

Charakterisierung der Funktion von Proteinbestandteilen in einem aus humanem Plasma isolierten Prothrombinkomplexkonzentrat

DIPLOMARBEIT

Zur Erlangung des akademischen Grades
Magister der Pharmazie (Mag. pharm.)

An der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Universität Wien

Eingereicht von

Montsch Peter

Studienrichtung: Pharmazie – Studienkennzahl A449

Betreut von Univ.-Doz. Dr. Peter Turecek,
ausgeführt bei Baxter BioScience R&D Biopharmaceuticals

Wien , April 2010

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die mir das Gelingen dieser Arbeit ermöglicht haben.

Herrn Univ.-Doz. Dr. Peter Turecek danke ich für seine Bereitschaft zur Übernahme der Diplomarbeit bei Baxter BioScience und für seine fachkundige Betreuung.

Meine weitere Dankbarkeit gilt Fr. Dr. Katalin Varádi, Hrn. Ing. Herbert Gritsch, Fr. Brigitte Keil und Hrn. Dr. Gerald Schrenk, sowie den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Fa. Baxter BioScience die mich während der Zeit meiner Diplomarbeit begleitet haben, für ihre Hilfsbereitschaft und ihr Wissen, dass sie mir zu Verfügung gestellt haben.

Mein besonderer Dank gilt allerdings auch meiner Familie und meiner Freundin, die mich während des Studiums und der Diplomarbeit in vielerlei Hinsicht unterstützt haben.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einführung und Zusammenfassung.....	4
2.	Allgemeiner Teil.....	9
2.1.	Hämostase.....	9
2.1.1.	Vaskuläre Reaktion:.....	9
2.1.2.	Zelluläre Reaktion (primäre Hämostase):	9
2.1.3.	Plasmatische Hämostase (Sekundäre Hämostase):	11
2.1.4.	Gerinnungshemmung und Fibrinolyse	17
2.1.5.	Modernes Konzept der Gerinnung.....	19
2.2.	Hämophilie	20
2.3.	Aktiviertes Prothrombinkomplexkonzentrat	25
2.4.	Rekombinanter Faktor VIIa	26
3.	Material und Methoden.....	27
3.1.	Thrombin Generation Assay (TGA).....	27
3.1.1.	Reagenzien und Apparaturen.....	30
3.1.2.	Testdurchführung.....	32
3.1.3.	Auswertung	35
3.2.	Aktivitätsbestimmung mittels Gerinnungstest (TPZ, aPTZ)	35
3.2.1.	Reagenzien und Apparaturen.....	36
3.2.2.	Thromboplastinzeit	38
3.2.3.	Aktivierte partielle Thromboplastinzeit	40
3.2.4.	Chromogenes Substrat.....	42
3.3.	ELISA	43
3.4.	Immunaффinitätschromatographie (IAC)	44
3.4.1.	Testdurchführung.....	45
3.4.2.	Reagenzien	45
4.	Ergebnisse – Diskussion und Interpretation	46

4.1.	Bestimmung der Probe nach Verminderung der Konzentration von IATI und VN durch Immunaffinitätschromatographie mit TPZ, aPTZ und TGA	46
4.1.1.	Testvorbereitung und Vortests	46
4.1.2.	Ergebnisse	47
4.2.	Bestimmung der kombinierten Einzelkomponenten des APCC mit TGA.....	51
4.2.1.	Basis – Xall	52
4.2.2.	Zugabe der Einzelgruppen.....	55
4.2.3.	Kombination der Einzelgruppen.....	67
5.	Schlussfolgerungen und Perspektiven	76
6.	Anhang	79
6.1.	Abkürzungen	79
6.2.	Abbildungsverzeichnis.....	81
6.3.	Tabellenverzeichnis.....	85
6.4.	Literaturnachweis.....	86
7.	Lebenslauf	93

1. Einführung und Zusammenfassung

Im Zuge dieser Diplomarbeit wurden die hämostatischen Funktionen der einzelnen Bestandteile von einem kommerziell erhältlichen (Baxter BioScience), aktivierten Prothrombinkomplexkonzentrat (APCC) charakterisiert. Dieses Präparat wird zur Behandlung hämophiler Patienten, welche einen Antikörper gegen Faktor VIII oder IX entwickelt haben, eingesetzt.

In früheren Arbeiten konnte das APCC in seiner Zusammensetzung analysiert werden. So wurde festgestellt, dass die prokoagulatorischen Proteine (Gerinnungsfaktoren) nur einen relativ kleinen Anteil an der Gesamtproteinmenge ausmachen. Die größte Fraktion im Präparat, mit fast 85%, nehmen andere Plasmaproteine, unter anderem Inter α -Trypsin-Inhibitor (IATI) und Vitronektin (VN) ein (*s. Tabelle 1*). Die prokoagulatorischen Proteine setzen sich unter anderem aus den Zymogenen und ihren aktiven Formen zusammen. Aktivierter Faktor VII (FVIIa) kommt im Vergleich zu den anderen aktivierten Gerinnungsfaktoren im APCC in relativ hoher Konzentration vor. FVIIa stellt einen wesentlichen Teil des exogenen Aktivierungsweges der Blutgerinnung dar und wird ebenfalls in der Therapie der Hämophilie mit Hemmkörper eingesetzt. Weitere, im APCC enthaltene und die Gerinnung beeinflussende, Komponenten sind die Inhibitoren Protein C und sein Co-Faktor Protein S. Aufgrund der zahlreichen Komponenten des APCCs stellt sich die Frage, wie stark die jeweilige Beteiligung, der einzelnen Proteine, an der pharmakologischen Wirkung des APCCs ist.

Zymogene	Faktor II (FII)	1,0 U/mL (0,8 – 1,2 U/mL / Aktivität)
	Faktor VII (FVII)	0,9 U/mL (0,3 – 1,2 U/mL / Aktivität)
	Faktor IX (FIX)	1,6 U/mL (1,2 – 2,1 U/mL / Aktivität)
	Faktor X (FX)	1,0 U/mL (0,7 – 1,1 U/mL / Aktivität)
Enzyme	Faktor IIa (FIIa)	0,0004 U/mL (0,0002 – 0,0005 U/mL / Aktivität)
	Faktor VIIa (FVIIa)	1,7 U/mL (1,5 – 2,0 U/mL / Aktivität)
	Faktor IXa (FIXa)	0,001 U/mL (Aktivität)
	Faktor Xa (FXa)	0,0004 U/mL (0,0002 – 0,0005 U/mL / Aktivität)
Inhibitoren	Protein C (PC)	1,3 U/mL (1,0 – 1,6 U/mL / Aktivität)
	Protein S (PS)	0,4 U/mL (Antigen)
Co-Faktoren	Faktor V (FV)	0,66 U/mL (Antigen)
	Faktor VIII (FVIII)	0,075 U/mL (0,03 – 0,12 U/mL / Antigen)
	Phospholipide (PL)	0,099 nmol (0,0003 – 0,195 nmol)
	Vitronektin (VN)	0,40 mg/mL (0,29 – 0,47 mg/mL / Antigen)
	Inter- α -Trypsin-Inhibitor (IATI)	0,69 mg/mL (0,42 – 0,84 mg/mL / Antigen)

Tabelle 1: Proteinzusammensetzung des APCCs und deren gemittelte Konzentrationen aus mehreren APCC-Chargen (Min – Max Wert); die Werte sind auf 1 Unit (U) des APCCs bezogen

Um diese Problemstellung zu lösen, wurde ein „künstliches“ APCC, durch Mischung der im APCC enthaltenen Gerinnungsfaktoren, hergestellt. Diese Proteine sollten die Funktion des APCCs am stärksten beeinflussen. In einem zweiten Versuchsansatz wurden bei dem Originalpräparat die mengenmäßig dominierenden Proteine, Vitronektin (VN) und Inter α -Trypsin-Inhibitor (IATI), mittels Immun-Affinitätschromatographie (IAC) abgetrennt. So sollte festgestellt werden, inwieweit diese beiden Proteine aufgrund ihrer mengenmäßigen Dominanz und ihrer physiologischen Funktion Einfluss auf die Wirkung des Produktes nehmen.

Die Testung der Aktivität erfolgte durch Messung der Thromboplastinzeit (Quick-Wert, TPZ) und der aktivierten partiellen Thromboplastinzeit (aPTZ) und mit Hilfe eines Thrombin Generation Assays (TGA). Die ersten beiden Verfahren sind wichtige diagnostische Instrumente um Störungen der Hämostase festzustellen. Sie erfassen Störungen des exogenen Aktivierungsweges (Thromboplastinzeit) und Störungen des endogenen Aktivierungsweges (aktivierte partielle Thromboplastinzeit). Durch bestimmte Modifikationen können sie auch zur Aktivitätsbestimmung von einzelnen Gerinnungsfaktoren herangezogen werden. Diese beiden Testsysteme simulieren nur den frühen Teil der Gerinnungsbildung,

nämlich der Bildung von ausreichend Thrombin, um einen Fibrinclot zu bilden. Sie geben dadurch keinen Überblick über die gesamte Blutgerinnung.

Der TGA ist ein in vitro Testverfahren zur Bestimmung der Kinetik der Thrombin Bildung. Er zeigt, im Gegensatz zu den zuvor genannten Methoden, auch die Thrombin-Entwicklung nach der Gerinnungsbildung an und gibt somit alle Aktivierungs- und Inaktivierungsmechanismen der Thrombin Bildung wieder. Er ist darum ein guter physiologischer Funktionstest zur Beobachtung des hämostatischen und thrombotischen Systems. Um die Kinetik zu messen, wird in einer ex vivo Probe, im plättchenreichen (PRP) oder plättchenarmen Plasma (PPP), bzw. im Vollblut (Tappenden, et al., 2007) / (Ramjee, 1999), die Hämostase ausgelöst und die darauf folgenden zeitabhängigen Veränderungen der Thrombin-Konzentrationen werden kontinuierlich detektiert. In dieser Arbeit wird die Thrombin Bildung durch eine niedrig konzentrierte Tissue Factor (TF) – Phospholipid-Lösung in einem Faktor VIII Mangel-Plasma mit einem hochkonzentrierten Faktor VIII Inhibitor ausgelöst. Über den Verbrauch eines fluorogenen Substrats, welches durch, während der Reaktion gebildetes Thrombin, gespalten wird, wird die Thrombin-Konzentration zum jeweiligen Messzeitpunkt berechnet.

Zusammenfassung der Vorgangsweise und Ergebnisse

Immunaffinitätschromatographie

IATI und VN wurden jeweils mittels Affinitätschromatographie vom Originalpräparat abgetrennt. Gleichzeitig hat das Originalpräparat ohne eine Abtrennung von IATI oder VN die Immunaffinitätschromatographie durchlaufen. Dies diente zur Kontrolle, ob das Verfahren der Affinitätschromatographie an sich einen Einfluss auf die Wirkung des Präparates hat. Da bei der Kontrolle die Aktivität abgenommen hat bzw. die Konzentration sämtlicher im Originalpräparat enthaltenen Proteine, konnte rückgeschlossen werden, dass die Chromatographie-Bedingungen das APCC inaktiviert haben. Somit konnte auf diesem Weg nicht beurteilt werden, inwieweit IATI und VN Einfluss auf die Wirkung des APCC nehmen.

Künstliches APCC

Im künstlichen APCC wurden die einzelnen Faktoren systematisch in verschiedenen Kombinationen und Konzentrationen zusammengefügt, wobei ein Komplex aus Prothrombin (FII) und aktiviertem Faktor X (FXa) – XaII – , welcher laut vorangegangenen Untersuchungen die Hauptwirkung trägt (Turecek, et al., 1999), als Basis gewählt wurde. Um die Anzahl der Kombinationen einzuschränken wurden die Faktoren nach ihrer Funktion im hämostatischen

System in verschiedene Gruppen unterteilt (s. *Tabelle 2*). Die eingesetzten Konzentrationen der Faktoren wurden so gewählt, dass sie den Konzentrationen im zu untersuchenden APCC und deren Schwankungen entsprachen.

Basis (Xall)	Protein	FII	FXa	
	U/mL	1	0,0003	0,0006
Zymogene (Zym)	Protein	FVII	FIX	FX
	U/mL	1	1,5	1
Aktivierte Faktoren (akt)	Protein	FIIa	FVIIa	FIXa
	U/mL	0,0005 (0,14 NIH)	1,5	0,001
Inhibitoren (Inh)	Protein	Protein C (PC)	Protein S (PS)	
	U/mL	1	0,2	
Co-Faktoren (Co)	Protein	FV	FVIII	
	U/mL	0,5	0,1	
Phospholipide (PL)	Protein	Phosphatidyl-Cholin / Phosphatidyl-Serin in einem Verhältnis von 80 zu 20 Teilen (PpC/PpS – 80:20)		
	µM	0,2		

Tabelle 2: Gruppeneinteilung der prokoagulatorischen Proteine und deren im künstlichen APCC eingesetzte Konzentrationen; die verwendeten FXa Konzentrationen werden bei den entsprechenden Experimenten beschrieben;

In diesem Ansatz sollte auch der Einfluss von IATI und VN beurteilt werden. Da für die Herstellung des künstlichen APCCs die Ausgangs-Konzentration der Einzelkomponenten relativ hoch sein muss (das künstliche APCC besteht aus insgesamt dreizehn Komponenten und bei jedem Mischungsschritt findet eine Verdünnung statt), und weder IATI noch VN in entsprechend hohen Konzentration erhältlich bzw. verfügbar waren, konnte nicht getestet werden, inwieweit sie Einfluss auf die Wirkung des APCCs nehmen.

Bei der Auswertung der Daten des künstlichen APCCs zeigte sich, wie durch frühere Studien belegt, dass der Gerinnungsfaktor II zusammen mit Faktor Xa die Hauptwirkung trägt. Selbst kleinere Konzentrationsveränderungen von FXa lösten, in Gegenwart von FII, bereits eine relativ starke Veränderung in der Thrombin-Bildung (TG) aus. Verglichen mit dem APCC wird dessen Wirkung, solange das molekulare Verhältnis von FXa zu FII dem des APCC entspricht, in Bezug auf die Thrombin-Bildung aber nicht erreicht. Erst durch die gezielte Zugabe sämtlicher

im kommerziellen APCC enthaltenen gerinnungsaktiven Proteine konnte ein dem APCC ähnlicher Effekt ausgelöst werden. Die weiteren Zymogene verstärken die Wirkung. Die restlichen aktivierten Faktoren, inklusive FVIIa, haben dagegen kaum einen Effekt. Die Inhibitoren des APCCs gleichen den Überschuss an Gerinnungsfaktoren wieder aus. Somit kann gesagt werden, dass ausschließlich das Zusammenspiel aller prokoagulatorischen Bestandteile des „künstlichen“ APCCs eine dem zu untersuchenden Präparat entsprechende Wirkung hervorrufen kann.

2. Allgemeiner Teil

2.1. Hämostase

Die Hämostase (Blutstillung) bezeichnet sämtliche physiologische Prozesse, die ohne Verlust der rheologischen Eigenschaften des Blutes zum Stillstand einer Blutung führen. Ein verletztes venöses oder arterielles Gefäß kann somit rasch verschlossen werden, ohne dass der Verschluss der Verletzung den Blutfluss unterbricht. Sie dient dem Organismus folglich als Schutz gegen größere Blutverluste.

Die Blutgerinnung kommt durch ein komplexes Zusammenspiel von vaskulären, zellulären und plasmatischen Reaktionen zustande (Witt, et al., 2006). Anschließend an die Blutstillung kommt es zur Fibrinolyse, in welcher das gebildete Gerinnsel langsam wieder aufgelöst wird. Beide Vorgänge stehen in einem dynamischen Gleichgewicht, durch welches ein kontrollierter Ablauf des Gerinnungssystems ermöglicht wird. Befindet sich dieses Gleichgewicht eher auf der Seite der Fibrinolyse, dann kann es zu Blutungsneigungen kommen. Steht das Gleichgewicht auf der Seite der Gerinnung, dann ist die Thrombosegefahr erhöht.

2.1.1. Vaskuläre Reaktion:

Hier kommt es durch die Verletzung zu einer Reizung der glatten Muskelzellen, welche über den Sympathikus zu einer reflektorischen Kontraktion der Blutgefäße führt. Die reflektorische Kontraktion erfolgt durch die Ausschüttung von Serotonin und Katecholaminen. Zusätzlich wird aus den Thrombozyten Thromboxan A₂ freigesetzt. Dies führt durch die Verengung der Gefäße zu einer Verlangsamung des Blutflusses, was eine wesentliche Voraussetzung für die Blutgerinnung darstellt.

2.1.2. Zelluläre Reaktion (primäre Hämostase):

Bei der Schädigung des Gefäßes werden subendotheliale Kollagenfasern freigelegt, an welche sich die Thrombozyten anheften (Adhäsion). Die Adhäsion erfolgt mit Hilfe des von-Willebrand-Faktors, der das Bindeglied zwischen der Kollagenfaser

und dem auf der Oberfläche des Thrombozyten liegenden Glykoprotein Ib – Rezeptors darstellt (Estler, 2000). Durch den Kontakt mit der extrazellulären Matrix werden die Thrombozyten aktiviert. Im Zuge dessen kommt es zur Formänderung und Aggregation der Thrombozyten, aber auch zu einer Sekretion von, für die Gerinnung essentiellen, Substanzen.

Die aus der Granula der Thrombozyten freigesetzten Substanzen, fördern unter anderem die Aggregation der Thrombozyten und in weiterer Folge das endogene Gerinnungssystem. Die wichtigsten Substanzen sind ADP, Thromboxan A₂, Plättchen-aktivierender Faktor (PAF), Serotonin und Thrombospondin. Serotonin und Thromboxan A₂ wirken vasokonstriktorisch, ADP, PAF, Thrombospondin und Thromboxan A₂ wirken aggregationsfördernd. Thrombospondin führt zu einer irreversiblen Aggregation, da dieses Glykoprotein die Fibrinogenbrücken der Thrombozyten stabilisiert. Zusätzlich werden an der Thrombozyten-Oberfläche negativ geladene Phospholipide, Plättchenfaktor (PF) 3 und 4, verfügbar, an welche die plasmatischen Gerinnungsfaktoren binden können (sekundäre Hämostase). PF3 ist ein gerinnungsaktives Phospholipid und wird während der plasmatischen Gerinnung als Komplexbildner benötigt (Aktivierung von Faktor X und von Prothrombin). PF4 bindet Heparin und neutralisiert so dessen Wirkung.

Durch die Aktivierung der Thrombozyten wird auf ihrer Oberfläche der Glykoprotein IIb/IIIa – Rezeptor freigelegt, welcher wieder über den von-Willebrand-Faktor die Aggregatbildung fördert. Gleichzeitig verändern die Thrombozyten ihre Gestalt, sie werden kugelförmig und bilden Pseudopodien aus, wodurch die Aggregation stattfinden kann. Der Glykoprotein IIb/IIIa – Rezeptor besitzt eine hohe Affinität für Fibrinogen, Fibronectin und Calcium (Estler, 2000). Durch deren Bindung kommt es zu einer Festigung des Thrombus. Während Fibrinogen die Bindung der Thrombozyten untereinander fördert, ist Fibronectin für die Bindung der Thrombozyten an subendotheliale Matrix nötig.

Mit diesem Vorgang ist die primäre Hämostase abgeschlossen (Blutungszeit), der Thrombus ist noch nicht sehr stabil und könnte vom Blutstrom wegspült werden. Erst durch die Umwandlung von Fibrinogen zu Fibrin und die Einlagerung von Erythrozyten wird der Thrombus gefestigt (sekundäre Hämostase).

2.1.3. Plasmatische Hämostase (Sekundäre Hämostase):

Die sekundäre Hämostase kann in drei Phasen unterteilt werden:

1. Aktivierungsphase
2. Koagulationsphase
3. Retraktionsphase

Weiters kann bei der plasmatischen Gerinnung zwischen zwei Systemen unterschieden werden: der intrinsischen und der extrinsischen Gerinnungskaskade. Beide Systeme haben eine kaskadenartige Aktivierung der Gerinnungsfaktoren zur Folge, bei welcher der nächste Faktor immer durch den zuvor aktivierten Faktor aktiviert wird. Die intrinsische Gerinnung wird durch den Kontakt mit negativen Ladungen an der Oberfläche vom geschädigten Endothel aktiviert, während die extrinsische Gerinnung von Gewebsthromboplastin (Gewebsfaktor III, „Tissue Factor“ – TF), welches durch die Verletzung aus dem Gewebe freigesetzt wird, in Gang gesetzt wird. Die letztere entspricht eher dem physiologischen Ablauf der Blutgerinnung.

Zwischen diesen zwei Systemen bestehen eine Reihe von Wechselwirkungen und Abhängigkeiten, wodurch eine Trennung in vivo nicht erfolgen kann. Die plasmatische Gerinnung wird daher nur noch aus didaktischen Gründen in eine intrinsische und eine extrinsische Gerinnungskaskade gegliedert.

Für beide Systeme der Gerinnungsaktivierung müssen negativ geladene Phospholipide (an der Oberfläche der Thrombozyten) vorliegen und beide Wege münden schließlich in der Aktivierung von Faktor X durch welchen Prothrombin (FII) zu Thrombin (FIIa) aktiviert wird, welches wiederum die Umwandlung von Fibrinogen zu Fibrin fördert. Fibrin durchdringt den losen Thrombozytenpfropf und verfestigt ihn durch die Bildung eines dreidimensionalen Netzwerks.

Die Membranen unserer Körperzellen sind asymmetrisch, außen befinden sich eher positive Ladungen und innen negativ geladene Phospholipide. Durch die Verletzung der Gefäße kommt die negativ geladene Seite an die Oberfläche und fördert so die Aktivierung der Gerinnungsfaktoren. Im Kaskadenartigen Ablauf der Blutgerinnung kommt es zu einigen zentralen Reaktionen, wie die Komplexbildung aus Gerinnungsfaktoren Calcium-Ionen und Phospholipiden. Die negativ geladene Oberfläche der Phospholipide dient im Komplex als reaktive Oberfläche an der die

Gerinnungsfaktoren über Calcium gebunden sind. Die Phospholipide, vor allem Phosphatidyl-Serin und Phosphatidyl-Cholin, werden darum auch als gerinnungsaktive Phospholipide bezeichnet. Aber auch Calcium ist somit ein wichtiger Mediator der Bindung und Aktivierung der Gerinnungsfaktoren.

2.1.3.1. Gerinnungsfaktoren

Die Gerinnungsfaktoren des Blutplasmas sind mit Ausnahme der Calcium-Ionen Glykoproteine, die fast ausschließlich in der Leber synthetisiert werden. Der von-Willebrand-Faktor (VWF) wird als einziger Faktor nicht in der Leber gebildet, sondern in den Endothelzellen der Gefäße, aber auch in Megakaryozyten. Für die Synthese der Faktoren II, VII, IX und X ist das Vorhandensein von Vitamin K erforderlich, ebenso für den Inhibitor Protein C und seinen Co-Faktor Protein S. Vitamin K wirkt bei der Synthese dieser Faktoren als Co-Enzym und zwar bei der γ -Carboxylierung von Glutaminsäure-hältigen Seitenketten der Faktoren. Die so entstandenen γ -Carboxyglutamyl-Verbindungen sind jetzt in der Lage Calcium-Komplexe mit den Phospholipiden zu bilden (Mutschler, et al., 2005).

Die Faktoren wirken entweder als Enzyme (Serinproteasen) oder als Co-Faktoren und sie liegen im Plasma in inaktiver Form vor (= Zymogen). Nur so können sie dem Körper nicht schaden, indem sie unkontrollierte Situationen auslösen. Ein zweiter Schutz ist ihre Halbwertszeit. Thrombin zum Beispiel könnte, nur durch eine kleine Wunde aktiviert, das Blut des gesamten Körpers zum Gerinnen bringen, wenn es eine zu lange Halbwertszeit hätte.

Die Aktivierung der Serinproteasen erfolgt jeweils durch den in der Gerinnungskaskade zuvor aktivierten Faktor (wird durch ein kleines nachgestelltes „a“ angezeigt). Dabei wird der inaktive Faktor proteolytisch gespalten, sodass das aktive Zentrum des Enzymproteins freigelegt wird. Dieses ist für die katalytische Aktivität verantwortlich. Nur die Serinproteasen, die Faktoren II, IX, X, XI und XII sind aktive Enzyme, die Faktoren V und VIII besitzen keine enzymatische Aktivität. Faktor V und VIII zählen neben Fibrinogen zu den Substratfaktoren, bzw. Co-Faktoren. Durch Thrombin kommt es bei FV und FVIII zu einer Peptidabspaltung, welche eine Konformationsänderung bei ihnen auslöst. Erst dadurch können sie als Co-Faktoren wirken.

Faktor		Wirkung	Halbwertszeit	Syntheseort
I	Fibrinogen	Substrat	96-120h	Leber
II	Prothrombin	Zymogen	41-72h	Leber, Vitamin-K-abhängig
IIa	Thrombin	Enzym		
III	Tissue Factor (TF) (Gewebs-Faktor) Thromboplastin = Thrombokinas	Zymogen	sehr kurz	Subendothel (glatte Muskulatur), Monozyten, Leukozyten, Thrombozyten, zirkulierende Mikropartikel, Fibroblasten
(IV)	Ca ⁺⁺ (früher: F IV)	Katalysator		
V	Proakzelerin	Akzelerator	12-15h	Leber
Va	Akzelerin	Akzelerator		
VII	Proconvertin	Zymogen	2-5h	Leber, Vitamin-K-abhängig
VIIa	Convertin	Enzym	<2h	
VIII	antihämophiles Globulin A	Akzelerator	8-12h	Leber, Megakaryozyten
VWF	Von-Willebrand-Faktor	- Vermittlung der Plättchenadhäsion (Bindung an Glykoprotein Ib) - Vermittlung der Plättchenaggregation (Bindung an Glykoprotein IIb/IIIa) - Bindung von F VIII (Schutz vor Proteolyse)	10-12h	Endothelzellen, Megakaryozyten
IX	Christmas-Faktor = antihämophiles Globulin B	Zymogen	18-30h (F IXa: <12h)	Leber, Vitamin-K-abhängig
X	Stuart-Prower-Faktor	Zymogen	20-42h (F Xa: 4h)	Leber, Vitamin-K-abhängig
XI	PTA (Plasmathromboplastin antecedent)	Zymogen	10-20h	Leber
XII	Hagemann-Faktor	Zymogen	<12h	Leber
XIII	Fibrinstabilisierender Faktor	Zymogen	100-120h	Leber, Thrombozyten
(XIV)	Fitzgerald-Faktor	Zymogen: Kininogen		
(XV)	Fletcher-Faktor	Zymogen: Präkallikrein		

Tabelle 3: Aufstellung der Gerinnungsfaktoren ((Barthels, et al., 2002) / (Golenhofen, 2006) / (Pötzsch, et al., 2010) / (Hagemann, 2009))

2.1.3.2. Aktivierungsphase

Intrinsisches System

Gibt man Blut in ein Gefäß mit negativ geladener Oberfläche, wie beispielsweise Glas, dann gerinnt es. Folglich müssen alle zur Blutgerinnung nötigen Faktoren innerhalb des Blutes vorliegen, weshalb man von der intrinsischen Gerinnung spricht.

Den ersten Schritt im intrinsischen System machen Präkallikrein, hochmolekulares Kininogen (high molecular weight kininogen – HMWK) und Faktor XII, sie binden direkt an negativ geladene Oberflächen, wie unter anderem an das bei einer Verletzung freigelegte Kollagen. Deswegen wird das intrinsische System auch Kontaktaktivierung genannt.

Die erste Reaktion ist die Aktivierung von Faktor XII durch die Bindung an die negative Oberfläche, dieser wiederum katalysiert die Umwandlung von Präkallikrein in aktives Kallikrein (Witt, et al., 2006). So entstandenes Kallikrein aktiviert durch Proteolyse seinerseits Faktor XII mit der Unterstützung von HMWK. Aus letzterem wird dabei Bradykinin freigesetzt. Der durch Kallikrein aktivierte Faktor XII führt in Folge zu einer verstärkten Aktivierung von Präkallikrein zu Kallikrein. Diese Verstärkerschleife (amplifier loop) ist eine wesentliche Voraussetzung für die rasche und ausreichende Aktivierung des plasmatischen Gerinnungsverlaufes.

Gleichzeitig aktiviert Faktor XIIa Faktor XI, welcher wiederum unter Anwesenheit von Calcium Faktor IX aktiviert. FIXa bildet zusammen mit seinem Co-Faktor VIII, welcher durch kleine Mengen von initial synthetisiertem Thrombin aktiviert wurde, Calcium-Ionen und Phospholipiden, welche durch die Aktivierung der Thrombozyten an ihrer Oberfläche freigelegt wurden, einen Komplex, den Tenase-Komplex. Die Bildung dieses Komplexes ist unabdingbar für die proteolytische Spaltung von Faktor X, also dessen Aktivierung, durch Faktor IXa.

Faktor VIIIa stellt in diesem Komplex den geschwindigkeitsbestimmenden Co-Faktor für das Enzym FIXa dar. Initial synthetisiertes Thrombin aktiviert ebenfalls Faktor XI, was zu einer zusätzlichen Verstärkung der Aktivierung von Faktor IX führt.

Extrinsisches System

Bei der extrinsischen Gerinnung geht man von einer Gefäßverletzung mit freiliegendem subendotheliales Gewebe aus. Seine Aktivierung erfährt das extrinsische System durch Freisetzung von Gewebsthromboplastin (TF), einem integralem Membranprotein, aus den zerstörten Zellen. TF bildet zusammen mit Faktor VIIa einen Komplex welcher in Anwesenheit von Calcium an den Phospholipiden der aktivierten Thrombozyten (PF3) Faktor X aktiviert. Es wird durch den Komplex, TF/FVIIa, nicht nur Faktor X sondern auch Faktor IX aktiviert, welcher im Komplex mit FVIIIa zu einer verstärkten FX-Aktivierung führt (Joss-Schleife) (Neumann, 2008). Dies stellt eine Verknüpfung des extrinsischen mit dem intrinsischen System dar. Zusätzlich wird durch den Komplex aus TF und FVIIa auch Faktor VII autokatalytisch aktiviert (Brackmann, et al., 2003). FXa selbst aktiviert auch weiteren FVII, womit er seine eigene Aktivierung über den TF-FVIIa-Komplex fördert (Pötzsch, et al., 2010).

FXa alleine spaltet nur geringe Mengen an Prothrombin zu Thrombin, da seine volle enzymatische Fähigkeit erst durch die Komplexbildung mit FVa zustande kommt. Die kleine Menge an gebildetem Thrombin ist ausreichend, um eine Reihe von Verstärkungsreaktionen auszulösen. Thrombin aktiviert Faktor V, welcher genau wie Faktor VIII als Co-Faktor wirkt. FVa bildet zusammen mit FXa einen Enzym-Komplex, die Prothrombinase, welche die Aktivität von FXa vertausendfacht. Infolgedessen kommt es zu einem drastischen Anstieg der Thrombin-Bildung. Die Prothrombinase kann nur in Verbindung mit Phospholipiden, durch die aktivierten Thrombozyten präsentiert, und Calcium-Ionen, zur proteolytischen Spaltung von Prothrombin beitragen. Thrombin aktiviert aber auch die Thrombozyten. Diese werden somit nicht mehr nur durch die Bindung an das freigelegte Kollagen aktiviert, sondern auch durch Thrombin. Die durch die Aktivierung der Plättchen ausgelöste Konformationsänderung ihrer Oberflächenstruktur ermöglicht die Bindung der Tenase und der Prothrombinase, welche erst durch diese Bindung ihre volle Wirkung entfalten können. Zusätzlich wird umso mehr Prothrombin umgesetzt, je größer die Fläche der zu Verfügung gestellten Phospholipide ist. Thrombin führt aber auch zur Aktivierung der Faktoren VIII und XI, die über die Aktivierung von FIX und der Bildung des Tenase-Komplexes verstärkt FXa erzeugen. Die Thrombin-Bildung wird durch diese positive Rückkopplung wesentlich beschleunigt. Die Wichtigkeit

der Faktoren VIII und IX wird durch ihr Fehlen bei der Hämophilie A (FVIII) und B (FIX) ersichtlich.

