

**Aus dem Institut für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie
der Medizinischen Fakultät der Charité - Universitätsmedizin Berlin
Campus Virchow-Klinikum**

DISSERTATION

Entwicklung und Evaluation eines Fibrinolyse-Globaltestes "Fibrinolytische Kapazität"

**Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)**

**vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité -
Universitätsmedizin Berlin**

von

**Tobias R. Willich
aus Hamburg**

Dekane: Prof. Dr. Joachim W. Dudenhausen
Prof. Dr. Martin Paul

Gutachter: 1. Prof. Dr. Wolfgang Dubiel
2. Prof. Dr. I. Schimke
3. PD Dr. H. Bondke

Datum der Promotion: 25.11.2004

für Anni

INHALTSVERZEICHNIS

1.	Einleitung	10
1.1.	Blutgerinnung	10
1.2.	Fibrinolyse	12
1.3.	Thrombose	15
1.4.	Thrombosedagnostik	16
1.5.	Zielsetzung der Arbeit	17
2.	Material und Methode	18
2.1.	Materialien	18
2.1.1.	Material / Geräte / Reagenzien	18
2.1.2.	Lösungen	19
2.1.3.	Fertigreagenzien	20
2.2.	Probanden	23
2.2.1.	Patientenkollektive	23
2.2.1.1.	Thrombosen	23
2.2.1.2.	Schwangere	24
2.2.1.3.	Patienten unter oraler Antikoagulation	24
2.2.2.	Normalkollektiv	25
2.2.3.	Fehlerquellen	25
2.3.	Blutentnahme und Probenverarbeitung (thrombozytenarm / -reich)	26
2.3.1.	Durchführung	26
2.3.2.	Fehlerquellen	27
2.4.	Fibrinolytische Kapazität (basale FC <150, aktivierte FC <150)	27
2.4.1.	Prinzip	27
2.4.2.	Durchführung	28
2.4.3.	Auswertung	29
2.4.4.	Fehlerquellen	31
2.5.	Tests aus der Euglobulinfraktion (EF)	31
2.5.1.	Herstellung der Euglobulinfraktion (EF)	31
2.5.1.1.	Prinzip	31
2.5.1.2.	Durchführung	32
2.5.1.3.	Fehlerquellen	32
2.5.2.	Fibrinplatte (FP)	33

2.5.2.1.	Prinzip.....	33
2.5.2.2.	Durchführung.....	33
2.5.2.3.	Auswertung.....	33
2.5.2.4.	Fehlerquellen.....	34
2.6.	Plasminogenaktivatorinhibitor (PAI) Aktivität.....	35
2.6.1.	Prinzip.....	35
2.6.2.	Durchführung.....	36
2.6.3.	Auswertung.....	36
2.6.4.	Fehlerquellen.....	37
2.7.	Plasminogenaktivatorinhibitor 1 (PAI-1) Antigenkonzentration.....	37
2.7.1.	Prinzip.....	37
2.7.2.	Durchführung.....	38
2.7.3.	Auswertung.....	38
2.7.4.	Fehlerquellen.....	38
2.8.	Plasminogen (Plg).....	39
2.8.1.	Prinzip.....	39
2.8.2.	Durchführung.....	39
2.8.3.	Auswertung.....	40
2.8.4.	Fehlerquellen.....	40
2.9.	α_2 -Antiplasmin (α_2 -AP).....	40
2.9.1.	Prinzip.....	40
2.9.2.	Durchführung.....	41
2.9.3.	Auswertung.....	41
2.9.4.	Fehlerquellen.....	41
2.10.	D-Dimer.....	42
2.10.1.	Prinzip.....	42
2.10.2.	Durchführung.....	42
2.10.3.	Auswertung.....	43
2.10.4.	Fehlerquellen.....	43
2.11.	Thromboplastinzeit, aktivierte partielle Thromboplastinzeit, Fibrinogen, Antithrombin III, Faktor XII, ProC Global, Protein C und S, Akzelerin-Inaktivierung, APC-Resistenz, Faktor V-Leiden Genotypisierung.....	43
2.12.	Qualitätskontrollen.....	45
2.13.	Statistik.....	45

2.13.1.	Allgemeine Auswertungsmethoden	45
2.13.2.	Lineare Regressionsanalyse	47
2.13.2.1.	Lineare Abhängigkeit	47
2.13.2.2.	Methode der kleinsten Quadrate.....	47
2.13.2.3.	Bestimmtheitsmaß	48
2.13.2.4.	Varianzzerlegung und <i>F</i> -Test	49
2.13.2.5.	Modellannahmen	49
3.	Ergebnisse.....	51
3.1.	Beschreibung der Testeigenschaften der Fibrinolytischen Kapazität.....	51
3.1.1.	Kontaktphaseaktivierung der FC mit Dextransulfat.....	51
3.1.2.	Wirksamkeit der α_2 -Antiplasmininhibition.....	52
3.1.3.	Kalibration der FC.....	53
3.1.4.	Ermittlung des Referenzbereiches für die FC <150	54
3.1.5.	Präzision der FC <150	54
3.1.5.1.	Unpräzision von-Tag-zu-Tag (Inter-Assay Variabilität)	54
3.1.5.2.	Unpräzision in der Serie (Intra-Assay Variabilität)	55
3.1.6.	Einflussgrößen auf die FC	55
3.1.6.1.	Einfluss von PAI-1 auf die FC.....	55
3.1.6.2.	Einfluss von Plasminogen auf die FC	58
3.1.6.3.	Einfluss von Fibrinogen auf die FC	59
3.1.7.	Störgrößen der FC.....	59
3.1.7.1.	Einfluss von Antioxidantien auf die FC	59
3.1.7.2.	Einfluss von parenteralen Antikoagulantien auf die FC	61
3.1.7.3.	Einfluss von oralen Antikoagulantien auf die FC	63
3.1.7.4.	Einfluss von Aprotinin und Tranexamsäure auf die FC.....	63
3.1.7.5.	Einfluss von Thrombozyten auf die FC	65
3.1.7.6.	Einfluss von Bilirubin auf die FC	65
3.2.	Beschreibung der Testeigenschaften der Fibrinplatte.....	66
3.2.1.	Plasmin-Standardkurve	66
3.2.2.	Präzision der Fibrinplatte Unpräzision von Fibrinplatte zu Fibrinplatte	66
3.2.3.	Einfluss von Heparin.....	67
3.3.	Analyse der untersuchten Kollektive.....	68
3.3.1.	Einteilung des Gesamtkollektives in Untergruppen.....	68
3.3.2.	Geschlechtsverteilung der Untergruppen	69

3.3.3.	Vergleich des Normalkollektives mit dem Schwangerenkollektiv.....	69
3.3.4.	Vergleich des Schwangerenkollektives an zwei verschiedenen Zeitpunkten ("Zeitpunkt 1" und "Zeitpunkt 2").....	71
3.3.5.	Vergleich des Kollektives der Patienten unter oraler Antikoagulation an zwei verschiedenen Zeitpunkten (TPZ-Wert "hoch" und "niedrig").....	72
3.3.6.	Vergleich des Normalkollektives mit den Thrombosekollektiven	74
3.3.6.1.	basale FC <150	74
3.3.6.2.	aktivierte FC <150	75
3.3.6.3.	endogene FC	75
3.3.6.4.	TPZ und aPTT	75
3.3.6.5.	Fibrinogen.....	76
3.3.6.6.	Antithrombin III.....	77
3.3.6.7.	Faktor XII	78
3.3.6.8.	ProC Global	78
3.3.6.9.	α_2 -Antiplasmin	79
3.3.6.10.	Plasminogen	80
3.3.6.11.	D-Dimer	81
3.3.6.12.	PAI-1.....	83
3.3.6.13.	Fibrinplatte mit normaler Euglobulinfraktion (FP-NEF)	84
3.3.6.14.	Fibrinplatte mit aktivierter Euglobulinfraktion (FP-DEF).....	84
3.3.6.15.	Untersuchung des Protein C- und S-Systems bei auffälligem ProC Globalwert	85
3.3.7.	Korrelationen	86
3.3.7.1.	Korrelation von der FC mit den Begleitparametern.....	89
3.3.7.1.1.	Fibrinolytische Kapazität und Fibrinplatte	90
3.3.7.1.2.	Plasminogen und α_2 -Antiplasmin.....	91
3.3.7.1.3.	D-Dimer, PAI-1 und Faktor XII.....	92
3.3.7.1.4.	TPZ, aPTT, Fibrinogen, Antithrombin III und ProC Global.....	93
3.3.7.2.	Korrelation von ProC Global mit Protein C und S, Akzelerin-Inaktivierung (AKI), aPC-Resistenz und Faktor V-Leiden	94
3.3.8.	Lineare Regressionsanalyse	99
3.3.8.1.	Darstellung des Regressionsmodells.....	100
3.3.8.1.1.	Regressionskoeffizienten.....	100
3.3.8.1.2.	Geschätzte Regressionsgleichung	102

3.3.8.1.3.	Anpassungsgüte des Regressionsmodells	102
3.3.8.1.4.	Varianzanalyse (ANOVA) Varianzzerlegung und <i>F</i> -Test	103
3.3.8.2.	Regressionsdiagnostik.....	104
4.	Diskussion	106
4.1.	Testeigenschaften	106
4.1.1.	Grundvoraussetzungen	106
4.1.2.	Kalibration.....	107
4.1.3.	Präzision und Reliabilität	107
4.1.4.	Validität.....	107
4.1.5.	Störgrößen.....	109
4.2.	Analyse der Kollektive	111
4.2.1.	Schwangerenkollektiv	111
4.2.2.	Kollektiv der Patienten unter oraler Antikoagulation	113
4.2.3.	Thrombosekollektiv	114
4.2.3.1.	basale und aktivierte Fibrinolytische Kapazität (FC).....	116
4.2.3.2.	Fibrinplatte (FP).....	118
4.2.3.3.	TPZ und aPTT	119
4.2.3.4.	Fibrinogen.....	119
4.2.3.5.	Antithrombin III.....	120
4.2.3.6.	Faktor XII	120
4.2.3.7.	ProC Global	120
4.2.3.8.	α_2 -Antiplasmin	121
4.2.3.9.	Plasminogen	121
4.2.3.10.	D-Dimer	121
4.2.3.11.	PAI-1.....	122
4.3.	Regressionsanalyse	123
4.4.	Präliminäre Aussagen hinsichtlich der Übereinstimmung der FC-Varianten mit Thrombose und der FC-Varianten untereinander	125
5.	Zusammenfassung	130
	LITERATURVERZEICHNIS.....	132
	DANKSAGUNG	148
	LEBENS LAUF	149
	PUBLIKATIONS LISTE	151
	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG.....	152

1. Einleitung

1.1. Blutgerinnung

Die Hämostase besteht aus dem komplizierten Zusammenspiel von drei Systemen (Virchow'sches Trias): Zustand der Gefäße, rheologische Eigenschaften des Blutes und plasmatische Gerinnungs- und Fibrinolyseproteine.

Die Blutstillung beginnt mit einer reflektorischen Kontraktion glatter Muskelzellen der Gefäßwand. Nach Kontakt von Thrombozyten mit dem verletzten Gefäßgewebe kommt es zur Aktivierung, Adhäsion und schließlich zur Aggregation von Thrombozyten mit Freisetzung von Thrombozyteninhaltsstoffen. Die prokoagulatorischen Eigenschaften des Endothels führen des Weiteren zu einer Aktivierung des Gerinnungs- und Fibrinolysesystems.

Im Verlauf der Blutstillung kommt es, hauptsächlich durch endotheliale Freisetzung von Gewebsthromboplastin und Freilegung des Plättchenfaktors 3, sowie durch Bereitstellung von Rezeptoren, zur lokalen Aktivierung des plasmatischen Gerinnungssystems. Hierbei wird ein inaktives Proenzym oder inaktiver Kofaktor durch Proteolyse aktiviert und Enzym/Substrat-Komplexe gebildet. Diese Komplexe bestehen aus einer Vitamin K-abhängigen Serin-Protease, einem Kofaktor, der die Geschwindigkeit der proteolytischen Spaltung des Substrates bestimmt und dem entsprechenden Substrat. Zu den Vitamin K-abhängigen Serin-Proteasen gehören: Faktor II, VII, IX und X, sowie Protein C. Weitere Serin-Proteasen sind Faktor XII, XI und Präkallikrein. Kontrolliert wird das System durch entsprechende Inhibitoren.

Im einzelnen verläuft die Gerinnungsaktivierung bzw. Fibrinbildung über zwei Wege ⁽¹⁻⁴⁾. Beim ersten Weg wird durch eine Endothelläsion der Gewebefaktor (TF = tissue faktor) freigelegt, der in Verbindung mit einem Phospholipidkomplex Thromboplastinaktivität erlangt ⁽⁵⁾. Diese gewebefaktorinduzierte Gerinnungsaktivierung beginnt mit der Anlagerung des Faktors VII oder VIIa. Der Komplex aus Thromboplastin und Faktor VII(a) katalysiert dann sowohl die Aktivierung des Faktors X (extrinsische Tenase), als auch des Faktors IX (Josso-Schleife). Durch Faktor Xa kommt es zur Feedback-Aktivierung des Faktors VII, wodurch eine erhebliche Reaktionsbeschleunigung entsteht. Prothrombin (Faktor II) bildet mit Faktor Xa und dem geschwindigkeitsbestimmenden Kofaktor Faktor Va (Akzelerin) den "Prothrombinasekomplex", der Prothrombin zu Thrombin (Faktor IIa) aktiviert. Thrombin (Faktor IIa) spaltet dann von Fibrinogen (Faktor I) die Fibrinopeptide A und B ab. Die spontan entstehenden Fibrinmonomer-

Polymerisate (lösliches Fibrin) werden durch den von Thrombin aktivierten Faktor XIIIa, einer Transglutaminase, quervernetzt und dadurch stabilisiert.

Unabhängig von dem Gewebefaktor verläuft der zweite Weg der Gerinnungsaktivierung über die Kontaktphasefaktoren Faktor XII, Faktor XI, Präkallikrein und High Molecular Weight Kininogen (HMWK). Diese Faktoren binden an negativ geladene Oberflächen wie Plättchenmembran, Kollagen, Glas, Kaolin, Ellagsäure oder andere künstliche Oberflächen. Dabei liegen Präkallikrein und Faktor XI gebunden an Kofaktor HMWK vor. Nach initialer Autoaktivierung von Faktor XII werden Kallikrein und Faktor XIa gebildet. Die Serin-Protease Faktor XIa katalysiert auch die Bildung von Faktor IXa; diese Gerinnungsaktivierung hat aber eher lokale bzw. an negativ geladenen Oberflächen Bedeutung. Die Aktivierung des Faktors IX durch den TF/Faktor VIIa-Komplex ist dagegen von dominierender Bedeutung. Die Kontaktphasefaktoren, insbesondere Faktor XIIIa und Kallikrein, sind darüber hinaus zur Aktivierung von Faktor VII, einer Kinin- und Komplementaktivierung, sowie zur intrinsischen Fibrinolyseaktivierung in der Lage. Diese Funktion des Kontaktphasesystems in Richtung Fibrinolyse scheint wichtiger als die Gerinnungsaktivierung zu sein⁽⁶⁻⁸⁾. Der Komplex aus Faktor IXa, aktiviertem Kofaktor Faktor VIIIa und dem Substrat Faktor X (intrinsische Tenase) führt zur Aktivierung des Faktors X. Der weitere Gerinnungsablauf entspricht der oben beschriebenen Endstrecke des ersten Weges.

Die Kontrolle der Thrombinbildung gehört aufgrund ihrer Bedeutung für die Fibrinbildung und Thrombozytenaktivierung zu den wichtigsten Prozessen der Hämostase. Die Generierung von Thrombin wird einerseits über Feedback-Aktivierung von Faktor VIII und Faktor V durch Thrombin, andererseits über Feedback-Inaktivierung durch das Thrombomodulin/Protein C- und S-System kontrolliert. Hierbei aktiviert an Thrombomodulin gebundenes Thrombin Protein C, welches im Komplex mit seinem Kofaktor Protein S die Kofaktoren Faktor Va und VIIIa inaktiviert. Weiterhin wird über diesen Komplex der Plasminogenaktivatorinhibitor-1 (PAI-1) inhibiert, eine profibrinolytische Funktion des aktivierten Protein C⁽⁹⁾. Reguliert wird das Thrombomodulin/Protein C-System über den heparinabhängigen Protein C-Inhibitor (PAI-3) und den heparinunabhängigen α_1 -Proteaseinhibitor (α_1 -PI).

Die Regulation des Gerinnungssystems unterliegt weiteren Inhibitoren. Bei der Hemmung der prokoagulatorischen Serin-Proteasen spielt das Antithrombin III (AT III) die wichtigste Rolle⁽¹⁰⁾. Es bildet ebenso wie Heparinkofaktor II (HC II) mit den entsprechenden Proteasen äquimolare stöchiometrische Komplexe, wobei ihre Inhibitorrate

durch Heparin, bzw. Heparansulfat oder andere Glykosaminoglykane um das tausendfache gesteigert werden kann. Antithrombin III hat eine besonders starke Affinität zu Faktor IIa und Xa. Faktor IXa, die Kontaktphasefaktoren Faktor XIIa, XIa und Kallikrein werden schlechter, Faktor VIIa kaum inhibiert. HC II hat eine sehr hohe spezifische Bindung zu Thrombin, kann aber Antithrombin III in seiner Effizienz nicht ersetzen.

Ein weiterer wesentlicher Regulator der Blutgerinnung ist der Tissue Factor Pathway Inhibitor (TFPI), der an Faktor Xa bindet und diesen neutralisiert ⁽¹⁰⁾. Der TFPI/Faktor Xa-Komplex bindet an den Gewebefaktor (TF)/Faktor VIIa-Komplex und hemmt seine enzymatische Aktivität. Dadurch wird aber die Aktivierung des Faktors IX durch den TF/Faktor VIIa-Komplex nicht beeinträchtigt. Die Bedeutung dieses Aktivierungsweges (Josso-Schleife) für die Gerinnung sei hier noch einmal betont.

Wesentliche Inhibitoren der Kontaktphasefaktoren sind der C1-Inhibitor (C1-INH) für Kallikrein, Faktor XIIa und XIa, der α_1 -Proteaseinhibitor (α_1 -PI) für Faktor XIa und das α_2 -Makroglobulin (α_2 -MG) für Kallikrein.

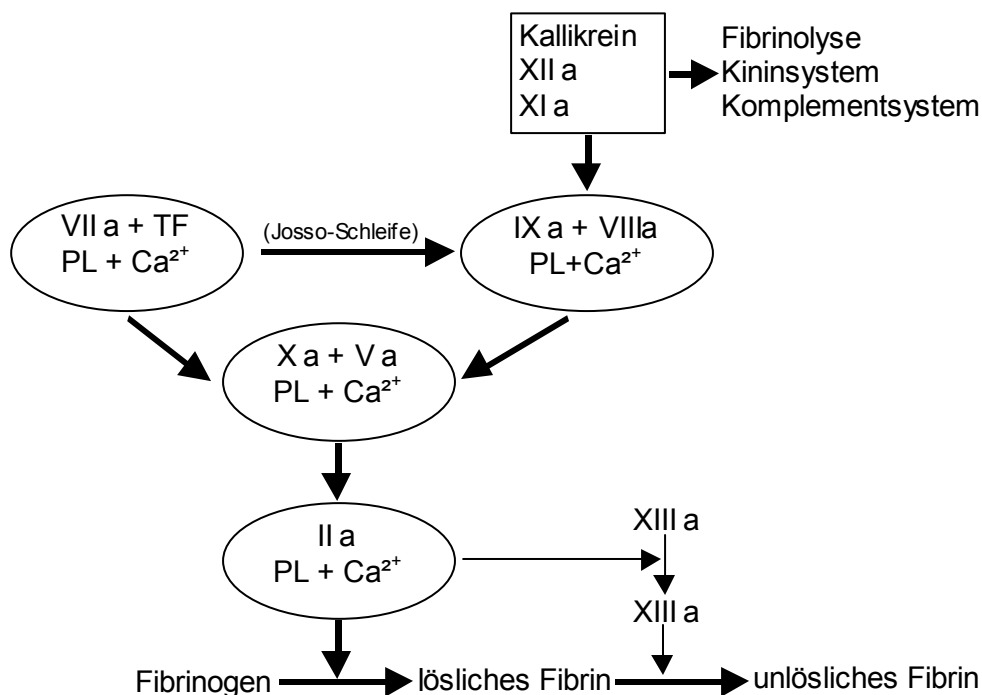


Abbildung 1.1. Übersicht über die Hämostase.

1.2. Fibrinolyse

Die Fibrinolyse sorgt für die Auflösung des entstandenen Fibringerinnsels, wobei das D-Dimer als kleinstes Abbauprodukt des Fibrins entsteht. Das wirksame proteolytische Enzym ist Plasmin, das sowohl Fibrin als auch Fibrinogen spaltet. Es entsteht aus der

inaktiven Vorstufe Plasminogen durch enzymatische Einwirkung von Plasminogenaktivatoren. Das fibrinolytische System spielt außerdem eine Rolle bei der Ovulation und Embryoimplantation, der Gewebereparatur und bei der Tumorinvasion und Metastasierung⁽¹¹⁻¹²⁾.

Während der Fibrinbildung wird Plasminogen im Gerinnsel eingeschlossen und aktiviert, so dass es zur langsamen Auflösung des Gerinnsels von innen her kommt. Plasminogen bindet nicht nur an Fibrin, sondern auch noch an Thrombozyten und Endothelzellen, sowie an Thrombospondin (TSP) und histidinreiches Glykoprotein (HRG), wodurch die Aktivierung zu Plasmin mit hoher Effizienz abläuft.

Die Plasminogenaktivatoren sind Serin-Proteasen mit hoher Substratspezifität. Neben den natürlich vorkommenden spezifischen Aktivatoren Gewebeaktivator (t-PA), und Urokinase (u-PA), können die Kontaktphasefaktoren Faktor XIIa und Kallikrein Plasminogen und Plasminogenaktivatoren aktivieren^(6-7, 13-21). Zur therapeutischen Anwendung existieren daneben weitere Substanzen. Der Gewebeaktivator t-PA wird durch Thrombin und Histamin aus Gefäßendothelien freigesetzt. Die Plasminbildung durch t-PA ist fibrinabhängig und dadurch weitestgehend auf das Fibrin beschränkt. t-PA interagiert auch mit anderen Matrixproteinen wie Fibronectin, Laminin und Thrombospondin und erhöht so seine Aktivität. An Fibrin gebundenes t-PA ist vor der Inaktivierung durch Plasminogenaktivatorinhibitor-1 (PAI-1) geschützt. Freies t-PA wird sonst rasch durch das im Überschuss vorkommende PAI-1 irreversibel gebunden und inaktiviert. Urokinase kommt im Plasma als Proenzym single-chain u-PA (scu-PA) vor, das nach seiner Aktivierung durch Plasmin und die Kontaktphasefaktoren (vor allem Kallikrein) zu two-chain u-PA (tcu-PA) umgewandelt wird^(13, 17, 22). Im Gegensatz zu t-PA kann tcu-PA Plasminogen auch in freier Lösung aktivieren. Bei der Aktivierung von Plasmin besteht eine Verstärkerschleife, da Plasmin sowohl Urokinase als auch Faktor XII aktiviert.

Freies Plasmin wird sofort durch Antiplasmin inaktiviert, so dass es normalerweise im Plasma nicht nachweisbar ist. Der effizienteste Inhibitor ist α_2 -Antiplasmin (α_2 -AP) unter Bildung von kovalenten Plasmin/ α_2 -Antiplasmin-Komplexen (PAP)⁽²³⁾. Im Unterschied zum α_2 -Antiplasmin ist α_2 -Makroglobulin (α_2 -MG) unspezifisch und inhibiert auch andere Serin-Proteasen. Daneben gibt es therapeutische Inhibitoren wie Tranexamsäure und Aprotinin.

Im quervernetzten Fibrin kommt es durch die Wirkung des Faktors XIIIa zur kovalenten

Bindung von α_2 -Antiplasmin an Fibrin, wodurch die Plasminwirkung an der Fibrinoberfläche vermindert wird. Es wird auch Fibronectin an das Fibrin gebunden, wodurch sich die initiale Bindung des t-PA an das Fibrin vermindern kann. Daher wird quervernetztes Fibrin zunächst durch Plasmin schlechter aufgelöst, was physiologisch sinnvoll ist, da die Verletzung zunächst verschlossen werden muss.

Auf der Stufe der Plasminogenaktivatoren wird die plasminvermittelte Proteolyse durch vier Inhibitoren (PAI-1 bis 4) reguliert. Der wichtigste Inhibitor ist der Serin-Proteaseinhibitor (Serpine) PAI-1, der mit t-PA stabile stöchiometrisch äquimolare Komplexe bildet und auch in Thrombozyten in relevanten Mengen vorkommt ⁽²⁴⁻³⁰⁾. Im Plasma wird u-PA ebenfalls von PAI-1 gehemmt. PAI-1 kommt in einer aktiven und einer latenten Form vor, wobei der PAI-1 in den α -Granula von Plättchen hauptsächlich in der latenten Form vorliegt ⁽³¹⁻³⁴⁾. Durch negativ geladene Phospholipide wird die latente Form in die aktive überführt. PAI-1 wird in freier Form schnell oxidiert ⁽³⁵⁾; gebunden an t-PA oder Vitronectin ist es davor geschützt ⁽³⁶⁻⁴¹⁾. Wie bereits erwähnt, wird über den aPC-Komplex der Plasminogenaktivatorinhibitor-1 (PAI-1) inhibiert. PAI-2 wird hauptsächlich in der Plazenta gebildet, ist resistent gegenüber Oxidation und inhibiert sowohl t-PA als auch u-PA ⁽⁴¹⁻⁴⁴⁾. PAI-3 ist identisch mit dem Protein C-Inhibitor (PCI) und hemmt relativ unspezifisch u-PA, Faktor Xa, Kallikrein und andere Serin-Proteasen ⁽⁴⁵⁾. PAI-4 ist identisch mit Proteasenexin 1 und inaktiviert u-PA und Thrombin.

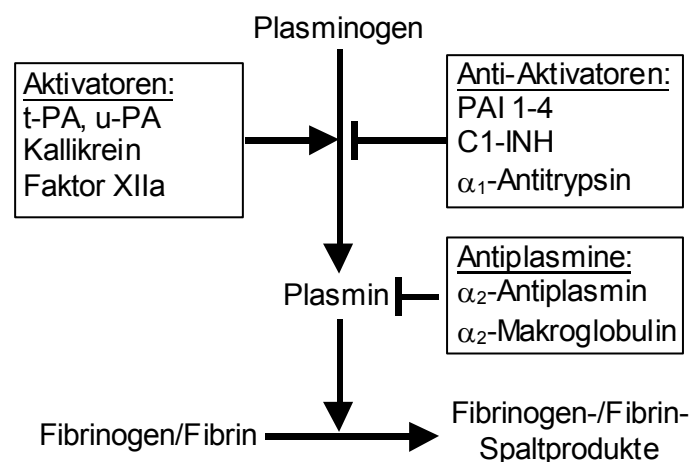


Abbildung 1.2. Übersicht über die Fibrinolyse.

1.3. Thrombose

Die Hämostase ist ein Gleichgewichtszustand zwischen Gerinnung, Fibrinolyse, Thrombozyten, Leukozyten, Immunsystem und dem Endothel. Das enzymatische Zusammenspiel von Fibrinbildung und Fibrinolyse entscheidet, ob eine Blutung oder eine Thrombose entsteht, oder ob die Hämostase gewährleistet ist. Bei einem Ungleichgewicht der Hämostase in Richtung Thrombose bzw. Hyperkoagulabilität entsteht diese dann als Folge eines durch intravasale Gerinnung entstandenen Thrombus. Die Ursachen einer Thrombose können vielfältig sein, sind aber prinzipiell die der von Virchow beschriebenen Trias, also Veränderungen der Gefäßwand, Hyperkoagulabilität und Veränderungen der Fließeigenschaften des Blutes bzw. des Stromzeitvolumens, auf die oben bereits eingegangen wurde.

Thrombotische Gefäßverschlüsse haben eine große individuelle und sozioökonomische Bedeutung. Im venösen System führen sie zu einer Stase und treten hauptsächlich als tiefe Beinvenenthrombose auf, mit ihrer möglichen Komplikation einer Lungenembolie oder eines postthrombotischen Syndroms. Im arteriellen System führen sie zu einer Ischämie und treten beispielsweise im Bereich der Koronararterien, der hirnzuführenden Gefäße oder der Beingefäße mit der Folge eines Infarktes auf.

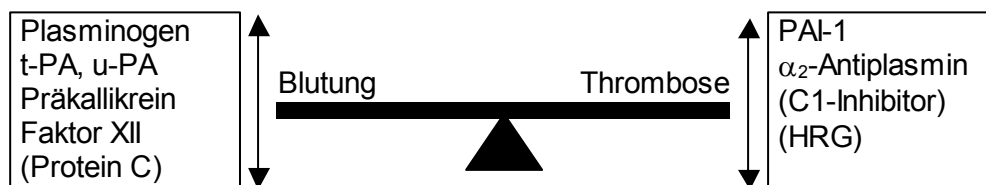


Abbildung 1.3. Gleichgewicht von Blutung und Thrombose.

Im Vergleich von arteriellen und venösen Thromben lässt sich feststellen, dass im arteriellen System die Thrombenbildung durch die hohen Schergeschwindigkeiten hauptsächlich von der Adhäsion und Aggregation der Thrombozyten abhängt, der Thrombus demzufolge vorwiegend weiß aussieht (Thrombozyten und Leukozyten). Im venösen System und in den Kapillaren spielt das plasmatische Gerinnungssystem bei langsam strömendem Blut und bei Stase die überwiegende Rolle. Der Thrombus hat hier meist eine rote Farbe (Erythrozyten und Fibrin). Die häufigsten Orte der Thrombusbildung sind Bein- und Beckenvenen und die wesentlichste Komponente bei der Thrombusentstehung ist die Hyperkoagulabilität, die sowohl durch Gerinnungs- als auch durch Fibrinolysedefekte verursacht sein kann.

Die Inzidenz von venösen Thrombembolien ist schlecht beschrieben, dennoch gibt es

darüber eine Reihe von Untersuchungen. Die beschriebene jährliche Inzidenz variiert von 45 bis 145 auf 100 000 für tiefe Beinvenenthrombosen und von 20 bis 65 auf 100 000 für Lungenembolien ⁽⁴⁶⁻⁵¹⁾. Die große Bandbreite ist hauptsächlich durch das jeweils unterschiedliche Studiendesign bedingt. Aber auch Missklassifikationen, die durch unsichere klinische Diagnosen und begrenzte Autopsiedaten verursacht werden, mit einer gleichzeitigen Diskrepanz zwischen klinisch und durch objektive Tests diagnostizierte Thrombosen kommen hinzu. Dazu bleiben als wesentliche Unsicherheit eine Reihe von oligo- bis asymptomatischen Thrombembolien undiagnostiziert ⁽⁵²⁻⁵⁴⁾. Eine Gruppe hat jüngst retrospektiv aus Daten einer 25 Jahre andauernden Kohortenstudie ⁽⁵⁵⁾ versucht, die genaue Inzidenz von tiefen venösen Thrombosen und Lungenembolien sowie Trends derselben zu beschreiben. In Ihren Ergebnissen war die alters- und geschlechtsangeglichene Inzidenz für venöse Thrombembolien 117 auf 100 000 (48/100 000 tiefe venöse Thrombosen alleine; 69/100 000 Lungenembolie), mit etwas höheren Werten für Männer als für Frauen (130 vs. 110/100 000). Sie fand, dass die Inzidenz für venöse Thrombembolien mit zunehmendem Alter für beide Geschlechter deutlich, wenn nicht sogar exponentiell, ansteigt.

Diese Ergebnisse machen deutlich, dass eine Notwendigkeit für die präzisere Identifikation von Patienten mit Risiken für venöse Thrombembolien, sowie für die sichere und effektivere Prophylaxe besteht.

1.4. Thrombosedagnostik

Zur Diagnosestellung einer tiefen Beinvenenthrombose, der häufigsten Manifestationsform der venösen Thrombose, gibt es eine Reihe von diagnostischen Mitteln. Neben den Möglichkeiten der radiologischen Diagnostik (einschließlich Doppler-Sonographie) und der postmortalen Autopsie, spielen plasmatische Gerinnungstests eine wesentliche Rolle. Dennoch werden dadurch nicht alle Ursachen einer Thromboseneigung erkannt. Unter anderem zählt auch eine verminderte fibrinolytische Kapazität (Potential oder Aktivität) ⁽⁵⁶⁻⁶²⁾ zu den durch einfache Tests nicht erfassbaren möglichen Ursachen einer Thromboseneigung. Im Gegensatz zu der Vielzahl der diagnostischen Parameter zur Erfassung von Störungen im Gerinnungssystem, gibt es nur wenige zur Erfassung von Fibrinolysestörungen. Es gibt zwar die Möglichkeit zur Messung der Einzelparameter der Fibrinolyse wie Plasminogen, Antiplasmin, der Plasminogenaktivatoren und -inhibitoren, aber nur ungenaue Messungen, die das Fibrinolyse-System als Ganzes erfassen. So wurden zwar Versuche unternommen, das Gesamtsystem mit Globaltesten,

wie dem Venous-occlusion-test, der Fibrinplatte, der Euglobulinlysezeit und ihren Varianten zu erfassen, doch haben sich diese letztlich in breiter Anwendung nicht durchgesetzt. Sie sind entweder zu aufwendig in ihrer Anwendung oder in ihrer Aussage über die globale fibrinolytische Aktivität eingeschränkt.

1.5. Zielsetzung der Arbeit

Unsere Zielsetzung war die Entwicklung und Optimierung eines Globaltestes der Fibrinolyse, der einfach in der Durchführung und dabei ausreichend aussagekräftig ist. Dieser Test soll bei reduzierter α_2 -Antiplasminaktivität die Summe der Aktivatoren und Inhibitoren der Fibrinolyse in Form von generiertem Plasmin erfassen. Mit reduzierter α_2 -Antiplasminaktivität deshalb, weil α_2 -Antiplasmin als schnellster Plasmininhibitor sonst eine Erfassung des im Test generierten Plasmins unmöglich macht. Der Test "Fibrinolytische Kapazität" soll einen solchen Globaltest darstellen. Eine weitere Zielsetzung war die Evaluation der Fibrinolytischen Kapazität im Vergleich zu anderen Parametern der Hämostase und Fibrinolyse mit einem gesunden Probandenkollektiv und einem Thrombosekollektiv. Die Evaluation erfolgte mit Hilfe folgender weiterer Parameter:

- Fibrinplatte mit normaler und aktivierter Euglobulinfraktion (FP-NEF/DEF)
- Plasminogenaktivatorinhibitor-1 Aktivität (PAI-1)
- Plasminogen (Plg)
- α_2 -Antiplasmin (α_2 -AP)
- D-Dimer (DD)
- Thromboplastinzeit (TPZ)
- aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT)
- Fibrinogen (Fbg)
- Antithrombin III (AT III)
- Faktor XII (FXII)
- ProC Global (PCG)

Zusätzlich bei auffälligen ProC Globalwert folgende Parameter:

- Protein C (PC)
- Protein S (PS)
- APC-Resistenz (APCR)
- Akzelerin-Inaktivierung (AKI)
- Faktor V Leiden Genotypisierung (F V Leiden)

2. Material und Methode

2.1. Materialien

2.1.1. Material / Geräte / Reagenzien

- Gewebekulturschalen, Ø 92 mm, Fa. Nalge Nunc International, Dänemark.
- Mikrotiterplatten (96 Well, F- oder U-Boden), Fa. Nalge Nunc Intern., Dänemark.
- Heizblock für Mikroelisasystem, +37°C, Fa. Organon Teknika, Deutschland.
- Heizblock für Reaktionsgefäße (Thermomixer 5436), Fa. Eppendorf-Netheler-Hinz, Deutschland.
- Heizplatte, (IKMAG[®] RCT), Fa. Jahnke & Kunkel, Deutschland.
- Mischer (Easyshaker EAS 2/4), Fa. Labinstruments, Österreich.
- Vortexer (Vibrofix VF 1 elektronik), Fa. Jahnke & Kunkel, Deutschland.
- Ultraschallgerät (Sonorex-Super Digital 10P), Fa. Bandelin, Deutschland.
- Inkubationsschrank, +37°C, Fa. Heraeus Instruments, Deutschland.
- Zentrifugen:
 - Eppendorf (Centrifuge 5402), Fa. Eppendorf-Netheler-Hinz, Deutschland.
 - Hettich (Rotixa/RP), Fa. Hettich, Deutschland.
 - Sorvall (RT 6000D), Fa. DuPont Instruments, USA.
- Photometer (MRX Mikroplattenleser für Mikrotiterplatten), mit dem Programm Dynatech Revelation 2.0, Fa. Dynatech, Deutschland.
- Analysegerät Cobas Mira Plus, Fa. Hoffmann-La Roche, Schweiz.
- Gerinnungsanalysegerät STA, Fa. Boehringer Mannheim, Deutschland.
- Koagulometer Coa Screener, Fa. LAbor, Deutschland.
- Sarstedt Monovetten 3 ml oder 5 ml für Gerinnung (1 Teil Na-Citrat-Lösung 0,106 mol/l, 9 Teile venöses Blut), Fa. Sarstedt, Deutschland.
- Sarstedt Monovetten-Kanüle, 20 Gauge, 0,9 x 38 mm, Fa. Sarstedt, Deutschland.
- Dade Hepzyme[®] (gereinigte Heparinase I zur Neutralisierung von bis zu 2 USP-Einheiten unfraktionierten Heparins in Citratplasma, für 0,5 – 1,0 ml Plasma), Fa. Dade International, USA ⁽⁶³⁻⁶⁴⁾.
- Standard-Human-Plasma, lyophilisiert, Fa. Behring, Deutschland.
- Kontroll-Plasma N und P, lyophilisiert, Fa. Behring, Deutschland.
- PreciClot[®] I und II, lyophilisiert, Fa. Boehringer Mannheim, Deutschland.

- STA PreciClot[®] Plus I und II, lyophilisiert, Fa. Boehringer Mannheim, Deutschland.
- TRIS (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan), Fa. Merck, Deutschland.
- TRITON X-100 (t-Octylphenoxypolyethoxyethanol), Fa. Sigma Chemical, USA.
- Dextransulfat (Na-Salz, von Dextran mit einem durchschnittlichen MW von 500 000 g/mol), Fa. Sigma Chemical, USA.
- Humane Urokinase, lyophilisiert (HMW-u-PA, 52 000 g/mol, 90 000 IU/mg, 3050 IU), Fa. American Diagnostica, USA.
- Natriumhydrogencarbonat, Fa. Merck, Deutschland.
- Taurin (2-Aminoethansulfonsäure), Fa. Sigma Chemical, USA.
- Natriumhypochlorit 5%, Fa. Bayer, Deutschland.
- L-Arginin, freie Base, Fa. Sigma Chemical, USA.
- Kaliumchlorid, Fa. Merck, Deutschland.
- S-2251, Fa. Chromogenix, Schweden.
- Essigsäure (Eisessig) 100%, Fa. Merck, Deutschland.
- EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure (2Na 2H₂O)), Fa. Sigma Chemical, USA.
- Natriumchlorid, Fa. Merck, Deutschland.
- Schwefelsäure (H₂SO₄), 3 mol/l mit AD, Fa. Merck, Deutschland.

2.1.2. Lösungen

- **Puffer A:** 0,1 mol/l TRIS (pH 8,00 mit HCl), 0,02% (v/v) TRITON X-100 mit AD (65-68).
- **Kontaktaktivatorlösung 1 (KAL1):** Dextransulfat 25 µg/ml (entspricht 50 nmol/l) in Puffer A.
- **Plasminogenaktivatorlösung (PAL):** Humane Urokinase 7,26 IU/ml, 1,55 nmol/l in Puffer A.
- **Taurin-Hypochlorit-Lösung (Tauchlor (TC)):** 5 Teile Taurin 0,6 mol/l (mit NaHCO₃ 0,1 mol/l) und 1 Teil NaOCl 5%, entspricht 112 mmol/l NaOCl; 30 min Inkubationszeit bei Raumtemperatur.
- **Puffer B:** 0,3 mol/l L-Arginin, 2 mol/l KCl mit AD (pH 8,25 mit HCl).
- **Oxidationslösung:** Taurin-Hypochlorit-Lösung 1:5,6 verdünnt mit Puffer A, entspricht 20 mmol/l NaOCl.
- **Substratlösung:** S-2251-Lösung 3 mmol/l in Puffer B.

- PreciClot[®] I gelöst in 1,0 ml AD, entspricht 200%, verdünnt auf 125%, 100%, 75%, 50%, 25%, 12,5% mit Puffer A (Standards).
- PreciClot[®] II gelöst in 1,0 ml AD, verdünnt 1:2 mit Puffer A (Kontrolle).
- Na-Citrat Plasma (kurz vor Messbeginn aufgetaut) 1:2 vorverdünnt mit Puffer A.
- **Kontaktaktivatorlösung 2 (KAL2):** Dextransulfat 12,5 µg/ml in AD.
- Essigsäure 0,025% (AD).
- **Euglobulinfraktion-Puffer (EF-Puffer):** 20 mmol/l TRIS, 100 mmol/l NaCl, 2,7 mmol/l EDTA mit AD (pH 7,8 mit HCl).

