszeit von zwanzig Minuten nach intravenöser Gabe erklärt[54]. MDCO2010 scheint nach ersten Studienergebnissen eine zum Aprotinin vergleichbare Plasmininhibition und eine stärkere Plasma- Kallikrein- Inhibition aufzuweisen. Die Plasma- Kallikrein- Inhibition durch MDCO2010 erfolgt im Unterschied zu Aprotinin dabei schon bei antifibrinolytischen Konzentrationen[55]. Szabo et al.[54] untersuchten und verglichen in ihrer Studie im Tiermodell den Effekt neuer Serinproteaseninhibitoren (CU2010 = MDCO2010¹[70], CU2020) im Vergleich zu Aprotinin bezüglich des perioperativen Blutverlustes und der Gerinnungsparameter ACT, aPTT und TPZ. Sowohl MDCO2010 (CU2010) als auch CU2020 führten zu einem signifikant geringeren postoperativen Blutverlust. In der Kontrollgruppe wie auch in der Aprotinin- Gruppe normalisierten sich postoperativ nach Protamingabe die ACT und aPTT. In der MDCO2010- und CU2020- Gruppe blieben die ACT und aPTT erhöht, was als günstigeres antithrombotisches Profil der neuen Serinproteaseinhibitoren gewertet wurde.

Kim et al.[57] untersuchten den in vitro Effekt von MDCO2010 auf die ACT Messungen unterschiedlicher Geräte (Medtronic, Hemochron, Helena) und Aktivatoren (Kaolin, Celite). In der ersten Phase der Studie wurden die ACT Messungen mit Blutproben gesunder Freiwilliger durchgeführt. In der zweiten Phase wurden die Messungen an Blutproben herzchirurgischer Patienten vor, während und nach der EKZ durchgeführt.

¹ Die Namensänderung erfolgte 2008, nachdem Curacyte AG ihr in Leipzig ansässiges Tochterunternehmen Curacyte Discovery GmbH an The Medicines Company (MDCO) verkaufte.

Testkonzentrationen waren in beiden Phasen der Studie jeweils 100nM und 500nM MDCO2010. MDCO2010 verlängerte konzentrationsabhängig, unabhängig vom verwendeten Aktivator und Gerät, die ACT sowohl in den Blutproben gesunder Freiwilliger, als auch in den Blutproben der herzchirurgischen Patienten. Besonders in hohen MDCO2010- Konzentrationen war die ACT- Verlängerung hochsignifikant ($p < 0.001$ versus 100nM und control). Die ACT Verlängerung mit Kaolin als Aktivator war dabei unabhängig vom verwendeten Gerät signifikant geringer ($p < 0.001$) im Vergleich zu den Celite- basierten ACT Messungen mit Helena Cascade® POC (Helena Laboratories, Beaumont, TX). Diese Ergebnisse werden durch vorliegende Daten bestätigt.

Da sowohl Hemochron als auch Medtronic routinemäßig verwendete Geräte zum intraoperativen Heparinmonitoring sind, führten wir in unserer Studie die Messungen mit beiden Geräten durch. Zudem erfolgt die ACT Bestimmung des Medtronic Geräts nach dem gleichen Prinzip wie die ACT Messung des Hepcons, sodass sich hier zumindest indirekt eine Vergleichbarkeit zwischen den Daten der beiden Geräte ergibt.

Die Ergebnisse unserer Studie zeigen wie die Arbeit von Kim et al.[57] eine dosisabhängige, Geräte-/ und Aktivator- unabhängige Verlängerung der ACT unter MDCO2010. Im Gegensatz zur Arbeit von Kim et al.[57], die signifikant höhere ACT Level in den Celite- basierten Messungen fanden, konnten wir in unserer Studie zu den Zeitpunkten T1 und T3 keinen signifikanten Unterschied zwischen den Kaolin-/ und Celite- basierten Hemochron Messungen feststellen. Zu Zeitpunkt T2 war die ACT in der Kaolin- basierten Hemochron Messung sowohl in der Kontrollgruppe, als auch in der MDCO2010- Gruppe (600nM) signifikant höher als in der Celite- basierten Messung. Die Gründe für diesen unerwarteten Befund müssen weitere Studien untersuchen.

Despotis et al.[69] fanden, dass hohe Heparinkonzentrationen zu Schwankungen in der Kaolin- basierten ACT Messung führten, sobald eine ACT von 500 Sekunden überschritten wurde. In der Studie von Dalbert et al.[71] waren ACT- Werte über 480 Sekunden mit unzuverlässigeren Kaolin- basierten ACT Ergebnissen assoziiert. Die in unserer Studie während der EKZ gemessenen, Kaolin- basierten ACT Hemochron Werte lagen mit 784 ± 282 sec (Kontrolle), beziehungsweise 1042 ± 283 sec (600nM

MDCO2020), weit über den angestrebten 480 Sekunden. Die Celite- basierten Hemochron Messungen waren mit 726 ± 273 sec (control), beziehungsweise 926 ± 258 sec (600nM MDCO2010), zwar signifikant niedriger als die Kaolin Messungen, lagen jedoch ebenso deutlich über den geforderten 480 Sekunden, sodass wir keinen Hinweis auf die Gefahr einer Unterheparinisierung sehen konnten. Da in einigen Studien die Möglichkeit unzureichender Heparinisierung auf Grund veränderter ACT Messungen unter der Behandlung mit Proteaseninhibitoren –speziell dem Aprotinin- diskutiert wurden[35, 39], kommt der Messung der Heparinisierung mit Hilfe der ACT unter der Behandlung mit Proteaseninhibitoren eine besondere Bedeutung zu. Dieses Problem wurde in Studien zur Aprotinin Behandlung ausführlich diskutiert. Einige dieser Studien wurden später methodisch kritisiert[35, 36]. Weitere Studien versuchten zu klären, ob es sich bei der Celite- aktivierten ACT- Verlängerung unter Aprotinin, um einen in vitro Effekt oder um eine „echte“ ACT- Verlängerung im Sinne einer antikoagulatorischen Wirkung des Aprotinins handelt. Dabei wurde in einigen Studien vermutet, dass der Oberflächenaktivator Celite in Kombination mit Heparin zu einer artifiziellen Verlängerung der ACT führt, und ein Heparinmonitoring mit Kaolin- basierten ACT- Messungen empfohlen[30, 69, 72].

Andere Studien zeigten, dass Aprotinin die Celite- basierte ACT nicht verlängert, sondern die Kaolin- basierte ACT verkürzt[28, 29]. Dietrich et al.[29] untersuchten in ihrer Arbeit den Einfluss von Celite und Kaolin auf die ACT Messung unter Aprotinin. Hierfür wurden 11 Patienten, die im Rahmen herzchirurgischer Eingriffe Aprotinin (6×10^6 KIU) erhielten und vor der EKZ vollheparinisiert wurden (375U/kg vor EKZ), Blut entnommen. Anschließend wurde die ACT sowohl mit Kaolin, als auch mit Celite bestimmt. Die Kaolin-/bzw. Celite- aktivierten Blutproben und eine zusätzliche native Blutprobe wurden daraufhin zentrifugiert und das Plasma für die spätere Aprotininspiegelbestimmung eingefroren. Die Aprotininspiegel in den Celite- aktivierten Blutproben waren unwesentlich niedriger als in den nativen Blutproben. Die Aprotininspiegel in den Kaolin- aktivierten Proben dagegen waren signifikant geringer beziehungsweise nahezu nicht mehr messbar. Im neutralen Milieu ist Aprotinin hochpositiv geladen, während Kaolin negativ geladen ist. Daher nahmen Dietrich et al. als Grund für die signifikant geringeren Aprotininspiegel in den Kaolin- Proben an, dass Aprotinin aufgrund der unterschiedlichen elektrischen Ladung in vitro an Kaolin gebunden ist und daher in der Küvette nicht seinen gerinnungsverlängernden Effekt

entfalten kann. Demnach wird die ACT unter Celite und Aprotinin nicht etwa „artifizial“ verlängert, sondern unter Kaolin „artifizial“ verkürzt.

In unserer Arbeit zeigten sich höhere MDCO2010- Spiegel in den Celite- aktivierten Hemochron Röhrchen. Gleichzeitig waren die Gerinnungszeiten unter Kaolin signifikant länger als unter Celite. Die Frage, ob es sich hierbei um einen in vitro Effekt unter Kaolin handelt, der die gerinnungsverlängernden Eigenschaften von MDCO2010 potenziert, oder die Gerinnungszeiten unter Celite artifizial verkürzt sind, lässt sich aus vorliegenden Daten nicht eindeutig beantworten.

