

Blut und Blutgerinnung

Teil 3

1

INHALT

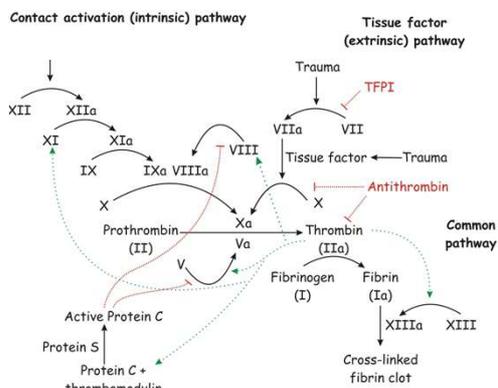
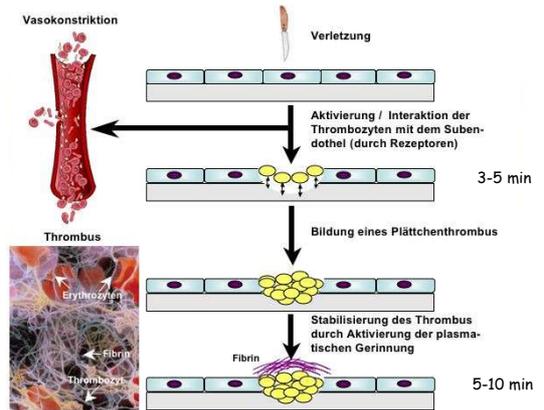
- (I) Bestandteile und Funktionen des Blutes
- (II) Blutgerinnung und Fibrinolyse
- (III) Regulation der Blutgerinnung
- (IV) Wechselwirkung von Gerinnung und Entzündung
- (V) Antikoagulation und Methoden der Blutreinigung

2

Teil 2

- Zelluläre und plasmatische Gerinnung
- Plättchen
- Gerinnungskaskade
- Gerinnungsfaktoren und Gla-Domänen
- Fibrinolyse

3



5

Teil 3

Regulation der Blutgerinnung

- Natürliche Antikoagulantien
 - Tissue Factor Pathway Inhibitor
 - Antithrombin
 - Protein C
- Antikoagulantien in der Medizin
 - Heparin
 - Coumarinderivate
 - direkte Thrombininhibitoren
- Gerinnungstests

6

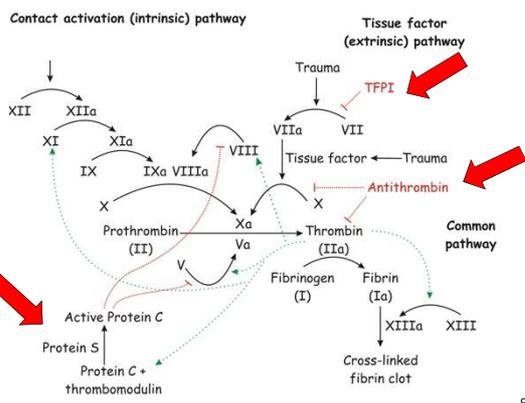
Regulation der Blutgerinnung

7

Natürliche Antikoagulanzen

- Tissue factor pathway inhibitor (TFPI)
- Antithrombin (AT-III)
- aktiviertes Protein C, Protein S

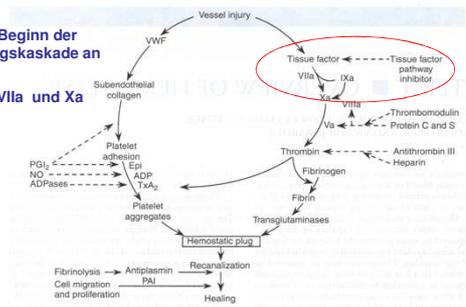
8



9

Tissue factor pathway inhibitor, TFPI

- setzt am Beginn der Gerinnungskaskade an
- inhibiert VIIa und Xa



10

TFPI

- Lokalisation: v.a. auf der Endotheloberfläche (gerinnungshemmende Eigenschaften!)
- zusätzlicher Pool in den α -Granula der Plättchen, wird bei Plättchenaktivierung freigesetzt
- zirkulierender Pool im Plasma gebunden an Lipoproteine (LDL)

11

Antithrombin AT-III

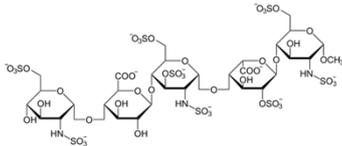
- Serinproteaseinhibitor (Serpin)
- inaktiviert v.a. Thrombin (FIIa) und FXa; schwächer auch IXa, XIa, XIIa
- AT allein inhibiert Thrombin nur schwach
- Wirkung wird durch Glukosaminoglykane verstärkt:
Heparansulfat (Endotheloberfläche)
Heparin (Klinik)

12

Heparin

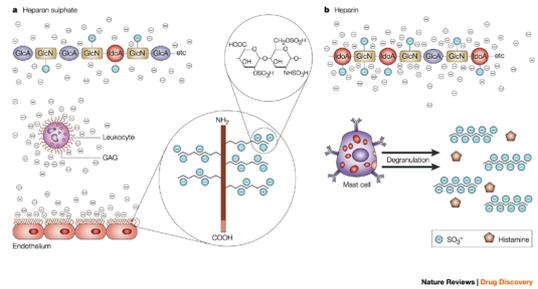
gehört zur Gruppe der Glukosaminoglykane (Mucopolysaccharide)

- saure Polysaccharide
- Aufbau aus Disaccharideinheiten, je eine Zuckersäure und ein Aminozucker
- Bestandteile vieler Makromoleküle (Proteoglykane)
- Teil der extrazellulären Matrix (Wasserspeicherung, Elastizität)



13

Heparin and heparan sulphate



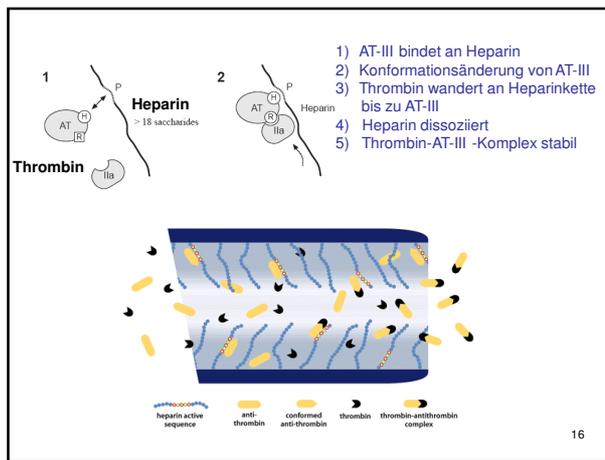
Nature Reviews Drug Discovery 1, 140-148 (2002)

14

Antithrombin

- AT-III bindet spezifisch an Pentasaccharidsequenz in Heparin
- Bindung bewirkt Konformationsänderung von AT-III
- Dadurch erhöht sich Affinität von AT-III für FXa und Thrombin

15



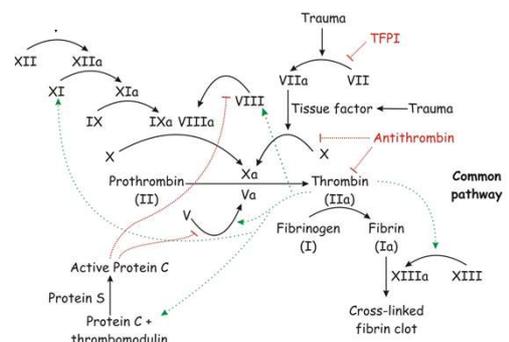
16

Aktiviertes Protein C

- Thrombin (FIIa) bindet an Thrombomodulin (Endotheloberfläche)
- FIIa-Thrombomodulinkomplex:
 - aktiviert Protein C (antikoagulatorisch)
- Aktiviertes Protein C (APC) hemmt Faktoren Va und VIIIa
- APC hat auch entzündungshemmende und anti-apoptische Effekte

17

Inaktivierung von FVa und FVIIIa durch APC



18

Faktor V Leiden

- Mutation in Faktor V (Name: wurde in Leiden entdeckt)
- häufigste Ursache für erbliche venöse Thrombose
- durch eine Mutation an der Spaltungsstelle für Protein C kann Faktor Va nicht inaktiviert werden, Protein C kann daher nicht wirken

19

Antikoagulantien in der Medizin

- direkte: reagieren mit Faktoren der Gerinnungskaskade
z.B. Heparin
- indirekte: hemmen die Synthese der Gerinnungsfaktoren
z.B. Warfarin bzw. den Ablauf der Gerinnungskaskade z. B. Citrat
- Thrombozytenaggregationshemmer
z. B. Acetylsalicylsäure (inhibiert die Cyclooxygenase und die Entstehung von Thromboxan aus Arachidonsäure)

20

Antikoagulantien in der Medizin

Anwendung:

- prophylaktisch:
 - vor, während und nach Operationen
 - bei Bettlägrigkeit
 - bei Blutentnahme
 - bei Blutreinigung (Dialyse etc.)
- therapeutisch:
 - Behandlung von Thrombosen

21

Antikoagulantien in der Medizin

Beispiele:

- Heparine (wirken über AT-III)
- Hirudin (inhibiert Thrombin)
- Argatroban (inhibiert Thrombin)
- Cumarinderivate (hemmen Carboxylierung v. Gerinnungsfaktoren)
- Zitrat (extrakorporale Blutreinigung)

22

Heparine

- heterogene Gruppe von Molekülen
- gewonnen aus Dünndarmmucosa des Schweins oder aus Rinderlungen
- wird nicht aus dem Magen-Darm-Trakt resorbiert
Verabreichung intravenös oder subkutan
- Angriffspunkt: Antithrombin
Erhöhung der Affinität von AT für FXa und FIIa
ca. um den Faktor 1000
- Dosis wird in Internationalen Einheiten (IE) angegeben: bezieht sich auf biologische Aktivität

23

Klassifizierung der Heparine

- **Unfraktioniertes Heparin (UFH)**
 - ca. 15 kDa (3 - 30)
 - ca. 1/3 der Moleküle sind aktiv (enthalten spezifische Pentasaccharidsequenz für Bindung von AT)
- **Low molecular weight heparin (LMWH)**
 - ca. 5 kDa (1 - 10)
 - wirken v.a. auf FXa
 - bessere Pharmakokinetik (höhere HWZ)
 - gewonnen aus UFH durch enzymatische oder chemische Spaltung

24

Heparin-induzierte Thrombozytopenie (HIT)

- Bildung von Antikörpern gegen Komplexe aus Plättchenfaktor 4 (PF4) und Heparin
- tritt in ca. 5% der Patienten auf, die mit UFH behandelt werden (bei LMWH ca. 1%)
 - PF 4: in α -Granula der Plättchen gespeichert, stark positiv geladen
 - wird bei Plättchenaktivierung freigesetzt
 - bindet an Glykosaminoglykane (Heparansulfat) auf der Endotheloberfläche
 - kann daher lokal die Wirkung von Antithrombin hemmen
 - hohe Affinität für Heparin

25

HIT

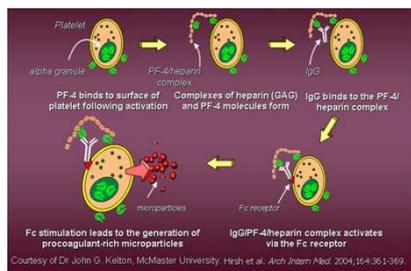
- PF4 und Heparin wirken als Antigen
- Bildung von AK gegen diesen Komplex

Folgen der Antikörperbildung:

- Komplex aus PF4, Heparin, und Antikörper bindet an den Fc-Rezeptor der Plättchen und führt zur Plättchenaktivierung
 - > weitere Ausschüttung von PF4
 - > PF4 bindet und neutralisiert freies Heparin
 - > PF4 bindet auch an Heparansulfat auf Endothelzellen > Aktivierung der Endothelzellen und weitere Thrombinbildung > **Thrombose**

26

Heparin-induzierte Thrombozytopenie



Hirsh et al Arch Intern Med 2004; 164:361-369

27

HIT

Maßnahmen:

- Bestimmung der Thrombozytenzahl vor jeder Heparinabgabe
Abfall unter 50% des Ausgangswertes oder auf < 150.000/ μ L wird als HIT angesehen
- Keine Behandlung von Patienten mit HIT in der Vorgeschichte mit Heparin
- bei HIT-Verdacht sofortiges Absetzen von Heparin

28

Heparin-Beschichtung von Oberflächen

- unterdrückt Gerinnungsaktivierung auf der Oberfläche
- Heparin an der Oberfläche bindet Antithrombin und hält so die lokalen Thrombinkonzentrationen niedrig
Anwendung z. B. bei Stents



29

Der Heparin-Skandal

Anfang 2008: 100 Todesfälle in den USA durch verunreinigtes Heparin

Februar 2008: kontaminierte Chargen auch in Europa auf dem Markt

80 Dialysepatienten zeigten Blutdruckabfall, Atemnot; allergischer Schock bei 3 Patienten
Rückruf

- seit BSE ist Schweinemucosa die Hauptquelle für Heparinergewinnung (statt Rinderlunge)
- mehr als die Hälfte von Rohheparin der Weltproduktion stammt aus China

30



31



32



33

Ursache:

Verunreinigung mit Chondroitinsulfat (5 - 50 %)

- Chemisch ähnlich dem Heparin
- N-Acetylgalaktosamin und Glucuronsäure, sulfatiert
- kommt in Knorpel und Schalen von Meeresfrüchten vor
- deutlich billiger als Heparin

vorsätzliche Beimischung?

34

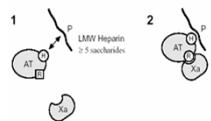
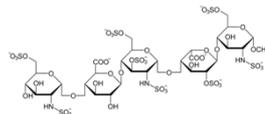
Fondaparinux Arixtra

Selektiver Faktor Xa-Hemmer

Bindet nicht an PF4, daher keine
Induktion von HIT

Pentasaccharid
„aktive Sequenz“ von Heparin

Nachteil:
es gibt kein Gegenmittel



35

Direkte Thrombin-Inhibitoren

- Argatroban (synthetisch)
- Hirudin (rekombinant)
- binden direkt an das aktive Zentrum von Thrombin
- Nicht abhängig von AT-III

36

1914
Luis Agote
erste erfolgreiche Bluttransfusion, Antikoagulation mit Natriumzitrat

43

Zitrat

$$\begin{array}{c} \text{Ca}^{2+} \quad \cdot \text{OOC} \\ | \\ \cdot \text{OOC} - \text{CH}_2 - \text{C} - \text{CH}_2 - \text{COO} \cdot \\ | \\ \text{OH} \end{array} \quad \begin{array}{c} \text{COO}^- \quad \text{Ca}^{2+} \\ | \\ \cdot \text{OOC} - \text{CH}_2 - \text{C} - \text{CH}_2 - \text{COO} \cdot \\ | \\ \text{OH} \end{array}$$

Komplex: Ca₃ (Citrate)₂

- metabolisiert zu Bicarbonat (Leber)
- reduziert Komplementaktivierung

44

Blutabnahmesystem (Vacuette)

Glasröhrchen mit Schraubdeckel (Septum), Vakuum, Farbcodierung je nach Verwendung bzw. je nach Antikoagulation

45

VACUETTE® Coagulation Tubes

Coagulation tubes are filled with buffered tri-sodium citrate solution. Citrate concentration of 0.109 mol/l (3.2%) is available. The choice of the concentration depends upon the policies of the laboratories. The mixing ratio is 1 part citrate to 9 parts blood.

VACUETTE® Heparin tubes

The interior of the tube wall is coated with lithium heparin, ammonium heparin or sodium heparin. The anticoagulant heparin activates antithrombins, thus blocking the coagulation cascade and producing a whole blood / plasma sample instead of clotted blood plus serum. Plasma tubes with lithium heparin and gel contain a barrier gel in the tube. The specific gravity of this material lies between that of the blood cells and plasma. During centrifugation the gel barrier moves upwards providing a stable barrier separating the plasma from cells. Plasma may be aspirated directly from the collection tube, eliminating the need for manual transfer to another container. This barrier allows for the stability of certain parameters in the primary tube under the recommended storage conditions for up to 48 hours.

46

Blutprodukte

47

Bluttransfusion

Zuführen von Blut oder Blutbestandteilen als Infusion

- Fremdblutspende
- Eigenblutspende

Vollbluttransfusionen heute nur mehr selten durchgeführt; Blut wird in Komponenten aufgetrennt und komponentenweise transfundiert

Vorteile:

- Patient erhält nur die tatsächlich benötigten Blutbestandteile (Plasma bei Faktorenmangel, Erythrozyten bei Anämie,...)
- Bessere Lagerfähigkeit (Plättchen bei RT, Erythrozyten bei mindestens 4 °C, Plasmaproteine eingefroren)

48

Gewinnung von Blutprodukten aus

- a) Vollblut (Pool vieler Blutspenden)
- b) Apherese (kontinuierlicher Prozess)

49

Blutprodukte:

- Erythrozyten-Konzentrate (bei Anämie)
- Granulozyten-Konzentrate
- Thrombozyten-Konzentrate
- Plasma (FFP, fresh frozen plasma)
- Stammzell-Präparate
- Gerinnungsfaktor-Konzentrate
- Immunglobuline

50

Erythrozytenkonzentrat



Thrombozytenkonzentrat



Indikationen für Bluttransfusionen

- Blutersatz nach Unfall/Operation
- Blutkrankheiten (Anämien; ab Hb von 6g/dL)
normal: 14-18 bzw. 12-16 g/dL
- Mangel od. Funktionsstörungen von
 - Thrombozyten
 - Plasma
 - Gerinnungsfaktoren

53

Risiken

- Übertragung von Bakterien oder Viren (Hepatitis B & C, HIV)

HIV, Hepatitis C -> Antikörpertests
(ELISA od. Western Blot gegen virale Proteine)

„diagnostisches Fenster“: Antikörper sind im Blut erst mehrere Wochen nach der Infektion nachweisbar

-> molekularbiologische Testmethoden (RT-PCR) – direkter Nachweis der viralen RNA

54

Transfusionszwischenfälle

- Verwechslung von Blutkonserven -> hämolytische Transfusionsreaktion, Zerstörung der Erythrozyten bei Transfusion von ABO-inkompatiblen Blut
- Bedside-Test (Kreuzprobe) vor Transfusion daher Vorschrift

55

Leukozytendepletion

- Entfernung von Leukozyten aus Blutpräparaten vor der Transfusion
- Leukozytengehalt < 10⁶/Konserven

Gründe:

- 1) Zellständige Viren (z.B. CMV) werden damit entfernt
 - 2) Graft-versus-host-disease wird vermieden: Leukozyten des Spenders (aus der Blutkonserven) erkennen Körperzellen des Empfängers als fremd und zerstören diese
- Leukozytenabreicherung erfolgt durch Filtration oder Zentrifugation und wird vor der Lagerung durchgeführt (LRC leukocyte reduction chambers)

56

Plasma

Fresh frozen plasma:

laut Definition innerhalb von 8 h eingefroren; Realität: < 24 h (dadurch Reduktion von FV und VIII um ca. 15%)

Verwendung:

- Ersatz für spezifische Gerinnungsfaktoren
- Behandlung von Blutungen bei Lebererkrankungen
- Behandlung von DIC
- Plasmaaustausch bei verschiedenen Autoimmunerkrankungen

57

Plättchenkonzentrate

- Gewinnung durch Apherese (kontinuierliche Aufarbeitung großer Blutvolumina)
- 50 mL Konzentrat -> ca. 5,5 x 10¹⁰ Plättchen
- Lagerung bei 22 °C, max. 5 d
- Anwendung: Therapie von Thrombozytopenie (verschiedene Ursachen: Autoimmunerkrankung -> erhöhte Zerstörung der Plättchen durch Autoantikörper; DIC; induziert durch bestimmte Medikamente)
- Platelet storage lesion – Verlust der Aktivität

58

Erythrozytenkonzentrate

- aus Frischblut durch Entfernung von Plasma gewonnen
- Hämatokrit ca. 75%
- Lagerung: 42 d bei 4 °C

59

Plasmaderivate

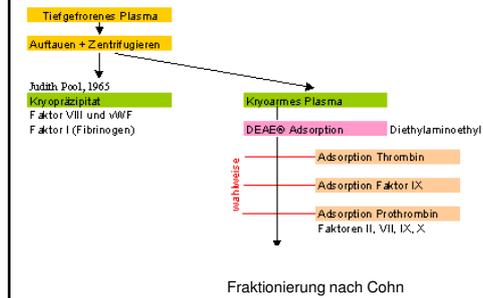
- Plasma als Ausgangsmaterial für die Gewinnung von Gerinnungsfaktoren
- FVII, FVIII, FIX werden heute rekombinant hergestellt
- Gefahr der Krankheitsübertragung -> PCR-Testung
- Reinigung der Einzelfaktoren durch verschiedene Präzipitations- und Chromatographieschritte
- Lyophilisierung der Produkte (Vorteil: keine Kühlung erforderlich)

60

Plasmafraktionierung

- FFP wird aufgetaut
- Kryopräzipitat durch Zentrifugieren entfernt (enthält FVIII, vWF, Fibrinogen)
- Reinigung dieser Proteine durch weitere Fäll- und Chromatographieschritte
- aus dem Überstand werden FII, VII, IX, X mittels DEAE-Adsorption gewonnen
- weitere Proteine durch Fraktionierung nach Cohn

61



62

Edwin J. Cohn, 1940er

Kryoarmeres Plasma nach Adsorption

Zugabe von Ethanol

Ethanol Fällung 8%
Faktor XIII im Präzipitat

Heparin-Adsorption
Antithrombin III

Zugabe von Ethanol

Ethanol Fällung 20-25%
Immunglobulin-Produkte im Präzipitat

Zugabe von Ethanol

Ethanol Fällung 40-42%
Albumin im Präzipitat

63

Fraktionierung nach Cohn

- Dem Plasma (ohne Kryopräzipitat) wird Ethanol in steigender Konzentration zugesetzt, Temperatur wird abgesenkt
- 8% Ethanol -> Faktor XIII ↓
- aus Überstand: Antithrombin durch Adsorption an Heparin gewonnen
- 20-25% Ethanol -> IgG ↓
- 40-42% Ethanol -> Albumin ↓

64

Methoden der Blutreinigung

65

Apherese

- griech. „wegnehmen“
- Verfahren zur Entfernung von Substanzen aus dem Blut oder Plasma des Patienten (Proteine, proteingebundene Substanzen, Zellen)

Therapeutische Apherese (pathogene Komponenten werden entfernt)
Diagnostische Apherese (Gewinnung von Zellen aus dem Blut)

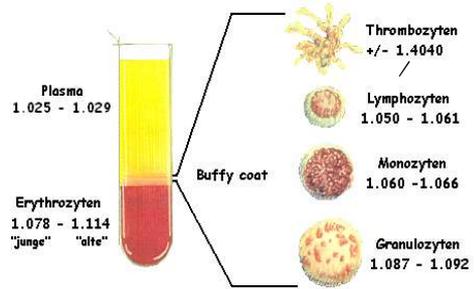
66

Apherese zur Gewinnung von Zellen

- Blut wird aus Armvene entnommen
- in steriles Schlauchsystem geleitet
- Antikoagulation mit Citrat
- Mischung wird in Zellzentrifuge geleitet
- Blutbestandteile werden entsprechend der Dichte aufgetrennt und gesammelt
- nicht benötigte Komponenten zum Spender zurück

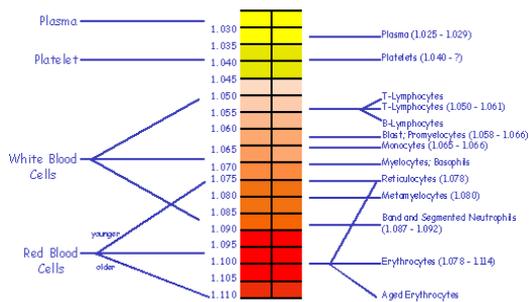
67

Dichte der Blutzellen



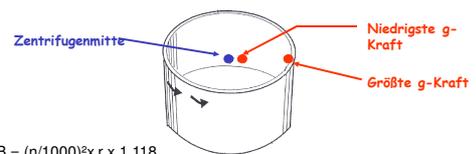
68

Dichte der Blutzellen



69

Zentrifugation



$$RZB = (n/1000)^2 \times r \times 1,118$$

n...rpm

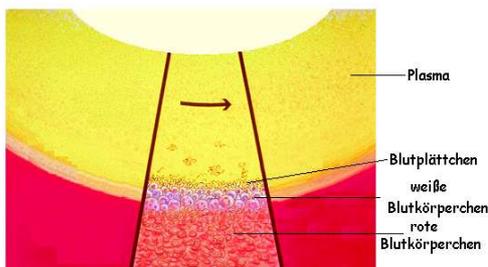
r...Radius in mm

RZB...relative Zentrifugalbeschleunigung

Die g-Kraft in der Zentrifuge variiert mit der Geschwindigkeit und dem Radius. Die g-Kraft ist am größten am äußeren Rand und am niedrigsten am inneren Rand, nahe dem Zentrum. Die g-Kraft verstärkt sich mit zunehmender Zentrifugengeschwindigkeit.

