

H.-J. Kolde, H. Pelzer,
L. Borzhenskaya, A. Russo,
M. Rose, L. Tejidor

Baxter Diagnostics, Abt. Scientific Support und
Research and Development, Unterschleißheim
und Miami

Ein einfaches und spezifisches Verfahren zur Entfernung von Heparin aus Zitratplasma

Wir haben eine stabilisierte Form des Enzyms Heparinase zur Anwendung in der Hämostasediagnostik entwickelt, die in der Anwendung einfacher ist als die meisten älteren Verfahren zur Entfernung bzw. Neutralisierung von Heparin. Mit diesem Reagenz liegen erste Ergebnisse vor; einige Daten sowie der generelle Wirkungsmechanismus wurden bereits publiziert (18). Der Mechanismus der Spaltung von Heparin durch Heparinase ist in Abbildung 1 dargestellt.

Material und Methoden

Stabilisierte Heparinase 1 aus *Flavobacterium heparinum* liegt als Lyophilisat in silikonierten Glasfläschchen vor. Es wird direkt mit 0,5 bis 1,0 ml Zitratplasma aufgelöst. Nach einer Inkubationszeit von 15 min bei Raumtemperatur ist die enzymatische Spaltung des Heparins in der Probe abgeschlossen. Das Reagenz ist unter dem Namen Hepzyme® im Handel (Baxter Diagnostics, Unterschleißheim).

Die Gewinnung der Blutproben erfolgte mittels Venenpunktion bei 34 gesunden Freiwilligen. Das Blut wurde im Verhältnis 9:1 mit 0,13 M Natriumzitrat antikoaguliert und durch Zentrifugation bei $3000 \times g$ für 10 min Zitratplasma gewonnen. Für einige Versuche wurde darüber hinaus ein Plasmapool aus dem Blut von 15 gesunden männlichen Spendern hergestellt.

Gerinnungsuntersuchungen erfolgten mit Reagenzien von Baxter Diagnostics auf Gerinnungsautomaten vom Typ Electra 800, 900 oder 1000 C der Firma Medical Laboratory Automation (MLA, Vertrieb durch Baxter

Schlüsselwörter

Heparin, Heparinase, extrakorporaler Kreislauf, Antikoagulation, Gerinnungstest, Lupusantikoagulans

Zusammenfassung

Heparin hat einen signifikanten Einfluß auf eine ganze Reihe von Laboruntersuchungen in der Hämostase. Häufig gelingt daher unter Heparintherapie nicht mehr der Nachweis von bestimmten Gerinnungsstörungen, deren Kenntnis jedoch für die weitere Therapie von Bedeutung wäre. Durch Einsatz eines spezifischen heparinabbauenden Enzyms (Heparinase 1) gelingt eine einfache und schnelle enzymatische Depolymerisierung von sowohl unfractionierten als auch niedermolekularen Heparinen.

Bei insgesamt 34 Gesunden wurden die aPTT vor und nach Behandlung mit Heparinase gemessen. Der Mittelwert betrug vor Heparinase 25,6 und nach Heparinase 25,2 sec. Offensichtlich wird lediglich das Heparin abgebaut, ohne daß es zum Verlust von Gerinnungsfaktoren kommt. Die Analyse der Einzelfaktoren in einem Plasmapool zeigte praktisch identische Werte vor und nach der Enzymbehandlung. Auch die Thromboplastinzeit wird durch das enzymatische Verfahren nicht verändert. Nach Zusatz von verschiedenen Heparinen zu Plasma wurde durch Heparinasebehandlung nahezu der Ausgangswert der aPTT wieder erreicht, solange die Konzentration unter 2 E/ml lag.

Diese Ergebnisse zeigen, daß die enzymatische Behandlung mit Heparinase 1 ein einfaches und spezifisches Verfahren zur Entfernung von Heparin darstellt.

Keywords

Heparin, heparinase, extracorporal circulation, anticoagulation, coagulation assay, lupus anticoagulant

Summary

Heparin has a significant influence on various assays in hemostasis. Therefore, the detection of certain coagulopathies which is important for further treatment is not possible. By using a specific heparin degrading enzyme (heparinase 1) a simple and fast enzymatic depolymerisation of both unfractionated and low molecular weight heparins is possible.

In 34 plasmas from healthy volunteers the aPTT was determined before and after treatment with heparinase. The mean value of this group was 25.6 before and 25.2 sec after heparinase. Apparently this enzyme degrades specifically heparin without a loss of coagulation factors. Specific assays of coagulation factors in a plasma showed identical values before and after enzyme treatment. The prothrombin time is not changed by the procedure as well. After the addition of various heparins to plasma the base value of the aPTT was almost reached after heparinase treatment, as long as the concentration was <2 U/ml.

These results show that the enzymatic treatment with heparinase 1 is a simple and specific method for the removal of heparin.