Dennoch konnten wir zeigen, dass- wenn sich auch die ACT signifikant unterschied- die Kaolin- und Celite- basierten Hemochronmessungen dennoch sehr gut miteinander korrelierten (s. Abb. 17 + Abb. 18). Die Abbildungen 15+16 zeigen die Korrelation zwischen der ACT Hemochron Kaolin und der Medtronic- Messung mit Kaolin. Hier konnte keine Korrelation gezeigt werden, wobei einschränkend daraufhingewiesen werden muss, dass die Zählzeiten der ACT- Geräte sich unterschieden (Hemochron 1500 sec, Medtronic 999 sec). Sowohl in Abb. 15b (T1), als auch 16b (T2), die beide die Ergebnisse unter Zugabe von 600nM MDCO2010 zeigen, wurde bei beiden Geräten häufig der obere Messwert erreicht, sodass hier auch keine gute Korrelation zu erwarten war.

Die Diskussion um die korrekte Heparinisierung und deren Messung ist immer noch sehr aktuell und die Kontroverse hält bis heute an. So kritisiert die kanadische Arzneimittelbehörde bei ihrer Analyse der Daten der BART- Studie die unterschiedlichen aPTT und ACT Werte zwischen Kontroll- und Aprotinigruppe und führt die schlechteren Ergebnisse der Aprotinin- Patienten zum Teil auf diese Unterschiede zurück und begründet damit die Wiedezulassung von Aprotinin[73].

6.2.1 Bewertung der ACT Messung

Seit über 50 Jahren wird die ACT für das Gerinnungsmonitoring bei herzchirurgischen Eingriffen verwendet[60]. Trotz einiger Unsicherheiten des Messverfahrens ist die ACT Messung weiterhin Standard des herzchirurgischen Gerinnungsmanagements. Durch

einen Oberflächen Aktivator wird, ähnlich wie bei der aPTT Messung, die intrinsische Gerinnung aktiviert. Schnelle Ergebnisse, einfache Handhabung, geringere Blutprobenmengen und lange Erfahrung mit dieser Methode sind Vorteile der ACT Messung gegenüber anderen Gerinnungstests (z.B. ROTEM s.u.), die oft sehr spezifisch sind und keinen Gesamtüberblick über die Gerinnungssituation des Patienten geben können. Standardgerinnungstests wie die aPTT oder TPZ messen die Plasmagerinnungsaktivität, ohne jedoch die Thrombozytenfunktion erfassen. Da die ACT Messung mit Vollblut durchgeführt wird, wird hierbei unspezifisch auch die Thrombozytenfunktion erfasst, was sich durch eine Beeinflussung der ACT bemerkbar macht[74].

Dennoch ist die ACT eine durch äußere Einflüsse beeinflussbare Messgröße. Hämodilution während der EKZ, Hypothermie, Thrombozytenfunktion, Gerinnungsfaktorenmängel, orale Antikoagulanzen wie Marcumar und weitere Faktoren können die ACT Messungen beeinflussen[74]. Einige Studien konnten zeigen, dass die ACT eines Patienten im weiteren Sinne auch von seinem Antithrombin (AT) Level abhängt, da die antikoagulatorische Wirkung des Heparins auf einer Verstärkung der Antithrombin Wirkung beruht[2, 75-77]. Verringerte AT-Level führen daher aufgrund der verminderten Heparinwirkung in der Folge zu kürzeren ACT Zeiten.

Die Beeinflussbarkeit der ACT durch äußere Parameter machen sie daher auch zu einer unpräzisen Methode zur Kalkulation und Kontrolle der richtigen Protamindosis zur Heparinneutralisierung nach Ende der EKZ[74]. Nach der Antagonisierung des Heparins mit Protamin wird eine ACT innerhalb von 10 - 20% des Ausgangswertes als Zeichen der kompletten Heparin-Neutralisierung erwartet. Eine Verlängerung der ACT nach Protamingabe weist jedoch aus oben genannten Gründen nicht zwangsläufig auf in der Zirkulation verbleibendes Heparin hin.

6.3 Verlängerung der ROTEM CT unter MDCO2010

Ein neueres Gerät zur Gerinnungsdiagnostik ist das ROTEM (Rotationsthrombelastometrie). Das Funktionsprinzip entspricht dem der Thrombelastographie[59]. Mittels unterschiedlicher Testansätze können verschiedene Abschnitte der Gerinnung genauer betrachtet werden. Während die ACT eine

unspezifische Gerinnungsmessung ist, können mit dem ROTEM die einzelnen Phasen der Gerinnung genauer untersucht werden, sodass bei Auffälligkeiten der Gerinnungsmessungen eine spezifischere Therapie möglich ist.

In unserer Studie untersuchten wir den Einfluss von MDCO2010 auf die CT von drei unterschiedlichen Testansätzen im ROTEM (exTEM, inTEM, hepTEM).

Die Zugabe von MDCO2010 führte dosisabhängig in allen Testansätzen zu einer signifikanten Verlängerung der CT. MDCO2010 beeinflusst demnach sowohl die extrinsische, als auch die intrinsische Gerinnung- oder zumindest die gemeinsame Endstrecke. Durch die hepTEM Messungen, bei der noch eventuell vorhandenes Heparin durch Heparinase eliminiert wird, schlossen wir heparinbedingte Gerinnungsauffälligkeiten aus. In einer aktuellen Phase II Studie von Englberger et al.[66] zu MDCO2010 wurden die Gerinnungsveränderungen, wie in unserer Arbeit, dosisabhängig mittels Hemochron Kaolin, Medtronic Plus und ROTEM überwacht. Es zeigte sich auch hier eine signifikante dosisabhängige Verlängerung der ACT unter steigenden MDCO2010- Konzentrationen, die mit einem signifikant geringeren perioperativen Blutverlust assoziiert waren.

6.4 Verlängerung der aPTT unter MDCO2010

Die aPTT gehört zu den laborchemischen Standardgerinnungstests. Sie misst den intrinsischen Teil der Blutgerinnung und ist ein wichtiger Kontrollparameter für die Antikoagulation mit Heparin.

Die Bestimmung der aPTT in unserer Studie zeigte eine signifikante Verlängerung der Gerinnungszeiten mit steigenden MDCO2010- Konzentrationen. Dietrich et al.[55] fanden in ihrer Arbeit zu MDCO2010 ebenso verlängerte aPTT Zeiten und sahen zudem, dass MDCO2010 offenbar den intrinsischen Teil der Gerinnung (aPTT, inTEM) mehr beeinflusst als den extrinsischen (exTEM). Auch in unserer Arbeit war der Einfluss von MDCO2010 auf die intrinsische Gerinnung größer (inTEM: 48% Verlängerung der CT unter 600nM im Vergleich zur Kontrollgruppe) als auf die extrinsische Gerinnung (exTEM: 28% 600nM vs. control). Hier sind deutliche Parallelen zur Aprotininwirkung zu sehen.

6.5 Hepcon Messung unter MDCO2010

Eine weitere verbreitete Point-of-Care Methode (POC) ist das Hepcon. Dieses Gerät kalkuliert –wie unter Punkt 3.5.4 genau erläutert- anhand einer Heparin- Dose-Response die individuell notwendige Heparinmenge, um eine vorgegebene ACT zu erreichen[78]. Dadurch soll eine Über- sowie Unterheparinisierung verhindert werden. In den weiteren Messungen wird durch Heparin- Protamin- Titration indirekt der Heparinspiegel sowie die zur Antagonisierung notwendige Protaminmenge ermittelt.

Traditionell wurde Heparin in einem 1:1 bis 1:1,5 Verhältnis mit Protamin antagonisiert. Wegen möglicher Protamin Nebenwirkungen wird heute hingegen mit geringeren Protamindosen die Heparinantagonisierung nach Ende der EKZ angestrebt. Leitliniengemäß wird hierbei nur die verabreichte Heparindosis der vorangegangenen 2 Stunden berücksichtigt[79]. Während der EKZ wird bereits ein Teil des verabreichten Heparins metabolisiert, sodass das zirkulierende aktive Heparin am Ende der EKZ nur noch einem Teil der initialen Dosis entspricht. Eine 1:1 Antagonisierung mit Protamin würde daher eine Überdosierung von Protamin bedeuten, die mit einem erhöhten Blutungsrisiko und einer höheren Transfusionsrate von Blutprodukten assoziiert sein kann [80, 81]. Protamin beeinflusst dosisabhängig vor allem die Thrombozytenaggregationsfähigkeit und die Clot- Parameter, wie die Gerinnsel-Stärke und den Beginn der Gerinnselbildung, und kann mit einer Verlängerung der ACT einhergehen[35, 82-84]. Nielsen et al.[84] konnten außerdem eine gesteigerte Fibrinolyseaktivität unter Protamin zeigen.

Aziz et al.[85] zeigten, dass ein POC- Monitoring mit Hepcon® zu höheren Heparin-, aber niedrigeren Protamindosen führt. Andere Studien kamen zu ähnlichen Ergebnissen[86-92]. Es gibt Hinweise, dass geringere Protamindosen die Aktivierung der Hämostase, das postoperative Blutungsrisiko und die Transfusionsrate mit Blutprodukten vermindern. Koster et al.[93] verglichen die Effektivität von ACT und Hepcon® und fanden eine signifikante Reduktion der Thrombinbildung, Fibrinolyse und Neutrophilenaktivierung unter einem POC- Monitoring mit Hepcon® im Vergleich zum Heparin- Management mit der ACT. Einige Autoren untersuchten, ob eine Protamintitration mit Hepcon gegenüber der standardisierten Protamingabe zu einer Abnahme der Blutungskomplikationen führt und konnten zeigen, dass die Titration von Protamin den Blutverlust reduziert[94, 95]. Runge et al.[94] fanden unter

Protamintitration signifikant geringere postoperative Blutverluste in der Protamin-Titrationsgruppe (375ml; range 125-700ml) als in der Kontrollgruppe (600ml; range 250-1920ml). Der Fremdblutverbrauch war in der Titrationsgruppe reduziert, wenn auch nicht signifikant.

