

**Aus dem Institut für Klinische Biochemie und Pathobiochemie  
der Universität Würzburg**

**Vorstand: Professor Dr. med. Ulrich Walter**

**Das prokoagulatorische Potential  
hoher Faktor XI-Spiegel bei der venösen Thromboembolie**

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde  
der Medizinischen Fakultät  
der  
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von  
Konrad Joachim Reibetanz  
aus Seeheim an der Bergstraße

Würzburg, Februar 2006

Referent: Priv.-Doz. Dr. med. Christian M. Schambeck

Koreferent: Professor Dr. med. Ulrich Walter

Dekan: Professor Dr. med. Georg Ertl

Tag der mündlichen Prüfung: 18.07.2006

Der Promovend ist Arzt.

Meinen Eltern gewidmet.

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1	<i>Die normale Hämostase .....</i>	1
1.1.1	Das klassische Modell der plasmatischen Gerinnung .....	1
1.1.2	Die neue Rolle des intrinsischen Systems.....	3
1.1.3	Das „revised model of coagulation“ .....	3
1.1.4	Gerinnungsfaktor XI.....	5
1.1.4.1	Einflussfaktoren auf Faktor XI-Spiegel .....	6
1.1.4.2	Faktor XI im „revised model of coagulation“ .....	7
1.1.5	TAFI (thrombin activatable fibrinolysis inhibitor) .....	8
1.1.5.1	TAFI im „revised model of coagulation“ .....	8
1.2	<i>Venöse Thrombose und Lungenembolie .....</i>	10
1.2.1	Allgemeines .....	10
1.2.2	Pathogenese der Thrombose .....	10
1.2.2.1	Veränderungen der Blutströmung .....	11
1.2.2.2	Veränderungen der Gefäßwand .....	11
1.2.2.3	Hyperkoagulabilität .....	12
1.2.3	Risikofaktoren der venösen Thrombose .....	12
1.2.3.1	Erworbene Risikofaktoren der venösen Thrombose.....	12
1.2.3.2	Angeborene Risikofaktoren der venösen Thrombose .....	14
1.2.3.3	„Neue“ Risikofaktoren der venösen Thrombose .....	18
1.3	<i>Hyperkoagulabilität und deren laborchemische Marker .....</i>	20
1.3.1	Prothrombinfragmente F1+2.....	20
1.3.1.1	Allgemeines.....	20
1.3.1.2	F1+2 bei verschiedenen Erkrankungen und Lebensumständen .....	21
1.3.1.3	F1+2-Spiegel bei thrombophilen Diathesen .....	22
1.3.1.4	Faktor XI-Spiegel und F1+2 .....	24
1.4	<i>Fragestellung und Zielsetzung.....</i>	25

<b>2</b>	<b>PATIENTEN UND METHODEN.....</b>	<b>26</b>
2.1	<i>Patienten und Kontrollen .....</i>	26
2.1.1	Das Normalkollektiv .....	26
2.1.2	Das Thrombosekollektiv .....	26
2.1.3	Probensammlung und Lagerung .....	27
2.2	<i>Methoden.....</i>	28
2.2.1	Enzymimmunologische Bestimmung von Faktor XI.....	28
2.2.2	Enzymimmunologische Bestimmung von TAFIa/ai.....	31
2.2.3	Enzymimmunologische Bestimmung der Prothrombin- fragmente F1+2 .....	35
2.2.4	Chromogene Bestimmung von Gerinnungsfaktor VIII .....	38
2.2.5	Nachweis der Faktor V Leiden-Mutation.....	39
2.2.6	Nachweis des Prothrombin G20210A Polymorphismus .....	41
2.2.7	Bestimmung der antikoagulatorischen Aktivität von Protein C .....	41
2.2.8	Enzymimmunologische Bestimmung von Protein C .....	42
2.2.9	Bestimmung der antikoagulatorischen Aktivität von Protein S.....	43
2.2.10	Enzymimmunologische Bestimmung des ges. Protein S.....	44
2.2.11	Bestimmung des freien Protein S .....	44
2.2.12	Chromogene Bestimmung von Antithrombin .....	45
2.2.13	Bestimmung der Antiphospholipidantikörper .....	46
2.2.14	Bestimmung der Antikardiolipin-IgM- und -IgG-Antikörper .....	48
2.2.15	Statistische Auswertung und graphische Darstellung.....	49
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>51</b>
3.1	<i>Klinischer Hintergrund der untersuchten Kollektive .....</i>	51
3.1.1	Das Normalkollektiv .....	51
3.1.2	Das Thrombosekollektiv .....	51
3.1.2.1	Träger der Faktor V Leiden-Mutation .....	53
3.1.2.2	Patienten mit anderen thrombophilen Defekten .....	55
3.1.2.3	Patienten ohne thrombophile Diathese .....	55

3.1.3	Verteilung thromboembolischer Ereignisse in den Thrombosekollektiven.....	57
3.2	<i>Faktor XI-Spiegel bei Patienten und Kontrollen</i> .....	58
3.2.1	Faktor V Leiden-Träger versus Blutspender.....	58
3.2.1.1	Berechnung der Odds ratio bei Faktor V Leiden-Trägern.....	59
3.2.2	Nicht-thrombophile Thrombosepatienten vs. Blutspender.....	60
3.2.2.1	Berechnung der Odds ratio bei nicht-thrombophilen Thrombosepatienten.....	62
3.2.3	Vergleich zwischen Patienten mit Faktor V Leiden-Mutation und Patienten ohne thrombophile Diathese.....	63
3.3	<i>Thrombingenerierung bei Patienten und Kontrollen</i> .....	65
3.3.1	Zusammenhang zwischen F1+2-Werten und Faktor XI-Spiegeln bei den gesunden Blutspendern.....	66
3.3.2	Zusammenhang zwischen F1+2-Werten und Faktor XI-Spiegeln bei den Faktor V Leiden-Trägern.....	68
3.3.3	Zusammenhang zwischen F1+2-Werten und Faktor XI-Spiegeln bei den nicht-thrombophilen Patienten.....	70
3.4	<i>TAFIa/ai-Spiegel bei Patienten und Kontrollen</i> .....	73
3.4.1	TAFIa/ai-Spiegel und Faktor XI-Spiegel.....	74
3.4.1.1	Zusammenhang zwischen TAFIa/ai-Spiegeln und Faktor XI-Spiegeln bei Faktor V Leiden-Trägern.....	74
3.4.1.2	Zusammenhang zwischen TAFIa/ai-Spiegeln und Faktor XI-Spiegeln bei gesunden Blutspendern.....	76
3.4.2	TAFIa/ai-Spiegel und F1+2-Werte.....	78
3.4.2.1	Zusammenhang zwischen F1+2-Werten und TAFIa/ai-Spiegeln bei Faktor V Leiden-Trägern.....	78
3.4.2.2	Zusammenhang zwischen F1+2-Werten und TAFIa/ai-Spiegeln bei Blutspendern.....	80

<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>83</b>
4.1	<i>Die Prävalenzen der thrombophilen Diathesen</i> .....	84
4.1.1	Das Normalkollektiv .....	84
4.1.2	Das Thrombosekollektiv .....	85
4.2	<i>Gerinnungsfaktor XI – Erkenntnisse und neue Fragen</i> .....	86
4.2.1	Faktor XI als Risikofaktor der venösen Thrombose?.....	87
4.3	<i>Die Prothrombinfragmente F1+2 und ihre klinische Relevanz</i> .....	92
4.3.1	Thrombingenerierung im Normalkollektiv .....	93
4.3.2	Thrombingenerierung bei Thrombosepatienten.....	93
4.3.3	Erhöhte Aktivitätsmarker als Hinweis auf ein erhöhtes Thromboserisiko?.....	96
4.4	<i>Thrombin-Activatable Fibrinolysis Inhibitor (TAFI)</i> .....	97
4.4.1	TAFI-Funktion im Fibrinolytischen System .....	98
4.4.2	TAFIa/ai-Spiegel bei Faktor V Leiden-Trägern und Kontrollen .....	99
4.4.3	TAFI-Hemmung als therapeutische Maßnahme? .....	99
4.5	<i>Die Interaktion zwischen TAFI und der Faktor V Leiden-Mutation, der Thrombingenerierung und Faktor XI im Gerinnungsablauf</i> .....	102
4.5.1	Die Rolle des intrinsischen Gerinnungssystems bei der Regulation der Fibrinolyse in-vitro .....	103
4.5.2	Die Interaktion zwischen Faktor XI und der Faktor V Leiden-Mutation bei der Thrombogenese .....	104
4.5.3	Die Interaktion zwischen Faktor XI und der Thrombin-generierung.....	106
4.5.4	Die Interaktion zwischen Faktor V Leiden und TAFIa/ai .....	109
4.5.5	Die Rolle von Thrombin-Thrombomodulin bei der TAFI-Aktivierung in-vivo .....	111
4.5.6	Das revised model of coagulation „in-vivo“ .....	114
4.6	<i>Konsequenzen für den klinischen Alltag</i> .....	117

5	ZUSAMMENFASSUNG .....	119
6	LITERATURVERZEICHNIS .....	122



# 1 EINLEITUNG

## ***1.1 Die normale Hämostase***

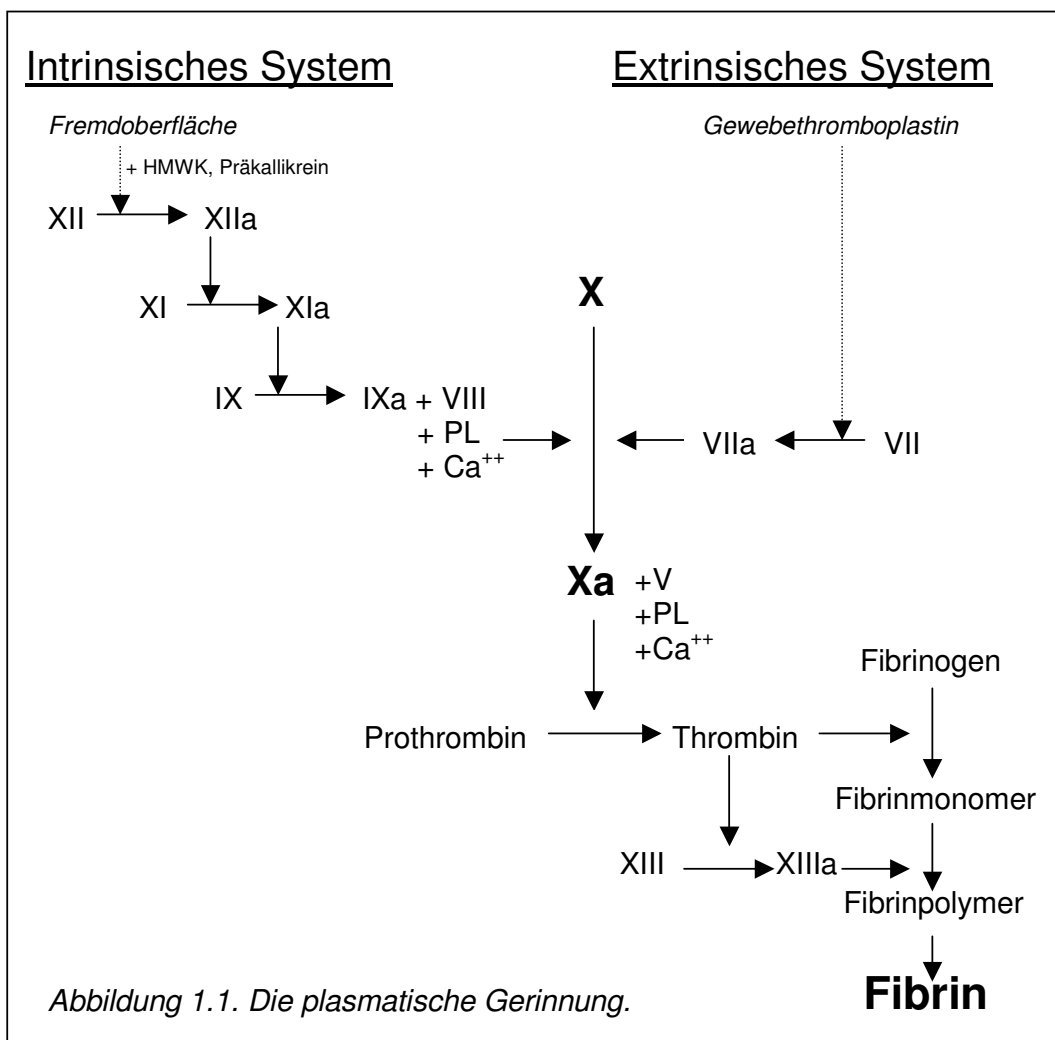
Die Blutgerinnung ist ein physiologischer Abwehrmechanismus des Körpers, der uns nach einem Gefäßdefekt vor größeren Blutverlusten bewahrt. Als Sofortantwort auf solch einen Gefäßdefekt werden Thrombozyten aktiviert, aggregieren und bilden einen Plättchenthrombus. Unterstützend stoppt eine Vasokonstriktion kurzzeitig den Blutfluss (Primäre Hämostase). Parallel dazu kommt es zur Aktivierung der plasmatischen Gerinnung und damit zur Bildung eines Fibringerinnsels, welches den Plättchenthrombus konsolidiert (Sekundäre Hämostase). Diese lebenswichtigen, aber gleichzeitig auch potentiell gefährlichen Schritte der Blutgerinnung unterliegen einer strengen Kontrolle und Regulierung durch eine Vielzahl verschiedener Proteaseinhibitoren und antikoagulatorischer Systeme. Nur das harmonische Zusammenspiel zwischen pro- und antikoagulatorischen Mechanismen stellt sicher, dass Gefäßdefekte schnell und suffizient abgedichtet werden können, aber gleichzeitig eine überschießende Thrombusbildung unterbleibt.

### **1.1.1 Das klassische Modell der plasmatischen Gerinnung**

Die Vorstellung, dass es sich bei der plasmatischen Gerinnung um eine sich schrittweise amplifizierende Kaskade handelt, geht auf Beobachtungen von Davie et. al. Mitte der sechziger Jahre zurück (Davie EW 1964). Diese Kaskade läuft auf der phospholipidhaltigen Oberfläche von Thrombozyten, Leukozyten und Endothelzellen ab und schließt eine Vielzahl verschiedener Plasmaproteine ein. Dabei wird in jedem Schritt ein inaktives Proenzym zum aktiven Enzym umgewandelt, welches dann die Aktivierung des in der Kaskade folgenden Proenzym vermittelt. Diese Abläufe werden an verschiedenen Stellen durch nicht-enzymatische Cofaktoren unterstützt. Klassischerweise unterscheidet man bei der plasmatischen Gerinnung zwei unabhängige Systeme: ein extrinsisches System, so genannt, da es durch eine extravaskuläre Komponente

(Gewebethromboplastin) aktiviert wird, sowie ein intrinsisches System, so genannt, da seine Komponenten im strömenden Blut enthalten sind. Beide Kaskaden laufen in einer gemeinsamen Endstrecke zusammen, an deren Schlusspunkt die Bildung von Thrombin steht, welches die Umwandlung von Fibrinogen zu Fibrin katalysiert (siehe Abbildung 1.1, modifiziert nach Hiller).

Damit die einmal aktivierte Gerinnungskaskade nicht zu einer überschießenden Thrombingenerierung und generalisierten Gerinnungsbildung führt, steht ihr ein ausgewogenes antagonistisches System gegenüber. Seine wichtigsten Aufgaben sind die Hemmung aktivierter Gerinnungsfaktoren (durch Antithrombin und das Protein C-System), deren Elimination durch das retikuloendotheliale System sowie der proteolytische Abbau überschüssigen Fibrins durch das fibrinolytische System.



Obwohl dieses klassische Kaskadenmodell der plasmatischen Gerinnung durch neuere Erkenntnisse abgewandelt werden muss, so ist es doch trotzdem für das grundsätzliche Verständnis des Gerinnungsablaufs unerlässlich.

### **1.1.2 Die neue Rolle des intrinsischen Systems**

Wie in Abbildung 1.1 dargestellt, geht das klassische Gerinnungsmodell davon aus, dass der intrinsische Weg abläuft, wenn Faktor XII mit einer negativ geladenen Fremdoberfläche in Kontakt kommt („contact activation“). In diese Reaktionsschritte sind Präkallikrein und high molecular weight kininogen (HMWK) mit involviert (Ratnoff OD 1979; Griffin JH 1976). Aktivierter Faktor XII spaltet dann Faktor XI in seine aktive Form (Bouma BN 1977). Es wurde beobachtet, dass ein Mangel an einem der Kontaktfaktoren (Faktor XII, Präkallikrein, HMWK) klinisch asymptomatisch ist, d.h. nicht mit einer Blutungsneigung einhergeht (Kaplan AP 1987), wohingegen schwerer Faktor XI-Mangel zu verschiedensten Blutungsabnormalitäten führen kann (Berliner S 1992; Asakai R 1991). Darüber hinaus konnte von Osterud et. al. gezeigt werden, dass der Faktor VIIa-TF-Komplex nicht nur Faktor X, sondern auch Faktor IX (Komponente des intrinsischen Systems) aktivieren kann (Osterud B 1977). Diese beiden Beobachtungen stellten die physiologische Relevanz der Kontaktfaktoren und ihre Beteiligung an der Gerinnungsaktivierung in Frage. Man schlussfolgerte, dass es einen anderen, kontaktsystem-unabhängigen Weg der Faktor XI-Aktivierung geben müsse. Dieser Weg wurde 1991 von zwei unabhängigen Forscherteams beschrieben: beide konnten eine (kontaktsystem-unabhängige) Aktivierung von Faktor XI durch Thrombin nachweisen (Naito K 1991; Gailani D 1991)

### **1.1.3 Das „revised model of coagulation“**

Basierend auf den in Abschnitt 1.1.2 beschriebenen Beobachtungen wurde von Gailani et. al. eine neue Modellvorstellung entwickelt, in der die Komponenten des intrinsischen und des extrinsischen Systems in einen gemeinsamen Gerinnungsweg vereinigt werden (Gailani D 1991). Dieser Gerinnungsweg wird aktiviert, wenn Faktor VII mit Gewebethromboplastin (TF = tissue factor) in

Berührung kommt, d.h. die Aktivierung erfolgt über das klassische extrinsische System. Der Komplex aus aktiviertem Faktor VII (VIIa) und TF (VIIa-TF) aktiviert Faktor X und katalysiert somit die Bildung einer geringen Menge Thrombins. Diese Menge an Thrombin ist nicht ausreichend, eine für ein stabiles Gerinnsel nötige Fibrinmenge zu bilden, reicht jedoch aus, retrograd Faktor XI zu aktivieren. Der VIIa-TF-Komplex hingegen wird sehr schnell durch die Wirkung des tissue factor pathway inhibitor (TFPI) gehemmt (Broze GJ 1990). Unter diesen Bedingungen kann zusätzliches Thrombin nur noch durch die Feedback-Aktivierung von Faktor XI unter Einschluss der Komponenten des klassischen intrinsischen Systems gebildet werden. Diese zusätzliche Thrombinbildung ist zum einen für die Konvertierung von Fibrinogen zu Fibrin und damit für die Gerinnelbildung verantwortlich, trägt aber gleichzeitig durch Aktivierung von TAFI zur Hemmung der Fibrinolyse bei (siehe Abschnitt 1.1.5). Somit werden die beiden klassischen Gerinnungssysteme zu einem gemeinsamen System zusammengefasst, wobei die Rolle des extrinsischen Systems v.a. in der Aktivierung der Gerinnung besteht, während das intrinsische System durch zusätzliche Thrombingenerierung die Gerinnung unterhält und (via TAFI) den vorzeitigen Abbau des Fibringerinnsels verhindert (siehe Abbildung 1.2).

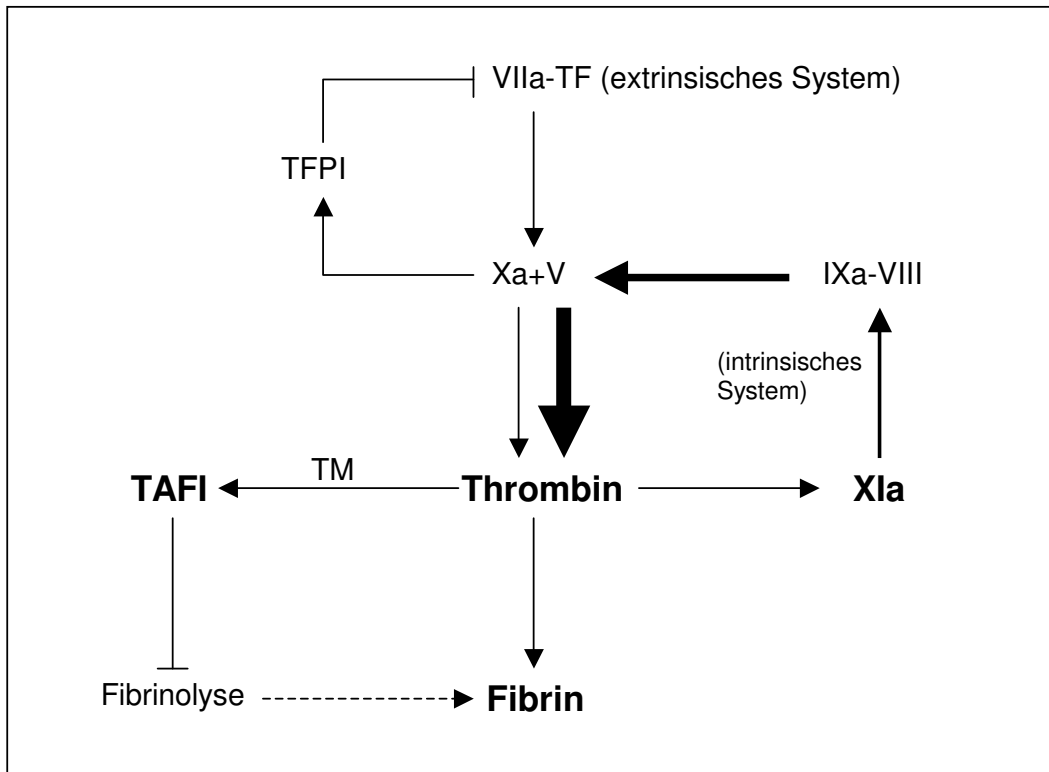


Abbildung 1.2. Das „revised model of coagulation“.

(TM= Thrombomodulin; TFPI= tissue factor pathway inhibitor;  $\longrightarrow$  aktiviert;  $\dashrightarrow$  baut ab;  $\longleftarrow$  hemmt)

### 1.1.4 Gerinnungsfaktor XI

Humaner Gerinnungsfaktor XI wird in der Leber gebildet und zirkuliert im Plasma in einer Konzentration von etwa 30 nM. Er wird codiert von einem 23 kb großen Gen, welches auf dem langen Arm von Chromosom 4 lokalisiert ist (Kato A 1989; Asakai R 1987; Fujikawa K 1986). Faktor XI ist ein 160 kDa schweres Glykoprotein, bestehend aus zwei identischen 80 kDa schweren Polypeptid-Untereinheiten, die über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind (McMullen BA 1991; Fujikawa K 1986; Bouma BN 1977). Jede dieser Untereinheiten besteht aus einer N-terminalen schweren Kette und einer C-terminalen trypsinähnlichen leichten Kette, welche das katalytische Zentrum bildet. An der schweren Kette lassen sich vier durch tandem repeats codierte „Apfeldomänen“, unterscheiden (McMullen BA 1991; Fujikawa K 1986) (siehe Abbildung 1.3). Die Aktivierung von Faktor XI (durch Faktor XIIa oder Thrombin)

zur aktiven Serinprotease XIa erfolgt durch eine einzige enzymatische Spaltung zwischen den Aminosäuren Arg<sup>369</sup> und Ile<sup>370</sup> in der leichten Kette (Fujikawa K 1986; Bouma BN 1977). Der so aktivierte Faktor XI kann nun Faktor IX in seine aktive Form konvertieren.

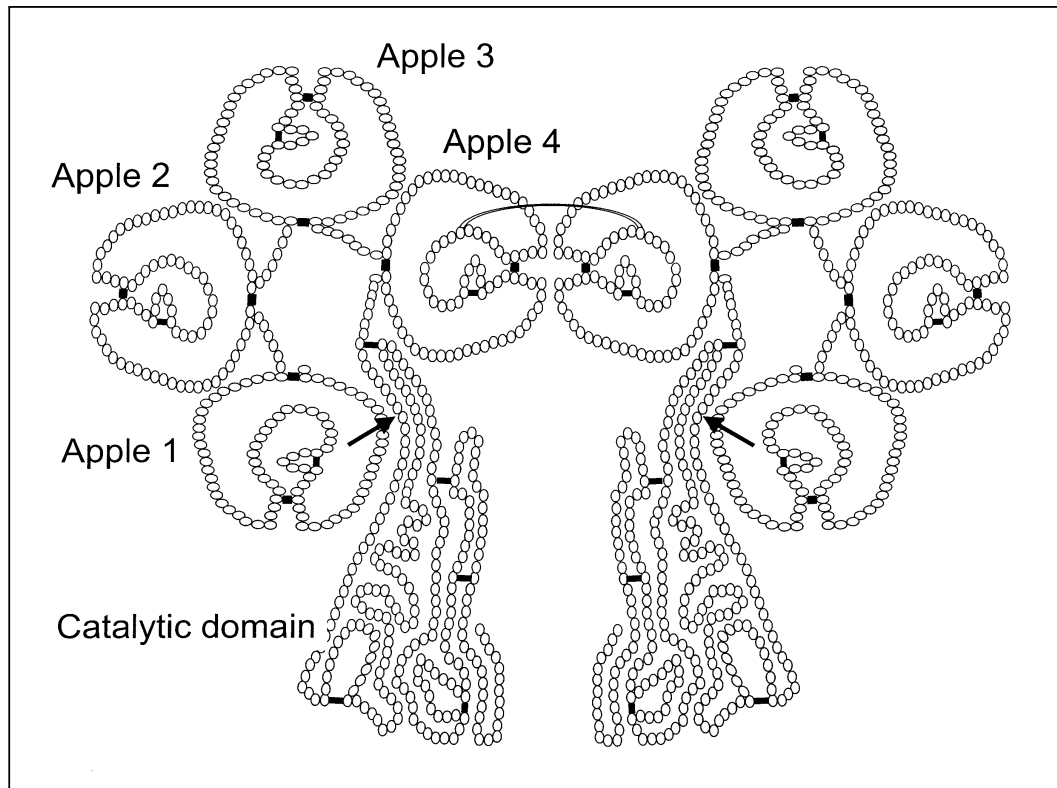


Abbildung 1.3. Gerinnungsfaktor XI.

#### 1.1.4.1 Einflussfaktoren auf Faktor XI-Spiegel

Die Plasmaspiegel von Faktor XI können durch eine Vielzahl verschiedener Lebensumstände und Erkrankungen beeinflusst werden. Es wurde gezeigt, dass Faktor XI-Spiegel mit zunehmendem Alter leicht ansteigen und bei Frauen etwas höher liegen als bei Männern (Meijers JC 2000). Ebenso führen eine instabile Angina pectoris (Murakami T 1995), akuter Myokardinfarkt (Minnema MC 2000) und maligne Erkrankungen (Glassman AB 1994) zu erhöhten Plasmaspiegeln von Faktor XI. Auch Diabetes mellitus, besonders in seiner insulinpflichtigen Form, geht mit signifikant über die Norm erhöhten Faktor XI-Werten einher (Patrassi GM 1982). Hingegen führen chronische Nieren- und

Lebererkrankungen zu einem deutlichen Abfall der Plasmaspiegel von Faktor XI (Degushi K 1989; Walker IR 1983). Ebenfalls fallen die Faktor XI-Spiegel mit fortschreitender Schwangerschaft ab, wobei v.a. im zweiten und dritten Trimenon signifikant erniedrigte Werte gefunden werden. Sie steigen in der frühen Postpartalperiode rasch wieder auf Normalwerte an (Phillips LL 1973).

#### **1.1.4.2 Faktor XI im „revised model of coagulation“**

Gerinnungsfaktor XI ist für den normalen Ablauf der Hämostase wichtig. Nach dem klassischen Kaskadenmodell der Gerinnung besteht die Hauptrolle von Faktor XI darin, zusammen mit Faktor XII, Kallikrein und HMWK den Gerinnungsvorgang von der intrinsischen Seite her zu initiieren. Im Gegensatz dazu erscheint im revised model of coagulation die Aktivierung von Faktor XI erst *spät*, nachdem die Kaskade durch das extrinsische System aktiviert wurde (siehe Abbildung 1.2). In diesem Modell ist Faktor XI v.a. dafür wichtig, die Thrombingenerierung aufrechtzuerhalten und somit für eine suffiziente Fibrinbildung zu sorgen, da der extrinsische Gerinnungsweg durch die Wirkung von TFPI schon sehr früh gehemmt wird (Broze GJ 1990). Ohne diese zusätzliche Faktor XI-abhängige Thrombinbildung ist eine effektive Hämostase nicht möglich. Dies wird teilweise durch klinische Beobachtungen belegt, die schweren Faktor XI-Mangel mit einer gewissen Tendenz zur Blutungsneigung in Verbindung bringen (Berliner S 1992; Asakai R 1991).

Zunächst bestanden Zweifel an dieser „späten“ Faktor XI-Aktivierung und damit an der in-vivo-Relevanz des revised model of coagulation. Zum einen konnte gezeigt werden, dass HMWK, an welches Faktor XI im Plasma gebunden ist (Bouma BN 1983), die thrombinabhängige Faktor XI-Aktivierung auch hemmen kann. Zum anderen fand die Faktor XI-Aktivierung nur in Gegenwart einer dextransulfathaltigen Oberfläche statt, welche physiologischerweise im Plasma nicht vorhanden ist (Scott CF 1992). Durch spätere Studien konnte jedoch wiederholt belegt werden, dass eine Faktor XI-Aktivierung durch Thrombin auch ohne dextransulfathaltige Cofaktoren möglich ist (von dem Borne PA 1995), bzw. die Oberfläche aktivierter Thrombozyten einen potentiellen Kofaktor darstellt (Baglia FA 2000; Baglia FA 1998). Folgt

man diesen Beobachtungen, so darf man davon ausgehen, dass eine thrombinabhängige Faktor XI-Aktivierung unter physiologischen Bedingungen stattfindet (von dem Borne PA 1995).

### **1.1.5 TAFI (thrombin activatable fibrinolysis inhibitor)**

TAFI ist eine Pro-Carboxypeptidase, die in der Leber gebildet wird und im Plasma in einer Konzentration von etwa 75 nM zirkuliert, wobei die Plasmaspiegel interindividuell sehr stark schwanken können (Henry M 2001; van Tilburg NH 2000; Schatteman KA 2000; Mosnier LO 1998; Bajzar L 1995), auch Konzentrationen von 275 nM sind in Gesunden gefunden worden (Mosnier LO 1998). TAFI ist ein 60 kDa schweres Glycoprotein, bestehend aus einer einzelnen Proteinkette mit 401 Aminosäuren. Seine Aktivierung zur Carboxypeptidase TAFIa (35 kDa) erfolgt durch eine enzymatische Spaltung hinter der Aminosäure Arg<sup>92</sup> und wird durch Thrombin (Name!), Plasmin oder Trypsin katalysiert (Bajzar L 1995; Eaton DL 1991). Thrombomodulin, ein spezifischer Rezeptor für Thrombin auf Endothelzellen, wirkt dabei als Cofaktor der thrombinvermittelten Aktivierung (Bajzar L 1996). Aktiviertes TAFI (TAFIa) wirkt antifibrinolytisch, indem es carboxyterminale Lysin- und Argininreste vom Fibrinmolekül abspaltet, wodurch Fibrin seine Cofaktorwirkung bei der Aktivierung von Plasminogen zu Plasmin verliert (Wang W 1998). TAFIa ist ein sehr instabiles Enzym. Seine Halbwertszeit ist stark temperaturabhängig und beträgt bei 37°C gerade einmal 8 Minuten, wobei der schnelle Wirkungsverlust durch eine intrinsische Konformationsänderung und nicht durch einen spezifischen Inhibitor bedingt ist (Boffa M 2000; Boffa M 1998). Diese inaktivierte Form von TAFIa wird als TAFIai bezeichnet.

#### **1.1.5.1 TAFI im „revised model of coagulation“**

Während der normalen Hämostase besteht ein Gleichgewicht zwischen Gerinnung und Fibrinolyse. Als „Vermittler“ in diesem labilen Gleichgewicht kann Thrombin angesehen werden, da es neben den gerinnungsfördernden Einflüssen auch einen antifibrinolytischen Effekt zu haben scheint (von dem Borne PA 1995). Der Mechanismus hinter diesem fibrinolysehemmenden Effekt



war lange unklar, bis zur Entdeckung von TAFI. Dieses Protein war in der Lage, die Lysezeit eines Fibringerinnsels auf mehr als das Doppelte zu verlängern. Der antifibrinolytische Effekt von Thrombin beruht demnach auf einer zusätzlichen, Faktor XI-getriggerten Thrombingenerierung und wird vermittelt durch die Wirkung von TAFI (von dem Borne PA 1997). Für die Aktivierung von TAFI sind dabei sehr hohe Thrombinkonzentrationen (500-2100 nmol/l) nötig (Bajzar L 1995). Nur der Feedback-Mechanismus der Thrombinbildung des revised model of coagulation liefert dafür eine Erklärung. Dies wird durch Beobachtungen von Mosnier et. al. bestätigt, nach denen die fibrinolysehemmende TAFI-Wirkung an ein intaktes intrinsisches System und damit auch an Faktor XI gebunden ist (Mosnier LO 1998). Damit nimmt Thrombin in diesem neuen Gerinnungsmodell eine zentrale Rolle ein: es ist durch die Konvertierung von Fibrinogen zu Fibrin nicht nur an der Bildung eines Gerinnsels beteiligt, sondern „schützt“ dieses gleichzeitig durch eine TAFI-vermittelte Hemmung der Fibrinolyse auch vor dessen Abbau.

## **1.2 Venöse Thrombose und Lungenembolie**

### **1.2.1 Allgemeines**

Die Diagnose einer venösen Thrombose wird in den westlichen Industrieländern jährlich etwa bei 1 von 1000 Einwohnern gestellt (Nordström M 1992, Anderson FA 1991) und ist damit nach dem akuten Myokardinfarkt und dem Schlaganfall die dritthäufigste Erkrankung des kardiovaskulären Systems (Goldhaber SZ 1994). Die bevorzugte Lokalisation ist mit über 85% das tiefe Venensystem der unteren Extremität, was u.a. die pathophysiologische Bedeutung des erschwerten Blutrückflusses unterstreicht. Die Thrombose stellt nicht nur wegen der Häufigkeit ihres Auftretens, sondern auch wegen ihrer Komplikationen ein großes medizinisches Problem dar. Akut ist v.a. die Lungenembolie gefürchtet, die in 1 bis 2% der Fälle tödlich endet. Eine viel häufigere und von anhaltender Morbidität geprägte Folge der Thrombose ist das postthrombotische Syndrom. Je nach Lokalisation und Ausdehnung der Thrombose tritt es bei 24 bis 60% der Patienten auf und verläuft stadienhaft, wobei die Symptome von ödematöser Schwellung über trophische Hautveränderungen bis hin zu chronischen und schwer therapierbaren Ulzerationen reichen (Brandjes DP 1997). Für den Betroffenen bedeutet dies eine langwierige Behandlung, verbunden mit einem deutlichen Verlust an Lebensqualität. Für die Gesellschaft stellen die hohen Therapiekosten einen nicht zu unterschätzenden ökonomischen Aufwand dar. Damit es nicht so weit kommt, versucht man dem Problem „Thromboembolie“ durch konsequente und routinemäßige Prophylaxe zu begegnen, basierend auf unseren Kenntnissen über pathophysiologische Abläufe bei der Thrombogenese sowie deren Risiken und Risikofaktoren.

### **1.2.2 Pathogenese der Thrombose**

Das Schlüsselereignis bei der Ausbildung einer Thrombose ist die Formation eines Blutgerinnsels innerhalb eines venösen Gefäßes. Nachdem lokal und unphysiologisch, d.h. ohne dass ein Gefäßdefekt abgedichtet werden müsste, die Gerinnungskaskade aktiviert wurde, kommt es zur Bildung eines Thrombus,

der sich entweder lokal-obstruktiv entwickelt oder instabil wird und kleinere Emboli bildet, die mit dem Blutstrom weitergetragen werden und entfernte Gefäße verschließen können. Die Hypothese, dass die Thrombusbildung das Ergebnis einer gestörten Balance zwischen lokaler Fibrinbildung und Fibrinolyse ist, wurde schon vor nunmehr fast 50 Jahren formuliert und beschreibt Fibrinbildung und -abbau als dynamische Prozesse (Astrup T 1958). Die aktuelle Kinetik im Gleichgewicht dieses Prozesses bestimmt, ob eine gewisse Schwelle zur Thrombogenese überschritten wird oder nicht. Drei Arten von Störungen im Kompartiment „Gefäß“ können die Kinetik dieses Gleichgewichts in Richtung Thrombose kippen. Diese wurden schon Mitte des vorletzten Jahrhunderts von Rudolph Virchow beschrieben und haben als sog. „Virchow-Trias“ auch heute noch Gültigkeit in der Erklärung der Pathogenese der Thrombose: Veränderungen der Blutströmung, Veränderungen der Gefäßwand und Veränderungen der Blutzusammensetzung (Hyperkoagulabilität).

### **1.2.2.1 Veränderungen der Blutströmung**

Die Thromboseentstehung wird durch die Verlangsamung der Blutströmung erheblich begünstigt. Im nicht zirkulierenden Blut kommt es früher oder später zu Hypoxidose mit konsekutiver Freisetzung gerinnungsaktivierender Stoffe aus geschädigten Thrombozyten (ADP, Serotonin, vWF, Kalzium). Zusätzlich können bei Verhältnissen der Stase antikoagulatorische Substanzen nicht herbeigeführt werden und prokoagulatorische nicht abströmen. Dies erklärt, warum thromboembolische Ereignisse bevorzugt in pathologisch erweiterten Gefäßen an der unteren Extremität auftreten, in der, durch die Gravitation bedingt, ohnehin schon ungünstige Strömungsverhältnisse herrschen.

### **1.2.2.2 Veränderungen der Gefäßwand**

Veränderungen der Gefäßwand sind im wesentlichen auf eine Schädigung des Endothels zurückzuführen. Damit geht zum einen die endotheliale Synthese gerinnungshemmender Substanzen (Prostazyklin) verloren, zum anderen führt die Endothelläsion zur Exposition des mikrofibrillären subendothelialen

Gewebes mit seiner plättchen-adhäsiven und gerinnungsaktivierenden Wirkung. Konsekutiv scheiden sich Thrombozyten ab und aggregieren. Die damit verbundene Thrombozytorhexis setzt zusätzliche Stoffe (u.a. Phospholipide) frei, die zur Aktivierung der plasmatischen Gerinnung und damit zur Fibrinbildung im Plättchenthrombus führen.

### **1.2.2.3 Hyperkoagulabilität**

Prinzipiell lässt sich eine erhöhte Gerinnungsneigung des Blutes nachweisen, wenn zu viele Substanzen mit gerinnungsaktivierender Wirkung (z.B. durch Gewebeschädigung oder Tumornekrose) in die Blutbahn eingeschwemmt werden, Hemmkörper aktivierter Gerinnungsfaktoren zu rasch abgebaut werden oder das Fibrinolyse-System gestört ist. In den letzten Jahren ist es durch neue Einsichten in den molekularen Ablauf der Gerinnungskaskade möglich geworden, „Marker der Hyperkoagulabilität“ zu identifizieren und spezifische Assays zu ihrem Nachweis zu entwickeln.

## **1.2.3 Risikofaktoren der venösen Thrombose**

Allgemein bezeichnet man als Risikofaktoren Umstände, die mit einer erhöhten Inzidenz der Erkrankung einhergehen und für die ein kausaler Zusammenhang nachweisbar ist. Wirken mehrere Risikofaktoren zusammen, können sie sich in ihrer Wirkung potenzieren und die Manifestation der Erkrankung nochmals beschleunigen. Bezogen auf die Erkrankung „venöse Thrombose“ lassen sich die Risikofaktoren danach einteilen, ob sie angeboren oder erworben sind.

### **1.2.3.1 Erworbene Risikofaktoren der venösen Thrombose**

- **Alter:** das Risiko einer venösen Thrombose steigt mit zunehmendem Alter stark an, von 1 Ereignis pro 10.000 Personen jünger als 40 Jahre auf 1 pro 100 Personen älter als 75 Jahre. (Nordström M 1992; Anderson FA 1991) Der Grund für diese starke Altersabhängigkeit ist letztendlich nicht geklärt, könnte aber in einer abnehmenden Mobilität, einer Abnahme des Muskel- und Gefäßtonus und einer erhöhten allgemeinen Morbidität mit zunehmendem Alter liegen.

