

F Zusammenfassung

Das Ziel der vorliegenden Untersuchung war, basierend auf den Ergebnissen einer einmaligen subkutanen oder intravenösen Injektion unterschiedlicher Dosierungen des niedermolekularen Heparins (NMH) Fragmin® D ein Dosierungsschema für den Hund zu erarbeiten und anschließend zu überprüfen. Zudem sollte der Einfluß auf verschiedene Screeningtests des Hämostasesystems untersucht werden, im Hinblick auf die mögliche Überwachung der Therapie mit NMH und die Erarbeitung von Grundlagen der Wirkung von NMH auf das Gerinnungssystem beim Hund.

Die Untersuchung erfolgte an jeweils 5 gesunden Hunden der Rasse Beagle, die eine einmalige subkutane (50, 100 oder 200 Anti-Faktor-Xa-Einheiten [Anti-FXaE.]/kg Körpergewicht, KGW) oder intravenöse (25, 50 oder 100 Anti-FXaE./kg KGW) Applikation des NMH in den angegebenen Dosierungen erhielten. Die Entnahme von Zitrat- und EDTA-Blut erfolgte für die subkutane Applikation vor der Heparin-gabe, 15 und 30 Minuten sowie 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12 und 24 Stunden nach der Heparin-gabe und für die intravenöse Applikation: vor der Heparin-gabe, 2, 5, 10, 15 und 30 Minuten sowie 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10 und 12 Stunden nach der Heparin-gabe. Für die wiederholten subkutanen Applikationen wurde Blut an folgenden Zeitpunkten gewonnen: jeweils vor und 2 Stunden nach der 1., 2., 3. und 6. Heparin-gabe.

Bei allen Zeitpunkten wurde neben der Anti-Faktor-Xa-Aktivität (Anti-FXa-Aktivität) die Thrombinzeit (TZ) mit zwei unterschiedlichen Thrombinaktivitäten im Reagenz (3 I.U./ml, 6 I.U./ml), die aktivierte partielle Thromboplastinzeit (APTT) mit zwei verschiedenen kommerziellen Reagenzien, die Reaktionszeit des Resonanzthrombogramms (RTG-r, nur nach der einmaligen NMH-Injektion) und die Antithrombin-III-Aktivität ermittelt. Des weiteren wurden zu allen Zeitpunkten der Hämatokrit sowie die Thrombozytenzahl gemessen.

Es wurden folgende Ergebnisse erzielt:

1. Nach intravenöser Applikation von 25, 50 und 100 Anti-FXaE./kg KGW wurden mittlere maximale Heparinaktivitäten von $0,52 \pm 0,12$ (arithmetischer Mittelwert und Standardabweichung), $1,08 \pm 0,23$ bzw. $1,86 \pm 0,17$ Anti-FXaE./ml gemessen. Nach subkutaner Verabreichung wurde ein Maximum der Heparinaktivität (50 Anti-

FXaE./kg KGW: $0,28 \pm 0,01$ Anti-FXaE./ml, 100 Anti-FXaE./kg KGW: $0,52 \pm 0,06$ Anti-FXaE./ml, 200 Anti-FXaE./kg KGW: $1,09 \pm 0,23$ Anti-FXaE./ml) im Plasma nach im Mittel 144 bis 216 Minuten festgestellt. Nach intravenöser Applikation von NMH zeigte sich eine kurze terminale Halbwertszeit (t_{50}), die im Mittel zwischen 49 und 76 Minuten lag. Eine deutlich längere t_{50} wurde nach subkutaner Gabe gefunden. Sie lag nach Gabe von 50, 100 und 200 Anti-FXaE./kg KGW NMH im Mittel bei 80, 123 bzw. 180 Minuten. Die Bioverfügbarkeit ergab für die subkutane NMH-Applikation von 50 und 100 Anti-FXaE./kg KGW Werte von 107 % und 104 %.

2. Als sensitivster Test zeigte sich die RTG-r, z.B. mit einer maximalen 2,0-fachen Verlängerung der Ausgangswerte nach subkutaner Gabe von 200 Anti-FXaE./kg KGW. Die zweithöchste Empfindlichkeit wurde für die mit 3 I.U./ml Thrombinaktivität im Reagenz gemessene TZ nachgewiesen, deren Gerinnungszeit sich auf das 1,5-fache des Ausgangswertes nach gleicher Dosierung verlängerte. Die Sensitivität dieser Screeningtests erklärt sich aus der geringeren Thrombinkonzentration (TZ) bzw. langsameren Gerinnung in diesen Testsystemen. Einschränkend muß hervorgehoben werden, daß die deutlichen Veränderungen beider Testsysteme auf eine Plasmaheparinaktivität beschränkt waren, die oberhalb des, vom Menschen übernommenen, therapeutischen Bereiches einer Heparintherapie lagen und somit auch diese Tests nicht zur Überwachung der Therapie mit NMH geeignet sind. Dieses ist auch beim Hund nur mittels Aktivitätsbestimmung mit einem chromogenen Substrat möglich.
3. Die Überprüfung der Dosierungsempfehlung mit wiederholenden Injektionen zeigte Plasmaheparinspiegel, die geringgradig über dem angestrebten, vom Menschen entlehnten, therapeutischen Bereich lagen. Auffällig war der signifikante Abfall der Antithrombin-III-Aktivität, der Thrombozytenzahl sowie der Hämatokritwerte, die eine engmaschige Kontrolle während einer Therapie mit NMH bedürfen.