70

Zentrifugation



71

Zellzentrifuge



72

Hämodialyse:

Entfernung niedermolekularer, wasserlöslicher Substanzen aus dem Blut

- Akutdialyse
- Chronische Dialyse

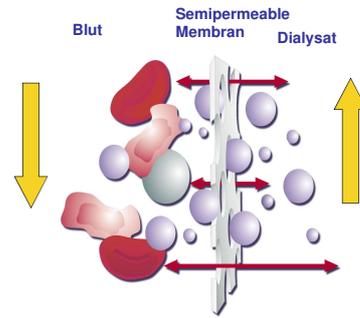
Therapeutische Apherese:

Entfernung größerer, meist proteingebundener Substanzen

- Behandlung von Autoimmunerkrankungen
- Leberunterstützung
- Therapie von Sepsis, MOF
- Vergiftungen
- Hypercholesterolämie

73

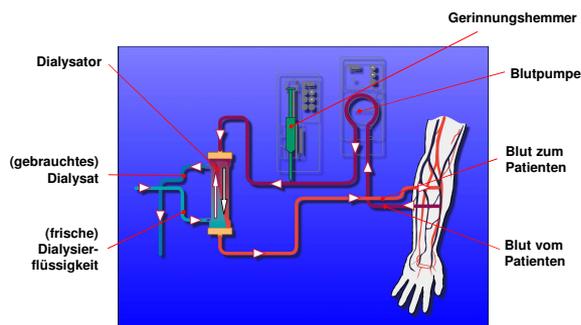
Prinzip der Hämodialyse



Gegenstrom von Blut und Dialysat

74

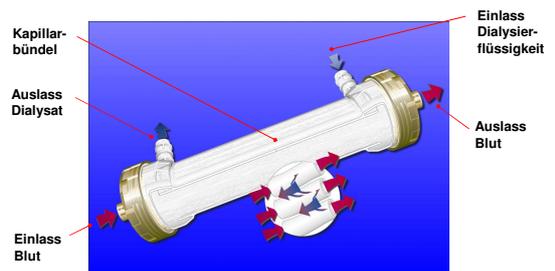
Standard-Hämodialyse (HD)



75

Dialysator

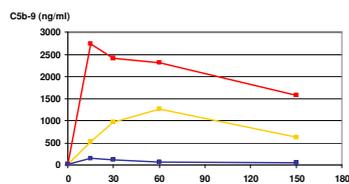
Technischer Aufbau



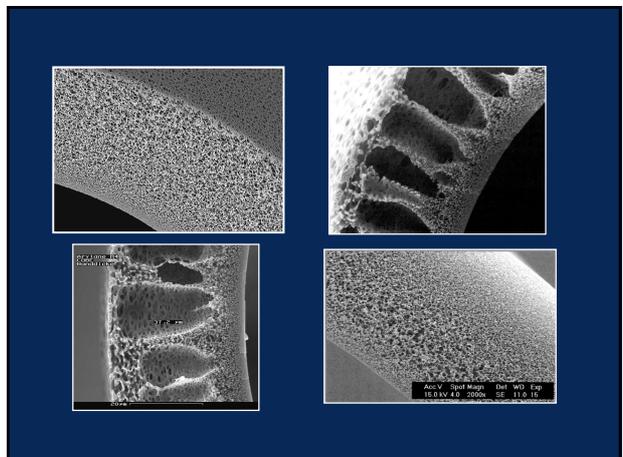
76

Materialien

- früher Cellulose (Aktivierung des Komplementsystems)
- synthetisch modifizierte Cellulosen
- heute meist synthetische Membranen (Polysulfon)

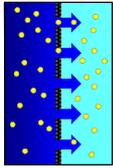


77



Siebkoefizient

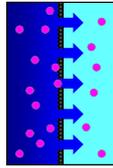
$$S = c_{\text{Filtrat}} / c_{\text{Plasma}}$$



Solute 1

$$c_f = c_p$$

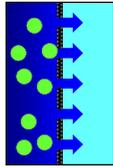
$$S = 1$$



Solute 2

$$c_f = 0.5 \cdot c_p$$

$$S = 0.5$$



Solute 3

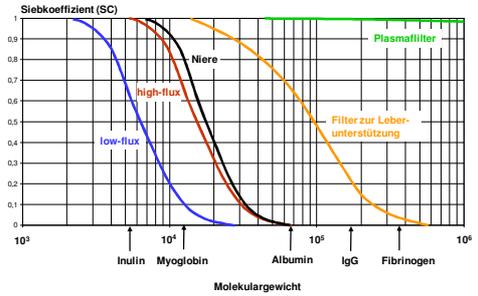
$$c_f = 0$$

$$S = 0$$

79

Dialysator: Siebkoefizient

Semipermeable Membranen



80

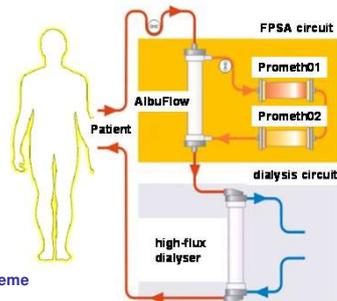
Therapeutische Apherese

81

- Plasmaaustausch
 - unselektiv; entfernt auch wertvolle Komponenten des Plasmas, Substitutionslösungen erforderlich; potentielle Gefahr von allergischen Reaktionen oder Infektionen
- Adsorptionssysteme
 - Hämapherese
 - Vollblut über Adsorber geleitet, pathogene Komponenten gebunden, gereinigtes Blut zurück zum Patienten
 - Plasmapherese
 - Trennung in Zell- und Plasmafraktion, nur Plasma in Kontakt mit Adsorbmaterial > bioverträglicher

82

Leberunterstützung Prometheus-System



artifizielle und bioartifizielle Systeme

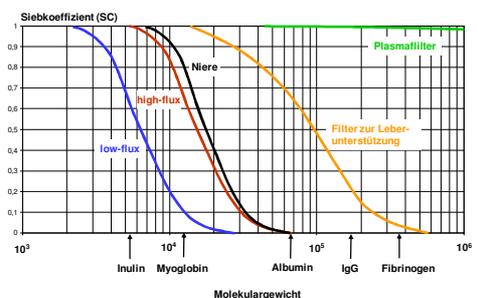
Entfernung von hydrophoben, meist proteingebundenen Substanzen (z.B. Bilirubin, Gallensäuren)

Bioartifizielle Systeme: zusätzlich Bioreaktoren mit Leberzellen
technisch sehr komplex, klinisch nicht etabliert

83

Dialysator: Siebkoefizient

Semipermeable Membranen



84



Leberunterstützung

- keine chronische Therapie
- Behandlung bis zur Regeneration der Leber oder bis ein Spenderorgan zur Verfügung steht (Bridge to transplant)

86

Autoimmunerkrankungen

Antikörper gegen körpereigene Strukturen führen zur Zerstörung von Geweben

Behandlungsansätze:

- Plasmaaustausch
- unspezifische Immunadsorption (Entfernung von IgG)
- spezifische Immunadsorption (Entfernung des pathogenen Autoantikörpers, falls charakterisiert u. bekannt)

87

Protein A *Staphylococcus aureus*

- bindet an Fc Region von IgG
- bindet kein IgG der Subklasse 3

z.B Entfernung von Faktor VIII Antikörpern bei Therapie der Hämophilie

88

DALI direct adsorption of lipoproteins Lipidapherese

bei Patienten mit familiärer Hypercholesterinämie

89

Transport-Lipoproteine

- Im Serum von Säugetieren kommen komplexe Lipide und Proteine vor, die relativ konstante Mengenverhältnisse besitzen und die als Transport-Lipoproteine **wasserunlösliche Lipide** wie **Cholesterin**, **Cholesterinester** und **Triacylglycerine** zwischen den Organen über die Blutbahn transportieren.

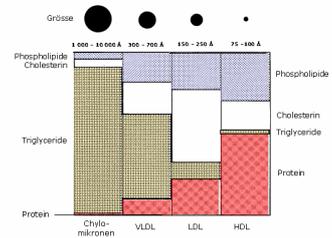
90

Transport-Lipoproteine

- Sie werden nach Dichte und Partikelgröße charakterisiert, man unterscheidet
 - Chylomikronen* (Partikelgröße 75 -1000 nm)
 - VLDL* [*very low density lipoprotein*, 30 - 50 nm] sehr niedriger Dichte
 - LDL* [*low density protein*, 20 - 22 nm]
 - HDL* [*high density lipoprotein*, 7.5 - 10 nm]

91

Zusammensetzung verschiedener Lipoproteinpartikel



92

Transport-Lipoproteine

- Chylomikronen transportieren nach der Nahrungsaufnahme Triacylglyceride und Cholesterin vom Verdauungstrakt in das Gewebe. Der Lipidanteil beträgt zwischen 98 und 99.5 %, der Proteinanteil schwankt zwischen 0.5 und 2 %.
- Die VLDLs enthalten sehr viel Triglyceride und wenig Protein. Auf ihrem Weg durch den Organismus erhöht sich durch fortlaufende Abspaltung von Triglyceriden ihr Anteil an Cholesterin und es entstehen die cholesterinreichen LDLs.

93

Transport-Lipoproteine

- LDL transportiert Cholesterin im Plasma, bindet an der Zielzelle an den *LDL-Rezeptor* und wird von der Zelle aufgenommen. Liegt ein Defekt am *LDL-Rezeptor* vor, so kommt es zur Anreicherung von LDL und Cholesterin im Blut.

Schädigung der Arterienwände kann zur Einlagerung von LDL in die Zellwand führen und es kann sich ein Thrombus bilden, der zu Herzinfarkt oder Schlaganfall führt.

94

Arterielle Thrombose

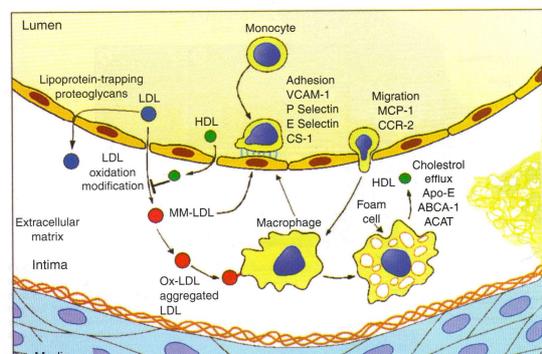
Auslöser:
Ruptur oder Erosion eines arteriosklerotischen Plaques

Plättchen spielen wichtige Rolle

Lipoprotein-induced hypothesis

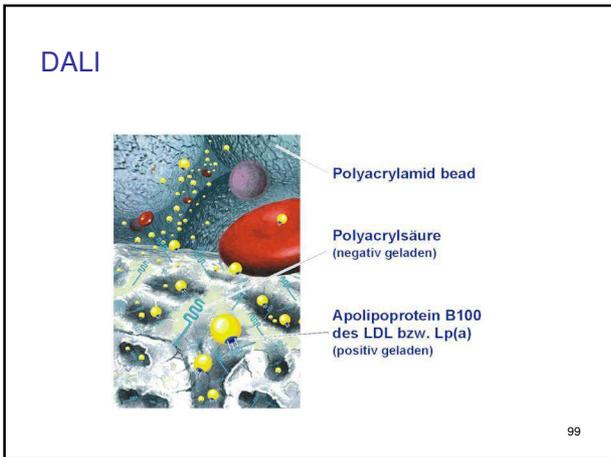
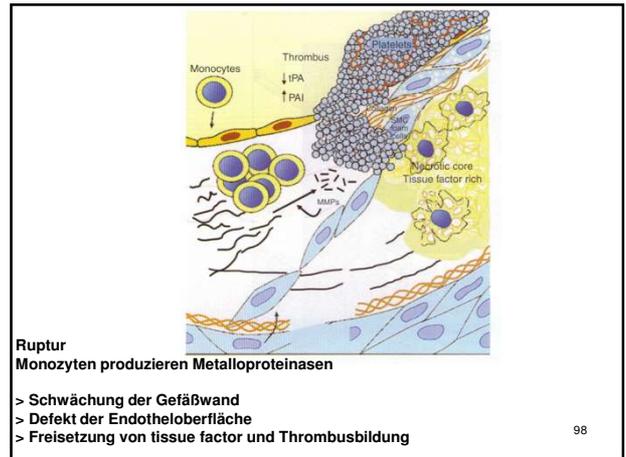
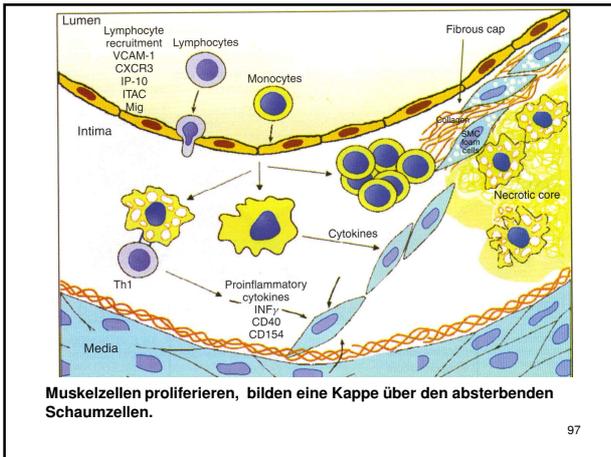
Joseph Leonard Goldstein (Nobelpreis 1985 für Arbeiten zum Cholesterinstoffwechsel)

95



Makrophagen nehmen oxidiertes LDL auf; Bildung von Schaumzellen; dadurch Entzündungsreaktion; Veränderung der Gefäßwand

96



Blut und Blutgerinnung

Teil 3

1

INHALT

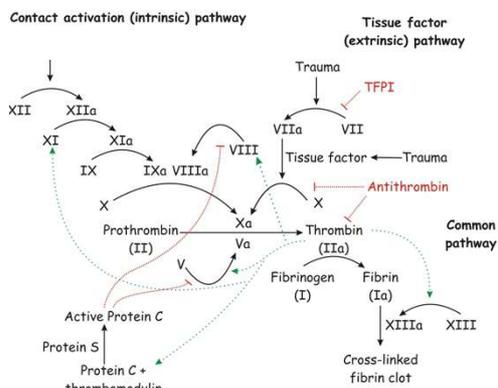
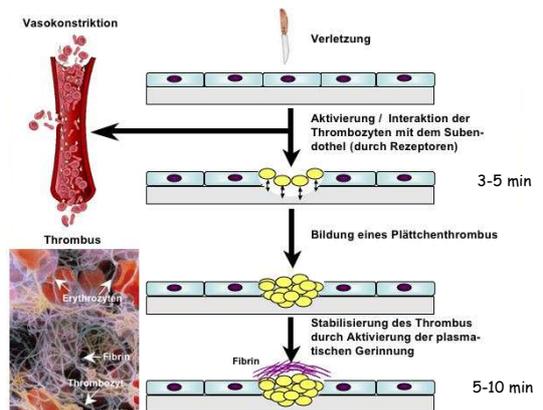
- (I) Bestandteile und Funktionen des Blutes
- (II) Blutgerinnung und Fibrinolyse
- (III) Regulation der Blutgerinnung
- (IV) Wechselwirkung von Gerinnung und Entzündung
- (V) Antikoagulation und Methoden der Blutreinigung

2

Teil 2

- Zelluläre und plasmatische Gerinnung
- Plättchen
- Gerinnungskaskade
- Gerinnungsfaktoren und Gla-Domänen
- Fibrinolyse

3



5

Teil 3

Regulation der Blutgerinnung

- Natürliche Antikoagulantien
 - Tissue Factor Pathway Inhibitor
 - Antithrombin
 - Protein C
- Antikoagulantien in der Medizin
 - Heparin
 - Coumarinderivate
 - direkte Thrombininhibitoren
- Gerinnungstests

6

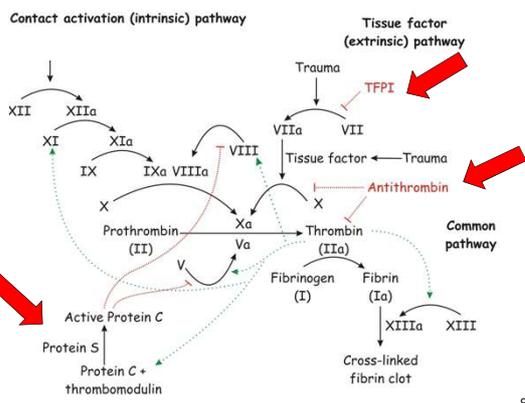
Regulation der Blutgerinnung

7

Natürliche Antikoagulanzen

- Tissue factor pathway inhibitor (TFPI)
- Antithrombin (AT-III)
- aktiviertes Protein C, Protein S

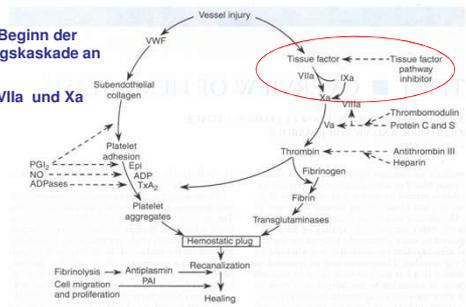
8



9

Tissue factor pathway inhibitor, TFPI

- setzt am Beginn der Gerinnungskaskade an
- inhibiert VIIa und Xa



10

TFPI

- Lokalisation: v.a. auf der Endotheloberfläche (gerinnungshemmende Eigenschaften!)
- zusätzlicher Pool in den α -Granula der Plättchen, wird bei Plättchenaktivierung freigesetzt
- zirkulierender Pool im Plasma gebunden an Lipoproteine (LDL)

11

Antithrombin AT-III

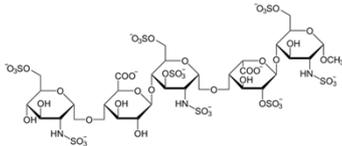
- Serinproteaseinhibitor (Serpin)
- inaktiviert v.a. Thrombin (FIIa) und FXa; schwächer auch IXa, XIa, XIIa
- AT allein inhibiert Thrombin nur schwach
- Wirkung wird durch Glukosaminoglykane verstärkt:
Heparansulfat (Endotheloberfläche)
Heparin (Klinik)

12

Heparin

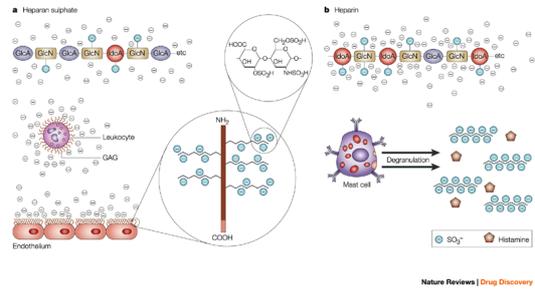
gehört zur Gruppe der Glukosaminoglykane (Mucopolysaccharide)

- saure Polysaccharide
- Aufbau aus Disaccharideinheiten, je eine Zuckersäure und ein Aminozucker
- Bestandteile vieler Makromoleküle (Proteoglykane)
- Teil der extrazellulären Matrix (Wasserspeicherung, Elastizität)



13

Heparin and heparan sulphate



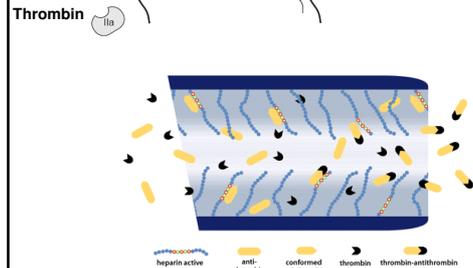
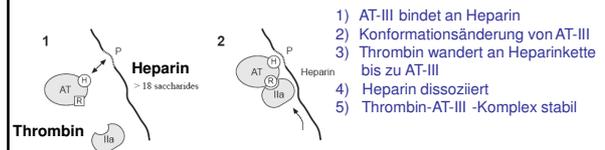
Nature Reviews Drug Discovery 1, 140-148 (2002)

14

Antithrombin

- AT-III bindet spezifisch an Pentasaccharidsequenz in Heparin
- Bindung bewirkt Konformationsänderung von AT-III
- Dadurch erhöht sich Affinität von AT-III für FXa und Thrombin

15



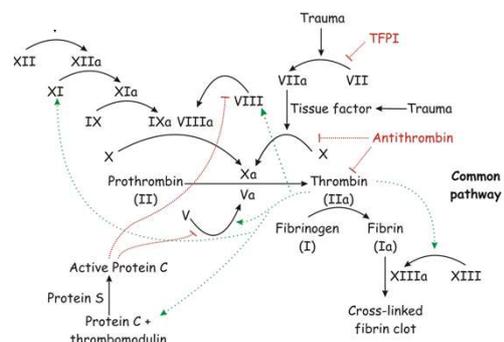
16

Aktiviertes Protein C

- Thrombin (FIIa) bindet an Thrombomodulin (Endotheloberfläche)
- FIIa-Thrombomodulinkomplex:
 - aktiviert Protein C (antikoagulatorisch)
- Aktiviertes Protein C (APC) hemmt Faktoren Va und VIIIa
- APC hat auch entzündungshemmende und anti-apoptische Effekte

17

Inaktivierung von FVa und FVIIIa durch APC



18

Faktor V Leiden

- Mutation in Faktor V (Name: wurde in Leiden entdeckt)
- häufigste Ursache für erbliche venöse Thrombose
- durch eine Mutation an der Spaltungsstelle für Protein C kann Faktor Va nicht inaktiviert werden, Protein C kann daher nicht wirken

19

Antikoagulantien in der Medizin

- direkte: reagieren mit Faktoren der Gerinnungskaskade
z.B. Heparin
- indirekte: hemmen die Synthese der Gerinnungsfaktoren
z.B. Warfarin bzw. den Ablauf der Gerinnungskaskade z. B. Citrat
- Thrombozytenaggregationshemmer
z. B. Acetylsalicylsäure (inhibiert die Cyclooxygenase und die Entstehung von Thromboxan aus Arachidonsäure)

20

Antikoagulantien in der Medizin

Anwendung:

- prophylaktisch:
 - vor, während und nach Operationen
 - bei Bettlägrigkeit
 - bei Blutentnahme
 - bei Blutreinigung (Dialyse etc.)
- therapeutisch:
 - Behandlung von Thrombosen

21

Antikoagulantien in der Medizin

Beispiele:

- Heparine (wirken über AT-III)
- Hirudin (inhibiert Thrombin)
- Argatroban (inhibiert Thrombin)
- Cumarinderivate (hemmen Carboxylierung v. Gerinnungsfaktoren)
- Zitrat (extrakorporale Blutreinigung)

22

Heparine

- heterogene Gruppe von Molekülen
- gewonnen aus Dünndarmmucosa des Schweins oder aus Rinderlungen
- wird nicht aus dem Magen-Darm-Trakt resorbiert
Verabreichung intravenös oder subkutan
- Angriffspunkt: Antithrombin
Erhöhung der Affinität von AT für FXa und FIIa
ca. um den Faktor 1000
- Dosis wird in Internationalen Einheiten (IE) angegeben: bezieht sich auf biologische Aktivität

23

Klassifizierung der Heparine

- **Unfraktioniertes Heparin (UFH)**
 - ca. 15 kDa (3 - 30)
 - ca. 1/3 der Moleküle sind aktiv (enthalten spezifische Pentasaccharidsequenz für Bindung von AT)
- **Low molecular weight heparin (LMWH)**
 - ca. 5 kDa (1 - 10)
 - wirken v.a. auf FXa
 - bessere Pharmakokinetik (höhere HWZ)
 - gewonnen aus UFH durch enzymatische oder chemische Spaltung

24

Heparin-induzierte Thrombozytopenie (HIT)

- Bildung von Antikörpern gegen Komplexe aus Plättchenfaktor 4 (PF4) und Heparin
- tritt in ca. 5% der Patienten auf, die mit UFH behandelt werden (bei LMWH ca. 1%)
 - PF 4: in α -Granula der Plättchen gespeichert, stark positiv geladen
 - wird bei Plättchenaktivierung freigesetzt
 - bindet an Glykosaminoglykane (Heparansulfat) auf der Endotheloberfläche
 - kann daher lokal die Wirkung von Antithrombin hemmen
 - hohe Affinität für Heparin

25

HIT

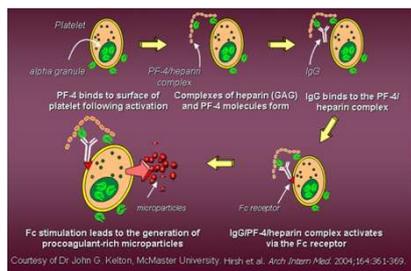
- PF4 und Heparin wirken als Antigen
- Bildung von AK gegen diesen Komplex

Folgen der Antikörperbildung:

- Komplex aus PF4, Heparin, und Antikörper bindet an den Fc-Rezeptor der Plättchen und führt zur Plättchenaktivierung
 - > weitere Ausschüttung von PF4
 - > PF4 bindet und neutralisiert freies Heparin
 - > PF4 bindet auch an Heparansulfat auf Endothelzellen > Aktivierung der Endothelzellen und weitere Thrombinbildung > **Thrombose**

26

Heparin-induzierte Thrombozytopenie



Hirsh et al Arch Intern Med 2004; 164:361-369

27

HIT

Maßnahmen:

- Bestimmung der Thrombozytenzahl vor jeder Heparin-gabe
Abfall unter 50% des Ausgangswertes oder auf < 150.000/ μ L wird als HIT angesehen
- Keine Behandlung von Patienten mit HIT in der Vorgeschichte mit Heparin
- bei HIT-Verdacht sofortiges Absetzen von Heparin

28

Heparin-Beschichtung von Oberflächen

- unterdrückt Gerinnungsaktivierung auf der Oberfläche
- Heparin an der Oberfläche bindet Antithrombin und hält so die lokalen Thrombinkonzentrationen niedrig
Anwendung z. B. bei Stents



29

Der Heparin-Skandal

Anfang 2008: 100 Todesfälle in den USA durch verunreinigtes Heparin

Februar 2008: kontaminierte Chargen auch in Europa auf dem Markt

80 Dialysepatienten zeigten Blutdruckabfall, Atemnot;
allergischer Schock bei 3 Patienten
Rückruf

- seit BSE ist Schweinemucosa die Hauptquelle für Heparin-gewinnung (statt Rinderlunge)
- mehr als die Hälfte von Rohheparin der Weltproduktion stammt aus China

30



31



32



33

Ursache:

Verunreinigung mit Chondroitinsulfat (5 - 50 %)

- Chemisch ähnlich dem Heparin
- N-Acetylgalaktosamin und Glucuronsäure, sulfatiert
- kommt in Knorpel und Schalen von Meeresfrüchten vor
- deutlich billiger als Heparin

vorsätzliche Beimischung?