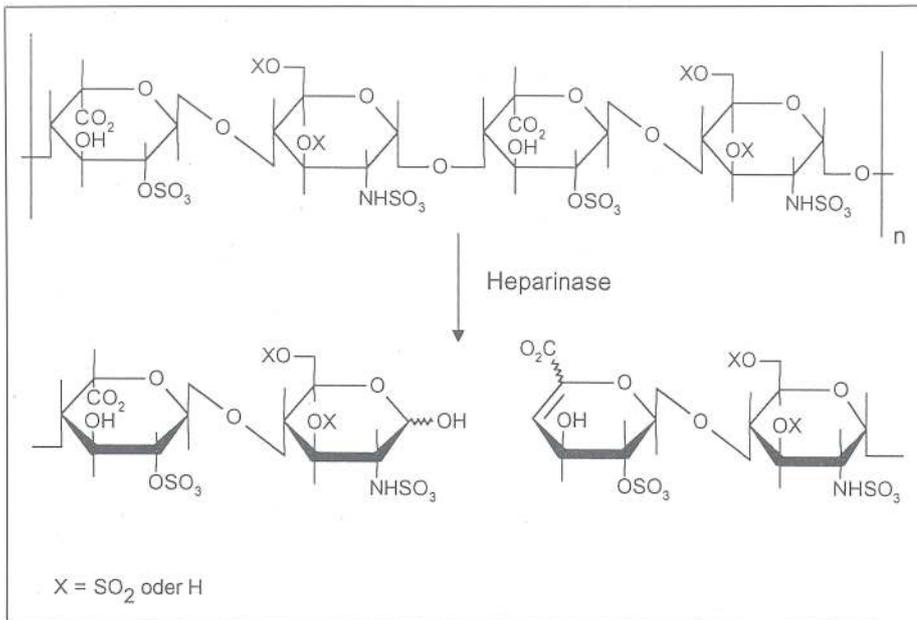


Abb. 1 Mechanismus der enzymatischen Spaltung von Heparin durch Heparinase 1 (β -Eliminierung)

Diagnostics). Die Bestimmung von Heparin erfolgte mit einem Kit der Firma American Diagnostica als Anti-Faktor-Xa-Aktivität. Heparine (unfraktioniert oder niedermolekular) wurden von verschiedenen Herstellern bezogen und für verschiedene Versuche direkt dem Zitratplasma zugesetzt.

Ergebnisse

Einfluß von Heparinase auf die aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT)

Durch Vergleich der aPTT-Werte vor und nach Behandlung mit Heparinase wurde die Spezifität des Verfahrens untersucht. Dazu wurden insgesamt 34 Plasmen zunächst mit Actin® (Ellag-Säure und Kaninchenhirn-Phospholipide) untersucht und dann anschließend der Behandlung mit Heparinase unterzogen. Vor der Behandlung betrug der Mittelwert dieses Kollektives 25,2 sec mit einer Standardabweichung von 1,7 sec. Nach dem Heparinaseschritt wurden $25,6 \pm 1,7$ sec gefunden. Die beiden Mittelwerte unterscheiden sich lediglich um 0,6% und bewegen sich damit in der

Fehlerbreite der aPTT-Bestimmung am Electra 1000.

Zum Vergleich wurde auch eine Behandlung dieser Plasmen mit einem käuflichen Heparinabsorbens auf der Basis eines Ionenaustauschers durchgeführt (Organon Teknika). Die aPTT betrug danach $28,0 \pm 2,6$ sec. Dieses entspricht einer Abweichung von 10,4% und liegt daher weit außerhalb der Fehlerbreite einer aPTT. Die Verteilung der Meßwerte der individuellen Plasmen ist in Abbildung 2 dargestellt. Man erkennt deutlich die engere Streuung der Meßwerte um die Regressionsgeraden bei dem Verfahren mit Heparinase im Vergleich zur Heparinabsorption mit dem Ionenaustauscher.

Bei Benutzung anderer aPTT-Reagenzien wurde ebenfalls gefunden, daß die aPTT durch Heparinase praktisch nicht verändert wird.

Einfluß von Heparinase auf die Thromboplastinzeit

Unter gleichen Bedingungen wurde auch der Einfluß von Heparinase auf die Thromboplastinzeit (TPZ) mit Thromboplastin IS aus Kaninchenhirn untersucht. Vor der Inkubation mit Heparinase wurde ein Mittelwert von

$12,7 \pm 0,49$ sec gefunden, nach Heparinase von $12,8 \pm 0,42$ sec. Es ergibt sich also auch bei der Thromboplastinzeit keine Änderung durch die Enzymbehandlung. Bei Verwendung anderer Thromboplastine wurden vergleichbare Resultate erzielt. Die Ergebnisse von aPTT und TPZ sind in Tabelle 1 zusammengefaßt.

Einfluß von Heparinase auf die Bestimmung der einzelnen Gerinnungsfaktoren

In Tabelle 2 ist der Einfluß einer Behandlung mit Heparinasereagenz auf die Gerinnungsfaktoren sowie auf Fibrinogen in einem Normalplasma zusammengefaßt. Es zeigen sich keine gravierenden Veränderungen der einzelnen Werte. Damit werden die in den Globaltests erzielten Resultate bestätigt.

Einfluß von Heparinase auf die Thrombinzeit

In 27 Plasmen von Gesunden, denen zwischen 0,3 bis zu 2,7 E/ml Heparin zugesetzt worden war, konnte keine völlige Normalisierung der Thrombinzeit durch Zugabe von He-

Tab. 1 Einfluß von Heparinase auf die aPTT und TPZ bei 34 Plasmen von Gesunden

Parameter	vor Heparinase	nach Heparinase
aPTT	$25,2 \pm 1,7$ sec	$25,6 \pm 1,7$ sec
TPZ	$12,7 \pm 0,5$ sec	$12,8 \pm 0,4$ sec

Tab. 2 Einfluß der Heparinasebehandlung auf die Gerinnungsfaktoren eines Frischplasmas

Parameter	Aktivität vor Heparinase	Aktivität nach Heparinase
F I	4,3 g/l	4,0 g/l
F II	121%	114%
F V	75%	77%
F VII	85%	84%
F VIII	83%	81%
F IX	115%	119%
F X	116%	114%
F XI	110%	100%
F XII	61%	61%

