

Medizinische Fakultät
der
Universität Duisburg-Essen

Aus der Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin

Nachweis von unfraktioniertem und niedermolekularem Heparin mittels
rotationsthrombelastometrischer Variablen der Blutgerinnung

I n a u g u r a l d i s s e r t a t i o n
zur
Erlangung des Doktorgrades der Medizin
durch die Medizinische Fakultät
der Universität Duisburg-Essen

Vorgelegt von
Matthias Werner Gisevius
aus Bochum
2024

DuEPublico

Duisburg-Essen Publications online

UNIVERSITÄT
DUISBURG
ESSEN

Offen im Denken

ub | universitäts
bibliothek

Diese Dissertation wird via DuEPublico, dem Dokumenten- und Publikationsserver der Universität Duisburg-Essen, zur Verfügung gestellt und liegt auch als Print-Version vor.

DOI: 10.17185/duepublico/82527

URN: urn:nbn:de:hbz:465-20241204-110803-2

Alle Rechte vorbehalten.

Dekan: Herr Univ.-Prof. Dr. med. J. Buer
1. Gutachter: Herr Prof. Dr. med. D. Dirkmann
2. Gutachter: Herr Priv. -Doz. Dr. med. M. Eikermann M.D.

Tag der mündlichen Prüfung: 14. Oktober 2024

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG.....	5
1.1	Einleitung	5
1.2	Gerinnungsphysiologische Grundlagen	7
1.3	Effekte von Heparinen auf die Hämostase	10
1.4	Messmethoden für die Abschätzung der Heparinwirkung.....	12
1.5	Fragestellungen der Arbeit	16
2	MATERIAL UND METHODEN	17
2.1	Studiendesign	18
2.2	Probanden.....	18
2.3	Probengewinnung.....	18
2.4	Messverfahren	19
2.4.1	Rotationsthrombelastometrie (ROTEM®).....	19
2.4.2	Bestimmung der Anti-Xa-Aktivität.....	22
2.5	Untersuchungsprotokoll	23
2.6	Statistik.....	24
3	ERGEBNISSE	25
3.1	Einfluss von unfraktioniertem Heparin auf die rotationsthrombelastometrisch gemessene Clotting Time (CT) in INTEM®- und HEPTEM®-Assays und die Anti-Xa- Aktivität.....	25
3.1.1	Konzentrationsabhängiger Effekt von UFH auf die CT in INTEM®-Assays	25
3.1.2	Konzentrationsabhängiger Effekt von UFH auf die CT in HEPTEM®-Assays.....	28
3.1.3	Konzentrationsabhängiger Effekt von UFH auf die $CT_{INTEM®}/CT_{HEPTEM®}$ -Ratios..	30
3.1.4	Konzentrationsabhängiger Effekt von UFH auf die Anti Xa-Aktivität	32

3.1.5	Übersicht UFH CT _{INTEM®} /CT _{HEPTEM®} -Ratios und Anti-Xa-Aktivität.....	34
3.1.6	Ergebnisse der ROC-Analyse zur Vorhersage des Vorhandenseins von UFH (>0,1 IE/ml) anhand der CT _{INTEM®} /CT _{HEPTEM®} -Ratios.....	35
3.2	Einfluss des niedermolekularen Heparins Enoxaparin auf die rotationsthrombelastometrisch gemessene Clotting Time (CT) in INTEM®, HEPTEM®, NATEM®- und NA-HEPTEM-Assays.....	40
3.2.1	Konzentrationsabhängiger Effekt von NMH auf die CT in INTEM®-Assays.....	41
3.2.2	Konzentrationsabhängiger Effekt von NMH auf die CT in HEPTEM®-Assays	43
3.2.3	Konzentrationsabhängiger Effekt von NMH auf die CT _{INTEM®} /CT _{HEPTEM®} -Ratios	45
3.2.4	Konzentrationsabhängiger Effekt von NMH auf die Anti Xa- Aktivität	47
3.2.5	Übersicht NMH CT _{INTEM®} /CT _{HEPTEM®} -Ratios und Anti-Xa-Aktivität	49
3.2.6	Ergebnisse der ROC-Analyse zur Vorhersage des Vorhandenseins von NMH (>0,1 IE/ml) anhand der CT _{INTEM®} /CT _{HEPTEM®} -Ratios.....	50
3.2.7	Konzentrationsabhängiger Effekt von NMH auf die CT in NATEM®-Assays	55
3.2.8	Konzentrationsabhängiger Effekt von NMH auf die CT in NA-HEPTEM-Assays	57
3.2.9	Konzentrationsabhängiger Effekt von NMH auf die CT _{NATEM®} /CT _{NA-HEPTEM} -Ratios.	59
3.2.10	Konzentrationsabhängiger Effekt von NMH auf die Anti Xa-Aktivität	61
3.2.11	Übersicht NMH CT _{NATEM®} /CT _{NA-HEPTEM} -Ratio und Anti-Xa-Aktivität	63
3.2.12	Ergebnisse der ROC-Analyse zur Vorhersage des Vorhandenseins von NMH (>0,1 IE/ml) anhand der CT _{NATEM®} /CT _{NA-HEPTEM} -Ratios	64
4	DISKUSSION	69
5	ZUSAMMENFASSUNG	78
6	LITERATURVERZEICHNIS	80
7	ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS.....	89
8	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	93
9	DANKSAGUNG	94
10	LEBENS LAUF	95

1 EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG

1.1 Einleitung

Heparine sind körpereigene Polysaccharide, die in Mastzellen gebildet werden. Durch Antithrombin-vermittelte und -unabhängige Mechanismen üben die unterschiedlich großen Moleküle differenzierten Einfluss auf die Hämostase aus (Baluwala et al., 2017; Howell and Holt, 1918). Klinisch werden sie heutzutage zur Hemmung der Blutgerinnung (Antikoagulation) in unterschiedlichen Indikationen eingesetzt (Hao et al., 2019). Die gerinnungshemmenden Eigenschaften der Heparine senkt die Inzidenz für das Auftreten von Thrombosen (Murray et al., 1936), weshalb es zur Prophylaxe und Therapie von Venenthrombosen und Lungenembolien eingesetzt wird (AWMF, 2015; Crafoord et al., 1947). Ferner werden sie bei der Behandlung des akuten Koronarsyndroms (Carleton et al., 1960; Collet et al., 2021) und als Prophylaxe bei Vorhofflimmern verwendet (DGK, 2020; Hirsh et al., 2001; Sterne et al., 2017). Oftmals erfolgt mithilfe von Heparin die Durchführung vieler moderner Organersatzverfahren, wie der Dialyse bei chronischer Niereninsuffizienz, bei Operationen unter Verwendung einer Herz-Lungen-Maschine (HLM), oder bei Herz- und Lungenersatzverfahren, den sogenannten Extracorporeal-Life-Support-Systemen (ECLS) (Cronin and Reilly, 2010). Ihrem klinischen Nutzen steht eine dosisabhängige Steigerung der Inzidenz von Blutungskomplikationen gegenüber (Robertson and Jones, 2017).

Erstmals wurden Heparine im Jahr 1916 von Jay McLean entdeckt, der ein fettlösliches Phosphatid aus der Hundeleber extrahierte, das nachfolgend als Heparin benannt wurde (McLean, 1959). Strukturell handelt es sich bei den Heparinen um Polysaccharide (=Glykosaminoglykane), die abhängig von ihrem Extraktionsort ein Gemisch aus Heparinen unterschiedlicher Kettenlängen aufweisen (Gray et al., 2008). Durch Aufbereitung lassen sich aus diesem Gemisch, dem sog. unfraktioniertem Heparin (UFH; durchschnittliches Molekulargewicht 15 kDa) auch die Heparine mit geringem Molekulargewicht extrahieren. Diese, als niedermolekulare Heparine (NMH) bezeichneten, enthalten nur noch Heparine, die mindestens 60% unter einem

Molekulargewicht von 8 kDa liegen (z.B. Enoxaparin 4,5 kDa) (Barrowcliffe, 2012; Chen et al., 2018).

Der Wirkmechanismus der Heparine basiert letztlich auf einer Potenzierung der durch Antithrombin III (AT III, im weiteren als Antithrombin (AT) bezeichnet) vermittelten Hemmung von Thrombin (Faktor IIa) und Faktor Xa (Tanguay and Seguin, 2022). Heparine können subkutan oder intravenös appliziert werden. UFH haben eine geringe Halbwertszeit (HWZ) von 30-60 min, wodurch sich ihre Wirkung sehr gut steuern lässt. Der schnelle Abbau erfolgt dabei vor allem über Makrophagen, Endothelzellen der Gefäßwand und retikuloendotheliale Zellen (Leentjens et al., 2017). NMH haben im direkten Vergleich mit UFH eine längere HWZ von 4,5 Stunden (Enoxaparin) mit entsprechend verlängerter antikoagulatorischer Wirkung, wodurch eine kontinuierliche Gabe nicht erforderlich ist (Lim et al., 2006). Gerade NMH bergen die Gefahr einer systemischen Akkumulation bei Niereninsuffizienz, wodurch das Blutungsrisiko steigt (Lim et al., 2006; Wang et al., 2022). Einerseits bieten NMH also den klinischen Vorteil einer verlängerten und im Regelfall zuverlässig ohne Monitoring einsetzbaren Wirkung. Andererseits gibt es klinische Einflussfaktoren wie eine Niereninsuffizienz, Adipositas, hohes Alter und kritische Erkrankungen, wodurch die gerinnungshemmende Wirkung von NMH deutlich schlechter steuerbar ist als die von UFH (Leung and MacRae, 2019). Eine mögliche, wenngleich äußerst seltene Nebenwirkung von Heparinen besteht darüber hinaus in der Ausbildung einer sog. Heparin-induzierten Thrombozytopenie (HIT) Typ II. Hierbei kommt es zu einer Antikörperbildung gegen den Heparin-Plättchen Faktor 4 (PF 4) -Komplex, wodurch vor allem Thrombosen entstehen können (Greinacher, 2015; Walenga et al., 2005).

Um Blutungskomplikationen bei Überdosierung, oder Thrombosegefahr bei Unterdosierung von Heparinen zu minimieren kann die antikoagulatorische Wirkung mittels verschiedener Labortests, wie z.B. der aktivierten partiellen Thromboplastinzeit (aPTT), der Thrombinzeit (TZ), der Anti-Xa-Aktivität oder bettseitig verfügbaren sog. Point-of-Care-Testing (POCT) (wie z.B. dem viskoelastischen Verfahren der Rotationsthrombelastometrie (ROTEM®) und der Activated Clotting Time (ACT)) gemessen werden.

1.2 Gerinnungsphysiologische Grundlagen

Die Hämostase wird üblicherweise in die Phasen der primären (thrombozytäre) und sekundären (plasmatische) Hämostase unterteilt.

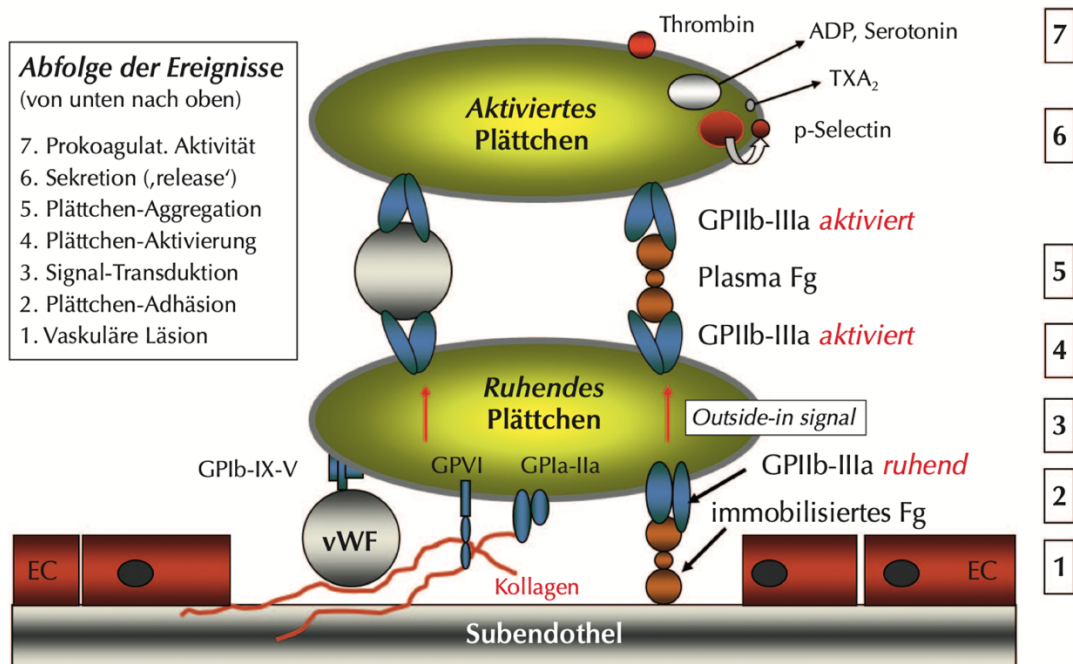


Abbildung 1: Ablauf der primären Hämostase

Nach Verletzung einer Gefäßwand erfolgt eine Bindung des vWF an subendotheliale Kollagenfibrillen mit anschließender Adhäsion, Aktivierung und Aggregation von Thrombozyten (Klippe et al., 2014).

Die primäre oder zelluläre Hämostase beschreibt die initiale Bildung eines primären, thrombozytären Blutgerinnsels, in Folge einer Gefäßverletzung. In Folge dieser, kommt es zunächst zu einer u.a. durch Prostaglandine vermittelten Vasokonstriktion. Der im Blutplasma zirkulierende von Willebrand Faktor (vWF) bindet nach einer Konformationsänderung über die A3-Domäne an die verletzungsbedingt freiliegenden Kollagenfibrillen der subendothelialen Matrix (Klippe et al., 2014; Lankhof et al., 1996). Nachfolgend kommt es zu einer vWF vermittelten Thrombozytenadhäsion über den Glykoprotein-Ib-IX-V-Komplex. Die anschließende Aktivierung von Thrombozyten ist gekennzeichnet durch eine Anlagerung von Kollagen an Thrombozyten, vor allem über den GPVI-Rezeptor. Hierrüber kommt es zu einer Ausschüttung von ADP, Serotonin und Thromboxan A₂ (TXA₂). Durch die ausgeschütteten Mediatoren kommt es zu einer Aktivierung weiterer Thrombozyten (i.S. einer positiven Rückkopplung) mit anschließender Anlagerung und Aggregation von Thrombozyten über Fibrinogen an den

Glykoprotein IIb-IIIa-Rezeptoren (Abbildung 1) (Broos et al., 2011; Colvin, 2004; Onishi et al., 2016).

Bei der sogenannten sekundären Hämostase erfolgt eine Kaskadenartig ablaufende und verstärkende Thrombin-Bildung über die gemeinsame Endstrecke von Faktor Xa und Faktor Va die in einer Fibrinpolymerisation mündet (Klippe et al., 2014).

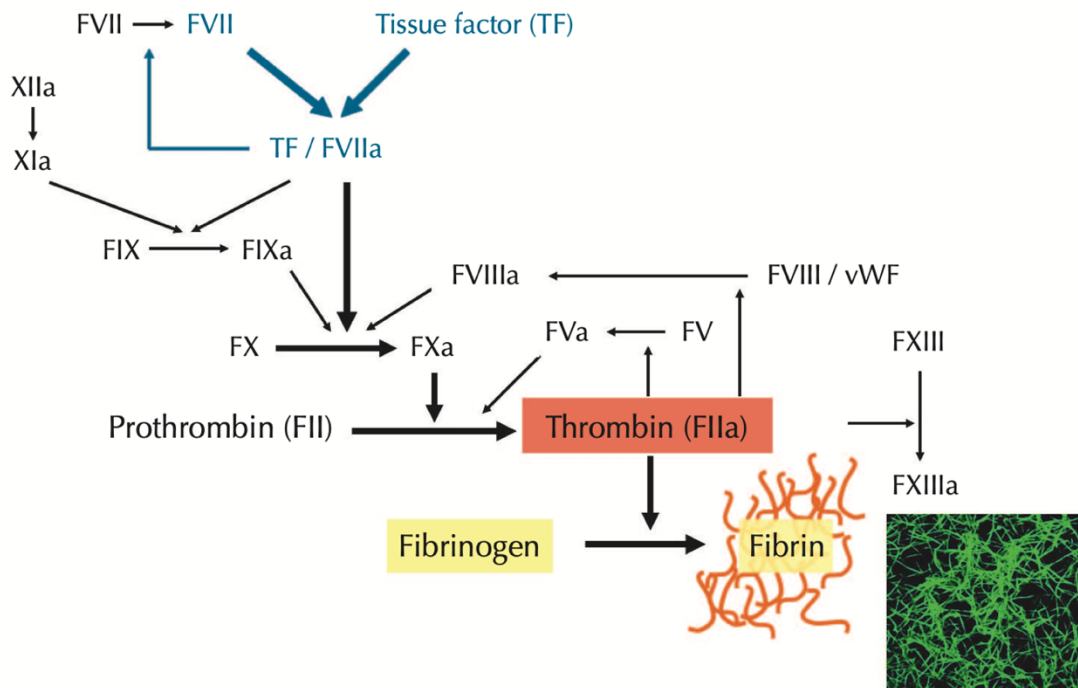


Abbildung 2: Ablauf der sekundären Hämostase

Die intrinsische (über Aktivierung von Faktor XII durch das Endothel) und extrinsische (über die Bindung von Faktor VII an den vom Endothel freigesetzten Tissue factor) Gerinnungskaskade mündet in einer gemeinsamen Endstrecke. Über den Faktor IIa wird Fibrinogen zu Fibrin und in Anwesenheit von Faktor XIIIa zum stabilen quervernetzten Fibrinthrombus (Klippe et al., 2014).

Die plasmatische Gerinnung wird historisch bedingt in eine sog. extrinsische und eine intrinsische Gerinnungskaskade unterteilt, die in eine gemeinsame Endstrecke münden. Während heutzutage vornehmlich das zellbasierte Modell der Hämostase, das mit Initiation, Amplifikation, Propagationsphase, ein weitaus umfassenderes Bild der vielschichtigen Prozesse der Hämostase zeichnet, wird das historische Kaskadenmodell, vornehmlich aus didaktischen Gründen weiterhin herangezogen.

Dem Kaskadenmodell zur Folge, kommt es in der extrinsischen Kaskade nach einer Endothelschädigung zum Kontakt von Gewebefaktor (Tissue Factor (TF); Faktor III) -

exprimierenden Zellen mit dem zirkulierenden Blut. Der TF aktiviert den im Blut zirkulierenden Faktor VII. Es kommt zu einer Komplexbildung von Faktor III, VIIa, Calcium und Phospholipiden, der als sog. extrinsischer Tenase-Komplex bezeichnet wird. In der gemeinsamen Endstrecke der Gerinnungskaskade wird Faktor X aktiviert.

Bei der intrinsischen Kaskade erfolgt eine Kontaktphasenaktivierung über Kininogen und Kalikrein mit Aktivierung von Faktor XII. Faktor XIIa aktiviert nun Faktor XI, der wiederum Faktor IX aktiviert. Faktor IXa und Faktor VIIIa bilden über Calcium und Phospholipide den sog. intrinsischen Tenase-Komplex, der ebenfalls in der gemeinsamen Gerinnungsendstrecke mündet. Es erfolgt eine Aktivierung von Faktor X zu Xa, der wiederum Faktor II (Prothrombin) zu Faktor IIa (Thrombin) aktiviert. Der Faktor IIa spaltet Fibrinogen in Fibrin. In zusätzlicher Anwesenheit von Faktor XIII/XIIIa kommt es zur Quervernetzung des Fibrins (Abbildung 2).

Mittlerweile konnte gezeigt werden, dass die Hämostase vielmehr auf den entsprechenden Zellen stattfindet (v.a. Thrombozyten und Endothelzellen), weshalb vom zellbasierten Modell der Hämostase gesprochen wird, dass wiederum den in vivo Ablauf besser beschreibt. In der Initiationsphase führt eine Verletzung des Endothels zur Freilegung des in der subendothelialen Matrix liegenden TF und von Kollagen mit Anlagerung von Thrombozyten und Faktor VII. Durch den TF-VIIa Komplex wird Faktor IX und X aktiviert. Der intrinsische Tenase Komplex (Faktor IXa und VIIIa) aktiviert ebenfalls Faktor X. Durch den Prothrombinase-Komplex (Faktor Xa, Calcium und Faktor Va) wird Thrombin generiert. In der nachfolgenden Amplifikation werden durch Thrombin zahlreiche weitere Prozesse aktiviert. So kommt es zu einer weiteren Aktivierung von Thrombozyten und der Faktoren V, VIII und XI, wodurch wiederum große Mengen von Thrombin („Thrombin burst“) generiert werden. In der Propagationsphase erfolgt schließlich über Thrombin die Umwandlung von Fibrinogen in Fibrinmonomere. Thrombin aktiviert zusätzlich Faktor XIII, der die Fibrinmonomere in quervernetzte Fibrinpolymere umwandelt und somit das Gerinnsel stabilisiert (Hoffman and Monroe, 2001).

1.3 Effekte von Heparinen auf die Hämostase

Physiologisch wird den Heparinen inzwischen eine maßgebliche Rolle in der endogenen Regulation von Gerinnungsprozessen zugeschrieben (Lee et al. 2015). Der Mechanismus beruht auf einer Verstärkung der Wirkung von AT (neben anderen Serin-Protease-Inhibitoren), wodurch die Faktoren Xa und IIa gehemmt werden (Baluwala et al., 2017). Für die Aktivierung von AT ist eine Pentasaccharidsequenz (Abbildung 3) im Heparin erforderlich (Hao et al., 2019).

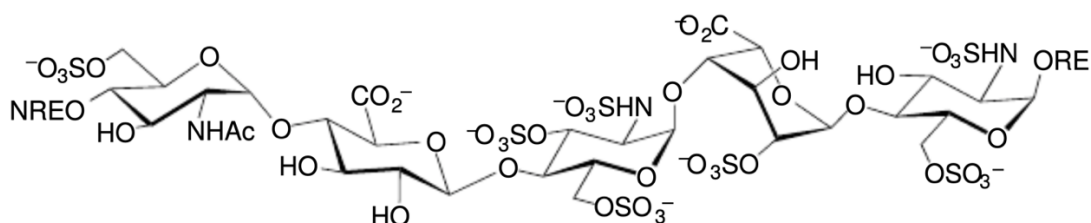


Abbildung 3: Darstellung eines Heparinmoleküls

Die Pentasaccharidsequenz ermöglicht die Bindung von AT, über das die antikoagulatorische Wirkung entfaltet wird (Capila and Linhardt, 2002).

Bei der Injektion von UFH bindet nur etwa ein Drittel der applizierten Menge an AT (Casu et al., 1981). Der Komplex aus Heparin und AT erhöht die antikoagulatorische Wirkung von AT um das 1.000-fache (Baluwala et al., 2017). Es kommt zu einer Konformationsänderung des AT, wodurch es an Faktor IIa, Xa, IXa, XIa und Kallikrein binden kann. Die Inhibition von Faktor IIa bedarf einer Heparinkettenlänge von mindestens 18 Saccharidsequenzen. Über eine Komplexbildung von Heparin mit AT (Abbildung 4) und Faktor IIa wird Faktor IIa inhibiert (Krishnaswamy et al., 2010). Aufgrund der verkürzten Polysaccharidlänge, und weiter vorhandener Pentasaccharidsequenz (Chen et al., 2018), können NMH vor allem den Faktor Xa hemmen (Tanguay and Seguin, 2022). Zusätzlich kann Heparin auch andere Serin-Protease-Inhibitoren aktivieren. Hierzu zählen der Heparin-Kofaktor-II, der Protein-C-Inhibitor und der TF-Plasminogen-Inhibitor (Abbildung 5) (Gray et al., 2012). Darüber hinaus kann Heparin an den vWF binden, wodurch es zu einer Einschränkung der Thrombozytenfunktion kommt (Hirsh et al., 2001).

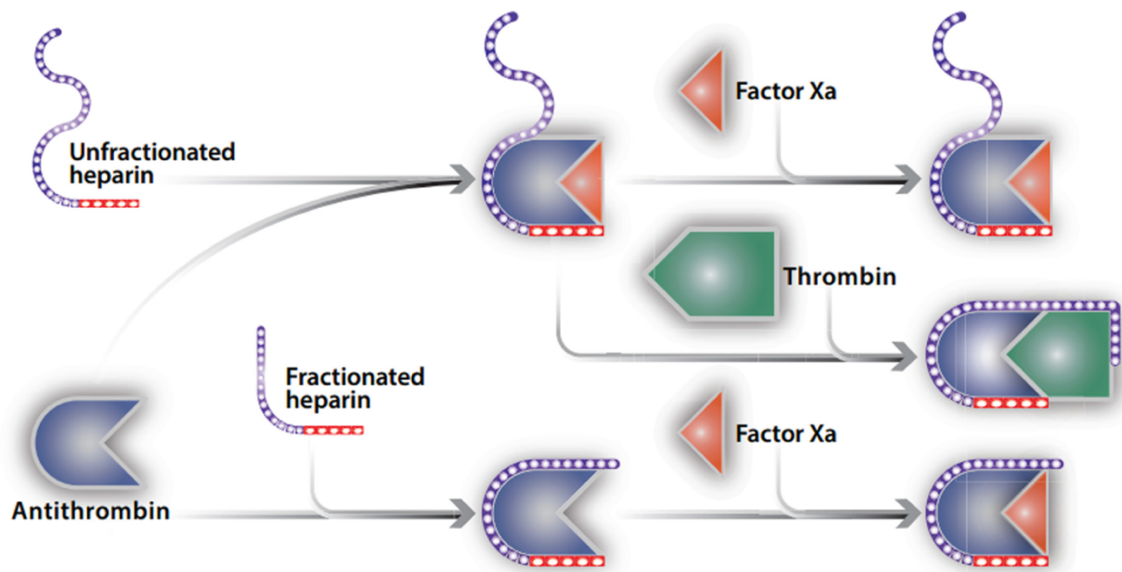


Abbildung 4: Bindung von UFH und NMH an AT
 UFH kann nach Bindung an AT sowohl Faktor Xa und IIa inhibieren. NMH kann aufgrund der verkürzten Kettenlänge überwiegend Faktor Xa inhibieren (Tanguay and Seguin, 2022).

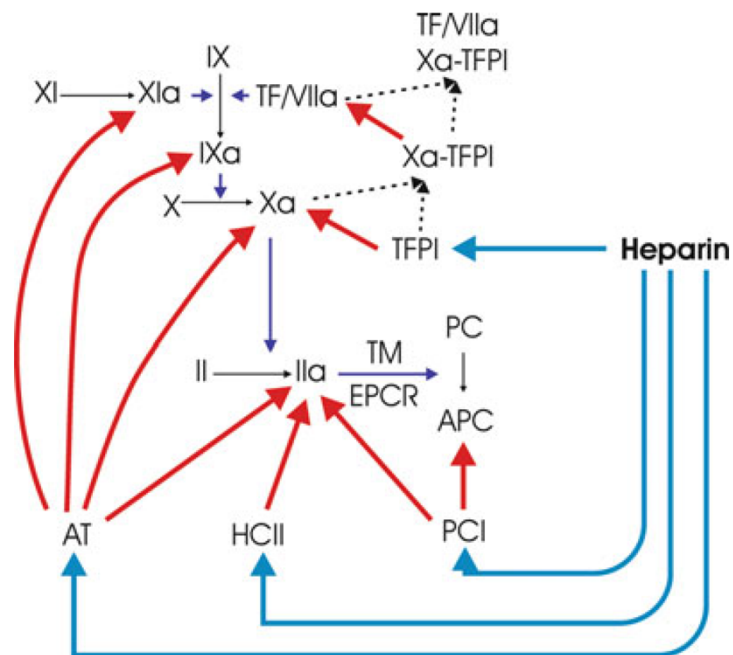


Abbildung 5: Einfluss von Heparin auf die sekundäre Hämostase
 Heparin bindet an AT, den Heparin-Kofaktor-II (HCII), den Protein-C-Inhibitor (PCI) sowie den Tissue-Factor-Plasminogen-Inhibitor (TFPI) und hat hierdurch die Möglichkeit, über verschiedene Faktoren auf die sekundäre Hämostase einzuwirken (Gray et al., 2012).