- **Maligne Erkrankungen:** Schon 1865 stellte Trousseau einen Zusammenhang zwischen Krebserkrankungen und dem Auftreten von Thrombosen fest (Trousseau A 1865). In der Tat leiden etwa 10 bis 20% der Patienten mit Thrombosen an einer bösartigen Erkrankung. Die meisten Autoren machen humorale Effekte des Tumors für den Anstieg des Thromboserisikos verantwortlich (Bick RL 1992; Nand S 1990; Donati BM 1995), aber auch ein direkter mechanischer Einfluss in Form einer Gefäßkompression durch die wachsende Geschwulst ist denkbar.
- **Operationen und Traumata:** Chirurgische Eingriffe sind einer der häufigsten und damit gleichzeitig wichtigsten Risikofaktoren für Thrombosen. Ein sehr hohes Risiko (bis zu 50%) wurde in Zusammenhang mit Hüft- und Kniegelenksoperationen (Hull RD 1986; Cohen SH 1973), nach Abdominalchirurgie und Operationen im Bereich des Urogenitalsystems beschrieben (Bergquist D 1983; Walsh JJ 1974; Mayo ME 1971). Teilweise noch höhere Risiken (bis 60%) fand man nach schweren Schädel-Hirn-Traumen, Rückenmarksverletzungen oder Frakturen großer Knochen (Geerts WH 1994; Hjelmstedt A 1968).
- **Immobilisation:** Bettlägerigkeit ist schon seit vielen Jahren als Ursache der venösen Thrombose bekannt (Gibbs NW 1957). Auch Lähmungen, Ruhigstellung durch Gipsverbände sowie langes Sitzen (z.B. auf Flugreisen) erhöhen das Risiko der venösen Thrombose (Warlow C 1976; Cruickshank JM 1988; Symington IS 1977). Formalpathogenetisch gesehen rührt die thrombogene Wirkung der Immobilisation immer aus einer Beeinträchtigung der Funktion der Muskelpumpe der unteren Extremität her.
- **Östrogen therapie:** Eine Vielzahl verschiedener Studien bescheinigen der „Pille“ eine thrombogene Wirkung (Spitzer WO 1996; WHO 1995; Stadel BV 1981; Sartwell PE 1969). Ob dabei der Östrogengehalt allein für das erhöhte Thromboserisiko verantwortlich ist und ob ein linearer Zusammenhang zwischen der Östrogenmenge und dem Risiko besteht, ist letztlich noch nicht geklärt (Bloemenkamp KW 1995; Gerstmann BB 1991). Dagegen sprechen zumindest Beobachtungen, die ein vergleichbar hohes Thromboserisiko in Zusammenhang mit der postmenopausalen Hormon-

Ersatz-Therapie fanden (Grady D 1997; Daly E 1996; Grodstein F 1996; Jick H 1996), obwohl sich die darin enthaltene Östrogenmenge um mehrere Zehnerpotenzen von der Dosierung oraler Kontrazeptiva unterscheidet. Nichtzuletzt wegen der Häufigkeit ihrer Anwendung -und das v.a. im jüngeren Alter- stellt die orale Kontrazeption ein „thrombogenes Problem“ dar.

- **Schwangerschaft und Wochenbett:** Verglichen mit Gleichaltrigen besteht während der Schwangerschaft ein bis zu 10-fach erhöhtes Risiko für eine venöse Thrombose (Nordström M 1992). Zahlreiche Studien berichten davon, dass dieses Risiko in der postpartalen Periode durch den Rückgang der physiologischen Schwangerschaftshydrämie noch deutlich weiter ansteigt (Treffers PE 1983; Kierkegaard A 1983). Gründe für die allgemeine schwangerschaftsbedingte Steigerung des Thromboserisikos sind neben direkten mechanischen Einflüssen durch den wachsenden Uterus auch in typischen hormonellen Änderungen zu suchen (Macklon NS 1997; Goodrich SM 1964).
- **Antiphospholipidantikörper:** Das erworbene Antiphospholipidantikörper-Syndrom zeichnet sich durch das Auftreten eines Lupusantikoagulans und/oder erhöhter Spiegel an Anticardiolipinantikörpern aus. Darunter versteht man Antikörper der Klasse IgG (seltener IgM), die gegen Phospholipide gerichtet sind und die phospholipidabhängigen Reaktionen der Hämostase stören. Dies geht klinisch mit einer erhöhten Thrombose- (Ginsberg JS 1995) und Abortneigung (Branch DW 1985) einher.

### 1.2.3.2 Angeborene Risikofaktoren der venösen Thrombose

Ein sogenanntes „familial thrombophilia syndrome“ wurde schon Anfang des letzten Jahrhunderts beschrieben, jedoch wurde dieser Beobachtung bis zur Aufdeckung einzelner genetischer Defekte keine Aufmerksamkeit geschenkt. Allgemein versteht man unter diesem Syndrom eine Thromboseneigung, die sich v.a. in jungen Jahren und an ungewöhnlicher Lokalisation manifestiert und oft mehrere Familienmitglieder gleichermaßen betrifft (Meijers JC 2002, unveröffentlicht).

- **Antithrombin-Mangel:** Dieser Defekt wurde erstmals Mitte der sechziger Jahre von Egeberg beschrieben (Egeberg O 1965). Er wird autosomal-dominant vererbt und tritt nur in heterozygoter Form auf (die homozygote Form ist letal), wobei dann die Antithrombinaktivität auf etwa 1/3 der Norm reduziert ist. Es werden zwei Formen des Mangels unterschieden: *Typ I:* Antithrombin-Antigenspiegel und Antithrombin-Aktivität sind reduziert; *Typ II:* normaler Antithrombin-Antigenspiegel bei reduzierter Antithrombin-Aktivität. Beide Formen sind mit einem etwa 5-fach erhöhten Thromboserisiko verbunden (Koster T 1995) und treten etwa mit einer Häufigkeit von 1/350 in der Normalbevölkerung auf (Tait RC 1991).
- **Protein C-Mangel:** Dieser Defekt wurde erstmals 1981 von Griffin beschrieben (Griffin JH 1981). Ähnlich dem Antithrombinmangel scheint die homozygote Ausprägung rasch letal zu verlaufen. Auch hier sind zwei Typen bekannt: gestörte Proteinsynthese (Typ I) und dysfunktionelles Protein (Typ II), die sich aber in ihrem Thromboserisiko nicht grundlegend unterscheiden (jeweils etwa 7-fach erhöht (Koster T 1995)), seine Gesamtprävalenz in der Normalbevölkerung liegt bei etwa 0,2% (Tait RC 1995).
- **Protein S-Mangel:** Protein S ist als nicht-enzymatischer Cofaktor von aktiviertem Protein C ein sehr wichtiges antikoagulatorisches Protein. Erstmals 1984 wurde ein Zusammenhang zwischen Protein S-Mangel und einem erhöhten Thromboserisiko beschrieben (Comp PC 1984, Schwartz HP 1984). Weitere Studien ergaben ein dem Protein C- und Antithrombinmangel vergleichbares Krankheitsbild: autosomal-dominanter Vererbungsmodus, heterozygote Form mit etwa 6- bis 10-fach erhöhtem Thromboserisiko, homozygote Form extrem selten (Simmonds RE 1998; Engesser L 1987). Bei der überwiegenden Zahl der betroffenen Patienten liegt eine kombinierte Reduktion des Protein S-Gesamtantigens und freien Protein S-Antigens (Typ I) oder ein gemischter Typ I / Typ III vor (Typ III: reduziertes freies Protein S bei normalem Gesamtprotein S). Beide Formen führen zur Verminderung der Protein S-Aktivität. Sehr selten findet man eine isolierte Reduktion des freien Protein S (Typ II). Die Prävalenz des Protein

S-Mangels im Thrombosekollektiv liegt bei etwa 1 bis 2% (Koster T 1995), Angaben über die Häufigkeit im Normalkollektiv liegen derzeit nicht vor.

Antithrombin- und Protein C- / S-Mangel auch können als „erworbene Form“ im Rahmen von Leber- und Nierenerkrankungen, bzw. bei einer oralen Antikoagulationstherapie auftreten. Diese Umstände müssen bei der Diagnose der hereditären Form des Inhibitorenmangels stets berücksichtigt und ausgeschlossen werden.

- **Faktor V Leiden-Mutation:** Das Plasma von Normalpersonen antwortet auf die Zugabe von aktiviertem Protein C (APC) mit einer Verlängerung der Gerinnungszeit, da APC durch enzymatische Spaltung die Cofaktoren Va und VIIIa inaktiviert. Im Jahr 1993 beschrieben Dahlbäck et. al. drei Familien, bei denen eine APC-Zugabe nicht die zu erwartende antikoagulatorische Wirkung zeigte (Dahlbäck B 1993). Diese „APC-Resistenz“ ging mit einer Häufung von Thromboseereignissen in diesen Familien einher, was für eine neue, genetisch bedingte Ursache der „familial thrombophilia“ sprach. Ein Jahr nach der Entdeckung der APC-Resistenz konnte von Bertina et. al. die molekulare Grundlage dieses Defekts identifiziert werden: in über 90% der Fälle lag ihr eine autosomal-dominant vererbte Punktmutation an Position 1.691 im Exon 10 des Faktor V Gens zugrunde, wobei die Aminosäure Arg<sup>506</sup> durch Glutamin ersetzt war (Bertina RM 1994). Diese Mutation betrifft eine von drei Schnittstellen des APC im Faktor Va, mit der Folge, dass (die prokoagulatorische Wirkung von) Faktor Va bei diesen Patienten nicht mehr durch (das antikoagulatorisch wirkende) APC reguliert werden kann, d.h. *resistent* gegen APC ist. Benannt nach ihrem Entdeckungsort, dem niederländischen Ort Leiden, bezeichnet man diese APC-Resistenz auch als „Faktor V Leiden-Mutation“. Die Prävalenz der Faktor V Leiden-Mutation hängt von der ethnischen Herkunft der Bevölkerung ab und ist somit starken regionalen Schwankungen unterworfen. Die höchsten Prävalenzen wurden für die Bevölkerung kaukasischer Abstammung beschrieben, d.h. 2 bis 16% heterozygote (Rees



DC 1995) und 0,06 bis 0,25% homozygote (Dahlbäck B 1997) Träger in der Normalbevölkerung. Im Gegensatz dazu ist die Faktor V Leiden-Mutation bei Eskimos, Afrikanern, Japanern und bei den australischen und amerikanischen Ureinwohnern eine ausgesprochene Rarität (De Maat MP 1996; Gou D 1996; Ko YL 1996; Ozawa T 1996; Rees DC 1995). Diese großen geographischen Differenzen lassen vermuten, dass die Mutation *einmal* vor langer Zeit auftrat und dass wahrscheinlich alle Fälle vererbt sind und nicht auf spontanen Neumutationen beruhen. Verglichen mit der Normalbevölkerung ist eine heterozygote Faktor V Leiden-Mutation mit einem 3- bis 8-fach erhöhtem Thromboserisiko assoziiert (Ridker PM 1995; Rosendaal FR 1995; Koster T 1993). Dieses Risiko steigt bei Homozygotie auf das bis zu 80-fache der Norm an (Rosendaal FR 1995). Die Faktor V Leiden-Mutation findet man bei etwa 20% der Patienten eines unselektierten Thrombosekollektivs (Rosendaal FR 1995; Koster T 1993) und bei über der Hälfte der Thrombopatienten mit hereditärer thrombophiler Diathese (Griffin JH 1993). Somit ist die Faktor V Leiden-Mutation nicht nur in der Normalbevölkerung von hoher Prävalenz, sondern stellt auch bei Thrombopatienten den häufigsten zu beobachtenden Defekt dar.

- **Prothrombin-Polymorphismus:** Im Jahre 1996 beschrieben Poort et. al. eine Mutation im Prothrombingen, die sowohl mit einem erhöhten Plasma-Prothrombinspiegel als auch mit einem gesteigerten Thromboserisiko einhergeht (Poort SR 1996). Es handelt sich dabei um eine Punktmutation in der 3' "untranslated region" des Prothrombingens, wobei in Position 20210 die Aminosäure Arginin durch Glutamin ersetzt ist. Ähnlich der Faktor V Leiden-Mutation unterliegt die Prävalenz des Prothrombinpolymorphismus regionalen Einflüssen (Zunahme von Nord nach Süd) und liegt in der gesunden Bevölkerung kaukasischer Abstammung bei etwa 2% (Rosendaal FR 1998). Im unselektierten Thrombosekollektiv sind etwa 6%, in Familien mit hereditärer Thrombophilie 18% der Patienten Träger des Prothrombinpolymorphismus, welcher damit (nach der Faktor V Leiden-Mutation) den zweithäufigsten hereditären Risikofaktor für die venöse Thrombose darstellt. Verglichen mit dem Normalkollektiv erhöht sich bei Mutationsträgern das

Thromboserisiko auf etwa das 3-fache (Poort SR 1996). Ob für dieses erhöhte Risiko die erhöhten Prothrombin-Plasmaspiegel anzuschuldigen sind oder ob ein anderer Mechanismus vorliegt, kann zur Zeit noch nicht abschließend gesagt werden.

- **Hyperhomozysteinämie:** Moderat erhöhte Homozysteinspiegel sollen mit einem etwa 2-fach gesteigerten Thromboserisiko einhergehen (den Heijer M 1998; den Heijer M 1996; Simioni P 1996; Falcon CR 1994), wobei die Prävalenz derartiger Plasmaspiegel in der Normalbevölkerung 5 bis 10% beträgt (Franco RF 1998; den Heijer M 1996). Hyperhomozysteinämie kann genetische Ursachen haben (Mutation im Gen der Methylen-tetrahydrofolsäure-Reduktase (Engbersen AM 1995)) oder erworben sein (z.B. Vitamin B6-, B12-Mangel (Ubbink JB 1993)).

### 1.2.3.3 „Neue“ Risikofaktoren der venösen Thrombose

- **Hoher Faktor VIII-Spiegel:** Faktor VIII-Spiegel >150 IU/dl sind mit einem ca. 3-fach über die Norm erhöhten Thromboserisiko assoziiert. In der Normalbevölkerung liegt die Prävalenz dieser Plasmaspiegel bei etwa 11% (Koster T 1995). Die Ursache erhöhter Faktor VIII-Spiegel ist nicht endgültig geklärt, man vermutet aber auch hier genetische Ursachen, da der Faktor VIII-Spiegel stark von der Blutgruppe und dem Spiegel des von-Willebrand-Faktor abhängig ist.
- **Hoher Faktor XI-Spiegel:** Meijers et. al. konnten 2000 an den Patienten der „Leiden Thrombophilia Study (LETS)“ zeigen, dass Faktor XI-Spiegel oberhalb der 90. Perzentile mit einem 2-fach über die Norm erhöhten Risiko für eine venöse Thromboembolie verbunden sind. Darüber hinaus berichten die Autoren über eine Dosis-Wirkungs-Beziehung zwischen steigenden Faktor XI-Spiegeln und einem parallel dazu ansteigenden Thromboserisiko (Meijers JC 2000). Es wird vermutet, dass das thrombogene Potential hoher Faktor XI-Werte v.a. in einer TAFI-vermittelten Hemmung der Fibrinolyse begründet ist.
- **Hohe TAFI-Spiegel:** Ebenfalls an den Patienten der LETS konnten van Tilburg et. al. im Jahr 2000 zeigen, dass TAFI-Antigen-Spiegel oberhalb der

90. Perzentile mit einem leicht erhöhten Thromboserisiko assoziiert sind. Ein graduelles Ansteigen des Thromboserisikos mit steigendem TAFI-Spiegel wurde nicht gefunden, d.h. leicht erhöhte TAFI-Werte scheinen keinen Risikofaktor darzustellen (van Tilburg NH 2000).

### **1.3 Hyperkoagulabilität und deren laborchemische Marker**

Ein präthrombotischer Zustand lässt sich beschreiben als eine Verschiebung des physiologischen Gleichgewichts zwischen pro- und antikoagulatorischen Kräften in Richtung „Übergerinnbarkeit“ (Hyperkoagulabilität), hervorgerufen durch eine pathologische Aktivierung der Enzyme der Gerinnungskaskade, ohne dass jedoch klinische Zeichen einer Thrombose vorliegen. Diese Gerinnungsaktivierung geht einher mit der Freisetzung einer Vielzahl verschiedener Peptide, Enzyme und Enzym-Inhibitor-Komplexe (Bauer KA 1994; Mannucci PM 1994). Genaue Einsichten in die Biochemie der Gerinnungsabläufe haben es ermöglicht, diese sog. „Aktivitätsmarker“ zu identifizieren und spezifische und sensitive Methoden / Assays für deren Bestimmung zu entwickeln. Erhöhte Plasmaspiegel dieser Marker sind dabei ein sensitiver Fühler für das Ausmaß der Gerinnungsaktivität und können somit bei der Aufdeckung von Hyperkoagulabilität und präthrombotischen Zuständen von großem Nutzen sein. Sie stellen außerdem gute Parameter zur Überwachung einer antikoagulatorischen oder thrombolytischen Therapie dar. Einer der wichtigsten Aktivitätsmarker sind die Prothrombinfragmente F1+2 (F1+2).

#### **1.3.1 Prothrombinfragmente F1+2**

##### **1.3.1.1 Allgemeines**

Prothrombin ist ein Vitamin K-abhängiges Protein, das in der Leber gebildet wird und aus 582 Aminosäuren aufgebaut ist. Vor seiner Sezernierung ins Plasma wird Prothrombin post-translational modifiziert, wobei Vitamin K-abhängig am N-terminalen Ende 10 Glutaminsäurereste in Carboxyglutaminsäurereste (Gla-Reste)  $\delta$ -carboxyliert werden. Diese Reste sind für die spätere Bindung des Moleküls an phospholipidhaltige Membranen (z.B. von Thrombozyten) nötig. Das Prothrombinmolekül enthält zentral zwei homologe Bereiche, die „Kringeldomänen“ genannt werden und wahrscheinlich für die Interaktion mit Faktor Va des Prothrombinase-Komplexes verantwortlich sind.

Das „reife“ Prothrombinmolekül zirkuliert im Plasma als Zymogen (Referenzbereich 0,4 bis 1,1 nmol/l) und wird während des Gerinnungsablaufs zu einer Serinprotease aktiviert. Diese Aktivierung wird katalysiert durch die proteolytische Wirkung des Prothrombinase-Komplexes (FXa + FVa + Phospholipid + Ca<sup>2+</sup>), wobei Prothrombin zwischen den Aminosäuren Arg<sup>273</sup> und Thr<sup>274</sup> in Prä-Thrombin (carboxyterminales Ende) und die Prothrombinfragmente F1+2 (aminoternales Ende) gespalten wird (schematisch in Abbildung 1.4). Durch weitere Proteolyse des Prä-Thrombin durch Faktor Xa entsteht das aus einer A- und B-Kette aufgebaute Thrombin, welches die Bildung von Fibrin katalysiert. Da Prothrombinfragmente F1+2 im gleichen Maße wie Thrombin freigesetzt werden, stellen sie einen direkten Marker der Thrombingenerierung dar.

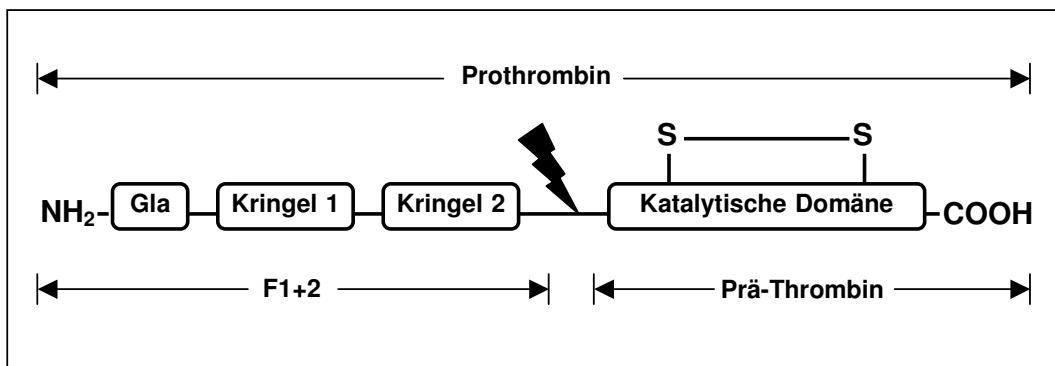


Abbildung 1.4. Spaltung des Prothrombin-Moleküls.

### 1.3.1.2 F1+2 bei verschiedenen Erkrankungen und Lebensumständen

Eine ganze Reihe verschiedener Lebensumstände und Erkrankungen geht mit einer Erhöhung der F1+2-Spiegel über die Norm und damit mit einer Verschiebung des hämostaseologischen Gleichgewichts in Richtung Hyperkoagulabilität einher, ohne dass jedoch klinische Zeichen einer Thrombose vorliegen müssen. Eine naheliegende Beobachtung ist, dass akute und chronische Erkrankungen, die mit Schäden an den Gefäßwänden einhergehen, wie z.B. Angina pectoris und Herzinfarkt, Schlaganfälle oder Diabetes mellitus, zu einer messbaren Gerinnungsaktivierung führen (Lopez Y

1999; Reverter JL 1997; Yokoyama H 1996). Auch bei entzündlichen (Lins M 1996) oder malignen Erkrankungen (Gouin-Thibault I 1999; Lopez Y 1999) konnte ein Anstieg der Prothrombinfragment-Spiegel nachgewiesen werden. Aber nicht nur verschiedenste Arten von Erkrankungen, sondern auch „physiologische“ Vorgänge, wie eine normal verlaufende Schwangerschaft (Schambeck CM 2001; Lopez Y 1999), das normale Altern (Lopez Y 1999; Mari D 1995) oder die Einnahme von steroidhaltigen Medikamenten (orale Kontrazeptiva, Hormon-Ersatz-Therapie) (Prasad RN 1999; Vehkavaara S 2001) werden von einer über die Norm erhöhten Thrombinbildung (und damit F1+2-Erhöhung) begleitet.

### **1.3.1.3 F1+2-Spiegel bei thrombophilen Diathesen**

Als thrombophile Diathese wird ein Zustand einer im Vergleich zur Normalbevölkerung erhöhten Thromboseneigung bezeichnet, wobei die Ursachen dafür sowohl angeboren als auch erworben sein können. Die thrombophile Diathese ist im strengen Sinne der Definition kein klinisches Symptom und darf nicht mit der thromboembolischen Erkrankung gleichgesetzt werden. Sie kann aber, nicht zuletzt aufgrund ihrer Häufigkeit (etwa 10% in der gesunden Bevölkerung), Morbidität und Mortalität der Bevölkerung entscheidend beeinflussen. Bei einer Vielzahl dieser thrombophilen Störungen ist die basale Thrombinbildung erhöht und damit das Gleichgewicht zwischen pro- und antikoagulatorischen Kräften in Richtung Hyperkoagulabilität verschoben. Daher lässt sich bei einem nicht unerheblichen Anteil dieser Patienten eine messbare Erhöhung der F1+2-Plasmaspiegel als Ausdruck dieser Hyperkoagulabilität nachweisen. Wie bereits in Abschnitt 1.3.1.2 erwähnt, können eine ganze Reihe verschiedenster Erkrankungen und Lebensumstände einen Einfluss auf die Aktivitätsmarker der Gerinnung nehmen. Daher ist es auch nicht verwunderlich, dass die Häufigkeitsangaben bezüglich Hyperkoagulabilität bei thrombophilen Patienten stark von den Selektionskriterien des Patientenkollektivs abhängen. So finden sich in der Literatur in Abhängigkeit der Patientenauswahl teils sehr stark divergierende Angaben in Bezug auf die Häufigkeit erhöhter F1+2-Spiegel bei ein- und

derselben thrombophilen Diathese. Ebenso gilt zu berücksichtigen, dass es sich generell bei den Aktivitätsmarkern um rein laboranalytische Parameter handelt, die keinen Rückschluss auf die Wahrscheinlichkeit einer klinischen Thrombosemanifestation zulassen. So konnten Kyrle et. al. eindrücklich belegen, dass die F1+2-Spiegel keine prädiktive Aussagekraft in Bezug auf das Thromboserisiko haben (Kyrle PA 1997).

#### **1.3.1.3.1 Faktor V Leiden-Mutation und F1+2**

Eine Vielzahl verschiedener Studien konnte zeigen, dass die Faktor V Leiden-Mutation mit signifikant über die Norm erhöhten F1+2-Spiegeln einhergeht. Unabhängig von einer eventuellen thromboembolischen Vorgeschichte wurden in Abhängigkeit der Patientenauswahl bei 20 bis 30% der Mutationsträger F1+2-Werte im pathologischen Bereich beobachtet (Gouin-Thibault I 2002; Kyrle PA 1997; Leroy-Matheron C 1996; Martinelli I 1996; Zöller B 1996). Somit finden sich bei einem gewissen (identischen) Prozentsatz sowohl symptomatischer als auch asymptomatischer Faktor V Leiden-Träger Anzeichen einer andauernden und unphysiologisch hohen Thrombingenerierung.

#### **1.3.1.3.2 Weitere thrombophile Diathesen und F1+2**

- **Inhibitorenmangel:** Angeborene Defekte, welche die normale Funktion des antikoagulatorisch wirkenden Protein C-Wegs betreffen, also ein Protein C- und / oder Protein S-Mangel, sind mit einer erhöhten Thrombingenerierung und einem lebenslang erhöhten Thromboserisiko verbunden (Mannucci PM 1992; Bauer KA 1988). Die gesteigerte Thrombingenerierung bei diesen Patienten spiegelt sich laboranalytisch in erhöhten F1+2-Spiegeln wider. So konnte Bauer et. al. bei bis zu 50% der Patienten mit isoliertem Protein C-Mangel deutlich über die Norm erhöhte F1+2-Werte nachweisen (Bauer KA 1988). Hingegen scheint bei Vorliegen eines Antithrombin-Mangels Hyperkoagulabilität ein nicht so ausgeprägtes Symptom zu sein: bei diesen Patienten konnten nur gering erhöhte F1+2-Spiegel nachgewiesen werden (Mannucci PM 1992).

- **Hoher Faktor VIII-Spiegel:** Thrombosepatienten, bei denen ein hoher Faktor VIII-Spiegel (>150 IU/dl) nachweisbar ist, zeigen sehr häufig über das normale Maß erhöhte F1+2-Werte als Ausdruck einer anhaltend hohen Thrombingenerierung. Teilweise soll das auf bis zu 75% dieser Patienten zutreffen (O'Donnell J 2001). Verglichen mit anderen thrombophilen Diathesen scheint somit Hyperkoagulabilität bei Patienten mit hohen Faktor VIII-Spiegeln ein deutlich häufigerer Befund zu sein.
- **Prothrombin-Polymorphismus:** Was Hyperkoagulabilität anbelangt, so soll sich der Prothrombinpolymorphismus analog zur Faktor V Leiden-Mutation verhalten: auch hier finden sich deutlich über die Norm erhöhte F1+2-Spiegel, sowohl bei symptomatischen wie auch bei asymptomatischen Mutationsträgern (Gouin-Thibault I 2002).
- **Antiphospholipid-Antikörpersyndrom:** Auch dieser erworbene thrombophile Defekt zeichnet sich durch signifikant über die Norm erhöhte F1+2-Spiegel aus und stellt somit einen „hypercoagulable state“ dar (Ellis MH 2000; Ferro D 1994).

#### 1.3.1.4 Faktor XI-Spiegel und F1+2

Über den Zusammenhang zwischen hohen Faktor XI-Spiegeln und der Thrombingenerierung liegen im Moment noch sehr spärliche und fast ausschließlich experimentelle Daten vor. Es konnte vor einigen Jahren in einem in-vitro Gerinnungsmodell mit humanem Plasma gezeigt werden, dass eine Hemmung von Faktor XI durch einen spezifischen Anti-Faktor XI-Antikörper zu signifikant niedrigerer Thrombingenerierung (gemessen an niedrigen F1+2-Werten) führt, als in Anwesenheit von nativem Faktor XI (von dem Borne PA 1995). Diese Ergebnisse unterstreichen die wichtige Rolle von Faktor XI im in-vitro-Gerinnungsablauf und können als experimentelle Bestätigung einer Faktor XI-getriggerten Thrombinbildung in Sinne eines Feedback-Mechanismus entsprechend dem revised model of coagulation angesehen werden.



## **1.4 Fragestellung und Zielsetzung**

Neueren Erkenntnissen zufolge stellen erhöhte Faktor XI-Spiegel einen Risikofaktor für die Ausbildung einer venösen Thromboembolie dar, über welchen Mechanismus Faktor XI dabei thrombogen wirkt, ist allerdings noch unklar. Nach den Vorstellungen des revised model of coagulation erfolgt die Faktor XI-Aktivierung innerhalb eines Feedback-Mechanismus durch Thrombin und trägt im Folgenden zu einer andauernden Thrombingenerierung bei. Eine gesteigerte Thrombinenerierung finden wir gehäuft auch bei Trägern von thrombophilen Defekten, wie z.B. der Faktor V Leiden-Mutation. Folgt man der Annahme einer multikausalen Ätiologie der Thrombose, könnte eine eventuelle Faktor XI-abhängige Hyperkoagulabilität bei Patienten mit bereits gestörtem antikoagulatorischen APC-Weg (Faktor V Leiden-Mutation) einen zusätzlichen Risikofaktor bei der Ausbildung einer Thrombose darstellen. Wir vermuteten daher, dass hohe Faktor XI-Spiegel bei diesen Patienten auch in-vivo für Hyperkoagulabilität und Thrombogenität verantwortlich sein könnten.

Zunächst wollten wir klären, welchen Einfluss ein erhöhter Faktor XI-Spiegel auf das Thromboserisiko bei Trägern der Faktor V Leiden-Mutation im Vergleich zu nicht-thrombophilen Patienten hat. Uns interessierte weiterhin die bisher in der Literatur noch nicht vollständig geklärte Frage, über welchen Mechanismus erhöhte Faktor XI-Spiegel in-vivo zum Tragen kommen. Spiegelt sich das revised model of coagulation mit seiner Faktor XI-getriggerten Thrombingenerierung und einer dadurch ausgelösten TAFI-abhängigen Fibrinolysehemmung auch in-vivo wider? Kann der neue Risikofaktor „hoher Faktor XI“ hier Aufschluss bringen und wie ist dabei seine Interaktion mit der Faktor V Leiden-Mutation, dem häufigsten hereditären Gerinnungsdefekt?

Um diese Fragen zu beantworten, analysierten wir die Faktor XI-, F1+2- und TAFIa/ai-Werte bei Thrombosepatienten mit Faktor V Leiden-Mutation und nicht-thrombophilen Thrombosepatienten, jeweils verglichen mit Blutspendern. Anders als in der bereits veröffentlichten Literatur arbeiteten wir dabei mit hochselektierten Patientenkollektiven, unter Ausschluss sämtlicher möglicher Einflussfaktoren.

## **2 PATIENTEN UND METHODEN**

### ***2.1 Patienten und Kontrollen***

#### **2.1.1 Das Normalkollektiv**

Als Kontrollkollektiv stand uns eine Gruppe von 420 Personen zur Verfügung, die in der Zeit von Anfang Januar 2001 bis Mitte März 2001 in der Universitätsklinik Würzburg Blut spendeten. Bei allen Blutspendern wurde eine detaillierte Eigenanamnese mit besonderem Augenmerk auf eine thromboembolische Vorgeschichte, Herz-Kreislauf- und Stoffwechselerkrankungen sowie etwaiger Medikation erhoben. Es wurden nur diejenigen Blutspender in die Studie aufgenommen, bei denen anamnestisch eine thromboembolische Vorgeschichte ausgeschlossen werden konnte und die nicht Träger der relativ häufigen Faktor V Leiden-Mutation oder eines Prothrombin G20210A Polymorphismus waren.

#### **2.1.2 Das Thrombosekollektiv**

In der Zeit zwischen März 1998 bis Februar 2002 stellten sich 717 Patienten zur (Weiter-)Behandlung einer Thrombose in der Gerinnungsambulanz der Medizinischen Universitätsklinik Würzburg vor. Bei allen Patienten war die Thrombose zum Zeitpunkt ihres Auftretens durch eine objektive Untersuchung (Phlebographie, farbkodierte Duplexsonographie, Perfusions- / Ventilations-Szintigraphie der Lunge, Pulmonalis-Angiographie) gesichert worden. Es wurde zunächst vom Patienten eine eingehende Eigen- und Familienanamnese erhoben und sämtliche thromboembolische Ereignisse sowie deren mögliche Auslöser und Risikofaktoren verzeichnet. Des Weiteren wurde eine körperliche Untersuchung u.a. zur Erfassung einer frischen Thrombose durchgeführt. In die Studie wurden nur Patienten aufgenommen, deren thromboembolisches Ereignis mindestens zwei Monate zurücklag und bei denen eine maligne Erkrankung ausgeschlossen werden konnte. Weitere Ausschlusskriterien waren

Erkrankungen / Ereignisse von denen bekannt ist, dass sie zu Veränderungen der Plasmaspiegel von Gerinnungsfaktor XI (Diabetes mellitus, koronare Herzkrankheit, akuter Myokardinfarkt, Lebererkrankungen, Schwangerschaft, s. Kap. 1.1.4.1) oder der Prothrombinfragmente F1+2 (Diabetes mellitus, maligne Erkrankungen, koronare Herzkrankheit, akuter Myokardinfarkt, Leber- und Nierenerkrankungen, entzündliche Erkrankungen, Antiphospholipid-Antikörper-Syndrom, Protein C / S- oder Antithrombinmangel, Steroid- oder Kuminmedikation, Operationen < 2 Monate, Schwangerschaft, s. Kap. 1.3.1.2) führen können.

### **2.1.3 Probensammlung und Lagerung**

Bei Erstvorstellung in der Gerinnungsambulanz wurde dem Patienten aus einer dicken Antekubitalvene EDTA-Blut und Plasma entnommen. Dabei wurde eine Stauzeit von einer Minute nicht überschritten, da hierdurch erhebliche Verlängerungen der zu untersuchenden Gerinnungsmarker auftreten können (Miller GJ 1995). Die Proben für die Gerinnungsanalysen wurden in Sarstaedt® Citratmonovetten gesammelt. Das Blut wurde sogleich gründlich mit der Citratlösung gemischt, um eine Gerinnungsaktivierung zu verhindern. Innerhalb von 2 Stunden wurden die Proben bei 4000 x g für 10 Minuten zentrifugiert. Dann wurden etwa 1 ml Plasma aus dem mittleren Drittel des Überstandes herauspipettiert, anschließend für weitere 10 Minuten bei 4000 x g zentrifugiert und der Überstand abgehoben, um möglichst thrombozytenfreies Plasma zu erhalten. Das so gewonnene Plasma wurde in Aliquots von 500 µl bis zur weiteren Analyse bei -72°C tiefgefroren.

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Enzymimmunologische Bestimmung von Faktor XI**

#### **2.2.1.1 Testprinzip**

Gerinnungsfaktor XI wird mit einem Enzymimmunoassay nach dem Sandwich-Prinzip bestimmt. Antikörper gegen das Faktor XI-Antigen werden an den Wänden der Vertiefungen einer Mikrotitrationsplatte fixiert. An diese bindet während einer ersten Inkubation das Faktor XI-Antigen. Zur Detektion des gebundenen Antigens werden (nach einem Waschvorgang) in einem zweiten Reaktionsschritt Peroxidase-konjugierte Antikörper gegen Faktor XI verwendet. Diese binden an die freien Determinanten des Immunkomplexes. Nach Auswaschen überschüssiger enzymkonjugierter Antikörper erfolgt die enzymatische Umsetzung von Wasserstoffperoxid und Chromogen, die durch Zugabe von konzentrierter Salzsäure nach einer definierten Zeit abgebrochen wird. Die der Konzentration des Faktor XI proportionale Farbintensität wird photometrisch gemessen.

#### **2.2.1.2 Geräte und Reagenzien**

##### Verwendete Geräte / Materialien:

- Eppendorfpipette: 10 µl, 100 µl, 1000 µl
- Wasserbad (37 °C)
- Waschautomat SLT 812 SM1 (Firma SLT Lab Instruments, Crailsheim, Germany)
- Spektralphotometer SLT 400 ATX (Firma SLT Lab Instruments) für Mikrotitrationsplatten, Messwellenlänge: 492 nm
- Standard-Human-Plasma (Firma DadeBehring, Schwalbach, Germany)

##### Antikörper:

- Beschichtungs-Antikörper: muriner monoklonaler anti-human-FXI IgG (Firma Affinity Biologicals Inc., Ancaster, Ontario, Canada)

- Nachweis-Antikörper: Peroxidase-konjugierter Ziege-anti-human-FXI IgG (Firma Affinity Biologicals Inc.)

#### Benötigte Reagenzien:

Zunächst wurden die Reagenzien (sofern noch nicht gebrauchsfertig) gemäss den Angaben des Herstellers vorbereitet:

- 1) Beschichtungspuffer: 1,59 g Natriumcarbonat und 2,93 g Natriumhydrogencarbonat ad 1 Liter destilliertes Wasser, pH 9,6
- 2) Waschlösung: 8,0 g Natriumchlorid, 2,9 g di-Natriumhydrogenphosphat, 0,2 g Kalium-di-hydrogenphosphat, 0,2 g Kaliumchlorid und 1 ml Tween-20 ad 1 Liter destilliertes Wasser, pH 7,4
- 3) Blockpuffer: 8,0 g Natriumchlorid, 2,9 g di-Natriumhydrogenphosphat, 0,2 g Kalium-di-hydrogenphosphat und 0,2 g Kaliumchlorid ad 1 Liter destilliertes Wasser, zu 100 ml dieser Lösung Zugabe von 2 g Rinderserumalbumin, pH mit verdünnter Natronlauge oder Kaliumphosphat auf 7,4 eingestellt
- 4) Probenpuffer: 0,25 ml Tween-20, 5,95 g HEPES-Puffer, 1,46 g Natriumchlorid und 2,5 g Rinderserumalbumin ad 250 ml destilliertes Wasser, pH mit verdünnter Natronlauge auf 7,2 eingestellt
- 5) Puffer / Substrat-POD: Wasserstoffperoxid in Citrat-Pufferlösung
- 6) Chromogen-POD: o-Phenylendiamin-dihydrochlorid in Tabletten á 5 mg
- 7) 1 N Salzsäure als Stopplösung

### **2.2.1.3 Praktische Durchführung**

Alle Bestimmungen wurden als Doppelbestimmungen durchgeführt. Auf einer Mikrotitrationsplatte wurde stets Patienten- und Kontrollplasma gleichzeitig analysiert. Das Standard-Human-Plasma (Firma DadeBehring) wurde in 1 ml destilliertem Wasser gelöst. Dann wurde eine Verdünnungsreihe des Standard-Human-Plasma von 1:25 bis 1:3600 angelegt. Alle Verdünnungen wurden mit Probenpuffer durchgeführt. Das bei  $-72^{\circ}\text{C}$  gelagerte Patienten- und Kontrollplasma wurde nach 10 minütiger Erwärmung im Wasserbad ( $37^{\circ}\text{C}$ ) mit Probenpuffer 1:100 verdünnt.

- 1) 50 µl Beschichtungs-Antikörper wurden mit 10 ml Beschichtungspuffer 1:200 verdünnt und davon 100 µl in jede Vertiefung der Mikrotitrationsplatte pipettiert.
- 2) Die Mikrotitrationsplatte wurde mit selbsthaftender Folie abgedeckt und bei 4°C über Nacht oder bei 22°C für 2 Stunden inkubiert.
- 3) Alle Vertiefungen wurden abgesaugt. Es folgte die Zugabe von 150 µl Blockpuffer in jede Vertiefung und das Abdecken der Mikrotitrationsplatte.
- 4) Die Platte wurde für mindestens 1 Stunde bei 22°C inkubiert.
- 5) Anschließend wurde der Blockpuffer abgesaugt und die Platte viermal mit Waschlösung gewaschen. Die Platte wurde auf Zellstoff ausgeklopft, um Reste der Waschlösung zu entfernen.
- 6) In jede Vertiefung der Platte wurden 100 µl der Standard-Verdünnungsreihe, Kontrolle oder Patientenprobe pipettiert. Hierbei wurde darauf geachtet, dass man bei der ersten Vertiefung beginnt und den Rand möglichst nicht benetzt. Es folgte das Abdecken der Platte.
- 7) Es folgte die Inkubation für 1 Stunde bei 22°C. Kurz vor Ende der Inkubation wurden 100 µl des Nachweisantikörpers 1:100 in 10 ml des Probenpuffers gelöst.
- 8) Alle Vertiefungen der Platte wurden abgesaut und viermal mit Waschlösung gewaschen. Die Platte wurde auf Zellstoff ausgeklopft, um Reste der Waschlösung zu entfernen.
- 9) 100 µl der frisch angesetzten Nachweis-Antikörper-Verdünnung wurden in jede Vertiefung pipettiert, anschließend wurde die Mikrotitrationsplatte abgedeckt.
- 10) Es folgte erneut eine Inkubation für 1 Stunde bei 22°C. Kurz vor Ende der Inkubation wurden 2 Tabletten des Chromogen-POD in 10 ml Puffer / Substrat-Lösung gegeben und unter Schütteln zur Lösung gebracht.
- 11) In jede Vertiefung wurden 100 µl der frisch angesetzten Chromogen-Puffer / Substrat-Lösung eingefüllt.
- 12) Nach exakt 10 minütiger Inkubation wurde die Farbreaktion durch Zugabe von 100 µl 1 N Salzsäure abgestoppt.

13) Anschließend wurden die Extinktionen gegen destilliertes Wasser als Leerwert bei einer Wellenlänge von 492 nm gemessen. Mit Hilfe der Extinktionsmittelwerte des Standard-Human-Plasmas wurde für jede Messreihe eine Bezugskurve erstellt.

#### **2.2.1.4 Variationskoeffizient des Faktor XI-ELISA**

Der Inter-assay-Variationskoeffizient (VK) der Faktor XI-Bestimmung ist in Tabelle 2.1 zusammengefasst.

<b>Kollektiv</b>	<b>N</b>	<b>Mittelwert (%)</b>	<b>SD</b>	<b>VK</b>
Pool N	11	83,72	4,68	5,6 %
Pool P	11	43,82	2,33	5,3 %

*Tabelle 2.1. Variationskoeffizient des Faktor XI-ELISA.*

Pool N= gepooltes Normalplasma, Pool P= gepooltes pathologisches Plasma, SD= Standardabweichung)

### **2.2.2 Enzymimmunologische Bestimmung von TAFIa/ai**

#### **2.2.2.1 Testprinzip**

Das TAFIa/ai-Antigen wird enzymimmunologisch nach dem Sandwich-Prinzip bestimmt. Das in der Plasmaprobe enthaltene TAFIa/ai wird von spezifischen Anti-TAFIa/ai-Antikörpern gebunden, welche sich an den Wänden der Vertiefungen der vorbeschichteten Mikrotitrationsplatte befinden. Nach einem ersten Waschschrift wird ein muriner monoklonaler anti-human-TAFI-Antikörper zugegeben, der an das immobilisierte TAFIa/ai bindet. Es folgt ein zweiter Waschvorgang. Zum Nachweis des gebundenen Antigens wird ein Peroxidase-konjugierter anti-Maus-IgG-Antikörper zugegeben. Nach Auswaschen von ungebundenem enzymkonjugierten Antikörper wird ein Chromogen zugesetzt, das von der Peroxidase unter Farbentwicklung umgesetzt wird. Nach definierter Zeit wird durch Zugabe von konzentrierter Schwefelsäure die Farbreaktion

gestoppt. Die Absorption dieser Lösung ist direkt proportional zur Menge an TAFIa/ai in der Plasmaprobe.