2.1.3. Fertigreagenzien

- Humanes Fibrinogen 2% (AD) (Haemocomplettan[®] HS 1 g, bei einer Gesamtproteinmenge von 1400-2000 mg. Weitere Bestandteile: 400-700 mg Humanalbumin, L-Argininhydrochlorid, NaCl, Natriumcitrat-Dihydrat), Fa. Centeon, Deutschland.
- Humanes Plasminogen 120 µg/ml = 2 CU/ml (AD), Fa. Chromogenix, Schweden.
- Agarose 1% mit einer Temperatur von +55°C, Typ II-A, Fa. Sigma Chemical, USA.
- Human-Thrombin 8,46 NIH/ml = 15 U/ml (AD), Fa. Boehringer Mannheim, Deutschland.
- Humanes Plasmin 7,9 mg/l = 125 mCU/ml, Fa. Chromogenix, Schweden.
- Berichrom[®] PAI Testkit, Fa. Behring, Deutschland.
 - PAI-Standard S1 0,0 U/ml, PAI-Standard S2 5 – 7 U/ml, PAI-Kontrollplasma 2,5 – 4,0 U/ml PAI.
 - Urokinase-Reagenz: 5 IU/ml Urokinase (human), 100 mmol/l TRIS, pH 8,4.
 - Plasminogen-Reagenz: 15 CTA-U/ml Glu-Plasminogen (human), 100 mmol/l TRIS, pH 8,4.
 - Oxidans: 1,8 g/l Chloramin T.
 - Plasmin-Substrat: 0,6 mmol/l HD-Nva-CHA-Lys pNA in Substrat-Verdünnungslösung (35 g/l NaCl, 50 mmol/l TRIS, pH 8,4).
- Enzym-Immunoassay TintElize[®] PAI-1, Fa. Biopool, Schweden.
 - Mikrotiterplatte, gebrauchsfertig, beschichtet mit monoklonalen anti-PAI-1-Antikörpern (Maus) und vorgefüllt mit Kontroll-Antikörpern.
 - PET-Puffer (PBS-EDTA-Tween 20).

- PAI-1-Mangelplasma, PAI-1-Standardplasma.
- Konjugat: anti-PAI-1-Antikörper (Ziege), konjugiert mit Peroxidase.
- Wasserstoffperoxid 0,15% in AD.
- Substrat (ortho-Phenylendiamin, OPD), gelöst mit 22 ml AD, dann Zugabe von 2 ml Wasserstoffperoxid 0,15%.
- Dade® Plasminogen Chromogen, Fa. Dade AG, Schweiz.
 - Streptokinase-Reagenz: 2000 Einheiten Streptokinase/ml, Puffer.
 - Substrat-Reagenz: 2 µmol/l Methyl-Malonyl-Ser-(OBzl)-Arg pNA AcOH.
- Dade® Alpha-2-Antiplasmin Chromogen, Fa. Dade AG, Schweiz.
 - Plasmin-Reagenz: 3,85 nKat Plasmin/ml, gelöst in Plasmin-Solvent (enthält α_2 -Makroglobulininhibitor).
 - Substrat-Reagenz: 1,5 µmol/l Methyl-Malonyl-Hydroxypropyl-Lysin pNA AcOH.
- IL Test™ D-Dimer, Fa. Instrumentation Laboratory Co., USA.
 - D-Dimer-Kontrollen niedriger und hoher Bereich, D-Dimer-Kalibrator: enthalten partiell gereinigtes D-Dimer, welches bei der Verdauung von durch Faktor XIIa stabilisierten und quervernetzten Fibrins durch Plasmin entstanden ist.
 - Latex-Reagenz: enthält eine Suspension aus Polystyren-Latexpartikeln einheitlicher Größe, die mit gegen D-Dimer gerichteten monoklonalen Antikörpern beschichtet sind.
 - Reaktionspuffer: enthält Phosphatpuffer, Rinderserumalbumin.
 - IL Faktor Diluent.
- Dade® Innovin (TPZ-Testkit, bestehend aus Lyophilisat von rekombinantem humanem Gewebefaktor und synthetischen Phospholipiden (Thromboplastin), Kalziumionen, einer heparinneutralisierenden Verbindung, Puffer und Stabilisatoren (Rinderserumalbumin)), Fa. Dade International, USA.
- Platelin LS® (standardisiertes aPTT Reagenz, bestehend aus pulverisiertem Siliziumdioxid und reinen Phospholipiden), Fa. Organon Teknika, Deutschland.
- STA Calciumchlorid (25 mmol/l CaCl_2), Fa. Boehringer Mannheim, Deutschland.
- STA Fibrinogen (Human-Thrombin ≥ 70 NIH/ml, Polybrene® $\geq 0,01$ mg/ml, Heparininhibitor; zur Fibrinogenbestimmung nach Clauss), Fa. Boehringer Mannheim, Deutschland.
- Accucolor® Antithrombin III (Testkit zur quantitativen Bestimmung von Antithrombin III mittels eines chromogenen Substrates, bestehend aus Heparin-/

Thrombinreagenz: lyophilisiertes Rinderthrombin (6 IU/ml) mit Heparin; Thrombin-substrat: lyophilisiertes Sar-Pro-Arg pNA (3,1 mmol/l); AT-III Verdünnungspuffer (10fach): 0,38 mol/l TAPS-Puffer, 37,5 mmol/l EDTA, 5 U/ml Heparin, pH 8,2.), Fa. Sigma Diagnostics, USA.

- F XII-Mangelplasma (lyophilisiertes humanes F XII-Mangelplasma mit einer Gerinnungsaktivität von $\leq 1\%$ des Faktors XII, zur Bestimmung des Gerinnungsfaktors XII basierend auf der partiellen Thromboplastinzeit.), Fa. Immuno, Österreich.
- STA Diluent Puffer, Fa. Boehringer Mannheim, Deutschland.
- ProC[®] Global (Testkit zur Bestimmung der antikoagulatorischen Kapazität des Protein C-Systems), bestehend aus APTT-Reagenz, flüssig: Siliziumdioxid, pflanzliche Phospholipide, 2,4 g/l NaCl, 14,3 g/l HEPES, pH 7,6; Aktivator-Reagenz, lyophilisiert: Extrakt aus dem Gift von Agkistrodon contortrix, 50 mmol/l HEPES, Heparinneutralisator Hexadimethrinbromid (15 mg/l), pH 7,4; Puffer, flüssig: 50 mmol/l HEPES, Heparinneutralisator Hexadimethrinbromid (15 mg/l), pH 7,4, Fa. Behring, Deutschland.
- STA Protein C Clotting (Testkit zur Bestimmung der Protein C-Aktivität, bestehend aus Protein C-Mangelplasma/PF 3-Äquivalent, lyophilisiert; Protein C-Aktivator (Protac[®]), lyophilisiert), Fa. Boehringer Mannheim, Deutschland.
- STA Protein S Clotting (Testkit zur Bestimmung der Protein S-Aktivität, bestehend aus Protein S-Mangelplasma, lyophilisiert; Protein C-aktiviert, lyophilisiert; Faktor Va, lyophilisiert), Fa. Boehringer Mannheim, Deutschland.
- Coatest[®] APC[™] Resistance (Testkit zur Bestimmung der gerinnungshemmenden Reaktion auf aktiviertes Protein C, bestehend aus CaCl₂: 0,025 mol/l CaCl₂, TRIS-Puffer mit 0,5% Rinderserumalbumin (BSA); APTT-Reagenz: gereinigte Phospholipide mit kolloidalem Silika als Kontaktaktivator; APC/CaCl₂: humanes APC, colyophilisiert mit CaCl₂.), Fa. Chromogenix, Schweden.
- Akzelerin-Inaktivierung: Zur Bestimmung der APC-Resistenz unter Antikoagulation, bestehend aus Coatest[®] APC[™] Resistance, Fa. Chromogenix, Schweden, Barbitol-Azetat-Puffer (pH 7,6), Fa. Behringwerke, Deutschland, Faktor V-Mangelplasma, Fa. Immuno, Deutschland.

2.2. Probanden

2.2.1. Patientenkollektive

Das Patientenkollektiv setzt sich aus verschiedenen Anteilen zusammen, zum großen Teil Patienten mit verschiedenen thrombembolischen Erkrankungen, sowie Schwangere und Patienten unter oraler Antikoagulation (Phenprocoumon, Marcumar®). Das Kollektiv wurde aus dem Krankengut des Universitätsklinikums Charité, Campus Virchow-Klinikum, erhoben. Von dem Kollektiv wurde anamnestisch und klinisch ein vorhandenes thrombembolisches Ereignis sowie Begleiterkrankungen erfasst. Die Kontrolle eingenommener Medikamente beschränkte sich auf ausgewiesene Antikoagulantien (Heparin, Heparinoide, Hirudin, Vitamin K-Antagonisten), Fibrinolytika (Streptokinase, Urokinase, t-PA) und Antifibrinolytika (Tranexamsäure, Aprotinin).

Probanden	Männer	Frauen	Summe	Alter	
				Median	Quartilabst.
Thrombosen (Gesamt)	34	41	75	54,0	27,4
Schwangere	0	17	17	30,9	9,6
Orale Antikoagulation	20	5	25	62,7	14,6

Tabelle 2.1. Probanden.

2.2.1.1. Thrombosen

Das Patientenkollektiv mit thrombembolischen Erkrankungen besteht aus verschiedenen Untergruppen. Es handelt sich entweder um Patienten mit klinischer Diagnose einer akuten Thrombose, oder bereits durchgemachter bzw. alter Thrombose, oder positiver Familienanamnese. Dabei lagen die akuten Thrombosen sowohl als Erstmanifestation, als auch als Rezidivthrombose im Sinne einer Thromboseneigung vor. Daraus ergibt sich folgende distinkte Einteilung: Thrombosekollektiv (Gesamt) (T), akute Thrombose mit Thromboseneigung (Rezidivthrombose) (T+), Erstmanifestation einer akuten Thrombose (T-), sowie alleinige Thromboseneigung (alte Thrombose bzw. positive Familienanamnese) ohne akut bestehende Thrombose (Tp). Die Diagnosen wurden teilweise mit diagnostischen Tests (plasmatische Gerinnungstests) gesichert. Radiologische Diagnostik wurde nur im Einzelfall durchgeführt, meist zur Diagnostik einer akuten Lungenembolie.

Erkrankung	Männer	Frauen	Summe	Alter	
				Median	Quartilabst.
Thrombosekollektiv (Gesamt)	34	41	75	54,0	27,4
akute Thrombose	27	35	62	55,6	27,2
Lungenembolie	9	7	16	59,5	21,0
tiefe Beinvenenthromb.	16	26	42	57,6	28,1
andere Thrombosen	9	8	17	44,2	25,3
kombinierte Thromb.	7	8	15	57,0	32,7
Thromboseneigung	15	11	26	52,6	22,4
alte Thrombose	13	10	23	51,2	20,9
pos. Familienanamnese	4	2	6	46,8	28,1

Tabelle 2.2. Erkrankungen im Thrombosekollektiv.

Erkrankung		Männer	Frauen	Summe	Alter	
					Median	Quartilabst.
Thrombosekollektiv (Gesamt)	T	34	41	75	54,0	27,4
akute Thrombose <u>mit</u> Thromboseneigung	T+	8	5	13	56,1	17,7
akute Thrombose <u>ohne</u> Thromboseneigung	T-	19	30	49	55,1	29,6
<u>nur</u> alte Thrombose bzw pos. Familienanamnese	Tp	7	6	13	49,1	33,4

Tabelle 2.3. Thombosekollektiv-Untergruppen.

Die Darstellung der Ergebnisse erfolgt mit dieser Einteilung des Thrombosekollektives.

2.2.1.2. Schwangere

Beim Kollektiv der Schwangeren wurden z.T. Blutproben von zwei Zeitpunkten verwendet. Die erste Blutentnahme ("Zeitpunkt 1") erfolgte kurz vor/bei der Geburt, bei 9 Schwangeren erfolgte eine zweite ("Zeitpunkt 2") ein bis drei Tage post partal.

2.2.1.3. Patienten unter oraler Antikoagulation

Das Kollektiv der Patienten unter oraler Antikoagulation setzt sich aus zwei Gruppen zusammen: aus Patienten mit thrombembolischen Ereignissen und aus solchen ohne

Ereignisse, wobei innerhalb der zweiten Gruppe noch zwischen Patienten mit Vorhofflimmern, Bypass-Operation bei arterieller Verschlusskrankheit (AVK) oder anderen Erkrankungen unterschieden werden kann. Die Blutentnahmen erfolgten bei zwei unterschiedlichen Antikoagulationsgraden, wobei die beiden Zeitpunkte so gewählt wurden, dass die jeweiligen TPZ-Werte möglichst weit auseinander lagen.

Erkrankung	Männer	Frauen	Summe	Alter	
				Median	Quartilabst.
ohne akutes thromboembolisches Ereignis	12	5	17	67,4	13,1
Herzrhythmusstörung	4	2	6	69,3	7,2
AVK und Bypass-OP	3	2	5	60,0	15,8
Vermischt	5	1	6	64,9	40,6
mit akutem thromboembolischem Ereignis	8	0	8	58,6	31,8

Tabelle 2.4. Erkrankungen im Kollektiv der Patienten unter oraler Antikoagulation.

2.2.2. Normalkollektiv

Das Normalkollektiv besteht aus 162 freiwilligen gesunden Probanden, 93 männlichen und 69 weiblichen. Der Altersmedian liegt bei 24,0 Jahren, der Interquartilbereich bei 2. Bei zwei Freiwilligen (gesunde Männer, Alter 30 und 26) wurde eine orale Antikoagulation mit einem Vitamin K-Antagonisten (Phenprocoumon) vorgenommen. Die beiden gesunden Probanden unter oraler Antikoagulation gehen in das Kollektiv der Patienten unter oraler Antikoagulation ein (ohne akutes thromboembolisches Ereignis, vermischt).

2.2.3. Fehlerquellen

- Bei der Blutentnahme wurde ein möglicherweise vorhandener Tag/Nacht-Rhythmus der Hämostase oder Fibrinolyse nicht berücksichtigt ⁽⁶⁹⁻⁷⁰⁾.
- Es wurde nicht auf eingenommene Mahlzeiten und den Genuss von Nikotin, Ethanol, Koffein und anderen Purinderivaten geachtet.
- Ein vorhandenes thromboembolisches Ereignis wurde nicht in allen Fällen radiologisch verifiziert, so dass falsch positive klinische Diagnosen möglich sind. Diese Gefahr ist aber von geringer Bedeutung, da Thrombosen eher in zu seltenen Fällen diagnostiziert werden ^(46, 52, 71-73).

- Die Kollektive der Patienten mit Thrombose und oraler Antikoagulation sind sehr heterogen. Es lassen sich also nur allgemeine Aussagen treffen.
- Deutlich verschiedener Altersmedian des Normalkollektives im Vergleich zu den anderen Kollektiven.

2.3. Blutentnahme und Probenverarbeitung (thrombozytenarm / -reich)

2.3.1. Durchführung

Am Oberarm wird mit Hilfe eines Stauschlauches an der sitzenden oder liegenden Person ein venöser Stau angelegt. Die Dauer des Staus darf zwei Minuten nicht überschreiten. An geeigneter Stelle (Ellenbeuge bis Handrücken) erfolgt nach Hautdesinfektion die Entnahme von 10 – 20 ml Blut. Nach kompletter Füllung der Monovetten wird der Inhalt durch vorsichtiges Schwenken/Kippen gemischt.

Die Zentrifugation der Proben erfolgt innerhalb einer Stunde nach Blutentnahme für 15 Minuten bei +4°C mit 3000g (Hettich Rotixa/RP). Wir können zeigen, dass das Plasma nach der Zentrifugation ausreichend thrombozytenarm ist (siehe Kapitel 3.1.7.5.). Das Plasma wird sofort in mehrere 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt, bis zur weiteren Verwendung bei -70°C tiefgekühlt und jeweils nur einmal aufgetaut und anschließend sofort zu Messungen verarbeitet.

Zur Herstellung von thrombozytenreichem Plasma wird Blut aus einer ungestauten V. cubitalis entnommen. Dabei wird 25 ml Blut (5 mal 5 ml) mit milder Aspiration entnommen und die ersten 5 ml verworfen. Die übrigen Monovetten bleiben nach vorsichtigem Schwenken/Kippen für 15 Minuten bei Raumtemperatur im schrägen Winkel stehen und werden anschließend für 10 Minuten bei +20°C mit 100g (Sorvall RT 6000 D, ohne Bremse) zentrifugiert. Der vorsichtig abpipettierte Überstand ist das plättchenreiche Plasma (PRP). Aus dem restlichen Sediment kann wie oben beschrieben plättchenarmes Plasma (PPP) gewonnen werden.

Zur Zerstörung von Thrombozyten wird Plasma (PRP, PPP) im Wasserbad für 10 Minuten bei +20°C mit Ultraschall behandelt oder 2 mal bei -30°C für 15 Minuten tiefgekühlt und anschließend wieder bei +37°C über 5 Minuten aufgetaut.

Für die Fibrinolytische Kapazität wird das Plasma von heparinisierten Patienten vor der Messung mit Heparinase I (Dade Hepzyme[®]) behandelt. Dabei wird 0,5 ml Plasma pro Fläschchen Dade Hepzyme[®] bei Raumtemperatur eingesetzt. Nach Lösen des Lyophilisat steht das Fläschchen dann 15 Minuten vor Testbeginn bei Raumtemperatur.

2.3.2. Fehlerquellen

- Zu langer venöser Stau vor der Blutentnahme.
- Nicht exakte Venenpunktion mit Aspiration von Gewebeflüssigkeit.
- Hämolyse.
- Unvollständige Füllung der Monovetten mit Veränderung des Mischungsverhältnisses zwischen Venenblut und Natriumcitrat.
- Zu großer Zeitraum zwischen Blutentnahme und Einfrieren des Plasmas.

2.4. Fibrinolytische Kapazität (basale FC <150, aktivierte FC <150)

2.4.1. Prinzip

Die Fibrinolytische Kapazität (FC) mit ihren Varianten (b FC <150 und a FC <150) ist ein Test zur Beurteilung der fibrinolytischen Gesamtaktivität im Plasma. Ziel ist die summarische Erfassung von Aktivatoren und Inhibitoren der Fibrinolyse. Das Testverfahren entspricht einem zweistufigen, indirekten enzymatischen Assay. In der ersten Stufe wird dem Plasma eine bestimmte Menge Urokinase (u-PA) zugeführt. In der zweiten Stufe wird dann die aus dem Plasminogen der Probe gebildete Plasminmenge bestimmt. Dieses Verfahren wurde von Stief, Hansen, Kettelgerdes und Willich entwickelt und optimiert.

Die FC besteht aus drei Varianten. Erstens der basalen FC (b FC), die aus einer verdünnten Plasmaprobe bestimmt wird, zweitens der aktivierten FC (a FC), die zusätzlich mit Dextransulfat (DXS) vorbehandelt ist. Dextransulfat ist ein Polyanion, bzw. Glykosaminoglykan, welches sehr potent die kontaktphaseabhängige Fibrinolyse aktiviert ^(17, 22, 74-75). Dadurch wird erreicht, dass der intrinsische Fibrinolyseweg im Test in einem hohen Aktivierungszustand abgebildet werden kann. Die dritte Variante (endogene FC) wird ohne Zugabe von Urokinase durchgeführt, um eventuell vorhandene Plasminogenaktivatoren der Probe zu erfassen.

Durch Zugabe von Urokinase wird in der ersten Stufe die Generierung von Plasmin aus Plasminogen des Plasmas gestartet. Im Plasma vorhandener freier Plasminogenaktivatorinhibitor (PAI) inaktiviert jetzt die vorgelegte Urokinase durch rasche Komplexbildung. Hauptsächlich der schnell wirksame PAI-1 wird hier in seiner Wirksamkeit erfasst, aber auch andere PAI können erfasst werden. In der zweiten Stufe wird die resultierende Plasminmenge gemessen, die aus dem Plasminogen des Plasmas gebildet werden konnte. Hierfür wird dem Plasma eine Oxidationslösung zugegeben, welche Antiplasmi-

ne (vor allem α_2 -Antiplasmin) inaktiviert, ohne die Aktivität von Urokinase oder Plasmin wesentlich zu beeinflussen^(40, 67, 76-80). Zur Herstellung dieser Oxidationslösung wird eine Taurin-Hypochlorit-Lösung verwendet, die 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert wird. Während dieser Inkubationszeit reagieren Taurin und Natrium-Hypochlorit miteinander zu Taurin-Chloramin (ein N-Chloramin), indem das Chloranion auf Taurin übertragen wird. Hypochlorit und Chloramin sind physiologische Produkte der Myeloperoxidase von aktivierten polymorphkernigen Leukozyten⁽⁸¹⁻⁸⁵⁾. Unter alkalischen Bedingungen (pH 8,0 – 8,5) oxidiert Taurin-Chloramin selektiv Methionin-Reste in Proteinen zu Methioninsulfoxid. Andere Aminosäuren (auch Tryptophan) werden durch Taurin-Chloramin nicht beeinträchtigt. Durch diese Wirkungsweise inaktiviert Taurin-Chloramin Serpine, ohne die Serin-Proteaseaktivität herabzusetzen⁽⁸⁶⁻⁸⁷⁾. Aktive PAI werden also durch die Oxidation nicht beeinträchtigt, da zudem zwischen Zugabe von Urokinase und Oxidans eine Inkubationsphase von 5 Minuten liegt, in der eine Komplexbildung entsteht. Die in dieser Phase gebildeten u-PA/PAI-1-Komplexe sind ähnlich wie die Vitronectin/PAI-1-Komplexe vor Oxidation geschützt^(40-41, 86). Die verbleibende u-PA-Aktivität katalysiert die weitere Bildung von Plasmin. Das entstandene Plasmin hydrolysiert das chromogene Substrat S-2251 (HD-Val-Leu-Lys pNA) zu freiem p-Nitroanilin (pNA), einem gelben Farbstoff, der bei 405 nm gemessen wird⁽⁸⁹⁾. Die Zunahme der Absorption durch das entstehende freie pNA ist ein indirektes Maß für das umgesetzte Plasminogen. Durch diesen Test werden also hauptsächlich Plasminogen, PAI-1, Kontaktphasenfaktoren (F XI, F XII, PK) und Plasminogenaktivatoren der Probe erfasst. Zur Beschreibung der FC wurde der Testansatz verschiedentlich modifiziert. Die einzelnen Modifikationen werden im Ergebnissteil der Arbeit dargestellt, in der Testbeschreibung jedoch nicht einzeln aufgeführt.

2.4.2. Durchführung

Für die Fibrinolytische Kapazität (FC) werden 25 μ l einer Plasma-Vorverdünnung (Na-Citrat Plasma 1:2 vorverdünnt mit Puffer A), der Standards (PreciClot[®] I verdünnt auf 125%, 100%, 75%, 50%, 25%, 12,5% mit Puffer A) und Kontrolle (PreciClot[®] II verdünnt 1:2 mit Puffer A) mit 25 μ l Puffer A bzw. 25 μ l der Kontaktaktivatorlösung 1 (50 nmol/l DXS) in einer 96-Loch MTP mit Rundboden gemischt. Danach werden 50 μ l der Plasminogenaktivatorlösung (1,55 nmol/l u-PA; 363 mIU u-PA/50 μ l) hinzugegeben, gemischt und in einem Heizblock für 5 Minuten bei +37°C temperiert. Nach Zugabe der Oxidationslösung (20 mmol/l NaOCl) wird der Messansatz nach erneuter Mischung für

weitere 55 Minuten bei +37°C inkubiert. Im Messansatz befinden sich dann 10 nmol/l Dextransulfat, 0,31 nmol/l Urokinase und 4 mmol/l NaOCl. Vor Beginn der Messung werden 50 µl der Substratlösung (3 mmol/l S-2251 in Puffer B) zugegeben. Die Messung im Photometer findet bei konstanter Temperatur (+37°C) und einem pH-Wert im Messansatz von ca. 8,0 statt. Zur Messung wird alle 60 Sekunden die Absorption bei $\lambda = 405 \text{ nm}$ Wellenlänge im Messbereich zwischen 5. und 10. Minute nach Messbeginn zur Ermittlung der Differenz der Absorptionen/Minute ($\Delta A_{405\text{nm}}/\text{min}$) herangezogen. In diesem Messbereich liegen die Messungen annähernd im linearem Bereich. Der Mittelwert einer jeweiligen Probe von $\Delta A_{405\text{nm}}/\text{min}$ im angegebenen Messbereich wird zur Berechnung der FC (%) verwendet. Die Messungen erfolgen jeweils im dreifachen Ansatz.

Verdünnte Plasmaprobe/Standard 1:2 (Puffer A)	25 µl
Puffer A / Kontaktaktivatorlösung 1 (50 nmol/l DXS)	25 µl
Plasminogenaktivatorlösung (1,55 nmol/l u-PA)	50 µl
Mischung und Inkubation für 5 Minuten bei +37°C	
Oxidationslösung (20 mmol/l NaOCl)	25 µl
Mischung und Inkubation für 55 Minuten bei +37°C	
Substratlösung (3 mmol/l S-2251)	50 µl
Mischung und Bestimmung von $\Delta A_{405\text{nm}}/\text{min}$	

Tabelle 2.5. Durchführung der Fibrinolytischen Kapazität.

2.4.3. Auswertung

Die Auswertung der Fibrinolytischen Kapazität im Plasma in Prozent (FC %) erfolgt mit Hilfe einer Kalibrationskurve, die durch die Verdünnungsreihe des Standardnormalplasmas (PreciClot® I) erstellt wird. (Diese Kalibration wurde erst für die Messung der Kollektive durchgeführt, davor wurde die Fibrinolytische Kapazität als Absorption/min (A/min) dargestellt.) Die Kalibrationskurve wird aus sechs einzelnen Messpunkten bei jeder MTP neu im Photometer berechnet. Dabei verwenden wir eine kubische Funktion als Berechnungsmodell für die Kurvenanpassung. Die Messwerte für die Verdünnungsreihe des Standardnormalplasmas werden im Vergleich mit einer Verdünnungsreihe eines Plasmapools (laborinterner Standard) ermittelt, welcher aus unserem Probandenkollektiv (Normalkollektiv) erstellt wird. Es wird dabei das Poolplasma als Norm (100%) gesetzt, der Messwert des Standardplasmas PreciClot® I daran entsprechend ermittelt.

Hierbei gilt:

Standard	b / a FC _{Poolplasma} (%)	b FC _{PreciClot® I} (%)	a FC _{PreciClot® I} (%)
S1	125	122,5	111,25
S2	100	98	89
S3	75	73	66,75
S4	50	49	44,5
S5	25	24,5	22,25
S6	12,5	12,25	11,125

Tabelle 2.6. Vergleich Poolplasma und Standardplasma.

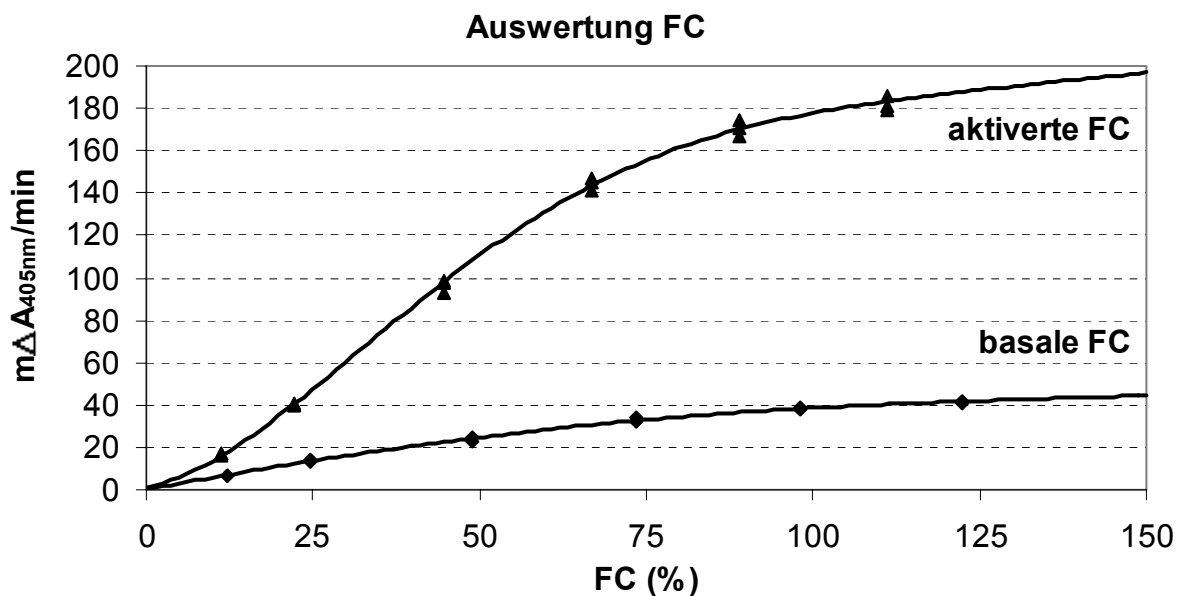


Abbildung 2.1 Auswertung der FC mittels der Kalibrationskurve der Standards.

Da es sich um eine nicht-lineare Kalibrationskurve handelt, die Kurve im oberen Prozentbereich flacher wird, werden Werte nur bis zu einer FC <150% gewertet. Allen Proben mit einer FC >150% wird der Wert 150% zugewiesen. Bei starker Streuung der Analysewerte der Dreifachbestimmung (>10%) wird ein Messwert eliminiert, falls ein Messwert von zwei anderen stark abweicht. Ist kein Messwert als Ausreißer erkennbar, wird die Messung wiederholt. Das Kontrollplasma dient zur internen Qualitätskontrolle. Mit ihm wird die Präzision von-Tag-zu-Tag ermittelt, die Qualitätskontrolle wird im Ergebnisteil dargestellt (Kapitel 3.1.5.1).

2.4.4. Fehlerquellen

- Ungenauigkeit beim Pipettieren kleiner Volumina.
- Nichteinhaltung der erforderlichen Zeiträume und Temperaturen.
- Die Proben sollten frei von Reagenzien sein, welche die Oxidation behindern.
- Verfärbung oder Trübung des Plasmas haben bei der geringen eingesetzten Plasmamenge nur untergeordnete Bedeutung.
- Veraltete Materialien, Reagenzien und Lösungen.

2.5. Tests aus der Euglobulinfraktion (EF)

2.5.1. Herstellung der Euglobulinfraktion (EF)

2.5.1.1. Prinzip

Man versucht, die Gesamtaktivität der Fibrinolyse, Fibrinolyseaktivatoren und -proaktivatoren im Plasma u.a. über die Euglobulinfällung darzustellen. Mit diesem Verfahren der Verdünnung und Ansäuerung des Plasmas bei ca. +4°C mit anschließender Zentrifugation erhofft man sich eine Abtrennung der Fibrinolyseinhibitoren aus der Euglobulinfraktion (EF). Diese Methode ist sicherlich nicht ideal, da einige Aktivatoren nicht mehr in der Euglobulinfraktion enthalten sind oder inaktiviert wurden. Zum anderen befinden sich weiterhin Inhibitoren in der Euglobulinfraktion. In der normalen Euglobulinfraktion (NEF) ist vor allem t-PA als Plasminogenaktivator enthalten, gebunden an PAI-1, α_2 -AP und C1-INH, aber auch Plasmin, scu-PA, F XII, Präkallikrein und HMWK. Durch Zugabe von verschiedenen Polyanionen lässt sich die fibrinolytische Aktivität stimulieren; es wird so weitere Aktivatoraktivität aus Präkursoren/Präenzymen freigesetzt. Dextransulfat ist eines der potentesten Polyanionen in dieser Hinsicht. Es aktiviert hauptsächlich die Fibrinolyse über den kontaktphaseabhängigen (intrinsischen) Weg. Die mit Dextransulfat aktivierte Euglobulinfraktion (DEF) enthält t-PA und Kallikrein, gebunden an C1-INH ^(13-14, 17, 20, 90-92).

Das gelöste Präzipitat wird zur Messung der fibrinolytischen Aktivität benutzt. Dazu wird meist die Fibrinplattenmethode (FP) verwendet, aber auch andere Verfahren wie der (aktivierte) Clot-Lysis-Assay oder die Euglobulinlysezeit.

Wir verwenden leicht veränderte Methode von R. J. Klauser und C. Kluff zur Herstellung der Euglobulinfraktion ^(90-91, 93).

2.5.1.2. Durchführung

Zur Herstellung der Euglobulinfraktion werden jeweils 100 µl Plasma mit 900 µl Aqua destilata für die normale Euglobulinfraktion (NEF) oder mit 800 µl Aqua destilata und 100 µl Kontaktaktivatorlösung 2 (12,5 µg/ml Dextransulfat) für die aktivierte Euglobulinfraktion (DEF) in einem Reaktionsgefäß gemischt. Die Ansätze werden dann für 10 Minuten bei +37°C inkubiert, pH-Wert ist hierbei ca. 8. Anschließend werden 900 µl Essigsäure 0,025% (+4°C) hinzugegeben, nach Mischung wird für 5 Minuten bei +4°C inkubiert. Daraufhin wird für 5 Minuten bei +4°C mit 2000g zentrifugiert. Das Präzipitat (Euglobulinfraktion) wird nach vorsichtigem Absaugen des Überstandes mit 100 µl des EF-Puffers gelöst. Die Euglobulinfällung und -resuspension finden bei einem pH-Wert von 5-6 statt. Die Euglobulinfraktion wird im einfachen Ansatz als normale Euglobulinfraktion (NEF) und als durch Dextransulfat aktivierte Euglobulinfraktion (DEF) hergestellt. Diese Euglobulinfraktion wird dann weiter in der Fibrinplatte verwendet.

Plasma	100 µl
Aqua destilata	800 µl
Aqua destilata (für NEF) oder KAL2 (für DEF)	100 µl
Inkubation für 10 Minuten bei +37°C	
0,025% Essigsäure (ca. +4°C)	900 µl
Inkubation für 5 Minuten bei ca. +4°C	
Zentrifugation für 5 Minuten mit 2000g bei +4°C	
EF-Puffer zum Lösen des Präzipitates	900 µl

Tabelle 2.7. Herstellung der Euglobulinfraktion.

2.5.1.3. Fehlerquellen

- Da wir zur Herstellung der Euglobulinfraktion kein Flufenamat verwenden, kann es zu Interferenzen mit dem C1-Inhibitor gekommen sein ^(20, 78, 93).
- Aktivitätsverluste der Euglobulinfraktion durch mangelnde Kühlung.
- Fehlerhaftes Entfernen des Euglobulinpräzipitatüberstandes, entweder durch Belassen von Flüssigkeit oder durch unvorsichtiges Absaugen.

2.5.2. Fibrinplatte (FP)

2.5.2.1. Prinzip

Die Verwendung von Fibrinplatten (FP) zur Abschätzung der fibrinolytischen Aktivität von Plasma bzw. der Euglobulinfraktion geht auf Permin⁽⁹⁴⁾ bzw. Astrup und Müllertz zurück⁽⁹⁵⁾. Der Methode liegen die physiologischen Prinzipien der Hämostase und Fibrinolyse zugrunde. Thrombin katalysiert die Bildung von Fibrin aus Fibrinogen, welches einen Film auf dem Boden einer Petrischale bildet. Wahlweise wird auch Plasminogen hinzugegeben, entsprechend dem physiologischen Einbau von Plasminogen in das Gerinnsel. Die in dem Plasma, bzw. der Euglobulinfraktion enthaltenen Plasminogenaktivatoren führen während einer Inkubationszeit zu einer Lyse des Fibrins. Die Größe des Lysehofes ist proportional zur fibrinolytischen Aktivität der aufgetragenen Substanz. Es ist eine Art "Globaltest" mit semi-quantitativer Aussagekraft. Diese Methode hat zahlreiche Varianten erfahren^(20, 96-102). Wir verwenden eine Variante des Verfahrens von Klauser⁽⁹⁰⁾.

2.5.2.2. Durchführung

Für die Fibrinplatte werden 3 ml Fibrinogen 2%, 1 ml Plasminogen 120 µg/ml (2 CU/ml), 3 ml Agarose 1% (ca. +55°C) und 1 ml Thrombin 15 U/ml (8,46 NIH/ml) in einem vorgewärmten (+40°C) Röhrchen kurz gemischt und in eine vorgewärmte (+40°C) Petrischale (Ø 9 cm) gegossen. Die Fibrinplatte wird dann auf einem Heizblock für 5 Minuten bei +40°C waagrecht inkubiert und anschließend bis zum Gebrauch bei +4°C gelagert. Vor Gebrauch werden Löcher (Ø 5 mm) ausgestanzt. In diese Löcher werden 20 µl der Euglobulinfraktion (NEF/DEF) gegeben. Als Kontrolle dienen 20 µl humanes Plasmin 125 mU/ml. Inkubation der Fibrinplatte für 18 Stunden bei +37°C.

2.5.2.3. Auswertung

Nach Ende der Inkubationszeit wird der Durchmesser (d) der Lysiszone ausgemessen und die lysierte Fläche (F) durch Subtraktion der Fläche des Stanzloches berechnet. Die lysierte Fläche F (mm²) ist ein Maß der fibrinolytischen Aktivität.

Dabei gilt für Kreisflächen:

$$F = \pi \times r^2, \quad \text{wobei: } r = \frac{d}{2}.$$

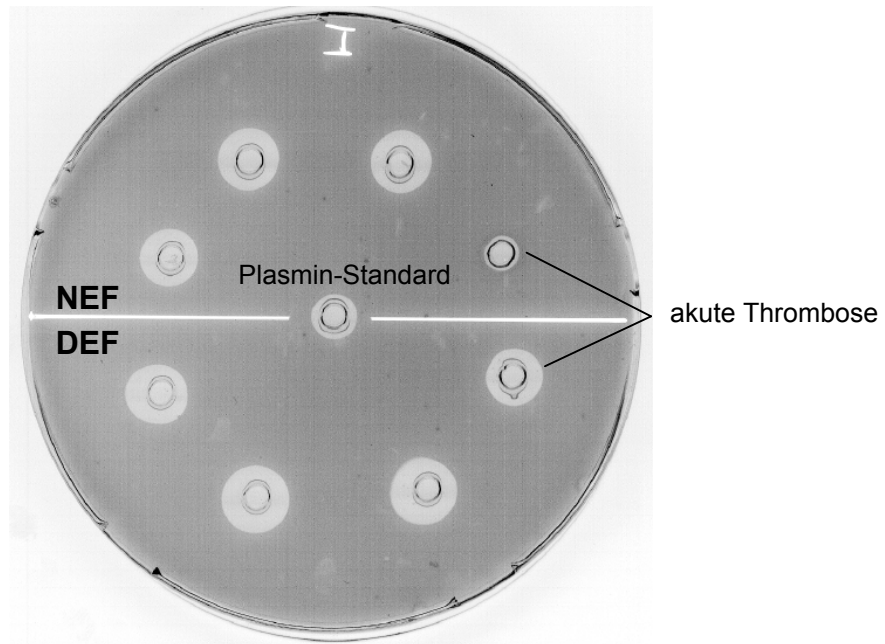


Abbildung 2.2. Fibrinplatte (3x Normalkollektiv, 1 akute Thrombose).

2.5.2.4. Fehlerquellen

- Bei zu langsamem Arbeiten während der Herstellung der Fibrinplatten kann es vorzeitig zum Erstarren der Agarose oder zur Bildung von Gerinnseln kommen.
- Bei nicht waagerechter Unterlage bei Herstellung der Fibrinplatte kann es zu ungleicher Schichtdicke kommen. Da immer nur der sichtbare Lysishof betrachtet wird und nicht das gesamte lysierte Fibrinvolumen, kann es zu Fehlinterpretationen der fibrinolytischen Aktivität kommen.
- Die Stanzlöcher dürfen nicht zu nahe am Schalenrand liegen, weil hier durch Adhäsion eine ungleichmäßige Schichtdicke vorliegt.
- Durch Schaumbildung des Fibrinogen-Plasminogen-Agarose-Gemisches ist eine glatte Oberfläche der Fibrinplatte nicht gewährleistet.
- Es ist auf korrekte Temperatur während der Inkubationsphase zu achten; durch zu hohe Temperaturen des Fibrinogen-Plasminogen-Agarose-Gemisches kann es zu Denaturierung von Proteinen kommen.
- Messungenauigkeiten beim Ablesen der Fibrinplatte können bei nicht exakt runden Lysehöfen entstehen.

2.6. Plasminogenaktivatorinhibitor (PAI) Aktivität

2.6.1. Prinzip

Für die Messung der Plasminogenaktivatorinhibitor (PAI) Aktivität im Plasma verwenden wir das Verfahren Berichrom[®] PAI der Firma Behring Diagnostics GmbH. Dieses Testverfahren entspricht einem zweistufigen, indirekten enzymatischen Assay. Im ersten Schritt wird dem Plasma eine bestimmte Menge Urokinase (u-PA) zugeführt. Die Menge ist so gewählt, dass sich u-PA gegenüber PAI im Überschuss befindet. Der PAI in der Probe inaktiviert die vorgelegte Urokinase durch rasche 1:1 Komplexbildung. Hauptsächlich wird der Inhibitor von Typ 1 in seiner Aktivität erfasst. Im zweiten Schritt wird die resultierende u-PA-Aktivität bestimmt. Dazu wird der Probe sowohl Glu-Plasminogen, als auch Chloramin T zugegeben. Chloramin T inaktiviert oxidativ α_2 -Antiplasmin, ähnlich wie schon bei der FC dargestellt. Ansäuerung und Verdünnung der Probe, wie bei anderen Bestimmungsverfahren von PAI, sind bei diesem Verfahren nicht notwendig. Auch eine Blutentnahme mit einem sauren Medium ist für die Stabilität des PAI nicht notwendig^(31, 86, 103-104). Die verbleibende u-PA-Aktivität katalysiert die Umwandlung von Glu-Plasminogen zu Plasmin. Das entstehende Plasmin hydrolysiert das chromogene Substrat (HD-Nva-CHA-Lys-pNA) zu freiem p-Nitroanilin (pNA). Die Zunahme der Absorption durch das entstehende freie pNA ist ein indirektes Maß für das umgesetzte Plasminogen und damit für die noch aktive Urokinase. Die Differenz zur zugegebenen Urokinase entspricht dem Anteil, der durch den PAI inhibiert wurde. Die Menge des freigesetzten pNA ist also umgekehrt proportional zur PAI-Aktivität der Probe. Die PAI-Aktivität der Plasmaprobe wird mit Hilfe eines laborinternen Faktors (F_L) bestimmt. Die PAI-Aktivitäten in Probe und Standard werden in urokinaseinhibierenden Einheiten/ml (U/ml) angegeben⁽⁸⁶⁾.