1.4 Messmethoden für die Abschätzung der Heparinwirkung

Messverfahren zur Abschätzung der antikoagulatorischen Wirkung von Heparinen sind essenziell, um eine adäquate Dosierung, je nach Indikation (z.B. Thromboembolieprophylaxe; therapeutische Antikoagulation bei mechanischen Herzklappen, der Dialyse etc.) zu gewährleisten. Eine Unterdosierung kann unzureichend die Entstehung von Thrombosen verhindern, während eine Überdosierung mit einer erhöhten Rate an Blutungskomplikationen vergesellschaftet ist. Für die Abschätzung der Wirkung von Heparinen (Monitoring) existieren sowohl Labor als auch POCT-basierte Methoden. Für UFH können die aPTT, die TZ, die Anti-Xa-Aktivität, die ACT und die ROTEM®-Analyse verwendet werden. Obwohl NMH im Gegensatz zu UFH im klinischen Alltag häufiger eingesetzt werden, fehlt für sie bislang ein rasch verfügbares Verfahren zur Detektion und Quantifizierung der Wirkung. Diese kann für NMH bisher nur anhand der Anti-Xa-Aktivität abgeschätzt werden (Newall, 2013; Ng et al., 2018). NMH haben keinen Einfluss auf die ACT (Linkins et al., 2002) oder die aPTT (Kelecyc et al., 2018).

Bei der aPTT erfolgt die Messung der Zeit bis zur Bildung eines Gerinnsels nach Kontaktaktivierung. Der Normalwert ist dabei je nach verwendetem Gerät und Assay/Kontaktaktivator (Ellagsäure, Silica, Kaolin) unterschiedlich, wird aber je nach Literatur mit 25-34 Sekunden angegeben (Liu et al., 2022). Der therapeutische Wirkungsbereich von UFH liegt bei einer etwa 1,5- bis 2,5-fachen Verlängerung der aPTT im Vergleich zum Normalwert (Hirsh and Raschke, 2004) bzw. einer aPTT im Bereich von 45-60 Sekunden (van Roessel et al., 2014). Die Thrombinzeit (Normbereich 16-21 Sekunden) stellt ebenfalls die Dauer dar, die es zu einer Blutgerinnung bedarf, nachdem dem Blutplasma Thrombin hinzugegeben wurde (Undas, 2017). Die TZ ist sowohl durch UFH als auch NMH verlängert, dennoch gibt es keine Empfehlung für die Steuerung der Therapie mit ihr (Bonar et al., 2012).

Bei der Messung der Anti-Xa-Aktivität wird mithilfe eines chromogenen Substrats die Konzentration der durch Heparin inhibierten Faktor Xa-Aktivität gemessen und in IE/ml angegeben (Gehrie and Laposata, 2012). Ein therapeutischer Bereich von UFH liegt bei einer Anti-Xa-Aktivität von 0,3-0,7 IU/ml vor (Hirsh and Raschke, 2004; van Roessel et al., 2014). Der zur Thromboembolieprophylaxe empfohlene Wirkungsbereich von NMH wird

mit einer Anti-Xa-Aktivität von 0,2-0,4 IU/ml (Hamilton et al., 2021) und der therapeutische Wirkungsbereich mit einer Anti-Xa-Aktivität von 0,4-1,0 IU/ml angegeben (Damgen-von Brevern et al., 2005).

Die Bestimmung der aPTT weist eine gewisse Messgenauigkeit auf, sodass die TZ im Vergleich mit der aPTT sensitiver für den Nachweis von UFH sein kann (Apipongrat et al., 2022). Obwohl eine therapeutische Dosierung von UFH vorliegt, kann eine normale oder verminderte aPTT vorliegen. Je nach eingesetzten Testreagenzien, dem angewendeten UFH (aus Schweinen oder Rindern extrahiert), der Konzentration des UFH oder durch Vorerkrankungen bzw. unterschiedlichen Konzentrationen von endogenen Gerinnungsfaktoren eines Patienten kann die aPTT beeinflusst werden (Arachchillage et al., 2017). Durch diese Störeinflüsse wird eine Korrelation mit der Anti-Xa-Aktivität nahegelegt und bei Kindern unter 12 Jahren sogar ausschließlich die Messung der Anti-Xa-Aktivität empfohlen (Marlar et al., 2017). Rezente Leitlinien empfehlen daher eine UFH-Steuerung an ECLS inzwischen nicht mehr anhand der aPTT, sondern mittels der Anti-Xa-Aktivität (Helms et al., 2023).

Für UFH gibt es zusätzlich noch rasch verfügbare und validierte POCT-basierte Monitoringverfahren, die gerade bei der Dialyse, bei Herzoperationen, dem Einsatz von ECLS und der akuten Therapie von Thrombosen und Embolien eingesetzt werden. Hier haben sich vor allem die ACT (Horton and Augustin, 2013) sowie die Rotationsthrombelastometrie (ROTEM®) durchgesetzt. Bei der ACT handelt es sich um die Zeit bis zur Gerinnselbildung nach Oberflächenaktivierung z.B. mit Kaolin (Arachchillage et al., 2017). Der Hauptnachteil der ACT liegt aber in der unspezifischen Messung und der enormen Varianz in Abhängigkeit vom verwendeten Messverfahren (Dirkmann et al., 2019). Gerade in Blutungssituationen und bei der Anwendung in der Herzchirurgie existieren mit z.B. Hämodilution, Fibrinogenmangel oder Protaminüberdosierung zahlreiche Einflussfaktoren, sodass ein sicherer Rückschluss auf die vorliegende Heparinkonzentration nicht immer möglich ist.

Bei der Rotationsthrombelastometrie (ROTEM®, (TEM® Innovation GmbH München)) handelt es sich um ein viskoelastisches Testverfahren zur Untersuchung der Hämostase, welches eine Weiterentwicklung der 1948 von Hartert entwickelten

Rotations thrombelastographie (ROTEG) darstellt (Hartert, 1948). Das ursprünglich entwickelte Verfahren wurde nach Modifikation u.a. zu den klinisch anwendbaren TEG (Haemonetics, Braintree, USA) und ROTEM® (TEM Innovation GmbH München, Deutschland) Hämostase-Analysesystemen weiterentwickelt. Beide Systeme ermöglichen eine bettseitige Bestimmung von verschiedenen Gerinnungsvariablen, wodurch bei Blutungskomplikationen eine zielgerichtete Blut- und Gerinnungstherapie erfolgen kann. Viskoelastische Messverfahren bieten darüber hinaus die Möglichkeit, eine UFH-Wirkung spezifisch zu detektieren und deren Konzentrationsbereich anzuzeigen (Mittermayr et al., 2005; Mittermayr et al., 2009). Dies ist insbesondere perioperativ, z. B. bei herzchirurgischen Eingriffen essenziell, da im Falle einer Blutungsneigung eine Heparinrestwirkung nach unzureichender Antagonisierung mittels Protamin ausgeschlossen werden muss. Andere Verfahren, wie z. B. die ACT sind hingegen nicht in der Lage, zwischen einer Heparinwirkung und Koagulopathien (im Sinne von Mangelzuständen einzelner Gerinnungsfaktoren) zu differenzieren. Gleichzeitig muss eine Überdosierung von Protamin als Heparin-Antidot unbedingt vermieden werden, weil freies Protamin eine antikoagulatorische Wirkung über eine Thrombozytenaggregationshemmung, Inhibition der Aktivierung von Gerinnungsfaktoren wie Faktor V sowie eine verstärkte Fibrinolyse aufweist (Boer et al., 2018).

Für die perioperative Anwendung ist die Bestimmung der Anti-Xa-Aktivität z.B. vor einer Katheteranlage bei einer rückenmarksnahen Regionalanästhesie wichtig, um Blutungskomplikationen zu minimieren. Gerade wenn eine Niereninsuffizienz bekannt ist, wird die Messung der Anti-Xa-Aktivität empfohlen (DGAI, 2014; Kietaihl et al., 2022), aber auch bei intakter Nierenfunktion liegt noch bei bis zu 18% der Patienten nach 24 Stunden ein relevanter NMH-Effekt vor (Knoerlein et al., 2023), sodass die Detektion einer möglichen Restaktivität in manchen Situationen sinnvoll erscheint.

Das Fehlen eines jederzeit und rasch verfügbaren sowie zuverlässigen Monitoringverfahrens für NMH kann das Blutungsrisiko bei Patienten im Falle einer NMH-Überdosierung erhöhen, andererseits eine thrombotische Komplikation bei unzureichender NMH-Therapie begünstigen. Für erstere Patientengruppe kommt hinzu,

dass eine Antagonisierung von NMH zwar partiell mit Protamin möglich ist und auch empfohlen wird (Kozek-Langenecker et al., 2017), andererseits aber mit teils lebensbedrohlichen Komplikationen wie einer Anaphylaxie, Vasoplegie, pulmonalarterieller Hypertonie oder verstärkter Blutungsneigung bei Überdosierung vergesellschaftet sein kann (Boer et al., 2018). Eine Protamintherapie bei lediglich vermuteter Heparinwirkung kann dementsprechend den Patienten in höchstem Maße gefährden. Für die zweite Patientengruppe ist es zudem höchst problematisch, dass eine suffiziente Antikoagulation zwar unabdingbar bei einer Lungenembolie oder Gefäßverschlüssen ist, aber gerade bei kritisch kranken Patienten nicht immer unter den Standarddosierungen erreicht wird. Die vorliegende Arbeit versucht unter anderem diese diagnostische Lücke zu schließen und so eine Möglichkeit zu eröffnen, wie die Versorgung dieser Patienten verbessert werden könnte.

1.5 Fragestellungen der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es zu evaluieren, inwiefern die Rotationsthrombelastometrie dafür geeignet ist, verschiedene Plasmakonzentrationen (kein Substanznachweis vs. prophylaktischer vs. therapeutischer Bereich) von UFH und NMH zu detektieren. Für UFH besteht bisher zwar die Möglichkeit, mithilfe der Rotationsthrombelastometrie eine Wirkung zu detektieren, eine Plasmakonzentration kann aber bislang nicht genau aus den erhobenen Messwerten abgeleitet werden. Die Detektion und Quantifizierung einer NMH-Wirkung konnte bisher nicht hinreichend mit der Rotationsthrombelastometrie validiert werden (Ölander and Schött, 2021). Bislang sind demnach lediglich die Bestimmung einer aPTT bzw. der Anti-Xa-Aktivität zum Monitoring gebräuchlich, welche aber von einem Labor abhängig und hierdurch zeitaufwendig sind. Im klinischen Alltag sind zeitnahe Bestimmungen der Anti-Xa-Aktivität häufig gar nicht möglich. Insbesondere in dynamischen Blutungssituationen ist der Zeitverzug, der aus der Bestimmung von bestimmten Gerinnungsvariablen in einem Zentrallabor resultiert, (Davenport et al., 2011; Toulon et al., 2009) teilweise erheblich und führt dazu, dass die erhaltenen Ergebnisse nahezu unbrauchbar für klinische Entscheidungen oder gar eine Therapiesteuerung sind. Der Einsatz von POCT kann die Patientensicherheit durch zeitnah verfügbare Ergebnisse erhöhen. Die Wirkung von UFH ist bisher bettseitig mithilfe der ACT abschätzbar. Für NMH gibt es bisher kein bettseitig verfügbares Messverfahren, das schnell die Wirkung detektieren kann. Ferner kann eine NMH-Wirkung nicht mit der ACT detektiert werden. Es sollte überprüft werden, ob die Rotationsthrombelastometrie eine diagnostische Alternative zu den klassischen Labormessungen und der ACT-Bestimmung für die Abschätzung der Wirkung von Heparinen darstellt. Gerade für NMH, welche abgesehen von einer aufwändigen Bestimmung der Anti-Xa-Aktivität einem Monitoring nahezu unzugänglich sind, sollte eine bettseitige Detektion und Quantifizierung mittels viskoelastischer Messverfahren überprüft werden. Zur weiteren Differenzierung erfolgten spezifische ROTEM®-Messungen sowie eine Bestimmung der Anti-Xa-Aktivität im Labor.

2 MATERIAL UND METHODEN

Um die Effekte von Heparinen (UFH und NMH) im Vollblut auf verschiedene Variablen der ROTEM® zu bestimmen wurden zwei unterschiedliche Testreihen durchgeführt.

In der ersten Testreihe wurden unterschiedliche Konzentrationen von UFH im Vollblut mit jeweils verschiedenen ROTEM®-Assays (INTEM®- und HEPTEM®-Assay) analysiert und hieraus die entsprechende Gerinnungszeit (CT) bestimmt. Nach Durchführung der rotationsthrombelastometrischen Messungen erfolgte die unmittelbare Zentrifugation der restlichen Blutprobe und der Plasmaüberstand wurde bei -80°C eingefroren. Zu einem späteren Zeitpunkt erfolgte die Bestimmung der Anti-Xa-Aktivität im Zentrallabor des Universitätsklinikum Essen.

In der zweiten Testreihe wurden unterschiedliche Konzentrationen von NMH im Vollblut mit verschiedenen ROTEM®-Assays (INTEM®, HEPTEM®, NATEM®- und NA-HEPTEM Assay) analysiert und die jeweilige CT bestimmt. Nach Durchführung der rotationsthrombelastometrischen Messungen erfolgte die unmittelbare Zentrifugation der restlichen Blutprobe und der Plasmaüberstand wurde bei -80°C eingefroren. Zu einem späteren Zeitpunkt erfolgte die Bestimmung der Anti-Xa-Aktivität im Zentrallabor des Universitätsklinikum Essen.

2.1 Studiendesign

Nach Zustimmung der Ethikkommission der Universität Duisburg-Essen (Ethikvotum 16-7173-BO) erfolgte die experimentelle Studie im Zeitraum von Januar bis April 2019 in der Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin des Universitätsklinikums Essens. Alle teilnehmenden Probanden wurden aufgeklärt und willigten schriftlich in die Studienteilnahme ein. Den gesunden Probanden wurde Blut abgenommen, das gewonnene Material verarbeitet und Gerinnungsanalysen durchgeführt. Die Probandendaten wurden pseudonymisiert dokumentiert.

2.2 Probanden

An der Studie nahmen 20 gesunde Probanden im Alter zwischen 28 und 50 Jahren teil (Alter (Mittelwert \pm Standardabweichung): $34,0 \pm 5,7$ Jahre). Hiervon waren 10 Männer (Alter: $34,1 \pm 5,3$ Jahre) und 10 Frauen (Alter: $33,9 \pm 6,4$ Jahre). Alle Probanden gaben an, in den letzten zwei Wochen vor der Studie keine gerinnungsaktiven Medikamente eingenommen zu haben. Die Gerinnungsanamnese aller Probanden war unauffällig. Ausschlusskriterien waren jegliche Art von Vorerkrankungen, Allergien oder die Einnahme von gerinnungsaktiven Substanzen.

2.3 Probengewinnung

Jedem Probanden wurde insgesamt 72 ml periphervenöses Blut (1. Versuchsteil 33 ml, 2. Versuchsteil 39 ml) aus einer Cubitalvene ohne zusätzliche Venostase entnommen.

Die Abnahme erfolgte in Natriumcitrat-Küvetten, mit einem definierten Füllvolumen von 3000 μ l (Monovette®, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland). Das in den Küvetten enthaltene 0,106 molare Natriumcitrat liegt nach der Blutentnahme in einem Mischungsverhältnis von 1:10 vor und verhindert die Gerinnung der Probe durch Komplexierung von Calcium-Ionen. Die jeweils erste Probe wurde verworfen, um Verfälschungen z.B. durch eine Punktions-bedingte Kontamination mit Gewebethromboplastin zu verhindern. Die Lagerung der Proben erfolgte bei Raumtemperatur und die Messungen wurden innerhalb von zwei Stunden durchgeführt.

2.4 Messverfahren

2.4.1 Rotationsthrombelastometrie (ROTEM®)

Das in dieser Studie verwendete ROTEM® stellte eine Weiterentwicklung/Modifikation der 1948 von Hartert beschriebenen Thrombelastographie (TEG) dar (Hartert, 1948).

Bei der in dieser Arbeit verwendeten ROTEM®-Analytik wird mit Citrat versetztes Vollblut mit verschiedenen spezifischen Blutgerinnungsaktivatoren in eine auf 37°C beheizte Küvette (Cup) transferiert, in die während der anschließenden Messung ein zylindrischer Stift (Pin) eintaucht. Anders als bei der Thrombelastographie (TEG) bewegt sich der zylindrische Stift um die eigene Achse ($\pm 4,75^\circ$) hin und her (Abbildung 6). Der Stift kann sich bis zum Einsetzen der Gerinnung frei bewegen. Sobald es zur Gerinnselbildung kommt, führt dieses zu einer Einschränkung der Bewegung, die über einen Spiegel optisch erfasst, durch einen Computer berechnet und schließlich graphisch als sog. Temogramm (Abbildung 7) dargestellt wird (TEM® Innovation GmbH München).

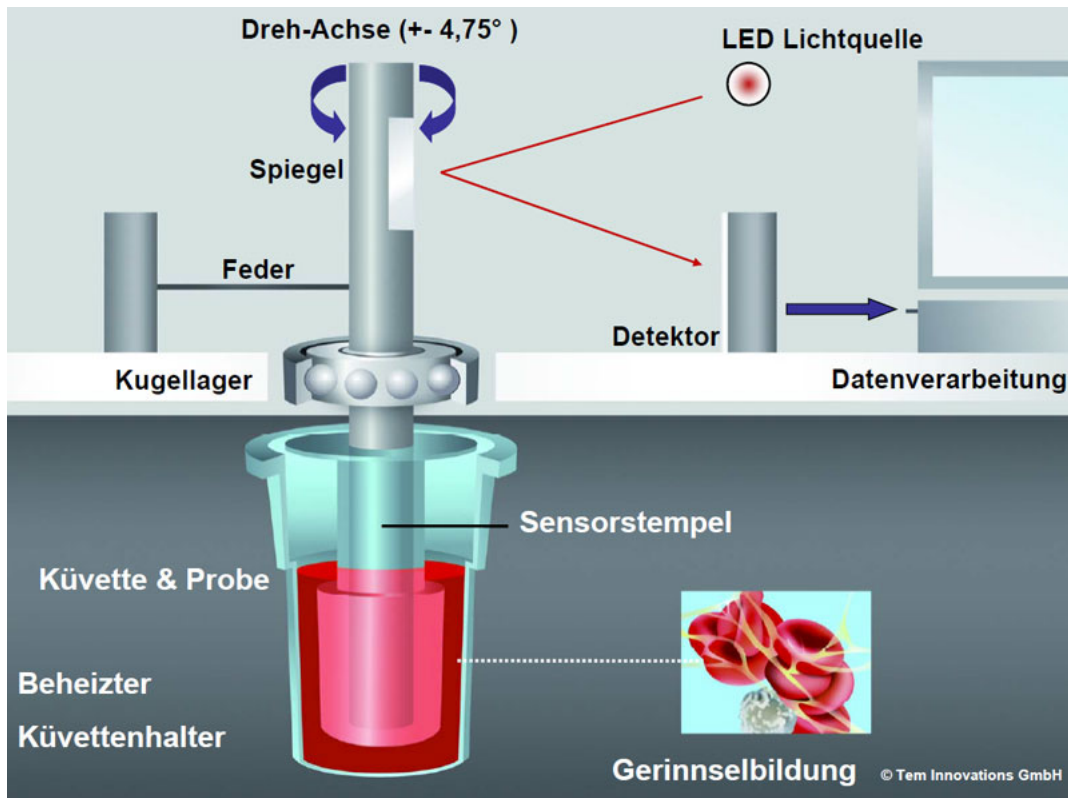


Abbildung 6: Messprinzip der Rotationsthembelastometrie

Es erfolgt ein Transfer von Blut in eine Mikroküvette (Cup), in die wiederum ein Stempel (Pin) eintaucht, der sich um $\pm 4,75^\circ$ dreht. Die Gerinnungsbildung kann optisch erfasst und mittels Computer verarbeitet werden (TEM® Innovation GmbH München).

Während es bei der ursprünglichen Thrombelastographie (TEG) zur Gerinnungsaktivierung über die Oberfläche der Mikroküvette kam, ermöglicht das ROTEM® mehrere verschiedene Analysen der Gerinnungsbildung. Bei der ROTEM®-Analyse erfolgt zunächst die Rekalzifizierung (star-tem®-Reagenz), gefolgt von dem gewünschten spezifischen Assay. Durch Zugabe verschiedener Gerinnungsaktivatoren können so gezielt intrinsische als auch extrinsische Signalkaskaden angestoßen und spezifische Fragestellungen (z.B. Heparineffekt, Hyperfibrinolyse, Fibrinogenmangel) beantwortet werden.

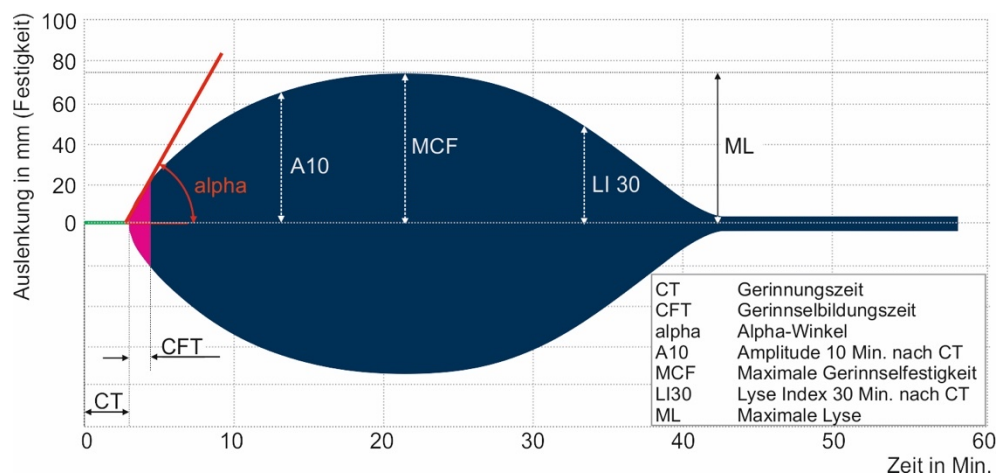


Abbildung 7: Temogramm einer ROTEM®-Analyse
Gezeigt ist die Entstehung eines Gerinnsels mit entsprechender Gerinnungszeit (CT), der Gerinnselfestigkeit (MCF) und der Lyse des Gerinnsels (TEM® Innovation GmbH München).

Grafische Darstellung (Temogramm) der ROTEM®-Analyse

Das Temogramm (Abbildung 7) veranschaulicht die unterschiedlichen Messvariablen, die eine zusätzliche Interpretation der Blutgerinnung ermöglicht.

Clotting Time

Die Clotting Time (CT) ist die Zeit von Beginn des Tests bis zur initialen Ausbildung eines Gerinnsels. Definiert ist der Beginn der Gerinnselfestigkeit mit einer Amplitude von 2 mm.

INTEM®

Das INTEM® beinhaltet Ellagsäure als Aktivator und ermöglicht hierdurch eine Beurteilung der intrinsischen Gerinnung durch Messung der CT, die wiederum vergleichbar mit der aPTT ist (Meesters et al., 2015; Theusinger et al., 2013).

HEPTEM®

Das HEPTEM® ist ein modifiziertes INTEM®, welches durch die Zugabe von Heparinase eine Heparinwirkung deaktivieren kann und im Vergleich zu einer korrespondierenden CT in einer INTEM®-Messung eine Heparinwirkung detektieren kann (Meesters et al., 2015).

NATEM®

Beim NATEM® erfolgt ausschließlich eine Rekalzifizierung mittels des star-tem®-Reagenz, ohne dass ein weiterer Aktivator hinzugegeben wird, wodurch es zu einer isolierten Kontaktaktivierung durch die Küvettenoberfläche kommt.

NA-HEPTEM

Das NA-HEPTEM ist eine Modifikation des NATEM®, bei der durch Zugabe von Heparinase die Heparinwirkung deaktiviert und somit im direkten Vergleich mit einem korrespondierenden NATEM-Assay eine Heparinwirkung demaskiert werden kann. Nach Rekalzifizierung mittels star-tem®-Reagenz erfolgt die Zugabe des hep-tem®-Reagenz.

2.4.2 Bestimmung der Anti-Xa-Aktivität

Die Bestimmung der Anti-Xa-Aktivität erfolgte durch das Zentrallabor der Universitätsmedizin Essen mithilfe von Assays der Firma Siemens Healthcare Diagnostic Products GmbH (Eschborn, Deutschland). Für die Bestimmung der Anti-Xa-Aktivität für das UFH wurde der Innovance®-Heparin-Assay und für das NMH der Innovance®-LMW-Heparin-Assay benutzt. Die Testdurchführung erfolgte nach Zentrifugation im Blutplasma mittels eines Sysmex CS-5100 der Firma Siemens (Eschborn, Deutschland).

Beiden Assays liegt ein chromogenes Messprinzip zugrunde, bei dem die Faktor Xa vermittelte Umwandlung eines zugesetzten chromogenen Substrats (S-2732) gemessen wird. Diese Einstufen Tests enthalten eine definierte Menge Faktor Xa (Reagenz). Dieser wird durch den im Plasma enthaltenen Antithrombin-UFH bzw. NMH-Komplex gehemmt. Die Bildung des Produktes (Paranitroanilin) wird vom Analysator bei einer spezifischen Wellenlänge (405 nm) optisch gemessen und ist umgekehrt proportional zur Heparinaktivität. Laut Herstellerangaben liegt der Messbereich bei 0,1 IE/ml bis 1,5 IE/ml. Die Plasma-Probe hat bei Raumtemperatur eine Stabilität von bis zu 4 Stunden.

2.5 Untersuchungsprotokoll

Es erfolgten viskoelastische Gerinnungsanalysen bei unterschiedlichen Konzentrationen von UFH und NMH im humanen Vollblut (Tabelle 1). Der Hälfte der Blutproben wurde nach der Entnahme UFH (Heparin-Natrium, Leo Pharma AS) in Endkonzentrationen (Vollblut) von 0,0 IE/ml bis 1,6 IE/ml zugesetzt (Gesamtvolumen 3160 μ l), während die andere Hälfte der Blutproben mit Enoxaparin (Clexane® multidose) als NMH in Endkonzentrationen von 0,0 IE/ml bis 0,8 IE/ml (Gesamtvolumen 3080 μ l) versetzt wurde. Um einen Dilutionseffekt zu verhindern, wurde jeweils das gleiche Volumen einer Mischung aus UFH bzw. NMH und NaCl 0,9% zugesetzt, welche erst unmittelbar vor der Blutabnahme vorbereitet wurde. Die prozessierte Blutprobe wurde für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Währenddessen wurde die ROTEM®-Analyse gemäß den Herstellerangaben vorbereitet.

Tabelle 1: Konzentrationsreihe UFH und NMH

Endkonzentration Unfraktioniertes Heparin (IE/ml)	0,0	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1,2	1,6
Endkonzentration Niedermolekulares Heparin (IE/ml)	0,0	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8		

Mithilfe von 4 ROTEM® delta (TEM® Innovation GmbH, München, Deutschland) wurden die CTs in INTEM®- und HEPTEM®-Assays für UFH und NMH bestimmt. Für die NMH erfolgte zusätzlich eine Messung der CT in NATEM®- und NA-HEPTEM®-Assays. Auf eine Analyse von NATEM®- und NA-HEPTEM® bei UFH wurde bewusst verzichtet, da eine ausreichende Korrelation zumindest der $CT_{HEPTEM®}/CT_{INTEM®}$ -Ratio für UFH bekannt ist (Görlinger et al., 2019). Die Analysen wurden bis zum Erreichen der A10 durchgeführt. Unmittelbar nach dem Start der viskoelastischen Testverfahren wurden das restliche Probenmaterial bei einer Zentripetalbeschleunigung von 2000 x g für 20 Minuten zentrifugiert (Rotina 48r, Firma Hettich, Tuttlingen, Deutschland). Hiernach wurde der Plasmaüberstand sorgfältig in ein Reaktionsgefäß (Firma Eppendorf SE, Hamburg, Deutschland) übertragen und bei -80°C eingefroren. Die Anti-Xa-Aktivitätsbestimmung für UFH und NMH erfolgte nachfolgend gemeinsam für alle gesammelten Proben durch das Zentrallabor der Universitätsmedizin Essen.

2.6 Statistik

Die statistischen Auswertungen erfolgten mit der Software GraphPad Prism Version 9.1.0 für MAC OS XI (GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com).

Die Daten wurden zunächst mittels D'Agostino & Pearson Test auf das Vorliegen einer Normalverteilung geprüft. Aufgrund fehlender Normalverteilung erfolgten die Vergleiche der jeweiligen CT im INTEM® und HEPTEM® mit entsprechender INTEM®/HEPTEM®-Ratio (UFH und NMH), sowie NATEM® und NAHEPTEM® mit dazugehöriger NATEM®/NAHEPTEM®-Ratio (NMH) mittels nicht parametrischen Friedmann Tests unter Dunn Korrektur des Alpha Fehlers. Alle Ergebnisse werden nachfolgend als Median mit der entsprechenden 25. und 75. Perzentile dargestellt.

Mittels Receiver Operating Characteristic (ROC)-Analysen wurden die inkrementellen Vollblutkonzentrationen von UFH bzw. NMH mit der nativen Probe (Kontrolle) verglichen, um herauszufinden, ob die jeweilige Variable bzw. Ratio dazu geeignet ist das Vorhandensein oder die Abwesenheit von Heparin zu diskriminieren. Mithilfe der jeweiligen Sensitivität und Spezifität wurde der optimale Schwellenwert der ROC-Kurve anhand des Youden Index berechnet. Hierbei handelt es sich um den Punkt, bei dem die Summe aus Sensitivität und Spezifität ihren Maximalwert hat (Youden, 1950).

