

Blutgerinnung

Grundlagen

Ein funktionierendes Blutgerinnungssystem ist für den Organismus lebenswichtig. Neben der Notfallfunktion bei Verletzungen ist die Erhaltung des Gleichgewichtes aus Gerinnung und gerinnungshemmenden Faktoren von lebenswichtiger Bedeutung. Bereits bei minimalen Störungen drohen Thrombosen bzw. andererseits eine erhöhte Blutungsneigung mit inneren Blutungen. Gerinnungsfördernde und gerinnungshemmende Faktoren stehen dabei in einem empfindlichen Gleichgewicht.

Unterschieden wird zwischen primärer und sekundärer Hämostase.

Primäre Hämostase

bedeutet die Bildung eines Thrombozytenpfropfes, welcher relativ kurzfristig nach einer Verletzung eintritt. Die Thrombozyten verändern ihre Form und setzen nach Aktivierung vasokonstriktische Stoffe (Adrenalin, Noradrenalin, Serotonin) frei. Den Thrombozyten kommt dabei eine Schlüsselfunktion bei der Blutgerinnung zu.

Es folgt eine Aktivierung der Gerinnungskaskade (Gerinnungsfaktoren) über Kontakt der Gerinnungsfaktoren mit Kollagen des Subendothels (endogene Aktivierung) und/oder durch in das Blut abgegebene Aktivatoren (exogene Aktivierung)

Sekundäre Hämostase

Extravaskuläres System: Die Aktivierung beginnt mit der Freisetzung von Gewebsthromboplastin (Faktor III). Dieser Faktor bewirkt im Zusammenspiel mit weiteren Faktoren und Calcium innerhalb von wenigen Sekunden die Umwandlung von Prothrombin (Faktor II) in Thrombin (Faktor IIa).

Intravaskuläres System: Die Aktivierung erfolgt über eine Kaskade von Faktoren u.a. durch den Hagemann-Faktor (Faktor XII) und durch Calcium (Faktor IV). Nach mehreren Minuten kommt es zur Umwandlung von Prothrombin in Thrombin.

Grundlagen

Vitamin K-Mangel

Vitamin K wird u.a. zur Prothrombinbildung in der Leber benötigt. Kommt es z.B. durch Resorptionsstörungen (Vitamin K ist sehr fettlöslich und benötigt zur Aufnahme Gallensekret) zu einem Mangel, so ist die Blutgerinnung gestört.

Indirekte Antikoagulantien: Vit.K-Epoxid-Reduktase Hemmer

Vitamin K-Antagonisten (4-Hydroxycumarine) hemmen die Vitamin K abhängige Synthese von Gerinnungsfaktoren (und auch von Antigerinnungsfaktoren wie Protein C).

Direkte Antikoagulantien: Stoffe, die mit den Gerinnungsfaktoren interagieren.

Der Entzug von Calcium-Ionen kann nur in vitro durchgeführt werden, da ein Absinken des Calcium-Spiegels im Blut zur Tetanie führen würde. Dies geschieht durch Zusatz von EDTA, Citrat oder Fluorid.

Heparin ist ein körpereigenes Antikoagulans und wird in den Mastzellen gebildet und gespeichert. Es ist ein Polysaccharid und zugleich eine der stärksten Säuren im Organismus. Die Wirkung des Heparins ist an Antithrombin III gebunden. Der Heparin/Antithrombin-Komplex inaktiviert Faktor IXa, Xa, XIa und XIIa.

Thrombozytenaggregationshemmer

Acetylsalicylsäure: Der Wirkungsmechanismus beruht auf der Acetylierung von Plättchenmembran- und Plasmaproteinen sowie auf der irreversiblen Hemmung der Cyclooxygenase.

Ticlopidin, Clopidogrel: Es wird eine irreversible Veränderung des ADP-Rezeptors postuliert.