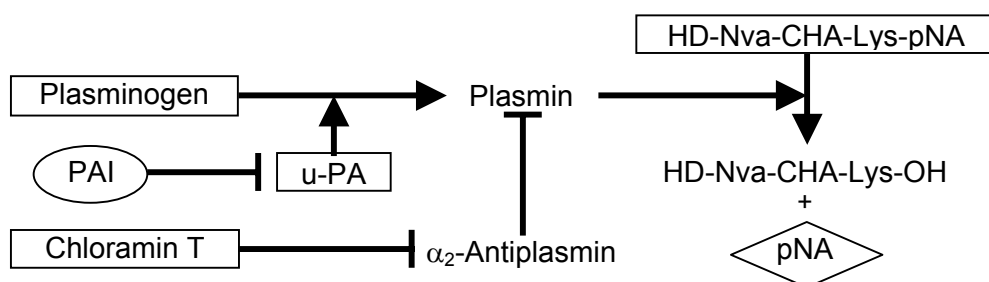


Abbildung 2.3. Prinzip des PAI Tests.

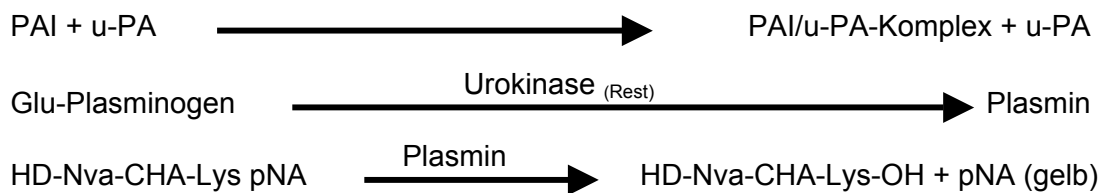


Abbildung 2.4. Durchführung des PAI Tests.

2.6.2. Durchführung

In eine 96-Loch MTP werden in Doppelansätzen jeweils 10 µl von PAI-Standard S1, S2, PAI-Kontrollplasma und der zu bestimmenden Plasmaprobe pipettiert. Dazu werden dann 20 µl vom Urokinase-Reagenz (5 IU/ml Urokinase) gegeben. Nach kurzer Mischung wird für 5 Minuten bei +37°C inkubiert. In dieser Zeit reagieren u-PA und PAI miteinander. Anschließend werden 40 µl Plasminogen-Reagenz (15 CTA-U/ml Glu-Plasminogen) und 40 µl Oxidans (1,8 g/l Chloramin T) hinzugeben. Dann wird wieder nach kurzer Mischung bei +37°C für 5 Minuten inkubiert. Abschließend werden 100 µl des verdünnten Plasmin-Substrates (0,6 mmol/l HD-Nva-CHA-Lys pNA) zugefügt. Es folgt dann eine kinetische Messung der Absorption der Standards, Proben und der Kontrolle im Photometer bei einer Wellenlänge von $\lambda = 405 \text{ nm}$. Die Messung erfolgt alle 60 Sekunden (+37°C) im Messbereich von 11. bis 16. Minute nach Messbeginn zur Ermittlung der Differenz der Absorptionen/Minute ($\Delta A_{405\text{nm}}/\text{min}$). In diesem Messbereich sind die Messungen annähernd linear. Der Mittelwert von $\Delta A_{405\text{nm}}/\text{min}$ des angegebenen Messbereiches wird zur Berechnung der PAI-Aktivität verwendet.

2.6.3. Auswertung

Die Auswertung der PAI-Aktivität im Plasma in U/ml erfolgt mit Hilfe eines laborinternen Faktors (F_L) aus den Standards S1 und S2. Dabei wird folgende Formel benutzt::

$$F_L = \frac{\text{PAI - Aktivität S2 (U/ml)}}{\Delta A/\text{min}_{S1} - \Delta A/\text{min}_{S2}}$$

Dieser Faktor wird für jede Messung einer MTP neu erhoben.

Für die PAI-Aktivität der Kontrolle und Proben gilt:

$$\text{PAI-Aktivität}_{\text{Probe}} \text{ (U/ml)} = F_L \times (\Delta A/\text{min}_{S1} - \Delta A/\text{min}_{\text{Probe}})$$

Die PAI-Aktivität wird in Urokinase inhibierenden Einheiten/ml (U/ml) angegeben. Bei starker Streuung der Analysewerte der Doppelbestimmung (>10%) wird die Messung

wiederholt. Der Referenzbereich für dieses Verfahren liegt zwischen 0,3 und 3,5 U/ml (10. und 90. Perzentile), der Median beträgt 1,1 U/ml ⁽¹⁰⁵⁾. Die Nachweisgrenze liegt bei 0,5 U/ml.

2.6.4. Fehlerquellen

- Die PAI-Aktivität zeigt starke tageszeitliche Schwankungen. Dies wurde bei der Probenentnahme nicht immer berücksichtigt.
- Nichteinhaltung der erforderlichen Zeiträume und Temperaturangaben.
- Die Proben sollten frei von Reagenzien sein, welche die Oxidation behindern.
- Verwendung von thrombozytenarmen Plasma, da Thrombozyten PAI enthalten.
- Pipettiergenauigkeit wegen der geringen Probenmenge von jeweils 10 µl. Dies wird durch die Doppelbestimmung kontrolliert.
- Verfärbung oder Trübung des Plasmas haben bei der geringen eingesetzten Plasmamenge nur untergeordnete Bedeutung.

2.7. Plasminogenaktivatorinhibitor 1 (PAI-1) Antigenkonzentration

2.7.1. Prinzip

Für die quantitative Bestimmung der PAI-1-Antigenkonzentration verwenden wir den ELISA TintElize[®] PAI-1 der Firma Biopool. Der Test basiert auf einem "Sandwichverfahren", ähnlich dem von Declerk beschriebenen ELISA ⁽¹⁰⁶⁾ und verwendet einen monoklonale Antikörper (mAB) gegen PAI-1 (MA-7D4B7). Im Assay werden aktiver, latenter und an t-PA oder u-PA gebundener PAI-1 nachgewiesen.

Jede Probe wird in zwei benachbarten MTP-Vertiefungen, der N- und A-Vertiefung, untersucht. Die A-Vertiefung enthält wandgebundenen anti-PAI-1-Antikörper und gelöste anti-PAI-1-Antikörper. Die N-Vertiefung enthält die gleiche Menge wandgebundene anti-PAI-1-Antikörper und gelöste nicht-anti-PAI-1-Antikörper. Während der Inkubation bindet der PAI-1 in der Probe an die wandgebundenen anti-PAI-1-Antikörper der N-Vertiefung, nicht jedoch an die der A-Vertiefung. Die Bindung von PAI-1 in der A-Vertiefung wird durch die gelösten anti-PAI-1-Antikörper verhindert, wodurch unspezifische Reaktionen von unspezifische Antikörpern in der Probe erfasst werden können. Nun erfolgt die Zugabe eines zweiten mit Peroxidase konjugierten anti-PAI-1-Antikörpers (Konjugat). Ungebundenes Material und überschüssige Antikörper werden durch Waschen entfernt. Anschließend wird ein Peroxidase-Substrat (ortho-Phenyl-

diamin, OPD) zugefügt. Das Substrat führt nach der Reaktion mit der antikörpergebundenen Peroxidase zu einem gelben Farbumschlag, welcher direkt proportional zur gebundenen Menge an konjugiertem Antikörper ist und somit auch zur PAI-1-Antigenkonzentration. Die Differenz des Farbumschlages von der N- und A-Vertiefung ist hochspezifisch für PAI-1 (ISAC = Immunological Specificity and Accuracy Control) ⁽¹⁰⁷⁾.

2.7.2. Durchführung

In jeweils benachbarte N- und A-Vertiefungen werden nach Rekonstitution der MTP mit 100 µl PET-Puffer 20 µl Probe und PAI-1-Standards pipettiert. Nach Zugabe von 50 µl Konjugat wird auf einem Mischer (500-600 rpm) für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach viermaligem Waschen der Vertiefungen mit PET-Puffer wird 200 µl Substrat zugegeben, und die Platte für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird die Stopplösung (3 mol/ Schwefelsäure) zugegeben, und die MTP für 10 Minuten in Dunkelheit zur Farbstabilisierung stehen gelassen. Die Messung der Absorption des Farbumschlages erfolgt bei einer Wellenlänge von $\lambda = 492 \text{ nm}$.

2.7.3. Auswertung

Zur Ermittlung der PAI-1-Antigenkonzentration wird die Absorptionsdifferenz (ΔA) zwischen Vertiefung N und A von allen Proben und PAI-1-Standards gebildet. Anhand der Kalibrationsreihe wird die PAI-1-Antigenkonzentration in ng/ml ermittelt. Der Referenzbereich liegt zwischen 4 und 43 ng/ml ($18 \pm 10 \text{ ng/ml}$, Korrelation zur PAI-1-Aktivität von $r = 0,80$) ⁽¹⁰⁶⁾. Die Nachweisgrenze liegt bei 0,5 ng/ml.

2.7.4. Fehlerquellen

- Die PAI-Aktivität zeigt starke tageszeitliche Schwankungen. Dies wurde bei der Probenentnahme nicht immer berücksichtigt.
- Es sollte nur thrombozytenarmes Plasma verwendet werden, da Thrombozyten PAI-1-Antigen enthalten.
- Beim Waschen muss auf komplette Füllung und Leerung der Vertiefungen geachtet werden. Sowohl Blasenbildung beim Waschen, als auch Austrocknen der Vertiefungen sind zu vermeiden.

2.8. Plasminogen (Plg)

2.8.1. Prinzip

Es wird das Verfahren Dade® Plasminogen Chromogen der Firma Dade AG verwendet⁽¹⁰⁸⁾. Bei dieser indirekten chromogenen Bestimmung wird der Probe Streptokinase im Überschuss zugefügt. Diese bildet mit dem in der Probe enthaltenen Plasminogen einen Komplex, der das chromogene Substrat hydrolysiert. Die Menge des freigesetzten p-Nitroanilins (pNA) ist proportional zur Plasminogenaktivität. Die kinetische Absorptionsmessung der Standards, Kontrollen und Proben erfolgt im Photometer ($\lambda = 405 \text{ nm}$, $+37^\circ\text{C}$). Dabei wird die Absorptionsdifferenz/Minute ($\Delta A_{405\text{nm}}/\text{min}$) ermittelt. Die Plasminogenaktivität wird in Prozent der Norm angegeben. Plasmininhibitoren, Fibrin- oder Fibrinogenabbauprodukte beeinträchtigen diesen Test laut Hersteller nicht.

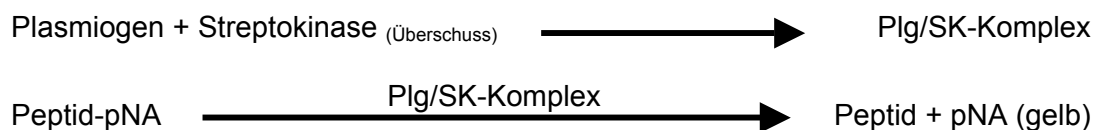


Abbildung 2.5. Durchführung des Plasminogen Tests.

2.8.2. Durchführung

Vor Messbeginn wird auf dem Analysegerät Cobas Mira Plus eine automatische Kalibrationskurve mit Standard-Human-Plasma erstellt, die vor jeder Messserie mit den Kontroll-Plasmen N und P überprüft wird. Es wird dabei die Plasminogenaktivität in Prozent des Standard-Human-Plasmas auf der Abszisse und die Differenz der Absorption/Minute ($\Delta A_{405\text{nm}}/\text{min}$) auf der Ordinate aufgetragen. Die Linearität der Kalibrationskurve reicht von 10 bis 130%. Die Analyse erfolgt automatisch, einem eingespeicherten Programm folgend.

verdünnte Probe 1:11 (Aqua destilata)	100 μl
Streptokinase-Reagenz	500 μl
Mischung und Inkubation für 3 Minuten bei $+37^\circ\text{C}$	
Substrat-Reagenz	500 μl
Mischung und Bestimmung von $\Delta A_{405\text{nm}}/\text{min}$	

Tabelle 2.8. Durchführung des Plasminogen Tests.

2.8.3. Auswertung

Die Plasminogenaktivität in Prozent wird anhand der Kalibrationskurve bestimmt. Werte <10% oder >130% werden nicht exakt erfasst, daher werden Messungen mit Analysewerten >130% in Verdünnung wiederholt. Für die Plasminogenaktivität der Kontrolle und Proben gilt:

$$\text{Plg}_{\text{Probe}} (\%) = \text{Plg}_{\text{S2}} (\%) + [F_L \times (\Delta A/\text{min}_{\text{Probe}} - \Delta A/\text{min}_{\text{S2}})]$$

Dabei ist: $F_L = \frac{\text{Plg}_{\text{S1}} (\%) - \text{Plg}_{\text{S2}} (\%)}{\Delta A/\text{min}_{\text{S1}} - \Delta A/\text{min}_{\text{S2}}}$ $s_1 = \text{Standard 1 mit 25\% Plasminogenaktivität}$
 $s_2 = \text{Standard 2 mit 100\% Plasminogenaktivität}$

Der Referenzbereich für dieses Verfahren liegt laut Hersteller zwischen 75 und 160%.

2.8.4. Fehlerquellen

- Werte <10% oder >130% werden nicht exakt erfasst.
- Nichteinhaltung der erforderlichen Zeiträume und Temperaturangaben.

2.9. α_2 -Antiplasmin (α_2 -AP)

2.9.1. Prinzip

Es wird das Testkit Dade® Alpha-2-Antiplasmin Chromogen der Firma Dade AG verwendet ⁽¹⁰⁹⁾. Bei dieser indirekten chromogenen Bestimmung wird Plasmin im Überschuss der Probe zugefügt. Dieses bildet mit dem in der Probe enthaltenen α_2 -Antiplasmin (α_2 -AP) einen Komplex. Die restliche freie Plasminmenge, die p-Nitroanilin (pNA) aus dem chromogenen Substrat freisetzt, ist umgekehrt proportional zum α_2 -Antiplasmingehalt der Probe. Die kinetische Absorptionsmessung der Standards, Kontrollen und Proben erfolgt im Photometer ($\lambda = 405 \text{ nm}$, $+37^\circ\text{C}$). Dabei wird die Absorptionsdifferenz/Minute ($\Delta A_{405\text{nm}}/\text{min}$) ermittelt. Die α_2 -Antiplasminaktivität wird in Prozent der Norm angegeben.

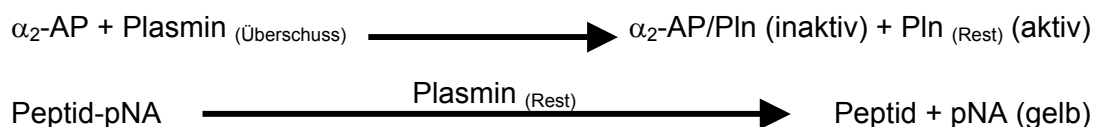


Abbildung 2.6. Durchführung des α_2 -Antiplasmin Tests.

2.9.2. Durchführung

Vor Messbeginn (Cobas Mira Plus) wird eine automatische Kalibrationskurve mit Standard-Human-Plasma erstellt, die vor jeder Messserie mit Kontroll-Plasmen N und P überprüft wird. Dabei wird die α_2 -Antiplasminaktivität des Standard-Human-Plasmas in Prozent auf der Abszisse und die Differenz der Absorptionen/Minute ($\Delta A_{405\text{nm}}/\text{min}$) auf der Ordinate aufgetragen. Die Linearität der Kalibrationskurve reicht von 0 bis 135%. Die Analyse erfolgt automatisch, einem eingespeicherten Programm folgend.

Verdünnte Probe 1:11 (Aqua destilata)	100 μl
Plasmin-Reagenz	500 μl
Mischung und Inkubation für 3 Minuten bei +37°C	
Substrat-Reagenz	500 μl
Mischung und Bestimmung von $\Delta A_{405\text{nm}}/\text{min}$	

Tabelle 2.9. Durchführung des α_2 -Antiplasmin Tests.

2.9.3. Auswertung

Die α_2 -Antiplasminaktivität in Prozent wird anhand der Kalibrationskurve bestimmt. Werte >135% werden nicht exakt erfasst, daher werden Messungen mit Analysewerten >135% in Verdünnung wiederholt. Für die α_2 -Antiplasminaktivität der Kontrolle und Proben gilt:

$$\alpha_2\text{-AP}_{\text{Probe}} (\%) = F_L \times (\Delta A/\text{min}_{S_0} - \Delta A/\text{min}_{\text{Probe}})$$

Dabei ist: $F_L = \frac{\text{Plg}_{S_1} (\%)}{\Delta A/\text{min}_{S_0} - \Delta A/\text{min}_{S_1}}$ $S_0 = \text{Standard 0, Null-Standard}$
 $S_1 = \text{Standard 1, Kalibrationsplasma}$

Der Referenzbereich für dieses Verfahren liegt laut Hersteller zwischen 80 und 128%.

2.9.4. Fehlerquellen

- Werte >135% werden nicht exakt erfasst.
- Nichteinhaltung der erforderlichen Zeiträume und Temperaturangaben.
- In einigen Fällen kann eine leicht Interferenz von α_2 -Makroglobulin nicht ausgeschlossen werden (z.B. Fälle, bei denen der α_2 -Antiplasmingehalt stark erniedrigt ist, oder bei einer hohen α_2 -Makroglobulinkonzentration).

- Plasma, das in Probenröhrchen gesammelt wird, die entweder Tranexamsäure, Aprotinin oder Heparin enthalten, darf laut Hersteller nicht verwendet werden, da die Konzentration dieser Substanzen den Test beeinflussen, während therapeutische Dosen geringe oder keine Auswirkungen zeigen.

2.10. D-Dimer

2.10.1. Prinzip

Wir verwenden den quantitativen turbidimetrischen Latex-Immunoassay IL Test™ D-Dimer der Firma Instrumentation Laboratory Co. Das IL Test™ D-Dimer-Reagenz ist eine Suspension aus Polystyren-Latexpartikeln einheitlicher Größe, die mit monoklonalen Antikörpern (MA-8D3), hochspezifisch für D-Dimer-haltige Fibrin-spaltprodukte, beschichtet sind. In Anwesenheit von D-Dimer im Plasma agglutinieren diese beschichteten Latexpartikel. Der Grad der Agglutination nimmt proportional zur D-Dimerkonzentration in der Probe zu. Die Bestimmung erfolgt durch die Messung der Absorption bei $\lambda = 405 \text{ nm}$, die mit dem Grad der Agglutination zunimmt. Die Ergebnisse werden in ng/ml dargestellt ⁽¹¹⁰⁾.

2.10.2. Durchführung

Vor Messbeginn (Cobas Mira Plus) wird eine automatische Kalibrationskurve mit D-Dimer-Kalibrator erstellt, die vor jeder Messserie mit D-Dimer-Kontrollen überprüft wird. Es wird dabei die D-Dimerkonzentration in ng/ml auf der Abszisse und die Differenz der Absorptionen/Minute ($\Delta A_{405\text{nm}}/\text{min}$) auf der Ordinate aufgetragen. Die nicht-lineare Kalibrationskurve umschließt den Bereich von 200 bis 1050 ng/ml.

Probe	95 μl
Reaktionspuffer	70 μl
Latex-Reagenz	90 μl
Mischung und Inkubation für 1 Minute bei +37°C	
Bestimmung von $\Delta A_{405\text{nm}}/\text{min}$ über 5 Minuten	

Tabelle 2.10. Durchführung des D-Dimer Tests.

2.10.3. Auswertung

Die D-Dimerkonzentration in ng/ml wird anhand der Kalibrationskurve bestimmt. Der Referenzbereich für dieses Verfahren liegt nach Angaben des Herstellers unterhalb des Cut-Off-Wertes zwischen 250 und 280 ng/ml.

2.10.4. Fehlerquellen

- Nichteinhaltung der erforderlichen Zeiträume und Temperaturangaben.
- Rheumafaktoren können zu falsch positiven Ergebnissen führen.
- Es besteht eine schwache Kreuzreaktion des monoklonalen Antikörpers (MA-8D3) mit Fibrinogenabbauprodukten (>20 µg/ml gereinigte Fragmente D und E).
- Plasmatrübungen (Hämoglobin >50 mg/dl, Bilirubin >5 mg/dl, Lipide >1000 mg/dl) können mit der Messung interferieren.

2.11. Thromboplastinzeit, aktivierte partielle Thromboplastinzeit, Fibrinogen, Antithrombin III, Faktor XII, ProC Global, Protein C und S, Akzelerin-Inaktivierung, APC-Resistenz, Faktor V-Leiden Genotypisierung

Die Thromboplastinzeit (TPZ) ⁽¹¹¹⁻¹¹³⁾ wird mit dem Test Dade Innovin (Dade International), die aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT) ⁽¹¹⁴⁻¹¹⁵⁾ mit dem Test Platelin LS (Organon Teknika) und STA Calciumchlorid (25 mmol/l CaCl₂) (Boehringer Mannheim), Fibrinogen (Fbg) ⁽¹¹⁶⁾ mit dem Test STA Fibrinogen nach Clauss (Boehringer Mannheim), Antithrombin III (AT III) ⁽¹¹⁷⁻¹¹⁸⁾ mit dem Testkit Accucolor[®] Antithrombin III (Sigma Diagnostics), Faktor XII (F XII) ⁽¹¹⁹⁾ mit F XII-Mangelplasma (Immuno) mit einer auf der aPTT beruhenden Testanordnung, Protein C (PC) ⁽¹²⁰⁾ mit dem Testkit STA Protein C Clotting (Boehringer Mannheim), Protein S (PS) ⁽¹²¹⁻¹²²⁾ mit dem Testkit STA Protein S Clotting (Boehringer Mannheim) auf dem automatisierten Gerinnungsanalysegerät STA (Boehringer Mannheim) laut Anweisungen der Hersteller gemessen.

Die antikoagulatorischen Kapazität des Protein C-Systems wird mit dem Testkit ProC Global (Behring) (PCG) ⁽¹²³⁻¹²⁴⁾ auf dem Gerinnungsanalysegerät STA (Boehringer Mannheim) bestimmt. Zur Messung der Protein C aktivitätsabhängigen Gerinnungszeit von ProC Global (PCAT): 100 µl Na-Citrat Plasma, 100 µl Aktivator-Reagenz und 100 µl APTT-Reagenz werden für 3 Minuten bei +37°C inkubiert, dann werden 100 µl CaCl₂ 25 mmol/l (+37°C) zugegeben und die Gerinnungszeit abgelesen. Zur Bestimmung des

PCAT-Leerwertes (PCAT/0) wird statt dem Aktivator-Reagenz Puffer zugegeben. Für die Berechnung des normalisierten Quotienten (PCAT-NR) gilt:

$$\text{PCAT - NR} = \frac{\left(\frac{\text{PCAT}}{\text{PCAT/0}} \right)^{\text{Probe}}}{\left(\frac{\text{PCAT}}{\text{PCAT/0}} \right)^{\text{SHP}}} \times \text{Sensitivitätswert für SHP}$$

Die APC-Resistenz wird mit dem Testkit Coatest® APC™ Resistance (Chromogenix) (APCR) ⁽¹²⁵⁻¹²⁶⁾ auf dem Koagulometer Coa Screener (Labor, Deutschland) bestimmt: 100 µl Na-Citrat Plasma und 100 µl APTT Reagenz werden für 3 Minuten bei +37°C inkubiert, dann werden 100 µl CaCl₂ 25 mmol/l (+37°C) zugegeben und die Gerinnungszeit gemessen. In einem zweiten Ansatz werden statt CaCl₂ 100 µl APC/CaCl₂ (+37°C) hinzugegeben. Für die Berechnung des APC Quotienten gilt:

$$\text{APC Ratio} = \frac{\text{Gerinnungszeit APC/CaCl}_2}{\text{Gerinnungszeit CaCl}_2}$$

Die Akzelerin-Inaktivierung (AKI) ⁽¹²⁷⁾, ein Test zur Diagnose von APC-Resistenz unter Antikoagulation, erfolgt unter Verwendung der Originalreagenzien vom Coatest® APC™ Resistance (Chromogenix) laut Anweisungen der Erstbeschreiber auf dem Koagulometer Coa Screener (Labor, Deutschland). Na-Citrat Plasma wird 1:20 mit Barbitol-Azetat-Puffer pH 7,6 (Behringwerke) verdünnt, 50 µl verdünntes Plasma werden mit 50 µl F V-Mangelplasma (Immuno) und 50 µl APTT Reagenz für 7 Minuten bei +37°C inkubiert, dann werden 50 µl APC/CaCl₂ (+37°C) zugegeben und die Gerinnungszeit gemessen. Die Ermittlung des Ergebnisses erfolgt in Prozent. Für die Referenzkurve wird die APC/CaCl₂-Lösung mit 25 mmol/l CaCl₂ verdünnt. Laut Definition ist die Akzelerin-Inaktivierung die Verdünnungsstufe der APC-Lösung in Prozent.

Faktor V Leiden Genotypisierung ⁽¹²⁸⁾ mit Isolation der genomischen DNA: 10 ml 0,8% TRITON X-100 werden zu 10 ml EDTA-Blut, welches einmal eingefroren und wieder aufgetaut wurde, hinzugefügt. Die Zellkerne werden mit 12000g für 30 Minuten bei RT abzentrifugiert und in 20 ml Lysis-Puffer (0,3 mol/l NaCl, 1,5 mol/l Harnstoff, 0,25% SDS, 10 mmol/l TRIS-HCl, 1 mmol/l EDTA) resuspendiert. Extraktion (zweifach) der DNA mit 20 ml Phenol-Chloroform, vor der Präzipitation der genomische DNA aus der wässrigen Phase durch Addition von 20 ml Isopropanol. Die DNA wird abzentrifugiert, einmal mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet, in H₂O resuspendiert und bei +4°C aufbewahrt. Ein 161 bp langes Fragment des Faktors V Gens, welches das Nukleotid

1691 enthält, wird mit der Polymerasekettenreaktion (PCR) amplifiziert. Die folgenden Primer werden verwendet I: 5'-TCT CTT GAA GGA AAT GCC CCA TTA-3' und II: 5'-GGG CTA ATA GGA CTA CTT CTA ATC-3'. Der Restriktionsansatz enthält 50 mmol/l NaCl, 10 mmol/l TRIS-HCl, pH 9,6; 10 mmol/l MgCl₂. 10 µl Puffer + 200 µmol/l dNTPs (New England Biolabs) + 50 pmol/l Primer + 2 µl genomische template DNA + 2,5 Units Ampli-Taq DNA-Polymerase (New England Biolabs). Nach initialer Denaturierung bei +94°C für 5 Minuten folgen 30 Zyklen bei: +93°C für 30 Sekunden, bei +61°C für 30 Sekunden, bei +72°C für 90 Sekunden mit einem finalen Elongationsschritt von 10 Minuten bei +72°C. Das PCR-Produkt wird verdaut mit 1 Unit Mnl I (New England Biolabs) für 2 Stunden bei +37°C. Die Restriktionsprodukte werden mit Elektrophorese im Agarosegel (3% Agarose in TAE-Puffer: 40 mmol/l TRIS-Azetat, 1 mmol/l EDTA) analysiert.

2.12. Qualitätskontrollen

Für alle dargestellten Parameter erfolgt eine interne Qualitätskontrolle. Die Qualitätskontrollen für die FC und die Fibrinplatte werden im Ergebnisteil vorgestellt und ausgewertet (Kapitel 3.1.5 und 3.2.2). Die Qualitätskontrollen für alle weiteren Parameter werden nicht dargestellt. Es erfolgt aber für diese Parameter nur dann eine Analyse, wenn die Kontrollproben im vorgeschriebenen Vertrauensbereich liegen.

2.13. Statistik

Die statistische Analyse unserer Daten erfolgt mit Hilfe des Programms SPSS 9.0. Zur Beschreibung unserer Ergebnisse verwenden wir folgende einfache Maßzahlen:

- Mittelwert und Median
- Standardabweichung, Variationskoeffizient und Interquartilbereich

2.13.1. Allgemeine Auswertungsmethoden

Zur Testung von vermuteten Aussagen (Hypothesen) über Zusammenhänge zwischen Merkmalen in der Grundgesamtheit werden aufgestellte Hypothesen gegenübergestellt und überprüft. Der Hypothese H_1 , die das Vorliegen eines solchen Zusammenhanges vermutet, wird die Gegenhypothese (Nullhypothese) H_0 gegenübergestellt, dass ein solcher Zusammenhang nicht existiert. Der empirisch beobachtete Zusammenhang des Merkmals in der Stichprobe kann auch zufällig bedingt sein. Es wäre auch möglich, dass der Zusammenhang des Merkmals in der Grundgesamtheit tatsächlich besteht. Um zu entscheiden, ob H_1 als statistisch gesichert angenommen werden kann, oder H_0

vorläufig beibehalten werden sollte, wird ein Signifikanztest durchgeführt. Wir formulierten H_0 als Punkthypothese (es besteht kein Unterschied), H_1 dagegen als zweiseitige Bereichshypothese (es besteht irgendeine Differenz). Die wahrscheinlichkeitstheoretischen Überlegungen gehen dann von der Annahme der Richtigkeit der Nullhypothese aus, und die Wahrscheinlichkeitsverteilung wird auf dieser Basis ermittelt. H_0 wird erst abgelehnt, wenn eine geringe Wahrscheinlichkeit von α , oder eine kleinere Wahrscheinlichkeit als α dafür spricht, dass der beobachtete Unterschied bei Geltung von H_0 zufällig zustande gekommen sein könnte. Die Hypothese H_1 (Alternativhypothese) wird indirekt über Zurückweisen von H_0 angenommen. Dabei bestehen zwei Möglichkeiten für Fehlentscheidungen: man kann sich sowohl fälschlicherweise für H_0 (Fehler erster Art = α) als auch für H_1 (Fehler zweiter Art = β) entscheiden. Das gewählte Signifikanzniveau α des Tests legt den Fehler erster Art fest. Wir legten für zweiseitige Tests die Signifikanzniveaus für signifikante Zusammenhänge bei $\alpha = 0,05$, für hoch signifikante Zusammenhänge bei $\alpha = 0,01$ fest. Die Wahrscheinlichkeit des Fehlers zweiter Art β verändert sich in nicht genau ermittelbarer Weise in Abhängigkeit von α (je geringer α , desto größer β), von der Stichprobengröße N und von der Differenz der verglichenen Werte.

Untersucht wird also die Wahrscheinlichkeit p für das Auftreten der Prüfgröße bei Geltung der Nullhypothese, bzw. die Irrtumswahrscheinlichkeit bei Geltung der Alternativhypothese eines zweiseitigen statistischen Tests. Ist $p < \alpha$, so entscheidet man sich für H_1 . Ist umgekehrt $p > \alpha$, so wird H_0 beibehalten. Nach Möglichkeit haben wir die exakte Wahrscheinlichkeit, oder die Schätzung der exakten Wahrscheinlichkeit mit Hilfe des Monte-Carlo-Verfahrens verwendet.

Bei den von uns ermittelten Werten konnte nicht immer von einer Normalverteilung ausgegangen werden. Aus diesem Grunde wurden zur Berechnung der Signifikanz hauptsächlich verteilungsunabhängige Tests herangezogen. Im einzelnen wendeten wir folgenden statistischen Tests an:

- χ^2 -Test nach Pearson
- Kruskal-Wallis H-Test
- Mann-Whitney U-Test
- Wilcoxon-Test für Paardifferenzen
- Pearson'scher Korrelationskoeffizient r

2.13.2. Lineare Regressionsanalyse

2.13.2.1. Lineare Abhängigkeit

Die Regressionsanalyse befasst sich mit der Untersuchung und Quantifizierung von Abhängigkeiten zwischen metrisch skalierten Variablen (der abhängigen und den unabhängigen Variablen). Wesentliche Aufgabe ist es, eine lineare Funktion zu finden, die die Abhängigkeit einer abhängigen Variablen \hat{y}_i von einer oder mehreren unabhängigen Variablen β_n quantifiziert, welche additiv von einer Zufallsvariablen ε_i überlagert wird.

$$\hat{y}_i = \beta_0 + \beta_n x_{n,i} + \varepsilon_i$$

Die Bezeichnung \hat{y}_i steht für die geschätzten y_i -Werte (Vorhersagewert). Sie symbolisiert, dass die Regressionsfunktion jedem beobachteten x_i -Wert nicht den tatsächlich beobachteten y_i -Wert zuordnet, sondern einem mittleren \hat{y}_i -Wert, der auf der Regressionsgeraden liegt. Der tatsächliche y_i -Wert liegt in der Regel oberhalb und unterhalb der Regressionsgeraden, kann aber auch auf die Gerade selbst fallen. Die Beobachtungswerte streuen folglich um die Regressionsfunktion. Die Abweichung $\varepsilon_i = (y_i - \hat{y}_i)$ wird Residualwert genannt und stellt die Abweichung des geschätzten vom beobachteten Wert dar. Für die Bestimmung der besten Anpassung (und damit der geringsten Streuung) unter theoretisch vielen Geraden wird im allgemeinen die Methode der Kleinsten Quadrate verwendet.

2.13.2.2. Methode der kleinsten Quadrate

Die Koeffizienten β_0 und β_n der linearen Regressionsfunktion werden so bestimmt, dass die Summe der quadrierten Residualwerte für alle Beobachtungen i ein Minimum annimmt:

$$\sum \varepsilon_i^2 = \sum (y_i - \hat{y}_i)^2 = \text{Minimum}$$

Ergebnis der Minimierung (mit Hilfe der partiellen Differentiation) sind zwei Bestimmungsgleichungen für die Koeffizienten β_0 und β_n . Diese werden interpretiert als die mittlere Änderung der zu erklärenden Variable \hat{y}_i , wenn die erklärende Variable β um eine Einheit variiert, unter der Bedingung, dass die anderen erklärenden Variablen β_n konstant gehalten werden. Die beta-Koeffizienten sind die Koeffizienten, die sich ergeben würden, wenn vor der Anwendung der Regressionsanalyse alle Variablen standar-

disiert worden wären. Mit der Standardisierung werden die Abweichungen der Messwerte der Variablen von ihrem Mittelwert in Standardabweichungen ausgedrückt:

$$z = \frac{x - \bar{x}}{s}$$

Im Unterschied zu den Regressionskoeffizienten sind die beta-Koeffizienten deshalb von der Dimension der erklärenden Variablen unabhängig und daher miteinander vergleichbar. Die Regressionskoeffizienten werden mit einem Student-t-Test auf Signifikanz geprüft.

Erklärende Variablen können auf unterschiedliche Weise in die Regressionsgleichung eingeschlossen werden. Beim Verfahren "Rückwärts" werden zunächst alle Variablen eingeschlossen. In Folgeschritten werden Variablen, die ein bestimmtes Ausschlusskriterium erfüllen, ausgeschlossen. Beim Verfahren "Vorwärts" werden die erklärenden Variablen Schritt für Schritt einbezogen, falls sie ein bestimmtes Einschlusskriterium erfüllen. Wir legen das Aufnahme- und Ausschlusskriterium bei den verwendeten Verfahren bei der kritischen Wahrscheinlichkeit von $p = 0,05$ des F -Wertes fest.

2.13.2.3. Bestimmtheitsmaß

Die Abweichung der Beobachtungswerte von ihren arithmetischen Mitteln $(y_i - \bar{y}_i)$ wird durch die Regressionsgerade in $(y_i - \hat{y}_i)$ und $(\hat{y}_i - \bar{y}_i)$ zerlegt. Da mittels der Regressionsgleichung die Variation der abhängigen Variable y statistisch durch die Variation der unabhängigen Variable β_n vorhergesagt werden soll, kann die Abweichung $(y_i - \bar{y}_i)$ als zu erklärende Abweichung interpretiert werden. Diese teilt sich in die nicht erklärte Abweichung $(y_i - \hat{y}_i)$ (den Residualwert ε) und die erklärte Abweichung $(\hat{y}_i - \bar{y}_i)$ auf. Es gilt also für jedes beobachtete Wertepaar i :

$$(y - \bar{y}) = (y - \hat{y}) + (\hat{y} - \bar{y})$$

Damit gilt auch

$$\sum (y - \bar{y})^2 = \sum (y - \hat{y})^2 + \sum (\hat{y} - \bar{y})^2$$

Das Bestimmtheitsmaß R^2 ist definiert als der Anteil der (durch die Variation der unabhängigen Variable) erklärten Variation an der gesamten Variation der abhängigen Variable:

$$R^2 = \frac{\sum (\hat{y} - \bar{y})^2}{\sum (y - \bar{y})^2} = \frac{\sum (y - \bar{y})^2 - \sum (y - \hat{y})^2}{\sum (y - \bar{y})^2} = 1 - \frac{\sum (y - \hat{y})^2}{\sum (y - \bar{y})^2}$$

Mit Hilfe des Bestimmtheitsmaßes R^2 wird also bestimmt, wie gut die gewonnene lineare Gleichung geeignet ist, die beobachtete Abhängigkeit der Variablen zu beschreiben bzw. vorherzusagen. R^2 wird maximal gleich 1, wenn $\sum (y - \hat{y})^2 = 0$ ist. Dieses ist gegeben, wenn für jedes Beobachtungspaar i $y = \hat{y}$ ist, d.h. dass alle Beobachtungspunkte des Streudiagramms auf der Regressionsgeraden liegen und damit alle Residualwerte gleich 0 sind. R^2 nimmt den kleinsten Wert 0 an, wenn $\sum (\hat{y} - \bar{y})^2 = 0$ bzw. $\sum (y - \bar{y})^2 = \sum (y - \hat{y})^2$ ist. Diese Bedingung beinhaltet, dass die nicht erklärte Variation der gesamten zu erklärenden Variation entspricht, d.h. die Regressionsgleichung erklärt gar nichts. Damit ist als Ergebnis festzuhalten:

$$0 \leq R^2 \leq 1$$

Das korrigierte Bestimmtheitsmaß R^2_{kor} ist kleiner als R^2 . Es stellt für vergleichende Beurteilungen von Regressionsgleichungen mit unterschiedlicher Anzahl von Erklärungsvariablen bzw. Beobachtungswerten ein besseres Maß für die Güte der Vorhersagequalität der Regressionsgleichung dar.

2.13.2.4. Varianzzerlegung und F-Test

Mit dem F -Test in der Varianzanalyse (analysis-of-variance, ANOVA) wird geprüft, ob mehrere Erklärungsvariablen gemeinsam einen regressionsanalytischen Erklärungsbeitrag leisten. Das Testen einzelner Regressionskoeffizienten auf Signifikanz erübrigt sich dadurch nicht. Für den F -Test wird die Variation (Summe der Abweichungsquadrate) der zu erklärenden Variable in die durch die Regressionsgleichung erklärte ("Regression") und nicht erklärte ("Residual") Variation zerlegt. In einem varianzanalytischen Test wird ein Quotient aus zwei auf Basis der Zerlegung der Variation vorgenommenen unterschiedlichen Schätzungen der Gesamtvarianz gebildet und mit dem F -Test geprüft, ob der Faktor einen statistisch signifikanten Einfluss auf die Kriteriumsvariable hat oder nicht. Die Testgröße F hat eine Verteilung mit $df_1 = k - 1$ und $df_2 = n - k$. Der F -Test kann auch als Signifikanzprüfung interpretiert werden, ob $R^2 = 0$ ist.

2.13.2.5. Modellannahmen

Damit die Methode der kleinsten Quadrate zu den besten Schätzwerten führt, und Signifikanzprüfungen für die Regressionskoeffizienten durchgeführt werden können,

werden für die Residualwerte ε_i (Zufallsvariable) folgende Eigenschaften ihrer Verteilung vorausgesetzt:

1. Die Residuen sind seriell unabhängig. Die Kovarianz der Residualwerte ist gleich 0, d.h. die Verteilungen der Residualwerte sind unabhängig voneinander. Ist die Bedingung nicht erfüllt, so besteht Autokorrelation von ε_i . Die Überprüfung der Kovarianz der Residualwerte für verschiedene Beobachtungen wird mit der Durbin-Watson-Statistik überprüft (0 \cong positive Autokorrelation, 2 \cong keine Autokorrelation, 4 \cong negative Autokorrelation).
2. Die Residuen haben konstante Varianz. Damit ist die Varianz von der Höhe der erklärenden Variablen unabhängig. Ist die Bedingung erfüllt, so besteht Homoskedastizität der Fehlervariable ε_i . Ist die Bedingung nicht erfüllt, so besteht Heteroskedastizität. Überprüft wird diese Voraussetzung mittels der Darstellung von Streudiagrammen der Residualwerte ε_i gegen die erklärenden Variablen β_n und der Residualwerten ε_i gegen die Vorhersagewerte \hat{y}_i .
3. Die Residuen folgen einer Normalverteilung. Die Prüfung auf Normalverteilung erfolgt mit dem Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstest. Diese Voraussetzung ist erforderlich, wenn Signifikanzprüfungen der Regressionskoeffizienten durchgeführt werden sollen.
4. Es liegt keine Multikollinearität der erklärenden Variablen vor. Dafür erfolgt eine Kollinearitätsdiagnostik zur Beurteilung der Stärke von Multikollinearität, d.h. der Abhängigkeit der erklärenden Variablen untereinander. Daraus leitet sich der Konditionsindex ab (10-30 moderate bis starke, >30 sehr starke Multikollinearität).