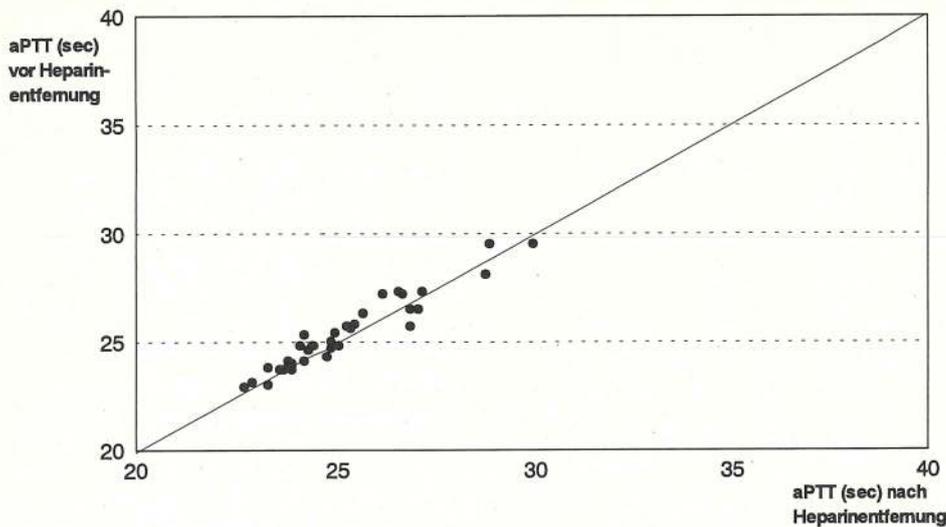


Abb. 2a Vergleich der aPTT, gemessen mit Actin, vor und nach Gabe von Heparinase 1

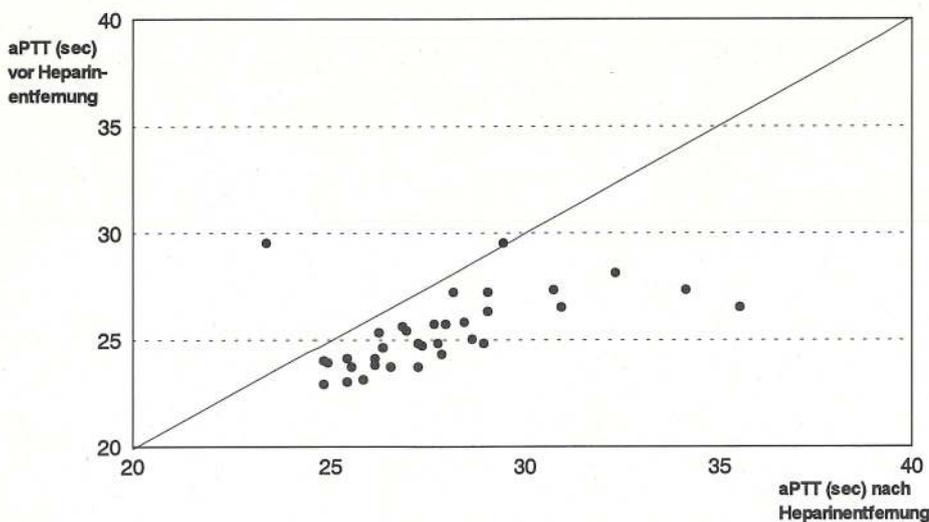


Abb. 2b Vergleich der aPTT, gemessen mit Actin, vor und nach Behandlung mit einem Ionenaustauscher (kommerzielles Heparinabsorbens)

parinase erzielt werden. Der Mittelwert dieser Gruppe lag vor Heparinase bei $13,3 \pm 1,3$ sec und nach Heparinase bei $16,9 \pm 3,6$ sec. Man erhält aber auch hier annähernd normale Thrombinzeitwerte. Die leichte Verlängerung wurde auch in Plasmen ohne vorherigen Heparinzusatz beobachtet. Sie ist daher nicht mit einem unvollständigen Heparinabbau zu erklären. Angesichts der vielen methodischen Probleme und Einflußgrößen auf die Thrombinzeit wie pH-Wert, Ionenstärke sowie Konzentration von Kalziumionen (19) ist es wahrscheinlicher, daß die zur Stabilisierung des Enzympräparates eingesetzten Puffer-substanzen und Konservierungsmittel

einen leichten Einfluß auf die Bestimmung selbst ausüben. Dieser Effekt ist anscheinend auch teilweise geräteabhängig, da an einem Kugelkoagulometer nahezu eine vollständige Übereinstimmung der Gerinnungszeit vor und nach Heparinase-Gabe gefunden wurde (nicht gezeigt).

Bestimmung der Thromboplastinzeit und der aPTT in mit Heparin versetzten Proben

Einige verschiedene unfraktionier-te und niedermolekulare Heparine wurden in verschiedenen Konzentra-

tionen Normalplasma zugesetzt und nach der Behandlung mit Heparinase mit Actin® FS analysiert. In Tabelle 3 sind die Ergebnisse zusammengefaßt. Es ergibt sich in der aPTT eine nahezu vollständige Neutralisierung der Heparinwirkung beider Heparintypen. In weiteren Versuchen wurde gefunden, daß bis zu etwa 2 E/ml eines Standardheparins sicher neutralisiert werden, so daß anschließend die aPTT wieder im Normalbereich liegt. Bei der Thromboplastinzeit wird ebenfalls das zugesetzte unfraktionierte Heparin abgebaut. Hier wurde in 21 Normalplasmen mit zugesetztem Heparin in einem Konzentrationsbereich von 0,2 bis 2,0 E/ml mit Thromboplastin C Plus aus Kaninchenhirn vor Heparinzusatz ein Mittelwert von $12,7 \pm 0,35$ sec und nach dem Heparinase-schritt von $12,93 \pm 0,4$ sec gemessen.