34

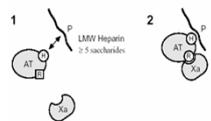
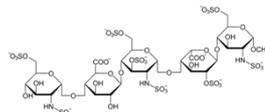
**Fondaparinux
Arixtra**

Selektiver Faktor Xa-Hemmer

Bindet nicht an PF4, daher keine Induktion von HIT

Pentasaccharid
„aktive Sequenz“ von Heparin

Nachteil:
es gibt kein Gegenmittel



35

Direkte Thrombin-Inhibitoren

- Argatroban (synthetisch)
- Hirudin (rekombinant)
- binden direkt an das aktive Zentrum von Thrombin
- Nicht abhängig von AT-III

36

1914
Luis Agote
erste erfolgreiche Bluttransfusion, Antikoagulation mit Natriumzitat

43

Zitrat

$$\begin{array}{c} \text{Ca}^{2+} \quad \cdot \text{OOC} \\ | \\ \cdot \text{OOC} - \text{CH}_2 - \text{C} - \text{CH}_2 - \text{COO}^- \\ | \\ \text{OH} \end{array} \quad \begin{array}{c} \text{COO}^- \quad \text{Ca}^{2+} \\ | \\ \cdot \text{OOC} - \text{CH}_2 - \text{C} - \text{CH}_2 - \text{COO}^- \\ | \\ \text{OH} \end{array}$$

Komplex: $\text{Ca}_3 (\text{Citrate})_2$

- metabolisiert zu Bicarbonat (Leber)
- reduziert Komplementaktivierung

44

Blutabnahmesystem (Vacuette)

Glasröhrchen mit Schraubdeckel (Septum), Vakuum, Farbcodierung je nach Verwendung bzw. je nach Antikoagulation

45

VACUETTE® Coagulation Tubes

Coagulation tubes are filled with buffered tri-sodium citrate solution. Citrate concentration of 0.109 mol/l (3.2%) is available. The choice of the concentration depends upon the policies of the laboratories. The mixing ratio is 1 part citrate to 9 parts blood.

VACUETTE® Heparin tubes

The interior of the tube wall is coated with lithium heparin, ammonium heparin or sodium heparin. The anticoagulant heparin activates antithrombins, thus blocking the coagulation cascade and producing a whole blood / plasma sample instead of clotted blood plus serum. Plasma tubes with lithium heparin and gel contain a barrier gel in the tube. The specific gravity of this material lies between that of the blood cells and plasma. During centrifugation the gel barrier moves upwards providing a stable barrier separating the plasma from cells. Plasma may be aspirated directly from the collection tube, eliminating the need for manual transfer to another container. This barrier allows for the stability of certain parameters in the primary tube under the recommended storage conditions for up to 48 hours.

46

Blutprodukte

47

Bluttransfusion

Zuführen von Blut oder Blutbestandteilen als Infusion

- Fremdblutspende
- Eigenblutspende

Vollbluttransfusionen heute nur mehr selten durchgeführt; Blut wird in Komponenten aufgetrennt und komponentenweise transfundiert

Vorteile:

- Patient erhält nur die tatsächlich benötigten Blutbestandteile (Plasma bei Faktorenmangel, Erythrozyten bei Anämie,...)
- Bessere Lagerfähigkeit (Plättchen bei RT, Erythrozyten bei mindestens 4 °C, Plasmaproteine eingefroren)

48

Gewinnung von Blutprodukten aus

- a) Vollblut (Pool vieler Blutspenden)
- b) Apherese (kontinuierlicher Prozess)

49

Blutprodukte:

- Erythrozyten-Konzentrate (bei Anämie)
- Granulozyten-Konzentrate
- Thrombozyten-Konzentrate
- Plasma (FFP, fresh frozen plasma)
- Stammzell-Präparate
- Gerinnungsfaktor-Konzentrate
- Immunglobuline

50

Erythrozytenkonzentrat



Thrombozytenkonzentrat



Indikationen für Bluttransfusionen

- Blutersatz nach Unfall/Operation
- Blutkrankheiten (Anämien; ab Hb von 6g/dL)
normal: 14-18 bzw. 12-16 g/dL
- Mangel od. Funktionsstörungen von
 - Thrombozyten
 - Plasma
 - Gerinnungsfaktoren

53

Risiken

- Übertragung von Bakterien oder Viren (Hepatitis B & C, HIV)

HIV, Hepatitis C -> Antikörpertests
(ELISA od. Western Blot gegen virale Proteine)

„diagnostisches Fenster“: Antikörper sind im Blut erst mehrere Wochen nach der Infektion nachweisbar

-> molekularbiologische Testmethoden (RT-PCR) – direkter Nachweis der viralen RNA

54

Transfusionszwischenfälle

- Verwechslung von Blutkonserven -> hämolytische Transfusionsreaktion, Zerstörung der Erythrozyten bei Transfusion von ABO-inkompatiblen Blut
- Bedside-Test (Kreuzprobe) vor Transfusion daher Vorschrift

55

Leukozytendepletion

- Entfernung von Leukozyten aus Blutpräparaten vor der Transfusion
- Leukozytengehalt < 10⁶/Konserven

Gründe:

- 1) Zellständige Viren (z.B. CMV) werden damit entfernt
 - 2) Graft-versus-host-disease wird vermieden: Leukozyten des Spenders (aus der Blutkonserven) erkennen Körperzellen des Empfängers als fremd und zerstören diese
- Leukozytenabreicherung erfolgt durch Filtration oder Zentrifugation und wird vor der Lagerung durchgeführt (LRC leukocyte reduction chambers)

56

Plasma

Fresh frozen plasma:

laut Definition innerhalb von 8 h eingefroren; Realität: < 24 h (dadurch Reduktion von FV und VIII um ca. 15%)

Verwendung:

- Ersatz für spezifische Gerinnungsfaktoren
- Behandlung von Blutungen bei Lebererkrankungen
- Behandlung von DIC
- Plasmaaustausch bei verschiedenen Autoimmunerkrankungen

57

Plättchenkonzentrate

- Gewinnung durch Apherese (kontinuierliche Aufarbeitung großer Blutvolumina)
- 50 mL Konzentrat -> ca. 5,5 x 10¹⁰ Plättchen
- Lagerung bei 22 °C, max. 5 d
- Anwendung: Therapie von Thrombozytopenie (verschiedene Ursachen: Autoimmunerkrankung -> erhöhte Zerstörung der Plättchen durch Autoantikörper; DIC; induziert durch bestimmte Medikamente)
- Platelet storage lesion – Verlust der Aktivität

58

Erythrozytenkonzentrate

- aus Frischblut durch Entfernung von Plasma gewonnen
- Hämatokrit ca. 75%
- Lagerung: 42 d bei 4 °C

59

Plasmaderivate

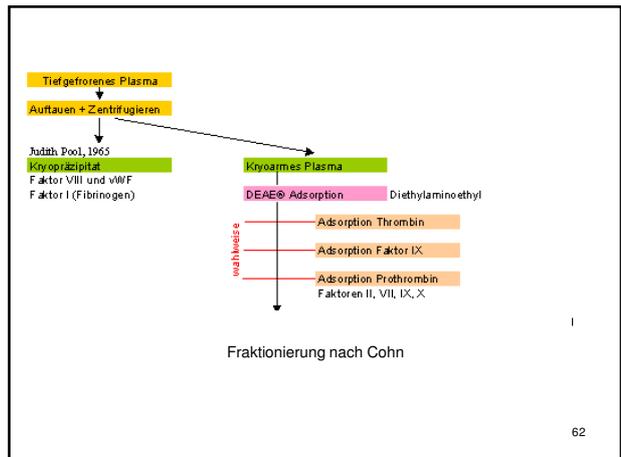
- Plasma als Ausgangsmaterial für die Gewinnung von Gerinnungsfaktoren
- FVII, FVIII, FIX werden heute rekombinant hergestellt
- Gefahr der Krankheitsübertragung -> PCR-Testung
- Reinigung der Einzelfaktoren durch verschiedene Präzipitations- und Chromatographieschritte
- Lyophilisierung der Produkte (Vorteil: keine Kühlung erforderlich)

60

Plasmafraktionierung

- FFP wird aufgetaut
- Kryopräzipitat durch Zentrifugieren entfernt (enthält FVIII, vWF, Fibrinogen)
- Reinigung dieser Proteine durch weitere Fäll- und Chromatographieschritte
- aus dem Überstand werden FII, VII, IX, X mittels DEAE-Adsorption gewonnen
- weitere Proteine durch Fraktionierung nach Cohn

61



62

Edwin J. Cohn, 1940er

Kryoarmeres Plasma nach Adsorption

Zugabe von Ethanol

Ethanol Fällung 8%

Faktor XIII im Präzipitat

Heparin-Adsorption

Antithrombin III

Zugabe von Ethanol

Ethanol Fällung 20-25%

Immunglobulin-Produkte im Präzipitat

Zugabe von Ethanol

Ethanol Fällung 40-42%

Albumin im Präzipitat

63

Fraktionierung nach Cohn

- Dem Plasma (ohne Kryopräzipitat) wird Ethanol in steigender Konzentration zugesetzt, Temperatur wird abgesenkt
- 8% Ethanol -> Faktor XIII ↓
- aus Überstand: Antithrombin durch Adsorption an Heparin gewonnen
- 20-25% Ethanol -> IgG ↓
- 40-42% Ethanol -> Albumin ↓

64

Methoden der Blutreinigung

65

Apherese

- griech. „wegnehmen“
- Verfahren zur Entfernung von Substanzen aus dem Blut oder Plasma des Patienten (Proteine, proteingebundene Substanzen, Zellen)

Therapeutische Apherese (pathogene Komponenten werden entfernt)

Diagnostische Apherese (Gewinnung von Zellen aus dem Blut)

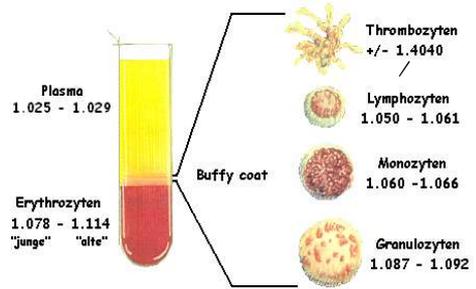
66

Apherese zur Gewinnung von Zellen

- Blut wird aus Armvene entnommen
- in steriles Schlauchsystem geleitet
- Antikoagulation mit Citrat
- Mischung wird in Zellzentrifuge geleitet
- Blutbestandteile werden entsprechend der Dichte aufgetrennt und gesammelt
- nicht benötigte Komponenten zum Spender zurück

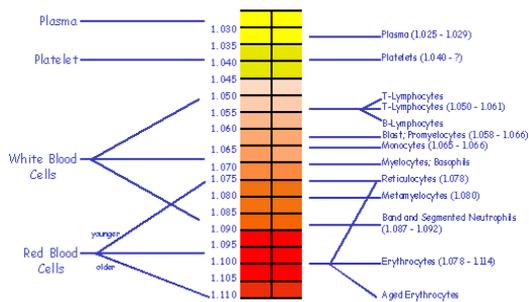
67

Dichte der Blutzellen



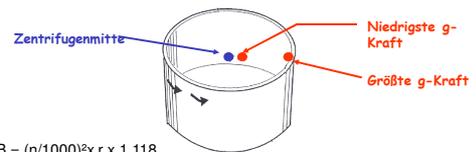
68

Dichte der Blutzellen



69

Zentrifugation



$$RZB = (n/1000)^2 \times r \times 1,118$$

n...rpm

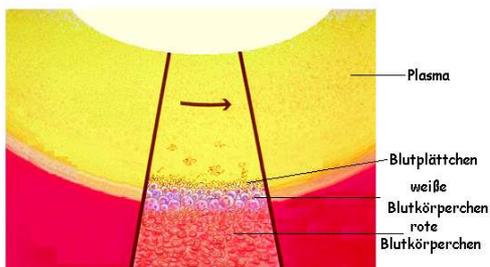
r...Radius in mm

RZB...relative Zentrifugalbeschleunigung

Die g-Kraft in der Zentrifuge variiert mit der Geschwindigkeit und dem Radius. Die g-Kraft ist am größten am äußeren Rand und am niedrigsten am inneren Rand, nahe dem Zentrum. Die g-Kraft verstärkt sich mit zunehmender Zentrifugengeschwindigkeit.

70

Zentrifugation



71

Zellzentrifuge



72

Hämodialyse:

Entfernung niedermolekularer, wasserlöslicher Substanzen aus dem Blut

- Akutdialyse
- Chronische Dialyse

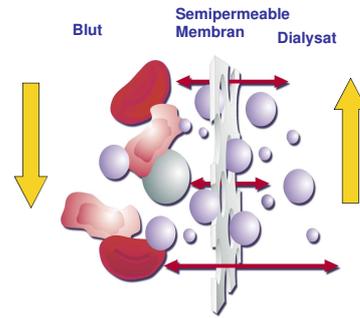
Therapeutische Apherese:

Entfernung größerer, meist proteingebundener Substanzen

- Behandlung von Autoimmunerkrankungen
- Leberunterstützung
- Therapie von Sepsis, MOF
- Vergiftungen
- Hypercholesterolämie

73

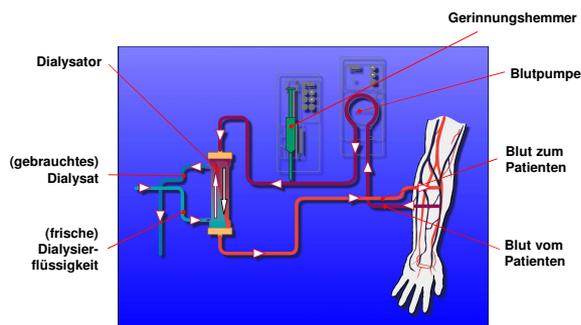
Prinzip der Hämodialyse



Gegenstrom von Blut und Dialysat

74

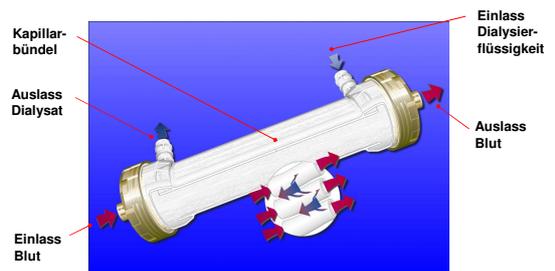
Standard-Hämodialyse (HD)



75

Dialysator

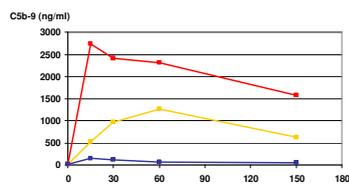
Technischer Aufbau



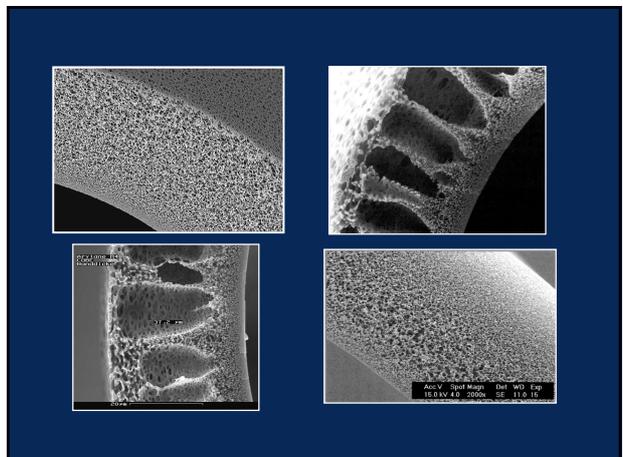
76

Materialien

- früher Cellulose (Aktivierung des Komplementsystems)
- synthetisch modifizierte Cellulosen
- heute meist synthetische Membranen (Polysulfon)

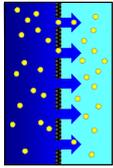


77



Siebkoefizient

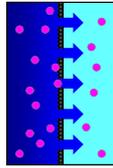
$$S = c_{\text{Filtrat}} / c_{\text{Plasma}}$$



Solute 1

$$c_f = c_p$$

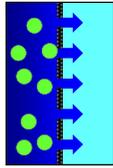
$$S = 1$$



Solute 2

$$c_f = 0.5 \cdot c_p$$

$$S = 0.5$$



Solute 3

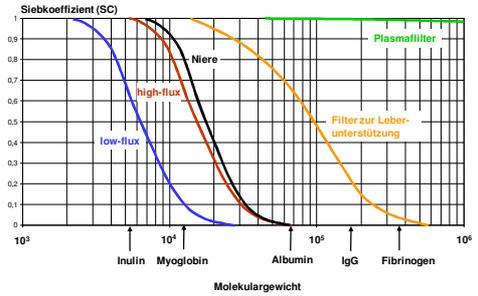
$$c_f = 0$$

$$S = 0$$

79

Dialysator: Siebkoefizient

Semipermeable Membranen



80

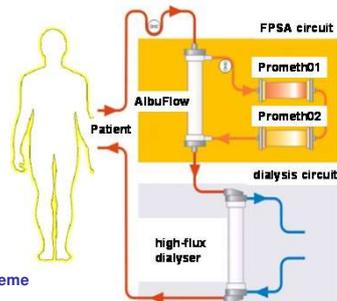
Therapeutische Apherese

81

- Plasmaaustausch
 - unselektiv; entfernt auch wertvolle Komponenten des Plasmas, Substitutionslösungen erforderlich; potentielle Gefahr von allergischen Reaktionen oder Infektionen
- Adsorptionssysteme
 - Hämapherese
 - Vollblut über Adsorber geleitet, pathogene Komponenten gebunden, gereinigtes Blut zurück zum Patienten
 - Plasmapherese
 - Trennung in Zell- und Plasmafraktion, nur Plasma in Kontakt mit Adsorbentmaterial > bioverträglicher

82

Leberunterstützung Prometheus-System



artifizielle und bioartifizielle Systeme

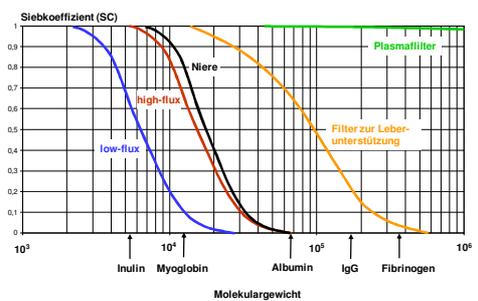
Entfernung von hydrophoben, meist proteingebundenen Substanzen (z.B. Bilirubin, Gallensäuren)

Bioartifizielle Systeme: zusätzlich Bioreaktoren mit Leberzellen
technisch sehr komplex, klinisch nicht etabliert

83

Dialysator: Siebkoefizient

Semipermeable Membranen



84



Leberunterstützung

- keine chronische Therapie
- Behandlung bis zur Regeneration der Leber oder bis ein Spenderorgan zur Verfügung steht (Bridge to transplant)

86

Autoimmunerkrankungen

Antikörper gegen körpereigene Strukturen führen zur Zerstörung von Geweben

Behandlungsansätze:

- Plasmaaustausch
- unspezifische Immunadsorption (Entfernung von IgG)
- spezifische Immunadsorption (Entfernung des pathogenen Autoantikörpers, falls charakterisiert u. bekannt)

87

Protein A *Staphylococcus aureus*

- bindet an Fc Region von IgG
- bindet kein IgG der Subklasse 3

z.B Entfernung von Faktor VIII Antikörpern bei Therapie der Hämophilie

88

DALI direct adsorption of lipoproteins Lipidapherese

bei Patienten mit familiärer Hypercholesterinämie

89

Transport-Lipoproteine

- Im Serum von Säugetieren kommen komplexe Lipide und Proteine vor, die relativ konstante Mengenverhältnisse besitzen und die als Transport-Lipoproteine **wasserunlösliche Lipide** wie **Cholesterin**, **Cholesterinester** und **Triacylglycerine** zwischen den Organen über die Blutbahn transportieren.

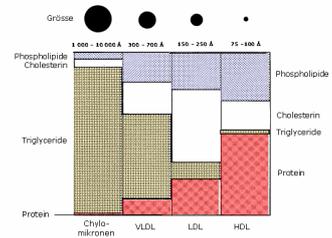
90

Transport-Lipoproteine

- Sie werden nach Dichte und Partikelgröße charakterisiert, man unterscheidet
 - Chylomikronen** (Partikelgröße 75 -1000 nm)
 - VLDL** [*very low density lipoprotein*, 30 - 50 nm] sehr niedriger Dichte
 - LDL** [*low density protein*, 20 - 22 nm]
 - HDL** [*high density lipoprotein*, 7.5 - 10 nm]

91

Zusammensetzung verschiedener Lipoproteinpartikel



92

Transport-Lipoproteine

- Chylomikronen transportieren nach der Nahrungsaufnahme Triacylglyceride und Cholesterin vom Verdauungstrakt in das Gewebe. Der Lipidanteil beträgt zwischen 98 und 99.5 %, der Proteinanteil schwankt zwischen 0.5 und 2 %.
- Die VLDLs enthalten sehr viel Triglyceride und wenig Protein. Auf ihrem Weg durch den Organismus erhöht sich durch fortlaufende Abspaltung von Triglyceriden ihr Anteil an Cholesterin und es entstehen die cholesterinreichen LDLs.

