

Aus der Klinik für  
Anästhesiologie mit Schwerpunkt operative Intensivmedizin,  
der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

„Beeinflussen die Antikoagulantien Heparin und Hirudin die  
Aktivierung des plasmatischen Gerinnungssystems unter  
kontinuierlicher Nierenersatztherapie“

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Kadir Yilmaz

aus Berlin

Datum der Promotion: 03.03.2023

„Das Wort, das aus der Seele kommt,  
das setzt sich ganz bestimmt ins Herz“

*Rumi (1207 - 1273)*

Für meine Familie

## Vorwort

Zwischenergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden in folgenden Posterbeiträgen vor Abschluss des Promotionsvorhabens veröffentlicht:

C. von Heymann<sup>1</sup>, K. Yilmaz<sup>2</sup>, O. Vargas<sup>1</sup>, W.J. Kox<sup>1</sup>, C. Spies<sup>1</sup>

„Beeinflusst das Antikoagulans die Aktivierung des plasmatischen Gerinnungssystems während kontinuierlicher Nierenersatzverfahren? Ein Vergleich von Heparin und rHirudin“. Hauptstadtkongress für Anästhesie und Intensivmedizin.

C. von Heymann<sup>1</sup>, O. Vargas<sup>1</sup>, S.Ziemer<sup>2</sup>, K. Yilmaz<sup>3</sup>, W.J. Kox<sup>1</sup>, C. Spies<sup>1</sup>

“Does the anticoagulant influence the activation of the plasmatic coagulation system during continuous renal replacement therapy? A comparison of unfractionated heparin and recombinant hirudin“. Gesellschaft für Thrombose- und Hämostaseforschung (GTH).

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen und Akronyme .....	III
Tabellenverzeichnis .....	VI
Abbildungsverzeichnis .....	VII
Formelverzeichnis .....	VIII
Zusammenfassung/ Abstract.....	- 1 -
1 Einleitung .....	- 2 -
1.1 Fragestellung und Ziel der Untersuchung.....	- 9 -
2 Patienten und Methoden .....	- 11 -
2.1 Patienten.....	- 11 -
2.2 Ein-, Ausschluss-, und Abbruchkriterien .....	- 12 -
2.3 Geräte .....	- 13 -
2.4 Studiendesign und Monitoring .....	- 14 -
2.5 Durchführung und Monitoring .....	- 15 -
2.5.1 Activated-Clotting-Time.....	- 15 -
2.5.2 Ecarin Clotting Time (ECT) .....	- 16 -
2.6 Verarbeitung und Messung.....	- 16 -
2.7 Bestimmung der therapeutischen Hirudin-Konzentration .....	- 17 -
2.8 Gerinnungsfaktoren.....	- 19 -
2.8.1 Prothrombin (Gerinnungsfaktor II) .....	- 19 -
2.8.2 Fibrinogen-/Fibrinspaltprodukte (D-Dimere) .....	- 20 -
2.8.3 Prothrombinfragment 1 und 2 (PF 1+2) .....	- 23 -
2.8.4 Thrombin-Antithrombin-Komplex (TAT) .....	- 24 -
2.9 Datenerfassung und statistische Analyse .....	- 26 -
3 Ergebnisse.....	- 28 -
3.1 Patienten.....	- 28 -
3.2 TAT-Konzentration .....	- 30 -
3.3 Prothrombinfragment 1+2 .....	- 32 -
3.4 Antithrombin-Konzentration .....	- 33 -
3.5 Fibrinogenkonzentration .....	- 34 -
3.6 Thromboplastinzeit nach Quick .....	- 35 -

3.7	Aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT) .....	- 36 -
3.8	Thrombozytenanzahl/ nl.....	- 37 -
3.9	Filterlaufzeit .....	- 38 -
3.10	Dosis- und Plasmaspiegel von Hirudin und Plasma ECT Werte .....	- 39 -
3.11	Blutungen .....	- 40 -
4	Diskussion .....	- 42 -
4.1	Plasmatische Gerinnungsparameter.....	- 43 -
4.2	Filterlaufzeit .....	- 46 -
4.3	Blutungskomplikationen .....	- 47 -
4.4	Methodendiskussion .....	- 48 -
5	Zusammenfassung .....	- 50 -
6	Literaturverzeichnis.....	- 52 -
7	Erklärung .....	- 61 -
8	Lebenslauf.....	- 62 -
9	Danksagung.....	- 63 -

## Abkürzungen und Akronyme

### A

ACT	Activated Clotting Time
AHT	Arterielle Hypertonie
ALT	Alanin-Aminotransferase
APACHE III	Acute Physiology and Chronic Health Evaluation, Version 3
aPTT	aktivierte partielle Thromboplastinzeit
AS	Aminosäuren
AST	Aspartat-Aminotransferase
AT	Antithrombin
aXa	anti-Faktor Xa

### C

CRP	C-reaktives Protein
CRRT	kontinuierliche Nierenersatztherapie
CVVH	Kontinuierliche veno-venöse Hämofiltration

### E

ECT	Ecarin Clotting Time
EK	Erythrozytenkonzentrat
EKZ	Extracorporale Zirkulation
ExTEG	TEG, speziell der extrinsischen Gerinnung
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay

### F

FFP	fresh frozen plasma
FLZ	Filterlaufzeit
FXa	Faktor Xa
FibTEG	Reagenz für das Fibrinogen sensitive TEG

### G

GF	Gerinnungsfaktoren
GGT	Gamma-Glutamyl-Transpeptidase

## H

HAA	Hirudin Activity Assay
Hb	Hämoglobin
HIPA	heparin induced platelet activation
HIT	Heparin induzierte Thrombozytopenie
HMWH	high molecular weight heparin
HPIA	Heparin/Plättchenfaktor 4-Enzymimmunoassay

## I

I.E.	Internationale Einheit
i.v.	Intravenös
ICU	Intensivstation (intensive care unit)
INR	international normalized ratio
InTEG	Reagenz, speziell für die intrinsische Gerinnung

## L

LMWH	low molecular weight heparin
LPS	Lipopolysaccharid

## N

NMH	niedermolekulares Heparin
-----	---------------------------

## O

OP	Operation
----	-----------

## P

PF 4	Plättchenfaktor 4
PKL	polymorphkernige Leukozyten
PPSB	Prothrombin, Proconvertin, Stuart Faktor

## R

rHirudin                    rekombinantes Hirudin  
rEcaTEG                    rekombinantes Ecarin, für das Hirudin-empfindliche TEG

## S

s.c.                            subcutan  
StartTEG                    CaCl<sub>2</sub>+HEPES Puffer zur Rekalzifizierung des Citratblutes

## T

TAT                            Thrombin-Antithrombin-Komplex  
TEG                            Thrombelastogramm  
TF                             tissue factor, Gewebethromboplastin  
TK                             Thrombozytenkonzentrat

TNF- $\alpha$                     Tumornekrosenfaktor alpha  
t-PA                           tissue-Plasminogenaktivator  
TPZ                           Thromboplastinzeit  
TZ                             Thrombinzeit

## U

UFH                           Unfraktioniertes Heparin

## Z

Z. n                           Zustand nach

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zusammenstellung der erfassten Blutparameter.....	- 12 -
Tabelle 2: Zusammenstellung der Einschluss-, Ausschluss- und Abbruchkriterien.....	- 13 -
Tabelle 3: Intra-Assay (Dimertest® Gold EIA Agen Biomedical Limited) .....	- 22 -
Tabelle 4: Inter-Assay (Dimertest® Gold EIA Agen Biomedical Limited). .....	- 23 -
Tabelle 5: Anzahl und Art der Erkrankungen der Studienpatienten vor- und nach Herz-OP..	- 29 -
Tabelle 6: Basisdaten der Patienten und Indikationen für die kontinuierliche Nierenersatztherapie.....	- 30 -
Tabelle 7: Dosis- und Plasmaspiegel von Hirudin (Medianwert und Spannbreite) .....	- 39 -
Tabelle 8: Labor- und klinische Parameter beim Auftreten der Blutung und Ausgangswerte der zwei Patienten mit Blutverlust.....	- 41 -

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: KDIGO-Leitlinien zum akuten Nierenversagen.....	- 3 -
Abbildung 2: Aus Entstehung und Eigenschaften der Fibrinogenspaltprodukte .....	- 21 -
Abbildung 3: Zeitlicher Verlauf der TAT-Konzentration unter den zwei Therapieformen. Median (25./75. Perzentile), Signifikanzniveau: $p^* < 0,05$ , als Unterschied zwischen den Gruppen. ....	- 31 -
Abbildung 4: Zeitlicher Verlauf der Prothrombinfragment 1+2-Konzentration unter den zwei Therapieformen. Median (25./75. Perzentile) Ein signifikanter Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen lag zu t96 vor. ....	- 32 -
Abbildung 5: Zeitlicher Verlauf der Antithrombin-Konzentration unter den zwei Therapieformen. Median (25./75. Perzentile) .....	- 33 -
Abbildung 6: Zeitlicher Verlauf der Fibrinogenkonzentration unter den zwei T herapieformen. Median (25./75. Perzentile). ....	- 34 -
Abbildung 7: Zeitlicher Verlauf der Thromboplastinzeit nach Quick unter den zwei Therapieformen. Median (25./75. Perzentile). ....	- 35 -
Abbildung 8: Verlauf der partiellen Thromboplastinzeit (aPTT) unter den zwei Therapieformen. Median (25./75. Perzentile). ....	- 36 -
Abbildung 9: Zeitlicher Verlauf der Thrombozytenzahl unter den zwei Therapieformen. Median (25./75. Perzentile) .....	- 37 -
Abbildung 10: Filterlaufzeiten für Hirudin und Heparin, Kaplan-Meier-Analyse .....	- 38 -
Abbildung 11: Hirudin-ECT-Werte im Plasma [sec] im Zeitverlauf. Median (25./75. Perzentile). ....	- 39 -

## Formelverzeichnis

Formel 1: Berechnung der ermittelten Hirudinkonzentration nach Pötzsch .....	- 18 -
Formel 2: Hirudin Referenzwertbestimmung der Max-Planck-Arbeitsgruppe	
“Pharmakologische Hämostaseologie” an der FSU Jena 2000 .....	- 19 -

## Zusammenfassung/ Abstract

Die plasmatische Gerinnungshemmung ist entscheidend bei akutem Nierenversagen mit Notwendigkeit zur kontinuierlicher Nierenersatztherapie. Die Antikoagulation mit Heparin stellt eine Alternative zur Citrat- Antikoagulation dar. Bei der Unverträglichkeit beider Substanzen ist die Kenntnis über eine dritte Alternativsubstanz essentiell. In der vorliegenden Studie wurde kontinuierlich verabreichtes Heparin (UFH) mit diskontinuierlich verabreichtem Hirudin im Vergleich bei CVVH hinsichtlich der plasmatischen Gerinnungsaktivierung untersucht. Die intermittierende Hirudin Gabe kann zur Antikoagulation bei kontinuierlicher extrakorporaler Nierenersatztherapie sicher eingesetzt werden. Die diskontinuierliche Hirudin Anwendung war gegenüber der kontinuierlichen Heparin Applikation in Bezug auf Blutungskomplikationen nicht unterlegen. Die vorliegende Studie zeigte, dass unfraktioniertes Heparin bei der Hemmung der Gerinnungsaktivierung Vorteile besitzt. Unter kontinuierlicher Heparin Applikation ist eine engmaschige Anpassung der Heparin Dosis möglich. Dies ermöglicht im Vergleich der hier dargelegten Applikationsform des Hirudin weniger Gerinnungsaktivierung und damit längere Filterlaufzeiten. Die vorgelegte Studie wies nach, dass Hirudin hinsichtlich der dargelegten Applikationsform zu mehr plasmatischer Gerinnungsaktivität bezogen auf den Thrombin-Antithrombin-Komplex (TAT) führt.

*The plasmatic anticoagulation is crucial for the efficacy of renal replacement therapy due to acute renal failure. Heparin- Anticoagulation is an alternative to Citrate- Anticoagulation. An intolerance of both substances results in an important need to know a third alternative substance. The present study is a comparison between continuous application of unfractionated heparin versus discontinuous application of recombinant Hirudin due to continuous renal replacement therapy and the activation of plasmatic coagulation. The study showed Benefits in using continuous application of Heparin due to the adjustment. Results were a lower activation of plasmatic coagulation and therefore a longer filter runtime. Discontinuous applied Hirudin is a safe treatment and noninferior to Heparin treatment related to bleeding complications. Hirudin showed a significant activation of plasmatic coagulation referred to Thrombin-Antithrombin-Complex (TAT).*

# 1 Einleitung

Die Ausscheidungen von Stoffwechselendprodukten, die Steuerung der Osmose und des intra-, extrazellulären Wasser- und Elektrolythaushaltes sowie die Aufrechterhaltung einer optimierten Säure-Basen-Konstellation bedarf einer suffizienten Nierenfunktion (Morgera, 2005). Nach der KDIGO Richtlinie (clinical practice guideline for acute kidney injury) ist eine häufige Komplikation intensivpflichtiger Patienten ein akutes Nierenversagen (ANV) (Kaufmann & Voit, 2019; Khwaja, 2012; Lopes et al., 2008; Morgera, 2005; Samimagham et al., 2011; Vanmassenhove et al., 2017; Weinreich, 2020). Der Anstieg des Kreatinins i.S. (Leitsymptom) von mehr als 0,3 mg/dl (SI-Einheit  $\geq 26,5 \mu\text{mol/l}$ ) innerhalb von 2 Tagen (48h) oder sowie mehr als das 1.5fache des Ausgangswertes ( $\geq 50 \%$ ) im Verlauf einer Woche (7 Tage (168 h)) charakterisieren des ANV (Bienholz & Kribben, 2013; Herold, 2012). Eine progrediente Abnahme der Urin-Ausscheidung, welche mindestens weniger als 0,5 ml/kg/h in mehr als 6 Stunden betragen muss ist ebenfalls charakteristisch (Bienholz & Kribben, 2013; Herold, 2012; Kaufmann & Voit, 2019; Lopes et al., 2008; Moore et al., 2018).

Die KDIGO Kriterien (Bienholz & Kribben, 2013) erlauben eine Aussage bezüglich einer Remission des Nierenversagens sowie der Erfordernis einer extrakorporalen Nierenersatztherapie. Das ANV als alleinige Organdysfunktion gilt als unabhängiger Risikofaktor für Morbidität und Mortalität der Patienten auf Intensivstation (Bienholz & Kribben, 2013; Kaufmann & Voit, 2019; Lo et al., 2009; Samimagham et al., 2011). Ein im Rahmen eines Multiorgan-Dysfunktionssyndrom (MODS) (Baue, 2006) aufgetretenes ANV hat eine Mortalität bis zu 90 % (Guérin et al., 2002; Samimagham et al., 2011). Frühe Studien von Mangano (Mangano et al., 1998) und Guerin (Guérin et al., 2002) konnten zeigen, dass das Mortalitätsrisiko von 63% und 66% signifikant gesteigert ist gegenüber Patienten ohne Nierenversagen (0,9 % und 15 %). Wird das ANV überlebt, so ist die Prognose der vollständigen Wiederherstellung der Nierenfunktion mit ca. 90 % sehr gut (Kaufmann & Voit, 2019).

Der Grund für ein akutes Nierenversagen ist häufig ein Volumenmangel (ca. 60%), welches zu einer renalen Minderperfusion führt (Herold, 2012; Moore et al., 2018). Am zweithäufigsten kommt es durch direkte Nierenschädigungen zu einem intrarenal bedingtem Nierenversagen (ca. 35%). Ca. 85% dieser renalen Form des ANV ist durch

Tubulusnekrosen bedingt (Herold, 2012; Moore et al., 2018). Auch eine lange Periode prärenalen Volumenmangels führt zu Tubulusnekrosen. Postrenale Abflussbehinderungen haben ca. 5% Anteil am ANV (Herold, 2012; Kaufmann & Voit, 2019; Moore et al., 2018). Tubulusnekrosen begründen sich vielfach in einer durch Mikroembolien ausgelösten zirkulatorischen Inkompetenz, und damit einer unzureichenden Sauerstoffversorgung des Nierengewebes (Guérin et al., 2002; Herold, 2012; Moore et al., 2018). Diese Hyperkoagulopathie wird primär durch eine erhöhte Thrombinaktivierung, welche eine irreversible Plasminaktivator-Inhibitor Hemmung verursacht (Himmelreich & Riess, 1999). Ein Thrombinanstieg, welcher durch erhöhte Ausschüttung von Gewebsthromboplastin und dessen Komplexierung mit aktiviertem FVII entsteht, konnte bei Trauma, Sepsis und Myokardinfarkt beobachtet werden (Gulba et al., 1991; Himmelreich & Riess, 1999). Die primären therapeutischen Optionen des ANV nach KDIGO beinhalten allgemein gehaltene, Stadien basierte Handlungsempfehlungen nach drei Stadien, welche im Acute Kidney Injury Network zusammengefasst wurden (Bienholz & Kribben, 2013; Khwaja, 2012).



Abbildung 1: Schweregrad des ANV nach KDIGO-Leitlinien zum akuten Nierenversagen: Bienholz, A. & Kribben, A. Nephrologe (2013) 8: 247. <https://doi.org/10.1007/s11560-013-0752-1> (Bienholz & Kribben, 2013).

Ziel ist es eine suffiziente Sauerstoffversorgung der Nieren durch eine optimierte Perfusion des Nierengewebes zu etablieren. Volumensubstitution und die Sicherung

eines stabilen Herzzeitvolumens sind hierbei primär (Bellomo et al., 2004; Bienholz & Kribben, 2013; Khwaja, 2012; Vanmassenhove et al., 2017). Auch müssen bei weitgehendem oder vollständigem Nierenversagen die ausfallenden Funktionen der Nieren übernommen werden (Bienholz & Kribben, 2013; Herold, 2012; Lo et al., 2009; Wald et al., 2009). Neben nicht-extrakorporalen Methoden (Peritonealdialyse) kommen sogenannte extrakorporale Verfahren (Hämodialyse, Hämofiltration sowie die Hämodiafiltration) zur Anwendung (Bienholz & Kribben, 2013; Macedo & Mehta, 2016; Weinreich, 2020). Bei der Hämodialyse kommt es durch Osmose zwischen zweier Flüssigkeiten, die durch eine semipermeable Membran getrennt sind, zu einer Angleichung der Konzentration kleinmolekularer Substanzen (Barenbrock & Schaefer, 2004; Palmer et al., 2012). Dies kann kontinuierlich und diskontinuierlich angewendet werden (Weinreich, 2020). Die semipermeable, poröse Filtermembran (Morgera, 2005), ermöglicht eine Filtrierung kleinmolekularer Teile, wie Harnstoff, Harnsäure, Wasser und Elektrolyte. Korpuskulare Elemente, wie Blutzellen und Eiweiße werden hingegen zurückgehalten (Barenbrock & Schaefer, 2004; Palmer et al., 2012). Bei den Filtermembranen handelt es sich um Materialien aus Cellulose oder aus synthetischen Stoffen, wie Polysulfon, Polyamid, Polyacrylnitrit, Polykarbonat oder Polymethylmethacrylat (Jörres et al., 1999; Palmer et al., 2012). Die synthetischen Hämofilter haben sich bereits früh zur Behandlung des akuten Nierenversagens etabliert (Morgera, 2005; Schiffel et al., 2002; Weinreich, 2020). Die venö-venöse Hämofiltration ist physiologisch, als auch hämodynamisch besser verträglich (Bellomo et al., 1999; Jörres et al., 1999; Wendon et al., 1989), daher ist sie die intensivmedizinische Therapie der Wahl bei ANV (Bienholz & Kribben, 2013; Kaufmann & Voit, 2019; Kretschmer, 2006; Lopes et al., 2008; Schiffel et al., 2002; Weinreich, 2020). Aufgrund einer hydrostatischen Druckdifferenz (Barenbrock & Schaefer, 2004) an der semipermeablen Membran kommt es zum Abscheiden einer Ultrafiltration, welche durch Substitution einer physiologischen Elektrolytlösung ersetzt wird. Die Anwendung dieses Verfahrens erfolgt in der Regel kontinuierlich (Barenbrock & Schaefer, 2004; Weinreich, 2020). Die Hämodiafiltration ist ein Verfahren bei der Hämodialyse (Prinzip der Diffusion) und Hämofiltration (Prinzip der Konvektion) in Kombination angewendet werden und ermöglicht die Entfernung von nieder- und mittelmolekularen Substanzen, ohne dass ein Dialysat verwendet wird (Barenbrock & Schaefer, 2004; Macedo & Mehta, 2016).

Insgesamt gilt für alle Verfahren: Filtergröße, Flussraten und venöser Druck müssen aufeinander abgestimmt werden (Barenbrock & Schaefer, 2004; Weinreich, 2020). Eine zu kurze Filterlaufzeit, zum Beispiel durch eine gesteigerte Koagulationsneigung ("clotting") führt zum Wechsel desselbigen und zu einer erneuten Aktivierung der Gerinnungskaskade und der Akute Phase Reaktion (Barenbrock & Schaefer, 2004; Schetz, 2001). In Bezug auf die plasmatische Gerinnung kommt es vor allem zu einem Anstieg der Fibrinogen Konzentration, was zu einer verschlechterten Hämorrhologie führt (Scharf, 2010). Deshalb ist die Antikoagulation von klinischer Relevanz (Schetz, 2001; Vargas-Hein et al., 2004; Weinreich, 2020). Es lässt sich postulieren, dass das zentrale Problem der Nierenersatzverfahren eine Fremdoberflächen-Kontaktaktivierung (Schetz, 2001; Vanholder & Dhondt, 1999) des plasmatischen Gerinnungssystems und des durch Aggregation und Adhäsion von Thrombozyten, und Leukozyten bestimmten zellulären Gerinnungssystems ist (Calatzis et al., 2004; Köstering et al., 1977; Lindhout T, 1994; Scharf, 2010; Schetz, 2001). Neben der Aktivierung des ehemals als extrinsisch bezeichneten Gerinnungssystems durch Freisetzung von Gewebsthromboplastin (tissue factor) (Scharf, 2010) kommt es durch Fremdoberflächenkontakt zu einer sekundären Aktivierung von Faktor XII (XII -> XIIa, klassischer Marker der Kontaktaktivierung des ehemals intrinsisch bezeichneten Gerinnungssystems) und weiteren Gerinnungsfaktoren (FXI, FIX, FVIII) (Scharf, 2010). Diese dienen der Bildung eines Komplexes aus FXa/FVa, dem sogenannten Prothrombinkomplex. Dieser Komplex leitet die proteolytische Spaltung von Prothrombin (FII) zu Thrombin (FIIa) ein, dass seinerseits eine Aktivierung der Thrombozyten sowie Leukozyten und Endothelzellen einleitet (Hirsh et al., 2005; Hoffman & Monroe, 2001; Scharf, 2010; Schetz, 2001). Aufgrund der kurzen Halbwertszeit des Thrombin (5sek.) im Plasma kann es fast nur als Thrombin-Antithrombin-Komplex (TAT-Komplex) nachgewiesen werden. Eine Erhöhung der TAT-Konzentration im Plasma korreliert unter Umständen eng mit einer verkürzten Filterlaufzeit (Schetz, 2001; Vargas-Hein et al., 2004). Eine Modulation erfährt dieser Gerinnungsprozess durch verschiedene Protease Inhibitoren. Antithrombin (AT III) hemmt vorrangig Thrombin und FXa. Es entstehen Thrombin-AT-Komplexe (TAT) bzw. FXa-AT-Komplexe (Scharf, 2010). Protein C mit dem Cofaktor Protein S hemmt nach Aktivierung durch Thrombin das endotheliale Thrombomodulin sowie die Aktivierung von Faktor V und Faktor VIII. In der Endstrecke der Gerinnung bilden sich Fibrinmonomere,

die zunächst zu löslichen und unter dem Einfluss von durch Thrombin aktiviertem FXIII (FXIIIa) zu unlöslichem Fibrin polymerisieren (Scharf, 2010). Der Ort dieser Gerinnungsvorgänge befindet sich überwiegend auf der Oberfläche aktivierter Thrombozyten, die über die Fibrinmonomere zu einem stabilen Thrombus vernetzt werden. Dieses Modell stellt neben der Virchowschen Trias (venöse Stase, Hyperkoagulabilität, Gefäßendothelverletzung) das moderne Verständnis des Systems der zellulären Hämostase dar (Hoffman & Monroe, 2001; Scharf, 2010).