Mit der Bildung des enzymatisch aktiven Thrombins ist die Aktivierungsphase abgeschlossen.

2.1.3.3. Koagulations- und Retraktionsphase

In der Koagulationsphase werden durch Thrombin Peptide von Fibrinogen abgespalten. Die so entstandenen Fibrinmonomere lagern sich zu einem Fibrinpolymer zusammen und werden durch den fibrinstabilisierenden Faktor XIII kovalent vernetzt. Die Fibrinmonomere des Fibrinpolymers sind nur über Wasserstoffbrücken verbunden und somit noch löslich. Erst die kovalente Bindung zwischen den γ -Carboxylgruppen des Glutaminrestes eines Fibrinmonomers und den Aminogruppen der Lysinreste eines weiteren Monomers, die durch die enzymatische Wirkung des aktiven Faktors XIII zustande kommt, führt zum stabilen unlöslichen Fibringerinnsel (Estler, 2000).

In der Retraktionsphase kommt es durch den Einfluss des Thrombins mit Beteiligung des Fibronectins zur Bindung des Fibrins an den Glykoprotein IIb/IIIa-Rezeptors der Thrombozyten (Estler, 2000). Außerdem kontrahiert das Aktin-Myosin-Skelett der Thrombozyten, was zu einem Zusammenziehen der Wundränder führt. Dies verfestigt den Thrombus zusätzlich und ein mechanischer Verschluss der Wunde ist die Folge.

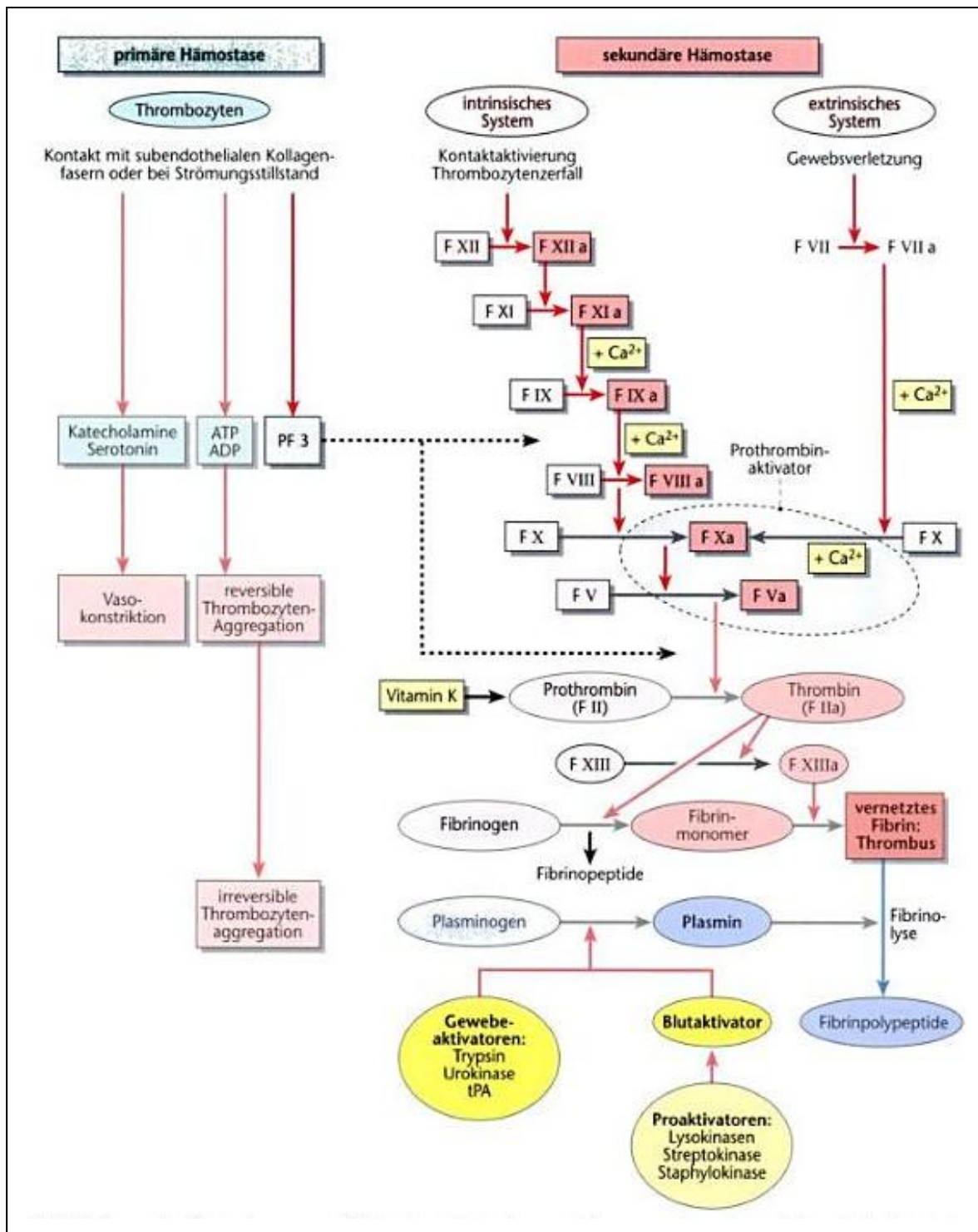


Abbildung 1: Gerinnungskaskade (Hick, et al., 2006)

2.1.4. Gerinnungshemmung und Fibrinolyse

Damit die Gerinnung auf den Ort der Verletzung bzw. in ihrem Umfang beschränkt bleibt, existieren eine Reihe von Mechanismen, die eine unkontrollierte Gerinnung und damit die Gefahr einer Thrombose oder einer Embolie verhindern. Um dies zu

erreichen kommt es einerseits zur Auflösung des Fibringerinnsels (Fibrinolyse) oder andererseits wird die Gerinnung von vornherein gehemmt. Die Auslösung von Inaktivierungsschritten erfolgt zwar zeitgleich mit denen der Aktivierung, läuft aber über zusätzliche Zwischenschritte bzw. ist von der Konzentration von einzelnen Faktoren abhängig. Dadurch entsteht ein Zeitfenster bis zum Beginn der Hemmung und damit ist eine ausreichende Blutgerinnung sichergestellt. Außerdem schaffen die Thrombozyten erst durch ihre Bindung am verletzten Gewebe und durch ihre darauffolgende Formänderung die Voraussetzungen für die Gerinnung, da die Gerinnungsfaktoren, aber auch der Tenase- oder Prothrombinase-Komplex, erst dadurch binden und somit ihre Wirkung entfalten können. Damit bleibt die Gerinnung lokal auf die Verletzung begrenzt.

Die primäre Hämostase, also der Beginn der Gerinnung, wird im gesunden Endothel durch eine Vielzahl von Faktoren gehemmt. Das intakte Endothel weist einige Hemmstoffe auf, welche die primäre Hämostase begrenzen können. Zu diesen Substanzen zählen unter anderem Thrombomodulin, Prostacyclin (PGI₂) und t-PA (tissue plasminogen activator). Prostacyclin hemmt die Thrombozytenaggregation und erweitert die Blutgefäße.

Durch die Bindung von Thrombomodulin an Thrombin, verliert Thrombin seine Substratspezifität, worauf es nicht mehr in der Lage ist Fibrinogen, FV, FVIII, FXI und die Thrombozyten zu aktivieren (Brackmann, et al., 2003). So verändertes Thrombin kann aber nun Protein C, eine Serinprotease, aktivieren (APC), welches zusammen mit seinem Co-Faktor Protein S in der Gegenwart von Calcium-Ionen, die prokoagulatorischen Faktoren V und VIII proteolytisch spaltet. Somit wird die weitere Bildung von Thrombin verhindert. Protein C und S werden beide Vitamin K abhängig in der Leber synthetisiert.

Eine weitere negative Rückkopplung ist die Bindung von FXa an TFPI, einem Plasma-Protein. Ist genügend freier FXa im Plasma vorhanden, dann bildet dieser mit TFPI einen Komplex. Durch diesen Komplex kommt es zur Inaktivierung der enzymatischen Aktivität von TF-VIIa (Brackmann, et al., 2003), womit eine weitere FIX und FX Aktivierung durch diesen Komplex gehemmt wird. Außerdem steht in diesem Komplex gebundener FXa nicht mehr der Spaltung von Prothrombin zu Verfügung.

Der wichtigste Schutz des Körpers vor einer Thrombose ist aber Antithrombin III. Es bildet bevorzugt Komplexe mit Thrombin und aktiviertem Faktor X aber auch mit anderen aktivierten Faktoren und hemmt so deren enzymatische Aktivität (Silbernagl, et al., 2003).

Die Fibrinolyse startet im gleichen Moment wie die Aktivierung der Gerinnung, um zu gewährleisten, dass es zu keinem übermäßigen Anwachsen des Gerinnsels kommt. Dafür ist die Serinprotease Plasmin verantwortlich. Sie wird durch verschiedene Aktivatoren aus der Vorstufe Plasminogen gebildet. Neben den physiologischen Aktivatoren vom Urokinase-Typ, oder den Aktivatoren vom Gewebe Typ, der t-PA, ist der nicht-physiologische Aktivator Streptokinase der bedeutsamste (Witt, et al., 2006). Plasmin spaltet Fibrin oder Fibrinogen proteolytisch auf. Diese Spaltprodukte hemmen die proteolytische Aktivität von Thrombin und verhindern auch die Polymerisation der Fibrinmonomere. Die Fibrinolyse selbst wird durch α_2 -Antiplasmin, α_2 -Makroglobulin und den Plasminogen-Aktivator-Inhibitor (PAI-1) reguliert beziehungsweise gehemmt.

Eine Regulierung des fibrinolytischen Systems ist durch den Thrombin-aktivierten Fibrinolyse Inhibitor (TAFI) gegeben. Dieser sorgt dafür, dass das Gerinnsel nicht zu früh aufgelöst wird. TAFI ist ein Zymogen (= Procarboxypeptidase) und wird durch Thrombin in der Gegenwart von Thrombomodulin aktiviert. TAFIa reduziert die Bindungsstellen von t-PA, Plasminogen und Plasmin auf der Fibrinoberfläche und steigert so die Widerstandsfähigkeit des Gerinnsels gegen die proteolytische Spaltung durch Plasmin (Dempfle, 2007).

2.1.5. Modernes Konzept der Gerinnung

Moderne Konzepte der Blutgerinnung gehen davon aus, dass es nach einer Gewebsverletzung zu einer Freisetzung von TF kommt und dieser zusammen mit den Blutplättchen wesentlich für die Lokalisierung der Gerinnung und deren Kontrolle verantwortlich ist (Roberts, et al., 2006).

Nach der erfolgten Freisetzung von TF aus TF-bearing-cells (z.B. Monozyten, Fibroblasten, Endothelzellen (glatte Muskelzellen)) bildet dieser mit FVIIa einen Komplex, welcher zur Aktivierung der Faktoren X und IX führt. FXa aktiviert an der

Oberfläche von TF-bearing-cells im Komplex mit FVa geringe Mengen Prothrombin zu Thrombin (Hoffman, et al., 1995). Diese geringe Menge an Thrombin ist noch nicht ausreichend um ein erstes Gerinnsel zu erzeugen, aber sie ist in der Lage die Blutplättchen bzw. die Faktoren V, VIII und XI zu aktivieren. Dieser Teil der Gerinnung wird als initiale Phase (Thrombin-Bildung) bezeichnet. Die so aktivierten Co-Faktoren (FV bzw. FVIII) führen im Komplex mit den zuvor aktivierten Faktoren IX bzw. VIII an der Oberfläche der aktivierten Plättchen zu einer verstärkten Aktivierung von Prothrombin. FXIa steigert durch die Aktivierung von FIX zusätzlich die Thrombin-Bildung. Durch diese Verstärker-Schleifen kommt es zu einem explosionsartigen Anstieg der Thrombin-Bildung. Dies stellt die zweite Phase der Thrombin-Bildung dar. Thrombin ist nun hinreichend vorhanden um ein Gerinnsel zu bilden und TAFI zu aktivieren. Letzterer schützt das Gerinnsel vor einer vorzeitigen Proteolyse durch Plasmin, da das fibrinolytische System gleichzeitig mit der Gewebsverletzung aktiviert wird. Die Stabilisierung des Gerinnsels wird durch FXIIIa (ebenfalls durch Thrombin aktiviert) und die Retraktion der Thrombozyten erreicht.

Nachdem ein Maximum in der Thrombin Bildung erreicht wurde, kommt es über die verschiedenen Thrombin-Abbau Mechanismen (*s. Kap. 2.1.4*) zu einem allmählichen Abfall der Thrombin-Konzentration.

2.2. Hämophilie

Die Hämophilie (Bluterkrankheit) ist eine angeborene Koagulopathie die sich in einer erhöhten Blutungsneigung äußert, die bei schweren Formen mitunter lebensbedrohlich werden kann. Es gibt zwei Varianten der Krankheit, nämlich die Hämophilie A und B. Die Hämophilie A ist die häufigste Form und tritt mit einer Wahrscheinlichkeit von 1 : 10.000 auf. Die im Gegensatz zur Hämophilie A (Mangel an Faktor VIII) durch einen Faktor IX Mangel bedingte Hämophilie B tritt dagegen wesentlich seltener auf. Beide Varianten der Hämophilie werden X-chromosomal rezessiv vererbt, können aber auch spontan auftreten. Ihnen liegt ein Defekt im Faktor VIII bzw. IX Gen zugrunde, auf Grund dessen, je nach Schwere der Krankheit, die Aktivität oder das Vorkommen der beiden Faktoren unterschiedlich stark eingeschränkt sein können.

Der Defekt im FVIII-Gen kann durch eine Vielzahl an Mutationen ausgelöst werden (Punktmutation, Deletion, Insertion, (v.a. Intron-22-) Inversion). Eine Mutationsanalyse kann infolgedessen einen prädiktiven Wert bezüglich des Schweregrades oder des Hemmkörperrisikos (s.u.) geben. Der Schweregrad ist mutationsabhängig und bleibt deswegen innerhalb der Familie bzw. im Leben, eines an Hämophilie erkrankten Patienten, gleich. Bei etwa 30 Prozent der Patienten tritt die Erkrankung ohne eine entsprechende familiäre Vorgeschichte auf, was auf spontane Mutationen zurückgeführt werden kann.

Beide Gene, sowohl das FVIII- bzw. FIX-Gen, liegen auf dem langen Arm des X-Chromosoms. Die Krankheit trifft somit in erster Linie Männer (Genotyp XY), da bei Frauen (Genotyp XX) das zweite X-Chromosom meist unverändert ist. Eine echte Bluterin ist folglich selten, kann aber, wenn z.B. beide Elternteile an Hämophilie A erkrankt sind, oder wenn das zweite X-Chromosom schadhaft ist (z.B. Turner Syndrom), dennoch vorkommen. Auch durch extreme Lyonisierung (Lyon, 2002) kann es zu erniedrigten FVIII-Konzentrationen kommen. Diese Fälle sind aber eher selten. Meistens ist eine hämophile Frau lediglich Trägerin (Konduktorin) des defekten Gens. Das heißt sie gibt, mit einer 50 prozentigen Wahrscheinlichkeit, das fehlerhafte Gen an ihre Kinder weiter. Die Söhne eines hämophilen Vaters sind dagegen gesund, die Töchter sind aber potentielle Trägerinnen des defekten Gens.

FVIII ist ein essentieller Faktor der Blutgerinnung und zirkuliert in geringen Mengen im Blut. Er ist von seiner Struktur her sehr labil und wird durch Komplexbildung mit VWF vor Proteolyse geschützt. Der enge Kontakt zu VWF behütet FVIII nicht nur vor seinem Abbau, VWF bringt ihn auch zum Ort der Gerinnung. Während der Gerinnungskaskade beschleunigt FVIII, als Co-Faktor von aktiviertem Faktor IX (FIXa) die Aktivierung von FX und damit in weiterer Folge die Bildung von Thrombin. Für eine normale Hämostase ist eine besonders rasche und in ausreichenden Konzentrationen ablaufende TG von essentieller Bedeutung. Dadurch wird auch ersichtlich, dass die primäre (zelluläre) Blutstillung bei an Hämophilie Erkrankten normal abläuft und nur die sekundäre (plasmatische) Gerinnung gestört ist. Die gemeinsame Aktivierung von FX durch FIXa und FVIIIa führt dazu, dass klinisch kein Unterschied zwischen Hämophilie A und B vorherrscht, da beide Faktoren am gleichen Schritt der Kaskade beteiligt sind.

Der Schweregrad der Hämophilie A wird anhand der Konzentration (bzw. Restaktivität) von Faktor VIII bestimmt. Ein Milliliter (Normal-) Plasma enthält eine Einheit (E) des Faktors – somit sind $100\% = 1\text{E} / \text{mL}$. Eine FVIII-Konzentration von weniger als ein Prozent

wird als schwere Hämophilie bezeichnet. Sie äußert sich durch häufige spontane Blutungen (durch Mikrotraumen verursacht) vor allem in die Gelenke, aber auch in die Muskulatur. Die gefährlichen, aber relativ seltenen intrakraniellen Blutungen können unbehandelt tödlich sein. Die Gelenkblutungen können zu Synovitis führen, die in weiterer Folge eine hämophile Arthropathie (Knorpelschädigung bis zu seiner Auflösung) auslösen kann. Am häufigsten sind die Knie- Ellenbogen- und Sprunggelenke betroffen.

Bei einer mittelschweren (moderaten) Hämophilie wird eine Konzentration von ein bis fünf Prozent Faktor VIII im Plasma gemessen. Hier sind die spontanen Blutungen seltener. Es überwiegen zum Teil schwere Blutungen nach Verletzungen bzw. Operationen. Bei der leichten Hämophilie (FVIII-Konzentration über 5 bis ungefähr 40%) sind spontane Blutungen sehr selten, die Erkrankung fällt im Alltag grundsätzlich kaum auf. Nur bei starken Verletzungen und Operationen kann es ebenfalls zu schweren Blutungen kommen.

Die Globaltests der Gerinnung können den Hinweis auf eine Blutungsneigung geben. Quick-Test, Blutungszeit und Fibrinogenbestimmung sind bei Hämophilie A und B normal, während die aPTZ verlängert ist. Die Spezifikation erfolgt dann mit Analyse der einzelnen Faktoren. Es besteht auch die Möglichkeit einer pränatalen Diagnostik. Sie wird, wegen ihres hohen Abortrisikos, meist nur bei Verdacht auf eine schwere Hämophilie durchgeführt.

Die Basisbehandlung der Hämophilie ist die intravenöse Gabe des fehlenden Faktors. Dieser kann gentechnisch hergestellt (rekombinante Faktoren) oder aus humanem Plasma gewonnen werden. Unabhängig von der Herstellung bzw. Gewinnung wird versucht eine möglichst hohe Sicherheit zu gewährleisten, da, vor allem bei aus Plasma gewonnenen Proteinen, die Gefahr der Übertragung von hochinfektiösen Viren sehr hoch ist. Der entsprechende Faktor wird bis zur Abheilung der Wunde bzw., bei schweren Formen, auch prophylaktisch gegeben (z.B. Verhinderung einer Gelenkschädigung v.a. im Säuglings- und Kleinkinder-Alter). Als ergänzende Therapie werden Antifibrinolytika (z.B. Tranexamsäure) und Desmopressin-Analoga gegeben. Die Einnahme von irreversiblen, aber auch reversiblen Thrombozytenaggregationshemmern (Acetylsalicyl-Säure und Derivate bzw. NSAIDs) ist kontraindiziert.

Hemmkörperbildung

Eine mögliche Komplikation ist die Bildung von Hemmkörpern (Inhibitoren), als Folge einer Antwort des Immunsystems auf die Substitutionsbehandlung. Der Hemmkörper

(Alloantikörper) ist gegen den substituierten Faktor gerichtet und erscheint bereits sehr früh im Leben, bzw. nach wenigen Tagen der Exposition (Lusher, 2000). Das Risiko der Entstehung solcher Antikörper erscheint während der ersten 20 – 50 Behandlungen am höchsten und sinkt mit der Dauer der Behandlung (Kempton, et al., 2006). Hämophilie A Patienten besitzen ein wesentlich höheres Risiko einen Hemmkörper zu entwickeln als Hämophilie B Patienten. Das Krankheitsbild ist aber das Gleiche. Die Symptome entsprechen grundsätzlich denen ohne Hemmkörper, die Blutungen sind aber erheblich schwerer zu stoppen. Die Ursache der Hemmkörperbildung ist weitgehend unklar, wird aber als genetisch bedingt angenommen. Es werden aber auch die Tage der Exposition und die Art des Präparats als mögliche Ursache angesehen (Goudemand, et al., 2006). Darum werden regelmäßige Kontrollen auf eine Hemmkörper-Bildung durchgeführt. Zur Entdeckung des Inhibitors kommt es meist, indem die übliche Dosis des Faktors nicht mehr hilft die Symptome zu beseitigen.

Bei ungefähr 30 Prozent der Patienten, die an einer schweren Form der Hämophilie A erkrankt sind, kommt es zu solch einer Antikörper-Bildung. Je größer der Defekt am FVIII-Gen ist, umso höher erscheint das Antikörper-Risiko (Oldenburg, et al., 2005). Bei zwei Drittel dieser Patienten ist der Antikörper mittel bis niedrig titrig, das heißt, diese Patienten besitzen einen Hemmkörper-Titer kleiner fünf Bethesda-Einheiten (BE). Diese werden als „low responder“ bezeichnet und zeigen nur sehr selten eine anamnestic Immunantwort. Das letzte Drittel bildet hochtitrige Hemmkörper aus („high responder“ – über 5 BE). Hier führt eine weitere Exposition mit dem Gerinnungsfaktor zu einem starken Anstieg des Titors.

Hemmkörper bei leichten bis moderaten Formen der Hämophilie A bilden sich nur bei ca. 12 Prozent der Patienten, vor allem bei hochdosierter Gabe des Faktors über einen längeren Zeitraum (Sharathkumar, et al., 2003) / (White, et al., 2000). Die Symptome entsprechen eher denen der erworbenen Inhibitoren (s.u.) und verschwinden oftmals nach längerer FVIII-Karenz.

Erworbene Inhibitoren

Als erworbene Inhibitoren werden solche Hemmkörper bezeichnet, die ein Nicht-Hämophiler gegen einen Blutgerinnungsfaktor entwickelt. Am häufigsten sind diese Inhibitoren gegen FVIII gerichtet. Bei ihnen handelt es sich um Autoantikörper (polyklonale Immunglobuline G (IgG)), die gegen vereinzelte Epitope des FVIII Moleküls gerichtet sind. Auslösende Faktoren können verschiedene Grundkrankheiten aber auch

ein idiopathisches Auftreten sein. Mit erworbenen Inhibitoren in Verbindung gebrachte Krankheiten bzw. Situationen können folgende sein: z.B. andere Autoimmunkrankheiten (rheumatoide Arthritis, Lupus erythematoses), postpartales Auftreten, maligne Tumore, medikamentös bedingt. Mit der Behandlung des Grunderleidens, aber auch spontan, können diese Inhibitoren verschwinden.

Diese Art der Hemmkörper tritt vorwiegend im hohen Alter auf und ist durch schwere Blutungen in die Muskulatur und die Haut und weniger in die Gelenke gekennzeichnet.

Die Basisdiagnostik der beiden Arten von Hemmkörpern entspricht der Diagnostik der Hämophilie ohne Antikörper. Die aPTZ ist verlängert, während Quick-Test, die Fibrinogenbestimmung und die Thrombozytenkonzentration im Referenzbereich liegen. Zur Testung der Inhibitoren wird der Bethesda-Test (Kasper, et al., 1975), hauptsächlich in der Nijmegen-Modifikation (Verbruggen, et al., 1995), herangezogen. Diese verbessert die Spezifität im unteren Titerbereich. Das Ergebnis dieses Tests wird in Bethesda-Einheiten (BE) angegeben, wobei eine BE der Menge an Inhibitor entspricht, die die FVIII-Aktivität eines Normal Plasma Pools, nach zweistündiger Inkubation bei 37°C, um 50% reduziert (Kasper, et al., 1975). Die Antikörper, die während einer schweren Hämophilie auftreten, zeigen im Bethesda-Test einen linearen Reaktionsverlauf (Typ I Kinetik) – vollständige Hemmung der FVIII-Aktivität. Antikörper der leichten bis moderaten Hämophilie und erworbene Antikörper besitzen meist einen nicht linearen Reaktionsverlauf (Typ II Kinetik) – unvollständige Hemmung der FVIII-Aktivität.

Zur Therapie von niedrig titrigen Antikörpern kann die weitere Substitution des entsprechenden Faktors, in hochdosierter Form, Erfolg bringen. Bei hoch titrigen Antikörpern wird die Blutstillung mit Hilfe von Bypass-Präparaten erreicht. Diese können die Blutgerinnung ohne die Anwesenheit von FVIII oder FIX auslösen. Zu Verfügung stehende Präparate sind, dass im Rahmen dieser Diplomarbeit behandelte, aktivierte Prothrombin Komplex Konzentrat (APCC) und rekombinanter Faktor VIIa (rFVIIa). Bei rekombinantem FVIIa handelt es sich um ein einzelnes Plasmaprotein, während sich das APCC aus mehreren prokoagulatorischen Proteinen zusammensetzt.

Eine weitere Behandlungsmöglichkeit stellt die Hemmkörper-Elimination (oder Reduktion) mittels der Immuntoleranztherapie (ITT) oder die Apherese mit Immunadsorption des Hemmkörpers mit Hilfe eines, an eine Säule gebundenen, tierischen Antikörpers gegen humanes IgG dar (Jansen, et al., 2001). Bei der ITT wird nach FVIII-Abstinenz, sobald der

Hemmkörper-Titer ein Plateau erreicht hat, FVIII in hochdosierter Form zusammen mit APCC oder rFVIIa gegeben. So wird versucht eine Immuntoleranz gegen FVIII aufzubauen.

Nach überprüfter Kreuzreaktivität – wenn diese gering ist oder gar fehlt – kann bei high respondern auch porciner FVIII gegeben werden. Dieser führt nur in weniger als fünf Prozent der Fälle zu einer anamnestischen Antwort. Bei Hämophilen mit Autoantikörpern ist oft eine immunsuppressive Therapie (mit z.B. Prednison oder Cyclophosphamid) erfolgreich.

2.3. Aktiviertes Prothrombinkomplexkonzentrat

Bei dem in dieser Arbeit untersuchten pharmazeutischen Produkt handelt es sich um ein aus humanem Plasma isoliertes und intermediär gereinigtes Proteinkonzentrat. Es wird für die Behandlung von Hämophilie Patienten, welche Antikörper gegen Faktor VIII oder IX gebildet haben, eingesetzt, da es in der Lage ist, die Gerinnung unter Umgehung dieser beiden Faktoren auszulösen.

Da sich dieses Präparat aus mehreren Proteinen zusammensetzt, wird es auf eine Summenaktivität standardisiert: eine Einheit des APCCs verkürzt die aPTZ eines FVIII-Mangelplasmas mit gegen FVIII gerichtetem Inhibitor um 50 Prozent (Turecek, et al., 2004). Als primärer Wirkmechanismus wurde die verstärkte Aktivierung von Thrombin über einen Komplex aus den Faktoren Xa und II ergründet (Turecek, et al., 1999). Dieser Komplex löst auf der Oberfläche von TF-bearing-cells und aktivierten Plättchen, aber nur in Gegenwart von FV (Mann, et al., 1981), die Bildung von geringen Mengen an Thrombin aus, welches über verschiedene Verstärker-Schleifen, teils mit den weiteren prokoagulativen Proteinen des Präparats, aber auch mit denen des Patienten, eine zufriedenstellende Gerinnung auslöst.

Der genaue Effekt der einzelnen Komponenten bzw. der genaue Wirkmechanismus dieses Präparates ist nicht aufgeklärt und ist Gegenstand dieser Arbeit.

2.4. Rekombinanter Faktor VIIa

Rekombinanter Faktor VIIa (rFVIIa) wird aus Baby-Hamster-Kidney-Zellen gewonnen. Er wird, wie eingangs erwähnt, zur Therapie der Hämophilie mit Hemmkörper-Entwicklung eingesetzt. rFVIIa wird als Monopräparat verwendet und entfaltet seine pharmakologische Wirkung erst bei einem supraphysiologischen Plasmaspiegel. Die üblichen pharmakologischen Dosen betragen daher 10 – 50 nmol/L, während die physiologische Konzentration von FVIIa 0,075 nmol/L beträgt. Die Wirkung von FVIIa ist in physiologischen Konzentrationen stark Tissue Factor (TF) abhängig (Butenas, et al., 2002). FVIIa ist erst nach Komplexbildung mit TF, zusammen mit diesem, in der Lage Faktor X zu aktivieren. Dies stellt den initialen Schritt der Blutgerinnung dar.

Durch die Anhebung der FVIIa Konzentration auf ein Vielfaches seiner physiologischen Konzentration wird ein TF unabhängiger Weg ausgelöst (Monroe, et al., 1998). rFVIIa kann so direkt an die Phospholipid-Struktur der aktivierten Plättchen binden und aktiviert dort, anstelle des Tenase-Komplexes, Faktor X (Monroe, et al., 1997) / (Hoffman, et al., 1994). Aktivierter Faktor X kann nun seinerseits im Komplex mit Faktor Va Prothrombin zu Thrombin aktivieren. Somit wird ein von der Aktivität der Faktoren VIII und IX unabhängiger Aktivierungsweg geschaffen. Durch diesen hohen FVIIa-Spiegel wird aber auch die Komplexbildung mit TF verstärkt, wodurch auch der normale physiologische Weg beschritten wird.

3. Material und Methoden

3.1. Thrombin Generation Assay (TGA)

FVIII-Bypass-Präparate führen, unabhängig von der Konzentration der Faktoren VIII und IX, über verschiedene Wege zur Einleitung der Thrombin-Bildung. Aus diesem Grund stellt der TGA, durch Messung der Thrombin-Kinetik, eine ideale Methode zur Bestimmung der Funktion von FVIII-Bypass-Präparaten dar. In diesem Assay wird die Thrombin-Bildung in einer ex vivo Probe ausgelöst. Das Prinzip dieser Methode beruht auf der kontinuierlichen Änderung der Fluoreszenz, die bei der Spaltung eines fluorogenen Substrats durch Thrombin entsteht. Diese wird mit Hilfe eines Microplate Fluorescence Readers gemessen.

Die Grundprinzipien des hier verwendeten Tests basieren auf dem von Hemker entwickelten TGA (Hemker, et al., 2000). Diese Grundlagen wurden aber mit einem chromogenen Substrat entwickelt (Hemker, et al., 1993). Für die Messung der optischen Dichte mit Hilfe des chromogenen Substrats ist eine klare Lösung eine Voraussetzung. Wenn das Blut gerinnt, wird es trüb und undurchsichtig, somit muss zuerst Fibrin entfernt, bzw. seine Polymerisation unterdrückt werden. Dies ist wiederum nicht möglich ohne die Plättchen zu entfernen. Der Vorteil des fluorogenen Substrats ist, dass es nicht von der Trübheit der Probelösung abhängig ist. Dies ermöglicht bei dem Einsatz eines fluorogenen Substrates auch die Verwendung von PRP bzw. Vollblut anstelle eines PPP.

PPP kann zur Messung der Hypokoagulation (Hämophilie – Beobachtung der FVIII-Inhibitor-Bypassing-Therapie (Turecek, et al., 2003), Therapie mit oralen Antikoagulantien, usw.) und der Hyperkoagulation (Protein C/S Mangel, Faktor-V-Leiden, orale Kontrazeptiva) herangezogen werden. PPP wird aber vor allem zur Bestimmung der Funktion der Gerinnungsfaktoren, unabhängig von den zellulären Bestandteilen, eingesetzt. Aus letztem Grund wurde zur Untersuchung des APCCs PPP verwendet, da in dieser Arbeit, die Einflüsse der im APCC enthaltenen Gerinnungsfaktoren und ihre Wechselwirkungen untereinander untersucht werden sollten. Bei diesem Plasma handelt es sich um ein humanes Normalplasma, bei dem der Faktor VIII mit Hilfe einer Antigen-Antikörper-Reaktion abgereichert wurde. Zusätzlich wird dieses FVIII-Mangel-Plasma mit einem hochtitrigen humanen FVIII-Inhibitor im Ziegenplasma versetzt (FVIII-Inhibitor-Plasma). So erhält man ein Plasma, das dem Patientenplasma entspricht, bei welchem das kommerzielle APCC als Arzneimittel eingesetzt wird.