93

Transport-Lipoproteine

- LDL transportiert Cholesterin im Plasma, bindet an der Zielzelle an den **LDL-Rezeptor** und wird von der Zelle aufgenommen. Liegt ein Defekt am LDL-Rezeptor vor, so kommt es zur Anreicherung von LDL und Cholesterin im Blut.

Schädigung der Arterienwände kann zur Einlagerung von LDL in die Zellwand führen und es kann sich ein Thrombus bilden, der zu Herzinfarkt oder Schlaganfall führt.

94

Arterielle Thrombose

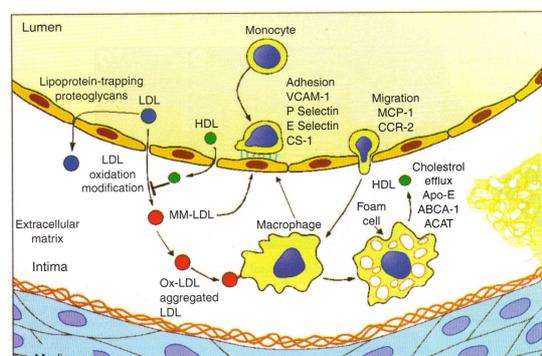
Auslöser:
Ruptur oder Erosion eines arteriosklerotischen Plaques

Plättchen spielen wichtige Rolle

Lipoprotein-induced hypothesis

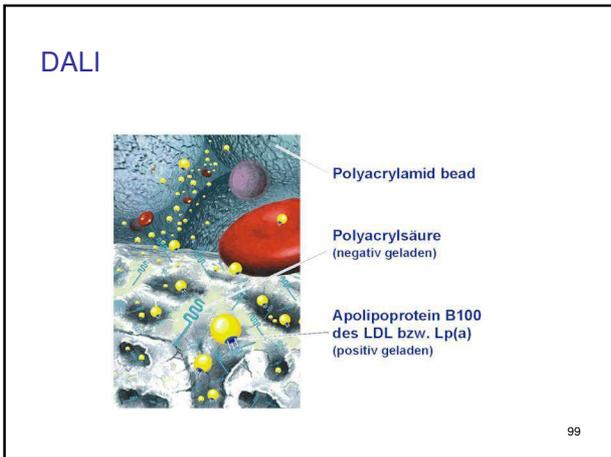
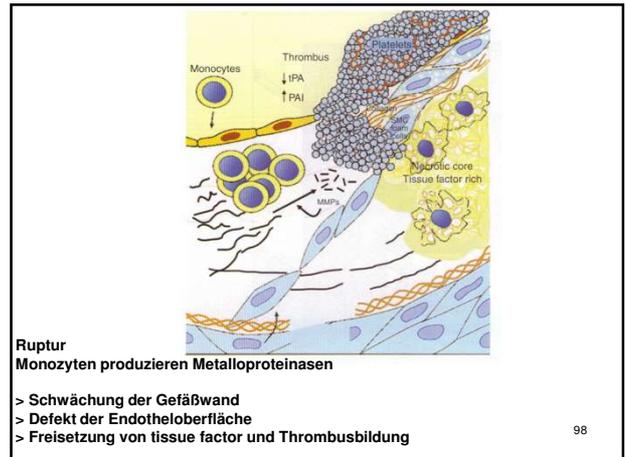
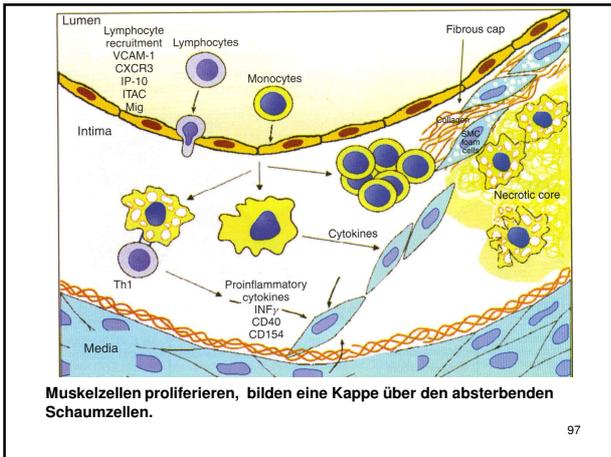
Joseph Leonard Goldstein (Nobelpreis 1985 für Arbeiten zum Cholesterinstoffwechsel)

95



Makrophagen nehmen oxidiertes LDL auf; Bildung von Schaumzellen; dadurch Entzündungsreaktion; Veränderung der Gefäßwand

96



Blut und Blutgerinnung

Teil 3

1

INHALT

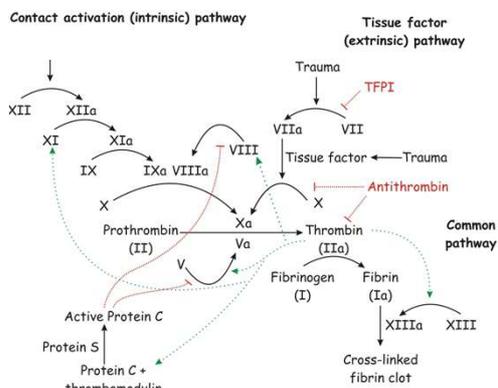
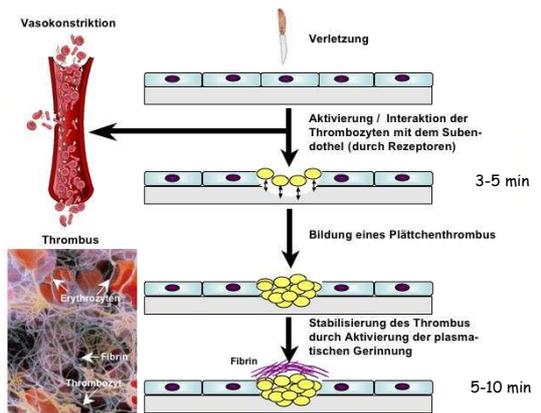
- (I) Bestandteile und Funktionen des Blutes
- (II) Blutgerinnung und Fibrinolyse
- (III) Regulation der Blutgerinnung
- (IV) Wechselwirkung von Gerinnung und Entzündung
- (V) Antikoagulation und Methoden der Blutreinigung

2

Teil 2

- Zelluläre und plasmatische Gerinnung
- Plättchen
- Gerinnungskaskade
- Gerinnungsfaktoren und Gla-Domänen
- Fibrinolyse

3



5

Teil 3

Regulation der Blutgerinnung

- Natürliche Antikoagulantien
 - Tissue Factor Pathway Inhibitor
 - Antithrombin
 - Protein C
- Antikoagulantien in der Medizin
 - Heparin
 - Coumarinderivate
 - direkte Thrombininhibitoren
- Gerinnungstests

6

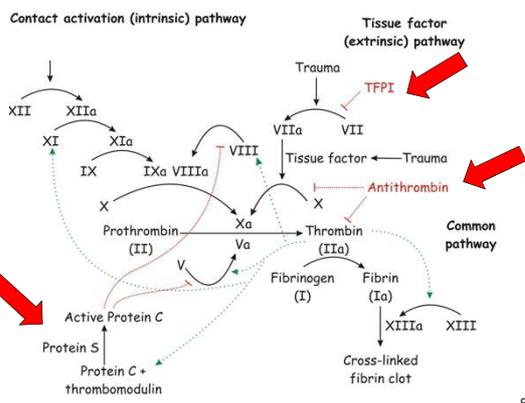
Regulation der Blutgerinnung

7

Natürliche Antikoagulanzen

- Tissue factor pathway inhibitor (TFPI)
- Antithrombin (AT-III)
- aktiviertes Protein C, Protein S

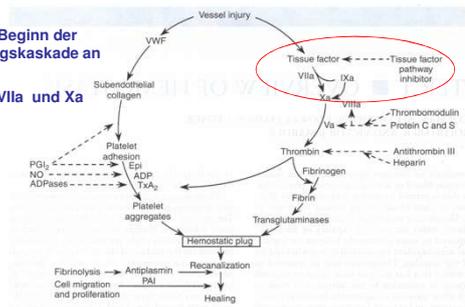
8



9

Tissue factor pathway inhibitor, TFPI

- setzt am Beginn der Gerinnungskaskade an
- inhibiert VIIa und Xa



10

TFPI

- Lokalisation: v.a. auf der Endotheloberfläche (gerinnungshemmende Eigenschaften!)
- zusätzlicher Pool in den α -Granula der Plättchen, wird bei Plättchenaktivierung freigesetzt
- zirkulierender Pool im Plasma gebunden an Lipoproteine (LDL)

11

Antithrombin AT-III

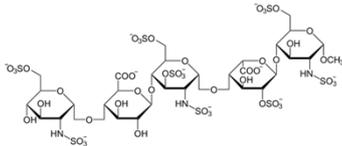
- Serinproteaseinhibitor (Serpin)
- inaktiviert v.a. Thrombin (FIIa) und FXa; schwächer auch IXa, XIa, XIIa
- AT allein inhibiert Thrombin nur schwach
- Wirkung wird durch Glukosaminoglykane verstärkt:
Heparansulfat (Endotheloberfläche)
Heparin (Klinik)

12

Heparin

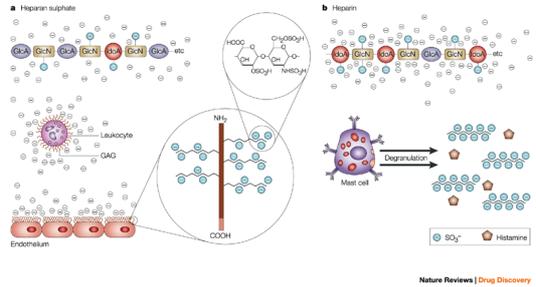
gehört zur Gruppe der Glukosaminoglykane (Mucopolysaccharide)

- saure Polysaccharide
- Aufbau aus Disaccharideinheiten, je eine Zuckersäure und ein Aminozucker
- Bestandteile vieler Makromoleküle (Proteoglykane)
- Teil der extrazellulären Matrix (Wasserspeicherung, Elastizität)



13

Heparin and heparan sulphate



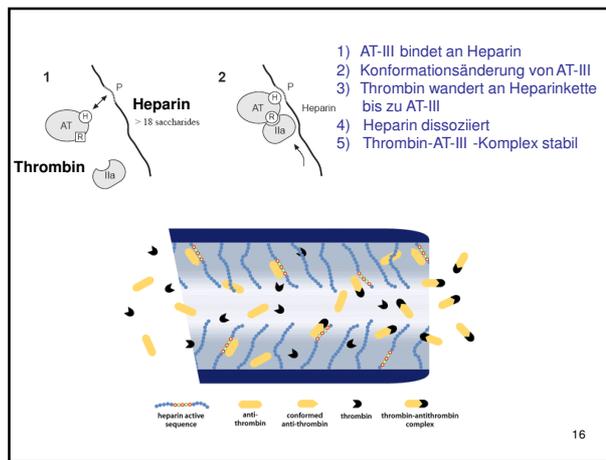
Nature Reviews Drug Discovery 1, 140-148 (2002)

14

Antithrombin

- AT-III bindet spezifisch an Pentasaccharidsequenz in Heparin
- Bindung bewirkt Konformationsänderung von AT-III
- Dadurch erhöht sich Affinität von AT-III für FXa und Thrombin

15



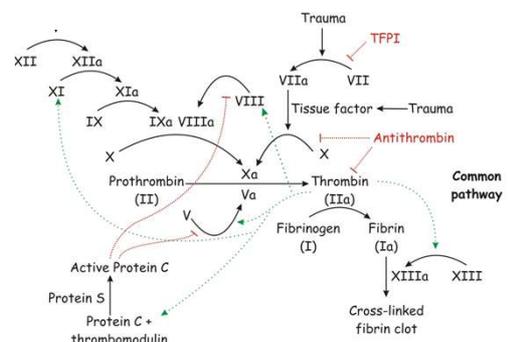
16

Aktiviertes Protein C

- Thrombin (FIIa) bindet an Thrombomodulin (Endotheloberfläche)
- FIIa-Thrombomodulinkomplex:
 - aktiviert Protein C (antikoagulatorisch)
- Aktiviertes Protein C (APC) hemmt Faktoren Va und VIIIa
- APC hat auch entzündungshemmende und anti-apoptische Effekte

17

Inaktivierung von FVa und FVIIIa durch APC



18

Faktor V Leiden

- Mutation in Faktor V (Name: wurde in Leiden entdeckt)
- häufigste Ursache für erbliche venöse Thrombose
- durch eine Mutation an der Spaltungsstelle für Protein C kann Faktor Va nicht inaktiviert werden, Protein C kann daher nicht wirken

19

Antikoagulantien in der Medizin

- direkte: reagieren mit Faktoren der Gerinnungskaskade
z.B. Heparin
- indirekte: hemmen die Synthese der Gerinnungsfaktoren
z.B. Warfarin bzw. den Ablauf der Gerinnungskaskade z. B. Citrat
- Thrombozytenaggregationshemmer
z. B. Acetylsalicylsäure (inhibiert die Cyclooxygenase und die Entstehung von Thromboxan aus Arachidonsäure)

20

Antikoagulantien in der Medizin

Anwendung:

- prophylaktisch:
 - vor, während und nach Operationen
 - bei Bettlägrigkeit
 - bei Blutentnahme
 - bei Blutreinigung (Dialyse etc.)
- therapeutisch:
 - Behandlung von Thrombosen

21

Antikoagulantien in der Medizin

Beispiele:

- Heparine (wirken über AT-III)
- Hirudin (inhibiert Thrombin)
- Argatroban (inhibiert Thrombin)
- Cumarinderivate (hemmen Carboxylierung v. Gerinnungsfaktoren)
- Zitrat (extrakorporale Blutreinigung)

22

Heparine

- heterogene Gruppe von Molekülen
- gewonnen aus Dünndarmmucosa des Schweins oder aus Rinderlungen
- wird nicht aus dem Magen-Darm-Trakt resorbiert
Verabreichung intravenös oder subkutan
- Angriffspunkt: Antithrombin
Erhöhung der Affinität von AT für FXa und FIIa
ca. um den Faktor 1000
- Dosis wird in Internationalen Einheiten (IE) angegeben: bezieht sich auf biologische Aktivität

23

Klassifizierung der Heparine

- **Unfraktioniertes Heparin (UFH)**
 - ca. 15 kDa (3 - 30)
 - ca. 1/3 der Moleküle sind aktiv (enthalten spezifische Pentasaccharidsequenz für Bindung von AT)
- **Low molecular weight heparin (LMWH)**
 - ca. 5 kDa (1 - 10)
 - wirken v.a. auf FXa
 - bessere Pharmakokinetik (höhere HWZ)
 - gewonnen aus UFH durch enzymatische oder chemische Spaltung

24

Heparin-induzierte Thrombozytopenie (HIT)

- Bildung von Antikörpern gegen Komplexe aus Plättchenfaktor 4 (PF4) und Heparin
- tritt in ca. 5% der Patienten auf, die mit UFH behandelt werden (bei LMWH ca. 1%)
 - PF 4: in α -Granula der Plättchen gespeichert, stark positiv geladen
 - wird bei Plättchenaktivierung freigesetzt
 - bindet an Glykosaminoglykane (Heparansulfat) auf der Endotheloberfläche
 - kann daher lokal die Wirkung von Antithrombin hemmen
 - hohe Affinität für Heparin

25

HIT

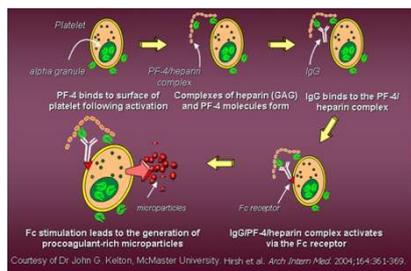
- PF4 und Heparin wirken als Antigen
- Bildung von AK gegen diesen Komplex

Folgen der Antikörperbildung:

- Komplex aus PF4, Heparin, und Antikörper bindet an den Fc-Rezeptor der Plättchen und führt zur Plättchenaktivierung
 - > weitere Ausschüttung von PF4
 - > PF4 bindet und neutralisiert freies Heparin
 - > PF4 bindet auch an Heparansulfat auf Endothelzellen >Aktivierung der Endothelzellen und weitere Thrombinbildung > **Thrombose**

26

Heparin-induzierte Thrombozytopenie



Hirsh et al Arch Intern Med 2004; 164:361-369

27

HIT

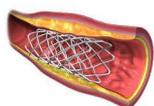
Maßnahmen:

- Bestimmung der Thrombozytenzahl vor jeder Heparin-gabe
Abfall unter 50% des Ausgangswertes oder auf < 150.000/ μ L wird als HIT angesehen
- Keine Behandlung von Patienten mit HIT in der Vorgeschichte mit Heparin
- bei HIT-Verdacht sofortiges Absetzen von Heparin

28

Heparin-Beschichtung von Oberflächen

- unterdrückt Gerinnungsaktivierung auf der Oberfläche
- Heparin an der Oberfläche bindet Antithrombin und hält so die lokalen Thrombinkonzentrationen niedrig
Anwendung z. B. bei Stents



29

Der Heparin-Skandal

Anfang 2008: 100 Todesfälle in den USA durch verunreinigtes Heparin

Februar 2008: kontaminierte Chargen auch in Europa auf dem Markt

80 Dialysepatienten zeigten Blutdruckabfall, Atemnot; allergischer Schock bei 3 Patienten
Rückruf

- seit BSE ist Schweinemucosa die Hauptquelle für Heparin-gewinnung (statt Rinderlunge)
- mehr als die Hälfte von Rohheparin der Weltproduktion stammt aus China

30



31



32



33

Ursache:

Verunreinigung mit Chondroitinsulfat (5 - 50 %)

- Chemisch ähnlich dem Heparin
- N-Acetylgalaktosamin und Glucuronsäure, sulfatiert
- kommt in Knorpel und Schalen von Meeresfrüchten vor
- deutlich billiger als Heparin

vorsätzliche Beimischung?

34

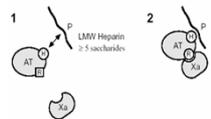
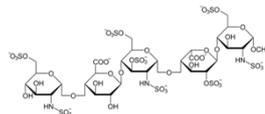
Fondaparinux Arixtra

Selektiver Faktor Xa-Hemmer

Bindet nicht an PF4, daher keine
Induktion von HIT

Pentasaccharid
„aktive Sequenz“ von Heparin

Nachteil:
es gibt kein Gegenmittel



35

Direkte Thrombin-Inhibitoren

- Argatroban (synthetisch)
- Hirudin (rekombinant)
- binden direkt an das aktive Zentrum von Thrombin
- Nicht abhängig von AT-III

36

1914
Luis Agote
erste erfolgreiche Bluttransfusion, Antikoagulation mit Natriumzitrat

43

Zitrat

$$\text{Ca}^{2+} \cdot \text{OOC} - \text{CH}_2 - \text{C}(\text{OH}) - \text{CH}_2 - \text{COO}^-$$

Citrate

$$\text{Ca}^{2+} \cdot \text{COO}^- - \text{CH}_2 - \text{C}(\text{OH}) - \text{CH}_2 - \text{COO}^- \cdot \text{Ca}^{2+}$$

Citrate

Komplex: Ca₃ (Citrate)₂

- metabolisiert zu Bicarbonat (Leber)
- reduziert Komplementaktivierung

44

Blutabnahmesystem (Vacuette)

Glasröhrchen mit Schraubdeckel (Septum), Vakuum, Farbcodierung je nach Verwendung bzw. je nach Antikoagulation

45

VACUETTE® Coagulation Tubes

Coagulation tubes are filled with buffered tri-sodium citrate solution. Citrate concentration of 0,109 mol/l (3,2%) is available. The choice of the concentration depends upon the policies of the laboratories. The mixing ratio is 1 part citrate to 9 parts blood.

VACUETTE® Heparin tubes

The interior of the tube wall is coated with lithium heparin, ammonium heparin or sodium heparin. The anticoagulant heparin activates antithrombins, thus blocking the coagulation cascade and producing a whole blood / plasma sample instead of clotted blood plus serum. Plasma tubes with lithium heparin and gel contain a barrier gel in the tube. The specific gravity of this material lies between that of the blood cells and plasma. During centrifugation the gel barrier moves upwards providing a stable barrier separating the plasma from cells. Plasma may be aspirated directly from the collection tube, eliminating the need for manual transfer to another container. This barrier allows for the stability of certain parameters in the primary tube under the recommended storage conditions for up to 48 hours.