In unserer Studie untersuchten wir, ob MDCO2010 die intraoperativen Hepcon®-Messungen der Heparinkonzentration beeinflusst und ob das Hepcon® ein geeignetes Verfahren zum Gerinnungsmonitoring unter MDCO2010 ist.

Da MDCO2010 dosisabhängig die ACT verlängert und das Hepcon die individuelle Heparinzielkonzentration und Heparinmenge auf Basis einer ACT- Messung kalkuliert, führte die Bestimmung des Heparinbedarfs **nach** Gabe von 600nM MDCO2010 wie erwartet zu signifikant niedrigeren kalkulierten Heparinzielkonzentrationen, beziehungsweise Heparinmengen. So sahen wir zu Zeitpunkt T1 eine kalkulierte Heparinzielkonzentration von $4,5 \pm 0,8 \text{ E/ml}$ in der Kontrollgruppe versus $2,4 \pm 0,5 \text{ E/ml}$ in der MDCO2010- Gruppe. Der Heparinbedarf muss also **vor** der Gabe des Proteaseninhibitors bestimmt werden.

Die Heparinspiegelmessungen anhand der Heparin- Protamin- Titration zu den Zeitpunkten T2 und T2.1 ergaben in der MDCO2010- Gruppe signifikant geringere Heparinspiegel als in der Kontrollgruppe. So fanden wir in T2 bzw. T2.1 in der Kontrollgruppe Heparinspiegel von $3,6 \pm 0,91 \text{ E/ml}$ beziehungsweise $4,3 \pm 0,96 \text{ E/ml}$ versus $3,4 \pm 3,4 \text{ E/ml}$ bzw. $3,8 \pm 0,91 \text{ E/ml}$ in der MDCO2010- Gruppe.

Die Hepcon Heparinspiegelmessungen erfolgen in 0,7 beziehungsweise 0,6E/ml Abständen (s. 3.5.4 und Abb.8), sodass sich unsere Ergebnisse häufig um diese Differenzen unterschieden. Die Unterschiede in den Heparinspiegelmessungen sehen wir daher am ehesten im Rahmen der gerätebedingten Messungenaugigkeit.

Auffällig war, dass in den Messungen unter EKZ (T2, T2.1) fast ausschließlich höhere Heparinkonzentrationen in der Kontrollgruppe gemessen wurden als in der MDCO2010- Gruppe. Denkbar wäre daher auch ein methodikspezifischer Fehler der Messungen, da die Blutproben für die Hepconmessungen gleichzeitig entnommen wurden. Anschließend erfolgte zuerst die Messung der Kontrollgruppe, sodass in der

Blutprobe der MDCO2010- Gruppe eine bereits erfolgte Gerinnungsaktivierung zu einer beginnenden Gerinnungsbildung in der Kartusche geführt haben könnte.

Auch die Protaminkalkulation zur Heparinneutralisierung unterschied sich dementsprechend signifikant voneinander, sodass in T2 bzw. T2.1. in der Kontrollgruppe bei jeweils signifikant höheren Heparinspiegeln auch signifikant höhere Protaminmengen ermittelt wurden als in der MDCO2010- Gruppe

6.6 Aprotinin und Tranexamsäure

Aprotinin ist als unspezifischer Serinproteasen Inhibitor ein potentes Antifibrinolytikum, das wirksam den peri- und postoperativen Blutverlust reduziert. Zusätzlich zu seinem Einfluss auf die Blutungsneigung zeigten einige Arbeiten auch einen antiinflammatorischen Effekt. Die Ergebnisse von Murkin et al. und Poston et al.[21, 50] konnten einen antithrombotischen Effekt von Aprotinin mit Reduktion thrombembolischer Ereignisse wie Myokardinfarkten und cerebralen Ischämien zeigen. Dagegen kamen Cosgrove et al. und Mangano et al.[35, 36] zu gegenteiligen Resultaten und assoziierten Aprotinin mit einem erhöhten Risiko für thrombotische Ereignisse. Mangano et al.[36] begründeten die erhöhte Rate an postoperativem Nierenversagen nach Aprotinin mit seiner selektiven Bindung an die Membran des proximalen Tubulus und Akkumulation mit dem Zytoplasma mit anschließender Hemmung der Kallikrein- und Kininsekretion, Prostaglandin- und Reninsynthese sowie Bradykininfreisetzung[96-99]. In Kombination mit anderen Faktoren, die mit einer erhöhten Kallikreinaktivität einhergehen, wie zum Beispiel Hypothermie, sowie einer dosisabhängigen renalen afferenten Vasokonstriktion, wird die Nierenperfusion mit der Folge von renalen Nekrosen beeinträchtigt[96, 99-102]. Die Behinderung der endothelialen Nitratsynthese und -freisetzung[103, 104] könnte nach Mangano et al.[36] zu einem erhöhten Risiko mikro- und makrovaskulärer Thrombosen führen und die erhöhten Raten an postoperativen Myokardinfarkten und Enzephalopathien erklären. Lysinanaloga (TA, Aminocaprinsäure) seien nach Mangano nicht mit einem erhöhten Risiko thrombotischer Ereignisse assoziiert.

Dietrich et al.[27] argumentierten dagegen, dass Aprotinin als unspezifischer Proteaseinhibitor auch die Gerinnung hemmt, was sich an der verlängerten Celite ACT

zeige. Auch andere Studien fanden ein reduziertes Thromboserisiko unter Aprotinin, welches sie der Interaktion mit dem PAR-1 Rezeptor zuschrieben[21, 22].

Durch seine tierische Herkunft birgt Aprotinin zudem ein allergenes Potential. Beierlein et al.[17] fanden in einem Zeitraum von 40 Jahren 124 Fälle von anaphylaktischen Reaktionen auf Aprotinin. Das Risiko einer Anaphylaxie auf Aprotinin beträgt bei Reexposition etwa 2,8%. 11 der 124 Patienten starben an den Folgen der allergischen Reaktion. 72% der Patienten wurden nach Aprotininexposition innerhalb von 3 Monaten erneut Aprotinin ausgesetzt. Dietrich et al.[32] untersuchten hinsichtlich des Anaphylaxie- Risikos 13.315 herzchirurgische Interventionen, davon 12.403 mit Aprotinin. Nach Primärexposition wurden 11 (0,09%) allergische Reaktionen beobachtet, keine davon war schwer. Nach Reexposition wurden bei 12 von 801 Patienten (1,5%) allergische Reaktionen beobachtet, davon waren 5 schwer. Alle schweren anaphylaktischen Reaktionen wurden bei Patienten beobachtet, bei denen die Aprotinin Reexposition innerhalb eines Zeitintervalls von 6 Monaten erfolgte. Die Inzidenz allergischer Reaktionen auf Aprotinin war 4,1% (Reexposition < 6 Monaten nach Erstkontakt), 1,9% (Reexposition 6- 12 Monate nach Erstkontakt) und 0,4% (> 12 Monate nach Erstkontakt). Das Risiko einer allergischen Reaktion auf Aprotinin ist demnach insgesamt gering. Das größte Risiko bestand innerhalb von 6 Monaten nach erster Exposition und sank nach einem Jahr.

Diverse Arbeiten zeigten einen Einfluss von Aprotinin auf die Hämostase, wobei unklar ist, ob dies als Vor- oder Nachteil zu werten ist[18, 19]. Aprotinin ist nun zwar wieder auf europäischer Ebene und in Canada für die Anwendung in der Herzchirurgie zugelassen[40], doch bleibt fraglich, ob es wieder routinemäßige Verwendung in der Herzchirurgie finden wird. Vorliegende Arbeit kann wichtige Hinweise auch für die Heparinisierung unter Aprotinin Behandlung erbringen.