Es wurden folgende a priori Nullhypothesen formuliert:

1. Durch die Zugabe von UFH verändert sich eine $CT_{\text{INTEM}^{\circledast}}/CT_{\text{HEPTEM}^{\circledast}}$ -Ratio (ROTEM®) nicht.
2. Durch die Zugabe von NMH verändert sich eine $CT_{\text{INTEM}^{\circledast}}/CT_{\text{HEPTEM}^{\circledast}}$ -Ratio (ROTEM®) nicht.
3. Durch die Zugabe von NMH verändert sich eine $CT_{\text{NATEM}^{\circledast}}/CT_{\text{NA-HEPTEM}^{\circledast}}$ -Ratio (ROTEM®) nicht.
4. $CT_{\text{INTEM}^{\circledast}}/CT_{\text{HEPTEM}^{\circledast}}$ -Ratios sind nicht geeignet, um eine UFH-induzierte Anti-Xa-Aktivität kleiner bzw. größer als 0,1 IU/ml zu diskriminieren.
5. $CT_{\text{NATEM}^{\circledast}}/CT_{\text{NA-HEPTEM}^{\circledast}}$ -Ratios sind nicht geeignet, um eine NMH-induzierte Anti-Xa-Aktivität kleiner bzw. größer 0,1 IU/ml zu diskriminieren.

Bei einem Alpha- Fehler von $p < 0,05$ wurden die Nullhypothesen verworfen.

3 ERGEBNISSE

3.1 Einfluss von unfractioniertem Heparin auf die rotationsthrombelastometrisch gemessene Clotting Time (CT) in INTEM®- und HEPTEM®-Assays und die Anti-Xa-Aktivität

In der ersten Untersuchungsreihe erfolgte die Messung der CT in INTEM®- und HEPTEM®-Assays nach Zugabe unterschiedlicher Konzentrationen von UFH zu humanem Vollblut. Zusätzlich erfolgte die Bestimmung der Anti-Xa-Aktivität aus den Resten der für die ROTEM®-Untersuchungen verwendeten Proben.

3.1.1 Konzentrationsabhängiger Effekt von UFH auf die CT in INTEM®-Assays

Nach Zugabe von UFH zum Vollblut in vitro, zeigte sich eine konzentrationsabhängige Verlängerung der CT in INTEM®-Assays. Ab einer Vollblutkonzentration von 0,4 IE/ml war eine signifikante Verlängerung der CT (Median [25./75. Perzentile]: 354s [309;376]) im Vergleich zur Kontrolle (Median [25./75. Perzentile]: 169s [161;180]) festzustellen ($p=0,0039$). Bei den beiden geringeren, getesteten Vollblutkonzentrationen (d.h. 0,1 und 0,2 IE/ml) war keine statistische Signifikanz zu verzeichnen. Die CT zeigte jedoch bereits bei Zugabe von 0,1 IE/ml eine deutliche Verlängerung (Median [25./75. Perzentile]: 218s [201;243]) (Abbildung 8 und Tabelle 2)-

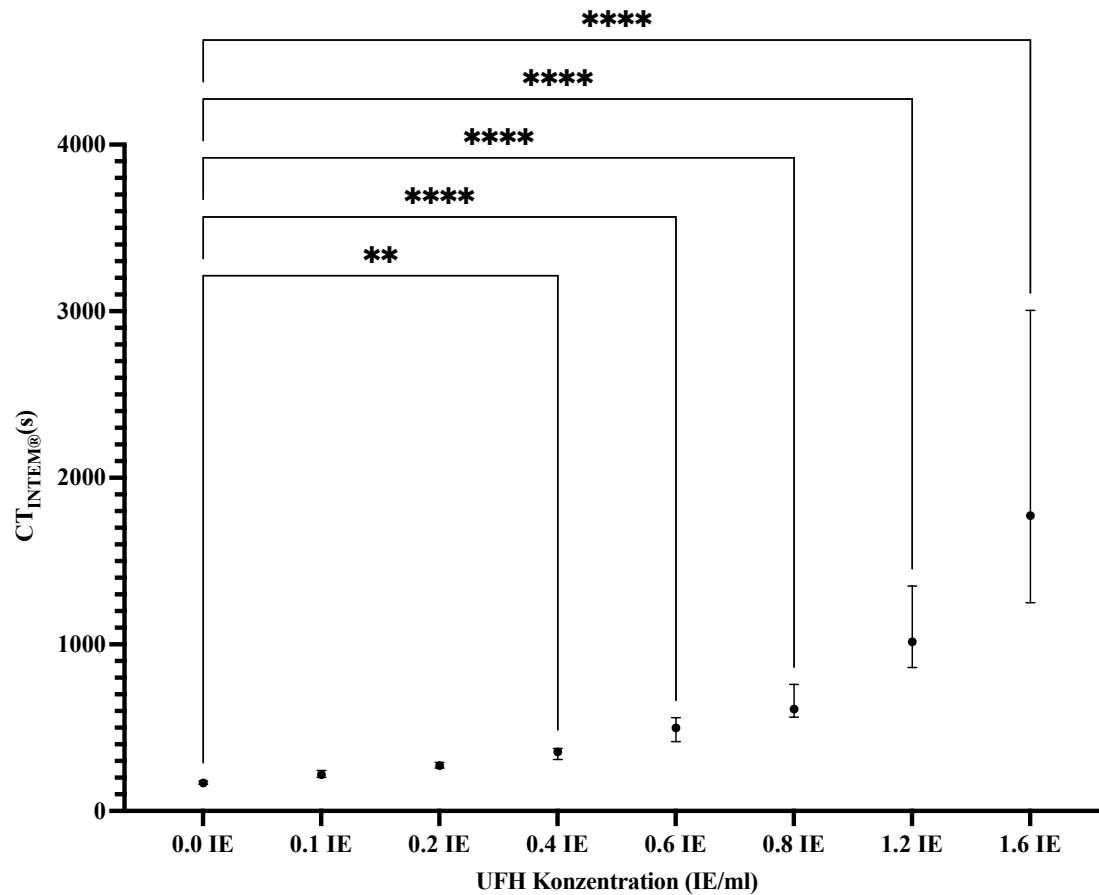


Abbildung 8: Konzentrationsabhängiger Effekt von UFH auf die CT in INTEM®-Assays bei 20 Probanden
Graphische Darstellung mit Median, 25. und 75. Perzentile. Signifikanz (**) $p=0,0039$, (****) $p<0,0001$ im Vergleich zur Kontrolle (0,0 IE/ml).

Tabelle 2: Effekte inkrementeller Konzentrationen von unfraktioniertem Heparin auf die CT_{INTEM®}

Konzentration (IE/ml)	CT (s)		p Wert
	Median	25. / 75. Perzentile	
0.0	169	161 / 180	
0.1	218	201 / 243	>0,9999
0.2	272	258 / 292	0,2277
0.4	354	309 / 376	0,0039
0.6	499	417 / 560	<0,0001
0.8	612	563 / 760	<0,0001
1,2	1015	861 / 1350	<0,0001
1,6	1773	1251 / 3005	<0,0001

3.1.2 Konzentrationsabhängiger Effekt von UFH auf die CT in HEPTEM®-Assays

Nach Zugabe von UFH zum Vollblut in vitro zeigte sich eine konzentrationsabhängige Verlängerung der CT in HEPTEM®-Assays. Ab einer Vollblutkonzentration von 1,2 IE/ml war eine signifikante Verlängerung der CT (Median [25./75. Perzentile]: 192s [181;204]) im Vergleich zur Kontrolle (Median [25./75. Perzentile]: 165s [160;181]) festzustellen ($p=0,0004$). Bei den geringeren, getesteten Vollblutkonzentrationen (d.h. 0,1 bis 0,8 IE/ml) war keine statistische Signifikanz zu verzeichnen (Abbildung 9 und Tabelle 3).

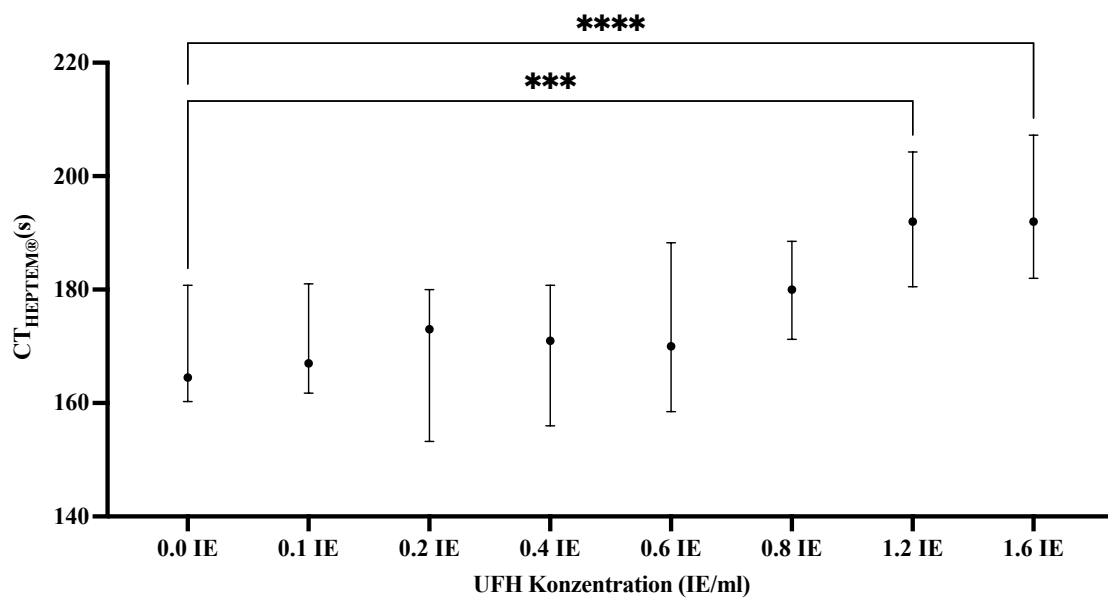


Abbildung 9: Konzentrationsabhängiger Effekt von UFH auf die CT in HEPTEM®-Assays bei 20 Probanden

Graphische Darstellung mit Median, 25. und 75. Perzentile. Kennzeichnung Signifikanz (***) $p=0,0004$, (****) $p<0,0001$ im Vergleich zur Kontrolle (0,0 IE/ml).

Tabelle 3: Effekte inkrementeller Konzentrationen von unfraktioniertem Heparin auf die CT_{HEPTEM®}

Konzentration (IE/ml)	CT (s)		p Wert
	Median	25. / 75. Perzentile	
0.0	165	160 / 181	
0.1	167	162 / 181	>0,9999
0.2	173	153 / 180	>0,9999
0.4	171	156 / 181	>0,9999
0.6	170	159 / 188	>0,9999
0.8	180	171 / 189	0,0836
1,2	192	181 / 204	0,0004
1,6	192	182 / 207	<0,0001

3.1.3 Konzentrationsabhängiger Effekt von UFH auf die $CT_{\text{INTEM}}^{\text{®}}/CT_{\text{HEPTEM}}^{\text{®}}$ -Ratios

Nach Zugabe von UFH zum Vollblut in vitro, zeigte sich ein konzentrationsabhängiger Anstieg der $CT_{\text{INTEM}}^{\text{®}}/CT_{\text{HEPTEM}}^{\text{®}}$ -Ratio. Ab einer Vollblutkonzentration von 0,4 IE/ml war ein signifikanter Anstieg der Ratio (Median [25./75. Perzentile]: 2,10 [1,92;2,24]) im Vergleich zur Kontrolle (Median [25./75. Perzentile]: 1,02 [0,96;1,06]) festzustellen ($p=0,0051$). Bei den beiden geringeren, getesteten Vollblutkonzentrationen (d.h. 0,1 und 0,2 IE/ml) war keine statistische Signifikanz zu verzeichnen. Die Ratio zeigte jedoch bereits bei Zugabe von 0,1 IE/ml einen deutlichen Anstieg (Median [25./75. Perzentile]: 1,28 [1,23;1,34]) (Abbildung 10 und Tabelle 4)-

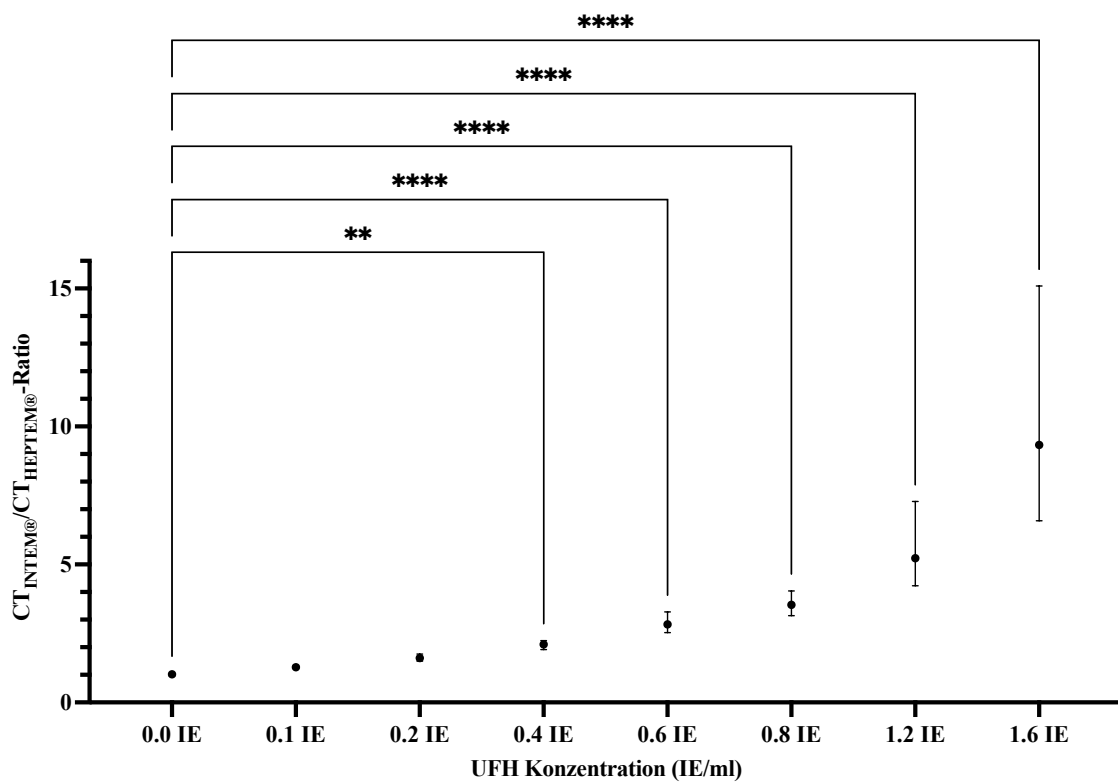


Abbildung 10: Konzentrationsabhängiger Effekt von UFH auf die $CT_{\text{INTEM}}^{\text{®}}/CT_{\text{HEPTEM}}^{\text{®}}$ -Ratio bei 20 Probanden
Graphische Darstellung mit Median, 25. und 75. Perzentile. Kennzeichnung Signifikanz (**) $p=0,0051$, (****) $p<0,0001$ im Vergleich zur Kontrolle (0,0 IE/ml).

Tabelle 4: Effekte inkrementeller Konzentrationen von unfraktioniertem Heparin auf die $CT_{\text{INTEM}}/CT_{\text{HEPTEM}}$ -Ratio

Konzentration (IE/ml)	$CT_{\text{INTEM}}/CT_{\text{HEPTEM}}$-Ratio		p Wert
	Median	25. / 75. Perzentile	
0.0	1,02	0,96 / 1,06	
0.1	1,28	1,23 / 1,34	>0,9999
0.2	1,61	1,50 / 1,76	0,2751
0.4	2,10	1,92 / 2,24	0,0051
0.6	2,83	2,53 / 3,28	<0,0001
0.8	3,54	3,14 / 4,04	<0,0001
1,2	5,23	4,23 / 7,28	<0,0001
1,6	9,33	6,59 / 15,09	<0,0001

3.1.4 Konzentrationsabhängiger Effekt von UFH auf die Anti Xa-Aktivität

Nach Zugabe von UFH zum Vollblut in vitro, zeigte sich ein konzentrationsabhängiger Anstieg der Anti-Xa-Aktivität. Ab einer Vollblutkonzentration von 0,6 IE/ml war ein signifikanter Anstieg der Anti-Xa-Aktivität (Median [25./75. Perzentile]: 0,62 IE/ml [0,32;0,77]) im Vergleich zur Kontrolle (Median [25./75. Perzentile]: 0,09 IE/ml [0,09;0,09]) festzustellen ($p=0,0007$). Die Zugabe von 0,4 IE/ml UFH je Milliliter humanem Vollblut, resultierte im Median in einer laborchemisch gemessenen Anti-Xa-Aktivität von 0,39 IE/ml ([25./75. Perzentile]: [0,15;0,47]) (Abbildung 10 und Tabelle 4).

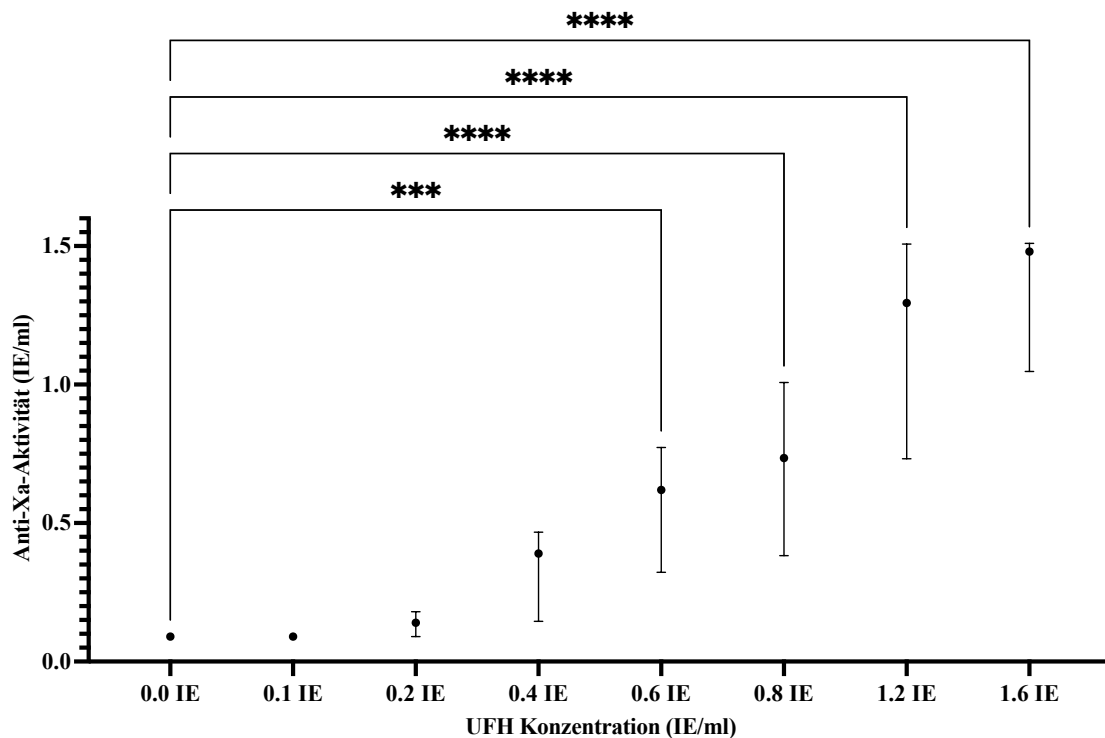


Abbildung 11: Konzentrationsabhängiger Effekt von UFH auf die Anti-Xa-Aktivität bei 20 Probanden. Graphische Darstellung mit Median, 25. und 75. Perzentile. Kennzeichnung Signifikanz (***) $p=0,0007$, (****) $p<0,0001$ im Vergleich zur Kontrolle (0,0 IE/ml).

Tabelle 5: Effekte inkrementeller Konzentrationen von unfraktioniertem Heparin auf die Anti-Xa-Aktivität

Konzentration (IE/ml)	Anti-Xa-Aktivität (IE/ml)		p Wert
	Median	25. / 75. Perzentile	
0.0	0,09	0,09 / 0,09	
0.1	0,09	0,09 / 0,09	>0,9999
0.2	0,14	0,09 / 0,18	>0,9999
0.4	0,39	0,15 / 0,47	0,0752
0.6	0,62	0,32 / 0,77	0,0007
0.8	0,74	0,38 / 1,01	<0,0001
1,2	1,30	0,73 / 1,51	<0,0001
1,6	1,48	1,05 / 1,51	<0,0001

3.1.5 Übersicht UFH CT_{INTEM®}/CT_{HEPTEM®}-Ratios und Anti-Xa-Aktivität

Für UFH zeigte sich in der Kontrollgruppe ohne Heparinzugabe (Tabelle 6), dass die Anti-Xa-Aktivität in allen Fällen <0,1 IE/ml war. Zusätzlich zeigte sich, dass obwohl UFH vorhanden war, auch Anti-Xa-Aktivitäten <0,1 IE/ml gemessen wurden (z.B. UFH-Konzentration bei 1,6 IE/ml; 2 von 20 Messungen mit einer Anti-Xa-Aktivität <0,1 IE/ml).

Tabelle 6: Übersicht UFH CT_{INTEM®}/CT_{HEPTEM®}-Ratio, Anti-Xa-Aktivität und Anzahl Anti-Xa-Aktivität <0,1 IE/ml

UFH	CT _{INTEM®} /CT _{HEPTEM®} -Ratio		Anti-Xa-Aktivität (IE/ml)		Anzahl Anti-Xa-Aktivität <0,1 IE/ml
	Konzentration (IE/ml)	Median	25. / 75. Perzentile	Median	
0.0	1,02	0,96 / 1,06	0,09	0,09 / 0,09	20/20
0.1	1,28	1,23 / 1,34	0,09	0,09 / 0,09	19/20
0.2	1,61	1,50 / 1,76	0,14	0,09 / 0,18	8/20
0.4	2,10	1,92 / 2,24	0,39	0,15 / 0,47	3/20
0.6	2,83	2,53 / 3,28	0,62	0,32 / 0,77	2/20
0.8	3,54	3,14 / 4,04	0,74	0,38 / 1,01	1/20
1,2	5,23	4,23 / 7,28	1,30	0,73 / 1,51	1/20
1,6	9,33	6,59 / 15,09	1,48	1,05 / 1,51	2/20

3.1.6 Ergebnisse der ROC-Analyse zur Vorhersage des Vorhandenseins von UFH (>0,1 IE/ml) anhand der $CT_{INTEM^{\circledR}}/CT_{HEPTEM^{\circledR}}$ -Ratios

Abbildung 12 und Tabelle 7 zeigen die Ergebnisse der ROC-Analyse für die nach Zugabe von UFH (alle Wertepaare mit einer Anti-Xa Aktivität >0,1 IE/ml) im Vergleich zur Kontrolle (keine Zugabe von UFH). Anhand einer $CT_{INTEM^{\circledR}}/CT_{HEPTEM^{\circledR}}$ -Ratio von > 1,26 konnte das Vorhandensein von UFH mit einer Sensitivität von 100% (95% KI: 96,44-100%) und einer Spezifität von 100% (95% KI: 83,89-100%) nachgewiesen werden (Fläche unter der ROC-Kurve (Area under the Curve (ROC-AUC)) 1,0; $p < 0,0001$). Aus Abbildung 13 und Tabelle 8 ist ersichtlich, dass bei einer $CT_{INTEM^{\circledR}}/CT_{HEPTEM^{\circledR}}$ -Ratio > 1,91 eine Anti-Xa-Aktivität >0,3 IE/ml (therapeutischer Bereich) mit einer Sensitivität von 88,46% (95% KI: 71,02-96,00%) und einer Spezifität von 67,80% (95% KI: 55,11-78,31%) nachgewiesen werden konnte (AUC 0,79; $p < 0,0001$). Abbildung 14 und Tabelle 9 zeigen, dass eine $CT_{INTEM^{\circledR}}/CT_{HEPTEM^{\circledR}}$ -Ratio > 3,39 eine Anti-Xa-Aktivität >0,75 IE/ml mit einer Sensitivität von 87,23% (95% KI: 74,83-94,02%) und einer Spezifität von 84,95% (95% KI: 76,30-90,82%) erkennen lässt (AUC 0,9039; $p < 0,0001$).

ROC Kurve - UFH $CT_{INTEM}^{\text{®}}$ / $CT_{HEPTEM}^{\text{®}}$ -Ratio Kein UFH vs Anti-Xa-Aktivität >0,1 IE/ml

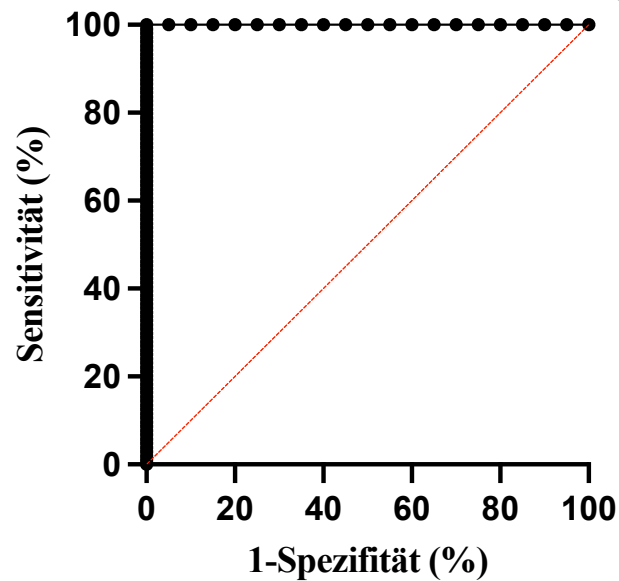


Abbildung 12: ROC-Kurve für die Unterscheidung zwischen Kontrolle (Keine Zugabe von UFH) und einer laborchemisch gemessenen Anti-Xa-Aktivität >0,1 IE/ml anhand von $CT_{INTEM}^{\text{®}}$ / $CT_{HEPTEM}^{\text{®}}$ -Ratios' bei 20 Probanden

Graphische Darstellung als ROC-Kurve mit Sensitivität und Spezifität. Bei einer Ratio von <1,26 konnte mit einer Sensitivität von 100% und einer Spezifität von 100% zwischen der Abwesenheit von UFH (Kontrolle) und einer laborchemisch gemessenen Anti-Xa-Aktivität (>0,1 IE/ml) unterschieden werden.

Tabelle 7: UFH-Kontrolle vs. UFH-Anti-Xa-Aktivität >0,1 IE/ml Sensitivität und Spezifität $CT_{INTEM}^{\text{®}}$ / $CT_{HEPTEM}^{\text{®}}$ -Ratio

Ratio	Sensitivität (%)	95% Konfidenzintervall	Spezifität (%)	95% Konfidenzintervall	Youden-Index
> 1.19	100	96,44% bis 100%	95,00	76,39% bis 99,74%	0,95
> 1.26	100	96,44% bis 100%	100	83,89% bis 100%	1,00
> 1.29	99,04	94,75% bis 99,95%	100	83,89% bis 100%	0,99

ROC Kurve - UFH CT_{INTEM®}/CT_{HEPTEM®}-Ratio Anti-Xa-Aktivität >0,3 IE/ml

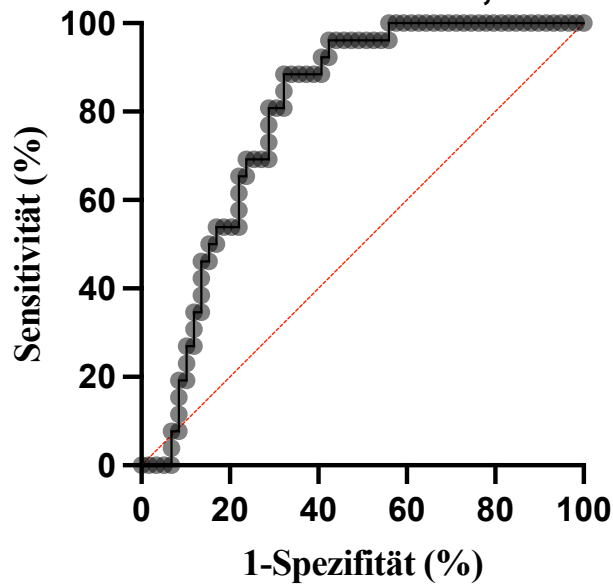


Abbildung 13: ROC-Kurve für die Unterscheidung zwischen laborchemisch gemessenen Anti-Xa-Aktivität (bei UFH) <0,3 IE/ml und einer Anti-Xa-Aktivität >0,3 IE/ml anhand von CT_{INTEM®}/CT_{HEPTEM®}-Ratios' bei 20 Probanden

Graphische Darstellung als ROC-Kurve mit Sensitivität und Spezifität. Bei einer Ratio von >1,91 zeigt sich mit einer Sensitivität von 88,46% und einer Spezifität von 67,80% eine Anti-Xa-Aktivität >0,3 IE/ml.