### **2.2.2.2 Geräte und Reagenzien**

#### Verwendete Geräte / Materialien:

- Eppendorfpipetten: 50 µl, 100 µl, 200 µl
- Wasserbad (37°C)
- Waschautomat SLT 812 SM1 (Firma SLT Lab Instruments)
- Spektralphotometer SLT 400 ATX (Firma SLT Lab Instruments) für Mikrotitrationsplatten, Messwellenlänge: 450 nm
- Plattenschüttelgerät
- IMUBIND® TAFIa/ai Antigen ELISA (Firma american diagnostica inc., Greenwich, Connecticut, USA)

#### Zusammensetzung:

- Mikrotitrationsplatten: mit Nachweis-Agens für humanes TAFIa/ai vorbeschichtet
- Nachweisantikörper: muriner monoklonaler anti-human-TAFI-Antikörper
- Anti-Maus-IgG-HRP-Konjugat: anti-Maus-IgG, konjugiert mit Meerrettich-Peroxidase (HRP = horseradish peroxidase)
- TAFIa/ai-Antigen Standard zur Erstellung der Bezugskurve
- TAFIa/ai-Kontrollplasma
- Proben-Verdünnung
- Standard-Verdünnung
- Waschlösung (Konzentrat): Tween-haltige Phosphatpufferlösung
- Chromogenes Substrat für HRP: Tetramethylbenzidin (TMB) in Wasserstoffperoxid
- 0,5 N Schwefelsäure zum Abstoppen

### **2.2.2.3 Praktische Durchführung**

Sämtliche Bestimmungen wurden als Doppelbestimmungen durchgeführt. Stets wurde auf einer Testplatte sowohl Patienten- als auch Kontrollplasma bestimmt.



Sofern die mitgelieferten Reagenzien nicht direkt gebrauchsfertig waren, wurden sie gemäss den Angaben des Herstellers vorbereitet.

Der Waschpuffer (Pulverform) wurde in 3 Litern destilliertem Wasser gelöst. Die mitgelieferte Standard-Verdünnung wurde in 2 ml Proben-Verdünnung gelöst. Von der so bereiteten Standard-Verdünnung wurden 500 µl zu dem TAFIa/ai-Antigen-Standard gegeben und durch Schütteln vermischt, wodurch die Konzentration des TAFIa/ai-Antigen-Standard 500 ng/ml betrug. Zum TAFIa/ai-Kontrollplasma wurden 250 µl Proben-Verdünnung gegeben, der Nachweisantikörper wurde in 5,5 ml Proben-Verdünnung gelöst und der Inhalt durch vorsichtiges Schütteln vollständig homogenisiert. 50 µl des mitgelieferten Anti-Maus-IgG-HRP-Konjugats wurden in 6 ml Proben-Verdünnung in Lösung gebracht.

Die bei  $-72^{\circ}\text{C}$  gelagerten Patientenproben wurden 10 Minuten im Wasserbad bei  $37^{\circ}\text{C}$  aufgetaut. Das Patientenplasma wurde, anders als vom Hersteller vorgeschlagen, unverdünnt eingesetzt.

- 1) In die beiden ersten Vertiefungen der Mikrotitrationsplatte (A1/A2) wurden je 200 µl TAFIa/ai-Antigen-Standard gegeben. In die Vertiefungen B1/B2 bis F1/F2 wurden je 100 µl Standard-Verdünnung vorgelegt. Nun wurde eine Verdünnungsreihe angelegt, indem 100 µl aus A1/A2 nach B1/B2 pipettiert wurden und von dort wiederum 100 µl in C1/C2, usw. Die Konzentration des TAFIa/ai-Antigen-Standards fiel somit von 500 ng/ml in A1/A2 schrittweise auf 15,6 ng/ml in F1/F2. 100 µl reine Standard-Verdünnung in den Vertiefungen G1/G2 dienten als 0 ng/ml Leerwert. In jede weitere Vertiefung wurden je 100 µl des unverdünnten Patientenplasmas bzw. die mitgelieferte Positiv-Kontrolle (ebenfalls unverdünnt) pipettiert. Die Mikrotitrationsplatte wurde im folgenden kurz geschüttelt, um ein vollständiges Durchmischen zu erreichen.
- 2) Nach Abdeckung mit selbstklebender Folie wurde die Platte bei Zimmertemperatur für 2 Stunden auf einem Plattenschüttelgerät (ca. 250 rpm) inkubiert.

- 3) Die Folie wurde abgezogen und die Testplatte viermal mit Wasch-Puffer gewaschen. Evtl. noch vorhandene Reste an Waschlösung wurden durch vorsichtiges Ausklopfen der Platte über Zellstoff entfernt.
- 4) Nun wurden in jede Vertiefung 100 µl Nachweis-Antikörper gegeben.
- 5) Nach Abdeckung mit selbstklebender Folie wurde die Platte bei Zimmertemperatur für 1 Stunde auf einem Plattenschüttelgerät (ca. 250 rpm) inkubiert.
- 6) Wie unter 3) beschrieben wurde die Platte erneut viermal gewaschen.
- 7) In jede Vertiefung wurden nun 100 µl Anti-Maus-IgG-HRP-Konjugat gegeben.
- 8) Die Mikrotitrationsplatte wurde erneut bei Zimmertemperatur für 1 Stunde auf einem Plattenschüttelgerät (ca. 250 rpm) inkubiert.
- 9) Wie unter 3) beschrieben wurde die Platte erneut viermal gewaschen.
- 10) Nun wurden in jede Vertiefung der Mikrotitrationsplatte 100 µl chromogenes Substrat pipettiert.
- 11) Nach exakt 8 minütiger Inkubation bei Zimmertemperatur wurde die Farbreaktion durch Zugabe von 50 µl einer 0,5 M Schwefelsäure abgestoppt.
- 12) Nach weiteren 10 Minuten wurde die Extinktion gegen die reine Standard-Verdünnung als Leerwert bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen. Mit Hilfe der Extinktionswerte der TAFIa/ai-Antigen-Standards wurde für jede Messreihe eine eigene Bezugskurve erstellt.

### 2.2.2.4 Variationskoeffizient des TAFIa/ai-ELISA

Der Inter-assay-Variationskoeffizient (VK) der TAFIa/ai-Bestimmung ist in Tabelle 2.2 zusammengefasst.

Kollektiv	N	Mittelwert (%)	SD	VK
Pos-Kontr.	4	205,11	15,52	7,57
Pool N	4	57,14	6,09	10,66
Pool P	4	65,18	9,07	13,91

*Tabelle 2.2. Variationskoeffizient des TAFIa/ai-ELISA.*

(Pos-Kontr.= vom Hersteller mitgelieferte Positivkontrolle, Pool N= gepooltes Normalplasma, Pool P= gepooltes pathologisches Plasma, SD= Standardabweichung)

## 2.2.3 Enzymimmunologische Bestimmung der Prothrombinfragmente F1+2

### 2.2.3.1 Testprinzip

Prothrombinfragmente F1+2 werden mit dem Enzymimmunoassay Enzygnost® F1+2 micro nach der Sandwich-Methode bestimmt. In einem ersten Inkubationsschritt bindet das in der Probe enthaltene F1+2-Antigen an Antikörper gegen F1+2, welche auf einer Mikrotitrationsplatte fixiert sind. Nach einem Waschvorgang werden in einem zweiten Reaktionsschritt Peroxidase-konjugierte Antikörper gegen humanes Prothrombin an die freien Determinanten des Immunkomplexes gebunden. Nicht-gebundene Enzym-konjugierte Antikörper werden ausgewaschen. Es folgt eine enzymatische Umsetzung von Wasserstoff und Chromogen, die nach einer definierten Zeit durch die Zugabe von verdünnter Schwefelsäure abgebrochen wird. Die nun messbare Farbintensität ist der Konzentration von F1+2 proportional.

### 2.2.3.2 Geräte und Reagenzien

#### Verwendete Geräte / Materialien:

- Eppendorfpipetten: 50 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl
- Wasserbad (37 °C)
- Waschautomat SLT 812 SM1 (Firma SLT Lab Instruments)
- Spektralphotometer SLT 400 ATX (Firma SLT Lab Instruments) für Mikrotitrationsplatten, Messwellenlänge: 492 nm
- Enzygnost<sup>®</sup> F1+2 micro (Firma DadeBehring)

#### Zusammensetzung:

- Enzygnost<sup>®</sup> F+2 micro: Mikrotitrationsplatten, mit Kaninchen-Antikörper gegen humanes F1+2 beschichtet.
- Anti-Prothrombin-POD-Konjugat: anti-human-Prothrombin-Antikörper, Peroxidase-konjugiert, vom Kaninchen
- Konjugat-Puffer (coag.): Tween-haltige Tris-Pufferlösung, Rinderserumalbumin
- F1+2-Standards S1 bis S4 (human) zur Erstellung der Bezugskurve
- F1+2-Kontrollplasma (human)
- Proben-Puffer (F1+2): Tween-haltige Tris-Pufferlösung, Kochsalz, Natriumazid zur Konservierung
- Waschlösung-POD (Konzentrat): Tween-haltige Phosphatpufferlösung
- Puffer / Substrat-POD: Wasserstoffperoxid in Citratpuffer
- Chromogenes Substrat für POD: o-Phenyldiamin-dihydrochlorid
- 0,5 N Schwefelsäure zum Abstoppen

### 2.2.3.3 Praktische Durchführung

Sämtliche Bestimmungen wurden als Doppellbestimmungen durchgeführt. Zunächst wurden die Reagenzien gemäss den Angaben des Herstellers vorbereitet.

Die Waschlösung-POD (Konzentrat) wurde mit destilliertem Wasser 1:20 verdünnt. 200 µl Anti-Prothrombin-POD-Konjugat wurden zu 11 ml Konjugatpuffer gegeben und unter leichtem Schütteln vermischt. Der F1+2

Standard S1 bis S4 wurde in je 1 ml destilliertem Wasser gelöst, so dass die Standards eine Konzentration von 0,04 bis 10 nmol/l F1+2 enthielten, das Kontrollplasma  $1,0 \pm 0,2$  nmol/l. Sämtliche Lösungen wurden auf  $+20^{\circ}\text{C}$  bis  $+25^{\circ}\text{C}$  erwärmt, das bei  $-72^{\circ}\text{C}$  gelagerte Patientenplasma wurde 10 Minuten lang im Wasserbad ( $37^{\circ}\text{C}$ ) aufgetaut.

- 1) 50  $\mu\text{l}$  Probenpuffer wurden in jede Vertiefung vorgelegt. Dann wurden in jede Vertiefung weitere 50  $\mu\text{l}$  Standard, Kontrolle oder Probe pipettiert. Die Testplatte wurde kurz geschüttelt, um ein vollständiges Durchmischen zu erreichen.
- 2) Es folgte das Abdecken der Testplatte mit selbstklebender Folie und ein erster Inkubationsschritt im Wasserbad bei  $37^{\circ}\text{C}$  für 30 Minuten.
- 3) Nach Entfernen der Abdeckung wurden alle Vertiefungen abgesaugt. Nun folgte ein zweimaliger Waschvorgang, wobei alle Vertiefungen zunächst mit 0,3 ml verdünnter Waschlösung beschickt und nochmals abgesaugt wurden. Zum Entfernen etwaiger Reste von Waschlösung wurde die Testplatte auf Zellstoff ausgeklopft.
- 4) 100  $\mu\text{l}$  Konjugat-Lösung wurden in jede Vertiefung (beginnend bei der ersten Vertiefung) pipettiert. Der Rand der Vertiefungen sollte dabei nicht benetzt werden.
- 5) Die Testplatte wurde abgedeckt und über 15 Minuten inkubiert. Kurz vor Ende der Inkubationszeit wurden 10 ml Puffer / Substrat-Lösung in eine Chromogen-Abfüllung gegeben und unter Schütteln gelöst.
- 6) Nach Entfernen der Abdeckung wurden alle Vertiefungen, die Testplatte dreimal gewaschen und ausgeklopft (s.o.).
- 7) In jede Vertiefung wurden 100  $\mu\text{l}$  der frisch angesetzten Chromogen-Puffer / Substrat-Lösung eingefüllt.
- 8) Die Testplatte wurde abgedeckt und lichtgeschützt bei  $+20^{\circ}\text{C}$  bis  $+25^{\circ}\text{C}$  über 15 Minuten inkubiert.
- 9) Nach Entfernen der Abdeckung erfolgte das Abstoppen der Farbreaktion durch Zugabe von 100  $\mu\text{l}$  einer 0,5 N Schwefelsäure.
- 10) Die Extinktionen wurden innerhalb einer Stunde gegen destilliertes Wasser als Leerwert bei einer Wellenlänge von 492 nm gemessen. Mit Hilfe der

Extinktionsmittelwerte der F1+2-Standard-Plasmen wurde für jede Messreihe eine eigene Bezugskurve erstellt.

### 2.2.3.4 Variationskoeffizient des F1+2-ELISA

Für den Inter-assay-Variationskoeffizient (VK) der F1+2-Bestimmung siehe Tabelle 2.3.

Kollektiv	N	Mittelwert (nmol/l)	SD	VK	Zeitraum
Kit-Ko	12	1,03	0,09	8,7%	03/98-12/99
Pool	12	5,29	0,48	9,1%	
Kit-Ko	8	1,05	0,11	10,5%	01/00-10/00
Pool	8	3,13	0,32	10,2%	
Kit-Ko	10	0,93	0,07	7,5%	11/01-02/02
Pool	10	2,66	0,20	7,5%	

Tabelle 2.3. Variationskoeffizienten des F1+2-ELISA.

(Kit-Ko= mitgelieferte Kit-Kontrolle, Pool= gepooltes Plasma des Labors)

## 2.2.4 Chromogene Bestimmung von Gerinnungsfaktor VIII

### 2.2.4.1 Testprinzip

Durch Thrombin wird Faktor VIII in der Plasmaprobe aktiviert. Dieser beschleunigt dann die Umwandlung von Faktor X zu Faktor Xa in Gegenwart von aktiviertem Faktor IX, Phospholipiden und Calciumionen. Die Faktor Xa-Aktivität wird durch Hydrolyse eines Faktor Xa-spezifischen p-Nitroanilid-Substrates gemessen. Die Ausgangsmenge des freigesetzten p-Nitroanilid, gemessen bei 405 nm, ist proportional zur Faktor Xa-Aktivität und damit auch zur Faktor VIII-Aktivität der Probe.

### **2.2.4.2 Geräte und Reagenzien**

Die Bestimmungen wurden am Behring Coagulation System (BCS) durchgeführt, wobei das Gerät alle Verdünnungs-, Pipettier- und Messschritte automatisch ausführte.

Reagenzien: Firma DadeBehring (Art.-Nr. B 4238-40)

### **2.2.4.3 Referenzbereich**

50 bis 175% der Norm

## **2.2.5 Nachweis der Faktor V Leiden-Mutation**

### **2.2.5.1 Testprinzip**

Der Nachweis des FV:Q506-Allels, einer G→A-Substitution an Position 1.691 im Exon 10 des Faktor V Gens, wird mit Hilfe einer Polymerasekettenreaktion (PCR) durchgeführt. Hierzu werden dem Faktor-V-Gen benachbarte Sequenzen zunächst durch die PCR amplifiziert. Daran schließt sich eine Inkubation der amplifizierten DNS mit dem Restriktionsenzym *Mnl* an. Dabei macht man sich zunutze, dass durch das Vorhandensein der Mutation die Ziel- / Angriffssequenzen von *Mnl* an der DNS zerstört werden und so im Vergleich zu normalen Faktor-V-Allelen DNS-Fragmente anderer Größe resultieren (Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus), die elektrophoretisch nachweisbar sind.

### **2.2.5.2 Geräte und Reagenzien**

#### Verwendete Geräte / Materialien:

- Ionenaustauschsäule (Firma Qiagen Operon, Hilden, Germany)
- Thermocycler Primus 25 (Firma MWG-Biotech, Ebersberg, Germany)
- UV-Licht-Box (Firma Biometra, Göttingen, Germany)
- Photoapparat (Polaroid)
- MiniGel Kammer (Firma Pharmacia, Freiburg, Germany)

Reagenzien:

- Tris-Puffer 20 mM, pH 8,0
- Primer (Firma Qiagen Operon)
- Taq-DNA-Polymerase 5 U/μl (Firma Sigma, Deisenhofen, Germany)
- Restriktionsenzym *MnI* (100 U/l) (Firma Biolabs, Beverly, Massachusetts, Germany)
- Agarose-Gel-System 1X TBE, 2% LMP (Firma Sigma, Deisenhofen, Germany)
- Ethidiumbromid 25 mM

**2.2.5.3 Testdurchführung**

DNS wurde nach der QIA Amp Technik aus EDTA-Blut (periphere Leukozyten) herausgelöst. Nach proteolytischer Aufarbeitung des Vollblutes wurden 200 μl auf Ionenaustauschsäulen aufgebracht. Im Anschluss an einen Waschschrift eluierte man die DNS in 100 μl Tris-Puffer (20 mM Tris, pH 8,0). Die Polymerasekettenreaktion der 267 Basenpaare, die die G→A Substitution enthalten können, wurde, wie von Bertina et. al. beschrieben, im Thermocycler Primus 25 unter Verwendung der von ihm beschriebenen TAQ-Polymerase durchgeführt (Bertina RM 1994). Die „annealing temperature“ wurde in zehn Zyklen über 20 Minuten von 65°C auf 56°C abgesenkt; es folgten 30 Zyklen, wie von Schwender vorgeschlagen. Jeder dieser Zyklen lief wie folgt ab: Zunächst wurde 20 Minuten bei einer „annealing temperature“ von 55°C der Primer an die DNS gekoppelt, danach erfolgte jeweils bei 72°C über 30 Minuten die Polymerasereaktion, sowie die sich anschließende Denaturierung bei 95°C für 20 Minuten. Unter geeigneten Pufferbedingungen wurden in einem Gesamtvolumen von 20 μl Aliquots der PCR-Produkte mit 2 Units Restriktionsenzym *MnI* (100 U/ml, Erkennungssitz CCTC(N) 7/6) für 10 Stunden bei 37°C inkubiert. Danach füllte man die DNS-Fragmente in die Taschen eines 2%igen LMP Agarose-Gels der entsprechenden Mini-Gel-Kammer und spaltete die Restriktionsfragmente elektrophoretisch auf. Nach zehnmütiger Färbung mit Ethidiumbromid wurde das Ergebnis durch UV-Licht visualisiert und photographisch festgehalten.



## **2.2.6 Nachweis des Prothrombin G20210A Polymorphismus**

### **2.2.6.1 Testprinzip**

Der Nachweis einer G→A Mutation an Position 20210 in der „3´untranslated region“ des Prothrombingens wird mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion durchgeführt. Bei Vorhandensein dieser Mutation entsteht im Prothrombingen eine zusätzliche Schnittstelle für das Restriktionsenzym *HindIII*. Als Folge davon wird bei elektrophoretischer Auftrennung im Agarosegel eine DNA-Bande sichtbar, die um 23 Basenpaare kürzer ist als die des Wildtyps.

### **2.2.6.2 Geräte und Reagenzien**

Diese entsprechen den unter 2.2.5.2 genannten Geräten und Reagenzien, es wurden lediglich ein anderer Primer (Firma MWG-Biotech) und statt *MnlI* das Restriktionsenzym *HindIII* (Firma Biolabs) verwendet.

### **2.2.6.3 Testdurchführung**

Diese entspricht dem unter 2.2.5.3 genannten Ablauf, allerdings mit anderem Primer und anderem Restriktionsenzym (siehe Abschnitt 2.2.6.1).

## **2.2.7 Bestimmung der antikoagulatorischen Aktivität von Protein C**

### **2.2.7.1 Testprinzip**

Das in der Patientenprobe enthaltene Protein C wird durch Zugabe eines Protein-C-Aktivator-Reagenzes (aus dem Gift der Kupferkopfschlange) aktiviert. Das solchermaßen aktivierte Protein C der Probe hemmt die Faktoren V und VIII des zugesetzten Protein-C-Mangelplasmas, wodurch der nachgeschaltete PTT-Test verlängert wird. Die Verlängerung der aPTT ist proportional zum Protein C-Gehalt der Probe. Dieser Gehalt kann in Prozent der Norm an einer Bezugskurve (erstellt durch Reihenverdünnung eines Standardplasmas) abgelesen werden.

### **2.2.7.2 Geräte und Reagenzien**

Die Bestimmungen wurden am Behring Coagulation System (BCS) durchgeführt, wobei das Gerät alle Verdünnungs-, Pipettier- und Messschritte automatisch ausführte.

Reagenzien: Dade<sup>®</sup> Protein C-Gerinnungstest (Firma DadeBehring)

### **2.2.7.3 Referenzbereich**

70 bis 140% der Norm

## **2.2.8 Enzymimmunologische Bestimmung von Protein C**

### **2.2.8.1 Testprinzip**

Es handelt sich um einen enzymimmunologischen in-vitro-Test zur Bestimmung des Gesamt-Protein C, der nach dem Sandwich-Prinzip arbeitet. In den Vertiefungen der Mikrotitrationstreifen ist ein spezifischer Antikörper gegen Protein C fixiert. Dieser bindet in einem ersten Inkubationsschritt das gesamte in der Patientenprobe enthaltene Protein C. In einer zweiten Reaktion lagern sich Peroxidase-konjugierte Antikörper an das gebunden Protein C an (Bildung von Sandwich-Komplexen). Nachdem durch einen Waschschrift ungebundenes Peroxidase-Konjugat entfernt wurde, wird ein Chromogen (Wasserstoffperoxid und o-Phenylendiamin) zugegeben. Dieses wird durch die Peroxidase-Aktivität in einer Farbreaktion umgesetzt. Die nun photometrisch messbare Farbintensität ist dem Protein C-Gehalt der Probe direkt proportional.

### **2.2.8.2 Geräte und Reagenzien**

Sämtliche Bestimmungen sind als Doppelbestimmungen durchgeführt worden. Alle Pipettierschritte wurden von Hand ausgeführt. Das Waschen der Mikrotitrationsplatte erfolgte am Waschautomat SLT 812 SW1 der Firma SLT-Instruments, die Extinktionsmessung wurde bei 492 nm am SLT 400 ATX derselben Firma durchgeführt.

Reagenzien: Firma Diagnostica Stago / Roche, Parsippany, New Jersey, USA  
(Art.-Nr. 1875361)

### **2.2.8.3 Referenzbereich**

70 bis 140% der Norm

## **2.2.9 Bestimmung der antikoagulatorischen Aktivität von Protein S**

### **2.2.9.1 Testprinzip**

Die Plasmaprobe wird mit Protein S-Mangelplasma und aktiviertem Protein C (aPC) sowie mit Faktor Va, dem physiologischen Substrat von aPC, versetzt. Durch Zugabe von Calciumchlorid wird die Gerinnung gestartet. Der Verbrauch von Faktor Va und damit auch die Verlängerung der Gerinnungszeit korreliert mit der Menge des funktionellen Protein S. Die Aktivität wird direkt im real-time-Verfahren angezeigt.

### **2.2.9.2 Geräte und Reagenzien**

Die Bestimmungen wurden am Behring Coagulation System (BCS) durchgeführt, wobei das Gerät alle Verdünnungs-, Pipettier- und Messschritte automatisch ausführte.

Reagenzien: Firma Diagnostica Stago / Roche (Art.Nr.1447076)

### **2.2.9.3 Referenzbereich**

50 bis 120% der Norm

## **2.2.10 Enzymimmunologische Bestimmung des gesamten Protein S**

### **2.2.10.1 Testprinzip**

Es handelt sich um einen enzymimmunologischen in-vitro-Test zur quantitativen Bestimmung von Gesamt-Protein S und freiem Protein S. Ein auf der Festphase fixierter spezifischer Antikörper gegen Protein S bindet das Gesamt-Protein S. Im folgenden Reaktionsschritt werden nach Zugabe von Peroxidase-konjugierten Antikörpern gegen das gebundene Protein S Sandwichkomplexe gebildet. Nach Auswaschen des ungebundenen Peroxidase-Konjugats und Zusatz von Chromogen und Wasserstoffperoxid kann die gebundene Peroxidase-Aktivität photometrisch erfasst werden. Die Farbintensität ist dem Gesamt-Protein S-Gehalt der Probe direkt proportional.

### **2.2.10.2 Geräte und Reagenzien**

Sämtliche Bestimmungen wurden als Doppelbestimmungen durchgeführt. Alle Pipettierschritte wurden von Hand ausgeführt. Das Waschen der Mikrotitrationsstreifen erfolgte am Waschautomat SLT 812 SW1 der Firma SLT-Instruments, die Extinktionsmessung wurde bei 492 nm am SLT 400 ATX derselben Firma durchgeführt.

Reagenzien: Firma Diagnostica Stago / Roche (*Art.Nr. 1360264*)

### **2.2.10.3 Referenzbereich**

70 bis 140% der Norm

## **2.2.11 Bestimmung des freien Protein S**

### **2.2.11.1 Testprinzip**

Es handelt sich um einen Latex-Immunoassay, der das in der Patientenprobe enthaltene freie Protein S über die Messung der Trübungszunahme, die durch die Agglutination zweier Latexreagenzien entsteht, quantitativ nachweist.

Zunächst wird in Gegenwart von Calciumionen das freie Protein S im Patientenplasma vom spezifischen Liganden C4bp an Latexpartikel gebunden. Nach Zugabe von ebenfalls an Latexpartikel gebundenen monoklonalen anti-Protein S-Antikörpern kommt es zur Bildung von Immunkomplexen. Der Agglutinationsgrad ist direkt proportional zur Konzentration des freien Protein S in der Probe. Die Auswertung der Trübungszunahme an einer erstellten Kalibrationskurve erfolgt am Analyser automatisch.

### **2.2.11.2 Geräte und Reagenzien**

Die Bestimmungen wurden am Behring Coagulation System (BCS) durchgeführt, wobei das Gerät alle Schritte automatisch ausführte.

Reagenzien: Firma Instrumentation Laboratory GmbH, Kirchheim, Germany (Art. Nr.20002700)

### **2.2.11.3 Referenzbereich**

♀ >55%, ♂ >70% der Norm

## **2.2.12 Chromogene Bestimmung von Antithrombin**

### **2.2.12.1 Testprinzip**

Das Antithrombin III der Probe wird durch Heparinzugabe in einen Heparin-AT-Komplex überführt und inaktiviert eine äquivalente Menge vorgelegten Thrombins. Die Aktivität des verbleibenden Thrombins wird unter Anwendung eines chromogenen Substrats bestimmt, dessen Extinktion (gemessen bei 405 nm) umgekehrt proportional zur Antithrombin-Aktivität der Plasmaprobe ist.

### **2.2.12.2 Geräte und Reagenzien**

Die Bestimmungen wurden am Behring Coagulation System (BCS) durchgeführt, wobei das Gerät alle Schritte automatisch ausführte.

Reagenzien: Firma DadeBehring (Art.Nr. OWWR 15)

### **2.2.12.3 Referenzbereich**

70 –120% der Norm

## **2.2.13 Bestimmung der Antiphospholipidantikörper**

### **2.2.13.1 Testprinzip Kaolin Clotting Time (KCT)**

Es handelt sich um einen Screeningtest auf Lupusantikoagulantien. Plättchenarmes Patientenplasma wird mit Kaolin inkubiert und die Gerinnungsreaktion durch Zugabe von Calciumchlorid in Gang gesetzt. Die Zeit bis zur Bildung eines Plättchenthrombus wird gemessen.

### **2.2.13.2 Geräte und Reagenzien**

#### Messgerät:

Kugelkoagulometer KC10 (Firma Amelung, Lemgo, Germany)

#### Reagenzien und Lösungen:

- Kaolin 20 mg/ml
- 0,025 M Calciumchlorid
- Patientenplasma
- Normalplasma

Die Gerinnungsreaktion wurde für Patientenplasma (PP), Normalplasma (NP) und eine 1:1-Mischung aus beiden Plasmen durchgeführt. Nach unten stehender Formel wurde dann der ICA-(induzierte circulierende Antikoagulantien)-Index bestimmt und gegen Normwerte (Standard) verglichen.

$$ICA = (KCT \text{ aus } PP - KCT \text{ aus } NP) \times 100 / KCT (PP \text{ und } NP \text{ 1:1})$$

### **2.2.13.3 Referenzbereich**

ICA-Index <17

#### **2.2.13.4 Testprinzip DVVtest® und DVVconfirm®**

In Gegenwart von Phospholipiden und Calciumionen führt das Gift der Russel's-Viper (Kettenviper) im Plasma zur direkten Aktivierung von Faktor X zu Faktor Xa, zum Umsatz von Fibrin und schließlich zur Gerinnungsbildung. Dieser direkte Aktivierungsweg ist unabhängig von Faktoren des endogenen und exogenen Wegs der Blutgerinnung. Liegen in der Plasmaprobe Antiphospholipidantikörper vor, so binden diese im DVVtest® an die Phospholipide und inhibieren dadurch den Gerinnungsvorgang, was sich in einer Verlängerung der aktivierten partiellen Thromboplastinzeit niederschlägt (diluted Russel-Viper-Venom-Time). Im Bestätigungstest DVVconfirm® werden Antikörper gegen Phospholipide durch hohe Phospholipidkonzentrationen neutralisiert und haben dann keinen Einfluss auf den Gerinnungsablauf. Zur Auswertung werden beide Tests zueinander in Beziehung gesetzt, indem man den Quotienten aus der Gerinnungszeit im DVVtest® und im DVVconfirm® bildet. Eine Verkürzung der Gerinnungszeit im DVVconfirm®, bedingt durch Neutralisation der Antiphospholipidantikörper, lässt sich an einer Erhöhung des Quotienten ablesen.

#### **2.2.13.5 Geräte und Reagenzien**

##### Messgerät:

Kugelkoagulometer KC10 (Firma Amelung)

##### Reagenzien und Lösungen:

- DVVconfirm® (Firma American Diagnostics, Boise, Idaho, USA)
- DVVtest®-Reagenz (Firma American Diagnostics)
- DVVtroll® Lupus-Antikoagulanz-negative (*Art.Nr.816N*) und -positive (*Art.Nr.816A*) Kontrollplasmen (Firma LOXO, Dossenheim, Germany)

#### **2.2.13.6 Referenzbereich**

Ratio 0 bis 1,38

## **2.2.14 Bestimmung der Antikardiolipin-IgM- und -IgG-Antikörper**

### **2.2.14.1 Testprinzip**

Bei diesem Test handelt es sich um einen kompetitiven Enzymimmunoassay zum Nachweis von Anti-Cardiolipin-IgG oder -IgM. Eine Festphase ist mit Cardiolipin-Antigen beschichtet. Im ersten Schritt binden die im Patientenplasma vorhandenen spezifischen Cardiolipin-Antikörper an dieses Antigen. Im folgenden Schritt reagiert dieser Antigen-Antikörper-Komplex mit einem zweiten enzymmarkierten anti-human IgG- oder IgM-Antikörper (Konjugat). Die enzymmarkierten Konjugat-Antikörper-Antigen-Komplexe setzen ein zugefügtes Substrat im Rahmen einer Farbreaktion um. Die Farbentwicklung des Chromogens ist abhängig von der im Komplex gebundenen Konjugatmenge und damit proportional zu der gesuchten Antikörperkonzentration.

### **2.2.14.2 Geräte und Reagenzien**

Sämtliche Bestimmungen wurden als Doppelbestimmungen durchgeführt. Alle Pipettierschritte wurden von Hand ausgeführt. Das Waschen der Mikotitrationsstreifen erfolgte am Waschautomat SLT 812 SW1 der Firma SLT-Instruments, die Extinktionsmessung wurde bei 492 nm am SLT 400 ATX derselben Firma durchgeführt.

#### Reagenzien:

Firma Pharmacia Diagnostics, Columbus, Ohio, USA (*Art.-Nr. ACLG 15596 / ACLM 15696*)

### **2.2.14.3 Referenzbereich**

negativ: <10 MPL-U/ml

grenzwertig: 10 - 15 MPL-U/ml

positiv: >15 MPL-U/ml



### **2.2.15 Statistische Auswertung und graphische Darstellung**

Zur statistischen Auswertung und graphischen Darstellung der Ergebnisse wurde SPSS 11.0 für Windows verwendet. Bei den Häufigkeiten berechneten wir Median, Mittelwert, Minimum und Maximum, sowie die 25., 75., 90. und 95. Perzentile. Zur Überprüfung der Hypothese, ob sich zwei Kollektive voneinander unterscheiden, wurde der nicht-parametrische Mann-Whitney-U-Test herangezogen. Als Signifikanzniveau legten wir ein  $p$ -Wert  $<0,05$  fest. Die graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgt mittels Box- and Whiskers-Plots. Die Box zeigt dabei die 25., 50. und 75. Perzentile an. Die vertikalen Linien (Whiskers) zeigen die Distanz vom Ende der Box (25. bzw. 75. Perzentile) bis zum höchsten oder niedrigsten Wert an, der weniger als 1,5 Boxlängen von der Box selbst entfernt ist. Extremwerte, d.h. Fälle mit Werten, die mehr als 3 Balkenlängen von der oberen bzw. unteren Kante des Balkens entfernt sind, wurden ebensowenig in diese Diagramme mit einbezogen, wie sog. Ausreißer (Werte, die zwischen 1,5 und 3 Balkenlängen von Balken entfernt lagen). Zur Verifizierung, ob für ein bestimmtes Kollektiv ein erhöhtes Erkrankungsrisiko besteht, berechneten wir die Odds ratio (95% Konfidenzintervall, in Klammern dargestellt) entsprechend einem cut-off bei der 90. Perzentile des zu untersuchenden Wertes (z.B. Faktor XI-Spiegel) innerhalb des Blutspender-Kollektivs. Die Odds ratio, auch Quoten-Quotient genannt, ist ein dem relativen Risiko ähnliches Maß. Sie findet Anwendung zur Risikoabschätzung bei retrospektiven Studien, bei denen sich das relative Risiko nicht berechnen lässt. Sowohl die Odds ratio als auch das relative Risiko geben an, um wievielfach größer das Erkrankungsrisiko für die Exponierten im Verhältnis zu den Nicht-Exponierten ist. Eine Odds ratio bzw. ein relatives Risiko von größer als 1 bedeutet, dass die Exposition einen zusätzlichen Risikofaktor darstellt. Eine Odds ratio von 1 bedeutet kein erhöhtes Risiko bei Exposition, wohingegen bei einer Odds ratio kleiner als 1 von einem protektiven Faktor für den Exponierten auszugehen ist. Vereinfachend dargestellt lässt sich die Odds ratio wie folgt berechnen:

$$\text{Odds ratio} = \frac{\frac{\text{Exponierte Erkrankte}}{\text{Exponierte Nichterkrankte}}}{\frac{\text{Nicht-exponierte Erkrankte}}{\text{Nicht-exponierte Nichterkrankte}}}$$

Für unsere Korrelationsanalysen nutzten wir den Spearman's rho-Test, der speziell zur Analyse nicht-normalverteilter Variablen geeignet ist.

Die Altersmatchung unserer Kontrollkollektive führten wir durch, indem wir für jeden Patienten einen möglichst altersgleichen passenden Blutspender rekrutierten. Stand kein genau gleichaltriger passender Blutspender zur Verfügung, wurde der Blutspender ausgewählt, dessen Alter am dichtesten an dem des Patienten lag, wobei bis auf zwei Fälle ein Altersunterschied von 4 Jahren nicht überschritten wurde. In diesen beiden Fällen betrug die Altersdifferenz 8 bzw. 10 Jahre.

## **3 ERGEBNISSE**

### ***3.1 Klinischer Hintergrund der untersuchten Kollektive***

#### **3.1.1 Das Normalkollektiv**

Das gesamte Normalkollektiv umfasst 420 Blutspender, die in der Zeit von Anfang Januar 2001 bis Mitte März 2001 bei der Universitätsklinik Würzburg Blut spendeten. Eine detaillierte Eigenanamnese ergab bei keinem dieser Blutspender einen Hinweis auf ein vorangegangenes thromboembolisches Ereignis. Unter den 420 Blutspendern fanden sich 28 Träger einer heterozygoten Faktor V Leiden-Mutation (medianes Alter 26 Jahre) und 14 Träger eines Prothrombinpolymorphismus. Dies entspricht einer Prävalenz von 6,5% für die Faktor V Leiden Mutation bzw. 3,3% für den Prothrombinpolymorphismus im Normalkollektiv. Die übrigen 378 Blutspender (202 Männer und 176 Frauen) zeigten keine der beiden o.g. Gerinnungsstörungen. Lediglich aus diesem Kollektiv, in dem die Faktor V Leiden-Mutation und / oder ein Prothrombinpolymorphismus ausgeschlossen werden konnten, wurden die alters- und geschlechts-gematchten Kontrollen rekrutiert. Das mediane Alter dieser Blutspender lag bei 27 Jahren (Spannweite 18 bis 63 Jahre).

#### **3.1.2 Das Thrombosekollektiv**

Im Zeitraum zwischen März 1998 und Februar 2002 wurden in der Gerinnungsambulanz der Universitätsklinik Würzburg 717 Patienten behandelt. Die klinischen Daten dieser Patienten wurden retrospektiv erhoben. Alle Patienten hatten anamnestisch ein oder mehrere thromboembolische Ereignisse vorzuweisen. Bei 27 Thrombosepatienten waren die benötigten klinischen Angaben unvollständig, so dass diese Fälle nicht ausgewertet werden konnten. Die verbleibenden 690 Thrombosepatienten bildeten das Grund-Thrombosekollektiv aus dem die Studienteilnehmer ausgewählt wurden. Auf diese 690 Patienten verteilten sich 907 thromboembolische Ereignisse. Das

mediane Alter der Patienten bei Erstvorstellung lag bei 41 Jahren (Spannweite 17 bis 79 Jahre), 441 Patienten (64%) waren weiblichen und 249 Patienten (36%) männlichen Geschlechts. Das mediane Alter beim Auftreten des ersten Ereignisses lag bei 36 Jahren. 181 Patienten (26%) hatten rezidivierende Thromboembolien zu verzeichnen. Das mediane Alter beim Auftreten eines zweiten Ereignisses lag bei diesen Patienten bei 45 Jahren.

Die Patienten des Thrombosekollektives wurden zur Auswertung der Ergebnisse unterteilt in Patienten mit *ausschließlich Faktor V Leiden-Mutation* und solche *ohne jegliche thrombophile Diathese*. Aus der Gruppe der Patienten ohne thrombophile Diathese wurden jene Patienten ausgeschlossen, die einen der folgenden Defekte aufwiesen: Faktor V Leiden-Mutation, Prothrombin-polymorphismus, Inhibitorenmangel (Antithrombin-, Protein C-, Protein S-Mangel (definiert als pathologischer Ausfall des jeweiligen Tests, s. Kap. 2.2.7 – 2.2.12)), Antiphospholipid-Syndrom, erhöhter Faktor VIII-Spiegel. Als erhöhter Faktor VIII-Spiegel im Sinne einer thrombophilen Diathese galt dabei ein Faktor VIII >200 IU/dl, der nicht durch einen der folgenden Einflussfaktoren erklärlich war: thrombotisches Ereignis <2 Monate, CRP >0,5 mg/dl, bekannte Leber- / Nierenerkrankung, Hypertonus, maligne Erkrankungen, Operation <2 Monate, Steroidmedikation, bestehende Schwangerschaft oder Entbindung <2 Monate. Innerhalb des gesamten Thrombosekollektivs ergab sich somit folgende Verteilung von Gerinnungsdefekten bzw. Syndromen (Tabelle 3.1).

<b>Gerinnungsdefekte / Syndrome</b>	<b>N(Patienten)=</b>	<b>Prozent</b>
Faktor V Leiden	220 / 690	32
Prothrombin-Polymorphismus	55 / 690	8
Inhibitoren-Mangel	43 / 690	6
Faktor VIII >200 IU/dl	124 / 690	18
Antiphospholipid-Syndrom	18 / 690	3
keine Thrombophilie	311 / 690	45
davon Mehrfachdefekte	82 / 690	12

*Tabelle 3.1. Gerinnungsdefekte / Syndrome im Thrombosekollektiv.*

Aus den beiden oben genannten Patientengruppen (Faktor V Leiden-Träger und Nicht-Thrombophile) wurden im folgenden diejenigen Patienten ausgeschlossen, die Erkrankungen / Ereignisse zeigten, von denen bekannt ist, dass sie zu Veränderungen des Plasmaspiegels von Gerinnungsfaktor XI (Diabetes mellitus, koronare Herzkrankheit, akuter Myokardinfarkt, Lebererkrankungen, Schwangerschaft, s. Kap. 1.1.4.1) oder der Prothrombinfragmente F1+2 (Diabetes mellitus, maligne Erkrankungen, koronare Herzkrankheit, akuter Myokardinfarkt, Leber- und Nierenerkrankungen, entzündliche Erkrankungen, Antiphospholipid-Antikörper-Syndrom, Protein C- / S- oder Antithrombinmangel, Steroid- oder Kuminmedikation, Operation <2 Monate, Schwangerschaft, s. Kap. 1.3.1.2) führen können.