Einsatz von Heparinase in Patientenproben

Durch Heparintherapie wird nach neueren Ergebnissen die Konzentration des Tissue-Factor-Pathway-Inhibitors im Blut erhöht (20). Dieser Inhibitor hat auch eine direkte Aktivität gegenüber Faktor Xa und auch auf die aPTT (21). Es ist daher keine vollständige Normalisierung der aPTT bei Patienten unter Heparintherapie zu erwarten.

In einer kleinen Gruppe von Patienten mit Heparintherapie wurde zunächst die aPTT vor und nach Heparinasebehandlung gemessen und mit dem Ausgangswert des Patienten vor Heparintherapie verglichen. Die in Tabelle 4 zusammengefaßten Werte zeigen, daß in allen Proben vor Heparinasebehandlung Heparinspiegel zwischen 0,07 und 0,57 E/ml vorlagen, und daß nach dem enzymatischen Abbau noch maximal 0,05 E/ml Heparin nachweisbar waren. Angesichts der meßtechnischen und kalibrationsbedingten Grenzen einer Anti-Faktor-Xa-Bestimmung zeigen diese Resultate eine gute Effektivität des Verfahrens. Die aPTT-Werte dieser Patienten gingen in den Normalbereich zurück oder blieben knapp darüber. In jedem Fall wurde aber eine deutliche Verkürzung der aPTT gefunden.

Bei zwei Patienten mit gleichzeitiger oraler Antikoagulation und Heparin gelang erwartungsgemäß keine vollständige Normalisierung der aPTT, da die aPTT natürlich auch durch das Absinken der Vitamin-K-abhängigen Gerinnungsfaktoren sowie den Einfluß des Tissue-Factor-Pathway-Inhibitors beeinflußt wird.

Eine potentielle Anwendung des Heparinasereagens besteht in dem Nachweis von Lupusantikoagulanzien in phospholipidabhängigen Gerinnungstests bei Patienten, die schon mit Heparin behandelt werden. Dazu wurde einigen Proben mit Lupusantikoagulans Heparin in einer Konzentration von 2,7 E/ml zugesetzt und anschließend mit Heparinase abgebaut. Auch hier wurde eine vollständige Entfernung des Heparins erzielt (Tabelle 5).

Tab. 3 Entfernung von verschiedenen Heparinpräparaten nach Zusatz zu Plasma durch Heparinase

Heparinpräparat		aPTT vor Heparinase	aPTT nach Heparinase
Liquemin®	2,7 E/ml	n.g.	36,8 sec
	1,4 E/ml	n.g.	32,5 sec
Calciparin®	2,0 E/ml	n.g.	34,2 sec
	1,0 E/ml	n.g.	33,1 sec
Fragmin®	0,8 E/ml	71,7 sec	35,1 sec
	0,2 E/ml	35,1 sec	30,4 sec
Fraxiparin®	0,8 E/ml	51,8 sec	32,0 sec
	0,2 E/ml	35,2 sec	31,3 sec
Kontrolle	–	30,3 sec	30,1 sec

aPTT-Reagenz Actin® FS am Electra TM 800; n.g. = nicht gerinnbar, aPTT >180 sec

Tab. 4 aPTT und Heparinkonzentration vor und nach Heparinase-Gabe bei Patienten mit Heparin- bzw. Heparin/Cumarin-Therapie (Pat. 9 und 10)

Patient	aPTT (sec) Ausgangswert vor Heparintherapie	aPTT (sec) unter Heparintherapie		Heparinkonzentration (anti-F Xa, E/ml)	
		vor Heparinase	nach Heparinase	vor Heparinase	nach Heparinase
1	28,1	51,7	37,3	0,27	0,02
2	43,0	82,7	38,5	0,40	0,02
3	29,5	69,8	35,0	0,26	0,03
4	25,4	69,7	35,7	0,57	0,04
5	31,0	56,9	33,9	0,31	0,03
6	32,4	61,9	32,4	0,52	0,02
7	32,6	59,7	32,8	0,26	0,03
8	32,0	60,5	32,7	0,42	0,02
9	29,7	182,2	49,7	0,42	0,04
10	30,1	49,1	40,5	0,07	0,02

(aPTT Normalbereich bis 35,3)

Diskussion

Die mit Hepzyme® erzielten Resultate zeigen zunächst, daß eine weitgehende Entfernung verschiedener Heparinarten mit dieser stabilisierten Form von Heparinase möglich ist. Die Veränderungen im Gerinnungssystem sind marginal und in der Praxis nicht von Bedeutung. Lediglich bei der Thrombinzeit werden etwas verlängerte Gerinnungszeiten gefunden. Diese haben wahrscheinlich nichts mit der enzymatischen Wirkung der Heparinase zu tun, sondern sind auf die im Reagenz enthaltenen Stabilisatoren zurückzuführen. Die Globaltests Thromboplastinzeit und aktivierte partielle Thromboplastinzeit werden durch das Verfahren nicht beeinflußt.