Die Antikoagulation mit Citrat wird in der kontinuierlicher extrakorporalen Nierenersatztherapie primär bevorzugt (Bienholz & Kribben, 2013). Ohne eine relevante systemische Beeinträchtigung (systemische Blutungen, allergische Reaktion, Kreuzreaktion), zählt sie zu der sogenannten lokalen Antikoagulation am Hämofilter (Böhrer & Nawroth, 1999). Trinatriumcitrat bindet als Chelatkomplex ionisiertes Calcium und inhibiert damit den Beginn der plasmatischen und zum Teil korpuskularen Gerinnungskaskade. Trotz der überwiegend positiven Eigenschaften können Kontraindikationen und sich entwickelnde Komplikationen (metabolische Alkalose, Hypernatriämie, Hyperkalzämie) (Böhrer & Nawroth, 1999) den Gebrauch von alternativen Antikoagulantien notwendig machen (Ronco et al., 2007; Schneider et al., 2000; Shah et al., 2000; Warkentin et al., 2008).

Ein häufiges, auf Intensivstationen verwendetes Antikoagulans ist das aus Polyschwefelsäureester eines Mucopolysacchariden bestehende Heparin (Bienholz & Kribben, 2013; Ronco et al., 2007; Warkentin et al., 2008; Weinreich, 2020). Je nach Molekülgröße unterscheidet man hochmolekulare (unfraktioniert) und niedermolekulare (fraktioniert) Heparine (Barth, 1998; Harenberg et al., 1997). Das Molekulargewicht von unfraktioniertem Heparin beträgt zwischen 3 und 30 kDa (im Mittel ca. 4-6 kDa) (Barth, 1998; Harenberg et al., 1997). Heparin wurde 1916 in der Hundeleber entdeckt (Haas, 1997) und in den 30`er Jahren erstmalig am Menschen zur Hemmung der Blutgerinnung eingesetzt. Unfraktioniertes, hochmolekulares Heparin bindet an Antithrombin und beschleunigt die Inaktivierung von Gerinnungsfaktoren um das 1000fache (Visentin & Aster, 1995). Dazu muss das Heparin mindestens eine Kettenlänge von 18 oder mehr Monosacchariden aufweisen. Unfraktioniertes Heparin inaktiviert neben Thrombin (FIIa) auch den aktivierten FX. Neben der Applikationsart (i.v. vs. s.c.) erklärt sich dadurch auch

die schnellere gerinnungshemmende Wirkung von unfraktioniertem Heparin gegenüber fraktioniertem, niedermolekularem Heparin. Ferner werden die Faktoren Xa, VIIa, IX (Antihämophiler Faktor B bzw. Christmas Faktor), XI (Hagemann Faktor) und Kallikrein inaktiviert. Bei unfraktioniertem Heparin beträgt die Halbwertszeit bei i. v. Gabe 1 Stunde, nach s.c. Applikation 2 Stunden (Harenberg et al., 1997). Fraktioniertes Heparin zeigt eine Halbwertszeit von 2h nach i.v. und 4h nach s.c. Gabe. Heparin dissoziiert nach Bindung an Thrombin und Faktor Xa aus dem Heparin-Antithrombin-Komplex und kann erneute Komplexe mit Antithrombin bilden (Luxembourg et al., 2007). Das Retikulohistiozytäre System eliminiert den inaktivierten Proteasen-Antithrombin-Komplex. Durch die ausschließliche Hemmung des freien Thrombin kommt es zu einer Inhibierung der Polymerisation von Fibrin durch reduzierte Produktion von Fibrinmonomeren. Insgesamt wird der aktivierte Faktor V und die Thrombozytenaggregation gehemmt (Lämmle & Griffin, 1985).

Neben Blutungskomplikationen ist das Heparin Ursache der sogenannten Heparin-Induzierten-Thrombozytopenie (HIT) (Greinacher et al., 2003; Warkentin, 2010, 2018; Warkentin et al., 2008). Innerhalb von 5-10 Tagen kommt es entweder zu einer proaggregatorisch, vorübergehenden (HIT Typ I) oder immunologisch, IgG vermittelten (HIT Typ II) Form (Petros, 2008). Hierbei erworbene IgG-Antikörper binden an Heparin-Plättchenfaktor 4-Komplexe und induzieren die weitere Freisetzung von Plättchenfaktor 4 (PF4), sodass es zu einer kaskadenartigen Ausweitung der thrombozytären Aggregation kommt (Greinacher et al., 2003; Petros, 2008; Warkentin, 2018). Die Inzidenz der HIT Typ II wird auf 1 bis 3% (Greinacher et al., 2003) bei postoperativen Patienten und 0.2 bis 0.5% (<1%) (Petros, 2008; Warkentin, 2010) geschätzt. Bei konservativ mit unfraktioniertem Heparin behandelten Patienten tritt sie mehr als bei Therapie mit niedermolekularem Heparin auf (Greinacher et al., 2003; Petros, 2008). Eine Unverträglichkeitsreaktion auf Heparin erfordert das sofortige Absetzen von Heparin und die Umstellung auf alternative Antikoagulanzen (Fischer et al., 1999; Petros, 2008; Ronco et al., 2007; Vanholder et al., 1994).

Die in dieser Studie untersuchte Substanz "Hirudin", wurde 1884 erstmals durch Haycraft gefunden und von Jakobi 1904 (Junren et al., 2021) benannt. Markwardt (Markwardt et al., 1991) charakterisierte es erstmals 1955. Es ist ein hochwirksames

gerinnungshemmendes Polypeptid aus 65 Aminosäuren des Blutegels "hirudo medicinalis" mit einem Molekulargewicht von ca. 7000 Dalton (Markwardt, 1991, 1994). Die Applikation erfolgt parenteral, die Bioverfügbarkeit nach s.c. Injektion beträgt ca. 85%. Die Halbwertszeit beträgt 60 Minuten nach i.v. und 120 Minuten nach s.c. Applikation (Hirsh et al., 2005; Vanholder et al., 1994). Für medizinische Zwecke wird es als rekombinantes Hirudin (Lepirudin und Desirudin) aus gentechnologisch veränderten Hefen (*Saccharomyces cerevisiae*) (Park et al., 1995) hergestellt. Aufgrund der strukturellen Gegebenheiten des Thrombins an seinem N-Ende mit drei paar Disulfid-Bindungen (Junren et al., 2021) kann es eine 1:1 Bindung an der Fibrinogenbindungsstelle des Thrombins eingehen und dieses hemmen (Hirsh et al., 2005; Vanholder et al., 1994). Und das unabhängig von einem Cofaktor wie AT III. Es hemmt irreversibel das aktive Zentrum von freiem und fibrinogengebundenem Thrombin, wodurch dessen Wirkung auf Fibrinogen durch Inhibition der Zwischenprodukte sowie der Faktoren V, VIII und XIII gehemmt wird (Hirsh et al., 2005; Junren et al., 2021; Ronco et al., 2007; Vanholder et al., 1994; Vanholder & Dhondt, 1999). Neben der Wirkung auf die plasmatische Gerinnung bewirkt Hirudin auch eine Hemmung von Zellfunktionen. So wird das Fibroblastenwachstum gehemmt, wobei rHirudin nur die thrombininduzierte, fibrinabhängige Plättchenaggregation, nicht aber die Plättchenaggregation durch andere Aggreganzien wie ADP und Kollagen hemmt (Fa. Celgene, 2008; Junren et al., 2021). Die rHirudin Aktivität ist nach Herstellerangaben mit einer spezifischen Aktivität von 16.000 ATE (ATE= Antithrombineinheit) angegeben (Fa. Celgene, 2008). Dabei entspricht eine AT Einheit, derjenigen Menge von Hirudin, „die eine Einheit der WHO Zubereitung 89/588 von Thrombin neutralisiert“ (Fa. Celgene, 2008). rHirudin ist bei Patienten mit einer HIT Typ II erfolgreich angewandt worden (Hirsh et al., 2005; Schneider et al., 2000; Vanholder et al., 1994; Vargas-Hein et al., 2004). Allerdings liegen keine ausreichenden Ergebnisse zur Sicherheit der Antikoagulation mit rHirudin bei niereninsuffizienten Patienten, welche eine Hämofiltration benötigen, vor (Bienholz & Kribben, 2013; Bucha et al., 1990; Fischer et al., 1999; Kiser et al., 2010; Markwardt et al., 1991). Da die Elimination nur renal erfolgt (Hirsh et al., 2005), kommt es im Nierenversagen zu einer deutlichen Verlängerung der Eliminations-Halbwertszeit (Vanholder et al., 1994; Vanholder & Dhondt, 1999) und somit zu einem erhöhten Risiko von Nebenwirkungen, insbesondere von Blutungen (Kern et al., 1999; Vargas-Hein et al.,

2005). Rekombinantes Hirudin ist für folgende Anwendungen untersucht worden: Akuter Myokardinfarkt (Global Use of Strategies to Open Occluded Coronary Arteries (GUSTO) IIb investigators, 1996), instabile angina Pectoris und Koronarangioplastie (Aggarwal et al., 2002; Hirsh et al., 2005), Herzchirurgische Eingriffe mit und ohne Unterstützung einer Herz-Lungen-Maschine (Koster et al., 2006) sowie postoperative Thromboseprophylaxe (Junren et al., 2021; Slaughter & Greenberg, 1997).

Die direkte Thrombin-Inhibition ist ein Hauptziel der HIT II Therapie (Greinacher & Warkentin, 2006; Schneider et al., 2000; Shah et al., 2000; Warkentin, 2018). Durch die Thrombin-Hemmung bei Patienten mit Heparin-induzierter Thrombozytopenie vom Typ II ist rHirudin in der Lage, weiteren thromboembolischen Komplikationen vorzubeugen und zeigt neben den potenten Thrombin-inhibierenden Eigenschaften auch eine im Vergleich zu Heparin verminderte Plättchenaggregation (Beiderlinden et al., 2018; Junren et al., 2021; Kobsar et al., 2012; Mollnes et al., 1988) die vielleicht eine wirksamere Thromboembolie Prophylaxe bei arthrogenem Risikoprofil darstellen könnte, als es mit unfraktioniertem Heparin möglich ist. Der Vertrieb von rHirudin (Refludan®) ist in der Europäischen Union ab dem 1. April 2012 vom Hersteller einseitig eingestellt worden (Fa. Celegene, 2011). Aktuell kommt es durch die Diskussionen um Vakzin vermittelte venöse Thromboembolien im Rahmen der COVID19 Pandemie zu erneuten Betrachtungen direkter Thrombin-Inhibitoren (Greinacher et al., 2021).

## **1.1 Fragestellung und Ziel der Untersuchung**

Hintergrund dieser Pilotstudie war die höhere Blutungsinzidenz unter kontinuierlicher Hirudingabe bei CVVH-Therapie (Müller et al., 1999; Shah et al., 2000; Vargas-Hein et al., 2005). Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, dieses Risikoprofil durch die intermittierende Gabe von rekombinantem Hirudin (rHirudin) zu reduzieren und in Bezug auf die Hemmung der plasmatischen Gerinnungsaktivierung zu untersuchen. Die antithrombotische Wirksamkeit wurde bereits in mehreren Thrombosemodellen (Fischer et al., 1999; Kobsar et al., 2012; Markwardt, 1991, 1994) nachgewiesen, jedoch fehlten im Kontext der Niereninsuffizienz weiterhin klare Aussagen zur gerinnungsphysiologischen Effektivität von rHirudin für die Anwendung bei längerfristiger kontinuierlicher extrakorporaler Nierenersatztherapie des ANV. In der Kontrollgruppe

dieser Untersuchung wurde unfraktioniertes Heparin (UFH) kontinuierlich appliziert. Mithilfe etablierter Testverfahren sollte neben dem Monitoring von Gerinnungsparametern, den Hirudinspiegeln im Serum und Aktivierungsmarkern der plasmatischen Gerinnung die Effektivität beider Antikoagulanzen über einen Zeitraum von 96h untersucht werden. Die wesentlichen Fragestellungen dieser Untersuchung waren:

- 1.) Wird die Gerinnungsaktivierung durch die zu untersuchenden Antikoagulanzen unterschiedlich beeinflusst?
- 2.) Hat dies einen Einfluss auf die Laufzeiten des Hämofilters und damit auf die Effektivität der CVVH zwischen den Gruppen?
- 3.) Wie häufig sind Blutungskomplikationen bei den zu untersuchenden Antikoagulanzen zu beobachten?

## 2 Patienten und Methoden

Nach Zustimmung der örtlichen Ethikkommission (Nr. 169-1, 2000), wurde diese prospektiv-kontrollierte und offen-randomisierte Pilotstudie (Einzelzentrum) an der Klinik für Anästhesiologie mit Schwerpunkt operative Intensivmedizin im Universitätsklinikum Charité (Campus- Mitte) der Humboldt-Universität zu Berlin durchgeführt.

### 2.1 Patienten

26 postoperativ kritisch kranke Patienten mit akutem Nierenversagen und daraus folgender Indikation zur kontinuierlichen extrakorporalen Nierenersatztherapie (veno-venösen Hämofiltration, CVVH) wurden im Zeitraum 02.02.2000 - 01.02.2001 in zwei Gruppen randomisiert. Da alle Patienten aufgrund des Gesundheitszustandes analgosediert und somit nicht einwilligungsfähig waren, wurde eine vormundschaftliche Betreuung durch einen Familienangehörigen eingeleitet. Der/die eingesetzten Betreuer/in wurde ausführlich über die Studie informiert und das schriftliche Einverständnis eingeholt.

Zur Beantwortung der genannten Fragestellungen wurden in beiden Gruppen neben den unten (Tabelle 1) genannten Parametern der Gerinnungsphysiologie die folgenden Variablen der Gerinnungsaktivierung im Studienverlauf gemessen: Thrombin-Antithrombin-Komplex, Prothrombinfragment 1+2, und D-Dimere. Bei allen Patienten wurden initial Alter, Geschlecht, Größe und Gewicht erfasst. Über den gesamten Zeitraum (96h) erfolgten 8-stündlich Messungen (Tabelle 1).

<b>Blutbild</b>	Hämoglobin (Hb) Hämatokrit (Hkt) Leukozyten (WBC) Thrombozyten (PLT)
<b>Retentionswerte +Elektrolyte</b>	Harnstoff Kreatinin Natrium Kalium Magnesium Kalzium
<b>Globale Gerinnungsparameter</b>	aPTT TPZ

<b>Parameter der Gerinnungsaktivierung</b>	TAT-Komplex Prothrombin D-Dimere Fragment 1+2
<b>Gerinnungsinhibitoren</b>	Antithrombin (AT), Protein C (PC) Protein S (PS)
<b>Hirudinspiegel</b>	Ecarin Clotting Time (ECT)
<b>Heparinzeit</b>	Activated Clotting Time (ACT)

Tabelle 1: Zusammenstellung der erfassten Blutparameter

## 2.2 Ein-, Ausschluss-, und Abbruchkriterien

<b>Einschlusskriterien</b>	<p>Neben der klinischen Notwendigkeit einer postoperativen Nierenersatzbehandlung wegen Anurie.</p> <p>Anurie: Restdiurese weniger als 500ml in den letzten 24 Stunden  Kreatinin i.S. 3-fache über der Norm (88µmol / l)  Harnstoff i.S. 3-fache über der Norm (2,3-7,6mmol/l)  Alter &gt;18 Jahren</p>
<b>Ausschlusskriterien</b>	<p>Die Patienten waren nicht für den Einschluss in diese Studie geeignet bzw. wurden aus der Untersuchung ausgeschlossen, wenn eines der folgenden Kriterien vorlag:</p> <p>Nicht-Einwilligungsfähigkeit eines Patienten  Bei Ablehnung des Patienten oder eines Angehörigen  Alter &lt; 18 Jahren</p> <p><b>Pharmako-Hämatologische Interaktionen</b>  Einnahme von Aspirin bis 5 Tage präoperativ  Einnahme von ADP Antagonisten (Clopidogrel/Ticlopidin) bis 7 Tage präoperativ  Therapie mit GP IIb/IIIa Rezeptorantagonisten bis 3 Tage präoperativ  Bekannte Heparin-Unverträglichkeit  plasmatische Gerinnungsstörung (aPTT&gt;60sec., Quick&lt;50%)  Thrombozytopathie, -penie &lt;100.000/µl  HIT Typ II</p> <p><b>Niereninsuffizienz</b>  Terminale Niereninsuffizienz</p> <p><b>Neurologische Vorerkrankungen</b>  Schädel-Hirn-Trauma (SHT)  Zerebrale Insulte innerhalb der letzten 2 Jahre  Zerebrale Insulte mit neurologischen Residuen  Epilepsie</p> <p><b>Schwangerschaft</b></p> <p><b>Gastroenterologische Vorerkrankungen</b>  Chronische Lebererkrankung  aktive und chronische Hepatitis  Bilirubinwert &gt;2mg/dl</p> <p><b>Kardiale Assistverfahren</b></p>

<b>Abbruchkriterien</b>	<p>Postoperative latente oder manifeste Blutungsneigung waren wie folgt definiert:</p> <p><b>Leichte Blutung:</b> keine Bluttransfusion oder nur eine Blutkonserve erforderlich.</p> <p><b>Mäßige Blutung:</b> keine gestörte Hämodynamik und zwei bis drei Transfusionen erforderlich.</p> <p><b>Schwere Blutung:</b> intrakranielle Blutungen, Blutungen mit Todesfolge, Blutungen, die einen chirurgischen Eingriff erforderlich machen oder mit hämodynamischer Beeinträchtigung und einem Bedarf von mehr als vier Transfusionen einhergehen.</p>
-------------------------	--

Tabelle 2: Zusammenstellung der Einschluss-, Ausschluss- und Abbruchkriterien

### 2.3 Geräte

Alle für die Labordiagnostik dieser Studie verwendeten Geräte gehörten zur Standardausstattung der Klinik für Anästhesiologie mit Schwerpunkt operative Intensivmedizin bzw. des Instituts für Laboratoriumsmedizin und pathologische Biochemie der Charité-Universitätsmedizin Berlin. Als ACT-Messgerät, wurde das HemoTEC<sup>®</sup>-ACT von der Fa. HemoTec Inc., Englewood, CO, USA (Seriennummer: 5001187) verwendet. Die dazugehörigen Küvetten wurden von der Fa. Medtronic Hemotec Inc., San Diego, California, USA, hergestellt. Das ECT-Gerät Thrombostat-2-Channel<sup>®</sup> (Seriennummer: 1038) stammte von der Fa. Behnk Elektronik aus Norderstedt, Deutschland. Für die Blutentnahmen wurde ausschließlich Zubehör der Firma Sarstedt AG & Co. Medizintechnik, Nümbrecht, Deutschland verwendet. Die Reagenzien für die mit dem Blutgasanalysator ABL<sup>®</sup> 725 bestimmten Parameter, wie z. B. den pH-Wert, die Partialdrücke der Atmungsgase (pCO<sub>2</sub>, pO<sub>2</sub>), Sauerstoffsättigung (sO<sub>2</sub>), Elektrolyte (cK<sup>+</sup>, cNa, cCa, cCl) sowie Blutzucker und Laktat, wurden vom Hersteller des Blutgasanalysators RADIOMETER<sup>®</sup> Medical, Brønshøj, Dänemark bezogen. Bei den Zentrifugen handelte es sich eine Labofuge<sup>®</sup> 200 Heraeus sowie eine Sepatech<sup>®</sup> CL Allegra 21R-Zentrifuge von der Fa. Beckmann Coulter, Krefeld, Deutschland. Als Dialysatoren wurden ausschließlich Geräte vom Typ BM 11<sup>®</sup> und BM 14<sup>®</sup> der Fa. Baxter, München, Deutschland verwendet. Der routinemäßig verwandte Hämodialyse-Filter der Marke Polyflux<sup>®</sup> 140H wurde von der Fa. Gambro Dialysatoren GmbH, Hechingen, Deutschland hergestellt. Das Schlauchsystem Haemotronic<sup>®</sup> I-41037 wurde von der Fa. Haemotronic Modena, Italien hergestellt. Des Weiteren wurden folgende Geräte und Gerinnungsanalyser zur Bestimmung der notwendigen Blutparameter verwendet: Hitachi<sup>®</sup> 744E zur Bestimmung von Kreatinin und Harnstoff sowie STA Compact<sup>®</sup> für die

Bestimmung von aPTT, Prothrombin sowie ECT (beides von Roche<sup>®</sup> Diagnostics Mannheim, Deutschland). Technicon<sup>®</sup> H3 (Fa. Bayer Diagnostics Leverkusen, Deutschland). Coagulation timer analyzer-BCT<sup>®</sup> (Fa. Dade Behring, Schwalbach, Deutschland). Elida Reader 530<sup>®</sup> (Fa. Schering-Plough Corporation/ Organon Teknika, Durham, North Carolina, USA). roTEG<sup>®</sup> Coagulation Analyzer (Fa. Nobis Labordiagnosics, Endingen, Deutschland).

## **2.4 Studiendesign und Monitoring**

Die vorliegende Pilotstudie wurde als prospektiv randomisierte Studie konzipiert und durchgeführt. 26 postoperativ kritisch kranke Patienten mit akutem Nierenversagen und daraus folgender Indikation zur kontinuierlichen extrakorporalen Nierenersatztherapie (CVVH) wurden entsprechend einer offenen Randomisierungsliste in 2 Gruppen (Heparin, rHirudin) eingeteilt. Während der gesamten Beobachtungszeit von 96h wurde den Patienten der Heparin-Gruppe nach klinikinternem Standard unfractioniertes Heparin (Liquemin<sup>®</sup> NTM, Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland) kontinuierlich per Spritzenpumpe appliziert. Die Initialdosis betrug 250 IU/h bis 500 IU/h. Das extrakorporale Schlauchsystem wurde mit 3 l Heparin-haltiger 0,9% Natriumchloridlösung (10.000 IU Heparin) für 10 min gespült. Die Antikoagulationstherapie wurde 4-stündlich durch Verwendung der "activated clotting time" (ACT) überwacht. Der Zielbereich der ACT betrug 180-210s. Eine Anpassung der Heparin-Dosis bei Über- bzw. Unterschreiten des Zielbereiches erfolgte in Schritten von 125 IU/h.