Tranexamsäure dagegen ist, ebenso wie Epsilonaminocapronsäure, ein reines Antifibrinolytikum ohne weiteren Einfluss auf die Aktivierung der Gerinnung oder Hemmung von Entzündungsreaktionen. Ähnlich wie Aprotinin senkt Tranexamsäure das postoperative Blutungsrisiko und die Transfusionsrate[20, 42]. McCormack et al.[43] zeigten neben einer Reduktion der postoperativen Blutungsneigung nach diversen Eingriffen und einem reduzierten Transfusionsbedarf zudem eine Senkung der Mortalitätsrate in Trauma- Patienten. Im CRASH-2 Trial (The Clinical

Randomisation of an Antifibrinolytic in Significant Haemorrhage 2), in dem 20.211 erwachsene Patienten mit signifikanten Blutungen nach Trauma untersucht wurden, wurde entweder Tranexamsäure (1g Bolus+ 1g Infusion >8h) oder ein Placebo verabreicht. Die Mortalität war in der Tranexamsäure- Gruppe signifikant geringer als in der Placebo Gruppe ($p=0,0035$). Zudem wurde ein signifikant geringerer Blutverlust ohne Zunahme von thrombembolischen Ereignissen unter Tranexamsäure beobachtet. Die Gesamtmortalität aufgrund von Blutungen war signifikant geringer, wenn Tranexamsäure innerhalb von 3h nach Trauma verabreicht wurde. Tatsächlich ging eine spätere Verabreichung von Tranexamsäure mit einem signifikant höheren Blutungs- und Todesrisiko im Vergleich zur Placebo Gruppe einher.

Im Vergleich zu Aprotinin war Tranexamsäure in einigen Studien hinsichtlich der Blutungsreduktion weniger effektiv, [41, 45]. In anderen Arbeiten unterschieden sich Aprotinin und Tranexamsäure in ihrer Effektivität nicht[39, 46, 47]. Jedoch sind wesentlich höhere Dosen von Tranexamsäure notwendig, um die gleiche antifibrinolytische Potenz wie Aprotinin zu erreichen[48].

Einige Autoren fanden ein erhöhtes Risiko für epileptische Anfälle nach herzchirurgischen Eingriffen unter hohen Tranexamsäuredosen[50, 53]. Koster et al.[52] fanden in ihrer Studie, dass selbst moderate Tranexamsäuredosen (24mg/kgKG) mit einem zweifach erhöhten Risiko für konvulsive epileptische Anfälle einhergingen. Retrospektiv wurde die Inzidenz von epileptischen Anfällen in 4883 herzchirurgischen Patienten untersucht. Verglichen wurden die Inzidenzen konvulsiver Anfälle bei Patienten, die moderate Tranexamsäuredosen erhielten (24mg/kgKG) mit Patienten die keine Tranexamsäure erhielten. Die Inzidenz epileptischer Anfälle unter Tranexamsäure betrug 2,5%, in der Kontrollgruppe 1,2%. Die Mortalitätsrate war in dieser Studie unter Tranexamsäure signifikant höher als in der Kontrollgruppe ($p=0,005$).

Der Grund für die erhöhte Inzidenz an epileptischen Anfällen sehen Lecker et al.[53] in der Ähnlichkeit der Tranexamsäure zum inhibitorischen Neurotransmitter Glyzin. Eine verringerte Funktion von Glyzin kann epileptische Anfälle auslösen. In ihrer Studie konnten Lecker et al.[53] zeigen, dass Tranexamsäure kompetitiv am Glyzinrezeptor bindet und somit das Risiko für epileptische Anfälle erhöht.

6.7 Klinischer Ausblick

Blutverluste stellen immer noch ein Problem in der Herzchirurgie dar, welches den Einsatz von Medikamenten zur Reduzierung der Blutungsneigung rechtfertigt. Da die Zukunft von Aprotinin unsicher ist, dieses Präparat als tierisches Eiweiß ein allergenes Potential hat, und auch bei der Tranexamsäure die Meldungen über unerwünschte Nebenwirkungen häufiger werden, scheint die Entwicklung neuer Antifibrinolytika gerechtfertigt. Der neu entwickelte Serinproteaseninhibitor MDCO2010 zeigt nach bisheriger Studienlage eine ebenso große antifibrinolytische Potenz wie Aprotinin, wird aber synthetisch hergestellt, ist nicht tierischen Ursprungs und besitzt daher nicht das allergene Potential des Aprotinins. Als unspezifischer Proteasehemmer hat es sowohl antifibrinolytische als auch, wie in vorliegender Arbeit gezeigt, antikoagulatorische Eigenschaften. Ob dieser Effekt einer klinisch relevanten Antikoagulation entspricht, müssen weitere Studien klären. Antiinflammatorische Eigenschaften könnten möglich sein, sind aber bisher nicht bewiesen.

Im Jahr 2010 konnten Szabo et al.[54] im Tierversuch zeigen, dass MDCO2010 signifikant den postoperativen Blutverlust senkt. Verlängerte aPTT und ACT Zeiten unter MDCO2010 und CU2020 wurden als bessere antithrombotische Eigenschaften im Vergleich zu Aprotinin interpretiert. Kim et al.[57] untersuchten den antikoagulatorischen Effekt von MDCO2010 im Blut gesunder Freiwilliger sowie in Blutproben herzchirurgischer Patienten und konnten - ähnlich wie in vorliegender Arbeit - eine dosisabhängige ACT Verlängerung sowohl im Blut der Freiwilligen, als auch in den Blutproben der Patienten zeigen, die unabhängig vom verwendeten Gerät und Aktivator war. In einer anderen Arbeit konnten Kim et al.[58] in vitro wieder eine konzentrationsabhängige, signifikante ACT Verlängerung in den Blutproben herzchirurgischer Patienten unter MDCO2010 während der EKZ zeigen.

In der neuesten Studie von Englberger et al.[66], einer Phase II Studie, wurden die ersten in vivo Ergebnisse mit MDCO2010 vorgestellt. Es wurden insgesamt 32 Patienten in die Studie eingeschlossen, die sich einem elektiven Eingriff unter EKZ unterzogen. Die Patienten wurden in 5 Gruppen unterteilt (je 4 Patienten in Kohorte 1 und 2, je 8 Patienten Kohorte 3-5). Die Patienten erhielten entweder MDCO2010 oder

ein Placebo. Insgesamt erhielten 24 Patienten MDCO2010, 8 Patienten erhielten Placebo. Die MDCO2010- Startdosis entsprach den MDCO2010- Mengen, die in der Phase I Studie an gesunden Freiwilligen als sicher gewertet worden waren. In jeder MDCO2010- Gruppe war eine Verdopplung der vorangegangenen MDCO2010- Dosis vorgesehen, wobei eine Dosisanpassung laut Studienprotokoll erlaubt war. Die MDCO2010- Höchstdosis sollte in einer Plasmakonzentration von 900nmol/L resultieren. Eine intraoperative Gabe von Tranexamsäure oder Aminocaprinsäure war im Studienprotokoll nicht vorgesehen.

In den 3 von 5 Gruppen mit den höchsten MDCO2010- Konzentrationen zeigte sich ein signifikant geringerer Blutverlust als in der Kontrollgruppe ($p=0,002$; $0,004$; $0,011$). Die Bluttransfusionsrate war in der MDCO2010- Gruppe signifikant geringer (17%) als in der Kontrollgruppe (50%). Die ACT sowie die aPTT waren wiederum dosisabhängig verlängert. Antifibrinolytische Aktivität von MDCO2010 konnten bereits Dietrich et al.[55] zeigen, welche wir auch in den ROTEM Parametern (LOT, LI60) unserer Arbeit sahen. Auch Erdoes et al.[56] fanden eine verlängerte LOT unter MDCO2010. Dieser Effekt wurde auch wieder in der neuesten Studie von Englberger beobachtet.

In 2 von 24 Fällen in der MDCO2010- Gruppe trat ein unerwünschtes Ereignis ein, das mit MDCO2010 assoziiert sein könnte. Insgesamt gab es jedoch keinen Unterschied zwischen der MDCO2010- und der Placebogruppe.

Nach erfolgreicher Phase II Studie wurde vorerst die Weiterentwicklung gestoppt[105], nachdem es in einer darauffolgenden Studie, die MDCO2010 mit Tranexamsäure und Placebo vergleichen wollte, zu unerwarteten prothrombotischen Komplikationen kam. Ob diese Zwischenfälle in Zusammenhang mit dem neuen Serinproteaseinhibitor MDCO2010 zu sehen sind, muss die bisher nicht abgeschlossene endgültige Analyse der Daten zeigen.

6.8 Limitationen der Arbeit

Die vorliegende Arbeit hat Limitationen einer ex vivo Studie, die Gerinnungsveränderungen außerhalb des Körpers untersucht. Es ist eine endothelfreie Umgebung ohne Metabolisierung der Substrate. Jedoch erfolgten die Untersuchungen im Blut herzchirurgischer Patienten, die mit Hilfe der EKZ operiert

wurden und deren Gerinnungssystem der Aktivierung einer Routine Herzoperation ausgesetzt war. Die Blutgerinnung wurde mit Hilfe von POC Methoden, wie sie im Operationssaal verwendet werden, untersucht und es wurden keine Faktorenanalysen durchgeführt. Unser Versuchsaufbau spiegelt aber in realistischer Weise die Verhältnisse einer herzchirurgischen Operation wider.

6.9 Zusammenfassung

Auch wenn die klinische Entwicklung von MDCO2010 gestoppt wurde, so stellt die vorliegende Untersuchung doch einen wichtigen Baustein bei der sicheren Kontrolle der Antikoagulation unter der Behandlung von unspezifischen Proteaseninhibitoren dar. Partiiell können die Ergebnisse auch auf andere Medikamente wie neue Antifibrinolytika oder andere Proteaseinhibitoren übertragen werden. MDCO2010 inhibiert die Fibrinolyse und verlängert dosisabhängig die Gerinnungszeiten.