Unterteilt man die Patienten mit thrombophiler Diathese in Träger der Faktor V Leiden-Mutation und Nicht-Träger, ergibt sich die in Tabelle 3.2 dargestellte Verteilung. Es sind u.a. dargestellt, wie häufig die verschiedenen anderen Gerinnungsdefekte kombiniert mit einer Faktor V Leiden-Mutation auftraten.

<b>Gerinnungsdefekt</b>	<b>Faktor V Leiden N(Patienten)= 220</b>	<b>Andere thrombophile Diathesen* N(Patienten)= 159</b>
Prothrombin-Polymorphismus	22	33
Inhibitoren-Mangel	5	38
Faktor VIII >200 IU/dl	33	91
Antiphospholipid-Syndrom	5	13
nur Faktor V Leiden	155	-

*Tabelle 3.2. Verteilung thrombophiler Defekte.*

\* Durch das Auftreten von Mehrfachdefekten übersteigt die Anzahl der Gerinnungsdefekte die Anzahl der Patienten

### **3.1.2.1 Träger der Faktor V Leiden-Mutation**

Von den 690 untersuchten Thrombosepatienten waren 220 Patienten (32%) u.a. Träger einer Faktor V Leiden-Mutation. Bei 65 dieser Patienten ließen sich

neben der Faktor V Leiden-Mutation noch weitere Gerinnungsdefekte nachweisen: bei 33 Patienten zusätzlich ein Faktor VIII-Spiegel >200 IU/dl, bei 22 Patienten zusätzlich ein Prothrombinpolymorphismus, bei 5 Patienten zusätzlich ein Inhibitorenmangel und bei 5 Patienten fand sich zusätzlich ein Antiphospholipid-Syndrom (siehe auch Tabelle 3.2).

Die restlichen 155 Patienten (22% des gesamten Thrombosekollektivs) waren ausschließlich Träger der Faktor V Leiden-Mutation. Von diesen 155 Faktor V Leiden-Trägern mussten aufgrund von Vor- / Begleiterkrankungen insgesamt 79 Patienten ausgeschlossen werden. Die Häufigkeit und Verteilung der Ausschlusskriterien innerhalb dieses Kollektivs ist in Tabelle 3.3 dargestellt.

<b>Ausschlusskriterien, Vor-/ Begleiterkrankungen</b>	<b>N=</b>
CRP >0,5 mg/dl	37 / 155
Steroid- / Markumarmedikation	35 / 155
Herz-Kreislauf-Erkrankungen	8 / 155
Nieren- / Lebererkrankungen	6 / 155
Maligne Erkrankungen	9 / 155
Diabetes mellitus	1 / 155
Aktuelle Schwangerschaft oder Entbindung <2Monate	7 / 155
Mehrfacherkrankungen	17 / 155

*Tabelle 3.3. Ausgeschlossene Patienten innerhalb der Faktor V Leiden-Träger.*

Nur die verbleibenden 76 Faktor V Leiden-Träger wurden in die Studie aufgenommen. Für diese Patienten galt, dass der einzig feststellbare Gerinnungsdefekt eine Faktor V Leiden-Mutation war und dass keiner von ihnen Zustände / Erkrankungen aufwies, die zu Veränderungen der Plasmaspiegel von Faktor XI oder der Prothrombinfragmenten F1+2 führen konnten.

Das mediane Alter der 76 Mutationsträger (70 heterozygote und 6 homozygote Patienten) bei Erstvorstellung lag bei 35 Jahren (Spannweite 17

bis 76 Jahre). Innerhalb dieser Patientengruppe zeigten sich insgesamt 95 thromboembolische Ereignisse. Das mediane Alter beim ersten Ereignis betrug 32 Jahre (Spannweite 16 bis 68 Jahre). 12 Patienten hatten rezidivierende Ereignisse zu beklagen. Das Geschlechtsverhältnis in dieser Patientengruppe lag bei  $\frac{1}{4}$  zu  $\frac{3}{4}$ , mit Bevorzugung des weiblichen Geschlechts. Der klinische Hintergrund bezüglich der thromboembolischen Ereignisse dieser Patientengruppe ist zusammenfassend in Tabelle 3.5 dargestellt.

### **3.1.2.2 Patienten mit anderen thrombophilen Defekten**

159 Thrombosepatienten, die keine Faktor V Leiden-Mutation aufwiesen, zeigten andere Gerinnungsstörungen. Das mediane Alter dieser Patienten bei Erstvorstellung in der Gerinnungsambulanz betrug 44 Jahre (Spannweite 17 bis 82 Jahre) und bei Auftreten des ersten thromboembolischen Ereignisses 40 Jahre (Spannweite 17 bis 82 Jahre). 91 Patienten dieser Gruppe zeigten einen Faktor VIII-Spiegel  $>200$  IU/dl, 33 Patienten waren Träger eines Prothrombinpolymorphismus, bei 38 Patienten ließ sich ein Inhibitorenmangel nachweisen und 13 Patienten hatten ein Antiphospholipid-Syndrom (siehe auch Tabelle 3.2). 16 Patienten zeigten Mehrfachdefekte. Rezidivierende thromboembolische Ereignisse fanden sich bei 48 Patienten.

### **3.1.2.3 Patienten ohne thrombophile Diathese**

Bei 311 der 690 Thrombosepatienten ließen sich keine Gerinnungsdefekte nachweisen (ausgeschlossen waren: Faktor V Leiden-Mutation, Prothrombinpolymorphismus, Inhibitorenmangel, Faktor VIII-Spiegel  $>200$  IU/dl, Antiphospholipid-Syndrom). Aus diesem Patientenkollektiv mussten 195 Patienten aufgrund von Vor- / Begleiterkrankungen ausgeschlossen werden. Einen Überblick über die Häufigkeit und Verteilung der Ausschlusskriterien bei den nicht-thrombophilen Thrombosepatienten gibt Tabelle 3.4.

<b>Ausschlusskriterien, Vor-/ Begleiterkrankungen</b>	<b>N=</b>
CRP >0,5 mg/dl	73 / 311
Steroid- / Markumarmedikation	70 / 311
Herz-Kreislauf-Erkrankungen	42 / 311
Nieren- / Lebererkrankungen	19 / 311
Maligne Erkrankungen	9 / 311
Diabetes mellitus	8 / 311
Aktuelle Schwangerschaft oder Entbindung <2 Monate	15 / 311
Mehrfacherkrankungen	29 / 311

*Tabelle 3.4. Ausgeschlossene Patienten innerhalb der nicht-thrombophilen Thrombosepatienten.*

Nur die verbleibenden 116 Thrombosepatienten wurden in die Studie aufgenommen. Keiner von ihnen wies eine thrombophile Diathese auf oder zeigte Zustände bzw. Erkrankungen, die zu Veränderungen der Plasmaspiegel von Faktor XI oder der Prothrombinfragmenten F1+2 hätten führen können.

Das mediane Alter der nicht-thrombophilen Thrombosepatienten bei Erstvorstellung lag bei 34 Jahren (Spannweite 17 bis 73 Jahre). Innerhalb dieser Patientengruppe zeigten sich insgesamt 133 thromboembolische Ereignisse. Das mediane Alter beim ersten Ereignis betrug 31 Jahre (Spannweite 12 bis 73 Jahre). 14 Patienten hatten rezidivierende Ereignisse zu beklagen. 62% der Patienten waren weiblichen und 38% männlichen Geschlechts.



### 3.1.3 Verteilung thromboembolischer Ereignisse in den Thrombosekollektiven

Der klinische Hintergrund der Faktor V Leiden-Träger und der nicht-thrombophilen Thrombopatienten ist in Tabelle 3.5 zusammenfassend dargestellt. Dabei wird auf das mediane Alter, bekannte Risikofaktoren für Thromboseentwicklung und die verschiedenen Thromboselokalisationen eingegangen.

Es zeigte sich, dass beide Patientenkollektive hinsichtlich dieser Kriterien vergleichbar sind, was die Grundlage für die weitere Auswertung der Daten darstellt.

Klinischer Hintergrund	Faktor V Leiden	Nicht-Thrombophile
N (Patienten)	76	116
medianes Alter bei Erstereignis	32	31
Bekannte Risikofaktoren bei Erstereignis*	53 (70%)	77 (60%)
N (thromb. Ereignisse)	95	133
- nur TBVT	60 (63%)	69 (52%)
- nur TBeVT	4 (4%)	5 (4%)
- TBVT + TBeVT	7 (7%)	10 (7%)
- nur LE	4 (4%)	12 (9%)
- LE + TVT	11 (11%)	16 (12%)
- weitere Lokalisation		
- ZentralVT	2 (2%)	9 (7%)
- SinusVT	3 (3%)	7 (5%)
- ArmVT	4 (4%)	7 (5%)

Tabelle 3.5. Klinischer Hintergrund der Thrombosekollektive.

\* Schwangerschaft, orale Kontrazeption, Operation / Immobilisation

(TBVT= tiefe Beinvenenthrombose, TBeVT= tiefe Beckenvenenthrombose, LE= Lungenembolie, TVT= tiefe Venenthrombose (Bein+Becken), ZentralVT= Zentralvenenthrombose, SinusVT= Sinusvenenthrombose, ArmVT= Armvenenthrombose)

### 3.2 Faktor XI-Spiegel bei Patienten und Kontrollen

Die Faktor XI-Plasmaspiegel wurden getrennt für die Faktor V Leiden-Träger und die nicht-thrombophilen Thrombosepatienten bestimmt und mit denen der jeweiligen alters- und geschlechts-gematchten Blutspender verglichen.

#### 3.2.1 Faktor V Leiden-Träger versus Blutspender

Der Median der Faktor XI-Spiegel lag bei den symptomatischen Faktor V Leiden-Trägern bei  $102,0 \pm 16,2\%$  und damit ca. 15% höher als bei den alters- und geschlechts-gematchten Blutspendern ( $89,2 \pm 17,5\%$ ). Die Unterschiede in den Faktor XI-Spiegeln zwischen beiden Kollektiven zeigten eine deutliche Signifikanz ( $p < 0,001$ ). Dieser Zusammenhang ist in Abbildung 3.1 graphisch dargestellt.

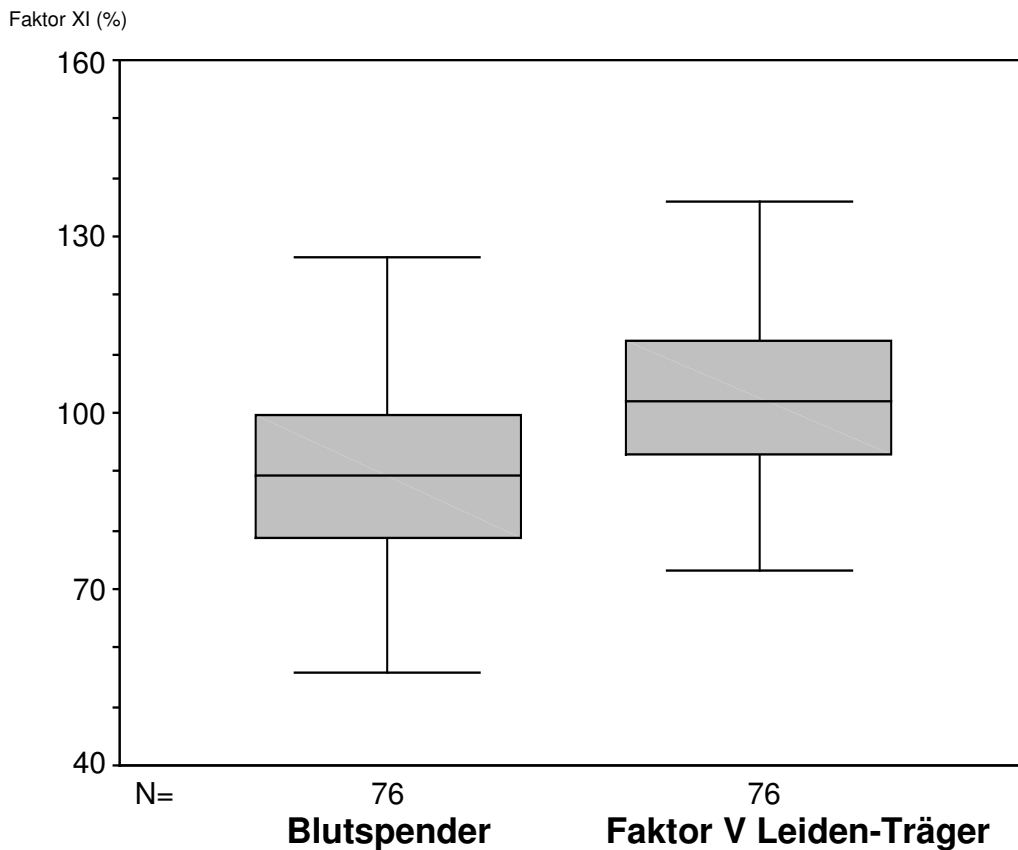


Abbildung 3.1. Faktor XI-Spiegel bei Faktor V Leiden-Trägern verglichen mit Blutspendern.

Tabelle 3.6 zeigt die Faktor XI-Spiegel von Patienten und Kontrollen geordnet nach Perzentilen.

<b>Faktor XI-Siegel (%)</b>	<b>Faktor V Leiden N= 76</b>	<b>Blutspender N= 76</b>
Minimum	73,0	45,9
25. Perzentile	92,9	78,9
<b>Median</b>	<b>102,9</b>	<b>89,2</b>
Mittelwert	103,3	89,1
75. Perzentile	112,1	99,6
90. Perzentile	125,2	110,9
95. Perzentile	130,2	117,6
Maximum	149,6	133,5

*Tabelle 3.6. Faktor XI-Spiegel bei Faktor V Leiden-Trägern und Blutspendern, geordnet nach Perzentilen.*

### 3.2.1.1 Berechnung der Odds ratio bei Faktor V Leiden-Trägern

Als Grundlage zur Berechnung der Odds ratio (95% Konfidenzintervall (KI)) bildeten wir Quartilen innerhalb der Faktor XI-Spiegel und unterteilten das Kollektiv entsprechend dieser Quartilen in vier Gruppen. Die Grundlage für das Quartilenniveau bildeten dabei die Faktor XI-Spiegel gesunder Blutspender, da diese die Normalbevölkerung repräsentieren.

Die erste Quartile umfasste 6 Patienten und 19 Blutspender, entsprechend einem Faktor XI-Spiegel <78,9%. Die zweiten Quartile umfasste jene mit Faktor XI-Spiegeln zwischen 78,9 und 89,2% (8 Patienten und 19 Blutspender). In der dritten Quartile befanden sich alle Patienten bzw. Kontrollen mit Faktor XI-Spiegeln zwischen 89,2 und 99,6% (18 Patienten und 19 Blutspender). Die vierte Quartile schließlich umfasste 44 Patienten und 19 Kontrollen, entsprechend einem Faktor XI-Spiegel über 99,6%. Tabelle 3.7 fasst diese Ergebnisse noch einmal zusammen.

Zur Berechnung der Odds ratio (95% KI) verglichen wir nun die einzelnen Quartilen untereinander. Beim Vergleich der ersten mit der zweiten Quartile zeigte sich eine Odds ratio von 1,87 (95% KI: 0,53-6,54), beim Vergleich der

ersten mit der dritten Quartile eine Odds ratio von 3,0 (95% KI: 1,007-8,94) und beim Vergleich der ersten mit der vierten Quartile eine Odds ratio von 8,11 (95% KI: 3,0-21,8) (siehe Tabelle 3.7).

N \ FXI-Quartile	1	2	3	4
	FXI <78,9%	FXI=79,0-89,2%	FXI=89,3-99,6%	FXI >99,6%
<b>Faktor V-Leiden</b>	6	8	18	44
<b>Blutspender</b>	19	19	19	19
<b>Odds ratio (95% Konfidenzintervall)</b>	Quartile 1 vs. 2: <b>1,87 (0,53-6,54)</b>			
	Quartile 1 vs. 3: <b>3,0 (1,007-8,94)</b>			
	Quartile 1 vs. 4: <b>8,11 (3,0-21,8)</b>			

Tabelle 3.7. Odds ratio: Faktor V-Leiden-Träger verglichen mit Blutspendern, geordnet nach Quartilen.

Außerdem führten wir noch eine weitere Risikoabschätzung durch. Als cut-off zur Berechnung der Odds ratio wählten wir in diesem Fall die 90. Perzentile (entsprechend einem Faktor XI-Spiegel von 110,9%) innerhalb des Blutspender-Kollektivs. Von den Faktor V Leiden-Trägern zeigten 21 Patienten (28%) und von den Blutspendern 8 Spender (10%, per definitionem) Faktor XI-Spiegel oberhalb dieses Grenzwertes. Aus dem Vergleich von Patienten mit Faktor XI-Spiegel unterhalb dieses cut-offs mit solchen mit Plasmaspiegeln darüber errechnete sich folgende Odds ratio (OR): OR = 3,3; 95% KI: 1,3-8,1. Zusammengefasst finden sich diese Ergebnisse in Tabelle 3.10, Kap. 3.2.3.

### 3.2.2 Nicht-thrombophile Thrombosepatienten versus Blutspender

Beim Vergleich der Faktor XI-Spiegel zwischen den nicht-thrombophilen Thrombosepatienten mit alters- und geschlechts-gematchten Blutspendern ließen sich keine signifikanten Unterschiede nachweisen ( $p > 0,05$ ). Der Median der Faktor XI-Spiegel lag bei diesen Thrombosepatienten bei  $91,2 \pm 16,9\%$ , bei

den Blutspendern bei  $88,0 \pm 16,8\%$ . Dies entspricht einem Unterschied von etwa 4% zwischen beiden Kollektiven (siehe Abbildung 3.2).

Faktor XI (%)

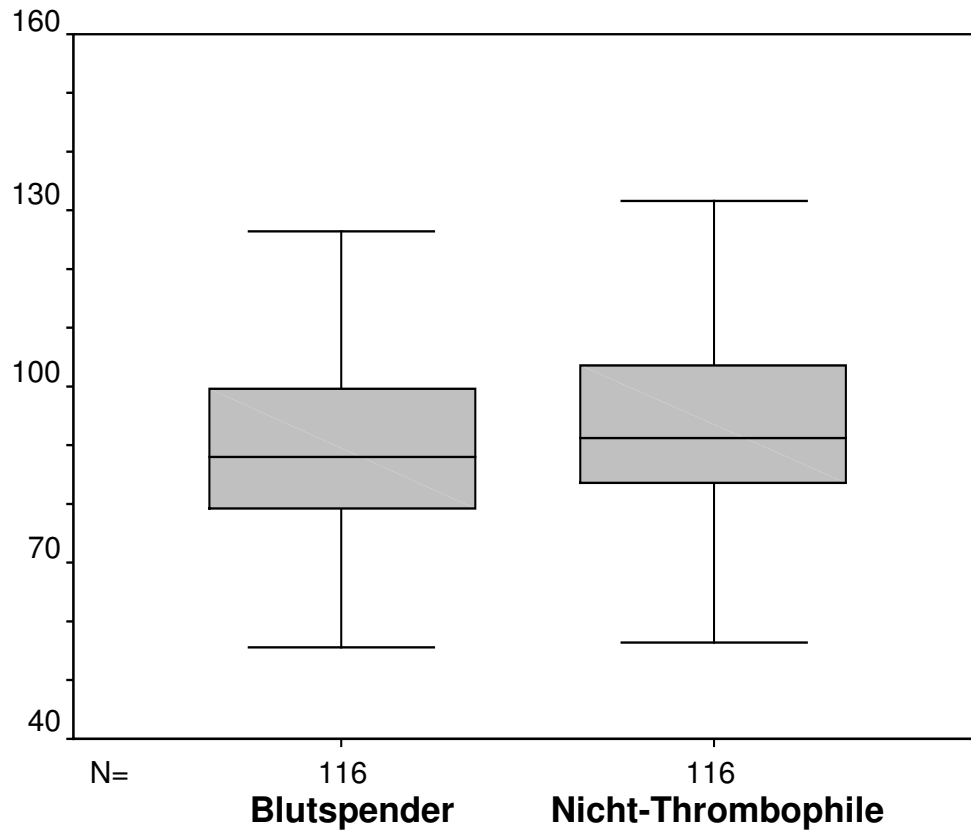


Abbildung 3.2. Faktor XI-Spiegel (%) bei nicht-thrombophilen Thrombosepatienten verglichen mit Blutspendern.

Tabelle 3.8 zeigt die Faktor XI-Spiegel von Patienten und Kontrollen geordnet nach Perzentilen.

<b>Faktor XI-Spiegel (%)</b>	<b>Nicht-thrombophile N= 116</b>	<b>Blutspender N= 116</b>
Minimum	56,3	45,9
25. Perzentile	83,5	79,5
<b>Median</b>	<b>91,2</b>	<b>88,0</b>
Mittelwert	93,2	88,9
75. Perzentile	103,0	99,4
90. Perzentile	114,2	110,7
95. Perzentile	124,4	116,5
Maximum	140,7	133,5

*Tabelle 3.8. Faktor XI-Spiegel bei nicht-thrombophilen Thrombosepatienten und Blutspendern, geordnet nach Perzentilen.*

### **3.2.2.1 Berechnung der Odds ratio bei nicht-thrombophilen Thrombosepatienten**

Analog zu den Faktor V Leiden-Trägern berechneten wir auch hier die Odds ratio. Entsprechend wurde das Kollektiv in vier Quartilen unterteilt. Die Grundlage für das Quartilenniveau bildeten auch diesmal die Faktor XI-Spiegel alters- und geschlechts-gematchter Blutspender.

Die erste Quartile umfasste 20 Patienten und 29 Blutspender, entsprechend einem Faktor XI-Spiegel <79,5%. Die zweite Quartile umfasste jene mit Faktor XI-Spiegeln zwischen 79,5 und 88,9% (28 Patienten und 29 Blutspender). In der dritten Quartile befanden sich alle Patienten bzw. Kontrollen mit Faktor XI-Spiegeln zwischen 88,9 und 99,4% (32 Patienten und 29 Blutspender). Die vierte Quartile schließlich umfasste 36 Patienten und 29 Kontrollen, entsprechend einem Faktor XI-Spiegel über 99,4%. Ein den Faktor V Leiden-Trägern vergleichbarer Anstieg der Odds ratio ließ sich hier jedoch nicht nachweisen. Tabelle 3.9 fasst diese Ergebnisse zusammen.

FXI- Quartile	<b>1</b> FXI <79,5%	<b>2</b> FXI=79,6-88,9%	<b>3</b> FXI=89,0-99,4%	<b>4</b> FXI >99,4%
<b>N</b>				
<b>Nicht- Thrombophile</b>	20	28	32	36
<b>Blutspender</b>	29	29	29	29
<b>Odds ratio (95% Konfidenz- intervall)</b>	Quartile 1 vs. 2: <b>1,31 (0,6-2,83)</b>			
	Quartile 1 vs. 3:		<b>1,49 (0,69-3,2)</b>	
	Quartile 1 vs. 4:		<b>1,8 (0,84-3,84)</b>	

*Tabelle 3.9. Odds ratio: Nicht-thrombophile Thrombosepatienten verglichen mit Blutspendern, geordnet nach Quartilen.*

Auch bei den nicht-thrombophilen Thrombosepatienten berechneten wir zusätzlich die Odds ratio bezogen auf die 90. Perzentile der Faktor XI-Spiegel innerhalb des Blutspender-Kollektivs. Diese betrug 110,7%. Von den nicht-thrombophilen Thrombosepatienten hatten 15 Patienten (13%) Faktor XI-Spiegel jenseits dieses cut-off-Wertes, von den Blutspendern überschritten 12 Spender diese Schwelle (10%, per definitionem). Daraus errechnete sich folgende Odds ratio (OR): OR = 1,3; 95% KI: 0,6-3,0. Zusammengefasst finden sich diese Ergebnisse in Tabelle 3.10, Kap. 3.2.3.

### **3.2.3 Vergleich zwischen Patienten mit Faktor V Leiden-Mutation und Patienten ohne thrombophile Diathese**

Tabelle 3.10 stellt die Faktor XI-Spiegel beider Patientengruppen (inklusive ihrer Kontrollen) gegenüber. Dargestellt sind weiterhin die Signifikanzen, sowie die Odds ratio. Diese ist bezogen auf einen cut-off bei der 90. Perzentile der Faktor XI-Spiegel, gemessen innerhalb des jeweiligen Kontrollkollektivs.

<b>Kollektiv</b>	<b>N</b>	<b>medianer Faktor XI (%) ±SD</b>	<b>p-Wert</b>	<b>Odds ratio (95% KI)</b>
<b>Faktor V Leiden vs. Blutspender</b>	76	102,0± 16,2	<b>&lt;0,001</b>	<b>3,3 (1,3-8,1)</b>
		89,2± 17,5		
<b>Nicht-Thrombophile vs. Blutspender</b>	116	91.2± 16.9	<b>=0,051</b>	<b>1,3 (0,6-3,0)</b>
		88.0± 16.8		

*Tabelle 3.10. Vergleich der Faktor XI-Spiegel zwischen beiden Patientengruppen.*



### **3.3 Thrombingenerierung bei Patienten und Kontrollen**

Wir bestimmten die Prothrombinfragmente F1+2 in unserem unselektierten Gesamt-Thrombosekollektiv. F1+2-Werte lagen uns dabei bei lediglich 456 der 690 Patienten vor. Außerdem wurden die F1+2-Spiegel bei 116 gesunden Blutspendern untersucht.

Der Median der F1+2-Werte lag im unselektierten Thrombosekollektiv bei 0,9 nmol/l, bei den Thrombosepatienten mit Faktor V Leiden-Mutation bei 0,8 nmol/l und bei den nicht-thrombophilen Thrombosepatienten bei 0,9 nmol/l. Erwartungsgemäß zeigten die gesunden Blutspender mit 0,7 nmol/l die niedrigsten medianen F1+2-Werte. Die Unterschiede in den Prothrombinfragmenten zwischen den einzelnen Kollektiven waren nicht signifikant ( $p > 0,05$ ). Der für den verwendeten Test vom Hersteller angegebene Normalwert der F1+2-Plasmaspiegel liegt bei 0,4 bis 1,1 nmol/l (s.a. O'Donnel J 2001). Innerhalb des unselektierten Gesamtkollektivs zeigten 29% der Patienten F1+2-Spiegel über dem oberen Grenzwert, bei den nicht-thrombophilen Patienten waren es 20%, bei den Mutationsträgern 17%. Bei 8% der gesunden Blutspender lagen die F1+2-Spiegel oberhalb der angegebenen Norm. Tabelle 3.11 fasst die F1+2-Werte innerhalb dieser Kollektive zusammen.

<b>F1+2 (nmol/ l)</b>	<b>Blutspender N= 116</b>	<b>unselektierte Thrombosepat. N= 456</b>	<b>Faktor V Leiden N= 76</b>	<b>Nicht- thombophil N= 116</b>
Minimum	0,4	0,2	0,2	0,2
25. Perzentile	0,6	0,7	0,7	0,7
<b>Median</b>	<b>0,7</b>	<b>0,9</b>	<b>0,8</b>	<b>0,9</b>
Mittelwert	0,8	1,1	0,9	0,9
75. Perzentile	0,9	1,2	1,1	1,0
90. Perzentile	1,1	1,7	1,6	1,4
95. Perzentile	1,2	2,0	1,9	1,6
Maximum	1,8	5,8	2,8	2,7
% Pat. (F1+2 >1,1 nmol/l)	8%	29%	17%	20%

*Tabelle 3.11. Thrombingenerierung bei Patienten und Kontrollen.*

### **3.3.1 Zusammenhang zwischen F1+2-Werten und Faktor XI-Spiegeln bei den gesunden Blutspendern**

Den Zusammenhang zwischen der Thrombingenerierung und den Faktor XI-Spiegeln bei den gesunden Blutspendern untersuchten wir, indem wir diese entsprechend ihrer (ansteigenden) F1+2-Werte in vier Gruppen einteilten und die Faktor XI-Spiegel der Gruppen untereinander verglichen. Dieses Vorgehen ist sinnvoller, als umgekehrt die Faktor XI-Werte als Grundlage der Berechnung zu nehmen, da die in vier Dezimalstellen angegebenen Faktor XI-Werte eine genauere Differenzierung der Ergebnisse ermöglichen, als die zweistelligen F1+2-Werte. Die erste Gruppe (N= 17) bildeten Blutspender mit F1+2-Werten zwischen 0,2 und 0,5 nmol/l, Gruppe 2 (N= 73) umfasste Blutspender mit F1+2-Werten zwischen 0,6 und 0,9 nmol/l. In Gruppe 3 (N= 21) wurden jene Blutspender eingeschlossen, die F1+2-Spiegel zwischen 1,0 und 1,3 nmol/l zeigten, Blutspender mit F1+2 >1,3 nmol/l bildeten die letzte Gruppe (N= 5).

Der Median der Faktor XI-Spiegel der Blutspender schwankte innerhalb der einzelnen Gruppen zwischen 81,4% und 91,3%. Ein signifikanter Anstieg

der Faktor XI-Spiegel ließ sich nicht nachweisen ( $p > 0,05$ ) (siehe Tabelle 3.12, graphische Darstellung siehe Abbildung 3.3). Ebenso zeigten die Korrelationsanalysen bzgl. F1+2 und Faktor XI in diesem Kollektiv keine signifikanten Ergebnisse ( $p > 0,05$ ; Korrelationskoeffizient = -0,037).

F1+2-Werte (nmol/l)	<b>0,2 – 0,5</b> N= 17	<b>0,6 – 0,9</b> N= 73	<b>1,0 – 1,3</b> N= 21	<b>&gt; 1,3</b> N= 5
<b>FXI (%)</b>				
Minimum	63,8	45,9	46,4	71,3
25. Perzentile	79,6	79,9	76,5	89,0
<b>Median</b>	<b>87,4</b>	<b>89,8</b>	<b>81,4</b>	<b>91,3</b>
Mittelwert	87,9	90,9	84,4	95,8
75. Perzentile	96,9	99,3	92,5	94,8
90. Perzentile	106,4	111,8	103,1	117,6
95. Perzentile	112,6	116,7	104,7	125,2
Maximum	115,3	131,9	133,5	132,8
Signifikanz	Quartile 1 vs. 2 <b><math>p= 0,578</math></b>			
	Quartile 1 vs. 3 <b><math>p= 0,504</math></b>			
	Quartile 1 vs. 4 <b><math>p= 0,493</math></b>			

Tabelle 3.12. Zusammenhang zwischen F1+2-Werten und Faktor XI-Spiegeln bei gesunden Blutspendern.

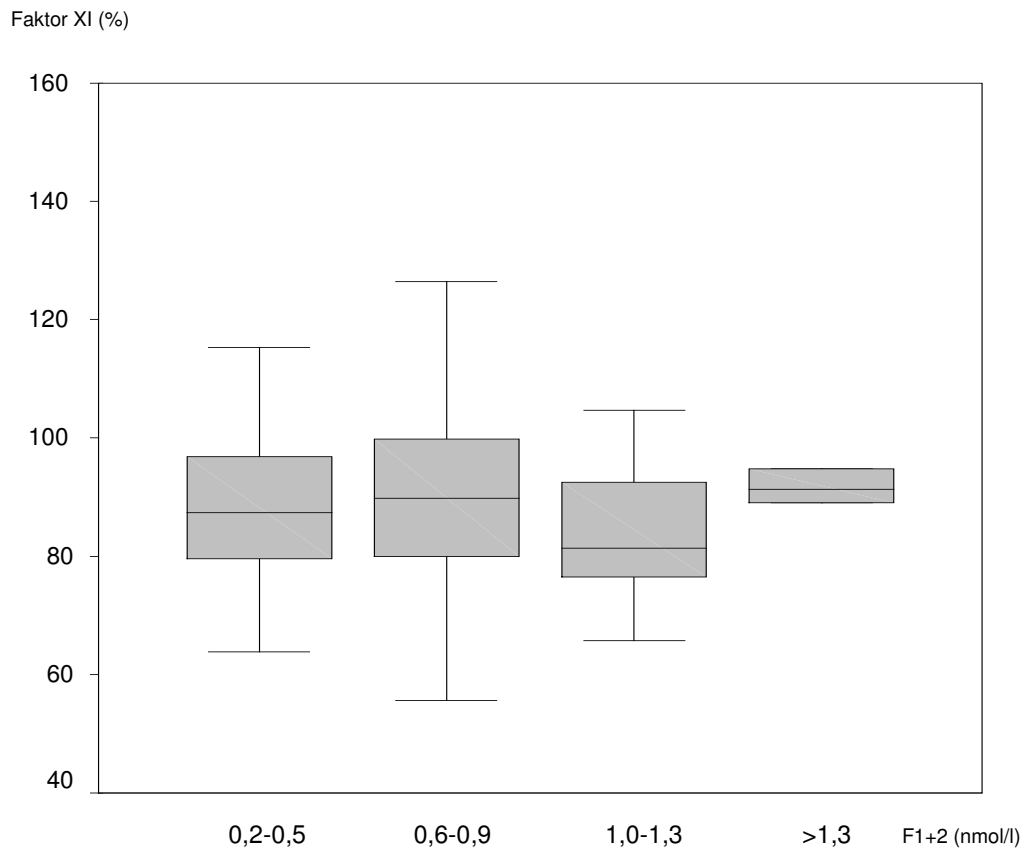


Abbildung 3.3. Zusammenhang zwischen F1+2-Werten und Faktor XI-Spiegeln bei gesunden Blutspendern.

### 3.3.2 Zusammenhang zwischen F1+2-Werten und Faktor XI-Spiegeln bei den Faktor V Leiden-Trägern

Der Zusammenhang zwischen den F1+2-Werten und den Faktor XI-Spiegeln bei 76 Faktor V Leiden-Trägern ist in Tabelle 3.13 dargestellt. Die Unterteilung in Gruppen entsprechend der F1+2-Werte erfolgte analog dem oben genannten.

Der Median der Faktor XI-Spiegel stieg von Gruppe zu Gruppe mit steigenden F1+2-Werten kontinuierlich an. So lag er bei der ersten F1+2-Gruppe bei 96,6%, bei der zweiten bei 101,5%, bei der dritten Gruppe bei 104,3% und in der letzten Gruppe bei 107,0%. Obwohl lediglich der Vergleich zwischen Gruppe 1 und 4 signifikante Unterschiede in den Faktor XI-Spiegeln zeigte, kann doch aus der Tendenz eine gewisse Korrelation zwischen Faktor XI-Werten und der Thrombingenerierung abgeleitet werden. Diese stellt sich

auch graphisch im treppenförmigen Anstieg der Faktor XI-Werte dar (Abbildung 3.4). Tabelle 3.13 fasst diesen Sachverhalt zusammen.

F1+2-Werte und Faktor XI-Spiegel bei den Faktor V Leiden-Trägern korrelierten hochsignifikant auf dem 0,01-Niveau (Korrelationskoeffizient =0,354).

F1+2-Werte (nmol/l) \ FXI (%)	0,2 - 0,5 N= 11	0,6 - 0,9 N= 37	1,0 - 1,3 N= 18	> 1,3 N= 10
Minimum	73,0	73,2	77,3	93,1
25. Perzentile	86,0	93,0	92,3	100,8
<b>Median</b>	<b>96,6</b>	<b>101,5</b>	<b>104,3</b>	<b>107,0</b>
Mittelwert	96,8	102,8	105,0	110,3
75. Perzentile	102,6	110,7	113,6	117,4
90. Perzentile	119,2	120,2	124,3	129,8
95. Perzentile	123,0	132,0	131,5	129,8
Maximum	126,8	149,6	145,1	129,9
Signifikanz	Quartile 1 vs. 2 <b>p= 0,275</b>			
	Quartile 1 vs. 3 <b>p= 0,276</b>			
	Quartile 1 vs. 4 <b>p= 0,043</b>			

Tabelle 3.13. Zusammenhang zwischen F1+2-Werten und Faktor XI-Spiegeln bei Faktor V Leiden-Trägern.

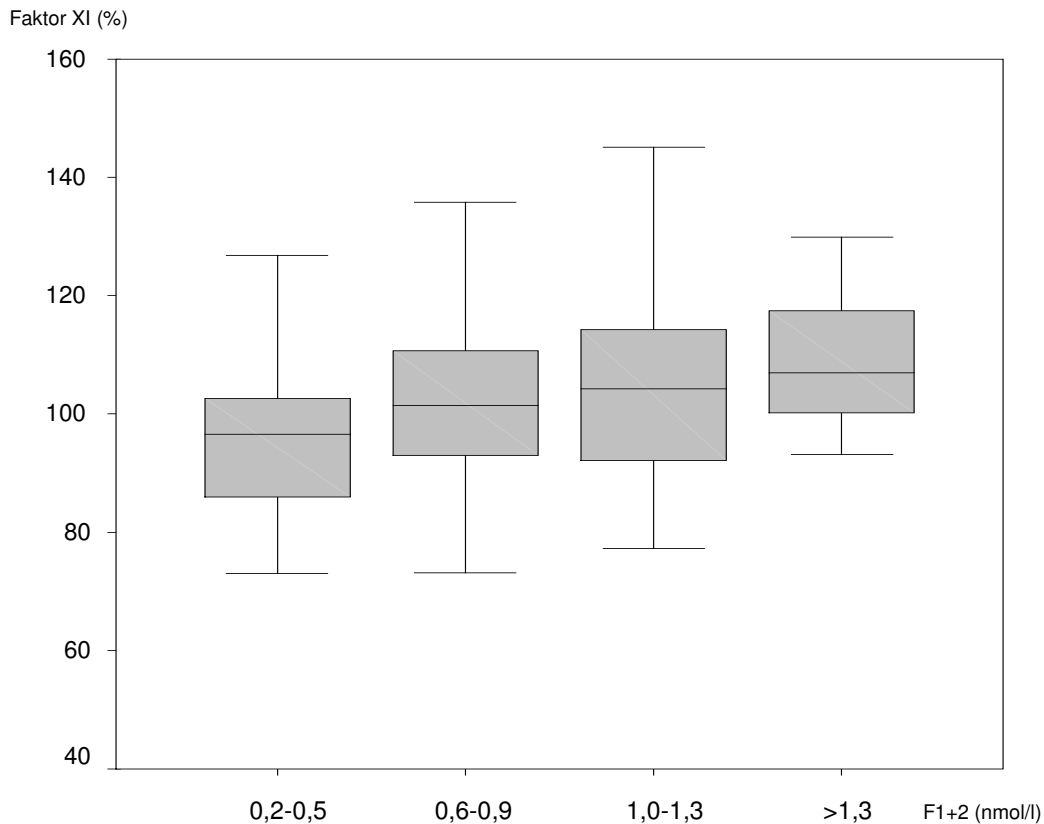


Abbildung 3.4. Zusammenhang zwischen F1+2-Werten und Faktor XI-Spiegeln bei Faktor V Leiden-Trägern.

### 3.3.3 Zusammenhang zwischen F1+2-Werten und Faktor XI-Spiegeln bei den nicht-thrombophilen Patienten

Wir untersuchten auch die Thrombosepatienten ohne thrombophile Defekte hinsichtlich des Zusammenhangs zwischen den F1+2-Werten und dem Faktor XI-Spiegel. Analog zu den Faktor V Leiden-Patienten und den Blutspendern teilten wir auch dieses Kollektiv entsprechend den F1+2-Werten in vier Gruppen und analysierten die zugehörigen Faktor XI-Spiegel.

Der Median der F1+2-Werte lag bei Patienten der ersten F1+2-Gruppe bei 88,0% und stieg mit steigenden F1+2-Werten leicht an (siehe Tabelle 3.14, graphische Darstellung siehe Abbildung 3.5). Der Anstieg war dabei nicht so deutlich ausgeprägt wie bei den Faktor V Leiden-Trägern. Ein signifikanter Unterschied der FXI-Werte zwischen den vier F1+2-Gruppen fand sich nicht ( $p > 0,05$ ).

F1+2 und Faktor XI zeigten bei den nicht-thrombophilen Patienten eine gerade signifikante Korrelation auf dem 0,05-Niveau (Korrelationskoeffizient = 0,204).

F1+2-Werte (nmol/l) \ FXI (%)	0,2 – 0,5 N= 18	0,6 – 0,9 N= 47	1,0 – 1,3 N= 41	> 1,3 N= 10
Minimum	64,3	67,0	56,3	84,7
25. Perzentile	77,3	81,3	86,4	90,4
<b>Median</b>	<b>88,0</b>	<b>89,0</b>	<b>92,0</b>	<b>94,5</b>
Mittelwert	92,0	90,8	95,4	97,5
75. Perzentile	103,3	100,0	104,4	100,4
90. Perzentile	119,6	109,4	119,1	109,2
95. Perzentile	126,9	110,4	130,6	117,8
Maximum	140,7	122,0	131,5	126,4
Signifikanz	Quartile 1 vs. 2 <b>p= 0,764</b>			
	Quartile 1 vs. 3 <b>p= 0,274</b>			
	Quartile 1 vs. 4 <b>p= 0,133</b>			

Tabelle 3.14. Zusammenhang zwischen F1+2-Werten und Faktor XI-Spiegeln bei nicht-thrombophilen Thrombosepatienten.