Die zweite Gruppe wurde mit rHirudin im i. v. Bolusprinzip antikoaguliert. Die Therapie wurde mit der "Ecarin-Clotting-Time" (ECT) gesteuert, da basierend auf Untersuchungen von Pötzsch (Pötzsch et al., 1997) eine bessere Korrelation der Ecarin-Clotting-Time (ECT) und der Hirudinkonzentration beschrieben (Gosselin et al., 2004; Lange et al., 2003, 2005) wurde. Die Hirudin Therapie wurde mit einem Bolus von 0,4mg gestartet und anschließend alle vier Stunden entsprechend der ECT Messung angepasst. Der Zielbereich der ECT lag bei 80-100 Sekunden. Betrug die ECT < 80s wurde ein Bolus von 0,2µg/kg KG rHirudin appliziert. Betrug die ECT > 80-100s wurde kein Bolus gegeben.

Die Organisation, Asservierung und Verarbeitung der Blutentnahmen zur Beurteilung der plasmatischen Gerinnungsaktivierung erfolgte für die 8-stündlich zu ermittelndem Marker

der Gerinnungsaktivierung (Thrombin, Prothrombin, Prothrombin-fragment 1+2, TAT-Komplex, D-Dimere) mittels venöser Blutprobenentnahme aus dem zentralen Venenkatheter nach Verwurf der initial abgenommenen 10ml Blutvolumen. Dabei wurden 9 Teile venöses Blut mit einem Teil 0,11 mol/l Natrium-Citrat in einer grünen Sarstedt Monovette (Coagulation 9NC/10 ml) vermischt. Das Citrat-Vollblut wurde in einer Kühlzentrifuge (2000U/min bei 4°C für 10min.) zentrifugiert. Der entstandene Plasma-Überstand wurde bis zu 0,5 ml abpipettiert und in einem zweiten Schritt erneut bei 3000 U/min für 10 min. zentrifugiert. Der jetzt nochmals entstandene Plasma-Überstand wurde in 6x1 ml Eppendorf-Röhrchen abpipettiert. Anschließend wurden die Proben in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70 bis -80° gelagert. Die Standardanzahl der Blutentnahmen je Patienten umfasste 1 Blutentnahme als Baseline sowie 3 Blutentnahmen in 24 Stunden, also 16 Blutentnahmen in 96 Stunden. Alle Parameter wurden jeweils im Vollblut sowie im Plasma zur gleichen Zeit bestimmt. Für jede Messung wurden Doppelbestimmungen durchgeführt.

## **2.5 Durchführung und Monitoring**

### **2.5.1 Activated-Clotting-Time**

Die folgenden Ausführungen basieren auf Herstellerangaben der Fa. Medtronic Inc. (Fa. Medtronic Inc., 1996). Zur Point of Care-Überwachung der Therapie mit unfraktioniertem Heparin ist die ACT Messung (Heparinzeit) die Methode der Wahl nach Hattersley (Hattersley, 1966). Die ACT-Küvetten werden zweifach standardisiert hergestellt und enthalten als "high range" HR-Küvette 12% Kaolin als Oberflächenreagenz, 0,0025M Kalziumchlorid (CaCl<sub>2</sub>), hydroxyethyl-piperazinyl-ethansulfonsäure (HEPES-Puffer) Natriumsäure. Die "low range" LR-Küvette enthält 0,75% Kaolin und 0,0025M CaCl<sub>2</sub>. Innerhalb unserer Studie benutzten wir die HR-Küvette, da, lt. Herstellerangaben eine erhöhte Sensitivität auf Heparin gewährleistet wird. In Fällen therapeutischer Heparin-Administration wird die HR-Küvette favorisiert (Fa. Medtronic Inc., 1996). Zur Messung wurde eine vorgefertigte ACT-Küvette innerhalb des Messgerätes ACT II® auf 37°C vorgewärmt. Nach Zugabe von 200 µl Frischblut und maschinell Umrühren erfolgte die Messung. Das Ergebnis der Messung stellte eine fotooptische Erfassung eines Fibrinformations dar (Fa. Medtronic Inc., 1996). Das Gerät kann eine Gerinnelbildung in

einer Zeit von 0-600 Sekunden erfassen. Die Validität wurde durch die simultane Messung in beiden Tüllen gewährleistet, hierbei wurde der Mittelwert berechnet und die Nachweiszeit in Sekunden direkt am Gerät angegeben. Der Zielbereichsangaben wurden den Herstellerangaben entsprechend bei einer Zeitspanne von 180-210 Sekunden festgelegt (Fa. Medtronic Inc., 1996).

### **2.5.2 Ecarin Clotting Time (ECT)**

Das zur Hirudinbestimmung verwendete Ecarin (MW 50-60000) ist eine Metalloprotease aus dem Gift der Schlange "Echis carinatus" (Viper) und wurde bereits 1969 von Kornalik charakterisiert (Kornalik et al., 1969). Ecarin aktiviert Prothrombin zum Zwischenprodukt Meizothrombin (Nowak, 2003). Hirudin inaktiviert Meizothrombin und Thrombin. Im Umkehrschluss kann erst die komplette Wirkungseliminierung des Hirudins eine vollständige Thrombinbildung ermöglichen (Fa. Pentapharm Product Description, 2020). Die Länge der ECT Messung ist proportional der Konzentration an Hirudin (Nowak, 2003). Die Befundmitteilung erfolgt nach Berechnung in µg/ml. Die Gerinnungszeit wird in Sekunden angegeben. Die ECT als Methode zur Überwachung des Hirudins weist eine ausreichende Sensitivität und Spezifität sowie eine schnelle Messzeit auf (Nowak, 2003). Im Vergleich zur aPTT und ACT erwies sich die ECT-Messung zur Überwachung der Hirudintherapie (Dosis-Wirkungsprinzip) als am besten geeignet. Die Bestimmung der ECT kann auch als "bedside"-Methode durchgeführt werden, so dass sofort auf Schwankungen der Hirudinkonzentration reagiert werden kann (Gosselin et al., 2004; Nowak, 2003).

### **2.6 Verarbeitung und Messung**

Die folgenden Ausführungen basieren auf Herstellerangaben der Fa. Nobis (Fa. Nobis Product Manual, 2000) und Fa. Pentapharm (Fa. Pentapharm Product Description, 2020). Zum Ansetzen das Ecarin-Reagenz wurde in einem Paar Küvetten (Doppelküvetten), welche bereits vom Werk aus mit Ecarinpulver (je 50 Einheiten) und einer Metallkugel versetzt waren, je 100µl Aqua dest. pipettiert. Dieser Ansatz wurde für 10 min. in Ruhe bei Raumtemperatur inkubiert. Im zweiten Schritt wurde mit einem Eppendorf®-Pipette je 500µl vom zuvor asservierten Citrat-Blut abpipettiert und in zwei

weitere "Nativ-Küvetten" eingefüllt und bei 37°C für 2 Minuten im ECT-Gerät vorgewärmt. Zur Messung der ECT wurde innerhalb von 3sek. je 200µl Citrat-Blut in die bereits vorgefertigten Ecarin-Küvetten langsam eingebracht. Das magnetische Koagulometer (Calatzis et al., 2004; Hänecke & Klouche, 2007) (Thrombostat® II) zählt für jeden Küvettenschicht und startet die fotokinetische Messung (Spannagl & Calatzis, 2002) nach 3 Sekunden. Als Abschluss erfolgte die Angabe der gemessenen Gerinnungszeiten der jeweiligen Reaktions-Küvetten im Mittel und die Berechnung der Hirudinkonzentrationen nach Pötzsch (Pötzsch et al., 1997). Der gleiche Ablauf wurde für die Hirudinbestimmung im Plasma durchgeführt. Hierbei wurden 500µl Citratblut bei 4000U/min für 10 Minuten zentrifugiert. Vom Überstand wurden dann 200µl abpipettiert und die ECT gemessen.

## **2.7 Bestimmung der therapeutischen Hirudin-Konzentration**

Die quantitative Bestimmung der Hirudinkonzentration wurde im Citrat-Plasma mittels eines Hirudin-Activity-Assay® durchgeführt. Die folgenden Ausführungen basieren z.T. auf Herstellerangaben der Fa. DADE Behring, Deutschland (Fa. Dade Behring, 1998c). Der hierfür benutzte Testkit enthielt 15 ml Thrombin (bovines, lyophilisiert, incl. Heparininhibitor + Aprotinin), 3 ml Substrat-Reagenz (lyophilisiert, tosglycyl-L-prolyl-L-arginyl-5-amino-2-nitrobenzoic acid isopropylamid 4mmol/ l), 1 ml Hirudin Kalibrator (lyophilisiert, rHirudin in humanem Plasma gelöst) sowie 100 ml HEPES-Puffer Lösung. Im ersten Schritt wurde Thrombin mit der Pufferlösung vermischt und bei 15-25°C für 15 min inkubiert. Die Reagenzsubstanz wurde in destilliertem Wasser gelöst.

Das in der Plasmaprobe enthaltene rHirudin inaktiviert das im Test Kit enthaltene Thrombin. Die Aktivität des restlichen, nicht gebundenen Thrombins wird mittels der kinetischen Reaktion in einem Fotometer gemessen. Die optimale Temperatur zur Durchführung der Messung sollte nach Herstellerangaben 25° C, 30° C oder 37° C betragen. Der Messbereich beträgt für das Hirudin 0,1 mg bis 5 mg/l. Vereinzelt Studien (Bucha et al., 1990; Lange et al., 2003, 2005; Nowak, 2003; Nowak & Bucha, 1996) zeigten, dass die ECT eine annähernd lineare Korrelation mit dem im Patientenblut, -plasma vorhandenem Hirudin hat. Der Range liegt bei 50 bis 5.000 ng/ml. Dies erlaubt nicht nur eine sofortige Aussage über die therapeutische Hirudin-Konzentration, sondern

auch über Über- und Unterdosierungen. Ein wesentlicher Vorteil war ferner die Möglichkeit, auch geringe Hirudinkonzentrationen im Blut zu messen. Heparin kann bei niedrigen Antithrombinkonzentrationen nicht die Hemmung von Thrombin katalysieren. Meizothrombin ist ein prokoagulatorisches Zwischenstufe bei der Aktivierung des Prothrombins zu Thrombin (Junren et al., 2021), an das rHirudin bindet. Das hierbei vorhandene AT beeinflusst nicht die Probe hinsichtlich der Inhibierung von Heparin nach Zusatz von Thrombin. Die folgende Formel von Pötzsch (Pötzsch et al., 1997) diente zur Berechnung der Hirudinkonzentration im Vollblut oder Citratplasma.

Die initial zu applizierende rHirudin Dosierung wurde mit 0,4 mg als Bolus angesetzt. In Abhängigkeit zur vierstündlichen ECT Messung wurden im Intervall Boli von 0,2 µg/kg KG appliziert, wenn der Zielbereich unterschritten wurde. Die Dosierung in der vorliegenden Studie wurde nach den Maßgaben von Vargas Hein (Vargas-Hein et al., 2004) zur Antikoagulation bei CVVH angepasst.

### **ECT in s-0,293µg/ml (Hirudinkonzentration in Blut o. Plasma)**

#### **143µg/ml (Hirudin Blutspiegel)**

Formel 1: Berechnung der ermittelten Hirudinkonzentration nach Pötzsch (Pötzsch et al., 1997)

Die zur Bestimmung der ermittelten Hirudinkonzentration verwendeten Referenzwerte für die therapeutische Anwendung wurden entsprechend den Angaben der Max-Planck-Arbeitsgruppe "Pharmakologische Hämostaseologie" um Nowak und Koßmehl (Koßmehl, 2000; Nowak & Koßmehl, 2000) in drei Bereiche unterteilt: So wurde der subtherapeutische Bereich bei 0,1 - 0,5 µg/ml, der therapeutische Bereich bei 0,5 - 2,5 µg/ml festgelegt. Eine Überdosierung bestand bei mehr als 2,5 µg/ml. Das "optimale Fenster" für eine prophylaktische Antikoagulation wurde zwischen 0,2 - 0,5 µg/ml festgelegt. Der Referenzwert der Gerinnungszeit ohne Hirudin im Plasma beträgt 45-55 sec.

**ECT in s- 0,445 µg/ml (Hirudinkonzentration in Blut o. Plasma)**  
**110 µg/ml (Hirudin Blutspiegel)**

Formel 2: Hirudin Referenzwertbestimmung der Max-Planck-Arbeitsgruppe "Pharmakologische Hämostaseologie" an der FSU Jena 2000 (Nowak & Koßmehl, 2000).

## **2.8 Gerinnungsfaktoren**

### **2.8.1 Prothrombin (Gerinnungsfaktor II)**

Faktor II der Blutgerinnung ist eine unter der Mitwirkung von Vitamin K in der Leber gebildete Serinprotease (Luxembourg et al., 2007), das durch Prothrombinase und aktiviertem FXa in Thrombin (FIIa) umgewandelt wird (Göbel et al., 2018). Es hat ein Molekulargewicht von 72.000 Dalton. Sein Normalwert im Humanplasma liegt bei 60-100 mg/l bzw. 0,7-1,2 E/ml (10 und 15 mg/l). Faktor II hat eine mittlere Halbwertszeit von 70h. Thrombin wird durch die Komplexbildung mit Antithrombin inaktiviert (Göbel et al., 2018). Die Bestimmung des Faktors II im Citrat-Plasma wurde mit einem Cryo Check<sup>®</sup> factor II Deficient Normal Plasma zur in vitro Diagnostik der Fa. Precision Biologic, Kanada (Fa. PrecisionBiologic Instruction Manual, 1999), durchgeführt. Dieses beinhaltet außer dem Faktor II alle anderen Gerinnungsfaktoren innerhalb ihrer Referenzbereiche. Es wird als Mangelsubstrat bei der Bestimmung der Prothrombinzeit eingesetzt. Die Aktivität des Faktors II in diesem Mangelplasma beträgt weniger als 1% der Aktivität in einem Normalplasma. Als Reagenzien wurden Thromboplastinlösung mit CaCl<sub>2</sub>, HEPES-Pufferlösung, Standard-Plasma (Cryo Check<sup>®</sup> Normal Referenz Plasma) verwendet. Ferner benutzten wir Reaktionsgefäße (12 x 75 mm), eine Eppendorfpipette (100 µl), Doppellogarithmisches Papier, einen Inkubator sowie zur Qualitätskontrolle eingesetztes Kontroll-Plasma Cryo Check<sup>®</sup> Abnormal Referenz Check / Cryo Check Abnormal<sup>®</sup> II Referenz Check des o. g. Herstellers. Der Variationskoeffizient (CV) für Cryo Check<sup>®</sup> factor II Deficient Normal Plasma im Plasma ist innerhalb normaler Spannbreite kleiner 2 %; ein CV zwischen 2% - 4% ergab sich innerhalb pathologischer Spannbreiten (Fa. Precision Biologic, 1999).

### **2.8.1.1 Verarbeitung und Messung**

Die folgenden Ausführungen basieren auf Herstellerangaben der Fa. Precision Biologic, Kanada (Fa. PrecisionBiologic Instruction Manual, 1999) Vor Beginn der Messung wurde das Faktor II Mangel-Plasma in einem Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Hier war es wichtig, abhängig von dem Mangel-Plasmavolumen eine vorgegebene Zeit beim Auftauen einzuhalten: 1,0ml -4 min, 1,5 ml -5 min. Die Bestimmung des Prothrombin erfolgte mit der modifizierten Thromboplastinzeit nach Quick. Für die Messung wurde eine 1:10 Verdünnung von Patienten-Plasma mit HEPES-Pufferlösung hergestellt und mit Cryo Check® factor II Deficient Plasma zur in vitro Diagnostik versetzt. Nach Zugabe von Thromboplastin und Ca<sup>2+</sup>-Ionen ist die ermittelte Gerinnungszeit proportional der Aktivität des zu bestimmenden Faktors. Die Messergebnisse wurden in Prozent angegeben. Der Normbereich liegt zwischen 70-130% (Fa. PrecisionBiologic Instruction Manual, 1999).

### **2.8.2 Fibrinogen-/Fibrinospaltprodukte (D-Dimere)**

Plasmin ist eine Seropeptidase, die aus Fibrinogen lösliche Peptide abspaltet. Aus einem Molekül Fibrinogen entstehen unter Einwirkung des Plasmins zwei D-Spaltprodukte und ein E-Spaltprodukt (Göbel et al., 2018). Der Abbau des quer vernetzten Fibrins verläuft ähnlich, durch die Quervernetzung entstehen jedoch hochmolekulare Fragment-X-Oligomere und kleinmolekulare D-Dimere (Abbildung 1). Der Referenzbereich im Citrat-Plasma von gesunden Erwachsenen liegt bei 1,5-4 g/l, 0 - 0,49 µg/ml Citrat-antikoaguliertes Vollblut (Aizawa et al., 2003; Barthels, 2012; Schouten et al., 2013).

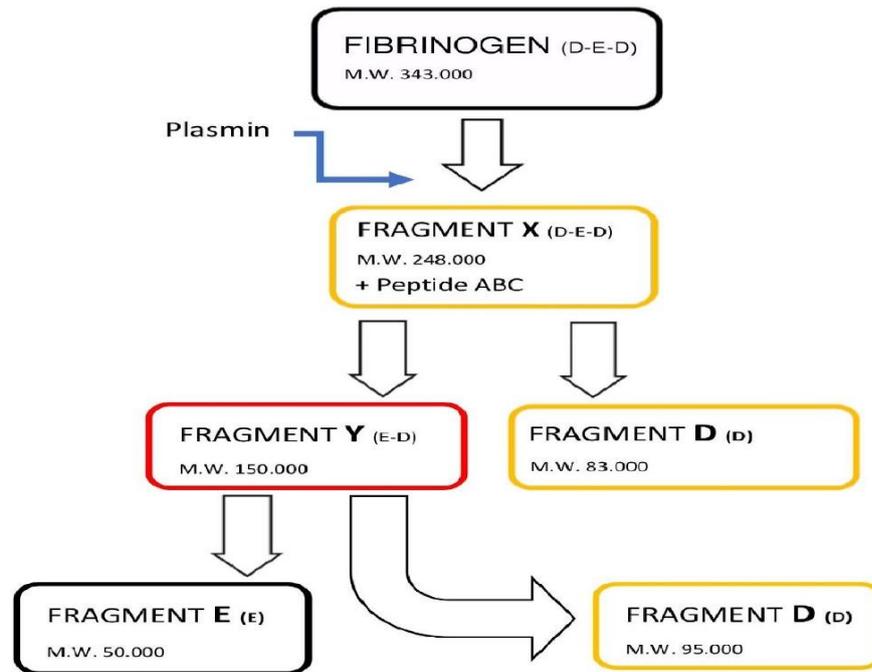


Abbildung 2: Entstehung der Fibrinogenspaltprodukte (Aizawa et al., 2003).

Eine erhöhte Konzentration an Fibrin- und Fibrinogenspaltprodukten findet man bei einer Vielzahl unterschiedlicher Krankheitsbilder insbesondere bei fibrinolytischer Therapie (Göbel et al., 2018). Andere Erkrankungen und Zustände, die mit erhöhten D-Dimer-Konzentrationen durch gesteigerte Fibrinolyse einhergehen, können z. B. bei Traumen, Hämolytisch-urämischem Syndrom (HUS), Leukämien und Tumoren, Verbrauchskoagulopathien, Thrombembolische Erkrankungen, u.a. auch HIT II (Aizawa et al., 2003; Dämpfle EC, 2005). Die Bestimmung der D-Dimere wurde mittels einem BCT<sup>®</sup> Autoanalyzer der Firma Dade Behring, Deutschland und einem Enzymimmunoassay durchgeführt. Der Agen<sup>®</sup> Dimertest Gold Stripwell Enzymimmunoassay (Fa. Agen Biomedical Limited, 1992) erfasst im (in vitro) menschlichen Plasma quantitativ die Konzentration der D-Dimere enthaltenden quer verbundenen Fibrinospaltprodukte "crosslinked fibrin degradation products". Während der frühen Gerinnelbildung wird das Thrombin aktiviert (Göbel et al., 2018) und spaltet Fibrinopeptide vom Fibrinogen ab. Das lösliche Fibrin wird mit kovalenter Vernetzung durch FXIII stabilisiert und in ein unlösliches Fibringerinnsel überführt. Gleichzeitig interagiert mit diesem Fibringerinnsel das Enzym Plasmin, um die Fibrinolyse, als

endogenen Reparaturmechanismus einzuleiten (Aizawa et al., 2003). Unter normalen physiologischen Bedingungen wird überschüssiges Plasmin schnell durch  $\alpha$ -2-Antiplasmin oder Plasmininhibitor innerhalb des Gerinnsels neutralisiert und gewährleistet hiermit die Stabilität der Gerinnselformation und damit die Blutstillung. Eine Vielzahl von quer verbundenen Fibrinolyseprodukten wird abhängig vom Umfang der Fibrinolyse gebildet. Das kleinste Fragment ist das Plasmin resistente D-Dimer (Aizawa et al., 2003; Luxembourg et al., 2007).

### 2.8.2.1 Verarbeitung und Messung

Die folgenden Ausführungen basieren auf Herstellerangaben der Fa. Agen Biomedical Ltd., Australia (Fa. Agen Biomedical Limited, 1992). Alle Standards, Kontrollen und Patientenproben wurden gleichzeitig in doppelter Ausführung geprüft. „Der Assay für die Dimere ist ein sogenannter ELISA „Sandwich-Assay“. Bedingung für diese Technik, bei der das Antigen von beiden Seiten mit einem Antikörper besetzt werden soll, ist, dass die zu untersuchende Substanz mehr als eine Bindungsstelle für die hinzugefügten Antikörper bereithält. Die Verdünnungen des Agen® Dimertest Gold Stripwell Enzymimmunoassays (Fa. Agen Biomedical Limited, 1992) decken einen Bereich von 0 bis 2000 ng/ml ab. Die Reihenfolge der Streifen wurde markiert, indem man eine diagonale Zeile auf der Oberfläche der Vertiefungen kennzeichnete. Alle Reagenzien und Patientenproben wurden vor der Messung auf Raumtemperatur (20-25°C) gebracht. Während der Inkubation wurde mittels Rührens kontinuierlich bei 360 rpm gemischt. Die statistische Präzision und Reproduzierbarkeit war folgendermaßen validiert: Der Variationskoeffizient in der Serie (Intra-Assay) lag zwischen 3,7 -6,8%:

Probe	Testläufe	Durchschnitt [ng/ml]	% C.V.
1	10	112	6.8
2	10	444	4.8
3	10	974	3.7

Tabelle 3: Intra-Assay (Dimertest © Gold EIA, Agen Biomedical Limited, Australia) (Fa. Agen Biomedical Limited, 1992).

Für den Variationskoeffizienten von Tag zu Tag (Inter-Assay) fanden sich Werte zwischen 6,6 und 10,1%.

Probe	Testläufe	Durschnitt [ng/ml]	% C.V.
1	7	133	10.1
2	7	455	7.1
3	7	984	6.6

Tabelle 4: Inter-Assay (Dimertest © Gold EIA, Agen Biomedical Limited, Australia) (Fa. Agen Biomedical Limited, 1992).