Die Verwendung von PPP setzt die Zugabe von gerinnungsaktiven Phospholipiden (PL) voraus. Dies hat zur Folge, dass die prokoagulative Aktivität der Phospholipide ab dem Zeitpunkt der Phospholipidzugabe vorhanden ist. Im PRP bzw. im Vollblut würde diese Aktivität schrittweise im Verlauf des Aktivierungsprozesses der Blutgerinnung erscheinen, indem die Plättchen durch ihre Aktivierung die PL zu Verfügung stellen.

Die Hämostase wird durch die Beifügung eines speziellen niedrig konzentrierten Tissue Factor-Phospholipid-Präparats (TFPL) (Váradi, et al., 1999) zum FVIII-Inhibitor-Plasma aktiviert. Die Phospholipid-Lösung setzt sich aus 80% (w/w) 1-Palmitoyl-2-Oleoyl Phosphatidyl-Cholin und 20% (w/w) 1-Palmitoyl-2-Oleoyl Phosphatidyl-Serin zusammen. Gleichzeitig wird die Lösung eines 1mM-Thrombin-Substrats mit 15mM CaCl₂ zugeführt (die gesamte Reaktion läuft bei 37°C ab). In Folge fängt durch die Thrombin vermittelte Abspaltung des Fluorophors vom Substrat das Fluoreszenz-Signal zu steigen an. Die Menge an Substrat, die während des Experiments durch Thrombin umgesetzt wurde, entspricht daher der gesamten enzymatischen Arbeit von Thrombin. Die Stärke der Fluoreszenz wird mit einem Microplate Fluorescence Reader FL600 (BioTek Instruments) mit einer Extinktionswellenlänge von 360nm und einer Emissionswellenlänge von 460nm gemessen und mit einem Kinetik-Programm als RFU (relative fluorescence unit) sichtbar gemacht (*s. Abbildung 2*).

Die Art und Weise der Thrombin-Aktivierung ist wesentlich vom Auslösefaktor abhängig. Das TFPL wurde deshalb als Aktivator der TG gewählt, da mit diesem der physiologische Weg der Gerinnungsaktivierung dargestellt werden kann (*s. Kap. 2.1.5*). Ein Überschuss an TF löst den extrinsischen Weg aus. Hierbei sind vor allem die Faktoren VII, V, X und TFPI involviert. Je niedriger die TF-Konzentration wird, umso stärker werden die Faktoren VIII, IX und XI mit einbezogen (Cawthorn, et al., 1998) / (Osterud, et al., 1977). In der Abwesenheit von TF wird, bei ausreichender Konzentration an PL, der intrinsische Weg eingeschlagen, welcher nach ungefähr zehn Minuten die Thrombin-Bildung bewirkt (Hemker, et al., 2003) / (Chantarangkul, et al., 2003). Die Auslösung durch niedrige TF-Konzentrationen ist die physiologischere Situation (Fareed, et al., 1995). Bei den PL sind einerseits ihre Zusammensetzung und andererseits ihre Konzentration bestimmend (Hemker, et al., 2003) / (De Smedt, et al., 2008). Die Zusammensetzung und Konzentration von TF und PL wurde so gewählt, dass die in vivo Situation weitgehend nachgeahmt wird, in der sich im FVIII-Inhibitor-Plasma keine und im Normalplasma eine Thrombin-Bildung ergibt (Turecek, et al., 2003).

Die Zugabe von Calcium ist essentiell, da Calcium einen wichtigen Bindungsfaktor während der Blutgerinnung darstellt (s. Kap. 2.1.3).

Bei dem Substrat handelt es sich um hochspezifisches Peptid-Substrat, dessen Eigenschaften eine kontinuierliche Messung erlauben. Das Oligopeptid bestimmt die Spezifität (Hemker, et al., 1990). An diesem ist ein Fluorophor (Amino-Methyl-Coumarin) gebunden, welches durch Thrombin abgespalten wird. Für die kontinuierliche Messung ist es wichtig, dass die Affinität des Substrats zum Enzym, Thrombin, gering ist (Turecek, et al.) / (Hemker, et al., 1993). Die geringe Affinität hat eine langsame Reaktion mit dem gebildeten Thrombin zur Folge (Turecek, et al.), somit bleibt die Menge an dem durch Thrombin umgesetzten Substrat proportional zur Reaktionsgeschwindigkeit (Hemker, et al., 1993) / (Wielders, et al., 1997).

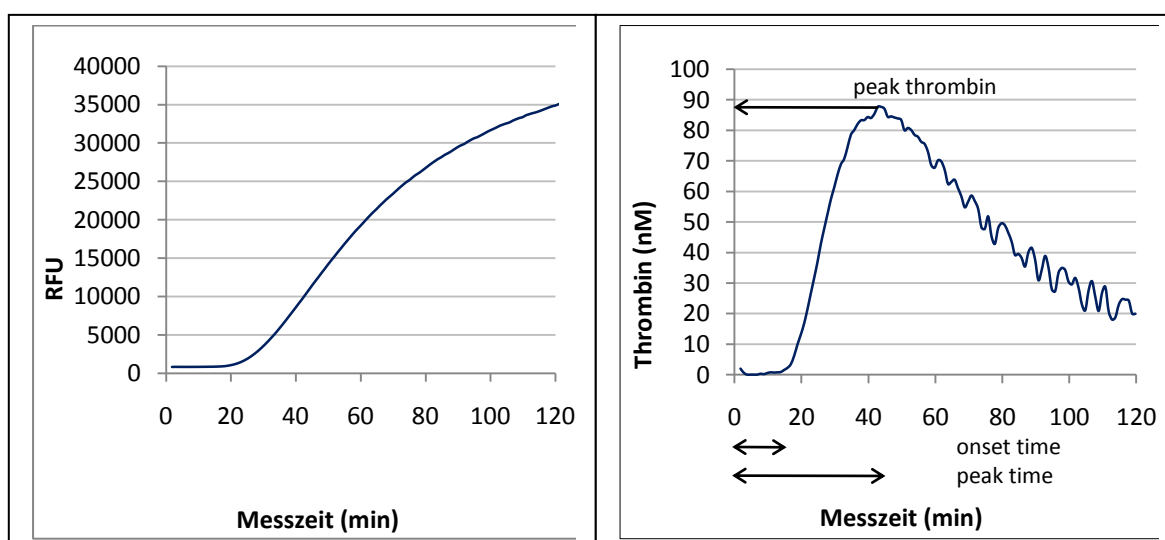


Abbildung 2: Kurve a: RFU pro Zeiteinheit – Kurve b: Thrombin-Kurve, durch Berechnung der 1. Ableitung aus Kurve a erhalten

Die gemessene Fluoreszenz (RFU) wird für jede Minute berechnet (RFU / min) und mit Hilfe einer zuvor erstellten Referenzkurve in eine Thrombin äquivalente Konzentration (nM) umgerechnet. Die Thrombin-Referenzkurve wird mit einer bekannten Konzentration an gereinigtem humanen α -Thrombin erstellt. Die dabei erhaltene Thrombin-Kurve, genauer gesagt die erste Ableitung der zuvor erhaltenen Kurve, verdeutlicht die Umwandlung von Prothrombin zu Thrombin. Weiters werden durch sie, die durch Thrombin ausgelösten Reaktionen und der darauffolgende Abbau von Thrombin ersichtlich (s. Kap. 2.1.5). Diese Kurve kann durch folgende Parameter quantitativ analysiert werden: onset time, peak time, peak thrombin, thrombin potential, velocity index (s. Abbildung 2).

Die Zeit bis zum Erreichen von ungefähr 5-10% aktivem Thrombin wird als onset time charakterisiert und entspricht auch in etwa den Zeiten welche bei der TPZ oder der aPTZ gemessen werden. Die onset time zeigt wie schnell es zur Thrombin-Bildung kommt und weist somit auf die initiale Thrombin-Bildung hin. Nach dieser initialen Thrombin-Bildung kommt es über verschiedene Verstärker-Schleifen zu einem raschen Anstieg in der Thrombin-Konzentration (s. Kap. 2.1.5), die in der höchsten Thrombin-Konzentration (peak thrombin) gipfelt. Die Zeit um diese zu erreichen wird als peak time bezeichnet. Aus onset time, peak thrombin und peak time kann die Steigung der Thrombin Bildung berechnet werden (velocity index). Nach dem Erreichen von peak thrombin wird das physiologische Inhibitorsystem aktiviert (ATIII/APC-PS/TFPI/ α 2-Macroglobulin) und es kommt zu einem Abfall der Thrombin-Konzentration. Aus dieser Inaktivierungsrate kann auf die Effektivität des Inaktivierungssystems rückgeschlossen werden. Die Fläche unter der so entstandenen Thrombin-Kurve wird als thrombin potential bezeichnet. Dieser Parameter spiegelt die totale Menge des gebildeten Thrombins wieder.

Nachdem sämtliches freies Thrombin inaktiviert wurde, kann trotzdem noch eine restliche amidolytische Aktivität gemessen werden. Diese wird durch das im α 2-Macroglobulin-Thrombin-Komplex gebundene Thrombin verursacht (Hemker, et al., 1995). Thrombin wird durch zwei verschiedene Prozesse abgebaut. Einerseits wird Thrombin durch Antithrombin und andere Proteasen zu einem inaktiven Produkt abgebaut und andererseits führt die Komplex-Bildung mit α 2-Macroglobulin zu einem für die Blutgerinnung inaktiven Produkt, welches aber noch eine restliche amidolytische Aktivität besitzt. Das fluorogene Thrombin-Substrat wird demzufolge von zwei Enzymen, dem freien Thrombin und dem im α 2-Macroglobulin-Thrombin-Komplex gebundenen Thrombin, umgesetzt. Die Steigerungsrate des Fluoreszenz-Signals gibt somit die amidolytische Aktivität von beiden Enzymen wieder (Turecek, et al., 2003).

3.1.1. Reagenzien und Apparaturen

- Aqua ad injectabilia

Reagenzien: die lyophilisierten TGA-Reagenzien wurden von Technoclone hergestellt

- TGA Substrat: fluorogenes Substrat / CaCl_2 – 1mM Z-Gly-Gly-Arg-AMC / 15mM CaCl_2 ; # 8F62000
- HNaBSA-Puffer: Hepes-NaCl-Puffer (25mM Hepes / 175 mM NaCl , pH 7.35, 0.5% Bovine Serum Albumin (BSA)); # 9P51002
- TFPL: TGA-Reagenz RC low mit ungefähr 71.6 pM Tissuefactor und einer niedrig konzentrierten Phospholipidlösung; #7 D51001
- human Thrombin für Referenzkurve mit 1000 nM Thrombin in 0.5% BSA-Lösung; #HT3132-2AL (ERL)
- Normal Plasma: George King, pooled normal Plasma, #823e1
- APCC-Reagent (humanes Faktor VIII-Mangelplasma mit hochtitrigem anti-human Faktor VIII aus der Ziege); #3V61000 (SRS)

Gerinnungsfaktoren

Enzyme Research Laboratories (ERL)

- Human Prothrombin; ERL, #HP3062AL;
- Human alpha Thrombin; ERL, #HT3132-2AL;
- Human Factor X; ERL, #HFX3064AL;
- Human Factor Xa; ERL, #HFXa3060AL;
- Human Factor VII; ERL, #HFVII2801PL;
- Human Factor IX; ERL, #HFIX2662AL;
- Human Factor IXa beta; ERL, #HFIXab3060AL;
- Human Protein C; ERL, #HPC2990AL;
- Human Protein S; ERL, #HPS2130PAL;

Novo Nordisk Inc. – 100 College Road West – Princeton – New Jersey – USA

- Recombinant Factor VIIa; NOVOSEVEN #RU61511;

Biopur – Kantonstr. 7 – Bubendorf - CH

- Human Inter- α_1 -Trypsin-Inhibitor; BIOPUR, #B 070221.01;

American Diagnostica Inc. (AD) – 500 West Avenue – Stamford – CT – USA

- Human Factor V; AD, #070607;
- Human Vitronectin; AD, #041118,

Apparaturen

- Pipetten: verstellbare Kolbenhubpipetten, Fixvolumen-Pipetten und Mehrkanalpipetten jeweils mit passenden Kunststoff-Einwegspritzen
- Thermostatiertes Wasserbad ($37.0 \pm 1.0 \text{ }^{\circ}\text{C}$)
- Gekühltes Wasserbad ($5.0 - 10.0 \text{ }^{\circ}\text{C}$)
- Stoppuhren
- Kunststoff-Eprouvetten
- Mikrotiterplatten für Fluoreszenzmessung; F 96, Nunc Maxisorp
- Vibrationsschüttler (Vortex)
- Microplate Fluorescence Reader FL600 (Bio-TEK Instruments)

3.1.2. Testdurchführung

3.1.2.1. Vorbereitung

Die prokoagulatorischen Proteine wurden laut Packungsbeilage gelöst, mit Puffer auf eine Konzentration eingestellt, die ein einheitliches Arbeiten bei den verschiedenen Testansätzen erlaubt und bei -20°C bis zur Verwendung gelagert.

Die lyophilisierten Reagenzien werden mit den auf den Etiketten des jeweiligen Reagenzes angegebenen Volumen Aqua dest. gelöst. Die gelösten Reagenzien sollen vor Gebrauch Raumtemperatur erreicht haben. Nach ungefähr 30min Rekonstitutionszeit und sorgfältigem Mischen (Vortex) können die Reagenzien verwendet werden.

Die Fläschchen mit dem TGA Substrat werden direkt nach dem Lösen und dem Poolen in das 37°C warme Wasserbad gestellt.

3.1.2.2. Durchführung

Die Verdünnung sämtlicher Proben und die des Thrombins für die Referenzkurve erfolgt mit HNaBSA-Puffer. Der Fluoreszenz Reader wird auf 37°C vorgeheizt. Nach Erreichen der 37°C wird eine Mikrotiterplatte vorab leer gelesen. Dies erfolgt, um sicherzustellen, dass die Mikrotiterplatte nicht defekt ist.

Vor der Probenmessung wird eine **Thrombineichkurve** separat erstellt. Hierzu wird eine Verdünnungsreihe mit Thrombin gemacht. Die Verdünnung erfolgt mit HNaBSA-Puffer im Bereich von 500nm bis 5nm Thrombin, wobei

Pipettierschema	
40 µL	Thrombin (nM)
10 µL	HNaBSA-Puffer
50 µL	TGA Substrat

alle Verdünnungen als Doppelwert bestimmt werden. Diese Verdünnungsreihe wird auf den Spalten eins und zwei der Mikrotiterplatte (Well A1 – H2) aufgetragen, wobei die Doppelwerte jeweils nebeneinander liegen.

Die Messung erfolgt bei 37°C bei den im Testprinzip genannten Wellenlängen zehn Minuten lang, wobei das Messintervall 30 Sekunden beträgt.

Die Messung muss sofort nach Substratzugabe gestartet werden, da die Substratumsetzung durch Thrombin direkt nach der Zugabe einsetzt.

Die darauf folgende **Probenmessung** dauert 120 Minuten, hier beträgt das Messintervall 60 Sekunden. Die Messung wird ebenfalls bei 37°C durchgeführt, wobei jeder Wert doppelt bestimmt wird. Die Doppelwerte liegen jeweils

Pipettierschema	
40 µL	Testlösung
10 µL	TFPL
50 µL	TGA Substrat

in einer Zeile, in nebeneinander liegenden Spalten (Well A3 & 4 – B3 & 4 – C3 & 4 usw. beziehungsweise. A5 & 6 – B5 & 6 usw.). Auch hier muss die Messung direkt nach dem Pipettieren des Substrats gestartet werden.

Die Herstellung der Testlösungen erfolgt in entsprechenden Kunststoffeprouvetten im Eiswasserbad. Dazu wird das Plasma (v.a. FVIII-Inhibitorplasma) mit den auszutestenden Probenkomponenten (prokoagulatorische Proteine des künstlichen APCCs) im Verhältnis 1:10 „gespikt“. Diese Verdünnung ist so gewählt, dass die Eigenschaften des Plasmas nicht oder nur wenig verändert wird. Die Probenkomponenten wurden zuvor entsprechend der eingesetzten Kombination gemischt bzw. mit Puffer verdünnt, sodass der Testansatz immer ein Volumen von 50µL aufweist (*s. Tabelle 4*). Das Volumen der Lösung von Gruppen oder Proteinen, die in den einzelnen Testansätzen weggelassen wurden, wurde durch eine äquivalente Menge an Puffer ersetzt.

HNaBSA-Puffer	Basis (Xall)	Zymogene (Zym)	Aktivierte Faktoren (akt)	Inhibitoren (Inh)	Co-Faktoren (Co)	Phospholipide (PL)
	FXa 0.0006U/mL; FII 1U/mL					PCPS 80/20 0,2µM
					FV 0,5U/mL; FVIII 0,1U/mL	PCPS
					PC 1U/mL; PS 0.2U/mL	PCPS
					FV; FVIII	PCPS
						PCPS
					FV; FVIII	PCPS
						PCPS
		FVII 1U/mL; FIX 1.5U/mL; FX 1U/mL	FIIa 0.0005U/mL; FVIIa 1.5U/mL; FIXa 0.001U/mL			
					FV; FVIII	PCPS
					PC; PS	PCPS
					FV; FVIII	PCPS
						PCPS
					FV; FVIII	PCPS
					PC; PS	PCPS
					FV; FVIII	PCPS
		FIIa; FVIIa; FIXa				
					FV; FVIII	PCPS
					PC; PS	PCPS
					FV; FVIII	PCPS

Tabelle 4: Darstellung der Testlösung: Aufstellung der einzelnen Gruppen und Kombinationen der Proteine des künstlichen APCCs mit den eingesetzten Volumina und Konzentrationen

3.1.3. Auswertung

Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Tabellenkalkulationsprogramm Microsoft Excel. Mit diesem wurden die mit dem Fluoreszenz Reader gemessenen Werte (RFU) auf RFU/min umgerechnet. Diese Werte werden in Folge mit der Thrombin Referenz Kurve in eine Thrombin äquivalente Konzentration (nM) umgewandelt. Mit der so erhaltenen ersten Ableitung kann der Verlauf der Thrombin-Generierung graphisch dargestellt werden. Folgende Parameter dienen der quantitativen Auswertung der Thrombin-Generierungs Kurve: onset time; peak time; peak thrombin; velocity index.

3.2. Aktivitätsbestimmung mittels Gerinnungstest (TPZ, aPTZ)

Zur Bestimmung der Gesamt-Aktivität des IATl und VN abgereicherten APCCs und der Aktivität der darin enthaltenen Gerinnungsfaktoren wurden Gerinnungstests, wie die Thromboplastinzeit (TPZ; *s. Kap. 3.2.2*) und die aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTZ; *s. Kap. 3.2.3*), aber auch die Aktivitätsbestimmung mit chromogenen Substraten (*s. Kap. 3.2.4*) angewendet. Diese Methoden dienen dazu um das plasmatische System zu überprüfen. Die Aktivität, genauer gesagt die Funktion, eines spezifischen Gerinnungsfaktors im Plasma wird relativ zu seiner Aktivität in einem Milliliter (Normal-) Plasma (= 100%) bestimmt, letztere entspricht auch einer internationalen Einheit (I.E.).

Bei den Gerinnungstests, TPZ und aPTZ, wird durch die Zugabe von Aktivatoren und Calcium-Ionen zu Citratplasma die Gerinnung ausgelöst und die Zeit bis zum erstmaligen Auftreten des Fibringerinnsels gemessen. Zwischen der Gerinnungszeit und der Aktivität der Probe besteht ein direkter Zusammenhang. Gemessen wird die Bildung des Fibringerinnsels mit Hilfe eines Kugelkoagulometers. Das Funktionsprinzip des Kugelkoagulometers ist, dass in einem sich drehenden und schräg gestellten Röhrchen, in welchem sich der Testansatz und ein Metallkügelchen befinden, das Metallkügelchen durch die Bildung von Fibrinfasern seine Lage verändert. Dadurch löst das Metallkügelchen an einem magnetischen Sensor einen Impuls aus, welcher die Bildung eines Clots und damit das Ende der Gerinnungszeit anzeigt.

Bei den chromogenen Substraten handelt es sich um synthetische Peptide, welche eine für den zu bestimmenden Gerinnungsfaktor spezifische Aminosäuresequenz besitzen, an die ein Chromophor gekoppelt ist (p-Nitro-Anilin). Dieser wird durch den Gerinnungsfaktor abgespalten und mit einem ELISA-Microplate-Reader (Bio-Tek Instruments) photometrisch erfasst. Die dabei entstandene Farbintensität, also die Menge des Chromophors, korreliert mit der Aktivität des Gerinnungsfaktors.

Da die Gerinnungszeiten bzw. Farbintensitäten teilweise stark von der angewandten Methode und den benutzten Reagenzien abhängen, erfolgt die quantitative Auswertung bei allen Methoden unter Verwendung einer Bezugskurve, welche mit geeigneten Kalibratoren erstellt wurde. Bei jedem Versuch müssen auch bestimmte Kontrollen mit getestet werden, deren Kontrollbereiche mit der gewählten Methode bzw. mit den verwendeten Reagenzien festgelegt wurden, um mögliche Einflüsse von Reagenzien oder Geräten ausschließen zu können.

3.2.1. Reagenzien und Apparaturen

Die einzelnen Reagenzien werden im laut Vorschrift angegebenen Volumen des entsprechenden Lösemittels rekonstituiert, eventuell geschüttelt oder gepoolt und gemäß Vorgabe entweder bei Raumtemperatur, im gekühlten Wasserbad oder bei 37.0 ± 1.0 °C im Wasserbad bis zur bzw. während der Testdurchführung aufbewahrt. Weiters ist die Beständigkeit der Stabilität der fertigen Lösungen zu beachten.

Reagenzien

- Aqua ad injectabilia
- Faktor II-Mangelplasma; #5114007 (Technoclone)
- Faktor IX-Mangelplasma; #500712 (Dade Behring)
- APCC-Reagent (humanes Faktor VIII-Mangelplasma mit hochtitrigem anti-human Faktor VIII aus der Ziege); #3V61000 (SRS)
- Citrat-NaCl-Puffer (7,50g NaCl/L; 5,40g Na₃Citrat x 2 H₂O/L; pH 7,35); #9G21000 (SRS)
- Imidazolpuffer-1% Albumin; #9V51000 (SRS)

- FX-Puffer (3,7g/L Tris; 2,1g/L Imidazol; 18,0g/L NaCl; 0,1% Humanalbumin; pH 8,4); #9X71000 (SRS)
- FVII-Reaktionspuffer (Tris; NaCl; EDTA; pH 7,9); #9Q51001 (SRS)
- FVII-Pufferkonzentrat (Tris; NaCl; Albumin; pH 7,6); #9Z41000 (SRS)
- Polybrene (Hexadimethrinbromid); Cat.-No. 52495 (Fluka Biochemika)
- FX-Aktivator (RVV); #7H21001 (SRS)
- Reagens A – FVII-Chromogen (Thromboplastin, Ca²⁺, Albumin); #7N61000 (SRS)
- Reagens B – FVII-Chromogen (Faktor X, Albumin); #7O61000 (SRS)
- Substrat FXa-1 (Methoxycarbonyl-D-Cyclohexylalanyl-Glycyl-L-Arginin-p-Nitroanilid-Acetat; 10µmol/Flasche); #8M61000 (SRS)
- Thromborel S (Calcium-Thromboplastin); (Behring AG)
- Calciumchlorid-Lösung (25mmol/L); #9C01000 (SRS)
- Calciumchlorid-Lösung (50mmol/L); #9A01001 (SRS)
- DAPTTIN TC; #6V73A00 (Technoclone)
- Konzentratstandard FII-IX-X (Referenzpräparation 34U/mL FII – 24U/mL FIX – 30,5U/mL FX); #5E31R00 (SRS)
- Konzentratstandard FII-IX-X (Kontrollpräparation 27,8U/mL FII – 24,1U/mL FIX – 25,0U/mL FX); #5E21K00 (SRS)
- Konzentratstandard FVII (Referenzpräparation 31,0U/mL FVII); #5A11R00 (SRS)
- Konzentratstandard FVII (Kontrollpräparation 26,2U/mL FVII); #5A11K01 (SRS)
- Konzentratstandard APCC (Referenzpräparation 25,5U/mL); #5F41R00 (SRS)
- Konzentratstandard APCC (Kontrollpräparation 25,9U/mL); #5F22K02 (SRS)
- Faktor VIIa Test-Kit STACLOT® VIIa-rTF; #7080B05 / #6075B03

Apparaturen

- Kugelkoagulometer – KC4A (Amelung, Lemgo, Deutschland)
- Pipetten: verstellbare Kolbenhubpipetten, Fixvolumen-Pipetten und Mehrkanalpipetten jeweils mit passenden Kunststoff-Einwegspritzen
- Thermostatisiertes Wasserbad (37.0 ± 1.0 °C)
- Gekühltes Wasserbad (5.0 – 10.0 °C)
- Stoppuhren
- Kunststoff-Eprouvetten
- Vibrationsschüttler (Vortex)

- Mikrotiterplatten
- Microplate Spectrophotometer (Bio-TEK Instruments)

3.2.2. Thromboplastinzeit

Die Thromboplastinzeit (TPZ) gibt einen Überblick über das exogene Gerinnungssystem. Sie erfasst somit die Gerinnungsfaktoren VII, X, V, II und Fibrinogen, dabei ist sie besonders sensitiv auf die Faktoren VII, X und II. Die Fibrinbildung wird durch die Zugabe von Gewebsthromboplastin und Calcium-Ionen gestartet (Witt, et al., 2006). Je nachdem, aus welchem Organ (Gehirn, Lunge, Plazenta) bzw. von welcher Spezies (Mensch, Affe, Kaninchen) das Thromboplastin-Präparat stammt, variiert die Empfindlichkeit, mit der die Faktoren erfasst werden. Die TPZ hängt aber nicht nur von den verwendeten Reagenzien, sondern auch von der eingesetzten Methode ab. Dies erfordert aber die Ermittlung methodenabhängiger bzw. auch chargenabhängiger Referenzwerte.

Das Ergebnis der TPZ wird meist als Prozent der Norm ausgedrückt, kann aber auch in I.E./mL angegeben werden. Da die TPZ nicht nur als Screening-Test um Störungen des extrinsischen Systems festzustellen dient, sondern auch zur Überwachung der oralen Antikoagulantientherapie herangezogen wird, ist die TPZ jene Messmethode, deren Standardisierung am stärksten vorangetrieben wurde. Die Einführung der INR („International Normalized Ratio“) erlaubt eine Vergleichbarkeit der Testergebnisse, unabhängig von den verwendeten Reagenzien und der eingesetzten Methode. Die INR ist das Verhältnis von der TPZ der Probe zu der TPZ eines Normalplasma-Pools, welches mit dem ISI-Wert des verwendeten Gewebsthromboplastins potenziert wird. Der ISI-Wert („International Sensitivity Index“) wird durch den Einsatz von Patientenplasmen ermittelt, welche Cumarin-Derivate in einer Langzeittherapie erhalten. Darum ist die INR nur zur Kontrolle der Antikoagulantientherapie mit Cumarin-Derivaten vorgesehen.

Um die Aktivität der einzelnen Faktoren bestimmen zu können, wird die TPZ modifiziert. Hierzu wird die Probe mit einem Mangelplasma versetzt, in welchem der zu bestimmende Faktor nicht vertreten ist, die restlichen Faktoren jedoch in normaler Konzentration vorhanden sind.

3.2.2.1. Faktor II – Bestimmung

Die Methode basiert auf einer modifizierten TPZ-Bestimmung, in der die Spezifität für FII durch Einsatz eines FII-Mangelplasmas erreicht wird. Die Gerinnung wird durch ein Calcium-Thromboplastin-Reagenz („Thromborel S“) gestartet. Die quantitative Auswertung mit dem Tabellenkalkulationsprogramm Microsoft Excel erfolgt mit einer während der Probestestung erstellten Bezugskurve durch das Einsetzen der Messwerte in die Gleichung der Bezugskurve. Die Bezugskurve wird mit den bekannten FII-Aktivitäten einer Referenzpräparation erhalten.

Testdurchführung

Es werden 50µL Testansatz (Verdünnungen der Probe, Referenz und Kontrolle) bzw. Verdünnungspuffer (Leerwert) zu 50µL FII-Mangelplasma gegeben und eine Minute bei 37°C im Kugelkoagulometer inkubiert. Die Verdünnungen des Testansatzes und der Leerwert werden mit Citrat-NaCl-Puffer hergestellt. Durch die Beifügung von 200µL Ca-Thromboplastin, welches auf 37°C temperiert wurde, wird die Reaktion gestartet und die Zeit bis zur Clotbildung gemessen.

3.2.2.2. Faktor VIIa – Bestimmung

Prinzip dieser abgewandelten TPZ: FVIIa ist ein Glykoprotein, welches aus zwei Polypeptidketten besteht, und wird durch die Spaltung des einkettigen FVII gebildet. Diese Spaltung wird durch die Faktoren XIIa, IXa, Xa, IIa und VIIa ausgelöst. Natürliches Gewebsthromboplastin bildet mit Faktor VII einen Komplex, welcher Faktor X aktiviert. Dabei wird auch Faktor VII aktiviert. Lösliches Gewebsthromboplastin, welches im Test eingesetzt wird, ist der extrazelluläre Teil des natürlichen Gewebsthromboplastins und führt zwar zur Aktivierung von Faktor X, aber nicht zur Selbstaktivierung von Faktor VII. Diese Modifikation erlaubt die Bestimmung des vorhandenen Faktor VIIa, ohne dass ebenfalls vorhandener Faktor VII das Testergebnis beeinflusst. Die Aktivität der Proben erhält man durch das Einsetzen der Messwerte in die Gleichung der Bezugskurve, welche mit einer Referenzpräparation erstellt wurde.

Testdurchführung

Zu 50µL Testansatz (Verdünnungen der Probe, Referenz und Kontrolle) werden 50µL FVII-Mangelplasma und 50µL einer TF/PL-Präparation gegeben. Diese Lösung wird bei 37°C für exakt 180 Sekunden im Kugelkoagulometer inkubiert. Die Gerinnung wird durch die Zugabe von 50µL einer 0,025 M CaCl₂-Lösung, welche auf 37°C vorgewärmt wurde, ausgelöst und die Zeit bis zur Gerinnungsbildung gemessen.

3.2.3. Aktivierte partielle Thromboplastinzeit

Die aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTZ) zeigt Störungen im endogenen System (Faktoren XII, XI, IX und VIII) und in der gemeinsamen Endstrecke der Blutgerinnung (Faktoren X, V, II und Fibrinogen) an. Die Faktoren der Endstrecke werden jedoch nur bei schweren Mangelzuständen erfasst. Die Faktoren des endogenen Systems können dagegen sehr sensitiv bestimmt werden, wodurch sich die aPTZ besonders zur Erkennung der Hämophilie A und B eignet, grundsätzlich wird sie aber als globaler Screening-Test verwendet. Die aPTZ reagiert aber auch sehr sensibel auf Heparin, sodass sie zur Kontrolle der Heparintherapie eingesetzt werden kann. Mit der aPTZ werden aber auch Prekallikrein und High-Molecular-Weight-Kininogen erfasst.