Thrombosen

Unterstützt durch atherosklerotische Ablagerungen in den Gefäßen kann es zu einem vollständigen Gefäßverschluß durch einen Thrombus kommen. Ist davon ein blutzuführendes Gefäß am Herz oder im Gehirn betroffen, kann es zu einem Herzinfarkt oder Schlaganfall kommen. Ein Venenthrombus kann sich lösen und zu einer Lungenembolie führen.

Eine erhöhte Thromboseneigung kann genetische Ursachen haben (Leiden-

Mutation) oder aufgrund äußerer Einflüsse entstehen (orale Kontrazeptiva, Rauchen, Krampfadern, schwere systemische Infektionen, Economy-class syndrome).

Eine therapeutische Gerinnungshemmung erfolgt bei Erkrankungen, welche in einer stark erhöhten Thromboseneigung resultieren wie:

- einer künstlichen Herzklappe
- Herzerkrankungen mit einem erhöhten Embolierisiko (z.B. Vorhofflimmern)
- Erhöhte Thromboseneigung aufgrund angeborener und erworbener Störungen (z.B. tiefe Beinvenenthrombose, rezidivierende Lungenembolien, Protein C-/S-Mangel u.v.m.)

Hämophilie

Die Bluterkrankheit entsteht beim Fehlen von Gerinnungsfaktoren (Faktor VIII: Hämophilie A; Faktor IX: Hämophilie B). Sie ist genetisch bedingt, wird rezessiv vererbt und manifestiert sich nur bei Männern. Heutzutage werden diese Faktoren gentechnologisch hergestellt. Früher wurden aufkonzentrierte Plasmaslösungen verabreicht, was in der Vergangenheit in manchen Fällen zu AIDS- bzw. zu Hepatitisinfektionen geführt hat.

Vorkenntnisse

- Aufbau und Funktion des Blutes, Bedeutung der Thrombozyten für die Blutgerinnung. Ablauf der Thrombozytenaggregation und –aktivierung
- endogene/ exogene Aktivierung der Gerinnungskaskade, Schlüsselfaktoren der Gerinnungskaskade und Antigerinnungskaskade.
- labordiagnostische Parameter: Hämatokrit, Hb-Wert, Quick, INR, aPTT, Thromboplastinzeit,
- Wirkmechanismen der Arzneistoffe: Heparine, Hirudine, Phenprocumon, Vitamin K, ASS, Clopidogrel, GpIIb/IIIa-Rezeptor-Antagonisten,
- Grundlagen der beteiligten Transmitter und Rezeptoren

Vorbereitung

- Für die Versuche wird ein Kittel benötigt
- Zur Auswertung benötigen Sie Lineal und evtl. Taschenrechner

Literaturempfehlungen

Aktuelle Empfehlungen und Links online

Lernziele:

- Zusammensetzung und Funktionen des Blutes, Blutprodukte als Pharmazeutika
- Funktionsweise und Aufbau der Thrombozyten, Funktion der Thrombozyten bei der Blutgerinnung. Thrombozytenadhäsion, -aggregation, -aktivierung
- Aktivierung und Ablauf der Gerinnungskaskade; Zusammenspiel von Gerinnungsfaktoren, gerinnungshemmenden Faktoren und Fibrinolyse, Aufbau und Funktionsweise der Gerinnungsfaktoren
- Hämophilie A/B, Pathophysiologie und Behandlung
- Kenntnisse labordiagnostischer Parameter; Umrechnung und Bewertung von Quick und INR-Werten.
- Grundlagen der Pharmazeutischen Betreuung von Marcumar®-Patienten. Sekundärprophylaxe des Herzinfarkts
- Heparinwertbestimmung nach DAB
- Pharmakologie der Arzneistoffe: u.a. Phenprocoumon, Heparinoide, Hirudin, ASS, Clopidogrel

Versuchsablauf

In diesem Versuch wird Rinderplasma eingesetzt. Bereitgestellt wird dieses Plasma im tiefgefrorenen Zustand. Um die Denaturierung des Fibrinogens zu vermeiden, sollte es bei $\leq 37^{\circ}\text{C}$ aufgetaut werden (Handwärme). Danach wird das Röhrchen in die dafür vorgesehene Halterung des Koagulometers zum Temperieren gestellt.