### 2.8.3 Prothrombinfragment 1 und 2 (PF 1+2)

Bei der Umwandlung von Prothrombin zu Thrombin spaltet Faktor Xa zwei Peptidbindungen ab. Der dabei freiwerdende N-terminale Anteil des Prothrombins wird als Fragment 1+2 (PF 1+2, Molekulargewicht: 35000 D) bezeichnet, das mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden kann. PF 1 enthält das Calcium- und Phospholipid bindenden Anteil des Prothrombins; PF 2 ist für die Interaktion mit Faktor V zuständig. Je mehr Thrombin gebildet wird, desto höher ist die PF 1+2-Konzentration. Der Referenzbereich von PF 1+2 im Citrat-Plasma von gesunden Erwachsenen (n=140) im Median bei 0,7 nmol/l und beträgt 0,4 -1,1 nmol/l, < 259pmol/l (Fa. Dade Behring, 1998b). Die Bestimmung des humanen Prothrombinfragments F1+2 dient zur Diagnose und Überwachung von Zuständen der Gerinnungsaktivierung bzw. thrombotischen Ereignisse. Die Bestimmung des Prothrombinfragments 1+2 im Plasma dient zum Nachweis einer In-vivo Thrombinbildung. Erhöhte PF 1+2-Konzentration wurden bislang gemessen bei Patienten mit Lungenembolie, Patienten mit Verbrauchskoagulopathie, Patienten mit Antithrombin-Mangel, Patienten mit Polytrauma und Sepsis, Patienten mit Gerinnungsaktivierung durch Tumornekrosefaktor, aber auch bei Patienten mit frischen Wundflächen (Greinacher, 2012). Unter der Therapie mit oralen Antikoagulantien wurde ein deutliches Absinken des PF 1+2-Spiegels unter den Referenzbereich festgestellt. Das Abfallen der PF1+2 Konzentration im Plasma ist umso ausgeprägter ausgefallen, je höher die Dosierung der Antikoagulation war (Bruhn & Zurborn, 1993). Die quantitative

Bestimmung der humanem Prothrombinfragmente 1+2 wurde mittels einem Elida Reader® 530 der Firma Organon Teknika, USA und einem Enzymimmunoassay "Enzygnost® F1+2 micro" (Fa. Dade Behring, 1998b) der Fa. Dade Behring, Deutschland durchgeführt.

### **2.8.3.1 Verarbeitung und Messung**

Die Messung von PF 1+2 im Plasma ist bei klinischen Fragestellungen mittels ELISA-Testen möglich. Die folgenden Ausführungen basieren auf Herstellerangaben der Fa. Dade Behring Deutschland (Fa. Dade Behring, 1998b). „Der Enzymimmunoassay funktioniert nach dem sog. "Sandwich" Prinzip zur in-vitro Determinierung der Prothrombinfragmente 1+2" (Fa. Dade Behring, 1998b). „Während der ersten Inkubation bindet sich das in der Probe vorhandene PF 1+ 2-Antigen an die Antikörper die an der Oberfläche der Mikrotitrationsplatte fixiert sind. Nach Auswaschen werden in der zweiten Reaktion Peroxidase-konjugierte Antikörper gegen humanes Prothrombin an die freien PF 1+2-Determinanten gebunden. Die überschüssigen Enzymkonjugierten Antikörper werden ausgewaschen; anschließend wird die gebundene Enzymaktivität bestimmt. Die enzymatische Umsetzung von Wasserstoffperoxid und Chromogen wird durch Zusatz von verdünnter Schwefelsäure unterbrochen. Die der Konzentration von PF 1 + 2 proportionale Farbintensität wird fotometrisch bestimmt. Der Konzentrationsbereich von 0,04 bis 10 nmol/l wird durch die in der Packung enthaltenen Standards abgedeckt" (Fa. Dade Behring, 1998). „Die statistische Präzision und Reproduzierbarkeit lag im Bereich zwischen 0,2 - 5,0 nmol/l. Der Variationskoeffizient lag für den Intra-Assay zwischen 5 - 7,5%, während der Variationskoeffizient für den Inter-Assay zwischen 6 - 13% schwankte" (Fa. Dade Behring, 1998b).

### **2.8.4 Thrombin-Antithrombin-Komplex (TAT)**

Thrombin kommt im Blut in freier Form fast nicht vor, sondern überwiegend an Antithrombin gebunden. Es entsteht ein Thrombin-Antithrombin-Komplex. Die Anwesenheit von Heparin beschleunigt die Komplexbildung. Die quantitative Bestimmung des Thrombin-Antithrombin-Komplexes sollte daher das Ausmaß Thrombin-spezifischer, intravasaler Gerinnungsprozesse widerspiegeln, und zwar unabhängig

davon, ob diese auf physiologischen oder auf pathologischen Mechanismen begründet sind. TAT-Konzentrationen  $>10\mu\text{g/l}$  sind Zeichen einer erhöhten intravasalen Thrombinbildung, Werte um  $60\mu\text{g/l}$  sind als pathologisch anzusehen, sofern keine Wundflächen vorhanden sind. Der Referenzbereich von TAT im Citrat-Plasma von gesunden Erwachsenen ( $n=196$ ) liegt im Median bei  $1,5\ \mu\text{g/l}$ . Der Referenzbereich liegt bei  $1.0\text{-}4.1\ \mu\text{g/l}$ . Die Halbwertszeit beträgt weniger als 10min. (Fa. Dade Behring, 1998a). Die Umwandlung von Prothrombin zum aktiven Thrombin (Faktor IIa) stellt ein zentrales Ereignis im Ablauf der Gerinnungskaskade dar (Fa. Dade Behring, 1998a; Scharf, 2010). Thrombin wirkt direkt auf verschiedene Substrate (u.a. Thrombozyten, Protein C, Fibrinogen) und wird durch Antithrombin inhibiert (Fa. Dade Behring, 1998a). Der sich daraus bildende Komplex (Proteinase/Inhibitor) kann durch einen Enzyimmunoassay erfasst werden (Fa. Dade Behring, 1998a). Aufgrund der sehr kurzen HWZ des Thrombins kommt es zu einer entscheidenden Bedeutung der Bestimmung von TAT in der Diagnose thrombotischer Ereignisse, wie z. B. bei Personen mit angeborener Neigung zu Thrombosen, Polytraumapatienten, Verbrauchskoagulopathie (DIC) oder in der Akutphase eines Myokardinfarktes. Außerdem wurden bereits in frühen Studien Anstiege von TAT Konzentration im Verlauf von Heparin- und Fibrinolysetherapien beobachtet (Gulba et al., 1991). Die quantitative Bestimmung von TAT-Komplex wurde in der vorliegenden Studie im Humanplasma mittels einem Enzyimmunoassay "Enzygnost® TAT micro" (Fa. Dade Behring, 1998a), durchgeführt.

#### **2.8.4.1 Verarbeitung und Messung**

Die folgenden Ausführungen basieren auf Herstellerangaben der Fa. Dade Behring, Deutschland. „Der Enzyimmunoassay arbeitet ebenfalls nach dem "Sandwich" Prinzip zur In-vitro-Bestimmung des humanen TAT“ (Fa. Dade Behring, 1998a). „Während der ersten Inkubation bindet sich das in der Probe vorhandene TAT an die Antikörper gegen Thrombin, die an der Oberfläche der Mikrotitrationsplatte fixiert sind. Nach Auswaschen werden in einer zweiten Reaktion Peroxidase-konjugierte Antikörper gegen humanes AT an die freien AT Determinanten gebunden. Die ungebundenen Antikörper werden ausgewaschen. Die enzymatische Umsetzung von Wasserstoffperoxid und Chromogen wird durch Zusatz von verdünnter Schwefelsäure unterbrochen. Die aufgetretene Farbveränderung ist proportional zur TAT-Konzentration der Probe. Die Extinktion wird

fotometrisch bestimmt. Bei höherem TAT Gehalt musste die Probe mit TAT-Verdünnungsplasma verdünnt werden“ (100) „Der Konzentrationsbereich von 2 bis 60 µg/l wird durch die in der Packung enthaltenen Standards abgedeckt“. (Fa. Dade Behring, 1998a). Störfaktoren, wie unsachgemäße Blutentnahmen, schlechte Durchmischung (Citrat/ Vollblut) führen zu falsch erhöhten in vitro Werten. Hämolytische, lipämische und Rheumafaktoren haltige Plasmen haben keinen Einfluss auf die Bestimmung. Die statistische Präzision und Reproduzierbarkeit lag im Bereich zwischen 2 und 60 µg/l. Der Variationskoeffizient lag für den Intra-Assay zwischen 4% -6%, während der Variationskoeffizient für den Inter-Assay zwischen 6 - 9 % schwankte. Die Wiederfindungsrate von TAT im Plasma betrug 95% - 105%. Alle angegebenen Werte für die Leistungsmerkmale, des Testes sind typische Ergebnisse und gelten nicht als Spezifikationen für den “Enzygnost® TAT micro“ Testkit (Fa. Dade Behring, 1998a).

## **2.9 Datenerfassung und statistische Analyse**

Die Erfassung der Daten sowie die Eingabe selbiger wurden studienbegleitend vor Ort durchgeführt. Bereits im Vorfeld wurde in Zusammenarbeit mit dem Institut für Biometrie und Klinische Epidemiologie der Charité Berlin eine Randomisierungsliste erstellt, mit deren Hilfe die Patienten in die Behandlungsgruppen randomisiert wurden. Alle studienrelevanten Daten wurden zunächst handschriftlich und pseudonymisiert erfasst und anschließend in ein Statistikprogramm übertragen. Der übertragene Datensatz wurde anschließend einer Plausibilitätskontrolle unterzogen und ggfs. fehlerhafte Eingaben wurden über eine Doppelkontrolle korrigiert.

Da bei der vorliegenden Größe der Studiengruppen nicht von einer Normalverteilung ausgegangen werden konnte, wurde die Beschreibung derselbigen durch die Angabe absoluter und relativer Häufigkeiten für qualitative Merkmale, Mittelwerte und Standardabweichungen sowie Mediane und Interquartilbereiche (25% und 75%) für die quantitativen Messparameter, durchgeführt. Alle Kennziffern wurden als Median und Spannbreite angegeben. Der Intergruppenvergleich für metrische Daten wurde mittels des Mann-Whitney-U-Tests für unabhängige Stichproben und für nominalskalierte Daten mit dem Chi-Quadrat-Test durchgeführt. Als statistisch signifikant wurde  $p < 0,05$  und als hochsignifikant  $p < 0,01$  betrachtet. Die Normalverteilung wurde mittels Kolmogorov-

Smirnov-Tests überprüft. Die obere und untere Grenze beschreibt den höchsten bzw. niedrigsten Wert der innerhalb des 1,5fachen Interquartilsabstandes unterhalb bzw. oberhalb des 25. Percentils bzw. 75. Percentils. Die statistische Auswertung aller relevanten Parameter erfolgte mit dem Statistikprogramm SPSS (Version 24.0). Die grafische Darstellung der Parameter erfolgte mit Microsoft Office Excel (Version 5.0-11.0).

### **3 Ergebnisse**

#### **3.1 Patienten**

Vom 02.02.2000- 01.02.2001 wurden n = 26 Patienten (n = 16 Männer und n = 10 Frauen) in diese Pilotstudie eingeschlossen. Alle Patienten wurden bei akutem Nierenversagen auf den Intensivstationen 101i und 103i der Charité Universitätsmedizin Berlin, Campus Charité Mitte (CCM), mithilfe der kontinuierlichen veno-venösen Hämofiltration (CVVH) behandelt. Im Verlauf der Untersuchung wurden insgesamt fünf Patienten aus der Studie ausgeschlossen (HeparinGruppe=4, HirudinGruppe=1). In der HeparinGruppe kam es bei einem Patienten zu einem Entzug des Einverständnisses. Ein weiterer Patient derselben Gruppe wurde ausgeschlossen, weil während der Untersuchung eine HIT II diagnostiziert wurde und das Antikoagulationsregime geändert werden musste. Des Weiteren wurden zwei Patienten ausgeschlossen, weil sie kurz nach Studieneinschluss nicht mehr dialysepflichtig waren. Ein Patient in der Hirudin Gruppe wurde ausgeschlossen, weil er kurz nach Studieneinschluss auf eine andere Station verlegt worden ist, so dass die Studie nicht weitergeführt werden konnte. In die HeparinGruppe wurden 4 Frauen und 6 Männer im Alter von 34 - 79 Jahren und in die HirudinGruppe 5 Frauen und 6 Männer im Alter von 46 - 81 Jahren randomisiert. Die unterschiedlichen Beobachtungszeiträume kamen durch Wiedereinsetzen einer suffizienten Nierenfunktion und die damit wegfallende Indikation zur CVVH-Behandlung zustande. Die Vorerkrankungen sowie die nach Herzoperation aufgetretenen Erkrankungen (Komorbiditäten) der untersuchten Patienten wurden, wie in Tabelle 6 angegeben, dokumentiert, wobei jedes Kriterium einzeln aufgeführt wurde.

Diagnose (n)	HeparinGruppe	Hirudingruppe
<b>Vor Herz-OP</b>		
<b>Koronare Herzkrankheit</b>	8	5
<b>Herzinsuffizienz (&lt;55%)</b>	3	4
<b>COPD</b>	0	1
<b>IDDM</b>	4	3
<b>NIDDM</b>	2	1
<b>Z. n. NTX</b>	2	0
<b>Chronische Niereninsuffizienz</b>	8	8
<b>Chronisches Vorhofflimmern</b>	4	3
<b>Maligne Erkrankung</b>	1	2
<b>Nach Herz-OP</b>		
<b>Akutes Herzversagen</b>	10	11
<b>ANV</b>	10	11
<b>Septischer Schock</b>	3	1
<b>Schrittmacher Implantation</b>	1	0
<b>ACVB</b>	6	7
<b>ASD Verschluss</b>	1	0
<b>Klappenersatz</b>	2	4

Tabelle 5: Anzahl und Art der Erkrankungen der Studienpatienten vor- und nach Herz-OP.

Die in der unten dargestellten Tabelle 7 erhobenen Daten wurden im Rahmen der hier vorliegenden Dissertation erhoben und analysiert. Es wurden keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Verteilung demografischer Parameter sowie anderer Risikofaktoren zwischen den zwei Gruppen festgestellt.

	Heparin	Hirudin	p
<b>Alter (Jahre)</b>	67,14 (34–79)	72,58 (67–85)	0,49
<b>Geschlecht (m / w)</b>	9 / 5	7 / 5	0,75
<b>APACHE III, Basis</b>	79,07 (48–111)	85,92 (72–107)	0,18
<b>MODS, Basis</b>	9,07 (3–15)	10,50 (6-15)	0,27
<b>Diagnose (n)</b>			
<b>akutes Herzversagen</b>	10	11	0,86
<b>Sepsis</b>	2	2	0,99
<b>Kreatinin bei der Aufnahme (µmol/l)</b>	318 (186–592)	283 (230–592)	0,80
<b>Harnstoff bei der Aufnahme (mmol/l)</b>	28 (6-53)	25 (18-55)	0,94

Tabelle 6: Basisdaten der Patienten und Indikationen für die kontinuierliche Nierenersatztherapie (Vargas-Hein et al., 2004), permission to reproduce from Taylor & Francis Group: 15.07.2020.

### 3.2 TAT-Konzentration

Der Referenzbereich liegt bei 0,1 - 3,9 µg/l. In der Heparin-Gruppe konnte ein Anstieg für diesen Wert bereits nach 8 Stunden belegt werden. Der mediane Wert stieg von 10,4 µg/l (5,35-19,2 µg/l) auf 15,5 µg/l (11,1-33,6 µg/l) an. In den nächsten 24 Stunden fiel die TAT-Konzentration bis auf 6,9 µg/l (3,15-23,25 µg/l) ab. Im weiteren Verlauf schwankte die TAT-Konzentration zwischen 6,8 µg/l (6,3-14,6 µg/l) und 9,8 µg/l (6,3-19,55 µg/l) und erreichte zum Messzeitpunkt t80 mit 11,8 µg/l (14,1-17,8 µg/l) den höchsten Wert. Danach folgte ein Rückgang der TAT-Konzentration bis auf 6,7 µg/l zum letzten Messzeitpunkt.

In der Hirudin-Gruppe zeigte sich beim Vergleich des medianen Wertes für den Messzeitpunkt t8 mit dem Wert des Ausgangszustandes ein signifikanter Anstieg dar. Lag der Wert zum Zeitpunkt t0 bei 10,2 µg/l (6,05-20,4 µg/l), so war er bei t8 bei 47,3 µg/l (2,9-64,2 µg/l). Im weiteren Verlauf fiel der Wert auf 31,9 µg/l (11,8-45,7 µg/l) zum Messzeitpunkt t16 ab, stieg zum Messzeitpunkt t24 aber wieder an auf 50,35 µg/l (32,85-83 µg/l). Es folgten drei weitere Abfälle nach jeweils einem leichten Anstieg. Zwischen den Messzeitpunkten t72 und t96 erfolgte eine kontinuierliche Abnahme der TAT-Konzentration bis auf 15,4 µg/l (11,8-16,3 µg/l) zur letzten Messung (Abb.3). Die Unterschiede bezüglich der TAT-Konzentration zwischen der Heparin- und der Hirudin-Gruppe erreichten ein signifikantes Niveau zu folgenden Messzeitpunkten: t16 [14 µg/l (6,88-20,35 vs. 31,9 µg/l (11,8-45,7 µg/l) (p=0,041)], t24 [6,9 µg/l (3,15-23,25 µg/l) vs. 50,35 µg/l (32,85-83 µg/l)] (p=0,001), t32 [8,6 µg/l (6,8-11,15 µg/l) vs. [22,9 µg/l (17,9-58 µg/l)] (p=0,001) und t48 [6,8 µg/l (4,35-8,95 µg/l)] vs. [23,1 µg/l (13-55,15 µg/l)] (p=0,001).

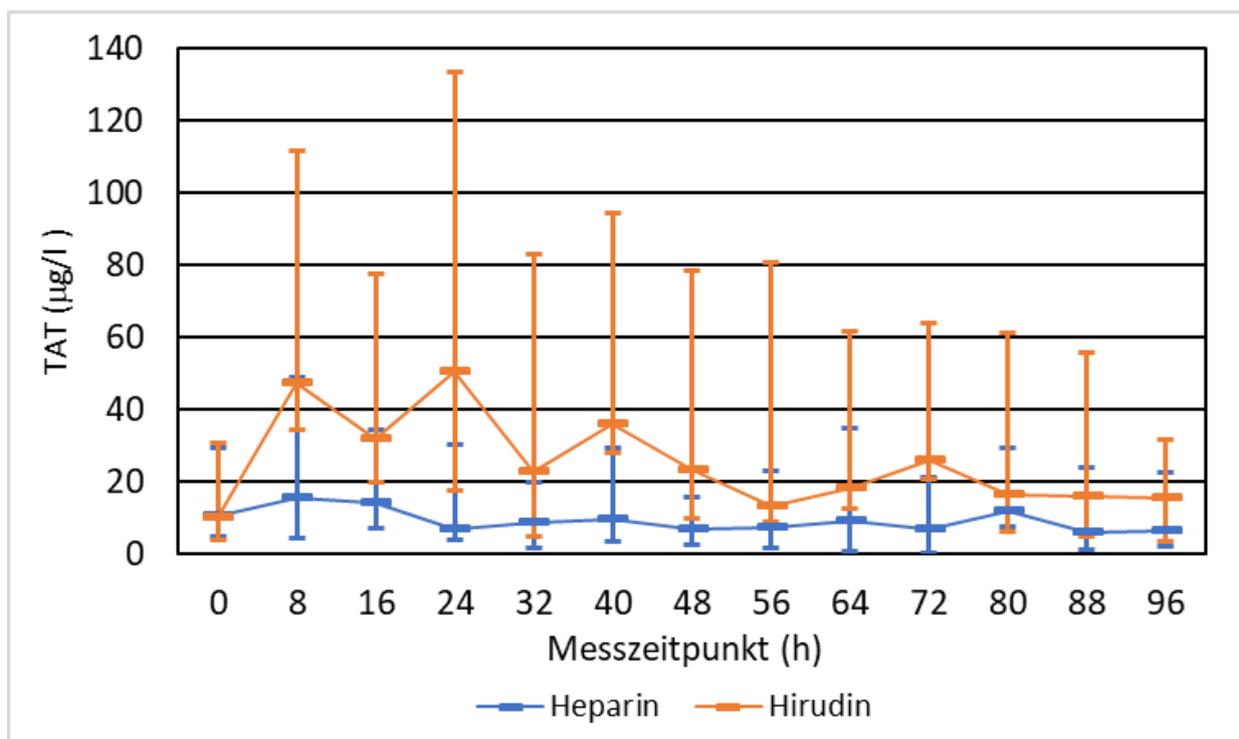


Abbildung 3: Zeitlicher Verlauf der TAT-Konzentration unter den zwei Therapieformen. Median (25. /75. Perzentile), Signifikanzniveau: p\* < 0,05, als Unterschied zwischen den Gruppen.

### 3.3 Prothrombinfragment 1+2

Der Referenzbereich liegt bei  $< 1,2$  nmol/l. Die Bestimmung von Prothrombinfragment 1+2 (F1+2) in der Heparin-Gruppe zeigte bei einer relativ großen Streuung der Messwerte die höchste Konzentration von 74% nach 40 Stunden. Im weiteren Verlauf des Messzeitraumes fiel die Mittlere Konzentration von F1+2 in der Heparin-Gruppe nach 64 Stunden zunächst auf 50% ab, stieg jedoch zum Messzeitpunkt t72 wieder an auf 56%.

In der Hirudin-Gruppe zeigte F1+2 ebenfalls nach 40 Stunden die höchste Konzentration (74%). Im weiteren Verlauf erreichte die F1+2-Konzentration nach 88 Stunden den niedrigsten Wert (58%), stieg jedoch nach 96 Stunden wieder an. Die F1+2-Konzentration zum letzten Messzeitpunkt (t96h) betrug in der Heparin-Gruppe 57% (50-59) und in der Hirudin-Gruppe 67% (64-83) (Abb. 4). Der Unterschied war nur hier statistisch signifikant ( $p=0,047$ ).

