

F. Zusammenfassung

Das Ziel der vorliegenden Studie war die Untersuchung des Einflusses von unfraktioniertem (UFH) und niedermolekularem (NMH) Heparin auf die Thrombozytenfunktion beim Hund.

Dies geschah einerseits durch In-vitro-Zusatz von Heparin in unterschiedlichen Konzentrationen (0,2, 0,5, 1, 2, 5, 10, 20 und 50 I.E./ml UFH bzw. Anti-FXaE/ml NMH), bei der Thrombin-induzierten Aggregation zusätzlich 0,025, 0,05 und 0,1 I.E. bzw. Anti-FXaE/ml) zum PRP gesunder Hunde ($n = 5 - 19$) und Messung der mit ADP, Kollagen bzw. Thrombin induzierten Thrombozytenaggregation nach BORN und der In-vitro-Blutungszeit. Zusätzlich kam ein Testansatz der ADP-induzierten Thrombozytenaggregation zur Anwendung mit individueller Einstellung des Aggregationsmaximums in der Kontrolle auf 30 - 40 %. Ergänzend wurde der Einfluß des Zusatzes von 1 und 50 I.E./ml UFH bzw. Anti-FXaE/ml NMH auf die mit der BREDDIN-Methode und der im Aggregometer gemessenen Spontanaggregation untersucht. Andererseits wurde der Einfluß einer einmaligen subkutanen Applikation von 1000 I.E./kg KGW UFH bei 5 gesunden Hunden auf die Thrombozytenaggregation, die kapilläre In-vitro- und In-vivo-Blutungszeit sowie die Thrombozytenzahlmessung bestimmt.

Der deutlichste Effekt zeigte sich bei der Thrombin-induzierten Aggregation. Der erzielte Effekt bei der Thrombin-induzierten Aggregation spiegelt die Hauptwirkung des Heparins wider, die auf der Katalyse der Hemmung von Thrombin und anderer Serinproteasen durch Antithrombin III (AT III) beruht. Das Aggregationsmaximum lag bei der mit 1 I.U./ml Thrombin (Endkonzentration) induzierten Thrombozytenaggregation bei allen geprüften Konzentrationen von UFH $\geq 0,025$ I.E./ml erheblich niedriger als in den mitgeführten Kontrollen. So lag das Aggregationsmaximum z.B. bei Verwendung von 0,2 I.E./ml bei 46,8 % (\bar{x}) [Kontrolle: 86,85 % (\bar{x})]. Bei der ergänzend mit 10 I.U./ml Thrombin induzierten Thrombozytenaggregation konnte eine signifikante Verringerung des Aggregationsmaximums ab einer UFH-Konzentration $\geq 0,5$ I.E./ml beobachtet werden. Der Zusatz von NMH ($\geq 0,2$ Anti-FXaE/ml) führte bei Verwendung von 1

I.U./ml Thrombin zur deutlichen Verminderung des Aggregationsmaximums im Vergleich zur Kontrolle ($p < 0,01$).

Eine signifikante Verminderung der Kollagen-induzierten Thrombozytenaggregation im Vergleich zur Kontrolle zeigte sich nur bei Zusatz hoher UFH-Konzentrationen zum PRP (≥ 20 I.E./ml UFH). Dagegen war ein systematischer Einfluß auf das Aggregationsmaximum der ADP-induzierten Thrombozytenaggregation weder für den Zusatz von UFH noch von NMH nachweisbar.

Die Spontanaggregation der Thrombozyten war nach Zugabe von Heparin zum PRP bei 50 I.E./ml UFH (17,6 % Aggregationsmaximum; Kontrolle: 2,6 % (Median)) bzw. 50 Anti-FXaE/ml NMH (9,3 % Aggregationsmaximum; Kontrolle: 2,8 %) deutlich gesteigert. Bei der Zugabe von 1 I.E./ml UFH bzw. 1 Anti-FXaE/ml NMH zum PRP zeigte sich das Aggregationsmaximum unverändert im Vergleich zur Kontrolle. Die Thrombozytenaggregation nach der BREDDIN-Methode wies keine wesentliche Veränderung im Vergleich zur Kontrolle (ohne Heparinzusatz) auf.

Die kapilläre In-vitro-Blutungszeit (Verschlußzeit) war nach Zugabe von UFH bzw. NMH zum antikoagulierten Vollblut erst bei Konzentrationen von ≥ 10 I.E./ml UFH bzw. ≥ 50 Anti-FXaE/ml NMH auffällig verlängert.

Nach subkutaner Heparininjektion (1000 I.E./kg KGW UFH) ergab sich bei einer Heparinplasmakonzentration von $1,20 \pm 0,11$ I.E./ml eine signifikante Verringerung des Aggregationsmaximums bei der Thrombin-induzierten Thrombozytenaggregation im Median von 93,5 % auf 14,6 %. Weder bei der ADP- noch bei der Kollagen-induzierten Thrombozytenaggregation konnte ein wesentlicher Einfluß von Heparin auf das Aggregationsmaximum festgestellt werden. Die Thrombozytenaggregation nach der Methode von BREDDIN ex vivo zeigte ebenfalls keine wesentliche Veränderung im Vergleich zur Kontrolle. Die entsprechend der NOLTE-Methode gemessene kapilläre In-vivo-Blutungszeit war 4 Stunden nach s.c. Heparinapplikation geringgradig verlängert von im Mittel 78 Sekunden in der Kontrolle auf 91 Sekunden ($p < 0,01$). Dieser Effekt konnte allerdings weder mit der subaqual gemessenen kapillären In-vivo-Blutungszeit noch mit der kapillären In-vitro-Blutungszeit bestätigt werden. Es bestand kein deutlicher Unterschied zwischen der Thrombozytenzahl vor und 4 Stunden nach s.c. Heparinapplikation.