Die Kleinst-Quadrate-Schätzer der Regressionskoeffizienten sind unter den gemachten Annahmen optimal im statistischen Sinn. Die Schätzer sind die besten (kleinste Standardfehler) linearen erwartungstreuen (unverzerrten) Schätzer (Gauss-Markov-Theorem), wenn mindestens die Annahmen 1 und 2 erfüllt sind.

3. Ergebnisse

3.1. Beschreibung der Testeigenschaften der Fibrinolytischen Kapazität

Die Fibrinolytische Kapazität (FC) mit ihren Varianten (basale FC <150 und aktivierte FC <150) ist ein zweistufiger, indirekter enzymatischer Assay zur Beurteilung der fibrinolytischen Gesamtaktivität in Plasma. Ziel ist die globale Erfassung von Aktivatoren und Inhibitoren der Fibrinolyse.

3.1.1. Kontaktphaseaktivierung der FC mit Dextransulfat

Für die Aktivierung der Fibrinolyse ist, neben dem klassischen Weg über die Plasminogenaktivatoren t-PA und Urokinase, die Kontaktphaseaktivierung über Kallikrein und Faktor XIIa von großer Bedeutung. Die Kontaktphaseaktivierung mit Dextransulfat wird durchgeführt, um eine maximale Stimulation der Fibrinolyse zu simulieren. Die Stimulation der Fibrinolyse durch Dextransulfat, bzw. die Menge des generierten Plasmins in der aktivierten FC (a FC) zeigt eine glockenförmige Konzentrations-Wirkungsbeziehung mit einem Maximum bei 25-50 µg/ml Dextransulfat (50-100 nmol/l) (Abbildung 3.1.).

Im Vergleich dazu hat nicht-sulfatiertes Dextran, in äquimolarer Konzentration eingesetzt, keinen Effekt: die Werte der "aktivierten" FC liegen auf Höhe der basalen FC (b FC) (ohne Abbildung). Die Aktivierung beruht also auf den Sulfatresten des Dextran-

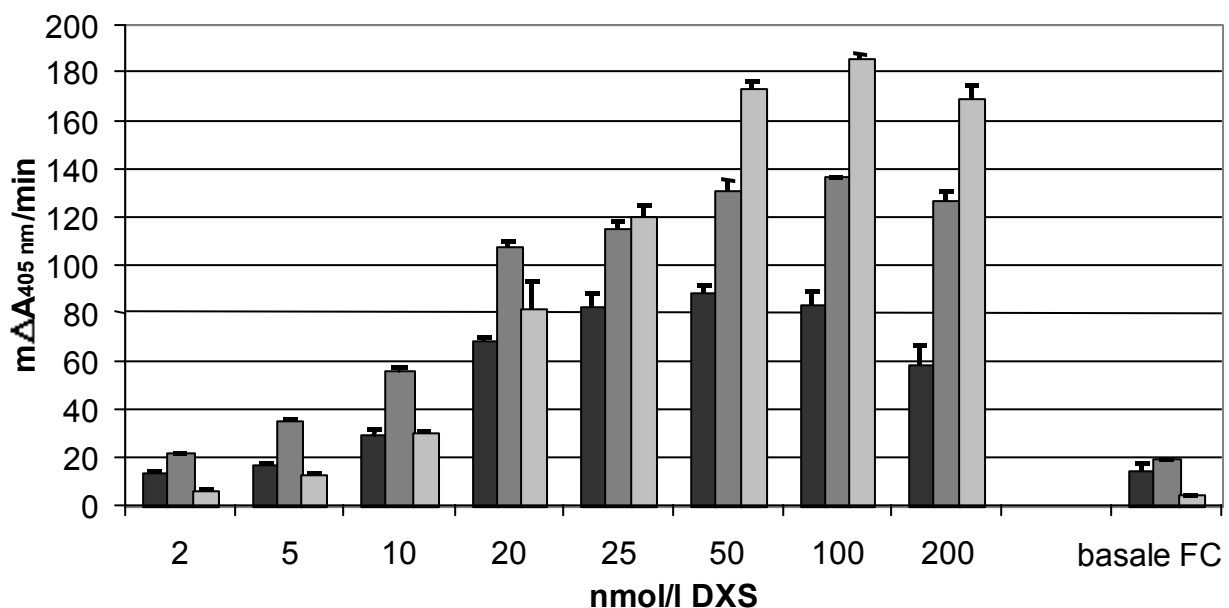


Abbildung 3.1. Kontaktphaseaktivierung der aktivierten FC mit Dextransulfat in ansteigender Konzentration (2-200 nmol/l) bei drei unterschiedlichen Plasmen (Plasma A ■, B ■, C ■) im Vergleich zur basalen FC (ohne DXS). (Mittelwert mit Standardabweichung als Fehlerbalken).

sulfats. Die Zugabe von Platelin LS[®] (SiO₂ und Phospholipid) als klassischem Kontaktphaseaktivator für den kontaktphaseabhängigen Gerinnungstest aPTT, zeigt im Vergleich zu Dextransulfat einen geringeren Aktivierungseffekt (ohne Abbildung).

3.1.2. Wirksamkeit der α_2 -Antiplasmininhibition

Ein wesentlicher Schritt bei der Durchführung der FC ist die Inaktivierung von α_2 -Antiplasmin. Ohne Inaktivierung von α_2 -Antiplasmin würde das im Testansatz generierte Plasmin sofort gehemmt werden. Wir verwenden ein oxidatives Verfahren durch Zugabe einer Oxidationslösung (Taurin-Hypochlorit, 4 mmol/l NaOCl im Gesamtansatz) zum Messansatz nach der ersten Inkubation von 5 Minuten. Neben der oxidativen Hemmung des α_2 -Antiplasmins besteht die Möglichkeit der Inaktivierung durch α_2 -Antiplasmin spezifische Antikörper.

In der Untersuchung der Konzentrations-Wirkungsbeziehung von Taurin-Hypochlorit auf α_2 -Antiplasmin (Abbildung 3.2.) tritt ab einer Konzentration von 8 mmol/l NaOCl in der Oxidationslösung eine vollständige Suppression der α_2 -Antiplasminaktivität mit maximaler Aktivierung der FC auf. Konzentrationen von 8 mmol/l und mehr NaOCl in der Oxidationslösung können jedoch zu Störeffekten der FC führen, weshalb wir eine Konzentration von 4 mmol/l NaOCl wählen. Bei dieser Konzentration liegt eine ausreichende Suppression der α_2 -Antiplasminaktivität vor.

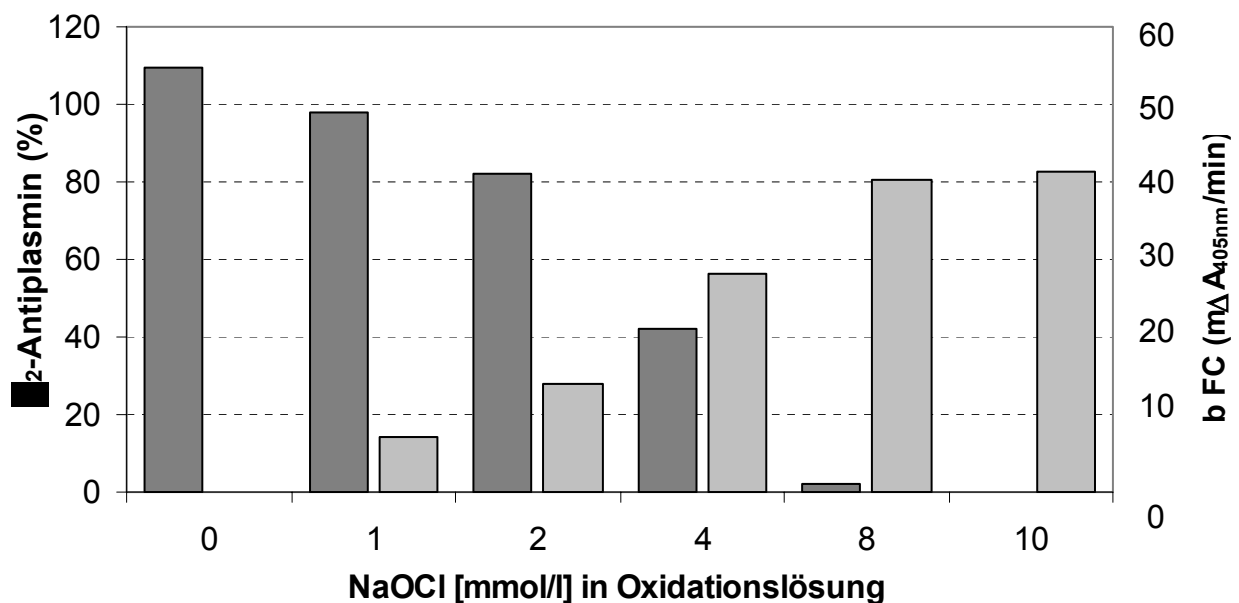


Abbildung 3.2. Wirksamkeit der Oxidationslösung in ansteigender Konzentration (0-10 mmol/l NaOCl) auf die α_2 -Antiplasminaktivität (■) und basale FC (▒) in einem repräsentativen Experiment.

Bei hoher α_2 -Antiplasminaktivität im Plasma kann daher eine mangelnde Inaktivierung mit erniedrigter FC folgen, bei niedriger α_2 -Antiplasminaktivität kann es zu oben genannten Störeffekten kommen. Andererseits spiegeln die unterschiedlichen α_2 -Antiplasminwerte die physiologische Fibrinolyse wider und tragen damit zum Gesamtbild der fibrinolytischen Kapazität bei, was durch den Test wiedergegeben werden soll.

3.1.3. Kalibration der FC

Zur Darstellung der Analysenergebnisse erfolgt die Kalibration der FC als Prozentangabe eines Normkollektives. Dafür wird ein Plasmapool Pool N (laborinterner Standard), der aus dem gepoolten Plasma unseres Normkollektives (gesunde Probanden) besteht, verwendet. Aus diesem Poolplasma wird mittels einer Verdünnungsreihe eine Eichkurve hergestellt. Diese wird mit einer Verdünnungsreihe des Standardnormalplasmas PreciClot I (PCI) verglichen. Dabei wird das Poolplasma als Referenz verwendet und gleich 100% FC gesetzt. Der Messwert des Standardplasmas PreciClot I wird daran entsprechend ermittelt, wobei die beiden Plasmen gut korrelieren (Abbildung 3.3.). FC-Werte größer 100% in der Verdünnungsreihe ergeben sich durch Vorverdünnungen des Plasmas im Messansatz, die geringer als 1:4 sind (Plasma-Vorverdünnung von 1:2 entspricht 200%).

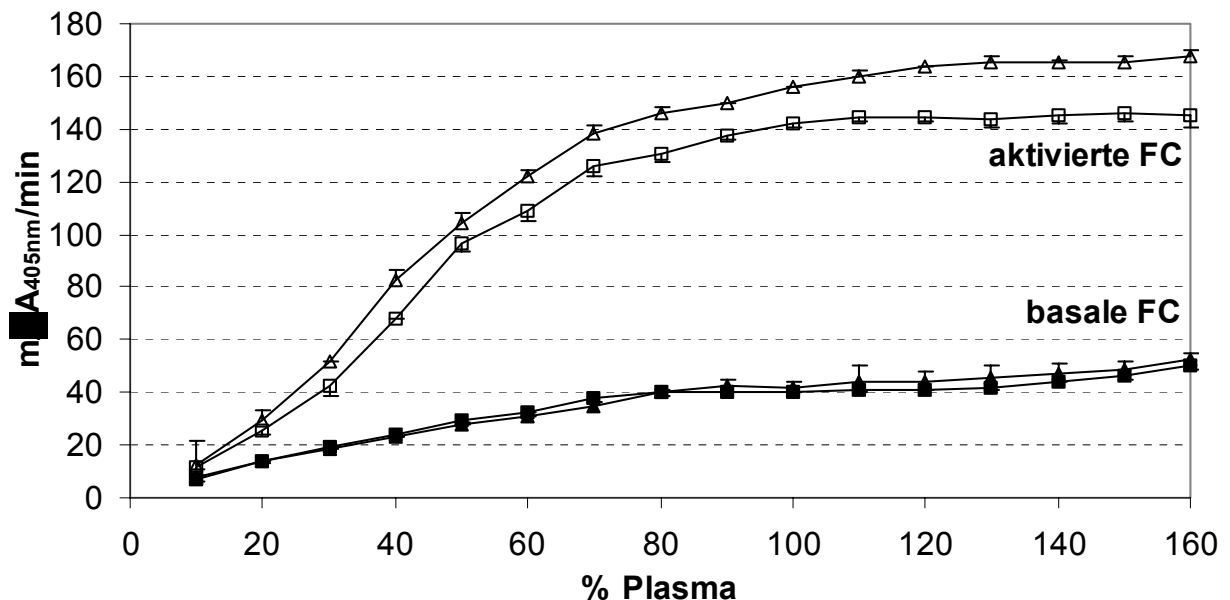


Abbildung 3.3. Kalibration der basalen und aktivierten FC [b FC und a FC] anhand zweier Plasma-Verdünnungsreihen. (Plasmapool [Pool N] u. Standardnormalplasma [PreciClot I = PCI]). (Mittelwert und Standardabweichung als Fehlerbalken bei Dreifachbestimmung). ▲ b FC Pool N, ■ b FC PCI, △ a FC Pool N, □ a FC PC

Deutlich wird hierbei, dass die FC nicht verdünnungsecht, und eine Extrapolation der Werte unzulässig ist. Im oberen Bereich der aktivierten FC wird die Auswertung ungenau, da dort ein geringer Anstieg der $\Delta A_{405nm}/min$ zu einem großen Anstieg der FC in Prozent führt. Wir verwenden zur Analyse unserer Kollektive nur FC-Werte kleiner 150%. Proben mit einer FC >150% wird der Wert 150% zugewiesen (b FC <150 und a FC <150).

3.1.4. Ermittlung des Referenzbereiches für die FC <150

Der Referenzbereich für die FC <150 wird anhand der Werte des Normalkollektives mit Hilfe des Kalibrationsplasmas in Prozent ermittelt (Kapitel 2.4.3.). Dabei ergeben sich für die basale FC <150 ein Mittelwert von 79,1% (Standardabweichung 38,2%) und ein Median von 63,6% (Quartilabstand 55,7%) und für die aktivierte FC <150 ein Mittelwert von 103,0% (Standardabweichung 32,7%) und ein Median von 91,8% (Quartilabstand 55,7%). Der Referenzbereich (90% der Werte) liegt für die basale FC <150 zwischen 34,2 – 150,0%, für die aktivierte FC <150 zwischen 63,2 – 150,0%. Da es sich hierbei nicht um normalverteilte Werte handelt, wird der Median als Referenzwert und der 90%-Bereich als Referenzbereich verwendet.

3.1.5. Präzision der FC <150

3.1.5.1. Unpräzision von-Tag-zu-Tag (Inter-Assay Variabilität)

Kontrollplasma	N	Mittelwert	Standardabweichung	Variationskoeffizient
b FC <150	28	7,91	1,61	20,29
a FC <150	28	54,84	1,78	3,25

Tabelle 3.1. Unpräzision der basalen FC <150 und aktivierten FC <150 von-Tag-zu-Tag (Inter-Assay Variabilität) des Kontrollplasmas anhand von Mittelwert, Standardabweichung und Variationskoeffizient.

Die Unpräzision von-Tag-zu-Tag wird mittels des Kontrollplasmas ermittelt. Sämtliche Kontrollen der jeweils ersten Assay-Platte des Tages werden erfasst und ausgewertet. Die Verteilung der Kontrollwerte ist auch im Test auf Normalverteilung (Kolmogorov-Smirnov (Liliefors)) normalverteilt. Alle Werte der Kontrollserien liegen, bis auf drei Ausnahmen, innerhalb des 3-Sigma-Bereiches. Bei der basalen FC <150 ist der Variationskoeffizient (Standardabweichung im Verhältnis zum Mittelwert), bedingt durch den niedrigen Mittelwert, sehr hoch (20,3%) (Tabelle 3.1.).

3.1.5.2. Unpräzision in der Serie (Intra-Assay Variabilität)

Kontrollserien	N	Mittelwert	Standardabweichung	Variationskoeffizient	
Serie 1	b FC <150	44	29,00	2,01	6,94
	a FC <150	44	57,61	2,09	3,63
Serie 2	b FC <150	21	34,10	1,78	3,46
	a FC <150	21	67,95	3,34	4,91
Serie 3	b FC <150	24	29,17	1,01	3,45
	a FC <150	24	60,13	1,04	1,72

Tabelle 3.2. Unpräzision der basalen FC <150 und aktivierten FC <150 in der Serie (Intra-Assay Variabilität) der drei Kontrollserien anhand von Mittelwert, Standardabweichung und Variationskoeffizient.

Die Unpräzision in der Serie wird mit 3 unterschiedlichen Plasmen untersucht. Alle Werte der Kontrollserien liegen innerhalb des 3-Sigma-Bereiches, wie auch die Dispersionsmaße Standardabweichung und Variationskoeffizient in einem vertretbarem Bereich (Tabelle 3.2.) liegen.

3.1.6. Einflussgrößen auf die FC

3.1.6.1. Einfluss von PAI-1 auf die FC

Die PAI-1-Aktivität in einer Probe kann durch den Übergang von der aktiven zur latenten Form abnehmen. Um PAI-1 in seiner aktiven Form zu stabilisieren, kann zum Beispiel eine Ansäuerung der Probe durchgeführt werden. Idealerweise wird dann bei der Blutentnahme saures Na-Citrat (pH 4,2) verwendet. Für die Bestimmung von PAI-1 mit den von uns angewendeten Analyseverfahren (Berichrom[®]-PAI [Aktivität], TintElize[®] PAI-1 [Antigenkonzentration]) ist kein besonderes Blutentnahmemedium außer normales Citrat vorgesehen, sofern die Probe rasch zentrifugiert und tiefgefroren wird. Zum Nachweis der ausreichenden Stabilität von PAI-1 im normalem Citrat (NC) untersuchten wir die PAI Aktivität (U/ml, Berichrom[®]-PAI), die PAI-1-Antigenkonzentration (ng/ml, TintElize[®] PAI-1) und die FC von Proben in normalem (NC) und saurem Citrat (SC) dreier Personen (Abbildung 3.4. und Abbildung 3.5. Probe I-III). Diese Proben wurden unterschiedlichen Verarbeitungen unterzogen: Bei einer Hälfte des Materials (B) wurden verschiedene Zeiten (0 bis 4 Stunden) für die Verarbeitung von antikoaguliertem Vollblut zu Plasma mit anschließender Tiefkühlung (-70°C) gewählt, für die andere Hälfte (P) verschiedene Zeiten (0 bis 4 Stunden) bis zur Tiefkühlung (-70°C) des bereit abzentrifu-

gierten Plasmas. Dadurch entstanden unterschiedliche Standzeiten sowohl für antikoaguliertes Vollblut, als auch für Plasma bei Raumtemperatur.

Im Vergleich von normalem (NC) zu saurem (SC) Citrat können wir zeigen (Abbildung 3.4.), dass normales Citrat die PAI Aktivität (U/ml, Berichrom®-PAI) ausreichend im Blut und Plasma für >2 Stunden stabilisiert. Dabei fällt in der ersten Stunde ein leichter Abfall der PAI-1-Aktivität bei Proben mit Standzeiten für antikoaguliertes Vollblut (B) und ein leichter Anstieg der PAI-1-Aktivität bei Proben mit Standzeiten für zentrifugiertes Plasma (P) auf. Bemerkenswert ist die Zunahme der PAI-1-Antigenkonzentration (ng/ml, TintElize® PAI-1) bei Proben mit Standzeiten für antikoaguliertes Vollblut (B), und die Abnahme der PAI-1-Antigenkonzentration bei Proben mit Standzeiten für zentrifugiertes Plasma (B), besonders in der ersten Stunde und vor allem bei normalem Citrat.

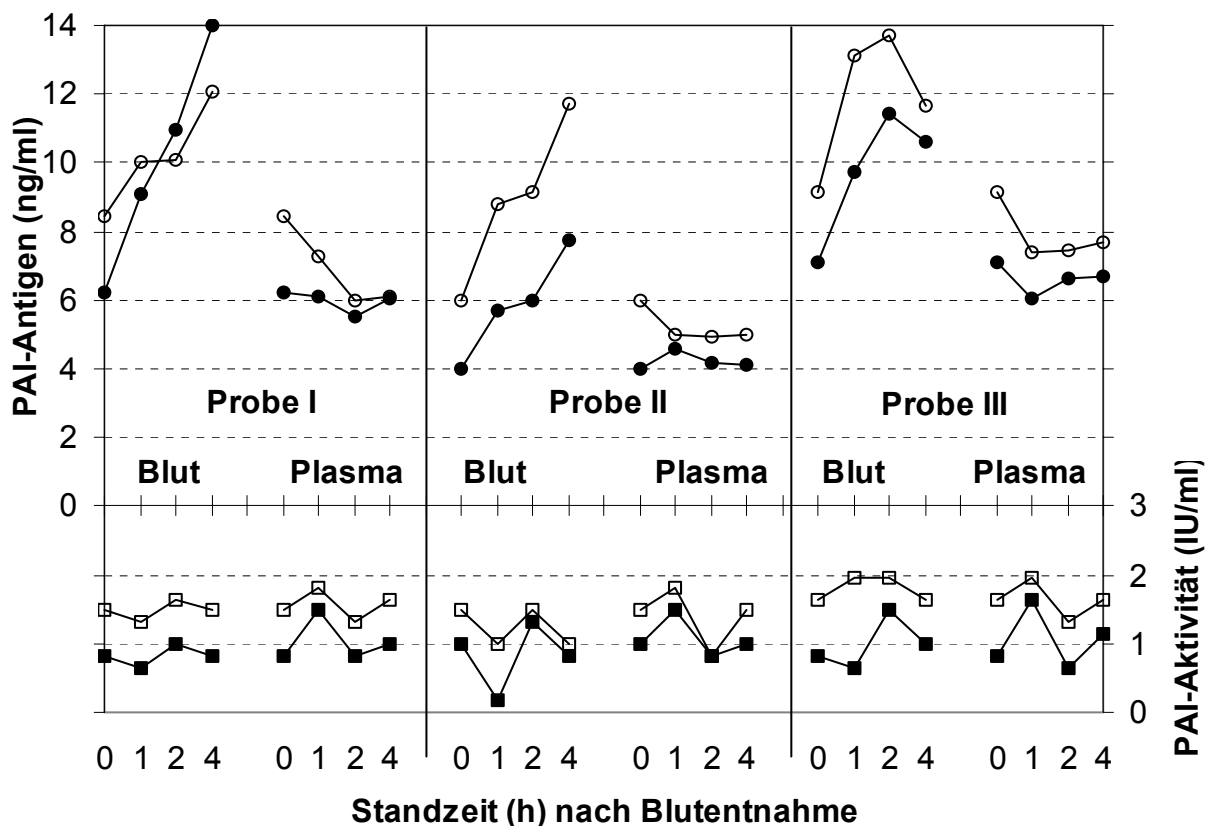


Abbildung 3.4. Probenstabilität von PAI-1 (PAI-Aktivität [U/ml, □ ■] und PAI-1-Antigenkonzentration [ng/ml, ○ ●]) im Vergleich von normalen (NC, offene Symbole) zum saurem Citrat (SC, geschlossene Symbole) in Abhängigkeit von den Standzeiten (0 bis 4 Stunden) nach Blutentnahme für Vollblut und Plasma (Mittelwert und Standardabweichung als Fehlerbalken bei Dreifachbestimmung).

Für die FC können wir aufweisen (Abbildung 3.5.), dass kein relevanter Unterschied zwischen normalem und saurem Citrat besteht. Erkennbar ist eine leichte Abnahme der FC-Werte in der ersten Stunde bei zunehmenden Standzeiten, sowohl für normales als auch für saures Citrat. Aufgrund dieser nur geringfügigen zeitabhängigen Veränderungen haben wir uns entschlossen, kein besonderes Blutentnahmemedium für die Bestimmungen von FC und PAI einzusetzen, und die Proben innerhalb einer Stunde zu verarbeiten (Zentrifugation und Tiefkühlung bei -70°C).

Des Weiteren haben wir die, in der basalen FC eingesetzte, Plasma-Vorverdünnung ($50\ \mu\text{l}$, 1:4) mit PAI-1 (0,4 bis 1600 IU/ $50\ \mu\text{l}$) angereichert (Abbildung 3.6.), wodurch die Sensitivität der FC auf PAI-1 deutlich wird. Es ist zu erwarten, dass eine äquimolare Interaktion von PAI-1 und Urokinase erkennbar sein muss. Bei etwa äquimolaren Konzentrationen von PAI-1 und Urokinase ($7,26\ \text{IU/ml}$, $360\ \text{mIU}/50\ \mu\text{l}$) ist die Aktivität der Urokinase soweit inhibiert, dass die Generierung von Plasmin in der FC zum Erliegen kommt.

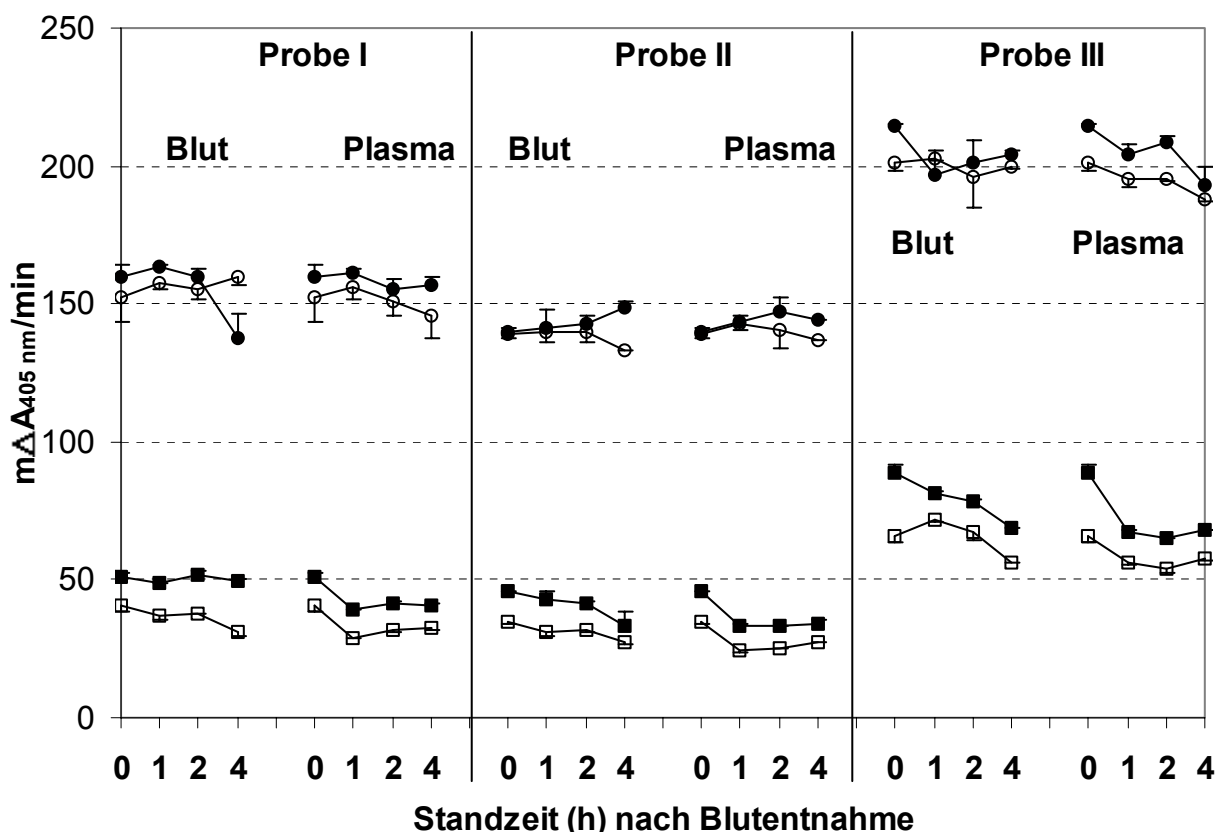


Abbildung 3.5. Probenstabilität in der basalen FC (□ ■) und aktivierten FC (○ ●) ($m\Delta A_{405\text{nm}}/\text{min}$) im Vergleich von normalen (NC, offene Symbole) zum saurem Citrat (SC, geschlossene Symbole) in Abhängigkeit von den Standzeiten (0 bis 4 Stunden) nach Blutentnahme für Vollblut und Plasma (Mittelwert und Standardabweichung als Fehlerbalken bei Dreifachbestimmung).

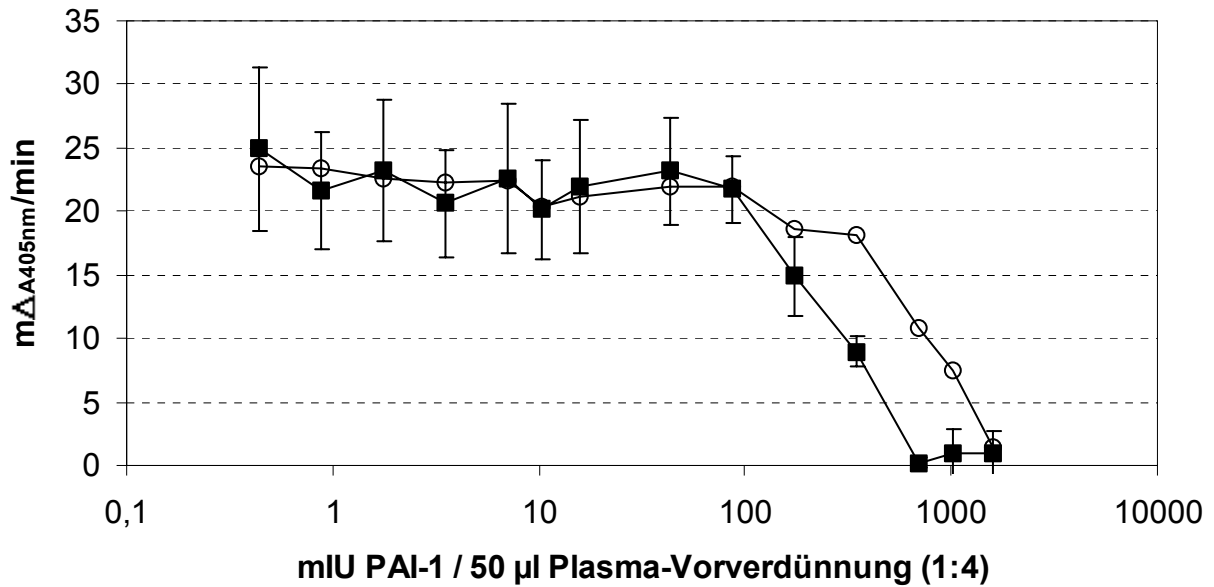


Abbildung 3.6. Einfluss von PAI-1 in ansteigender Konzentration auf die basale FC im Mittelwert von vier unterschiedlichen Plasmen ■ mit Standardabweichung als Fehlerbalken und auf eine Plasminogenlösung ○ (Plasminogen 250 ng/50 µl).

3.1.6.2. Einfluss von Plasminogen auf die FC

Wir haben bei vier Plasmen den Einfluss von Plasminogen auf die FC untersucht (Abbildung 3.7.). Durch die ansteigende Plasminogenkonzentration nivellieren sich die

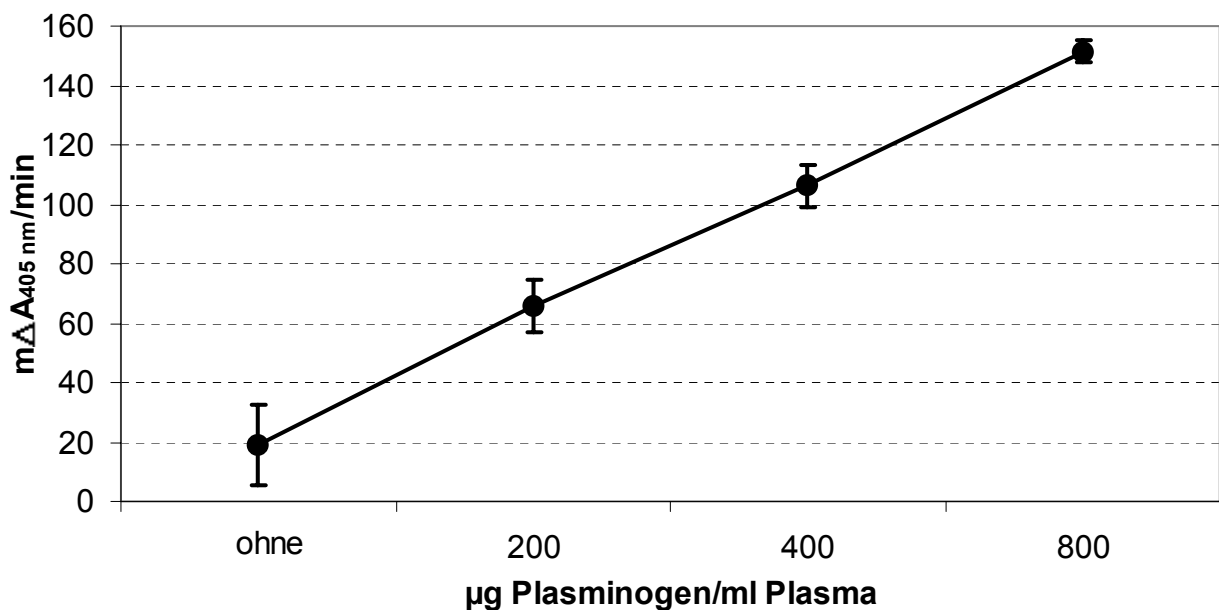


Abbildung 3.7. Einfluss von Plasminogen in ansteigender Konzentration (0 – 800 µg Plasminogen/ml Plasma) auf die basale FC im Mittelwert vier unterschiedlicher Plasmen mit Standardabweichung als Fehlerbalken.

Unterschiede der einzelnen Plasmen, was sich durch die kleiner werdenden Standardabweichungen zeigt.

3.1.6.3. Einfluss von Fibrinogen auf die FC

Um den Einfluss von Fibrinogen auf die FC zu untersuchen, haben wir Plasmen mit Fibrinogen (Haemocompletan[®]) angereichert (ohne Abbildung). Ein Einfluss ist in diesem Modell nicht feststellbar.

3.1.7. Störgrößen der FC

3.1.7.1. Einfluss von Antioxidantien auf die FC

Um den Einfluss von Antioxidantien (z.B. Ascorbinsäure) auf die FC zu sehen, haben wir sowohl den In-vitro-Effekt, als auch den In-vivo-Effekt von Ascorbinsäure untersucht. Durch Herstellung einer Mischlösung aus Oxidationslösung und Ascorbinsäure (im Gesamtansatz FC: 4 mmol/l NaOCl und 0,08 - 10 mmol/l Ascorbinsäure; Normbereich Ascorbinsäure im Serum: 0,4 – 1,0 mg/dl, 23 – 57 μ mol/l) wird die direkte Interaktion der beiden in einem In-vitro-Modell dargestellt. Diese Mischlösung wird nach der ersten fünfminütigen Inkubation des Messansatzes zugegeben (Abbildung 3.8.). Es zeigt sich ab einer Ascorbinsäurekonzentration von 0,63 mmol/l im Gesamtansatz (bei 4 mmol/l NaOCl in der Oxidationslösung) ein deutlicher Abfall der FC-Werte. Solche Ascorbinsäurewerte entsprechen etwa der zehnfachen physiologischen Serumkonzentration.

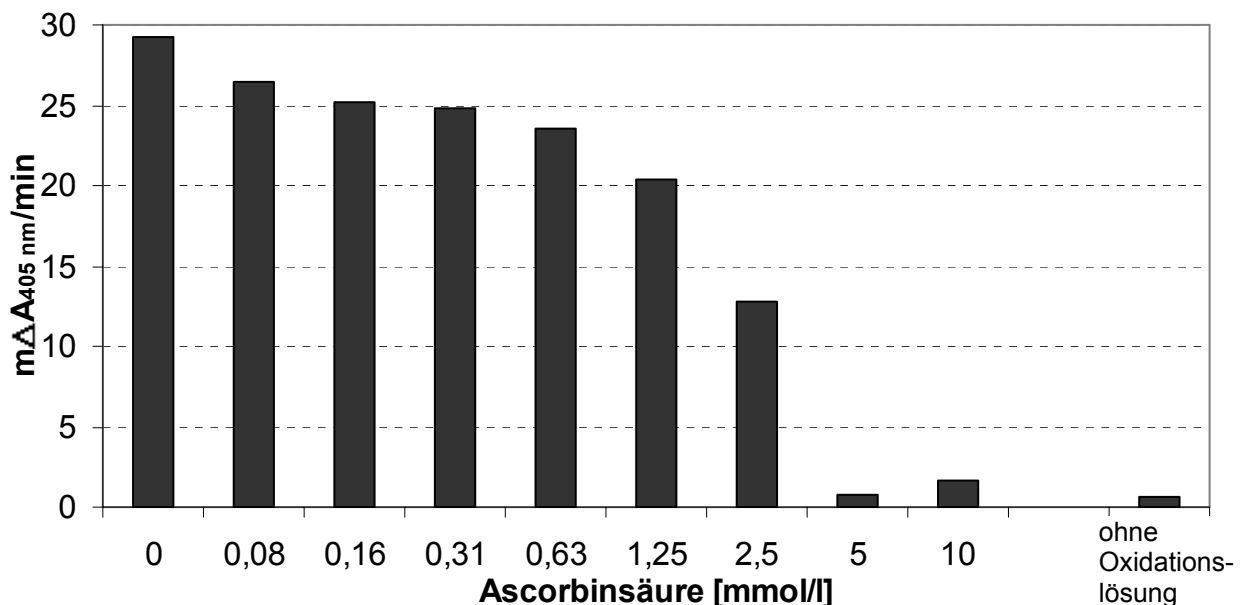


Abbildung 3.8. Wirkung von Ascorbinsäure in ansteigender Konzentration auf die basale FC im Vergleich zur FC ohne Oxidationslösung.

Äquimolare Konzentrationen von Ascorbinsäure zu NaOCl in der Oxidationslösung erzeugen Werte, die der Abwesenheit der Oxidationslösung entsprechen.

Da das Plasma selbst antioxidative Eigenschaften hat, untersuchten wir in einem In-vivo-Modell das Plasma von zwei Personen (1 und 2) vor (■) und zwei Stunden nach (▒) oraler Einnahme von 3 g Ascorbinsäure in Form von Vitamin C-Brausetabletten (Abbildung 3.9.). Bei der Person 1 (Abbildung 3.9. 1 A/B) zeigt sich auch bei abnehmender Konzentration an NaOCl in der Oxidationslösung keine Veränderung der Werte für die FC vor Einnahme zu 2 Stunden nach Einnahme von 3 g Ascorbinsäure. Bei Person 2 (Abbildung 3.9. 2 A/B) zeigen sich leichte Veränderungen in der FC beim Vergleich vor Einnahme zu 2 Stunden nach Einnahme von Ascorbinsäure.

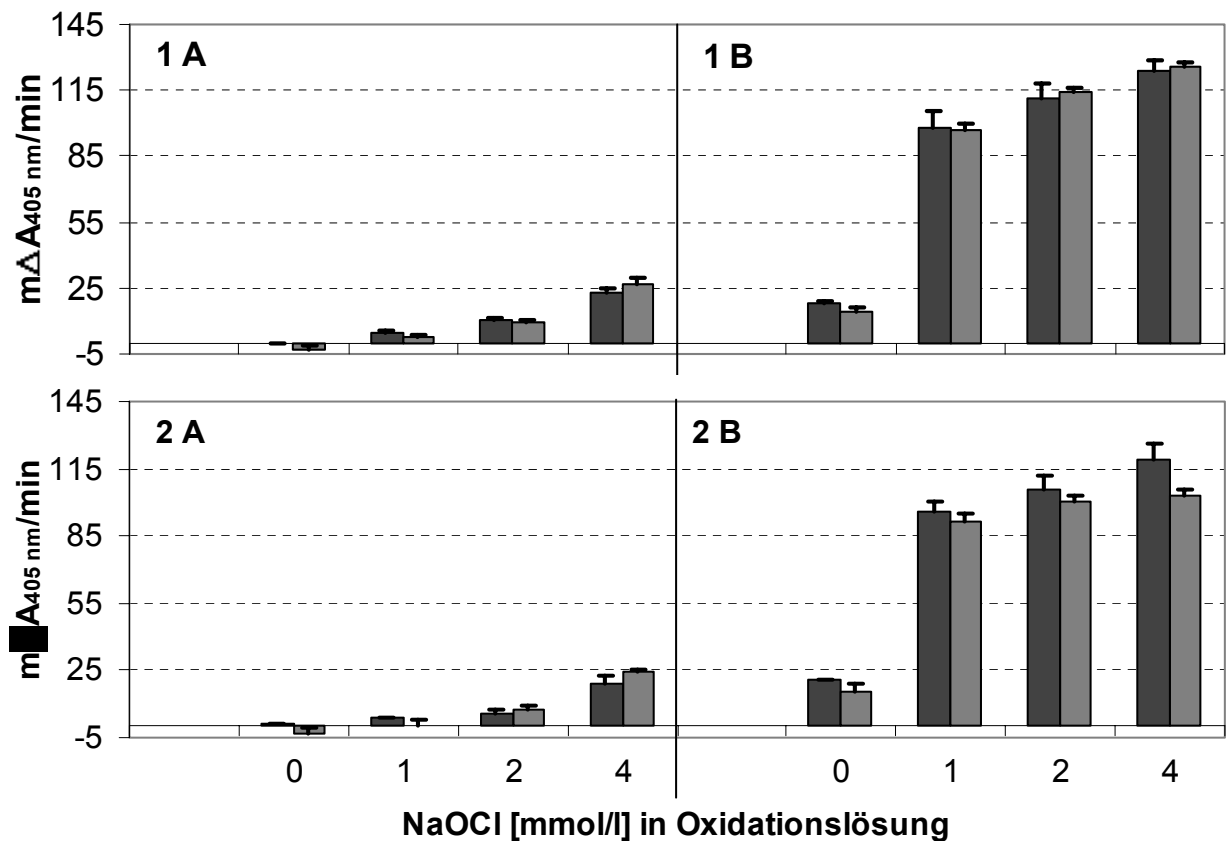


Abbildung 3.9. Wirkung oral eingenommener Ascorbinsäure (3 g Vit. C BT) auf die basale FC (A) und aktivierte FC (B) zweier Personen (1 und 2) unter ansteigender Konzentration von NaOCl in der Oxidationslösung. FC vor (■) und nach (▒) Einnahme von Ascorbinsäure (Mittelwert und Standardabweichung als Fehlerbalken bei Dreifachbestimmung).