Solange nicht geklärt ist, ob der gerinnungsverlängernde Effekt von MDCO2010 einer realen Antikoagulation entspricht, kann das intraoperative Heparinmonitoring auch unter MDCO2010 mit dem Hepcon erfolgen, allerdings muss die erste Messung zur Heparindosisfindung aufgrund des ACT- abhängigen Messprinzips vor der MDCO2010- Gabe erfolgen. Letztendlich sollten weitere Studien klären, ob das hier entwickelte Heparinmanagement klinisch praktikabel ist und welche Rolle der ACT zur intraoperativen Überwachung der Heparinsierung in Zukunft zukommt.

7 Literaturverzeichnis

1. Lo B, Fijnheer R, Castiglione D, Borst C, Kalkman CJ, Nierich AP: **Activation of hemostasis after coronary artery bypass grafting with or without cardiopulmonary bypass.** *Anesthesia & Analgesia*, **99**(3):634-640.
2. Avidan MS, Levy JH, van Aken H, Feneck RO, Latimer RD, Ott E, Martin E, Birnbaum DE, Bonfiglio LJ, Kajdasz DK *et al*: **Recombinant human antithrombin III restores heparin responsiveness and decreases activation of coagulation in heparin-resistant patients during cardiopulmonary bypass.** *Journal of Thoracic & Cardiovascular Surgery*, **130**(1):107-113.
3. Hoffman M, Monroe DM: **Coagulation 2006: a modern view of hemostasis.** *Hematology - Oncology Clinics of North America*, **21**(1):1-11.
4. Kirklin JK, Westaby S, Blackstone EH, Kirklin JW, Chenoweth DE, Pacifico AD: **Complement and the damaging effects of cardiopulmonary bypass.** *Journal of Thoracic & Cardiovascular Surgery*, **86**(6):845-857.
5. Wan S, Marchant A, DeSmet JM, Antoine M, Zhang H, Vachery JL, Goldman M, Vincent JL, LeClerc JL: **Human cytokine responses to cardiac transplantation and coronary artery bypass grafting.** *Journal of Thoracic & Cardiovascular Surgery*, **111**(2):469-477.
6. Walsh PN: **Platelet-mediated trigger mechanisms in the contact phase of blood coagulation.** *Seminars in Thrombosis & Hemostasis*, **13**(1):86-94.
7. Edgington TS, Mackman N, Brand K, Ruf W: **The structural biology of expression and function of tissue factor.** *Thrombosis & Haemostasis*, **66**(1):67-79.
8. Tanaka KA, Key NS, Levy JH: **Blood coagulation: hemostasis and thrombin regulation.** *Anesthesia & Analgesia*, **108**(5):1433-1446.
9. Aldea GS, Doursounian M, O'Gara P, Treanor P, Shapira OM, Lazar HL, Shemin RJ: **Heparin-bonded circuits with a reduced anticoagulation protocol in primary CABG: a prospective, randomized study.** *Annals of Thoracic Surgery*, **62**(2):410-417.
10. Lison S, Spannagl M, Dietrich W: **Thrombin dynamics in cardiac surgical patients.** *Journal of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia* 2009, **1**):S2.
11. Karkouti K, McCluskey SA, Syed S, Pazaratz C, Poonawala H, Crowther MA: **The influence of perioperative coagulation status on postoperative blood loss in complex cardiac surgery: a prospective observational study.** *Anesthesia & Analgesia*, **110**(6):1533-1540.
12. Rahe-Meyer N, Solomon C, Hanke A, Schmidt DS, Knoerzer D, Hochleitner G, Sorensen B, Hagl C, Pichlmaier M: **Effects of fibrinogen concentrate as first-line therapy during major aortic replacement surgery: a randomized, placebo-controlled trial.[Erratum appears in Anesthesiology. 2013 May;118(5):1244].** *Anesthesiology*, **118**(1):40-50.

13. van Oeveren W, Harder MP, Roozendaal KJ, Eijnsman L, Wildevuur CR: **Aprotinin protects platelets against the initial effect of cardiopulmonary bypass**. *Journal of Thoracic & Cardiovascular Surgery*, **99**(5):788-796; discussion 796-787.
14. Bevan DH: **Cardiac bypass haemostasis: putting blood through the mill**. *British Journal of Haematology*, **104**(2):208-219.
15. Lison S, Spannagl M, Dietrich W: **Enhanced thrombin generation after cardiac surgery**. *Hamostaseologie* 2010, **30** (1):A102.
16. Lison S, Weiss G, Spannagl M, Heindl B: **Postoperative modification in hemostasis after major surgery**. *Hamostaseologie* 2011, **31** (1):A49.
17. Beierlein W, Scheule AM, Dietrich W, Ziemer G: **Forty years of clinical aprotinin use: a review of 124 hypersensitivity reactions**. *Annals of Thoracic Surgery*, **79**(2):741-748.
18. Baufreton C, Velthuis HT, Jansen PG, Besnerais PL, Wildevuur CH, Loisançe DY: **Reduction of blood activation in patients receiving aprotinin during cardiopulmonary bypass for coronary artery surgery**. *ASAIO Journal*, **42**(5):M417-423.
19. Wachtfogel YT, Kucich U, Hack CE, Gluszko P, Niewiarowski S, Colman RW, Edmunds LH, Jr.: **Aprotinin inhibits the contact, neutrophil, and platelet activation systems during simulated extracorporeal perfusion**. *Journal of Thoracic & Cardiovascular Surgery*, **106**(1):1-9.
20. Henry DA, Carless PA, Moxey AJ, O'Connell D, Stokes BJ, Fergusson DA, Ker K: **Anti-fibrinolytic use for minimising perioperative allogeneic blood transfusion**. *Cochrane database of systematic reviews (Online)* 2011, **3**:CD001886.
21. Poston RS, White C, Gu J, Brown J, Gammie J, Pierson RN, Lee A, Connerney I, Avari T, Christenson R *et al*: **Aprotinin shows both hemostatic and antithrombotic effects during off-pump coronary artery bypass grafting**. *Annals of Thoracic Surgery*, **81**(1):104-110.
22. Poullis M, Manning R, Laffan M, Haskard DO, Taylor KM, Landis RC: **The antithrombotic effect of aprotinin: actions mediated via the proteaseactivated receptor 1**. *Journal of Thoracic & Cardiovascular Surgery*, **120**(2):370-378.
23. Day JR, Punjabi PP, Randi AM, Haskard DO, Landis RC, Taylor KM: **Clinical inhibition of the seven-transmembrane thrombin receptor (PAR1) by intravenous aprotinin during cardiothoracic surgery**. *Circulation*, **110**(17):2597-2600.
24. Wildevuur CR, Eijnsman L, Roozendaal KJ, Harder MP, Chang M, van Oeveren W: **Platelet preservation during cardiopulmonary bypass with aprotinin**. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*, **3**(6):533-537.
25. Hill GE, Alonso A, Spurzem JR, Stammers AH, Robbins RA: **Aprotinin and methylprednisolone equally blunt cardiopulmonary bypass-induced inflammation in humans**. *Journal of Thoracic & Cardiovascular Surgery*, **110**(6):1658-1662.

26. Day JR, Taylor KM, Lidington EA, Mason JC, Haskard DO, Randi AM, Landis RC: **Aprotinin inhibits proinflammatory activation of endothelial cells by thrombin through the protease-activated receptor 1.** *Journal of Thoracic & Cardiovascular Surgery*, **131**(1):21-27.
27. Dietrich W, Dilthey G, Spannagl M, Jochum M, Braun SL, Richter JA: **Influence of high-dose aprotinin on anticoagulation, heparin requirement, and celite-and kaolin-activated clotting time in heparin-pretreated patients undergoing open-heart surgery: A double-blind, placebo-controlled study.** *Anesthesiology* 1995, **83**(4):679-689.
28. Despotis GJ, Filos KS, Levine V, Alsoufiev A, Spitznagel E: **Aprotinin prolongs activated and nonactivated whole blood clotting time and potentiates the effect of heparin in vitro.** *Anesthesia & Analgesia*, **82**(6):1126-1131.
29. Dietrich W, Jochum M: **Effect of celite and kaolin on activated clotting time in the presence of aprotinin: Activated clotting time is reduced by binding of aprotinin to kaolin.** *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 1995, **109**(1):177-178.
30. Wang JS, Lin CY, Hung WT, Thisted RA, Karp RB: **In vitro effects of aprotinin on activated clotting time measured with different activators.** *Journal of Thoracic & Cardiovascular Surgery*, **104**(4):1135-1140.
31. Dietrich W, Spath P, Zuhlsdorf M, Dalichau H, Kirchhoff PG, Kuppe H, Preiss DU, Mayer G: **Anaphylactic reactions to aprotinin reexposure in cardiac surgery: Relation to antiaprotinin immunoglobulin G and E antibodies.** *Anesthesiology* 2001, **95**(1):64-71.
32. Dietrich W, Ebell A, Busley R, Boulesteix AL: **Aprotinin and Anaphylaxis: Analysis of 12,403 Exposures to Aprotinin in Cardiac Surgery.** *Annals of Thoracic Surgery* 2007, **84**(4):1144-1150.
33. Lemmer JH, Jr., Stanford W, Bonney SL, Breen JF, Chomka EV, Eldredge WJ, Holt WW, Karp RB, Laub GW, Lipton MJ *et al*: **Aprotinin for coronary bypass operations: efficacy, safety, and influence on early saphenous vein graft patency. A multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled study.** *Journal of Thoracic & Cardiovascular Surgery*, **107**(2):543-551.
34. Levy JH, Pifarre R, Schaff HV, Horrow JC, Albus R, Spiess B, Rosengart TK, Murray J, Clark RE, Smith P: **A multicenter, double-blind, placebo-controlled trial of aprotinin for reducing blood loss and the requirement for donor-blood transfusion in patients undergoing repeat coronary artery bypass grafting.** *Circulation*, **92**(8):2236-2244.
35. Cosgrove DM, 3rd, Heric B, Lytle BW, Taylor PC, Novoa R, Golding LA, Stewart RW, McCarthy PM, Loop FD: **Aprotinin therapy for reoperative myocardial revascularization: a placebo-controlled study.** *Annals of Thoracic Surgery*, **54**(6):1031-1036.
36. Mangano DT, Tudor IC, Dietzel C, Multicenter Study of Perioperative Ischemia Research G, Ischemia R, Education F: **The risk associated with aprotinin in cardiac surgery.** *New England Journal of Medicine*, **354**(4):353-365.