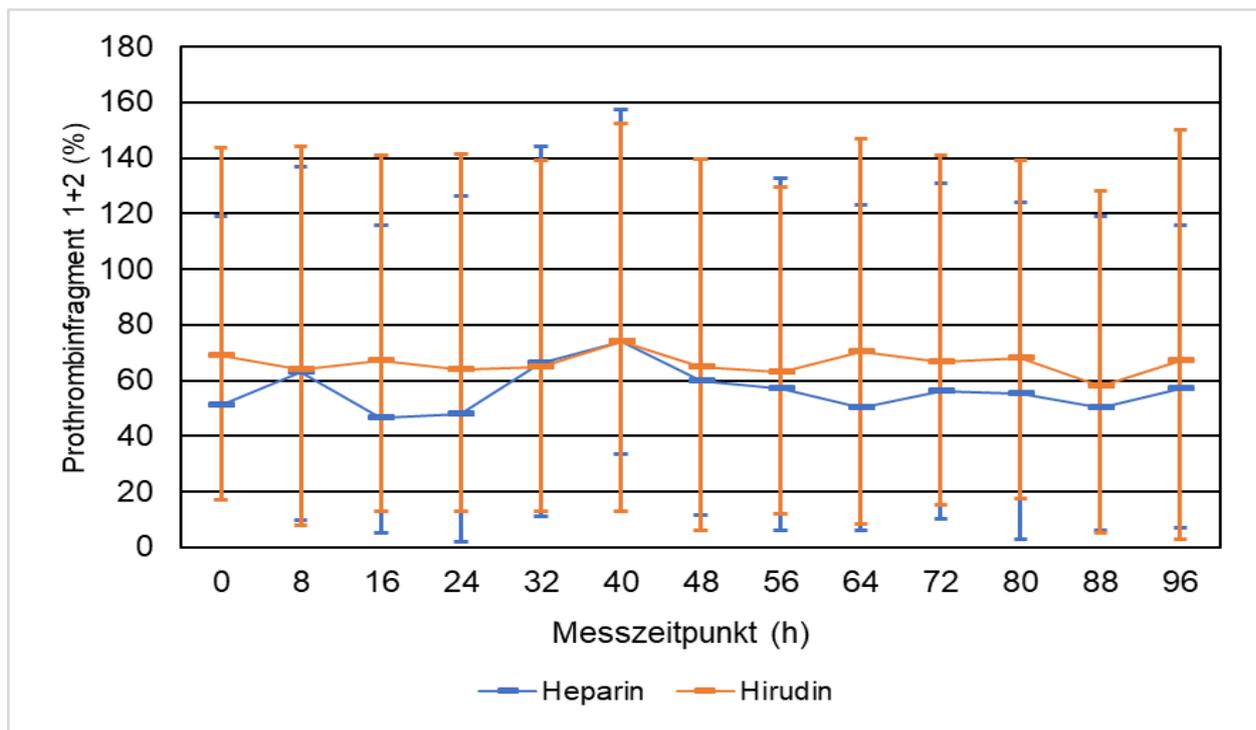


Abbildung 4: Zeitlicher Verlauf der Prothrombinfragment 1+2-Konzentration unter den zwei Therapieformen. Median (25./75. Perzentile) Ein signifikanter Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen lag zu t96 vor.

Der Medianwert der PF1+2-Konzentration für den gesamten Untersuchungszeitraum war in der Hirudin-Gruppe höher als in der Heparin-Gruppe (66,23 vs. 56,42%), (Abb. 4).

### 3.4 Antithrombin-Konzentration

Der Referenzbereich liegt bei 18-34 mg/dl. In der Heparin-Gruppe zeigte sich eine Reduktion der Antithrombinkonzentration im Verlauf der ersten 40 Stunden von 78% (64-86%) auf 66% (63-73%). Danach stieg die Konzentration bis zum Ende des Untersuchungszeitraumes an, so dass der Ausgangswert wieder erreicht war. Dieser Verlauf war durch einen Rückgang der Antithrombin-Konzentration zum Messzeitpunkt t70 auf 70% (65-81%) unterbrochen.

Der Verlauf der Antithrombin-Aktivität in der Hirudingruppe war unregelmäßig. Gegenüber dem Ausgangswert zeigte sich ein signifikanter Unterschied ( $p = 0,037$ ) t16. Die Antithrombin-Konzentration zum Messzeitpunkt t0 erhöhte sich von 75% (54-94%) auf t16 86% (78,6-103,3%) und erniedrigte sich zum Messzeitpunkt t56 auf 67% (59-86,5%). Gegenüber dem Ausgangswert zeichnete sich der Wert zur letzten Messung durch eine leichte Erhöhung aus (Abb. 5)

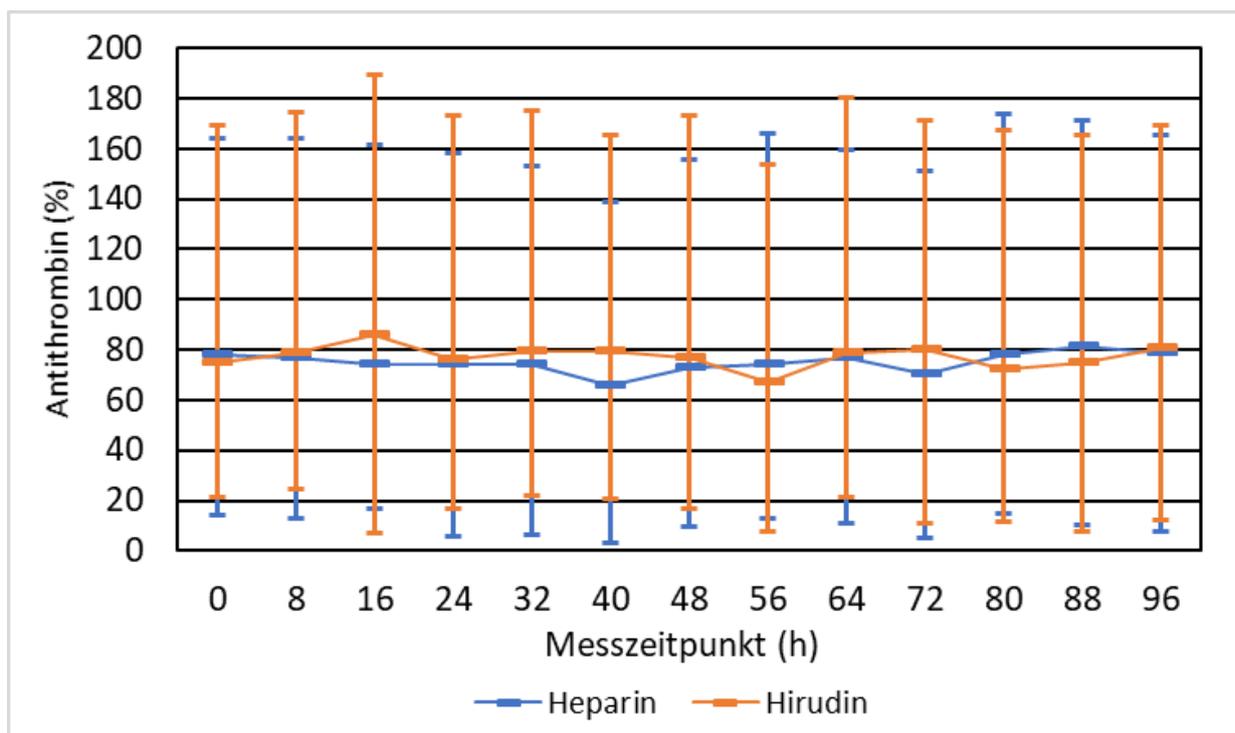


Abbildung 5: Zeitlicher Verlauf der Antithrombin-Konzentration unter den zwei Therapieformen. Median (25. / 75. Perzentile)

### 3.5 Fibrinogenkonzentration

Der Referenzbereich liegt bei 180 - 350 mg/dl. Die Ausgangswerte (Baseline) in der Heparin-Gruppe lag um 420 mg/dl. Unter der Heparintherapie lagen die mediane Fibrinogenkonzentration nach 16 Stunden einen anfänglichen Anstieg von 429 mg/dl auf 463,5 mg/dl. Der Wert fiel nach 40 Stunden um ca. 19,7%. Es folgten leichte Schwankungen des Verlaufs, wobei die Änderungen jedoch nicht so ein hohes Ausmaß annahmen. Nach 72 Stunden fiel dann die Fibrinogenkonzentration kontinuierlich von 409 mg/dl bis auf 328 mg/dl. (Abb. 6).

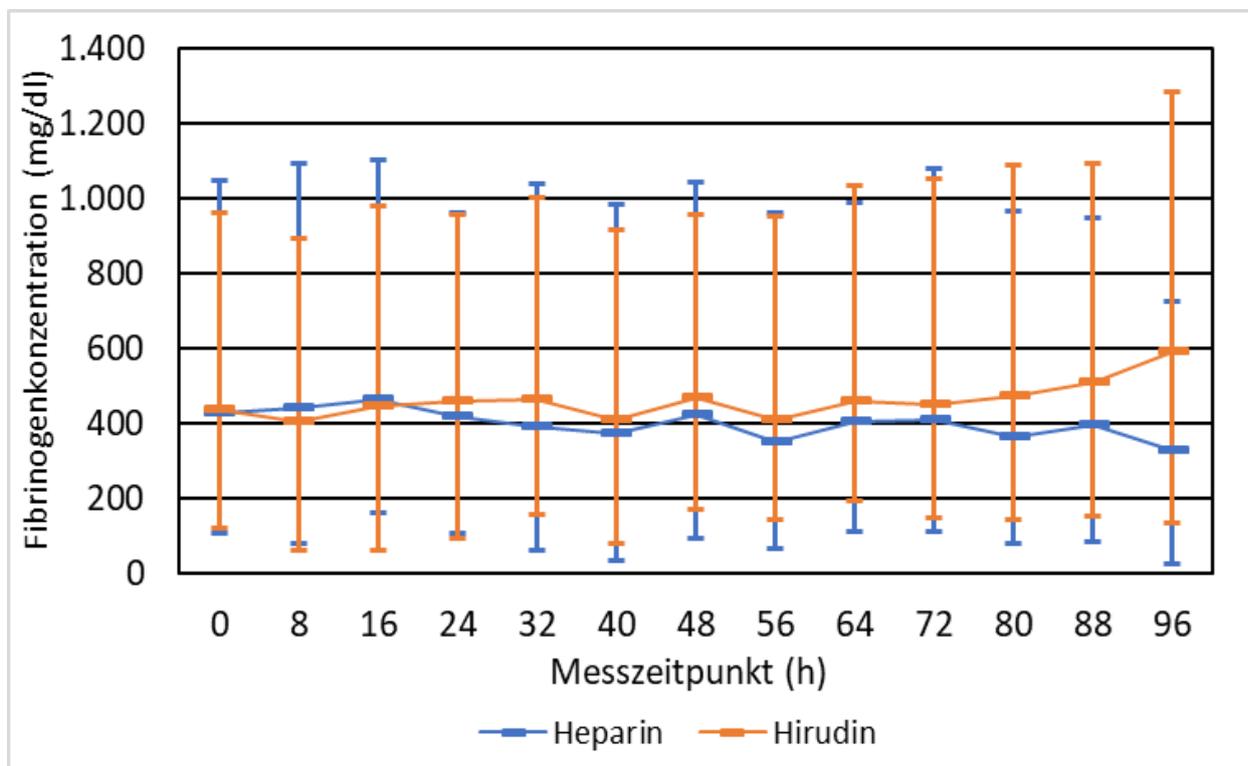


Abbildung 6: Zeitlicher Verlauf der Fibrinogenkonzentration unter den zwei Therapieformen. Median (25./75. Perzentile).

Der Durchschnittswert der Fibrinogenkonzentration für den gesamten Untersuchungszeitraum zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen (399,8 mg/dl vs. 461 mg/dl) (Abb. 6). Der Verlauf der Kurve ist insgesamt in beiden Gruppen homogen. Der Endwert in der Hirudingruppe zeigt eine ungleichmäßige Verschiebung um den Mittelwert. Der Grund für den Anstieg der Fibrinogenkonzentration

in der Hirudingruppe ab t80 ist nicht wirklich ersichtlich. Eine Substitution mit Fibrinogen oder fresh frozen plasma (FFP) lag zu diesen Zeitpunkten nicht vor.

### 3.6 Thromboplastinzeit nach Quick

Der Referenzbereich liegt bei 70 - 120 %. Unter der Heparintherapie nahm der mediane Quick-Wert am Tag 2 (t48h) im Verlauf von 78,5% als Ausgangswert auf 104,7% zu. Danach war zu allen Messzeitpunkten ein leichter Abfall zu verzeichnen. In der Hirudingruppe war im Verlauf des ersten Tages (t24h) eine leichte Erhöhung des medianen Quick-Wertes von 82% auf 86% zu verzeichnen. Nach einem Abfall stellte sich nach 48h wieder ein Anstieg des Quick-Wertes auf 95% dar. Dieser Verlauf wiederholte sich auch am 3. und 4. Tag. Die Thromboplastinzeiten nach Quick in den zwei Gruppen unterschieden sich voneinander zu keinem Messzeitpunkt (Abb. 8).

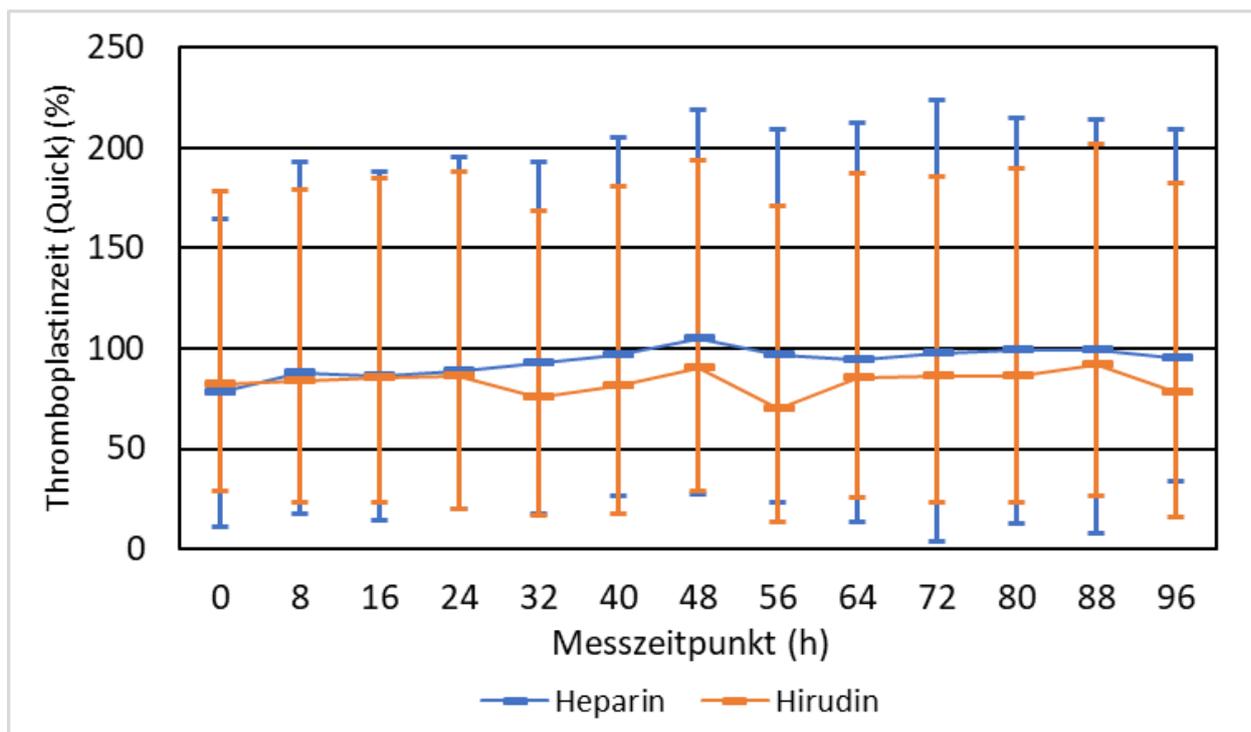


Abbildung 7: Zeitlicher Verlauf der Thromboplastinzeit nach Quick unter den zwei Therapieformen. Median (25./75. Perzentile).

Der Verlauf in der Hirudingruppe zeigte zum Zeitpunkt t32 sowie t56 einen Abfall, so dass eine Therapie mit Frischplasma notwendig wurde. Hier lag kein signifikanter Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen zu keinem Zeitpunkt vor.

### 3.7 Aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT)

Der Referenzbereich des verwendeten aPTT-Assays liegt bei 20-38 sec. Unter Heparintherapie verlängerte sich die aPTT im Verlauf von 43,2 (37,45 – 53,20) sec auf 51,45 (44,75 – 84,05) sec nach 32 Stunden. Dieser Wert wurde nach 64 Stunden erneut erreicht. Danach veränderte sich die aPTT unregelmäßig und erreichte nach 96 Stunden einen Wert von 44,05 sec. Unter der Hirudintherapie veränderte sich die aPTT unregelmäßig von Messzeitpunkt zu Messzeitpunkt. Gegenüber dem Ausgangswert (44,2 sec.) belief sich der Anstieg nach 96 Stunden auf 51,5 sec (Abb. 8). Es lag zu keinem Messzeitpunkt signifikante Unterschiede vor.

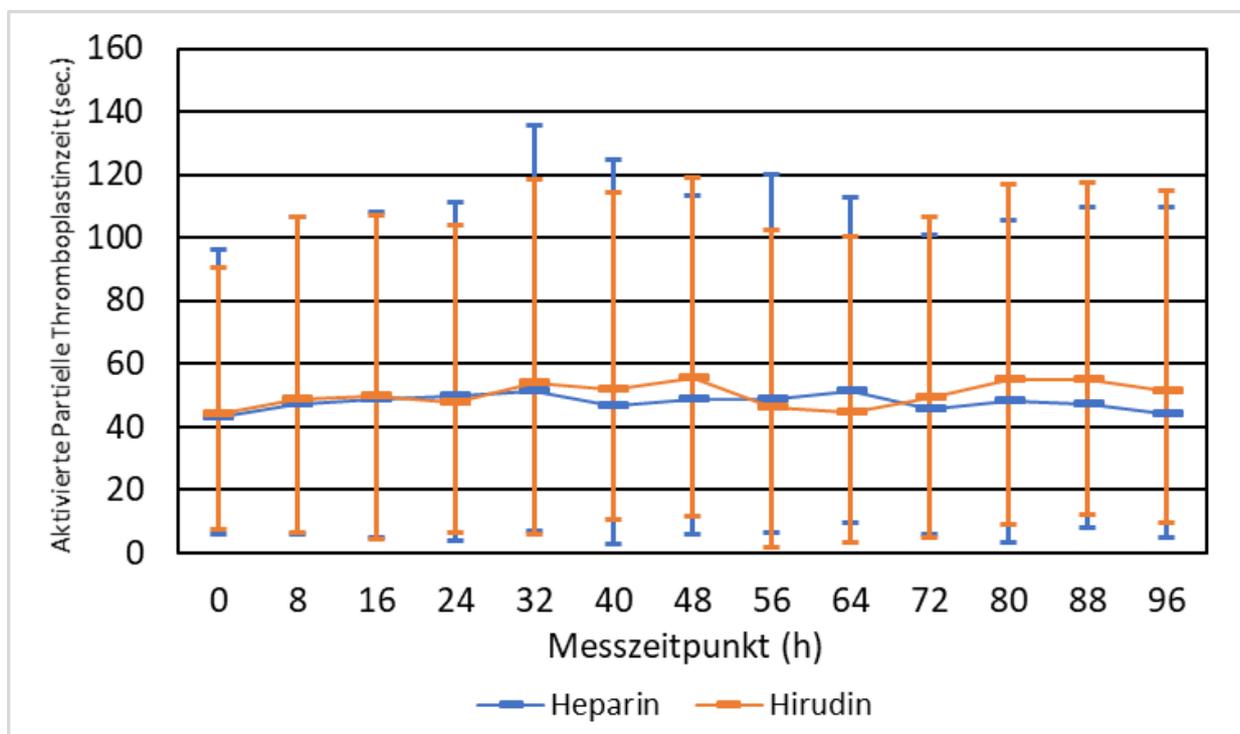


Abbildung 8: Verlauf der partiellen Thromboplastinzeit (aPTT) unter den zwei Therapieformen. Median (25./75. Perzentile).

### 3.8 Thrombozytenanzahl/ nl

Der Referenzbereich liegt bei 150.000-400.000 / $\mu$ l. Unter der Heparintherapie sank die Thrombozytenzahl (PLT) im Mittel vom Ausgangswert 118 /nl auf 83 /nl nach 24 Stunden. Danach stieg der Wert wieder auf 119,5 /nl nach 40 Stunden bzw. auf 104,5 /nl zur letzten Messung. Unter der Hirudintherapie sank die Thrombozytenzahl im Mittel vom Ausgangswert 108 /nl auf 51 /nl nach 80 Stunden. Danach war ein leichter Anstieg des Wertes bis auf 69 /nl zur letzten Messung zu verzeichnen, ohne aber den Ausgangswert zu erreichen (Abb. 3). Aufgrund der therapeutischen Notwendigkeit, wegen progredienter Blutungen aus den Operationswunden, wurden in der HeparinGruppe zum Zeitpunkt t40 (PLT 59/ nl) und t80 (PLT 48/ nl) zwei Patienten je ein Thrombozytenkonzentrat gegeben werden, so dass man sich die starken Schwankungen in der Thrombozytenzahl zu diesen Messzeitpunkten erklären kann (Abb.9). Die medianen Thrombozytenzahlen unter der Hirudintherapie waren im Verlauf tendenziell niedriger, jedoch zeigten sie zu keinem Messzeitpunkt signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen.

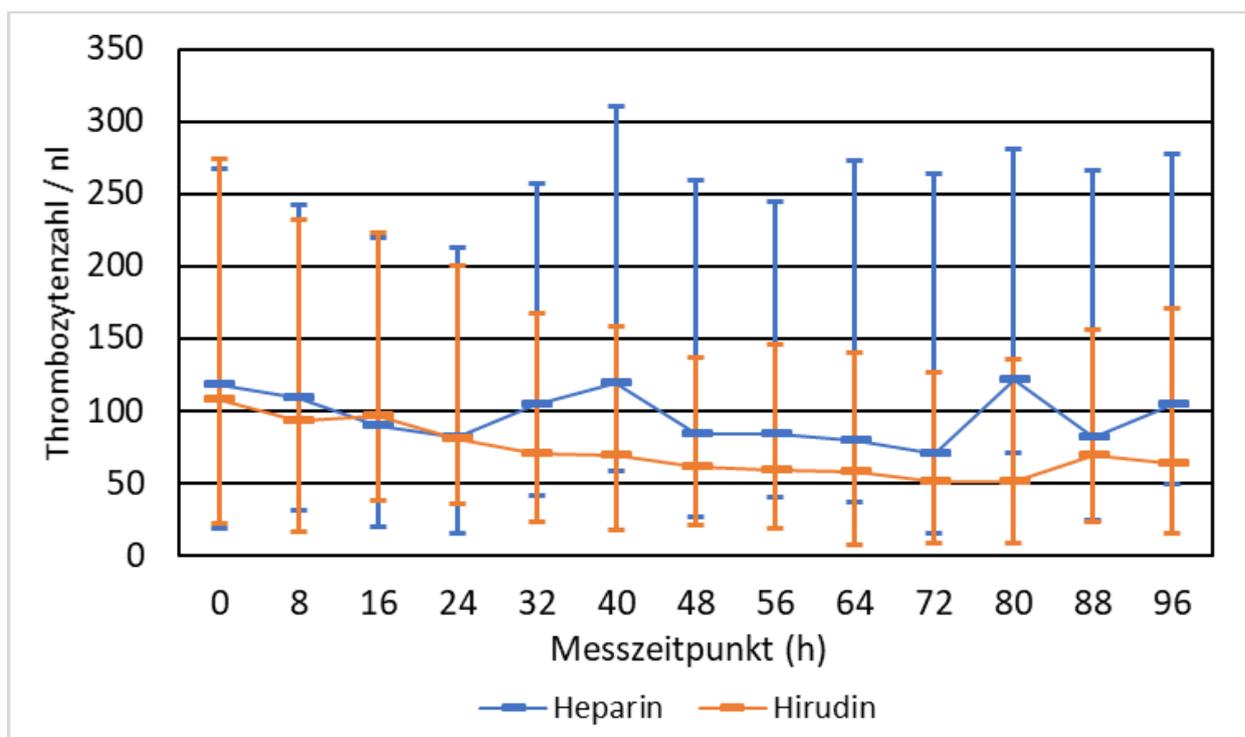


Abbildung 9: Zeitlicher Verlauf der Thrombozytenzahl unter den zwei Therapieformen. Median (25./75. Perzentile).