Tab. 5 Neutralisierung von zugesetztem Heparin (2,7 U/ml) in Proben mit Lupusantikoagulans

Probe	aPTT (sec) vor Heparinase	aPTT (sec) nach Heparinase
1	48,7	47,2
2	61,3	57,2
3	41,4	44,4
4	55,1	57,7
5	35,5	37,7

aPTT-Reagenz: Actin® FSL am Electra® 1000 C

Die im Reagenz enthaltene Enzymkonzentration sorgt für eine rasche Entfernung des Heparins im Konzentrationsbereich von bis zu 2 E/ml Standardheparin innerhalb von wenigen Minuten bei Raumtemperatur. Der Prozeß kann auch noch einmal mit einem neuen Fläschchen Heparinase wiederholt und damit weiteres Heparin abgebaut werden. Nach Ergebnissen von Linhardt et al. (22) entstehen bei der enzymatischen Depolymerisierung von Heparin durch Heparinase eine Reihe von Oligosacchariden mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht von etwa 900 D. Die dabei entstehenden Reaktionsprodukte verlieren dabei praktisch alle Aktivität gegenüber Thrombin, während eine gewisse Restaktivität gegenüber Faktor Xa selbst noch in Tetrasacchariden nachweisbar war.

Nach Hemker und Mitarbeitern ist die Beschleunigung der Antithrombinwirkung in Plasma jedoch die wichtigste Funktion von Heparin, da die Faktoren IXa und Xa in ihren Komplexen mit ihren jeweiligen Kofaktoren Faktor VIIIa bzw. Faktor Va sowie Phospholipiden praktisch nicht durch Antithrombin III/Heparin inhibierbar sind (3). Unsere Ergebnisse mit den Globaltests des endogenen bzw. exogenen Wegs der Gerinnungskaskade nach Zusatz und anschließender enzymatischer Hydrolyse des Heparins durch Heparinase lassen einen ähnlichen Schluß zu, da eine weitgehende Normalisierung der Gerinnungszeiten erzielt werden konnte. Die in den Proben von Patienten unter Heparintherapie nach Heparinase verbliebene »Restaktivität« von

Tab. 6 Potentielle Anwendung von Heparinase im Hämostaselabor

1. Bestimmung der aPTT in Situationen mit Verbrauch von Gerinnungsfaktoren und -inhibitoren und Heparintherapie wie
 - Verbrauchskoagulopathie
 - Thrombolysetherapie
 - schwere Leber- und Nierenerkrankungen
 - extrakorporale Therapieformen (Dialyse, LDL-Immunapherese)
 - Herz-Lungen-Maschine
 - Übersicht über Gerinnungssituation ohne Störung/Einfluß von Heparin
 - Einsparung von aufwendigen und teuren Spezialuntersuchungen
 - Einsparung von Blutprodukten oder Konzentraten
2. Einstellphase der oralen Antikoagulation bei gleichzeitiger Heparinbehandlung bei Verwendung heparinempfindlicher Thromboplastine
 - plausible TPZ-Werte ohne Störung durch Heparin
 - Einsparung von Einzelfaktorbestimmungen
3. Differenzierung einer Heparin- bzw. Aprotinin-induzierten Verlängerung der aPTT, ACT oder anderer Gerinnungstests
 - Einsparung von Spezialuntersuchungen
 - gezielter Einsatz von Blutprodukten
4. Differenzierung von Heparin- bzw. FSP-induzierten Verlängerungen von Gerinnungstests
5. Subtraktion eines Heparineffektes bei anderen Gerinnungs-, Fibrinolyse- oder Thrombozytenfunktionsuntersuchungen
 - Nachweis von Lupusantikoagulans, Faktorenmangel u. a.
6. Plausibilitätstestung von Gerinnungstests
 - Heparinkontamination bei Abnahme?

0,02–0,05 E/ml ist angesichts der in diesem niedrigen Konzentrationsbereich nicht mehr ausreichenden Sensitivität der üblichen Heparintests über Faktor Xa noch kein ausreichender Beweis für das Vorliegen von antikoagulatorisch wirksamen niedermolekularen Heparinfragmenten. Allerdings könnte die etwas längere aPTT einzelner Patientenproben neben anderem auch auf eine eventuelle restliche Anti-Faktor-Xa-Aktivität zurückzuführen sein.

Die Ergebnisse der Patienten mit Heparintherapie zeigen, daß es gelingt, die aPTT durch Heparinase weitgehend zu normalisieren. Eine völlige Normalisierung ist schon aus theoretischen Überlegungen nicht zu erwarten, da unter Heparintherapie die Aktivität von Antithrombin III etwas abnehmen kann und auch die Freisetzung des Tissue-Factor-Pathway-Inhibitors durch Heparin die Konzentration dieses Proteins um bis zu 100% ansteigen läßt (20). Die Anti-Faktor-Xa-Aktivität dieses Inhibitors kann offensichtlich auch in der aPTT wirksam werden (21), auch wenn sicherlich quantitativ die Wirksamkeit von Antithrombin III als Heparin-Kofaktor von größerer Bedeutung ist.

Darüber hinaus ist natürlich bei Heparintherapie im Rahmen der Grunderkrankung des Patienten eine bzgl. der aPTT wirksame Veränderung der Konzentrationen der einzelnen Gerinnungsfaktoren von Blutentnahme zu Blutentnahme nicht auszuschließen. Gerade die im Rahmen einer Akute-Phase-Reaktion oder postoperativ stark variierenden Aktivität von Faktor VIII und Fibrinogen oder anderer Gerinnungsfaktoren hat einen nicht zu vernachlässigenden Einfluß auf die aPTT, zumal diese Methode auch hinsichtlich der Präanalytik relativ störanfällig ist (23). In jedem Falle ist jedoch nach Heparinneutralisierung ein Überblick über die

aktuelle Gerinnungssituation des endogenen Systems zu erzielen. Eine größere multizentrische Studie mit Hepzyme® bestätigt diese Befunde (24).