Zusammenfassend verdeutlichen die Ergebnisse, daß UFH und NMH nach In-vitro-Zusatz bzw. s.c. Applikation in therapeutisch erreichten Heparinplasmakonzentrationen keinen wesentlichen Einfluß auf die primäre Hämostase beim Hund besitzen.

G. Summary

Katja Nimmerfall

The effect of heparin on platelet function in dogs

The aim of the present study was to examine the influence of unfractionated heparin (UFH) and low-molecular weight heparin (LMWH) on the function of canine thrombocytes.

This was performed by adding different concentrations of heparin (0,2, 0,5, 1, 2, 5, 10, 20, and 50 I.U./ml UFH or Anti-FXaU/ml LMWH, respectively; aggregation induced by thrombin additionally: 0,025, 0,05, and 0,1 I.U./ml UFH or Anti-FXaU/ml LMWH) to platelet rich plasma (PRP) of healthy dogs (n = 5 - 19). Subsequently, platelet aggregation induced by ADP, collagen or thrombin as well as the in vitro bleeding time were measured. Additionally, a specific assay for ADP induced platelet aggregation was performed which enabled an individual adjustment of the aggregation maximum at 30 - 40 % in the control measurements. The influence of 1 and 50 I.U./ml UFH and Anti-FXaU/ml LMWH on spontaneous platelet aggregation was measured using the BREDDIN method and by the aggregometer.

In addition, the influence of a single subcutaneous injection of 1000 I.U./kg body weight UFH on thrombocyte aggregation, capillary in vitro and in vivo bleeding time as well as platelet number was examined in 5 dogs.

The most prominent effect was noted in the platelet aggregation induced by thrombin. This reflects the main coagulation inhibiting effect of heparin resulting in the inhibition of thrombin and further serine proteases by the heparin induced activation of antithrombin III (AT III).

The aggregation maximum of the platelet aggregation induced by 1 I.U./ml thrombin (final concentration) was significantly lower in all of the tested UFH concentrations \geq 0,025 I.U./ml in comparison to control measurements. For example, the aggregation maximum was 46.8 % (\bar{x}) [control: 86.85%, (\bar{x})] at a concentration of UFH of 0.2

I.U./ml. If the aggregation was induced by 10 I.U./ml thrombin a significant reduction of the aggregation maximum was restricted to UFH concentrations ≥ 0.5 I.U./ml.

The addition of LMWH to canine PRP resulted in a distinct decrease ($p < 0,01$) of the maximum aggregation induced by 1 I.U./ml thrombin in concentrations ≥ 0.2 AntiFXaU/ml LMWH.

A significant reduction of collagen induced platelet aggregation in comparison to control measurements was only seen with the addition of high concentrations of UFH to the PRP (≥ 20 I.U./ml) in comparison to control measurements.

A systematic influence of heparin on the aggregation maximum of ADP induced platelet aggregation could not be demonstrated, neither for UFH nor for LMWH.

Spontaneous platelet aggregation was increased after the addition of 50 I.U./ml UFH [aggregation maximum: 17.6 %, control: 2.6 % (median)] and 50 AntiFXaU/ml LMWH (aggregation maximum: 9.3 %, control: 2.8 %) to the PRP. No significant change in platelet aggregation could be demonstrated with the method according to BREDDIN in comparison to control measurements.

Capillary in vitro bleeding time (closure time) was prolonged only after adding high heparin concentrations (≥ 10 I.U./ml UFH and ≥ 50 AntiFxaU/ml LMWH) to the sample material.

A single subcutaneous injection of heparin (1000 I.U./kg body weight UFH) with subsequent plasma heparin concentrations of 1.20 ± 0.11 I.U./ml resulted in a significant reduction of the aggregation maximum of platelet aggregation induced by thrombin from 93.5% to 14.6% (mean values). Neither in the platelet aggregation induced by ADP nor collagen an influence of subcutaneously administered heparin on the aggregation maximum could be shown. The platelet aggregation measured by the BREDDIN method also exhibited no significant changes in comparison to control measurements.

Capillary bleeding time measured according to NOLTE et al. was slightly prolonged 4 hours after the heparin injection to a mean value of 91 sec (control: 78 sec) ($p < 0.01$). This effect could, however, neither be confirmed by subaqual capillary bleeding time nor by capillary in vitro bleeding time measurements. No difference in the platelet numbers was seen before and 4 hours after the heparin application.

In conclusion, the results of the present study illustrate the insignificant influence of UFH and LMWH in therapeutical heparin plasma concentrations on the function of primary haemostasis in dogs.