Faktor XI (%)

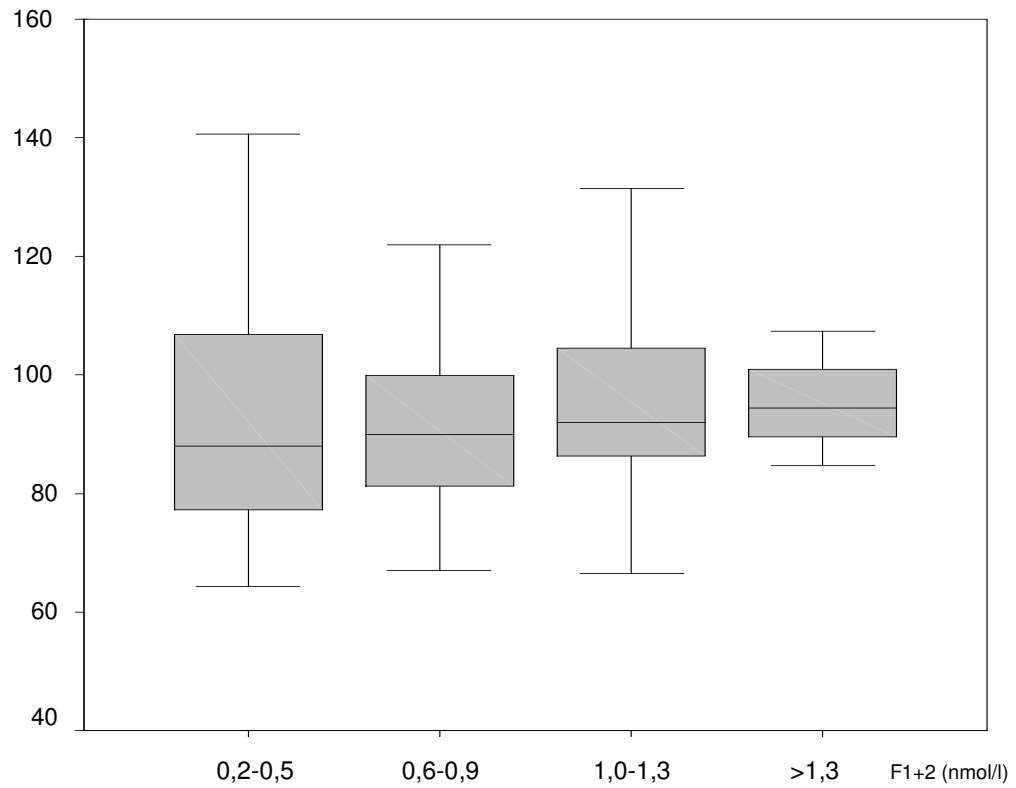


Abbildung 3.5. Zusammenhang zwischen F1+2-Werten und Faktor XI-Spiegeln bei nicht-thrombophilen Thrombosepatienten.



### 3.4 TAFIa/ai-Spiegel bei Patienten und Kontrollen

Wir bestimmten die TAFIa/ai-Spiegel bei den Faktor V Leiden-Trägern, sowie bei den entsprechenden alters- und geschlechts-gematchten Kontrollen. Da ausreichend Plasma nicht mehr von allen 76 Faktor V Leiden-Trägern vorhanden war, konnten die Bestimmungen nur bei 65 dieser Patienten bzw. Kontrollen durchgeführt werden.

Die medianen Faktor XI-Spiegel der eingeschlossenen 65 Patienten und der 11 Patienten, deren TAFIa/ai-Spiegel wegen Plasmamangel nicht bestimmt werden konnten, zeigten keine Unterschiede (102,5% vs. 101,2%), sodass durch deren Ausschluss keine Ergebnisverzerrung zu erwarten war. Bei den nicht-thrombophilen Patienten sowie deren Kontrollen bestimmten wir keine TAFIa/ai-Spiegel.

Der Median der TAFIa/ai-Spiegel lag bei 63,2 ng/ml bei den symptomatischen Faktor V Leiden-Trägern und bei 57,5 ng/ml innerhalb des Blutspenderkollektivs. Die Unterschiede zwischen beiden Kollektiven waren statistisch signifikant ( $p= 0,044$ ). Tabelle 3.15 zeigt die TAFIa/ai-Spiegel von Patienten und Kontrollen, geordnet nach Perzentilen.

TAFIa/ai (ng/ml)	Faktor V Leiden N= 67	Blutspender N= 67
Minimum	35,0	30,7
25. Perzentile	55,0	52,0
<b>Median</b>	<b>63,2</b>	<b>57,5</b>
Mittelwert	68,8	61,9
75. Perzentile	77,5	66,9
90. Perzentile	100,9	84,6
95. Perzentile	106,8	93,7
Maximum	135,7	112,0

Tabelle 3.15. TAFIa/ai-Spiegel bei Patienten und Kontrollen.

### **3.4.1 TAFIa/ai-Spiegel und Faktor XI-Spiegel**

Wir untersuchten den Zusammenhang zwischen den Plasma-TAFIa/ai-Spiegeln und den Faktor XI-Spiegeln sowohl bei den Faktor V Leiden-Trägern, als auch im entsprechenden Kontrollkollektiv. Auch hier bildeten wir Quartilen innerhalb der Faktor XI-Spiegel und unterteilten das Kollektiv entsprechend dieser Quartilen in vier Gruppen. Die Grundlage für das Quartilenniveau bildeten dabei die Faktor XI-Spiegel gesunder Blutspender.

#### **3.4.1.1 Zusammenhang zwischen TAFIa/ai-Spiegeln und Faktor XI-Spiegeln bei Faktor V Leiden-Trägern**

Wir untersuchten isoliert die Patienten mit Faktor V Leiden-Mutation hinsichtlich des Zusammenhangs zwischen dem TAFIa/ai-Spiegel und dem Faktor XI-Spiegel, wobei die Patienten entsprechend ihrer Faktor XI-Quartilen in vier Gruppen unterteilt wurden. Die erste Gruppe (N= 16) entsprach somit Patienten mit einem Faktor XI-Spiegel <93,4%, die zweite Gruppe (N= 17) entsprach Patienten mit einem Faktor XI-Spiegel zwischen 93,4% und 102,5%, die dritte Gruppe (N= 16) entsprach Patienten mit einem Faktor XI zwischen 102,6% und 112,5%. Patienten der Gruppe vier (N= 16) zeigten einen Faktor XI-Spiegel >112,5%.

Der Median der TAFIa/ai-Werte lag bei Patienten der ersten Faktor XI-Quartile bei 67,9 ng/ml, bei denen der zweiten Quartile bei 77,5 ng/ml. Die Patienten der dritten Faktor XI-Quartile zeigten mediane TAFIa/ai-Werte von 58,3 ng/ml und jene der vierten Quartile hatten Werte von 60,2 ng/ml. Ein signifikanter Unterschied der TAFIa/ai-Spiegel zwischen den vier Faktor XI-Quartilen ließ sich jedoch nicht nachweisen ( $p > 0,05$ ) (siehe Tabelle 3.16, graphische Darstellung in Abbildung 3.6).

TAFIa/ai-Werte und Faktor XI-Spiegel zeigten bei diesem Patientenkollektiv eine gerade signifikante, negative Korrelation ( $p < 0,05$ ; Korrelationskoeffizient = -0,276).

<b>Faktor XI- Quartile</b>	<b>1</b> <b>N= 16</b>	<b>2</b> <b>N= 17</b>	<b>3</b> <b>N= 16</b>	<b>4</b> <b>N= 16</b>
<b>TAFIa/ai (ng/ml)</b>	FXI <93,4%	FXI=93,4-102,5%	FXI=102,6-112,5%	FXI >112,5%
Minimum	49,3	46,5	38,9	35,0
25. Perzentile	60,1	55,0	47,7	53,5
<b>Median</b>	<b>67,9</b>	<b>77,5</b>	<b>58,3</b>	<b>60,2</b>
Mittelwert	74,0	78,4	59,7	62,7
75. Perzentile	78,6	101,3	70,9	68,4
90. Perzentile	98,1	108,6	77,0	79,9
95. Perzentile	109,2	111,0	79,5	90,1
Maximum	135,7	112,0	79,9	105,2
Signifikanz	Quartile 1 vs. 2 <b>p= 0,773</b>			
	Quartile 1 vs. 3 <b>p= 0,052</b>			
	Quartile 1 vs. 4 <b>p= 0,093</b>			

Tabelle 3.16. TAFIa/ai-Werte entsprechend der Faktor XI-Quartile bei symptomatischen Faktor V Leiden-Trägern.

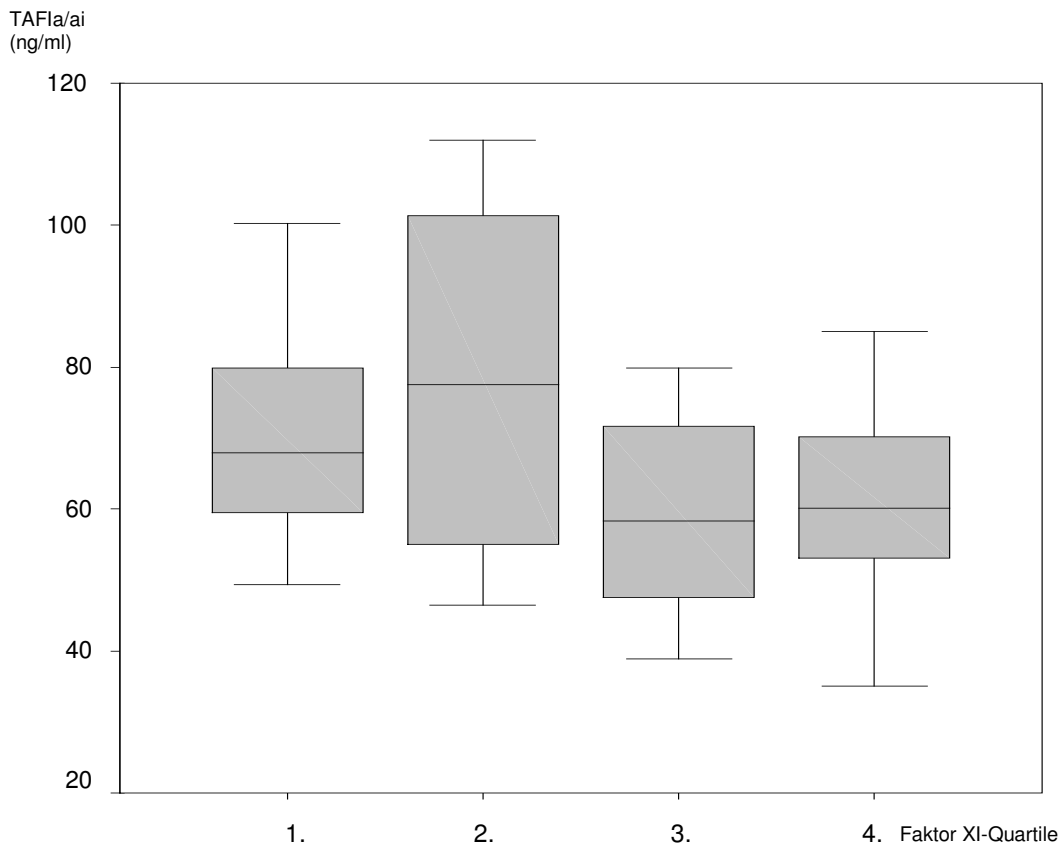


Abbildung 3.6. TAFIa/ai-Werte entsprechend der Faktor XI-Quartile bei symptomatischen Faktor V Leiden-Trägern.

### 3.4.1.2 Zusammenhang zwischen TAFIa/ai-Spiegeln und Faktor XI-Spiegeln bei gesunden Blutspendern

Auch das Kollektiv der Blutspender wurde in Quantilen entsprechend ihrer Faktor XI-Spiegel geteilt und der Zusammenhang zwischen diesen und den TAFIa/ai-Werten geprüft. Die erste Quartile (N= 16) entsprach somit Patienten mit einem Faktor XI-Spiegel <79,0%, die zweite Gruppe (N= 16) entsprach Patienten mit einem Faktor XI-Spiegel zwischen 79,1% und 90,4%, die dritte Gruppe (N= 17) entsprach Patienten mit einem Faktor XI zwischen 90,5% und 99,8%. Patienten der Gruppe vier (N= 16) zeigten einen Faktor XI-Spiegel >99,8%.

Der Median der TAFIa/ai-Werte lag bei den Blutspendern der ersten Faktor XI-Quartile bei 58,2 ng/ml, bei denen der zweiten Quartile bei 59,4 ng/ml. Die Patienten der dritten Faktor XI-Quartile zeigten mediane TAFIa/ai-Werte von 55,2 ng/ml und jene der vierten Quartile hatten Werte von 59,6 ng/ml. Ein

signifikanter Unterschied der TAFIa/ai-Spiegel zwischen den vier Faktor XI-Quartilen ließ sich jedoch auch hier nicht nachweisen ( $p > 0,05$ ) (siehe Tabelle 3.17, graphische Darstellung in Abbildung 3.7).

TAFIa/ai-Werte und Faktor XI-Spiegel zeigten keine signifikante Korrelation ( $p > 0,05$ ; Korrelationskoeffizient = -0,024).

<b>Faktor XI-Quartile</b>	<b>1</b> <b>N= 16</b>	<b>2</b> <b>N= 16</b>	<b>3</b> <b>N= 17</b>	<b>4</b> <b>N= 16</b>
<b>TAFIa/ai (ng/ml)</b>	FXI <79,0%	FXI=79,1-90,4%	FXI=90,5-99,8%	FXI >99,8%
Minimum	30,7	43,3	40,4	45,2
25. Perzentile	52,5	54,4	48,8	51,9
<b>Median</b>	<b>58,2</b>	<b>59,4</b>	<b>55,2</b>	<b>59,6</b>
Mittelwert	65,7	59,7	56,7	65,9
75. Perzentile	82,7	66,8	60,1	78,2
90. Perzentile	98,1	69,8	69,2	89,4
95. Perzentile	104,8	72,3	79,1	96,7
Maximum	112,0	72,7	92,9	105,9
Signifikanz	Quartile 1 vs. 2 <b><math>p= 0,867</math></b>			
	Quartile 1 vs. 3		<b><math>p= 0,231</math></b>	
	Quartile 1 vs. 4		<b><math>p= 0,956</math></b>	

Tabelle 3.17. TAFIa/ai-Werte entsprechend der Faktor XI-Quartile bei gesunden Blutspendern.

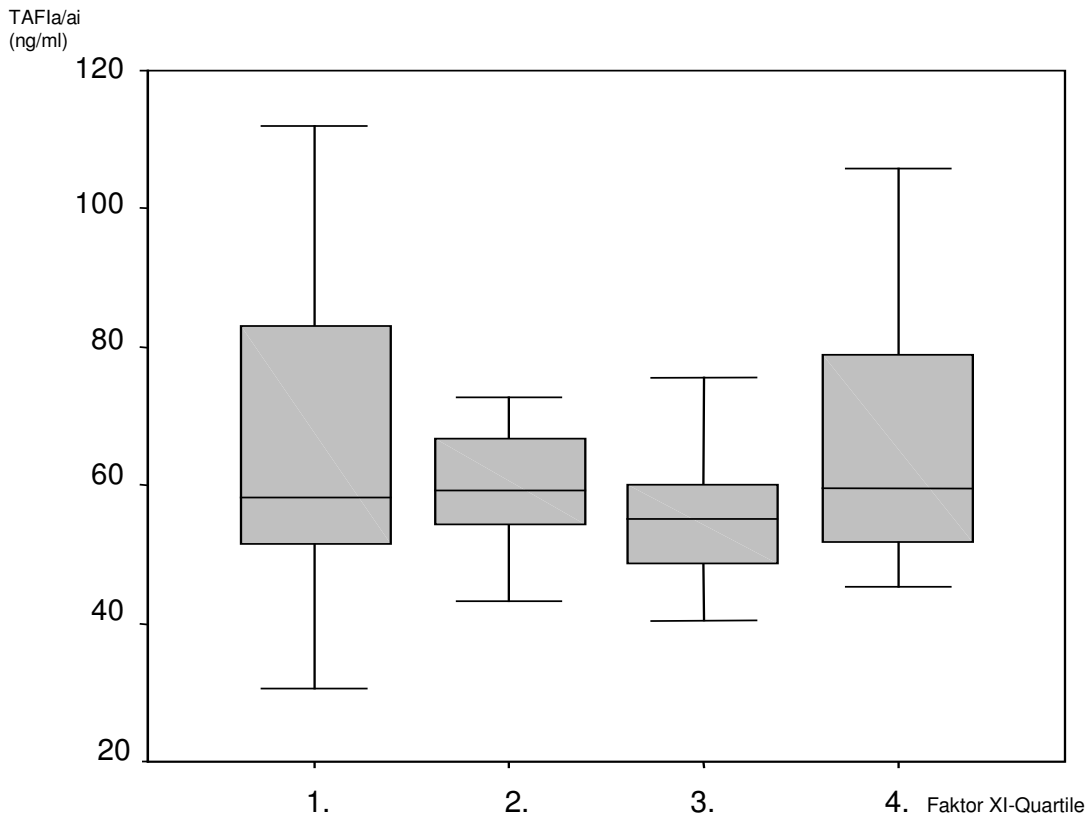


Abbildung 3.7. TAFIa/ai-Spiegel entsprechend der Faktor XI-Quartile bei gesunden Blutspendern.

### 3.4.2 TAFIa/ai-Spiegel und F1+2-Werte

Wir untersuchten den Zusammenhang zwischen dem Plasma-TAFIa/ai-Spiegel und der Thrombingenerierung sowohl bei den Faktor V Leiden-Trägern, als auch im entsprechenden Kontrollkollektiv.

#### 3.4.2.1 Zusammenhang zwischen F1+2-Werten und TAFIa/ai-Spiegeln bei Faktor V Leiden-Trägern

Wir untersuchten isoliert die Patienten mit Faktor V Leiden-Mutation hinsichtlich des Zusammenhangs zwischen dem TAFIa/ai-Spiegel und der Thrombingenerierung, wobei die Patienten entsprechend ihrer F1+2-Werte in vier Gruppen unterteilt wurden. Die erste Gruppe (N= 10) entsprach somit Patienten mit einem F1+2-Wert zwischen 0,2-0,5 nmol/l, die zweite Gruppe (N= 31) entsprach Patienten mit einem F1+2-Wert zwischen 0,6 und 0,9 nmol/l, die dritte Gruppe (N= 14) entsprach Patienten mit einem Spiegel zwischen 1,0 und

1,3 nmol/l. Patienten der Gruppe vier (N= 10) zeigten einen F1+2-Spiegel >1,3 nmol/l.

Der Median der TAFIa/ai-Werte der ersten Gruppe lag bei 73,4 ng/ml. Die Patienten der zweiten bis vierten F1+2-Gruppe zeigten niedrigere mediane TAFIa/ai-Werte als jene der ersten Gruppe. Ein signifikanter Unterschied der TAFIa/ai-Spiegel zwischen den vier F1+2-Gruppen ließ sich jedoch nicht nachweisen ( $p > 0,05$ ) (siehe Tabelle 3.18, graphische Darstellung in Abbildung 3.8).

TAFIa/ai-Werte und F1+2-Spiegel zeigten bei diesem Patientenkollektiv keine signifikante Korrelation ( $p > 0,05$ ; Korrelationskoeffizient = 0,239).

F1+2-Werte (nmol/l)	0,2 – 0,5 N= 10	0,6 – 0,9 N= 31	1,0 – 1,3 N= 14	> 1,3 N= 10
<b>TAFIa/ai (ng/ml)</b>				
Minimum	52,1	35,0	47,2	59,0
25. Perzentile	57,7	47,5	59,1	60,8
<b>Median</b>	<b>73,4</b>	<b>57,3</b>	<b>69,4</b>	<b>67,3</b>
Mittelwert	78,9	65,0	68,4	71,6
75. Perzentile	101,1	74,1	75,9	74,7
90. Perzentile	104,3	96,9	78,7	87,2
95. Perzentile	107,6	104,9	88,4	97,2
Maximum	110,8	135,7	105,2	107,2
Signifikanz	Quartile 1 vs. 2 <b><math>p = 0,061</math></b>			
	Quartile 1 vs. 3 <b><math>p = 0,371</math></b>			
	Quartile 1 vs. 4 <b><math>p = 0,853</math></b>			

Tabelle 3.18. TAFIa/ai-Werte entsprechend der F1+2-Gruppen bei Faktor V Leiden-Trägern.

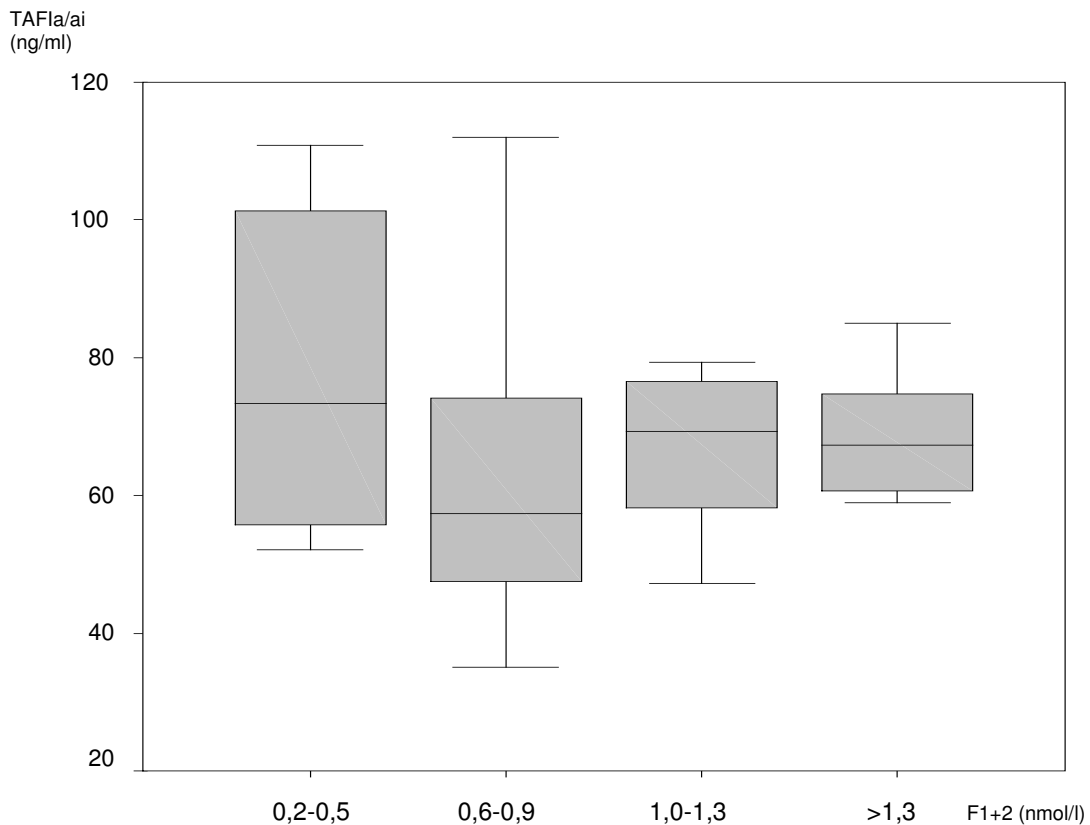


Abbildung 3.8. TAFIa/ai-Spiegel entsprechend der F1+2-Werte bei Faktor V Leiden-Trägern.

### 3.4.2.2 Zusammenhang zwischen F1+2-Werten und TAFIa/ai-Spiegeln bei Blutspendern

Wir untersuchten isoliert die Blutspender hinsichtlich des Zusammenhangs zwischen dem TAFIa/ai-Spiegel und der Thrombingenerierung, wobei diese entsprechend ihrer F1+2-Werte in vier Gruppen unterteilt wurden. Die erste Gruppe (N= 13) entsprach somit Individuen mit einem F1+2-Wert zwischen 0,2-0,5 nmol/l, die zweite Gruppe (N= 31) entsprach einem F1+2-Wert zwischen 0,6-0,9 nmol/l, die dritte Gruppe (N= 17) hatte F1+2-Spiegel zwischen 1,0 und 1,3 nmol/l. Blutspender der Gruppe vier (N= 4) zeigten einen F1+2-Spiegel >1,3 nmol/l.

Der Median der TAFIa/ai-Werte lag bei Blutspendern der ersten F1+2-Gruppe bei 55,7 ng/ml, bei denen der zweiten Gruppe bei 56,7 ng/ml. Die Blutspender der dritten F1+2-Gruppe zeigten mediane TAFIa/ai-Werte von 59,3 ng/ml und jene der vierten Gruppe hatten Werte von 75,9 ng/ml. Signifikante



Unterschiede hinsichtlich der TAFIa/ai-Werte zeigte lediglich der Vergleich der ersten mit der vierten F1+2-Gruppe. Allerdings beinhaltete dieses Kollektiv nur 4 Blutspender, sodass hier auch eine Ergebnisverzerrung vorliegen kann (siehe Tabelle 3.19, graphische Darstellung in Abbildung 3.9).

TAFIa/ai-Werte und F1+2-Spiegel zeigten keine signifikante Korrelation ( $p > 0,05$ ; Korrelationskoeffizient = 0,098).

F1+2-Werte (nmol/l) \ TAFIa/ai (ng/ml)	0,2 – 0,5 N= 13	0,6 – 0,9 N= 31	1,0 – 1,3 N= 17	> 1,3 N= 4
Minimum	45,0	30,7	43,3	64,9
25. Perzentile	52,0	52,3	49,0	66,3
<b>Median</b>	<b>55,7</b>	<b>56,7</b>	<b>59,3</b>	<b>75,9</b>
Mittelwert	59,3	60,0	62,9	80,7
75. Perzentile	61,2	63,8	72,1	90,4
90. Perzentile	72,7	82,3	83,9	99,6
95. Perzentile	86,3	88,4	97,3	102,8
Maximum	102,0	93,8	112,0	105,9
Signifikanz	Quartile 1 vs. 2 <b><math>p= 0,738</math></b>			
	Quartile 1 vs. 3 <b><math>p= 0,621</math></b>			
	Quartile 1 vs. 4 <b><math>p= 0,015</math></b>			

Tabelle 3.19. TAFIa/ai-Werte entsprechend der F1+2-Gruppe bei gesunden Blutspendern.

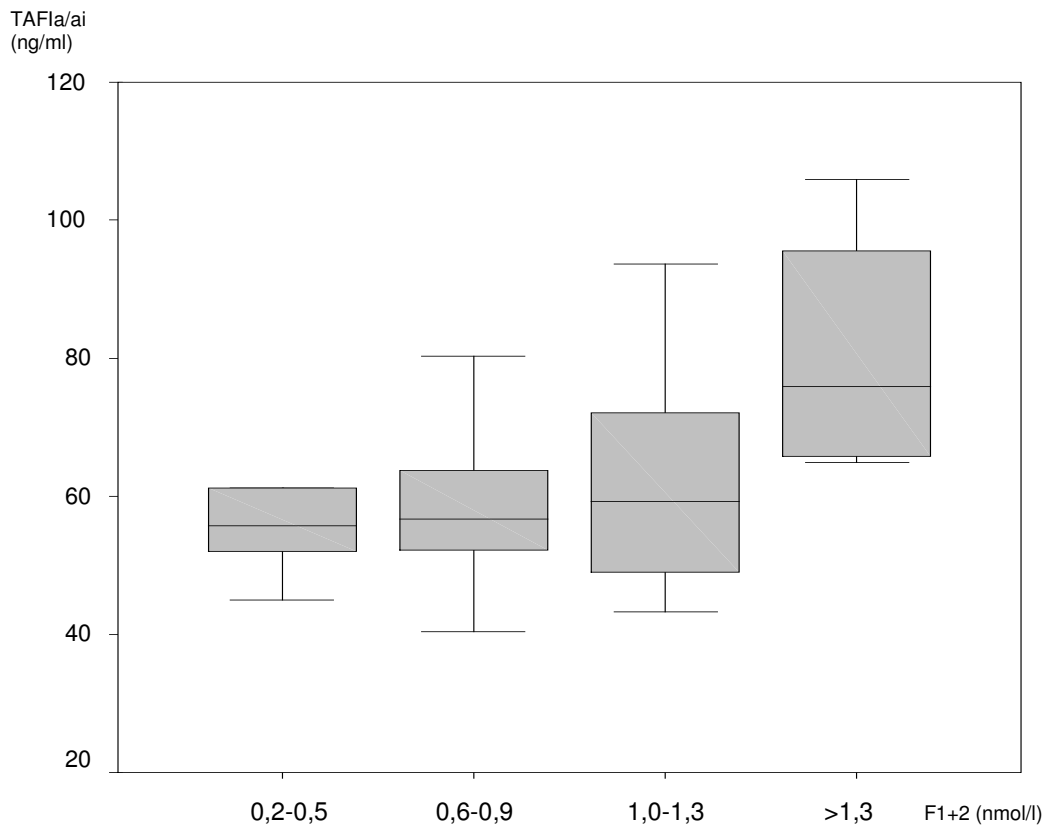


Abbildung 3.9. TAFIa/ai-Spiegel entsprechend der F1+2-Werte bei gesunden Blutspendern.

## 4 DISKUSSION

Die venöse Thromboembolie stellt ein sehr häufiges Ereignis weltweit dar und betrifft jährlich etwa 1 von 1000 gesunden Individuen. Die multifaktorielle Genese dieser Erkrankung drückt sich hierbei vor allem dadurch aus, dass bei vielen der Betroffenen verschiedene prädisponierende genetische und / oder umweltbedingte Risikofaktoren der venösen Thrombose nachweisbar sind. So konnten wir bei unseren Thrombosepatienten in fast zwei Drittel der Fälle (65%) eine genetisch bedingte Gerinnungsstörung nachweisen, die zumindest mitursächlich für die Thrombose gewesen sein dürfte. Dabei beeinflussen und stören die meisten genetischen Defekte insbesondere die normale Funktion der natürlichen antikoagulatorischen Mechanismen, wie z.B. das Protein C- / S-System. Da jeder genetische Defekt einen eigenständigen Risikofaktor darstellt, ist zu erwarten, dass Patienten mit multiplen Gerinnungsdefekten ein nochmals erhöhtes Risiko für venöse Thromboembolien haben (Rosendaal FR 1997). Immerhin 12% der Patienten unseres Thrombosekollektivs zeigten derartige multiple genetisch bedingte Gerinnungsdefekte und wären somit als Hochrisikopatienten anzusehen. Tatsächlich konnten wir zeigen, dass das mediane Alter beim Auftreten der ersten Thrombose bei Patienten mit multiplen Gerinnungsstörungen 4 Jahre niedriger lag, als bei den übrigen Thrombosepatienten (medianes Alter 32 versus 36 Jahre). Diese Beobachtung lässt sich sicherlich als Risikosteigerung im Sinne einer „Summation“ der Gerinnungsstörungen deuten. Stellen vor diesem Hintergrund auch erhöhte Faktor XI-Spiegel einen Risikofaktor der venösen Thromboembolie dar und wären damit nach dem oben gesagten entweder alleine, oder in Kombination mit weiteren zugrundeliegenden Gerinnungsdefekten in der Lage, die klinische Manifestation einer Thrombose zu beschleunigen? Dieser Zusammenhang und die ihn begründenden Wirkmechanismen waren Gegenstand dieser Arbeit.

## **4.1 Die Prävalenzen der thrombophilen Diathesen**

### **4.1.1 Das Normalkollektiv**

Untersuchungen zum Auftreten thrombophiler Diathesen innerhalb des Normalkollektivs führten wir lediglich für die Faktor V Leiden-Mutation und den Prothrombinpolymorphismus durch, da die Prävalenzen für die übrigen in unserer Arbeit behandelten Gerinnungsstörungen (z.B. Antithrombinmangel, Protein C- / S-Mangel) außerordentlich gering sind. Sie liegen je nach Studie bei weit weniger als 1% (Tait RC 1991). Daher war eine statistische Auswertung in dem uns zur Verfügung stehen Kollektiv nicht möglich.

Die Gesamtprävalenz der heterozygoten Faktor V Leiden-Mutation wird in der Literatur je nach Abstammung mit 2 bis 16% angegeben (Rees DC, 1995), die der homozygoten Mutation mit 0,06 bis 0,25% (Dahlbäck B 1995). Innerhalb unserer 420 gesunden Blutspender fanden wir 28 heterozygote Mutationsträger, entsprechend einer Prävalenz von 6,5%. Ein homozygoter Mutationsträger innerhalb dieses Kollektivs fand sich nicht. Diese Daten sind somit mit den Ergebnissen anderer Autoren gut vereinbar. Die häufig zitierten regionalen Unterschiede der Faktor V Leiden-Prävalenz konnten wir dabei nicht nachweisen, da sich unser Kollektiv fast ausnahmslos aus dem Bereich Unterfranken rekrutierte.

Ähnlich der Faktor V Leiden-Mutation unterliegt auch die Prävalenz des Prothrombinpolymorphismus starken regionalen Schwankungen. Die Prävalenz dieser Mutation in der Normalbevölkerung wird in der Literatur mit 1 bis 4% angegeben und scheint in südlichen Regionen häufiger aufzutreten als im Norden (Rosendaal FR 1998). Innerhalb unseres Blutspenderkollektivs fanden wir eine Prävalenz von 3,3%, was mit diesen Daten recht gut übereinstimmt. Der Mechanismus, über den diese Mutation zu einem erhöhten Thromboserisiko führt, ist nicht abschließend geklärt, er könnte jedoch in erhöhten Plasmaspiegeln an Prothrombin begründet sein.

### **4.1.2 Das Thrombosekollektiv**

Die angegebenen Prävalenzen der Faktor V Leiden-Mutation in Kollektiven mit Thrombose in der Vorgeschichte schwanken in einem weiten Rahmen. Man findet diese Mutation bei etwa 20% der Patienten eines unselektierten Thrombosekollektivs (Rosendaal FR 1995; Koster T 1993) und in über der Hälfte der Thrombosepatienten mit hereditärer thrombophiler Diathese (Griffin JH 1993). Dies betont den starken Einfluss der Patientenselektion auf die Prävalenzangaben der Faktor V Leiden-Mutation. In unserem Thrombosekollektiv aus 690 Patienten fanden sich 220 Mutationsträger, entsprechend einer Prävalenz von 32%. Ebenso für die weiteren getesteten Gerinnungsstörungen (Prothrombinpolymorphismus, Inhibitorenmangel, erhöhte Faktor VIII-Spiegel, Antiphospholipid-Syndrom) fanden wir Prävalenzen, die den bekannten Literaturangaben sehr ähnlich sind. Insgesamt zeigten 65% unserer Thrombosepatienten einen der getesteten Defekte, in 12% der Fälle traten kombinierte Gerinnungsstörungen auf. Stets muss aber bedacht werden, dass ein direkter Vergleich der Prävalenzen zwischen unterschiedlichen Studien nur dann zulässig ist, wenn dieselben Selektionskriterien zugrunde gelegt werden.

## **4.2 Gerinnungsfaktor XI – Erkenntnisse und neue Fragen**

Faktor XI stellt in-vitro eine Komponente innerhalb des intrinsischen Gerinnungssystems dar. Erkenntnisse über die klinische Bedeutung von Faktor XI entstammen dabei v.a. Beobachtungen beim Auftreten von Faktor XI-Mangel, Daten über erhöhte Plasmaspiegel und ihr klinischer Bezug sind deutlich spärlicher. So ist bekannt, dass Faktor XI-Mangel mit einer gewissen, in ihrem Ausmaß sehr variablen, Blutungsneigung assoziiert ist. Dass andererseits der Mangel an z.B. Faktor XII, nach der klassischen Vorstellung Aktivator von Faktor XI, nicht mit Blutungsstörungen einhergeht, hat dazu geführt, nach alternativen Mechanismen der Faktor XI-Aktivierung (unabhängig vom intrinsischen System) zu suchen. Heiße Kandidaten in diesem Zusammenhang sind Thrombin und eine Autoaktivierung von Faktor XI durch bereits aktivierten Faktor XIa. Derartige Erkenntnisse lassen vermuten, dass die Hauptaufgabe von Faktor XI weniger in der Initiierung des Gerinnungsablaufs, sondern vielmehr in der Konsolidierung des Gerinnsels nach bereits stattgehabter Gerinnung zu suchen ist.

Ziel unserer Studie war es nun zunächst, die Rolle von Faktor XI bei der Thromboseentstehung näher zu beleuchten. Diese Fragestellung interessierte uns um so mehr, als dass Faktor XI-Spiegel oberhalb der 90. Perzentile mit einem zweifach über die Norm erhöhten Thromboserisiko einhergehen und somit einen wichtigen Risikofaktor bei einem nicht unerheblichen Anteil der Bevölkerung darstellen sollen (Meijers JC 2000). Spiegelt sich dabei die in-vitro-Vorstellung des revised model of coagulation (Faktor XI-abhängige Thrombingenerierung und konsekutive Fibrinolysehemmung) auch in-vivo wider und kann als Erklärung des erhöhten Risikos dienen? Kann ein hoher Faktor XI als „neuer Risikofaktor“ hier Aufschluss bringen und wie ist dabei die Interaktion mit weiteren, bekannten Risikofaktoren der venösen Thrombose? Unser Interesse galt dabei insbesondere der Faktor V Leiden-Mutation, nicht zuletzt wegen der Häufigkeit ihres Auftretens. Im Gegensatz zu Meijers et. al. arbeiteten wir nicht mit Thrombopatienten allgemein, sondern mit

hochselektierten Patientenkollektiven. Eine direkte Vergleichbarkeit der gefundenen Daten ist daher nur bedingt möglich.

Für unsere Analysen selektierten wir aus einem Gesamt-Thrombosekollektiv von 690 Patienten solche, die keinerlei thrombophile Diathese erkennen ließen, und solche, deren einziger Defekt eine Faktor V Leiden-Mutation war. Jedem dieser beiden Patientengruppen standen alters- und geschlechts-gematchte gesunde Blutspender als Kontrollkollektiv gegenüber. Großen Wert legten wir dabei auf die Vergleichbarkeit beider Patientengruppen hinsichtlich ihres Alters, Geschlechts sowie ihres klinischen Hintergrundes. Auch wurden in beiden Kollektiven mögliche Störgrößen und Einflussfaktoren auf die Plasmaspiegel von Faktor XI ausgeschlossen. Die sorgfältige Patientenselektion bildete dabei den Kernpunkt bei der Zusammenstellung unserer Kollektive.

#### **4.2.1 Faktor XI als Risikofaktor der venösen Thrombose?**

Wir konnten zeigen, dass Faktor XI-Spiegel oberhalb der 90. Perzentile bei Trägern der Faktor V Leiden-Mutation mit einem 3,3-fach erhöhten Risiko für die Ausbildung einer venösen Thrombose verbunden sind (odds ratio= 3,3; 95% Konfidenzintervall (KI): 1,3-8,1). Weiterhin konnten wir nachweisen, dass für diese Patienten eine klare Dosis-Wirkungs-Beziehung zwischen den Faktor XI-Werten und dem Thromboserisiko besteht. Dabei berechneten wir die odds ratio für die Thromboseentstehung bei Faktor V Leiden-Trägern mit Faktor XI-Spiegeln entsprechend der zweiten, dritten und vierten Quartile, jeweils verglichen mit jenen der ersten Faktor XI-Quartile. So ergab sich für die Patienten der zweiten Faktor XI-Quartile ein knapp zweifach über die Norm erhöhtes Thromboserisiko (odds ratio= 1,87; 95% KI: 0,53-6,54). Für Faktor V Leiden-Träger mit Faktor XI-Spiegeln entsprechend der dritten Quartile stieg dieses Risiko auf das Dreifache an (odds ratio= 3,0; 95% KI: 1,007-8,94). Patienten mit Faktor XI-Werten entsprechend der vierten Quartile ließen, verglichen mit jenen der ersten Faktor XI-Quartile, ein über achtfach erhöhtes Risiko für die Ausbildung einer venösen Thrombose erkennen (odds ratio=

8,11; 95% KI: 3,0-21,8). Eine derart lineare Beziehung stellt dabei das charakteristische Merkmal eines echten Risikofaktors dar.

Im Gegensatz dazu scheinen hohe Faktor XI-Spiegel bei Patienten ohne thrombophile Störung nicht mit einem erhöhten Risiko einer Thromboseentstehung assoziiert zu sein. Dies zeigte die Auswertung der Daten unseres zweiten Patientenkollektives, der Thrombosenpatienten ohne jeglichen Gerinnungsdefekt. Innerhalb dieser Gruppe aus 116 Patienten waren Faktor XI-Spiegel oberhalb der 90. Perzentile nicht mit einem gesteigerten Thromboserisiko assoziiert (odds ratio= 1,3; 95% KI: 0,6-3,0). Einen Hinweis auf diese Ergebnisse gab schon die Beobachtung, dass sich die medianen Faktor XI-Spiegel bei diesen Patienten kaum von denen einer gesunden Vergleichspopulation unterschieden (91,2% vs. 88,0%). Auch ließ sich für diese Patienten kein der Faktor V Leiden-Situation vergleichbarer Dosis-Wirkungs-Zusammenhang zwischen dem Faktor XI-Spiegel und dem Thromboserisiko herstellen. Die unterschiedlichen Ergebnisse zwischen beiden Patientengruppen sind dabei nicht durch andere Gerinnungsdefekte oder erworbene Risikofaktoren für die venöse Thromboembolie zu erklären, da diese vorher sorgfältig ausgeschlossen wurden. Auch waren beide Kollektive hinsichtlich Alter, Geschlecht und Krankengeschichte vergleichbar, so dass auch diese die unterschiedlichen Ergebnisse nicht erklären können.

Es scheint daher, dass hohe Faktor XI-Spiegel keinen eigenständigen Risikofaktor für die Ausbildung einer Thrombose darstellen, sondern ihr thrombogenes Potential lediglich bei bereits zu Grunde liegenden Gerinnungsdefekten, wie etwa einer Faktor V Leiden-Mutation entfalten. Unsere Beobachtungen unterstützen damit die Hypothese, dass das weite Spektrum der klinischen Erscheinung „Thrombose“ auf dem Zusammenwirken verschiedener thrombophiler Defekte beruht, wohingegen der Einzeldefekt selten zur klinischen Manifestation führt. Ähnliche Schlussfolgerungen konnten Libourel et. al. mittels einer Familienkohortenstudie an Faktor V Leiden-Trägern ziehen (Libourel EJ 2002). Eine venöse Thrombose trat bei Faktor V Leiden-Trägern in knapp 18% auf, wenn eine begleitende Gerinnungsstörung vorlag. Dagegen waren nur 1,6% der Mutationsträger klinisch auffällig, wenn es sich



dabei um einen isolierten Defekt handelte. Für Faktor VIII-Spiegel >150% und TAFI-Werte oberhalb der 75. Perzentile konnten sie nachweisen, dass das Zusammentreffen dieser Gerinnungsstörungen mit der Faktor V Leiden-Mutation zu einer weiteren Steigerung des Thromboserisikos führt. Zwar konnte diese Studie keine direkte Steigerung des Thromboserisikos für das Zusammentreffen von hohen Faktor XI-Werten mit der Faktor V Leiden-Mutation nachweisen, dies führen die Autoren allerdings auf die geringe Patientenzahl ihrer Studie zurück. In der Zusammenschau ihrer Ergebnisse gibt diese Arbeit aber einen deutlichen Hinweis auf eine multikausale Thrombogenese.