Der Durchschnittswert der Thrombozytenzahl (PLT) für die gesamte Studiendauer war in der Hirudingruppe niedriger als in der Heparin-Gruppe (83,23 /nl vs. 93,69 /nl), der Unterschied war jedoch nicht signifikant (Abb. 10). Es zeigt sich eine gleichmäßige Streuung um den Median und die Kurve verlief bis auf zwei Messpunkte homogen. Ein Signifikanzniveau:  $p < 0,05$  zwischen den Messzeitpunkten lag nicht vor. ( $p_{HEP} > 0,1 / p_{HIR} = 0,0731$ ). Zum Zeitpunkt  $t = 88$  stieg die Thrombozytenzahl in der Hirudingruppe an. Anzumerken ist, dass die Gaben von Thrombozytenkonzentraten korrelieren nicht unbedingt mit Blutungskomplikationen.

### 3.9 Filterlaufzeit

Die in der unten dargestellten Abbildung 10 erhobenen Daten wurden im Rahmen der hier vorliegenden Dissertation erhoben und analysiert. Die Filterlaufzeit war in der Heparin-Gruppe tendenziell länger als in der Hirudin-Gruppe ( $p = 0,06$ ). Zwischen den beiden Gruppen unterschieden sich die Filterlaufzeiten jedoch nicht signifikant (Hirudin: 11h (4-30h) vs. Heparin 13h (4-63h), ( $p = 0,18$ )).

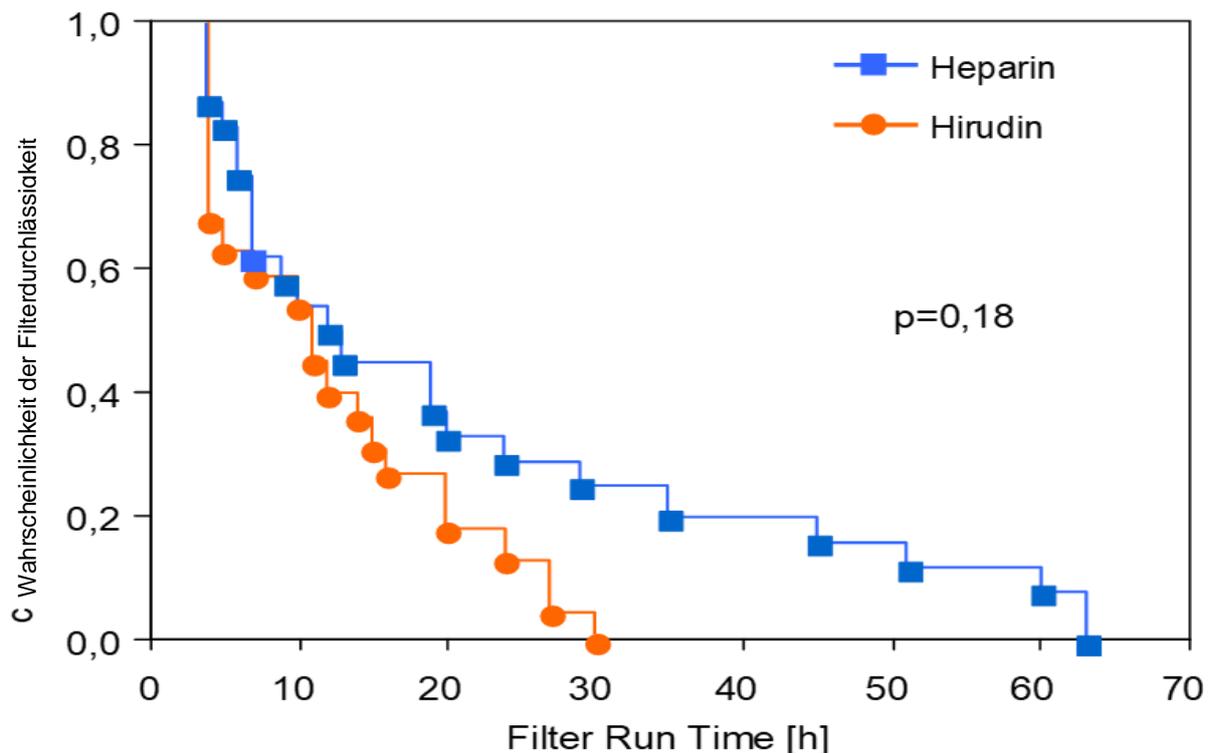


Abbildung 10: Filterlaufzeiten für Hirudin und Heparin, Kaplan-Meier-Analyse (Vargas-Hein et al., 2004), permission to reproduce from Taylor & Francis Group: 15.07.2020.

### 3.10 Dosis- und Plasmaspiegel von Hirudin und Plasma ECT Werte

Die in der unten dargestellten Tabelle 8 erhobenen Daten wurden im Rahmen der vorliegenden Dissertation erhoben und analysiert. Die kumulative Dosis für die Hirudin-Therapie und die Plasmaspiegel von Hirudin sind in Tabelle 9 aufgeführt. Heparin wurde in einer Dosis von 500 (125-1250) IU/h, 8(2-13) IU/kg/h verabreicht.

	Hirudin
Plasmaspiegel von Hirudin (ng/ml)	113 (<99-305)
Tägliche Dosis (mg/24h)	3,2 (0,3-4,9)
Gesamt-Dosis (mg)	0,71 (0,8-22)
Tägliche Dosis / Kg (mg/kg/24h)	0,046 (0,004-0,07)
Gesamt-Dosis / Kg (mg/kg)	0,1 (0,01-0,3)

Tabelle 7: Dosis- und Plasmaspiegel von Hirudin (Medianwert und Spannweite) (Vargas-Hein et al., 2004), permission to reproduce from Taylor & Francis Group: 15.07.2020.

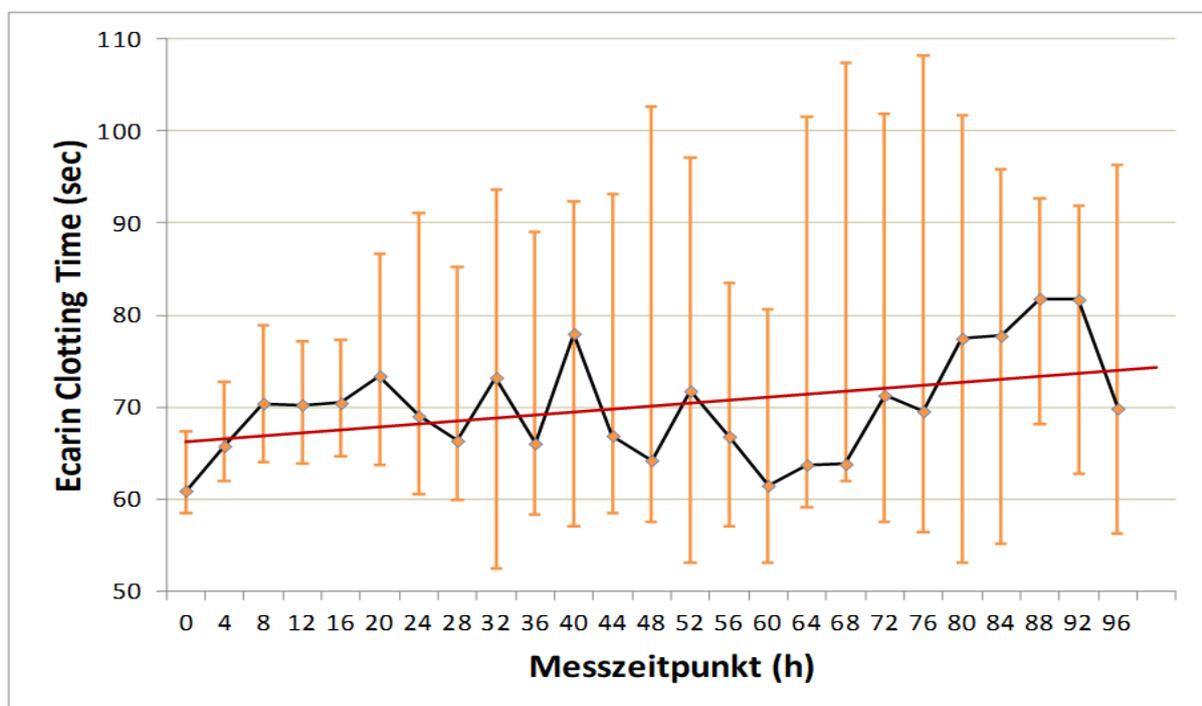


Abbildung 11: Hirudin-ECT-Werte im Plasma [sec] im Zeitverlauf. Median (25./75. Perzentile).

Der Sollwert von 80 Sek. im Mittel über den gesamten Zeitraum wurde nicht erreicht, obwohl die statistische Analyse der Hirudin-Gruppe einen signifikanten Anstieg der ECT-Werte (Abb.11) vom Ausgangswert zeigte.

### 3.11 Blutungen

Die in der unten dargestellten Tabelle 9 erhobenen Daten wurden im Rahmen der vorliegenden Dissertation erhoben und analysiert. In der rHirudin-Gruppe wurde keine Blutung festgestellt. In der Heparin-Gruppe traten bei zwei Patienten Blutungen nach 72 bzw. 76 Stunden auf (Heparin vs. Hirudin,  $p < 0,01$ ). Tabelle 10 zeigt die Parameter beim Auftreten der Blutung: die Dosis der Heparin-Therapie, den Transfusionsbedarf, Hämoglobinspiegel, Koagulationsparameter, APACHE III (Knaus et al., 1991)- und MODS-Score (Baue, 2006), den Bedarf an Noradrenalin sowie den Laktatspiegel. Blutungen traten in zwei Fällen in der Heparin-Gruppe auf. Hier zeigten sich transfusionspflichtige Blutungen im Bereich der OP-Wunde sowie an Einstichstellen. Diese waren nicht operationspflichtig und konnten durch konservative Therapie beherrscht werden.

	Patient 1	Patient 2
Auftreten der Blutung nach Beginn der Studie (h)	72	76
Heparin-Dosis ((IU/kg/h)	2	9
Heparin-Dosis (IU/h)	125	625
Erythrozytenkonzentrate	4	2
Hb (g/dl)	9,1	8,1
Thrombozytenzahl, Ausgangswert (/nL)	82	114
Thrombozytenzahl (/nL)	59	48
PT Ausgangswert (%)	130	86
PT (%)	115	96
APTT Ausgangswert (sec)	57	42

APTT (sec.)	78	70
ACT Ausgangswert (sec.)	219	122
ACT (sec.)	146	137
MODS	12	14
APACHE III	101	92
Norepinephrine ( $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ )	0,15	0,07
Laktat (mmol/L)	1,97	1,20

Tabelle 8: Labor- und klinische Parameter beim Auftreten der Blutung und Ausgangswerte der zwei Patienten mit Blutverlust (Vargas-Hein et al., 2004), permission to reproduce from Taylor & Francis Group: 15.07.2020.

Abk. PT: Prothrombinzeit; aPTT: aktivierte partielle Thromboplastinzeit; ACT: activated clotting time; ECT: ecarin clotting time; AT III: Antithrombin III;  $p < 0,05$  für statistisches Signifikanz-Test: Ausgangswert vs. Medianwert.

Zusammenfassend lässt sich postulieren, dass die Antikoagulation mit Heparin bei kontinuierlichen Nierenersatzverfahren eine statistisch signifikante geringere Aktivierung der plasmatischen Gerinnung, gemessen am Nachweis des Thrombin-Antithrombin-Komplexes gegenüber mit rHirudin behandelten Patienten zeigte. Prothrombin-Fragment 1+2 zeigte keine Unterschiede zwischen den Gruppen. In der Hirudin-Gruppe wurde keine Blutung festgestellt. In der Heparin-Gruppe traten bei zwei Patienten Blutungen auf. Diese konnten jedoch durch konservative Therapie beherrscht werden. Die Filterlaufzeit war in der Heparin-Gruppe nicht signifikant länger als in der Hirudin-Gruppe.

## 4 Diskussion

Die Antikoagulationstherapie bei CVVH auf der Intensivstation wird standardgemäß mit Citrat durchgeführt (Bienholz & Kribben, 2013; Weinreich, 2020), welches lokal am Hämofilter wirkt und unter standardisierter Anwendung niedriges Potenzial für systemische Ereignisse auslöst. Trotzdem können Kontraindikationen und sich entwickelnde Komplikationen sekundär den Gebrauch von Heparin oder andere Alternativen wie rHirudin notwendig machen (Barth, 1998; Global Use of Strategies to Open Occluded Coronary Arteries (GUSTO) IIb investigators, 1996; Macedo & Mehta, 2016; Ronco et al., 2007; Shah et al., 2000; Warkentin et al., 2008). Trotz des bereits 2012 vom deutschen Markt genommenen rHirudin (Fa. Celegene, 2011) besteht hierbei eine Notwendigkeit der Kenntnis dieser alternativen Grundsubstanz. Zumal aktuell auch eine zunehmende Diskussion über Thrombin Hemmer, wie rHirudin, im Rahmen Vakzin vermittelter immunologisch thrombotischer Thrombozytopenie aufkommt (Greinacher et al., 2021).

Direkte Thrombin Hemmer, wie das rHirudin, sind eine potente Alternative bei Heparin assoziierten Komplikationen, wie die HIT Typ II. Die relevante Nebenwirkung jedes Antikoagulans ist das Auslösen von Blutungskomplikationen. Eine Fallbeschreibung von Shah (Shah et al., 2000) zeigte bei kontinuierlicher Applikation von rHirudin eine vermehrte Blutungsneigung. In Studien an unserer Klinik wurde die kontinuierliche rHirudin-Applikation bei CVVH-Patienten untersucht (Vargas-Hein et al., 2004). Hierbei kam es signifikant häufiger zu Blutungskomplikationen (Vargas-Hein et al., 2005). Kern kam bereits 1999 (Kern et al., 1999) zum Ergebnis, dass intermittierende Kontrollen der Hirudinkonzentration im Serum sowie eine angepasste Antikoagulation mit Bolus weiser Gabe von Hirudin schwere Blutungskomplikationen erfolgreich verhindern konnten (Koster et al., 2006).

Die Untersuchung von rHirudin im Rahmen einer Studie zur Antikoagulation bei kontinuierlichen Nierenersatzverfahren an kritisch kranken Patienten zeigte im Vergleich zu Heparin eine geringere Inzidenz an Filterclotting in der Hirudin-Gruppe (Vargas-Hein et al., 2004). Eine Erklärung dieser Befunde könnte sein, dass rHirudin kontinuierlich verabreicht wurde und somit eine wirksamere kontinuierliche Thrombin Hemmung bewirkt. Dies reduziert die Thrombin induzierte prokoagulatorische Wirkung auf das

plasmatische Gerinnungssysteme sowie der Thrombozyten- und Endothelfunktion. Eine alternative Erklärung könnte sein, dass rHirudin im Vergleich zu unfraktioniertem Heparin auch eine Hemmung der Plättchenfunktion bewirkt (Eichinger et al., 1995).

#### **4.1 Plasmatische Gerinnungsparameter**

In der rHirudin-Gruppe fanden wir eine statistisch signifikant stärkere Aktivierung der plasmatischen Gerinnung, gemessen am Nachweis des Thrombin-Antithrombin-Komplexes. So war die Konzentration des TAT-Komplexes im Plasma der Patienten in der Heparin-Gruppe bereits zum Messzeitpunkt t16 ( $p = 0,041$ ) signifikant höher als in der Hirudin-Gruppe. Ein signifikanter Unterschied bezüglich der TAT-Konzentration zwischen der Heparin- und der Hirudin-Gruppe wurde ebenfalls zu Messzeitpunkten t24 ( $p = 0,001$ ), t32 ( $p = 0,001$ ) und t48 ( $p = 0,001$ ) gemessen. Die Verlaufskurve lässt darauf schließen, dass eine Hemmung der Thrombin-Bildung mit der vorliegenden Dosierung von rHirudin bezüglich der TAT Konzentration weniger effektiv erfolgte als mit Heparin. In Studien mit direkten Thrombin-Inhibitoren, wie Bivalirudin, konnte bei herzchirurgischen Patienten eine schnelle spontane Normalisierung des Gerinnungsstatus erreicht werden. Jedoch wurde in diesem Fall eine Dosis von 0,75 mg/kg Körpergewicht intravenös als Bolus appliziert. Anschließend erfolgte eine Dauerinfusion (i.v.) mit 1,75 mg/kg/h für die komplette OP-Dauer (Koster et al., 2006).

Prothrombinfragment 1+2 ist ein Marker der Aktivierung des Gerinnungssystems: je mehr PF 1+2 nachgewiesen wird, desto mehr Prothrombin ist durch den Faktor Xa+ Va, Ca<sup>2+</sup> und PL-Komplex gespalten worden. In beiden Gruppen zeigte das PF1+2 einen Anstieg bis auf eine Konzentration von 74% nach 40 Stunden. Die PF1+2 Konzentration zum Messzeitpunkt t96 betrug in der Heparin-Gruppe 57% und in der Hirudin-Gruppe 67%. Dieser Unterschied war statistisch signifikant. Jedoch zeigte sich kein signifikanter Unterschied über den gesamten Zeitraum. Die Diskrepanz kann durch eine höhere Ausgangs-Prothrombinkonzentration im Plasma hervorgerufen werden. Mutationen des Prothrombin Gens mit erhöhten Prothrombinkonzentrationen sind bereits beschrieben worden (Poort et al., 1996).

Die Fibrinogenkonzentration zeigte im zeitlichen Verlauf zu keinem Messzeitpunkt einen signifikanten Unterschied zwischen den zwei Therapieformen. Zurzeit liegen keine

vergleichbaren Studien vor. Das rHirudin ist bezüglich des Fibrinogenabbaus zu Fibrinmonomeren genauso effizient wie Heparin. Es gibt keinen Unterschied im Fibrinogenverlauf zwischen den Gruppen. Der Grund für den Anstieg der Fibrinogenkonzentration in der Hirudin Gruppe ab t80 ist nicht ersichtlich. Eine Substitutionstherapie mit FFP, PPSB oder Fibrinogen lag zu diesem Zeitpunkt nicht vor. Physiologisch lässt sich eine Steigung der Fibrinogenkonzentration in akute Phase Reaktion belegen. Hierbei wurden im Einzelnen die Konzentrationen von Kallikrein und PMN-Elastase- $\alpha$ 1-Protein-Inhibitor als sensitive Marker für Inflammation und plasmatische Gerinnung gemessen. In einer späteren Studie von Aggarwal (Aggarwal et al., 2002), in dem Heparin mit einem direkten rekombinanten Thrombininhibitor (Bivalirudin) verglichen wurde, wurde mittels Durchflusszytometrie nachgewiesen, dass durch den direkten Thrombininhibitor eine stärkere Reduzierung der prozentualen Thrombozytenanzahl, und damit eine Reduzierung der Fibrinogenbindungskapazität, erfolgte als durch unfraktioniertes Heparin (Aggarwal et al., 2002).

Die antikoagulatorischen Wirkungen von rHirudin können mit einer Reihe diagnostischer Tests überwacht werden (Beiderlinden et al., 2018; Calatzis et al., 2004; Hänecke & Klouche, 2007; Lange et al., 2005). Die Bestimmung der aktivierten Partiiellen Thromboplastinzeit (aPTT), ein globaler Test zur Messung der Gerinnungszeit, ist in den meisten klinischen Studien die primäre Methode zur Überwachung der mit Hirudin erreichten Antikoagulation. Da selbst ein genauer Test zur Messung des Plasmaspiegels von Hirudin das Blutungsrisiko nicht voraussagt, wurde bereits von Fischer 1999 (Fischer et al., 1999) empfohlen die aPTT-Spiegel bei einem Referenzbereich von 26-40 sec. zwischen dem 1,5 und 2,0-fachen der Ausgangswerte zu halten (Pötzsch et al., 1997). An dieser Strategie, bezogen auf die Therapie mit direkten Thrombin-Antagonisten, hat sich bis heute nichts Wesentliches verändert (Beiderlinden et al., 2018). Dabei ist zu beachten, dass die Empfindlichkeit der aPTT-Tests unterschiedlich sein kann, so dass jedes Labor mit seinen eigenen Reagenzien eine Dosis-Wirkungs-Kurve erstellen muss. Hieraus resultiert eine erschwerte Vergleichbarkeit, da es keinen linearen Zusammenhang zwischen der aPTT und der Plasmakonzentration gibt (Beiderlinden et al., 2018; Fischer et al., 1999). Bis zu einem Plasmaspiegel von 0,5  $\mu$ g/ml korreliert die aPTT in einer dosisabhängigen Weise. Darüber hinaus ist eine wiederholte Bewertung der klinischen Situation zwingend notwendig (Kern et al., 1999; Pötzsch et al., 1997). Die

aPTT stellt den besten Parameter zur Überwachung der Antikoagulation während der Hämodialyse oder Hämofiltration in einem Notfall dar, wenn die Bestimmung der ECT nicht möglich ist. Jedoch sollte nach Möglichkeit die Konzentration von rHirudin direkt durch Messung der Ecarin-clotting-Time oder auch anderer quantitativer Methoden, wie dem "Ecarin chromogenic assay" bestimmt werden (Gosselin et al., 2004; Lange et al., 2003, 2005; Nowak, 2003). In der vorliegenden Arbeit erreichten die Unterschiede bezüglich der aPTT zwischen den zwei Gruppen zu keinem Messzeitpunkt ein statistisch signifikantes Niveau. Aufgrund der vorliegenden Literatur scheint die aPTT ein sinnvoller Überwachungsparameter zu sein, vorausgesetzt dass die Antikoagulation mit einem direkten Thrombin-Inhibitor, wie dem in der aktuellen Studie verwendeten rHirudin, in einem Niedrigdosis-Bereich durchgeführt wird (Pöttsch et al., 1997).

Auch die medianen Thromboplastinzeiten nach Quick in den zwei Gruppen unterschieden sich zu keinem Messzeitpunkt signifikant. Die Werte lagen nahezu auf identischen Ausgangswerten.