46

Blutprodukte

47

Bluttransfusion

Zuführen von Blut oder Blutbestandteilen als Infusion

- Fremdblutspende
- Eigenblutspende

Vollbluttransfusionen heute nur mehr selten durchgeführt; Blut wird in Komponenten aufgetrennt und komponentenweise transfundiert

Vorteile:

- a) Patient erhält nur die tatsächlich benötigten Blutbestandteile (Plasma bei Faktorenmangel, Erythrozyten bei Anämie,...)
- b) Bessere Lagerfähigkeit (Plättchen bei RT, Erythrozyten bei mindestens 4 °C, Plasmaproteine eingefroren)

48

Gewinnung von Blutprodukten aus

- a) Vollblut (Pool vieler Blutspenden)
- b) Apherese (kontinuierlicher Prozess)

49

Blutprodukte:

- Erythrozyten-Konzentrate (bei Anämie)
- Granulozyten-Konzentrate
- Thrombozyten-Konzentrate
- Plasma (FFP, fresh frozen plasma)
- Stammzell-Präparate
- Gerinnungsfaktor-Konzentrate
- Immunglobuline

50

Erythrozytenkonzentrat



Thrombozytenkonzentrat



Indikationen für Bluttransfusionen

- Blutersatz nach Unfall/Operation
- Blutkrankheiten (Anämien; ab Hb von 6g/dL)
normal: 14-18 bzw. 12-16 g/dL
- Mangel od. Funktionsstörungen von
 - Thrombozyten
 - Plasma
 - Gerinnungsfaktoren

53

Risiken

- Übertragung von Bakterien oder Viren (Hepatitis B & C, HIV)

HIV, Hepatitis C -> Antikörpertests
(ELISA od. Western Blot gegen virale Proteine)

„diagnostisches Fenster“: Antikörper sind im Blut erst mehrere Wochen nach der Infektion nachweisbar

-> molekularbiologische Testmethoden (RT-PCR) – direkter Nachweis der viralen RNA

54

Transfusionszwischenfälle

- Verwechslung von Blutkonserven -> hämolytische Transfusionsreaktion, Zerstörung der Erythrozyten bei Transfusion von ABO-inkompatiblen Blut
- Bedside-Test (Kreuzprobe) vor Transfusion daher Vorschrift

55

Leukozytendepletion

- Entfernung von Leukozyten aus Blutpräparaten vor der Transfusion
- Leukozytengehalt < 10⁶/Konserven

Gründe:

- 1) Zellständige Viren (z.B. CMV) werden damit entfernt
 - 2) Graft-versus-host-disease wird vermieden: Leukozyten des Spenders (aus der Blutkonserven) erkennen Körperzellen des Empfängers als fremd und zerstören diese
- Leukozytenabreicherung erfolgt durch Filtration oder Zentrifugation und wird vor der Lagerung durchgeführt (LRC leukocyte reduction chambers)

56

Plasma

Fresh frozen plasma:

laut Definition innerhalb von 8 h eingefroren; Realität: < 24 h (dadurch Reduktion von FV und VIII um ca. 15%)

Verwendung:

- Ersatz für spezifische Gerinnungsfaktoren
- Behandlung von Blutungen bei Lebererkrankungen
- Behandlung von DIC
- Plasmaaustausch bei verschiedenen Autoimmunerkrankungen

57

Plättchenkonzentrate

- Gewinnung durch Apherese (kontinuierliche Aufarbeitung großer Blutvolumina)
- 50 mL Konzentrat -> ca. 5,5 x 10¹⁰ Plättchen
- Lagerung bei 22 °C, max. 5 d
- Anwendung: Therapie von Thrombozytopenie (verschiedene Ursachen: Autoimmunerkrankung -> erhöhte Zerstörung der Plättchen durch Autoantikörper; DIC; induziert durch bestimmte Medikamente)
- Platelet storage lesion – Verlust der Aktivität

58

Erythrozytenkonzentrate

- aus Frischblut durch Entfernung von Plasma gewonnen
- Hämatokrit ca. 75%
- Lagerung: 42 d bei 4 °C

59

Plasmaderivate

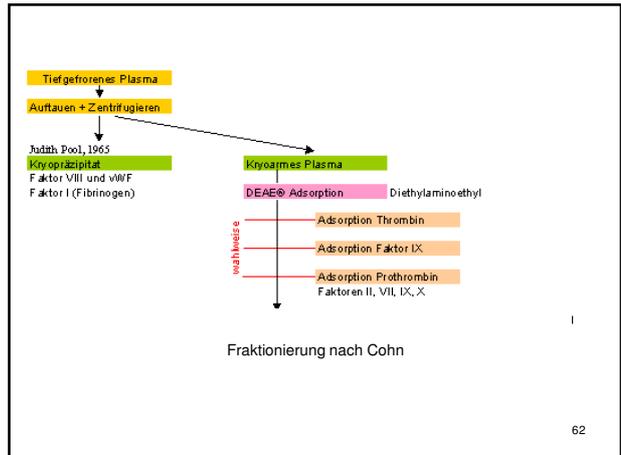
- Plasma als Ausgangsmaterial für die Gewinnung von Gerinnungsfaktoren
- FVII, FVIII, FIX werden heute rekombinant hergestellt
- Gefahr der Krankheitsübertragung -> PCR-Testung
- Reinigung der Einzelfaktoren durch verschiedene Präzipitations- und Chromatographieschritte
- Lyophilisierung der Produkte (Vorteil: keine Kühlung erforderlich)

60

Plasmafraktionierung

- FFP wird aufgetaut
- Kryopräzipitat durch Zentrifugieren entfernt (enthält FVIII, vWF, Fibrinogen)
- Reinigung dieser Proteine durch weitere Fäll- und Chromatographieschritte
- aus dem Überstand werden FII, VII, IX, X mittels DEAE-Adsorption gewonnen
- weitere Proteine durch Fraktionierung nach Cohn

61



62

Edwin J. Cohn, 1940er

Kryoarmeres Plasma nach Adsorption

Zugabe von Ethanol

Ethanol Fällung 8%
Faktor XIII im Präzipitat

Heparin-Adsorption
Antithrombin III

Zugabe von Ethanol

Ethanol Fällung 20-25%
Immunglobulin-Produkte im Präzipitat

Zugabe von Ethanol

Ethanol Fällung 40-42%
Albumin im Präzipitat

63

Fraktionierung nach Cohn

- Dem Plasma (ohne Kryopräzipitat) wird Ethanol in steigender Konzentration zugesetzt, Temperatur wird abgesenkt
- 8% Ethanol -> Faktor XIII ↓
- aus Überstand: Antithrombin durch Adsorption an Heparin gewonnen
- 20-25% Ethanol -> IgG ↓
- 40-42% Ethanol -> Albumin ↓

64

Methoden der Blutreinigung

65

Apherese

- griech. „wegnehmen“
- Verfahren zur Entfernung von Substanzen aus dem Blut oder Plasma des Patienten (Proteine, proteingebundene Substanzen, Zellen)

Therapeutische Apherese (pathogene Komponenten werden entfernt)
Diagnostische Apherese (Gewinnung von Zellen aus dem Blut)

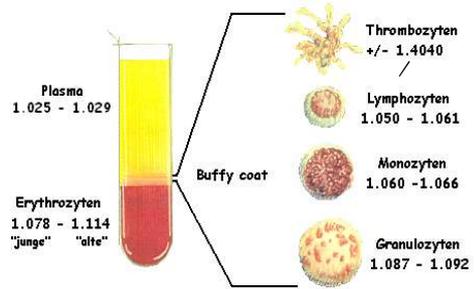
66

Apherese zur Gewinnung von Zellen

- Blut wird aus Armvene entnommen
- in steriles Schlauchsystem geleitet
- Antikoagulation mit Citrat
- Mischung wird in Zellzentrifuge geleitet
- Blutbestandteile werden entsprechend der Dichte aufgetrennt und gesammelt
- nicht benötigte Komponenten zum Spender zurück

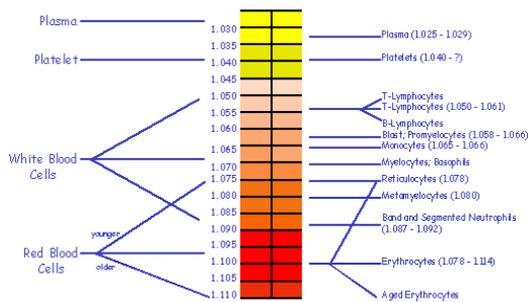
67

Dichte der Blutzellen



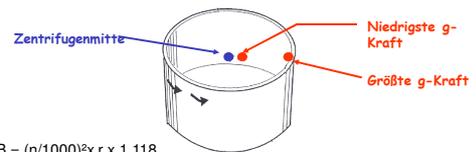
68

Dichte der Blutzellen



69

Zentrifugation



$$RZB = (n/1000)^2 \times r \times 1,118$$

n...rpm

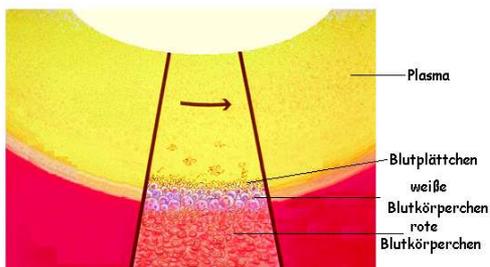
r...Radius in mm

RZB...relative Zentrifugalbeschleunigung

Die g-Kraft in der Zentrifuge variiert mit der Geschwindigkeit und dem Radius. Die g-Kraft ist am größten am äußeren Rand und am niedrigsten am inneren Rand, nahe dem Zentrum. Die g-Kraft verstärkt sich mit zunehmender Zentrifugengeschwindigkeit.

70

Zentrifugation



71

Zellzentrifuge



72

Hämodialyse:

Entfernung niedermolekularer, wasserlöslicher Substanzen aus dem Blut

- Akutdialyse
- Chronische Dialyse

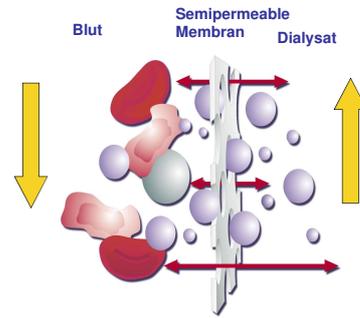
Therapeutische Apherese:

Entfernung größerer, meist proteingebundener Substanzen

- Behandlung von Autoimmunerkrankungen
- Leberunterstützung
- Therapie von Sepsis, MOF
- Vergiftungen
- Hypercholesterolämie

73

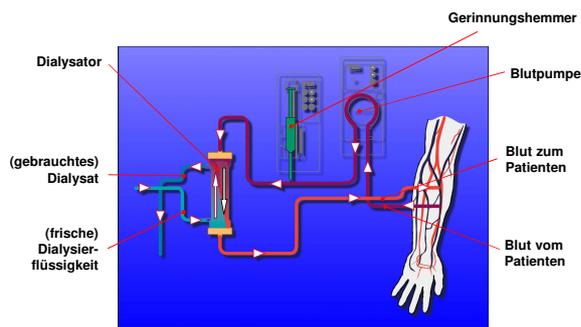
Prinzip der Hämodialyse



Gegenstrom von Blut und Dialysat

74

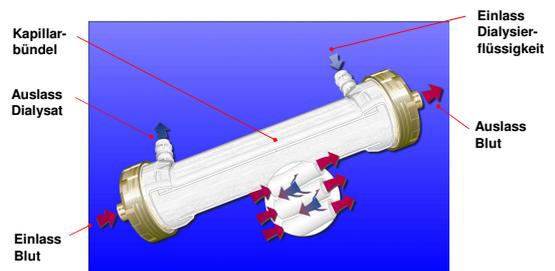
Standard-Hämodialyse (HD)



75

Dialysator

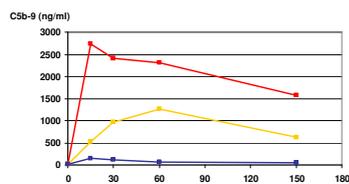
Technischer Aufbau



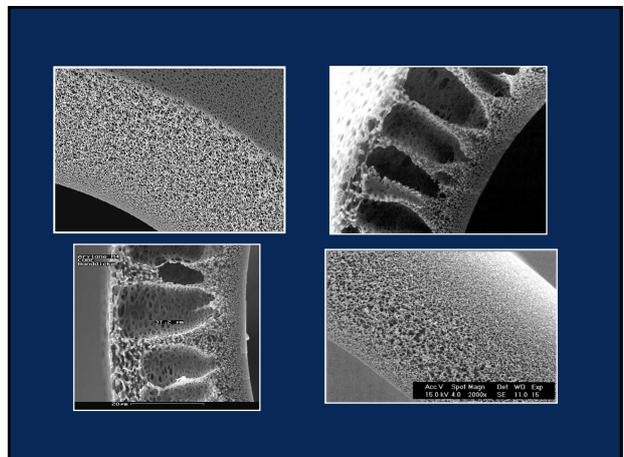
76

Materialien

- früher Cellulose (Aktivierung des Komplementsystems)
- synthetisch modifizierte Cellulosen
- heute meist synthetische Membranen (Polysulfon)

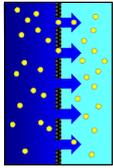


77



Siebkoefizient

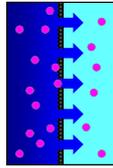
$$S = c_{\text{Filtrat}} / c_{\text{Plasma}}$$



Solute 1

$$c_f = c_p$$

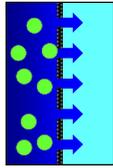
$$S = 1$$



Solute 2

$$c_f = 0.5 \cdot c_p$$

$$S = 0.5$$



Solute 3

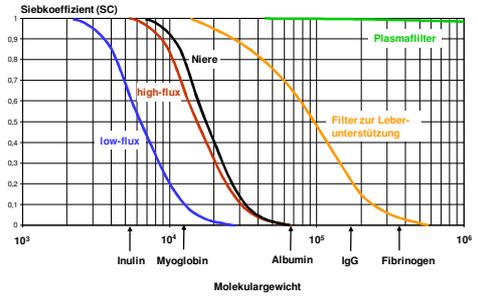
$$c_f = 0$$

$$S = 0$$

79

Dialysator: Siebkoefizient

Semipermeable Membranen



80

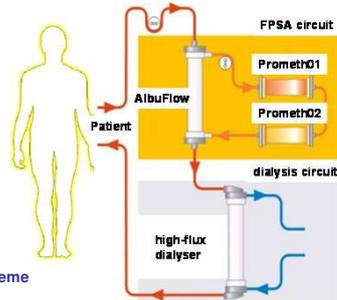
Therapeutische Apherese

81

- Plasmaaustausch
 - unselektiv; entfernt auch wertvolle Komponenten des Plasmas, Substitutionslösungen erforderlich; potentielle Gefahr von allergischen Reaktionen oder Infektionen
- Adsorptionssysteme
 - Hämapherese
 - Vollblut über Adsorber geleitet, pathogene Komponenten gebunden, gereinigtes Blut zurück zum Patienten
 - Plasmapherese
 - Trennung in Zell- und Plasmafraktion, nur Plasma in Kontakt mit Adsorbentmaterial > bioverträglicher

82

Leberunterstützung Prometheus-System



artifizielle und bioartifizielle Systeme

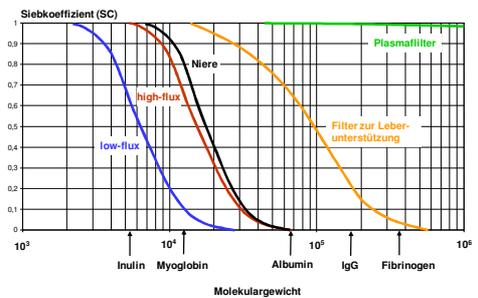
Entfernung von hydrophoben, meist proteingebundenen Substanzen (z.B. Bilirubin, Gallensäuren)

Bioartifizielle Systeme: zusätzlich Bioreaktoren mit Leberzellen
technisch sehr komplex, klinisch nicht etabliert

83

Dialysator: Siebkoefizient

Semipermeable Membranen



84



Leberunterstützung

- keine chronische Therapie
- Behandlung bis zur Regeneration der Leber oder bis ein Spenderorgan zur Verfügung steht (Bridge to transplant)

86

Autoimmunerkrankungen

Antikörper gegen körpereigene Strukturen führen zur Zerstörung von Geweben

Behandlungsansätze:

- Plasmaaustausch
- unspezifische Immunadsorption (Entfernung von IgG)
- spezifische Immunadsorption (Entfernung des pathogenen Autoantikörpers, falls charakterisiert u. bekannt)

87

Protein A *Staphylococcus aureus*

- bindet an Fc Region von IgG
- bindet kein IgG der Subklasse 3

z.B Entfernung von Faktor VIII Antikörpern bei Therapie der Hämophilie

88

DALI direct adsorption of lipoproteins Lipidapherese

bei Patienten mit familiärer Hypercholesterinämie

89

Transport-Lipoproteine

- Im Serum von Säugetieren kommen komplexe Lipide und Proteine vor, die relativ konstante Mengenverhältnisse besitzen und die als Transport-Lipoproteine **wasserunlösliche Lipide** wie **Cholesterin**, **Cholesterinester** und **Triacylglycerine** zwischen den Organen über die Blutbahn transportieren.

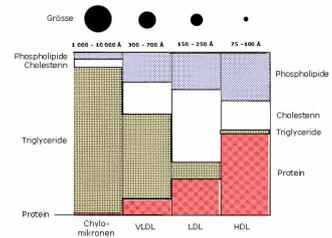
90

Transport-Lipoproteine

- Sie werden nach Dichte und Partikelgröße charakterisiert, man unterscheidet
 - Chylomikronen* (Partikelgröße 75 -1000 nm)
 - VLDL* [*very low density lipoprotein*, 30 - 50 nm] sehr niedriger Dichte
 - LDL* [*low density protein*, 20 - 22 nm]
 - HDL* [*high density lipoprotein*, 7.5 - 10 nm]

91

Zusammensetzung verschiedener Lipoproteinpartikel



92

Transport-Lipoproteine

- Chylomikronen transportieren nach der Nahrungsaufnahme Triacylglyceride und Cholesterin vom Verdauungstrakt in das Gewebe. Der Lipidanteil beträgt zwischen 98 und 99.5 %, der Proteinanteil schwankt zwischen 0.5 und 2 %.
- Die VLDLs enthalten sehr viel Triglyceride und wenig Protein. Auf ihrem Weg durch den Organismus erhöht sich durch fortlaufende Abspaltung von Triglyceriden ihr Anteil an Cholesterin und es entstehen die cholesterinreichen LDLs.

93

Transport-Lipoproteine

- LDL transportiert Cholesterin im Plasma, bindet an der Zielzelle an den *LDL-Rezeptor* und wird von der Zelle aufgenommen. Liegt ein Defekt am *LDL-Rezeptor* vor, so kommt es zur Anreicherung von LDL und Cholesterin im Blut.

Schädigung der Arterienwände kann zur Einlagerung von LDL in die Zellwand führen und es kann sich ein Thrombus bilden, der zu Herzinfarkt oder Schlaganfall führt.

94

Arterielle Thrombose

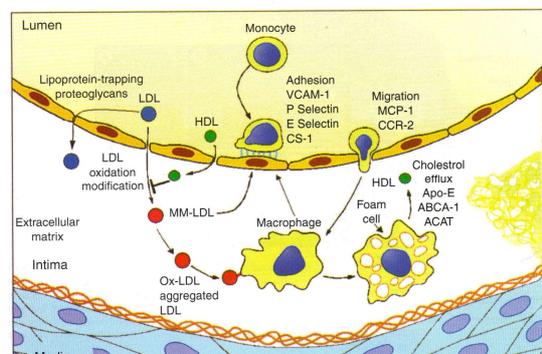
Auslöser:
Ruptur oder Erosion eines arteriosklerotischen Plaques

Plättchen spielen wichtige Rolle

Lipoprotein-induced hypothesis

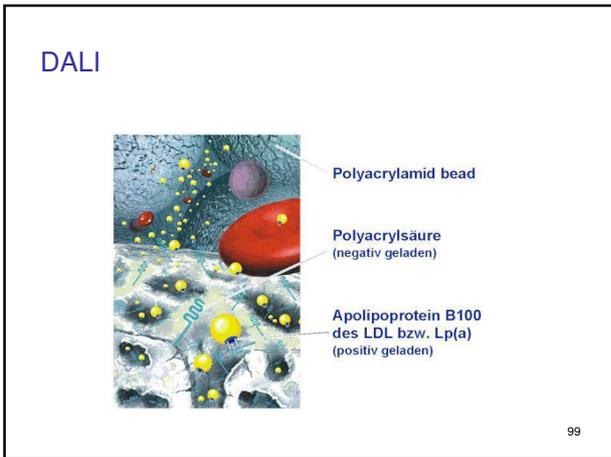
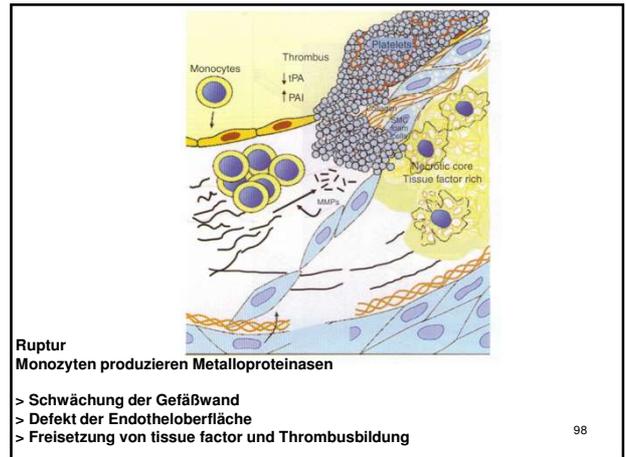
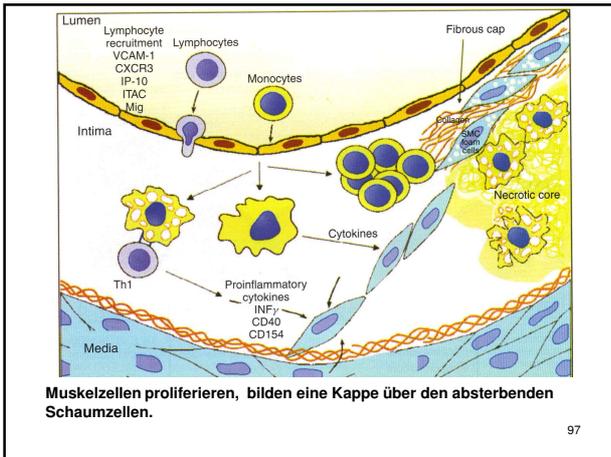
Joseph Leonard Goldstein (Nobelpreis 1985 für Arbeiten zum Cholesterinstoffwechsel)

95



Makrophagen nehmen oxidiertes LDL auf; Bildung von Schaumzellen; dadurch Entzündungsreaktion; Veränderung der Gefäßwand

96



Blut und Blutgerinnung

Teil 3

1

INHALT

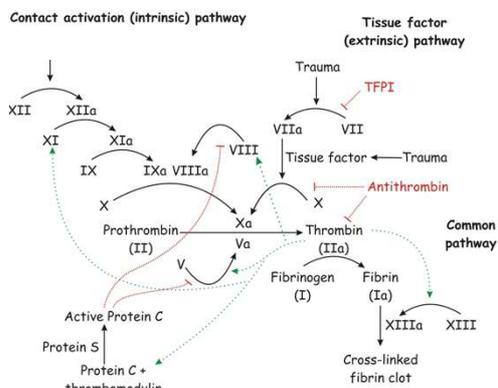
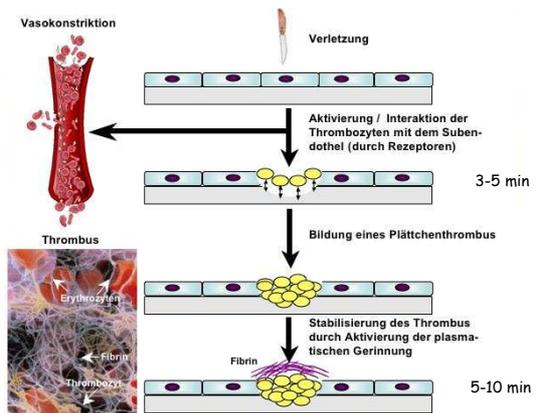
- (I) Bestandteile und Funktionen des Blutes
- (II) Blutgerinnung und Fibrinolyse
- (III) Regulation der Blutgerinnung
- (IV) Wechselwirkung von Gerinnung und Entzündung
- (V) Antikoagulation und Methoden der Blutreinigung

2

Teil 2

- Zelluläre und plasmatische Gerinnung
- Plättchen
- Gerinnungskaskade
- Gerinnungsfaktoren und Gla-Domänen
- Fibrinolyse

3



5

Teil 3

Regulation der Blutgerinnung

- Natürliche Antikoagulantien
 - Tissue Factor Pathway Inhibitor
 - Antithrombin
 - Protein C
- Antikoagulantien in der Medizin
 - Heparin
 - Coumarinderivate
 - direkte Thrombininhibitoren
- Gerinnungstests

6

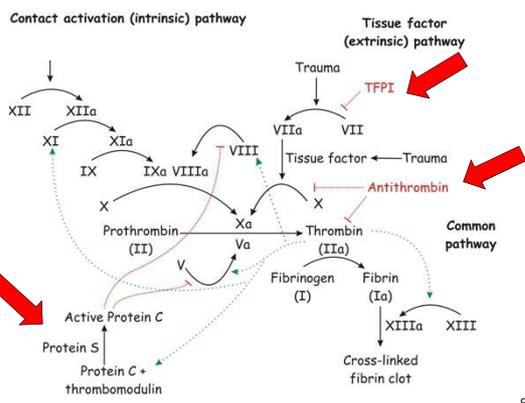
Regulation der Blutgerinnung

7

Natürliche Antikoagulanzen

- Tissue factor pathway inhibitor (TFPI)
- Antithrombin (AT-III)
- aktiviertes Protein C, Protein S

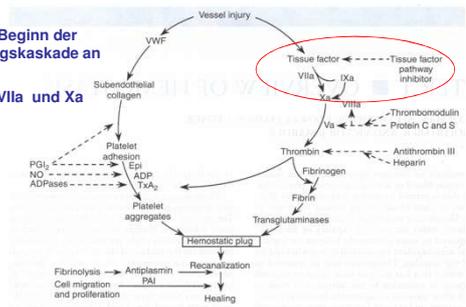
8



9

Tissue factor pathway inhibitor, TFPI

- setzt am Beginn der Gerinnungskaskade an
- inhibiert VIIa und Xa



10

TFPI

- Lokalisation: v.a. auf der Endotheloberfläche (gerinnungshemmende Eigenschaften!)
- zusätzlicher Pool in den α -Granula der Plättchen, wird bei Plättchenaktivierung freigesetzt
- zirkulierender Pool im Plasma gebunden an Lipoproteine (LDL)

11

Antithrombin AT-III

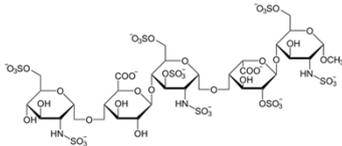
- Serinproteaseinhibitor (Serpine)
- inaktiviert v.a. Thrombin (FIIa) und FXa; schwächer auch IXa, XIa, XIIa
- AT allein inhibiert Thrombin nur schwach
- Wirkung wird durch Glukosaminoglykane verstärkt:
Heparansulfat (Endotheloberfläche)
Heparin (Klinik)