Die Vorstellung der multikausalen Thrombogenese wird dadurch gestützt, dass wir in Familien mit Tendenz zur Thrombose häufig verschiedene Gerinnungsdefekte gleichzeitig antreffen. So konnten Koeleman et. al. bei 19% der symptomatischen Mitglieder einer Familie mit Protein C-Mangel gleichzeitig eine Faktor V Leiden-Mutation nachweisen. Eine Thrombose trat bei Trägern des kombinierten Defekts weitaus häufiger auf (73%) als bei Vorliegen lediglich des Protein C-Mangels (36%) oder der Faktor V Leiden-Mutation (10%) (Koeleman BP 1994). Vergleichbare Daten liegen auch für den Prothrombinpolymorphismus (Zöller B 1999), den Protein S- (Zöller B 1995) und Antithrombinmangel vor (van Boven HH 1996). Aber nicht nur angeborene Gerinnungsdefekte wirken synergistisch bei der Thrombogenese zusammen. Da einige dieser Defekte auch in der gesunden Bevölkerung recht häufig sind, ist ein zufälliges Zusammentreffen dieser mit erworbenen Risikofaktoren sicher keine Seltenheit. Auch hier kommen klare Hinweise auf synergistische Effekte aus Studien an thrombophilen Familien, bei denen besonders hohe Thromboserisiken während Schwangerschaft und Wochenbett (Gerhardt A 2003) sowie durch Gebrauch von oralen Kontrazeptiva (Rintelen C 1996; Pabinger I 1994) bei Frauen mit Faktor V Leiden- Mutation, Protein C- / S- und Antithrombinmangel gefunden wurden. In einer Vielzahl von Studien an unselektierten Patientinnen mit Thrombosen während der Schwangerschaft wurde eine Faktor V Leiden-Mutation weitaus häufiger gefunden als in der Durchschnittsbevölkerung (McColl MD 1997; Bokarewa MI 1996; Hirsh DR

1996; Hellgren M 1995). Die deutlichsten Hinweise auf die Multikausalität der Thrombogenese kommen allerdings von Erkrankungsfällen bei Kindern. Ganz davon abgesehen, dass Thrombosen an sich im Kindesalter ausgesprochen selten sind, findet man bei Kindern mit Thrombose häufig drei oder mehr Risikofaktoren gleichzeitig. Bei 25-30% der Kinder mit Thrombose sind Protein C-, Protein S- oder Antithrombinmangel beschrieben worden, die Thrombose trat allerdings erst dann auf, als zusätzliche Risikofaktoren hinzukamen (i.v.-Katheter, schwere Krankheit, etc.) (Nuss R 1995; Andrew M 1994). All dies kann als Beispiel für eine Gen-Gen- bzw. Gen-Umwelt-Interaktion bei der Thromboseentstehung aufgefasst werden. Ihre Genese scheint multikausal bedingt. Dagegen ist die Rolle *singulärer* Gerinnungsdefekte bei der Thrombogenese bei weitem nicht so groß, wie man zunächst glaubte, als die genetischen Grundlagen der Thrombophilie erkannt wurden und man die Thrombose als Einzel-Gen-Defekt verstand (Broekmans AW 1983).

Wir konnten nun zeigen, dass auch die Wirkung von Faktor XI als isolierter Gerinnungsdefekt nicht überbewertet werden darf. Unseren Ergebnissen zufolge scheint ein hoher Faktor XI erst in Kombination mit anderen Defekten thrombogenes Potential zu entwickeln. Diese Beobachtungen widersprechen in gewisser Weise denen Meijers et al., die hohe Faktor XI-Spiegel als eigenständigen Risikofaktor identifizierten und eine Interaktion mit einer Faktor V Leiden-Mutation nicht nachweisen konnten (Meijers JC 2000). Allerdings führten Meijers et. al. ihre Untersuchungen im Gegensatz zu uns an einem unselektierten Thrombosekollektiv der Leiden Thrombophilia Study durch. Dieses Kollektiv umfasst 473 Thrombosepatienten mit den unterschiedlichsten thrombophilen Diathesen und Kombinationen dieser. Ebenso sind Grunderkrankungen, Medikamente etc. der eingeschlossenen Patienten nicht hinreichend erfasst und bei der Auswertung berücksichtigt. Nur einige dieser „Defekte“ wurden (lediglich rechnerisch) ausgeschlossen, eine präanalytische Selektionierung der Patienten hat nicht stattgefunden. Somit ließe sich die beschriebene thrombogene Wirkung hoher Faktor XI-Spiegel durchaus durch das gleichzeitige Auftreten anderer

Gerinnungsstörungen oder Interaktionen mit Grunderkrankungen der betreffenden Patienten erklären.

### **4.3 Die Prothrombinfragmente F1+2 und ihre klinische Relevanz**

Hyperkoagulabilität lässt sich biochemisch definieren als ein Zustand der prokoagulatorischen Imbalance aufgrund einer erhöhten Gerinnungsaktivität, aber ohne laborchemische oder gar klinische Zeichen einer Thrombose (Bauer KA 1987). Mittels der sogenannten Aktivitätsmarker der Gerinnung lässt sich ein solches Geschehen allerdings nachweisen. Die Prothrombinfragmente F1+2, die bei der Konversion von Prothrombin zu Thrombin entstehen, sind dabei die wohl bekanntesten Vertreter der Gruppe von Aktivitätsmarkern. Die Höhe ihrer Plasmaspiegel hängt dabei nicht nur vom Gerinnungsgeschehen an sich, sondern auch von einer ganzen Reihe von Erkrankungen und Lebensumständen ab (siehe Abschnitt 1.3.1.2).

Eine Vielzahl verschiedener Studien konnte zeigen, dass die Aktivitätsmarker bei Patienten mit stattgehabter Thrombose über längere Zeit erhöht sind, was einen Hinweis auf eine andauernde Gerinnungsaktivierung bei diesen Patienten gibt. Auch scheint das bloße Vorliegen einer hereditären Gerinnungsstörung mit einer Verschiebung des Gerinnungsgleichgewichts hin zur Hyperkoagulabilität einher zu gehen (Gouin-Thibault I 2002; O'Donnell J 2001; Martinelli I 1996; Simioni P 1996; Zöller B 1996). Diese Beobachtungen wollten wir nun an unseren hochselektierten Thrombosekollektiven unter Ausschluss bekannter Einflussfaktoren erneut überprüfen. Vor dem Hintergrund der bereits für die in-vitro-Situation nachgewiesenen Interaktion zwischen Faktor XI und der Thrombinbildung sollte die Frage geklärt werden, ob auch in-vivo hohe Faktor XI-Spiegel zu einer gesteigerten Gerinnungsaktivierung führen. Dies könnte einen Hinweis auf den Wirkungsmechanismus erhöhter Faktor XI-Spiegel geben. Auf diese Frage wird insbesondere im Kapitel 4.5 genauer eingegangen. Darüber hinaus zielte unsere Fragestellung auf einen potentiellen klinischen Nutzen der Aktivitätsmarker-Bestimmung ab, etwa bei der Identifikation von Individuen mit erhöhtem Thromboserisiko.

### **4.3.1 Thrombingenerierung im Normalkollektiv**

Der Referenzbereich für die Prothrombinfragmente F1+2 in dem von uns verwendeten Test wird mit 0,4 bis 1,1 nmol/l angegeben. Unsere Blutspender zeigten mediane F1+2-Werte von 0,7 nmol/l und liegen somit gut im angegebenen Normalbereich. Lediglich knapp 8% der Kontrollen zeigten F1+2-Spiegel oberhalb von 1,1 nmol/l. Leider gibt es in der veröffentlichten Literatur wenige Angaben zu absoluten F1+2-Werten innerhalb der gesunden Bevölkerung. Derartige Normalkollektive dienen meist nur als Vergleichsgruppen zu den eigentlich zu untersuchenden Patienten. In den seltensten Fällen ist das gesunde Kollektiv im Speziellen Gegenstand der Analysen. So ist es nicht verwunderlich, dass Angaben zu Kontrollgruppen bzw. einem Normalkollektiv meist sehr spärlich sind. Hinzu kommt noch, dass gerade die Prothrombinfragmente F1+2 einer Vielzahl von Einflussfaktoren und Störgrößen unterliegen (siehe Abschnitt 1.3.1.2), was es um so schwieriger macht, valide Vergleichswerte zu erhalten. Lediglich Gouin-Thibault beschreibt für ein aus 41 Personen bestehendes Kontrollkollektiv (nähere Angaben fehlen) durchschnittliche F1+2-Spiegel von 0,8 nmol/l (Gouin-Thibault I 2002). Bei O'Donnell (O'Donnell J 2001) zeigten 6% gesunder Blutspender, bei Martinelli (Martinelli I 1996) 4% der Kontrollen F1+2-Werte oberhalb des oberen Grenzwertes von 1,1 nmol/l, bzw. 1,58 nmol/l. Mit diesen Angaben wären unsere Ergebnisse durchaus in Einklang zu bringen, wobei nochmals betont werden muss, dass eine direkte Vergleichbarkeit der Kontrollkollektive nicht gegeben war.

### **4.3.2 Thrombingenerierung bei Thrombosepatienten**

In unserem unselektierten Gesamtkollektiv an Thrombosepatienten (bestehend aus 456 Patienten) fanden wir mediane F1+2-Werte von 0,9 nmol/l. 29% dieser Patienten zeigten Werte, die die obere Normgrenze von 1,1 nmol/l überschritten. Obwohl unsere beiden selektierten Thrombosekollektive, die reinen Faktor V Leiden-Träger und die nicht-thrombophilen Patienten, mit 0,8 bzw. 0,9 nmol/l vergleichbar hohe durchschnittliche F1+2-Spiegel zeigten, lagen doch deutlich weniger Patienten außerhalb der Normwerte für F1+2: bei den

Mutationsträgern hatten 17%, bei den nicht-thrombophilen Patienten 20% F1+2-Werte oberhalb von 1,1 nmol/l. Diese Beobachtung betont erneut die starke Abhängigkeit der Ergebnisse bezüglich der Aktivitätsmarker von der Patientenselektion.

Vergleicht man nun diese Ergebnisse mit anderen Studien, so liegen die von uns gefundenen absoluten F1+2-Spiegel für Thrombosepatienten meist unter den dort zu findenden Angaben. So zeigten Martinelli et. al. bei heterozygoten Faktor V Leiden-Trägern mit stattgehabter Thrombose mediane F1+2-Spiegel von 1,39 nmol/l, allerdings arbeitete diese Studie mit einer deutlich geringeren Fallzahl (Martinelli I 1996). Ebenso fanden Kyrle et. al. sowohl bei nicht-thrombophilen Thrombosepatienten, als auch bei symptomatischen Faktor V Leiden-Trägern höhere absolute Konzentrationsbereiche der Aktivitätsmarker als wir (jeweils zwischen 1,1 und 1,3 nmol/l) (Kyrle PA 1997). Lediglich O'Donnell fand in einem unselektierten Thrombosekollektiv mediane F1+2-Spiegel von 0,87 nmol/l, die unseren Werten vergleichbar sind (O'Donnell 2001). Diese Differenzen in den absoluten Konzentrationsangaben, sind sicherlich durch unterschiedliche Teilnehmerzahlen und Selektionskriterien der verschiedenen Arbeiten erklärbar. Dabei wird deutlich, dass eine gründliche Patientenselektion unter Ausschluß möglichst aller Einflussfaktoren auf die Prothrombinfragmente die gefundenen medianen F1+2-Werte im Allgemeinen sinken lässt.

Darüber hinaus berichten die o.g. Studien, sowie eine weitere Arbeit von Zöller et. al., über signifikant höhere Aktivitätsmarker in einem großen Teil der Patienten mit Resistenz gegen aktiviertes Protein C, verglichen mit ihren asymptomatischen Familienmitgliedern bzw. gesunden Kontrollen (Zöller B 1996). Der Zusammenhang zwischen der Thrombingenerierung und dem Vorliegen von bekannten thrombophilen Gerinnungsstörungen scheint somit gut dokumentiert (Bauer KA 1988; Mannucci PM 1992). Übereinstimmend mit diesen Daten konnten auch wir bei 17% der Faktor V Leiden-Träger F1+2-Werte oberhalb der oberen Normgrenze nachweisen. Im Vergleich dazu ließen jedoch nur 8,5% der gesunden Kontrollen pathologisch erhöhte Aktivitätsmarker erkennen. Obwohl dieser Unterschied zwischen beiden Kollektiven nicht

signifikant ist, so zeigen doch die Träger hereditärer Gerinnungsdefekte Anzeichen einer über das normale Maß erhöhten Gerinnungsaktivierung.

Im Gegensatz zu thrombophilen Patienten ist bisher wenig über das Maß der Gerinnungsaktivierung bei Patienten bekannt, bei denen sich kein definierter thrombophiler Defekt nachweisen lässt. Interessanterweise fanden wir bei dieser Patientengruppe noch höhere mediane F1+2-Werte als bei unseren Faktor V Leiden-Trägern. Da weitere Gerinnungsstörungen (Inhibitorenmangel, Antiphospholipid-Syndrom etc.) sowie Einflussfaktoren auf die Aktivitätsmarker (maligne Erkrankungen, Schwangerschaft etc.) in beiden Patientengruppen gleichsam ausgeschlossen waren, scheiden diese als Erklärung der beobachteten Unterschiede aus. Unsere Ergebnisse legen somit die Vermutung nahe, dass sich nicht nur bei Thrombosepatienten mit bekannten Gerinnungsstörungen, sondern auch bei solchen, bei denen wir keine thrombophilen Defekte nachweisen konnten, ein über das normale Maß aktiviertes Gerinnungssystem finden lässt. Hyperkoagulabilität ist somit kein Merkmal, welches ausschließlich thrombophile Patienten charakterisiert, sondern tritt auch bei einem beachtlichen Teil (scheinbar) nicht-thrombophiler Thrombosepatienten auf. Nicht untersuchte oder (noch) nicht identifizierte Gerinnungsstörungen wären eine mögliche Erklärung. So gilt etwa Hyperhomozysteinämie seit einiger Zeit als Risikofaktor für arterielle und venöse Thrombosen und soll bei bis zu 20% der Thrombosepatienten nachweisbar sein (den Heijer M 1996; Fermo I 1995). Allerdings fehlen bisher valide Angaben über das Ausmaß der Gerinnungsaktivität bei diesen Patienten. Daher lässt sich nicht ausschließen, dass die bei unseren nicht-thrombophilen Patienten nachgewiesene Gerinnungsaktivierung teilweise auf diese oder eine andere bisher unidentifizierte hämostaseologische Störung zurückzuführen ist. Jedenfalls passen unsere Ergebnisse diesbezüglich gut zu einer von Kyrle et. al. durchgeführten Studie über die Höhe der Prothrombinfragmente bei Faktor V Leiden-Trägern und nicht-thrombophilen Patienten (Kyrle PA 1997).

### **4.3.3 Erhöhte Aktivitätsmarker als Hinweis auf ein erhöhtes Thromboserisiko?**

Da thromboembolische Ereignisse eine häufige Ursache von Morbidität und Mortalität innerhalb der Bevölkerung darstellen, wäre es von großem medizinischen Interesse, einen „Marker“ zu besitzen, mit dem sich Patienten mit erhöhtem Thromboserisiko identifizieren ließen. In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage, ob vielleicht die Prothrombinfragmente F1+2 als bekannter Marker einer Übergerinnbarkeit des Blutes in direkter Beziehung zum Thromboserisiko bisher nicht symptomatischer Individuen stehen. Verglichen wir jedoch die F1+2-Werte unserer Patientenkollektive mit denen entsprechender alters- und geschlechts-gematchter Blutspender, so ließen sich keine signifikanten Unterschiede nachweisen (mediane F1+2-Werte 0,7 nmol/l versus 0,8 nmol/l). Ob sich daraus bzgl. des klinischen Nutzens der Aktivitätsmarker allgemeingültige Schlüsse ziehen lassen, muss fraglich bleiben, da wir mit stark vorselektionierten Patientenkollektiven arbeiteten. Allerdings schwankten selbst bei gesunden Individuen die F1+2-Spiegel in einem so weiten Rahmen (0,4 bis 1,8 nmol/l), dass im Einzelfall valide Aussagen über den Zusammenhang zwischen der Höhe der Aktivitätsmarker und dem Thromboserisiko sicher nicht möglich sind. Aber nicht nur im Bezug auf das Thromboserisiko scheint die Aussagekraft der Aktivitätsmarker eingeschränkt zu sein. Der Vergleich der F1+2-Spiegel zwischen thrombophilen und nicht-thrombophilen Thrombosepatienten zeigte nämlich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede. Somit dürfte die Höhe der Aktivitätsmarker auch keinen eindeutigen Hinweis auf das Vorliegen einer thrombophilen Diathese geben.

Die F1+2-Werte scheinen daher als zuverlässige Screening-Marker für noch nicht erkannte thrombophile Störungen oder zur Identifikation eines gesteigerten Thromboserisikos von eingeschränkter Bedeutung zu sein. Diese Befunde werden durch Untersuchungen anderer Autoren bestätigt (Kyrle PA 1997; Martinelli I 1996; Boneu B 1991).



#### **4.4 Thrombin-Activatable Fibrinolysis Inhibitor (TAFI)**

Während der normalen Hämostase besteht eine Balance zwischen Gerinnung und Fibrinolyse. Störungen dieses labilen Gleichgewichts könnten einerseits in einer verstärkten Blutungsneigung, andererseits in einer Tendenz zur Thrombose resultieren. Aktiviertes Protein C als Endprodukt des wichtigsten antikoagulatorischen Protein C-Weges (Dahlbäck B 1995; Esmon CT 1995) spielt dabei durch seine gerinnungshemmende (Vehar GA 1980; Kisiel W 1977) und gleichzeitig profibrinolytische Wirkung (Bajzar L 1993) eine besondere Rolle bei der Aufrechterhaltung dieses Gerinnungsgleichgewichts. Bajzar et. al. konnten ein Plasmaprotein isolieren, welches durch Thrombin aktiviert wird und in dieser Form als potenter Inhibitor der Fibrinolyse wirkt (Bajzar L 1995). Dieses Protein, genannt „thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI)“, stellt somit das Bindeglied zwischen Gerinnung und Fibrinolyse dar. TAFI kann durch trypsin-verwandte Enzyme, etwa Thrombin oder Plasmin, zu TAFIa aktiviert werden (Bajzar L 1995; Eaton DL 1991). Die Kinetik dieser thrombinabhängigen Aktivierung ist in hohem Maße vom Kofaktor Thrombomodulin (TM) abhängig (Bajzar L 1996).

Während noch weitestgehend unklar ist, welche Rolle TAFI bei der Thrombogenese spielt, scheinen die in-vitro-Zusammenhänge bzgl. TAFI durch zahlreiche Studien gut dokumentiert. So konnte für die in-vitro-Situation gezeigt werden, dass bereits kleine Mengen an Faktor XI (<0,01% der Faktor XI-Aktivität im Normalplasma) die Fibrinolyse zu hemmen vermögen (von dem Borne PA 1995). Der Mechanismus hinter dieser Hemmung soll dabei auf einer Faktor XI-abhängigen TAFI-Aktivierung beruhen (von dem Borne PA 1997). In Analogie zu diesen in-vitro-Beobachtungen interessierten uns nun die in-vivo Bedeutung von TAFI und die Zusammenhänge zwischen Faktor XI, der Thrombingenerierung und dem Grad der TAFI-Aktivierung. Lässt sich dabei auch klinisch eine vergleichbare Korrelation zwischen diesen drei Parametern herstellen, was wiederum Aufschlüsse über den Wirkungsmechanismus von Faktor XI geben könnte? Auf diese Frage soll insbesondere im Kapitel 4.5 eingegangen werden.

#### **4.4.1 TAFI-Funktion im Fibrinolytischen System**

Nach Bildung eines Fibringerinnsels wird das fibrinolytische System aktiviert, wenn Plasminogen und tPA an der Oberfläche des Fibrinmoleküls binden. Diese Bindung wird über spezifische C-terminale Lysinreste vermittelt (Fleury V 1991; Christensen U 1985) und führt zur Entstehung eines Komplexes mit hoher katalytischer Aktivität bei der Plasminbildung. Plasmin wiederum baut Fibrin ab, wobei erneut C-terminale Lysinreste freigelegt werden, die ihrerseits zu weiterer Plasminbildung führen. TAFIa wirkt in diesem Zusammenhang antifibrinolytisch, indem es die C-terminalen Lysinreste des Fibrinmoleküls abspaltet und dadurch die Plasminaktivierung supprimiert (Wang W 1998; Bajzar L 1995; Redlitz A 1995).

Erste Hinweise auf die in-vivo-Funktion des endogenen Gerinnungswegs und von TAFI im fibrinolytischen System stammen von einem experimentellen Thrombosemodell (Minemba MC 1998). Die Inkorporation von anti-Faktor XI-Antikörpern oder eines Carboxypeptidase-Inhibitors (spezifischer TAFIa-Inhibitor) in einen Jugularvenenthrombus führte zu einer 2-fach gesteigerten Thrombolyse, verglichen mit Kontrollantikörpern. Andere Hinweise auf die Bedeutung von TAFI in-vivo stammen aus Studien zur thrombolytischen Therapie. So konnte bei Hunden mit koronararteriellen Thrombosen während der thrombolytischen Therapie mit t-PA die TAFIa-Bildung nachgewiesen werden (Redlitz A 1996). Während der Streptokinase-Therapie bei Herzinfarkt-Patienten zeigte sich schon bald nach Therapiebeginn ein Anstieg der TAFIa-Spiegel, was auf eine plasminvermittelte TAFI-Aktivierung hinweist. Viele Studien konnten zeigen, dass die Empfindlichkeit eines Thrombus für die Fibrinolyse stark durch TAFI beeinflusst wird. Sowohl in einem arteriellen, als auch in einem venösem Thrombosemodell bei Kaninchen, führte die TAFI-Hemmung zu einer Beschleunigung der tPA-vermittelten Thrombolyse (Nagashima M 2000; Refino CJ 2000; Klement P 1999).

#### **4.4.2 TAFIa/ai-Spiegel bei Faktor V Leiden-Trägern und Kontrollen**

Sowohl bei unseren Faktor V Leiden-Trägern, als auch bei den Blutspendern schwankten die gemessenen TAFIa/ai-Spiegel in einem weiten Rahmen (zwischen 30,7 und 135,7 ng/ml). Ähnliche Beobachtungen konnten auch andere Autoren mit TAFI-Antigen machen (Chetaille P 2000; Schatteman KA 1999; Mosnier LO 1998). Als Ursache für diese interindividuellen Schwankungen wird oftmals die starke genetische Determinierung der TAFI-Antigen-Spiegel angesehen. Des weiteren konnten wir feststellen, dass der mediane TAFIa/ai-Spiegel bei den Mutationsträgern mit Thrombose in der Vorgeschichte mit 63,2 ng/ml etwa 10% höher lag als der der gesunden Blutspender (57,5 ng/ml). Diese Unterschiede in den TAFIa/ai-Werten könnten einen indirekten Hinweis auf den Pathomechanismus geben, welcher der thrombotischen Tendenz zugrunde liegt, die wir vielfach bei Faktor V Leiden-Trägern finden. Auf die genauen Zusammenhänge der Interaktion zwischen der Faktor V Leiden-Mutation und den TAFIa/ai-Werten wird in Kapitel 4.5 eingegangen.

#### **4.4.3 TAFI-Hemmung als therapeutische Maßnahme?**

Obwohl klinische Daten über den Effekt von TAFI in-vivo zur Zeit noch spärlich sind, erscheint es doch vielversprechend, TAFI als einen therapeutischen Angriffspunkt in akuten und chronischen Gerinnungssituationen anzusehen. Falls TAFI in-vivo tatsächlich eine Rolle bei der Regulation der Balance zwischen Gerinnung und Fibrinolyse spielt, könnte eine TAFI-Hemmung den absoluten Wert der Plasminogen-Aktivierung erhöhen und somit das Gleichgewicht hin zur Fibrinolyse schieben. Dieser Effekt wäre sicherlich für Patienten mit prädisponierenden Faktoren für eine Thromboseentstehung interessant, die ansonsten mit Aspirin bzw. Antikoagulantien behandelt werden müssten, um ihrer pathologischen Übergerinnbarkeit adäquat zu begegnen. Als Alternative oder in Ergänzung zu bisherigen Antikoagulantien könnte ein TAFI-Inhibitor die endogenen thrombolytischen Kräfte aktivieren und damit den Blutfluß aufrechterhalten. Da TAFI andererseits die Fibrinolyse nur verzögert

und nicht komplett hemmt, würde aus einer TAFI-Modulation bestimmt kein alles-oder-nichts-Effekt resultieren. Die Plasminbildung ließe sich somit gewissermaßen titrieren. Bei akuten Gerinnungsereignissen, wie etwa einem Herzinfarkt, könnte ein TAFI-Inhibitor seine thrombolytische Aktivität vergleichsweise spezifisch entfalten. Da die Halbwertszeit von aktiviertem TAFIa bei Körpertemperatur nur bei etwa 10 Minuten liegt (Boffa MB 2000; Marx PF 2000), wäre möglicherweise ein neu entstandener Thrombus mit noch hoher TAFIa-Aktivität ein bevorzugter Angriffspunkt für eine thrombolytische Behandlung mittels eines TAFI-Inhibitors. Auch würde die sehr kurze Halbwertszeit von TAFIa die Steuerbarkeit eines entsprechenden Medikaments positiv beeinflussen. Im Vergleich dazu wäre ein alter Thrombus mit nur noch geringer TAFIa-Aktivität (bedingt durch die kurze Halbwertszeit) weniger empfänglich für die akute Wirkung von TAFIa-Hemmern. Allerdings könnte eine Langzeit-Hemmung von TAFIa den steady-state des fibrinolytischen Systems erhöhen und den Körper dadurch in eine bessere Ausgangssituation für den endogenen Abbau von Gerinnseln versetzen.

Für den Effekt von TAFI-Inhibitoren auf die Fibrinolyseparameter in-vivo gibt es bereits erste Ergebnisse. Klement et. al. arbeiteten dabei mit New Zealand-Kaninchen, in deren Körperschlagadern sie durch wiederholte Ligaturen künstlich akute Thrombosen erzeugten (Klement P 1999). Im folgenden studierten sie den Effekt eines künstlichen TAFIa-Inhibitors (Carboxypeptidase-Inhibitor aus Tomaten) im Vergleich zu Gewebe-Plasminogenaktivator (tPA) im Hinblick auf die Thrombolyse sowie auf ein möglicherweise damit einhergehendes gesteigertes Blutungsrisiko. Sie fanden dabei, dass der Einsatz des TAFIa-Inhibitors im Vergleich zu tPA zu einer 3,7-fach schnelleren Thrombolyse führte. Ein gesteigertes Blutungsrisiko hingegen korrelierte nur mit der Dosis des verwendeten tPA, wohingegen die TAFIa-Hemmung nicht zu vermehrter Blutung führte. Folgt man diesen Ergebnissen, so scheint die Verwendung von TAFIa-Inhibitoren eine sehr effiziente und vergleichsweise sichere Methode der Thrombolyse zu sein. Zum besseren Verständnis der Rolle von TAFIa-Inhibitoren unter physiologischen Bedingungen und letztendlich ihrem sicheren klinisch Einsatz sind allerdings

noch eine Vielzahl von Studien zu ihrem gerinnungsbeeinflussenden Potential und ihrer therapeutischen Breite nötig.

#### **4.5 Die Interaktion zwischen TAFI und der Faktor V Leiden-Mutation, der Thrombingenerierung und Faktor XI im Gerinnungsablauf**

Obwohl in-vitro-Experimente zeigen konnten, dass eine Faktor XI-abhängige TAFI-Aktivierung hemmenden Einfluss auf die Fibrinolyse nimmt (von dem Borne PA 1995 und 1997), ist weiterhin unklar, welche Rolle TAFI in-vivo spielt. Die Plasmaspiegel an aktiviertem TAFI sind bei Lebererkrankungen erniedrigt (van Thiel DH 2001), bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit konnte man hingegen erhöhte Werte feststellen (Silveira A 2000). Darüber hinaus berichten van Tilburg et. al., dass erhöhte TAFI-Spiegel einen moderaten Risikofaktor für die Ausbildung einer Thrombose darstellen (van Tilburg NH 2000). Gleichzeitig steht die Vermutung im Raum, dass der profibrinolytische Effekt von aktiviertem Protein C ebenfalls über TAFI vermittelt ist, und zwar derart, dass der Protein C-Weg die Thrombinbildung hemmt und somit die Aktivierung von TAFI verhindert. Folgt man diesen Vermutungen, so scheint es eine Verbindung zwischen dem intrinsischen Gerinnungssystem, der Thrombinbildung, aktiviertem Protein C und TAFI zu geben. Um diesem Sachverhalt auf den Grund zu gehen, untersuchten wir die Plasmaspiegel an TAFI<sub>a</sub>/ai (aktive und inaktivierte aktive Form von TAFI) bei symptomatischen Trägern der Faktor V Leiden-Mutation im Vergleich zu gesunden Blutspendern, jeweils in Abhängigkeit von den Faktor XI-Spiegeln und der Thrombinbildung. Für die Analysen nutzten wir einen neu entwickelten und von uns leicht modifizierten TAFI-ELISA, der sowohl aktiviertes TAFI (TAFI<sub>a</sub>), als auch bereits wieder inaktiviertes TAFI (TAFI<sub>ai</sub>) misst. Dieses Vorgehen ist nötig, da die Halbwertszeit von TAFI<sub>a</sub> bekannterweise sehr gering ist und somit seine alleinige Bestimmung nur eine Momentaufnahme darstellen würde. Die Erfassung der Gesamtmenge an aktiviertem TAFI wäre so nicht möglich.

#### 4.5.1 Die Rolle des intrinsischen Gerinnungssystems bei der Regulation der Fibrinolyse in-vitro

Die thrombinvermittelte TAFI-Aktivierung legt die Vermutung nahe, dass das Gerinnungssystem eine entscheidende Rolle bei der Regulation der Fibrinolyse spielt und folglich Veränderungen der Thrombinbildung zu einem gestörten Ablauf der Fibrinolyse führen. Diese Überlegungen haben letztlich zur Hypothese des „revised model of coagulation“ geführt (Gailani D 1991; Naito K 1991). Nach diesem Modell ist die Intaktheit des intrinsischen Systems Voraussetzung, um die Fibrinolyse (via Thrombinbildung und TAFI-Aktivierung) zu hemmen. Die in der Folge durchgeführten in-vitro-Studien konnten diese Vorstellungen stützen. So konnte gezeigt werden, dass unter in-vitro-Bedingungen Faktor XI die Lysezeit eines Gerinnsels deutlich verlängern kann, Faktor XI also inhibitorisch auf die Fibrinolyse einwirkt und dieser Effekt via TAFI vermittelt wird (von dem Borne PA 1995 und 1997).

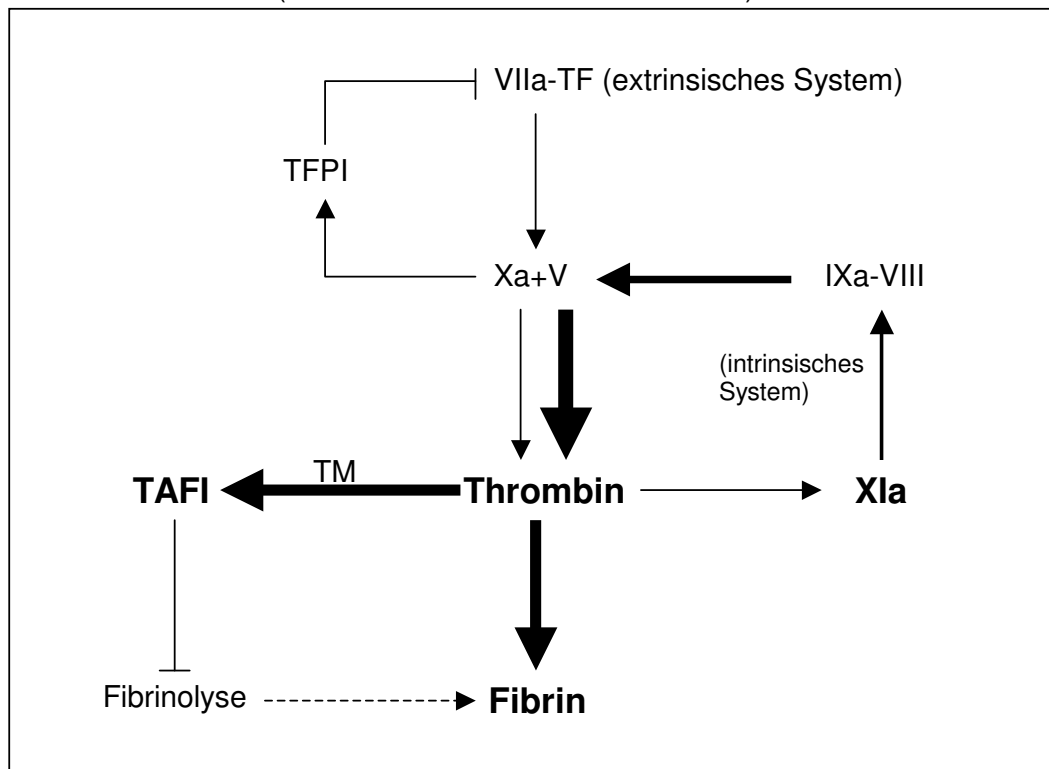


Abbildung 4.1. Das „revised model of coagulation“.

(TM= Thrombomodulin; TFPI= tissue factor pathway inhibitor;  $\longrightarrow$  aktiviert;  $\dashrightarrow$  baut ab;  $\text{---|}$  hemmt)

Sowohl für die Hemmung der Fibrinolyse, als auch für die Aktivierung von TAFI werden im experimentellen Gerinnungsablauf supraphysiologische Thrombinkonzentrationen benötigt (zwischen 500 und 2100 nmol/l) (Boffa MB 1998), im Gegensatz zu geringen Thrombinmengen, die für die Fibrinbildung ausreichen (20 nmol/l). Nach dem revised model of coagulation werden derart hohe Thrombinkonzentrationen durch eine Faktor XI-abhängige Feedback-Schleife generiert. Parallel dazu steigt auch der TAFI-vermittelte antifibrinolytische Effekt (von dem Borne PA 1995). Dieses Phänomen lässt sich mit einer andauernden Faktor XI-vermittelten Thrombingenerierung und folglich TAFI-Aktivierung entsprechend dem oben gezeigten Modell erklären. Die Vorstellung eines direkten Zusammenhangs zwischen Faktor XI-abhängiger Thrombinbildung, TAFI-Aktivierung und dadurch ausgelöster Fibrinolysehemmung begründet sich allerdings auf einem rein experimentellen Modell.

Basierend auf diesen Befunden wollten wir für unsere hochselektierten Patientenkollektive prüfen, ob sich die Vorstellung einer Faktor XI-induzierten (thrombinvermittelten) Fibrinolysehemmung letztlich auch in-vivo zeigt. Diese Untersuchungen führten wir mit den Faktor V Leiden-Trägern (und ihre Kontrollen) durch, für die wir den Zusammenhang zwischen Faktor XI und der Thrombingenerierung bereits aufzeigen konnten.

#### **4.5.2 Die Interaktion zwischen Faktor XI und der Faktor V Leiden-Mutation bei der Thrombogenese**

Das oben gezeigte Gerinnungsmodell beschreibt eine Rückkopplungsschleife zwischen Thrombin, Faktor XI, dem Faktor IXa-VIII-Komplex und dem Prothrombinase-Komplex (Faktor Xa + V) zurück zu Thrombin. Es ist leicht nachzuvollziehen, dass diese Schleife vor allem dann besonders gut abläuft, wenn folgende Voraussetzungen erfüllt sind:

1. Es müssen alle Komponenten des Feedback-Loop in ausreichender Konzentration im Plasma vorliegen, d.h. es darf kein Mangel an diesen Faktoren bestehen.
2. Keine der beteiligten Komponenten darf in nennenswertem Maße durch einen Inhibitor blockiert sein.



Nun liegt aber physiologischerweise im Plasma gesunder Individuen ein derartiger Inhibitor vor, der in diesen Rückkopplungsmechanismus eingreift: aktiviertes Protein C (APC). Dieses Protein ist in der Lage, die Wirkung von aktiviertem Faktor V (Va) zu hemmen und dadurch den Gerinnungsablauf zu bremsen. Es ist gemäß dieses Gerinnungsmodells sicherlich vorstellbar, dass durch die APC-Wirkung auch der Durchlauf der Feedback-Schleife beeinträchtigt wird. APC wäre somit indirekt in der Lage, die Faktor XI-Wirkung innerhalb dieser Schleife zu hemmen und damit die gesamte Schleife zu bremsen. Dagegen ist zu vermuten, dass bei defektem Protein C-Weg dieser Feedback-Mechanismus ungebremst ablaufen kann, was in einer gesteigerten Thrombinbildung mit evtl. konsekutiv gesteigertem Thromboserisiko resultieren könnte. Dieser defekte Protein C-Weg ist das pathophysiologische Korrelat der Faktor V Leiden-Mutation. Folgerichtig könnte bei intaktem APC-Weg die Wirkung eines isoliert erhöhten Faktor XI durch die Hemmung von Faktor Va kompensiert werden, wodurch sein thrombogenes Potential regelrecht „ausgebremst“ würde und die Funktion der Feedback-Loop innerhalb des Gerinnungsablaufs an Einfluss verliert. Bei Vorliegen einer Faktor V Leiden-Mutation dagegen fällt diese „Bremse“ der Rückkopplungsschleife weg, mit der Konsequenz, dass nun erhöhte Faktor XI-Spiegel viel eher zum Tragen kommen.

Gerade diesen Zusammenhang zwischen Faktor XI und der Faktor V Leiden-Mutation konnten wir mit unseren Patienten eindrucksvoll darstellen. Bei den nicht-thrombophilen Patienten (kein Vorliegen einer Faktor V Leiden-Mutation) führten hohe Faktor XI-Spiegel vermutlich deshalb nicht zu einem gesteigerten Thromboserisiko, da die Faktor XI-Wirkung noch unter der Kontrolle eines intakten APC-Wegs stand. Im Gegensatz dazu konnten wir bei den Patienten mit Faktor V Leiden-Mutation erhöhte Faktor XI-Spiegel als Risikofaktor der Thrombose identifizieren. Dies erklärt sich durch die nunmehr unkontrollierte Faktor XI-Wirkung im Rückkopplungskreislauf des oben beschriebenen Gerinnungssystems. Des weiteren konnten wir für diese Patienten einen Zusammenhang zwischen der Höhe der Faktor XI-Werte und der Thrombingenerierung nachweisen. Trotzdem scheinen in diesem

Zusammenhang weitere Einflussfaktoren eine Rolle zu spielen, die in-vivo nicht unberücksichtigt bleiben dürfen (s.u.). Unsere Darstellung liefert allerdings ein Beispiel und gleichzeitig eine plausible theoretische Erklärung für das Konzept der multifaktoriellen Thrombogenese, angewandt auf Faktor XI und die Faktor V Leiden-Mutation. Es demonstriert, wie zwei isolierte Gerinnungsstörungen sowohl in der Theorie, als auch in-vivo aufeinander Einfluss nehmen.

#### **4.5.3 Die Interaktion zwischen Faktor XI und der Thrombingenerierung**

Einige Studien sehen Faktor XI als einen Risikofaktor für die Thromboseentstehung an, über welchen Mechanismus Faktor XI dabei zum Tragen kommt ist allerdings weitgehend spekulativ. Möglich wäre eine durch Faktor XI ausgelöste, und eventuell über Gebühr gesteigerte Thrombingenerierung. Über den direkten Zusammenhang zwischen den Faktor XI-Spiegeln und der Thrombingenerierung liegen derzeit aber nur sehr spärliche und fast ausschließlich experimentelle Daten vor. Die F1+2-Werte repräsentieren direkt die Thrombingenerierung und zeigen somit eine vorliegende Hyperkoagulabilität an. Von dem Borne et. al. konnten bereits 1995 in einem in-vitro-Modell mit humanem Plasma nachweisen, dass eine Blockade von Faktor XI mittels spezifischer anti-Faktor-XI-Antikörper zu einem signifikanten Abfall der Thrombingenerierung (gemessen an den F1+2-Werten) führt (von dem Borne PA 1995). Die deutlichen Unterschiede in der Thrombinbildung in Anwesenheit bzw. bei Fehlen des Antikörpers seien ein Hinweis auf die wichtige Rolle von Faktor XI im experimentellen Gerinnungsablauf. Man schlussfolgerte, dass die prokoagulatorische Wirkung von Faktor XI auf einer gesteigerten Thrombingenerierung beruhe, auch wenn über einen genaueren Dosis-Wirkungs-Zusammenhang keine Aussagen gemacht wurden. Folgt man darüber hinaus den Vorstellungen des revised model of coagulation, so darf man hier ebenfalls einen Zusammenhang zwischen der Höhe der Faktor XI-Werte und der Thrombingenerierung vermuten und zwar derart, dass Faktor XI über eine Rückkopplungsschleife zur sekundären Thrombinbildung beiträgt. Diese Beobachtungen beruhen

allerdings ebenfalls auf einem rein experimentellen Modell. Für unsere Thrombosekollektive und die gesunden Blutspender wollten wir daher prüfen, ob auch klinisch eine Korrelation zwischen den Faktor XI-Spiegeln und den F1+2-Werten besteht. Dies könnte einen Hinweis auf die Wirkweise von Gerinnungsfaktor XI in-vivo geben.