Tabelle 8: Ergebnisse Anti-Xa-Aktivität <0,3 IE/ml vs. >0,3 IE/ml Sensitivität und Spezifität CT_{INTEM®}/CT_{HEPTEM®}-Ratio

Ratio	Sensitivität (%)	95% Konfidenzintervall	Spezifität (%)	95% Konfidenzintervall	Youden-Index
> 1.86	88,46	71,02% bis 96,00%	66,10	53,37% bis 76,86%	0,55
> 1.91	88,46	71,02% bis 96,00%	67,80	55,11% bis 78,31%	0,56
> 1.92	84,62	66,47% bis 93,85%	67,80	55,11% bis 78,31%	0,52

ROC Kurve - UFH CT_{INTEM®}/CT_{HEPTEM®}-Ratio Anti-Xa-Aktivität >0,75 IE/ml

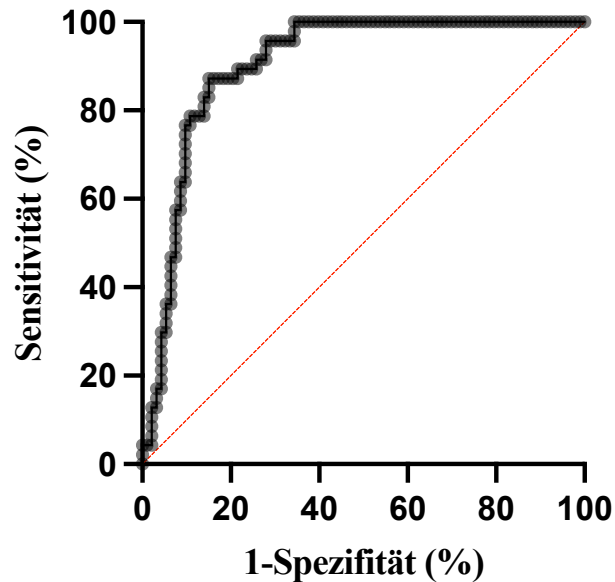


Abbildung 14: ROC-Kurve für die Unterscheidung zwischen laborchemisch gemessenen Anti-Xa-Aktivität (bei UFH) <0,75 IE/ml und einer Anti-Xa-Aktivität >0,75 IE/ml anhand von CT_{INTEM®}/CT_{HEPTEM®}-Ratios' bei 20 Probanden

Graphische Darstellung als ROC-Kurve mit Sensitivität und Spezifität. Bei einer Ratio von >3,39 zeigt sich mit einer Sensitivität von 87,23% und einer Spezifität von 84,95% eine Anti-Xa-Aktivität >0,75 IE/ml.

Tabelle 9: Ergebnisse Anti-Xa-Aktivität <0,75 IE/ml vs. >0,75 IE/ml Sensitivität und Spezifität CT_{INTEM®}/CT_{HEPTEM®}-Ratio

Ratio	Sensitivität (%)	95% Konfidenzintervall	Spezifität (%)	95% Konfidenzintervall	Youden-Index
> 3.35	87,23	74,83% bis 94,02%	83,87	75,08% bis 89,97%	0,71
> 3.39	87,23	74,83% bis 94,02%	84,95	76,30% bis 90,82%	0,72
> 3.44	85,11	72,31% bis 92,59%	84,95	76,30% bis 90,82%	0,70

Abbildung 15 und Tabelle 10 zeigt die ROC-Analyse für die $CT_{INTEM}^{\text{®}}/CT_{HEPTEM}^{\text{®}}$ -Ratio nach Zugabe von UFH in einer Konzentration von mehr als 0,1 IE/ml im direkten Vergleich mit der Kontrolle (keine Zugabe von UFH) unabhängig der gemessenen Anti-Xa-Aktivität. Die Substanz ließ sich bei einer Ratio von $> 1,13$ mit einer Sensitivität von 100% (95% KI: 97,33-100%) und einer Spezifität von 95% (95% KI: 83,5-99,11%) nachweisen ($p < 0,0001$, AUC 0,9971).

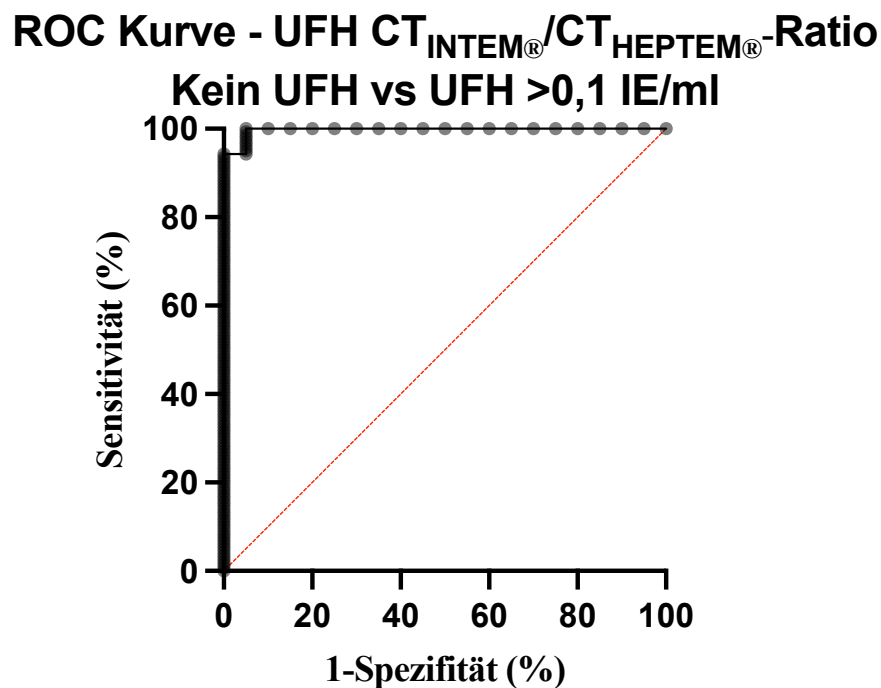


Abbildung 15: ROC-Kurve für die Unterscheidung zwischen Kontrolle (Keine Zugabe von UFH) und einer UFH-Konzentration $> 0,1$ IE/ml anhand von $CT_{INTEM}^{\text{®}}/CT_{HEPTEM}^{\text{®}}$ -Ratios' bei 20 Probanden
Graphische Darstellung als ROC-Kurve mit Sensitivität und Spezifität. Bei einer Ratio von $< 1,13$ konnte mit einer Sensitivität von 100% und einer Spezifität von 95,00% zwischen der Abwesenheit von UFH (Kontrolle) und einer UFH-Konzentration $> 0,1$ IE/ml unterschieden werden.

Tabelle 10: UFH-Kontrolle vs. UFH-Konzentration $> 0,1$ IE/ml Sensitivität und Spezifität
 $CT_{INTEM}^{\text{®}}/CT_{HEPTEM}^{\text{®}}$ -Ratio

Ratio	Sensitivität (%)	95% Konfidenzintervall	Spezifität (%)	95% Konfidenzintervall	Youden- Index
> 1.10	100	97,33% bis 100%	90,00	76,95% bis 96,04%	0,90
> 1.13	100	97,33% bis 100%	95,00	83,50% bis 99,11%	0,95
> 1.14	99,29	96,07% bis 99,96%	95,00	83,50% bis 99,11%	0,94

3.2 Einfluss des niedermolekularen Heparins Enoxaparin auf die rotationsthrombelastometrisch gemessene Clotting Time (CT) in INTEM®-, HEPTEM®-, NATEM®- und NA-HEPTEM-Assays.

In der zweiten Untersuchungsreihe erfolgte die Messung der CT in INTEM®- und HEPTEM®-Assays nach Zugabe unterschiedlicher Konzentrationen von NMH zu humanem Vollblut, wie in der ersten Untersuchungsreihe. Zusätzlich wurden noch die NATEM®- sowie die NA-HEPTEM-Assays durchgeführt. Analog zur ersten Untersuchungsreihe erfolgten laborchemische Messungen der Anti-Xa-Aktivität aus den jeweiligen Resten der Proben.

3.2.1 Konzentrationsabhängiger Effekt von NMH auf die CT in INTEM®-Assays

Nach Zugabe von NMH zum Vollblut *in vitro*, zeigte sich eine konzentrationsabhängige Verlängerung der CT in INTEM®-Assays. Ab einer Vollblutkonzentration von 0,4 IE/ml war eine signifikante Verlängerung der CT (Median [25./75. Perzentile]: 209s [199;223]) im Vergleich zur Kontrolle (Median [25./75. Perzentile]: 169s [161;180]) festzustellen ($p=0,0035$). Bei den beiden geringeren, getesteten Vollblutkonzentrationen (d.h. 0,1 und 0,2 IE/ml) war keine statistische Signifikanz zu verzeichnen. Die CT zeigte jedoch bereits bei Zugabe von 0,1 IE/ml eine Verlängerung (Median [25./75. Perzentile]: 182s [174;194]) (Abbildung 16 und Tabelle 11)-

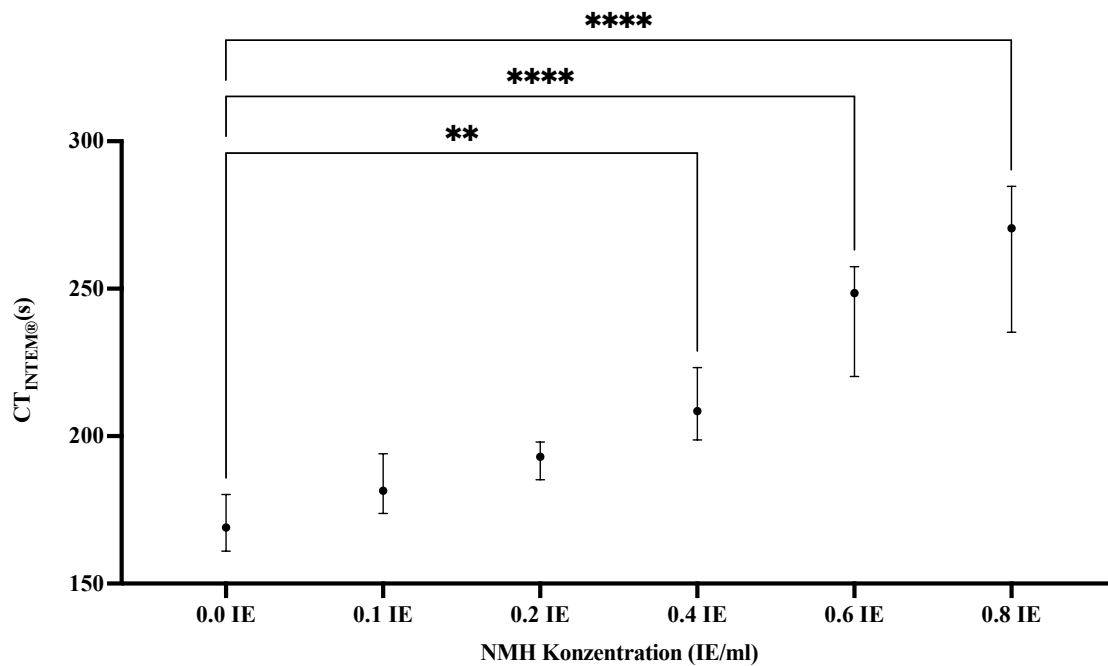


Abbildung 16: Konzentrationsabhängiger Effekt von NMH auf die CT in INTEM®-Assays bei 20 Probanden
Graphische Darstellung mit Median, 25. und 75. Perzentile. Kennzeichnung Signifikanz (**) $p=0,0035$, (***) $p<0,0001$ im Vergleich zur Kontrolle (0,0 IE/ml).

Tabelle 11: Effekte inkrementeller Konzentrationen von niedermolekularem Heparin auf die CT_{INTEM}[®]

Konzentration (IE/ml)	CT (s)		p Wert
	Median	25. / 75. Perzentile	
0.0	169	161 / 180	
0.1	182	174 / 194	>0,9999
0.2	193	185 / 198	0,5192
0.4	209	199 / 223	0,0035
0.6	249	220 / 258	<0,0001
0.8	271	235 / 285	<0,0001

3.2.2 Konzentrationsabhängiger Effekt von NMH auf die CT in HEPTEM®-Assays

Nach Zugabe von NMH zum Vollblut *in vitro* zeigte sich eine konzentrationsabhängige Verlängerung der CT in HEPTEM®-Assays. Ab einer Vollblutkonzentration von 0,8 IE/ml war eine signifikante Verlängerung der CT (Median [25./75. Perzentile]: 191s [177;199]) im Vergleich zur Kontrolle (Median [25./75. Perzentile]: 167s [161;177]) festzustellen ($p=0,0018$). Bei den geringeren, getesteten Vollblutkonzentrationen (d.h. 0,1 bis 0,6 IE/ml) war keine statistische Signifikanz zu verzeichnen (Abbildung 17 und Tabelle 12).

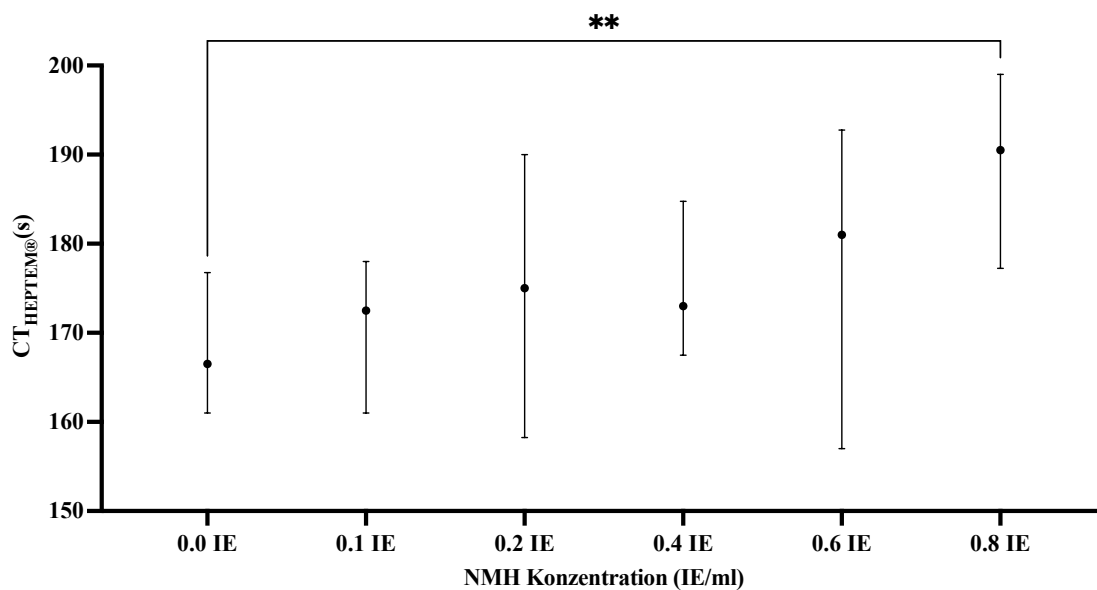


Abbildung 17: Konzentrationsabhängiger Effekt von NMH auf die CT in HEPTEM®-Assays bei 20 Probanden
Graphische Darstellung mit Median, 25. und 75. Perzentile. Kennzeichnung Signifikanz (**) $p=0,0018$ im Vergleich zur Kontrolle (0,0 IE/ml).

Tabelle 12: Effekte inkrementeller Konzentrationen von niedermolekularem Heparin auf die CT_{HEPTEM®}

Konzentration (IE/ml)	CT (s)		p Wert
	Median	25. / 75. Perzentile	
0.0	167	161 / 177	
0.1	173	161 / 178	>0,9999
0.2	175	158 / 190	>0,9999
0.4	173	168 / 185	>0,9999
0.6	181	157 / 193	>0,9999
0.8	191	177 / 199	0,0018

3.2.3 Konzentrationsabhängiger Effekt von NMH auf die $CT_{INTEM®}/CT_{HEPTEM®}$ -Ratios

Nach Zugabe von NMH zum Vollblut in vitro, zeigte sich ein konzentrationsabhängiger Anstieg der $CT_{INTEM®}/CT_{HEPTEM®}$ -Ratio. Ab einer Vollblutkonzentration von 0,4 IE/ml war ein signifikanter Anstieg der Ratio (Median [25./75. Perzentile]: 1,19 [1,13;1,28]) im Vergleich zur Kontrolle (Median [25./75. Perzentile]: 1,03 [0,93;1,05]) festzustellen ($p=0,0015$). Bei den beiden geringeren, getesteten Vollblutkonzentrationen (d.h. 0,1 und 0,2 IE/ml) war keine statistische Signifikanz zu verzeichnen. Die Ratio zeigte jedoch bereits bei Zugabe von 0,1 IE/ml einen Anstieg (Median [25./75. Perzentile]: 1,07 [1,00;1,15]) (Abbildung 18 und Tabelle 13):

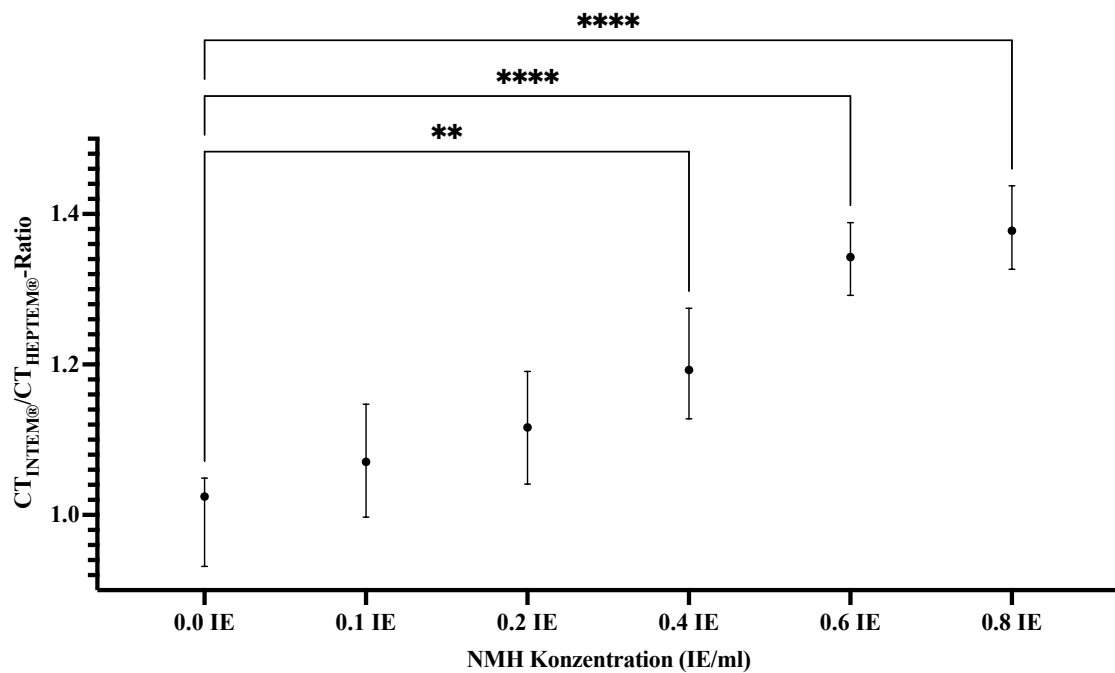


Abbildung 18: Konzentrationsabhängiger Effekt von NMH auf die $CT_{INTEM®}/CT_{HEPTEM®}$ - Ratio bei 20 Probanden

Graphische Darstellung mit Median, 25. und 75. Perzentile. Kennzeichnung Signifikanz (**) $p=0,0015$, (****) $p<0,0001$ im Vergleich zur Kontrolle (0,0 IE/ml).

Tabelle 13: Effekte inkrementeller Konzentrationen von niedermolekularem Heparin auf die $CT_{INTEM}^{\circledR}/CT_{HEPTEM}^{\circledR}$ -Ratio

Konzentration (IE/ml)	$CT_{INTEM}^{\circledR}/CT_{HEPTEM}^{\circledR}$-Ratio		p Wert
	Median	25. / 75. Perzentile	
0.0	1,03	0,93 / 1,05	
0.1	1,07	1,00 / 1,15	>0,9999
0.2	1,12	1,04 / 1,19	>0,9999
0.4	1,19	1,13 / 1,28	0,0015
0.6	1,34	1,29 / 1,39	<0,0001
0.8	1,38	1,33 / 1,44	<0,0001

3.2.4 Konzentrationsabhängiger Effekt von NMH auf die Anti Xa- Aktivität

Nach Zugabe von NMH zum Vollblut in vitro, zeigte sich ein konzentrationsabhängiger Anstieg der Anti-Xa-Aktivität. Ab einer Vollblutkonzentration von 0,4 IE/ml war ein signifikanter Anstieg der Anti-Xa-Aktivität (Median [25./75. Perzentile]: 0,61 IE/ml [0,45;0,69]) im Vergleich zur Kontrolle (Median [25./75. Perzentile]: 0,09 IE/ml [0,09;0,09]) festzustellen ($p < 0,0001$) (Abbildung 19 und Tabelle 14)-

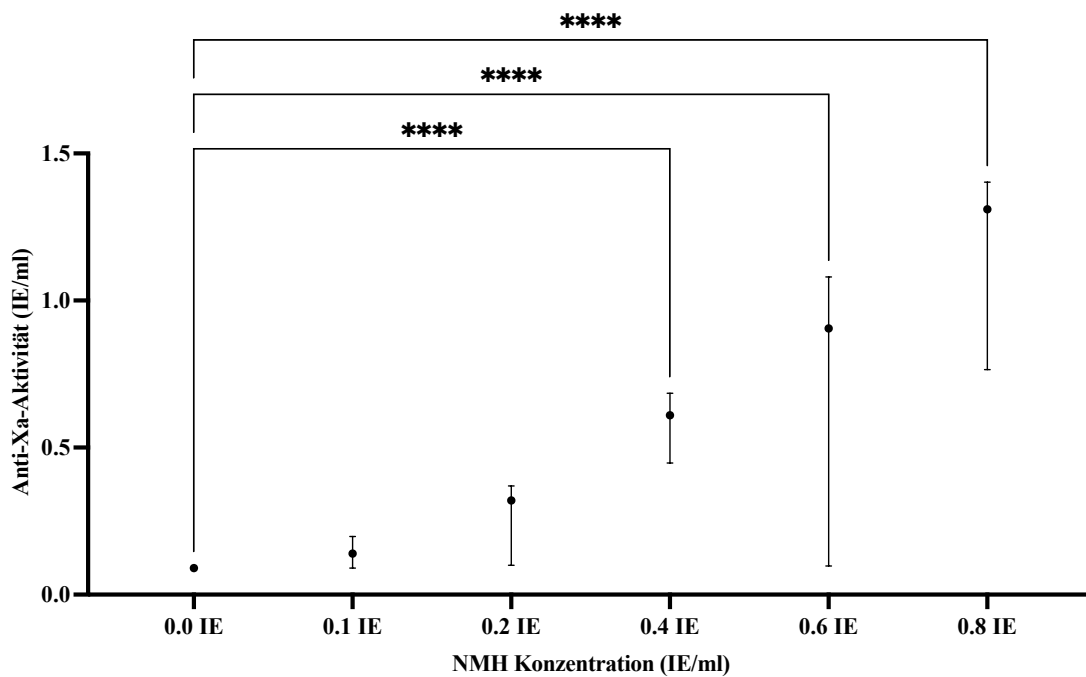


Abbildung 19: Konzentrationsabhängiger Effekt von NMH auf die Anti-Xa-Aktivität bei 20 Probanden
Graphische Darstellung mit Median, 25. und 75. Perzentile. Kennzeichnung Signifikanz (****) $p < 0,0001$ im Vergleich zur Kontrolle (0,0 IE/ml).

Tabelle 14: Effekte inkrementeller Konzentrationen von niedermolekularem Heparin auf die Anti-Xa-Aktivität

Konzentration (IE/ml)	Anti-Xa-Aktivität (IE/ml)		p Wert
	Median	25. / 75. Perzentile	
0.0	0,09	0,09 / 0,09	
0.1	0,14	0,09 / 0,20	>0,9999
0.2	0,32	0,10 / 0,37	0,1319
0.4	0,61	0,45 / 0,69	<0,0001
0.6	0,91	0,10 / 1,08	<0,0001
0.8	1,32	0,77 / 1,40	<0,0001

3.2.5 Übersicht NMH CT_{INTEM}[®]/CT_{HEPTEM}[®]-Ratios und Anti-Xa-Aktivität

Für NMH zeigte sich in der Kontrollgruppe ohne Heparinzugabe (Tabelle 15), dass die Anti-Xa-Aktivität in allen Fällen <0,1 IE/ml war. Zusätzlich zeigte sich, dass obwohl NMH vorhanden war, auch Anti-Xa-Aktivitäten <0,1 IE/ml gemessen wurden (z.B. NMH-Konzentration bei 0,6 IE/ml; 5 von 20 Messungen mit einer Anti-Xa-Aktivität <0,1 IE/ml).

Tabelle 15: Übersicht NMH CT_{INTEM}[®]/CT_{HEPTEM}[®]-Ratio, Anti-Xa-Aktivität und Anzahl Anti-Xa-Aktivität <0,1 IE/ml

NMH	CT _{INTEM} [®] /CT _{HEPTEM} [®] -Ratio		Anti-Xa-Aktivität (IE/ml)		Anzahl Anti-Xa-Aktivität <0,1 IE/ml
	Konzentration (IE/ml)	Median	25. / 75. Perzentile	Median	
0.0	1,06	0,93 / 1,05	0,09	0,09 / 0,09	20/20
0.1	1,07	1,00 / 1,15	0,14	0,09 / 0,20	8/20
0.2	1,12	1,04 / 1,19	0,32	0,10 / 0,37	5/20
0.4	1,19	1,13 / 1,28	0,61	0,45 / 0,69	2/20
0.6	1,34	1,29 / 1,39	0,91	0,10 / 1,08	5/20
0.8	1,38	1,33 / 1,44	1,32	0,77 / 1,40	0/20

3.2.6 Ergebnisse der ROC-Analyse zur Vorhersage des Vorhandenseins von NMH (>0,1 IE/ml) anhand der CT_{INTEM®}/CT_{HEPTEM®}-Ratios

Abbildung 20 und Tabelle 16 zeigen die Ergebnisse der ROC-Analyse für die nach Zugabe von NMH (alle Wertepaare mit einer Anti-Xa Aktivität >0,1 IE/ml) im Vergleich zur Kontrolle (keine Zugabe von NMH). Anhand einer CT_{INTEM®}/CT_{HEPTEM®}-Ratio von > 1,10 konnte das Vorhandensein von NMH mit einer Sensitivität von 77,5% (95% KI: 67,21-85,27%) und einer Spezifität von 95% (95% KI: 76,39-99,74%) nachgewiesen werden (AUC 0,89; p=0,0009). Aus Abbildung 21 und Tabelle 17 ist ersichtlich, dass bei einer CT_{INTEM®}/CT_{HEPTEM®}-Ratio > 1,15 eine Anti-Xa-Aktivität >0,2 IE/ml (prophylaktischer Bereich) mit einer Sensitivität von 66,67% (95% KI: 45,37-82,81%) und einer Spezifität von 53,33% (95% KI: 36,14-69,77%) nachgewiesen werden konnte (AUC 0,55; p=0,527).

Aus Abbildung 22 und Tabelle 18 ist ersichtlich, dass bei einer CT_{INTEM®}/CT_{HEPTEM®}-Ratio > 1,14 eine Anti-Xa-Aktivität >0,4 IE/ml (therapeutischer Bereich) mit einer Sensitivität von 77,78% (95% KI: 59,24-89,39%) und einer Spezifität von 54,17% (95% KI: 40,29-67,42%) nachgewiesen werden konnte (AUC 0,66; p=0,0202).

