



Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg
Fakultät für Klinische Medizin Mannheim
Dissertations-Kurzfassung

Heparin and heparin-induced thrombocytopenia: new methods for determination, diagnosis and inside into pathophysiology

Autor: Lianchun Wang
Einrichtung: I. Medizinische Klinik
Doktorvater: Prof. Dr. J. Harenberg

Many techniques have been applied to analyze heparins, low molecular weight heparins (LMWHs) and other glycosaminoglycans (GAGs). In the present study, a sensitive, nonradioactive azure A-silver staining method combining agarose gel electrophoresis was established and evaluated. Unfractionated heparins (UFHs), LMWHs, heparan sulfate (HS), chondroitin sulfate A (CSA), dermatan sulfate (DS), keratan sulfate (KS) and hyaluronic acid (HA) were analyzed. The detection limit of the method was 0.5 ng for heparin, LMWH, HA, CSA and DS, 2 ng for KS and 6 ng for HA in the 2 μ l sample volume. Dilution curves demonstrated linear correlation between logarithm of the concentration (1-500 ng/ μ l) of the GAGs and their optical absorbance.

A fluorescence-linked immunofiltration assay (FLIFA) was developed for the determination of heparin-induced (HI) -IgG in heparin-induced thrombocytopenia (HIT) type II patients. Values were expressed as relative fluorescence intensity (RFI) ratio (RFI patient / RFI normal) and were 1.965 ± 0.413 in HIT type II patients (n=36) and 1.064 ± 0.162 in healthy controls (n=50, p < 0.0001). The intra- and inter-assay coefficients of variation of the assay were 4.9% and 10.4%, respectively. 81 clinically suspected HIT type II patients were analyzed by HI-IgG assay. 37 of 38 finally confirmed patients had elevated RFI ratios of HI-IgG and 36 had positive heparin-induced platelet activation (HIPA) results, meanwhile 42 of the 43 non-HIT type II patients had normal RFI ratios of HI-IgG and 41 had negative HIPA results. The agreement between the two methods was 93.8%. 58 of the 81 patients were available for heparin-platelet factor 4 induced antibody assay (HPIA). HI-IgG assay had a good agreement with HPIA too(81%). None of 319 healthy volunteers and 38 other thrombocytopenic patients had positive results. 2 of 56 heparin/LMWH receiving patients had elevated RFI ratios of HI-IgG. The cross-reactivities of HIT sera with LMWH, danaparoid were analyzed by competitive binding and had similar results as did in HIPA. Based on the present results, the inside of the pathophysiology in HIT type II patients was elucidated in more detail and a more specific model is suggested.

Eine Anzahl von Techniken sind entwickelt worden, um Heparine, niedermolekulare Heparine (LMWH) und andere Glykosaminoglykane (GAG's) zu analysieren. In der vorliegenden Studie wurde eine sensitive, nicht-radioaktive, kombinierte Färbung aus Azur A und Silber entwickelt, die die Glykosaminoglykane auf Agarose Gelelektrophoresen darstellt. Unfraktionierte Heparine, niedermolekulare Heparine, Heparansulfat (HS), Chondroitinsulfat (CSA), Dermatansulfat (DS), Keratansulfat (KS) und Hyaluronsäure (HA) wurden analysiert. Die Detektionsgrenze lag bei 0,5 ng für Heparin, LMWH, HA, CSA und DS, bei 2 ng für KS und bei 6 ng für HA bei 2 μ l Analysen-Volumen. Die Verdünnungskurven zeigten eine lineare Korrelation zwischen dem Logarithmus der Konzentration von 1-500 ng/ μ l und der Absorption in dem Testsystem für alle Glykosaminoglykane.

Ein Fluoreszenz-gebundener Immunfiltrations-Assay (FLIFA) wurde für die Bestimmung der Heparin-induzierten (HI)-IgG bei Patienten mit Heparin-induzierter Thrombozytopenie (HIT) Typ II entwickelt. Die Werte wurden als relative Fluoreszenz Intensität (RFI)-Ratio (RFI Patient/RFI normal) ausgedrückt und betragen $1,965 \pm 0,413$ bei HIT Typ II Patienten (n=36) und $1,064 \pm 0,162$ bei gesunden Kontrollen (n=50, p <0,0001). Die Intra- und Inter-Assay Variationskoeffizienten betragen 4,9 % und 10,4 %. 81 Patienten mit Verdacht auf HIT Typ II wurden mittels HI-IgG Assay analysiert. 37 der 38 schließlich bestätigten HIT Typ II Patienten zeigten erhöhte RFI-Ratios. 36 dieser Patienten wiesen einen positiven Heparin-induzierten Plättchenaggregationstest (HIPA) auf, während 42 der 43 Nicht-HIT Typ II Patienten normale RFI-Ratios aufwiesen. 41 Patienten hatten negative HIPA Ergebnisse. Die Übereinstimmung beider Testmethoden betrug 93,8 %. 58 von 81 Patienten wurden mittels Heparin-Plättchenfaktor 4-induziertem Antikörper Assay (HPIA) zusätzlich analysiert. Die

Übereinstimmung mit dem HI-IgG Assay betrug 81 %. Keiner von 319 gesunden Personen oder von 38 Patienten mit Thrombozytopenie anderer Ursache zeigten positive Ergebnisse. 2 von 56 Patienten unter Therapie mit Heparin oder niedermolekularem Heparin zeigten erhöhte RFI-Ratios der HI-IgG. Die Kreuzreaktion der HIT Seren mit niedermolekularem Heparin oder Danaparoid wurden mittels kompetitiver Bindung analysiert und zeigten ähnliche Ergebnisse wie im HIPA-Test. Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse ließ sich die Pathophysiologie des HIT Typ II deutlicher zuordnen und in einem Modell darstellen.