Weder bei den gesunden Blutspendern, noch bei den nicht-thrombophilen Thrombosepatienten konnten wir einen Zusammenhang zwischen der Thrombingenerierung und den Faktor XI-Werten aufzeigen. Bei den Faktor V Leiden-Trägern dagegen fand sich eine Korrelation zwischen F1+2 und Faktor XI. Dabei deuten die gefundenen Unterschiede zwischen den Mutationsträgern und den nicht-thrombophilen Thrombosepatienten darauf hin, dass die Assoziation zwischen der Thrombingenerierung und den Faktor XI-Werten bei den Faktor V Leiden-Patienten nicht durch die Thrombose bedingt ist. Dies erklärt sich daraus, dass sich beide Kollektive hinsichtlich ihrer thrombotischen Vorgeschichte nicht unterscheiden (siehe Tabelle 3.5), wohl aber in Bezug auf das Vorliegen einer Faktor V Leiden-Mutation. Auch diese Unterschiede lassen sich mit der Interaktion zwischen der APC-Wirkung und Faktor XI im Gerinnungsmodell erklären. Analog der oben beschriebenen Vorstellung könnte APC den Faktor XI-abhängigen Gerinnungsweg blockieren, wodurch die Wirkung hoher Faktor XI-Spiegel bei nicht-thrombophilen Patienten (intakter APC-Weg) weniger zum Tragen kommt. Bei APC-Resistenz dagegen steigt durch aufgehobene Blockierung des Faktor XI-abhängigen Gerinnungswegs der Einfluss von Faktor XI auf die Thrombingenerierung. Ergebnissen von Fernandez et. al. zufolge könnte diese (gesteigerte) Thrombingenerierung wiederum hemmenden Einfluss auf die APC-Funktion nehmen, i.S. eines Circulus vitiosus (Fernandez J 1997). So konnten sie zumindest für gesunde Individuen zeigen, dass die Thrombinaktivität invers mit der APC-Funktion korreliert ist. Dies würde entsprechend unserer Ergebnisse bedeuten, dass die Faktor XI-abhängige Thrombingenerierung bei Faktor V Leiden-Trägern eine eventuelle APC-(Rest-)Wirkung weiter herunterreguliert und damit die Thrombinbildung bei diesen Patienten zusätzlich anheizt.

Mit gewissen Einschränkungen, die sich aber aus der Komplexität der in-vivo Situation allgemein ergeben, kann nach unseren Ergebnissen festgestellt werden, dass eine durch hohe Faktor XI-Spiegel vermittelte Thromboseneigung bei Faktor V Leiden-Trägern durchaus auf dem Boden einer gesteigerten Thrombinaktivierung entsteht.

Allerdings scheinen in-vivo auf diesen Zusammenhang gewisse „Einflussfaktoren“ einzuwirken, die nicht vernachlässigt werden sollen: So dürfte etwa der Ausprägungsgrad der Mutation als homo- oder heterozygot eine Rolle in der Faktor XI-abhängige Thrombingenerierung bei diesen Patienten spielen. Diese Überlegung scheint durchaus sinnvoll, da bei heterozygoter Ausprägung wenigstens noch eine Teilaktivität des APC-Systems vorhanden ist, wohingegen diese bei Homozygotie völlig fehlt. Analog dazu fanden wir in unserem Faktor V Leiden-Kollektiv bei 4 der 6 homozygoten Mutationsträger (entsprechend 66%) F1+2-Werte über 1,1 nmol/l. Dagegen zeigten lediglich 17% der Heterozygoten derart erhöhte F1+2-Werte.

Im Gegensatz zu den Faktor V Leiden-Patienten fanden wir weder bei nicht-thrombophilen Thrombosepatienten noch bei gesunden Blutspendern einen Hinweis auf eine Faktor XI-abhängige Thrombingenerierung. Diese Beobachtungen lassen sich durch Ergebnisse von Butenas et. al. bestätigen, die in einem in-vitro-System mit Normalplasma den Einfluss unterschiedlich hoher Spiegel von u.a. Faktor XI auf das Maß der Thrombingenerierung analysierten (Butenas S 2003; Butenas S 1999). Sie konnten zeigen, dass eine Schwankung der Faktor XI-Spiegel zwischen 50-150% nur marginale Auswirkungen auf das Maß der Thrombinbildung hat. In diesem Konzentrationsbereich, der etwa der von uns gefundenen Schwankungsbreite der Faktor XI-Spiegel bei diesem Kollektiv entspricht, scheint somit die Thrombingenerierung weitgehend unabhängig von Faktor XI zu sein. Diese Ergebnisse werden durch klinische Befunde unterstützt, die zeigen, dass manifeste Blutungen bei Faktor XI-Mangel erst auftreten, wenn seine Konzentration deutlich unter 10% der Normalwerte sinkt (Roberts HR 1998). Umgekehrt wird die Thromboseneigung erst bei Faktor XI-Spiegel oberhalb der 90. Perzentile deutlich (Meijers JC 2000). In-vivo scheinen daher

Schwankungen von Faktorensiegeln im „gesunden“ Plasma in einem hohen Maße kompensierbar. Dieser Mechanismus macht durchaus Sinn, v.a. wenn man sich vor Augen hält, wie viele Variablen die Faktor XI-Spiegel in-vivo beeinflussen (s. Kap. 1.1.4.1), bzw. in welchem Rahmen die Faktor XI-Spiegel selbst bei unseren gesunden Blutspendern schwankten (45,9 bis 133,5%). Unter physiologischen Bedingungen wäre eine zu enge Interaktion zwischen den Faktor XI-Siegeln und der Thrombingenerierung demnach eher schädlich als nützlich, da sich jede biochemische Schwankung direkt klinisch manifestieren würde. Auch unter evolutiven Gesichtspunkten scheint es vorteilhaft, dass der Organismus scheinbar über Mechanismen verfügt, die es ihm ermöglichen, trotz (interindividuell) stark schwankender Faktor XI-Spiegel die Thrombingenerierung über weite Strecken konstant zu halten.

Somit müssen in-vivo verschiedene Faktoren bei der Interaktion von Faktor XI und den F1+2-Werten berücksichtigt werden. Bezogen auf die Situation bei Vorliegen einer Faktor V Leiden-Mutation konnten wir jedoch eindrücklich zeigen, dass der thrombosefördernde Effekt hoher Faktor XI-Spiegel durchaus auf eine gesteigerte Thrombingenerierung zurückzuführen ist. Wir erkennen daher für diese Patienten deutliche Parallelen zu den experimentellen Ergebnissen von dem Bornes et. al., die einen Zusammenhang zwischen Faktor XI und dem Grad der Thrombingenerierung bereits nachweisen konnten (von dem Borne PA 1995). Im Gegensatz dazu hat ein hoher Faktor XI ohne zugrundeliegende Faktor V Leiden-Mutation wohl keinen Einfluss auf die Thrombinbildung oder das Risiko der Thromboseentstehung.

#### **4.5.4 Die Interaktion zwischen Faktor V Leiden und TAFIa/ai**

Unsere Untersuchungen konnten einen signifikanten Unterschied der TAFIa/ai-Spiegel zwischen den Faktor V Leiden-Trägern und gesunden Blutspendern aufzeigen (63,2 ng/ml bei Patienten vs. 57,5 ng/ml bei Blutspendern). Unklar ist allerdings, worauf dieser zurückzuführen ist, da sich beide Kollektive in *zwei* Merkmalen unterscheiden: der Thrombose und dem Vorliegen der Faktor V Leiden-Mutation als solcher.

Einerseits ist denkbar, dass die gefundenen Unterschiede in enger Beziehung zum thrombotischen Geschehens stehen, welches dieses Kollektiv charakterisiert. Dafür sprechen u.a. Untersuchungen von van Tilburg et. al., die bei Thrombosepatienten im Vergleich zu Kontrollen erhöhte TAFI-Antigenspiegel beschrieben und folglich diese als einen moderaten Risikofaktor für die Ausbildung einer Thrombose identifizieren konnten (van Tilburg NH 2000). Darüber hinaus ist zumindest für das Normalkollektiv eine enge Korrelation zwischen TAFI-Antigenspiegeln und TAFI-Aktivität beschrieben (Mosnier LO 1998). Es ließe sich daher vermuten, dass ein vergleichbarer Zusammenhang zwischen TAFI-Antigenspiegel und TAFI-Aktivität auch für unsere Faktor V Leiden-Patienten zutreffen könnte.

Andererseits gibt es Hinweise darauf, dass auch das Vorliegen einer Faktor V Leiden-Mutation (unabhängig von der stattgehabten Thrombose) einen Effekt auf die Fibrinolyse hat. Dieser wiederum könnte sich in der Höhe der TAFIa/ai-Werte widerspiegeln. So konnten Dai et. al. in einem experimentellen Modell zeigen, dass die Plasmakomponente von Thrombomodulin (Plasma-TM) hemmenden Einfluss auf die TAFI-Aktivierung nimmt, und dass darüber hinaus dieser Effekt an ein intaktes APC-System gebunden ist (Dai L 2004). Folgerichtig könnte es bei gestörtem APC-Weg (Faktor V Leiden-Mutation) zu einer gesteigerten TAFI-Aktivierung kommen. Der beobachtete Effekt von APC auf die TAFI-Aktivität wurde allerdings via gesteigerte Thrombinbildung vermittelt, eine Beobachtung, die durch unsere Ergebnisse nicht gestützt wird. Dieser Unterschied mag sich zum einen dadurch erklären, dass wir im Gegensatz zu Dai et. al. nicht das endogene Thrombinpotential, sondern die F1+2-Werte als Maß der Thrombingenerierung bestimmten. Darüber hinaus beziehen sich die Ergebnisse von Dai et. al. lediglich auf die in-vitro-Situation und ihre in-vivo-Relevanz ist letztlich nicht belegt.

Für die in-vivo-Situation ist es unserer Meinung nach und entsprechend den Beobachtungen von van Tilburg et. el. wahrscheinlicher, dass die festgestellte höhere TAFI-Aktivität (gemessen an TAFIa/ai) der Faktor V Leiden-positiven Thrombosepatienten Ausdruck allgemein erhöhter TAFI-Antigenspiegel dieses Patientenkollektivs ist.

#### **4.5.5 Die Rolle von Thrombin-Thrombomodulin bei der TAFI-Aktivierung in-vivo**

Die Aktivierung von TAFI zu TAFIa allein durch Thrombin ist ein ineffektiver Prozess und benötigt zu seinem Ablauf (unphysiologisch) hohe Thrombinkonzentrationen (zwischen 500 und 2100 nmol/l). Nach den in-vitro-Vorstellungen des revised model of coagulation kann eine derartige Thrombingenerierung nur durch einen Feedback-Loop unter Einschluss von Faktor XI geleistet werden. Dass diese Vorstellung v.a. im Normalplasma in-vivo eine geringe Relevanz zu haben scheint, haben wir bereits hervorgehoben. Die folgenden Beobachtungen mögen dies unterstreichen.

Thrombomodulin (TM), ein integrales Membran-Glycoprotein der Endothelzellen, kann durch Konformationsänderung innerhalb des Thrombinmoleküls die Kinetik der thrombinvermittelten TAFI-Aktivierung dramatisch verändern (Bajzar L 1995). Nach Bindung an Thrombin kann der Thrombin-TM-Komplex sowohl auf den Gerinnungs-, als auch auf den Fibrinolyseablauf Einfluss nehmen: TM verstärkt einerseits die thrombinvermittelte TAFI-Aktivierung über 1250-fach und hemmt so die Fibrinolyse (Bajzar L 1995), andererseits kann dieser Komplex die Aktivierung von Protein C zu aktiviertem Protein C (APC) stimulieren (Dittman WA 1990), was zu einer Hemmung der Thrombinbildung und damit Verminderung der TAFI-Aktivierung führt. Obwohl diese Aktivierung von TAFI und APC gleichzeitig abläuft, scheint die Konzentration an TM einen entscheidenden Einfluss darauf zu haben, welcher Effekt in der Summe überwiegt. Bei niedriger TM-Konzentration (< 5 nmol/l) steht die TAFI-Aktivierung im Vordergrund, während bei höheren TM-Spiegeln (> 10 nmol/l) die Hemmung der Thrombinbildung durch APC überwiegt, wobei dieser Effekt natürlich von einem funktionstüchtigen antikoagulatorischen Weg abhängt (Mosnier LO 2001). Der entsprechende Schwellenwert für die antagonistischen Effekte von TM scheint somit zwischen diesen beiden Konzentrationen zu liegen. Physiologischerweise ist der Hauptanteil an TM auf der Zelloberfläche der Endothelien lokalisiert, doch ist auch eine Plasmakomponente von TM (Plasma-TM) bekannt (errechnete Plasmakonzentration an TM ca. 10-15 nmol/l (Ishii H 1985)). Die

Konzentration des endothelzellgebundenen TM (und damit sein potentieller Einfluss auf TAFI) ist in verschiedenen Körpergeweben und in Abhängigkeit von der Gefäßgröße sehr unterschiedlich (Bajaj MS 1999; Ishii H 1986). Esmon et. al. und Busch et. al. errechneten, dass die effektive endothelzellgebundene TM-Konzentration von deutlich weniger als 5 nmol/l in der Aorta bis auf >100 nmol/l im Kapillarsystem ansteigt (Esmon CT 1989; Busch C 1982). Folglich kann es in verschiedenen Körperregionen und Gefäßgebieten sowohl zur TAFI-Aktivierung (TM-Konzentration < 5 nmol/l), als auch zur TAFI-Hemmung (TM-Konzentration > 10 nmol/l) kommen, und zwar unabhängig von der lokalen Faktor XI-Konzentration und dem Grad der Thrombingenerierung. Diese Beobachtungen unterstreichen den starken (und wechselnden) Einfluss von TM auf das Gerinnungs- und Fibrinolyse-System und mögen gleichzeitig erklären, warum sich der Nachweis eines genauen Regulationsmechanismus der TAFI-Aktivierung in-vivo besonders schwierig gestalten dürfte.

Vor dem Hintergrund des einerseits sehr großen, andererseits aber auch sehr variablen Einflusses von TM auf die TAFI-Aktivierung in-vivo müssen somit auch die Ergebnisse von Dai et. al. diskutiert werden. Der von ihnen in-vitro beschriebene hemmende Effekt von TM auf die TAFI-Aktivierung mag für das von ihnen untersuchte System und die speziell von ihnen verwandte TM-Konzentration gültig sein. Bei in-vivo aber stark schwankenden TM-Werten sind allerdings nach dem oben gesagten auch genau gegensätzliche Effekte wahrscheinlich. Da der „Spielraum“ für den Thrombin-TM-vermittelten antagonistischen Effekt bzgl. der TAFI-Aktivierung oder TAFI-Hemmung in-vivo sehr klein (<5 nmol/l vs. >10 nmol/l), der katalytische Einfluss von TM auf diesen Reaktionsschritt aber sehr groß ist, scheint die Thrombingenerierung bei der Regulation der TAFI-Aktivierung von weit geringerer Bedeutung als die TM-Konzentration zu sein. Entsprechend fanden wir weder bei unseren Faktor V Leiden-Trägern, noch bei den gesunden Blutspendern eine Korrelation zwischen den F1+2-Werten und der Höhe der TAFIa/ai-Spiegel. Wir vermuten daher, dass in-vivo die regulierende Größe bei der Interaktion zwischen Gerinnungs- und Fibrinolyse-System hauptsächlich die plasmatische / systemische TM-Konzentration ist und weniger durch Komponenten des intrinsischen Systems



bestimmt wird. Dabei sollte bei den im Plasma vorliegenden TM-Konzentrationen sein Einfluss auf das APC-System (mit evtl. konsekutiver Hemmung der Thrombinbildung) gegenüber dem TAFI-aktivierenden Effekt überwiegen.

Darüber hinaus gibt es neben TM noch weitere Faktoren, die unter physiologischen Bedingungen Einfluss auf die TAFI-Aktivierung nehmen. So kann etwa Plasmin TAFI nach der Aminosäure Arg<sup>92</sup> spalten und damit zu TAFIa aktivieren, wobei die Kinetik dieser Reaktion deutlich schlechter ist, als die der Thrombin-TM-vermittelten TAFI-Aktivierung (Mao SS 1999). Allerdings können Glykosaminoglykane, die physiologischerweise in der extrazellulären Matrix und auf Endothelzellen zu finden sind, die plasminvermittelte TAFI-Aktivierung deutlich verstärken. Unter diesen in-vivo-Bedingungen scheint auch Plasmin einen nicht zu vernachlässigenden Beitrag zur TAFI-Aktivierung zu leisten. Dies kann ein weiterer Hinweis dafür sein, dass es schwierig ist, unter physiologischen Verhältnissen eine strenge Korrelation zwischen Faktoren des endogenen Systems, der Thrombingenerierung und der TAFI-Aktivierung zu suchen. Diese Schlussfolgerungen werden u.a. durch Untersuchungen von Santamaria et. al. unterstützt. Sie analysierten in einer gesunden spanischen Population die Zusammenhänge zwischen den TAFIa-Werten und verschiedenen hämostatischen Parametern, u.a. auch Faktor XI (Santamaria A 2004). Eine signifikante Korrelation zwischen diesen Parametern konnten auch sie nicht nachweisen. Sie schlussfolgerten, dass ähnlich den TAFI-Antigenspiegeln (Tregouet DA 2001; Henry M 2001) auch die TAFIa-Spiegel einer großen interindividuellen Variabilität unterliegen und durch Gen-Umwelt-Interaktionen mitbestimmt werden und weniger in direktem Zusammenhang mit Gerinnungsfaktorspiegeln stehen. Wir können ihre Ergebnisse wiederum dahingehend bestätigen, dass wir für ein vergleichbares Kollektiv (gesunde Blutspender) keinen Zusammenhang zwischen Faktor XI und der Thrombinbildung (und folglich auch nicht TAFIa/ai) nachweisen konnten.

In-vivo scheint daher die Rolle des intrinsischen Systems im Gerinnungsablauf und bei der Fibrinolysehemmung (thrombin-abhängige TAFI-Aktivierung) nicht so offensichtlich zu sein, wie man nach dem revised model of

coagulation annehmen mag. In diesem komplexen Milieu tritt durch die Anwesenheit von „Modulatoren / Katalysatoren“ (wie z.B. TM oder Plasmin) die Höhe der Faktor XI- oder Thrombinkonzentration als ausschlaggebender Faktor der TAFI-Aktivierung und Fibrinolyse-Regulation in den Hintergrund. Dies erklärt sich nicht nur aus den von uns gefundenen Ergebnissen, sondern auch durch die klinische Beobachtung, dass ein Mangel an verschiedenen Komponenten des endogenen Systems hinsichtlich einer etwaigen Blutungsneigung durchaus asymptomatisch bleiben kann. Dies ist insbesondere bei Faktor XI- oder XII-Mangel auch mehrheitlich der Fall.

#### **4.5.6 Das revised model of coagulation „in-vivo“**

Wir konnten zeigen, dass ein erhöhter Faktor XI-Spiegel bei Patienten mit zugrundeliegender Faktor V Leiden-Mutation das Risiko für die Ausbildung einer Thrombose erhöht. Dabei kommt aktiviertem Protein C im Bezug auf die Gerinnungsaktivität eine entscheidende regulierende Funktion (i.S. einer downregulation) zu. Bei Vorliegen einer Faktor V Leiden-Mutation ist diese Regulation nur noch eingeschränkt oder nicht mehr gegeben und erhöhte Faktor XI-Spiegel könnten über eine gesteigerte Thrombingenerierung direkt das Thromboserisiko erhöhen. Zusätzlich gibt es Hinweise darauf, dass eine gesteigerte Thrombinbildung auch die antikoagulatorische APC-Wirkung hemmt, was bei diesen Patienten einen weiteren Risikofaktor darstellen könnte. Nach unseren Ergebnissen scheint daher eine Faktor XI-vermittelte Feedback-Aktivierung von Thrombin (entsprechend den bekannten in-vitro-Daten) auch in-vivo vorzuliegen und in Abhängigkeit vom Auftreten einer Faktor V Leiden-Mutation für die Manifestation einer Thrombose bedeutsam zu sein. Dass dieser Zusammenhang nur für Faktor V Leiden-Träger und nicht für Thrombosepatienten allgemein gilt, kann durch die gestörte regulative Funktion des APC-Systems erklärt werden. Neben diesem Faktor XI-Feedback-Weg hat in-vivo der „direkte“ Weg des endogenen und exogenen Systems sicherlich ebenso einen Einfluss auf die Thrombinbildung.

Abweichend von den Vorstellungen des revised model of coagulation haben wir keinen Zusammenhang zwischen der Aktivität des

Gerinnungssystems (gemessen an F1+2) und dem Maß der Fibrinolyseaktivierung (gemessen an TAF1a/ai) feststellen können. Dies mag sich letztlich durch die Komplexität der in-vivo-Situation erklären zu lassen. Auch wenn wir den direkten Einfluss der katalytischen Funktion des Thrombin-TM-Komplexes auf diesen Reaktionsschritt nicht untersucht haben, so sprechen doch diverse Literaturangaben dafür, dass dies in-vivo die entscheidende regulierende Komponente zu sein scheint. In diesem Punkt sind die ursprünglichen Vorstellungen des revised model of coagulation zu wenig umfassend und erklären diesen Sachverhalt nicht ausreichend.

Auch wenn die Gerinnungssituation in-vivo eigentlich zu komplex ist, um sie in einem schematischen Modell abzubilden, so soll Abbildung 4.2 wenigstens ein Versuch sein, wie man sich den Gerinnungsablauf entsprechend unserer Ergebnisse vorstellen könnte (Legende s. Abb. 4.1). Dabei soll die Stärke der Pfeile den Grad der Relevanz des jeweiligen Reaktionsschritts darstellen.

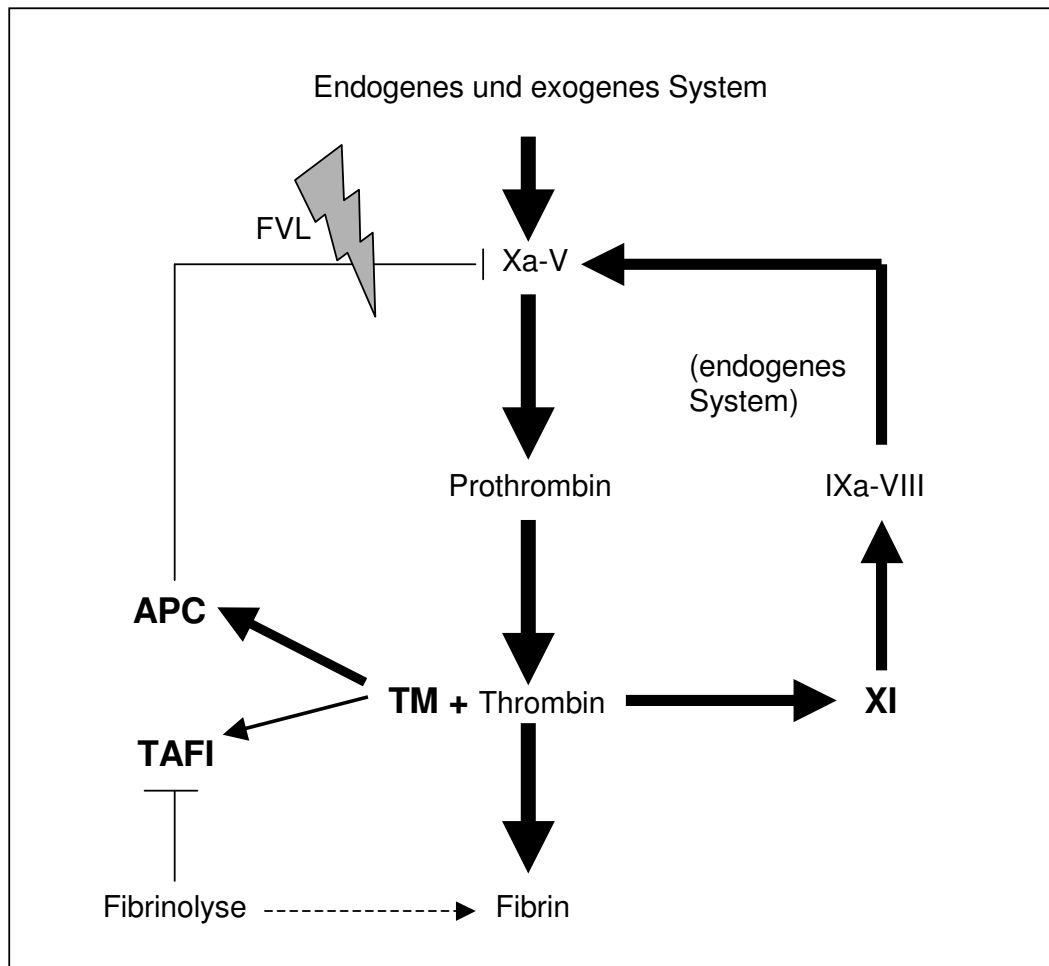


Abbildung 4.2. Das Gerinnungsmodell in-vivo.

Das 1992 erstmals von Gailani und Broze beschriebene revised model of coagulation hat in der Vergangenheit oft als erklärendes Modell der koagulatorischen und fibrinolytischen Zusammenhänge innerhalb des Gerinnungsablaufs gedient. Dieses Modell scheint die in-vitro-Situation auch plausibel abzubilden. Grundlegende Gesichtspunkte der in-vivo-Situation werden in diesem Modell allerdings nicht berücksichtigt. Folgt man unseren Ergebnissen und denen anderer Studien, die sich mit den klinischen Aspekten der Gerinnungszusammenhänge auseinandergesetzt haben, so muss man sagen, dass sich die in-vivo-Situation in den Vorstellungen des ursprünglichen revised model of coagulation nur in Ansätzen widerspiegelt.

#### **4.6 Konsequenzen für den klinischen Alltag**

In den letzten Jahren hat unser Wissen über angeborene und erworbene Ursachen der Thrombophilie enormen Zuwachs erfahren. So können wir heute bei fast 40% der Thrombosepatienten zumindest *einen* der am häufigsten gefundenen angeborenen Gerinnungsdefekte (Faktor V Leiden-Mutation, Prothrombinpolymorphismus, Protein C- / S-Mangel, Hyperhomozysteinämie etc.) nachweisen. Und auch in der gesunden Bevölkerung beträgt die Gesamtprävalenz der Thrombophilie immerhin etwa 10%, was ihre große Bedeutung bezüglich Morbidität und Mortalität innerhalb einer Population verdeutlicht. Trotzdem ist ihre klinische Penetranz alles andere als einheitlich. Die Spannweite reicht von subklinisch verlaufenden leichten Thrombosen bis zur lebensbedrohlichen Lungenembolie, tritt unprovokiert oder in Assoziation mit begleitenden Risikofaktoren auf und manifestiert sich bei jungen Patienten oder erst im fortgeschrittenen Alter. Aus diesen Gründen können sowohl für Screeninguntersuchungen, als auch für die Prophylaxe und Therapie betroffener Individuen keine einheitlichen Maßstäbe geltend gemacht werden. Im „Chaos der Thrombophilie“ könnte in Zukunft der Genotyp des Patienten bezüglich einzelner Gerinnungsstörungen eine Entscheidungshilfe sein.

Mit unseren Untersuchungen konnten wir Faktor XI als einen von der Faktor V Leiden-Mutation abhängigen, in seiner Ausprägung eher milden klinischen Risikofaktor der venösen Thrombose identifizieren. Diese klinische Beobachtung steht in Einklang mit der von uns beschriebenen Wirkung von Faktor XI nur auf die Thrombingenerierung, ohne einen gleichzeitigen hemmenden Einfluss auf die Fibrinolyse.

Da wir andererseits die thrombogene Wirkung singular erhöhter Faktor XI-Spiegel als gering einschätzen, wäre es sicherlich wenig erfolgversprechend, Patienten mit einer kryptogenen Thrombose (d.h. es ließ sich als Ursache der Thrombose keiner der bekannten Risikofaktoren identifizieren) auf ihre Faktor XI-Spiegel hin zu untersuchen, bzw. gegebenenfalls erhöhte Spiegel für die Thrombose allein verantwortlich zu machen. Vor dem Hintergrund des oben zitierten Konzepts der multikausalen Thrombogenese wäre es aber andererseits auch nicht sinnvoll, sich bei der Ursachensuche nach

stattgehabtem thrombotischen Ereignis mit der Identifizierung *eines* bekannten Risikofaktors (etwa einer Faktor V Leiden-Mutation) zufriedenzugeben und diesen als alleinigen Verursacher anzusehen. Hier wäre es sicherlich angezeigt, auch weitere mögliche Faktoren abzuklären und in die Suche gegebenenfalls auch einmal die Faktor XI-Spiegel des Patienten mit einzubeziehen.

Im Hinblick auf etwaige medikamentös-therapeutische Konsequenzen ließen sich die folgenden Schlussfolgerungen ableiten: Da bezogen auf Faktor XI die Einzelfaktorerhöhung unserer Ansicht nach klinisch wenig zur Thrombogenese beiträgt, ist der Benefit einer von der Norm abweichenden / zusätzlichen medikamentösen Prophylaxe bei diesen Patienten fraglich. Dagegen offenbart ein erhöhter Faktor XI bei zugrundeliegender Thrombophilie sein thrombose-förderndes Potential eher durch Aktivierung prokoagulatorischer Kräfte, als durch Hemmung fibrinolytischer Wege. Dies sollte bei der Prophylaxe und Therapie berücksichtigt werden. Weiterführende Studien müssen allerdings noch zeigen, ob eventuell Patienten mit kombinierten Gerinnungsstörungen von einer ihrem gesteigerten Risiko speziell angepassten und gegebenenfalls höher als üblich dosierten Antikoagulation gabe profitieren.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Faktor XI, ein Protein innerhalb des intrinsischen Gerinnungswegs, spielt für den normalen Ablauf der Hämostase eine wichtige Rolle. So zeigen Patienten mit schwerem Faktor XI-Mangel ein variables Spektrum an Blutungsstörungen, wohingegen erhöhte Faktor XI-Spiegel mit einem auf das Doppelte gesteigerten Thromboserisiko assoziiert sein sollen. Über welchen Mechanismus hohe Faktor XI-Spiegel dabei thrombogen wirken ist noch weitestgehend unklar. Denkbar wäre eine Faktor XI-abhängige und evtl. über Gebühr gesteigerte Thrombingenerierung. Diese Assoziation konnte in-vitro bereits nachgewiesen werden und hat zur Hypothese des revised model of coagulation geführt. Nach dieser Vorstellung ist Faktor XI innerhalb des intrinsischen Systems verantwortlich für eine anhaltende Thrombinbildung, in deren Folge es via TAFI-Aktivierung letztlich zur Hemmung der Fibrinolyse kommt. Vergleichbare Zusammenhänge könnten auch für die in-vivo-Situation gewisse Gültigkeit besitzen.

Andererseits ist eine gesteigerte Thrombingenerierung ein Merkmal von Patienten mit thrombophilen Störungen, wie etwa einer Faktor V Leiden-Mutation. Allerdings zeigen bei weitem nicht alle dieser Patienten eine Hyperkoagulabilität und nur ein Bruchteil davon wird jemals durch Thrombosen auffällig. Entsprechend den Vorstellungen einer multifaktoriellen Thrombogenese war es daher unsere Vermutung, dass erhöhte Faktor XI-Spiegel bei bereits bestehender thrombophiler Gerinnungsstörung die Thrombinbildung zusätzlich triggern könnten und so das Risiko der Thromboseentstehung bei diesen Patienten weiter steigern. Wir konzentrierten uns dabei auf Träger der Faktor V Leiden-Mutation, der wohl häufigsten Ursache der hereditären Thrombophilie.

Für unsere Untersuchungen stand uns das Plasma von 690 Thrombosepatienten zur Verfügung. Aus diesem Gesamtkollektiv wurden jene Patienten ausgewählt, die entweder Träger einer Faktor V Leiden-Mutation waren, oder aber keinen der bisher bekannten Gerinnungsdefekte aufwiesen.

Jedem Patienten stand ein nach Alter und Geschlecht passender gesunder Blutspender als Kontrolle gegenüber. Sehr großen Wert legten wir dabei auf die Selektionierung der Patienten und die Zusammenstellung unserer Kollektive, unter Ausschluß sämtlicher bekannter Einflussfaktoren. Die laborchemischen Bestimmungen von TAFIa/ai führten wir mit einem speziell entwickelten und von uns leicht modifizierten Sandwich-ELISA durch. Dieser Test misst gleichzeitig die Gesamtkonzentration der aktivierten und inaktivierten Form von TAFI. Dagegen wäre die alleinige Bestimmung von TAFIa aufgrund seiner kurzen HWZ von nur geringer Aussagekraft. Für alle übrigen Analysen griffen wir auf Routine-Assays zurück.

Mit unseren Ergebnissen konnten wir nun entgegen früherer Studien zeigen, dass ein erhöhter Faktor XI-Spiegel keinen eigenständigen Risikofaktor für die venöse Thromboembolie darstellt. Seine thrombogene Wirkung erhält Faktor XI erst im Zusammenwirken mit einer zugrunde liegenden Faktor V Leiden-Mutation. Bei diesen Patienten scheint das mit hohen Faktor XI-Spiegeln assoziierte Thromboserisiko in einer beschleunigten Thrombinbildung begründet zu sein. Vermutlich wirken hier eine gestörte Hemmung der Gerinnungskaskade bei defektem APC-Weg und ein zusätzlicher Faktor XI-abhängiger prokoagulatorischer Effekt gleichsinnig zusammen. Dagegen ist das isolierte Auftreten erhöhter Faktor XI-Spiegel ohne Einfluss auf die Thrombingenerierung oder das Thromboserisiko. Unsere Ergebnisse bekräftigen damit erneut die Hypothese einer multikausalen Thrombogenese und stellen gleichzeitig die Wertigkeit einer Einzelfaktorerhöhung als alleinigen Defekt in Frage.

Folgt man dem revised model of coagulation, so scheint die Hauptaufgabe von Faktor XI weniger in der Initiierung der Gerinnung, als vielmehr in deren Aufrechterhaltung sowie in der Fibrinolysehemmung zu liegen. Diese Faktor XI-abhängigen Blockade der Fibrinolyse wurde in der Vergangenheit für das thrombogene Potential von Faktor XI mitverantwortlich gemacht. Auch diesem Sachverhalt gingen wir mit unserer Arbeit nach und untersuchten unsere Faktor V Leiden-Träger auf den Zusammenhang zwischen den Faktor XI-Spiegeln und Markern der Fibrinolyseaktivität (TAFIa/ai).



Verglichen mit gesunden Blutspendern zeigten die Faktor V Leiden-positiven Thrombosepatienten signifikant höhere TAFI<sub>a</sub>/ai-Werte. Wir glauben, dass dies Ausdruck der bei Thrombosepatienten allgemein erhöhten TAFI-Antigenspiegel ist. Ein entsprechend des revised model of coagulation geforderter direkter Zusammenhang zwischen der Höhe der Faktor XI-Spiegel bzw. dem Grad der Thrombinbildung und den TAFI<sub>a</sub>/ai-Werten ließ sich klinisch nicht nachweisen. Auch wenn wir den Einfluss von TM auf die TAFI-Aktivierung nicht direkt untersucht haben, so deuten doch viele Literaturbefunde darauf hin, dass TM in diesem Zusammenhang die Hauptrolle spielt. Neben einer thrombin-TM-vermittelten TAFI-Aktivierung und damit verbundenen Fibrinolysehemmung, stellt TM auch eine wichtige Komponente bei der Protein-C-Aktivierung dar. Obwohl die Aktivierung von TAFI und APC im Plasma gleichzeitig ablaufen, bestimmt letztlich die systemische TM-Konzentration, welcher Effekt insgesamt überwiegt. In der Summe lässt sich durch den starken und gleichzeitig sehr variablen Einfluss von TM ein Zusammenhang zwischen Faktor XI und dem fibrinolytischen System in-vivo nicht nachvollziehen. Wir können daher die Hypothese des revised model of coagulation in Bezug auf eine Faktor XI-bedingte Regulation der Fibrinolyse hier nicht bestätigen.

Wir konnten Faktor XI als einen von der Faktor V Leiden-Mutation abhängigen, in seiner Ausprägung moderaten Risikofaktor der Thrombose identifizieren. Dies steht in Einklang mit unseren Ergebnissen: Faktor XI nimmt bei diesen Patienten Einfluss auf die Thrombingenerierung, darüber hinaus jedoch nicht auf das fibrinolytische System.

## 6 LITERATURVERZEICHNIS

**Anderson FA Jr**, Wheeler HB, Goldberg RJ, Hosmer DW, Patwardhan NA, Jovanovic B, Forcier A, Dalen JE  
*A population-based perspective of the hospital incidence and case-fatality rates of deep vein thrombosis and pulmonary embolism. The Worcester DVT Study.*  
Arch Intern Med. 1991 May;151(5):933-8.

**Andrew M**, David M, Adams M, Ali K, Anderson R, Barnard D, Bernstein M, Brisson L, Cairney B, DeSai D, et al.  
*Venous thromboembolic complications (VTE) in children: first analyses of the Canadian Registry of VTE.*  
Blood. 1994 Mar 1;83(5):1251-7.

**Asakai R**, Chung DW, Davie EW, Seligsohn U  
*Factor XI deficiency in Ashkenazi Jews in Israel.*  
N Engl J Med. 1991 Jul 18;325(3):153-8.

**Asakai R**, Dawie EW, Chung DW  
*Organization of the gene for human factor XI.*  
Biochemistry. 1987 Nov 17;26(23):7221-8.

**Astrup T**  
*The hemostatic balance.*  
Thromb Diath Haemorrh. 1958;2:347-57.

**Baglia FA**, Walsh PN  
*Prothrombin is a cofactor for the binding of factor XI to the platelet surface and for platelet-mediated factor XI activation by thrombin.*  
Biochemistry. 1998 Feb 24;37(8):2271-81.

**Baglia FA, Walsh PN**

*Thrombin-mediated feedback activation of factor XI on the activated platelet surface is preferred over contact activation by factor XIIIa or factor XIa.*

J Biol Chem. 2000 Jul 7;275(27):20514-9.

**Bajaj MS, Kuppuswamy MN, Manepalli AN, Bajaj SP.**

*Transcriptional expression of tissue factor pathway inhibitor, thrombomodulin and von Willebrand factor in normal human tissue.*

Thromb Haemost 1999; 82: 1047-52.

**Bajzar L, Manuel R, Nesheim ME**

*Purification and characterization of TAFI, a thrombin-activable fibrinolysis inhibitor.*

J Biol Chem. 1995 Jun 16;270(24):14477-84.

**Bajzar L, Morser J, Nesheim M**

*TAFI, or plasma procarboxypeptidase B, couples the coagulation and fibrinolytic cascades through the thrombin-thrombomodulin complex.*

J Biol Chem. 1996 Jul 12;271(28):16603-8.

**Bajzar L, Nesheim M**

*The effect of activated protein C on fibrinolysis in cell-free plasma can be attributed specifically to attenuation of prothrombin activation.*

J Biol Chem. 1993 Apr 25;268(12):8608-16.

**Bauer KA**

*Hypercoagulability--a new cofactor in the protein C anticoagulant pathway.*

N Engl J Med. 1994 Feb 24;330(8):566-7.

**Bauer KA**

*New markers for in vivo coagulation.*

Curr Opin Hematol. 1994 Sep;1(5):341-6. Review.

**Bauer KA**

Management of patients with hereditary defects predisposing to thrombosis including pregnant women.

*Thromb Haemost.* 1995 Jul;74(1):94-100. Review.

**Bauer KA**, Brokemans AW, Bertina RM, Conrad J, Horellou MH, Samama MM, Rosenberg RD

*Hemostatic enzyme generation in the blood of patients with hereditary protein C deficiency.*

*Blood.* 1988 May;71(5):1418-26.

**Bauer KA**, Rosenberg RD

*The pathophysiology of the prethrombotic state in humans: insights gained from studies using markers of hemostatic system activation.*

*Blood.* 1987 Aug;70(2):343-50.

**Bergquist D**

*Frequency of thromboembolic complications.*

*In: Bergquist D, ed. Postoperative Thromboembolism.*

Berlin, Springer-Verlag, 1983:12-13.

**Berliner S**, Horowitz I, Martinowitz U, Brenner B, Seligsohn U

*Dental surgery in patients with severe factor XI deficiency without plasma replacement.*

*Blood Coagul Fibrinolysis.* 1992 Aug;3(4):465-8.

**Bertina RM**, Koeleman BP, Koster T, Rosendaal FR, Dirven RJ, de Ronde H, van der Velden PA, Reitsma PH

*Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C.*

*Nature.* 1994 May 5;369(6475):64-7.

**Bick RL**

*Coagulation abnormalities in malignancy: a review.*

Semin Thromb Hemost. 1992;18(4):353-72. Review.

**Blomenkamp KW, Rosendaal FR, Helmerhorst FM, Buller HR, Vandenbroucke JP**

*Enhancement by factor V Leiden mutation of risk of deep-vein thrombosis associated with oral contraceptives containing a third-generation progestagen.*

Lancet. 1995 Dec 16;346(8990):1593-6.

**Blomenkamp KW, Rosendaal FR, Helmerhorst FM, Koster T, Bertina RM,**

Vandenbroucke JP

*Hemostatic effects of oral contraceptives in women who developed deep-vein thrombosis while using oral contraceptives.*

Thromb Haemost. 1998 Sep;80(3):382-7.

**Boffa MB, Bell R, Stevens WK, Nesheim ME**

*Roles of thermal instability and proteolytic cleavage in regulation of activated thrombin-activable fibrinolysis inhibitor.*

J Biol Chem. 2000 Apr 28;275(17):12868-78.