Die Überwachung der Heparintherapie erfolgt heute überwiegend mittels der aPTT, auch wenn die Korrelation zwischen der Heparinkonzentration und der aPTT nicht besonders gut ist (25). Es könnte daher möglich sein, durch Einsatz einer aPTT-Ratio vor und nach Heparinase-Gabe eine bessere Standardisierung der aPTT sowie eine engere Korrelation zur Konzentration des Heparins zu erzielen. Nach vorläufigen ersten eigenen Ergebnissen ist die Korrelation der aPTT-Differenz vor und nach Heparinase-Gabe zum Heparinspiegel (gemessen über die Anti-Faktor-Xa-Aktivität oder die Messung der Hemmung der Thrombingeneration in einem System von gereinigten Gerinnungsfaktoren und Antithrombin III als Reagenzien [26]) nur relativ schwach (27). Dieses muß jedoch in einem größeren Umfang untersucht werden, bevor schlüssig bewiesen ist, ob eine bessere Standardisierung der aPTT zur Überwachung der Heparintherapie durch Einsatz von Heparinase in Verbindung mit einer aPTT-Ratio möglich ist.

Welche Einsatzmöglichkeiten sind nun für dieses Enzympräparat denkbar (Tab. 6)? Hier sind prinzipiell alle Gerinnungstests zu nennen, die zwar durch Heparin beeinflusst werden,

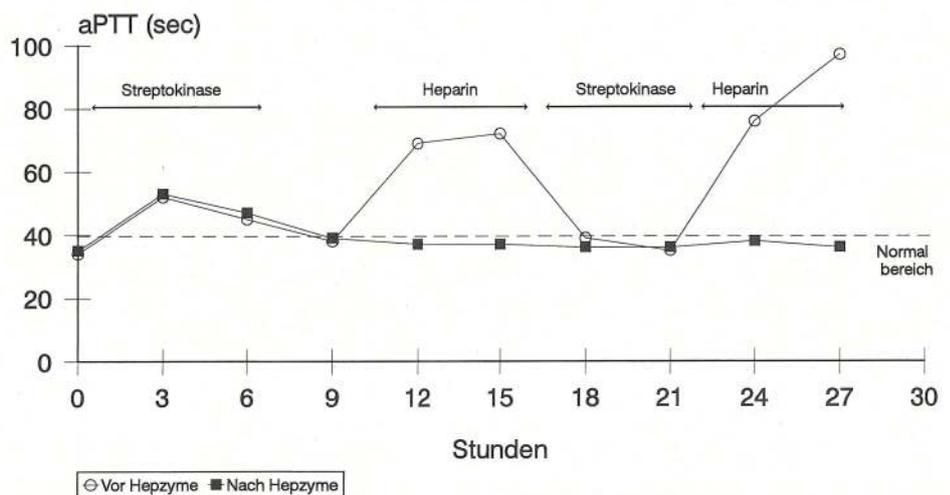


Abb. 3 Verlauf der aPTT bei einem Patienten mit tiefer Beinvenenthrombose unter einer ultrahochdosierten Streptokinase- und Heparintherapie

aber dennoch während der Heparintherapie eine rasche Information über die Restaktivität des Gerinnungssystems gewährleisten; weiterhin dient die Heparinase zur Plausibilitätsprüfung von Ergebnissen, die möglicherweise durch Heparinkontamination der Probe während der Blutabnahme verfälscht wurden.

Wichtig ist hier natürlich die überlappende Heparin- und Cumarintherapie bei Verwendung von heparinempfindlichen Thromboplastinreakgenzien. Nach den Ergebnissen von Hellstern et al. werden praktisch alle Gewebethromboplastine in unterschiedlichem Ausmaß durch Heparin beeinflusst (7). Nach Ergebnissen von Keller et al. ist dieser Effekt bei einem rekombinanten Thromboplastin mit Zusatz von Polybren als Heparininhibitor praktisch zu vernachlässigen, während in dieser Studie selbst bei alleiniger Heparintherapie ein Plazentathromboplastin bereits deutlich durch Heparin beeinflusst wurde (28). Auch für den Thrombotest, der in wesentlich höherer Probenverdünnung durchgeführt wird, fanden van den Besselaar und Mitarbeiter einen leichten Einfluß von Heparin auf die Thromboplastinzeit (29).

Ein großes gerinnungsanalytisches Problem verursachen Proben von Patienten mit extrakorporaler Zirkulation, insbesondere in der Herzchirurgie. Hier wird nicht nur durch hohe Dosen von Heparin, sondern zusätzlich auch durch Aprotinin die Messung der Gerinnungsglobaltests nahezu unmöglich. Heparinase wurde bereits erfolgreich zur Messung der aktivierten Gerinnungszeit (activated clotting time, ACT) eingesetzt (30). Einige vorläufige eigene Untersuchungen zeigen, daß in solchen Proben, die ohne Heparinasevorbehandlung eine völlig ungerinnbare aPTT aufweisen, nach Heparinase gut meßbare aPTT-Werte erhalten werden (31). Hier kann durch die Einfachheit der Heparinasebehandlung in recht kurzer Zeit ein Überblick über die Gerinnungssituation des Patienten erhalten und damit möglicherweise die Verwendung von Blutprodukten eingeschränkt werden.

Eine weitere Anwendung stellen Proben von Patienten mit Lupusanti-

koagulans dar. Diese Antikörper werden häufig übersehen, da es bis heute keine absolut zuverlässige Methode zum Screening gibt und darüber hinaus die bestehenden Methoden auch bei Patienten mit thromboembolischen Erkrankungen oft gar nicht eingesetzt werden. Unter Heparinbehandlung ist der Einsatz von Gerinnungstests zum Nachweis von Lupusantikoagulanzen nicht möglich, da diese durch Heparin gestört werden.