3.1.7.2. Einfluss von parenteralen Antikoagulantien auf die FC unfraktioniertes Heparin, niedermolekulares Heparin (Nadroparin), Heparinoid (Danaparoid), Hirudin (Lepirudin)

Fibrinolyseuntersuchungen bei Patienten mit Thrombophilieverdacht werden oftmals erst dann vorgenommen, wenn eine therapeutische Maßnahme bereits eingeleitet worden ist. Daher ist es von besonderer Wichtigkeit zu untersuchen, ob ein Fibrinolysetest durch eine antikoagulatorische Therapie beeinflusst wird. An erster Stelle sind hier die parenteral verabreichten Antikoagulantien von Bedeutung, d.h. unfraktioniertes Heparin (Liquemin N[®]), niedermolekulare Heparine (Nadroparin, Fraxiparin[®]), Heparinoide (Danaparoid, Orgaran[®]), und Hirudin (Lepirudin, Refludan[®]). Zur Untersuchung des Einflusses von parenteral verabreichten Antikoagulantien analysierten wir das Plasma Pool N, bestehend aus dem gepoolten Plasma unseres Normalkollektives (gesunde Probanden) mit den oben genannten Antikoagulantien (Abbildung 3.11. A -D).

Es zeigt sich, dass die Antikoagulation mit Heparinen (unfraktioniert und niedermolekular) zu einer deutlichen Verminderung der Werte für die FC (sowohl für die basale FC als auch für die aktivierte FC) führt (Abbildung 3.11. A und B). In einem niedrigen Dosisbereich (kleiner als 0,4 IE Liquemin oder Fraxiparin/ml Plasma) wird ein leichter Aktivierungseffekt von unfraktionierten und niedermolekularen Heparinen sichtbar. Dies ist

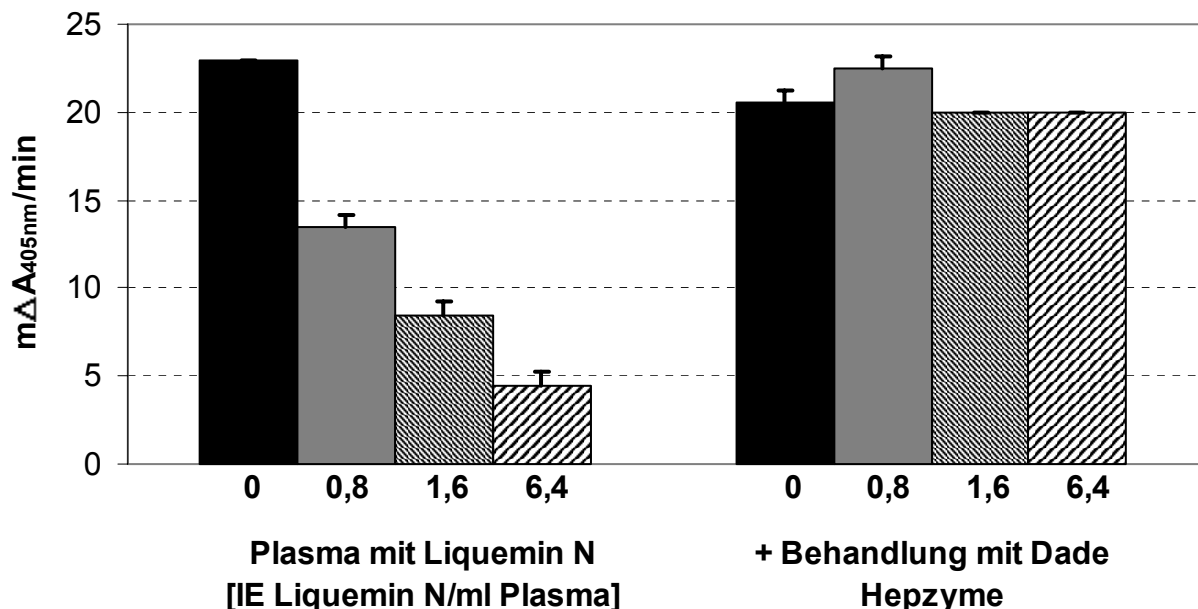


Abbildung 3.10. Wirkung von Heparinase (Dade Hepzyme[®]) auf die basalen FC mit unfraktioniertem Heparin (Liquemin N[®]) angereichertem Plasma in ansteigender Konzentration (0 bis 6,4 IE Liquemin N[®]/ml Plasma) (Mittelwert und Standardabweichung als Fehlerbalken bei Dreifachbestimmung).

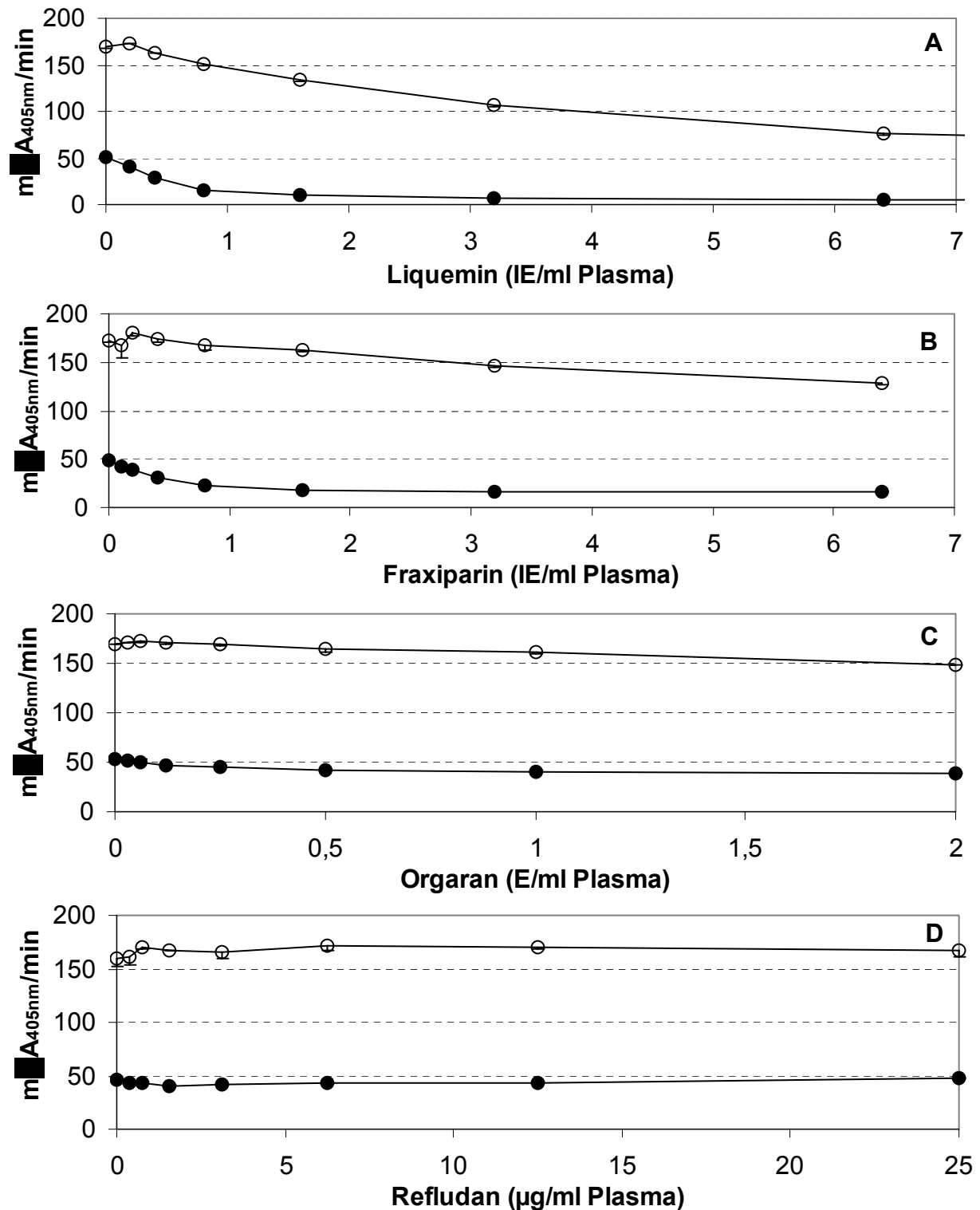


Abbildung 3.11. Einfluss von parenteral verabreichten Antikoagulantien (unfraktioniertes Heparin [Liquemin[®], **A**] niedermolekulares Heparin [Nadroparin, Fraxiparin[®], **B**] Heparinoid [Danaparoid, Orgaran[®], **C**] Hirudin [Lepirudin, Refludan[®], **D**]) in ansteigenden Konzentrationen auf die basale FC (●, unten) und aktivierte FC (○, oben) von Pool N (Mittelwert und Standardabweichung als Fehlerbalken bei Dreifachbestimmung).

durch Bindung von Heparin an Heparinbindungsstellen von two-chain u-PA sowie single-chain t-PA erklärbar, wodurch die Plasminogenaktivatoraktivität steigt und das fibrinolytische System moduliert wird ⁽¹²⁹⁾. Die Antikoagulation mit dem Heparinoid Orgaran[®] (Abbildung 3.11. C) und dem Hirudin Refludan[®] (Abbildung 3.11. D) zeigen in therapeutischen Dosen diese Effekte zwar auch, aber in deutlich geringerem Ausmaß, so dass man von keiner relevanten Beeinflussung ausgehen kann. Dies veranlasst uns bei allen mit Heparinen antikoagulierten Patienten eine Behandlung des Plasmas mit Heparinase I (Dade Hepzyme[®]) vorzunehmen. Es zeigt sich, dass durch die enzymatische Behandlung des Plasmas vor der Messung bis zu 6,4 IE Liquemin N[®]/ml Plasma neutralisiert werden können. Dabei erreichen wir Werte, die denen ohne Antikoagulation gleichkommen (Abbildung 3.10.).

3.1.7.3. Einfluss von oralen Antikoagulantien auf die FC

Phenprocoumon (Marcumar[®])

Der Einfluss von oralen Antikoagulantien (Phenprocoumon/Marcumar[®]) auf die FC wird im Zusammenhang mit der Analyse der Kollektive dargestellt und untersucht (Kapitel 3.3.5.). Dabei ergibt sich für die zwei Probanden aus dem Normalkollektiv, welche mit einem Vitamin K-Antagonisten antikoaguliert wurden, kein signifikanter Zusammenhang ($r = 0,08$ für Proband 1 und $r = 0,24$ für Proband 2) zwischen TPZ und FC im Verlauf der Antikoagulation.

3.1.7.4. Einfluss von Aprotinin und Tranexamsäure auf die FC

Aprotinin bildet direkt mit freiem Plasmin Komplexe und wirkt somit ähnlich wie α_2 -Antiplasmin und andere Serin-Proteaseinhibitoren. An Fibrin gebundenes Plasmin wird dabei nicht von Aprotinin inhibiert. Durch die direkte Plasmininhibition verhindert es die Konversion von single-chain Urokinase zu two-chain Urokinase und inhibiert (aktiviertes) Protein C. Außerdem inhibiert Aprotinin in den höchsten klinisch verwendeten Dosen Kallikrein und vermindert die Bildung von Bradykinin ⁽¹³⁰⁻¹³²⁾. Dadurch reduziert Aprotinin insgesamt die fibrinolytische Aktivität, wobei ansteigende Konzentrationen von Aprotinin zu ansteigender Plasmininhibition führen. Diesen Effekt von Aprotinin auf die Fibrinolyse können wir in ansteigender Konzentration zeigen (Abbildung 3.12).

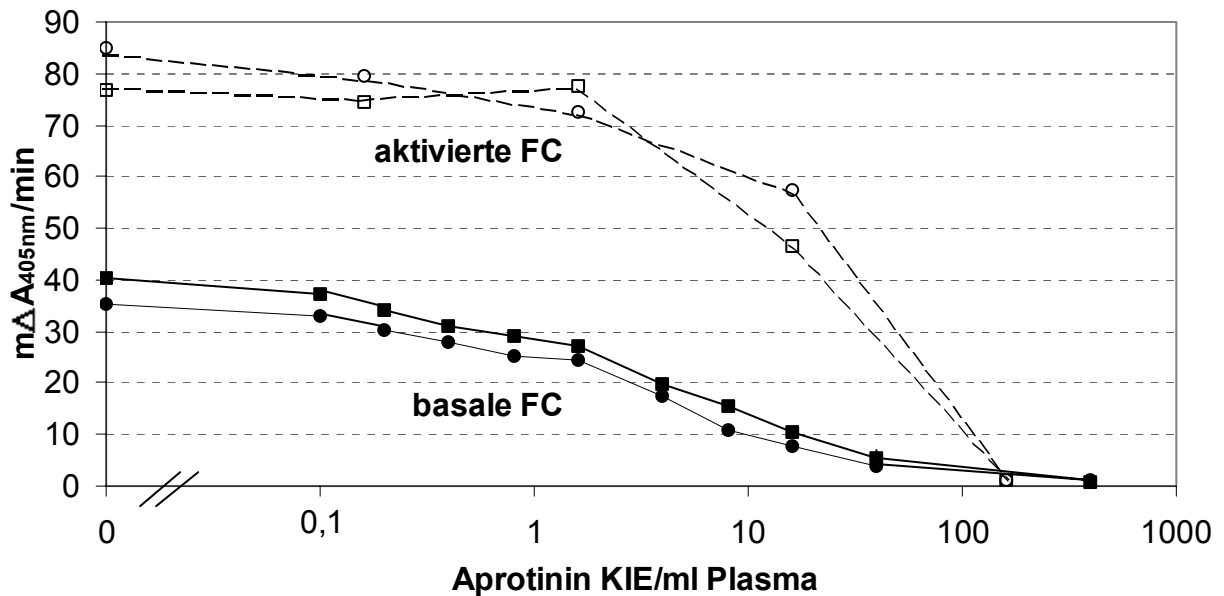


Abbildung 3.12. Einfluss von Aprotinin in ansteigenden Konzentrationen auf die basale FC (Plasma 1 [■] und 2 [●]) und aktivierte FC (Plasma 3 [□] und 4 [○]) jeweils zweier unterschiedlicher Plasmen.

Plasminogen besitzt eine Reihe von Lysin-Bindungsstellen, darunter eine starke und mehrere schwache. Bindung von Lysin-Analoga an die schwachen Bindungsstellen von Glu-Plasminogen führt zur Konformationsänderung und damit zur Steigerung der Aktivierbarkeit von Plasminogen durch Urokinase und t-PA. Bindung an die starke Bindungsstelle vermindert die Bindung von Glu-Plasminogen und Plasmin an die Lysinreste von Fibrin in niedriger Dosierung ⁽¹³³⁻¹³⁴⁾. Bei niedrigen Tranexamsäurekonzentrationen

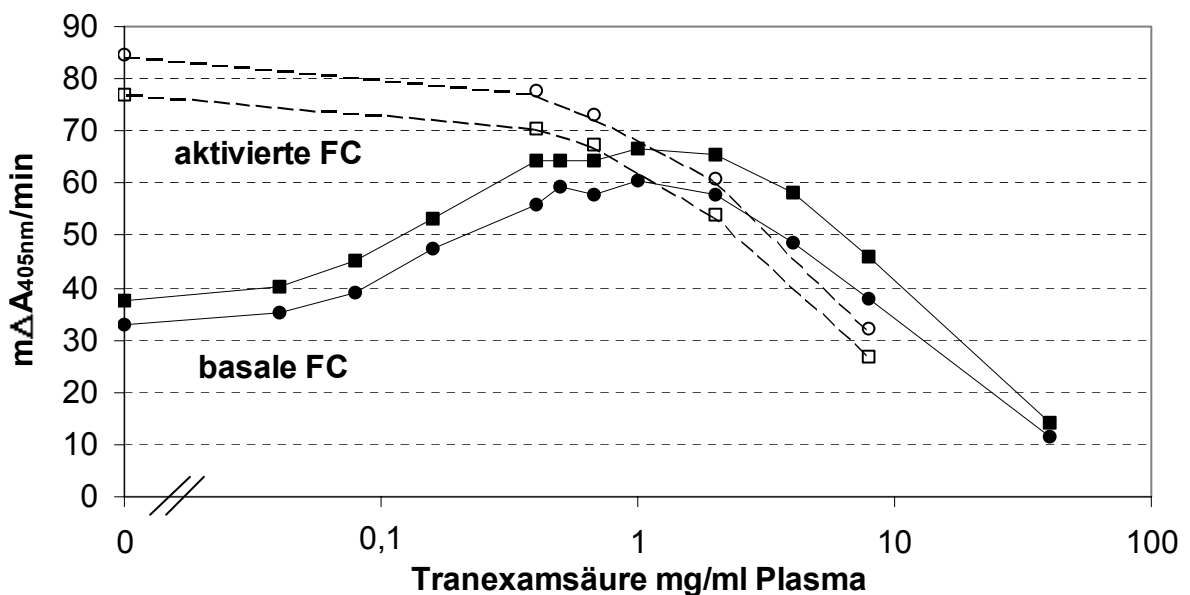


Abbildung 3.13. Einfluss von Tranexamsäure in ansteigenden Konzentrationen auf die basale FC (Plasma 1 [■] und 2 [●]) und aktivierte FC (Plasma 3 [□] und 4 [○]) jeweils zweier unterschiedlicher Plasmen.

trationen kommt es zur moderaten Verstärkung und bei höheren Konzentrationen zur Inhibierung der Plasminogenaktivierung ^(131, 135-137). Dabei tritt bei Glu-Plasminogen ein biphasischer Effekt mit Verstärkung gefolgt von Inhibition auf, während bei Lys-Plasminogen eine monophasische Inhibition beobachtet wird ⁽¹³⁸⁾.

Die Verstärkung der Glu-Plasminogenaktivierung durch Tranexamsäure in niedriger Konzentration ist eng mit Konformationsänderungen in der molekularen Struktur assoziiert, die durch die Bindung von Tranexamsäure/Lysin-Analoga an Plasminogen induziert werden. Der inhibitorische Effekt von Lysin-Analoga in höheren Konzentrationen kann als nicht (direkte) kompetitive Bindung des Liganden an die aktive Seite der Serin-Protease t-PA oder Urokinase erklärt werden ⁽¹³¹⁾. Das Konzentrationsintervall, welches zur Inhibition der Aktivierung von Plasminogen durch Urokinase führt, ist sehr unterschiedlich zu dem vom t-PA-Aktivatorsystem. Tranexamsäure bindet an die aktive Stelle des t-PA etwa 100 mal schwächer als an die aktive Stelle der Urokinase. Urokinase wird bei viel geringeren Konzentrationen inhibiert als t-PA. Tranexamsäure inhibiert die Konversion von sct-PA zu tct-PA durch Plasmin über Lysin-Bindungsstellen des Plasmins ⁽¹³⁹⁾.

Diesen biphasischer Effekt der Plasminogenaktivierung können wir deutlich bei der basalen FC zeigen. Für die aktivierte FC ist bei niedrigen Tranexamsäurekonzentrationen die Kontaktaktivierung stärker als die Inhibition der Plasminogenaktivierung (Abbildung 3.13).

3.1.7.5. Einfluss von Thrombozyten auf die FC

Zur Feststellung des Einflusses von Thrombozyten auf die FC wird sowohl plättchenreiches (PRP), als auch plättchenarmes (PPP) Plasma einer Blutentnahme miteinander verglichen. Um den Einfluss von Plättchenbestandteilen z.B. thrombozytären PAI zu erfassen, werden die Plasmen mit Ultraschall oder Kälte behandelt. Es ergeben sich bei drei untersuchten Proben keine signifikanten Unterschiede der behandelten Plasmen zur normalen FC (ohne Abbildung). Zugleich können wir feststellen, dass das normal hergestellte Plasma ausreichend thrombozytenarm ist. Ein Einfluss auf die basale FC durch Thrombozyten scheint ausgeschlossen.

3.1.7.6. Einfluss von Bilirubin auf die FC

Um den Einfluss von Trübungen des Plasmas auf die Bestimmung der FC festzustellen, haben wir die FC mit Plasma durchgeführt, welches mit steigenden Bilirubinmengen

angereichert ist. Mit Bilirubin angereichertes Plasma führt im Vergleich zum nativen Plasma bei der von uns für die FC verwendete Wellenlänge $\lambda = 405 \text{ nm}$ zu einer verstärkten Absorption. Der Einfluss auf die Bestimmung von $\Delta A_{405\text{nm}}/\text{min}$ der FC ist allerdings gering. Es lassen sich bis zu einer Bilirubinkonzentration von 33,72 mg/dl (eingesetzte Konzentration), resp. 24 mg/dl (gemessene Konzentration) sichere Werte für die FC messen. Sowohl für die basale, als auch für die aktivierte FC ergeben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Bilirubinkonzentrationen.

3.2. Beschreibung der Testeigenschaften der Fibrinplatte

3.2.1. Plasmin-Standardkurve

Mit der Fibrinplatte lässt sich semi-quantitativ die lysierte Fläche als Plasminäquivalent darstellen (Abbildung 3.14.). Wir geben unsere Ergebnisse als Größe der lysierten Fläche und nicht als Äquivalenz von Plasminaktivität an, da dadurch kein zusätzlicher Informationsgewinn entsteht.

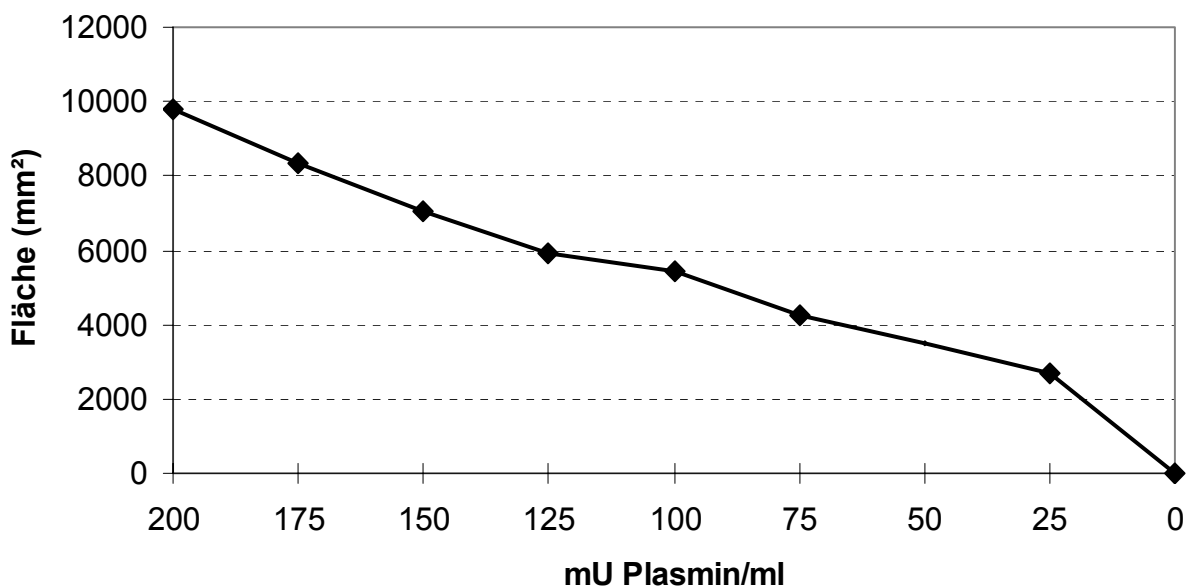


Abbildung 3.14. Plasmin-Standardkurve der Fibrinplatte. (Lysisfläche [mm²] in der Fibrinplatte durch ansteigende Konzentrationen von Plasmin [mU/ml]).

3.2.2. Präzision der Fibrinplatte

Unpräzision von Fibrinplatte zu Fibrinplatte

Die Unpräzision von Fibrinplatte zu Fibrinplatte wird mittels der Kontrollprobe bestimmt (125 mU/ml Plasmin). Sämtliche Kontrollen werden erfasst und ausgewertet. Die Vertei-

lung der Werte ist auch im Test auf Normalverteilung (Kolmogorov-Smirnov (Liliefors)) normalverteilt. Bis auf eine Ausnahme liegen alle Werte der Kontrollserien innerhalb des 3-Sigma-Bereiches. Auch die Dispersionsmaße Standardabweichung und Variationskoeffizient liegen in einem vertretbaren Bereich (Tabelle 3.3.).

Kontrollprobe (125 mU/ml Plasmin)	N	Mittelwert	Standard- abweichung	Variations- koeffizient
FP	81	3018	219	7

Tabelle 3.3. Unpräzision der Fibrinplatte von Platte zu Platte (Inter-Assay Variabilität) der Kontrollprobe anhand von Mittelwert, Standardabweichung und Variationskoeffizient.

3.2.3. Einfluss von Heparin

Unfraktioniertes Heparin (Liquemin®) hat einen konzentrationsabhängigen Einfluss auf die Größe der lysierten Fläche der Fibrinplatte (Abbildung 3.15.). Die Ursache einer zunehmenden Aktivierung der Fibrinolyse können die Sulfatreste des Heparins sein ^(90, 129, 140).

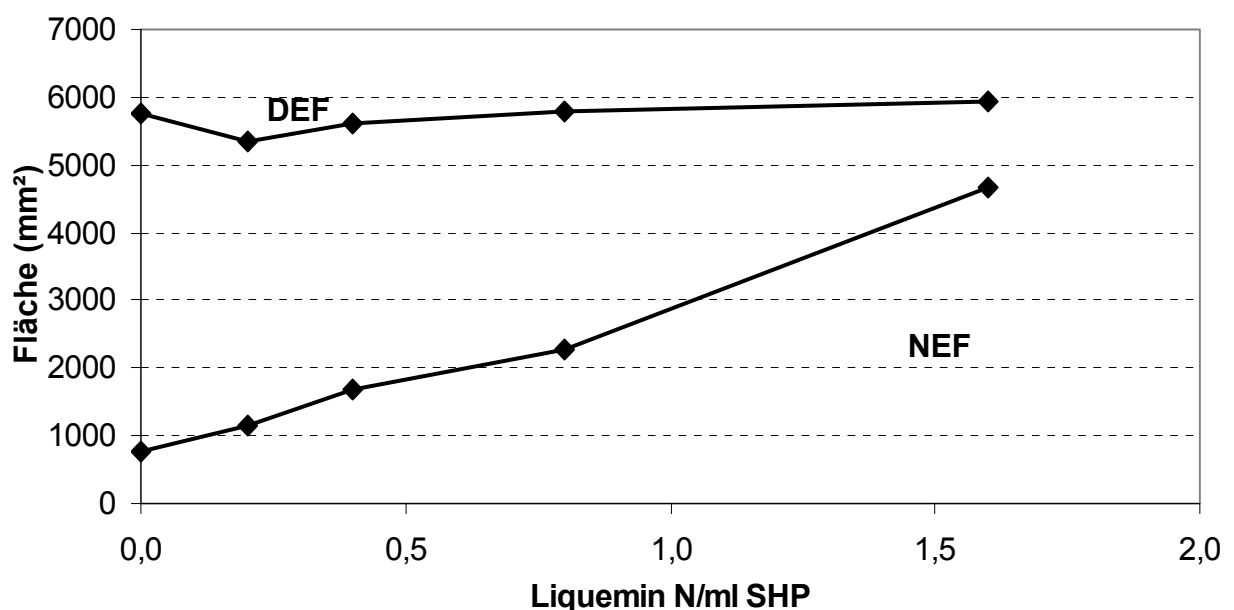


Abbildung 3.15. Einfluss von unfraktioniertem Heparin in ansteigender Konzentration auf die Lysisfläche der Fibrinplatte (normale (NEF) und Dextransulfat aktivierte Euglobulinfraktion (DEF)).

3.3. Analyse der untersuchten Kollektive

3.3.1. Einteilung des Gesamtkollektives in Untergruppen

Die im Methodenteil (Kapitel 2.2.) beschriebenen Probanden werden zur vergleichenden Analyse der einzelnen Parameter in ein Normalkollektiv mit gesunden Probanden, ein Schwangerenkollektiv und ein Thrombosekollektiv (Patienten mit thrombembolischen Erkrankungen) eingeteilt. Dabei wird das Thrombosekollektiv in weitere drei distinkte Untergruppen unterteilt (siehe Kapitel 2.2.1.1., Tabelle 2.3.): Patienten mit akuter Thrombose und bekannter Thromboseneigung, also Thromboserezidive (T+), Erstmanifestation einer akuten Thrombose (T-), sowie alleinige Thromboseneigung (alte Thrombose bzw. positive Familienanamnese) ohne akut bestehende Thrombose (Tp).

Untergruppen	Akronym	N
Gesamtheit der Probanden (Gesamtkollektiv)	GP	254
Normalkollektiv (gesunde Probanden)	NK	162
Schwangerenkollektiv	SK	17
Thrombosekollektiv (Gesamt)	T	75
akute Thrombose mit Thromboseneigung	T+	13
akute Thrombose ohne Thromboseneigung	T-	49
nur alte Thrombose bzw. pos. Familienanamnese	Tp	13

Tabelle 3.4. Einteilung des Gesamtkollektives in Untergruppen.

Zur Analyse des Zeitverlaufes bei Probanden unter oraler Antikoagulation (Vitamin K-Antagonisten) und Schwangeren werden zwei weitere Gruppen gebildet. Die eine Gruppe umfasst ein Kollektiv aus Patienten unter oraler Antikoagulation mit Blutentnahmen bei unterschiedlichen Antikoagulationsgraden (mit hohen und niedrigen TPZ-Wert). Die andere Gruppe umfasst ein Kollektiv aus Schwangeren vor (Zeitpunkt 1) und nach der Geburt (Zeitpunkt 2). Die Schwangeren zum Zeitpunkt 1 sind Teil des Schwangerenkollektives (SK). Von den Patienten unter oraler Antikoagulation sind acht Patienten mit akutem thrombembolischen Ereignis und einer mit einer positiven Familienanamnese Bestandteil des Thrombosekollektives (T). Die Werte der zweiten Blutentnahme werden nicht in das Gesamtkollektiv aufgenommen.

Schwangerenkollektiv ("Zeitpunkt 1" – "Zeitpunkt 2")	9
Patienten unter oraler Antikoagulation ("TPZ-Wert hoch" – "TPZ-Wert niedrig")	25

Tabelle 3.5. Verbundene Stichproben.

3.3.2. Geschlechtsverteilung der Untergruppen

Vor der statistischen Analyse der gemessenen Parameter haben wir untersucht, ob sich die Geschlechtsverteilung der einzelnen Untergruppen signifikant unterscheidet. Zwischen den Untergruppen der Kollektive und der Geschlechtsverteilung besteht im χ^2 -Unabhängigkeitstest nach Pearson und im exakten Test nach Fischer kein signifikanter Zusammenhang. Die zweiseitige Signifikanz von Geschlecht x Gesamtkollektiv-Untergruppen ist $p = 0,20$. Die beobachtete Verteilung unterscheidet sich also nicht signifikant von der erwarteten. Aus diesem Grunde haben wir uns entschlossen, die folgenden Analysen ohne Geschlechtsdifferenzierungen durchzuführen. In die Analyse mit dem χ^2 -Unabhängigkeitstest haben wir das Schwangerenkollektiv nicht mit eingeschlossen, da diese Gruppe definitionsgemäß aus einem Geschlecht besteht.

3.3.3. Vergleich des Normalkollektives mit dem Schwangerenkollektiv

Zur Untersuchung des Schwangerenkollektives im Vergleich zum Normalkollektiv auf signifikante Unterschiede verwenden wir den zweiseitigen Mann-Whitney U-Test. Für die globalen Fibrinolyseparameter zeigt sich, dass das Schwangerenkollektiv eine hoch signifikant ($p < 0,001$) niedrigere basale FC <150 und einen nicht signifikanten ($p = 0,08$), aber deutlich höheren Median in der aktivierten FC <150 im Vergleich zum Normalkollektiv hat. Beide Kollektive haben in der aktivierten FC <150 eine große Streubreite. Ebenso eine hoch signifikant ($p = 0,007$) kleinere Lysefläche in der Fibrinplatte mit normaler Euglobulinfraktion (FP-NEF).

Bei den Gerinnungsparametern hat das Schwangerenkollektiv einen hoch signifikant ($p < 0,001$) höheren TPZ-Wert und einen hoch signifikant ($p = 0,002$) niedrigeren aPTT-Wert. Die Mediane der aPTT der beiden Kollektive liegen aber dicht beieinander. Das Schwangerenkollektiv hat ein hoch signifikant ($p < 0,001$) höheres Fibrinogen und höheren Faktor XII, sowie ein hoch signifikant ($p < 0,001$) niedrigeres Antithrombin III. Der Interquartilbereich ist beim Schwangerenkollektiv für das Antithrombin III größer, für das Fibrinogen deutlich größer als beim Normalkollektiv. Das Fibrinogen liegt beim Schwangerenkollektiv im Median oberhalb des Referenzbereiches von 180 bis

350 mg/dl. TPZ, aPTT, Faktor XII und Antithrombin III liegen innerhalb des Referenzbereiches.

Bei den einzelnen, die fibrinolytische Aktivität anzeigenden Parametern, hat das Schwangerenkollektiv einen hoch signifikant ($p < 0,001$) niedrigeren ProC Globalwert. Der ProC Globalwert liegt beim Schwangerenkollektiv im Median unterhalb des Referenzbereiches von 0,74 bis 1,12 sec/sec. Das Schwangerenkollektiv hat ein hoch signifikant höheres α_2 -Antiplasmin ($p < 0,001$) und Plasminogen ($p = 0,01$). Der α_2 -Antiplasminwert liegt beim Schwangerenkollektiv knapp oberhalb des Referenzbereiches von 80 bis 128%. Das Schwangerenkollektiv hat einen deutlich größeren Interquartilsbereich beim D-Dimer als das Normalkollektiv. Das Schwangerenkollektiv hat ein hoch signifikant ($p < 0,001$) höheres D-Dimer und PAI als das Normalkollektiv. Die Werte für D-Dimer liegen deutlich über dem oberen Referenzbereich von <250 bis 280 ng/ml. Der PAI-Wert liegt beim Schwangerenkollektiv deutlich oberhalb des Referenzbereiches von 0,3 bis 3,5 U/ml.

Parameter	Normalkollektiv, N=162		Schwangere, N=17		Signifikanz
	Median	Quartilabstand	Median	Quartilabstand	
b FC <150 (%)	63,6	55,7	10,2	19,0	$p < 0,001$
a FC <150 (%)	91,8	72,9	135,7	65,4	$p = 0,08$
TPZ (%)	102	19	136	17	$p < 0,001$
aPTT (sec)	33,5	4,1	31,8	4,1	$p = 0,002$
Fbg (mg/dl)	249	56	555	177	$p < 0,001$
AT III (%)	113	13	92	29	$p < 0,001$
F XII (%)	98	26	133	27	$p < 0,001$
PCG (sec/sec)	0,90	0,19	0,61	0,10	$p < 0,001$
α_2 -AP (%)	108,3	13,6	130,4	41,7	$p < 0,001$
Plg (%)	98,1	23,8	120,6	32,3	$p = 0,01$
D-Dimer (ng/ml)	58,4	55,0	443,6	340,2	$p < 0,001$
PAI (U/ml)	1,15	1,00	9,26	4,16	$p < 0,001$
FP-NEF (mm ²)	3106	2209	1225	3722	$p = 0,007$
FP-DEF (mm ²)	6984	2282	6651	3830	$p = 0,17$

Tabelle 3.6. Vergleich von Normalkollektiv und Schwangerenkollektiv mit Median, Quartilabstand und Test auf signifikante Unterschiede (Irrtumswahrscheinlichkeit p) im zweiseitigen Mann-Whitney U-Test.

3.3.4. Vergleich des Schwangerenkollektives an zwei verschiedenen Zeitpunkten ("Zeitpunkt 1" und "Zeitpunkt 2")

(N = 9) Parameter	Zeitpunkt 1		Zeitpunkt 2		Signifikanz
	Median	Quartil- abstand	Median	Quartil- abstand	
b FC <150 (%)	11,8	27,9	22,74	13,3	p = 0,04
a FC <150 (%)	150,0	76,7	95,27	64,8	p = 0,22
TPZ (%)	136	25	131	21	p = 0,53
aPTT (sec)	30,4	4,3	32,6	4,9	p = 0,43
Fbg (mg/dl)	534	188	511	193	p = 0,38
AT III (%)	102	20	96	30	p = 0,34
F XII (%)	133	54	119	31	p = 0,04
PCG (sec/sec)	0,58	0,06	0,65	0,13	p = 0,008
α_2 -AP (%)	130,4	53,4	107,4	23,6	p = 0,05
Plg (%)	122,9	30,4	121,4	20,0	p = 0,91
D-Dimer (ng/ml)	368,3	386,8	346,1	428,1	p = 0,66
PAI (U/ml)	12,05	4,28	9,10	2,56	p = 0,04
FP-NEF (mm ²)	0	1822	0	144	p = 0,13
FP-DEF (mm ²)	4386	5133	2529	3787	p = 0,17

Tabelle 3.7. Schwangerenkollektiv "Zeitpunkt 1" und "Zeitpunkt 2" mit Median, Quartilabstand und Test auf signifikante Unterschiede (Irrtumswahrscheinlichkeit p) im zweiseitigen Wilcoxon-Test für Paardifferenzen.

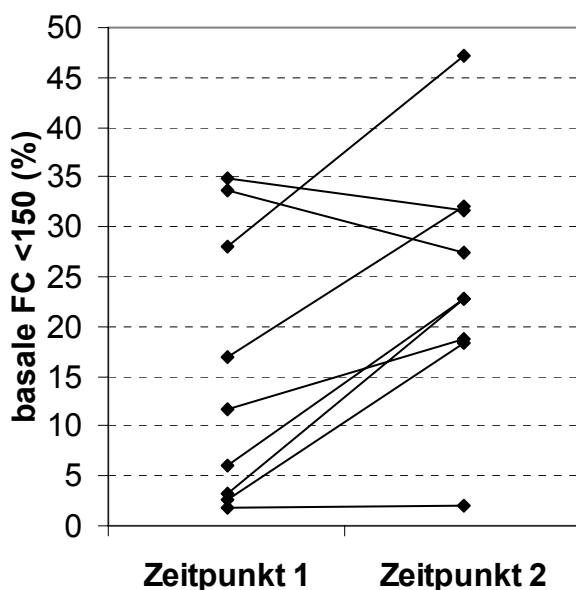


Abbildung 3.16. b FC "Zeitpunkt 1" und "Zeitpunkt 2".

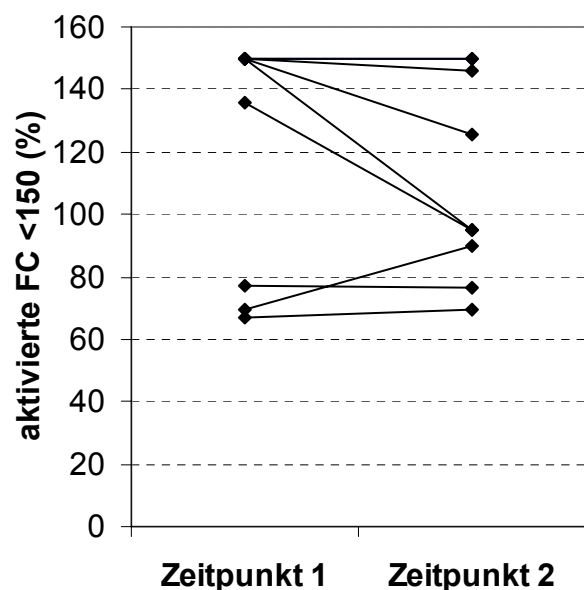


Abbildung 3.17. a FC "Zeitpunkt 1" und "Zeitpunkt 2".

Wir untersuchen beim Schwangerenkollektiv die aufeinanderfolgenden Blutentnahmen ("Zeitpunkt 1" (kurz vor/bei der Geburt) und "Zeitpunkt 2" (ein bis drei Tage post partal)) im Sinne verbundener Stichproben mit dem zweiseitigen Wilcoxon-Test für Paardifferenzen (Monte-Carlo-Verfahren). Dabei hat der "Zeitpunkt 2" im Vergleich zum "Zeitpunkt 1" der Blutentnahmen einen signifikant höheren Wert für basale FC <150 ($p = 0,04$) und ProC Global ($p = 0,008$). Für Faktor XII ($p = 0,04$) und PAI ($p = 0,04$) liegt zum "Zeitpunkt 2" ein signifikant niedrigerer Wert vor als zum "Zeitpunkt 1". Die anderen Werte unterscheiden sich nicht signifikant. Die Werte aus den zweiten Blutentnahmen werden nicht mit in das Gesamtkollektiv aufgenommen.