**Boffa MB, Wang W, Bajzar L, Nesheim ME**

*Plasma and recombinant thrombin-activable fibrinolysis inhibitor (TAFI) and activated TAFI compared with respect to glycosylation, thrombin/thrombomodulin-dependent activation, thermal stability, and enzymatic properties.*

J Biol Chem. 1998 Jan 23;273(4):2127-35.

**Bokarewa MI, Bremme K, Blombäck M**

*Arg506-Gln mutation in factor V and risk of thrombosis during pregnancy.*

Br J Haematol. 1996 Feb;92(2):473-8.

**Boneu B**, Bes G, Pelzer H, Sie P, Boccalon H

*D-Dimers, thrombin antithrombin III complexes and prothrombin fragments 1+2: diagnostic value in clinically suspected deep vein thrombosis.*

Thromb Haemost. 1991 Jan 23;65(1):28-31.

**Bouma BN**

*Human blood coagulation factor XI. Purification, properties, and mechanism of activation by activated factor XII.*

J Biol Chem. 1977 Sep 25;252(18):6432-7.

**Bouma BN**, Meijers JC

*Fibrinolysis and the contact system: a role for factor XI in the down-regulation of fibrinolysis.*

Thromb Haemost. 1999 Aug;82(2):243-50. Review.

**Bouma BN**, Mosnier LO, Meijers JC, Griffin JH

*Factor XI dependent and independent activation of thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) in plasma associated with clot formation.*

Thromb Haemost. 1999 Dec;82(6):1703-8.

**Bouma BN**, Vlooswijk RA, Griffin JH

*Immunologic studies of human coagulation factor XI and its complex with high molecular weight kininogen.*

Blood. 1983 Nov;62(5):1123-31.

**Bouma BN**, von dem Borne PA, Meijers JC

*Factor XI and protection of the fibrin clot against lysis--a role for the intrinsic pathway of coagulation in fibrinolysis.*

Thromb Haemost. 1998 Jul;80(1):24-7. Review.

**Branch DW**, Scott JR, Kochenour NK, Hershgold E

*Obstetric complications associated with the lupus anticoagulant.*

N Engl J Med. 1985 Nov 21;313(21):1322-6.

**Brandjes DP**, Buller HR, Heijboer H, Huisman MV, de Rijk M, Jagt H, ten Cate JW

*Randomised trial of effect of compression stockings in patients with symptomatic proximal-vein thrombosis.*

Lancet. 1997 Mar 15;349(9054):759-62.

**Broekmans AW**, Van der Linden IK, Veltkamp JJ, Bertina RM

Prevalence of isolated protein C deficiency in patients with venous thrombotic disease and in the population.

Thromb Haemost 1983; 50:350-50.

**Broze GJ**, Girard TJ, Novotny WF

*Regulation of coagulation by a multivalent Kunitz-type inhibitor.*

Biochemistry. 1990 Aug 21;29(33):7539-46. Review.

**Busch C**, Cancilla PA, DeBault LE, Goldsmith JC, Owen WG.

*Use of endothelium cultured on microcarriers as a model for the microcirculation.*

Lab Invest. 1982; 47:498-504.

**Butenas S**, Dee JD, Mann KG

*The function of factor XI in tissue factor-initiated thrombin generation.*

J Thromb Haemost. 2003 Oct;1(10):2103-11.

**Butenas S**, van't Veer C, Mann KG

*"Normal" thrombin generation.*

Blood. 1999 Oct 1;94(7):2169-78.

**Chetaille P**, Alessi MC, Kouassi D, Morange PE, Juhan-Vague I

*Plasma TAFI antigen variations in healthy subjects.*

Thromb Haemost. 2000 Jun;83(6):902-5.

**Christensen U**

*C-terminal lysine residues of fibrinogen fragments essential for binding to plasminogen.*

FEBS Lett. 1985 Mar 11;182(1):43-6.

**Cohen SH**, Ehrlich GE, Kauffman MS, Cope C

*Thrombophlebitis following knee surgery.*

J Bone Joint Surg Am. 1973 Jan;55(1):106-12.

**Comp PC**, Esmon CT

*Recurrent venous thromboembolism in patients with a partial deficiency of protein S.*

N Engl J Med. 1984 Dec 13;311(24):1525-8.

**Cruickshank JM**, Gorlin R, Jannett B

*Air travel and thrombotic episodes: the economy class syndrome.*

Lancet. 1988 Aug 27;2(8609):497-8.

**Dahlbäck B**

*New molecular insights into the genetics of thrombophilia. Resistance to activated protein C caused by Arg506 to Gln mutation in factor V as a pathogenic risk factor for venous thrombosis.*

Thromb Haemost. 1995 Jul;74(1):139-48. Review.

**Dahlbäck B**

*Resistance to activated protein C caused by the R506Q mutation in the gene for factor V is a common risk factor for venous thrombosis.*

J Intern Med Suppl. 1997;740:1-8. Review.



**Dahlbäck B**, Carlsson M, Svensson PJ

*Familial thrombophilia due to a previously unrecognized mechanism characterized by poor anticoagulant response to activated protein C: prediction of a cofactor to activated protein C.*

Proc Natl Acad Sci U S A. 1993 Feb 1;90(3):1004-8.

**Dai L**, Mitchell M, Savidge G, Alhaq A.

*The profibrinolytic effect of plasma thrombomodulin in factor XI deficiency and its implications in hemostasis.*

J Thromb Haemost 2004; 2: 2200-4.

**Daly E**, Vessey MP, Hawkins MM, Carson JL, Gough P, Marsh S

*Risk of venous thromboembolism in users of hormone replacement therapy.*

Lancet. 1996 Oct 12;348(9033):977-80.

**Davie EW**, Ratnoff OD

*Waterfall sequence for intrinsic blood clotting.*

Science. 1964 Sep 18;145:1310-2.

**Deguchi K**, Izumi K, Noguchi M, Yuwasaki E, Suzuki H, Mori Y, Deguchi A, Ohkubo I, Tsuda M, Wada H, et. al.

*Coagulation and fibrinolysis in patients with chronic renal failure on maintenance hemodialysis.*

Nippon Ketsueki Gakkai Zasshi. 1989 Feb;52(1):140-6.

**De Maat MP**, Kluit C, Jespersen J, Gram J

*World distribution of factor V Leiden mutation.*

Lancet. 1996 Jan 6;347(8993):58.

**Den Heijer M**, Koster T, Blom HJ, Bos GM, Briet E, Reitsma PH, Vandenbroucke JP, Rosendaal FR

*Hyperhomocysteinemia as a risk factor for deep-vein thrombosis.*

N Engl J Med. 1996 Mar 21;334(12):759-62.

**Den Heijer M**, Rosendaal FR, Blom HJ, Gerrits WB, Bos GM

*Hyperhomocysteinemia and venous thrombosis: a meta-analysis.*  
Thromb Haemost. 1998 Dec;80(6):874-7.

**Dittman WA**, Majerus PW

*Structure and function of thrombomodulin: a natural anticoagulant.*  
Blood. 1990 Jan 15;75(2):329-36. Review.

**Donati BM**

*Cancer and thrombosis: from Phlegmasia alba dolens to transgenic mice.*  
Thromb Haemost. 1995 Jul;74(1):278-81. Review.

**Eaton DL**, Malloy BE, Tsai SP, Henzel W, Drayna D

*Isolation, molecular cloning, and partial characterization of a novel carboxypeptidase B from human plasma.*  
J Biol Chem. 1991 Nov 15;266(32):21833-8.

**Egeberg O**

*On the natural blood coagulation inhibitor system. Investigations of inhibitor factors based on antithrombin deficient blood.*  
Thromb Diath Haemorrh. 1965 Nov 15;14(3-4):473-89.

**Ellis MH**, Kesler A, Friedman Z, Drucjer I, Radnai Y, Kott E

*Value of prothrombin fragment 1+2 (F 1+2) in the diagnosis of stroke in young patients with antiphospholipid antibodies.*  
Clin Appl Thromb Hemost. 2000 Apr;6(2):61-4.

**Engbersen AM**, Franken DG, Boers GH, Stevens EM, Trijbels FJ, Blom HJ

*Thermolabile 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase as a cause of mild hyperhomocysteinemia.*  
Am J Hum Genet. 1995 Jan;56(1):142-50.

**Engesser L**, Brokemans AW, Briet E, Brommer EJ, Bertina RM

*Hereditary protein S deficiency: clinical manifestations.*

Ann Intern Med. 1987 May;106(5):677-82.

**Esmon CT**, Fukudome K

*Cellular regulation of the protein C pathway.*

Semin Cell Biol. 1995 Oct;6(5):259-68. Review.

**Esmon CT**

*The roles of protein C and thrombomodulin in regulation of blood coagulation.*

J Biol Chem. 1989; 264:4743-6.

**Falcon CR**, Cattaneo M, Panzeri D, Martinelli I, Mannucci PM

*High prevalence of hyperhomocyst(e)inemia in patients with juvenile venous thrombosis.*

Arterioscler Thromb. 1994 Jul;14(7):1080-3.

**Fermo I**, Vigano' D'Angelo S, Paroni R, Mazzola G, Calori G, D'Angelo A

*Prevalence of moderate hyperhomocysteinemia in patients with early-onset venous and arterial occlusive disease.*

Ann Intern Med. 1995 Nov 15;123(10):747-53.

**Fernandez J**, Petäjä J, Gruber A, Griffin J

*Activated Protein C correlates inversely with thrombin levels in resting healthy individuals.*

Am J Hemat. 1997; 56:29-31.

**Ferro D**, Quintarelli C, Valesini G, Violi F

*Lupus anticoagulant and increased thrombin generation in patients with systemic lupus erythematosus.*

Blood. 1994 Jan 1;83(1):304.

**Fleury V**, Angles-Cano E

*Characterization of the binding of plasminogen to fibrin surfaces: the role of carboxy-terminal lysines.*

Biochemistry. 1991 Jul 30;30(30):7630-8.

**Fujikawa K**, Chung DW, Hendrickson LE, Davie EW

*Amino acid sequence of human factor XI, a blood coagulation factor with four tandem repeats that are highly homologous with plasma prekallikrein.*

Biochemistry. 1986 May 6;25(9):2417-24.

**Franco RF**, Araujo AG, Guerreiro JF, Elion J, Zago MA

*Analysis of the 677 C-->T mutation of the methylenetetrahydrofolate reductase gene in different ethnic groups.*

Thromb Haemost. 1998 Jan;79(1):119-21.

**Gailani D**, Broze GJ Jr.

*Factor XI activation in a revised model of blood coagulation.*

Science. 1991 Aug 23;253(5022):909-12.

**Geerts WH**, Code KI, Jay RM, Chen E, Szalai JP

*A prospective study of venous thromboembolism after major trauma.*

N Engl J Med. 1994 Dec 15;331(24):1601-6.

**Gerhardt A**, Scharf RE, Zotz RB

*Effect of hemostatic risk factors on the individual probability of thrombosis during pregnancy and the puerperium.*

Thromb Haemost. 2003 Jul;90(1):77-85.

**Gerstman BB**, Piper JM, Tomita DK, Ferguson WJ, Stadel BV, Lundin FE

*Oral contraceptive estrogen dose and the risk of deep venous thromboembolic disease.*

Am J Epidemiol. 1991 Jan; 133:32-37.

**Gibbs NW**

*Venous thromboembolism of the lower limbs with particular reference to bed-rest.*

Br J Surg. 1957;45:209-35.

**Ginsberg JS**, Wells PS, Brill-Edwards P, Donovan D, Moffatt K, Johnston M, Stevens P, Hirsh J

*Antiphospholipid antibodies and venous thromboembolism.*

Blood. 1995;86:3685-91.

**Glassman AB**, Jones E

*Thrombosis and coagulation abnormalities associated with cancer.*

Ann Clin Lab Sci. 1994 Jan-Feb ;24(1):1-5.

**Goldhaber SZ**

*Epidemiology of pulmonary embolism and deep vein thrombosis.*

Haemost Thromb (ed. Bloom AL, Forbes CD, Thomas DP, Tuddenham EGD)

p.1357 Churchill Livingstone, Edinburgh.

**Goodrich SM**, Wood JE

*Peripheral venous distensibility and velocity of venous blood flow during pregnancy or during oral contraceptive therapy.*

Am J Obstet Gynecol. 1964;90:740-744.

**Gou D**, Naipal A, Reitsma PH

*World distribution of factor V Leiden mutation.*

Lancet. 1996 Jan 6;347(8993):59.

**Gouin-Thibault I**, Arkam R, Nassiri S, de la Tourette A, Conrad J, Horellou MH, Elalamy I, Samama MM

*Markers of activated coagulation in patients with factor V Leiden and/or G20210A prothrombin gene mutation.*

Thromb Res. 2002 Jul 15;107(1-2):7-11.

**Gouin-Thibault I**, Samama MM

*Laboratory diagnosis of the thrombophilic state in cancer patients.*  
Semin Thromb Hemost. 1999;25(2):167-72. Review.

**Grady D**, Hulley SB, Furberg C

*Venous thromboembolic events associated with hormone replacement therapy.*  
JAMA. 1997 Aug 13;278(6):477.

**Griffin JH**, Cochrane CG

*Mechanisms for the involvement of high molecular weight kininogen in surface-dependent reactions of Hageman factor.*  
Proc Natl Acad Sci U S A. 1976 Aug;73(8):2554-8.

**Griffin JH**, Evatt B, Wideman C, Fernandez JA

Anticoagulant protein C pathway defective in majority of thrombophilic patients.  
Blood. 1993 Oct 1;82(7):1989-93.

**Griffin JH**, Evatt B, Zimmerman TS, Kleiss AJ, Wideman C

*Deficiency of protein C in congenital thrombotic disease.*  
J Clin Invest. 1981 Nov;68(5):1370-3.

**Grodstein F**, Stampfer MJ, Goldhaber SZ, Manson JE, Colditz GA, Speizer FE, Willett WC, Hennekens CH.

*Prospective study of exogenous hormones and risk of pulmonary embolism in women.*  
Lancet. 1996 Oct 12;348(9033):983-7.

**Henry M**, Aubert H, Morange PE, Nanni I, Alessi MC, Tiret L, Juhan-Vague I  
*Identification of polymorphisms in the promoter and the 3' region of the TAFI gene: evidence that plasma TAFI antigen levels are strongly genetically controlled.*  
Blood. 2001 Apr 1;97(7):2053-8.

**Hellgren M**, Svennson PJ, Dahlbäck B  
*Resistance to activated protein C as a basis for venous thromboembolism associated with pregnancy and oral contraceptives.*  
Am J Obstet Gynecol. 1995 Jul;173(1):210-3.

**Hirsch DR**, Mikkola KM, Marks PW, Fox FA, Dorfman DM, Ewenstein BM, Goldhaber SZ  
*Pulmonary embolism and deep venous thrombosis during pregnancy or oral contraceptive use: prevalence of factor V Leiden.*  
Am Heart J. 1996 Jun;131(6):1145-8.

**Hjelmstedt A**, Bergvall U  
*Incidence of thrombosis in patients with tibial fractures.*  
Acta Chir Scand. 1968;134(3):209-18.

**Hull RD**, Raskop GE  
*Prophylaxis of venous thromboembolic disease following hip and knee surgery.*  
J Bone Joint Surg Am. 1986 Jan;68(1):146-50.

**Ishii H**, Majerus PW  
*Thrombomodulin is present in human plasma and urine.*  
J Clin Invest 1985 Dec; 76(6):2178-81.

**Ishii H**, Salem HH, Bell CE, Laposata EA, Majerus PW.

*Thrombomodulin, an endothelial anticoagulant protein, is absent from the human brain.*

Blood 1986;67:362-5.

**Jick H**, Derby LE, Myers MW, Vasilakis C, Newton KM

*Risk of hospital admission for idiopathic venous thromboembolism among users of postmenopausal oestrogens.*

Lancet. 1996 Oct 12;348(9033):981-3.

**Kaplan AP**, Silverberg M

*The coagulation-kinin pathway of human plasma.*

Blood. 1987 Jul;70(1):1-15.

**Kato A**, Asakai R, Davie EW, Aoki N

*Factor XI gene (F11) is located on the distal end of the long arm of human chromosome 4.*

Cytogenet Cell Genet. 1989;52(1-2):77-8.

**Kierkegaard A**

*Incidence and diagnosis of deep vein thrombosis associated with pregnancy.*

Acta Obstet Gynecol Scand. 1983;62(3):239-43.

**Kisiel W**, Canfield WM, Ericsson LW, Davie EW

*Anticoagulant properties of bovine plasma protein C following activation by thrombin.*

Biochemistry. 1977 Dec 27;16(26):5824-31.

**Klement P**, Liao P, Bajzar L

*A novel approach to arterial thrombolysis.*

Blood. 1999 Oct 15;94(8):2735-43.



**Ko YL**, Hsu TS, Wu SM, Ko YS, Chang CJ, Wang SM, Chen WJ, Cheng NJ, Kuo CT, Chiang CW, Lee YS

*The G1691A mutation of the coagulation factor V gene (factor V Leiden) is rare in Chinese: an analysis of 618 individuals.*

Hum Genet. 1996 Aug;98(2):176-7.

**Koeleman BP**, Reitsma PH, Allaart CF, Bertina RM

*Activated protein C resistance as an additional risk factor for thrombosis in protein C-deficient families.*

Blood. 1994 Aug 15;84(4):1031-5.

**Koster T**, Rosendaal FR, Briet E, van der Meer FJ, Colly LP, Trienekens PH, Poort SR, Reitsma PH, Vandenbroucke JP

*Protein C deficiency in a controlled series of unselected outpatients: an infrequent but clear risk factor for venous thrombosis (Leiden Thrombophilia Study).*

Blood. 1995 May 15;85(10):2756-61.

**Koster T**, Rosendaal FR, de Ronde H, Briet V, Vandenbroucke JP, Bertina RM

*Venous thrombosis due to poor anticoagulant response to activated protein C: Leiden Thrombophilia Study.*

Lancet. 1993 Dec 18-25;342(8886-8887):1503-6.

**Kyrle PA**, Eichinger S

*The Risk of recurrent venous thromboembolism: the Austrian Study on Recurrent Venous Thromboembolism.*

Wien Klin Wochenschr. 2003 Aug 14;115(13-14):471-4.

**Kyrle PA**, Eichinger S, Pabinger I, Stumpflen A, Hirschl M, Bialonczyk C, Schneider B, Mannhalter C, Melichart M, Traxler G, Weltermann A, Speiser W, Lechner K  
*Prothrombin fragment F1+2 is not predictive for recurrent venous thromboembolism.*

Thromb Haemost. 1997 May;77(5):829-33.

**Leroy-Matheron C**, Levent M, Pignon JM, Mendonca C, Gouault-Heilmann M  
*The 1691 G-->A mutation in the factor V gene: relationship to activated protein C (APC) resistance and thrombosis in 65 patients.*  
Thromb Haemost. 1996 Jan;75(1):4-10.

**Libourel EJ**, Bank I, Meinardi JR, Balje-Volkers CP, Hamulyak K, Middeldorp S, Koopman MM, van Pampus EC, Prins MH, Buller HR, van der Meer J  
*Co-segregation of thrombophilic disorders in factor V Leiden carriers; the contributions of factor VIII, factor XI, thrombin activatable fibrinolysis inhibitor and lipoprotein(a) to the absolute risk of venous thromboembolism.*  
Haematologica. 2002 Oct;87(10):1068-73.

**Lins M**, Zurborn KH, Pries B, Bruhn HD  
*The thrombophilic status of patients with inflammatory diseases.*  
Dtsch Med Wochenschr. 1996 Jul 5;121(27):855-9.

**Lipscomb MS**, Walsh PN  
*Human platelets and factor XI. Localization in platelet membranes of factor XI-like activity and its functional distinction from plasma factor XI.*  
J Clin Invest. 1979 May;63(5):1006-14.

**Lopez Y**, Paloma MJ, Rifon J, Cuesta B, Paramo JA  
*Measurement of prethrombotic markers in the assessment of acquired hypercoagulable states.*  
Thromb Res. 1999 Jan 15;93(2):71-8.

**Macklon NS**, Greer IA, Bowman AW  
*An ultrasound study of gestational and postural changes in the deep venous system of the leg in pregnancy.*  
Br J Obstet Gynaecol. 1997 Feb;104(2):191-7.

**Mannucci PM**

*Mechanisms, markers and management of coagulation activation.*

Br Med Bull. 1994 Oct;50(4):851-70. Review.

**Mannucci PM**, Tripodi A, Bottasso B, Baudo F, Finazzi G, De Stefano V, Palareti G, Manotti C, Mazzucconi MG, Castaman G

*Markers of procoagulant imbalance in patients with inherited thrombophilic syndromes.*

Thromb Haemost. 1992 Feb 3;67(2):200-2.

**Mao SS**, Cooper CM, Wood T, Shafer JA, Gardell SJ

*Characterization of plasmin-mediated activation of plasma procarboxypeptidase B. Modulation by glycosaminoglycans.*

J Biol Chem. 1999 Dec 3;274(49):35046-52.

**Mari D**, Mannucci PM, Coppola R, Botasso B, Bauer KA, Rosenberg RD

*Hypercoagulability in centenarians: the paradox of successful aging.*

Blood. 1995 Jun 1;85(11):3144-9.

**Martinelli I**, Bottasso B, Duca F, Faioni E, Mannucci PM

*Heightened thrombin generation in individuals with resistance to activated protein C.*

Thromb Haemost. 1996 May;75(5):703-5.

**Marx PF**, Hackeng TM, Dawson PE, Griffin JH, Meijers JC, Bouma BN

*Inactivation of active thrombin-activable fibrinolysis inhibitor takes place by a process that involves conformational instability rather than proteolytic cleavage.*

J Biol Chem. 2000 Apr 28;275(17):12410-5.

**Mayo ME**, Halil T, Browse NL

*The incidence of deep vein thrombosis after prostatectomy.*

Br J Urol. 1971 Dec;43(6):738-42.

**McColl MD, Gibson BE**

*Risk factors for pregnancy associated venous thromboembolism.*

Thromb Haemost. 1997 Oct;78(4):1183-8.

**McMullen BA, Fujikawa K, Davie EW**

*Location of the disulfide bonds in human coagulation factor XI: the presence of tandem apple domains.*

Biochemistry. 1991 Feb 26;30(8):2056-60.

**Meijers JC, Tekelenburg WL, Bouma BN, Bertina RM, Rosendaal FR**

*High levels of coagulation factor XI as a risk factor for venous thrombosis.*

N Engl J Med. 2000 Mar 9;342(10):696-701.

**Miller GJ, Bauer KA, Barzegar S, Foley AJ, Mitchell JP, Cooper JA, Rosenber RD**

*The effects of quality and timing of venepuncture on markers of blood coagulation in healthy middle-aged men.*

Thromb Haemost. 1995 Jan;73(1):82-6.

**Minnema MC, Friederich PW, Levi M, von dem Borne PA, Mosnier LO, Meijers**

JC, Biemond BJ, Hack CE, Bouma BN, ten Cate H

*Enhancement of rabbit jugular vein thrombolysis by neutralization of factor XI.*

*In vivo evidence for a role of factor XI as an anti-fibrinolytic factor.*

J Clin Invest. 1998 Jan 1;101(1):10-4. Erratum in: J Clin Invest 1998 Feb 15;101(4):917.

**Minnema MC, Peters RJ, de Winter R, Lubbers YP, Barzegar S, Bauer KA,**

Rosenberg RD, Hack CE, ten Cate H

*Activation of clotting factors XI and IX in patients with acute myocardial infarction.*

Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2000 Nov;20(11):2489-93.

**Mosnier LO**, Meijers JC, Bouma BN

*Regulation of fibrinolysis in plasma by TAFI and protein C is dependent on the concentration of thrombomodulin.*

Thromb Haemost. 2001 Jan;85(1):5-11.

**Mosnier LO**, von dem Borne PA, Meijers JC, Bouma BN

*Plasma TAFI levels influence the clot lysis time in healthy individuals in the presence of an intact intrinsic pathway of coagulation.*

Thromb Haemost. 1998 Nov;80(5):829-35.

**Murakami T**, Komiyama Y, Masuda M, Karakawa M, Iwasaka T, Takahashi H

Evaluation of factor X<sub>II</sub>-alpha 1-antitrypsin in plasma, a contact phase-activated coagulation factor-inhibitor complex, in patients with coronary artery disease.

Arterioscler Thromb Vasc Biol. 1995 Aug;15(8):1107-13.

**Nagashima M**, Werner M, Wang M, Zhao L, Light DR, Pagila R, Morser J, Verhallen P.

*An inhibitor of activated thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor potentiates tissue-type plasminogen activator-induced thrombolysis in a rabbit jugular vein thrombolysis model.*

Thromb Res. 2000 May 15;98(4):333-42.

**Naito K**, Fujikawa K

Activation of human blood coagulation factor XI independent of factor XI.

J Biol Chem. 1991 Apr 25;266(12):7353-8.

**Nand S**, Messmore H

*Hemostasis in malignancy.*

Am J Hematol. 1990 Sep;35(1):45-55. Review.

**Nordstrom M**, Lindblad B, Bergqvist D, Kjellstrom T

*A prospective study of the incidence of deep-vein thrombosis within a defined urban population.*

J Intern Med. 1992 Aug;232(2):155-60.

**Nuss R, Hays T**, Manco-Johnson M

*Childhood thrombosis.*

Pediatrics. 1995 Aug;96(2 Pt 1):291-4.

**O'Donnel J**, Mumford AD, Manning RA, Laffan MA

*Marked elevation of thrombin generation in patients with elevated FVIII:C and venous thromboembolism.*

Br J Haematol. 2001 Dec;115(3):687-91.

**Osterud B**, Rapaport SI

*Activation of factor IX by the reaction product of tissue factor and factor VII: additional pathway for initiating blood coagulation.*

Proc Natl Acad Sci U S A. 1977 Dec;74(12):5260-4.

**Ozawa T**, Niiya K, Sakuragawa N

*Absence of factor V Leiden in the Japanese.*

Thromb Res. 1996 Mar 1;81(5):595-6.

**Pabinger I**, Kyrle PA, Heisteringer M, Eichinger S, Wittmann E, Lechner K

*Thrombotic risk of women with hereditary antithrombin III-, protein C- and protein S-deficiency taking oral contraceptive medication. The GTH Study Group on Natural Inhibitors.*

Thromb Haemost. 1994 May;71(5):548-52.

**Parker AC**, Mundada LV, Schmaier AH, Fay WP

*Factor V Leiden inhibits fibrinolysis in vivo.*

Circulation. 2004 Dec 7;110(23):3594-8.

**Patrassi GM**, Vettor R, Padovan D, Girolami A

*Contact phase of blood coagulation in diabetes mellitus.*

Eur J Clin Invest. 1982 Aug;12(4):307-11.

**Phillips LL**, Rosano L, Skrodellis V

*Changes in factor XI (plasma thromboplastin antecedent) levels during pregnancy.*

Am J Obstet Gynecol. 1973 Aug 15;116(8):1114-6.

**Poort SR**, Rosendaal FR, Reitsma PH, Bertina RM

*A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis.*

Blood. 1996 Nov 15;88(10):3698-703.

**Prasad RN**, Koh SC, Viegas OA, Ratnam SS

*Effects on hemostasis after two-year use of low dose combined oral contraceptives with gestodene or levonorgestrel.*

Clin Appl Thromb Hemost. 1999 Jan;5(1):60-70.

**Ratnoff OD**, Saito H

*Interactions among Hageman factor, plasma prekallikrein, high molecular weight kininogen, and plasma thromboplastin antecedent.*

Proc Natl Acad Sci U S A. 1979 Feb;76(2):958-61.

**Rees DC**, Cox M, Clegg JB

*World distribution of factor V Leiden.*

Lancet. 1995 Oct 28;346(8983):1133-4.

**Redlitz A**, Nicolini FA, Malycky JL, Topol EJ, Plow E

*Inducible carboxypeptidase activity. A role in clot lysis in vivo.*

Circulation. 1996 Apr 1;93(7):1328-30.

**Redlitz A**, Tan AK, Eaton DL, Plow EF

*Plasma carboxypeptidases as regulators of the plasminogen system.*  
J Clin Invest. 1995 Nov;96(5):2534-8.

**Refino CJ**, DeGunzman L, Schmitt D, Smyth R, Jeet S, Lipari MT, Eaton DL, Bunting S.

*Consequences of inhibition of plasma carboxypeptidase B on in vivo thrombolysis, thrombosis and hemostasis.*  
Fibrinolysis Proteolysis. 2000;14:305-14.

**Reverter JL**, Reverter JC, Tassies D, Rius F, Monteagudo J, Rubies-Prat J, Escolar G, Ordianas A, Sanmarti A

*Thrombomodulin and induced tissue factor expression on monocytes as markers of diabetic microangiopathy: a prospective study on hemostasis and lipoproteins in insulin-dependent diabetes mellitus.*  
Am J Hematol. 1997 Oct;56(2):93-9.

**Ridker PM**, Miletich JP, Stampfer MJ, Goldhaber SZ, Lindpaintner K, Hennekens CH

*Factor V Leiden and risks of recurrent idiopathic venous thromboembolism.*  
Circulation. 1995 Nov 15;92(10):2800-2.

**Rintelen C**, Mannhalter C, Ireland H, Lane DA, Knobl P, Lechner K, Pabinger I

*Oral contraceptives enhance the risk of clinical manifestation of venous thrombosis at a young age in females homozygous for factor V Leiden.*  
Br J Haematol. 1996 May;93(2):487-90.

**Roberts HR**, Monroe DM, Oliver JA, Chang JY, Hoffman M

*Newer concepts of blood coagulation.*  
Haemophilia. 1998 Jul;4(4):331-4.

**Rosendaal FR**

*Risk factors for venous thrombosis: prevalence, risk, and interaction.*  
Semin Hematol. 1997 Jul;34(3):171-87. Review.



**Rosendaal FR**, Doggen CJ, Zivelin A, Arruda VR, Aiach M, Siscovick DS, Hillarp A, Watzke HH, Bernardi F, Cumming AM, Preston FE, Reitsma PH  
*Geographic distribution of the 20210 G to A prothrombin variant.*  
Thromb Haemost. 1998 Apr;79(4):706-8.

**Rosendaal FR**, Koster T, Vandenbroucke JP, Reitsma PH  
*High risk of thrombosis in patients homozygous for factor V Leiden (activated protein C resistance).*  
Blood. 1995 Mar 15;85(6):1504-8.

**Santamaria A**, Borrell M, Oliver A, Ortin R, Forner R, Coll I, Mateo J, Souto JC, Fontcuberta J.  
*Association of functional thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) with conventional cardiovascular risk factors and its correlation with other hemostatic factors in a Spanish population.*  
Am J Hematol. 2004 Aug;76(4):348-52.

**Sartwell PE**, Masi AT, Arthes FG, Greene GR, Smith HE  
*Thromboembolism and oral contraceptives: an epidemiologic case-control study.*  
Am J Epidemiol. 1969 Nov;90(5):365-80.

**Schambeck CM**, Eberl E, Geisen U, Grossmann R, Keller F  
*The impact of dalteparin (Fragmin) on thrombin generation in pregnant women with venous thromboembolism: significance of the factor V Leiden mutation.*  
Thromb Haemost. 2001 May;85(5):782-6.

**Schatteman KA**, Goossens FJ, Scharpe SS, Hendriks DF  
*Proteolytic activation of purified human procarboxypeptidase U.*  
Clin Chim Acta. 2000 Feb 25;292(1-2):25-40.

**Schatteman KA**, Goossens FJ, Scharpe SS, Neels HM, Hendriks DF

*Assay of procarboxypeptidase U, a novel determinant of the fibrinolytic cascade, in human plasma.*

Clin Chem. 1999 Jun;45(6 Pt 1):807-13

**Schwarz HP**, Fischer M, Hopmeier P, Batard MA, Griffin JH

*Plasma protein S deficiency in familial thrombotic disease.*

Blood. 1984 Dec;64(6):1297-300.

**Scott CF**, Colman RW

*Fibrinogen blocks the autoactivation and thrombin-mediated activation of factor XI on dextran sulfate.*

Proc Natl Acad Sci U S A. 1992 Dec 1;89(23):11189-93.

**Silveira A**, Schatteman K, Goossens F, Moor E, Scharpe S, Stromquist M, Hendriks D, Hamsten A

*Plasma procarboxypeptidase U in men with symptomatic coronary artery disease.*

Thromb Haemost. 2000 Sep;84(3):364-8.

**Simioni P**, Pradoni P, Burlina A, Tormene D, Saardella C, Ferrari V, Benedetti L, Girolami A

*Hyperhomocysteinemia and deep-vein thrombosis. A case-control study.*

Thromb Haemost. 1996 Dec;76(6):883-6.

**Simmonds RE**, Ireland H, Lane DA, Zöller B, Garcia de Frutos P, Dahlbäck B

*Clarification of the risk for venous thrombosis associated with hereditary protein S deficiency by investigation of a large kindred with a characterized gene defect.*

Ann Intern Med. 1998 Jan 1;128(1):8-14.

**Spitzer WO**, Lewis MA, Heinemann LA, Thorogood M, MacRae KD

*Third generation oral contraceptives and risk of venous thromboembolic disorders: an international case-control study. Transnational Research Group on Oral Contraceptives and the Health of Young Women.*

BMJ. 1996 Jan 13;312(7023):83-8.

**Stadel BV**

*Oral contraceptives and cardiovascular disease (first of two parts).*

N Engl J Med. 1981 Sep 10;305(11):612-8. Review.

**Stadel BV**

*Oral contraceptives and cardiovascular disease (second of two parts).*

N Engl J Med. 1981 Sep 17;305(12):672-7. Review.

**Symington IS**

*Medical hazards of air travel.*

Br Med J. 1977 Oct 29;2(6095):1153.

**Tait RC**, Walker ID, Islam SI, Mitchell R, Conkie JA, McCall F, Davidson JF

*Age related changes in protein C activity in healthy adult males.*

Thromb Haemost. 1991 Mar 4;65(3):326-7.

**Tait RC**, Walker ID, Perry DJ, Islam SI, Daly ME, McCall F, Conkie JA, Carrell RW

*Prevalence of antithrombin deficiency in the healthy population.*

Br J Haematol. 1994 May;87(1):106-12.

**Tait RC**, Walker ID, Reitsma PH, Islam SI, McCall F, Poort SR, Conkie JA, Bertina RM

*Prevalence of protein C deficiency in the healthy population.*

Thromb Haemost. 1995 Jan;73(1):87-93.

**Treffers PE**, Huidekoper BL, Weenink GH, Kloosterman GJ

*Epidemiological observations of thrombo-embolic disease during pregnancy and in the puerperium in 56022 women.*

Int J Gynaecol Obstet. 1983 Aug;21(4):327-31

**Tregouet DA**, Aubert H, Henry M, Morange P, Visvikis S, Juhan-Vague I, Tired L.

*Combined segregation-linkage analysis of plasma thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) antigen levels with TAFI gene polymorphisms.*

Hum Genet. 2001 Aug;109(2):191-7.

**Trousseau A**

*Phlegmasia alba dolens.*

In: Anonymous Clinique Médicale de l'Hôtel-Dieu de Paris.

Paris: J.B. Ballière et fils. 1865:652-695.

**Ubbink JB**, van der Merwe A, Vermaak WJ, Delport R

*Hyperhomocysteinemia and the response to vitamin supplementation.*

Clin Investig. 1993 Dec;71(12):993-8.

**van Boven HH**, Reitsma PH, Rosendaal FR, Bayston TA, Chowdhury V, Bauer KA, Scharrer I, Conrad J, Lane DA

*Factor V Leiden (FV R506Q) in families with inherited antithrombin deficiency.*

Thromb Haemost. 1996 Mar;75(3):417-21.

**van Thiel DH**, George M, Fareed J

*Low levels of thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) in patients with chronic liver disease.*

Thromb Haemost. 2001 Apr;85(4):667-70.

**van Tilburg NH**, Rosendaal FR, Bertina RM

*Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor and the risk for deep vein thrombosis.*

Blood. 2000 May 1;95(9):2855-9.

**Vehar GA**, Davie EW

*Preparation and properties of bovine factor VIII (antihemophilic factor).*  
Biochemistry. 1980 Feb 5;19(3):401-10.

**Vehkavaara S**, Silveira A, Hakala-Ala-Pietila T, Virkamaki A, Hovatta O, Hamsten A,  
Taskinen MR, Yki-Jarvinen H

*Effects of oral and transdermal estrogen replacement therapy on markers of  
coagulation, fibrinolysis, inflammation and serum lipids and lipoproteins in  
postmenopausal women.*  
Thromb Haemost. 2001 Apr;85(4):619-25

**von dem Borne PA**, Bajzar L, Meijers JC, Nesheim ME, Bouma BN

*Thrombin-mediated activation of factor XI results in a thrombin-activatable  
fibrinolysis inhibitor-dependent inhibition of fibrinolysis.*  
J Clin Invest. 1997 May 15;99(10):2323-7.

**von dem Borne PA**, Meijers JC, Bouma BN

*Feedback activation of factor XI by thrombin in plasma results in additional  
formation of thrombin that protects fibrin clots from fibrinolysis.*  
Blood. 1995 Oct 15;86(8):3035-42.

**Walsh JJ**, Bonnar J, Wright FW

*A study of pulmonary embolism and deep leg vein thrombosis after major  
gynaecological surgery using labelled fibrinogen-phlebography and lung  
scanning.*  
J Obstet Gynaecol Br Commonw. 1974 Apr;81(4):311-6.

**Wang W**, Boffa MB, Bajzar L, Walker JB, Nesheim ME

*A study of the mechanism of inhibition of fibrinolysis by activated thrombin-  
activatable fibrinolysis inhibitor.*  
J Biol Chem. 1998 Oct 16;273(42):27176-81.

**Walker IR**, Milner RA, Johnston MA, Rand CA, Neame PB, Hirsh J

*Factors XI and XII are low in subjects with liver disease.*

Dig Dis Sci. 1983 Nov;28(11):967-70.

**Warlow C**, Ogston D, Douglas AS

*Deep venous thrombosis of the legs after strokes. Part 1-incidence and predisposing factors.*

Br Med J. 1976 May 15;1(6019):1178-81.

**Warlow C**, Ogston D, Douglas AS

*Deep venous thrombosis of the legs after strokes: Part 2-Natural history.*

Br Med J. 1976 May 15;1(6019):1181-3.

**World Health Organisation**

*Venous thromboembolic disease and combined oral contraceptives: results of international multicentre case-control study. World Health Organization Collaborative Study of Cardiovascular Disease and Steroid Hormone Contraception.*

Lancet. 1995;346:1575-1582.

**Yokoyama H**, Myrup B, Rossing P, Ostergaard PB

*Increased tissue factor pathway inhibitor activity in IDDM patients with nephropathy.*

Diabetes Care. 1996 May;19(5):441-5.

**Zöller B**, Berntsdotter A, Garcia de Frutos P, Dahlbäck B

*Resistance to activated protein C as an additional genetic risk factor in hereditary deficiency of protein S.*

Blood. 1995 Jun 15;85(12):3518-23.

**Zöller B**, Garcia de Frutos P, Hillarp A, Dahlbäck B

*Thrombophilia as a multigenic disease.*

Haematologica. 1999 Jan;84(1):59-70. Review.

**Zöller B**, Svensson P, Dahlbäck B

*Elevated levels of prothrombin activation fragment 1 + 2 in plasma from patients with heterozygous Arg506 to Gln mutation in the factor V gene (APC-resistance) and/or inherited protein S deficiency.*

Thromb Haemost. 1996 Feb;75(2):270-4.

## **Danksagung**

Die vorliegende Arbeit wurde in der Gerinnungsphysiologischen Ambulanz des Instituts für Klinische Biochemie und Pathobiochemie (Leiter: Prof. Dr. med. U. Walter) der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg erstellt.

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. med. U. Walter für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit, in seiner Abteilung arbeiten und lernen zu können.

Mein herzlichster Dank gilt meinem Betreuer, Herrn Priv.-Doz. Dr. med. C.M. Schambeck, der mich zu diesem Thema anregte und es verstand, mich immer wieder von neuem dafür zu begeistern. Durch seine intensive und kritische Betreuung blieb die Arbeit zu allen Zeiten spannend.

Ich danke den MTA's des Zentrallabors, insbesondere Frau Jutta Krause und Frau Kathleen Teuchert, für die Anleitung und hilfreiche Unterstützung bei der Durchführung der laborchemischen Tests.

Ich bedanke mich bei meinen Eltern, bei meiner Schwester Birgit und bei meiner Freundin Julia, die mich bei der Durchführung der Arbeit auf so vielfältige Weise unterstützten.

Mein aufrichtiger Dank gilt allen Patienten und Blutspendern, die sich freundlicherweise bereitklärten, ihre Blutproben für die Analysen dieser Arbeit zur Verfügung zu stellen.



## Lebenslauf

26. April 1977	geboren in Grimma / Sachsen
19. April 1984	Übersiedlung aus der ehemaligen DDR in die Bundesrepublik Deutschland
08/1984 - 07/1988	Besuch der Georg-August-Zinn-Grundschule Darmstadt
08/1988 - 06/1997	Besuch der Edith-Stein-Schule Darmstadt
06/1997	Abitur
07/1997 - 07/1998	Zivildienst im Kreiskrankenhaus Jugenheim
ab 11/1998	Studium der Humanmedizin an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg
09/2000	Ärztliche Vorprüfung
08/2001	Ärztliche Prüfung (Erster Abschnitt)
04/2004	Ärztliche Prüfung (Zweiter Abschnitt)
04/2005	Ärztliche Prüfung (Dritter Abschnitt)
04/2005	Approbation als Arzt
seit 07/2005	Beschäftigung als Assistenzarzt an der Klinik für Allgemeine-, Thorax- und Endokrine Chirurgie des Klinikums Nürnberg unter Leitung von Herrn Prof. Dr. med. C.-T. Germer