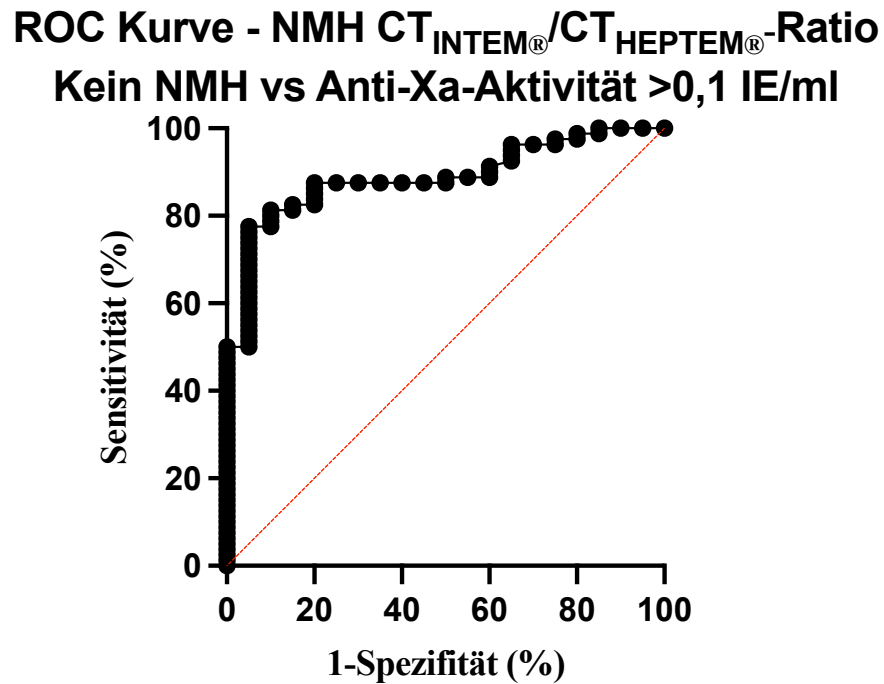


Abbildung 20: ROC-Kurve für die Unterscheidung zwischen Kontrolle (Keine Zugabe von NMH) und einer laborchemisch gemessenen Anti-Xa-Aktivität >0,1 IE/ml anhand von $CT_{INTEM}^{\circledR}/CT_{HEPTEM}^{\circledR}$ -Ratios' bei 20 Probanden

Graphische Darstellung als ROC-Kurve mit Sensitivität und Spezifität. Bei einer Ratio von <1,10 konnte mit einer Sensitivität von 77,50% und einer Spezifität von 95,00% zwischen der Abwesenheit von NMH (Kontrolle) und einer laborchemisch gemessenen Anti-Xa-Aktivität (>0,1 IE/ml) unterschieden werden.

Tabelle 16: NMH-Kontrolle vs. Anti-Xa-Aktivität >0,1 IE/ml Sensitivität und Spezifität $CT_{INTEM}^{\circledR}/CT_{HEPTEM}^{\circledR}$ -Ratio

Ratio	Sensitivität (%)	95% Konfidenzintervall	Spezifität (%)	95% Konfidenzintervall	Youden- Index
> 1.09	80,00	69,95% bis 87,30%	90,00	69,90% bis 98,22%	0,7
> 1.10	77,50	67,21% bis 85,27%	95,00	76,39% bis 99,74%	0,73
> 1,11	76,25	65,86% bis 84,24%	95,00	76,39% bis 99,74%	0,71

ROC Kurve - NMH $CT_{INTEM}^{\text{®}}/CT_{HEPTEM}^{\text{®}}$ -Ratio Anti-Xa-Aktivität >0,2 IE/ml

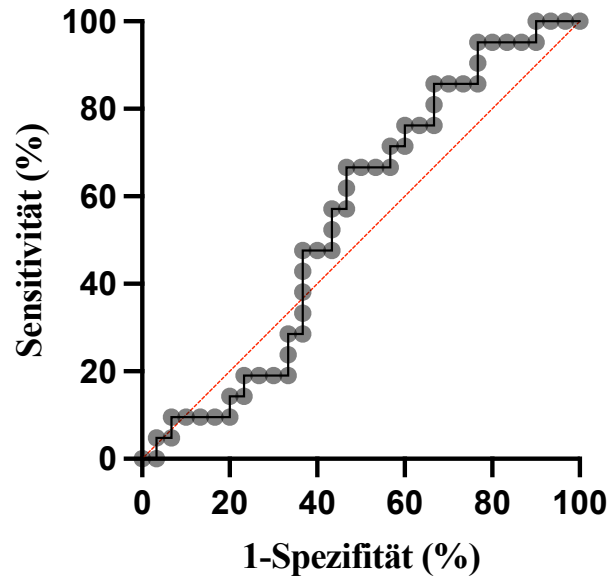


Abbildung 21: ROC-Kurve für die Unterscheidung zwischen laborchemisch gemessenen Anti-Xa-Aktivität (bei NMH) <0,2 IE/ml und einer Anti-Xa-Aktivität >0,2 IE/ml anhand von $CT_{INTEM}^{\text{®}}/CT_{HEPTEM}^{\text{®}}$ -Ratios' bei 20 Probanden

Graphische Darstellung als ROC-Kurve mit Sensitivität und Spezifität. Bei einer Ratio von >1,15 zeigt sich mit einer Sensitivität von 66,67% und einer Spezifität von 53,33% eine Anti-Xa-Aktivität >0,2 IE/ml.

Tabelle 17: Ergebnisse NMH Anti-Xa-Aktivität > 0,2 IE/ml Sensitivität und Spezifität $CT_{INTEM}^{\text{®}}/CT_{HEPTEM}^{\text{®}}$ -Ratio

Ratio	Sensitivität (%)	95% Konfidenzintervall	Spezifität (%)	95% Konfidenzintervall	Youden-Index
> 1.14	61,90	40,88% bis 79,25%	53,33	36,14% bis 69,77%	0,15
> 1.15	66,67	45,37% bis 82,81%	53,33	36,14% bis 69,77%	0,2
> 1.16	66,67	45,37% bis 82,81%	46,67	30,23% bis 63,86%	0,13

ROC Kurve - NMH $CT_{INTEM}^{\text{®}}/CT_{HEPTEM}^{\text{®}}$ -Ratio Anti-Xa-Aktivität >0,4 IE/ml

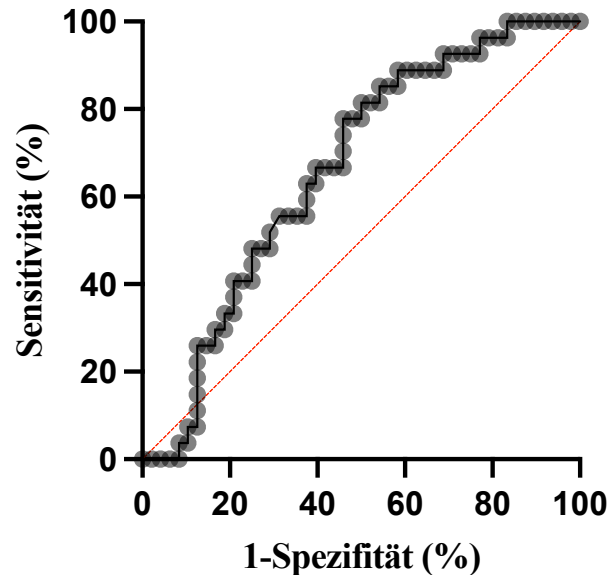


Abbildung 22: ROC-Kurve für die Unterscheidung zwischen laborchemisch gemessenen Anti-Xa-Aktivität (bei NMH) <0,4 IE/ml und einer Anti-Xa-Aktivität >0,4 IE/ml anhand von $CT_{INTEM}^{\text{®}}/CT_{HEPTEM}^{\text{®}}$ -Ratios' bei 20 Probanden

Graphische Darstellung als ROC-Kurve mit Sensitivität und Spezifität. Bei einer Ratio von >1,14 zeigt sich mit einer Sensitivität von 77,78% und einer Spezifität von 54,17% eine Anti-Xa-Aktivität >0,4 IE/ml.

Tabelle 18: Ergebnisse NMH Anti-Xa-Aktivität > 0,4 IE/ml Sensitivität und Spezifität $CT_{INTEM}^{\text{®}}/CT_{HEPTEM}^{\text{®}}$ -Ratio

Ratio	Sensitivität (%)	95% Konfidenzintervall	Spezifität (%)	95% Konfidenzintervall	Youden-Index
> 1.13	77,78	59,24% bis 89,39%	52,08	38,33% bis 65,53%	0,30
> 1.14	77,78	59,24% bis 89,39%	54,17	40,29% bis 67,42%	0,32
> 1.15	70,37	51,52% bis 84,15%	54,17	40,29% bis 67,42%	0,25

Abbildung 23 und Tabelle 19 zeigen die Auswertung einer ROC-Kurve für die $CT_{INTEM}^{\text{®}}/CT_{HEPTEM}^{\text{®}}$ -Ratio nach Zugabe von NMH in einer Konzentration von mehr als 0,1 IE/ml im direkten Vergleich mit der Kontrolle (keine Zugabe von NMH) unabhängig der gemessenen Anti-Xa-Aktivität. Die Substanz ließ sich bei einer Ratio von $< 1,10$ mit einer Sensitivität von 75% (95% KI: 65,70-82,45%) und einer Spezifität von 95% (95% KI: 76,39-99,74%) nicht mehr nachweisen ($p < 0,0001$, AUC 0,8633).

ROC Kurve - NMH $CT_{INTEM}^{\text{®}}/CT_{HEPTEM}^{\text{®}}$ -Ratio Kein NMH vs NMH $> 0,1$ IE/ml

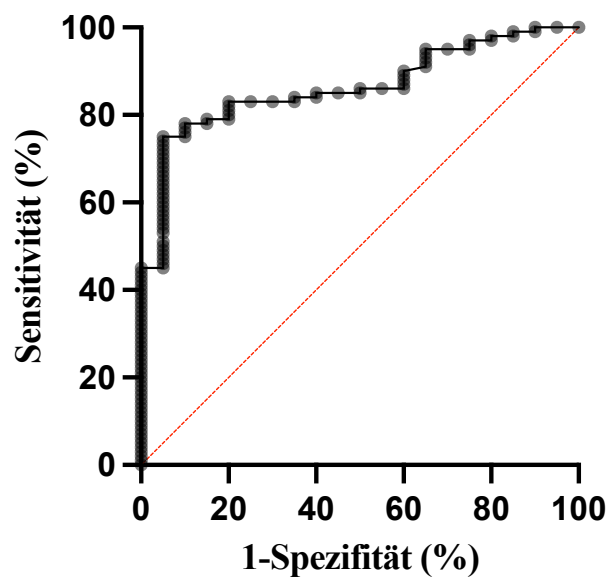


Abbildung 23: ROC-Kurve für die Unterscheidung zwischen Kontrolle (Keine Zugabe von NMH) und einer NMH-Konzentration $> 0,1$ IE/ml anhand von $CT_{INTEM}^{\text{®}}/CT_{HEPTEM}^{\text{®}}$ -Ratios' bei 20 Probanden
Graphische Darstellung als ROC-Kurve mit Sensitivität und Spezifität. Bei einer Ratio von $< 1,10$ konnte mit einer Sensitivität von 75,00% und einer Spezifität von 95,00% zwischen der Abwesenheit von NMH (Kontrolle) und einer NMH-Konzentration $> 0,1$ IE/ml unterschieden werden.

Tabelle 19: NMH-Kontrolle vs. NMH-Konzentration $> 0,1$ IE/ml Sensitivität und Spezifität $CT_{INTEM}^{\text{®}}/CT_{HEPTEM}^{\text{®}}$ -Ratio

Ratio	Sensitivität (%)	95% Konfidenzintervall	Spezifität (%)	95% Konfidenzintervall	Youden- Index
> 1.09	77,00	67,85% bis 84,16	90,00	69,90% bis 98,22%	0,67
> 1.10	75,00	65,70% bis 82,45%	95,00	76,39% bis 99,74%	0,70
> 1.11	73,00	63,57% bis 80,73%	95,00	76,39% bis 99,74%	0,68

3.2.7 Konzentrationsabhängiger Effekt von NMH auf die CT in NATEM®-Assays

Nach Zugabe von NMH zum Vollblut in vitro, zeigte sich eine konzentrationsabhängige Verlängerung der CT in NATEM®-Assays. Ab einer Vollblutkonzentration von 0,2 IE/ml war eine signifikante Verlängerung der CT (Median [25./75. Perzentile]: 1131s [1006;1324]) im Vergleich zur Kontrolle (Median [25./75. Perzentile]: 731s [636;774]) festzustellen ($p=0,0108$). Bei der geringeren, getesteten Vollblutkonzentrationen (d.h. 0,1 IE/ml) war keine statistische Signifikanz zu verzeichnen. Die CT zeigte jedoch bereits bei Zugabe von 0,1 IE/ml eine Verlängerung (Median [25./75. Perzentile]: 875s [798;1058]) (Abbildung 24 und Tabelle 20):

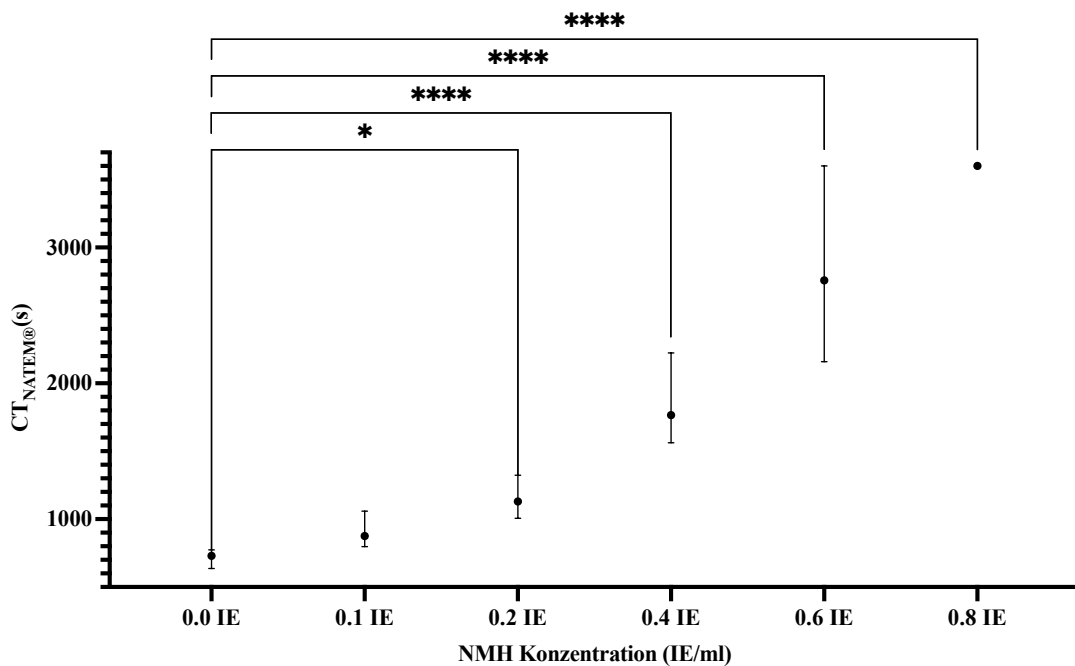


Abbildung 24: Konzentrationsabhängiger Effekt von NMH auf die CT in NATEM®-Assays bei 20 Probanden
Graphische Darstellung mit Median, 25. und 75. Perzentile. Kennzeichnung Signifikanz (*) $p=0,0108$, (****) $p<0,0001$ im Vergleich zur Kontrolle (0,0 IE/ml).

Tabelle 20: Effekte inkrementeller Konzentrationen von niedermolekularem Heparin auf die CT_{NATEM®}

Konzentration (IE/ml)	CT (s)		p Wert
	Median	25. / 75. Perzentile	
0.0	731	636 / 774	
0.1	875	798 / 1058	>0,9999
0.2	1131	1006 / 1324	0,0108
0.4	1766	1562 / 2224	<0,0001
0.6	2758	2159 / 3600	<0,0001
0.8	3600	3600 / 3600	<0,0001

3.2.8 Konzentrationsabhängiger Effekt von NMH auf die CT in NA-HEPTEM-Assays

Nach Zugabe von NMH zum Vollblut in vitro zeigte sich eine konzentrationsabhängige Verlängerung der CT in NA-HEPTEM-Assays. Ab einer Vollblutkonzentration von 0,8 IE/ml war eine signifikante Verlängerung der CT (Median [25./75. Perzentile]: 930s [852;1011]) im Vergleich zur Kontrolle (Median [25./75. Perzentile]: 747s [614;835]) festzustellen ($p < 0,0001$). Bei den geringeren, getesteten Vollblutkonzentrationen (d.h. 0,1 bis 0,6 IE/ml) war keine statistische Signifikanz zu verzeichnen (Abbildung 25 und Tabelle 21).

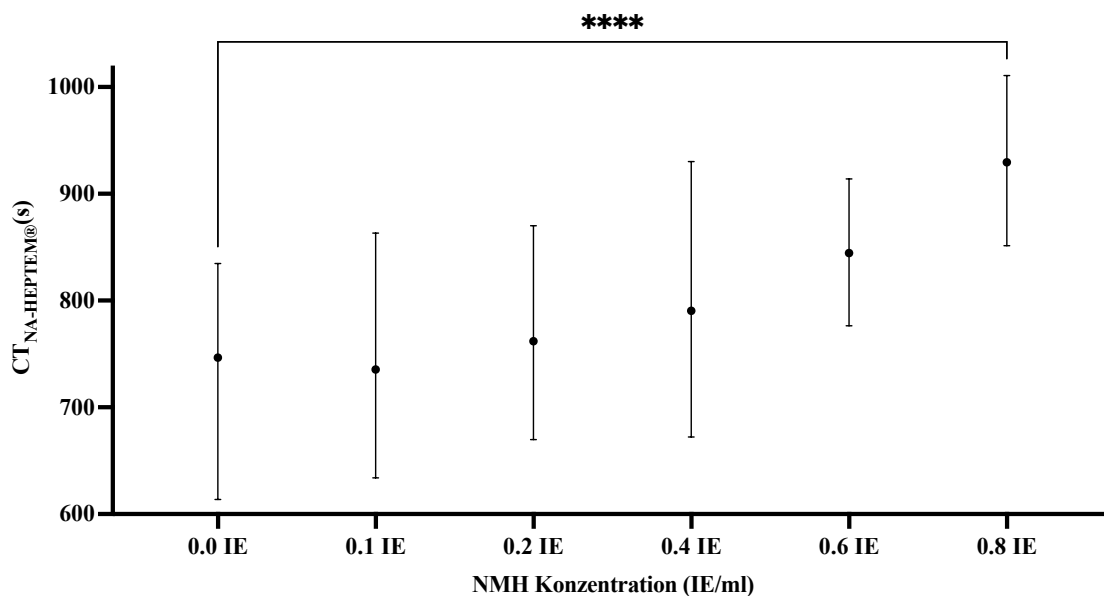


Abbildung 25: Konzentrationsabhängiger Effekt von NMH auf die CT in NA-HEPTEM-Assays bei 20 Probanden
Graphische Darstellung mit Median, 25. und 75. Perzentile. Kennzeichnung Signifikanz (****) $p < 0,0001$ im Vergleich zur Kontrolle (0,0 IE/ml).

Tabelle 21: Effekte inkrementeller Konzentrationen von niedermolekularem Heparin auf die CT_{NA-HEPTEM}

Konzentration (IE/ml)	CT (s)		p Wert
	Median	25. / 75. Perzentile	
0.0	747	614 / 835	
0.1	736	634 / 863	>0,9999
0.2	762	670 / 870	>0,9999
0.4	791	672 / 930	>0,9999
0.6	845	777 / 914	0,1899
0.8	930	852 / 1011	<0,0001

3.2.9 Konzentrationsabhängiger Effekt von NMH auf die $CT_{NATEM®}/CT_{NA-HEPTEM}$ -Ratios

Nach Zugabe von NMH zum Vollblut in vitro, zeigte sich ein konzentrationsabhängiger Anstieg der $CT_{NATEM®}/CT_{NA-HEPTEM}$ -Ratio. Ab einer Vollblutkonzentration von 0,2 IE/ml war ein signifikanter Anstieg der Ratio (Median [25./75. Perzentile]: 1,50 [1,43;1,60]) im Vergleich zur Kontrolle (Median [25./75. Perzentile]: 0,99 [0,93;1,02]) festzustellen ($p=0,0147$). Bei der geringeren, getesteten Vollblutkonzentrationen (d.h. 0,1 IE/ml) war keine statistische Signifikanz zu verzeichnen. Die Ratio zeigte jedoch bereits bei Zugabe von 0,1 IE/ml einen Anstieg (Median [25./75. Perzentile]: 1,26 [1,14;1,39]) (Abbildung 26 und Tabelle 22)-

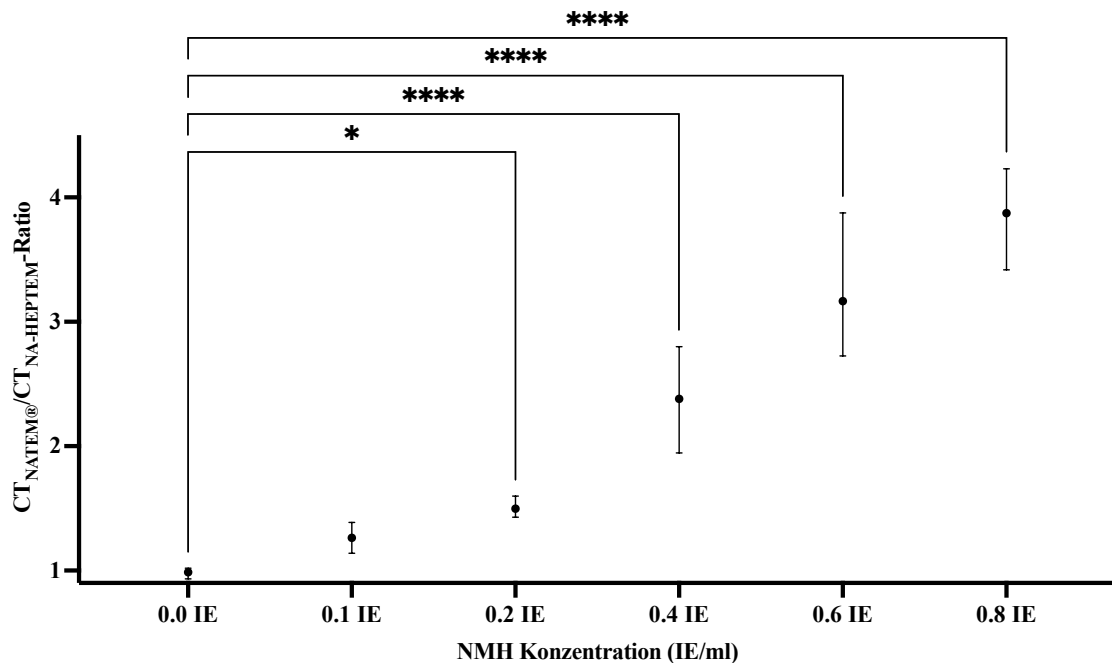


Abbildung 26: Konzentrationsabhängiger Effekt von NMH auf die $CT_{NATEM®}/CT_{NA-HEPTEM}$ -Ratio bei 20 Probanden

Graphische Darstellung mit Median, 25. und 75. Perzentile. Kennzeichnung Signifikanz (*) $p=0,0147$, (****) $p<0,0001$ im Vergleich zur Kontrolle (0,0 IE/ml).

Tabelle 22: Effekte inkrementeller Konzentrationen von niedermolekularem Heparin auf die $CT_{NATEM\textcircled{R}}/CT_{NA-HEPTEM}$ -Ratio

Konzentration (IE/ml)	$CT_{NATEM\textcircled{R}}/CT_{NA-HEPTEM}$-Ratio		p Wert
	Median	25. / 75. Perzentile	
0.0	0,99	0,93 / 1,02	
0.1	1,26	1,14 / 1,39	>0,9999
0.2	1,50	1,43 / 1,60	0,0147
0.4	2,38	1,95 / 2,80	<0,0001
0.6	3,17	2,73 / 3,88	<0,0001
0.8	3,87	3,42 / 4,23	<0,0001

3.2.10 Konzentrationsabhängiger Effekt von NMH auf die Anti Xa-Aktivität

Nach Zugabe von NMH zum Vollblut in vitro, zeigte sich ein konzentrationsabhängiger Anstieg der Anti-Xa-Aktivität. Ab einer Vollblutkonzentration von 0,2 IE/ml war ein signifikanter Anstieg der Anti-Xa-Aktivität (Median [25./75. Perzentile]: 0,31 IE/ml [0,22;0,33]) im Vergleich zur Kontrolle (Median [25./75. Perzentile]: 0,09 IE/ml [0,09;0,09]) festzustellen ($p=0,0352$). Die Zugabe von 0,4 IE/ml NMH je Milliliter humanem Vollblut, resultierte im Median in einer laborchemisch gemessenen Anti-Xa-Aktivität von 0,58 IE/ml ([25./75. Perzentile]: [0,35;0,67]) (Abbildung 27 und Tabelle 23):

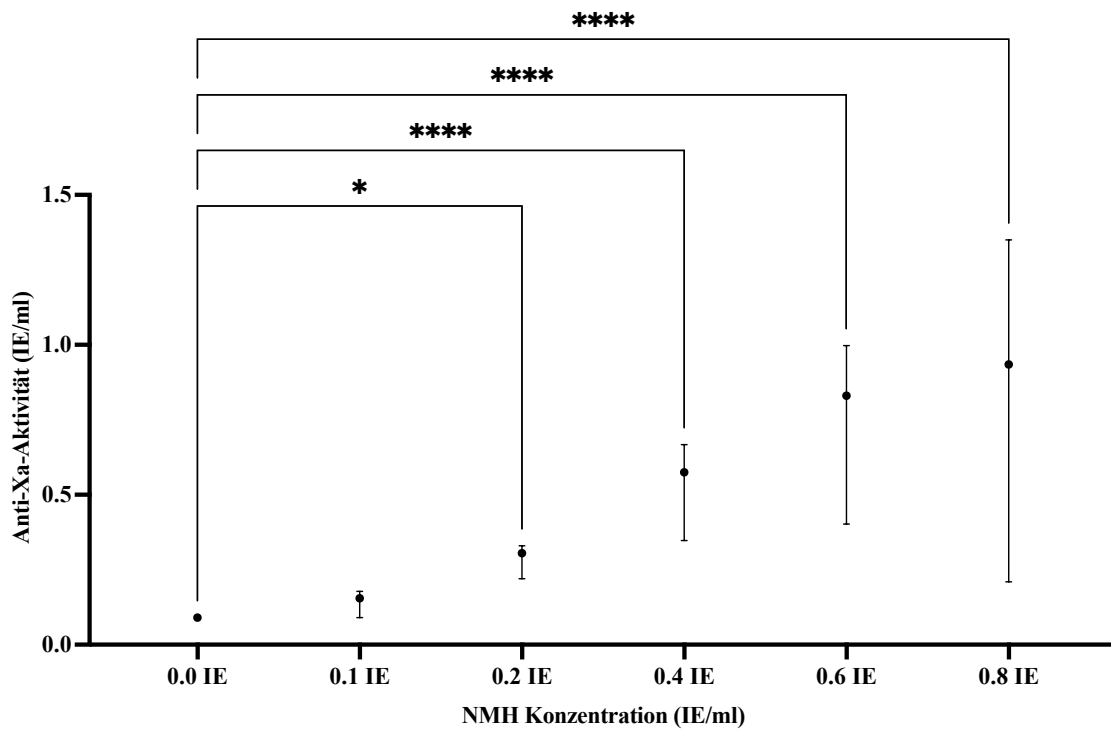


Abbildung 27: Konzentrationsabhängiger Effekt von NMH auf die Anti-Xa-Aktivität bei 20 Probanden
Graphische Darstellung mit Median, 25. und 75. Perzentile. Kennzeichnung Signifikanz (*) $p=0,0352$,
(****) $p<0,0001$ im Vergleich zur Kontrolle (0,0 IE/ml).

Tabelle 23: Effekte inkrementeller Konzentrationen von niedermolekularem Heparin auf die Anti-Xa-Aktivität

Konzentration (IE/ml)	Anti-Xa-Aktivität (IE/ml)		p Wert
	Median	25. / 75. Perzentile	
0.0	0,09	0,09 / 0,09	
0.1	0,16	0,09 / 0,18	>0,9999
0.2	0,31	0,22 / 0,33	0,0352
0.4	0,58	0,35 / 0,67	<0,0001
0.6	0,83	0,40 / 1,00	<0,0001
0.8	0,94	0,21 / 1,35	<0,0001

3.2.11 Übersicht NMH $CT_{\text{NATEM}}/CT_{\text{NA-HEPTEM}}$ -Ratio und Anti-Xa-Aktivität

Für NMH zeigte sich in der Kontrollgruppe ohne Heparinzugabe (Tabelle 24), dass die Anti-Xa-Aktivität in allen Fällen $<0,1$ IE/ml war. Zusätzlich zeigte sich, dass obwohl NMH vorhanden war, auch Anti-Xa-Aktivitäten $<0,1$ IE/ml gemessen wurden (z.B. NMH-Konzentration bei $0,8$ IE/ml; 3 von 20 Messungen mit einer Anti-Xa-Aktivität $<0,1$ IE/ml).