37. Royston D, van Haaften N, De Vooght P: **Aprotinin; friend or foe? A review of recent medical literature**. *European Journal of Anaesthesiology*, **24**(1):6-14.
38. Pagano D, Howell NJ, Freemantle N, Cunningham D, Bonser RS, Graham TR, Mascaro J, Rooney SJ, Wilson IC, Cramb R *et al*: **Bleeding in cardiac surgery: the use of aprotinin does not affect survival**. *Journal of Thoracic & Cardiovascular Surgery*, **135**(3):495-502.
39. Fergusson DA, Hebert PC, Mazer CD, Fries S, MacAdams C, Murkin JM, Teoh K, Duke PC, Arellano R, Blajchman MA *et al*: **A comparison of aprotinin and lysine analogues in high-risk cardiac surgery**. [Erratum appears in *N Engl J Med*. 2010 Sep 23;363(13):1290]. *New England Journal of Medicine*, **358**(22):2319-2331.
40. [http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/news_and_events/news/2012/02/news_detail_001447.jsp&mid=WC0b01ac058004d5c1\(28.10.2014\)](http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/news_and_events/news/2012/02/news_detail_001447.jsp&mid=WC0b01ac058004d5c1(28.10.2014)).
41. Later AF, Maas JJ, Engbers FH, Versteegh MI, Bruggemans EF, Dion RA, Klautz RJ: **Tranexamic acid and aprotinin in low- and intermediate-risk cardiac surgery: a non-sponsored, double-blind, randomised, placebo-controlled trial**. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*, **36**(2):322-329.
42. Senay S, Toraman F, Karabulut H, Alhan C: **Efficiency of preoperative tranexamic Acid in coronary bypass surgery: an analysis correlated with preoperative clopidogrel use**. *Heart Surgery Forum*, **13**(3):E149-154.
43. McCormack PL: **Tranexamic acid: a review of its use in the treatment of hyperfibrinolysis**. *Drugs*, **72**(5):585-617.
44. Dunn CJ, Goa KL: **Tranexamic acid: a review of its use in surgery and other indications**. *Drugs*, **57**(6):1005-1032.
45. Hekmat K, Zimmermann T, Kampe S, Kasper SM, Weber HJ, Geissler HJ, Mehlhorn U: **Impact of tranexamic acid vs. aprotinin on blood loss and transfusion requirements after cardiopulmonary bypass: a prospective, randomised, double-blind trial**. *Current Medical Research & Opinion*, **20**(1):121-126.
46. Casati V, Guzzon D, Oppizzi M, Bellotti F, Franco A, Gerli C, Cossolini M, Torri G, Calori G, Benussi S *et al*: **Tranexamic acid compared with high-dose aprotinin in primary elective heart operations: effects on perioperative bleeding and allogeneic transfusions**. *Journal of Thoracic & Cardiovascular Surgery*, **120**(3):520-527.
47. Casati V, Guzzon D, Oppizzi M, Cossolini M, Torri G, Calori G, Alfieri O: **Hemostatic effects of aprotinin, tranexamic acid and epsilon-aminocaproic acid in primary cardiac surgery**. *Annals of Thoracic Surgery*, **68**(6):2252-2256.
48. Dietrich W, Spannagl M, Boehm J, Hauner K, Braun S, Schuster T, Busley R: **Tranexamic acid and aprotinin in primary cardiac operations: an analysis of 220 cardiac surgical patients treated with tranexamic acid or aprotinin**. *Anesthesia & Analgesia*, **107**(5):1469-1478.

49. Kalavrouziotis D, Voisine P, Mohammadi S, Dionne S, Dagenais F: **High-dose tranexamic acid is an independent predictor of early seizure after cardiopulmonary bypass.** *Annals of Thoracic Surgery*, **93**(1):148-154.
50. Murkin JM, Falter F, Granton J, Young B, Burt C, Chu M: **High-dose tranexamic Acid is associated with nonischemic clinical seizures in cardiac surgical patients.** *Anesthesia & Analgesia*, **110**(2):350-353.
51. Keyl C, Uhl R, Beyersdorf F, Stampf S, Lehane C, Wiesenack C, Trenk D: **High-dose tranexamic acid is related to increased risk of generalized seizures after aortic valve replacement.** *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*, **39**(5):e114-121.
52. Koster A, Borgermann J, Zittermann A, Lueth JU, Gillis-Januszewski T, Schirmer U: **Moderate dosage of tranexamic acid during cardiac surgery with cardiopulmonary bypass and convulsive seizures: Incidence and clinical outcome.** *British Journal of Anaesthesia* 2013, **110**(1):34-40.
53. Lecker I, Wang DS, Romaschin AD, Peterson M, Mazer CD, Orser BA: **Tranexamic acid concentrations associated with human seizures inhibit glycine receptors.** *Journal of Clinical Investigation*, **122**(12):4654-4666.
54. Szabo G, Veres G, Radovits T, Haider H, Krieger N, Bahrle S, Miesel-Groschel C, Niklisch S, Karck M, van de Locht A: **Effects of novel synthetic serine protease inhibitors on postoperative blood loss, coagulation parameters, and vascular relaxation after cardiac surgery.** *Journal of Thoracic & Cardiovascular Surgery*, **139**(1):181-188.
55. Dietrich W, Nicklisch S, Koster A, Spannagl M, Giersiefen H, van de Locht A: **CU-2010--a novel small molecule protease inhibitor with antifibrinolytic and anticoagulant properties.** *Anesthesiology*, **110**(1):123-130.
56. Erdoes G, Englberger L, Dietrich W, Van De Locht A, Lison S, Carrel TP, Eberle B: **Clinical experience with a novel serine-protease inhibitor (MDCO-2010) in on-pump CABG surgery.** *Applied Cardiopulmonary Pathophysiology* 2012, **16**:224.
57. Kim H, Szlam F, Tanaka KA, van de Locht A, Ogawa S, Levy JH: **The effects of MDCO-2010, a serine protease inhibitor, on activated clotting time in blood obtained from volunteers and cardiac surgical patients.** *Anesthesia & Analgesia*, **115**(2):244-252.
58. Kim H, Szlam F, Tanaka K, Ogawa S, Van De Locht A, Levy JH: **Effects of MDCO-2010 on activated clotting time in blood obtained from patients undergoing cardiopulmonary bypass.** *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2011, **9**:574-575.
59. Mittermayr M, Margreiter J, Velik-Salchner C, Klingler A, Streif W, Fries D, Innerhofer P: **Effects of protamine and heparin can be detected and easily differentiated by modified thrombelastography (Rotem): an in vitro study.** *British Journal of Anaesthesia*, **95**(3):310-316.
60. Hattersley PG: **Activated coagulation time of whole blood.** *JAMA* 1966, **196**(5):436-440.
61. Bull MH, Huse WM, Bull BS: **Evaluation of tests used to monitor heparin therapy during extracorporeal circulation.** *Anesthesiology*, **43**(3):346-353.

