



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

**Herstellung und Eigenschaften von Protamin-Microbeads zur Bestimmung von Heparinkonzentrationen**

Autor: Daniel Melui  
Einrichtung: I. Medizinische Klinik  
Doktorvater: Prof. Dr. J. Harenberg

In den meisten heute eingesetzten Testsystemen erfolgt die Bestimmung von Heparinkonzentrationen durch enzymatische Aktivitätsmessungen. Dabei werden für die Bestimmung unfraktionierter Heparine Globalgerinnungsteste (aktivierte partielle Thromboplastinzeit und Thrombinzeit) verwendet. Für die Bestimmung niedermolekularer Heparine finden der chromogene Test S-2222 und der Heptest Verwendung, die spezifisch die Anti-Faktor Xa Aktivität erfassen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung eines kompetitiven Bindungsassays für Heparin mit LMW-Heparin-Tyramin-Fitc und Protamin-Microbeads zur durchflußzytometrischen Bestimmung von Heparinkonzentrationen. Dazu wurden verschiedene Protamin-Microbeads hergestellt und deren Eigenschaften verglichen. Mit Hilfe der Durchflußzytometrie wurde die Bindung von LMW-Heparin-Tyramin-Fitc an die Protamin-Microbeads in wässriger Lösung, Plasma und Vollblut untersucht. Der kompetitive Bindungsassay für Heparin wurde in wässriger Lösung, Plasma und Vollblut durchgeführt. Eine Validierung des entwickelten Tests mit den geeignetsten Protamin-Microbeads wurde in Plasma vorgenommen.

Die in dieser Studie verwendeten Protamin-Estapor-Microbeads, Protamin-Polysciences-Microbeads und Protamin-Dynabeads ließen sich durchflußzytometrisch gut voneinander trennen. Auch in Vollblut waren die Protamin-Microbeads gut von den verschiedenen Populationen der Leukozyten zu unterscheiden. Auch die relative Größe der Microbeads konnte mit der Durchflußzytometrie bestimmt werden. Die Durchflußzytometrie ermöglichte anhand der Messung der Fluoreszenzintensität die quantitative Bestimmung von LMW-Heparin-Tyramin-Fitc durch die Bindung an die Protamin-Microbeads. Mit der Relativen Fluoreszenzintensität (RFI) der einzelnen Partikelpopulationen konnte eine Aussage über die Menge der an den Protamin-Microbeads gebundenen Fluoreszenz gemacht werden. Auch die Konzentration unfraktionierter und niedermolekularer Heparine konnte mit den Protamin-Microbeads und der Durchflußzytometrie bestimmt werden. Dazu wurde ein kompetitiver Bindungsassay für Heparin mit LMW-Heparin-Tyramin-Fitc und Protamin-Microbeads entwickelt.

Die Bindung von LMW-Heparin-Tyramin-Fitc an die Protamin-Microbeads und der kompetitive Bindungsassay für Heparin zeigten eine Abhängigkeit von der Größe der Protamin-Microbeads, ihrer Herstellungsmethode (Reaktionsbedingungen, Art der Protaminbindung, pH-Wert, Verdünnung der Protamin-Microbeads) und dem umgebenden biologischen Medium (wässrige Lösung, Plasma, Vollblut). Aufgrund der Linearität und der geringen Standardabweichungen der Standardkurven erwiesen sich die Protamin-Dynabeads M-450 sowohl bei der Bindung von LMW-Heparin-Tyramin-Fitc als auch im kompetitiven Bindungsassay für Heparin am vorteilhaftesten. Außerdem zeigten sie eine sehr geringe Größenstreuung und stellten sich in der Durchflußzytometrie als kleine, umschriebene Population dar.

Die Konzentration von LMW-Heparin-Tyramin-Fitc ließ sich in wässriger Lösung, Humanplasma und Vollblut bestimmen. Mit dem entwickelten Test lassen sich LMW-Heparin-Tyramin-Fitc-Konzentrationen von 0,001 aXa E/ml bis 2,0 aXa E/ml messen. Dieser Assay eignet sich gut für pharmakokinetische Untersuchungen.

Der kompetitive Bindungsassay für Heparin mit Protamin-Dynabeads M-450 ist in Plasma am empfindlichsten. Es lassen sich Heparinkonzentrationen von 0,001 aXa E/ml bis 10,0 aXa E/ml messen. Der  $IC_{50}$ -Wert liegt in Plasma bei einer Heparinkonzentration von 0,15 aXa E/ml. Die

Sensitivität des kompetitiven Bindungsassays für Heparin liegt in Plasma bei einer Heparinkonzentration von 0,04 aXa E/ml.

Der kompetitive Bindungsassay für Heparin mit LMW-Heparin-Tyramin-Fitc und Protamin-Dynabeads M-450 wurde validiert. Dabei wurden die Konzentrationen unfraktionierter und niedermolekularer Heparine in Plasma bestimmt. Es wurde eine Inkubationsdauer des Heparins von 10 min und länger gewählt. Das entwickelte Testsystem ist für unfraktionierte Heparine empfindlicher als für niedermolekulare Heparine. Bei der Bestimmung unfraktionierter Heparine zeigt der Test für Heparin-Natrium (Ratiopharm) und Heparin-Calcium (Choay) eine größere Empfindlichkeit als für Heparin-Natrium (Sigma) und Heparin-Lithium (Pharmacia). Für Heparin-Lithium (Pharmacia) ist der meßbare Konzentrationsbereich des Assays am größten. Es lassen sich Konzentrationen von 0,005 E/ml bis 10,0 E/ml messen. Bei der Bestimmung niedermolekularer Heparine ist der meßbare Konzentrationsbereich des kompetitiven Bindungsassays für Fraxiparin® am größten. Es lassen sich Konzentrationen von 0,001 E/ml bis 10,0 E/ml bestimmen. Dermatansulfat und Dextransulfat lassen sich mit dem kompetitiven Bindungsassay für Heparin nicht messen. Chondroitinsulfat A dagegen ist ab einer Konzentration von 0,25 mg/ml meßbar. Dies entspricht etwa einer 2500-fach höheren Konzentration als die untere Nachweisgrenze für Heparin.

Die Ergebnisse zeigen, daß sich unfraktionierte und niedermolekulare Heparine mit Hilfe des kompetitiven Bindungsassays für Heparin mit LMW-Heparin-Tyramin-Fitc und Protamin-Microbeads quantitativ in wässrigen Lösungen und in Plasma bestimmen lassen. Dafür eignen sich von den geprüften Microbeads die Dynabeads M-450 am besten.