Tabelle 24: Übersicht NMH $CT_{\text{NATEM}}/CT_{\text{NA-HEPTEM}}$ -Ratio, Anti-Xa-Aktivität und Anzahl Anti-Xa-Aktivität $<0,1$ IE/ml

NMH	$CT_{\text{NATEM}}/CT_{\text{NA-HEPTEM}}$ -Ratio		Anti-Xa-Aktivität (IE/ml)		Anzahl Anti-Xa-Aktivität $<0,1$ IE/ml
	Konzentration (IE/ml)	Median	25. / 75. Perzentile	Median	
0.0	0,99	0,93 / 1,02	0,09	0,09 / 0,09	20/20
0.1	1,26	1,14 / 1,39	0,16	0,09 / 0,18	8/20
0.2	1,50	1,43 / 1,60	0,31	0,22 / 0,33	3/20
0.4	2,38	1,95 / 2,80	0,58	0,35 / 0,67	2/20
0.6	3,17	2,73 / 3,88	0,83	0,40 / 1,00	2/20
0.8	3,87	3,42 / 4,23	0,94	0,21 / 1,35	3/20

3.2.12 Ergebnisse der ROC-Analyse zur Vorhersage des Vorhandenseins von NMH (>0,1 IE/ml) anhand der $CT_{\text{NATEM}}/CT_{\text{NA-HEPTEM}}$ -Ratios

Abbildung 28 und Tabelle 25 zeigen die Ergebnisse der ROC-Analyse für die nach Zugabe von NMH (alle Wertepaare mit einer Anti-Xa Aktivität >0,1 IE/ml) im Vergleich zur Kontrolle (keine Zugabe von NMH). Anhand einer $CT_{\text{NATEM}}/CT_{\text{NA-HEPTEM}}$ -Ratio von > 1,16 konnte das Vorhandensein von NMH mit einer Sensitivität von 93,90% (95% KI: 86,51-97,37%) und einer Spezifität von 100% (95% KI: 83,89-100%) nachgewiesen werden (AUC 0,98; $p < 0,0001$). Aus Abbildung 29 und Tabelle 26 ist ersichtlich, dass bei einer $CT_{\text{NATEM}}/CT_{\text{NA-HEPTEM}}$ -Ratio > 1,30 eine Anti-Xa-Aktivität >0,2 IE/ml (prophylaktischer Bereich) mit einer Sensitivität von 90,48% (95% KI: 71,09-98,31%) und einer Spezifität von 37,50% (95% KI: 22,93-54,75%) nachgewiesen werden konnte (AUC 0,56; $p = 0,4342$).

Aus Abbildung 30 und Tabelle 27 ist ersichtlich, dass bei einer $CT_{\text{NATEM}}/CT_{\text{NA-HEPTEM}}$ -Ratio > 2,07 eine Anti-Xa-Aktivität >0,4 IE/ml (therapeutischer Bereich) mit einer Sensitivität von 89,36% (95% KI: 77,41-95,37%) und einer Spezifität von 81,13% (95% KI: 68,64,29-89,41%) nachgewiesen werden konnte (AUC 0,85; $p < 0,0001$).

ROC Kurve - NMH $CT_{NATEM^{\circledR}}/CT_{NA-HEPTEM}$ -Ratio Kein NMH vs Anti-Xa-Aktivität >0,1 IE/ml

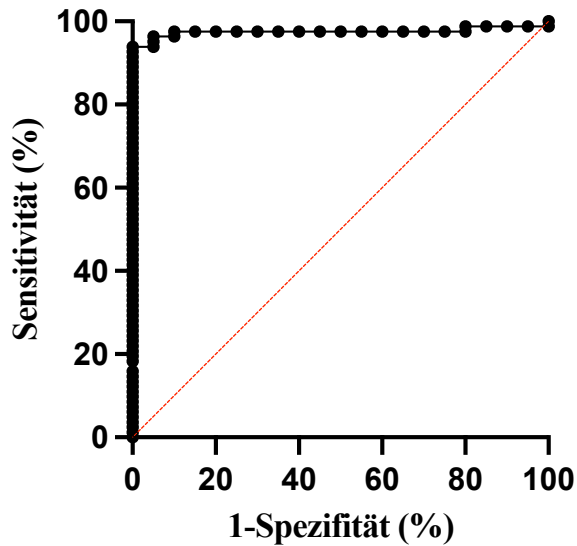


Abbildung 28: ROC-Kurve für die Unterscheidung zwischen Kontrolle (Keine Zugabe von NMH) und einer laborchemisch gemessenen Anti-Xa-Aktivität >0,1 IE/ml anhand von $CT_{NATEM^{\circledR}}/CT_{NA-HEPTEM}$ -Ratios' bei 20 Probanden

Graphische Darstellung als ROC-Kurve mit Sensitivität und Spezifität. Bei einer Ratio von <1,16 konnte mit einer Sensitivität von 93,90% und einer Spezifität von 100% zwischen der Abwesenheit von NMH (Kontrolle) und einer laborchemisch gemessenen Anti-Xa-Aktivität (>0,1 IE/ml) unterschieden werden.

Tabelle 25: NMH-Kontrolle vs. Anti-Xa-Aktivität >0,1 IE/ml Sensitivität und Spezifität $CT_{NATEM^{\circledR}}/CT_{NA-HEPTEM}$ -Ratio

Ratio	Sensitivität (%)	95% Konfidenzintervall	Spezifität (%)	95% Konfidenzintervall	Youden-Index
> 1.15	93,90	86,51% bis 97,37%	95,00	76,39% bis 99,74%	0,89
> 1.16	93,90	86,51% bis 97,37%	100	83,89% bis 100%	0,94
> 1.21	92,68	84,94% bis 96,60%	100	83,89% bis 100%	0,93

ROC Kurve - NMH $CT_{NATEM^{\circledR}}/CT_{NA-HEPTEM}$ -Ratio Anti-Xa-Aktivität >0,2 IE/ml

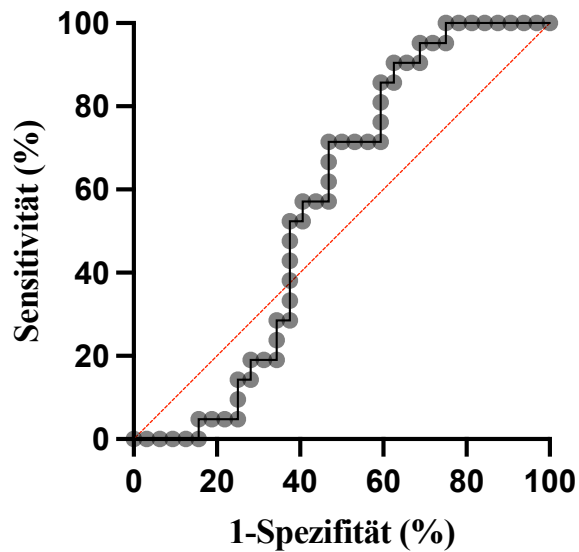


Abbildung 29: ROC-Kurve für die Unterscheidung zwischen laborchemisch gemessenen Anti-Xa-Aktivität (bei NMH) <0,2 IE/ml und einer Anti-Xa-Aktivität >0,2 IE/ml anhand von $CT_{NATEM^{\circledR}}/CT_{NA-HEPTEM}$ -Ratios' bei 20 Probanden

Graphische Darstellung als ROC-Kurve mit Sensitivität und Spezifität. Bei einer Ratio von >1,30 zeigt sich mit einer Sensitivität von 90,48% und einer Spezifität von 37,50% eine Anti-Xa-Aktivität >0,2 IE/ml.

Tabelle 26: Ergebnisse NMH Anti-Xa-Aktivität >0,2 IE/ml Sensitivität und Spezifität $CT_{NATEM^{\circledR}}/CT_{NA-HEPTEM}$ -Ratio

Ratio	Sensitivität (%)	95% Konfidenzintervall	Spezifität (%)	95% Konfidenzintervall	Youden-Index
> 1.29	90,48	71,09% bis 98,31%	34,38	20,41% bis 51,69%	0,25
> 1.30	90,48	71,09% bis 98,31%	37,50	22,93% bis 54,75%	0,28
> 1.31	85,71	65,36% bis 95,02%	37,50	22,93% bis 54,75%	0,23

ROC Kurve - NMH $CT_{NATEM®}/CT_{NA-HEPTEM}$ -Ratio Anti-Xa-Aktivität >0,4 IE/ml

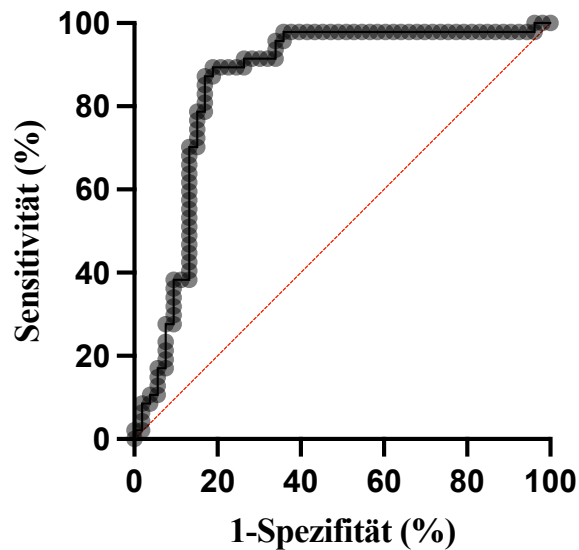


Abbildung 30: ROC-Kurve für die Unterscheidung zwischen laborchemisch gemessenen Anti-Xa-Aktivität (bei NMH) <0,4 IE/ml und einer Anti-Xa-Aktivität >0,4 IE/ml anhand von $CT_{NATEM®}/CT_{NA-HEPTEM}$ -Ratios' bei 20 Probanden

Graphische Darstellung als ROC-Kurve mit Sensitivität und Spezifität. Bei einer Ratio von >2,07 zeigt sich mit einer Sensitivität von 89,36% und einer Spezifität von 81,13% eine Anti-Xa-Aktivität >0,4 IE/ml.

Tabelle 27: Ergebnisse NMH Anti-Xa-Aktivität >0,4 IE/ml Sensitivität und Spezifität $CT_{NATEM®}/CT_{NA-HEPTEM}$ -Ratio

Ratio	Sensitivität (%)	95% Konfidenzintervall	Spezifität (%)	95% Konfidenzintervall	Youden-Index
> 2.03	89,36	77,41% bis 95,37%	79,25	66,54% bis 88,00%	0,69
> 2.07	89,36	77,41% bis 95,37%	81,13	68,64% bis 89,41%	0,70
> 2.20	87,23	74,83% bis 94,02%	81,13	68,64% bis 89,41%	0,68

Abbildung 31 und Tabelle 28 zeigen die ROC-Analyse für die $CT_{NATEM^{\circledR}}/CT_{NA-HEPTEM}$ -Ratio nach Zugabe von NMH in einer Konzentration von mehr als 0,1 IE/ml im direkten Vergleich mit der Kontrolle (keine Zugabe von NMH) unabhängig der gemessenen Anti-Xa-Aktivität. Die Substanz ließ sich bei einer Ratio von $> 1,08$ mit einer Sensitivität von 97% (95% KI: 91,55-99,18%) und einer Spezifität von 95% (95% KI: 76,39-99,74%) nachweisen ($p < 0,0001$, AUC 0,9780).

**ROC Kurve - NMH $CT_{NATEM^{\circledR}}/CT_{NA-HEPTEM}$ -Ratio
Kein NMH vs NMH $> 0,1$ IE/ml**

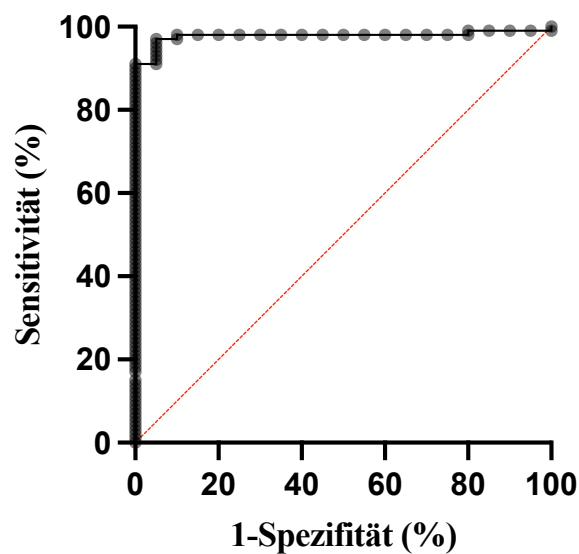


Abbildung 31: ROC-Kurve für die Unterscheidung zwischen Kontrolle (Keine Zugabe von NMH) und einer NMH-Konzentration $> 0,1$ IE/ml anhand von $CT_{NATEM^{\circledR}}/CT_{NA-HEPTEM}$ -Ratios' bei 20 Probanden
Graphische Darstellung als ROC-Kurve mit Sensitivität und Spezifität. Bei einer Ratio von $< 1,08$ konnte mit einer Sensitivität von 97,00% und einer Spezifität von 95,00% zwischen der Abwesenheit von NMH (Kontrolle) und einer NMH-Konzentration $> 0,1$ IE/ml unterschieden werden.

Tabelle 28: NMH-Kontrolle vs. NMH-Konzentration $> 0,1$ IE/ml Sensitivität und Spezifität $CT_{NATEM^{\circledR}}/CT_{NA-HEPTEM}$ -Ratio

Ratio	Sensitivität (%)	95% Konfidenzintervall	Spezifität (%)	95% Konfidenzintervall	Youden-Index
> 1.05	97,00	91,55% bis 99,18%	90,00	69,90% bis 98,22%	0,87
> 1.08	97,00	91,55% bis 99,18%	95,00	76,39% bis 99,74%	0,92
> 1.12	96,00	90,16% bis 98,43%	95,00	76,39% bis 99,74%	0,91

4 DISKUSSION

Ziel dieser Arbeit war es eine bettseitig anwendbare Methode zu validieren, die relevante Vollblutkonzentrationen von UFH und NMH ausschließt und zusätzlich Konzentrationen wie bei einer therapeutischen Antikoagulation abschätzt. Hierzu wurde Blut von 20 gesunden Probanden *in vitro* mit unterschiedliche Vollblutkonzentrationen von UFH (0,0; 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,2; 1,6 IE/ml) und NMH (0,0; 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 IE/ml) versetzt und der Effekt der unterschiedlichen Konzentrationen auf die Ergebnisvariablen im ROTEM® untersucht. Es erfolgte eine Bestimmung der CT in ROTEM®-Assays (INTEM®, HEPTEM®, NATEM® und NA-HEPTEM-Assay) und die Bestimmung der Anti-Xa-Aktivität. Zusätzlich wurde der Quotient der CTs korrespondierender Assays ($CT_{\text{INTEM}^\circledast}/CT_{\text{HEPTEM}^\circledast}$ für UFH/NMH und $CT_{\text{NATEM}^\circledast}/CT_{\text{NA-HEPTEM}}$ für NMH) als sog. Ratios bestimmt.

Hierbei zeigte sich eine konzentrationsabhängige unterschiedlich stark ausgeprägte Verlängerung der Gerinnungszeiten (Clotting Time (CT)) thrombelastometrischer Vollblut-Assays ($CT_{\text{INTEM}^\circledast}$, $CT_{\text{HEPTEM}^\circledast}$, $CT_{\text{NATEM}^\circledast}$, $CT_{\text{NA-HEPTEM}}$). Es zeigte sich, dass die Gerinnungszeiten thrombelastometrischer Assays ohne Heparinase (INTEM® und NATEM®), bereits ab der geringsten verwendeten Vollblutkonzentrationen von UFH und NMH (0,1 IE/ml) konzentrationsabhängig verlängert wurden. Signifikante Unterschiede zur Kontrolle zeigten sich für UFH im INTEM®-Assay ab 0,4 IE/ml ($p=0,0039$), für NMH im INTEM®-Assay ab 0,4 IE/ml ($p=0,0035$) und für NMH im NATEM®-Assay ab 0,2 IE/ml ($p=0,0108$). Sowohl für die NMH als auch für UFH waren konzentrationsabhängige Verlängerung der CTs in INTEM®-Assays festzustellen. In ähnlicher Weise konnte für die NMH eine eher noch ausgeprägtere, konzentrationsabhängige Verlängerung der CTs in NATEM®-Assays festgestellt werden.

Für die thrombelastometrischen Assays mit Heparinase (HEPTEM® und NA-HEPTEM) zeigte sich keine ausgeprägte Verlängerung der CTs. Ein signifikanter Unterschied zur Kontrolle zeigte sich erst ab einer Vollblutkonzentration von UFH 1,2 IE/ml ($p=0,0004$) und NMH 0,8 IE/ml ($CT_{\text{HEPTEM}^\circledast} p=0,0018$; $CT_{\text{NA-HEPTEM}} p<0,0001$). In allen Messungen zeigten sich normwertige Variablen, bezogen auf die Referenzwerte der CTs für UFH, da die Heparinase die Wirkung der zugesetzten Heparine inaktivierte.

Aus den jeweiligen CTs der Vollblutkonzentrationen von UFH und NMH wurde eine Ratio aus $CT_{\text{INTEM}}^{\text{®}}$ zur korrespondierenden $CT_{\text{HEPTEM}}^{\text{®}}$, bzw. bei NMH von $CT_{\text{NATEM}}^{\text{®}}$ zur korrespondierenden $CT_{\text{NA-HEPTEM}}$ gebildet. Diese Ergebnisse sind aus mehreren Gründen von klinischer Relevanz. Anhand einer $CT_{\text{INTEM}}^{\text{®}}/CT_{\text{HEPTEM}}^{\text{®}}$ -Ratio für UFH bzw. bei einer $CT_{\text{NATEM}}^{\text{®}}/CT_{\text{NA-HEPTEM}}$ -Ratio für NMH ist es möglich, klinisch relevante Konzentrationen ($<$ bzw. $>$ 0,1 IE/ml (Anti-Xa-Aktivität)) von UFH nachzuweisen bzw. auszuschließen. Des Weiteren lassen eine $CT_{\text{INTEM}}^{\text{®}}/CT_{\text{HEPTEM}}^{\text{®}}$ -Ratio für UFH bzw. bei einer $CT_{\text{NATEM}}^{\text{®}}/CT_{\text{NA-HEPTEM}}$ -Ratio für NMH abschätzen, ab wann eine Vollblutkonzentration vorliegt, die im klinischen Kontext als im therapeutischen Bereich (Anti-Xa-Aktivität $>$ 0,3 IE/ml UFH; $>$ 0,4 IE/ml NMH) liegend angesehen werden kann.

Die in dieser Studie verwendete Rotationsthrombelastometrie ist ein in der klinischen Routine bereits vielfach etabliertes Point-of-Care Messverfahren zur Analyse der Hämostase im Vollblut. Gerade in der Herz-Thorax-Chirurgie stellte es ein Verfahren dar, dass von einigen Zentren eingesetzt wird (Karrar et al., 2022). Die Vorteile der ROTEM[®]-Analyse liegen in der Differenzierung therapierelevanter Veränderungen der Blutgerinnung binnen weniger Minuten, wodurch eine rasche und zielgerichtete Gerinnungstherapie begonnen und der Erfolg unmittelbar reevaluiert werden kann (Whiting et al., 2015). Hierdurch lassen sich die Anzahl von Bluttransfusionen (Erythrozyten-, Plasma- und Thrombozytenkonzentrate) reduzieren und möglicherweise die Mortalität senken (Liu et al., 2024). Der Nachteil liegt darin, dass zum einen ausgebildetes Personal, das geschult im Umgang mit der Verarbeitung von Proben und der Interpretation notwendig ist (Gasciauskaite et al., 2023) und zum anderen, dass eine Untersuchung im Vergleich mit klassischen Labortests teurer ist (Prakash et al., 2016). Die Messung der Anti-Xa-Aktivität ist ein Verfahren, das zur Therapiesteuerung des prophylaktischen und therapeutischen Bereichs bei der Anwendung von UFH und NMH eingesetzt werden kann. Eine routinemäßige Messung der Anti-Xa-Aktivität wird allerdings nicht durchgeführt oder empfohlen (Hutt Centeno et al., 2019). Die plasmatische Bestimmung der Anti-Xa-Aktivität hat hingegen den Vorteil eines kalibrierten Verfahrens, welches verlässlich eine bestimmte Heparinwirkung über eine indirekte Messung der Anti-Xa-Aktivität ermöglicht. Der Nachteil liegt in der nicht immer verfügbaren Messmöglichkeit. Nicht alle Labore bieten eine zeitnahe Bestimmung

rund um die Uhr an. Darüber hinaus ist die Dauer der Anti-Xa-Aktivitätsbestimmung abhängig von der Transportzeit in das Labor und der entsprechenden Dauer der Testdurchführung. Die Bestimmung der Anti-Xa-Aktivität bietet sich vor allem für das ambulante und stationäre Umfeld an, da die Wirkung von NMH nicht regelmäßig überwacht werden muss (Hirsh et al., 2001). Zusammenfassend stellt die Bestimmung der Anti-Xa-Aktivität ein Verfahren dar, dass nur durch ein Labor durchgeführt werden kann und hierdurch zeitaufwendig ist. Je nach klinischer Situation, z.B. bei dringlicher Anwendung von Interventionen, wie rückenmarksnaher Regionalanästhesien oder in Notfallsituationen, in denen zeitkritisch ein Ergebnis notwendig ist, stellt die Bestimmung der Anti-Xa-Aktivität kein optimales Vorgehen dar. Eine zeitnahe Messung mithilfe eines POCT würde diese erhebliche klinische Versorgungslücke schließen können.

Bereits 2006 konnte gezeigt werden, dass sich im TEG® eine Verlängerung der r-Zeit (entspricht der CT im ROTEM® (Tekkesin et al., 2015) bereits bei einer Anti-Xa-Aktivität $< 0,1$ IE/ml bei UFH zeigt. Hierbei zeigte sich gerade bei dem TEG® eine deutlich höhere Sensitivität für den Nachweis von UFH als für die aPTT und die Anti-Xa-Aktivität (Coppell et al., 2006). In der vorliegenden Studie konnten diese Ergebnisse für die ROTEM®-Analyse mithilfe einer $CT_{INTEM®}/CT_{HEPTEM®}$ - bzw. $CT_{NATEM®}/CT_{NAHEPTEM}$ -Ratio in Bezug auf die Anti-Xa-Aktivität bestätigt und darüber hinaus auch für NMH gezeigt werden. In einer Studie von 1997 konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass die Sensitivität der ACT-Messung im direkten Vergleich mit der aPTT und der TEG geringer für den Nachweis einer Rest-Heparinwirkung ist (Murray et al., 1997).

In den nachfolgenden Jahren zeigte sich ein zunehmender Einsatz des ROTEM® zum Nachweis einer Rest-Heparinwirkung. Eine immer größer werdende Rolle spielte dabei die Anwendung einer $CT_{INTEM®}/CT_{HEPTEM®}$ -Ratio. Die $CT_{INTEM®}/CT_{HEPTEM®}$ -Ratio ermöglicht es z.B. in der Herzchirurgie, Restwirkungen von UFH nachzuweisen (Pavoni et al., 2022). Mittlerweile wurden Algorithmen zur Detektion der Rest-Heparinwirkung in der Herzchirurgie mittels der ROTEM®-Analyse etabliert (Görlinger et al., 2019). In diesem Algorithmus wird jedoch eine $CT_{HEPTEM®}/CT_{INTEM®}$ -Ratio genutzt. Ist diese $< 0,8$ wird die Gabe von Protamin empfohlen (Weber et al., 2012). Überträgt man dieses auf eine $CT_{INTEM®}/CT_{HEPTEM®}$ -Ratio, so entspräche dies einer Ratio von $> 1,25$. Die hier

vorliegende Studie kann diesen Algorithmus für eine Heparinwirkung in Bezug auf eine Anti-Xa-Aktivität bestätigen. Bei einer Ratio von $> 1,26$ liegt mit einer Sensitivität von 100% und einer Spezifität von 100% eine Heparinwirkung in Bezug auf die Anti-Xa-Aktivität ($>0,1$ IE/ml) vor. Vergleicht man es mit minimalen Heparinkonzentration im Vollblut ($0,1$ IE/ml UFH) liegt schon bei einer Ratio $>1,13$ mit einer Sensitivität von 100% und einer Spezifität von 95% eine Heparinwirkung vor. Es konnte bereits gezeigt werden, dass schon eine $CT_{INTEM^{\circledR}}/CT_{HEPTEM^{\circledR}}$ -Ratio $>1,0$ für eine UFH Heparinwirkung spricht (Mittermayr et al., 2005). Eine Limitierung der $CT_{INTEM^{\circledR}}/CT_{HEPTEM^{\circledR}}$ -Ratio zeigt sich jedoch in der Kinderherzchirurgie. Dort konnte nach Antagonisierung des UFH keine Aussage über die Notwendigkeit einer erneuten Protamingabe getroffen werden (Willems et al., 2016).

In letztgenannter Studie hätte möglicherweise die $CT_{INTEM^{\circledR}}/CT_{HEPTEM^{\circledR}}$ -Ratio zu einem späteren Zeitpunkt wieder eingesetzt werden können. Die Limitation dieser Ratio scheint vor allem unmittelbar nach Protamingabe zu bestehen. Vermutlich lässt sich eine bessere Aussage treffen, wenn genügend zeitlicher Abstand zwischen Protamingabe und erneuter Messung gegeben ist (Wand et al., 2020).

In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass anhand der $CT_{INTEM^{\circledR}}/CT_{HEPTEM^{\circledR}}$ -Ratios in weniger als 10 Minuten die Vollblutkonzentrationen von UFH $> 0,1$ IE/ml auszuschließen sind. Bei einer $CT_{INTEM^{\circledR}}/CT_{HEPTEM^{\circledR}}$ -Ratio $< 1,26$ eine Anti-Xa-Aktivität von UFH $>0,1$ IE/ml mit einer Sensitivität von 100% und einer Spezifität von 100% ausgeschlossen werden. Bemerkenswert ist, dass im chromogenen Assay zur Bestimmung der Anti-Xa-Aktivität bei 19 von 20 Proben eine Anti-Xa-Aktivität $<0,1$ IE/ml gemessen wurde, obwohl eine Heparinkonzentration von $0,1$ IE/ml Vollblut vorlag. Die $CT_{INTEM^{\circledR}}/CT_{HEPTEM^{\circledR}}$ -Ratio scheint in diesem Kontext noch sensitiver für die Bestimmung von minimalen Heparinkonzentrationen zu sein. In Bezug auf tatsächlich vorhandenes UFH kann erst ab einer Ratio von $<1,13$ mit einer Sensitivität von 100% und einer Spezifität von 95% eine Heparinwirkung ausgeschlossen werden. Zusätzlich zeigten sich in höheren Konzentrationen von UFH bis $1,6$ IE/ml auch Anti-Xa-Aktivitäten $<0,1$ IE/ml (z.B. bei $1,6$ IE/ml $2/20$ Messungen mit einer Anti-Xa-Aktivität $<0,1$ IE/ml) obwohl UFH in der Probe vorlag. Dies ist insofern problematisch, als dass die Anti-Xa-Aktivität von $0,1$ IE/ml gemäß nationalen und internationalen

Empfehlungen beispielhaft die Grenze darstellt, ab der neuraxiale Punktionen unter UFH-Therapie erfolgen können (Aase and Rosseland, 2023; DGAI, 2014). Die vorliegenden Ergebnisse ermöglichen nun auch die bettseitige Überwachung einer Therapie mit UFH: Bei einer $CT_{INTEM}^{\text{®}}/CT_{HEPTEM}^{\text{®}}$ -Ratio von $>1,91$ liegt mit einer Sensitivität von 88,46% und einer Spezifität von 67,8% eine therapeutische Antikoagulation (Anti-Xa-Aktivität $>0,3$ IE/ml) vor. Dementsprechend kann man anhand der vorliegenden Ergebnisse nicht nur eine relevante UFH-Wirkung ausschließen, sondern auch sowohl eine Unterdosierung von UFH mit konsekutiver Erhöhung des Thromboserisikos, als auch eine Überdosierung mit damit einhergehendem Blutungsrisiko vermeiden. Eine derartige Überdosierung von UFH mit einer Anti-Xa-Aktivität über 0,75 IE/ml erhöht das Blutungsrisiko und ließe sich ab einer $CT_{INTEM}^{\text{®}}/CT_{HEPTEM}^{\text{®}}$ -Ratio von $>3,39$ (Sensitivität 87,23; Spezifität 84,95) vermuten (Descamps et al., 2021). Eine Limitation der $CT_{INTEM}^{\text{®}}/CT_{HEPTEM}^{\text{®}}$ -Ratio zeigt sich in höheren Konzentrationsbereichen von über 1,2 IE/ml. In diesen supratherapeutischen Dosierungen zeigt sich bereits eine signifikante Verlängerung der $CT_{HEPTEM}^{\text{®}}$. Mutmaßlich reicht entweder die Menge an Heparinase im entsprechenden Assay nicht aus, um die gesamte Wirkung des UFH zu spalten oder aber die Spaltprodukte zeigen weiterhin eine gerinnungsaktive Wirkung. Das INTEM[®]-Assay allein kann aber auch in dieser Situation zum Monitoring hoher Heparinkonzentrationen während einer Herz-Lungen-Maschine eingesetzt werden (Gronchi et al., 2014).