Da zudem bei keinem der mit wiederholten NMH-Injektionen behandelten Hunde Anzeichen einer gesteigerten Blutungsbereitschaft auftraten, kann das hier verwendete Protokoll für orientierende klinische Studien empfohlen werden.

H Summary

Susanne Grebe

Pharmacokinetics of intravenously and subcutaneously injected low molecular weight heparin in dogs – effect on thrombin clotting time, activated partial thromboplastin time, resonance thrombogram and antithrombin III activity

The aim of the present study was to evaluate a dosage scheme for heparinization of dogs based on the results of a single subcutaneous or intravenous injection of different dosages of the low molecular weight heparin (LMWH) Fragmin® D and, in addition, to evaluate this scheme. Moreover, the influence of LMWH on the screening tests of the haemostasis system should be investigated with regard to a possible therapy monitoring and an evaluation of basic elements of the effects of LMWH on the blood coagulation system in dogs.

The study was carried out on groups of 5 healthy Beagle dogs which received a single subcutaneous (50, 100 or 200 anti-Factor-Xa-Units [anti-FXaU./kg body weight, BW) or intravenous (25, 50 or 100 anti-FXaU./kg BW) injection of LMWH. Samples of citrate- and EDTA-blood were collected after subcutaneous administration before heparin administration as well as 15 and 30 minutes, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12 and 24 hours. After intravenous injection samples were taken before heparin administration as well as 2, 5, 10, 15 and 30 minutes and also 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10 and 12 hours after the heparin application. Blood samples after subcutaneous repeated applications were drawn on the following times: before and 2 hours after the 1st, 2nd, 3rd and 6th heparin administration. To each time the anti-factor-Xa-activity, the thrombin clotting time (TCT) with two different thrombin activities in the reagent (3 I.U./ml and 6 I.U./ml), the activated partial thromboplastin time (APTT) with two different commercially reagents, the reaction time of the resonance thrombogram (RTG-r, only after single LMWH-injection) and the antithrombin III activity were measured. Furthermore, to each time of blood sampling the haematocrit and platelet count were determined.

The study revealed the following results:

1. After intravenous heparin application of 25, 50 and 100 anti-FXaU./kg BW the maximum plasma heparin activities of 0.52 ± 0.12 (mean and standard deviation), 1.08 ± 0.23 or 1.86 ± 0.17 anti-FXaU./ml, respectively, were measured. After subcutaneous application the maximum plasma heparin activity (50 anti-FXaU./kg BW: 0.28 ± 0.01 anti-FXaU./ml, 100 anti-FXaU./kg BW: 0.52 ± 0.06 anti-FXaU./ml, 200 anti-FXaU./kg BW: 1.09 ± 0.23 anti-FXaU./ml) was measured after 144 - 216 minutes (mean values). Intravenous application of LMWH had a short plasma terminal half-life (t_{50}) between 49 and 76 minutes. A distinctly longer t_{50} was found after subcutaneous injection. For the dosages of 50, 100 and 200 anti-FXaU./kg BW LMWH t_{50} of 80, 123 and 180 minutes were calculated. The bioavailability for the subcutaneous LMWH-injection of 50 and 100 anti-FXaU./kg BW was 107 % and 104 %.
2. The most sensitive test was the RTG-r with a 2.0-fold prolongation of the baseline after subcutaneous application of 200 anti-FXaU./kg BW. The second highest sensitivity was found for the TCT measured with 3 I.U. thrombin/ml in the reagent which was prolonged up to 1.5-fold above starting values after injection of the same dosage. These sensitivity of these screening tests is caused by the low concentration of thrombin respectively the slow clotting in these test systems. It must be kept in mind that the significant changes of the tests were limited to plasma heparin activities which were above the therapeutic levels taken from human beings guidelines. This indicates that these screening tests are not suitable for monitoring a therapy with LMWH and laboratory controls in dogs are only possible on the basis of activity measurements with a chromogenic substrate.
3. The evaluation of the dosage protocol for repeated applications revealed that plasma heparin activities ranged slightly over the therapeutic level taken from the guidelines for human beings. Further results of this experiment were a significant decrease of the antithrombin III activity, the platelet counts and the haematocrit indicating the necessity to monitor these parameters during a therapy with LMWH.

Since, in addition, none of the dogs treated with repeated subcutaneous injections of LMWH revealed symptoms of an increased bleeding tendency, the dosage scheme used in this study can be recommended for clinical trials.