62. [http://www.medtronic.de/\(12.12.2014\)](http://www.medtronic.de/(12.12.2014)).
63. Curtis G, Reddy A, Lam S, Bauer S: **Determination of factors associated with bleeding in patients receiving alteplase for pulmonary embolism: A focus on body weight.** *Critical Care Medicine* 2012, **1**):67-68.
64. Liao X-L, Wang C-X, Wang Y-L, Wang C-J, Zhao X-Q, Zhang L-Q, Liu L-P, Pan Y-S, Wang Y-J, the Thrombolysis I *et al*: **Implementation and Outcome of Thrombolysis with Alteplase 3 to 4.5 h After Acute Stroke in Chinese Patients.** *CNS: Neuroscience & Therapeutics* 2013, **19**(1):43-47.
65. Lozier JAYNa, lowast, Cullinane ANNMa, Nghiem Ka, Chang Rb, Horne MKIIIa: **Biochemical dynamics relevant to the safety of low-dose, intraclot alteplase for deep vein thrombosis.** *Translational Research* 2012, **160**(3):217-222.
66. Englberger L, Dietrich W, Eberle B, Erdoes G, Keller D, Carrel T: **A Novel Blood-Sparing Agent in Cardiac Surgery? First In-Patient Experience with the Synthetic Serine Protease Inhibitor MDCO-2010: A Phase II, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study in Patients Undergoing Coronary Artery Bypass Grafting with Cardiopulmonary Bypass.** *Anesthesia & Analgesia* 2014, **119**(1):16-25.
67. Bull BS, Korpman RA, Huse WM, Briggs BD: **Heparin therapy during extracorporeal circulation. I. Problems inherent in existing heparin protocols.** *Journal of Thoracic & Cardiovascular Surgery* 1975, **69**(5):674-684.
68. Bull BS, Huse WM, Brauer FS, Korpman RA: **Heparin therapy during extracorporeal circulation. II. The use of a dose-response curve to individualize heparin and protamine dosage.** *Journal of Thoracic & Cardiovascular Surgery* 1975, **69**(5):685-689.
69. Despotis GJ, Alsoufiev AL, Spitznagel E, Goodnough LT, Lappas DG: **Response of kaolin ACT to heparin: Evaluation with an automated assay and higher heparin doses.** *Annals of Thoracic Surgery* 1996, **61**(3):795-799.
70. [http://ir.themedicinescompany.com/phoenix.zhtml?c=122204&p=irol-newsArticle&ID=1183826&highlight\(02.02.2015\)](http://ir.themedicinescompany.com/phoenix.zhtml?c=122204&p=irol-newsArticle&ID=1183826&highlight(02.02.2015)).
71. Dalbert S, Ganter MT, Furrer L, Klaghofer R, Zollinger A, Hofer CK: **Effects of heparin, haemodilution and aprotinin on kaolin-based activated clotting time: in vitro comparison of two different point of care devices.** *Acta Anaesthesiologica Scandinavica* 2006, **50**(4):461-468.
72. Wang JS, Lin CY, Hung WT, Karp RB: **Monitoring of heparin-induced anticoagulation with kaolin-activated clotting time in cardiac surgical patients treated with aprotinin.** *Anesthesiology* 1992, **77**(6):1080-1084.
73. Hebert PC, Fergusson DA, Hutton B, Mazer CD, Fremes S, Blajchman M, MacAdams C, Wells G, Robblee J, Bussieres J *et al*: **Regulatory decisions pertaining to aprotinin may be putting patients at risk.** *Cmaj* 2014, **186**(18):1379-1387.
74. Horton S, Augustin S: **Activated clotting time (ACT).** *Methods in Molecular Biology* 2013, **992**:155-167.

75. Ranucci M: **Antithrombin III. Key factor in extracorporeal circulation.** *Minerva Anestesiologica*, **68**(5):454-457.
76. Levy JH, Montes F, Szlam F, Hillyer CD: **The in vitro effects of antithrombin III on the activated coagulation time in patients on heparin therapy.** *Anesthesia & Analgesia*, **90**(5):1076-1079.
77. Dietrich W, Busley R, Spannagl M, Braun S, Schuster T, Lison S: **The influence of antithrombin substitution on heparin sensitivity and activation of hemostasis during coronary artery bypass graft surgery: a dose-finding study.** *Anesthesia & Analgesia* 2013, **116**(6):1223-1230.
78. [http://mplusmedtech.com/123/pdf/848.pdf\(28.09.2014\)](http://mplusmedtech.com/123/pdf/848.pdf(28.09.2014)).
79. [http://www.rch.org.au/clinicalguide/guideline_index/Anticoagulation_Therapy_Guidelines/\(13.09.2014\)](http://www.rch.org.au/clinicalguide/guideline_index/Anticoagulation_Therapy_Guidelines/(13.09.2014)).
80. DeLaria GA, Tyner JJ, Hayes CL, Armstrong BW: **Heparin-protamine mismatch. A controllable factor in bleeding after open heart surgery.** *Archives of Surgery*, **129**(9):944-950.
81. McLaughlin KE, Dunning J: **In patients post cardiac surgery do high doses of protamine cause increased bleeding?** *Interactive Cardiovascular and Thoracic Surgery* 2003, **2**(4):424-426.
82. Khan NU, Wayne CK, Barker J, Strang T: **The effects of protamine overdose on coagulation parameters as measured by the thrombelastograph.** *European Journal of Anaesthesiology*, **27**(7):624-627.
83. Mochizuki T, Olson PJ, Szlam F, Ramsay JG, Levy JH: **Protamine reversal of heparin affects platelet aggregation and activated clotting time after cardiopulmonary bypass.** *Anesthesia & Analgesia*, **87**(4):781-785.
84. Nielsen VG: **Protamine enhances fibrinolysis by decreasing clot strength: role of tissue factor-initiated thrombin generation.** *Annals of Thoracic Surgery*, **81**(5):1720-1727.
85. Abdul Aziz KA, Masood O, Hoschtitzky JA, Ronald A: **Does use of the Hepcon point-of-care coagulation monitor to optimise heparin and protamine dosage for cardiopulmonary bypass decrease bleeding and blood and blood product requirements in adult patients undergoing cardiac surgery?** *Interactive Cardiovascular and Thoracic Surgery* 2006, **5**(4):469-482.
86. Shigeta O, Kojima H, Hiramatsu Y, Jikuya T, Terada Y, Atsumi N, Sakakibara Y, Nagasawa T, Mitsui T: **Low-dose protamine based on heparin-protamine titration method reduces platelet dysfunction after cardiopulmonary bypass.** *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 1999, **118**(2):354-360.
87. Yamanishi H, Watanabe S, Hayashi K, Tomioka H, Minami M, Nozaki Y, Aoki T, Kawai Y, Kishino K, Ohta S: **A clinical evaluation of the Hepcon/HMS: a new device of monitoring hemostasis management during cardiopulmonary bypass. [Japanese].** *Kyobu geka* 1997, *The Japanese journal of thoracic surgery*. **50**(6):459-462.

88. Despotis GJ, Joist JH, Hogue Jr CW, Alsoufiev A, Kater K, Goodnough LT, Santoro SA, Spitznagel E, Rosenblum M, Lappas DG: **The impact of heparin concentration and activated clotting time monitoring on blood conservation: A prospective, randomized evaluation in patients undergoing cardiac operation.** *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 1995, **110**(1):46-54.
89. Despotis GJ, Heinrich Joist J, Hogue Jr CW, Alsoufiev A, Joiner-Maier D, Santoro SA, Spitznagel E, Weitz JI, Goodnough LT: **More effective suppression of hemostatic system activation in patients undergoing cardiac surgery by heparin dosing based on heparin blood concentrations rather than ACT.** *Thrombosis and Haemostasis* 1996, **76**(6):902-908.
90. Newsome J, Stipanovich K, Flaherty S: **Comparison of heparin administration using the rapidpoint coag and hepcon HMS.** *Journal of Extra-Corporeal Technology* 2004, **36**(2):139-144.
91. Sakurada T, Kikuchi YI, Koushima R, Nakashima S, Hachiro Y, Kagaya H: **Clinical evaluation of heparin concentration and activated clotting time monitoring (HEPCON/HMS) system.** [Japanese]. *Journal of the Japanese Association for Thoracic Surgery* 1997, **45**(6):836-840.
92. Beholz S, Grubitzsch H, Bergmann B, Wollert HG, Eckel L: **Hemostasis management by use of Hepcon/HMS(TM): Increased bleeding without increased need for blood transfusion.** *Thoracic and Cardiovascular Surgeon* 1999, **47**(5):322-327.
93. Koster A, Fischer T, Praus M, Haberzettl H, Kuebler WM, Hetzer R, Kuppe H: **Hemostatic activation and inflammatory response during cardiopulmonary bypass: Impact of heparin management.** *Anesthesiology* 2002, **97**(4):837-841.
94. Runge M, Moller CH, Steinbruchel DA: **Increased accuracy in heparin and protamine administration decreases bleeding: a pilot study.** *Journal of Extra-Corporeal Technology*, **41**(1):10-14.
95. Wang J, Ma HP, Zheng H: **Blood loss after cardiopulmonary bypass, standard vs titrated protamine: A meta-analysis.** *Netherlands Journal of Medicine* 2013, **71**(3):123-127.
96. Kramer HJ, Dusing R, Glanzer K, Kipnowski J, Klingmuller D, Meyer-Lehnert H: **Effects of aprotinin on renal function.** *Contributions to Nephrology*, **42**:233-241.
97. Kramer HJ, Moch T, von Sicherer L, Dusing R: **Effects of aprotinin on renal function and urinary prostaglandin excretion in conscious rats after acute salt loading.** *Clinical Science*, **56**(6):547-553.
98. Vio CP, Oestreicher E, Olavarria V, Velarde V, Mayfield RK, Jaffa AA: **Cellular distribution of exogenous aprotinin in the rat kidney.** *Biological Chemistry* 1998, **379**(10):1271-1277.
99. Maier M, Starlinger M, Zhegu Z, Rana H, Binder BR: **Effect of the Protease Inhibitor Aprotinin on Renal Hemodynamics in the Pig.** *Hypertension January/February* 1985, **7**(1):32-38.