Die Möglichkeit eines Nachweises NMH mithilfe viskoelastischer Testverfahren wie der Rotationsthrombelastometrie wurde anfänglich kontrovers diskutiert. Mithilfe der TEG[®]-Analyse scheint sich anhand eines verlängerten r-Wert ein NMH-Effekt zu zeigen (Babin et al., 2017; Jackson et al., 2009; Klein et al., 2000) und eine Korrelation zwischen dem r-Wert und der Anti-Xa-Aktivität (Klein et al., 2000) zu bestehen. Dies konnte später nochmals bestätigt werden, eine signifikante Korrelation zur Anti-Xa-Aktivität zeigte sich jedoch nicht (White et al., 2012). Weitere Versuche, NMH mit dem TEG[®] zu detektieren, zeigten einen Zusammenhang zwischen der Anti-Xa-Aktivität und dem Coagulation Index (produzierter Wert aus r-Zeit, k-Zeit, maximaler Amplitude und Alpha Winkel). Auch hier gelang keine Korrelation zu einer bestimmten Dosis von NMH (Tekkesin et al., 2015).

Für die ROTEM® konnte, in mehreren Studien, eine dosisabhängige (NMH) Verlängerung der CT im INTEM® gezeigt werden (Pavoni et al., 2022). In einer in vitro Untersuchung, bei der dem Blut von Patienten einer Intensivstation Enoxaparin (0,2; 0,4; und 0,6 IE/ml) hinzugefügt wurde, konnte gezeigt werden, dass Enoxaparin zu einer konzentrationsabhängigen Verlängerung der CT in INTEM®- und NATEM®-Assays führt (Ölander and Schött, 2021). Eine signifikante Verlängerung der CT war in beiden Assays erst ab einer Vollblutkonzentration von 0,4 IE/ml zu verzeichnen. Diese Beobachtungen sind im Wesentlichen identisch mit den in der vorliegenden Studie gemachten. Während Ölander und Schött jedoch darauf abzielten eine Korrelation unterschiedlicher viskoelastischer Messvariablen mit der exogen hinzugefügten Vollblutkonzentration von Enoxaparin herzustellen, verfolgte die vorliegende Untersuchung eine andere Zielsetzung. Dabei konnte erstmals demonstriert werden, dass mithilfe der $CT_{\text{INTEM}^{\circledR}}/CT_{\text{HEPTEM}^{\circledR}}$ - bzw. $CT_{\text{NATEM}^{\circledR}}/CT_{\text{NA-HEPTEM}}$ -Ratios Enoxaparin detektiert und zumindest semiquantitativ nachgewiesen werden kann. Ziel war es dabei nicht eine Korrelation zwischen thrombelastometrischen Variablen und der (gemessenen) Anti-Xa-Aktivität herzustellen, sondern anhand der CT-Ratios die Abwesenheit oder das Vorhandensein relevanter Vollblutkonzentrationen nachzuweisen.

Die Ergebnisse belegen, dass Konzentrationen, wie bei einer therapeutischer Antikoagulation, von NMH bereits durch eine signifikante Verlängerung der $CT_{\text{INTEM}^{\circledR}}$ und eine Erhöhung der $CT_{\text{INTEM}^{\circledR}}/CT_{\text{HEPTEM}^{\circledR}}$ -Ratio nachgewiesen werden kann. Mithilfe der $CT_{\text{NATEM}^{\circledR}}$ und $CT_{\text{NATEM}^{\circledR}}/CT_{\text{NA-HEPTEM}}$ -Ratio lässt sich darüber hinaus aber auch eine geringere Konzentration von NMH detektieren: Durch Bestimmung der $CT_{\text{NATEM}^{\circledR}}/CT_{\text{NA-HEPTEM}}$ -Ratio in Bezug auf die Anti-Xa-Aktivität $<0,1$ IE/ml lässt sich Enoxaparin bei einer Ratio von $<1,16$ mit einer Sensitivität von 93,9% und einer Spezifität von 100% ausschließen. Auch hier muss die Anti-Xa-Aktivität kritisch hinterfragt werden. Es zeigte sich auch für NMH, dass obwohl eine Heparinkonzentration von 0,1 IE/ml im Vollblut vorlag, in 8 von 20 Proben eine Anti-Xa-Aktivität $<0,1$ IE/ml gemessen wurde. Sowohl die $CT_{\text{INTEM}^{\circledR}}/CT_{\text{HEPTEM}^{\circledR}}$ -Ratio als auch die $CT_{\text{NATEM}^{\circledR}}/CT_{\text{NA-HEPTEM}}$ -Ratio scheinen für derartig niedrige NMH-Wirkkonzentrationen sensitiver zu sein, als die Bestimmung der Anti-Xa-Aktivität an sich. In Bezug auf tatsächlich vorhandenes NMH kann erst ab einer $CT_{\text{NATEM}^{\circledR}}/CT_{\text{NA-HEPTEM}}$ -Ratio von $<1,08$ mit einer Sensitivität von 97% und einer Spezifität von 95% eine Heparinwirkung ausgeschlossen werden. Zusätzlich zeigten sich

in höheren Konzentrationen von NMH bis 0,8 IE/ml auch Anti-Xa-Aktivitäten $<0,1$ IE/ml (z.B. bei 0,8 IE/ml 3/20 Messungen mit Anti-Xa-Aktivität $<0,1$ IE/ml) obwohl NMH vorlag. Somit zeigt sich hier die Möglichkeit, eine klinisch relevante NMH-Wirkung auszuschließen. Bei einer $CT_{\text{NATEM}}/CT_{\text{NA-HEPTEM}}$ -Ratio $> 2,07$ lag mit einer Sensitivität von 89,36% und einer Spezifität von 81,13% eine therapeutische Antikoagulation (Anti-Xa-Aktivität $>0,4$ IE/ml) vor. Als Konsequenz für den klinischen Alltag lässt sich hieraus ableiten, dass die ROTEM®-Analyse als bettseitig verfügbare Messmethode sowohl die Detektion einer therapeutischen Antikoagulation mit NMH als auch den Ausschluss einer Heparinwirkung durch NMH ermöglicht. Dies bedeutet einen erheblichen Zeitvorteil für Therapieentscheidungen, da der Probentransport und die Messung der Anti-Xa-Aktivität in einem Zentrallabor entfallen können. Auch bettseitig kann nun eine Unterdosierung von NMH bei gewünschter therapeutischer Wirkung, sowie generell eine Heparinwirkung durch NMH detektiert und ausgeschlossen werden. Eine prophylaktische Antikoagulation (Anti-Xa-Aktivität 0,2-0,4 IE/ml) lässt sich mithilfe einer $CT_{\text{INTEM}}/CT_{\text{HEPTEM}}$ - bzw. $CT_{\text{NATEM}}/CT_{\text{NA-HEPTEM}}$ -Ratio aber nicht detektieren.

Als eine potenzielle Limitation der durchgeführten Studie könnte eine unterschiedlich große Bindung von Heparinen an unspezifische Proteine darstellen. Bis zum heutigen Zeitpunkt ist nicht in Gänze bekannt, an welche Moleküle Heparin zu binden vermag (Hao et al., 2019). Weiterhing könnte eine Limitation in der zeitlichen Stabilität der Proben für die Bestimmung der Anti-Xa-Aktivität vorliegen. Bei Lagerung der Proben unter Raumtemperatur sollte die Bestimmung der Anti-Xa-Aktivität innerhalb von 2 Stunden erfolgen. Auch nach dem Einfrieren der Plasmaproben bei -80 °C zeigt sich eine verminderte Anti-Xa-Aktivität. Als ursächlich hierfür wird eine mögliche Aktivierung von Gerinnungsfaktoren bei niedrigen Temperaturen, oder aber auch durch das Einfrieren und Auftauen von entstandene Mikrovesikel aus wenigen, nicht abzentrifugierten, Thrombozyten (Ng et al., 2018). Diese Limitation zeigt sich jedoch generell im klinischen Alltag. Nicht immer kann die Bestimmung der Anti-Xa-Aktivität unmittelbar oder auch überhaupt im jeweiligen Labor durchgeführt werden. Daher werden diese Proben oftmals eingefroren und ggf. sogar verschickt. Der Einfluss auf die Anti-Xa-Aktivität bei einer Probenlagerung bei 37 °C ist unbekannt. Durch die Inkubation der Blutproben bei 37 °C für 30 Minuten ist daher ein Einfluss auf die Anti-Xa-Aktivität möglich.

Eine weitere Limitation stellt die Auswahl von Enoxaparin als einziges untersuchtes NMH dar. Obgleich Enoxaparin zu den in Deutschland am häufigsten eingesetzten NMH zählt, unterscheidet es sich teils deutlich von anderen NMH wie z.B. Dalteparin oder Tinzaparin. Tinzaparin ist das NMH, das das höchste durchschnittliche Molekulargewicht (6,5 kDa) aufweist und halbsynthetisch über die Zugabe von Heparinase hergestellt wird (Boyce and Walsh, 2022). Dalteparin (mittleres Molekulargewicht 5 kDa) wird, wie Enoxaparin, über eine Depolymerisation aus UFH hergestellt (Dunn and Jarvis, 2000). Enoxaparin und Dalteparin unterscheidet sich in ihrer Anti-Xa- zu Anti-IIa-Aktivität (Enoxaparin 3,9:1; Dalteparin 2,5:1 (Gerotziakas et al., 2007)). Übertragen auf unser Studiendesign wäre es denkbar, dass gerade Dalteparin ebenfalls Einfluss auf die Messvariablen in der ROTEM® haben könnte, da der Herstellungsprozess dem von Enoxaparin sehr ähnelt. Eine Übertragbarkeit auf Tinzaparin könnte durch die Zugabe von Heparinase bereits im Herstellungsprozess einen möglichen Einfluss auf die Messvariablen haben, insbesondere auf die Assays mit Heparinase. Hinzu kommt, dass unterschiedliche Herstellungsverfahren für Enoxaparin existieren, sodass unterschiedliche Enoxaparinpräparate etwas unterschiedliche Eigenschaften auch in Bezug auf die Wirksamkeit aufweisen (Qneibi et al., 2020). Eine Generalisierbarkeit der gezeigten Ergebnisse auf andere NMH und auch unterschiedliche Enoxaparinpräparate müsste also durch weitere Versuche bestätigt werden.

Die allgemeine Limitation der Übertragbarkeit von in vitro Versuchen auf in vivo Situationen ist selbstverständlich auch bei dieser in vitro Studie gegeben. Zwar stellt die fehlende Interaktionsmöglichkeit der untersuchten Substanzen, z.B. mit dem Endothel, eine grundsätzliche Limitation dar, das genutzte Modell war jedoch darauf ausgelegt, die tatsächlich gemessene Anti-Xa-Aktivität als Maßstab zu nutzen. Insofern spielen in vivo Prozesse eine nachgeordnete Rolle, da das Modell ideal geeignet erscheint um die klinische Situation unter Therapie mit UFH/NMH zu simulieren. Auch unter in vivo Therapie erfolgt die Bestimmung aller Gerinnungstests schließlich in vitro.

Zusammenfassend konnte diese Studie erstmalig zeigen, dass anhand einer CT_{INTEM} / CT_{HEPTEM} -Ratio bereits geringe Vollblutkonzentrationen ($> 0,1$ IE/ml) von

UFH (Schwellenwert $CT_{\text{INTEM}}/CT_{\text{HEPTEM}}\text{-Ratio} >1,13$; Sensitivität 100%, Spezifität 95%) und NMH (Schwellenwert $CT_{\text{INTEM}}/CT_{\text{HEPTEM}}\text{-Ratio} >1,10$; Sensitivität 75,00%, Spezifität 95,00%) nachgewiesen werden können. Mithilfe der Verwendung einer CT-Ratio aus dem kommerziell erhältlichen NATEM®-Assay, welches mit dem ebenfalls kommerziell erhältlichen hep-tem®-Reagenz zum, in dieser Arbeit als NA-HEPTEM-Assay bezeichneten Assay kombiniert wurde, kann die Sensitivität für den Nachweis von NMH weiter gesteigert werden (Schwellenwert $CT_{\text{NATEM}}/CT_{\text{NA-HEPTEM}}\text{-Ratio} >1,08$; Sensitivität 97,00%, Spezifität 95,00%).

Die Kombination zweier thrombelastometrischer Assays, jeweils mit und ohne Zusatz von Heparinase, erlaubt also den Ausschluss, des Vorliegens klinisch relevanter Konzentrationen von UFH und NMH. Insbesondere für die NMH ist darüber hinaus auch eine semi-quantitative Abschätzung dahingehend möglich, ob in einer Blutprobe die gemessene Anti-Xa-Aktivität in dem, im allgemein als therapeutisch angesehenen Bereich (d.h. 0,4 – 0,8 IE/ml) liegt. In zeitkritischen klinischen Situationen könnte die Verwendung dieser Assay Kombinationen also dazu beitragen, Therapieentscheidungen (z.B. Protamingabe bei V.a. UFH / NMH induzierte Blutung, Dosisanpassung bei prophylaktischer oder therapeutischer Antikoagulation oder die Entscheidung ob ein (rückenmarksnahes) Regionalanästhesieverfahren durchgeführt werden kann zu unterstützen.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Einleitung: Heparine sind antikoagulatorisch wirksame Polysaccharide, die entsprechend ihrer Kettenlänge in unfraktionierte (UFH) und niedermolekulare Heparine (NMH) unterteilt werden. Klinisch werden sie zur Prophylaxe und Therapie von Thrombosen und Embolien, sowie zur gezielten Hemmung der Blutgerinnung z.B. während Verfahren mit extrakorporaler Zirkulation (z.B. Dialyse, Herz-Lungen-Maschine) eingesetzt. Das Monitoring der antikoagulativen Wirkung von UFH erfolgt vornehmlich laborchemisch mittels der aktivierten partiellen Thromboplastinzeit (aPTT), der Thrombinzeit (TZ), der activated clotting Time (ACT) und der Rotationsthrombelastometrie (ROTEM®). Das Monitoring der NMH erfolgt mittels der sog. Anti-Xa-Aktivität, die jedoch von einem Labor abhängig und hierdurch zeitaufwendig ist. Ziel dieser Arbeit war es den Effekt, klinisch relevanter Vollblutkonzentrationen von UFH und NMH auf Variablen der ROTEM® zu beschreiben und hierdurch eine schnellere und bettseitig anwendbare Methode zur Quantifizierung des antikoagulativen Effektes von Heparinen zu erhalten.

Methoden: Blut von 20 gesunden Probanden wurde in vitro mit UFH bzw. NMH versetzt (finale Vollblutkonzentrationen: UFH (0,0; 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,2; 1,6 IE/ml) bzw. NMH (0,0; 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 IE/ml)). Anschließend erfolgten die Bestimmung der jeweiligen Zeit bis zur initialen Gerinnungsbildung (Clotting Time (CT)) in ROTEM®-Assays (INTEM®, HEPTEM®, NATEM® und modifiziertes NATEM® mit Heparinase (NA-HEPTEM-Assay)) und die Bestimmung der Anti-Xa-Aktivität. Zusätzlich wurde der Quotient der CTs korrespondierender Assays ($CT_{\text{INTEM}^\circledast}/CT_{\text{HEPTEM}^\circledast}$ für UFH und $CT_{\text{NATEM}^\circledast}/CT_{\text{NA-HEPTEM}}$ für NMH) als sog. Ratios bestimmt.

Ergebnisse: Für UFH lässt eine $CT_{\text{INTEM}^\circledast}/CT_{\text{HEPTEM}^\circledast}$ -Ratio von $< 1,13$ den Ausschluss relevanter Heparinkonzentration zu (Sensitivität 100%, Spezifität 95%, $p < 0,0001$, AUC 0,9971), bei $> 1,909$ liegt eine Vollblutkonzentration vor, wie sie bei einer therapeutischen Antikoagulation zu erwarten wäre (Sensitivität 88,46%, Spezifität 67,8%, $p < 0,0001$, AUC 0,7940). Für NMH ermöglicht eine $CT_{\text{INTEM}^\circledast}/CT_{\text{HEPTEM}^\circledast}$ -Ratio von $< 1,1$ den Ausschluss relevanter Heparinkonzentrationen (Sensitivität 75%, Spezifität 95%, $p < 0,0001$, AUC 0,8633). Die $CT_{\text{NATEM}^\circledast}/CT_{\text{NA-HEPTEM}}$ -Ratio ermöglicht bei einer Ratio $< 1,08$ den Ausschluss einer NMH-Wirkung (Sensitivität 97%, Spezifität 95%, $p < 0,0001$, AUC 0,9780) und weist bei einer Ratio $> 2,074$ eine therapeutische Antikoagulation (Sensitivität 89,36%, Spezifität 81,13%, $p < 0,0001$, AUC 0,8547) nach.

Schlussfolgerung: Anhand rotationsthrombelastometrischer Assays mit und ohne Heparinase lassen sich in vitro Konzentrationen von Heparinen, wie bei einer therapeutischen Antikoagulation mit UFH und NMH abschätzen und relevante Vollblutkonzentration von UFH und NMH ausschließen. Ferner zeigt sich eine Überlegenheit der ROTEM®-Analyse im direkten Vergleich mit der Anti-Xa-Aktivität für minimale Vollblutkonzentrationen von NMH.

Summary

Introduction: Heparins are anticoagulant polysaccharides, which are divided into unfractionated (UFH) and low molecular weight heparins (LMWH), according to their chain length. Clinically, heparins are used for prophylaxis and treatment of thromboses and embolism, as well as for the targeted inhibition of blood clotting, e.g. during procedures with extracorporeal circulation (e.g. dialysis, heart-lung machines). The anticoagulating effect of UFH is primarily monitored by laboratory analyses using the activated partial thromboplastin time (aPTT), the thrombin time (TT), the activated clotting time (ACT), and rotational thrombelastometry (ROTEM®). LMWH are monitored by measuring the anti-Xa-activity, which requires a laboratory and is therefore time-consuming. The aim of this work was to describe the effect of clinically relevant whole blood concentrations of UFH and LMWH on ROTEM® variables of various assays and to obtain a faster bedside applicable method for quantifying the anticoagulating effect of heparins.

Methods: Blood from 20 healthy volunteers was spiked in vitro with UFH or LMWH (final whole blood concentrations: UFH (0,0; 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,2; 1,6 IE/ml) and LMWH (0,0; 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 IE/ml)). The respective time to initial clot formation was determined (Clotting Time (CT)) by ROTEM®-Assays (INTEM®, HEPTTEM®, NATEM® and modified NATEM® with addition of heparinase (NA-HEPTTEM-Assay)) and by measurement of the anti-Xa-activity. In addition, the quotient of the CTs of corresponding assays was calculated as so called ratios (i.e., $CT_{INTEM®}/CT_{HEPTTEM®}$ for UFH and $CT_{NATEM®}/CT_{NA-HEPTTEM}$ for LMWH).

Results: For UFH, a $CT_{INTEM®}/CT_{HEPTTEM®}$ -ratio of $< 1,13$ allows for the exclusion of relevant heparin concentrations $< 0,1$ IE/ml (sensitivity 100%, specificity 95%, $p < 0,0001$, AUC 0,9971); a $CT_{INTEM®}/CT_{HEPTTEM®}$ -ratio $> 1,909$ is indicative for a whole blood concentration as would be expected with therapeutic anticoagulation (i.e., $> 0,3$ IE/ml) (sensitivity 88,46%, specificity 67,8%, $p < 0,0001$, AUC 0,7940). For LMWH, a $CT_{INTEM®}/CT_{HEPTTEM®}$ -Ratio of $< 1,1$ allows the exclusion of relevant (i.e., $< 0,1$ IE/ml) heparin concentrations (sensitivity 75%, specificity 95%, $p < 0,0001$, AUC 0,8633). The $CT_{NATEM®}/CT_{NA-HEPTTEM}$ -ratio allows the exclusion of an LMWH effect with a ratio $< 1,08$ (sensitivity 97%, specificity 95%, $p < 0,0001$, AUC 0,9780) and proves therapeutic anticoagulation (i.e., $> 0,4$ IE/ml) with a ratio of $> 2,074$ (sensitivity 89,36%, specificity 81,13%, $p < 0,0001$, AUC 0,8547).

Conclusion: By using ROTEM®-assays with and without heparinase, in vitro heparin concentrations can be estimated as in therapeutic anticoagulation with UFH and LMWH, and relevant whole blood concentrations of UFH and LMWH can be excluded. Furthermore ROTEM® analysis shows superiority in direct comparison with measuring the anti-Xa-activity for minimal whole blood concentrations of LMWH.

6 LITERATURVERZEICHNIS

1. Aase, T.A., and Rosseland, L.A. (2023). Regional anaesthesia in patients on antithrombotic drugs. *Eur J Anaesthesiol* 40, 959.
2. Apipongrat, D., Police, P., Lamool, R., Butthep, P., and Chantkran, W. (2022). Validation of high concentrated thrombin time assay for unfractionated heparin monitoring. *J Clin Lab Anal* 36, e24695.
3. Arachchillage, D.R.J., Kamani, F., Deplano, S., Banya, W., and Laffan, M. (2017). Should we abandon the APTT for monitoring unfractionated heparin? *Thromb Res* 157, 157-161.
4. AWMF. (2015). S3-Leitlinie Prophylaxe der venösen Thrombembolie (VTE). Retrieved 15.10.2021, Online-Publikation; https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/003-0011_S3_VTE-Prophylaxe_2015-10-abgelaufen_01.pdf
5. Babin, J.L., Traylor, K.L., and Witt, D.M. (2017). Laboratory Monitoring of Low-Molecular-Weight Heparin and Fondaparinux. *Semin Thromb Hemost* 43, 261-269.
6. Baluwala, I., Favalaro, E.J., and Pasalic, L. (2017). Therapeutic monitoring of unfractionated heparin - trials and tribulations. *Expert Rev Hematol* 10, 595-605.
7. Barrowcliffe, T.W. (2012). History of heparin. *Handb Exp Pharmacol*, 3-22.
8. Boer, C., Meesters, M.I., Veerhoek, D., and Vonk, A.B.A. (2018). Anticoagulant and side-effects of protamine in cardiac surgery: a narrative review. *Br J Anaesth* 120, 914-927.
9. Bonar, R.A., Favalaro, E.J., and Marsden, K. (2012). External quality assurance for heparin monitoring. *Semin Thromb Hemost* 38, 632-639.
10. Boyce, A., and Walsh, G. (2022). Production, characteristics and applications of microbial heparinases. *Biochimie* 198, 109-140.
11. Broos, K., Feys, H.B., De Meyer, S.F., Vanhoorelbeke, K., and Deckmyn, H. (2011). Platelets at work in primary hemostasis. *Blood Rev* 25, 155-167.
12. Capila, I., and Linhardt, R.J. (2002). Heparin-protein interactions. *Angew Chem Int Ed Engl* 41, 391-412.
13. Carleton, R.A., Sanders, C.A., and Burack, W.R. (1960). Heparin Administration after Acute Myocardial Infarction. *New England Journal of Medicine* 263, 1002-1005.
14. Casu, B., Oreste, P., Torri, G., Zoppetti, G., Choay, J., Lormeau, J.C., Petitou, M., and Sinay, P. (1981). The structure of heparin oligosaccharide fragments with high anti-

- (factor Xa) activity containing the minimal antithrombin III-binding sequence. Chemical and ¹³C nuclear-magnetic-resonance studies. *Biochem J* 197, 599-609.
15. Chen, Y., Zhao, J., Yu, Y., Liu, X., Lin, L., Zhang, F., and Linhardt, R.J. (2018). Antithrombin III-Binding Site Analysis of Low-Molecular-Weight Heparin Fractions. *J Pharm Sci* 107, 1290-1295.
16. Collet, J.P., Thiele, H., Barbato, E., Barthelémy, O., Bauersachs, J., Bhatt, D.L., Dendale, P., Dorobantu, M., Edvardsen, T., Folliguet, T., Gale, C.P., Gilard, M., Jobs, A., Juni, P., Lambrinou, E., Lewis, B.S., Mehilli, J., Meliga, E., Merkely, B., Mueller, C., Roffi, M., Rutten, F.H., Sibbing, D., Siontis, G.C.M., and Group, E.S.C.S.D. (2021). 2020 ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation. *Eur Heart J* 42, 1289-1367.
17. Colvin, B.T. (2004). Physiology of haemostasis. *Vox Sang* 87 Suppl 1, 43-46.
18. Coppel, J.A., Thalheimer, U., Zambruni, A., Triantos, C.K., Riddell, A.F., Burroughs, A.K., and Perry, D.J. (2006). The effects of unfractionated heparin, low molecular weight heparin and danaparoid on the thromboelastogram (TEG): an in-vitro comparison of standard and heparinase-modified TEGs with conventional coagulation assays. *Blood Coagul Fibrinolysis* 17, 97-104.
19. Crafoord, C., Gallie, W.E., and et al. (1947). Heparin in surgery. *Lancet* 2, 482.
20. Cronin, R.E., and Reilly, R.F. (2010). Unfractionated heparin for hemodialysis: still the best option. *Semin Dial* 23, 510-515.
21. Damgen-von Brevern, G., Klaffling, C., and Lindhoff-Last, E. (2005). [Monitoring anticoagulation by fondaparinux: determination of anti factor Xa-level]. *Hamostaseologie* 25, 281-285.
22. Davenport, R., Manson, J., De'Ath, H., Platton, S., Coates, A., Allard, S., Hart, D., Pearse, R., Pasi, K.J., MacCallum, P., Stanworth, S., and Brohi, K. (2011). Functional definition and characterization of acute traumatic coagulopathy. *Crit Care Med* 39, 2652-2658.
23. Descamps, R., Moussa, M.D., Besnier, E., Fischer, M.O., Preau, S., Tamion, F., Daubin, C., Cousin, N., Vincentelli, A., Goutay, J., and Du Cheyron, D. (2021). Anti-Xa activity and hemorrhagic events under extracorporeal membrane oxygenation (ECMO): a multicenter cohort study. *Crit Care* 25, 127.
24. DGAI. (2014). S1-Leitlinie 001/005 Rückenmarksnahe Regionalanästhesien und Thromboembolieprophylaxe / antithrombotische Medikation. Retrieved 15.10.2021, Online-Publikation; https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/001-0051_S1_Rueckenmarksnahe_Regionalanasthesie_Thromboembolieprophylaxe_2015-01-abgelaufen.pdf

25. DGK. (2020). Diagnose und Behandlung von Vorhofflimmern. Retrieved 15.10.2021, Online-Publikation; https://leitlinien.dgk.org/files/21_2021_pocket_leitlinie_vorhofflimmern_komprimiert.pdf
26. Dirkmann, D., Nagy, E., Britten, M.W., and Peters, J. (2019). Point-of-care measurement of activated clotting time for cardiac surgery as measured by the Hemochron signature elite and the Abbott i-STAT: agreement, concordance, and clinical reliability. *BMC Anesthesiol* 19, 174.
27. Dunn, C.J., and Jarvis, B. (2000). Dalteparin: an update of its pharmacological properties and clinical efficacy in the prophylaxis and treatment of thromboembolic disease. *Drugs* 60, 203-237.
28. Gasciauskaite, G., Malorgio, A., Castellucci, C., Budowski, A., Schweiger, G., Kolbe, M., Grande, B., Noethiger, C.B., Spahn, D.R., Roche, T.R., Tscholl, D.W., and Akbas, S. (2023). User Perceptions of ROTEM-Guided Haemostatic Resuscitation: A Mixed Qualitative-Quantitative Study. *Bioengineering (Basel)* 10.
29. Gehrie, E., and Laposata, M. (2012). Test of the month: The chromogenic antifactor Xa assay. *Am J Hematol* 87, 194-196.
30. Gerotziafas, G.T., Petropoulou, A.D., Verdy, E., Samama, M.M., and Elalamy, I. (2007). Effect of the anti-factor Xa and anti-factor IIa activities of low-molecular-weight heparins upon the phases of thrombin generation. *J Thromb Haemost* 5, 955-962.
31. Görlinger, K., Pérez-Ferrer, A., Dirkmann, D., Saner, F., Maegele, M., Calatayud Á, A.P., and Kim, T.Y. (2019). The role of evidence-based algorithms for rotational thromboelastometry-guided bleeding management. *Korean J Anesthesiol* 72, 297-322.
32. Gray, E., Hogwood, J., and Mulloy, B. (2012). The anticoagulant and antithrombotic mechanisms of heparin. *Handb Exp Pharmacol*, 43-61.
33. Gray, E., Mulloy, B., and Barrowcliffe, T.W. (2008). Heparin and low-molecular-weight heparin. *Thromb Haemost* 99, 807-818.
34. Greinacher, A. (2015). CLINICAL PRACTICE. Heparin-Induced Thrombocytopenia. *N Engl J Med* 373, 252-261.
35. Gronchi, F., Perret, A., Ferrari, E., Marcucci, C.M., Fleche, J., Crosset, M., Schoettker, P., and Marcucci, C. (2014). Validation of rotational thromboelastometry during cardiopulmonary bypass: A prospective, observational in-vivo study. *Eur J Anaesthesiol* 31, 68-75.
36. Hamilton, D.O., Main-Ian, A., Tebbutt, J., Thrasher, M., Waite, A., and Welters, I. (2021). Standard- versus intermediate-dose enoxaparin for anti-factor Xa guided thromboprophylaxis in critically ill patients with COVID-19. *Thromb J* 19, 87.