Die Gerinnung wird bei der aPTZ durch partielle Thromboplastine, Aktivatoren und Calcium-Ionen ausgelöst. Hierzu wird die Plasmaprobe mit den partiellen Thromboplastinen und den Aktivatoren präinkubiert – dies löst die Kontaktaktivierung aus – und anschließend wird Calciumchlorid zugegeben, wodurch die Fibrinbildung gestartet wird. Bei den partiellen Thromboplastinen handelt es sich um Phospholipide, welche die aktivierten Plättchen, genauer gesagt den in vivo aktiven Plättchenfaktor 3, ersetzen (Witt, et al., 2006). Folglich ist die aPTZ unabhängig von der Thrombozytenzahl. Die partiellen Thromboplastine stammen aus verschiedenen Geweben oder sind pflanzlichen Ursprungs und setzen sich je nach Quelle aus verschiedenen Phospholipiden zusammen, wobei Phosphatidylcholin, Phosphatidylethanolamin und Phosphatidylserin mengenmäßig am stärksten vertreten sind. Da die Aktivierung der Blutgerinnung mit partiellen Thromboplastinen länger dauert als die Aktivierung mit Vollthromboplastinen

werden zur Beschleunigung Oberflächenaktivatoren (z.B. Kaolin, Celit oder Ellagsäure) zugegeben (Witt, et al., 2006). Die partiellen Thromboplastine enthalten im Gegensatz zu den Vollthromboplastinen keinen Proteinanteil, wodurch sie nicht in der Lage sind den exogenen Aktivierungsweg auszulösen.

Wie bei der TPZ wird bei der aPTZ die Zeit bis zum ersten Auftreten des Blutgerinnsels gemessen. Das Ergebnis wird dabei in Sekunden angegeben. Bei der aPTZ ist zu beachten, dass das Ergebnis von den verwendeten Reagenzien und Geräten abhängig ist. Variationen im Test können durch die Verwendung verschiedener Reagenzien (z.B. Art und Menge der Aktivatoren und Phospholipide; Pufferzusammensetzung) und durch verlängerte oder verkürzte Inkubationszeiten gesteuert werden und unter Verwendung von Mangelplasmen können selektiv Einzelfaktoren bestimmt werden.

3.2.3.1. Anti Inhibitor Coagulant Complex Activity (AICCA) – Bestimmung

Die AICCA ist so definiert, dass eine Einheit eines APCCs in einem Plasma, das einen hochtitrigen FVIII-Inhibitor enthält, die aPTZ um 50 % verkürzt. Die quantitative Auswertung erfolgt manuell mit Hilfe einer Bezugskurve, die mit einem kommerziell erhältlichen APCC als Referenzpräparation erstellt wird.

Testdurchführung

Zu einem Volumen von 50µL FVIII-Inhibitorplasma werden 50µL Testverdünnung (Leerwert, Probe, Referenz oder Kontrolle) und 50µL DAPTZIN, ein doppelt aktiviertes Phospholipid-Reagenz, gegeben. Die Verdünnungen des Testansatzes und der Leerwert werden mit Citrat-NaCl-Puffer hergestellt. Danach wird diese Lösung 60 Sekunden bei 37°C inkubiert. Die Zugabe von 50µL CaCl₂-Lösung (50mmol/L) startet die Gerinnung.

3.2.3.2. Faktor IX – Bestimmung

Die Faktor IX – Bestimmung beruht auf einer modifizierten partiellen Thromboplastinzeit, in welcher die Spezifität für Faktor IX durch ein Faktor IX-Mangelplasma bewirkt wird. Der Zusatz von Polybrene unterbindet mögliche Interaktionen von Heparin in der Probe. Die quantitative Auswertung wird durch

das Einsetzen der Messergebnisse in die Gleichung der Bezugskurve, welche mit einem Faktor IX-Konzentrat als Referenzpräparation erstellt wurde, erreicht.

Testdurchführung

100µL Faktor IX-Mangelplasma, welches mit einer Polybrene-Lösung rekonstituiert wurde, werden mit 100µL Testverdünnung (Probe, Referenz und Kontrolle) bzw. Leerwert und 100µL DAPTZIN, ein doppelt aktiviertes Phospholipid-Reagenz, vermischt und 240 Sekunden bei 37°C im Kugelkoagulometer inkubiert. Die Verdünnungen der Probe, Referenz und Kontrolle und der Leerwert werden mit Imidazolpuffer-1% Albumin hergestellt. Nach der Inkubation wird die Gerinnung mit einer Calciumchlorid-Lösung (25mmol/L), welche auf 37°C vorgewärmt wurde, gestartet.

3.2.4. Chromogenes Substrat

3.2.4.1. Faktor X – Bestimmung

Für die spezifische Messung von Faktor X mit einem chromogenen Substrat wird Faktor X mit Hilfe eines Schlangengifts (RVV), welches aus der Vipera Russellii gewonnenen wird, aktiviert. Aktivierter Faktor X spaltet selektiv das chromogene Substrat FXa-1 (Methoxycarbonyl-D-Cyclohexylalanyl-Glycyl-L-Arginin-p-Nitroanilid-Acetat), wodurch p-Nitroanilin freigesetzt wird, welches spektrophotometrisch bei 405nm verfolgt wird. Die auftretende Extinktionszunahme ist proportional zur Aktivität von Faktor X im getesteten Plasma. Mit Hilfe einer Bezugskurve, welche mit einem FX-Präparat hergestellt wurde, können die Messergebnisse quantitativ ausgewertet werden. Das FX-Präparat muss ebenfalls aktiviert werden.

Testdurchführung

Das chromogene Substrat (10µMol/Flasche) wird in 2,5mL Aqua dest. gelöst (4mmol/L). Nach Rekonstitution wird ein Teil chromogenes Substrat mit zwei Teilen Tris-Imidazol-Puffer gemischt und bei 37°C aufbewahrt. Die Testlösung (Probe, Kontrolle und Standard) wird bei Raumtemperatur mit FX-Puffer verdünnt. 50µL der Testlösung werden mit 50µL FX-Aktivator (RVV), welches auf

37°C vorgewärmt wurde, vermischt und bei 37°C 90 Sekunden inkubiert. Danach werden 100µL Substrat-Puffergemisch zugefügt. Die Reaktionskinetik, also der Extinktionsanstieg bei 405nm, wird über drei Minuten bei 37°C verfolgt.

3.2.4.2. Faktor VII – Bestimmung

Das Prinzip dieser chromogenen Bestimmung ist die Aktivierung von Faktor X durch einen Komplex aus Faktor VII und Thromboplastin. Es besteht somit eine direkte Beziehung zwischen der Menge an Faktor VII in der Probe und der gebildeten Faktor Xa-Aktivität. Durch den aktivierten Faktor X kommt es zur Spaltung des chromogenen Substrats FXa-1 (Methoxycarbonyl-D-Cyclohexylalanyl-Glycyl-L-Arginin-p-Nitroanilid-Acetat) und damit zur Freisetzung von p-Nitroanilin (pNA). Die Menge des gebildeten pNA ist direkt proportional zur Faktor Xa-Aktivität. Für eine konstante Reaktionsgeschwindigkeit ist Faktor X im Überschuss vorhanden. Die quantitative Auswertung erfolgt mittels Bezugskurve, die mit einem FVII-Referenzpräparat erstellt wurde.

Testdurchführung

Die Testlösung (Probe, Kontrolle und Standard) wird mit FVII-Pufferkonzentrat (Tris; NaCl; Albumin; pH 7,6) verdünnt und bei 4°C aufbewahrt. Das chromogene Substrat (10µMol/Flasche) wird in 2mL Aqua dest. gelöst (5mmol/L), im FVII-Reaktionspuffer (Tris; NaCl; EDTA; pH 7,9) 1 + 2 verdünnt und auf 37°C temperiert. 50µL Testlösung werden mit 50µL Reagens A (Thromboplastin, Ca²⁺, Albumin) und 50µL Reagens B (Faktor X, Albumin) bei 37°C drei Minuten inkubiert. Danach werden 125µL Substrat-Puffergemisch hinzupipettiert und die Kinetik wird über drei Minuten, bei 37°C und 405nm Extinktionswellenlänge beobachtet.

3.3. ELISA

Prinzipiell existieren mehrere Verfahren um die Konzentrationsbestimmung mittels ELISA durchzuführen. In der vorliegenden Untersuchung wurde das Sandwich-Verfahren

angewandt. Es zählt zu den nicht kompetitiven Verfahren von ELISA und wird meist auf einer Mikrotiterplatte als Träger durchgeführt (Richter, 2003). Im ersten Schritt wird dabei der Primär-Antikörper an der Trägermatrix (well) immobilisiert, wobei der Primär-Antikörper (auch Fang-Antikörper genannt) eine hohe Spezifität für den Analyten besitzt. Im nächsten Schritt müssen die unspezifischen Bindungsstellen abgesättigt werden („blockierende“ Agenzien wie Rinderserumalbumin (BSA), Casein, Magermilchpulver usw.) (Richter, 2003). Dies dient zur Unterbindung von unerwünschter Adsorption. Danach erfolgt die Analytbindung an den Primär-Antikörper. Sodann wird ein Sekundär-Antikörper hinzugefügt, der an eine andere Bindungsstelle (Epitop) des Analyten gerichtet ist. An diesen Sekundär-Antikörper ist ein Enzym gebunden (z.B. Peroxidase). Dieses Enzym ist in der Lage den Farbstoff vom Substrat abzuspalten (Die Intensität des Farbstoffes ist direkt proportional zur Konzentration des Analyten). Vor der Zugabe des Substrats werden durch ein Waschen der Platte sowohl die nicht gebundenen Sekundär-Antikörper als auch die freien Probenbestandteile entfernt. Nach diesem Waschschrift kann der Farbstoff photometrisch erfasst werden.

3.4. Immunaffinitätschromatographie (IAC)

Bei der IAC handelt es sich um ein Verfahren, bei dem die Fähigkeit des Immunsystems genutzt wird, das fremde Molekülstrukturen mit Hilfe von Antikörpern hochspezifisch zu erkennen vermag. Konkret geht es um die reversible Bindung von Zielmolekülen an immobilisierte Antikörper. Die biospezifischen Wechselwirkungen sind als Schlüssel-Schloss-Modell vorzustellen.

Die Trennung des Proteins von der Probenlösung teilt sich in eine stationäre und eine mobile Phase. Der Antikörper wird an die stationäre Phase gekoppelt. Die mobile Phase, d.h. das Proteingemisch, fließt an der stationären Phase vorbei, wobei die Antikörper-Antigen-Bindung zustande kommt. D.h. ein Reaktionspartner (= Antikörper, Ligand) wird am unlöslichen Träger (stationäre Phase) immobilisiert, wobei in einer Gleichgewichtsreaktion, die dem Massenwirkungsgesetz unterliegt, ein zweiter Reaktionspartner (= abzutrennendes Protein des APCC) selektiv mit dem Ersten reagiert.

3.4.1. Testdurchführung

Im ersten Schritt der IAC wurden die Antikörper (Sambucus nigra-Lectin (SNA); anti-human-Vitronectin (a-VN); anti-human-inter- α -Trypsininhibitor (a-IATI)) mittels Dialyse vorgereinigt, welches zur Vorbereitung einer spezifischen Antikörper-Kopplung dient. Dazu wurden die Antikörper in Dialysekassetten (Slidealyzer) gefüllt und gegen einen 0,1 M NaHCO_3 / 0,5 M NaCl Puffer dialysiert.

In der vorliegenden Untersuchung wurde eine aktivierte Trägersubstanz (Bromcyan-aktivierte Sepharose) verwendet. Um diese gebrauchsfertig zu machen wurde sie in zwei Liter 1 mM HCl aufgequollen und daraufhin ausgewaschen. Das so gewonnene Gel wurde mit einer 0,1 M NaHCO_3 / 0,5 M NaCl Lösung gepuffert. Zu dieser Gelsuspension wurden die dialysierten Antikörper-Lösungen zugesetzt und eine Stunde lang geschüttelt. Danach wurden ungefähr 500 mg Glycin zur Absättigung der freien Bromcyan-Bindungsstellen zugegeben. Diese Lösung wurde noch weitere zwei Stunden geschüttelt und über Nacht bei 4°C stehen gelassen.

Danach wurden die Gele abgesaugt und jeweils vier Mal abwechselnd mit einer Lösung aus 0,1 M Natriumacetat in 0,5 M NaCl bei pH = 4 und einer Lösung von 0,1 M Tris/HCl in 0,5 M NaCl bei pH = 8 gewaschen und in einer Lösung aus 0,5 M NaCl / 0,2 M Glycin / 0,1% Natriumazid aufgenommen.

Nachdem nun die Liganden an der Matrix gebunden sind, wird die Matrix mit der Probe (APCC) in einer Pufferlösung beladen. Danach folgt die Waschung mit dem Puffer, um sicherzustellen, dass alle nicht-gebundenen Teile die Säule verlassen bzw. aus der Säule gewaschen werden. Das Endprodukt dieses Vorgangs ist das sogenannte Eluat, das in der vorliegenden Untersuchung weiter untersucht wurde.

3.4.2. Reagenzien

- Sambucus nigra-Lectin (SNA, Vector Labs L-1300, Ch.Nr. S1104)
- anti-human-Vitronectin (a-VN, The Binding Site PC11,1 Ch.Nr. 217146)
- anti-human-inter- α -Trypsininhibitor (a-IATI, DAko PC060, Ch.Nr. 245032)

4. Ergebnisse – Diskussion und Interpretation

4.1. Bestimmung der Probe nach Verminderung der Konzentration von IATI und VN durch Immunaффinitätschromatographie mit TPZ, aPTZ und TGA

4.1.1. Testvorbereitung und Vortests

Die Herstellung der Proben (IATI-depleted, VN-depleted, MOCK) erfolgte durch Hrn. Dr. Heinz Anderle (Baxter BioScience).

- IATI-depleted: ist das APCC ohne seine Hauptkomponente, den Inter- α_1 -Trypsin-Inhibitor
- VN-depleted: ist das APCC ohne Vitronectin
- MOCK: ist das APCC ohne Entfernung einer Komponente und dient als Kontrolle

Die Abtrennung von IATI und VN wurde mit Affinitätsadsorptionsgelen aus Bromcyan-aktivierter Sepharose und den entsprechenden Antikörpern (Anti-human-Vitronectin [a-VN]; Anti-human-inter- α_1 -Trypsin-Inhibitor [a-IATI]) durchgeführt. Danach wurden die Proben bei -20°C bis zur Verwendung gelagert.

Zusätzlich wurden durch die Arbeitsgruppe von Hrn. Dr. Alfred Weber (Baxter BioScience) durch ELISA (Naser, 1990) die Konzentrationen von IATI, VN, Faktor II, Faktor X, Faktor IX, Faktor VII, Faktor V, Protein C und Protein S bestimmt (s. *Tabelle 5*).

	IATI:Ag	VN:Ag	FII:Ag	FX:Ag	FIX:Ag	FVII:Ag	FV:Ag	PC:Ag	PS:Ag
	mg/mL	mg/mL	U/mL	U/mL	U/mL	U/mL	U/mL	U/mL	U/mL
Originalpräparat	21.50	14.50	58.30	55.50	69.00	7.60	33.70	51.20	7.29
Originalpräparat verdünnt (1 : 5)	4.52	2.58	11.50	10.00	12.80	1.30	6.50	9.78	1.31
MOCK	1.9	1.29	5.99	4.75	6.81	0.55	1.60		
IATI-depleted	0.77	0.82	3.96	3.41	4.37	0.65	2.50		
VN-depleted	1.35	0.24	4.55	4.54	5.06	0.83	2.20		

Tabelle 5: Bestimmung der Konzentration der im APCC enthaltenen Proteine mit ELISA (Antigen (Ag))

Bevor die Aktivität der einzelnen Faktoren und des APCCs mittels aPTZ und TPZ bestimmt wurde, wurde kontrolliert, ob das Produkt während der Vorbehandlung stabil geblieben ist. Für die Immunaффinitätschromatographie musste das Präparat verdünnt werden, um die nötige Flüssigkeitsmenge für die Abtrennung bereitzustellen. Nach der Entfernung von IATi und VN wurden die Proben bei -20°C eingefroren. Um festzustellen, ob dieser Vorgang - einfrieren und auftauen der verdünnten Lösung - Einfluss auf die Aktivität hat, wurde ein unbehandeltes Originalpräparat im gleichen Puffer, der auch für die IAC nötig war, verdünnt, die Aktivität bestimmt und eingefroren. Danach wurde die Probe aufgetaut und die Aktivität erneut mittels Gerinnungstest gemessen und mit der Aktivität vor der Behandlung verglichen.

Die Gegenüberstellung zeigte, dass die Aktivität des Präparates durch das Einfrieren der verdünnten Lösung unverändert blieb. Aufgrund dieser Tatsache konnte die eigentliche Testung der Proben durchgeführt werden.

4.1.2. Ergebnisse

Die Bestimmung der Aktivität ergab folgende Testergebnisse:

	AICCA	FII	FX	FVIIa	FVII	FIX
Originalpräparat	50.80	45.64	49.22	101.56	13.36	104.91
Originalpräparat verdünnt (1 : 5)	9.76	8.77	9.46	19.52	2.57	20.16
MOCK	4.45	4.50	4.75	8.87	1.03	8.02
IATi-depleted	2.41	2.73	2.95	6.16	0.65	3.61
VN-depleted	3.13	3.29	3.67	7.27	0.83	4.49

Tabelle 6: Ergebnisse der Gerinnungstests – Aktivität der Proben in U/mL

Wie aus *Tabelle 5* ersichtlich, wurden nicht nur IATi und VN reduziert, sondern auch die prokoagulativen Proteine (Abnahme der Proteine beim gegenüberstellen der Kontrolle (MOCK) zu den abgereicherten Proben IATi- und VN-depleted). Setzt man die MOCK-Probe als 100 % fest, um sämtliche Einflüsse der IAC abzuziehen, so erkennt man, dass die Abtrennung von IATi im Vergleich zu der, durch die Bedingungen der IAC verursachten, Abtrennung der prokoagulativen Proteine nicht optimal funktioniert hat. Die Abtrennung von VN hat im Gegensatz zu der

Entfernung von IATl relativ gut funktioniert. Die Konzentration von VN beträgt nach der IAC nur noch 0.24 mg/mL, somit konnten, wenn man die Abnahme der prokoagulativen Proteine berücksichtigt, fast 60% des vorhandenen VN abgetrennt werden.

Die Gerinnungstests ergaben, dass nicht nur die Aktivität der abgereicherten Proben, sondern auch bei der Kontrolle die Aktivität teilweise abgenommen hat (s. *Tabelle 6*). Die Thrombin-Bildung von IATl-depleted, VN-depleted und MOCK mit Hilfe des im Kapitel Material und Methoden beschriebenen TGA bestätigte den Verlust der Aktivität. Für den TGA wurden diese drei Proben, jeweils in verschiedenen Verdünnungen, eingesetzt und mit einer Verdünnungsreihe des APCCs verglichen.

Die Kurven der Proben sind im Vergleich zu den in der Gesamtproteinmenge entsprechenden Kurven des APCCs stark gedrückt, die Latenzphase ist erweitert, peak Thrombin wird nicht erreicht. Die Steigung ist dadurch stark verringert (s. *Abbildung 3, Abbildung 4 und Abbildung 5*). Bei dem Vergleich der Kurve der Kontrolle (MOCK) mit denen der abgereicherten Proben zeigte sich, dass sich die Kurven der Proben, mit einer in etwa vergleichbaren Menge an Gesamtprotein, nicht in ihrer Form von der Kurve der Kontrolle unterscheiden (s. *Abbildung 6 und Abbildung 7*).

Somit kann darauf geschlossen werden, dass es durch die Bedingungen der IAC gleichermaßen, sowohl bei der Kontrolle, als auch bei den abgereicherten Proben, zum Verlust der Aktivität des APCCs gekommen ist. Folglich haben diese Versuchsserien nicht geholfen, einen möglichen Effekt von IATl oder VN auf die Wirkung des APCCs festzustellen.

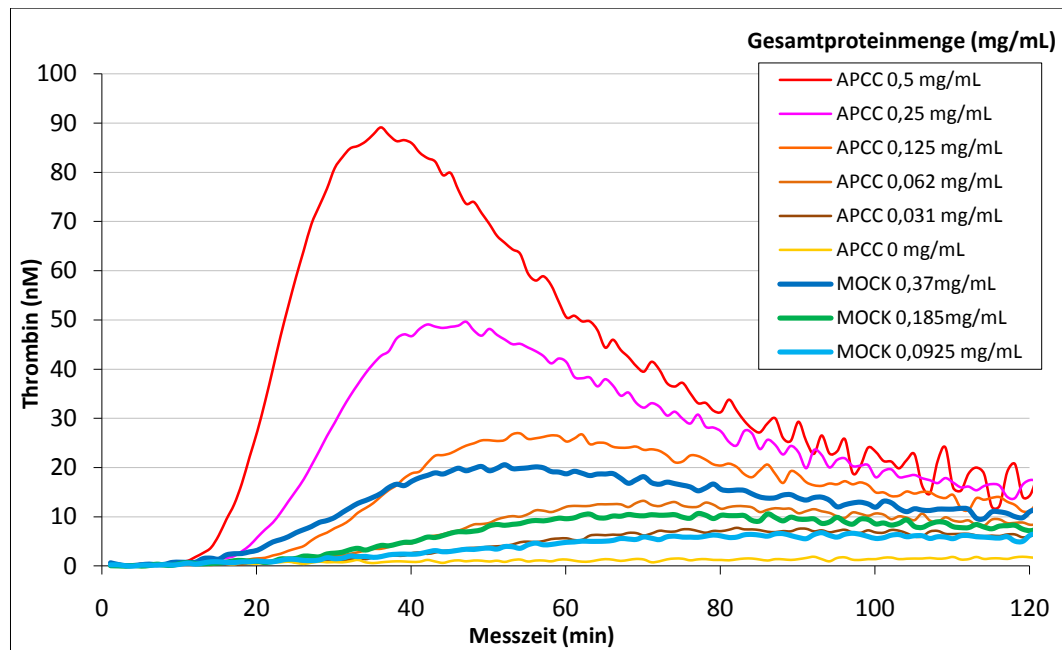


Abbildung 3: Gegenüberstellung der Verdünnungsreihen der Kontrollpräparation (MOCK) und der des APCC. Die Verdünnungen beziehen sich auf die Gesamtproteinmenge (mg/mL) des APCCs bzw. der MOCK-Präparation. Die dünnen Linien entsprechen den TG-Kurven des APCC, die dicken Linien denen der MOCK-Präparation.

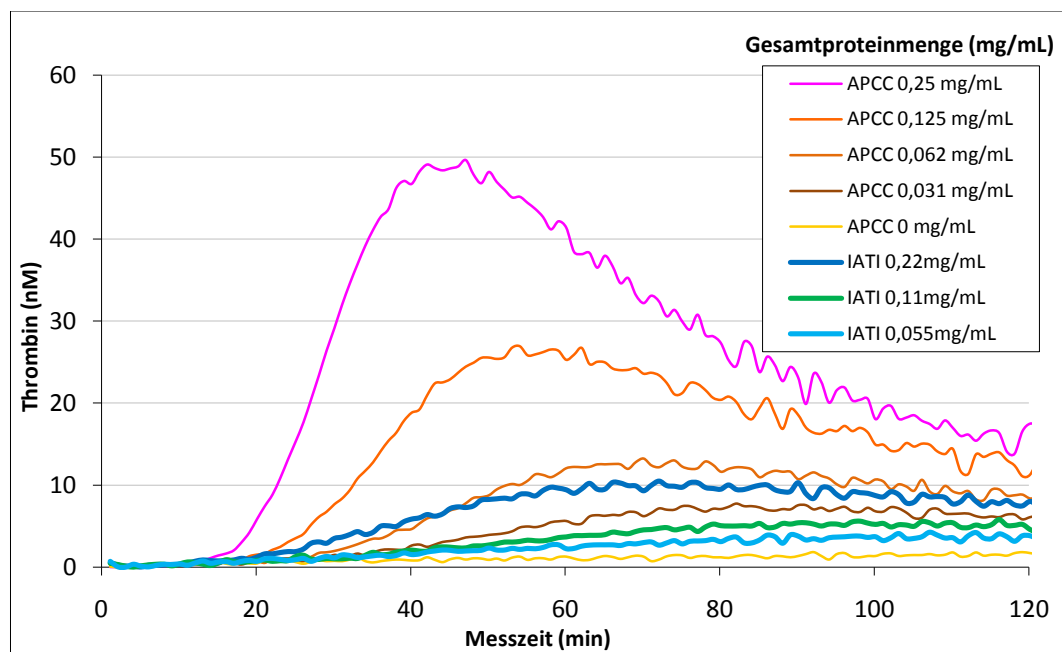


Abbildung 4: Gegenüberstellung der Verdünnungsreihen von IATI-depleted und der des APCC. Die Verdünnungen beziehen sich auf die Gesamtproteinmenge (mg/mL) des APCCs bzw. der IATI abgereicherten Probe. Die dünnen Linien entsprechen den TG-Kurven des APCC, die dicken Linien denen von IATI-depleted.

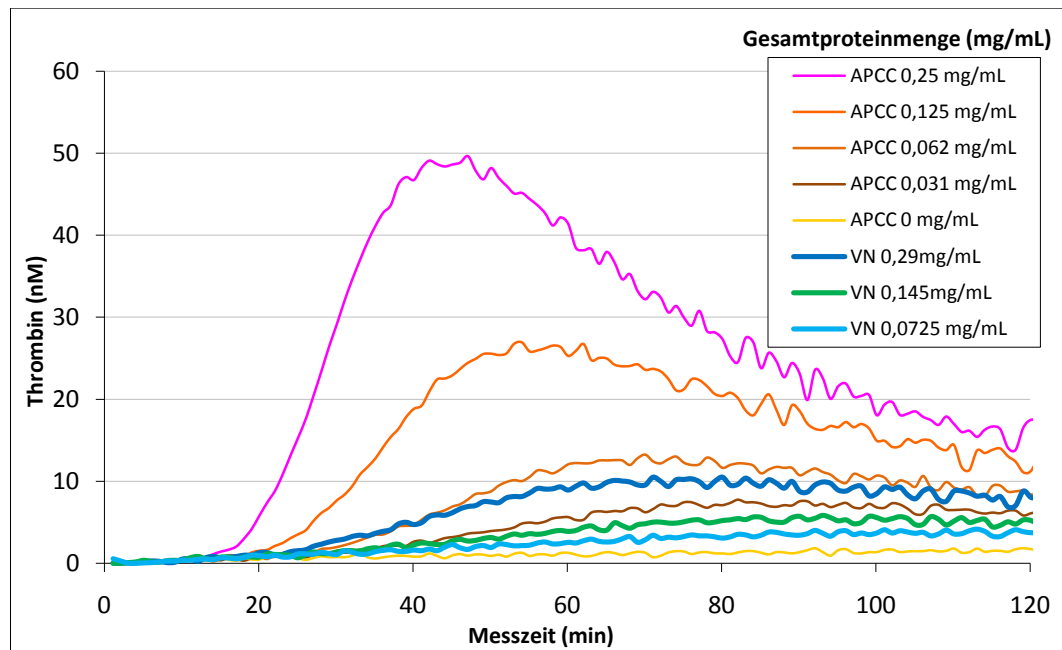


Abbildung 5: Gegenüberstellung der Verdünnungsreihen von VN-depleted und der des APCC. Die Verdünnungen beziehen sich auf die Gesamtproteinmenge (mg/mL) des APCCs bzw. der VN abgereicherten Probe. Die dünnen Linien entsprechen den TG-Kurven des APCC, die dicken Linien denen von VN-depleted.

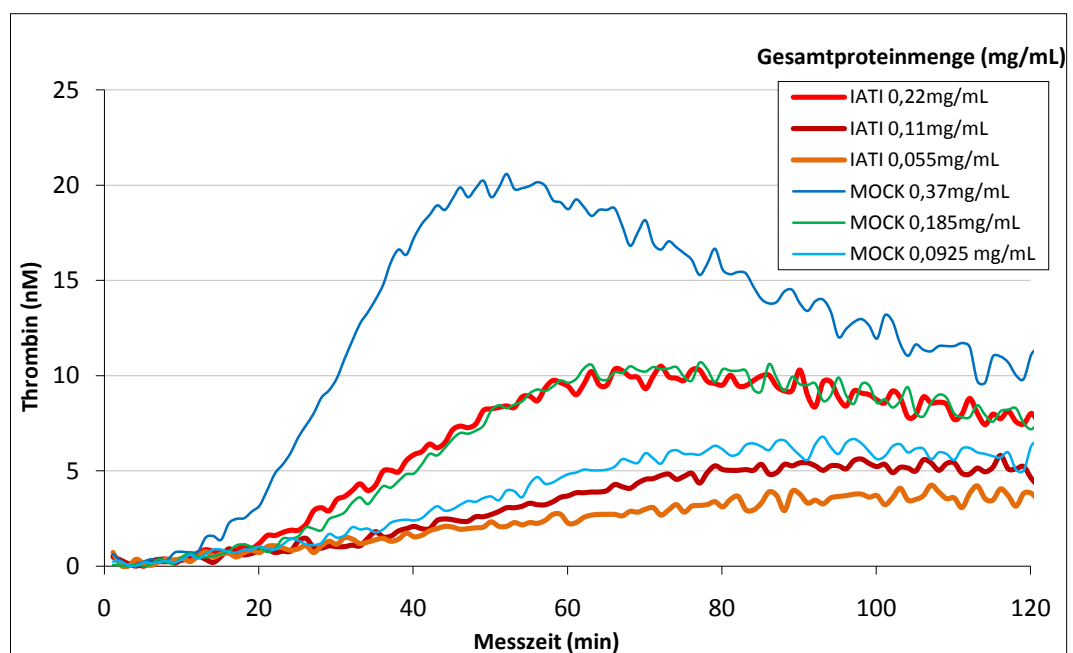


Abbildung 6: Gegenüberstellung der Verdünnungsreihen der Kontrolle (MOCK) und der von IATI-depleted. Die Verdünnungen beziehen sich auf die Gesamtproteinmenge (mg/mL) der Kontrolle bzw. der IATI abgereicherten Probe. Die dünnen Linien entsprechen den TG-Kurven der Kontrolle, die dicken Linien denen von IATI-depleted.

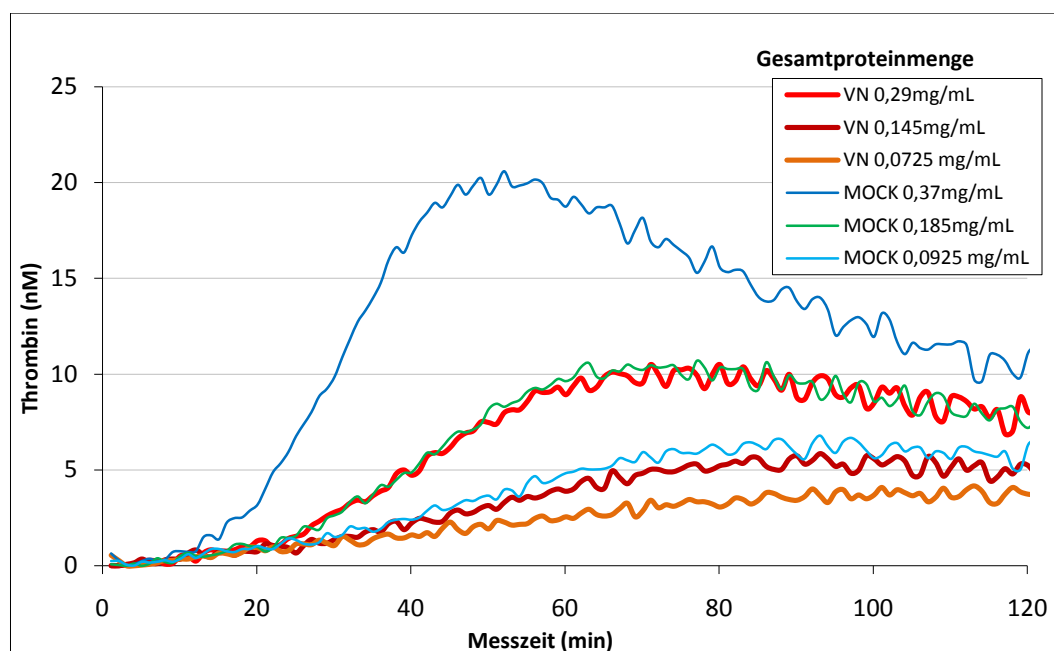


Abbildung 7: Gegenüberstellung der Verdünnungsreihen der Kontrolle (MOCK) und der von VN-depleted. Die Verdünnungen beziehen sich auf die Gesamtproteinmenge (mg/mL) der Kontrolle bzw. der VN abgereicherten Probe. Die dünnen Linien entsprechen den TG-Kurven der Kontrolle, die dicken Linien denen von VN-depleted.