Die verwendeten Reagenzien sind teilweise aus Humanplazenta hergestellt.

Es gelten für die Reagenzien selbst und die Blutprodukte die üblichen Schutzmaßnahmen (Handschuhe etc.) im Umgang mit Blutprodukten!

Methoden zur Erfassung der Blutgerinnung**Versuch A: aktivierte Partielle Thromboplastinzeit (aPTT)
Wertbestimmung von Heparin**

In einer Plasmaprobe aus Citrat-Vollblut wird die Fibrinbildung durch Zugabe eines PTT-Reagenzes und Calcium-Ionen ausgelöst. Die PTT dient der Prüfung des endogenen Aktivierungsweges (Faktor XII, XI, IX) und der gemeinsamen Endstrecke (Thrombinzeit, Faktor X ff.) der Gerinnungskaskade.

Zur Bestimmung der aktivierten partiellen Thromboplastinzeit wird dem Reagenz noch Kaolin zugesetzt. Kaolin soll als „künstliche Oberfläche“ den Endothelkontakt zur Aktivierung des endogenen Systems simulieren.

Mit Hilfe der aPTT kann ein Mangel der Hämophiliefaktoren VIII und IX nachgewiesen werden. Der Referenzbereich liegt bei ca. 40 Sekunden.

Das aPTT-Reagenz steht gebrauchsfertig zur Verfügung. Es handelt sich hierbei um eine Suspension und muß vor Gebrauch geschüttelt werden. Nach Gebrauch bitte sofort wieder in den Kühlschrank stellen.

Es wird eine Plasmaverdünnungsreihe hergestellt. Die gemessenen Werte sollen in ein halblogarithmisches Koordinatensystem eingetragen werden, wobei der Logarithmus der Zeit gegen die Konzentration aufgetragen wird. Anhand der Kalibriergerade kann die Aktivität einer unbekannten Heparinprobe bestimmt werden. Bei der Messung bitte mit der geringsten Heparinkonzentration beginnen.

Heparinlösung [I.E./ml]	3,125	1,56	0,78	0,39	0,195	0
Gerinnungszeit [s]						

- Je 200 µl Plasma werden mit 200 µl der jeweiligen Heparinverdünnung versetzt.
- Von den erhaltenen Mischungen werden je 100 µl in die vorgewärmten Probesteller pipettiert (Einfachbestimmungen reichen!).
- Dazu werden 100 µl Pathromtin-Reagenz pipettiert.
- 2 Minuten bei 37°C inkubieren. Dann den Meßarm senken.
- 100 µl vortemperierte CaCl₂-Lösung zugeben. Nach Zugabe dieser Lösung wird die Gerinnungszeit gemessen.

Versuch B: Recalcifizierungszeit

Es werden Calcium-Ionen im Überschuß zugegeben und die Zeit gemessen, die vergeht, bis Thrombin ein nachweisbares Gerinnsel gebildet hat.

Durch die Calcium-Zugabe wird durch EDTA entzogenes Calcium substituiert.

- Zu Beginn der Messung wird ein Probesteller in die dafür vorgesehene Halterung gegeben.
- 100 µl Plasma werden in die Vertiefung des Probestellers pipettiert. Nun Knopf "Inkubationszeit" am Gerät betätigen und 2 Minuten inkubieren lassen. Die Zeit wird im Display des Gerätes angezeigt.
- Der mit dem Meßstäbchen bestückte Meßkopf wird jetzt abgesenkt. - Nach 4 Sekunden leuchten die Funktionslampen rot auf und das Gerät ist meßbereit.
- 100 µl vorgewärmte CaCl₂-Lösung (0,37%) werden durch die Pipettenführung zupipettiert.
- Durch Änderung der Vibrationsdämpfung wird die Zugabe des Reagenzes automatisch als Start der Messung erkannt. Nach Bildung des Fibringerinnsels zeigt das Gerät die Gerinnungszeit an.
- Meßarm heben .
- Durch Drücken auf den Stäbchenabwurfknopf werden die Meßstäbchen abgestreift.