Hier ist auch die in jüngster Zeit sehr erfolgreich eingesetzte Thromboplastininhibition mit rekombinantem Thromboplastin zu nennen (32, 33). Das in dieser Methode verwendete Thromboplastin (Innovin®, Baxter Diagnostics) ist zwar per se durch Zusatz von Polybren nicht heparinempfindlich, jedoch wird durch die hohe Vorverdünnung des Thromboplastins in dieser speziellen Anwendung der Heparininhibitor ausverdünnt. Hier, wie auch bei anderen zum Nachweis von Lupusantikoagulanzen eingesetzten Methoden, sollte durch die enzymatische Heparinentfernung eine Detektion dieser in ihrer Bedeutung als Thromboserisikofaktor möglicherweise unterschätzten Antikörper ermöglicht werden.

Weitere erfolgversprechende Anwendungen des Enzyms sind im Zusammenhang mit dem Nachweis von Fibrin- und Fibrinogenspaltprodukten zu erwarten. Bei den üblichen Latextests mit polyklonalen Antikörpern ist vor der eigentlichen Bestimmung zunächst die Bereitung von Serum erforderlich, um kreuzreagierendes Fibrinogen zu entfernen. Dabei gibt es in heparinhaltigen Proben häufig Probleme bei der Gerinnung und damit falsch-positive Befunde (34). Hier ist möglicherweise mit Heparinase eine vollständige Entfernung von Fibrinogen zu erreichen.

Bei Thrombolysetherapie in Verbindung mit Heparin ist ein weiteres potentielles Einsatzgebiet für Heparinase zu erwarten. Hier kann, wie auch in anderen Fällen einer gesteigerten Fibrinolyse, der Einfluß des Heparins auf Globaltests oder auf die Bestimmung der Einzelfaktoren einfach und schnell beseitigt werden. Das zeigt deutlich der in Abbildung 3 dargestellte Verlauf bei einem Patienten mit

abwechselnder Streptokinase- und Heparintherapie (Daten von G. Lutze, Magdeburg).

Ähnliches gilt sicherlich auch für die Verbrauchskoagulopathie. Darüber hinaus werden durch Heparinase auch durch Heparin beeinflusste Thrombozytenfunktionsuntersuchungen ermöglicht. Nach eigenen Untersuchungen gelingt der Heparinabbau mit Heparinase auch im Vollblut.

Neben diesen spezifischen Anwendungen im Rahmen der Gerinnungsdiagnostik sind sicherlich auch in anderen Fachgebieten der Labormedizin Anwendungen von Heparinase möglich, beispielsweise in Proben, die wegen Heparin kein brauchbares Serum liefern oder wo Heparin selbst die Bestimmung stört. Auch in der Molekularbiologie wurde Heparinase bereits erfolgreich eingesetzt (35). Seit 1982 liegen erste Versuche zur therapeutischen Anwendung vor (36).

Zusammenfassend zeigen unsere Resultate, daß mit Heparinase bei geringstem Probenbedarf (0,5 bis 1,0 ml) eine schnelle und spezifische Entfernung von Heparin möglich ist. Ältere Resultate aus dem Jahr 1972 werden dadurch bestätigt (17). Damit werden in verschiedenen klinischen Situationen Gerinnungsuntersuchungen ermöglicht, die sonst kaum oder nur mit großen Schwierigkeiten und mit größeren Probenmengen durchzuführen sind. Durch Heparinase kann in manchen Fällen möglicherweise eine Verbesserung der Therapie und eine Senkung der Gesamtkosten erzielt werden.

Danksagung

Die Autoren danken Herrn Dr. Lutze für die Überlassung von Daten zum Einsatz von Heparinase bei Streptokinase und Heparin, anderen zitierten Autoren für die Überlassung weiterer Daten aus aktuellen Anwendungen dieses Enzyms sowie Frau Jutta Kohlheyer für die Erstellung des Manuskriptes.

LITERATUR

1. Harenberg J. Klinische Pharmakologie von Heparinen. *Hämostaseologie* 1992; 12: 23.
2. Hirsh J. Heparin. *N Engl J Med* 1991; 324: 1565.
3. Béguin S, Lindhout T, Hemker HC. The mode of action of heparin in plasma. *Thromb Haemost* 1988; 60: 457-62.
4. Solleder EM, Mayer J, Schwenk B, Kolde H-J, Simmoteit R, Keller F. Technical pro-

