



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

**Die antikoagulatorische Wirkung von Sulfatiden auf die Blutgerinnung**

Autor: Julia Schilling  
Institut / Klinik: I. Medizinische Klinik  
Doktorvater: Priv.-Doz. Dr. C.-E. Dempfle

Sulfatide inhibieren *in vitro* die tissue-factor-induzierte Gerinnung. Hierbei interagieren sie ohne Beteiligung von Cofaktoren in vesikulärer Form mit ihren negativ geladenen Sulfatgruppen mit positiv geladenen Oberflächenstrukturen des Thrombins.

Die globale Wirkung der Sulfatide wurde mittels eines PT-Testes mit humanen Citratplasma und rekombinanten Tissue-Factor untersucht. In Normalplasma zeigte sich die konträre Wirkung der Sulfatide, einerseits in geringen Konzentrationen die Gerinnung zu aktivieren und andererseits in hohen Konzentrationen gerinnungs-inhibitorisch zu wirken. Das Fehlen von FXII verhinderte die intrinsische Kontaktaktivierung durch Sulfatide und nur das antikoagulatorische Potential der Sulfatide zeigte sich nach extrinsischer Induktion der Gerinnung über den Tissue-Factor-Komplex.

Über die Aktivitätsbestimmung einzelner Gerinnungsfaktoren des durch Tissue-Factor induzierten Gerinnungsweges wurde der Angriffspunkt der Sulfatide bestimmt. Die Aktivierung von FVII zu FVIIa durch Tissue-Factor, bestimmt mittels chromogenen Aktivitätstests wurde durch Sulfatide nicht beeinflusst. Auch zeigten Sulfatide in einem chromogenen Versuchsaufbau keinen Einfluss auf die Aktivität von FXa und die Inaktivierung von FXa durch ATIII. Jedoch verstärkten Sulfatide in hohen Konzentrationen die Inaktivierung von FXa durch ATIII und unfraktioniertes Heparin oder niedermolekulare Heparine.

Die Thrombinaktivität, gemessen mit einem chromogenen Tripeptid (Chromozym<sup>®</sup> TH) und Fibrinogen, wurde in Abhängigkeit von der Sulfatidkonzentration vermindert. Eine Interaktion zwischen Sulfatiden und Fibrinogen konnte durch den Austausch von Thrombin durch Batroxobin und durch Experimente in denen Fibrinogen mit Sulfatiden statt Thrombin mit Sulfatiden inkubiert wurde, ausgeschlossen werden. In dem Versuchsaufbau aus Batroxobin und Fibrinogen zeigte sich durch Sulfatide kein Einfluss auf die Fibrinogengerinnung. Dieses Resultat bestätigte sich in der fehlenden Beeinflussung der thrombininduzierten Fibrinogengerinnung bei Inkubation des Fibrinogens mit Sulfatiden vor Zugabe von Thrombin.

Die Bestimmung des zeitlichen Verlaufs der Inhibition von Thrombin durch Sulfatide, gemessen mit Plasma, Fibrinogen und Chromozym<sup>®</sup> TH ergab, dass es sich um eine langsame Reaktion handelt, die mit dem Molekulargewicht (1000 kDa) der Sulfatidvesikel in ursächlicher Beziehung steht.

Die Interaktionen zwischen spezifischen Oberflächenstrukturen des Thrombins und Sulfatiden wurde im Fibrinogengerinnungstest mittels um Thrombin konkurrierenden Inhibitoren und SPR-Bindungsstudien untersucht. PPACK oder Hirudin inhibieren Thrombin in einer sehr schnell ablaufenden Reaktion über spezifische Interaktionen. PPACK alkyliert Thrombin am aktiven Zentrum (His57), Hirudin bindet weitläufig entlang des Thrombinmoleküls, wobei es die Spalte, die das aktive Zentrum enthält, abdeckt und mit der Fibrinogenbindungsstelle interagiert. Im Fall von Hirudin wurden im Fibrinogengerinnungstest für eine dem PPACK vergleichbare zusätzliche Gerinnungszeitverlängerung niedrigere Sulfatidkonzentrationen benötigt. Dies zeigt, dass Hirudin das Thrombinmolekül sterisch vor einer additiven Sulfatidbindung abschirmt und die Alkylierung des aktiven Zentrums des Thrombins durch PPACK die Bindung von Sulfatiden an Thrombin nicht inhibiert.

Im Vergleich zu ATIII, Batroxobin und FXa besitzt Thrombin, verteilt auf zwei Bindungsstellen, die höchste positive Oberflächenladung, was in der höchsten Sulfatidbindungskapazität, bestimmt mittels SPR, und in der funktionellen Beeinflussung (Aktivitätsteste) durch Sulfatide resultierte. Die Analogien im Verlauf der Inhibition von Thrombin durch Sulfatide mit dem Verlauf der Thrombininhibition durch unfraktioniertes Heparin und die SPR-Bindungsstudien wiesen auf eine gleichzeitige Interaktion der Sulfatidvesikel mit der Fibrinogenbindungsstelle und der Heparinbindungsstelle hin, die in der Inhibition des Thrombins resultierte.