Gemessene Zeit: _____

Versuch C: Bestimmung der Thromboplastinzeit nach Quick

Das extrinsic-System wird gestartet, indem man Calciumionen und Gewebsthromboplastin zusetzt, das den Faktor VII aktiviert.

Die Thromboplastinzeit dient der Prüfung des exogenen Aktivierungsweges und der gemeinsamen Endstrecke der Gerinnung (Faktor X ff.)

INR

International Normalized Ratio; von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) empfohlene Ergebniseinheit, zur Bestimmung der Blutgerinnung. Einer normalen Gerinnung entspricht INR = 1; INR = 2 bedeutet eine zweifach verlängerte Gerinnungszeit. Die Richtwerte liegen je nach Erkrankung bei einem INR von etwa 2,5 – 3,5.

$$INR = \left(\frac{t_{Patient}}{t_{Standard}} \right)^{ISI}$$

Art der Beinvenenthrombose	Dauer der OAK	Intensität der OAK
Thrombose +/- Lungenembolie bei passagerem Risikofaktor (z.B. postoperativ)	6 Wochen	INR 2,0-3,0
Erstmalige Unterschenkelvenenthrombose ohne nachweisbare Risikofaktoren +/- Lungenembolie	3 Monate	INR 2,0-3,0
Rezidiv einer Mehretagenthrombose +/- nachweisbare Risikofaktoren	12 Monate	INR 2,0-3,0
Rezidiv einer "primären" Mehretagen-thrombose unter Antikoagulation mit INR 2,0-3,0	Langfristig	INR 3,0-4,5
Rezidiv einer sekundären Thrombose bei befristetem Risiko (Immobilisation, kurables Karzinom)	für die Dauer des erhöhten Risikos	INR 2,0-3,0
Erstdiagnose APC-Resistenz Protein C/S- und AT-III-Mangel Ohne Thrombose	Keine Therapie, Prophylaxe in Risikosituationen	
Erstmalige Thrombose bei APC-Resistenz Und zusätzlichem Risikofaktor	6 Monate	INR 2,0-3,0

ISI

Internationaler Sensitivitätsindex, der die Empfindlichkeit eines Reagenzes erfaßt. Ermöglicht rechnerisch den Vergleich von unterschiedlichen Thromboplastin-Reagenzien.

Quick

Angabe zum Ausmaß der Gerinnbarkeit des Blutes in %. Der Quick-Wert wird gegen eine Plasmaverdünnungsreihe aus Referenzplasma der WHO ermittelt. Ein Quick-Wert von 50% entspricht der Gerinnungsfähigkeit einer 1:1 mit isotoner Kochsalzlösung versetzten Plasmaprobe.

- Erstellen Sie eine Verdünnungsreihe von Plasma mit physiologischer Kochsalzlösung, so daß sich folgende Plasmakonzentrationen pro Probe ergeben:

100%	50%	25%	12,5%
-------------	------------	------------	--------------

- 100 µl jeder Verdünnung werden auf den vorgewärmten Probesteller pipettiert. (Einfachbestimmungen reichen)
- 1 Minute bei 37°C inkubieren. Meßarm senken.
- 200 µl Thromboplastinreagenz zupipettieren. Das Reagenz muß vor Zugabe schon 15 Minuten auf 37°C temperiert sein. Die Gerinnungszeit wird abgelesen. (Das Thromboplastinreagenz (Thromborel-S) steht gebrauchsfertig im Kühlschrank.)

Verdünnung	100%	50%	25%	12,5%
Zeit (s)				

Die gemessenen Gerinnungszeiten werden gegen die Reziprokwerte der Plasmaverdünnungen aufgetragen. Anhand dieser Eichkurve soll der Quickwert einer heparinisierten Plasmaprobe bestimmt werden.

	Sekunden	Quick	INR
Analyse 1			
Analyse 2			
Analyse 3			

Interpretieren Sie die Ergebnisse. Um was für Proben könnte es sich handeln?