- blems in thrombin clotting time analysis. *Ann Haematol* 1992; 64 (Suppl): A 19
5. Lindhoff-Last E, Krzywonek HJ, Mosch G, Breddin HK. A comparison of different aPTT-reagents, heparin-sensitivity and detection of mild coagulopathies. *Lab med* 1992; 16: 423-6.
 6. Schultz NJ, Slaker RA, Rosborough TK. The influence of heparin on the prothrombin time. *Pharmacotherapy* 1991; 11: 312-6.
 7. Hellstern P, Anders CU, Oberfrank K, Faller B, Spaett A. Heparinsensitivität von Thromboplastinen zur Bestimmung der Thromboplastinzeit. *Klin Lab* 1992; 38: 183-8.
 8. Kolde H-J, Hawkins P, Tejedor L, Denzler B, Ramirez I. Eigenschaften eines neuen Thromboplastins auf der Basis von rekombinantem Tissue Factor und synthetischen Phospholipiden. *Klin Lab* 1993; 39: 511-21.
 9. Hoffmann JJML, Meulendijk PN. Evaluation of a heparin neutralizer. *Thromb Res* 1980; 18: 897-900.
 10. Schuler J, von Felten A. Eine einfache Methode zur Kontrolle der Antikoagulation mit Vitamin-K-Antagonisten unter Heparintherapie: Quick-Bestimmung nach Absorption des Heparins mittels ECTEO-LA-Cellulose. *Schweiz Med Wochenschr* 1982; 112: 1798-800.
 11. Branson HE, Schottinger JE, Fagin AR, Puri SL, Roohk V. Trials of commercial reagents in anion-exchange coagulation procedures: Ortho Diagnostics. *Am J Clin Path* 1984; 82: 432-5.
 12. Wenz B, Burns ER. Rapid removal of heparin from plasma by affinity filtration. *Am J Clin Path* 1991; 96: 385-90.
 13. Cumming AM, Jones GR, Wensky RT, Cundell RB. In vitro neutralization of heparin in plasma prior to the activated partial thromboplastin test: An assessment of four heparin antagonists and two anion exchange resins. *Thromb Res* 1986; 41: 43-56.
 14. Michalski R, Lane DA, Pepper DI, Kakkar VV. Neutralization of heparin in plasma by platelet factor 4 and protamine sulphate. *Br J Haematol* 1978; 38: 561-71.
 15. Linhardt RJ, Turnbull JE, Wang HM, Loganathan D, Gallagher JT. Examination of the substrate specificity of heparin and heparin sulfate lyases. *Biochemistry* 1990; 29: 2611-7.
 16. Zimmermann JJ et al. The Release of heparinase from the periplasmic space of flavobacterium heparinum by three-step osmotic shock. *App Biochem Biotech* 1991; 30: 137-48.
 17. Hutt ED, Kingdon HS. Use of heparinase to eliminate heparin inhibition in routine coagulation assays. *J Lab Clin Med* 1972; 79: 1027-1034.
 18. Tejedor L, Pelzer H et al. Enzymatischer Abbau von Heparin in einem gebrauchsfertigen Heparinasereagenz (Poster). *Klin Lab* 1993; 39: 409-12.
 19. Prohaska W. Untersuchungen über den Einfluß der Ionenstärke im Testansatz auf die Heparinempfindlichkeit der Thrombinzeit. Bedeutung für die Überwachung der Heparintherapie. *Ärztl Lab* 1987; 33: 99-105.
 20. Sandset PM, Abildgaard U, Larson ML. Heparin induces release of extrinsic pathway inhibitor (EPI). *Thromb Res* 1988; 50: 803-13.
 21. Nordfang O, Kristensen HJ, Valentin S, Ostergaard P, Wadt J. The significance of TFPI in clotting assays - comparison and combination with other anticoagulants. *Thromb Haemost* 1993; 70: 448-53.
 22. Linhardt RJ, Grant A, Corney CL, Langer R. Differential anticoagulant activity of heparin fragments prepared using microbial heparinase. *J Biol Chem* 1982; 257: 7310-3.
 23. Barthels M, Poliwoda H. Gerinnungsanalysen, 4. Aufl. Stuttgart, New York: Thieme 1993.
 24. Harenberg J, Hish J et al. Manuskript in Vorbereitung.
 25. Van den Besselaar AMHP, Meeuwisse-Braun J, Bertina RM. Monitoring heparin therapy. Relationships between the activated partial thromboplastin time and heparin based on ex-vivo samples. *Thromb Haemost* 1990; 63: 16-23.
 26. Waagenvoord RJ, Hendrix HH, Kolde H-J, Hemker HC. Development of a rapid and sensitive chromogenic heparin assay for clinical use. *Haemostasis* 1993; 23: 26-37.
 27. Kolde H-J, Stecher-Schilling A. Unpublizierte Ergebnisse.
 28. Keller F, Kolde H-J, Ramirez J. Evaluierung eines neuartigen Thromboplastins auf der Basis von rekombinantem humanen Tissue Factor und synthetischen Phospholipiden. *Lab med* 1993; 17: 523-32.
 29. Van den Besselaar AMHP, Meeuwisse-Braun. Enzymatic elimination of heparin from plasma for activated partial thromboplastin and prothrombin testing. *Blood Coagulation and Fibrinolysis* 1993; 4: 635-8.
 30. Baugh RF, Deemas KA, Zimmermann JJ. Heparinase in the activated clotting time assay: Monitoring heparin induced alterations in coagulation function. *Anesthesia and Analgesia* 1982; 74: 201-5.
 31. Kolde H-J, Spannagl M, Dietrich W. Unpublizierte Ergebnisse.
 32. Arnoud J, Vanrusselt M, Huybrecht E, Vermylen J. Optimisation of the dilute prothrombin time for the detection of the lupus anticoagulant by use of a recombinant human tissue thromboplastin. *Thromb Haemost* 1993; 69: 1222.
 33. Zanon E, Simioni P, Saracino M, Scarano J, Girolami B, Girolami A. Recombinant thromboplastin (innovin) inhibition assay for the detection of lupus anticoagulant. *Thromb Haemost* 1993; 69: 1220.
 34. Connaghan GD, Francis CW, Ryan DH, Mandor VJ. Prevalence and Clinical complications of heparin-associated false positive Test for Serum fibrinogen degradation products. *Am J Clin Pathol* 1986; 86: 304-10.
 35. Mannhalter C. Persönliche Mitteilung.
 36. Linhardt RJ, Tapper D, Klein M. An enzymatic system for removing heparin in extracorporeal therapy. *Science* 1982; 217: 261-3.

Korrespondenzadresse:
H.-J. Kolde
Baxter Diagnostics
Edisonstraße 3-4
D-85716 Unterschleißheim