100. Nakagawa M, Stewart JM, Vavrek RJ, Nasjletti A: **Effects of a Kinin Antagonist on Renal Function in Rats**. *American Journal of Physiology* 1990, **258**(3 PART 2):F643-F648.
101. Pfluger H, Maier M, Binder BR: **Effects of antiproteases (aprotinin and gabexate-mesilate) on the postischemic vascular response of the kidney**. *Urologia Internationalis* 1983, **38**(3):150-157.
102. Blauhut B, Gross C, Necek S, Doran JE, Spath P, Lundsgaard-Hansen P: **Effects of High-Dose Aprotinin on Blood Loss Platelet Function Fibrinolysis Complement and Renal Function after Cardiopulmonary Bypass**. *Journal of Thoracic & Cardiovascular Surgery* 1991, **101**(6):958-967.
103. Ulker S, McKeown PP, Bayraktutan U: **Aprotinin impairs coronary endothelial function and down-regulates endothelial NOS in rat coronary microvascular endothelial cells**. *Cardiovascular Research* 2002, **55**(4):830-837.
104. Samama C-M, Mazoyer E, Bruneval P, Ciostek P, Bonnin P, Bonneau M, Roussi J, Bailliart O, Pignaud G: **Aprotinin could promote arterial thrombosis in pigs: A prospective randomized, blind study**. *Thrombosis & Haemostasis* 1994, **71**(5):663-669.
105. [http://ir.themedicinescompany.com/phoenix.zhtml?c=122204&p=irol-newsArticle&ID=1741990\(22.02.2015\)](http://ir.themedicinescompany.com/phoenix.zhtml?c=122204&p=irol-newsArticle&ID=1741990(22.02.2015)).

8 Abkürzungsverzeichnis

ACT	Activated Clotting Time
AKE	Aortenklappenersatz
aPTT	aktivierte partielle Thromboplastinzeit
AT	Antithrombin
AUC	Area Under the Curve
BGA	Blutgasanalyse
CABG	Coronary Artery Bypass Graft
CFT	Clot Formation Time
CRP	C reaktives Protein
CT	Clotting Time
EKZ	Extrakorporale Zirkulation
FFP	Fresh Frozen Plasma
Hct	Hämatokrit
Hgb	Hämoglobin
HLM	Herz- Lungen- Maschine
HPT	Heparin-/Protamintitration
IE	Internationale Einheiten
IL	Interleukin
KG	Körpergewicht
LI	Lyseindex
LOT	Lysis Onset Time
MCF	Maximum Clot Firmness
MKE	Mitralklappenersatz
ML	Maximum Lysis
PAR 1	Protease Activated Receptor 1
POC	Point Of Care
rh-tPA	recombinant human tissue- type Plasminogen Activator
SD	Standardabweichung
TA	Tranexamsäure
TF	Tissue Factor
TFPI	Tissue Factor Pathway Inhibitor
TNF α	Tumornekrosefaktor α
TPZ	Thromboplastinzeit
UE	Unerwünschtes Ereignis
vWF	Von Willebrand Faktor

9 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Demographische Daten der Phase I.....	27
Tab. 2: Art und Anzahl der Operationen in Phase I.....	27
Tab. 3: Intraoperative Daten.....	28
Tab. 4: ACT Medtronic zu Zeitpunkt T1-3.....	29
Tab. 5: ACT Hemochron Kaolin zu Zeitpunkt T1-3.....	32
Tab. 6: ACT Hemochron Celite zu Zeitpunkt T1-3.....	36
Tab. 7: ROTEM.....	38
Tab. 8: LI 60 zu Zeitpunkt T1.....	40
Tab. 9: LOT.....	40
Tab. 10: aPTT zu Zeitpunkt T3.....	43
Tab. 11: MDCO2010 Spiegel zu Zeitpunkt T3.....	44
Tab. 12: MDCO2010 Spiegel im Hemochron Überstand.....	45
Tab. 13: Demographische Daten der Phase II.....	46
Tab. 14: Art und Anzahl der Operationen in Phase II.....	46
Tab. 15: Hepcon zu Zeitpunkt T1.....	47
Tab. 16: Hepcon zu den Zeitpunkten T2 und T2.1.....	50

10 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Vereinfachtes Modell der Gerinnungsaktivierung	2
Abb. 2: ROTEM Analyse: Darstellung unter massiver Hyperfibrinolyse	13
Abb. 3: Medtronic ACT Plus.....	15
Abb. 4: Hemochron 401.....	16
Abb. 5: Hepcon HMS Plus.....	17
Abb. 6: Hepcon- Kartusche für die erste Messung zur Heparin- Dosisfindung	18
Abb. 7: Beispiel eines Hepcon- Ausdrucks nach der ersten Hepconmessung.....	18
Abb. 8: HPT- Kartuschen für verschiedene Heparinkonzentrationen	19
Abb. 9: Gesamt-Heparin- und Protamindosen.....	28
Abb. 10: ACT Medtronic T1 - T3.....	30
Abb. 11: ACT Medtronic T1 - T3 in Einzeldarstellung	31
Abb. 12: ACT Hemochron Kaolin T1 – T3.....	33
Abb. 13: Hemochron Kaolin T1-3 in Einzeldarstellung.....	34
Abb. 14: Korrelation ACT Hemochron Kaolin zu T1 und T2 ohne Zugabe von MDCO2010 und mit 600nM MDCO2010	35
Abb. 15: Korrelation T1 ACT Hemochron Kaolin und ACT Medtronic ohne Zugabe von MDCO2010 und mit 600nM MDCO2010.....	35
Abb. 16: Korrelation T2 ACT Hemochron Kaolin und ACT Medtronic ohne Zugabe von MDCO2010 und mit 600nM MDCO2010.....	36
Abb. 17: Korrelation T1 ACT Hemochron Kaolin und ACT Hemochron Celite ohne Zugabe von MDCO2010 und mit 600nM MDCO2010.....	37
Abb. 18: Korrelation T2 ACT Hemochron Kaolin und ACT Hemochron Celite ohne Zugabe von MDCO2010 und mit 600nM MDCO2010.....	37
Abb. 19: T3 exTEM	39
Abb. 20: T3 inTEM	39
Abb. 21: T3 hepTEM	39
Abb. 22: T1: Anstieg der LI60 unter steigenden MDCO2010 Konzentrationen unter Zugabe von rh-tPA.....	41
Abb. 23: T1 exTEM mit rh-tPA.....	42
Abb. 24: T3 exTEM mit rh-tPA.....	43
Abb. 25: Konzentrationsabhängiger Anstieg der aPTT zu Zeitpunkt T3.....	44
Abb. 26: Streuung der gemessenen MDCO2010-Spiegel um die erwünschte Zielkonzentration (Teilstriche).....	44
Abb. 27: MDCO2010-Spiegel im Kaolin/ Celite- Überstand in der Einzeldarstellung.....	45
Abb. 28: T1 Hepcon: ACT Ergebnisse der verschiedenen Kanäle ohne und mit Zugabe von MDCO2010.....	48
Abb. 29: Heparin in IU ohne MDCO2010 (Kreuz) und mit MDCO2010 (Stern)	49

Interessenkonflikte: Diese Studie wurde mit finanzieller Unterstützung der Medicines Company durchgeführt. Die Erstellung des Studienprotokolls, sowie Auswertung und Interpretation der Daten erfolgte ohne Unterstützung der Firma. Alle Daten wurden von E.S. erhoben und ausgewertet.

11 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Wulf Dietrich für die Überlassung des Themas und für die Zeit, die er sich für Gespräche und die Klärung von Fragen und Problemen nahm. Herzlich und engagiert hat er mir immer geholfen. Er hat diese Arbeit mit seinen Ideen, seiner Geduld und seiner Erfahrung ermöglicht.

Besonderer Dank gilt Florian Baier, der mich bei der statistischen Auswertung geduldig und kompetent beraten hat. Vielen Dank!

Allen Patienten möchte ich für die Bereitstellung ihrer Daten danken.

12 Eidesstattliche Versicherung

Straube, Emilia

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

**Auswirkungen des Proteaseninhibitors MDCO2010 auf die
Gerinnungsdiagnostik während herzchirurgischer Eingriffe**

selbstständig 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.

München, den 01.02.2018

Ort, Datum

E. Straube

Unterschrift Doktorand/ Doktorandin