3.3.5. Vergleich des Kollektives der Patienten unter oraler Antikoagulation an zwei verschiedenen Zeitpunkten (TPZ-Wert "hoch" und "niedrig")

Wir untersuchen beim Kollektiv der Patienten unter oraler Antikoagulation die aufeinanderfolgenden Blutentnahmen ("TPZ-Wert hoch" und "TPZ-Wert niedrig") im Sinne verbundener Stichproben mit dem zweiseitigen Wilcoxon-Test für Paardifferenzen (Monte-Carlo-Verfahren), um den Einfluss der oralen Antikoagulation auf die FC festzustellen.

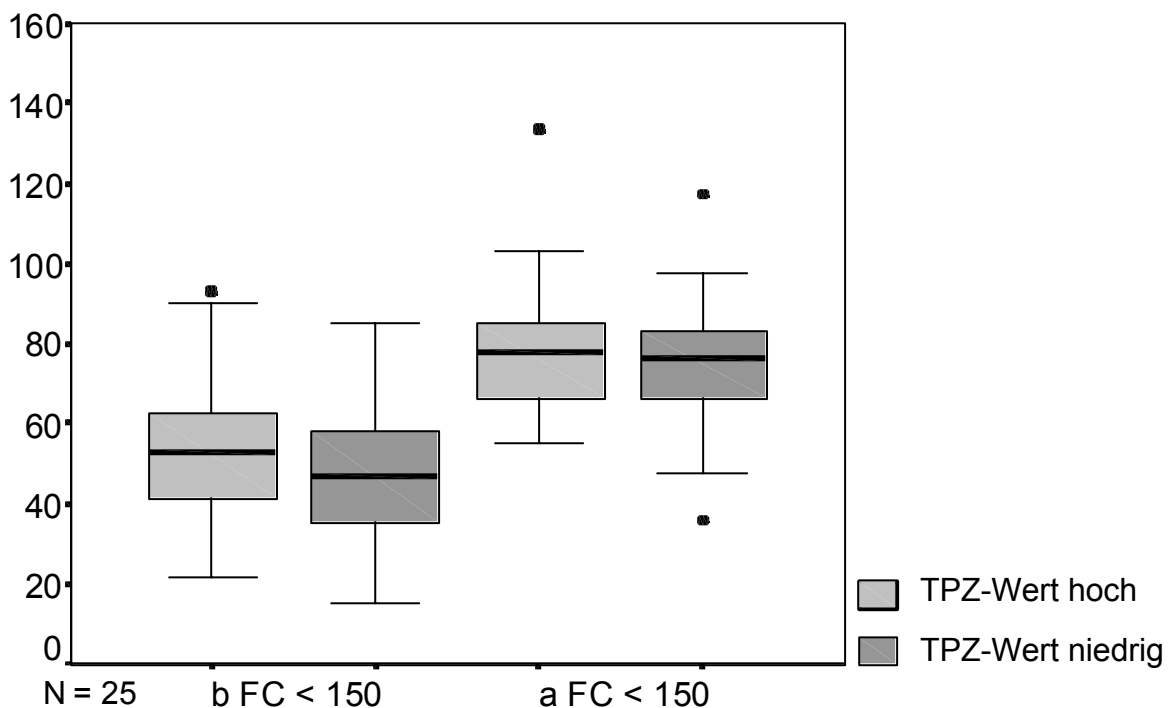


Abbildung 3.18. FC beim Kollektiv der Patienten unter oraler Antikoagulation "TPZ-Wert hoch" und "TPZ-Wert niedrig" mit Median (Balken), Interquartilbereich (Kasten), Spannweite (Linie mit Querbalken) und Ausreißer (Punkte). Der Test auf signifikante Unterschiede (Irrtumswahrscheinlichkeit p) im zweiseitigen Wilcoxon-Test für Paardifferenzen ist für basale FC <150 signifikant ($p = 0,02$) und für aktivierte FC <150 nicht signifikant ($p = 0,34$).

Dabei hat der Zeitpunkt "TPZ-Wert niedrig" im Vergleich zum Zeitpunkt "TPZ-Wert hoch" einen hoch signifikant niedrigeren Wert für TPZ und ProC Global. Für die basale FC <150 liegt zum Zeitpunkt "TPZ-Wert niedrig" ein signifikant niedrigerer Wert vor als zum Zeitpunkt "TPZ-Wert hoch".

Die Differenzierung der Patienten unter oraler Antikoagulation in Untergruppen (ohne/mit akute Thrombose, Herzrhythmusstörung, Bypass-OP bei AVK und anderes) bringt in der statistischen Analyse keine weiteren signifikanten Ergebnisse, außer für die aPTT und die Fibrinplatte mit aktivierter Euglobulinfraktion (FP-DEF) bei der Untergruppe ohne akute Thrombose (siehe Kapitel 2.2.1.3.). Hier liegen zum Zeitpunkt "TPZ-Wert niedrig" signifikant höhere Werte vor als zum Zeitpunkt "TPZ-Wert hoch".

Für die basale FC <150 ergibt sich in der Untergruppe der oral antikoagulierten Patienten "ohne akutes thrombembolisches Ereignis" (N = 17) ein signifikant ($p = 0,02$) unterschiedlicher Wert im Vergleich von "TPZ-Wert niedrig" zu "TPZ-Wert hoch".

(N = 25) Parameter	TPZ-Wert hoch		TPZ-Wert niedrig		Signifikanz
	Median	Quartil- abstand	Median	Quartil- abstand	
b FC <150 (%)	53,0	22,0	46,9	25,1	p = 0,02
a FC <150 (%)	77,7	19,0	76,2	20,6	p = 0,34
TPZ (%)	92	17	34	32	p < 0,001
aPTT (sec)	40,0	20,7	45,9	15,4	p = 0,17
Fbg (mg/dl)	420	195	408	156	p = 0,70
AT III (%)	76	24	82	33	p = 0,88
F XII (%)	76	25	75	28	p = 0,46
PCG (sec/sec)	0,72	0,20	0,46	0,13	p < 0,001
α_2 -AP (%)	94,7	22,8	96,9	22,3	p = 1,00
Plg (%)	116,1	12,7	114,8	12,5	p = 0,44
D-Dimer (ng/ml)	355,3	389,7	224,6	418,1	p = 0,56
PAI-1 (U/ml)	1,85	1,68	1,80	2,59	p = 0,50
FP-NEF (mm ²)	728	952	848	1649	p = 0,70
FP-DEF (mm ²)	3252	3065	2780	3214	p = 0,08

Tabelle 3.8. Kollektiv der Patienten unter oraler Antikoagulation "TPZ-Wert hoch" und "TPZ-Wert niedrig" mit Median, Quartilabstand und Test auf signifikante Unterschiede (Irrtumswahrscheinlichkeit p) im zweiseitigen Wilcoxon-Test für Paardifferenzen.

(53,0% vs. 40,5%). In der Untergruppe "mit akutem thrombembolisches Ereignis" (N = 8) ist dieser Unterschied (59,6% vs. 58,3%) nicht signifikant ($p = 0,12$).

Für die aktivierte FC <150 ergibt sich in der Untergruppe der oral antikoagulierten Patienten "ohne akutes thrombembolisches Ereignis" (N = 17) kein signifikant unterschiedlicher Wert im Vergleich von "TPZ-Wert niedrig" zu "TPZ-Wert hoch" (77,7% vs. 72,6%). In der Untergruppe "mit akutem thrombembolisches Ereignis" (N = 8) ist dieser Unterschied (77,7% vs. 79,5%) ebenfalls nicht signifikant ($p = 0,67$).

Der signifikante Unterschied bei der basalen FC <150 unter oraler Antikoagulation tritt also vor allem bei Patienten ohne akute Thrombose auf, obwohl eine sichere Aussage bei den kleinen Fallzahlen nicht möglich ist. Orale Antikoagulation scheint also einen Einfluss auf das fibrinolytische System zu haben, aber nicht in gleicher Weise wie ein zu einer Thrombose führender Fibrinolysedefekt.

3.3.6. Vergleich des Normalkollektives mit den Thrombosekollektiven

3.3.6.1. basale FC <150

Untergruppe		N	Median	Quartilabstand	Signifikanz
Normalkollektiv	NK	162	63,6	55,7	
Thrombosekollektiv (Gesamt)	T	75	53,0	42,7	$p < 0,001$
akute Thromb. <u>mit</u> Thromb.-neigung	T+	13	63,1	21,5	$p = 0,40$
akute Thromb. <u>ohne</u> Thromb.-neigung	T-	49	49,2	54,1	$p < 0,001$
<u>nur</u> alte Thrombose / pos. FA	Tp	13	54,9	28,2	$p = 0,03$

Tabelle 3.9. basale FC-Verteilung der Kollektive mit Median, Quartilabstand und Test auf signifikante Unterschiede (Irrtumswahrscheinlichkeit p) im zweiseitigen Mann-Whitney U-Test.

Wir haben zur Untersuchung eines signifikanten Unterschiedes der basalen FC zwischen dem Normalkollektiv und den einzelnen Thrombosekollektiven, diese untereinander verglichen. Zur statistischen Auswertung verwenden wir den zweiseitigen Mann-Whitney U-Test. Dabei zeigen die Thrombosekollektive T ("Thrombosekollektiv (Gesamt)") und T- ("akute Thrombose ohne Thromboseneigung") im Vergleich zum Normalkollektiv eine hoch signifikant ($p < 0,001$) niedrigere basale FC <150 . Das Thrombosekollektiv Tp ("nur alte Thrombose/positive Familienanamnese") hat eine signifikant ($p < 0,03$) niedrigere basale FC <150 , das Thrombosekollektiv T+ ("akute Thrombose mit Thromboseneigung") unterscheidet sich nicht signifikant ($p = 0,40$) vom Normalkol-

ektiv. Die einzelnen Thrombosekollektiv-Untergruppen (T+, T-, Tp) unterscheiden sich nicht signifikant voneinander in ihrer basalen FC <150 (Kruskal-Wallis H-Test).

3.3.6.2. aktivierte FC <150

Wir haben im Vergleich zwischen dem Normalkollektiv und den einzelnen Thrombosekollektiven die aktivierte FC <150 auf signifikante Unterschiede untersucht. Dies führen wir mit Hilfe des zweiseitigen Mann-Whitney U-Testes durch. Dabei fällt ein großer Interquartilbereich des Normalkollektives auf. Die Thrombosekollektive T ("Thrombosekollektiv (Gesamt)") und T- ("akute Thrombose ohne Thromboseneigung") haben im Vergleich zum Normalkollektiv eine hoch signifikant ($p < 0,001$) niedrigere aktivierte FC <150. Die Thrombosekollektive T+ ("akute Thrombose mit Thromboseneigung") und Tp ("nur alte Thrombose/positive Familienanamnese") unterscheiden sich nicht signifikant ($p = 0,07$ und $p = 0,12$) vom Normalkollektiv. Die einzelnen Thrombosekollektiv-Untergruppen (T+, T-, Tp) unterscheiden sich nicht signifikant voneinander in ihrer aktivierten FC <150 (Kruskal-Wallis H-Test).

Untergruppe		N	Median	Quartilabstand	Signifikanz
Normalkollektiv	NK	162	91,8	72,9	
Thrombosekollektiv (Gesamt)	T	75	76,3	34,2	p < 0,001
akute Thromb. <u>mit</u> Thromb.-neigung	T+	13	83,8	24,7	p = 0,07
akute Thromb. <u>ohne</u> Thromb.-neigung	T-	49	72,3	35,2	p < 0,001
<u>nur</u> alte Thrombose / pos. FA	Tp	13	88,9	34,3	p = 0,12

Tabelle 3.10. aktivierte FC-Verteilung der Kollektive mit Median, Quartilabstand und Test auf signifikante Unterschiede (Irrtumswahrscheinlichkeit p) im zweiseitigen Mann-Whitney U-Test.

3.3.6.3. endogene FC

Die Bestimmung der endogenen FC (ohne Zugabe der Plasminogenaktivatorlösung) erbringt FC-Werte <4%. Der Großteil der Werte liegt, wenn überhaupt ein Wert bestimmt werden kann, bei einer FC <2%. Vier Personen haben einen höheren Wert.

3.3.6.4. TPZ und aPTT

Beim Vergleich der TPZ- und aPTT-Werte auf signifikante Unterschiede (zweiseitiger Mann-Whitney U-Test) zwischen Normalkollektiv und den einzelnen Thrombosekollekti-

ven zeigen die Thrombosekollektive T ("Thrombosekollektiv (Gesamt)") und T- ("akute Thrombose ohne Thromboseneigung") eine hoch signifikant ($p < 0,001$) niedrigere TPZ (99%; 96%) bzw. höhere aPTT (37,5 sec; 39,5 sec) im Vergleich zum Normalkollektiv (102%; 33,5 sec). Die Interquartilbereiche sind bei den Thrombosekollektiven deutlich größer als beim Normalkollektiv. Beim Normalkollektiv liegen die aPTT-Werte (33,5 sec) im Median unterhalb des angegebenen Referenzbereiches von 35 bis 55 sec, die TPZ-Werte liegen innerhalb des Referenzbereiches. Die einzelnen Thrombosekollektiv-Untergruppen (T+, T-, Tp) unterscheiden sich nicht signifikant voneinander in ihrer TPZ und aPTT (Kruskal-Wallis H-Test).

3.3.6.5. Fibrinogen

Alle Thrombosekollektive (T: "Thrombosekollektiv (Gesamt)", 442 mg/dl; T+: "akute Thrombose mit Thromboseneigung", 494 mg/dl; T-: "akute Thrombose ohne Thromboseneigung", 417 mg/dl; Tp: "nur alte Thrombose/positive Familienanamnese", 417 mg/dl) haben im Vergleich zum Normalkollektiv (249 mg/dl) ein hoch signifikant ($p < 0,001$) höheres Fibrinogen im zweiseitigen Mann-Whitney U-Test. Die Interquartil-

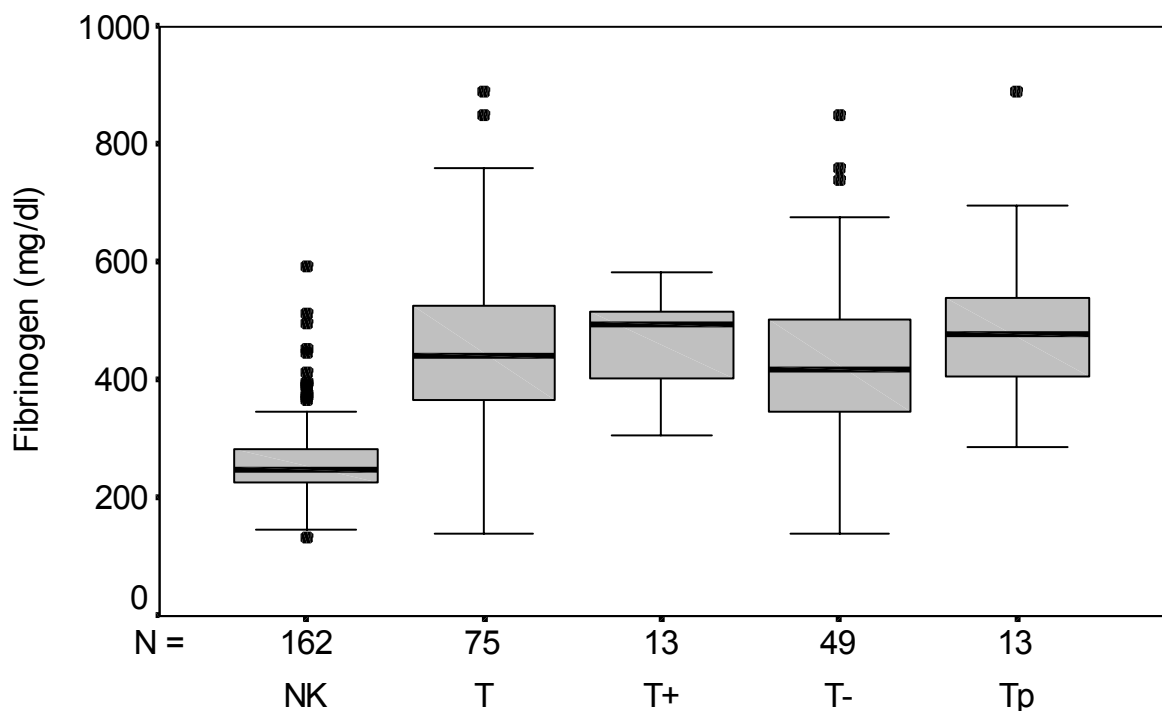


Abbildung 3.19. Fibrinogenverteilung der Kollektive mit Median (Balken), Interquartilbereich (Kasten), Spannweite (Linie mit Querbalken) und Ausreißer (Punkte). Der Test auf signifikante Unterschiede (Irrtumswahrscheinlichkeit p) im zweiseitigen Mann-Whitney U-Test ist für alle Thrombosekollektive im Vergleich zum Normalkollektiv hoch signifikant ($p < 0,001$).

bereiche sind bei allen Thrombosekollektiven deutlich größer (138 – 182 mg/dl) als beim Normalkollektiv (56 mg/dl). Das Fibrinogen liegt bei den Thrombosekollektiven im Median oberhalb des Referenzbereiches von 180 – 350 mg/dl. Die einzelnen Thrombosekollektiv-Untergruppen (T+, T–, Tp) unterscheiden sich nicht signifikant voneinander in ihrem Fibrinogen (Kruskal-Wallis H-Test).

3.3.6.6. Antithrombin III

Wir untersuchen das Normalkollektiv im Vergleich zu den Thrombosekollektiven auf signifikante Unterschiede der Antithrombin III-Werte. Dafür verwenden wir den zweiseitigen Mann-Whitney U-Test. Dabei zeigt sich, dass alle Thrombosekollektive im Vergleich zum Normalkollektiv (113%) ein hoch signifikant, bzw. signifikant niedrigeres Antithrombin III haben, für die Thrombosekollektive T ("Thrombosekollektiv (Gesamt)", 89%), T+ ("akute Thrombose mit Thromboseneigung", 94%) und T– ("akute Thrombose ohne Thromboseneigung", 86%) mit $p < 0,001$, für Tp ("nur alte Thrombose/positive Familienanamnese", 102%) mit $p = 0,03$. Die Interquartilbereiche sind bei allen Thrombosekollektiven (28 – 34%) größer als beim Normalkollektiv (13%). Die Kollektive liegen

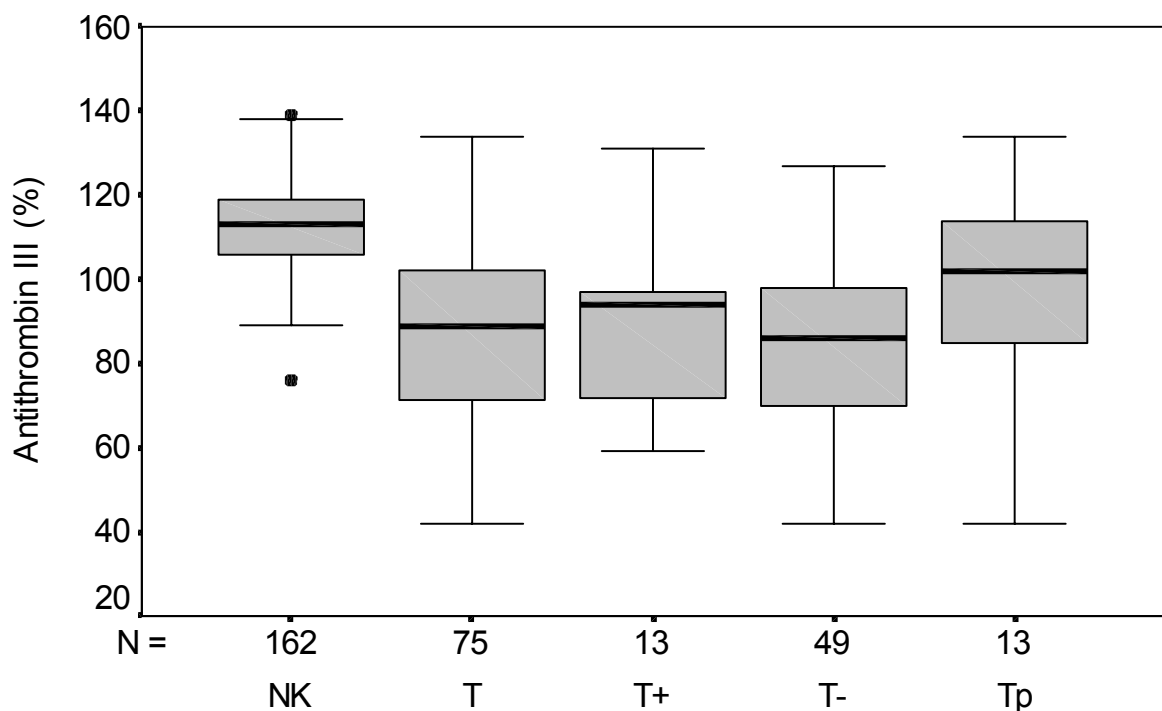


Abbildung 3.20. Antithrombin III-Verteilung der Kollektive mit Median (Balken), Interquartilbereich (Kasten), Spannweite (Linie mit Querbalken) und Ausreißer (Punkte). Der Test auf signifikante Unterschiede (Irrtumswahrscheinlichkeit p) im zweiseitigen Mann-Whitney U-Test ist für alle Thrombosekollektive im Vergleich zum Normalkollektiv (hoch) signifikant (für T, T+ und T– mit $p < 0,001$, für Tp mit $p = 0,03$).

dabei alle im Referenzbereich von 80-120%. Die einzelnen Thrombosekollektiv-Untergruppen (T+, T-, Tp) unterscheiden sich nicht signifikant voneinander in ihrem Antithrombin III (Kruskal-Wallis H-Test).

3.3.6.7. Faktor XII

Die Thrombosekollektive T ("Thrombosekollektiv (Gesamt)"), T+ ("akute Thrombose mit Thromboseneigung") und T- ("akute Thrombose ohne Thromboseneigung") haben im Vergleich zum Normalkollektiv (zweiseitiger Mann-Whitney U-Test) einen hoch signifikant, bzw. signifikant niedrigeren Faktor XII. Das Thrombosekollektiv Tp ("nur alte Thrombose/positive Familienanamnese") unterscheidet sich nicht signifikant vom Normalkollektiv ($p = 0,05$). Alle Kollektive liegen im Referenzbereich, die Thrombosekollektive T und T- liegen im Median knapp oberhalb des unteren Referenzbereiches von 70%. Die einzelnen Thrombosekollektiv-Untergruppen (T+, T-, Tp) unterscheiden sich nicht signifikant voneinander in ihrem Faktor XII (Kruskal-Wallis H-Test).

Untergruppe		N	Median	Quartilabstand	Signifikanz
Normalkollektiv	NK	162	98	26	
Thrombosekollektiv (Gesamt)	T	75	76	30	p < 0,001
akute Thromb. <u>mit</u> Thromb.-neigung	T+	13	84	26	p = 0,03
akute Thromb. <u>ohne</u> Thromb.-neigung	T-	49	74	36	p < 0,001
<u>nur</u> alte Thrombose / pos. FA	Tp	13	80	45	p = 0,05

Tabelle 3.11. Faktor XII-Verteilung der Kollektive mit Median, Quartilabstand und Test auf signifikante Unterschiede (Irrtumswahrscheinlichkeit p) im zweiseitigen Mann-Whitney U-Test.

3.3.6.8. ProC Global

Alle Thrombosekollektive (T: "Thrombosekollektiv (Gesamt)", 0,72 sec/sec; T+: "akute Thrombose mit Thromboseneigung", 0,72 sec/sec; T-: "akute Thrombose ohne Thromboseneigung", 0,72 sec/sec; Tp: "nur alte Thrombose/positive Familienanamnese", 0,76 sec/sec) haben im Vergleich zum Normalkollektiv (0,90 sec/sec) (zweiseitiger Mann-Whitney U-Test) einen hoch signifikant niedrigeren ProC Globalwert ($p < 0,001$). Der ProC Globalwert liegt bei den Thrombosekollektiven (außer dem Thrombosekollektiv Tp) im Median unterhalb des Referenzbereiches von 0,74 bis 1,12 sec/sec. Die ein-

zelenen Thrombosekollektiv-Untergruppen (T+, T-, Tp) unterscheiden sich nicht signifikant voneinander in ihren ProC Globalwerten (Kruskal-Wallis H-Test).

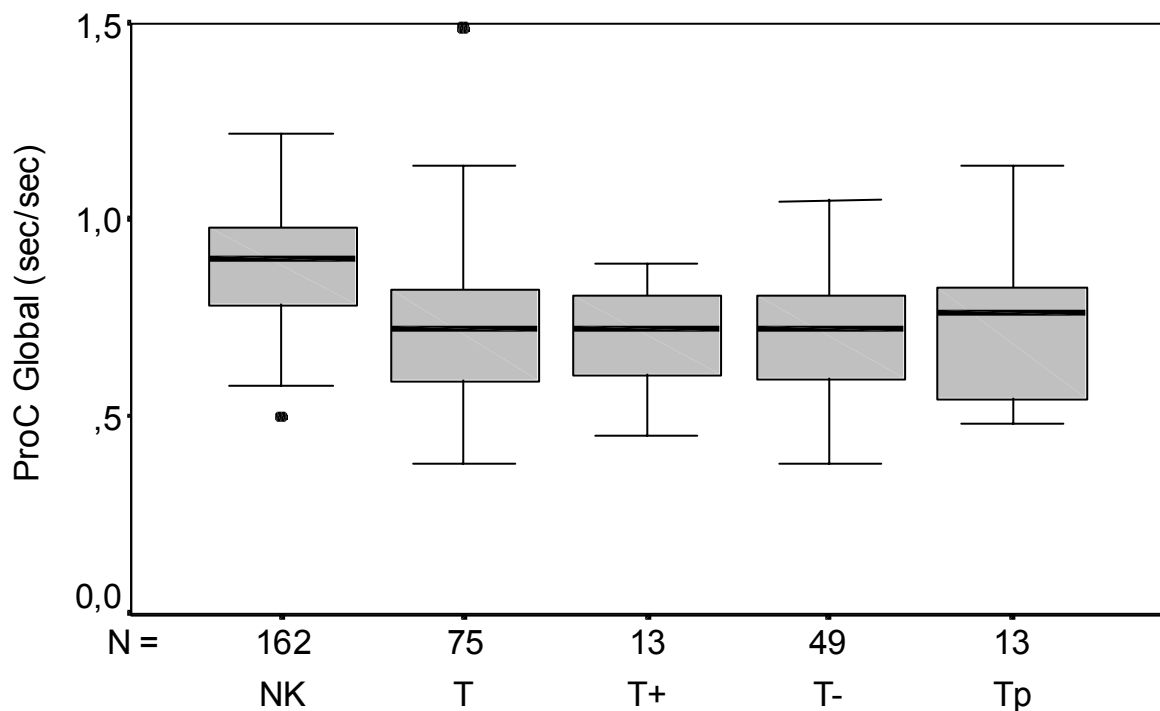


Abbildung 3.21. ProC Globalverteilung der Kollektive mit Median (Balken), Interquartilbereich (Kasten), Spannweite (Linie mit Querbalken) und Ausreißer (Punkte). Der Test auf signifikante Unterschiede (Irrtumswahrscheinlichkeit p) im zweiseitigen Mann-Whitney U-Test ist für alle Thrombosekollektive im Vergleich zum Normalkollektiv hoch signifikant ($p < 0,001$).

3.3.6.9. α_2 -Antiplasmin

Beim Vergleich der Thrombosekollektive mit dem Normalkollektiv (zweiseitiger Mann-Whitney U-Test) haben die Thrombosekollektive T ("Thrombosekollektiv (Gesamt)") und T- ("akute Thrombose ohne Thromboseneigung") ein hoch signifikant ($p < 0,001$) niedrigeres α_2 -Antiplasmin als das Normalkollektiv. Die Mediane liegen aber dicht zusammen. Die Thrombosekollektive T+ ("akute Thrombose mit Thromboseneigung") und Tp ("nur alte Thrombose/positive Familienanamnese") unterscheiden sich nicht vom Normalkollektiv ($p = 0,78$ und $p = 0,95$). Alle Kollektive liegen im Referenzbereich.

Die einzelnen Thrombosekollektiv-Untergruppen (T+, T-, Tp) unterscheiden sich im Kruskal-Wallis H-Test signifikant mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p = 0,006$ in ihren α_2 -Antiplasminwerten. Zur Untersuchung, ob sich die drei einzelnen Thrombosekollektiv-Untergruppen im Paarvergleich signifikant voneinander unterscheiden, ver-

wenden wir den Mann-Whitney U-Test, das Signifikanzniveau wird nach einer Anpassung nach Bonferroni bei $\alpha = 0,0167$ festgelegt. Im Einzelvergleich (Paarvergleich) der drei Thrombosekollektiv-Untergruppen hat das Thrombosekollektiv T+ ein signifikant höheres α_2 -Antiplasmin als T-. Der Unterschied zwischen T- und Tp ist nach Anpassung des Signifikanzniveaus nach Bonferroni nicht signifikant.

Untergruppe		N	Median	Quartilabstand	Signifikanz
Normalkollektiv	NK	162	108,3	13,6	
Thrombosekollektiv (Gesamt)	T	75	98,5	25,9	p < 0,001
akute Thromb. <u>mit</u> Thromb.-neigung	T+	13	107,0	19,2	p = 0,78
akute Thromb. <u>ohne</u> Thromb.-neigung	T-	49	91,6	30,5	p < 0,001
<u>nur</u> alte Thrombose / pos. FA	Tp	13	110,7	24,0	p = 0,95

Tabelle 3.12. α_2 -Antiplasminverteilung der Kollektive mit Median, Quartilabstand und Test auf signifikante Unterschiede (Irrtumswahrscheinlichkeit p) im zweiseitigen Mann-Whitney U-Test.

Mann-Whitney U-Test	Zweiseitige Signifikanz
T+ gegen T-	p = 0,007
T+ gegen Tp	p = 0,97
T- gegen Tp	p = 0,03

Tabelle 3.13. Paarvergleiche der einzelnen Thrombosekollektiv-Untergruppen (T+, T-, Tp) für α_2 -Antiplasmin mit dem Mann-Whitney U-Test.

3.3.6.10. Plasminogen

Beim Vergleich der Thrombosekollektive mit dem Normalkollektiv (zweiseitiger Mann-Whitney U-Test) haben alle Thrombosekollektive (T: "Thrombosekollektiv (Gesamt)", 117,4%; T+: "akute Thrombose mit Thromboseneigung", 120,5%; T-: "akute Thrombose ohne Thromboseneigung", 114,8%; Tp: "nur alte Thrombose/positive Familienanamnese", 122,2%) ein hoch signifikant höheres Plasminogen ($p < 0,001$) als das Normalkollektiv (98,1%). Alle Kollektive liegen im Referenzbereich.

Die einzelnen Thrombosekollektiv-Untergruppen (T+, T-, Tp) unterscheiden sich signifikant mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p = 0,009$ in ihren Plasminogenwerten (Kruskal-Wallis H-Test). Zur Untersuchung, ob sich die drei einzelnen Thrombosekollektiv-Untergruppen im Paarvergleich signifikant voneinander unterscheiden, verwenden

wir den Mann-Whitney U-Test. Das Signifikanzniveau wird nach der Anpassung nach Bonferroni bei $\alpha = 0,0167$ festgelegt. Im Paarvergleich hat das Thrombosekollektiv T– ein signifikant niedrigeres Plasminogen als Tp ($p = 0,007$). Bei den beiden anderen Paarvergleichen finden sich keine signifikanten Unterschiede.

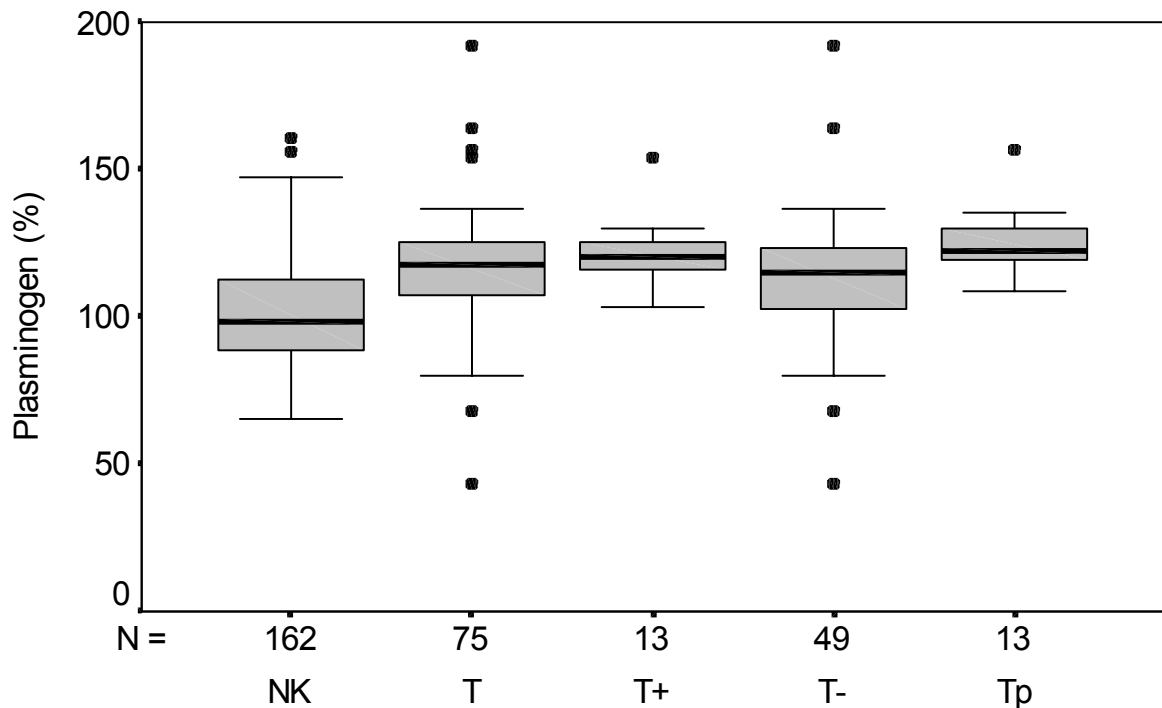


Abbildung 3.22. Plasminogenverteilung der Kollektive mit Median (Balken), Interquartilbereich (Kasten), Spannweite (Linie mit Querbalken) und Ausreißer (Punkte). Der Test auf signifikante Unterschiede (Irrtumswahrscheinlichkeit p) im zweiseitigen Mann-Whitney U-Test ist für alle Thrombosekollektive im Vergleich zum Normalkollektiv hoch signifikant ($p < 0,001$).

Mann-Whitney U-Test	Zweiseitige Signifikanz
T+ gegen T–	$p = 0,10$
T+ gegen Tp	$p = 0,20$
T– gegen Tp	$p = 0,007$

Tabelle 3.14. Paarvergleiche der einzelnen Thrombosekollektiv-Untergruppen (T+, T–, Tp) für Plasminogen mit dem Mann-Whitney U-Test.

3.3.6.11. D-Dimer

Alle Thrombosekollektive (T: "Thrombosekollektiv (Gesamt)", 565,2 ng/ml; T+: "akute Thrombose mit Thromboseneigung", 500,8 ng/ml; T–: "akute Thrombose ohne Thromboseneigung", 630,5 ng/ml; Tp: "nur alte Thrombose/positive Familienanamnese",

179,1 ng/ml) haben einen deutlich größeren Interquartilbereich als das Normalkollektiv (58,4 ng/ml) und bis auf das Thrombosekollektiv Tp ($p = 0,24$) ein hoch signifikant ($p < 0,001$) höheres D-Dimer im Vergleich zum Normalkollektiv (zweiseitiger Mann-Whitney U-Test). Die Werte für D-Dimer liegen zudem deutlich über dem oberen Referenzbereich von <250 bis 280 ng/ml.

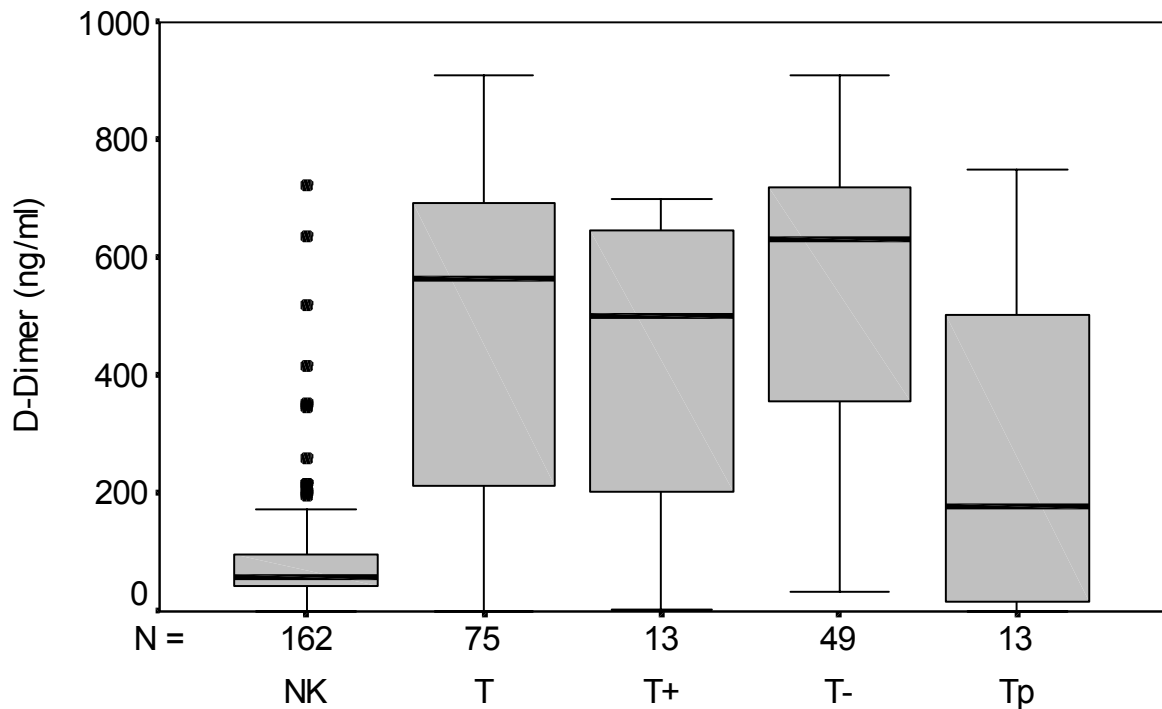


Abbildung 3.23. D-Dimerverteilung der Kollektive mit Median (Balken), Interquartilbereich (Kasten), Spannweite (Linie mit Querbalken) und Ausreißer (Punkte). Der Test auf signifikante Unterschiede (Irrtumswahrscheinlichkeit p) im zweiseitigen Mann-Whitney U-Test ist für die Thrombosekollektive T, T+ und T- im Vergleich zum Normalkollektiv hoch signifikant ($p < 0,001$). Die Kollektive Tp und NK unterscheiden sich nicht signifikant ($p = 0,24$).

Mann-Whitney U-Test	Zweiseitige Signifikanz
T+ gegen T-	$p = 0,14$
T+ gegen Tp	$p = 0,22$
T- gegen Tp	$p = 0,003$

Tabelle 3.15. Paarvergleiche der einzelnen Thrombosekollektiv-Untergruppen (T+, T-, Tp) für D-Dimer mit dem Mann-Whitney U-Test.

Die einzelnen Thrombosekollektiv-Untergruppen (T+, T-, Tp) unterscheiden sich signifikant mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p = 0,007$ in ihren D-Dimerwerten (Kruskal-Wallis H-Test). Zur Untersuchung, ob sich die drei einzelnen Thrombosekollektiv-

Untergruppen im Paarvergleich signifikant voneinander unterscheiden, verwenden wir den Mann-Whitney U-Test. Das Signifikanzniveau wird nach der Anpassung nach Bonferroni bei $\alpha = 0,0167$ festgelegt. Im Paarvergleich hat das Thrombosekollektiv T– ein signifikant ($p = 0,003$) höheres D-Dimer als Tp. Bei den beiden anderen Paarvergleichen finden sich keine signifikanten Unterschiede.

3.3.6.12. PAI-1

Im Vergleich mit dem Normalkollektiv (1,15 U/ml) haben alle Thrombosekollektive (T: "Thrombosekollektiv (Gesamt)", 2,70 U/ml; T+: "akute Thrombose mit Thrombose-
neigung", 2,42 U/ml; T–: "akute Thrombose ohne Thromboseneigung", 2,60 U/ml; Tp: "nur alte Thrombose/positive Familienanamnese", 3,18 U/ml) einen hoch signifikant ($p < 0,001$) höheren PAI-1 im zweiseitigen Mann-Whitney U-Test. Die Kollektive liegen dabei alle im Referenzbereich. Die einzelnen Thrombosekollektiv-Untergruppen (T+, T–, Tp) unterscheiden sich nicht signifikant voneinander in ihren PAI-1-Werten (Kruskal-Wallis H-Test).