12

Heparin

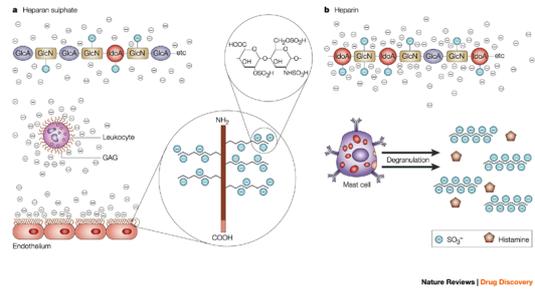
gehört zur Gruppe der Glukosaminoglykane (Mucopolysaccharide)

- saure Polysaccharide
- Aufbau aus Disaccharideinheiten, je eine Zuckersäure und ein Aminozucker
- Bestandteile vieler Makromoleküle (Proteoglykane)
- Teil der extrazellulären Matrix (Wasserspeicherung, Elastizität)



13

Heparin and heparan sulphate



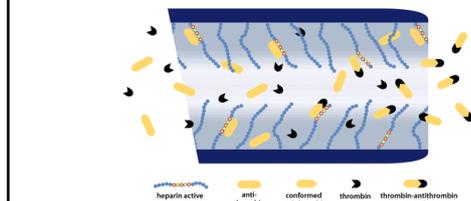
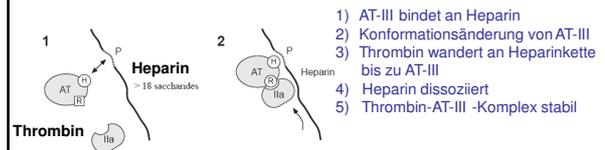
Nature Reviews Drug Discovery 1, 140-148 (2002)

14

Antithrombin

- AT-III bindet spezifisch an Pentasaccharidsequenz in Heparin
- Bindung bewirkt Konformationsänderung von AT-III
- Dadurch erhöht sich Affinität von AT-III für FXa und Thrombin

15



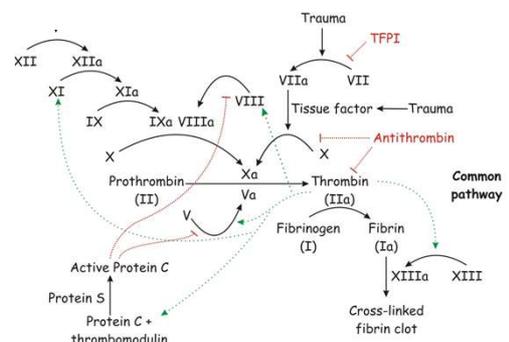
16

Aktiviertes Protein C

- Thrombin (FIIa) bindet an Thrombomodulin (Endotheloberfläche)
- FIIa-Thrombomodulinkomplex:
 - aktiviert Protein C (antikoagulatorisch)
- Aktiviertes Protein C (APC) hemmt Faktoren Va und VIIIa
- APC hat auch entzündungshemmende und anti-apoptische Effekte

17

Inaktivierung von FVa und FVIIIa durch APC



18

Faktor V Leiden

- Mutation in Faktor V (Name: wurde in Leiden entdeckt)
- häufigste Ursache für erbliche venöse Thrombose
- durch eine Mutation an der Spaltungsstelle für Protein C kann Faktor Va nicht inaktiviert werden, Protein C kann daher nicht wirken

19

Antikoagulantien in der Medizin

- direkte: reagieren mit Faktoren der Gerinnungskaskade
z.B. Heparin
- indirekte: hemmen die Synthese der Gerinnungsfaktoren
z.B. Warfarin bzw. den Ablauf der Gerinnungskaskade z. B. Citrat
- Thrombozytenaggregationshemmer
z. B. Acetylsalicylsäure (inhibiert die Cyclooxygenase und die Entstehung von Thromboxan aus Arachidonsäure)

20

Antikoagulantien in der Medizin

Anwendung:

- prophylaktisch:
 - vor, während und nach Operationen
 - bei Bettlägrigkeit
 - bei Blutentnahme
 - bei Blutreinigung (Dialyse etc.)
- therapeutisch:
 - Behandlung von Thrombosen

21

Antikoagulantien in der Medizin

Beispiele:

- Heparine (wirken über AT-III)
- Hirudin (inhibiert Thrombin)
- Argatroban (inhibiert Thrombin)
- Cumarinderivate (hemmen Carboxylierung v. Gerinnungsfaktoren)
- Zitrat (extrakorporale Blutreinigung)

22

Heparine

- heterogene Gruppe von Molekülen
- gewonnen aus Dünndarmmucosa des Schweins oder aus Rinderlungen
- wird nicht aus dem Magen-Darm-Trakt resorbiert
Verabreichung intravenös oder subkutan
- Angriffspunkt: Antithrombin
Erhöhung der Affinität von AT für FXa und FIIa
ca. um den Faktor 1000
- Dosis wird in Internationalen Einheiten (IE) angegeben: bezieht sich auf biologische Aktivität

23

Klassifizierung der Heparine

- **Unfraktioniertes Heparin (UFH)**
 - ca. 15 kDa (3 - 30)
 - ca. 1/3 der Moleküle sind aktiv (enthalten spezifische Pentasaccharidsequenz für Bindung von AT)
- **Low molecular weight heparin (LMWH)**
 - ca. 5 kDa (1 - 10)
 - wirken v.a. auf FXa
 - bessere Pharmakokinetik (höhere HWZ)
 - gewonnen aus UFH durch enzymatische oder chemische Spaltung

24

Heparin-induzierte Thrombozytopenie (HIT)

- Bildung von Antikörpern gegen Komplexe aus Plättchenfaktor 4 (PF4) und Heparin
- tritt in ca. 5% der Patienten auf, die mit UFH behandelt werden (bei LMWH ca. 1%)
 - PF 4: in α -Granula der Plättchen gespeichert, stark positiv geladen
 - wird bei Plättchenaktivierung freigesetzt
 - bindet an Glykosaminoglykane (Heparansulfat) auf der Endotheloberfläche
 - kann daher lokal die Wirkung von Antithrombin hemmen
 - hohe Affinität für Heparin

25

HIT

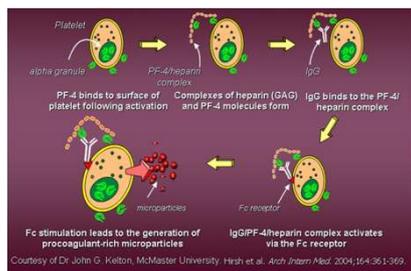
- PF4 und Heparin wirken als Antigen
- Bildung von AK gegen diesen Komplex

Folgen der Antikörperbildung:

- Komplex aus PF4, Heparin, und Antikörper bindet an den Fc-Rezeptor der Plättchen und führt zur Plättchenaktivierung
 - > weitere Ausschüttung von PF4
 - > PF4 bindet und neutralisiert freies Heparin
 - > PF4 bindet auch an Heparansulfat auf Endothelzellen >Aktivierung der Endothelzellen und weitere Thrombinbildung > **Thrombose**

26

Heparin-induzierte Thrombozytopenie



Hirsh et al Arch Intern Med 2004; 164:361-369

27

HIT

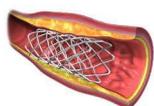
Maßnahmen:

- Bestimmung der Thrombozytenzahl vor jeder Heparinabgabe
Abfall unter 50% des Ausgangswertes oder auf < 150.000/ μ L wird als HIT angesehen
- Keine Behandlung von Patienten mit HIT in der Vorgeschichte mit Heparin
- bei HIT-Verdacht sofortiges Absetzen von Heparin

28

Heparin-Beschichtung von Oberflächen

- unterdrückt Gerinnungsaktivierung auf der Oberfläche
- Heparin an der Oberfläche bindet Antithrombin und hält so die lokalen Thrombinkonzentrationen niedrig
Anwendung z. B. bei Stents



29

Der Heparin-Skandal

Anfang 2008: 100 Todesfälle in den USA durch verunreinigtes Heparin

Februar 2008: kontaminierte Chargen auch in Europa auf dem Markt

80 Dialysepatienten zeigten Blutdruckabfall, Atemnot; allergischer Schock bei 3 Patienten
Rückruf

- seit BSE ist Schweinemucosa die Hauptquelle für Heparinergewinnung (statt Rinderlunge)
- mehr als die Hälfte von Rohheparin der Weltproduktion stammt aus China

30



31



32



33

Ursache:

Verunreinigung mit Chondroitinsulfat (5 - 50 %)

- Chemisch ähnlich dem Heparin
- N-Acetylgalaktosamin und Glucuronsäure, sulfatiert
- kommt in Knorpel und Schalen von Meeresfrüchten vor
- deutlich billiger als Heparin

vorsätzliche Beimischung?

34

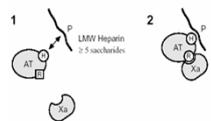
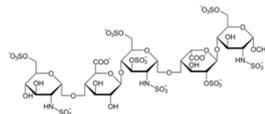
Fondaparinux Arixtra

Selektiver Faktor Xa-Hemmer

Bindet nicht an PF4, daher keine
Induktion von HIT

Pentasaccharid
„aktive Sequenz“ von Heparin

Nachteil:
es gibt kein Gegenmittel



35

Direkte Thrombin-Inhibitoren

- Argatroban (synthetisch)
- Hirudin (rekombinant)
- binden direkt an das aktive Zentrum von Thrombin
- Nicht abhängig von AT-III

36

1914
Luis Agote
erste erfolgreiche Bluttransfusion, Antikoagulation mit Natriumzitrat

43

Zitrat

$$\text{Ca}^{2+} \cdot \text{OOC} - \text{CH}_2 - \text{C}(\text{OH}) - \text{CH}_2 - \text{COO}^- \cdot \text{Ca}^{2+} \cdot \text{COO}^- - \text{CH}_2 - \text{C}(\text{OH}) - \text{CH}_2 - \text{COO}^- \cdot \text{Ca}^{2+}$$

Komplex: $\text{Ca}_3(\text{Citrate})_2$

- metabolisiert zu Bicarbonat (Leber)
- reduziert Komplementaktivierung

44

Blutabnahmesystem (Vacuette)

Glasröhrchen mit Schraubdeckel (Septum), Vakuum, Farbcodierung je nach Verwendung bzw. je nach Antikoagulation

45

VACUETTE® Coagulation Tubes

Coagulation tubes are filled with buffered tri-sodium citrate solution. Citrate concentration of 0.109 mol/l (3.2%) is available. The choice of the concentration depends upon the policies of the laboratories. The mixing ratio is 1 part citrate to 9 parts blood.

VACUETTE® Heparin tubes

The interior of the tube wall is coated with lithium heparin, ammonium heparin or sodium heparin. The anticoagulant heparin activates antithrombins, thus blocking the coagulation cascade and producing a whole blood / plasma sample instead of clotted blood plus serum. Plasma tubes with lithium heparin and gel contain a barrier gel in the tube. The specific gravity of this material lies between that of the blood cells and plasma. During centrifugation the gel barrier moves upwards providing a stable barrier separating the plasma from cells. Plasma may be aspirated directly from the collection tube, eliminating the need for manual transfer to another container. This barrier allows for the stability of certain parameters in the primary tube under the recommended storage conditions for up to 48 hours.

46

Blutprodukte

47

Bluttransfusion

Zuführen von Blut oder Blutbestandteilen als Infusion

- Fremdblutspende
- Eigenblutspende

Vollbluttransfusionen heute nur mehr selten durchgeführt; Blut wird in Komponenten aufgetrennt und komponentenweise transfundiert

Vorteile:

- Patient erhält nur die tatsächlich benötigten Blutbestandteile (Plasma bei Faktorenmangel, Erythrozyten bei Anämie,...)
- Bessere Lagerfähigkeit (Plättchen bei RT, Erythrozyten bei mindestens 4 °C, Plasmaproteine eingefroren)

48

Gewinnung von Blutprodukten aus

- a) Vollblut (Pool vieler Blutspenden)
- b) Apherese (kontinuierlicher Prozess)

49

Blutprodukte:

- Erythrozyten-Konzentrate (bei Anämie)
- Granulozyten-Konzentrate
- Thrombozyten-Konzentrate
- Plasma (FFP, fresh frozen plasma)
- Stammzell-Präparate
- Gerinnungsfaktor-Konzentrate
- Immunglobuline

50

Erythrozytenkonzentrat



Thrombozytenkonzentrat



Indikationen für Bluttransfusionen

- Blutersatz nach Unfall/Operation
- Blutkrankheiten (Anämien; ab Hb von 6g/dL)
normal: 14-18 bzw. 12-16 g/dL
- Mangel od. Funktionsstörungen von
 - Thrombozyten
 - Plasma
 - Gerinnungsfaktoren

53

Risiken

- Übertragung von Bakterien oder Viren (Hepatitis B & C, HIV)

HIV, Hepatitis C -> Antikörpertests
(ELISA od. Western Blot gegen virale Proteine)

„diagnostisches Fenster“: Antikörper sind im Blut erst mehrere Wochen nach der Infektion nachweisbar

-> molekularbiologische Testmethoden (RT-PCR) – direkter Nachweis der viralen RNA

54

Transfusionszwischenfälle

- Verwechslung von Blutkonserven -> hämolytische Transfusionsreaktion, Zerstörung der Erythrozyten bei Transfusion von ABO-inkompatiblen Blut
- Bedside-Test (Kreuzprobe) vor Transfusion daher Vorschrift

55

Leukozytendepletion

- Entfernung von Leukozyten aus Blutpräparaten vor der Transfusion
- Leukozytengehalt < 10⁶/Konserven

Gründe:

- 1) Zellständige Viren (z.B. CMV) werden damit entfernt
 - 2) Graft-versus-host-disease wird vermieden: Leukozyten des Spenders (aus der Blutkonserven) erkennen Körperzellen des Empfängers als fremd und zerstören diese
- Leukozytenabreicherung erfolgt durch Filtration oder Zentrifugation und wird vor der Lagerung durchgeführt (LRC leukocyte reduction chambers)

56

Plasma

Fresh frozen plasma:

laut Definition innerhalb von 8 h eingefroren; Realität: < 24 h (dadurch Reduktion von FV und VIII um ca. 15%)

Verwendung:

- Ersatz für spezifische Gerinnungsfaktoren
- Behandlung von Blutungen bei Lebererkrankungen
- Behandlung von DIC
- Plasmaaustausch bei verschiedenen Autoimmunerkrankungen

57

Plättchenkonzentrate

- Gewinnung durch Apherese (kontinuierliche Aufarbeitung großer Blutvolumina)
- 50 mL Konzentrat -> ca. 5,5 x 10¹⁰ Plättchen
- Lagerung bei 22 °C, max. 5 d
- Anwendung: Therapie von Thrombozytopenie (verschiedene Ursachen: Autoimmunerkrankung -> erhöhte Zerstörung der Plättchen durch Autoantikörper; DIC; induziert durch bestimmte Medikamente)
- Platelet storage lesion – Verlust der Aktivität

58

Erythrozytenkonzentrate

- aus Frischblut durch Entfernung von Plasma gewonnen
- Hämatokrit ca. 75%
- Lagerung: 42 d bei 4 °C

59

Plasmaderivate

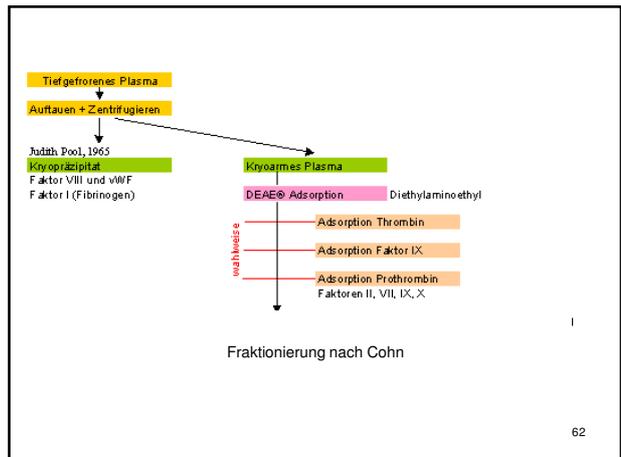
- Plasma als Ausgangsmaterial für die Gewinnung von Gerinnungsfaktoren
- FVII, FVIII, FIX werden heute rekombinant hergestellt
- Gefahr der Krankheitsübertragung -> PCR-Testung
- Reinigung der Einzelfaktoren durch verschiedene Präzipitations- und Chromatographieschritte
- Lyophilisierung der Produkte (Vorteil: keine Kühlung erforderlich)

60

Plasmafraktionierung

- FFP wird aufgetaut
- Kryopräzipitat durch Zentrifugieren entfernt (enthält FVIII, vWF, Fibrinogen)
- Reinigung dieser Proteine durch weitere Fäll- und Chromatographieschritte
- aus dem Überstand werden FII, VII, IX, X mittels DEAE-Adsorption gewonnen
- weitere Proteine durch Fraktionierung nach Cohn

61



62

Edwin J. Cohn, 1940er

Kryoarmeres Plasma nach Adsorption

Zugabe von Ethanol

Ethanol Fällung 8%
Faktor XIII im Präzipitat

Heparin-Adsorption
Antithrombin III

Zugabe von Ethanol

Ethanol Fällung 20-25%
Immunglobulin-Produkte im Präzipitat

Zugabe von Ethanol

Ethanol Fällung 40-42%
Albumin im Präzipitat

63

Fraktionierung nach Cohn

- Dem Plasma (ohne Kryopräzipitat) wird Ethanol in steigender Konzentration zugesetzt, Temperatur wird abgesenkt
- 8% Ethanol -> Faktor XIII ↓
- aus Überstand: Antithrombin durch Adsorption an Heparin gewonnen
- 20-25% Ethanol -> IgG ↓
- 40-42% Ethanol -> Albumin ↓

64

Methoden der Blutreinigung

65

Apherese

- griech. „wegnehmen“
- Verfahren zur Entfernung von Substanzen aus dem Blut oder Plasma des Patienten (Proteine, proteingebundene Substanzen, Zellen)

Therapeutische Apherese (pathogene Komponenten werden entfernt)
Diagnostische Apherese (Gewinnung von Zellen aus dem Blut)

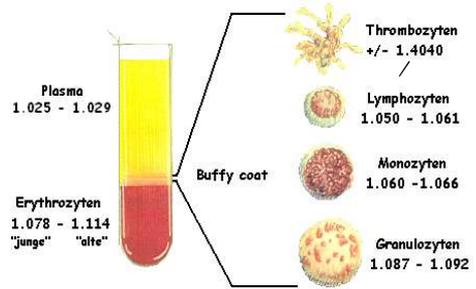
66

Apherese zur Gewinnung von Zellen

- Blut wird aus Armvene entnommen
- in steriles Schlauchsystem geleitet
- Antikoagulation mit Citrat
- Mischung wird in Zellzentrifuge geleitet
- Blutbestandteile werden entsprechend der Dichte aufgetrennt und gesammelt
- nicht benötigte Komponenten zum Spender zurück

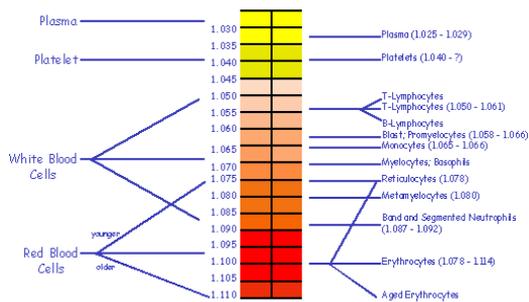
67

Dichte der Blutzellen



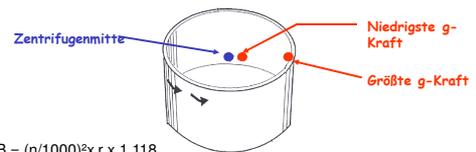
68

Dichte der Blutzellen



69

Zentrifugation



$$RZB = (n/1000)^2 \times r \times 1,118$$

n...rpm

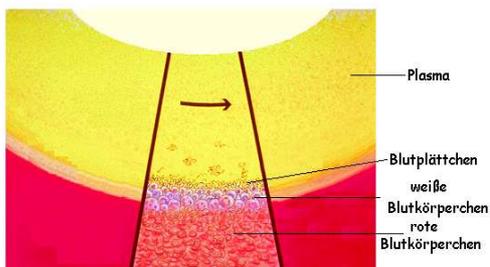
r...Radius in mm

RZB...relative Zentrifugalbeschleunigung

Die g-Kraft in der Zentrifuge variiert mit der Geschwindigkeit und dem Radius. Die g-Kraft ist am größten am äußeren Rand und am niedrigsten am inneren Rand, nahe dem Zentrum. Die g-Kraft verstärkt sich mit zunehmender Zentrifugengeschwindigkeit.