Besser als die herkömmlichen Parameter der Blutgerinnung scheint die Ecarin clotting Time (ECT) zur Überwachung der Hirudin-Antikoagulation geeignet zu sein, da eine annähernd lineare Korrelation zur Hirudinkonzentration über einen weiten Dosisbereich, von subtherapeutischen bis zum toxischen Hirudinspiegel (0,05 bis 5,0 µg/ml) beschrieben wurde. In der vorliegenden Arbeit wurde der Sollwert von 80sek. im Mittel nicht erreicht, obwohl die statistische Analyse der Hirudin-Gruppe einen signifikanten Anstieg der ECT-Werte vom Ausgangswert zu Globalparametern zeigte. Ein Grund hierfür könnte darin liegen, dass Hirudin als Bolusgabe mit im Median 46 (4-70) µg/kg KG/d niedrig dosiert war. Vergleichend könnte man annehmen, dass die kontinuierliche Anwendung in der Studie von Vargas Hein (Vargas-Hein et al., 2004) zu höheren Hirudin-Konzentrationen führte, da in dieser Arbeit höhere ECT-Spiegel gemessen wurden. Dies könnte die Erklärung für die längeren Filterlaufzeiten unter kontinuierlicher Applikation von Hirudin in dieser Studie gewesen sein.

Die Thrombozytenzahl sank in der vorliegenden Studie während der CVVH Therapie in beiden Gruppen ab. Der zeitliche Verlauf der Thrombozytenzahl zeigte zu keinem Messzeitpunkt signifikante Unterschiede zwischen der Heparin-Gruppe und der Hirudin-Gruppe. Neben der pharmakologischen Beeinflussung der Thrombozyten-Funktion durch

direkte Thrombin-Inhibitoren ist bekannt, dass die Thrombozyten während der CVVH aufgrund der physikalischen Scherkräfte verbraucht werden (Schmidt, 1994). Es ist bekannt, dass durch Fremdoberflächenkontakt zum Hämofilter und Komponenten eine verstärkte Adhäsion und Aggregation der Thrombozyten (Köstering et al., 1977; Macedo & Mehta, 2016) stattfindet. Der Verlauf der Thrombozytenzahl unterschied sich in beiden Gruppen nicht signifikant. Sepsis ist ein wesentlicher Faktor für die Abnahme der Thrombozytenzahl (Larkin et al., 2016). Auch der Einfluss von Membranen unterschiedlicher Beschaffenheit auf die Thrombozytenzahl wurde beschrieben. Bereits Falkenhagen (Falkenhagen D et al., 1983) konnte einen signifikanten Plättchenabfall während der Nierenersatztherapie mit einer Cuprophan®-Membran im Gegensatz zu Polysulfon-highflux Membranen feststellen. Abweichende Arbeiten, die ebenfalls Polysulfon-highflux Membranen verwendeten, konnten jedoch die von Falkenhagen erhobenen Daten nicht bestätigen (Mulvihill et al., 1992).

## **4.2 Filterlaufzeit**

In früheren Studien zeigte sich, dass die kontinuierliche Anwendung von Hirudin in Bezug auf die Filterlaufzeit keinen Unterschied zur kontinuierlichen Gabe von UFH aufwies (Van Wyk et al., 1995). In der vorliegenden Arbeit lagen die gemessenen Plasmaspiegel der rHirudin Dosierung mit 46 (4-70) µg/kg/d unterhalb der therapeutischen Norm von 0,5-2,5 µg/ml (Vargas-Hein et al., 2004). Es liegt nahe, dass in der vorliegenden Studie eine zu geringe Hirudin-Konzentration angewendet wurde. Die beobachteten Filterlaufzeiten liegen im unteren Bereich im Vergleich zu den in der Literatur beschriebenen Filterlaufzeiten für Heparin und Hirudin (Jörres, 2002; Jörres et al., 1999). So bestünde eine Möglichkeit, um längere Filterlaufzeiten zu erzielen, darin, entweder die Bolusapplikation mit höheren Dosierungen zu verabreichen oder rHirudin, unter Berücksichtigung der Kumulation bei ANV, kontinuierlich zu applizieren.

Van Holder (Vanholder et al., 1994) und Van Wyk (Van Wyk et al., 1995) führten intermittierende Hämodialyse unter Antikoagulation mit Hirudin durch. Ein Filterclotting wurde nicht berichtet. Die Autoren verwendeten eine Bolus-Dosis von 0,08 mg/kg bzw. 0,15 mg/kg und fanden weniger Akkumulation von markierten Thrombozyten in der künstlichen Niere während der Dialyse mit Hirudin als mit Heparin (Van Wyk et al., 1995).

Unter Berücksichtigung der Ergebnisse aus der Literatur über intermittierende Hämodialyse und der eigenen Ergebnisse zur CVVH (kein signifikanter Unterschied der Filterstandzeiten) schlussfolgern wir, dass Hirudin zur Vorbeugung des Filterclottings genauso effektiv wie Heparin war.

Aufgrund der Unterschiede in der Permeabilität für Hirudin ist das Membranmaterial der CVVH von entscheidender Bedeutung, wobei Cellulose low-flux-Membranen nicht durchlässig sind. Die von uns verwendeten Polysulfon-highflux 140H® Filter sind semipermeabel für Hirudin. Für diesen Filtertyp sind erniedrigte Blutkonzentrationen von Hirudin beschrieben worden (Mulvihill et al., 1992). Daher sollte das Hirudin-Monitoring vor allem bei kontinuierlicher Gabe, bei kritisch kranken Patienten engmaschiger gestaltet werden. So konnte Schmidt (Schmidt, 1994) bereits früh zeigen, dass eine Dosis von 0,005 mg/kg KG/h auch bei einem für Hirudin permeablen Highflux Polysulfonfilter ausreichend ist. Wird eine rHirudin-Antikoagulation durchgeführt, ist eine quantitative Messung der Hirudinkonzentration z.B. mit der ECT zu empfehlen (Nowak, 2003), um eine Kumulation zu verhindern.

### **4.3 Blutungskomplikationen**

In der vorliegenden Arbeit wurden in der rHirudin-Gruppe keine Blutungskomplikationen beobachtet. In einer früheren Studie von Kern (Kern et al., 1999) wurden vergleichsweise kontinuierlich 0,01mg/kg/h sowie bolusweise 0,05 mg/kg rHirudin während der CVVH verabreicht. Die angestrebte und erreichte aPTT lag bei 50-60 sec. Die Autoren beobachteten schwere Blutungskomplikationen in der Gruppe mit der kontinuierlichen Anwendungsform. Dahingegen konnten keine Blutungskomplikationen in der Gruppe mit der Bolusapplikation festgestellt werden. Fischer (Fischer et al., 1999) verabreichte 13-80 µg/kg/d Hirudin als Bolus-Gabe und 500 µg/kg/d als kontinuierliche Zugabe mit einer erreichten aPTT von 44-100 sek. ohne Blutungskomplikationen bei sieben kritisch kranken Intensivpatienten. In beiden Studien erfolgte die Überwachung der Hirudin-Therapie ohne ECT Messung, sondern nur mittels einer angestrebten aPTT von 1,5 - 2,0 fache des Ausgangswertes. Vergleichend erscheint eine Bolus-Gabe sicherer zu sein in Bezug auf Blutungskomplikationen. Zu berücksichtigen ist selbstverständlich der

Umstand, dass internistische weniger von Blutungskomplikationen betroffen sind als postoperative Patienten.

In der Heparin-Gruppe erlitt ein Patient eine mäßige und ein weiterer Patient eine transfusionspflichtige Blutung. Die Koagulationsparameter der Heparin behandelten Patienten mit Blutungskomplikationen zeigten eine milde Thrombozytopenie beim 1. Patienten und eine schwere Thrombozytopenie beim 2. Patienten sowie hohe aPTT-Werte bei beiden Patienten, welche in keiner Beziehung zu dem gemessenen ACT-Ausgangswert standen. Die Thrombozytenzahlen waren wahrscheinlich aufgrund der zugrunde liegenden schweren Sepsis erniedrigt. Dieser Befund unterstreicht die problematische Überwachung der Heparin-Therapie und die Bedeutung der kurzfristigen Dosisanpassung in Übereinstimmung mit dem Koagulationsstatus der postoperativen Patienten mit Nierenersatztherapie während kontinuierlicher Antikoagulation (Global Use of Strategies to Open Occluded Coronary Arteries (GUSTO) IIb investigators, 1996; Van Bommel et al., 1995). In der vorliegenden Hirudin-Gruppe wurden keine Blutungskomplikationen unter der angewandten Dosierung festgestellt. Unter Sicherheitsaspekten betrachtet ist die bolusweise Applikation von Hirudin bei kritisch kranken Patienten sicher und in Hinsicht auf die Filterlaufzeit nicht weniger effektiv, wobei jedoch ein Trend zu längeren FLZ in der Heparin-Gruppe gemessen werden konnte. Unter Berücksichtigung früherer Hirudin basierter Studien kann man feststellen, dass bei Notwendigkeit einer alternativen Antikoagulation zu Heparin, die bolusweise Gabe von rHirudin unter engem Monitoring des Koagulationsstatus des Patienten eine effektive Alternative darstellen kann.

#### **4.4 Methodendiskussion**

Zusammenfassend sollten bezüglich der vorliegenden Studienergebnisse nachfolgende kritische Anmerkungen über die methodische Vorgehensweise berücksichtigt werden. Zu bemerken ist, dass die vorhandene Patientenanzahl in beiden Gruppen relativ klein war, sodass statistisch keine ausreichende Teststärke bestand. Aufgrund des explorativen Charakters dieser Studie (Pilotstudie) war eine ausreichende Teststärke nicht primär intendiert. Ein Grund für das Ausbleiben der Blutungskomplikationen in Verbindung mit der verabreichten rHirudin-Dosis könnte sein, dass die untersuchten Gruppen aus

postoperativen Patienten bestehen, und dass die in dieser Studie ausgewählte Dosierung zu niedrig war, um eine Blutungskomplikation auszulösen. Blutungskomplikationen im Rahmen der intermittierenden Hämodialyse wurden in ähnlichen Studien berichtet. In anderen Studien dagegen traten diese hingegen nicht auf (Vargas-Hein et al., 2004, 2005). Eine Verringerung der Dosis des Antikoagulans führte jedoch immer zum Blutungsstillstand, ohne eine Verminderung der Effizienz. Jedoch kann eine Verminderung der Antikoagulantien-Dosis auf der anderen Seite auch eine Verkürzung der Filterlaufzeiten und damit Reduktion der Effektivität der Nierenersatztherapie bedeuten.

## 5 Zusammenfassung

Eine der häufigsten Komplikationen in der Intensivtherapie kritisch kranker Patienten ist das akute Nierenversagen (ANV) (Bienholz & Kribben, 2013; Kaufmann & Voit, 2019; Khwaja, 2012; Lopes et al., 2008; Vanmassenhove et al., 2017). Der Kontakt von Blut mit Fremdoberflächen, z. B. bei kontinuierlichen Nierenersatzverfahren (CVVH) führt zu einer Aktivierung des plasmatischen und korpuskularen (Köstering et al., 1977) Gerinnungssystems, welches trotz systemischer Antikoagulation zu einer ineffektiven Hämofiltrationsbehandlung führen kann (Vargas-Hein et al., 2004, 2005). Der aktuelle Standard der Antikoagulation bei CVVH wird mit Citrat durchgeführt. Neben unfraktioniertem Heparin (Barenbrock & Schaefer, 2004; Bienholz & Kribben, 2013; Khwaja, 2012; Weinreich, 2020) ist auch rekombinantes Hirudin (rHirudin) bei kontinuierlichen Nierenersatzverfahren mit Erfolg zur Antikoagulation eingesetzt worden, weist jedoch bei renaler Insuffizienz eine deutliche Kumulation auf (Fischer et al., 1999; Global Use of Strategies to Open Occluded Coronary Arteries (GUSTO) IIb investigators, 1996; Junren et al., 2021; Vanholder & Dhondt, 1999). Pharmakodynamische Unterschiede zu Heparin bestehen darin, dass Hirudin keine direkte Bindung mit Antithrombin, Blutzellen oder Plasmaproteinen eingeht und dass bis jetzt kein direktes Antidot verfügbar ist.

Die Fragestellung der vorliegenden Untersuchung war, die Gerinnungsaktivierung unter Antikoagulation mit unfraktioniertem Heparin und rekombinantem Hirudin während kontinuierlicher Hämofiltration zu untersuchen. Es wurden 26 kritisch kranke, postoperative Patienten mit akutem Nierenversagen und kontinuierlicher Hämofiltration in 2 Gruppen randomisiert. Im Verlauf der Untersuchung wurden insgesamt fünf Patienten aus der Studie ausgeschlossen (Heparin-Gruppe: 4, Hirudin-Gruppe: 1). Die Heparin-Therapie wurde nach der activated clotting time (ACT) gesteuert. Die Steuerung der Hirudin-Therapie erfolgte mit der Ecarin clotting Time (ECT). Die Heparin-Gruppe erhielt Heparin kontinuierlich über einen Perfusor appliziert. Die Initialdosis von Heparin betrug 250 IU/h. Das Ziel der Antikoagulationstherapie war eine ACT von 180-210 s. Die nachfolgenden Anpassungen der Heparindosis erfolgten in Schritten von 125 IU/h. Das rHirudin wurde intermittierend, im Bolusprinzip, verabreicht. Die Hirudin Therapie wurde mit einer Dosierung von 0,4 mg (2µg) / kg als Bolus gestartet und anschließend 4stündlich

entsprechend der ECT Messung angepasst. Der Zielbereich der ECT lag bei 80-100 Sekunden. Lag die ECT unter 80s wurde ein Bolus von 0,15mg/kg verabreicht.

Primäre Zielgröße dieser Untersuchung waren die nachfolgend aufgeführten Parameter der Gerinnungsaktivierung und des allgemeinen hämostaseologischen Labors: der Thrombin-Antithrombin-Komplex (TAT), Prothrombin-Fragment 1+2 (PF1+2) welche 8 stündlich über einen Zeitraum von 96 h gemessen wurden. Die statistische Auswertung wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test durchgeführt.

Das akute Nierenversagen der Studien-Patienten trat meistens im Kontext eines Multiorganversagens auf. Zugrundeliegend war eine kardiogener (n=21), oder ein septischer Schock (n=4). In der Heparin-Gruppe lag der APACHE-III-Score (Knaus et al., 1991) bei 71 (48-111) und in der Hirudin-Gruppe bei 84 (72-107). Der MODS Score betrug 9 (3-15) in der Heparin-Gruppe bzw. 11 (6-15) in der Hirudin-Gruppe. Die Unterschiede bezüglich der TAT-Konzentration zwischen der Heparin- und der Hirudin-Gruppe erreichten ein signifikantes Niveau. In beiden Gruppen zeigte das Prothrombinfragment F1+2 bei einer relativ großen Streuung der Messwerte einen Anstieg bis auf eine Konzentration von 74% nach 40 Stunden. Die F1+2 Konzentration war nur zum Messzeitpunkt t96 statistisch signifikant. Die Filterlaufzeit war in der Heparin-Gruppe tendenziell länger als in der Hirudin-Gruppe jedoch nicht signifikant.

Die intermittierende rHirudin-Gabe kann zur Antikoagulation bei kontinuierlicher extrakorporaler Nierenersatztherapie eingesetzt werden. Die intermittierende Hirudin-Anwendung führte nicht zu signifikanten Blutungskomplikationen. Die vorliegende Studie zeigte, dass Heparin bei der Hemmung der Gerinnungsaktivierung deutliche Vorteile besitzt. Die Vorteile bestehen darin, dass unter kontinuierlicher Applikation eine engmaschige Anpassung der Heparindosis möglich ist. Dies ermöglicht längere Filterlaufzeiten und damit weniger Gerinnungsaktivierung. Die wichtigsten Ergebnisse dieser Studie waren, dass rHirudin hinsichtlich der Filterlaufzeit ineffizient in der dargelegten Applikationsform ist. Es zeigten sich mehr Filterwechsel sowie mehr plasmatische Gerinnungsaktivität bezogen auf den Thrombin-Antithrombin-Komplex (TAT) auf.

## 6 Literaturverzeichnis

- Aggarwal, A., Sobel, B. E., & Schneider, D. J. (2002). Decreased platelet reactivity in blood anticoagulated with bivalirudin or enoxaparin compared with unfractionated heparin: Implications for coronary intervention. *Journal of Thrombosis and Thrombolysis*, 13(3), 161–165. <https://doi.org/10.1023/A:1020478923794>
- Aizawa, H., Kurosawa, S., Tozuka, M., Park, J. W., Kobayashi, K., & Tanaka, H. (2003). Conventional detection method of fibrinogen and fibrin degradation products using latex piezoelectric immunoassay. *Biosensors and Bioelectronics*, 18(5–6), 765–771. [https://doi.org/10.1016/S0956-5663\(03\)00029-0](https://doi.org/10.1016/S0956-5663(03)00029-0)
- Barenbrock, M., & Schaefer, R. (2004). 4 Hämodialyse, Hämofiltration und Hämodiafiltration. In W. H. Hörl & C. Wanner (Hrsg.), *Dialyseverfahren in Klinik und Praxis* (Bd. 6, S. 37–50). Georg Thieme Verlag. <https://doi.org/10.1055/b-0034-27392>
- Barth, K. S. (1998). *Inzidenz der Heparin-induzierten Thrombozytopenie Typ II. Dissertation*. Justus-Liebig-Universität Gießen.
- Barthels, M. (2012). 28 Aktivierungsmarker der Gerinnung und Fibrinolyse. In M. Barthels (Hrsg.), *Das Gerinnungskompodium* (Bd. 2, S. 686–688). Georg Thieme Verlag. <https://doi.org/10.1055/b-0034-15066>
- Baue, A. E. (2006). MOF, MODS, AND SIRS. *Shock*, 26(5). <https://doi.org/10.1097/01.shk.0000228172.32587.7a>
- Beiderlinden, M., Werner, P., Bahlmann, A., Kemper, J., Brezina, T., Schäfer, M., Görlinger, K., Seidel, H., Kienbaum, P., & Treschan, T. A. (2018). Monitoring of argatroban and lepirudin anticoagulation in critically ill patients by conventional laboratory parameters and rotational thromboelastometry - a prospectively controlled randomized double-blind clinical trial. *BMC Anesthesiology*, 18(1). <https://doi.org/10.1186/s12871-018-0475-y>
- Bellomo, R., Farmer, M., Bhonagiri, S., Porceddu, S., Ariens, M., M'pisi, D., & Ronco, C. (1999). Changing acute renal failure treatment from intermittent hemodialysis to continuous hemofiltration: impact on azotemic control. *Int J Artif Organs*, 22, 145–150.
- Bellomo, R., Ronco, C., Kellum, J. A., Mehta, R. L., & Palevsky, P. (2004). Acute renal failure - definition, outcome measures, animal models, fluid therapy and information technology needs: the Second International Consensus Conference of the Acute Dialysis Quality Initiative (ADQI) Group. *Critical care (London, England)*, 8(4). <https://doi.org/10.1186/cc2872>
- Bienholz, A., & Kribben, A. (2013). KDIGO-Leitlinien zum akuten Nierenversagen: Deutsche Übersetzung. *Nephrologie*, 8(3), 247–251. <https://doi.org/10.1007/s11560-013-0752-1>
- Böhrer, H., & Nawroth, P. (1999). Antikoagulation bei extrakorporalen Verfahren. *Anästhesiologie & Intensivmedizin*, 11(40), 806–808.
- Bruhn, H., & Zurborn, K. (1993). Messung des Prothrombinfragments F1+2 zur Kontrolle der antikoagulatorischen Wirkung von Phenprocoumon. *Dtsch Med Wochenschr*,

118(26). <https://doi.org/10.1055/s-2008-1059413>

- Bucha, E., Markwardt, F., & Nowak, G. (1990). Hirudin in haemodialysis. *Thrombosis Research*, 60(6), 445–455. [https://doi.org/10.1016/0049-3848\(90\)90229-6](https://doi.org/10.1016/0049-3848(90)90229-6)
- Calatzis, A., Spannagl, M., Vorweg, M., & Merheim, K. (2004). Zielgerichtete Behandlung akuter Hämostasestörungen mit Hilfe der ROTEM®-Analyse. *Fa. Pentapharm AG*.
- Dämpfle EC. (2005). Bestimmung des D-Dimer-Antigens in der klinischen Routine. *Dtsch Arztebl International*, 102, 428–428.
- Eichinger, S., Wolzt, M., Schneider, B., Nieszpaur-Los, M., Heinrichs, H., Lechner, K., Eichler, H.-G., & Kyrle, P. A. (1995). Effects of Recombinant Hirudin (r-Hirudin, HBW 023) on Coagulation and Platelet Activation In Vivo. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 15. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.15.7.886>Arteriosclerosis
- Fa. Agen Biomedical Limited. (1992). Dimertest Gold Stripwell EIA Kit. *Australas Biotechnol.*, 339–340.
- Fa. Celgene. (2011). Refludan Einstellung (Rote Hand Brief). *Rote Hand Brief*. [https://www.bfarm.de/SharedDocs/Risikoinformationen/Pharmakovigilanz/EN/RHB/2011/rhb-refludan.pdf?\\_\\_blob=publicationFile&v=6](https://www.bfarm.de/SharedDocs/Risikoinformationen/Pharmakovigilanz/EN/RHB/2011/rhb-refludan.pdf?__blob=publicationFile&v=6)
- Fa. Celgene. (2008). *Product Information Refludan (Lepirudin)*. <https://gp2u.com.au/static/pdf/R/REFLUDAN-PI.pdf>
- Fa. Dade Behring. (1998a). *Enzygnost TAT micro. Manual*.
- Fa. Dade Behring, M. D. (1998b). *Enzygnost F1+2 micro. Manual*.
- Fa. Dade Behring, M. D. (1998c). *Hirudin Activity Assay zur Erfassung der Hirudin Aktivität im Plasma. Manual*.
- Fa. Medtronic Inc., U. (1996). *Activated Clotting Time Cartridges Manual*. Medtronic Inc.
- Fa. Nobis Product Manual. (2000). *NobiClot EcaTEG zur Hirudin empfindlichen, jedoch Heparin unempfindlichen Erfassung der Blutgerinnung*.
- Fa. Pentapharm Product Description. (2020). Ecarin. In *ECT*. Loxo GmbH. <https://www.loxo.de/de/A811601/Ecarin>
- Fa. PrecisionBiologic Instruction Manual. (1999). *Cryo Check FII Deficient Plasma*. [www.precisionbiologic.com](http://www.precisionbiologic.com)
- Falkenhagen D, Ahrenholz P, Falkenhagen U, Holtz M, Behm E, Roy T, & Klinkmann H. (1983). Efficiency and blood compatibility of a new polysulfone high flux dialyzer *Artif Organs*. *Artif Organs*, 7, 44-undefined.
- Fischer, K., Van Loo, A., & Böhrer, J. (1999). Recombinant hirudin (lepirudin) as anticoagulant in intensive care patients treated with continuous hemodialysis. *Kidney International, Supplement*, 56(72). <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.56.s72.2.x>
- Global Use of Strategies to Open Occluded Coronary Arteries (GUSTO) IIb investigators. (1996). A Comparison of Recombinant Hirudin with Heparin for the Treatment of Acute Coronary Syndromes. *New England Journal of Medicine*,