4.2. Bestimmung der kombinierten Einzelkomponenten des APCC mit TGA

Die Abreicherung einzelner Komponenten zeigte aufgrund der Empfindlichkeit des APCCs keine verwertbaren Ergebnisse. Um sich dem Problem der Charakterisierung der Einzelkomponenten auf einem anderen Weg zu nähern versprach ein schrittweiser Aufbau des APCCs im Rahmen eines künstlichen APCCs den größten Erfolg, da so spezifisch auf den Effekt der einzelnen Komponenten eingegangen werden kann und gleichzeitig auch ihre Wechselwirkungen untereinander untersucht werden können. Die Zusammensetzung des künstlichen APCC beinhaltet sämtliche prokoagulatorische Proteine des Originalpräparates. Weiters sollte auf diesem Weg auch der Einfluss von IATi und VN bestimmt werden. Die Herstellung eines künstlichen APCCs stellt eine Mischung sämtlicher Komponenten dar. Somit müssen alle Komponenten entsprechend hoch dosiert vorliegen, da mit jedem Mischungsschritt eine Verdünnung stattfindet. Da IATi und VN aber nicht in solchen Konzentrationen erhältlich waren, konnte auch hier nicht der Effekt von diesen beiden Proteinen untersucht werden.

Die Herstellung des künstlichen APCCs stellte, aufgrund der großen Zahl, der am Blutgerinnungssystem beteiligten Komponenten im zu untersuchenden Präparat und den sich daraus ergebenden Kombinationsmöglichkeiten, eine komplexe Herausforderung dar. Um dieses Problem zu lösen, wurden die einzelnen Bestandteile nach ihrer Funktion im Gerinnungssystem in Zymogene, den aktiven Formen, den Inhibitoren, den Co-Faktoren und Phospholipide eingeteilt (s. *Tabelle 2*). Zusätzlich wurden, da durch frühere Studien gezeigt werden konnte, dass FXa und FII in einem molaren Verhältnis von 1 : 35000 die Hauptwirkung des zu untersuchenden APCC tragen (Turecek, et al.), diese beiden Proteine als Basis gewählt (Dieser Komplex wird im weiteren mit XaII bezeichnet). Sämtliche Kombinationen, die sich durch die oben genannten Gruppen ergeben, haben daher den Enzym-Substrat-Komplex XaII als fixen Bestandteil (s. *Tabelle 4*). Die Konzentrationen, sämtlicher prokoagulatorischer Proteine im künstlichen APCC, richten sich nach ihrer jeweiligen Konzentration im APCC (Vgl. *Tabelle 1 und Tabelle 2*), sodass eine Vergleichbarkeit gewährleistet ist.

Aufgrund der, wie bereits erwähnt hohen Anzahl an Kombinationsmöglichkeiten, stellte sich die Frage nach einem geeignetem Testsystem. Hierfür bot sich der TGA an, da mit diesem auf eine einfache, aber sehr effiziente Weise einerseits eine relativ große Anzahl an Kombinationen getestet werden konnte und andererseits misst er die gesamte Kinetik der Thrombin-Bildung, welche das zentrale Element von Bypass-Präparaten darstellt.

4.2.1. Basis – XaII

Der Komplex XaII zeigt im FVIII-Inhibitorplasma bereits eine Thrombin Generierungs Kurve, die weitgehend der Kurve des APCC entspricht. Unterschiede zwischen diesen beiden Kurven zeigen sich in der Startphase, welche, je nach Faktor Xa-Konzentration, um einiges verlängert ist. Im Vergleich zum APCC ist die Zeit bis zum Erreichen der höchsten Thrombin-Konzentration stark verlängert und peak Thrombin wird nicht erreicht. Somit ist die Steigung der Kurve stark verringert. Der Abbau des Thrombins verläuft flacher und langsamer im Vergleich zum APCC (s. *Abbildung 10*).

Die Zugabe der Substanzen der einzelnen Gruppen soll klären, welche Faktoren des APCCs für die Bildung und den Abbau von Thrombin weiter verantwortlich sind, um

mit XaII als Basis eine Thrombin-Kurve zu erreichen, die der Kurve des APCC entspricht.

FII alleine, ohne FXa, gibt im FVIII-Inhibitorplasma selbst bei Konzentrationssteigerungen auf 2 U/mL Plasmakonzentration kaum eine Reaktion (s. *Abbildung 8*). Dies kann dadurch erklärt werden, dass Prothrombin nur die inaktive Vorstufe des Thrombins ist und keine auslösende oder verstärkende Wirkung auf die Gerinnungskaskade hat, bzw. auch kein auslösender Mechanismus vorhanden ist.

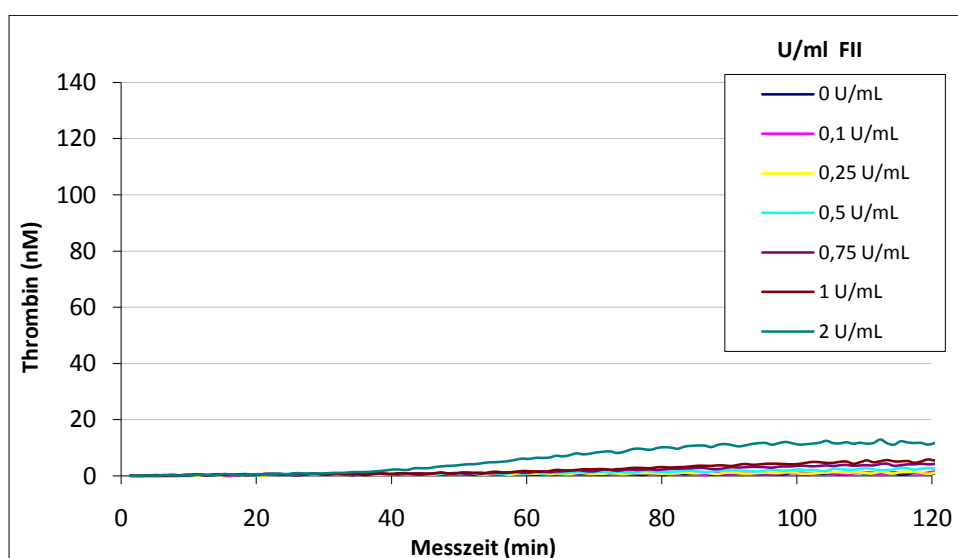


Abbildung 8: Faktor II-Konzentrationsreihe: schrittweises Erhöhen der FII-Konzentration (U/mL) im FVIII-Inhibitorplasma

FXa alleine erreicht hingegen schon in nur gering erhöhten Konzentrationen eine beträchtliche Thrombin-Bildung. Dies liegt einerseits daran, dass er im Komplex mit dem Faktor V in Anwesenheit von Phospholipiden und Calcium den Prothrombin-Aktivator-Komplex bildet und somit die Bildung von Thrombin einleitet. Andererseits wird durch Faktor Xa Faktor VII aktiviert, wodurch weiterer Faktor X aktiviert wird. Durch das so gebildete Thrombin kommt es zu einer Reihe von Verstärkungsreaktionen, welche eine weitere gesteigerte Thrombin-Bildung zur Folge haben. Diese äußert sich in einer konzentrationsabhängigen Steigerung von peak thrombin und einer Senkung von onset time und peak time (s. *Abbildung 9*).

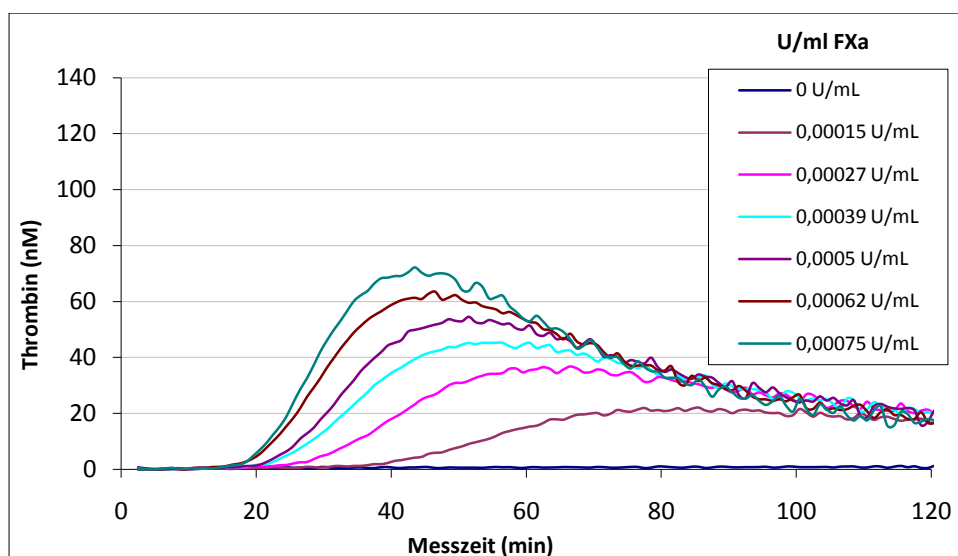


Abbildung 9: Faktor Xa-Konzentrationsreihe: schrittweises Erhöhen der FXa-Konzentration (U/mL) im FVIII-Inhibitorplasma

In Kombination bilden FXa und FII eine entsprechend verstärkte Kurve, da durch die erhöhte Konzentration an Prothrombin die Thrombin-Bildung zusätzlich verstärkt wird. Lässt man FII konstant bei 1 U/mL, und erhöht man schrittweise die Konzentration von FXa, dann erreicht man zumindest für die höchste Thrombin-Konzentration eine Kurve, die der des APCC entspricht. Onset time, peak time und der Abbau der Thrombin-Konzentration bleiben weiter verzögert. Die Aktivität (bzw. 1 Einheit) des APCC wird, wie in *Kapitel 2.3* besprochen, als die Summenaktivität sämtlicher prokoagulatorischer Proteine im APCC definiert. Das künstliche APCC hat während der gesamten Tests, mit dem Komplex XaII als Basis, FII mit 1 U/mL als konstante Größe. Damit das kommerzielle APCC mit dem „künstlichen APCC“ verglichen werden kann, wurde das APCC auf 1 U/mL FII eingestellt (s. *Abbildung 10*).

Im Verlauf der Testungen zeigte sich, dass die Kurve mit XaII als Basis die Kurve des APCC in Bezug auf die höchste Thrombin-Konzentration nicht erreichen wird. Darum wurde die Konzentration des FXa auf ein molares Verhältnis von 1 : 20.000 erhöht. Die erhöhte Konzentration von FXa hat keinen Einfluss auf die anderen zugegebenen Gerinnungsfaktoren. Variationen der FXa-Konzentration beeinflussen vor allem den Zeitpunkt und die Höhe der höchsten Thrombin-Konzentration.

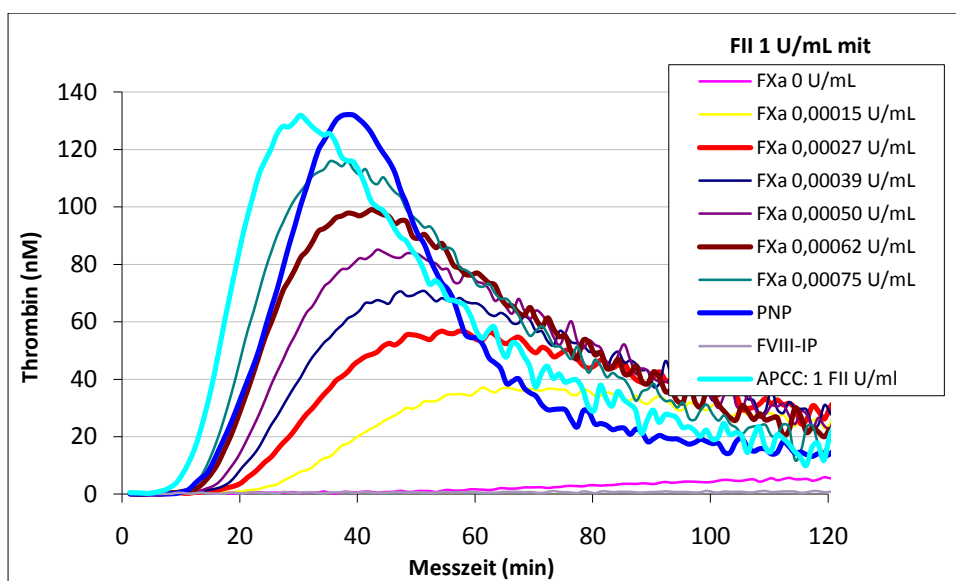


Abbildung 10: FXa-Reihe mit konstantem FII (1 U/mL) im FVIII-Inhibitorplasma; die dicke rote Linie entspricht einem molaren Verhältnis von 1:35000 zwischen FXa und FII, die dicke gelbe Linie entspricht dem molaren Verhältnis von 1:20000; PNP = Pooled Normal Plasma; FVIII-IP = FVIII-Inhibitorplasma; das APCC wurde auf eine FII-Konzentration von 1 U/mL eingestellt;

4.2.2. Zugabe der Einzelgruppen

In diesem Kapitel wird der Effekt der einzelnen prokoagulatorischen Proteine des APCCs besprochen. Dazu wurden die Proteine jeweils nach ihrer Funktion im hämostatischen System in verschiedene Gruppen unterteilt (s. *Tabelle 2*). Die Konzentrationen der Proteine orientieren sich an den Konzentrationen im zu untersuchenden APCC und deren Schwankungen (s. *Tabelle 1*).

4.2.2.1. Basis mit Zymogenen

Die Gruppe der Zymogene setzt sich aus den Faktoren X, VII und IX zusammen. Sie liegen alle in ihrer nicht aktivierten Form vor. Die Konzentration der einzelnen Faktoren wurde so gewählt, dass sie dem Verhältnis im APCC entsprechen.

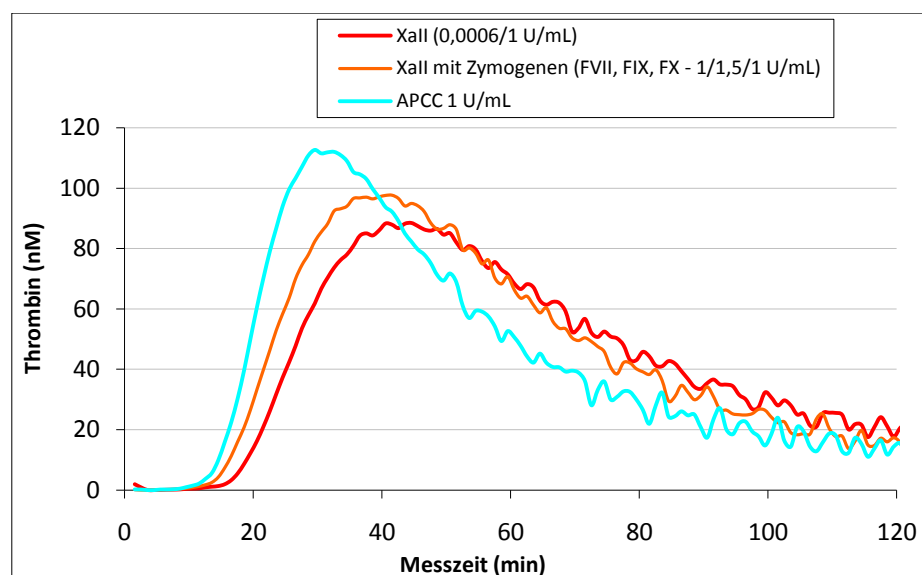


Abbildung 11: Basis mit Zymogenen im FVIII-IP: XaII liegen hier in einem molaren Verhältnis von 1 : 20000 vor (FXa 0,0006 U/mL / FII 1 U/mL); die Zymogene (FVII, FIX, FX) wurden mit Konzentrationen von 1/1,5/1 U/mL im Plasma eingesetzt; die Zugabe der Zymogene zu XaII führt zu einer Steigerung von peak thrombin und zu einer Verkürzung von onset time und peak time.

Wie aus *Abbildung 11* ersichtlich steigern die Zymogene die Thrombin-Bildung, verkürzen den Zeitpunkt des Beginns der Thrombin-Bildung und den der höchsten Thrombin-Bildung. Im Vergleich zu der Wirkung von XaII ist der Effekt der Faktoren X, VII und IX eher mäßig. Werden die Faktoren X, VII und IX einzeln in ansteigender Konzentration zugegeben, dann sieht man deutlich, dass sie nur einen sehr minimalen Effekt auf die Thrombin-Bildung ausüben (s. *Abbildung 12*) / (Butenas, et al., 1999).

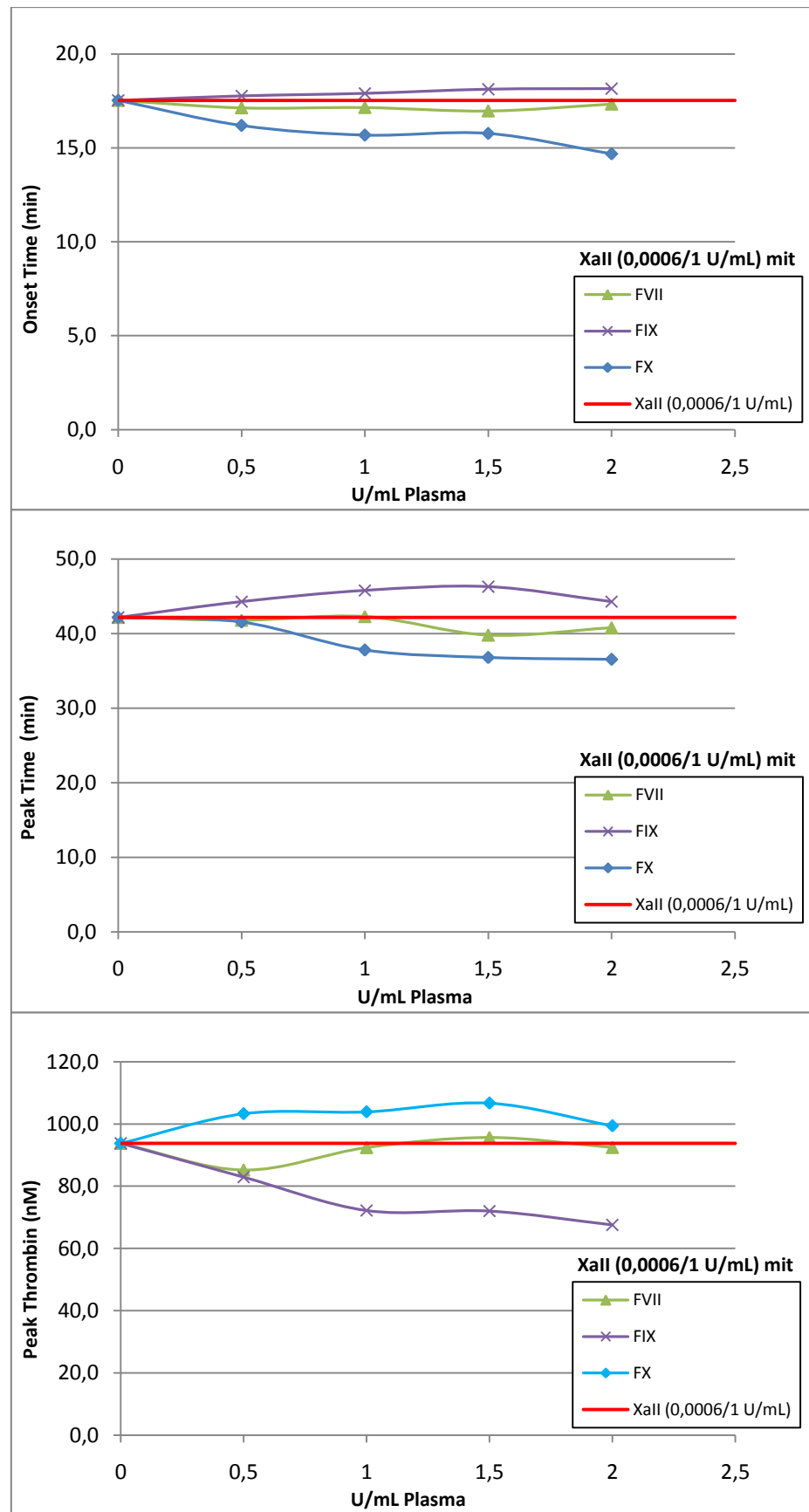


Abbildung 12: Faktoren VII, IX und X (1/1,5/1 U/mL) wurden einzeln zu XaII (0,0006/1 U/mL) zugegeben. Die durchgehenden Linien entsprechen XaII. Man sieht deutlich, dass die Faktoren VII und v.a. X die Thrombin-Konzentration anheben, und peak time und onset time senken. FIX hingegen zeigt einen genau gegenteiligen Effekt.

Setzt man die Zymogene einzeln zu Xall, dann zeigen sich folgende Ergebnisse:

Bei der alleinigen Zugabe von FX oder FVII zeigt sich, dass beide Faktoren die Thrombin-Bildung auf eine ähnliche Weise beeinflussen, wie die Zymogene in Kombination. FX hat aber einen deutlich stärkeren Effekt (*s. Abbildung 12*). Er hebt die Thrombin-Bildung an, verkürzt die Zeit bis zum Erreichen der höchsten Thrombin-Konzentration und verkürzt die Latenzzeit. Zumindest bei der peak time und der onset time ist ein konzentrationsabhängiger Effekt zu sehen. Diese, im Verhältnis zu FIX und FVIII gesehenen, starken Wirkungen von Faktor X lassen sich dadurch erklären, dass seine enzymatisch aktive Form Faktor Xa der unmittelbar bestimmende Faktor im Prothrombin-Aktivator-Komplex ist (Butenas, et al., 1997). Weiter ist zu bemerken, dass die Aktivierung von FX sowohl extrinsisch durch den Faktor VIIa-TF-Komplex, als auch intrinsisch durch den Faktor IXa und FVIII im Komplex erfolgt. Letzterer ist aber sehr stark durch die Erkrankung (Hämophilie A) bzw. durch die Hemmkörper-Entwicklung gegen den FVIII eingeschränkt, obwohl er grundsätzlich eine stärkere katalytische Aktivität besitzt (Hockin, et al., 2002).

Faktor VII alleine erhöht die maximale Thrombin-Konzentration mäßig, senkt peak time leicht und hat kaum Einfluss auf die Latenzzeit (Butenas, et al., 1999). Sein Haupteffekt besteht am ehesten in der Erhöhung der Thrombin-Konzentration. Nach seiner Aktivierung bildet er mit Tissue-Factor einen Komplex der die Aktivierung von Faktor X fördert und somit zu einer gesteigerten Thrombin-Bildung führt.

Faktor IX erzeugt einen genau gegenteiligen Effekt auf die Thrombin-Bildung. Er reduziert die Menge an gebildeten Thrombin, erhöht die Zeit bis zur höchsten Thrombin-Konzentration und verlängert ebenfalls die Latenzzeit (*s. Abbildung 13*). Das ist darauf zurückzuführen, dass der Komplex aus aktiviertem Faktor VII und TF sowohl FX als auch FIX aktiviert. Somit kommt es zu einem kompetitiven Antagonismus der, dem Massenwirkungsgesetz entsprechend, in Folge zu einer verstärkten Aktivierung von FIX führt. Dadurch steht nun weniger des FVIIa-TF Komplexes für die Aktivierung des Faktors X zur Verfügung (Butenas, et al., 1999).

Beim gesunden Menschen würde der aktivierte FIX einen Komplex mit FVIII in der Anwesenheit von aktivierten PL bilden, welcher ebenso wie der Komplex aus

TF-FVIIa, Faktor X aktiviert. Durch die Erkrankung (Hämophilie A mit Hemmkörper) kann der Komplex aus FIXa und FVIII keine Wirkung entfalten und stellt somit bezogen auf die FIX Aktivierung und in Folge auch die der FX Aktivierung eine Sackgasse dar.

Bei verschiedenen Kombinationen von FX, FVII und FIX zeigte sich, dass die negative Wirkung von FIX erst durch die Kombination mit FX und FVII aufgehoben werden konnte (s. *Abbildung 13*).

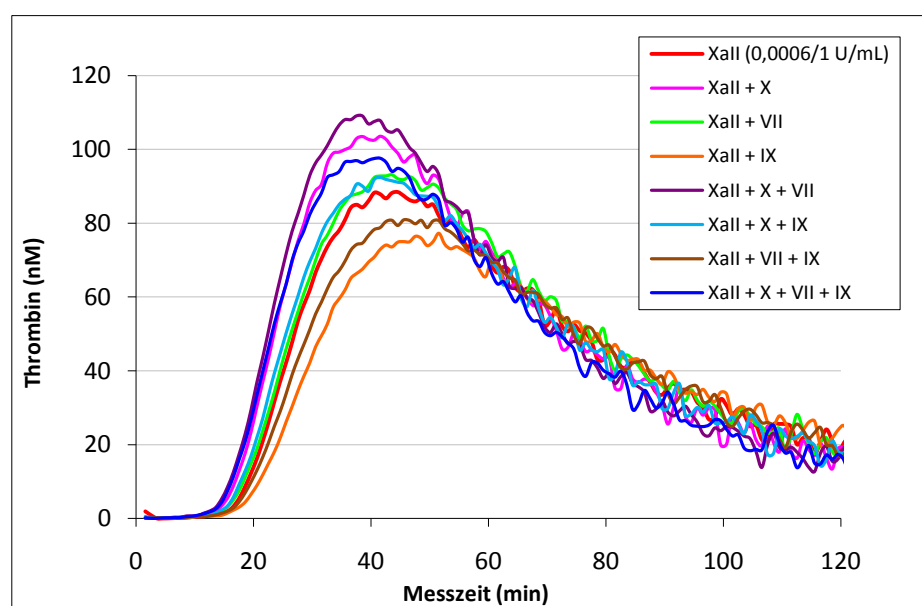


Abbildung 13: XaII (0,0006/1 U/mL) mit allen Kombinationsmöglichkeiten der Zymogene (VII, IX, X – 1/1,5/1 U/mL); die Zugabe von FX und FVII führte jeweils zu einer Erhöhung von peak thrombin und einer Verkürzung von peak time und onset time. Eine FIX-Zugabe reduzierte diese Werte. Erst die Zugabe von FVII und FX hob den Effekt von FIX auf.

4.2.2.2. Basis mit aktivierten Faktoren

Die Gruppe der aktiven Formen besteht aus den aktivierten Faktoren II (FIIa), VII (FVIIa) und IX (FIXa). Sie wurden XaII in Konzentrationen zugesetzt, die ihren Konzentrationen im APCC entsprechen (s. *Tabelle 1*). Im Laufe der verschiedenen Testreihen zeigte sich, dass die Wirkung der aktivierten Faktoren aufgrund der nur sehr geringen Konzentrationen, in denen sie zugesetzt wurden, kaum relevant für die Thrombin-Bildung des APCCs ist.

Die aktivierten Faktoren VII und IX bewirken eine leichte Erhöhung der Thrombin-Bildung mit einer Verkürzung der peak time und der onset time. Auch höhere Konzentrationen von FVIIa und FIXa lösten keine verstärkten Reaktionen

aus (s. *Abbildung 14*), der Effekt der verschiedenen Konzentrationen ist kaum zu unterscheiden.

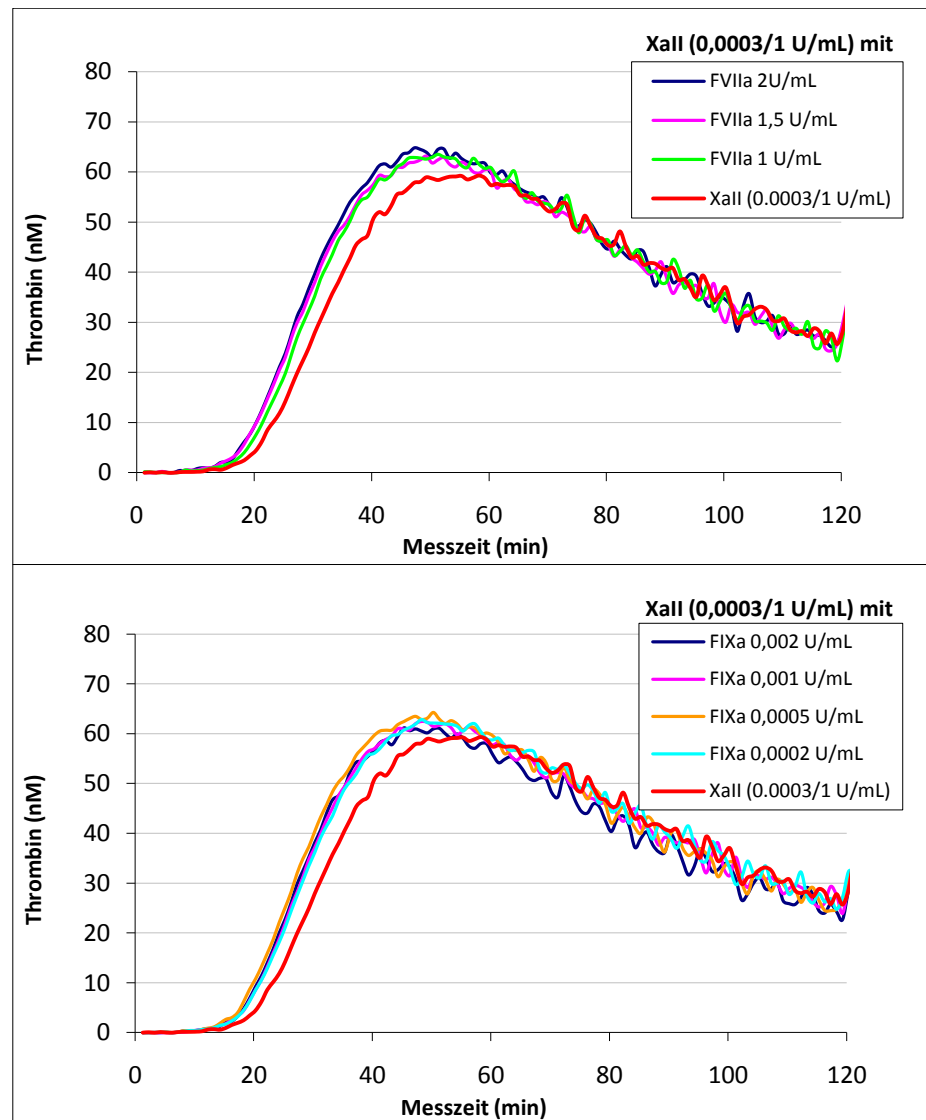


Abbildung 14: FVIIa- und FIXa-Reihe zu XaII (0,0003/1 U/mL); FVIIa (2/1,5/1 U/mL Plasma); FIXa (0,002/0,001/0,0005/0,0002 U/mL Plasma); XaII (0,0003/1 U/mL) wurde gewählt, da für FVIIa und FIXa keine Serien Daten mit XaII (0,0006/1 U/mL) vorliegen; Selbst gesteigerte Konzentrationen von FVIIa und FIXa zeigten keinen unterschiedlichen Effekt auf die Thrombin-Bildung.

FIIa hingegen hatte eine minimale von der Konzentration abhängige Verkürzung der Latenzzeit zur Folge (s. *Abbildung 15*). Ab einer Konzentration von 0,05NIH U/mL im Plasma kam es zu einer sofortigen Bildung eines Gerinnsels. Im APCC liegen aber maximal 0,0008NIH U/mL vor. Darum kann eine zu rasche Auslösung eines Gerinnsels durch den im APCC vorhandenen FIIa ausgeschlossen werden.