70

Zentrifugation



71

Zellzentrifuge



72

Hämodialyse:

Entfernung niedermolekularer, wasserlöslicher Substanzen aus dem Blut

- Akutdialyse
- Chronische Dialyse

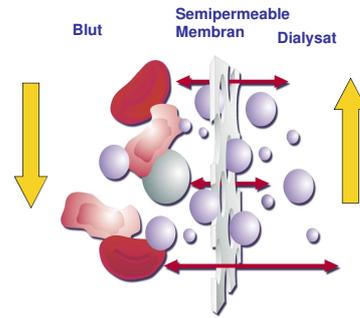
Therapeutische Apherese:

Entfernung größerer, meist proteingebundener Substanzen

- Behandlung von Autoimmunerkrankungen
- Leberunterstützung
- Therapie von Sepsis, MOF
- Vergiftungen
- Hypercholesterolämie

73

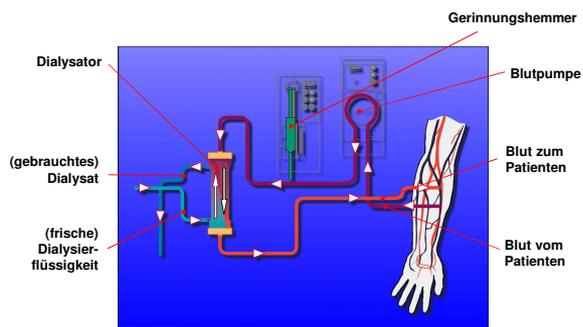
Prinzip der Hämodialyse



Gegenstrom von Blut und Dialysat

74

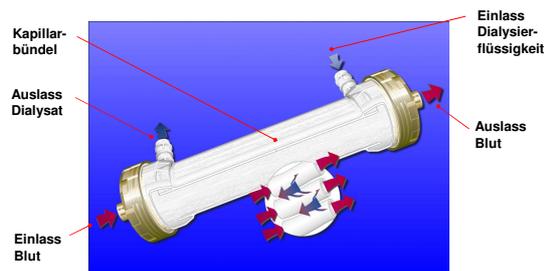
Standard-Hämodialyse (HD)



75

Dialysator

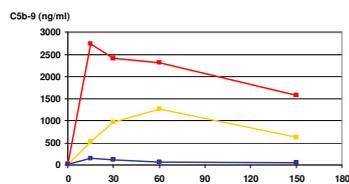
Technischer Aufbau



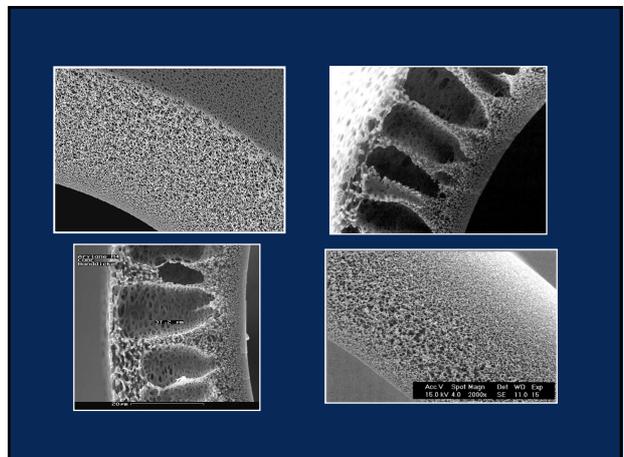
76

Materialien

- früher Cellulose (Aktivierung des Komplementsystems)
- synthetisch modifizierte Cellulosen
- heute meist synthetische Membranen (Polysulfon)

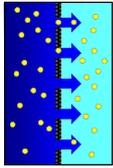


77



Siebkoefizient

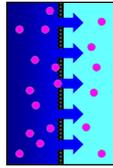
$$S = c_{\text{Filtrat}} / c_{\text{Plasma}}$$



Solute 1

$$c_f = c_p$$

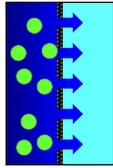
$$S = 1$$



Solute 2

$$c_f = 0.5 \cdot c_p$$

$$S = 0.5$$



Solute 3

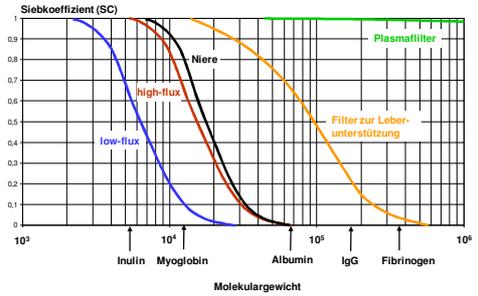
$$c_f = 0$$

$$S = 0$$

79

Dialysator: Siebkoefizient

Semipermeable Membranen



80

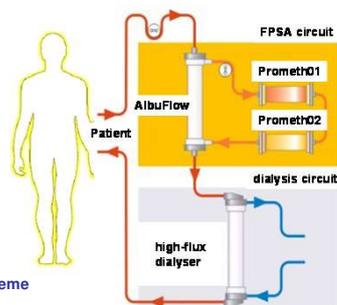
Therapeutische Apherese

81

- Plasmaaustausch
 - unselektiv; entfernt auch wertvolle Komponenten des Plasmas, Substitutionslösungen erforderlich; potentielle Gefahr von allergischen Reaktionen oder Infektionen
- Adsorptionssysteme
 - Hämapherese
 - Vollblut über Adsorber geleitet, pathogene Komponenten gebunden, gereinigtes Blut zurück zum Patienten
 - Plasmapherese
 - Trennung in Zell- und Plasmafraktion, nur Plasma in Kontakt mit Adsorbmaterial > bioverträglicher

82

Leberunterstützung Prometheus-System



artifizielle und bioartifizielle Systeme

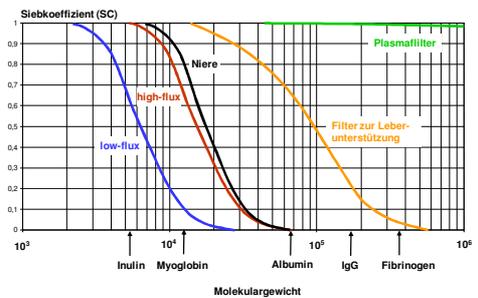
Entfernung von hydrophoben, meist proteingebundenen Substanzen (z.B. Bilirubin, Gallensäuren)

Bioartifizielle Systeme: zusätzlich Bioreaktoren mit Leberzellen
technisch sehr komplex, klinisch nicht etabliert

83

Dialysator: Siebkoefizient

Semipermeable Membranen



84



Leberunterstützung

- keine chronische Therapie
- Behandlung bis zur Regeneration der Leber oder bis ein Spenderorgan zur Verfügung steht (Bridge to transplant)

86

Autoimmunerkrankungen

Antikörper gegen körpereigene Strukturen führen zur Zerstörung von Geweben

Behandlungsansätze:

- Plasmaaustausch
- unspezifische Immunadsorption (Entfernung von IgG)
- spezifische Immunadsorption (Entfernung des pathogenen Autoantikörpers, falls charakterisiert u. bekannt)

87

Protein A *Staphylococcus aureus*

- bindet an Fc Region von IgG
- bindet kein IgG der Subklasse 3

z.B Entfernung von Faktor VIII Antikörpern bei Therapie der Hämophilie

88

DALI direct adsorption of lipoproteins Lipidapherese

bei Patienten mit familiärer Hypercholesterinämie

89

Transport-Lipoproteine

- Im Serum von Säugetieren kommen komplexe Lipide und Proteine vor, die relativ konstante Mengenverhältnisse besitzen und die als Transport-Lipoproteine **wasserunlösliche Lipide** wie **Cholesterin**, **Cholesterinester** und **Triacylglycerine** zwischen den Organen über die Blutbahn transportieren.

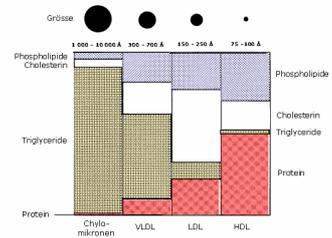
90

Transport-Lipoproteine

- Sie werden nach Dichte und Partikelgröße charakterisiert, man unterscheidet
 - Chylomikronen* (Partikelgröße 75 -1000 nm)
 - VLDL* [*very low density lipoprotein*, 30 - 50 nm] sehr niedriger Dichte
 - LDL* [*low density protein*, 20 - 22 nm]
 - HDL* [*high density lipoprotein*, 7.5 - 10 nm]

91

Zusammensetzung verschiedener Lipoproteinpartikel



92

Transport-Lipoproteine

- Chylomikronen transportieren nach der Nahrungsaufnahme Triacylglyceride und Cholesterin vom Verdauungstrakt in das Gewebe. Der Lipidanteil beträgt zwischen 98 und 99.5 %, der Proteinanteil schwankt zwischen 0.5 und 2 %.
- Die VLDLs enthalten sehr viel Triglyceride und wenig Protein. Auf ihrem Weg durch den Organismus erhöht sich durch fortlaufende Abspaltung von Triglyceriden ihr Anteil an Cholesterin und es entstehen die cholesterinreichen LDLs.

93

Transport-Lipoproteine

- LDL transportiert Cholesterin im Plasma, bindet an der Zielzelle an den *LDL-Rezeptor* und wird von der Zelle aufgenommen. Liegt ein Defekt am *LDL-Rezeptor* vor, so kommt es zur Anreicherung von LDL und Cholesterin im Blut.

Schädigung der Arterienwände kann zur Einlagerung von LDL in die Zellwand führen und es kann sich ein Thrombus bilden, der zu Herzinfarkt oder Schlaganfall führt.

94

Arterielle Thrombose

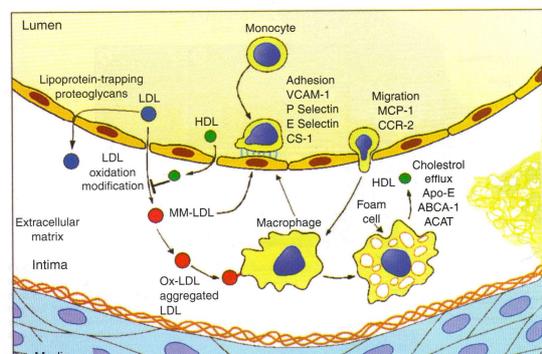
Auslöser:
Ruptur oder Erosion eines arteriosklerotischen Plaques

Plättchen spielen wichtige Rolle

Lipoprotein-induced hypothesis

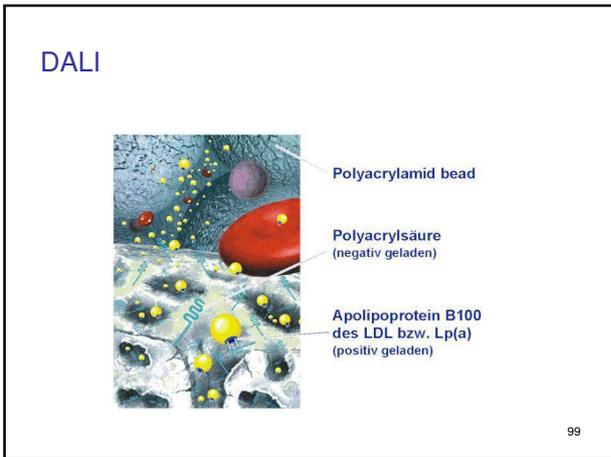
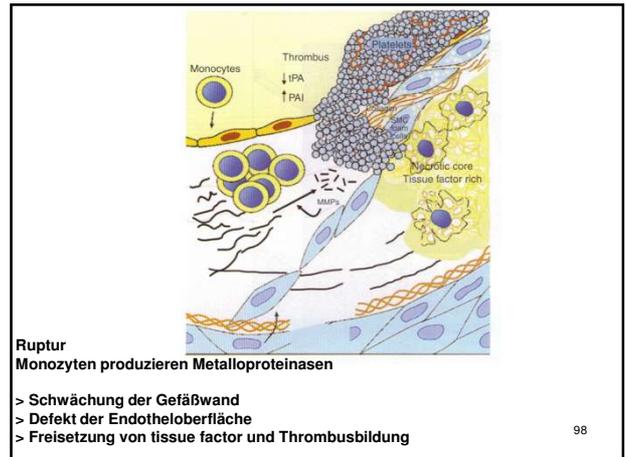
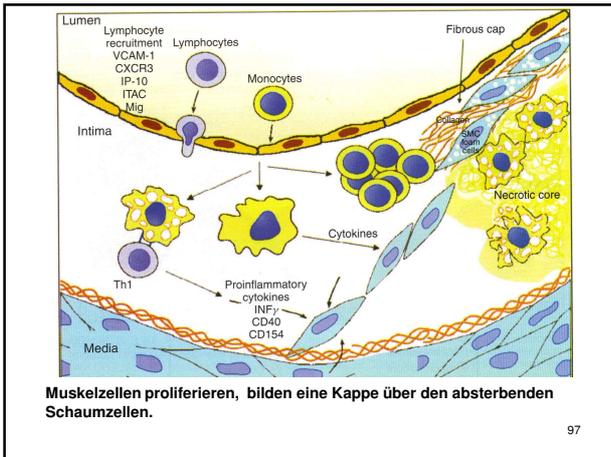
Joseph Leonard Goldstein (Nobelpreis 1985 für Arbeiten zum Cholesterinstoffwechsel)

95



Makrophagen nehmen oxidiertes LDL auf; Bildung von Schaumzellen; dadurch Entzündungsreaktion; Veränderung der Gefäßwand

96



Blut und Blutgerinnung

Teil 3

1

INHALT

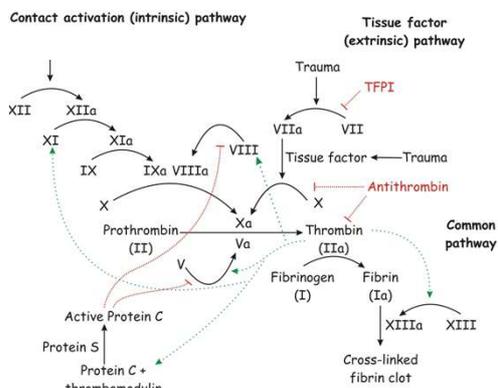
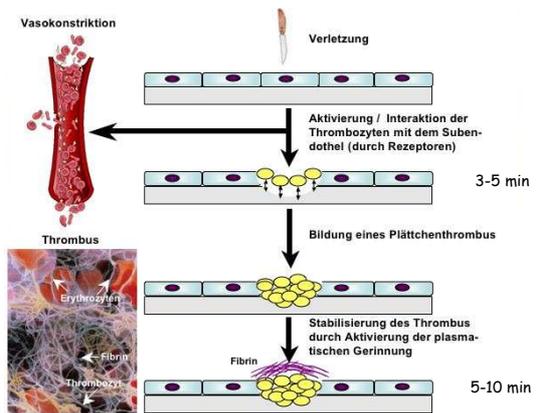
- (I) Bestandteile und Funktionen des Blutes
- (II) Blutgerinnung und Fibrinolyse
- (III) Regulation der Blutgerinnung
- (IV) Wechselwirkung von Gerinnung und Entzündung
- (V) Antikoagulation und Methoden der Blutreinigung

2

Teil 2

- Zelluläre und plasmatische Gerinnung
- Plättchen
- Gerinnungskaskade
- Gerinnungsfaktoren und Gla-Domänen
- Fibrinolyse

3



5

Teil 3

Regulation der Blutgerinnung

- Natürliche Antikoagulantien
 - Tissue Factor Pathway Inhibitor
 - Antithrombin
 - Protein C
- Antikoagulantien in der Medizin
 - Heparin
 - Coumarinderivate
 - direkte Thrombininhibitoren
- Gerinnungstests

6

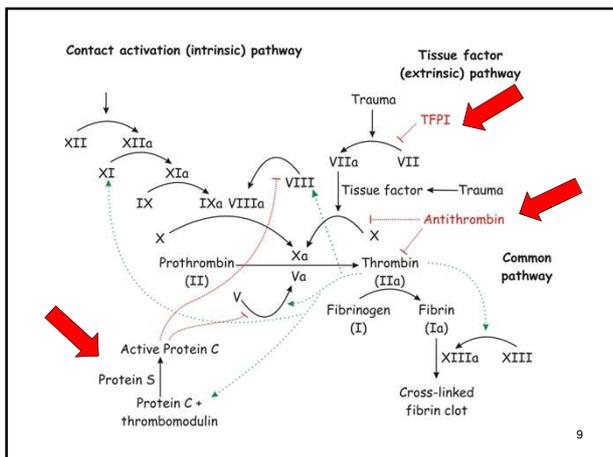
Regulation der Blutgerinnung

7

Natürliche Antikoagulanzen

- Tissue factor pathway inhibitor (TFPI)
- Antithrombin (AT-III)
- aktiviertes Protein C, Protein S

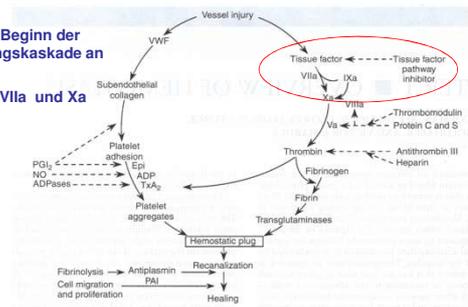
8



9

Tissue factor pathway inhibitor, TFPI

- setzt am Beginn der Gerinnungskaskade an
- inhibiert VIIa und Xa



10

TFPI

- Lokalisation: v.a. auf der Endotheloberfläche (gerinnungshemmende Eigenschaften!)
- zusätzlicher Pool in den α -Granula der Plättchen, wird bei Plättchenaktivierung freigesetzt
- zirkulierender Pool im Plasma gebunden an Lipoproteine (LDL)

11

Antithrombin AT-III

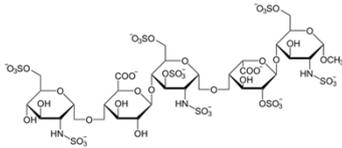
- Serinproteaseinhibitor (Serpine)
- inaktiviert v.a. Thrombin (FIIa) und FXa; schwächer auch IXa, XIa, XIIa
- AT allein inhibiert Thrombin nur schwach
- Wirkung wird durch Glukosaminoglykane verstärkt: Heparansulfat (Endotheloberfläche) Heparin (Klinik)

12

Heparin

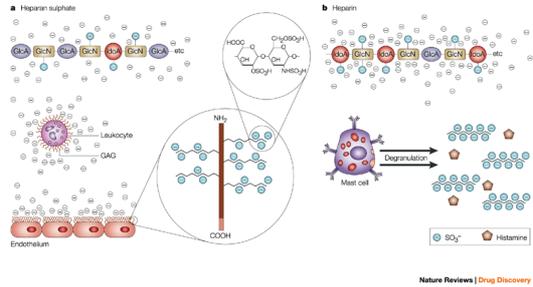
gehört zur Gruppe der Glukosaminoglykane (Mucopolysaccharide)

- saure Polysaccharide
- Aufbau aus Disaccharideinheiten, je eine Zuckersäure und ein Aminozucker
- Bestandteile vieler Makromoleküle (Proteoglykane)
- Teil der extrazellulären Matrix (Wasserspeicherung, Elastizität)



13

Heparin and heparan sulphate



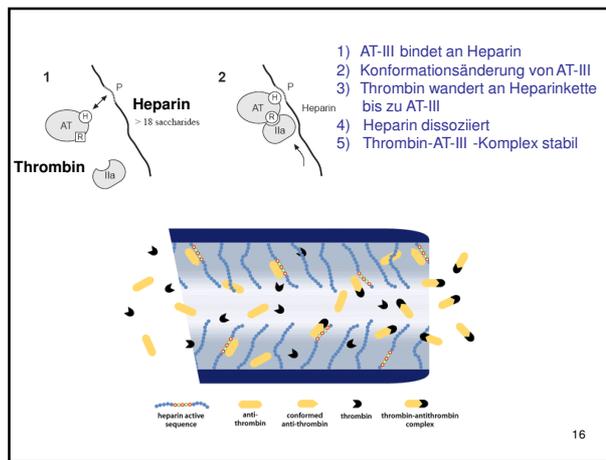
Nature Reviews Drug Discovery 1, 140-148 (2002)

14

Antithrombin

- AT-III bindet spezifisch an Pentasaccharidsequenz in Heparin
- Bindung bewirkt Konformationsänderung von AT-III
- Dadurch erhöht sich Affinität von AT-III für FXa und Thrombin

15



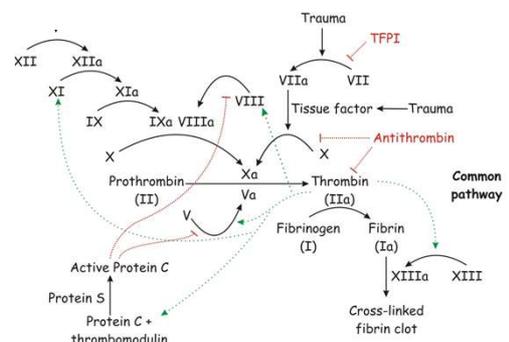
16

Aktiviertes Protein C

- Thrombin (FIIa) bindet an Thrombomodulin (Endotheloberfläche)
- FIIa-Thrombomodulinkomplex:
 - aktiviert Protein C (antikoagulatorisch)
- Aktiviertes Protein C (APC) hemmt Faktoren Va und VIIIa
- APC hat auch entzündungshemmende und anti-apoptische Effekte

17

Inaktivierung von FVa und FVIIIa durch APC



18

Faktor V Leiden

- Mutation in Faktor V (Name: wurde in Leiden entdeckt)
- häufigste Ursache für erbliche venöse Thrombose
- durch eine Mutation an der Spaltungsstelle für Protein C kann Faktor Va nicht inaktiviert werden, Protein C kann daher nicht wirken

19

Antikoagulantien in der Medizin

- direkte: reagieren mit Faktoren der Gerinnungskaskade
z.B. Heparin
- indirekte: hemmen die Synthese der Gerinnungsfaktoren
z.B. Warfarin bzw. den Ablauf der Gerinnungskaskade z. B. Citrat
- Thrombozytenaggregationshemmer
z. B. Acetylsalicylsäure (inhibiert die Cyclooxygenase und die Entstehung von Thromboxan aus Arachidonsäure)

20

Antikoagulantien in der Medizin

Anwendung:

- prophylaktisch:
 - vor, während und nach Operationen
 - bei Bettlägrigkeit
 - bei Blutentnahme
 - bei Blutreinigung (Dialyse etc.)
- therapeutisch:
 - Behandlung von Thrombosen

21

Antikoagulantien in der Medizin

Beispiele:

- Heparine (wirken über AT-III)
- Hirudin (inhibiert Thrombin)
- Argatroban (inhibiert Thrombin)
- Cumarinderivate (hemmen Carboxylierung v. Gerinnungsfaktoren)
- Zitrat (extrakorporale Blutreinigung)

22

Heparine

- heterogene Gruppe von Molekülen
- gewonnen aus Dünndarmmucosa des Schweins oder aus Rinderlungen
- wird nicht aus dem Magen-Darm-Trakt resorbiert
Verabreichung intravenös oder subkutan
- Angriffspunkt: Antithrombin
Erhöhung der Affinität von AT für FXa und FIIa
ca. um den Faktor 1000
- Dosis wird in Internationalen Einheiten (IE) angegeben: bezieht sich auf biologische Aktivität

23

Klassifizierung der Heparine

- **Unfraktioniertes Heparin (UFH)**
 - ca. 15 kDa (3 - 30)
 - ca. 1/3 der Moleküle sind aktiv (enthalten spezifische Pentasaccharidsequenz für Bindung von AT)
- **Low molecular weight heparin (LMWH)**
 - ca. 5 kDa (1 - 10)
 - wirken v.a. auf FXa
 - bessere Pharmakokinetik (höhere HWZ)
 - gewonnen aus UFH durch enzymatische oder chemische Spaltung

24

Heparin-induzierte Thrombozytopenie (HIT)

- Bildung von Antikörpern gegen Komplexe aus Plättchenfaktor 4 (PF4) und Heparin
- tritt in ca. 5% der Patienten auf, die mit UFH behandelt werden (bei LMWH ca. 1%)
 - PF 4: in α -Granula der Plättchen gespeichert, stark positiv geladen
 - wird bei Plättchenaktivierung freigesetzt
 - bindet an Glykosaminoglykane (Heparansulfat) auf der Endotheloberfläche
 - kann daher lokal die Wirkung von Antithrombin hemmen
 - hohe Affinität für Heparin

25

HIT

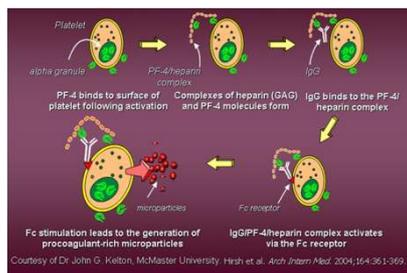
- PF4 und Heparin wirken als Antigen
- Bildung von AK gegen diesen Komplex

Folgen der Antikörperbildung:

- Komplex aus PF4, Heparin, und Antikörper bindet an den Fc-Rezeptor der Plättchen und führt zur Plättchenaktivierung
 - > weitere Ausschüttung von PF4
 - > PF4 bindet und neutralisiert freies Heparin
 - > PF4 bindet auch an Heparansulfat auf Endothelzellen > Aktivierung der Endothelzellen und weitere Thrombinbildung > **Thrombose**

26

Heparin-induzierte Thrombozytopenie



Hirsh et al Arch Intern Med 2004; 164:361-369

27

HIT

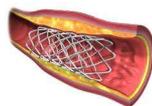
Maßnahmen:

- Bestimmung der Thrombozytenzahl vor jeder Heparin-gabe
Abfall unter 50% des Ausgangswertes oder auf < 150.000/ μ L wird als HIT angesehen
- Keine Behandlung von Patienten mit HIT in der Vorgeschichte mit Heparin
- bei HIT-Verdacht sofortiges Absetzen von Heparin

28

Heparin-Beschichtung von Oberflächen

- unterdrückt Gerinnungsaktivierung auf der Oberfläche
- Heparin an der Oberfläche bindet Antithrombin und hält so die lokalen Thrombinkonzentrationen niedrig
Anwendung z. B. bei Stents



29

Der Heparin-Skandal

Anfang 2008: 100 Todesfälle in den USA durch verunreinigtes Heparin

Februar 2008: kontaminierte Chargen auch in Europa auf dem Markt

80 Dialysepatienten zeigten Blutdruckabfall, Atemnot;
allergischer Schock bei 3 Patienten
Rückruf

- seit BSE ist Schweinemucosa die Hauptquelle für Heparin-gewinnung (statt Rinderlunge)
- mehr als die Hälfte von Rohheparin der Weltproduktion stammt aus China

30



31



32



33

Ursache:

Verunreinigung mit Chondroitinsulfat (5 - 50 %)

- Chemisch ähnlich dem Heparin
- N-Acetylgalaktosamin und Glucuronsäure, sulfatiert
- kommt in Knorpel und Schalen von Meeresfrüchten vor
- deutlich billiger als Heparin

vorsätzliche Beimischung?