Versuch 3: Bestimmung des INR-Wert mittels CoaguCheck S

In Deutschland stehen momentan etwa 460.000 Patienten unter ständiger Antikoagulation. Davon haben etwa 100.000 Patienten einen Herzklappenersatz. Bei antikoagulierten Patienten hängt die Komplikationsrate von Blutungen oder Thrombembolien von der stabilen Einstellung des "individuellen therapeutischen Bereichs" ab. Für eine sichere Therapieführung sind regelmäßige Kontrollen der Thromboplastinzeit (TPZ) notwendig. Die internationale Standardisierung der Thromboplastinbestimmung zur Kontrolle der oralen Antikoagulationstherapie mittels des International Sensitivity Index (ISI) mit Ergebnisangabe als International normalized ratio (INR) führt zu einer deutlichen Verbesserung der Qualität der Therapie und damit zu einer höheren Sicherheit. Deshalb soll auch bei einer Selbstkontrolle die Ergebniskontrolle stets in INR erfolgen.

- Folgen Sie genau den Anweisungen der beiliegenden Bedienungsanleitung
- Vermessen sie zuerst die Kontrolllösung

Ergebnis: **INR**_____ **Quick**_____

- und danach die Analyse 2

Ergebnis: **INR**_____ **Quick**_____

Wodurch wird das CoaguCheck S standardisiert?

Vergleichen Sie die beiden Messverfahren. Wo sehen Sie Unterschiede?

Vergleichen Sie die Ergebnisse aus Versuch 3 mit den Messwerten aus Versuch 2 bezüglich INR und Quick. Welche Schlüsse ziehen Sie daraus für die Praxis? Welche Bedeutung hat der ISI-Wert in diesem Vergleich?

Fragen zur Nachbereitung

- Wie ist das Blut aufgebaut. Wie gewinnen sie die zellulären und azellulären Bestandteile? Was verstehen Sie unter einer Cohnschen Fraktionierung?
- Wie ist ein Antikörper aufgebaut? Was bedeutet „monoklonal“?
- Was für Arten einer Anämie kenne Sie? Wie unterscheiden sich plastische und aplastische Anämien? Welche Bedeutung haben Vit. B₁₂ und Folsäure für das Blutbild?
- Welche Bedeutung hat das Gefäßendothel für die Blutgerinnung?
- Was verstehen Sie unter einem primären Wundverschluss? Mit welchem Laborparameter kann dessen Funktion überprüft werden?
- Was geschieht während der Thrombozytenaktivierung? Wie greift ASS in die Aktivierung ein? Haben andere COX-Hemmer Einfluss auf die thrombozytenaktivierung? Darf ASS während der Schwangerschaft gegeben werden? Was verstehen Sie unter dem „ion-trap“ Prinzip?
- Erklären Sie die Bedeutung des von-Willebrand-Faktors.
- Was ist die Therapie der ersten Wahl bei einer Hämophilie? Was verstehen Sie unter einer Hemmkörper-Hämophilie?
- Wie unterscheiden sich niedermolekulare und hochmolekulare Heparine? Wo greifen sie an. Was bedeutet „eine Einheit“ Heparin? Können Heparine oral, subcutan, cutan appliziert werden? Was ist eine Heparin induzierte Thrombozytopenie?
- Wie funktioniert die Aktivierung eines Faktors durch den vorherigen. Welche Rolle spielen dabei Calciumionen genau?
- Wie wirkt Vitamin K?
- Was verstehen Sie unter einer Leiden-Mutation. Bei welcher Therapie muss sie berücksichtigt werden?
- Nennen Sie typische Hämostyptika
- Erklären Sie die Unterschiede zwischen INR, Quick, PTZ, aPTT, Thrombinzeit. Auf welche Laborwerte können sich Leberparenchymschäden auswirken?
- Dürfen sich Markumar®-Patienten impfen lassen? Welche Wechselwirkungen können mit Phenprocoumon auftreten? Welchen Einfluss haben Infekte auf die Blutgerinnung?