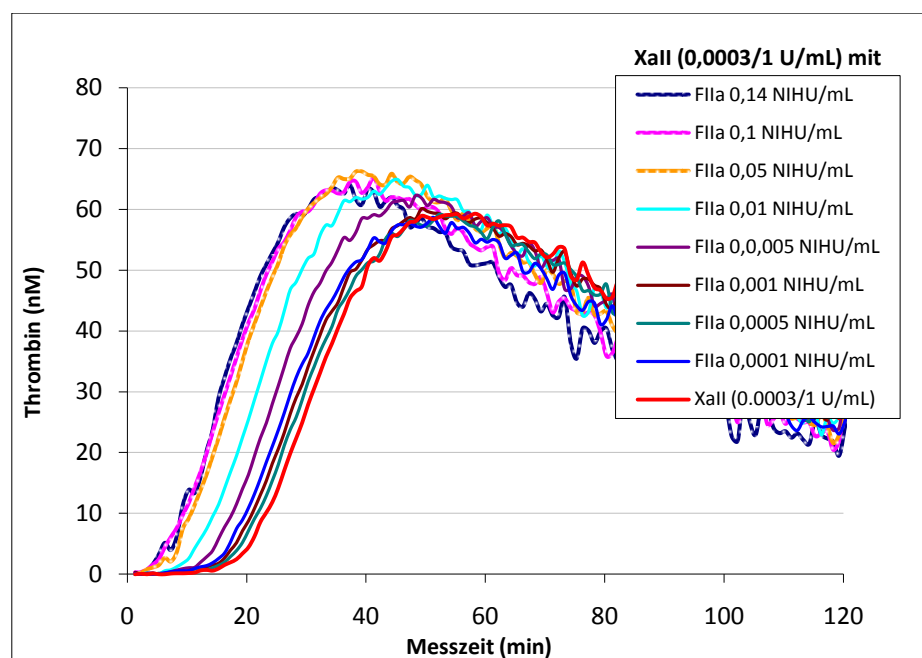


Abbildung 15: FIIa-Reihe zu XaII (0,0003/1 U/mL); XaII (0,0003/1 U/mL) wurde gewählt, da für FIIa keine Serien Daten mit XaII (0,0006/1 U/mL) vorliegen; die gestrichelten Linien sind jene Konzentrationen, bei denen die Thrombin-Zugabe eine baldige Bildung eines Gerinnsels zur Folge hatte. Mit steigender Konzentration verringerte sich die onset time.

4.2.2.3. Basis mit Co-Faktoren

Die Gruppe der Co-Faktoren besteht aus den Faktoren V und VIII. Faktor VIII bildet zusammen mit aktiviertem Faktor IX in Anwesenheit von Phospholipiden und Calcium einen Komplex, welcher Faktor X aktiviert. Aktivierter FX führt in weiterer Folge zu einer Verstärkung der Thrombin-Bildung. Durch die Hemmkörper gegen Faktor VIII sollte FVIII keine Reaktion zeigen. Dies wird in *Abbildung 21* sichtbar. FVIII führt zu keiner gesteigerten Thrombin-Bildung, er reduziert sie sogar leicht. Somit kann FVIII als wirksamkeitsmitbestimmender Faktor ausgeschlossen werden.

Faktor V ist der geschwindigkeitsbestimmende Co-Faktor des Prothrombin-Aktivator-Komplexes (Barthels, et al., 2002), welcher Prothrombin in Thrombin überführt. Er erfährt seine Aktivierung durch aktivierten Faktor X und Thrombin über einen positiven Rückkopplungsmechanismus, durch welchen er komplett aktiviert wird (Hockin, et al., 2002). Er beeinflusst die Thrombin-Bildung vor allem durch die Verringerung der Latenzzeit (Lawson, et al., 1994). Auf die maximale Thrombin-Konzentration hat Faktor V einen leicht positiven Einfluss,

den Zeitpunkt der höchsten Thrombin-Konzentration setzt er ebenfalls herab (s. *Abbildung 16*).

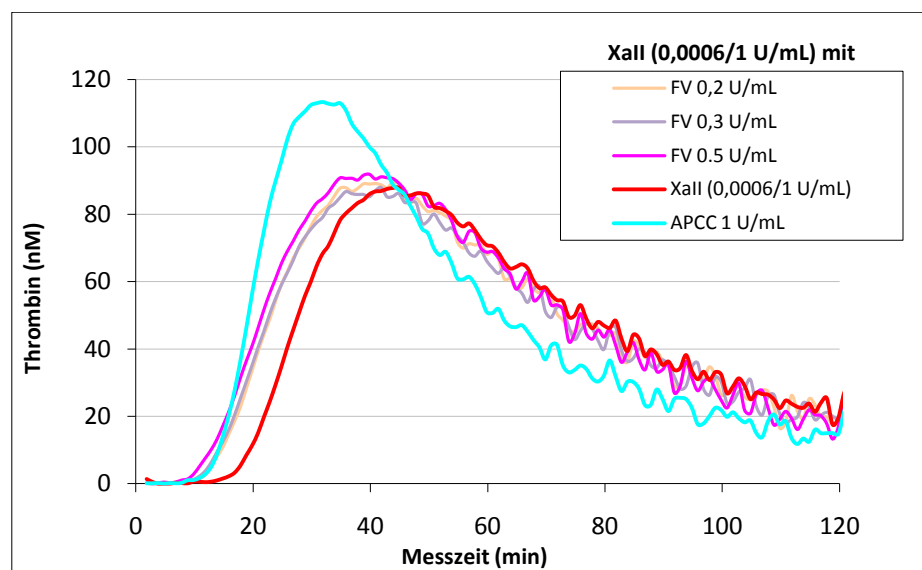


Abbildung 16: Zugabe einer Faktor V – Konzentrationsreihe (0,2/0,3/0,5 U/mL) zu XaII (0,0006/1 U/mL); Man sieht die deutliche Verkürzung der Latenzzeit. Die höchste Thrombin-Konzentration bleibt relativ unverändert.

Die dem Basis-Komplex XaII zugesetzte Konzentrationsreihe von Faktor V zeigt wenig Wirkung auf die maximale Thrombin-Konzentration (s. *Abbildung 16*). Der deutlich sichtbare Effekt ist die Verkürzung der Startzeit der Thrombin-Bildung, wobei eine sehr geringe konzentrationsabhängige Wirkung erkennbar ist. Der konzentrationsabhängige Effekt von Faktor V ist folglich zu vernachlässigen, seine Anwesenheit, unabhängig von der Konzentration, führt zu einer Reduktion der Latenzzeit (Butenas, et al., 1999). Somit ist es vom Faktor V – Präparat abhängig, wie stark die Wirkung auf die Latenzzeit ist (abhängig davon, wie groß der Anteil an bereits aktiviertem Faktor V im Präparat ist). Selbst durch niedrige Konzentrationen kann keine Einstellung der Latenzzeit erfolgen. Die genaue onset time des APCC konnte deshalb nicht erreicht werden.

4.2.2.4. Basis mit Inhibitoren

Diese Gruppe besteht aus den Inhibitoren Protein C (PC) und seinem Co-Faktor Protein S (PS). Ihre Funktion ist die Inaktivierung der Faktoren V und VIII. PC wird durch Thrombin und Thrombomodulin aktiviert und erfüllt seine inhibitorische

Wirkung mit PS als Co-Faktor. Aktiviertes Protein C und Protein S bilden einen Multienzym-Komplex, welcher den aktiven Faktor V inaktiviert (van't Veer, et al., 1997).

Beide Proteine wurden in gleicher Konzentration zugegeben, wie sie im zu untersuchenden APCC vorliegen (s. *Tabelle 1 und Tabelle 2*).

Bei Zugabe zu XaII reduzierten sie die Thrombin-Bildung, ohne einen Einfluss auf die Latenzzeit (van't Veer, et al., 1997) zu haben. Die Zeit zum Erreichen der höchsten Thrombin-Konzentration wurde leicht erhöht (s. *Abbildung 17*).

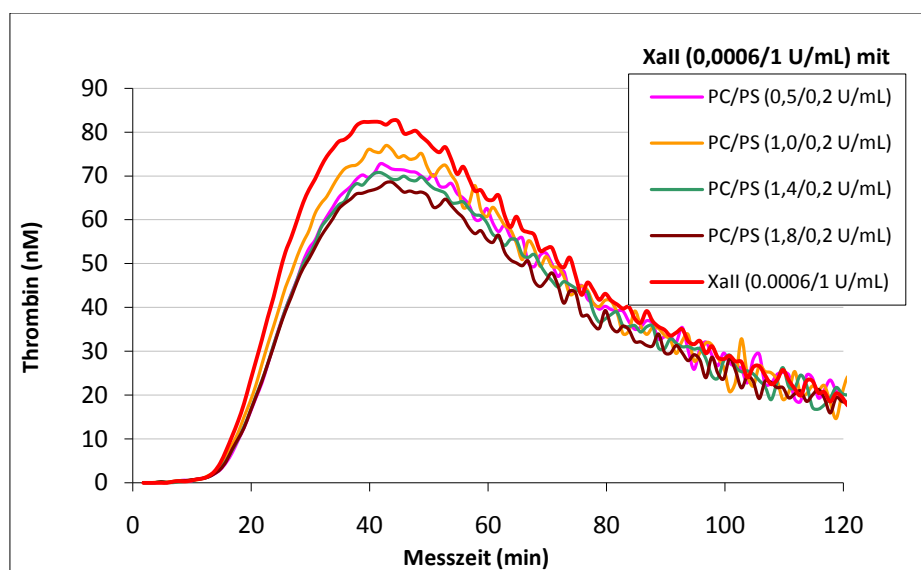


Abbildung 17: Zugabe der Inhibitoren zu XaII (0,0006/1 U/mL), wobei Protein C in steigender Konzentration zugegeben wurde (PC 0,5/1/1,4/1,8 U/mL); Protein S war konstant (PS 0,2 U/mL); der Unterschied im Effekt der steigenden Konzentrationen von Protein C ist zu minimal, als das eine eindeutige Beurteilung, ob eine Konzentrationsabhängigkeit vorhanden ist, möglich ist

Wie in *Abbildung 17* zu sehen, führt die Anwesenheit der Inhibitoren des Protein-C Systems zu einer Senkung der höchsten Thrombin-Bildung. Eine eindeutige Beurteilung, der Konzentrationsabhängigkeit ist nicht möglich. Der Unterschied der Wirkungen zwischen den einzelnen Konzentrationen ist zu gering.

Durch *Abbildung 18* wird ersichtlich, dass die alleinige Zugabe von Protein C keinen Einfluss auf die Thrombin-Bildung hat. Selbst in steigender Konzentration bleibt die Thrombin-Spitze ständig auf gleichem Niveau (Butenas, et al., 1999). Erst eine Zugabe von Protein S löst eine entsprechende Wirkung aus.

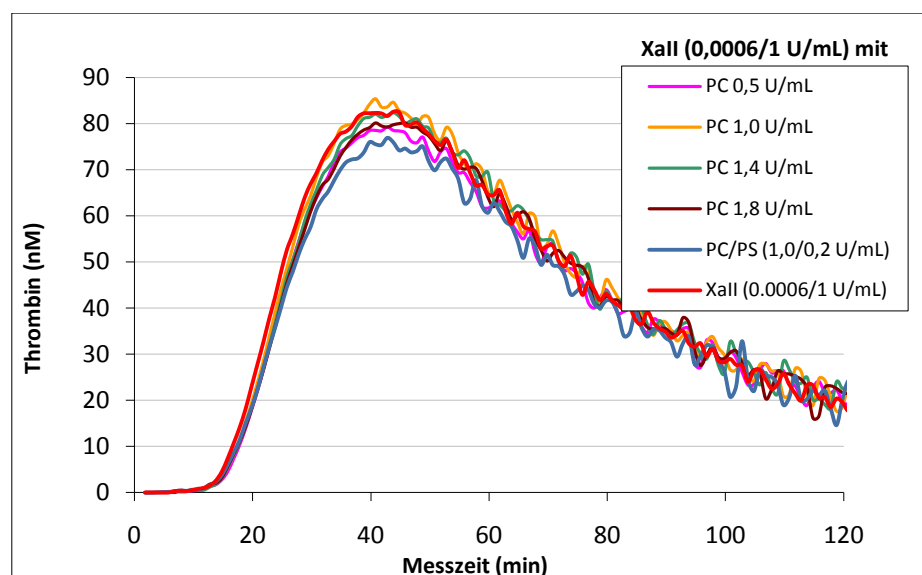


Abbildung 18: Zugabe von Protein C in steigender Konzentration zu XaII (0,0006/1 U/mL) ohne die Beifügung von Protein S; (PC 0,5/1/1,4/1,8 U/mL); Die alleinige Zugabe von PC hat keinen Einfluss auf die Thrombin-Bildung. Erst die Zugabe von PS (PC/PS (1,0/0,2 U/mL) führt zu einer Senkung von peak thrombin.

Protein S alleine zeigt aber sehr wohl eine reduzierende Wirkung auf die Thrombin-Bildung. Setzt man Protein S in verschiedenen Konzentrationen ein, dann ist ein sehr schwacher konzentrationsabhängiger Effekt zu sehen. Je höher die Konzentration von Protein S ist, desto stärker ist der negative Effekt auf die Thrombin-Bildung (s. Abbildung 19). Die alleinige Wirkung von Protein S kommt vermutlich dadurch zustande, dass im verwendeten FVIII-Inhibitor-Plasma Protein C vorliegt.

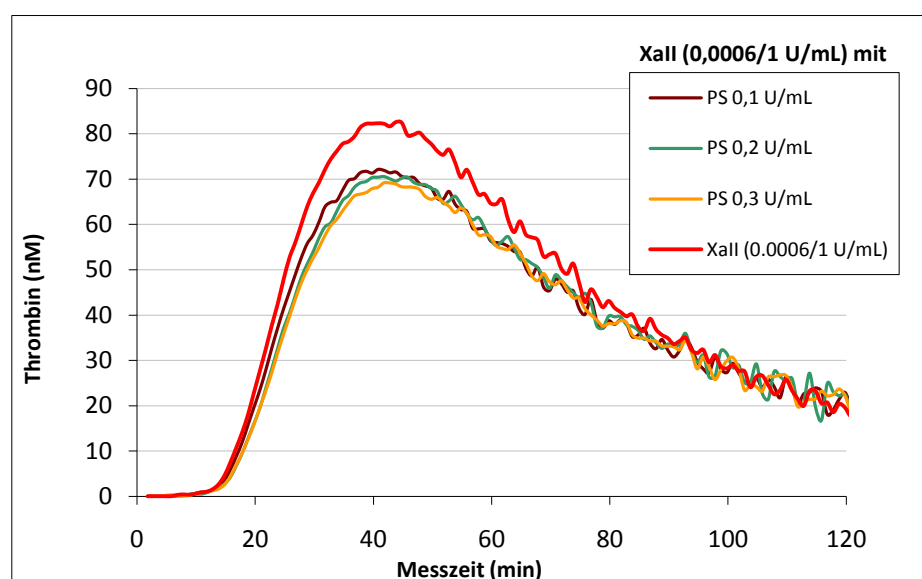


Abbildung 19: Zugabe von Protein S in steigender Konzentration zu XaII (0,0006/1 U/mL) in der Abwesenheit von Protein C; (PS 0,1/0,2/0,3 U/mL); Es ist ein geringer konzentrationsabhängiger Effekt zu sehen.

Der konzentrationsabhängige Effekt von Protein S ist in *Abbildung 19* nur wenig zu sehen, in Kombination mit Faktor V ist diese Reaktion wesentlich deutlicher ausgeprägt (s. *Abbildung 20*). Ebenfalls stärker ausgeprägt ist der reduzierende Effekt des Protein C Systems in Anwesenheit der Zymogene und der aktivierten Faktoren. Auch hier kommt es mit steigender Konzentration von Protein S zu einem immer stärkeren Abfallen der höchsten Thrombin-Konzentration (s. *Abbildung 21*).

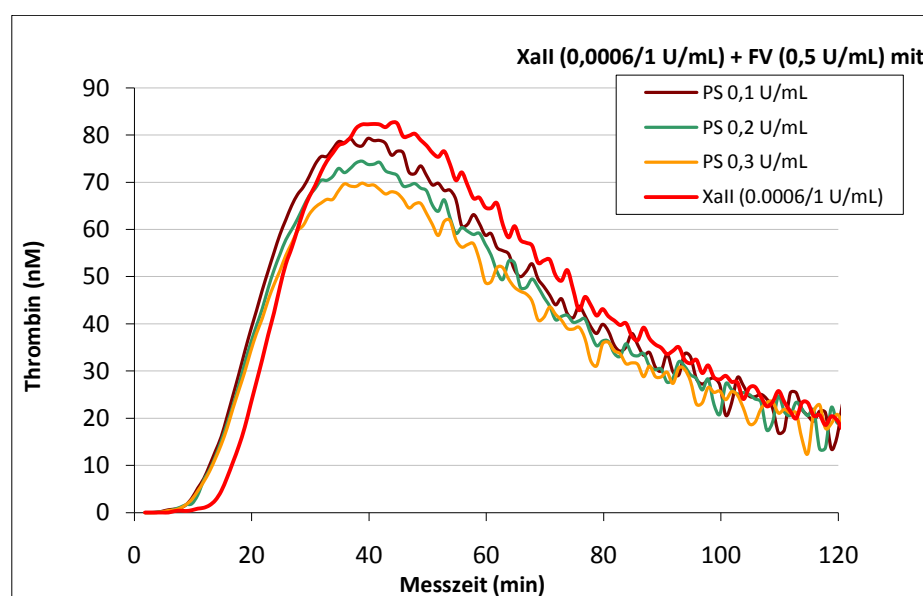


Abbildung 20: Zugabe von Protein S in steigender Konzentration zu XaII (0,0006/1 U/mL) in der Abwesenheit von Protein C; (PS 0,1/0,2/0,3 U/mL); Durch die Anwesenheit von Faktor V (0,5 U/mL) ist die konzentrationsabhängige Reduzierung von peak thrombin durch Protein S deutlich sichtbar. Zusätzlich kommt es durch FV zu einer Verkürzung der onset time.

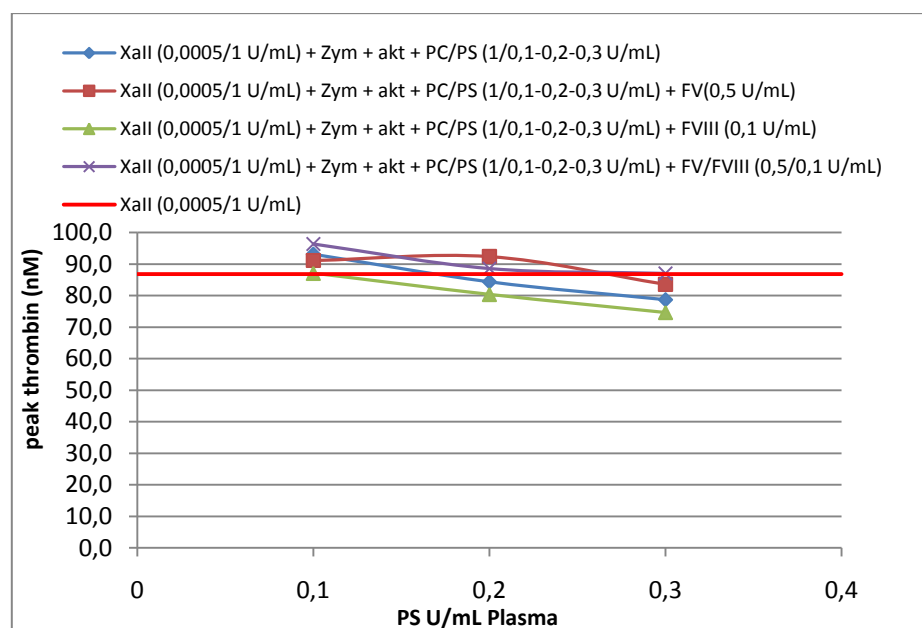


Abbildung 21: Zugabe einer Protein S-Reihe (0,1/0,2/0,3 U/mL) zu einer konstanten Menge an Protein C (1 U/mL) in Anwesenheit von XaII (XaII 0,0005/1 U/mL), den Zymogenen (Zym: VII, IX, X – 1/1,5/1 U/mL) und den aktivierten Faktoren (akt: IIa, 0,0005 NIHU/mL, VIIa, IXa – 1,5/0,001 U/mL); die Co-Faktoren, Faktor V (0,5 U/mL) und Faktor VIII (0,1 U/mL), wurden in verschiedenen Kombinationen zugesetzt. Neben der konzentrationsabhängigen Senkung von peak thrombin durch PS, ist auch der Einfluss der Co-Faktoren deutlich zu sehen. FVIII führt konstant zu einer Abnahme von peak thrombin. FV dagegen steigert peak thrombin.

4.2.2.5. Basis mit Phospholipid

Die Phospholipide (PL) stellen eine Mischung aus 80% (w/w) 1-Palmitoyl-2-Oleoyl Phosphatidyl-Cholin und 20% (w/w) 1-Palmitoyl-2-Oleoyl Phosphatidyl-Serin dar. Die Zusammensetzung und die eingesetzte Konzentration entsprechen der Konzentration im zu untersuchenden APCC (s. *Tabelle 1*).

Die Phospholipide bilden durch ihre negativ geladene Oberfläche die Grundlage für die Bindung der am Prothrombin-Aktivator-Komplex beteiligten Faktoren. Aufgrund dieser den Gerinnungsprozess unterstützenden Eigenschaft werden sie auch als gerinnungsaktive Phospholipide bezeichnet.

Sie steigern bei Zugabe zu XaII insbesondere die Menge an gebildetem Thrombin, beeinflussen peak time und onset time aber kaum (s. *Abbildung 22*).

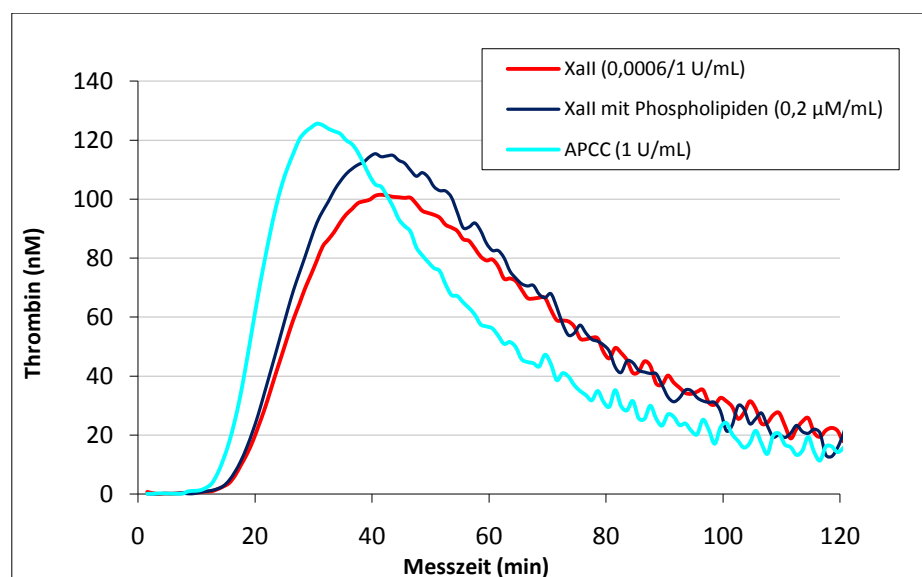


Abbildung 22: Zugabe der Phospholipide zu XaII (0,0006/1 U/mL); (Phospholipide 0,2µM/mL 80% (w/w) 1-Palmitoyl-2-Oleoyl Phosphatidyl-Cholin und 20% (w/w) 1-Palmitoyl-2-Oleoyl Phosphatidyl-Serin); Zugabe der PL führt zu einer Steigerung von peak thrombin

Sie verstärken die Aktivität des Prothrombin-Aktivator-Komplexes vor allem in Kombination mit Faktor V (s. Kapitel 4.2.3.2). Zusätzlich wird die Wirkung der aktivierten Zymogene in Bezug auf die Menge des gebildeten Thrombins durch die Phospholipide wesentlich verstärkt (s. Kapitel 4.2.3.1).

4.2.3. Kombination der Einzelgruppen

Nach der Testung der einzelnen Gruppen und einzelnen Kombinationen, um die jeweilige Funktion zu charakterisieren und mögliche Abhängigkeiten untereinander festzustellen, folgte die Zusammensetzung aller Gruppen in den verschiedenen Kombinationsmöglichkeiten (s. Tabelle 4).

Durch diesen Test konnten alle möglichen Interaktionen geprüft werden. Die Wirkungen der einzelnen Gruppen erfüllten Großteils jene Wirkungen, welche sie schon während der einzelnen Zugabe zu XaII zeigten. Wurde aus der Mischung von allen Gruppen eine Gruppe entfernt, dann präsentierte sich ein Effekt, welcher dem umgekehrten Effekt der Einzelgruppen entsprach (s. Abbildung 23).

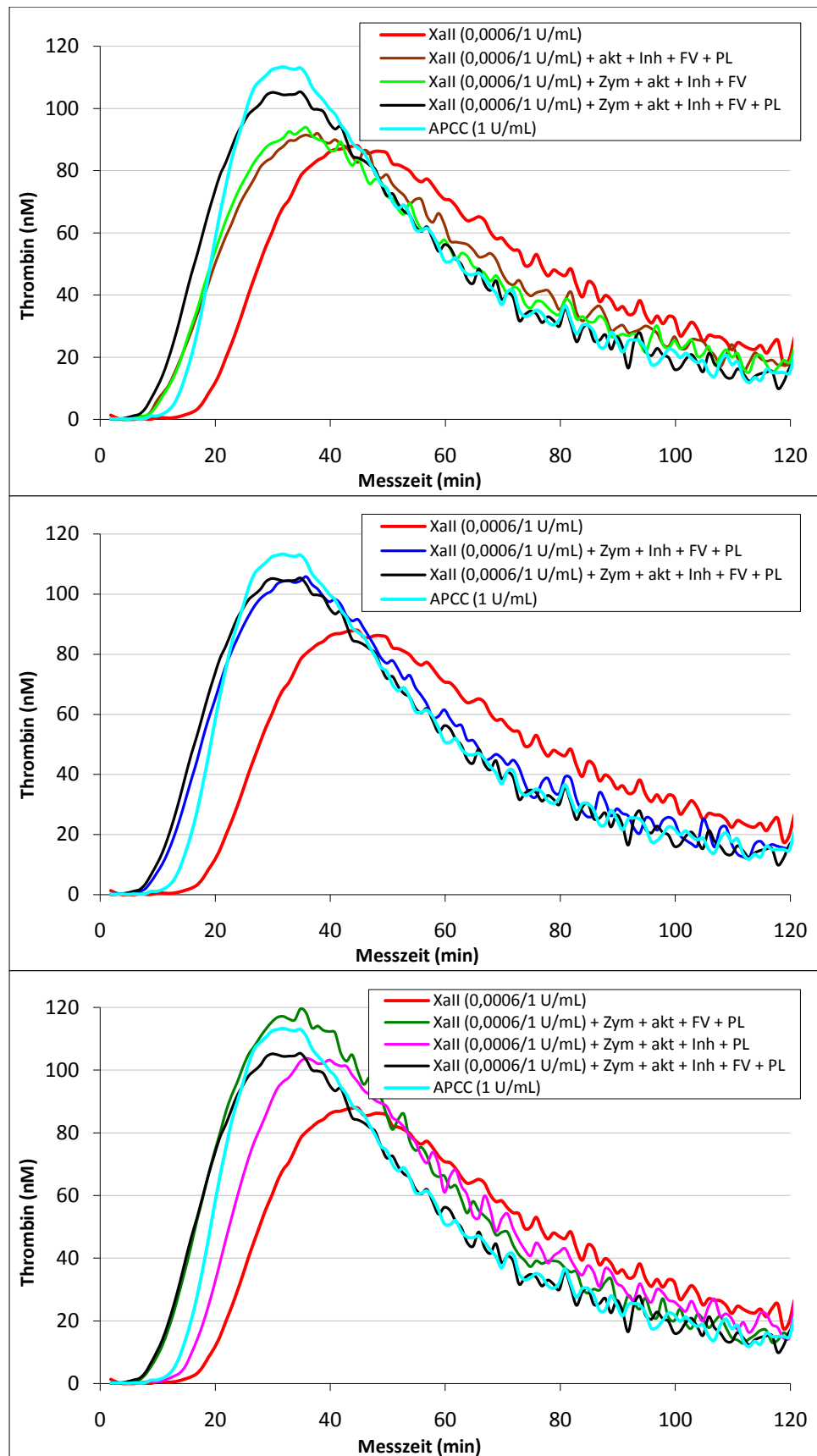


Abbildung 23: Zusammenfügung der Einzelgruppen (schwarze Linie); es wurde jeweils eine Gruppe entfernt, um mögliche Abhängigkeiten feststellen zu können; XaII (0,0006/1 U/mL); Zym (VII,IX,X – 1/1,5/1 U/mL); akt (IIa 0,0005 NIHU/mL, VIIa, IXa – 1,5/0,001 U/mL); FV (0,5 U/mL); Inh (PC, PS – 1/0,2 U/mL); PL (0,2µM/mL (PpC/PpS – 80:20)); APCC (1 U/mL); Oben: die Entfernung sowohl der

Zymogene, als auch der Phospholipide führte zu einer starken Abnahme von peak thrombin und zu einer Verlängerung von peak time und onset time; Mitte: die Entfernung der aktivierten Faktoren führte zu einer minimalen Verlängerung der Latenzzeit; Unten: die Entfernung der Inhibitoren brachte eine wesentliche Steigerung der Thrombin-Bildung mit sich; ohne FV wurde die onset time stark verlängert;

Ohne die Gruppe der Zymogene reduzierte sich die Spitze der Thrombin-Bildung, gleichzeitig flachte die Steigung der Propagierungsphase ab und peak time und die Latenzzeit verlängerten sich. Einen ähnlichen Effekt hatte das Fehlen der Phospholipide. Die Abwesenheit der aktivierten Faktoren brachte nur eine leichte Verlängerung der Latenzzeit. Das Fehlen der Inhibitoren zeigte sich in einem massiven Anstieg der Thrombin-Bildung, welcher sogar die Werte des zu untersuchenden APCC übertraf. Ohne Faktor V kam es zu einer wesentlichen Verlängerung der Latenzzeit und somit gleichfalls zu einer Verlängerung der peak time.

Das Mischen der einzelnen Gruppen zeigte zum größten Teil nur eine Addition oder eine Subtraktion der einzelnen Wirkungen. Nur die Kombination der Zymogene mit Phospholipid (*s. Kapitel 4.2.3.1*) und vor allem die von Faktor V ebenfalls mit Phospholipid (*s. Kapitel 4.2.3.2*) führte zu einer synergistischen Wirkungssteigerung. Diese übertraf den Effekt der einzelnen Zugabe deutlich.

4.2.3.1. Synergistische Effekte – Kombinationen der Zymogene mit Phospholipid

Kombiniert man die Gruppe der Zymogene mit der der Phospholipide, dann werden zwar peak time und onset time nur wenig bis gar nicht zusätzlich beeinflusst, aber peak thrombin wird stark erhöht. Beide Gruppen alleine erhöhen die maximal erreichte Thrombin-Konzentration, in Kombination potenziert sich ihre Wirkung über die Summe der einzelnen Wirkungen (*s. Abbildung 24*). Dieser Effekt kann auf die erhöhte Bildung des Prothrombin-Aktivator-Komplexes zurückgeführt werden. Nach der Aktivierung von Faktor X kann dieser mit aktiviertem Faktor V in Gegenwart der negativ geladenen Oberflächen der Phospholipide und Calcium einen Komplex bilden, welcher maßgeblich die Umwandlung von Prothrombin zu Thrombin fördert.