34

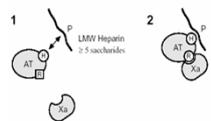
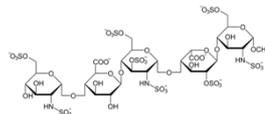
Fondaparinux Arixtra

Selektiver Faktor Xa-Hemmer

Bindet nicht an PF4, daher keine
Induktion von HIT

Pentasaccharid
„aktive Sequenz“ von Heparin

Nachteil:
es gibt kein Gegenmittel



35

Direkte Thrombin-Inhibitoren

- Argatroban (synthetisch)
- Hirudin (rekombinant)
- binden direkt an das aktive Zentrum von Thrombin
- Nicht abhängig von AT-III

36

Rekombinantes Hirudin Lepirudin, Refludan®

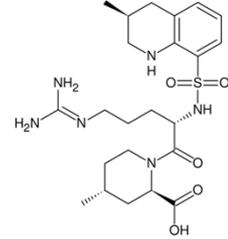
- direkter Thrombininhibitor (rekombinantes Hirudin)
Hirudin: aus Blutegel; *Hirudo medicinalis*
1884 entdeckt John Haycraft
1955 erstmals gereinigt aus Blutegelköpfen
- enger therapeutischer Bereich > Blutungsrisiko



37

Argatroban

- Synthetischer Thrombininhibitor
- Bei HIT-Patienten zugelassen



38

Cumarin-Derivate

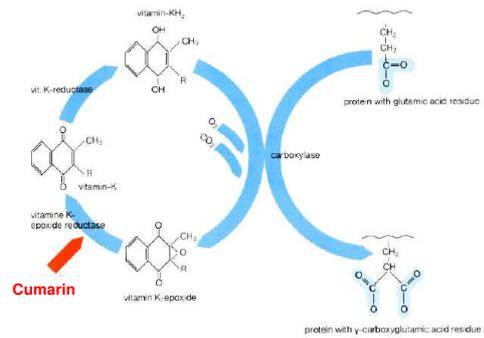
Vitamin K- Antagonisten

Vitamin K: Cofaktor bei der Carboxylierung von Gerinnungsfaktoren)

- 1920er Jahre: Todesfälle bei Rindern (USA, Kanada) verschimmelter Klee als Ursache (Schimmel bildet Cumarine)
- 1952 als Rattengift zugelassen
- 1978 Wirkmechanismus geklärt

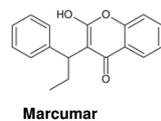
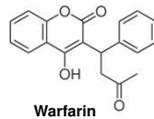
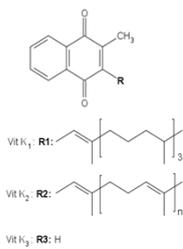
39

Vitamin K- Antagonisten: Cumarin



40

Vitamin K und Antagonisten



41

Zitrat

- Wirkung als Antikoagulans beruht auf Komplexbildung von Ca^{2+}
- bei extrakorporaler Blutreinigung verwendet
- Gegenmittel: Ca^{2+}

42

1914
Luis Agote
erste erfolgreiche Bluttransfusion, Antikoagulation mit Natriumzitrat

43

Zitrat

$$\text{Ca}^{2+} \cdot \text{OOC} - \text{CH}_2 - \text{C}(\text{OH}) - \text{CH}_2 - \text{COO}^- \cdot \text{Ca}^{2+} \cdot \text{COO}^- - \text{CH}_2 - \text{C}(\text{OH}) - \text{CH}_2 - \text{COO}^- \cdot \text{Ca}^{2+}$$

Komplex: $\text{Ca}_3(\text{Citrate})_2$

- metabolisiert zu Bicarbonat (Leber)
- reduziert Komplementaktivierung

44

Blutabnahmesystem (Vacuette)

Glasröhrchen mit Schraubdeckel (Septum), Vakuum, Farbcodierung je nach Verwendung bzw. je nach Antikoagulation

45

VACUETTE® Coagulation Tubes

Coagulation tubes are filled with buffered tri-sodium citrate solution. Citrate concentration of 0.109 mol/l (3.2%) is available. The choice of the concentration depends upon the policies of the laboratories. The mixing ratio is 1 part citrate to 9 parts blood.

VACUETTE® Heparin tubes

The interior of the tube wall is coated with lithium heparin, ammonium heparin or sodium heparin. The anticoagulant heparin activates antithrombins, thus blocking the coagulation cascade and producing a whole blood / plasma sample instead of clotted blood plus serum. Plasma tubes with lithium heparin and gel contain a barrier gel in the tube. The specific gravity of this material lies between that of the blood cells and plasma. During centrifugation the gel barrier moves upwards providing a stable barrier separating the plasma from cells. Plasma may be aspirated directly from the collection tube, eliminating the need for manual transfer to another container. This barrier allows for the stability of certain parameters in the primary tube under the recommended storage conditions for up to 48 hours.

46

Blutprodukte

47

Bluttransfusion

Zuführen von Blut oder Blutbestandteilen als Infusion

- Fremdblutspende
- Eigenblutspende

Vollbluttransfusionen heute nur mehr selten durchgeführt; Blut wird in Komponenten aufgetrennt und komponentenweise transfundiert

Vorteile:

- Patient erhält nur die tatsächlich benötigten Blutbestandteile (Plasma bei Faktorenmangel, Erythrozyten bei Anämie,...)
- Bessere Lagerfähigkeit (Plättchen bei RT, Erythrozyten bei mindestens 4 °C, Plasmaproteine eingefroren)

48

Gewinnung von Blutprodukten aus

- a) Vollblut (Pool vieler Blutspenden)
- b) Apherese (kontinuierlicher Prozess)

49

Blutprodukte:

- Erythrozyten-Konzentrate (bei Anämie)
- Granulozyten-Konzentrate
- Thrombozyten-Konzentrate
- Plasma (FFP, fresh frozen plasma)
- Stammzell-Präparate
- Gerinnungsfaktor-Konzentrate
- Immunglobuline

50

Erythrozytenkonzentrat



Thrombozytenkonzentrat



Indikationen für Bluttransfusionen

- Blutersatz nach Unfall/Operation
- Blutkrankheiten (Anämien; ab Hb von 6g/dL)
normal: 14-18 bzw. 12-16 g/dL
- Mangel od. Funktionsstörungen von
 - Thrombozyten
 - Plasma
 - Gerinnungsfaktoren

53

Risiken

- Übertragung von Bakterien oder Viren (Hepatitis B & C, HIV)

HIV, Hepatitis C -> Antikörpertests
(ELISA od. Western Blot gegen virale Proteine)

„diagnostisches Fenster“: Antikörper sind im Blut erst mehrere Wochen nach der Infektion nachweisbar

-> molekularbiologische Testmethoden (RT-PCR) – direkter Nachweis der viralen RNA

54

Transfusionszwischenfälle

- Verwechslung von Blutkonserven -> hämolytische Transfusionsreaktion, Zerstörung der Erythrozyten bei Transfusion von ABO-inkompatiblen Blut
- Bedside-Test (Kreuzprobe) vor Transfusion daher Vorschrift

55

Leukozytendepletion

- Entfernung von Leukozyten aus Blutpräparaten vor der Transfusion
- Leukozytengehalt < 10⁶/Konserven

Gründe:

- 1) Zellständige Viren (z.B. CMV) werden damit entfernt
 - 2) Graft-versus-host-disease wird vermieden: Leukozyten des Spenders (aus der Blutkonserven) erkennen Körperzellen des Empfängers als fremd und zerstören diese
- Leukozytenabreicherung erfolgt durch Filtration oder Zentrifugation und wird vor der Lagerung durchgeführt (LRC leukocyte reduction chambers)

56

Plasma

Fresh frozen plasma:

laut Definition innerhalb von 8 h eingefroren; Realität: < 24 h (dadurch Reduktion von FV und VIII um ca. 15%)

Verwendung:

- Ersatz für spezifische Gerinnungsfaktoren
- Behandlung von Blutungen bei Lebererkrankungen
- Behandlung von DIC
- Plasmaaustausch bei verschiedenen Autoimmunerkrankungen

57

Plättchenkonzentrate

- Gewinnung durch Apherese (kontinuierliche Aufarbeitung großer Blutvolumina)
- 50 mL Konzentrat -> ca. 5,5 x 10¹⁰ Plättchen
- Lagerung bei 22 °C, max. 5 d
- Anwendung: Therapie von Thrombozytopenie (verschiedene Ursachen: Autoimmunerkrankung -> erhöhte Zerstörung der Plättchen durch Autoantikörper; DIC; induziert durch bestimmte Medikamente)
- Platelet storage lesion – Verlust der Aktivität

58

Erythrozytenkonzentrate

- aus Frischblut durch Entfernung von Plasma gewonnen
- Hämatokrit ca. 75%
- Lagerung: 42 d bei 4 °C

59

Plasmaderivate

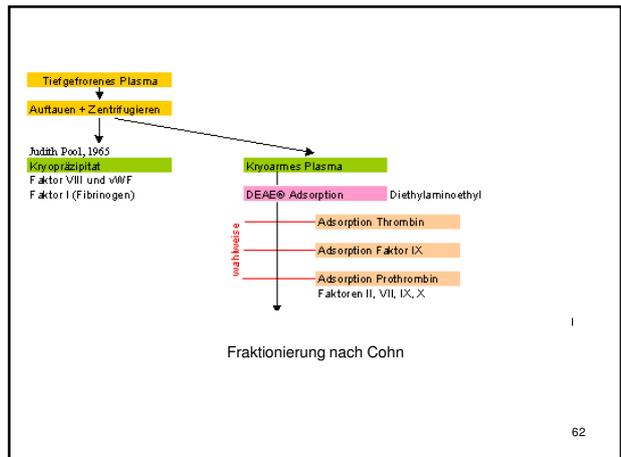
- Plasma als Ausgangsmaterial für die Gewinnung von Gerinnungsfaktoren
- FVII, FVIII, FIX werden heute rekombinant hergestellt
- Gefahr der Krankheitsübertragung -> PCR-Testung
- Reinigung der Einzelfaktoren durch verschiedene Präzipitations- und Chromatographieschritte
- Lyophilisierung der Produkte (Vorteil: keine Kühlung erforderlich)

60

Plasmafraktionierung

- FFP wird aufgetaut
- Kryopräzipitat durch Zentrifugieren entfernt (enthält FVIII, vWF, Fibrinogen)
- Reinigung dieser Proteine durch weitere Fäll- und Chromatographieschritte
- aus dem Überstand werden FII, VII, IX, X mittels DEAE-Adsorption gewonnen
- weitere Proteine durch Fraktionierung nach Cohn

61



62

Edwin J. Cohn, 1940er

Kryoarmeres Plasma nach Adsorption

Zugabe von Ethanol

Ethanol Fällung 8%
Faktor XIII im Präzipitat

Heparin-Adsorption
Antithrombin III

Zugabe von Ethanol

Ethanol Fällung 20-25%
Immunglobulin-Produkte im Präzipitat

Zugabe von Ethanol

Ethanol Fällung 40-42%
Albumin im Präzipitat

63

Fraktionierung nach Cohn

- Dem Plasma (ohne Kryopräzipitat) wird Ethanol in steigender Konzentration zugesetzt, Temperatur wird abgesenkt
- 8% Ethanol -> Faktor XIII ↓
- aus Überstand: Antithrombin durch Adsorption an Heparin gewonnen
- 20-25% Ethanol -> IgG ↓
- 40-42% Ethanol -> Albumin ↓

64

Methoden der Blutreinigung

65

Apherese

- griech. „wegnehmen“
- Verfahren zur Entfernung von Substanzen aus dem Blut oder Plasma des Patienten (Proteine, proteingebundene Substanzen, Zellen)

Therapeutische Apherese (pathogene Komponenten werden entfernt)
Diagnostische Apherese (Gewinnung von Zellen aus dem Blut)

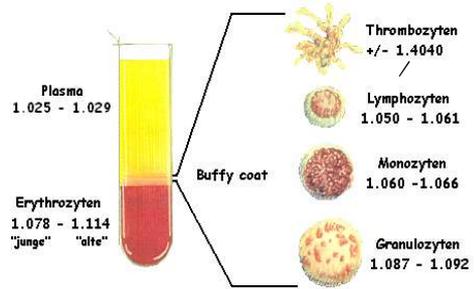
66

Apherese zur Gewinnung von Zellen

- Blut wird aus Armvene entnommen
- in steriles Schlauchsystem geleitet
- Antikoagulation mit Citrat
- Mischung wird in Zellzentrifuge geleitet
- Blutbestandteile werden entsprechend der Dichte aufgetrennt und gesammelt
- nicht benötigte Komponenten zum Spender zurück

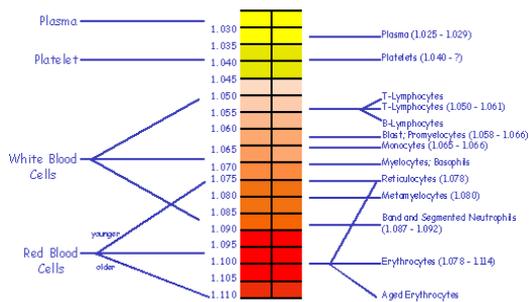
67

Dichte der Blutzellen



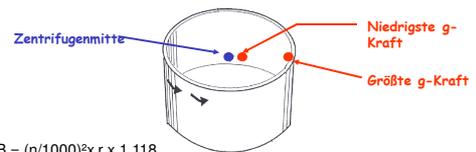
68

Dichte der Blutzellen



69

Zentrifugation



$$RZB = (n/1000)^2 \times r \times 1,118$$

n...rpm

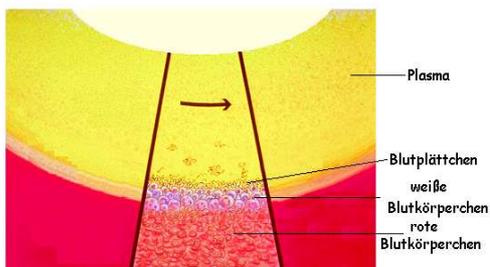
r...Radius in mm

RZB...relative Zentrifugalbeschleunigung

Die g-Kraft in der Zentrifuge variiert mit der Geschwindigkeit und dem Radius. Die g-Kraft ist am größten am äußeren Rand und am niedrigsten am inneren Rand, nahe dem Zentrum. Die g-Kraft verstärkt sich mit zunehmender Zentrifugengeschwindigkeit.

70

Zentrifugation



71

Zellzentrifuge



72

Hämodialyse:

Entfernung niedermolekularer, wasserlöslicher Substanzen aus dem Blut

- Akutdialyse
- Chronische Dialyse

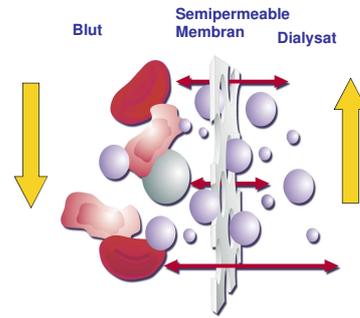
Therapeutische Apherese:

Entfernung größerer, meist proteingebundener Substanzen

- Behandlung von Autoimmunerkrankungen
- Leberunterstützung
- Therapie von Sepsis, MOF
- Vergiftungen
- Hypercholesterolämie

73

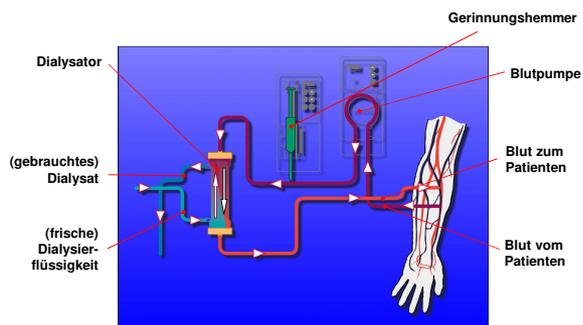
Prinzip der Hämodialyse



Gegenstrom von Blut und Dialysat

74

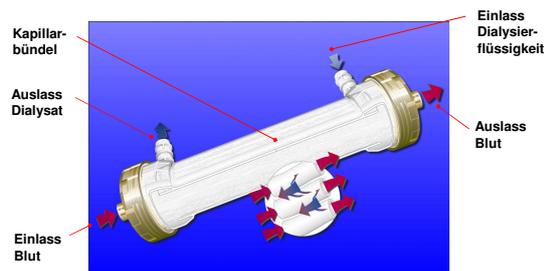
Standard-Hämodialyse (HD)



75

Dialysator

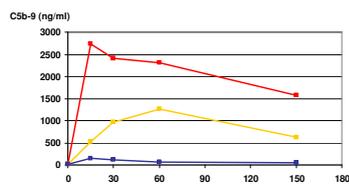
Technischer Aufbau



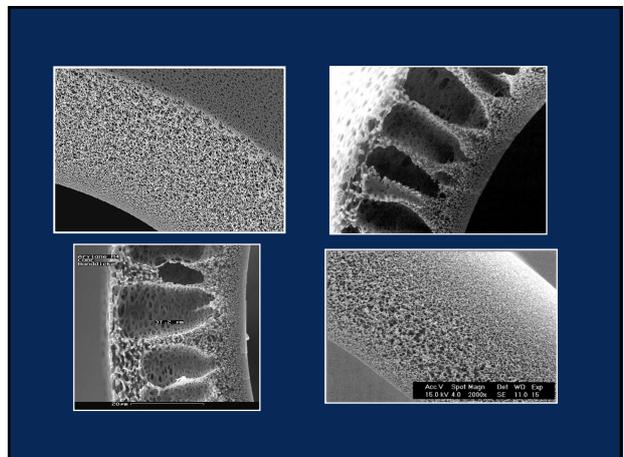
76

Materialien

- früher Cellulose (Aktivierung des Komplementsystems)
- synthetisch modifizierte Cellulosen
- heute meist synthetische Membranen (Polysulfon)

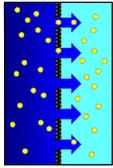


77



Siebkoefizient

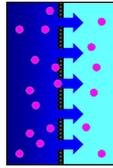
$$S = c_{\text{Filtrat}} / c_{\text{Plasma}}$$



Solute 1

$$c_f = c_p$$

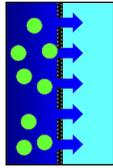
$$S = 1$$



Solute 2

$$c_f = 0.5 \cdot c_p$$

$$S = 0.5$$



Solute 3

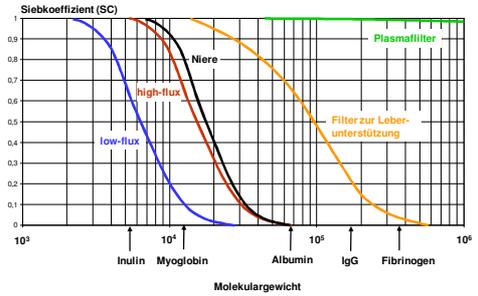
$$c_f = 0$$

$$S = 0$$

79

Dialysator: Siebkoefizient

Semipermeable Membranen



80

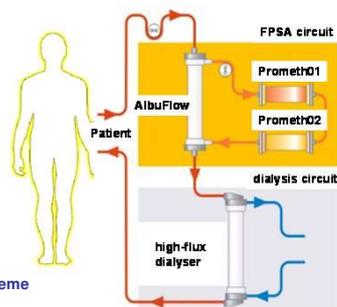
Therapeutische Apherese

81

- Plasmaaustausch
 - unselektiv; entfernt auch wertvolle Komponenten des Plasmas, Substitutionslösungen erforderlich; potentielle Gefahr von allergischen Reaktionen oder Infektionen
- Adsorptionssysteme
 - Hämapherese
 - Vollblut über Adsorber geleitet, pathogene Komponenten gebunden, gereinigtes Blut zurück zum Patienten
 - Plasmapherese
 - Trennung in Zell- und Plasmafraktion, nur Plasma in Kontakt mit Adsorbentmaterial > bioverträglicher

82

Leberunterstützung Prometheus-System



artifizielle und bioartifizielle Systeme

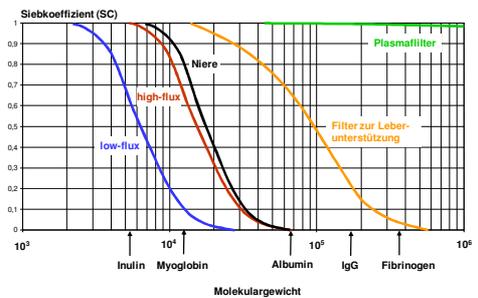
Entfernung von hydrophoben, meist proteingebundenen Substanzen (z.B. Bilirubin, Gallensäuren)

Bioartifizielle Systeme: zusätzlich Bioreaktoren mit Leberzellen
technisch sehr komplex, klinisch nicht etabliert

83

Dialysator: Siebkoefizient

Semipermeable Membranen



84



Leberunterstützung

- keine chronische Therapie
- Behandlung bis zur Regeneration der Leber oder bis ein Spenderorgan zur Verfügung steht (Bridge to transplant)

86

Autoimmunerkrankungen

Antikörper gegen körpereigene Strukturen führen zur Zerstörung von Geweben

Behandlungsansätze:

- Plasmaaustausch
- unspezifische Immunadsorption (Entfernung von IgG)
- spezifische Immunadsorption (Entfernung des pathogenen Autoantikörpers, falls charakterisiert u. bekannt)

87

Protein A *Staphylococcus aureus*

- bindet an Fc Region von IgG
- bindet kein IgG der Subklasse 3

z.B Entfernung von Faktor VIII Antikörpern bei Therapie der Hämophilie

88

DALI direct adsorption of lipoproteins Lipidapherese

bei Patienten mit familiärer Hypercholesterinämie

89

Transport-Lipoproteine

- Im Serum von Säugetieren kommen komplexe Lipide und Proteine vor, die relativ konstante Mengenverhältnisse besitzen und die als Transport-Lipoproteine **wasserunlösliche Lipide** wie **Cholesterin**, **Cholesterinester** und **Triacylglycerine** zwischen den Organen über die Blutbahn transportieren.

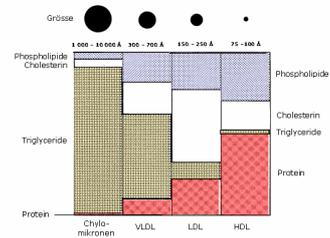
90

Transport-Lipoproteine

- Sie werden nach Dichte und Partikelgröße charakterisiert, man unterscheidet
 - Chylomikronen** (Partikelgröße 75 -1000 nm)
 - VLDL** [*very low density lipoprotein*, 30 - 50 nm] sehr niedriger Dichte
 - LDL** [*low density protein*, 20 - 22 nm]
 - HDL** [*high density lipoprotein*, 7.5 - 10 nm]

91

Zusammensetzung verschiedener Lipoproteinpartikel



92

Transport-Lipoproteine

- Chylomikronen transportieren nach der Nahrungsaufnahme Triacylglyceride und Cholesterin vom Verdauungstrakt in das Gewebe. Der Lipidanteil beträgt zwischen 98 und 99.5 %, der Proteinanteil schwankt zwischen 0.5 und 2 %.
- Die VLDLs enthalten sehr viel Triglyceride und wenig Protein. Auf ihrem Weg durch den Organismus erhöht sich durch fortlaufende Abspaltung von Triglyceriden ihr Anteil an Cholesterin und es entstehen die cholesterinreichen LDLs.

93

Transport-Lipoproteine

- LDL transportiert Cholesterin im Plasma, bindet an der Zielzelle an den **LDL-Rezeptor** und wird von der Zelle aufgenommen. Liegt ein Defekt am LDL-Rezeptor vor, so kommt es zur Anreicherung von LDL und Cholesterin im Blut.

Schädigung der Arterienwände kann zur Einlagerung von LDL in die Zellwand führen und es kann sich ein Thrombus bilden, der zu Herzinfarkt oder Schlaganfall führt.

94

Arterielle Thrombose

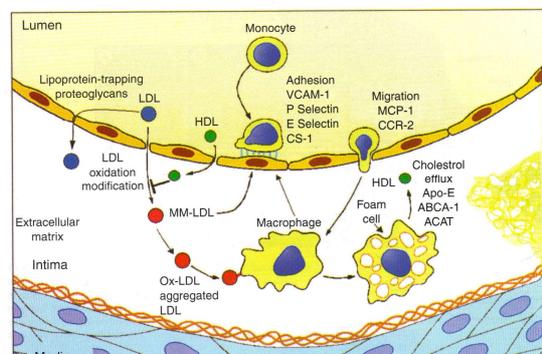
Auslöser:
Ruptur oder Erosion eines arteriosklerotischen Plaques

Plättchen spielen wichtige Rolle

Lipoprotein-induced hypothesis

Joseph Leonard Goldstein (Nobelpreis 1985 für Arbeiten zum Cholesterinstoffwechsel)

95



Makrophagen nehmen oxidiertes LDL auf; Bildung von Schaumzellen; dadurch Entzündungsreaktion; Veränderung der Gefäßwand

96