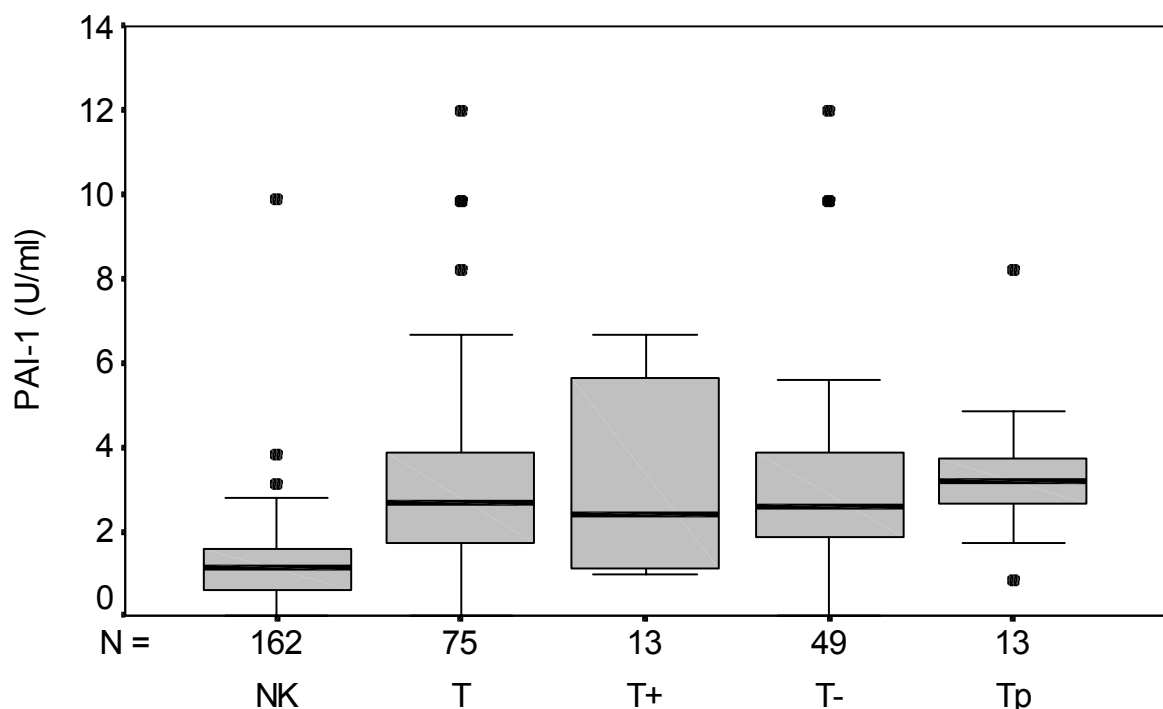


Abbildung 3.24. PAI-1-Verteilung der Kollektive mit Median (Balken), Interquartilbereich (Kasten), Spannweite (Linie mit Querbalken) und Ausreißer (Punkte). Der Test auf signifikante Unterschiede (Irrtumswahrscheinlichkeit p) im zweiseitigen Mann-Whitney U-Test ist für alle Thrombosekollektive im Vergleich zum Normalkollektiv hoch signifikant ($p < 0,001$).

3.3.6.13. Fibrinplatte mit normaler Euglobulinfraktion (FP-NEF)

Alle Thrombosekollektive (T: "Thrombosekollektiv (Gesamt)", 441 mm²; T+: "akute Thrombose mit Thromboseneigung", 610 mm²; T-: "akute Thrombose ohne Thromboseneigung", 441 mm²; Tp: "nur alte Thrombose/positive Familienanamnese", 252 mm²) haben eine hoch signifikant ($p < 0,001$) kleinere Lysefläche als das Normalkollektiv (3106 mm²) im zweiseitigen Mann-Whitney U-Test. Die Lyseflächen liegen im Median innerhalb des von uns ermittelten Referenzbereiches von 109 bis 7764 mm². Die einzelnen Thrombosekollektiv-Untergruppen (T+, T-, Tp) unterscheiden sich nicht signifikant voneinander in ihren Lyseflächen (Kruskal-Wallis H-Test).

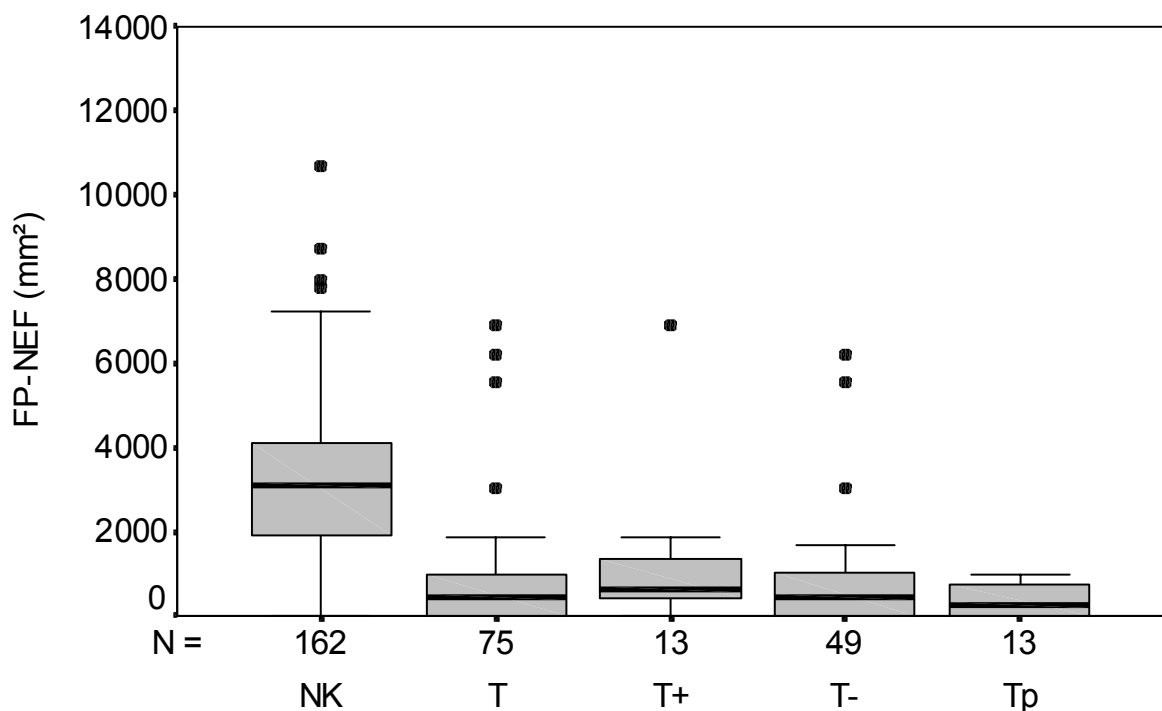


Abbildung 3.25. FP-NEF-Verteilung der Kollektive mit Median (Balken), Interquartilbereich (Kasten), Spannweite (Linie mit Querbalken) und Ausreißer (Punkte). Der Test auf signifikante Unterschiede (Irrtumswahrscheinlichkeit p) im zweiseitigen Mann-Whitney U-Test ist für alle Thrombosekollektive im Vergleich zum Normalkollektiv hoch signifikant ($p < 0,001$).

3.3.6.14. Fibrinplatte mit aktivierter Euglobulinfraktion (FP-DEF)

Alle Thrombosekollektive (T: "Thrombosekollektiv (Gesamt)", 2396 mm²; T+: "akute Thrombose mit Thromboseneigung", 2607 mm²; T-: "akute Thrombose ohne Thromboseneigung", 2379 mm²; Tp: "nur alte Thrombose/positive Familienanamnese", 2396 mm²) haben eine hoch signifikant ($p < 0,001$) kleinere Lysefläche als das Normal-

kollektiv (6984 mm²) im zweiseitigen Mann-Whitney U-Test. Die Lyseflächen der Thrombosekollektive liegen im Median deutlich unterhalb des von uns ermittelten Referenzbereiches von 3636 bis 10368 mm². Die einzelnen Thrombosekollektiv-Untergruppen (T+, T-, Tp) unterscheiden sich nicht signifikant voneinander in ihren Lyseflächen (Kruskal-Wallis H-Test).

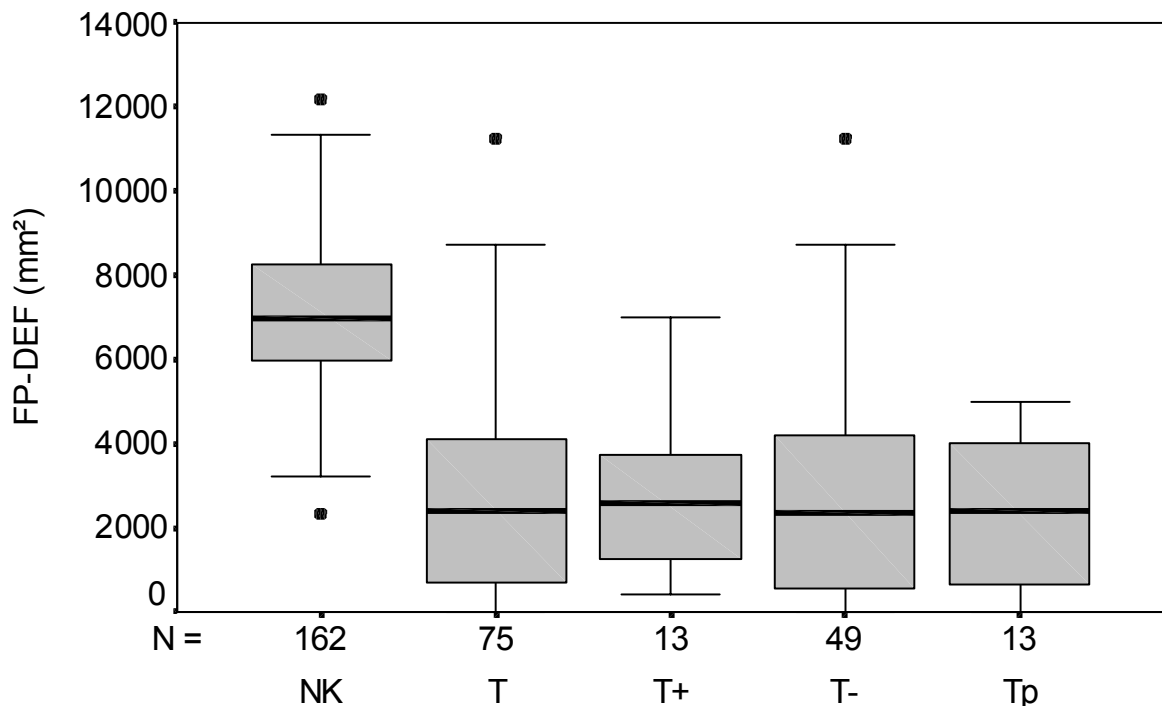


Abbildung 3.26. FP-DEF-Verteilung der Kollektive mit Median (Balken), Interquartilbereich (Kasten), Spannweite (Linie mit Querbalken) und Ausreißer (Punkte). Der Test auf signifikante Unterschiede (Irrtumswahrscheinlichkeit p) im zweiseitigen Mann-Whitney U-Test ist für alle Thrombosekollektive im Vergleich zum Normalkollektiv hoch signifikant ($p < 0,001$).

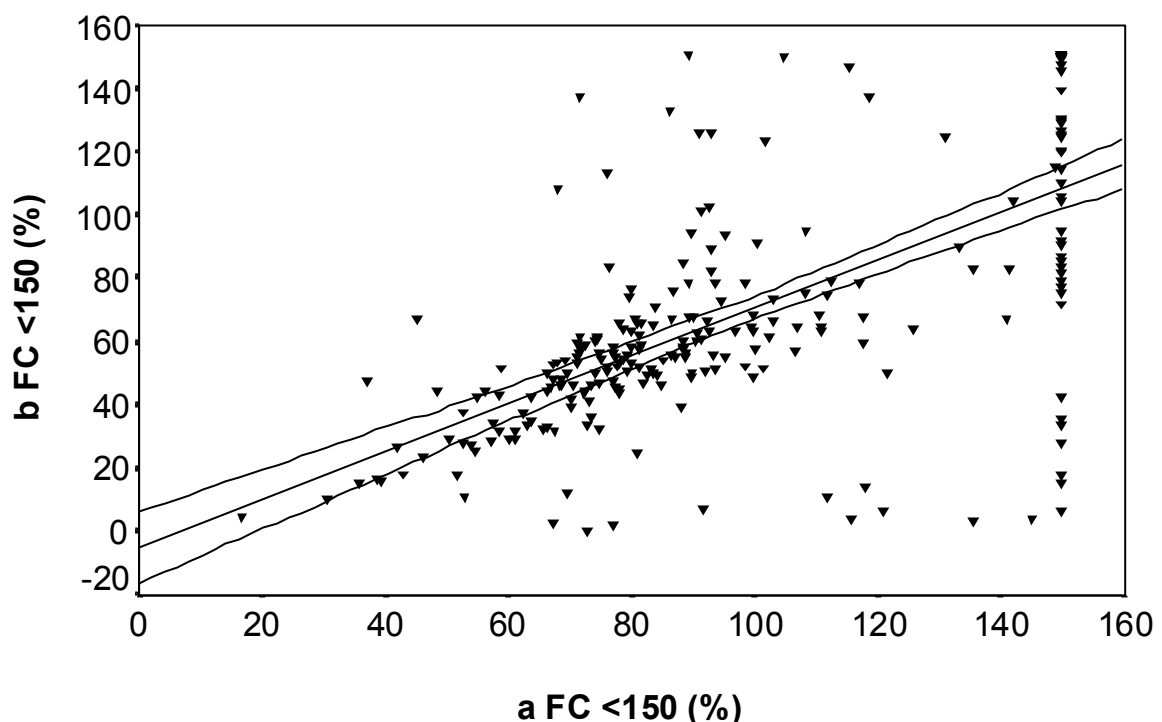
3.3.6.15. Untersuchung des Protein C- und S-Systems bei auffälligem ProC Globalwert

Bei auffälligem ProC Globalwert werden bei einer ausgewählten Gruppe von Probanden zusätzliche Parameter untersucht. Diese Parameter differenzieren einen auffälligen Befund im Protein C- und S-System, wie er beim ProC Global gefunden werden kann, genauer in Protein C- oder S-Mangel und aPC-Resistenz. Eine statistische Analyse der Thrombosekollektive im Vergleich zum Normalkollektiv ist nur für die Parameter Protein C oder S möglich, da uns bei den anderen Parametern ein Vergleichskollektiv fehlt. Diese Parameter (Akzelerin-Inaktivierung, aPCR und Faktor V-Leiden) werden nur un-

tereinander und mit dem Thrombosekollektiv T ("Thrombosekollektiv (Gesamt)") verglichen.

Das Thrombosekollektiv T hat ein signifikant niedrigeres Protein C und ein hoch signifikant niedrigeres Protein S, das Thrombosekollektiv T- ("akute Thrombose ohne Thromboseneigung") hat ein hoch signifikant niedrigeres Protein S, das Thrombosekollektiv Tp ("nur alte Thrombose/positive Familienanamnese") hat ein hoch signifikant niedrigeres Protein C und S als das Normalkollektiv. Es besteht kein signifikanter Unterschied in der Akzelerin-Inaktivierung, der aPC-Resistenz und des Faktor V-Leiden Genotypes der einzelnen Thrombosekollektive im Vergleich zum Thrombosekollektiv T (Gesamt). Die Werte der Kollektive für Protein C und S, der Akzelerin-Inaktivierung und die aPC-Resistenz liegen dabei alle im Referenzbereich. Die einzelnen Thrombosekollektiv-Untergruppen (T+, T-, Tp) unterscheiden sich nicht signifikant voneinander in ihren Werten für Protein C und S, der Akzelerin-Inaktivierung sowie der aPC-Resistenz (Kruskal-Wallis H-Test).

3.3.7. Korrelationen



$$b \text{ FC} = -4,82 + 0,76 * a \text{ FC};$$

$$r = 0,646; \quad R^2 = 0,417; \quad p < 0,001$$

Abbildung 3.27. Streudiagramm der basalen FC gegen die aktivierte FC mit Regressionsgerade und 95%-Konfidenzintervall. Regressionsgleichung der basalen FC bezüglich aktivierter FC, Korrelationskoeffizient r und Bestimmtheitsmaß R^2 mit Signifikanz p .

Pearson'scher Korrelationskoeffizient r , Gesamtkollektiv, N = 254														
	b FC <150	a FC <150	TPZ	aPTT	Fbg	AT III	F XII	PCG	α_2 -AP	Plg	D-Dim	PAI	FP	
													NEF	DEF
b FC <150		0,65	0,03	-0,06	<u>-0,15</u>	0,19	0,20	0,08	0,20	0,38	-0,28	-0,47	0,44	0,33
a FC <150	0,65		0,32	-0,19	0,04	<u>0,16</u>	0,55	-0,04	0,58	0,52	-0,26	0,00	0,40	0,44
TPZ	0,03	0,32		-0,33	0,07	0,12	0,41	0,11	0,39	0,18	<u>-0,16</u>	0,20	0,24	0,33
aPTT	-0,06	-0,19	-0,33		0,23	-0,39	-0,37	-0,11	-0,22	0,01	0,49	0,06	-0,18	-0,30
Fbg	<u>-0,15</u>	0,04	0,07	0,23		-0,42	-0,02	-0,46	<u>0,14</u>	0,47	0,56	0,53	-0,30	-0,47
AT III	0,19	<u>0,16</u>	<u>0,12</u>	-0,39	-0,42		0,25	0,29	0,25	-0,10	-0,58	-0,33	0,26	0,35
F XII	0,20	0,55	0,41	-0,37	-0,02	0,25		-0,09	0,55	0,27	-0,30	0,21	0,32	0,43
PCG	0,08	-0,04	0,11	-0,11	-0,46	0,29	-0,09		-0,11	-0,28	-0,36	-0,39	0,16	0,25
α_2 -AP	0,20	0,58	0,39	-0,22	<u>0,14</u>	0,25	0,55	-0,11		0,38	-0,23	0,19	0,21	0,32
Plg	0,38	0,52	0,18	0,01	0,47	-0,10	0,27	-0,28	0,38		0,11	0,26	0,01	<u>-0,14</u>
D-Dimer	-0,28	-0,26	<u>-0,16</u>	0,49	0,56	-0,58	-0,30	-0,36	-0,23	0,11		0,37	-0,40	-0,55
PAI	-0,47	0,00	0,20	0,06	0,53	-0,33	0,21	-0,39	0,19	0,26	0,37		-0,32	-0,28
FP-NEF	0,44	0,40	0,24	-0,18	-0,30	0,26	0,32	0,16	0,21	0,01	-0,40	-0,32		0,72
FP-DEF	0,33	0,44	0,33	-0,30	-0,47	0,35	0,43	0,25	0,32	<u>-0,14</u>	-0,55	-0,28	0,72	

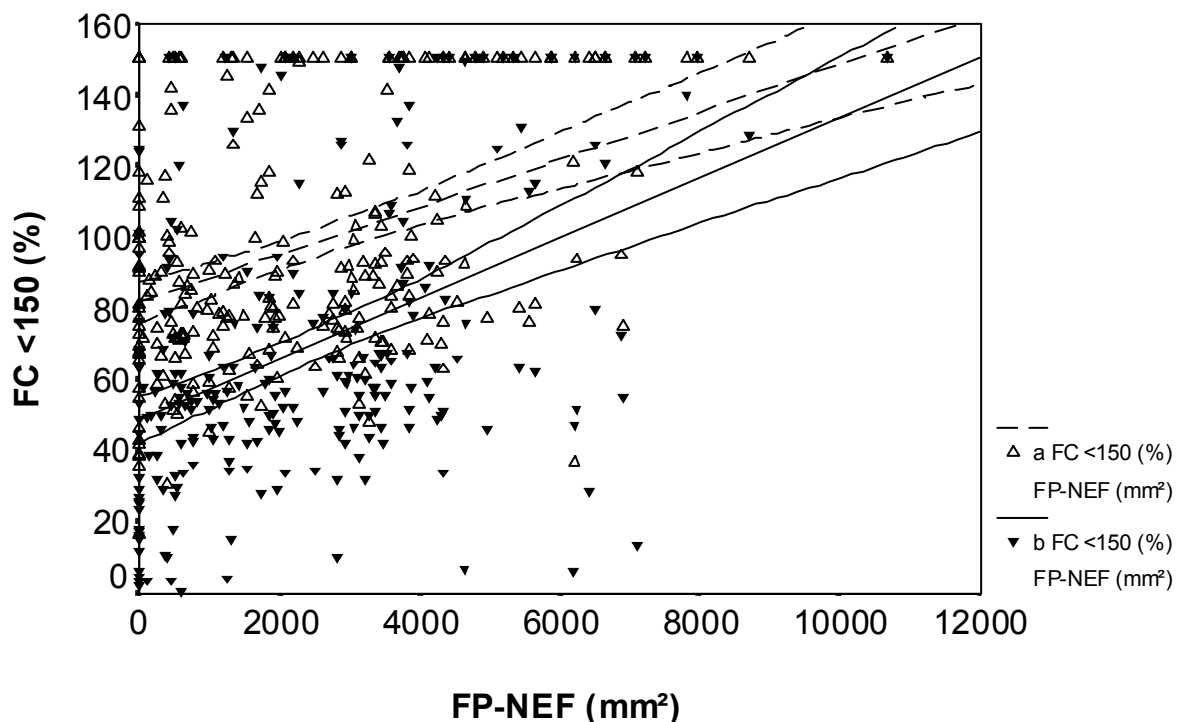
signifikante Korrelationen (2-seitig) auf dem Niveau von $\alpha = 0,01$ sind **fett** eingetragen.

signifikante Korrelationen (2-seitig) auf dem Niveau von $\alpha = 0,05$ sind unterstrichen eingetragen.

schwache (>0,25) und **starke** (>0,70) Korrelationen sind zusätzlich in der unteren Hälfte der Tabelle hellgrau, bzw. dunkelgrau gekennzeichnet.

Tabelle 3.16. Korrelation von der FC mit den Begleitparametern im Gesamtkollektiv.

Nach der Auswertung der einzelnen Parameter auf signifikante Unterschiede, untersuchen wir ihren linearen Zusammenhang in der Summe (Gesamtkollektiv: d.i. Normalkollektiv NK, Schwangerenkollektiv SK, Thrombosekollektiv (Gesamt) T), um Einzelabhängigkeiten der Parameter aufzudecken. Dabei verwenden wir den Pearson'schen Korrelationskoeffizienten r , obwohl wir bei den vorherigen statistischen Tests nicht von einer Normalverteilung ausgegangen sind. Wir sind von der Annahme ausgegangen, dass ein linearer Zusammenhang der FC zu den Begleitparametern besteht und deshalb eine lineare Regressionsanalyse gestattet ist. Bei der im weiteren Verlauf durchgeführten Regressionsanalyse (Testung auf einen linearen Zusammenhang) beruht das Maß für die Güte der Anpassung der Regressionsgeraden an den Beobachtungswert, also das Bestimmtheitsmaß R^2 , auf dem Pearson'schen Korrelationskoeffizienten r . Daher verwenden wir das lineare Zusammenhangsmaß r und nicht das monotone r_s (Spearman'scher Korrelationskoeffizient). Die Korrelationsanalyse erfolgt sowohl für die FC mit den Begleitparametern, als auch für ProC Global mit Protein C und S, Akzelerin-Inaktivierung (AKI), aPC-Resistenz (aPCR) und Faktor V-Leiden

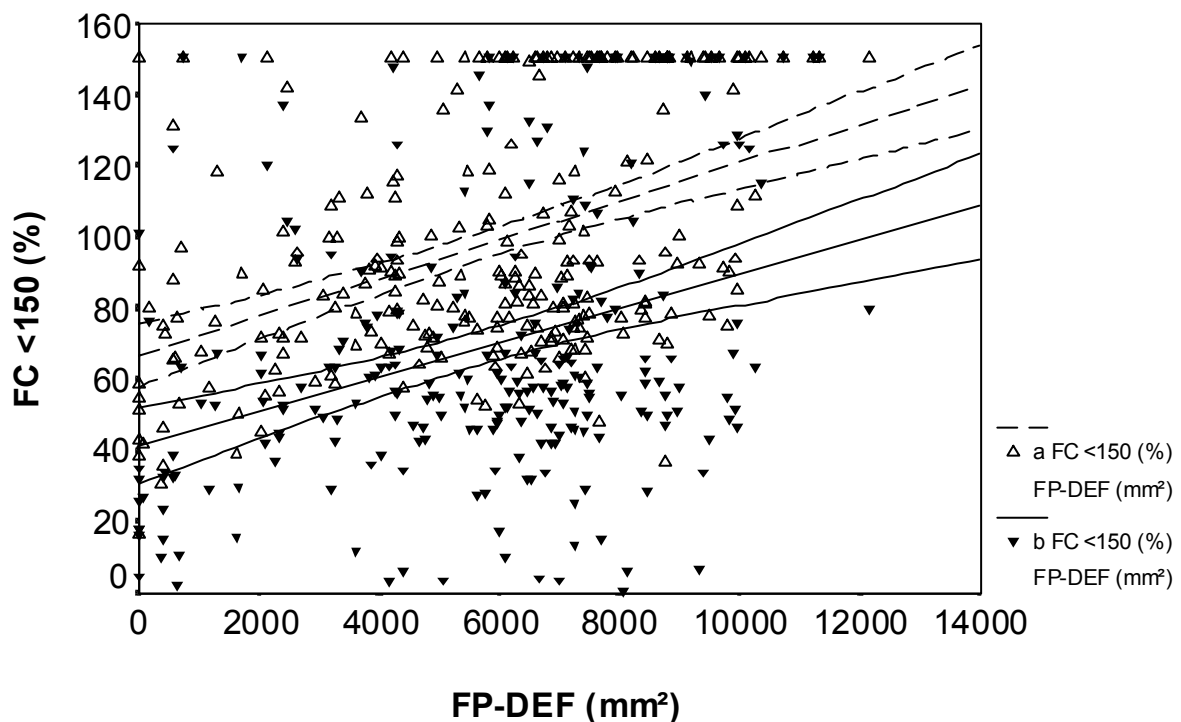


$$\begin{aligned}
 \text{b FC} &= 48,68 + 8,50^{-3} * \text{FP-NEF}; & r &= 0,440; & R^2 &= 0,193; & p < 0,001 \\
 \text{a FC} &= 81,62 + 6,67^{-3} * \text{FP-NEF}; & r &= 0,404; & R^2 &= 0,163; & p < 0,001
 \end{aligned}$$

Abbildung 3.28. Streudiagramm der FC gegen die Fibrinplatte mit normaler Euglobulinfraktion (FP-NEF) mit Regressionsgerade und 95%-Konfidenzintervall. Regressionsgleichung der FC bezüglich FP-NEF, Korrelationskoeffizient r und Bestimmtheitsmaß R^2 mit Signifikanz p .

3.3.7.1. Korrelation von der FC mit den Begleitparametern

Zuerst wird die FC auf Einzelabhängigkeiten von den Begleitparametern in der Summe aller Kollektive (Gesamtkollektiv) untersucht. Das Ergebnis wird mit Hilfe einer Tabelle der Korrelationskoeffizienten (Tabelle 3.16.), sowie mittels einer Auswahl von Streudiagrammen der FC und ihrer Begleitparameter, die für die Regressionsanalyse relevant sind, dargestellt (Abbildung 3.27. bis Abbildung 3.35.). Es wird sowohl der Korrelationskoeffizient r , als auch das Bestimmtheitsmaß R^2 mit der entsprechenden Regressionsgleichung und der zweiseitigen Signifikanz p für den linearen Zusammenhang angegeben. Die Regressionsgerade wird mit dem 95%igen Konfidenzintervall als Linienpaar um die Regressionsgerade in dem entsprechenden Streudiagramm dargestellt. Die Streuung der Werte um die Regressionsgerade entspricht der Stärke des linearen Zusammenhanges, d.h. dem Korrelationskoeffizient r .

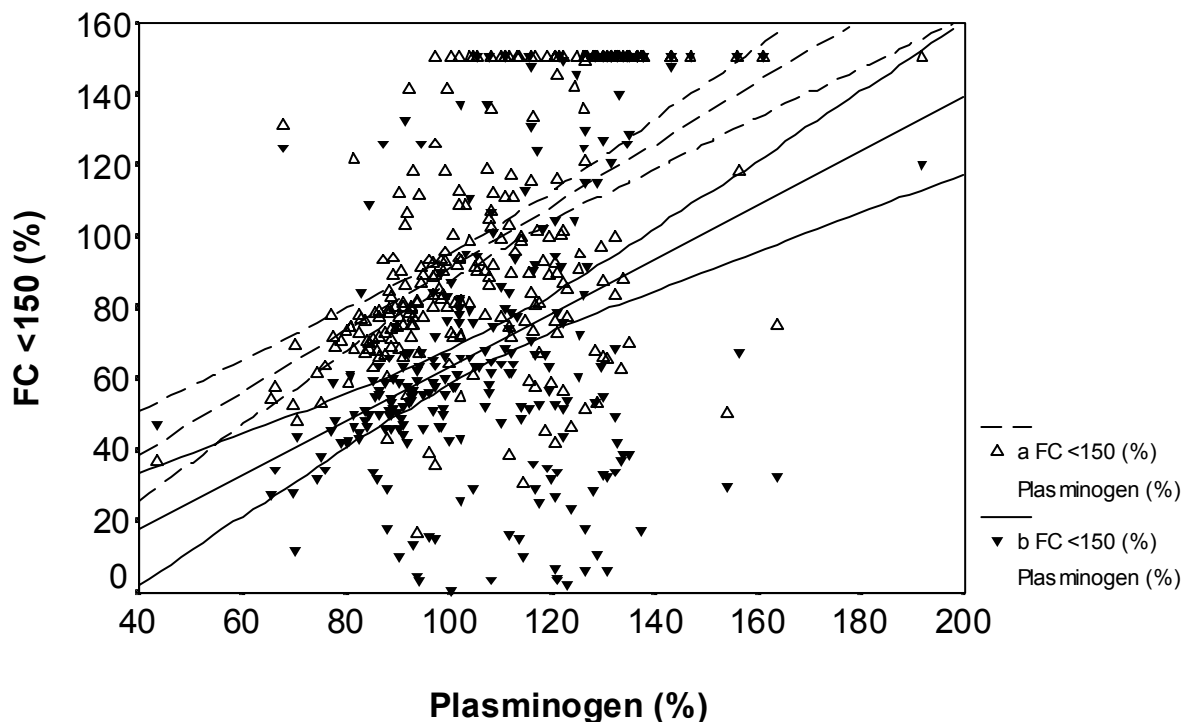


b FC = 41,65 + 4,79⁻³ * FP-DEF; $r = 0,334$; $R^2 = 0,111$; $p < 0,001$
a FC = 66,86 + 5,38⁻³ * FP-DEF; $r = 0,439$; $R^2 = 0,193$; $p < 0,001$

Abbildung 3.29. Streudiagramm der FC gegen die Fibrinplatte mit aktivierter Euglobulinfraktion (FP-DEF) mit Regressionsgerade und 95%-Konfidenzintervall. Regressionsgleichung der FC bezüglich FP-DEF, Korrelationskoeffizient r und Bestimmtheitsmaß R^2 mit Signifikanz p .

3.3.7.1.1. Fibrinolytische Kapazität und Fibrinplatte

Die basale und aktivierte FC korrelieren eng mit einer hohen Signifikanz ($r = 0,65$) (Abbildung 3.27.). Dies ist durch den sehr ähnlichen Testaufbau verständlich. Die beiden Varianten der Fibrinplatte korrelieren ebenfalls miteinander. Die Stärke des Zusammenhanges ist nur höher ($r = 0,72$). FC und Fibrinplatte hängen hoch signifikant zusammen: die basale FC korreliert mit der Fibrinplatte mit normaler Euglobulinfraktion (FP-NEF) ($r = 0,44$) etwas besser als mit der Fibrinplatte mit aktivierten Euglobulinfraktion (FP-DEF) ($r = 0,40$), die aktivierte FC korreliert mit der Fibrinplatte mit aktivierten Euglobulinfraktion (FP-DEF) ($r = 0,44$) deutlich besser als mit der Fibrinplatte mit normaler Euglobulinfraktion (FP-NEF) ($r = 0,33$), aber etwa ebenso wie die basale FC mit der Fibrinplatte mit normaler Euglobulinfraktion (FP-NEF) (Abbildung 3.28. und Abbildung 3.29.). FC und Fibrinplatte sollen auf ähnliche Weise die fibrinolytischen Eigenschaften des Plasmas zu erfassen, so dass die Übereinstimmung nicht verwundert.



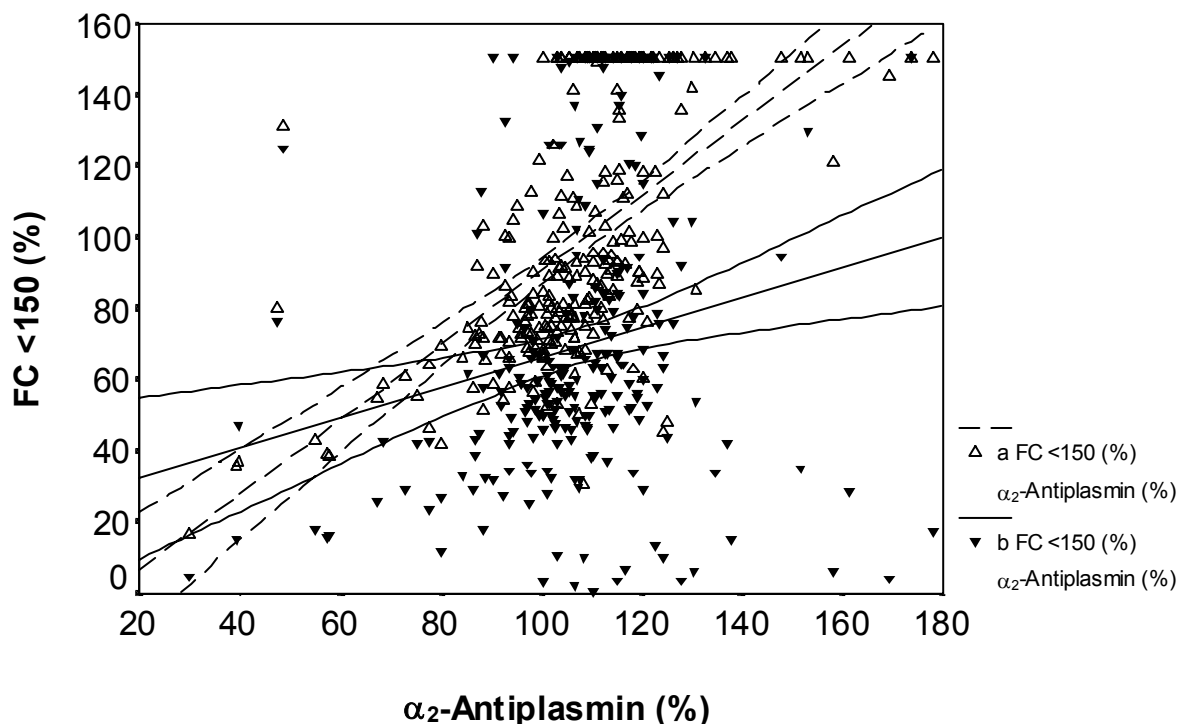
$$\begin{aligned} \text{b FC} &= -12,30 + 0,76 * \text{Plasminogen}; & r &= 0,384; & R^2 &= 0,148; & p < 0,001 \\ \text{a FC} &= 3,82 + 0,87 * \text{Plasminogen}; & r &= 0,519; & R^2 &= 0,269; & p < 0,001 \end{aligned}$$

Abbildung 3.30. Streudiagramm der FC gegen Plasminogen mit Regressionsgerade und 95%-Konfidenzintervall. Regressionsgleichung der FC bezüglich Plasminogen, Korrelationskoeffizient r und Bestimmtheitsmaß R^2 mit Signifikanz p .

3.3.7.1.2. Plasminogen und α_2 -Antiplasmin

Plasminogen hat einen deutlich höheren Einfluss auf die aktivierte FC ($r = 0,52$) als auf die basale FC ($r = 0,38$) (Abbildung 3.30.); bei beiden Parametern ist der Einfluss signifikant. Aufgrund der Testbedingungen bei der aktivierten FC mit maximaler Stimulation der Fibrinolyse entspricht dieses Ergebnis den Erwartungen. Anders verhält sich die Fibrinplatte zu Plasminogen ($r = 0,01$ für FP-NEF und $r = -0,14$ für FP-DEF). Die Fibrinplatte scheint unabhängig von der jeweiligen Konzentration des Plasminogens zu sein. Dies ist jedoch aufgrund des Aufbaus der Fibrinplatte zu verstehen, da sich Plasminogen im Überschuss in der Fibrinplatte befindet (siehe Kapitel 2.5.2.).

Zwischen basaler FC und α_2 -Antiplasmin besteht eine schwache positive Korrelation ($r = 0,20$), zwischen aktivierter FC und α_2 -Antiplasmin besteht eine deutliche positive Korrelation ($r = 0,58$) (Abbildung 3.31.), die primär nicht verständlich ist. Möglicherweise kommt sie durch die Korrelation von α_2 -Antiplasmin und Plasminogen ($r = 0,38$) zustande. Je höher der Plasminogenwert, desto höher ist auch der aktivierte FC-Wert. Dieser



$$b \text{ FC} = 24,06 + 0,42 * \alpha_2\text{-Antiplasmin}; \quad r = 0,199; \quad R^2 = 0,039; \quad p = 0,001$$

$$a \text{ FC} = -14,24 + 1,05 * \alpha_2\text{-Antiplasmin}; \quad r = 0,579; \quad R^2 = 0,336; \quad p < 0,001$$

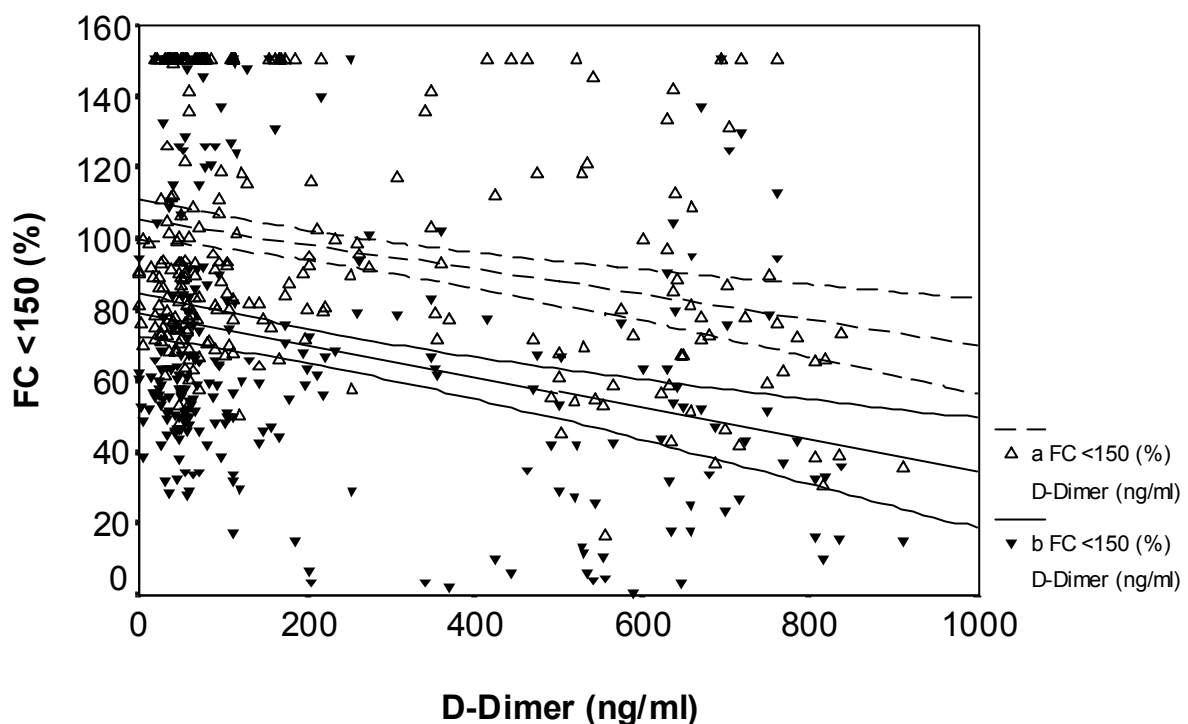
Abbildung 3.31. Streudiagramm der FC gegen α_2 -Antiplasmin mit Regressionsgerade und 95%-Konfidenzintervall. Regressionsgleichung der FC bezüglich α_2 -Antiplasmin, Korrelationskoeffizient r und Bestimmtheitsmaß R^2 mit Signifikanz p .

korreliert ebenso mit einem jeweils höheren α_2 -Antiplasmin. Ähnlich verhält sich α_2 -Antiplasmin zur Fibrinplatte ($r = 0,21$ für FP-NEF und $r = 0,32$ für FP-DEF).

3.3.7.1.3. D-Dimer, PAI-1 und Faktor XII

D-Dimer als Thromboseparameter korreliert negativ mit der FC ($r = -0,28$ für b FC und $r = -0,26$ für die a FC) (Abbildung 3.32.). Somit scheint die FC in der Lage zu sein, Hinweise für das Vorliegen einer Thrombose zu geben. Noch stärker verhält sich die Fibrinplatte zu D-Dimer ($r = -0,40$ für FP-NEF und $r = -0,55$ für FP-DEF). Daher scheint die Fibrinplatte besser als die FC, Hinweise für eine Thrombose zu geben.