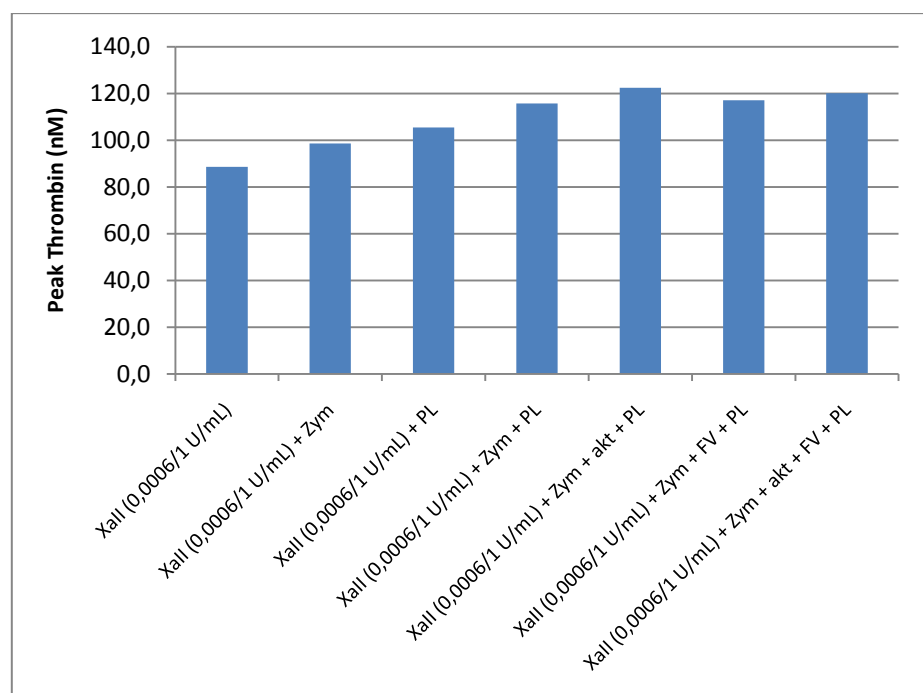


Abbildung 24: Kombination der Zymogene (VII, IX, X – 1/1,5/1 U/mL) mit Phospholipiden (0,2µM/mL (PpC/PpS – 80:20)) in Gegenwart von XaII (0,0006/1 U/mL); Peak Thrombin wird durch Zymogene und Phospholipide auf ein Level angehoben, welches dem Level der Kombination aller Gruppen ohne Inhibitoren entspricht; akt (IIa 0,0005 NIHU/mL, VIIa, IXa – 1,5/0,001 U/mL); FV (0,5 U/mL);

Die aktivierten Faktoren und Faktor V haben grundsätzlich auch einen positiven Einfluss auf die höchste gebildete Thrombin-Konzentration, ihr Einfluss ist aber bei weitem nicht so stark ausgeprägt, wie der der Zymogene und Phospholipide.

4.2.3.2. Synergistische Effekte – Einfluss von Faktor V auf Peak Time und Onset Time

Faktor V verringert die peak time nur geringfügig. Sobald er aber mit den Phospholipiden kombiniert wird, welche die peak time nicht beeinflussen, kommt es zu einem sehr starken Rückgang der peak time (*s. Abbildung 25*) (Béguin, et al., 1989). Dies kann auf die Komplexbildung des Prothrombin-Aktivator-Komplexes zurückgeführt werden.

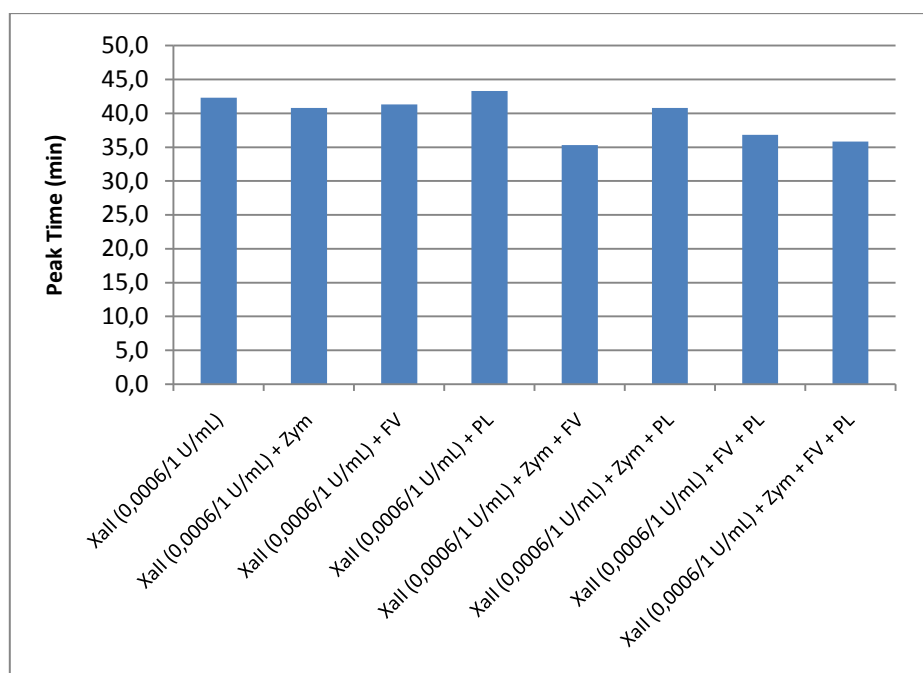


Abbildung 25: synergistische Effekte der Zymogene (VII, IX, X – 1/1,5/1 U/mL) und Phospholipide (0,2µM/mL (PpC/PpS – 80:20)) mit FV (0,5 U/mL) in der Gegenwart von XaII (0,0006/1 U/mL); verstärkte Senkung von peak time durch Kombination der Zymogene oder Phospholipide mit FV im Vergleich zu ihrer einzelnen Zugabe zu XaII;

Wie aus *Abbildung 25* ersichtlich führt auch die Kombination von Faktor V mit den Zymogenen zu einer verstärkten Verkürzung der peak time. Dies kann ebenfalls mit der Bildung des Prothrombin-Aktivator-Komplexes begründet werden.

In beiden Fällen, ist die Wirkung der einzelnen Gruppen bei weitem nicht so stark ausgeprägt, wie in Kombination. Die Zymogene zusammen mit Phospholipid ergeben keine verstärkte Senkung der peak time. Ihr gemeinsamer Effekt entspricht der senkenden Wirkung der Zymogene alleine. Weiter auffallend ist die Tatsache, dass die Gruppe der aktivierten Faktoren, welche bei alleiniger Zugabe zu XaII kaum eine Reaktion zeigen, einen ähnlichen Effekt in Kombination mit Faktor V hervorrufen, wie die Zymogene (*s. Abbildung 26*). Sie führen also ebenfalls zu einer starken Reduktion der peak time in Verbindung mit Co-Faktor V.

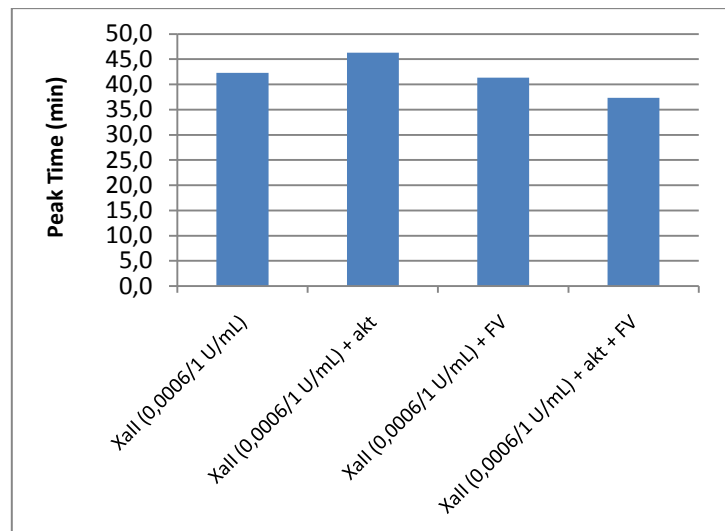


Abbildung 26: Kombination der aktivierten Faktoren (IIa 0,0005 NIHU/mL, VIIa, IXa – 1,5/0,001 U/mL) mit Faktor V (0,5 U/mL) in Gegenwart von XaII (0,0006/1 U/mL); verstärkte Senkung der peak time durch Kombination der aktivierten Faktoren mit FV

Die Anwesenheit von Faktor V ist in allen Kombinationen für einen verkürzenden Effekt auf die peak time Voraussetzung. Man sieht hier also deutlich, wie schon eingangs erwähnt, dass Faktor V die geschwindigkeitsbestimmende Macht ist.

Die Latenzzeit erfährt gleichfalls eine ähnlich verstärkte Verkürzung, wobei Faktor V grundsätzlich schon alleine eine starke Senkung der Latenzzeit hervorruft. Auch hier haben die einzelnen Gruppen alleine keinen starken Effekt, erst in Kombination kommt es zu einer Potenzierung ihrer Wirkung (s. *Abbildung 27*). Der Effekt der aktiv-Faktoren entspricht hier wiederum dem der Zymogene.

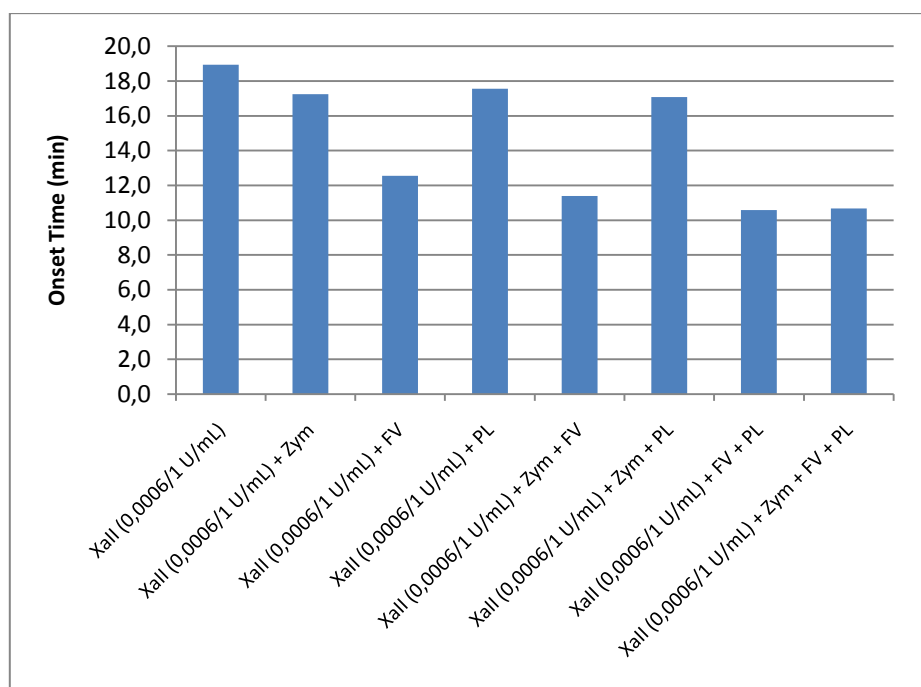


Abbildung 27: synergistische Effekte der Zymogene (VII, IX, X – 1/1,5/1 U/mL) und Phospholipide (0,2µM/mL (PpC/PpS – 80:20)) mit FV (0,5 U/mL) in der Gegenwart von XaII (0,0006/1 U/mL); verstärkte Senkung der onset time durch Kombination der Zymogene oder Phospholipide mit FV im Vergleich zu ihrer einzelnen Zugabe zu XaII;

Ein weiterer Effekt von Faktor V ist die Reduzierung, der durch das Protein C System verursachten Steigerung der peak time. Faktor V hat nur einen leicht reduzierenden Effekt auf die peak time. Mischt man den Komplex XaII mit der Inhibitor-Gruppe, dann ist eine starke Anhebung der peak time die Folge. Obwohl Faktor V alleine mit XaII nur eine geringe Wirkung auf die peak time hat, kann er die durch die Inhibitoren hervorgerufene Steigerung der peak time wesentlich dezimieren (*s. Abbildung 28*). Dieser Effekt kann wieder darauf zurückgeführt werden, dass durch den geschwindigkeitsbestimmenden Effekt von Faktor V auf den Prothrombin-Aktivator-Komplex während der Propagierungsphase vermehrt Thrombin umgesetzt wird. Im Faktor VIII-Inhibitorplasma ist eine grundsätzliche Menge den Inhibitoren des Protein C Systems vorhanden, welche durch weitere äußere Zugabe von Protein C und S in ein Missverhältnis zu den anderen Faktoren gerät. Die Zugabe von Faktor V gleicht dieses Ungleichgewicht wieder aus.

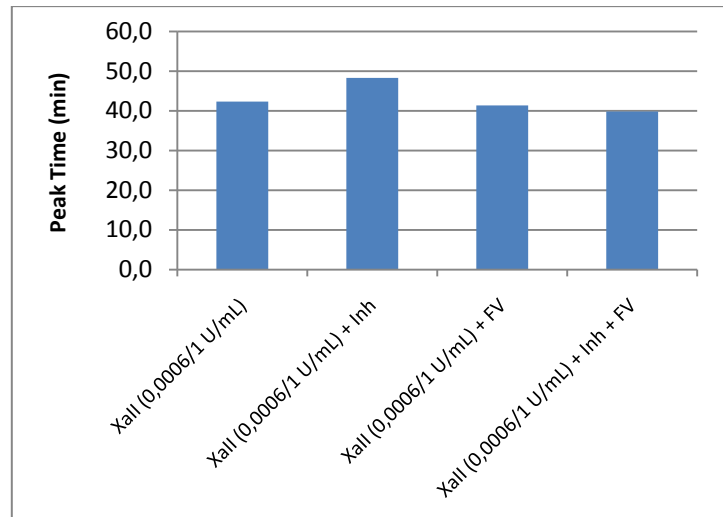


Abbildung 28: Kombination der Inhibitoren (PC, PS – 1/0,2 U/mL) mit Faktor V (0,5 U/mL) in Gegenwart von XaII (0,0006/1 U/mL); Faktor V reduziert die, durch die Inhibitoren hervorgerufene Steigerung der peak time;

4.2.3.3. Zusammensetzen der Gruppen zum „künstlichen“ APCC

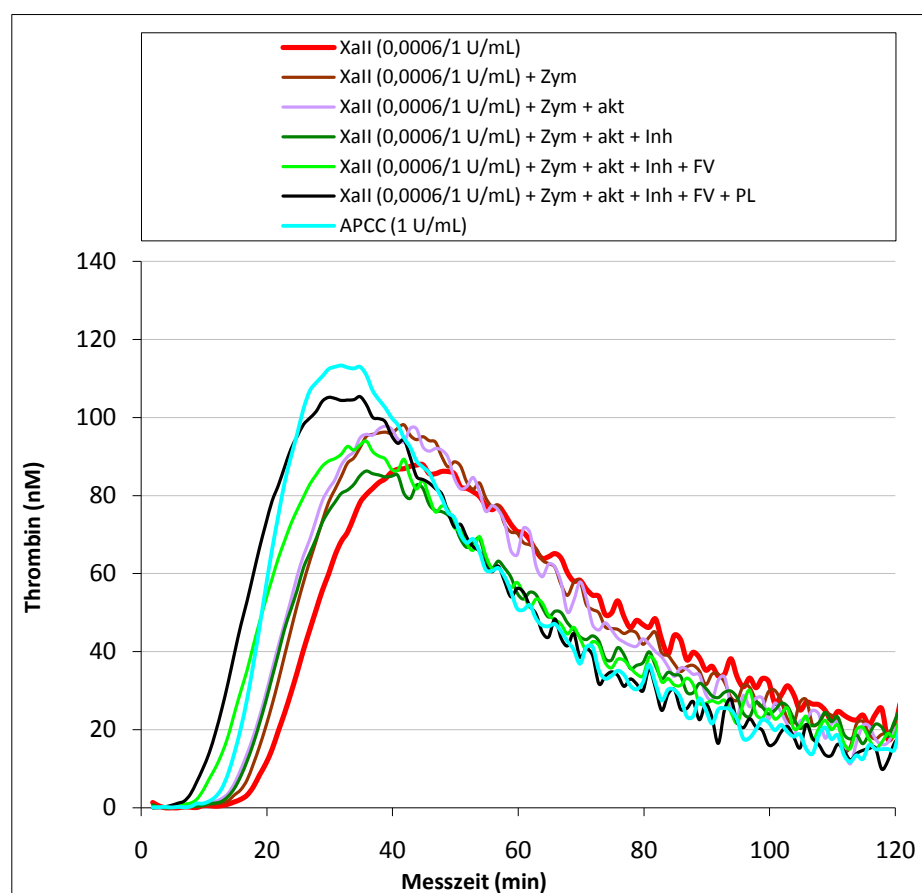


Abbildung 29: schrittweises Zusammensetzen der einzelnen Komponenten zum künstlichen APCC; XaII (0,0006/1 U/mL); Zym (VII,IX,X – 1/1,5/1 U/mL); akt (IIa 0,0005 NIHU/mL, VIIa, IXa – 1,5/0,001 U/mL); FV (0,5 U/mL); Inh (PC, PS – 1/0,2 U/mL); PL (0,2µM/mL (PpC/PpS – 80:20)); APCC (1 U/mL); die Zymogene steigerten die TG und senkten peak time und onset time; die aktivierten Faktoren reduzierten lediglich die peak time geringfügig; die Inhibitoren senkten die TG, ohne peak time und onset time zu beeinflussen; FV reduzierte peak time und onset time und erhöhte die TG; die Phospholipide führten ebenfalls zu einer wesentlichen Steigerung der TG;

Die Zugabe der Zymogene führte zu einer starken Steigerung der Thrombin-Bildung, zu einer Senkung der peak time und der onset time. Es wird somit in der Propagierungsphase vermehrt und schneller Thrombin gebildet. Sie sind folglich ein wesentlicher Bestandteil des APCC. Die aktivierten Faktoren haben nur eine geringe Senkung der Latenzzeit zur Folge. Die Inhibitoren führen zu einer Senkung der Thrombin-Bildung, ohne die peak time oder die onset time zu beeinflussen. Faktor V verkürzte relativ unabhängig von seiner Konzentration die Latenzzeit. Dadurch konnte die onset time des Originalpräparates nicht erreicht werden. Er verkürzte aber auch die peak time und außerdem erhöhte er die Thrombin-Bildung. Die Beimengung der Phospholipide führte zu einem starken Anstieg der maximalen Thrombin-Konzentration, welcher fast jene Thrombin-Konzentration erreichte, die dem untersuchten APCC entsprach.

5. Schlussfolgerungen und Perspektiven

Im Rahmen dieser Diplomarbeit konnten die Funktionen der prokoagulatorischen Bestandteile eines kommerziell erhältlichen APCC, welches zur Inhibitorthherapie bei hämophilen Patienten eingesetzt wird, erfolgreich charakterisiert werden. Dies wurde mit Hilfe eines TGAs erreicht. Dieser Test simuliert die physiologische Thrombin-Bildung und zeigt sämtliche Aktivierungs- und Inaktivierungsschritte der Thrombin-Bildung an. Zusätzlich sollte auch der Einfluss der mengenmäßig dominierenden Proteine, IATi und VN, im APCC untersucht werden.

Zur Bestimmung der Thrombin-Bildung, mittels TGA, wurde plättchenarmes Plasma (PPP) verwendet. Dies ermöglichte die Untersuchung der Wechselwirkung zwischen den Einzelfaktoren ohne störende Einflüsse von zellulären Bestandteilen. Dadurch wird die Zugabe von Phospholipiden nötig, da unter physiologischen Bedingungen die Blutplättchen diese bereit stellen würden. Im direkten Vergleich besitzen die Thrombozyten jedoch komplexe koagulatorische Eigenschaften, die die Phospholipide nicht nachahmen können (Monroe, et al., 2002), zusätzlich werden sie auch nicht aktiviert und stellen deshalb die negativ geladene Oberfläche von der Zugabe an zu Verfügung. Im Blut zirkulierende Mikropartikel, die einen wesentlichen Einfluss auf die Blutgerinnung besitzen (VanWijk, et al., 2003) (Müller, et al., 2003) (Berckmans, et al., 2001), werden somit auch nicht berücksichtigt. Mikropartikel sind durch Exozytose freigesetzte Fragmente der Zellmembran (werden von verschiedenen Zellen gebildet: Blutplättchen, Leukozyten, Erythrozyten, vaskuläre glatte Muskelzellen, Endothelzellen), die spezielle Merkmale ihrer Ursprungszelle besitzen (Gemmell, et al., 1993) (Müller, et al., 2003). Ihre negativ geladene Oberfläche ermöglicht ebenso wie die der Blutplättchen die Bindung der Blutgerinnungsfaktoren, oder des Tenase- oder Prothrombinase-Komplexes. Sie exprimieren an ihrer Oberfläche gleichermaßen Tissue Factor wie die Thrombozyten (Müller, et al., 2003). Aus diesen Gründen wäre die Verwendung von plättchenreichem Plasma (PRP) oder sogar Vollblut essentiell, da damit die physiologischen Prozesse besser nachempfunden werden könnten. Zusätzlich wären Untersuchungen unter Flussbedingungen und den dabei auftretenden Scherkräften aufschlussreich (VWF z.B. entfaltet seine Aktivität umso stärker, je höher die Scherkräfte sind (Schneider, et al., 2007).

Zur Feststellung, ob IATi oder VN aufgrund ihrer Menge oder ihrer Funktion einen Einfluss auf die Wirkung haben, wurden sie vom Originalpräparat (APCC) mittels IAC abgetrennt.

Die Bestimmung der Konzentration mittels ELISA zeigte, dass sämtliche im APCC enthaltenen Proteine reduziert wurden, was mit dem Verlust der Aktivität einher ging. Dies konnte mit den im Material und Methoden Kapitel beschriebenen Gerinnungstests bestätigt werden. Die Reaktionsbedingungen der IAC führten somit zu einer Verringerung der Aktivität des APCCs. Bei weiteren Tests mit dem TGA konnte dieses Ergebnis verifiziert werden (*s. Abbildung 3, Abbildung 4 und Abbildung 5*). Deswegen war es nicht möglich mit Hilfe dieser Testserien, die Einflüsse von IATI und VN auf die Wirkung des APCC zu bestimmen.

Um die Charakterisierung der Bestandteile zu realisieren wurden die Bestandteile des APCCs, welche seine Wirkung am wesentlichsten beeinflussen sollten, in den verschiedensten Kombinationen und Konzentrationen zusammengefügt. Die Bestimmung der Aktivität mittels eines TGAs erfolgte in einem Faktor VIII Inhibitor-Plasma, welches mit einem hochkonzentrierten Faktor VIII-Inhibitor versetzt war (PPP). Zur systematischen Untersuchung der Eigenschaften der Komponenten des zu untersuchenden Präparats wurde ihre physiologische Einteilung in Zymogene, den aktivierten Formen, den Inhibitoren, den Co-Faktoren und den Phospholipiden als Gruppeneinteilung gewählt. Die Konzentrationen wurden so gewählt, dass sie den Konzentrationen im APCC entsprachen. Die Variationen der Konzentrationen der Faktoren während der Tests entsprachen den Schwankungen ihrer Konzentrationen im APCC.

Der Enzym-Substrat Komplex von Faktor II und aktiviertem Faktor X (XaII) in einem molekularen Verhältnis von 1 : 20.000 (entsprechend dem Verhältnis im APCC) wurde als Basis genommen, da diese beiden Faktoren, wie in vorhergehenden Studien erwiesen werden konnte, die Hauptwirkkomponenten sind. Minimale Steigerungen der Konzentration von Faktor Xa führten bereits, bei gleich bleibender Konzentration von Faktor II, zu einem, dem APCC, ähnlichen Effekt auf die Thrombin-Bildung im Faktor VIII-Inhibitor-Plasma (*s. Abbildung 10*). Bei der Gegenüberstellung der beiden Thrombin-Bildungs-Kurven (APCC und Faktor Xa / II) zeigte sich, dass die Kurve von XaII eine verlängerte Onset-time, einen verringerten Peak-thrombin und eine verzögerte Inaktivierungsphase besitzt. Im Vergleich zu ihrer Kombination bewirkten beide Faktoren einzeln keine annähernd gleich starke Wirkung.

Die Zugabe der anderen Zymogene (Faktor VII, X und IX) führte zu einer gesteigerten Thrombin-Bildung und zu einer Verkürzung der Onset-time. Einzig Faktor IX zeigte durch einen kompetitiven Antagonismus zu Faktor X einen negativen Effekt (*s. Abbildung 13*) (Butenas, et al., 1999). Verschiedene Konzentrationen der einzelnen Zymogene zeigten kaum eine

Wirkung, woraus geschlossen werden kann, dass ihre Wirkung relativ unabhängig von ihrer Konzentration ist. Die aktivierten Faktoren hatten keinen weiteren Effekt auf die Thrombin-Bildung.

Faktor V (Co-Faktor) führte zu einer deutlichen Reduktion der onset time, wobei er in Kombination mit den Phospholipiden einen synergistischen Effekt in Bezug auf peak- und auch onset time hatte (Béguin, et al., 1989) (s. *Abbildung 16 / Abbildung 25*). Die Phospholipide alleine bewirkten eine konzentrationsabhängige Steigerung der Thrombin-Bildung (peak thrombin) (s. *Abbildung 17*). Die Inhibitoren (Protein C und sein Co-Faktor Protein S) senkten peak thrombin ohne onset time und peak time wesentlich zu beeinflussen (s. *Abbildung 22*).

Erst die vollständige Komposition aller Gruppen resultierte in einer dem APCC vergleichbaren Thrombin-Bildung, sowohl in der Aktivierungs-, als auch in der Inaktivierungsphase (s. *Abbildung 30*).

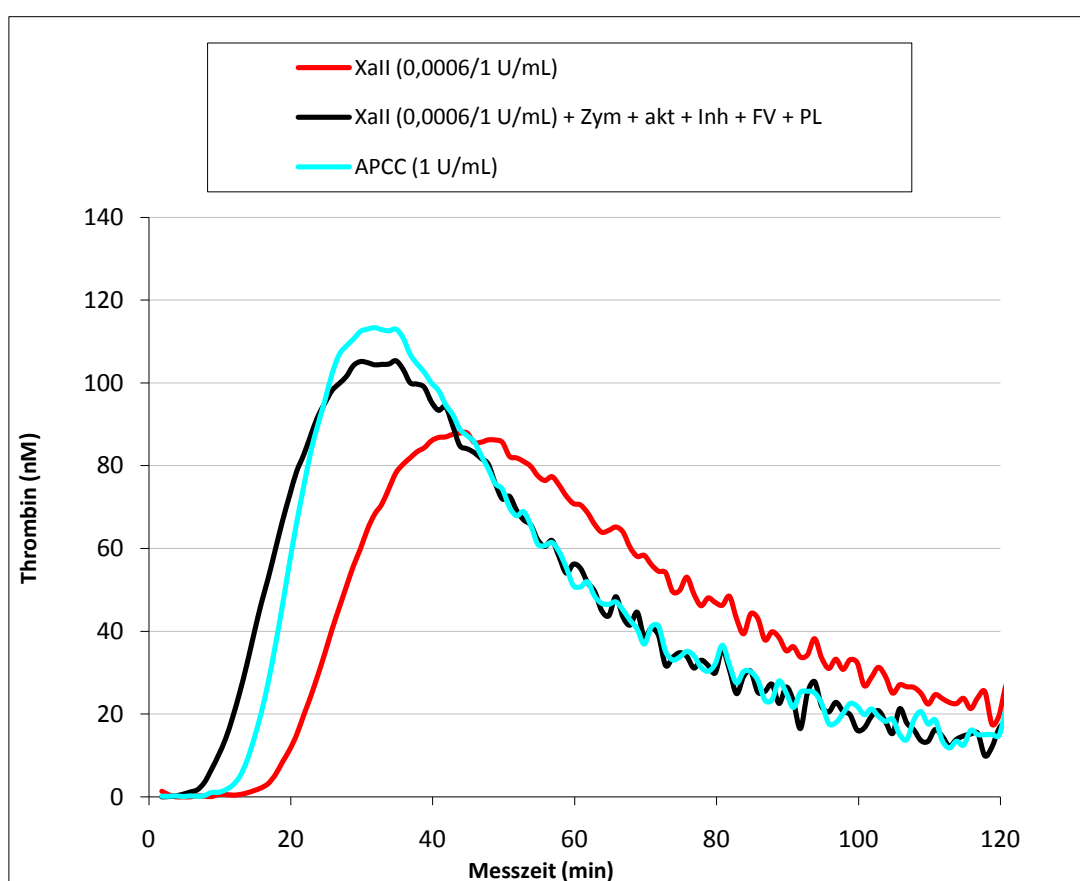


Abbildung 30: Enzym-Substrat-Komplex XaII in einem molaren Verhältnis von 1:20.000 mit Zugabe aller hämostatischen Komponenten (= künstliches APCC) im Vergleich zum untersuchenden Originalpräparat (APCC); XaII (0,0006/1 U/mL); Zym (VII,IX,X – 1/1,5/1 U/mL); akt (IIa 0,0005 NIHU/mL, VIIa, IXa – 1,5/0,001 U/mL); FV (0,5 U/mL); Inh (PC, PS – 1/0,2 U/mL); PL (0,2µM/mL (PpC/PpS – 80:20)); APCC (1 U/mL);

6. Anhang

6.1. Abkürzungen

AD	American Diagnostica Inc.
AICCA	Anti Inhibitor Coagulant Complex Activity
akt	Aktivierete Faktoren
APC	Aktiviertes Protein C
APCC	Aktiviertes Prothrombinkomplexkonzentrat
aPTZ	Aktivierete partielle Thromboplastinzeit
AUC	Area under the curve
BE	Bethesda-Einheit
Co	Co-Faktoren
DAPTTIN	Double-Activated Partial Thromboplastin Time-Reagens
ELISA	Enzyme linked Immuno Sorbent Assay
ERL	Enzyme Research Laboratories
ETP	endogenous thrombin potential
F	Faktor
FVIII-IP	Faktor VIII Inhibitor-Plasma
HMWK	high molecular weight kininogen
HNaBSA	Hepes-NaCl-buffer - Bovine Serum Albumin
IAC	Immunaffinitätschromatographie
IATI	Inter α -Trypsin-Inhibitor
I.E.	Internationale Einheit
Ig	Immunglobulin
Inh	Inhibitoren
INR	International Normalized Ratio
ISI	International Sensitivity Index
ITT	Immuntoleranztherapie
M	Molarität
NIH	National Institute of Health
PAF	Plättchen-aktivierender Faktor
PAI-1	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor
PC	Protein C

PpC/PpS – 80:20	Phosphatidyl-Cholin / Phosphatidyl-Serin in einem Verhältnis von 80 zu 20 Teilen
PF	Plättchenfaktor
PGI-2	Prostacyclin
PL	Phospholipid
PPP	plättchenarmes Plasma
PRP	plättchenreiches Plasma
PS	Protein S
RFU	relative fluorescence unit
rFVIIa	Rekombinanter Faktor VIIa
rTF	Rekombinanter Tissue Factor
RVV	Russell's viper venom
SRS	Standards and Reagents Service
TAFI	Thrombin aktivierter Fibrinolyse Inhibitor
TF	Tissue Factor
TFPI	tissue factor pathway inhibitor
TFPL	Tissue Factor-Phospholipid-Präparat
TG	Thrombin-Bildung (Generation)
TGA	Thrombin Generation Assay
t-PA	tissue plasminogen activator
TPZ	Thromboplastinzeit
U	Unit
VN	Vitronektin
VWF	Von-Willebrand-Faktor
Zym	Zymogen