335(11), 775–782. <https://doi.org/10.1056/NEJM199609123351103>

- Göbel, K., Eichler, S., Wiendl, H., Chavakis, T., Kleinschnitz, C., & Meuth, S. G. (2018). The coagulation factors fibrinogen, thrombin, and factor XII in inflammatory disorders—a systematic review. In *Frontiers in Immunology* (Bd. 9, Nummer JUL). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01731>
- Gosselin, R. C., King, J. H., Janatpour, K. A., Dager, W. E., Larkin, E. C., & Owings, J. T. (2004). Comparing direct thrombin inhibitors using aPTT, ecarin clotting times, and thrombin inhibitor management testing. *Annals of Pharmacotherapy*, 38(9), 1383–1388. <https://doi.org/10.1345/aph.1D565>
- Greinacher, A. (2012). Heparin-induced thrombocytopenia. *17th Congress of the European Hematology Association*, 6(1), 153–164.
- Greinacher, A., Lubenow, N., Hinz, P., & Ekkernkamp, A. (2003). HIT. *Deutsches Ärzteblatt*, 100(34–35).
- Greinacher, A., Thiele, T., Warkentin, T., Weisser, K., Kyrle, P., & Eichinger, S. (2021). Thrombotic Thrombocytopenia after ChAdOx1 nCov-19 Vaccination. *New England Journal of Medicine*, 384(22), 2092–2101. <https://doi.org/10.1056/nejmoa2104840>
- Greinacher, A., & Warkentin, T. (2006). Recognition, treatment, and prevention of heparin-induced thrombocytopenia: Review and update. In *Thrombosis Research* (Bd. 118, Nummer 2, S. 165–176). <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2005.07.012>
- Guérin, C., Girard, R., Selli, J., & Ayzac, L. (2002). Intermittent versus continuous renal replacement therapy for acute renal failure in intensive care units: Results from a multicenter prospective epidemiological survey. *Intensive Care Medicine*, 28(10), 1411–1418. <https://doi.org/10.1007/s00134-002-1433-0>
- Gulba, D. C., Barthels, M., Westhoff-Bleck, M., Jost, S., Rafflenbeul, W., Daniel, W. G., Hecker, H., & Lichtlen, P. R. (1991). Increased Thrombin Levels During Thrombolytic Therapy in Acute Myocardial Infarction Relevance for the Success of Therapy. *Circulation*, 83(3), 937–944. <http://ahajournals.org>
- Haas, S. (1997). Heparin und Hirudin-Unterschiede in der pharmakologischen Wirkung. *Thrombembolie Prophylaxe in der Inneren und operativen Medizin*. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-60>
- Hänecke, P., & Klouche, M. (2007). Thrombelastography today: Practicability and analytical power. In *Transfusion Medicine and Hemotherapy* (Bd. 34, Nummer 6, S. 421–428). <https://doi.org/10.1159/000110899>
- Harenberg, J., Huhle, G., Piazzolo, L., & Malsch, R. (1997). Niedermolekulare Heparine: Prophylaxe und Therapie thromboembolischer Erkrankungen. *Hautarzt*, 48, 852–864.
- Hattersley, P. G. (1966). Activated Coagulation Time of Whole Blood. *JAMA*, 196(5). <https://jamanetwork.com/>
- Herold, G. (2012). Akutes Nierenversagen. In *Innere Medizin* (S. 1543–1554).
- Himmelreich, G., & Riess, H. (1999). Klinische Bedeutung des Fibrinolyse systems [Clinical significance of the fibrinolysis system]. *Dtsch Med Wochenschr.*, 15(116), 426–430. <https://doi.org/10.1055s-2008-1063629>

- Hirsh, J., O'Donnell, M., & Weitz, J. I. (2005). New anticoagulants. In *Blood* (Bd. 105, Nummer 2, S. 453–463). <https://doi.org/10.1182/blood-2003-12-4195>
- Hoffman, M., & Monroe, D. M. (2001). A cell-based model of hemostasis. *Thromb Haemost*, 85(6), 958–965.
- Jörres, A. (2002). Extracorporeal treatment strategy in acute renal failure. *Int J Artif Organs*, 391–396. <https://doi.org/10.1177039139880202500508>
- Jörres, A., Gahl, G., Dobis, C., Polenakovic, M., Cakalaroski, K., Rutkowski, B., Kisielnicka, E., Krieter, D., Rumpf, K., Guenther, C., Gaus, W., & Hoegel, J. (1999). Haemodialysis-membrane biocompatibility and mortality of patients with dialysis-dependent acute renal failure: A prospective randomised multicentre trial. *Lancet*, 354(9187), 1337–1341. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(99\)01213-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(99)01213-1)
- Junren, C., Xiaofang, X., Huiqiong, Z., Gangmin, L., Yanpeng, Y., Xiaoyu, C., Yuqing, G., Yanan, L., Yue, Z., Fu, P., & Cheng, P. (2021). Pharmacological Activities and Mechanisms of Hirudin and Its Derivatives - A Review. In *Frontiers in Pharmacology* (Bd. 12). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.660757>
- Kaufmann, I., & Voit, A. (2019). Akutes Nierenversagen und Nierenersatzverfahren. In *Die Anästhesiologie* (Die Anästhesiologie, S. 2073–2097). Springer Reference Medizin. [https://doi.org/10.1007/978-3-662-54507-2\\_137](https://doi.org/10.1007/978-3-662-54507-2_137)
- Kern, Ziemer, & Kox. (1999). Bleeding after intermittent continuous r-hirudin during CVVH. *Intensive Care Med* (1999) 25: 1311±1314.
- Khwaja, A. (2012). KDIGO clinical practice guidelines for acute kidney injury. In *Nephron - Clinical Practice* (Bd. 120, Nummer 4). <https://doi.org/10.1159/000339789>
- Kiser, T. H., MacLaren, R., Fish, D. N., Hassell, K. L., & Teitelbaum, I. (2010). Bivalirudin versus unfractionated heparin for prevention of hemofilter occlusion during continuous renal replacement therapy. *Pharmacotherapy*, 30(11), 1117–1126. <https://doi.org/10.1592/phco.30.11.1117>
- Knaus, W. A., Wagner, D. P., Draper, E. A., Zimmerman, J. E., Bergner, M., Bastos, P. G., Sirio, C. A., Murphy, D. J., Lotring, T., Damiano, A., & Harrell, F. E. (1991). The APACHE III Prognostic System. *Chest*, 100(6). <https://doi.org/10.1378/chest.100.6.1619>
- Kobsar, A., Koessler, J., Kehrer, L., Gambaryan, S., & Walter, U. (2012). The thrombin inhibitors hirudin and Repludin® activate the soluble guanylyl cyclase and the cGMP pathway in washed human platelets. *Thrombosis and Haemostasis*, 107(3), 521–529. <https://doi.org/10.1160/TH11-07-0461>
- Kornalik, F., Schieck, A., & Habermann, E. (1969). Isolation, Biochemical and Pharmacological Characterization of a Prothrombin-Activating Principle from Echis Carinatus Venom / Isolierung sowie biochemische und pharmakologische Charakterisierung eines Prothrombin-aktivierenden Prinzips aus Echis carinatus-Gift. In Habermann E. et al (Hrsg.), *Naunyn Schmiedebergs Archiv für Pharmakologie*. Springer, Berlin. [https://doi.org/10.1007/978-3-662-39718-3\\_228](https://doi.org/10.1007/978-3-662-39718-3_228)
- Koßmehl, A. (2000). Ecarin-Clotting-Time (ECT) Manual. *Pharmakologische Hämostaseologie, Max-Planck-Arbeitsgruppe an der FSU Jena, 07747 Jena*, 1–3.
- Koster, A., Spiess, B., Jurmann, M., Dyke, M., Smedira, N., Aronson, S., & Lincoff, A.

- (2006). Bivalirudin Provides Rapid, Effective and Reliable Anticoagulation During Off-Pump Coronary Revascularization. *International Anesthesia Research Society*, 103(3). <https://doi.org/10.1213/01.ane.0000226098.95698.0f>
- Köstering, H., Girndt, J., Matthaei, D., Naidu, R., Quellhorst, E., & Germany, W. (1977). Alterations of clotting factors and platelets during hemofiltration. *Renal Failure*, 1(6), 607–617. <https://doi.org/10.3109/08860227709037656>
- Kretschmer, U. (2006). *Vergleich von Genius-Hämodialyse und kontinuierlicher venovenöser Hämo­filtration bei der Behandlung von Patienten mit akutem Nierenversagen auf der Intensivstation*. [Dissertation. MHH]. <http://www99.mh-hannover.de/einrichtungen/biblio/diss1/diss-kretschmer.pdf>
- Lämmle, B., & Griffin, J. (1985). Formation of the fibrin clot: the balance of procoagulant and inhibitory factors. *Clinics in haematology*, 14(2), 281–342. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2994929/>
- Lange, U., Nowak, G., & Bucha, E. (2003). Ecarin chromogenic assay - A new method for quantitative determination of direct thrombin inhibitors like hirudin. *Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis*, 33(4), 184–191. <https://doi.org/10.1159/000081506>
- Lange, U., Olschewski, A., Nowak, G., & Bucha, E. (2005). Ecarin chromogenic assay: an innovative test for quantitative determination of direct thrombin inhibitors in plasma]. *Hamostaseologie*, 25(3), 293–300. <https://doi.org/10.1267/hämo05030293>
- Larkin, C. M., Santos-Martinez, M.-J., Ryan, T., & Radomski, M. W. (2016). Sepsis-associated thrombocytopenia. *Thrombosis Research*, 141. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2016.02.022>
- Lindhout T. (1994). Biocompatibility of extracorporeal blood treatment. Selection of haemostatic parameters. *Nephrol Dial Transplant*, 9(2), 83–89.
- Lo, J. L., Go, A. S., Chertow, G. M., McCulloch, C. E., Fan, D., Ordóñez, J. D., & Hsu, C. Y. (2009). Dialysis-requiring acute renal failure increases the risk of progressive chronic kidney disease. *Kidney International*, 76(8), 893–899. <https://doi.org/10.1038/ki.2009.289>
- Lopes, J. A., Fernandes, P., Jorge, S., Gonçalves, S., Alvarez, A., Costa e Silva, Z., França, C., & Prata, M. M. (2008). Acute kidney injury in intensive care unit patients: A comparison between the RIFLE and the Acute Kidney Injury Network classifications. *Critical Care*, 12(4). <https://doi.org/10.1186/cc6997>
- Luxembourg, B., Krause, M., & Lindhoff-Last, E. (2007). Basiswissen Gerinnungslabor. *Dtsch Arztebl International*, 104(21), 1489–1497.
- Macedo, E., & Mehta, R. L. (2016). Continuous Dialysis Therapies: Core Curriculum 2016. *American Journal of Kidney Diseases*, 68(4), 645–657. <https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2016.03.427>
- Mangano, C. M., Diamondstone, L. S., Ramsay, J. G., Aggarwal, A., Herskowitz, A., & Mangano, D. T. (1998). Renal Dysfunction after Myocardial Revascularization: Risk Factors, Adverse Outcomes, and Hospital Resource Utilization. *Ann Intern Med*, 194–203. <https://doi.org/10.7326000034819128319980201000005>

- Markwardt, F. (1991). The Comeback of Hirudin as an Antithrombotic Agent. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 17(2).
- Markwardt, F. (1994). The development of Hirudin as a Anticoagulant. *Thrombosis Research*, 74(1).
- Markwardt, F., Nowak, G., & Bucha, E. (1991). Hirudin as anticoagulant in experimental hemodialysis. *Haemostasis*, 21(SUPPL. 1), 149–155. <https://doi.org/10.1159/000216277>
- Mollnes, T. E., Garred, P., & Bergseth, G. (1988). Effect of time, temperature and anticoagulants on in vitro complement activation: Consequences for collection and preservation of samples to be examined for complement activation. *Clin. exp. Immunol*, 73, 484–488.
- Moore, P. K., Hsu, R. K., & Liu, K. D. (2018). Management of Acute Kidney Injury: Core Curriculum 2018. *American Journal of Kidney Diseases*, 72(1), 136–148. <https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2017.11.021>
- Morgera, S. (2005). *Großporige Hämofiltration bei septischen Patienten im akuten Nierenversagen. Habilitationsschrift*. Medizinischen Fakultät der Charité – Humboldt-Universität zu Berlin.
- Müller, A., Huhle, G., Nowack, R., Birck, R., Heene, D., & Van Der Woude, F. (1999). Serious bleeding in a haemodialysis patient treated with recombinant hirudin. *Nephrol Dial Transplant*, 14, 2482–2483.
- Mulvihill, J., Cazenave, J.-P., Mazzucotelli, J.-P., Crost, T., Collier, C., Renaux, J.-L., & Pusineri, C. (1992). Minimodule dialyser for quantitative ex vivo evaluation of membrane haemocompatibility in humans: comparison of acrylonitrile copolymer, cuprophan and polysulphone hollow fibres. *Biomaterials*, 13(8), 527–536. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0142-9612\(92\)90104-V](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0142-9612(92)90104-V)
- Nowak, G. (2003). The ecarin clotting time, a universal method to quantify direct thrombin inhibitors. In *Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis* (Bd. 33, Nummer 4, S. 173–183). <https://doi.org/10.1159/000081505>
- Nowak, G., & Bucha, E. (1996). Quantitative Determination of Hirudin in Blood and Body Fluids. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 22(2).
- Nowak, G., & Koßmehl, M. (2000). *ECT Manual, Personal Communication. Pharmakologische Hämostaseologie, Max-Planck-Arbeitsgruppe an der FSU Jena, 07747 Jena*.
- Palmer, S. C., Rabindranath, K. S., Craig, J. C., Roderick, P. J., Locatelli, F., & Strippoli, G. F. (2012). High-flux versus low-flux membranes for end-stage kidney disease. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD005016.pub2>
- Park, J. B., Kweon, Y. E., Rhee, S. K., & Seo, J. H. (1995). Production of hirudin by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* in a membrane-recycle fermentor. *Biotechnology Letters*, 17(10), 1031–1036. <https://doi.org/10.1007/BF00143095>
- Petros, S. (2008). Lepirudin in the management of patients with heparin-induced thrombocytopenia. In *Biologics: Targets & Therapy* (Bd. 2, Nummer 3).

- Poort, S. R., Rosendaal, F. R., Reitsma, P. H., & Bertina, R. M. (1996). A Common Genetic Variation in the 3'-Untranslated Region of the Prothrombin Gene Is Associated With Elevated Plasma Prothrombin Levels and an Increase in Venous Thrombosis. *Blood*, *88*(10).
- Pöttsch, B., Hund, S., Madlener, K., Unkrig, C., & Muller-Berghaus, G. (1997). Monitoring of recombinant Hirudin: Assessment of a Plasma based Ecarin Clotting Time Assay. *Thrombosis Research*, *86*(5), 373–383.
- Ronco, C., Bellomo, R., & Kellum, J. A. (2007). Anticoagulation Options for Patients with Heparin-Induced Thrombocytopenia Requiring Renal Support in the Intensive Care Unit. In *Contrib Nephrol. Basel, Karger* (Bd. 156).
- Samimagham, H. R., Kheirkhah, S., Haghighi, A., & Najmi, Z. (2011). Acute Kidney Injury in Intensive Care Unit: Incidence, Risk Factors and Mortality Rate. In *Saudi J Kidney Dis Transpl* (Bd. 22, Nummer 3).
- Scharf, R. (2010). Grundlagen der Hämostase: Physiologie, Pathophysiologie und klinisch-praktische Perspektiven. *Anästh Intensivmed*. [https://www.ai-online.info/abstracts/pdf/dacAbstracts/2010/14\\_Scharf.pdf](https://www.ai-online.info/abstracts/pdf/dacAbstracts/2010/14_Scharf.pdf)
- Schetz, M. (2001). Anticoagulation for continuous renal replacement therapy. *Intensive Care*, 143–149. <https://journals.lww.com/co-anesthesiology>
- Schiffl, S., Susanne, M., & Fischer, R. (2002). Daily hemodialysis and the outcome of acute renal failure. *N Engl J Med*, *346*(5). [www.nejm.org](http://www.nejm.org)
- Schmidt, B. (1994). Experimental test systems for the assessment of the blood compatibility of materials used in extracorporeal circuits. *Nephrol Dial Transplant*, *9*(2), 77–82.
- Schneider, T., Heuer B, Deller A, & Boesken WH. (2000). Continuous haemofiltration with r-hirudin (lepirudin) as anticoagulant in a patient with heparin induced thrombocytopenia (HIT II). *Wiener Klinische Wochenschrift*, *112*(12), 552–555.
- Schouten, H. J., Geersing, G. J., Koek, H. L., Zuithoff, N. P. A., Janssen, K. J. M., Douma, R. A., Van Delden, J. J. M., Moons, K. G. M., & Reitsma, J. B. (2013). Diagnostic accuracy of conventional or age adjusted D-dimer cut-off values in older patients with suspected venous thromboembolism: Systematic review and meta-analysis. *BMJ (Online)*, *346*(7910). <https://doi.org/10.1136/bmj.f2492>
- Shah, A., Genoni, M., Niederhäuser, U., Maloigne, M., & Turina, M. (2000). R-hirudin (lepirudin, refludan) as an alternative Anticoagulant in heparin-induced thrombocytopenia during cardiopulmonary bypass connection. *Schweiz Med Wochenschr.*, *130*(23), 896–899.
- Slaughter, T., & Greenberg, C. (1997). Heparin-associated thrombocytopenia and thrombosis implications for perioperative management. *Anesthesiology*, *87*.
- Spannagl, M., & Calatzis, A. (2002). Point-of-Care Analyse des Hämostasesystems. *Laboratoriums Medizin*, *26*(1–2), 68–76. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0477.2002.02015.x>
- Unger, J. K., Haltern, C., Dohmen, B., Gressner, A., Grosse-Siestrup, C., Groneberg, D. A., & Rossaint, R. (2005). Albumin and hydroxyethyl starch 130 kDa/0.4 improve filter clearance and haemocompatibility in haemo- and plasmafiltration - An in vitro

- study. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 20(9), 1922–1931. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfh913>
- Van Bommel, E. F. H., Bouvy, N. D., So, K. L., Zietse, R., Vincent, H. H., Bruining, H. A., & Weimar, W. (1995). Acute dialytic support for the critically ill: Intermittent hemodialysis versus continuous arteriovenous hemodiafiltration. *American Journal of Nephrology*, 15(3), 192–200. <https://doi.org/10.1159/000168832>
- Van Wyk, V., Badenhorst, P. N., Luus, H. G., & Kotzé, H. F. (1995). A comparison between the use of recombinant hirudin and heparin during hemodialysis. *Kidney International*, 48(4), 1338–1343. <https://doi.org/10.1038/ki.1995.419>
- Vanholder, R., Camez, A. A., Veys, N. M., Soria, J., Mirshahi, M., Soria, C., & Ringoir, S. (1994). Recombinant hirudin: A specific thrombin inhibiting anticoagulant for hemodialysis. *Kidney International*, 45(6), 1754–1759. <https://doi.org/10.1038/ki.1994.228>
- Vanholder, R., & Dhondt, A. (1999). Recombinant Hirudin Clinical Pharmacology and Potential Applications in Nephrology. *BioDrugs*, 11(6), 417–429.
- Vanmassenhove, J., Kielstein, J., Jörres, A., & Van Biesen, W. (2017). Intensive care medicine and renal transplantation 1: Management of patients at risk of acute kidney injury. In *www.thelancet.com* (Bd. 389).
- Vargas-Hein, O., Von Heymann, C., Diehl, T., Ziemer, S., Ronco, C., Morgera, S., Siebert, G., Kox, W. J., Neumayer, H. H., & Spies, C. (2004). Intermittent hirudin versus continuous heparin for anticoagulation in continuous renal replacement therapy. *Renal Failure*, 26(3), 297–303. <https://doi.org/10.1081/JDI-120039529>
- Vargas-Hein, O., von Heymann, C., Morgera, S., Konertz, W., Ziemer, S., & Spies, C. (2005). Protracted Bleeding After Hirudin Anticoagulation for Cardiac Surgery in a Patient With HIT II and Chronic Renal Failure. In *Artificial Organs* (Bd. 29, Nummer 6). Blackwell Publishing, Inc.
- Visentin, G. P., & Aster, R. H. (1995). Heparin-induced thrombocytopenia and thrombosis. In *Current opinion in hematology* (Bd. 2, Nummer 5, S. 351–357). <https://doi.org/10.1097/00062752-199502050-00005>
- Wald, R., Quinn, R. R., Luo, J., Li, P., Scales, D. C., Mamdani, M. M., & Ray, J. G. (2009). Chronic dialysis and death among survivors of acute kidney injury requiring dialysis. *JAMA - Journal of the American Medical Association*, 302(11), 1179–1185. <https://doi.org/10.1001/jama.2009.1322>
- Warkentin, T. E. (2010). Agents for the treatment of heparin-induced thrombocytopenia. In *Hematology/Oncology Clinics of North America* (Bd. 24, Nummer 4, S. 755–775). <https://doi.org/10.1016/j.hoc.2010.05.009>
- Warkentin, T. E. (2018). Heparin-Induced-Thrombocytopenia. In *Hematology 7th Ed.* (7. Aufl., S. 1973–1983). Elsevier.
- Warkentin, T. E., Greinacher, A., Koster, A., & Lincoff, A. M. (2008). Treatment and prevention of heparin-induced thrombocytopenia: American College of Chest Physicians evidence-based clinical practice guidelines (8th edition). *Chest*, 133(6 SUPPL. 6), 340S-380S. <https://doi.org/10.1378/chest.08-0677>
- Weinreich, T. (2020). Dialysestandard Version 25-02-2020. *DGfN, Dialysestandard der*

*deutschen Gesellschaft für Nephrologie.*

Wendon, J., Smithies, M., Sheppard, M., Bullen, K., Tinker, J., & Bihari, D. (1989). Intensive Care Medicine Originals Continuous high volume venous-venous haemofiltration in acute renal failure. In *Intensive Care Med* (Bd. 15).

## 7 Erklärung

„Ich, Kadir Yilmaz, versichere an Eid statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Beeinflussen die Antikoagulantien Heparin und Hirudin die Aktivierung des plasmatischen Gerinnungssystems unter kontinuierlicher Nierenersatztherapie“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe. Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte. Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Berlin im November 2021

## **8 Lebenslauf**

Notiz: Aus Gründen des Persönlichkeitsschutzes verzichte ich auf eine Veröffentlichung meines Lebenslaufs in der gedruckten, als auch in der elektronischen Version der vorliegenden Dissertation!

## 9 Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben. Mein Dank gilt Frau Prof. Dr. med. C. Spies, ML. Direktorin der Klinik für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin der Charité-Universitätsmedizin Berlin, für die freundliche Überlassung des Themas.

Frau Dr. Mreike Körber, Klinik für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin der Charité-Universitätsmedizin Berlin, danke ich für die Betreuung dieser Arbeit. Frau PD Dr. Ortrud Vargas-Hein und Herrn Prof. Dr. Christian von Heymann, Klinik für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin der Charité- Universitätsmedizin Berlin, danke ich für die initiale praktische Betreuung der Studie.

Allen unmittelbar Beteiligten Mitarbeitern der Klinik für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin, der Labormedizin und des Instituts für Statistik der Charité-Universitätsmedizin Berlin, Campus Mitte danke ich für die fachlichen Diskussionen zur Befundinterpretation.

Abschließend möchte ich mich bei meiner geliebten Familie für Ihre uneingeschränkte Unterstützung bedanken. Ich widme diese Dissertation meinem Vater, meiner Mutter, meiner Schwester und Ihren Kindern.