37. Hao, C., Xu, H., Yu, L., and Zhang, L. (2019). Heparin: An essential drug for modern medicine. *Prog Mol Biol Transl Sci* 163, 1-19.
38. Hartert, H. (1948). Blood clotting studies with Thrombus stressography; a new Investigation procedure. *Klin Wochenschr* 26, 577-583.
39. Helms, J., Frere, C., Thiele, T., Tanaka, K.A., Neal, M.D., Steiner, M.E., Connors, J.M., and Levy, J.H. (2023). Anticoagulation in adult patients supported with extracorporeal membrane oxygenation: guidance from the Scientific and Standardization Committees on Perioperative and Critical Care Haemostasis and Thrombosis of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. *J Thromb Haemost* 21, 373-396.
40. Hirsh, J., and Raschke, R. (2004). Heparin and low-molecular-weight heparin: the Seventh ACCP Conference on Antithrombotic and Thrombolytic Therapy. *Chest* 126, 188S-203S.
41. Hirsh, J., Warkentin, T.E., Shaughnessy, S.G., Anand, S.S., Halperin, J.L., Raschke, R., Granger, C., Ohman, E.M., and Dalen, J.E. (2001). Heparin and low-molecular-weight heparin: mechanisms of action, pharmacokinetics, dosing, monitoring, efficacy, and safety. *Chest* 119, 64S-94S.
42. Hoffman, M., and Monroe, D.M., 3rd (2001). A cell-based model of hemostasis. *Thromb Haemost* 85, 958-965.
43. Horton, S., and Augustin, S. (2013). Activated clotting time (ACT). *Methods Mol Biol* 992, 155-167.
44. Howell, W.H., and Holt, E. (1918). TWO NEW FACTORS IN BLOOD COAGULATION—HEPARIN AND PRO-ANTITHROMBIN. *American Journal of Physiology-Legacy Content* 47, 328-341.
45. Hutt Centeno, E., Militello, M., and Gomes, M.P. (2019). Anti-Xa assays: What is their role today in antithrombotic therapy? *Cleve Clin J Med* 86, 417-425.
46. Jackson, G.N., Ashpole, K.J., and Yentis, S.M. (2009). The TEG vs the ROTEM thromboelastography/thromboelastometry systems. *Anaesthesia* 64, 212-215.
47. Karrar, S., Reniers, T., Filius, A., Bunge, J.J.H., Bekkers, J.A., Hoeks, S.E., and Horst, M.T. (2022). Rotational Thromboelastometry-Guided Transfusion Protocol to Reduce Allogeneic Blood Transfusion in Proximal Aortic Surgery With Deep Hypothermic Circulatory Arrest. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 36, 1029-1039.
48. Kelecyc, M.W., Shutt, T., Rostas, J., and Martin, R.C.G., 2nd (2018). Clinical effect of enoxaparin on international normalized ratio following hepato-pancreatico-biliary and gastroesophageal resection. *J Surg Oncol* 118, 15-20.

49. Kietaiabl, S., Ferrandis, R., Godier, A., Llau, J., Lobo, C., Macfarlane, A.J., Schlimp, C.J., Vandermeulen, E., Volk, T., von Heymann, C., Wolmarans, M., and Afshari, A. (2022). Regional anaesthesia in patients on antithrombotic drugs: Joint ESAIC/ESRA guidelines. *Eur J Anaesthesiol* 39, 100-132.
50. Klein, S.M., Slaughter, T.F., Vail, P.T., Ginsberg, B., El-Moalem, H.E., Alexander, R., D'Ercole, F., Greengrass, R.A., Perumal, T.T., Welsby, I., and Gan, T.J. (2000). Thromboelastography as a perioperative measure of anticoagulation resulting from low molecular weight heparin: a comparison with anti-Xa concentrations. *Anesth Analg* 91, 1091-1095.
51. Klippe, H.J., Adams, H.A., Baumann, G., Cascorbi, I., Emmel, M., Fischer, D., Flohé, S., Fries, D., Gänsslen, A., Geiger, S., Heller, A.R., Hildebrand, F., Klar, E., Lampl, L., Prange, H., Rolle, U., Sarrafzadeh, A., Scharf, R.E., Standl, T., Teske, W., Werner, G., and Zander, R. (2014). Hämostase im Schock, Teil 2: Physiologie der Hämostase. *Anästhesiologie und Intensivmedizin* 55, 272.
52. Knoerlein, J., Brodbeck, P., Buchsel, M., Zieger, B., and Schmutz, A. (2023). Residual anti-Xa activity in plasma of patients presenting for electively planned neuraxial regional anesthesia. *Reg Anesth Pain Med*.
53. Kozek-Langenecker, S.A., Ahmed, A.B., Afshari, A., Albaladejo, P., Aldecoa, C., Barauskas, G., De Robertis, E., Faraoni, D., Filipescu, D.C., Fries, D., Haas, T., Jacob, M., Lance, M.D., Pitarch, J.V.L., Mallett, S., Meier, J., Molnar, Z.L., Rahe-Meyer, N., Samama, C.M., Stensballe, J., Van der Linden, P.J.F., Wikkelso, A.J., Wouters, P., Wyffels, P., and Zacharowski, K. (2017). Management of severe perioperative bleeding: guidelines from the European Society of Anaesthesiology: First update 2016. *Eur J Anaesthesiol* 34, 332-395.
54. Krishnaswamy, A., Lincoff, A.M., and Cannon, C.P. (2010). The use and limitations of unfractionated heparin. *Crit Pathw Cardiol* 9, 35-40.
55. Lankhof, H., van Hoeij, M., Schiphorst, M.E., Bracke, M., Wu, Y.P., Ijsseldijk, M.J., Vink, T., de Groot, P.G., and Sixma, J.J. (1996). A3 domain is essential for interaction of von Willebrand factor with collagen type III. *Thromb Haemost* 75, 950-958.
56. Leentjens, J., Peters, M., Esselink, A.C., Smulders, Y., and Kramers, C. (2017). Initial anticoagulation in patients with pulmonary embolism: thrombolysis, unfractionated heparin, LMWH, fondaparinux, or DOACs? *Br J Clin Pharmacol* 83, 2356-2366.
57. Leung, K.C., and MacRae, J.M. (2019). Anticoagulation in CKD and ESRD. *J Nephrol* 32, 719-731.
58. Lim, W., Dentali, F., Eikelboom, J.W., and Crowther, M.A. (2006). Meta-analysis: low-molecular-weight heparin and bleeding in patients with severe renal insufficiency. *Ann Intern Med* 144, 673-684.

59. Linkins, L.A., Julian, J.A., Rischke, J., Hirsh, J., and Weitz, J.I. (2002). In vitro comparison of the effect of heparin, enoxaparin and fondaparinux on tests of coagulation. *Thromb Res* 107, 241-244.
60. Liu, C., Ling, L., Huang, X., Mi, J., Liao, J., Jia, J., Wang, X., and Zhou, J. (2022). Evaluation of Activated Partial Thromboplastin Time Mixing Studies Using Several Methods. *Arch Pathol Lab Med*.
61. Liu, Y.H., Sia, J., Munas, A., Tacon, C., Salaveria, K., Lutshaba, H.L., and Hanson, J. (2024). Utility of rotational thromboelastometry in the management of massive haemorrhage at a regional Australian hospital. *Transfus Med* 34, 54-60.
62. Marlar, R.A., Clement, B., and Gausman, J. (2017). Activated Partial Thromboplastin Time Monitoring of Unfractionated Heparin Therapy: Issues and Recommendations. *Semin Thromb Hemost* 43, 253-260.
63. McLean, J. (1959). The discovery of heparin. *Circulation* 19, 75-78.
64. Meesters, M.I., Lance, M.D., van der Steeg, R., and Boer, C. (2015). The value of the thromboelastometry heparinase assay (HEPTM) in cardiac surgery. *Thromb Haemost* 114, 1058-1063.
65. Mittermayr, M., Margreiter, J., Velik-Salchner, C., Klingler, A., Streif, W., Fries, D., and Innerhofer, P. (2005). Effects of protamine and heparin can be detected and easily differentiated by modified thrombelastography (Rotem): an in vitro study. *Br J Anaesth* 95, 310-316.
66. Mittermayr, M., Velik-Salchner, C., Stalzer, B., Margreiter, J., Klingler, A., Streif, W., Fries, D., and Innerhofer, P. (2009). Detection of protamine and heparin after termination of cardiopulmonary bypass by thrombelastometry (ROTEM): results of a pilot study. *Anesth Analg* 108, 743-750.
67. Murray, D.J., Brosnahan, W.J., Pennell, B., Kapalanski, D., Weiler, J.M., and Olson, J. (1997). Heparin detection by the activated coagulation time: a comparison of the sensitivity of coagulation tests and heparin assays. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 11, 24-28.
68. Murray, D.W., Jaques, L.B., Perrett, T.S., and Best, C.H. (1936). Heparin and Vascular Occlusion. *Can Med Assoc J* 35, 621-622.
69. Newall, F. (2013). Anti-factor Xa (anti-Xa) assay. *Methods Mol Biol* 992, 265-272.
70. Ng, D.P.J., Duffull, S.B., Faed, J.M., Isbister, G.K., and Gulati, A. (2018). An Evaluation of a Factor Xa-Based Clotting Time Test for Enoxaparin: A Proof-of-Concept Study. *Clin Appl Thromb Hemost* 24, 669-676.

71. Ölander, F., and Schött, U. (2021). Monitoring of Low Molecular Weight Heparin Thromboprophylaxis with Alternative Methods to Anti-Factor Xa. *Anesth Med Pract J Res* 5: 136.
72. Onishi, A., St Ange, K., Dordick, J.S., and Linhardt, R.J. (2016). Heparin and anticoagulation. *Front Biosci (Landmark Ed)* 21, 1372-1392.
73. Pavoni, V., Giancesello, L., Conti, D., Ballo, P., Dattolo, P., Prisco, D., and Gorlinger, K. (2022). "In Less than No Time": Feasibility of Rotational Thromboelastometry to Detect Anticoagulant Drugs Activity and to Guide Reversal Therapy. *J Clin Med* 11.
74. Prakash, S., Wiersema, U.F., Bihari, S., and Roxby, D. (2016). Discordance between ROTEM(R) clotting time and conventional tests during unfractionated heparin-based anticoagulation in intensive care patients on extracorporeal membrane oxygenation. *Anaesth Intensive Care* 44, 85-92.
75. Qneibi, D., Ramacciotti, E., Macedo, A.S., Caffaro, R.A., Agati, L.B., Siddiqui, F., Kouta, A., Hoppensteadt, D., Fared, J., and Carter, C.A. (2020). Comparative Studies on the Anticoagulant Profile of Branded Enoxaparin and a New Biosimilar Version. *Clin Appl Thromb Hemost* 26, 1076029620960820.
76. Robertson, L., and Jones, L.E. (2017). Fixed dose subcutaneous low molecular weight heparins versus adjusted dose unfractionated heparin for the initial treatment of venous thromboembolism. *Cochrane Database Syst Rev* 2, CD001100.
77. Sterne, J.A., Bodalia, P.N., Bryden, P.A., Davies, P.A., Lopez-Lopez, J.A., Okoli, G.N., Thom, H.H., Caldwell, D.M., Dias, S., Eaton, D., Higgins, J.P., Hollingworth, W., Salisbury, C., Savovic, J., Sofat, R., Stephens-Boal, A., Welton, N.J., and Hingorani, A.D. (2017). Oral anticoagulants for primary prevention, treatment and secondary prevention of venous thromboembolic disease, and for prevention of stroke in atrial fibrillation: systematic review, network meta-analysis and cost-effectiveness analysis. *Health Technol Assess* 21, 1-386.
78. Tanguay, M., and Seguin, C. (2022). Recurrent thrombosis rescued by fondaparinux in high-risk patients: A case series. *Res Pract Thromb Haemost* 6, e12773.
79. Tekkesin, N., Tekkesin, M., and Kaso, G. (2015). Thromboelastography for the monitoring of the antithrombotic effect of low-molecular-weight heparin after major orthopedic surgery. *Anatol J Cardiol* 15, 932-937.
80. TEM® Innovation GmbH München ROTEM® Analyse: Thrombelastometrie.
81. TEM® Innovation GmbH München. Thrombelastometrie. Retrieved 27.04.2021, Online-Publikation; <https://www.rotem.de/methodik/thrombelastometrie/>
82. Theusinger, O.M., Schroder, C.M., Eismon, J., Emmert, M.Y., Seifert, B., Spahn, D.R., and Baulig, W. (2013). The influence of laboratory coagulation tests and clotting

factor levels on Rotation Thromboelastometry (ROTEM(R)) during major surgery with hemorrhage. *Anesth Analg* *117*, 314-321.

83. Toulon, P., Ozier, Y., Ankri, A., Fléron, M.H., Leroux, G., and Samama, C.M. (2009). Point-of-care versus central laboratory coagulation testing during haemorrhagic surgery. A multicenter study. *Thromb Haemost* *101*, 394-401.

84. Undas, A. (2017). Determination of Fibrinogen and Thrombin Time (TT). *Methods Mol Biol* *1646*, 105-110.

85. van Roessel, S., Middeldorp, S., Cheung, Y.W., Zwinderman, A.H., and de Pont, A.C. (2014). Accuracy of aPTT monitoring in critically ill patients treated with unfractionated heparin. *Neth J Med* *72*, 305-310.

86. Walenga, J.M., Prechel, M., Jeske, W.P., and Bakhos, M. (2005). Unfractionated heparin compared with low-molecular-weight heparin as related to heparin-induced thrombocytopenia. *Curr Opin Pulm Med* *11*, 385-391.

87. Wand, S., Heise, D., Hillmann, N., Bireta, C., Brauer, A., Ahsen, N.V., and Quintel, M. (2020). Is There a "Blind Spot" in Point-of-Care Testing for Residual Heparin After Cardiopulmonary Bypass? A Prospective, Observational Cohort Study. *Clin Appl Thromb Hemost* *26*, 1076029620946843.

88. Wang, D., Fan, G., Lei, J., Yang, Y., Xu, X., Ji, Y., Yi, Q., Chen, H., Hu, X., Liu, Z., Mao, Y., Zhang, J., Shi, J., Zhang, Z., Wu, S., Tao, X., Xie, W., Wan, J., Zhang, Y., Zhang, S., Zhen, K., Zhang, Z., Fang, B., Wang, C., Zhai, Z., and China pUlmonary thromboembolism, R.S.i. (2022). LMWHs dosage and outcomes in acute pulmonary embolism with renal insufficiency, an analysis from a large real-world study. *Thromb J* *20*, 26.

89. Weber, C.F., Gorlinger, K., Meininger, D., Herrmann, E., Bingold, T., Moritz, A., Cohn, L.H., and Zacharowski, K. (2012). Point-of-care testing: a prospective, randomized clinical trial of efficacy in coagulopathic cardiac surgery patients. *Anesthesiology* *117*, 531-547.

90. White, H., Sosnowski, K., Bird, R., Jones, M., and Solano, C. (2012). The utility of thromboelastography in monitoring low molecular weight heparin therapy in the coronary care unit. *Blood Coagul Fibrinolysis* *23*, 304-310.

91. Whiting, P., Al, M., Westwood, M., Ramos, I.C., Ryder, S., Armstrong, N., Misso, K., Ross, J., Severens, J., and Kleijnen, J. (2015). Viscoelastic point-of-care testing to assist with the diagnosis, management and monitoring of haemostasis: a systematic review and cost-effectiveness analysis. *Health Technol Assess* *19*, 1-228, v-vi.

92. Willems, A., Savan, V., Faraoni, D., De Ville, A., Rozen, L., Demulder, A., and Van der Linden, P. (2016). Heparin Reversal After Cardiopulmonary Bypass: Are Point-of-Care Coagulation Tests Interchangeable? *J Cardiothorac Vasc Anesth* *30*, 1184-1189.

93. Youden, W.J. (1950). Index for rating diagnostic tests. *Cancer* 3, 32-35.

7 ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS

Abbildung 1: Ablauf der primären Hämostase	7
Abbildung 2: Ablauf der sekundären Hämostase	8
Abbildung 3: Darstellung eines Heparinmoleküls	10
Abbildung 4: Bindung von UFH und NMH an AT	11
Abbildung 5: Einfluss von Heparin auf die sekundäre Hämostase	11
Abbildung 6: Messprinzip der Rotationsthrombelastometrie	20
Abbildung 7: Temogramm einer ROTEM®-Analyse	21
Abbildung 8: Konzentrationsabhängiger Effekt von UFH auf die CT in INTEM®- Assays bei 20 Probanden	26
Abbildung 9: Konzentrationsabhängiger Effekt von UFH auf die CT in HEPTEM®- Assays bei 20 Probanden	28
Abbildung 10: Konzentrationsabhängiger Effekt von UFH auf die CT _{INTEM®} /CT _{HEPTEM®} -Ratio bei 20 Probanden	30
Abbildung 11: Konzentrationsabhängiger Effekt von UFH auf die Anti-Xa-Aktivität bei 20 Probanden	32
Abbildung 12: ROC-Kurve für die Unterscheidung zwischen Kontrolle (Keine Zugabe von UFH) und einer laborchemisch gemessenen Anti-Xa-Aktivität >0,1 IE/ml anhand von CT _{INTEM®} /CT _{HEPTEM®} -Ratios' bei 20 Probanden	36
Abbildung 13: ROC-Kurve für die Unterscheidung zwischen laborchemisch gemessenen Anti-Xa-Aktivität (bei UFH) <0,3 IE/ml und einer Anti-Xa-Aktivität >0,3 IE/ml anhand von CT _{INTEM®} /CT _{HEPTEM®} -Ratios' bei 20 Probanden	37
Abbildung 14: ROC-Kurve für die Unterscheidung zwischen laborchemisch gemessenen Anti-Xa-Aktivität (bei UFH) <0,75 IE/ml und einer Anti-Xa-Aktivität >0,75 IE/ml anhand von CT _{INTEM®} /CT _{HEPTEM®} -Ratios' bei 20 Probanden	38
Abbildung 15: ROC-Kurve für die Unterscheidung zwischen Kontrolle (Keine Zugabe von UFH) und einer UFH-Konzentration >0,1 IE/ml anhand von CT _{INTEM®} /CT _{HEPTEM®} - Ratios' bei 20 Probanden	39
Abbildung 16: Konzentrationsabhängiger Effekt von NMH auf die CT in INTEM®- Assays bei 20 Probanden	41
Abbildung 17: Konzentrationsabhängiger Effekt von NMH auf die CT in HEPTEM®- Assays bei 20 Probanden	43
Abbildung 18: Konzentrationsabhängiger Effekt von NMH auf die CT _{INTEM®} /CT _{HEPTEM®} - Ratio bei 20 Probanden	45
Abbildung 19: Konzentrationsabhängiger Effekt von NMH auf die Anti-Xa-Aktivität bei 20 Probanden	47
Abbildung 20: ROC-Kurve für die Unterscheidung zwischen Kontrolle (Keine Zugabe von NMH) und einer laborchemisch gemessenen Anti-Xa-Aktivität >0,1 IE/ml anhand von CT _{INTEM®} /CT _{HEPTEM®} -Ratios' bei 20 Probanden	51
Abbildung 21: ROC-Kurve für die Unterscheidung zwischen laborchemisch gemessenen Anti-Xa-Aktivität (bei NMH) <0,2 IE/ml und einer Anti-Xa-Aktivität >0,2 IE/ml anhand von CT _{INTEM®} /CT _{HEPTEM®} -Ratios' bei 20 Probanden	52
Abbildung 22: ROC-Kurve für die Unterscheidung zwischen laborchemisch gemessenen Anti-Xa-Aktivität (bei NMH) <0,4 IE/ml und einer Anti-Xa-Aktivität >0,4 IE/ml anhand von CT _{INTEM®} /CT _{HEPTEM®} -Ratios' bei 20 Probanden	53

Abbildung 23: ROC-Kurve für die Unterscheidung zwischen Kontrolle (Keine Zugabe von NMH) und einer NMH-Konzentration $>0,1$ IE/ml anhand von $CT_{INTEM®}/CT_{HEPTEM®}$ -Ratios' bei 20 Probanden	54
Abbildung 24: Konzentrationsabhängiger Effekt von NMH auf die CT in NATEM®-Assays bei 20 Probanden.....	55
Abbildung 25: Konzentrationsabhängiger Effekt von NMH auf die CT in NA-HEPTEM-Assays bei 20 Probanden.....	57
Abbildung 26: Konzentrationsabhängiger Effekt von NMH auf die $CT_{NATEM®}/CT_{NA-HEPTEM®}$ -Ratio bei 20 Probanden.....	59
Abbildung 27: Konzentrationsabhängiger Effekt von NMH auf die Anti-Xa-Aktivität bei 20 Probanden	61
Abbildung 28: ROC-Kurve für die Unterscheidung zwischen Kontrolle (Keine Zugabe von NMH) und einer laborchemisch gemessenen Anti-Xa-Aktivität $>0,1$ IE/ml anhand von $CT_{NATEM®}/CT_{NA-HEPTEM®}$ -Ratios' bei 20 Probanden.....	65
Abbildung 29: ROC-Kurve für die Unterscheidung zwischen laborchemisch gemessenen Anti-Xa-Aktivität (bei NMH) $<0,2$ IE/ml und einer Anti-Xa-Aktivität $>0,2$ IE/ml anhand von $CT_{NATEM®}/CT_{NA-HEPTEM®}$ -Ratios' bei 20 Probanden	66
Abbildung 30: ROC-Kurve für die Unterscheidung zwischen laborchemisch gemessenen Anti-Xa-Aktivität (bei NMH) $<0,4$ IE/ml und einer Anti-Xa-Aktivität $>0,4$ IE/ml anhand von $CT_{NATEM®}/CT_{NA-HEPTEM®}$ -Ratios' bei 20 Probanden	67
Abbildung 31: ROC-Kurve für die Unterscheidung zwischen Kontrolle (Keine Zugabe von NMH) und einer NMH-Konzentration $>0,1$ IE/ml anhand von $CT_{NATEM®}/CT_{NA-HEPTEM®}$ -Ratios' bei 20 Probanden	68

Tabelle 1: Konzentrationsreihe UFH und NMH	23
Tabelle 2: Effekte inkrementeller Konzentrationen von unfraktioniertem Heparin auf die CT _{INTEM®}	27
Tabelle 3: Effekte inkrementeller Konzentrationen von unfraktioniertem Heparin auf die CT _{HEPTEM®}	29
Tabelle 4: Effekte inkrementeller Konzentrationen von unfraktioniertem Heparin auf die CT _{INTEM®} /CT _{HEPTEM®} -Ratio.....	31
Tabelle 5: Effekte inkrementeller Konzentrationen von unfraktioniertem Heparin auf die Anti-Xa-Aktivität.....	33
Tabelle 6: Übersicht UFH CT _{INTEM®} /CT _{HEPTEM®} -Ratio, Anti-Xa-Aktivität und Anzahl Anti-Xa-Aktivität <0,1 IE/ml	34
Tabelle 7: UFH-Kontrolle vs. UFH-Anti-Xa-Aktivität >0,1 IE/ml Sensitivität und Spezifität CT _{INTEM®} /CT _{HEPTEM®} -Ratio	36
Tabelle 8: Ergebnisse Anti-Xa-Aktivität <0,3 IE/ml vs. >0,3 IE/ml Sensitivität und Spezifität CT _{INTEM®} /CT _{HEPTEM®} -Ratio	37
Tabelle 9: Ergebnisse Anti-Xa-Aktivität <0,75 IE/ml vs. >0,75 IE/ml Sensitivität und Spezifität CT _{INTEM®} /CT _{HEPTEM®} -Ratio	38
Tabelle 10: UFH-Kontrolle vs. UFH-Konzentration >0,1 IE/ml Sensitivität und Spezifität CT _{INTEM®} /CT _{HEPTEM®} -Ratio	39
Tabelle 11: Effekte inkrementeller Konzentrationen von niedermolekularem Heparin auf die CT _{INTEM®}	42
Tabelle 12: Effekte inkrementeller Konzentrationen von niedermolekularem Heparin auf die CT _{HEPTEM®}	44
Tabelle 13: Effekte inkrementeller Konzentrationen von niedermolekularem Heparin auf die CT _{INTEM®} /CT _{HEPTEM®} -Ratio.....	46
Tabelle 14: Effekte inkrementeller Konzentrationen von niedermolekularem Heparin auf die Anti-Xa-Aktivität.....	48
Tabelle 15: Übersicht NMH CT _{INTEM®} /CT _{HEPTEM®} -Ratio, Anti-Xa-Aktivität und Anzahl Anti-Xa-Aktivität <0,1 IE/ml	49
Tabelle 16: NMH-Kontrolle vs. Anti-Xa-Aktivität >0,1 IE/ml Sensitivität und Spezifität CT _{INTEM®} /CT _{HEPTEM®} -Ratio	51
Tabelle 17: Ergebnisse NMH Anti-Xa-Aktivität > 0,2 IE/ml Sensitivität und Spezifität CT _{INTEM®} /CT _{HEPTEM®} -Ratio.....	52
Tabelle 18: Ergebnisse NMH Anti-Xa-Aktivität > 0,4 IE/ml Sensitivität und Spezifität CT _{INTEM®} /CT _{HEPTEM®} -Ratio.....	53
Tabelle 19: NMH-Kontrolle vs. NMH-Konzentration >0,1 IE/ml Sensitivität und Spezifität CT _{INTEM®} /CT _{HEPTEM®} -Ratio	54
Tabelle 20: Effekte inkrementeller Konzentrationen von niedermolekularem Heparin auf die CT _{NATEM®}	56
Tabelle 21: Effekte inkrementeller Konzentrationen von niedermolekularem Heparin auf die CT _{NA-HEPTEM}	58
Tabelle 22: Effekte inkrementeller Konzentrationen von niedermolekularem Heparin auf die CT _{NATEM®} /CT _{NA-HEPTEM} -Ratio	60
Tabelle 23: Effekte inkrementeller Konzentrationen von niedermolekularem Heparin auf die Anti-Xa-Aktivität.....	62
Tabelle 24: Übersicht NMH CT _{NATEM®} /CT _{NA-HEPTEM} -Ratio, Anti-Xa-Aktivität und Anzahl Anti-Xa-Aktivität <0,1 IE/ml.....	63

Tabelle 25: NMH-Kontrolle vs. Anti-Xa-Aktivität >0,1 IE/ml Sensitivität und Spezifität $CT_{\text{NATEM}^{\text{®}}}/CT_{\text{NA-HEPTEM}}\text{-Ratio}$	65
Tabelle 26: Ergebnisse NMH Anti-Xa-Aktivität >0,2 IE/ml Sensitivität und Spezifität $CT_{\text{NATEM}^{\text{®}}}/CT_{\text{NA-HEPTEM}}\text{-Ratio}$	66
Tabelle 27: Ergebnisse NMH Anti-Xa-Aktivität >0,4 IE/ml Sensitivität und Spezifität $CT_{\text{NATEM}^{\text{®}}}/CT_{\text{NA-HEPTEM}}\text{-Ratio}$	67
Tabelle 28: NMH-Kontrolle vs. NMH-Konzentration >0,1 IE/ml Sensitivität und Spezifität $CT_{\text{NATEM}^{\text{®}}}/CT_{\text{NA-HEPTEM}}\text{-Ratio}$	68

8 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

®	eingetragenes Warenzeichen
A5	Amplitude 5
A10	Amplitude 10
ACT	Activated clotting Time
aPTT	aktivierte partielle Thromboplastinzeit
AT	Antithrombin
AUC	Area under the Curve
CT	Clotting Time
ECLS	Extracorporeal-Life-Support-Systeme
HIT	Heparininduzierte Thrombozytopenie
HWZ	Halbwertszeit
KI	Konfidenzintervall
MCF	Maximum Clot Firmness
NMH	niedermolekulare Heparine
PF4	Plättchen Faktor 4
POCT	Point-of-Care-Testing
ROC	receiver operating characteristic
ROTEM	Rotationsthrombelastometrie
TEM	Temogramm
TF	Tissue Factor
TZ	Thrombinzeit
UFH	unfraktionierte Heparine
vWF	von Willebrand Faktor

9 DANKSAGUNG

An erster Stelle möchte ich mich bei meiner wunderbaren Ehefrau Barbara bedanken. Ohne ihre unermüdliche Unterstützung, ihr Verständnis und ihrer Liebe wäre das alles nicht möglich gewesen. Du stehst immer an meiner Seite und hast ein offenes Ohr.

Mein herzlicher Dank gilt auch meinem Doktorvater Professor Daniel Dirkmann. Seine fachliche Anleitung, seine wertvollen Ratschläge und seine Expertise haben maßgeblich zur Qualität dieser Arbeit beigetragen.

Ein weiteres herzliches Dankeschön geht an alle, die mich bei der Korrektur dieser Arbeit unterstützt haben. Ein besonderer Dank geht an Professor Thorsten Brenner für seine Unterstützung und Ratschläge.

10 LEBENSLAUF

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.