6.2. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Gerinnungskaskade (Hick, et al., 2006).....	17
Abbildung 2: Kurve a: RFU pro Zeiteinheit – Kurve b: Thrombin-Kurve, durch Berechnung der 1. Ableitung aus Kurve a erhalten	29
Abbildung 3: Gegenüberstellung der Verdünnungsreihen der Kontrollpräparation (MOCK) und der des APCC. Die Verdünnungen beziehen sich auf die Gesamtproteinmenge (mg/mL) des APCCs bzw. der MOCK-Präparation. Die dünnen Linien entsprechen den TG-Kurven des APCC, die dicken Linien denen der MOCK-Präparation.	49
Abbildung 4: Gegenüberstellung der Verdünnungsreihen von IATI-depleted und der des APCC. Die Verdünnungen beziehen sich auf die Gesamtproteinmenge (mg/mL) des APCCs bzw. der IATI abgereicherten Probe. Die dünnen Linien entsprechen den TG-Kurven des APCC, die dicken Linien denen von IATI-depleted.....	49
Abbildung 5: Gegenüberstellung der Verdünnungsreihen von VN-depleted und der des APCC. Die Verdünnungen beziehen sich auf die Gesamtproteinmenge (mg/mL) des APCCs bzw. der VN abgereicherten Probe. Die dünnen Linien entsprechen den TG-Kurven des APCC, die dicken Linien denen von VN-depleted.	50
Abbildung 6: Gegenüberstellung der Verdünnungsreihen der Kontrolle (MOCK) und der von IATI-depleted. Die Verdünnungen beziehen sich auf die Gesamtproteinmenge (mg/mL) der Kontrolle bzw. der IATI abgereicherten Probe. Die dünnen Linien entsprechen den TG-Kurven der Kontrolle, die dicken Linien denen von IATI-depleted.....	50
Abbildung 7: Gegenüberstellung der Verdünnungsreihen der Kontrolle (MOCK) und der von VN-depleted. Die Verdünnungen beziehen sich auf die Gesamtproteinmenge (mg/mL) der Kontrolle bzw. der VN abgereicherten Probe. Die dünnen Linien entsprechen den TG-Kurven der Kontrolle, die dicken Linien denen von VN-depleted.	51
Abbildung 8: Faktor II-Konzentrationsreihe: schrittweises erhöhen der FII-Konzentration (U/mL) im FVIII-Inhibitorplasma	53
Abbildung 9: Faktor Xa-Konzentrationsreihe: schrittweises erhöhen der FXa-Konzentration (U/mL) im FVIII-Inhibitorplasma	54
Abbildung 10: FXa-Reihe mit konstantem FII (1 U/mL) im FVIII-Inhibitorplasma; die dicke rote Linie entspricht einem molaren Verhältnis von 1:35000 zwischen FXa und FII, die dicke gelbe Linie entspricht dem molaren Verhältnis von 1:20000; PNP = Pooled Normal Plasma; FVIII-IP = FVIII-Inhibitorplasma; das APCC wurde auf eine FII-Konzentration von 1 U/mL eingestellt;	55
Abbildung 11: Basis mit Zymogenen im FVIII-IP: XaII liegen hier in einem molaren Verhältnis von 1 : 20000 vor (FXa 0,0006 U/mL / FII 1 U/mL); die Zymogene (FVII, FIX, FX) wurden mit	

Konzentrationen von 1/1,5/1 U/mL im Plasma eingesetzt; die Zugabe der Zymogene zu XaII führt zu einer Steigerung von peak thrombin und zu einer Verkürzung von onset time und peak time. 56

Abbildung 12: Faktoren VII, IX und X (1/1,5/1 U/mL) wurden einzeln zu XaII (0,0006/1 U/mL) zugegeben. Die durchgehenden Linien entsprechen XaII. Man sieht deutlich, dass die Faktoren VII und v.a. X die Thrombin-Konzentration anheben, und peak time und onset time senken. FIX hingegen zeigt einen genau gegenteiligen Effekt. 57

Abbildung 13: XaII (0,0006/1 U/mL) mit allen Kombinationsmöglichkeiten der Zymogene (VII, IX, X – 1/1,5/1 U/mL); die Zugabe von FX und FVII führte jeweils zu einer Erhöhung von peak thrombin und einer Verkürzung von peak time und onset time. Eine FIX-Zugabe reduzierte diese Werte. Erst die Zugabe von FVII und FX hob den Effekt von FIX auf..... 59

Abbildung 14: FVIIa- und FIXa-Reihe zu XaII (0,0003/1 U/mL); FVIIa (2/1,5/1 U/mL Plasma); FIXa (0,002/0,001/0,0005/0,0002 U/mL Plasma); XaII (0,0003/1 U/mL) wurde gewählt, da für FVIIa und FIXa keine Serien Daten mit XaII (0,0006/1 U/mL) vorliegen; Selbst gesteigerte Konzentrationen von FVIIa und FIXa zeigten keinen unterschiedlichen Effekt auf die Thrombin-Bildung. 60

Abbildung 15: FIIa-Reihe zu XaII (0,0003/1 U/mL); XaII (0,0003/1 U/mL) wurde gewählt, da für FIIa keine Serien Daten mit XaII (0,0006/1 U/mL) vorliegen; die gestrichelten Linien sind jene Konzentrationen, bei denen die Thrombin-Zugabe eine baldige Bildung eines Gerinnsels zur Folge hatte. Mit steigender Konzentration verringerte sich die onset time. 61

Abbildung 16: Zugabe einer Faktor V – Konzentrationsreihe (0,2/0,3/0,5 U/mL) zu XaII (0,0006/1 U/mL); Man sieht die deutliche Verkürzung der Latenzzeit. Die höchste Thrombin-Konzentration bleibt relativ unverändert. 62

Abbildung 17: Zugabe der Inhibitoren zu XaII (0,0006/1 U/mL), wobei Protein C in steigender Konzentration zugegeben wurde (PC 0,5/1/1,4/1,8 U/mL); Protein S war konstant (PS 0,2 U/mL); der Unterschied im Effekt der steigenden Konzentrationen von Protein C ist zu minimal, als das eine eindeutige Beurteilung, ob eine Konzentrationsabhängigkeit vorhanden ist, möglich ist 63

Abbildung 18: Zugabe von Protein C in steigender Konzentration zu XaII (0,0006/1 U/mL) ohne die Beifügung von Protein S; (PC 0,5/1/1,4/1,8 U/mL); Die alleinige Zugabe von PC hat keinen Einfluss auf die Thrombin-Bildung. Erst die Zugabe von PS (PC/PS (1,0/0,2 U/mL) führt zu einer Senkung von peak thrombin. 64

Abbildung 19: Zugabe von Protein S in steigender Konzentration zu XaII (0,0006/1 U/mL) in der Abwesenheit von Protein C; (PS 0,1/0,2/0,3 U/mL); Es ist ein geringer konzentrationsabhängiger Effekt zu sehen. 64

Abbildung 20: Zugabe von Protein S in steigender Konzentration zu XaII (0,0006/1 U/mL) in der Abwesenheit von Protein C; (PS 0,1/0,2/0,3 U/mL); Durch die Anwesenheit von Faktor V (0,5

U/mL) ist die konzentrationsabhängige Reduzierung von peak thrombin durch Protein S deutlich sichtbarer. Zusätzlich kommt es durch FV zu einer Verkürzung der onset time. 65

Abbildung 21: Zugabe einer Protein S-Reihe (0,1/0,2/0,3 U/mL) zu einer konstanten Menge an Protein C (1 U/mL) in Anwesenheit von XaII (XaII 0,0005/1 U/mL), den Zymogenen (Zym: VII, IX, X – 1/1,5/1 U/mL) und den aktivierten Faktoren (akt: IIa, 0,0005 NIHU/mL, VIIa, IXa – 1,5/0,001 U/mL); die Co-Faktoren, Faktor V (0,5 U/mL) und Faktor VIII (0,1 U/mL), wurden in verschiedenen Kombinationen zugesetzt. Neben der konzentrationsabhängigen Senkung von peak thrombin durch PS, ist auch der Einfluss der Co-Faktoren deutlich zu sehen. FVIII führt konstant zu einer Abnahme von peak thrombin. FV dagegen steigert peak thrombin..... 66

Abbildung 22: Zugabe der Phospholipide zu XaII (0,0006/1 U/mL); (Phospholipide 0,2µM/mL 80% (w/w) 1-Palmitoyl-2-Oleoyl Phosphatidyl-Cholin und 20% (w/w) 1-Palmitoyl-2-Oleoyl Phosphatidyl-Serin); Zugabe der PL führt zu einer Steigerung von peak thrombin 67

Abbildung 23: Zusammenfügung der Einzelgruppen (schwarze Linie); es wurde jeweils eine Gruppe entfernt, um mögliche Abhängigkeiten feststellen zu können; XaII (0,0006/1 U/mL); Zym (VII,IX,X – 1/1,5/1 U/mL); akt (IIa 0,0005 NIHU/mL, VIIa, IXa – 1,5/0,001 U/mL); FV (0,5 U/mL); Inh (PC, PS – 1/0,2 U/mL); PL (0,2µM/mL (PpC/PpS – 80:20)); APCC (1 U/mL); Oben: die Entfernung sowohl der Zymogene, als auch der Phospholipide führte zu einer starken Abnahme von peak thrombin und zu einer Verlängerung von peak time und onset time; Mitte: die Entfernung der aktivierten Faktoren führte zu einer minimalen Verlängerung der Latenzzeit; Unten: die Entfernung der Inhibitoren brachte eine wesentliche Steigerung der Thrombin-Bildung mit sich; ohne FV wurde die onset time stark verlängert; 68

Abbildung 24: Kombination der Zymogene (VII, IX, X – 1/1,5/1 U/mL) mit Phospholipiden (0,2µM/mL (PpC/PpS – 80:20)) in Gegenwart von XaII (0,0006/1 U/mL); Peak Thrombin wird durch Zymogene und Phospholipide auf ein Level angehoben, welches dem Level der Kombination aller Gruppen ohne Inhibitoren entspricht; akt (IIa 0,0005 NIHU/mL, VIIa, IXa – 1,5/0,001 U/mL); FV (0,5 U/mL); 70

Abbildung 25: synergistische Effekte der Zymogene (VII, IX, X – 1/1,5/1 U/mL) und Phospholipide (0,2µM/mL (PpC/PpS – 80:20)) mit FV (0,5 U/mL) in der Gegenwart von XaII (0,0006/1 U/mL); verstärkte Senkung von peak time durch Kombination der Zymogene oder Phospholipide mit FV im Vergleich zu ihrer einzelnen Zugabe zu XaII;..... 71

Abbildung 26: Kombination der aktivierten Faktoren (IIa 0,0005 NIHU/mL, VIIa, IXa – 1,5/0,001 U/mL) mit Faktor V (0,5 U/mL) in Gegenwart von XaII (0,0006/1 U/mL); verstärkte Senkung der peak time durch Kombination der aktivierten Faktoren mit FV 72

Abbildung 27: synergistische Effekte der Zymogene (VII, IX, X – 1/1,5/1 U/mL) und Phospholipide (0,2µM/mL (PpC/PpS – 80:20)) mit FV (0,5 U/mL) in der Gegenwart von XaII (0,0006/1 U/mL);

verstärkte Senkung der onset time durch Kombination der Zymogene oder Phospholipide mit FV im Vergleich zu ihrer einzelnen Zugabe zu XaII;.....	73
Abbildung 28: Kombination der Inhibitoren (PC, PS – 1/0,2 U/mL) mit Faktor V (0,5 U/mL) in Gegenwart von XaII (0,0006/1 U/mL); Faktor V reduziert die, durch die Inhibitoren hervorgerufene Steigerung der peak time;	74
Abbildung 29: schrittweises Zusammensetzen der einzelnen Komponenten zum künstlichen APCC; XaII (0,0006/1 U/mL); Zym (VII,IX,X – 1/1,5/1 U/mL); akt (IIa 0,0005 NIHU/mL, VIIa, IXa – 1,5/0,001 U/mL); FV (0,5 U/mL); Inh (PC, PS – 1/0,2 U/mL); PL (0,2µM/mL (PpC/PpS – 80:20)); APCC (1 U/mL); die Zymogene steigerten die TG und senkten peak time und onset time; die aktivierten Faktoren reduzierten lediglich die peak time geringfügig; die Inhibitoren senkten die TG, ohne peak time und onset time zu beeinflussen; FV reduzierte peak time und onset time und erhöhte die TG; die Phospholipide führten ebenfalls zu einer wesentlichen Steigerung der TG;.....	75
Abbildung 30: Enzym-Substrat-Komplex XaII in einem molaren Verhältnis von 1:20.000 mit Zugabe aller hämostatischen Komponenten (= künstliches APCC) im Vergleich zum untersuchenden Originalpräparat (APCC); XaII (0,0006/1 U/mL); Zym (VII,IX,X – 1/1,5/1 U/mL); akt (IIa 0,0005 NIHU/mL, VIIa, IXa – 1,5/0,001 U/mL); FV (0,5 U/mL); Inh (PC, PS – 1/0,2 U/mL); PL (0,2µM/mL (PpC/PpS – 80:20)); APCC (1 U/mL);	78

6.3.Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Proteinzusammensetzung des APCCs und deren gemittelte Konzentrationen aus mehreren APCC-Chargen (Min – Max Wert); die Werte sind auf 1 Unit (U) des APCCs bezogen	5
Tabelle 2: Gruppeneinteilung der prokoagulatorischen Proteine und deren im künstlichen APCC eingesetzte Konzentrationen; die verwendeten FXa Konzentrationen werden bei den entsprechenden Experimenten beschrieben;.....	7
Tabelle 3: Aufstellung der Gerinnungsfaktoren ((Barthels, et al., 2002) / (Golenhofen, 2006) / (Pötzsch, et al., 2010) / (Hagemann, 2009)).....	13
Tabelle 4: Darstellung der Testlösung: Aufstellung der einzelnen Gruppen und Kombinationen der Proteine des künstlichen APCCs mit den eingesetzten Volumina und Konzentrationen	34
Tabelle 5: Bestimmung der Konzentration der im APCC enthaltenen Proteine mit ELISA (Antigen (Ag))	46
Tabelle 6: Ergebnisse der Gerinnungstests – Aktivität der Proben in U/mL.....	47

6.4.Literaturnachweis

Aledort, L. M. 2005. *Comparative thrombotic event incidence after infusion of recombinant factor VIIa vs. factor VIII inhibitor bypass activity - reply to a rebuttal.* s.l. : J Thromb. Haemost.; 3: 822, 2005.

Barthels, M. und Depka, M. 2002. *Gerinnungskompandium.* Stuttgart : Thieme, 2002.

Béguin, S. und Kumar, R. 1997. *Thrombin, fibrin and platelets: a resonance loop in which von Willebrand factor is a necessary link.* s.l. : Thromb Haemost.;78(1):590-594, 1997.

Béguin, S., Lindhout, T. und Hemker, H. C. 1989. *The Effect of Trace Amounts of Tissue Factor on Thrombin Generation in Platelet Rich Plasma, its Inhibition by Heparin.* s.l. : Thrombosis and Haemostasis - F.K. Schattauer Verlagsgesellschaft mbH (Stuttgart) 61 (1) 25-29, 1989.

Berckmans, RJ, et al. 2001. *Cell-derived microparticles circulate in healthy humans and support low grade thrombin generation.* s.l. : Thromb. Haemost; 85 (4): 639-646, 2001.

Brackmann, H. H., et al. 2003. *Klinische Anwendung plasmatischer und rekombinanter Gerinnungsfaktoren.* s.l. : uni-med, 2003.

Butenas, S., et al. 2002. *Mechanism of factor VIIa-dependent coagulation in hemophilia blood.* s.l. : Blood;vol.99:923-930, 2002.

Butenas, S., van't Veer, C. und Mann, K. G. 1997. *Evaluation of the initiation phase of blood coagulation using ultrasensitive assays for serine proteases.* s.l. : Biolog. Chem., 1997.

Butenas, Saulius, van't Veer, Cornelis und Mann, Kenneth G. 1999. *"Normal" Thrombin Generation.* s.l. : Blood, Vol 94, No 7, pp. 2169-2178, 1999.

Cawthorn, K.M., et al. 1998. *Blood Coagulation in Hemophilia A and Hemophilia C.* s.l. : Blood by the American Society of Hematology; www.bloodjournal.org; 91: 4581-4592, 1998.

Chantarangkul, V., et al. 2003. *Thrombin generation assessed as endogenous thrombin potential in pateints with hyper- or hypocoagulability.* s.l. : haematologica/journal of haematology vol. 88(05): 547-554, 2003.

De Smedt, E., et al. 2008. *The technique of measuring thrombin generation with fluorogenic substrates: I. Necessity of adequate calibration.* s.l. : Thromb Haemost; 100: 343-349, 2008.

- de Smedt, E., Wagenvoord, R. und Hemker, H.C. 2009.** *The technique of measuring thrombin generation with fluorogenic substrates. 3: The effects of sample dilution.* s.l. : Thromb Haemost; 101:, 2009.
- Dempfle, C.-E. 2007.** *The TAFI system - The new role of fibrinolysis.* Universitätsklinikum Mannheim, I. Medizinische Klinik, Mannheim : Hämostaseologie; Vol 27;p. 278-281, 2007. ISSN: 0720-9355.
- Estler, C.-J. 2000.** *Pharmakologie und Toxikologie.* s.l. : Schattauer; 5. Auflage, 2000.
- Fareed, J., et al. 1995.** *Tissue factor antigen levels in various biological fluids.* s.l. : Blood Coagul. Fibrinolysis; 6 (suppl 1):32-36, 1995.
- Gallistl, S., et al. 2002.** *Respective role of factors II, VII, IX and X in the procoagulant activity of FEIBA.* s.l. : Blood Coagulation and Fibrinolysis; Vol 13, Nr 7, 653-655, 2002.
- Gemmell, CH, Sefton, MV und Yeo, EL. 1993.** *Platelet-derived microparticle formation involves glycoprotein IIb–IIIa. Inhibition by RGDS and a Glanzmann's thrombasthenia defect.* s.l. : J Biol Chem; 268(20): 14586-14589, 1993.
- Golenhofen, Klaus. 2006.** *Basislehrbuch Physiologie.* München : Elsevier GmbH; Urban & Fischer Verlag; 4. Auflage, 2006.
- Goudemand, J., Rothschild, C. und Demiguel, V. 2006.** *Influence of the type of factor VIII concentrate on the incidence of factor VIII inhibitors in previously untreated patients with severe hemophilia A.* s.l. : Blood;107: 46–51, 2006.
- Hagemann, Olav. 2009.** Laborlexikon. [Online] 2009. [Zitat vom: 8. Jänner 2009.] <http://www.laborlexikon.de/Lexikon/Tabellen/45-Gerinnungsfaktoren.htm>.
- Hemker, H. Coenraad. 1996.** *The Endogenous Thrombin Potential, a New Laboratory Parameter to Indicate the Risk of Thrombosis and its Diminution by Treatment.* s.l. : Georg Thieme Verlag Stuttgart . New York; 104-109, 1996.
- Hemker, H.C. und Béguin, S. 1990.** *Method for determining the endogenous thrombin potential of plasma and blood.* 1990.
- . **2000.** *Phenotyping the Clotting System.* s.l. : Thromb Haemost; 84: 747–51, 2000.
- . **1995.** *Thrombin Generation in Plasma: Its Assessment Via the Endogenous Thrombin Potential.* s.l. : Thromb. Haemost.; 74(1) 134-138, 1995.

- Hemker, H.C. und Kessels, H. 1991.** *Feedback Mechanisms in Coagulation.* s.l. : Haemostasis; 21:189-196, 1991.
- Hemker, H.C., et al. 2003.** *Calibrated Automated Thrombin Generation Measurement in Clotting Plasma.* s.l. : Pathophysiol. Haemost. Thromb.; 33:4-15, 2003.
- Hemker, H.C., et al. 1993.** *Continuous Registration of Thrombin Generation in Plasma, Its Use for the Determination of the Thrombin Potential.* s.l. : Thromb. and Haemost.; 70, (4) 617-624, 1993.
- Hemker, H.C., et al. 2002.** *The Calibrated Automated Thrombogram (CAT): a universal routine test for hyper- and hypocoagulability.* s.l. : Pathophysiol Haemost Thromb; 32:249-253, 2002.
- Hemker, H.C., et al. 2000.** *The Thrombogram: Monitoring Thrombin Generation in Platelet Rich Plasma.* s.l. : Thromb. Haemost.; 83: 589-591, 2000.
- Hemker, H.C., Hemker, P.W. und Al Dieri, R. 2009.** *The technique of measuring thrombin generation with fluorescent substrates: 4. The H-transform, a mathematical procedure to obtain thrombin concentrations without external calibration.* s.l. : Thromb Haemost; 101:, 2009.
- Hemker, H.C., Willems, G.M. und Béguin, S. 1986.** *A Computer Assisted Method to Obtain the Prothrombin Activation Velocity in Whole Plasma Independent of Thrombin Decay Processes.* s.l. : Thrombosis and Haemostasis; 56 (1) 9-17, 1986.
- Hick, Christian und Astrid, Hick. 2006.** *Intensivkurs Physiologie.* s.l. : Elsevier, Urban & Fischer; 5. Auflage, 2006.
- Himmelsbach, Michéle, et al. 2002.** *A Fully Recombinant Partial Prothrombin Complex Effectively Bypasses FVIII In Vitro and In Vivo.* s.l. : Thromb. Haemost.; 88:1003-1011, 2002.
- Hockin, Matthew F., et al. 2002.** *A Model for the Stoichiometric Regulation of Blood Coagulation.* s.l. : The Journal of Biological Chemistry; Vol 277, Nr. 21, pp. 18322-18333, 2002.
- Hoffman, M., et al. 1995.** *Factors IXa and Xa play distinct roles in tissue factor-dependent initiation of coagulation.* s.l. : Blood; 86:1794-1801, 1995.
- Hoffman, M., Monroe, D.M. und Roberts, H.R. 1994.** *Human monocytes support factor X activation by factor VIIa, independent of tissue factor: Implications for the therapeutic mechanism of high dose factor VIIa in hemophilia.* s.l. : Blood;83:38-41, 1994.
- Jansen, M., Schmaldienst, S. und Banyai, S. 2001.** *Treatment of coagulation inhibitors with extracorporeal immunoadsorption (Ig-Therasorb).* s.l. : Brit J Haematol;112:91-97, 2001.

- Kasper, C.K., Aledort, L. und Counts, R. 1975.** *A more uniform measurement of factor VIII inhibitors.* s.l. : Thrombos Diathes Haemorrh;34:870-872, 1975.
- Kempton, C.L., Soucie, J.M. und Abshire, T.C. 2006.** *Incidence of inhibitors in a cohort of 838 males with hemophilia A previously treated with factor VIII concentrates.* s.l. : J Thromb Haemost;4:2576-2581, 2006.
- Kreis, Baron und Stoll. 2001.** *Biotechnologie der Arzneistoffe - Grundlagen und Anwendungen.* s.l. : Deutscher Apotheker Verlag Stuttgart, 2001.
- Kumar, R., Béguin, S. und Hemker, H.C. 1994.** *The influence of fibrinogen and fibrin on thrombin generation -evidence for feedback activation of the clotting system by clot bound thrombin.* s.l. : Thromb Haemost.;72(5):713-21, 1994.
- Lawson, Jeffrey H., et al. 1994.** *A Model for the Tissue Factor Pathway to Thrombin.* s.l. : The Journal of Biological Chemistry; Vol 269, Nr 37, pp. 23357-23366, 1994.
- Lusher, J.M. 2000.** *Inhibitor antibodies to factor VIII and factor IX: management.* s.l. : Semin Thromb Hemost;26:179–88, 2000.
- Luu, H. und Ewenstein, B. 2004.** *FEIBA safety profile in multiple modes of clinical and home-therapy application.* s.l. : Haemophilia;10:10–16, 2004.
- Lyon, M.F. 2002.** *X-chromosome inactivation and human.* s.l. : Acta Paediatr Suppl; 91: 107-112, 2002.
- Ma, Alice D. und Carrizosa, Daniel. 2006.** *Acquired Factor VIII Inhibitors: Pathophysiology and Treatment.* s.l. : Hematology; 432-437, 2006.
- Mann, K.G., et al. 1981.** *The role of factor V in the assembly of the prothrombinase complex.* s.l. : Ann NYAcadSci; 370:378-388, 1981.
- Monroe, D.M., et al. 1998.** *A possible mechanism of action of activated factor VII independent of tissue factor.* s.l. : Blood Coagul Fibrinolysis;Suppl1:15-20, 1998.
- . **1997.** *Platelet activity of high-dose factor VIIa is independent of tissue factor.* s.l. : BrJ Haematol;99:542-547, 1997.
- Monroe, Dougald M., Hoffman, Maureane und Roberts, Harold R. 2002.** *Platelets and Thrombin Generation.* s.l. : Vasc Biol.;22:1381-1389, 2002.

- Müller, Ingrid, et al. 2003.** *Intravascular tissue factor initiates coagulation via circulating microvesicles and platelets.* s.l. : The FASEB Journal; Vol 17, 476-478, 2003.
- Mutschler, Ernst, et al. 2005.** *Mutschler - Arzneimittelwirkungen kompakt.* s.l. : Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, 2005.
- Naser, WL. 1990.** *Single incubation multilayer immune technique.* s.l. : J. Immunol.Methods; 151-157, 1990.
- Neumann, Herbert A. 2008.** *Das Gerinnungssystem.* s.l. : ABW Wissenschaftsverlag GmbH, 2008.
- Odegaard, OR und Lee, M. 1978.** *On the use of chromogenic substrates for studies of coagulation inhibitors.* s.l. : Haemostasis; 7: 121-126, 1978.
- Oldenburg, E. und Tuddenham, E. 2005.** *Inhibitor to factor VIII – molecular basis.* s.l. : Blackwell Publishing Ltd; 59–63, 2005.
- Osterud, Bjarne und Rapaport, S.I. 1977.** *Activation of Factor IX by the reaction product of tissue factor and Factor VII: Additional pathway for initiating blood coagulation.* s.l. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA; Vol. 74, No. 12, pp. 5260-5264, 1977.
- Pingoud, Alfred und Urbanke, Claus. 1997.** *Arbeitsmethoden der Biochemie.* s.l. : Walter de Gruyter; Lehrbuch, 1997.
- Pötzsch, Bernd und Madlener, Katharina. 2010.** *Hämostaseologie.* s.l. : Springer-Verlag GmbH; 2. Auflage, 2010.
- Ramjee, Manoj K. 1999.** *The Use of Fluorogenic Substrates to Monitor Thrombin Generation for the Analysis of Plasma and Whole Blood Coagulation.* s.l. : Analytical Biochemistry 277, 11–18, 1999.
- Richter, Gerhard. 2003.** *Praktische Biochemie - Grundlagen und Techniken.* s.l. : GeorgThieme Verlag, 2003.
- Roberts, H.R., Hoffman, M. und Monroe, D.M. 2006.** *A Cell-Based Model of Thrombin Generation.* s.l. : Semin. Thromb. Hemost.; 32(suppl 1): 32-38, 2006. ISSN 0094-6176.
- Sallah, S., et al. 2005.** *Comparative thrombotic event incidence after infusion of recombinant factor VIIa vs. factor VIII inhibitor bypass activity - a rebuttal.* s.l. : J. Thromb. Haemost.; 3, 820-822, 2005.

Schneider, S. W., et al. 2007. *Shear-induced unfolding triggers adhesion of von Willebrand factor fibers.* s.l. : PNAS; Vol 104, Nr 19: 7899-7903, 2007.

Sharathkumar, A., Lillicrap, D. und Blanchette, V.S. 2003. *Intensive exposure to factor VIII is a risk factor for inhibitor development in mild hemophilia A.* s.l. : J Thromb Haemost;1:1228–1236, 2003.

Silbernagl, Stefan und Despopoulos, Agamemnon. 2003. *Taschenatlas der Physiologie.* s.l. : Georg Thieme Verlag; 6. korrigierte Auflage, 2003.

Skoog, Douglas A. und Leary, James J. 1996. *Instrumentelle Analytik - Grundlagen, Geräte, Anwendungen.* s.l. : Springer, 1996.

Sternbach, Hans. 1991. *Chromatographische Methoden in der Biochemie.* s.l. : Georg Thieme Verlag Stuttgart, 1991.

Tappenden, K.A., et al. 2007. *Whole Blood and Plasma Thrombin Generation Assays in Patients with a History of venous Thromboembolism.* s.l. : J Thromb. and Haemost.; Vol 5, Suppl. 2, 2007.

Tomokiyo, K., et al. 2003. *A novel therapeutic approach combining human plasma-derived Factors VIIa and X for haemophiliacs with inhibitors: evidence of a higher thrombin generation rate in vivo than obtained with Factor VIIa alone.* s.l. : Vox Sanguinis; 85: 290-299, 2003.

Turecek, P. L., et al. 1999. *Factor Xa and Prothrombin: Mechanism of Action of FEIBA.* s.l. : VoxSanguinis; 77 (Suppl 1), 72-79, 1999.

Turecek, P. L., et al. 2004. *FEIBA: mode of action.* s.l. : Haemophilia, 10, (Suppl. 2), 3-9, 2004.

Turecek, P.L., et al. 2003. *Factor VIII Inhibitor-Bypassing Agents Act by Inducing Thrombin Generation and Can Be Monitored by a Thrombin Generation Assay.* s.l. : Pathophysiol. Haemost. Thromb.; 33:16-22, 2003.

Turecek, P.L., Váradi, K. und Schwarz, H.P. *Thrombin Generation Assay (TGA): test for monitoring the pharmacological properties of inhibitor treatment in hemophilia.*

Udenfriend, S. 1996. *Fluorescence Assay in Biology and Medicine.* s.l. : Academic Press, vol 2, pp182–185, 1996.

van't Veer, C. und Mann, K. G. 1997. *Regulation of Tissue Factor Initiated Thrombin Generation by the Stoichiometric Inhibitors Tissue Factor Pathway Inhibitor, Antithrombin III and Heparin Cofactor II.* s.l. : J of Biological Chemistry; Vol 272, Nr 7, pp. 4367-4377, 1997.

van't Veer, C., et al. 1997. *Increased Tissue Factor-initiated Prothrombin Activation as a Result of the Arg(506)->Gln Mutation in Factor V (LEIDEN).* s.l. : J Biological Chemistry; Vol 272, Nr 33, pp. 20721-20729, 1997.

van't Veer, Cornelis, et al. 1997. *Inhibitory Mechanism of the Protein C Pathway on Tissue Factor-induced Thrombin Generation.* s.l. : The Journal of Biological Chemistry; Vol 272, Nr 12, pp. 7983-7994, 1997.

VanWijk, Marja J., et al. 2003. *Microparticles in cardiovascular diseases.* s.l. : Cardiovascular Research 59: 277–287, 2003.

Váradi, K., et al. 2003. *Monitoring the bioavailability of FEIBA with a thrombin generation assay.* s.l. : Journal of Thromb. and Haemost.; 1:2374-2380, 2003.

Váradi, K., et al. 1999. *Phospholipid-bound tissue factor modulates both thrombin generation and APC-mediated factor Va inactivation.* s.l. : Thromb. Haemost.; 82:1673-1679, 1999.

Váradi, K., Turecek, P.L. und Schwarz, H.P. 2004. *Thrombin Generation Assay and other universal tests for monitoring haemophilia therapy.* s.l. : Haemophilia; 10, (suppl. 2), 17-21, 2004.

Verbruggen, B., Novakova, I. und Wessels, H. 1995. *The Nijmegen modification of the Bethesda assay for factor VIII:C inhibitors: Improved specificity and reliability.* s.l. : Thromb Haemost;73;247-250, 1995.

White, B., Cotter, M. und Byrne, M. 2000. *High responding factor VIII inhibitors in mild haemophilia – is there a link with recent changes in clinical practice.* s.l. : Haemophilia;6:113-115, 2000.

Wielders, S., et al. 1997. *The routine determination of the endogenous thrombin potential, first results in different forms of hyper- and hypocoagulability.* s.l. : Thromb. Haemost.; 77: 629-636, 1997.

Witt, I. und Dörner, K. 2006. *Klinische Chemie und Hämatologie.* s.l. : Georg Thieme Verlag; 6. Auflage, 2006.

7. Lebenslauf

Name:	Montsch Peter
Anschrift:	Feldgasse 10, 2104 Spillern
Geburtstag:	6. Jänner 1981
Geburtsort:	Wien
Familienstand:	ledig
Eltern:	Walter Montsch / Alice Montsch

Schulausbildung:

1987 – 1991	Volksschule Spillern
1991 – 2000	BG / BRG Stockerau, Spezialzweig Informatik
Jänner – September 2001	Präsenzdienst
Oktober 2001	Studium der Pharmazie, Universität Wien