Erwartungsgemäß ist PAI-1 hoch signifikant negativ mit der basalen FC ($r = -0,47$) korreliert. Auf die aktivierte FC hat PAI-1 überhaupt keinen Einfluss (Abbildung 3.33.). Auf beide Fibrinplatten hat PAI-1 ähnlichen Einfluss ($r = -0,32$ für FP-NEF und $r = -0,28$ für FP-DEF). Auch hier besteht eine negative Korrelation, die schwächer als die der basalen FC ist und für beide Varianten der Fibrinplatte etwa gleich ist.



$$b \text{ FC} = 78,81 - 44,46^{-3} * \text{D-Dimer}; \quad r = -0,279; \quad R^2 = 0,078; \quad p < 0,001$$

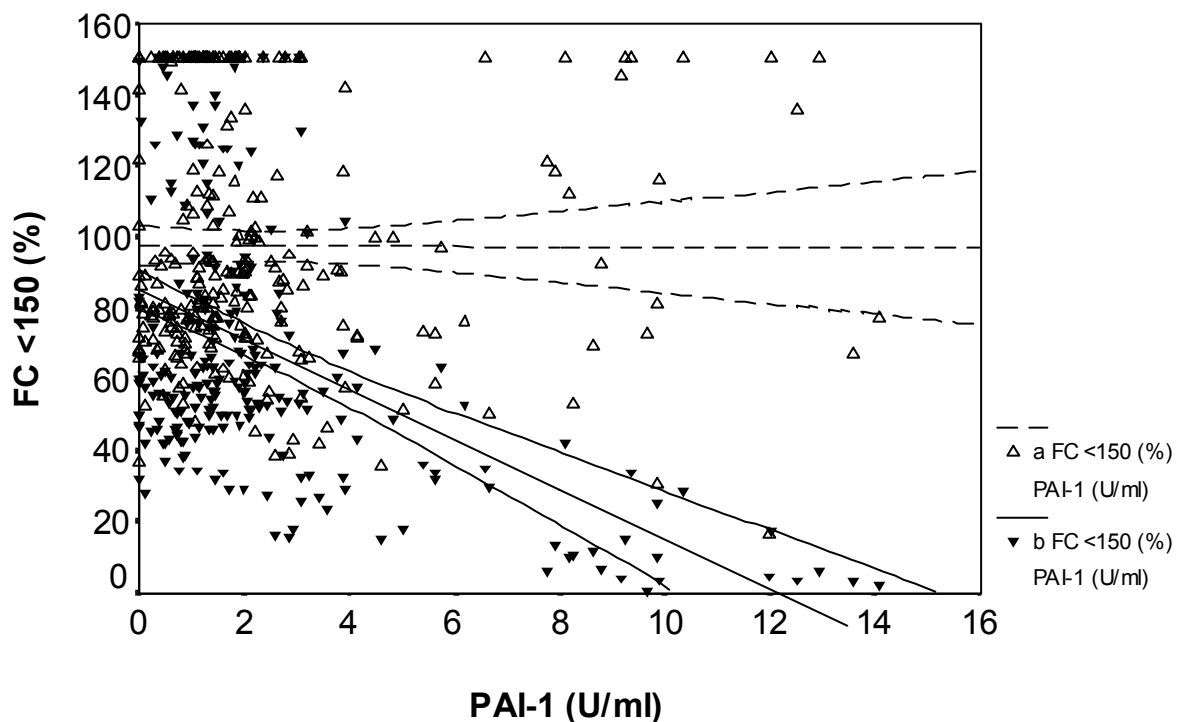
$$a \text{ FC} = 105,33 - 35,20^{-3} * \text{D-Dimer}; \quad r = -0,259; \quad R^2 = 0,067; \quad p < 0,001$$

Abbildung 3.32. Streudiagramm der FC gegen D-Dimer mit Regressionsgerade und 95%-Konfidenzintervall. Regressionsgleichung der FC bezüglich D-Dimer, Korrelationskoeffizient r und Bestimmtheitsmaß R^2 mit Signifikanz p .

Faktor XII hat einen mittelstarken, hoch signifikanten Einfluss auf die aktivierte FC ($r = 0,55$) und keinen relevanten Einfluss auf die basale FC ($r = 0,20$) (Abbildung 3.34.). Die theoretischen Überlegungen der Testkonzeption bestätigen sich damit. Abgeschwächt findet sich diese Konstellation auch bei der Fibrinplatte wieder ($r = 0,32$ für FP-NEF und $r = 0,43$ für FP-DEF).

3.3.7.1.4. TPZ, aPTT, Fibrinogen, Antithrombin III und ProC Global

TPZ, aPTT, Fibrinogen, Antithrombin III (Abbildung 3.35.) und ProC Global haben keine relevanten Korrelationen zur FC, bis auf TPZ zur aktivierten FC ($r = 0,32$). Für die Fibrinplatte fallen folgende schwache Korrelationen auf: zur TPZ ($r = 0,24$ für FP-NEF und $r = 0,33$ für FP-DEF), aPTT ($r = -0,18$ für FP-NEF und $r = -0,30$ für FP-DEF), zum Fibrinogen ($r = -0,30$ für FP-NEF und $r = -0,47$ für FP-DEF) und Antithrombin III ($r = 0,26$ für FP-NEF und $r = 0,35$ für FP-DEF).



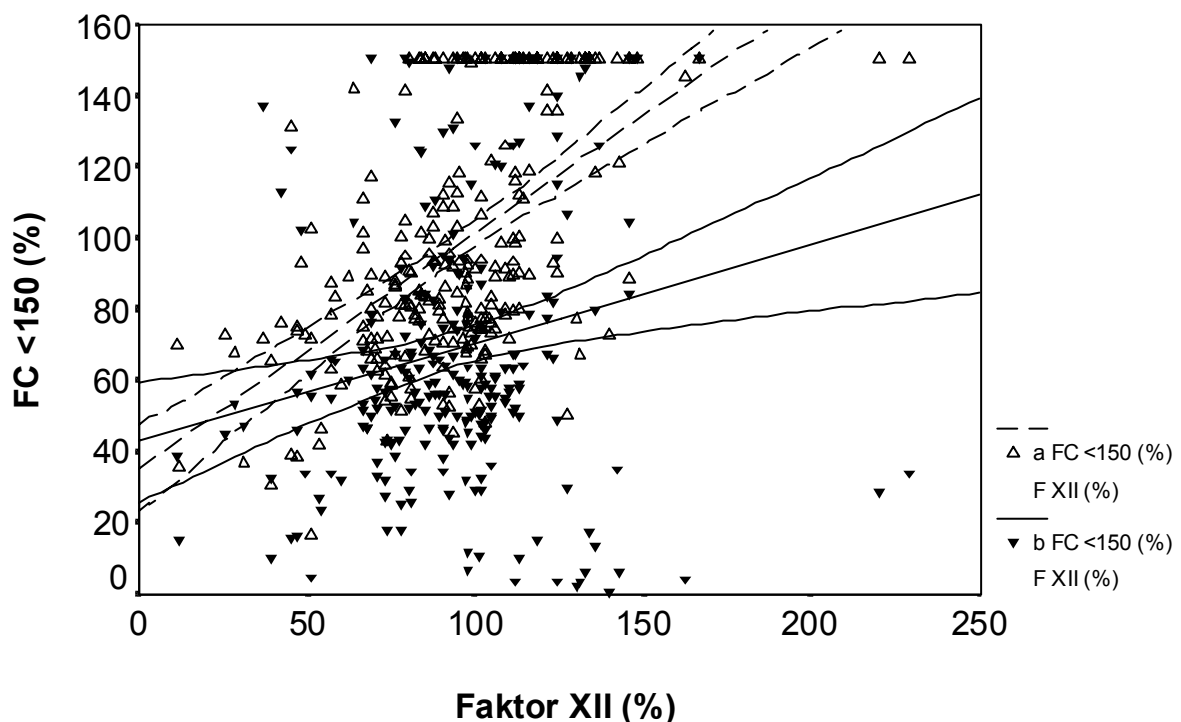
$$\begin{aligned}
 \text{b FC} &= 85,28 - 6,98 * \text{PAI-1}; & r &= -0,472; & R^2 &= 0,223; & p &< 0,001 \\
 \text{a FC} &= 97,61 - 36,82^{-3} * \text{PAI-1}; & r &= 0,003; & R^2 &= 0,000; & p &= 0,963
 \end{aligned}$$

Abbildung 3.33. Streudiagramm der FC gegen PAI-1 mit Regressionsgerade und 95%-Konfidenzintervall. Regressionsgleichung der FC bezüglich PAI-1, Korrelationskoeffizient r und Bestimmtheitsmaß R^2 mit Signifikanz p .

3.3.7.2. Korrelation von ProC Global mit Protein C und S, Akzelerin-Inaktivierung (AKI), aPC-Resistenz und Faktor V-Leiden

Des Weiteren untersuchen wir mit einer Korrelationsanalyse die Einzelabhängigkeiten des ProC Global von Protein C und S, der Akzelerin-Inaktivierung (AKI) und aPC-Resistenz (aPCR), sowie des Faktor V-Leiden Genotypes bei einer Auswahl von Personen des Gesamtkollektives anhand des linearen Zusammenhanges. Das Ergebnis wird mit Hilfe einer Tabelle der Korrelationskoeffizienten (Tabelle 3.17.), sowie von Streudiagrammen von ProC Global mit Protein C und S, der Akzelerin-Inaktivierung (AKI) und aPC-Resistenz (aPCR), sowie des Faktor V-Leiden Genotypes dargestellt (Abbildung 3.36. bis Abbildung 3.40.).

Wieder wird sowohl der Korrelationskoeffizient r , als auch das Bestimmtheitsmaß R^2 mit der entsprechenden Regressionsgleichung und der zweiseitigen Signifikanz p für den linearen Zusammenhang angegeben. Die Regressionsgerade wird auch hier mit dem 95%igen Konfidenzintervall als Linienpaar um die Regressionsgerade als Streudia-



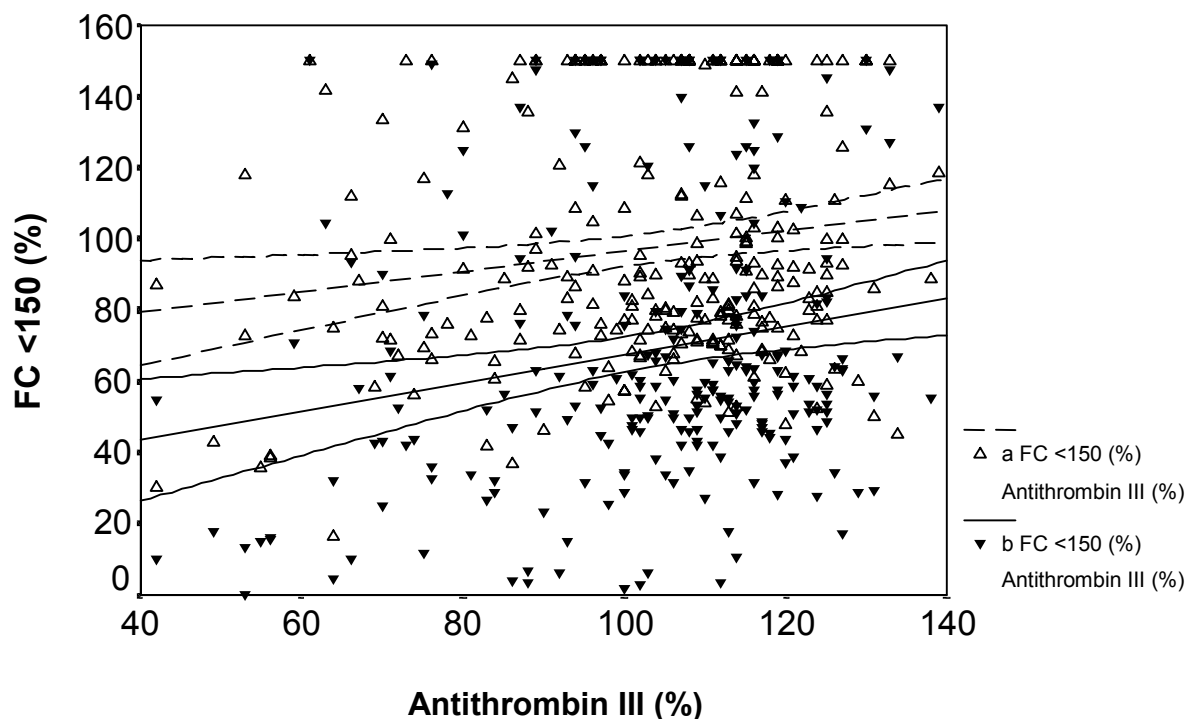
b FC = 42,90 + 0,28 * Faktor XII;	$r = 0,196$;	$R^2 = 0,038$;	p = 0,002
a FC = 35,40 + 0,66 * Faktor XII;	$r = 0,547$;	$R^2 = 0,300$;	p < 0,001

Abbildung 3.34. Streudiagramm der FC gegen Faktor XII mit Regressionsgerade und 95%-Konfidenzintervall. Regressionsgleichung der FC bezüglich Faktor XII, Korrelationskoeffizient r und Bestimmtheitsmaß R^2 mit Signifikanz p .

gramm dargestellt. Die Streuung der Werte um die Regressionsgerade entspricht der Stärke des linearen Zusammenhanges, d.h. dem Korrelationskoeffizient r .

Eine Untersuchung mit Hilfe einer Regressionsanalyse im weiteren Verlauf erfolgt nicht, weil sich die Anzahl der untersuchten Personen der einzelnen unabhängigen Variablen unterscheidet, und dadurch eine Aussage nicht möglich ist.

ProC Global ist mit Protein C (Abbildung 3.36.), im Gegensatz zum Protein S (Abbildung 3.37.), signifikant schwach korreliert ($r = 0,28$). Mit der Akzelerin-Inaktivierung (AKI) ist ProC Global hoch signifikant positiv ($r = 0,42$) (Abbildung 3.38.) und mit Faktor V-Leiden Genotyp negativ ($r = -0,48$) (Abbildung 3.40.) korreliert. Protein C selbst korreliert mit Protein S hoch signifikant positiv ($r = 0,56$) und mit der aPC-Resistenz negativ ($r = -0,47$). Faktor V-Leiden Genotyp korreliert hoch signifikant stark mit der Akzelerin-Inaktivierung (AKI) ($r = -0,79$) und signifikant schwach mit der aPC-Resistenz ($r = -0,37$).



$$\begin{aligned} \text{b FC} &= 27,60 + 0,40 * \text{Antithrombin III}; & r &= 0,188; & R^2 &= 0,035; & p &= \mathbf{0,003} \\ \text{a FC} &= 67,68 + 0,29 * \text{Antithrombin III}; & r &= 0,159; & R^2 &= 0,025; & p &= \mathbf{0,011} \end{aligned}$$

Abbildung 3.35. Streudiagramm der FC gegen Antithrombin III mit Regressionsgerade und 95%-Konfidenzintervall. Regressionsgleichung der FC bezüglich Antithrombin III, Korrelationskoeffizient r und Bestimmtheitsmaß R^2 mit Signifikanz p .

Die fehlende signifikante Korrelation von ProC Global und aPC-Resistenz (Abbildung 3.39.) erklärt sich durch die Zugabe von aktiviertem Protein C zum aPC-Resistenz Test.

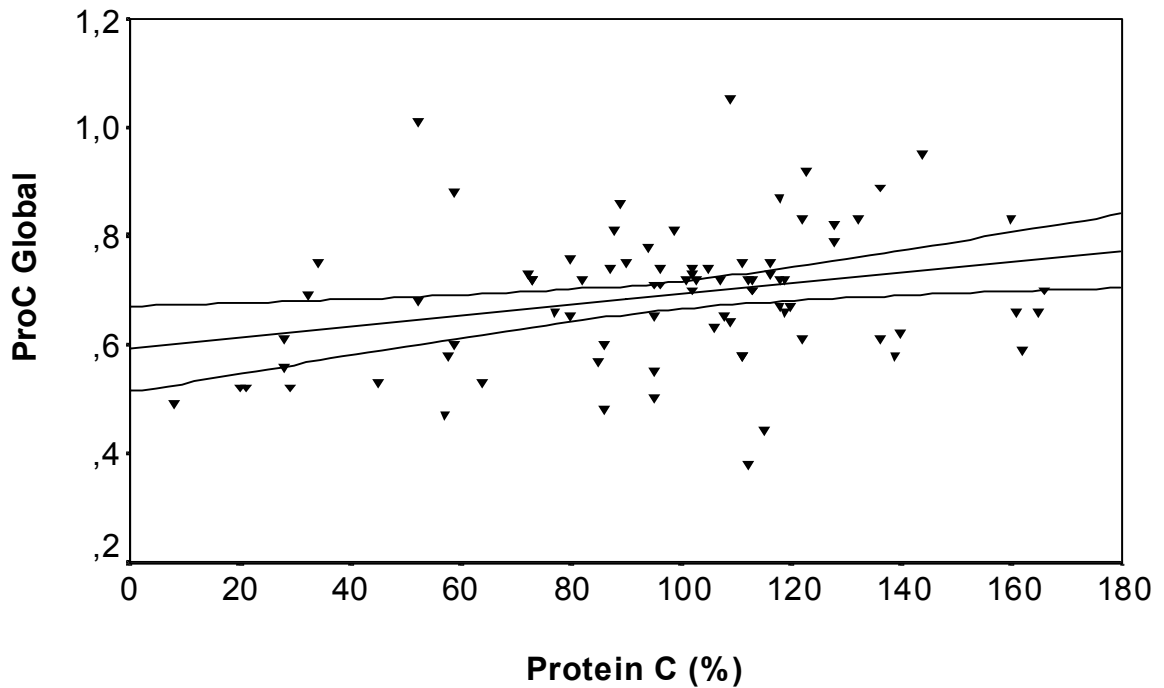
Die Akzelerin-Inaktivierung (AKI) und die aPC-Resistenz korrelieren nur mit Faktor V-Leiden Genotyp, während Protein C hoch signifikant nur mit Protein S und aPC-Resistenz korreliert, so dass nur die Faktor V-Leiden Genotypisierung mit allen drei anderen Tests des Protein C- und S-Systems gut korreliert. Dennoch ist der ProC Global Test als kostengünstiger Screening-Test empfehlenswert.

Pearson'scher Korrelationskoeffizient r , Gesamtkollektiv							
		ProC Global	Protein C	Protein S	AKI	aPC-Resistenz	Faktor V-Leiden
ProC Global	Korrelationskoeffizient		<u>0,28</u>	0,18	0,42	-0,14	-0,48
	N		82	82	54	43	40
Protein C	Korrelationskoeffizient	<u>0,28</u>		0,56	-0,09	-0,47	0,12
	N	82		82	50	39	37
Protein S	Korrelationskoeffizient	0,18	0,56		-0,19	-0,18	0,08
	N	82	82		50	39	37
AKI	Korrelationskoeffizient	0,42	-0,09	-0,19		0,17	-0,79
	N	54	50	50		43	40
aPC-Resistenz	Korrelationskoeffizient	-0,14	-0,47	-0,18	0,17		<u>-0,37</u>
	N	43	39	39	43		32
Faktor V-Leiden	Korrelationskoeffizient	-0,48	0,12	0,08	-0,79	<u>-0,37</u>	
	N	40	37	37	40	32	

signifikante Korrelationen (2-seitig) auf dem Niveau von $\alpha = 0,01$ sind **fett** eingetragen.
signifikante Korrelationen (2-seitig) auf dem Niveau von $\alpha = 0,05$ sind unterstrichen eingetragen.

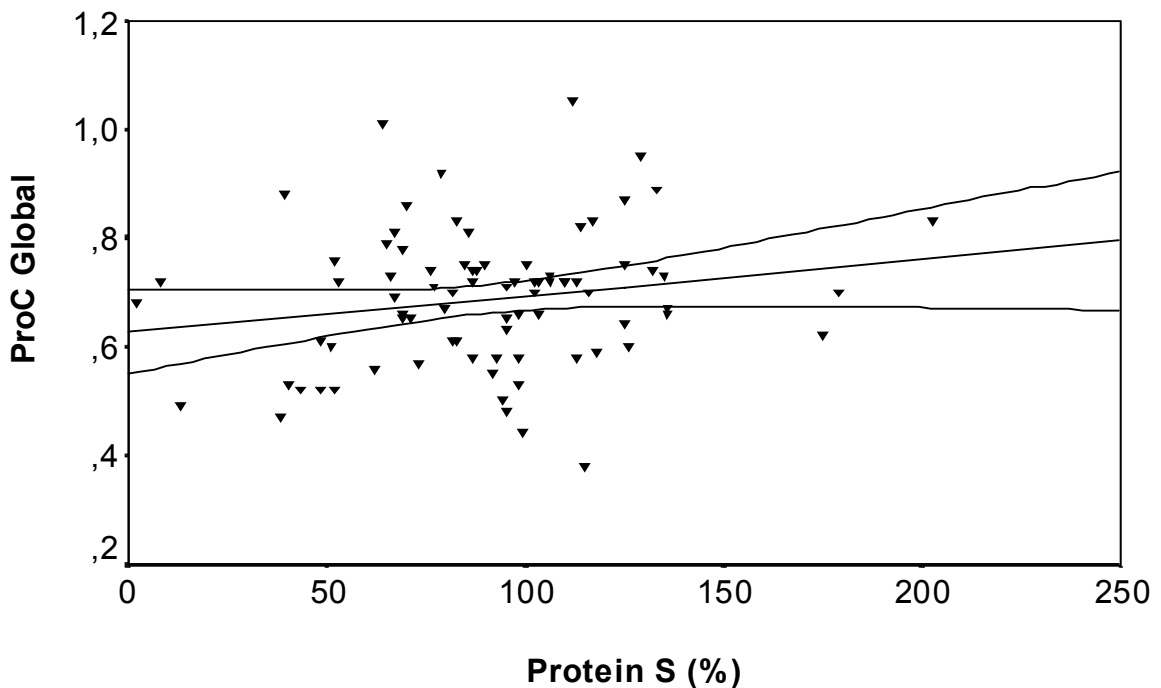
schwache (>0,25) und **starke** Korrelationen (>0,70) sind zusätzlich in der unteren Hälfte der Tabelle **hellgrau**, bzw. **dunkelgrau** gekennzeichnet.

Tabelle 3.17. Korrelation von ProC Global mit Protein C und S, Akzelerin-Inaktivierung (AKI), aPC-Resistenz (aPCR) und Faktor V-Leiden.



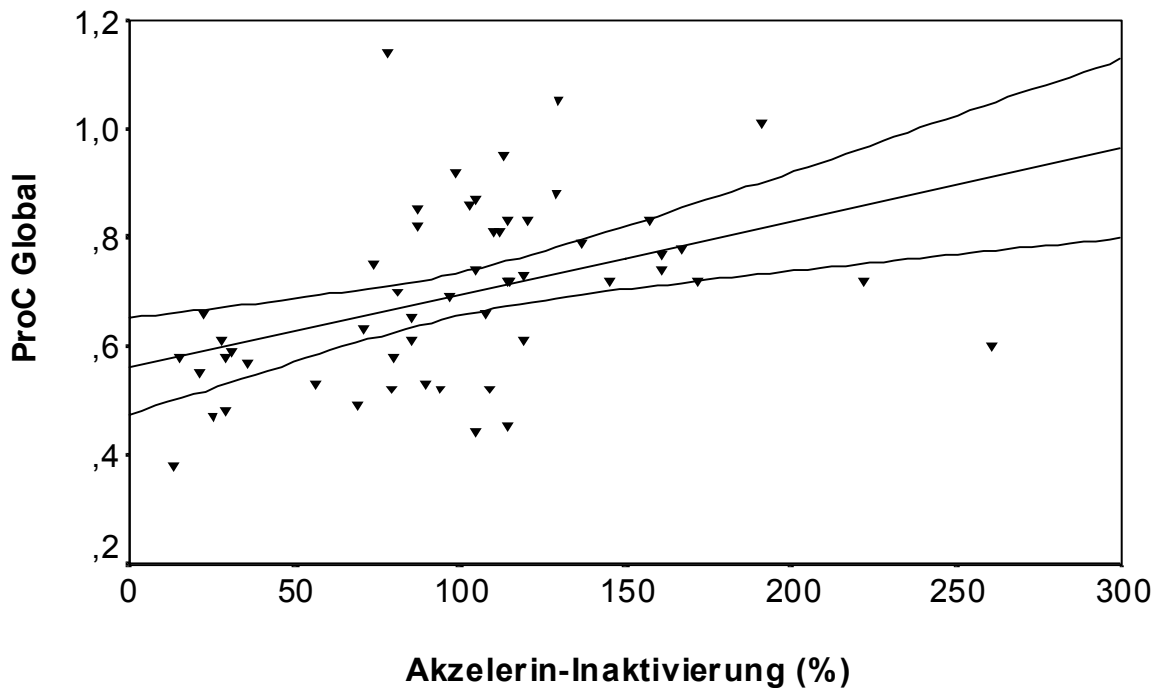
ProC Global = $0,59 + 1,00^{-3} * \text{Protein C}$; $r = 0,281$; $R^2 = 0,079$; $p = 0,011$

Abbildung 3.36. Streudiagramm von ProC Global gegen Protein C mit Regressionsgerade und 95%-Konfidenzintervall. Regressionsgleichung von ProC Global bezüglich Protein C, Korrelationskoeffizient r und Bestimmtheitsmaß R^2 mit Signifikanz p .



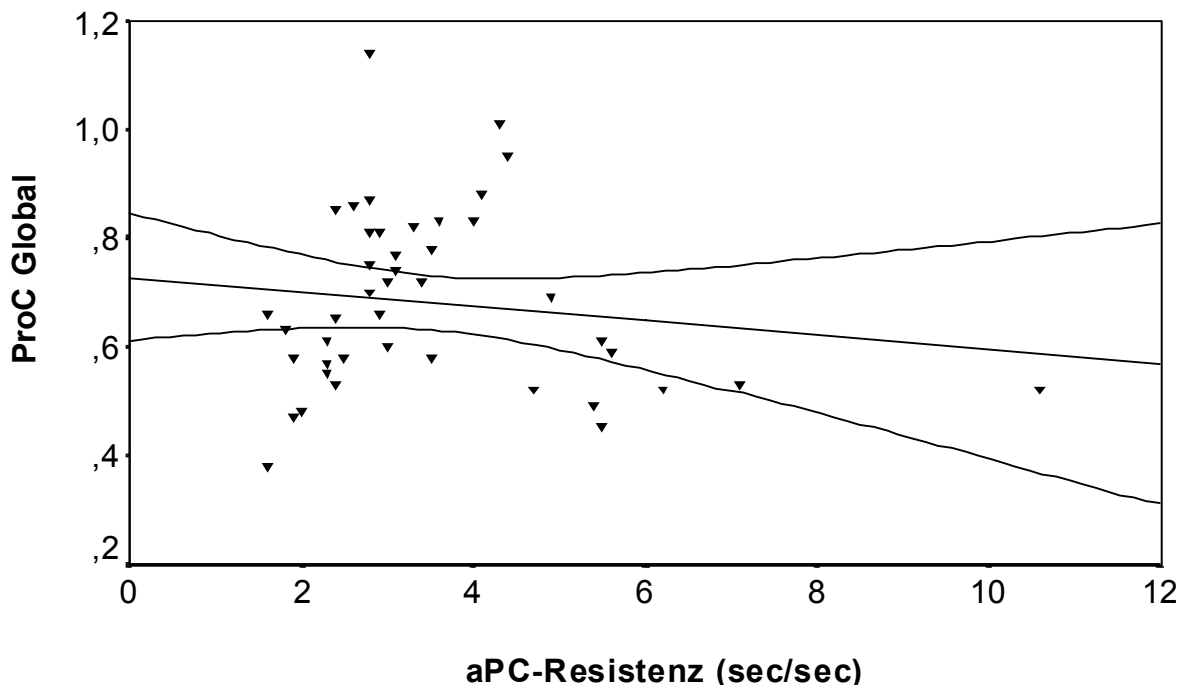
ProC Global = $0,63 + 0,67^{-3} * \text{Protein S}$; $r = 0,185$; $R^2 = 0,034$; $p = 0,096$

Abbildung 3.37. Streudiagramm von ProC Global gegen Protein S mit Regressionsgerade und 95%-Konfidenzintervall. Regressionsgleichung von ProC Global bezüglich Protein S, Korrelationskoeffizient r und Bestimmtheitsmaß R^2 mit Signifikanz p .



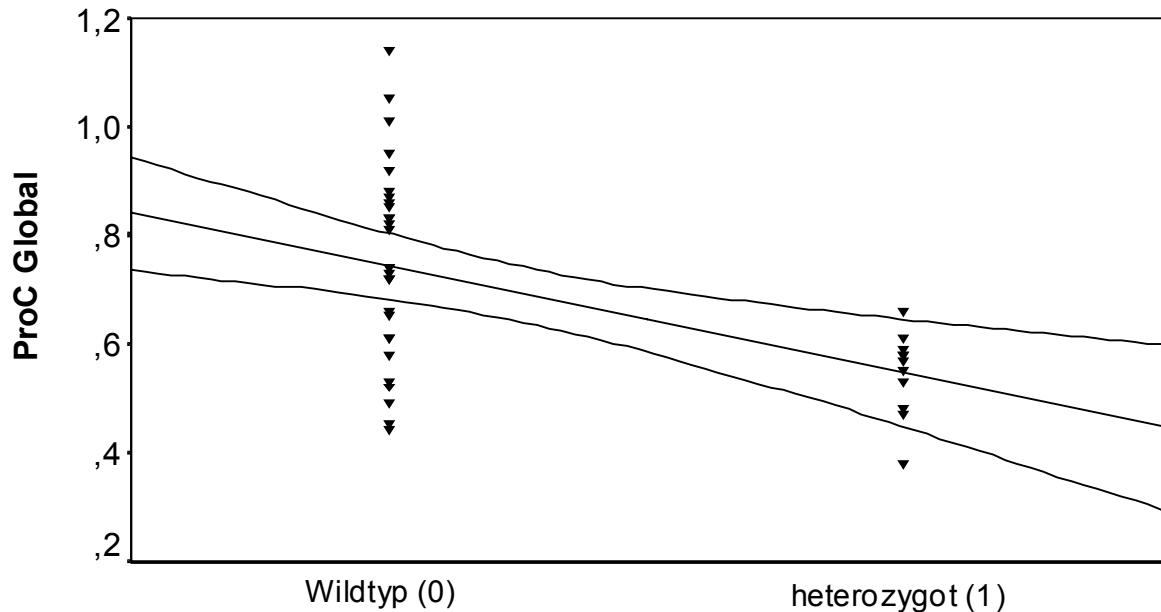
ProC Global = $0,56 + 1,34^{-3} * AKI$; $r = 0,422$; $R^2 = 0,178$; $p = 0,001$

Abbildung 3.38. Streudiagramm von ProC Global gegen die Akzelerin-Inaktivierung (AKI) mit Regressionsgerade und 95%-Konfidenzintervall. Regressionsgleichung von ProC Global bezüglich AKI, Korrelationskoeffizient r und Bestimmtheitsmaß R^2 mit Signifikanz p .



ProC Global = $0,73 - 13,43^{-3} * aPCR$; $r = -0,140$; $R^2 = 0,020$; $p = 0,37$

Abbildung 3.39. Streudiagramm von ProC Global gegen aPC-Resistenz (aPCR) mit Regressionsgerade und 95%-Konfidenzintervall. Regressionsgleichung von ProC Global bezüglich aPCR, Korrelationskoeffizient r und Bestimmtheitsmaß R^2 mit Signifikanz p .



Faktor V-Leiden

ProC Global = $0,74 - 0,20^{-3} * F \text{ V-Leiden}$; $r = -0,485$; $R^2 = 0,235$; $p = 0,002$

Abbildung 3.40. Streudiagramm von ProC Global gegen Faktor V-Leiden mit Regressionsgerade und 95%-Konfidenzintervall. Regressionsgleichung von ProC Global bezüglich Faktor V-Leiden, Korrelationskoeffizient r und Bestimmtheitsmaß R^2 mit Signifikanz p .

3.3.8. Lineare Regressionsanalyse

Um den quantitativen Zusammenhang zwischen der FC und den Begleitparametern zu beschreiben, haben wir mit Hilfe der Methode der kleinsten Quadrate eine Regressionsanalyse für die FC durchgeführt. In der linearen Regression wird für die Gesamtheit postuliert, dass ein linearer Zusammenhang zwischen einer zu erklärenden abhängigen (y) und einer erklärenden unabhängigen Variable (β) besteht und dieser additiv von einer Zufallsvariablen (Residual-Variabilität ε) überlagert wird (siehe auch Kapitel 2.13.2.).

$$\hat{y}_i = \beta_0 + \beta_n X_{n,i} + \varepsilon_i$$

Eine Regressionsanalyse erfolgt nur für die FC und ihre Begleitparameter. Die Untersuchung des linearen Zusammenhanges zwischen ProC Global und Protein C und S, Akzelerin-Inaktivierung (AKI), aPC-Resistenz (aPRC) und Faktor V-Leiden Genotyp mit Hilfe einer Regressionsanalyse erfolgt nicht, weil sich die Anzahl der untersuchten Personen in den einzelnen unabhängigen Variablen unterscheidet, und dadurch eine Aussage mit dieser Methode nicht möglich ist. Für die Regressionsanalyse haben wir die nominalskalierten Merkmale (Geschlecht und Kollektivklassifikation) als Klassifizie-

rungseinheiten in die Berechnung einbezogen. Für die kategorialen Merkmale der Kollektivklassifikation erfolgt eine Kodierung über eine Hilfsvariable (Dummy-Variable).

Kollektiv	dummy1	dummy2
Normalkollektiv (NK)	0	0
Schwangerenkollektiv (SK)	1	0
Thrombosekollektiv (T)	0	1

Tabelle 3.18. Kodierung der Dummy-Variablen für die Kollektivklassifikation.

Die Regressionsanalyse zeigt bei der Unterteilung des Thrombosekollektives in Untergruppen (siehe Kapitel 2.2.1.1.) beim Vergleich von Rückwärts- zur Vorwärtsregression keine übereinstimmenden Zusammenhänge auf. Aus diesem Grund erfolgt die Regressionsanalyse nur mit der groben Einteilung in Normalkollektiv (NK), Schwangerenkollektiv (SK) und Thrombosekollektiv (Gesamt) (T). Eine Unterscheidung des Thrombosekollektives (T) in die Untergruppen (T+, T-, Tp) wird nicht durchgeführt.

3.3.8.1. Darstellung des Regressionsmodells

Die Darstellung der Ergebnisse der Regressionsanalyse erfolgt für Rückwärts- und Vorwärtsregression gemeinsam, da diese sich für die beiden abhängigen Variablen (basale und aktivierte FC <150) nicht unterscheiden.

3.3.8.1.1. Regressionskoeffizienten

Die (nicht standardisierten) Regressionskoeffizienten b (Schätzwert) erlauben bei vorgegebenen Werten für die erklärenden (unabhängigen) Variablen den Schätzwert der zu erklärenden (abhängigen) Variablen (basale FC und aktivierte FC) in einer (Regressions-) Gleichung vorherzusagen (siehe auch Kapitel 2.13.2.1. und 2.13.2.2.) Es wird dabei außerdem ein konstanter Term angegeben, wenn die Regressionsgerade nicht durch den Ursprung geht. Der Standardfehler gibt die Schätzwerte für die Standardabweichung der Regressionskoeffizienten an. Das 95%ige Konfidenzintervall gibt den Vertrauensbereich von b an.

Die beta-Koeffizienten sind die Koeffizienten, die sich ergeben würden, wenn vor der Anwendung der Regressionsanalyse alle Variablen standardisiert worden wären, sie sind daher dimensionslos und miteinander vergleichbar. Ändert sich die zugehörige erklärende (unabhängige) Variable um eine Standardabweichung, so variiert im Mittel die zu erklärende (abhängige) Variable um β Standardabweichungen, vorausgesetzt,

Regressionskoeffizienten für die abhängige Variable basale FC <150						
N = 254	nicht standardisierte Koeffizienten		standardisierte Koeffizienten	2-seitige Signifikanz des t-Testes	95%-Konfidenzintervall für b	
	Aufgenommene Variablen	b	Standardfehler		beta	Untergrenze
(Konstante)	-30,24	9,30		p = 0,001	-48,57	-11,92
PAI-1	-8,37	0,70	-0,57	p < 0,001	-9,74	-7,00
Plasminogen	1,01	0,09	0,51	p < 0,001	0,82	1,19
FP-NEF	3,49 ⁻³	1,00 ⁻³	0,18	p = 0,001	0,60 ⁻³	1,51 ⁻³
Geschlecht	10,04	3,75	0,13	p = 0,008	2,66	17,42
Dummy2	-10,20	4,44	-0,12	p = 0,022	-18,94	-1,46

Ausgeschlossene Variablen: Alter, TPZ, aPTT, Fibrinogen, Antithrombin III, Faktor XII, ProC Global, α_2 -Antiplasmin, D-Dimer, FP-DEF, dummy1.

Tabelle 3.19. Regressionskoeffizienten für die basale FC.

dass die übrigen unabhängigen Variablen gleich bleiben. Die Regressionskoeffizienten werden mit einem Student-t-Test auf ihre zweiseitige Signifikanz getestet, bei einer vorgegebenen Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha = 0,05$.

Wir legen das Aufnahme- und Ausschlusskriterium der verwendeten Verfahren bei der kritischen Wahrscheinlichkeit von $p = 0,05$ des F -Wertes fest.

Nach Durchführung der Regressionsanalyse ergeben die ermittelten Koeffizienten, dass die basale FC mit hoher Signifikanz zum größten Teil durch die beiden Variablen PAI-1 (beta = -0,57) und Plasminogen (beta = 0,51) erklärt werden kann, wobei PAI-1 einen negativen und Plasminogen einen positiven Erklärungsanteil an der Höhe der basalen FC hat. Die Fibrinplatte mit normaler Euglobulinfraktion (FP-NEF) (beta = 0,18) und das Geschlecht (beta = 0,13) erklären ebenfalls einen positiven Anteil der Höhe der basalen FC. Das Geschlecht hat einen solchen Erklärungsanteil auf die basale FC, dass das männliche zu einem höheren, das weibliche Geschlecht zu einem niedrigeren FC-Wert führt. Den geringsten noch signifikanten (negativen) erklärenden Anteil an dem basalen FC-Wert hat das Vorhandensein einer Thrombose (dummy2 = Thrombosekollektiv) (beta = -0,12). Alle weiteren Variablen werden aufgrund des festgelegten Aufnahme- und Ausschlusskriteriums bei der kritischen Wahrscheinlichkeit von $p = 0,05$ des F -Wertes ausgeschlossen.

Die aktivierte FC wird zum größten Teil durch Plasminogen (beta = 0,52) erklärt. Die weiteren eingeschlossenen Variablen erklären nur einen wesentlich geringeren Anteil. Eine Thrombose (beta = -0,26) hat einen negativen Erklärungsanteil an der Höhe der

Regressionskoeffizienten für die abhängige Variable aktivierte FC <150						
N = 254	nicht standardisierte Koeffizienten		standardisierte Koeffizienten	2-seitige Signifikanz des t-Testes	95%-Konfidenzintervall für b	
	Aufgenommene Variablen	b	Standardfehler		beta	Untergrenze
(Konstante)	-32,76	12,94		p = 0,012	-58,24	-7,27
Plasminogen	0,88	0,08	0,52	p < 0,001	0,72	1,04
Dummy2	-19,41	4,87	-0,26	p < 0,001	-29,02	-9,81
α_2 -Antiplasmin	0,37	0,09	0,21	p < 0,001	0,19	0,56
FP-DEF	2,39 ⁻³	0,72 ⁻³	0,19	p = 0,001	0,96 ⁻³	3,81 ⁻³
Faktor XII	0,21	0,06	0,17	p = 0,002	0,08	0,33
PAI-1	-2,01	0,60	-0,16	p = 0,001	-3,19	-0,83
Antithrombin III	-0,26	0,09	-0,14	p = 0,004	-0,43	-0,08

Ausgeschlossene Variablen: Alter, Geschlecht, TPZ, aPTT, Fibrinogen, ProC Global, D-Dimer, FP-NEF, dummy1.

Tabelle 3.20. Regressionskoeffizienten für die aktivierte FC.

aktivierten FC. Das α_2 -Antiplasmin (beta = 0,21), die Fibrinplatte mit aktivierter Euglobulinfraktion (FP-DEF) (beta = 0,19) und Faktor XII (beta = 0,17) erklären einen positiven, PAI-1 (beta = -0,16) und Antithrombin III (beta = -0,14) einen geringen (negativen) Anteil an der Höhe der aktivierten FC.

3.3.8.1.2. Geschätzte Regressionsgleichung

Die geschätzten Regressionsgleichungen lauten demnach folgendermaßen:

$$\mathbf{b \ FC = -30,24 - 8,37 * PAI-1 + 1,01 * Plg + 3,49^{-3} * FP-NEF + 10,04 * Geschlecht - 10,20 * dummy2}$$

$$\mathbf{a \ FC = -32,76 + 0,88 * Plg - 19,41 * dummy2 + 0,37 * \alpha_2\text{-AP} + 2,39^{-3} * FP\text{-DEF} + 0,21 * F \text{ XII} - 2,01 * PAI\text{-1} - 0,26 * AT \text{ III}}$$

3.3.8.1.3. Anpassungsgüte des Regressionsmodells

Unser Regressionsmodell erklärt 58,3% der Variabilität von der basalen FC <150 und 63,4% der Variabilität von der aktivierten FC <150. Das korrigierte Bestimmtheitsmaß R^2_{kor} ermöglicht den Vergleich von Regressionen, da es um die Anzahl der Freiheitsgrade bereinigt ist und somit bei unterschiedlicher Anzahl von Erklärungsvariablen bzw. Beobachtungswerten verwendet werden kann (siehe auch Kapitel 2.13.2.3.).

Modellzusammenfassung Rückwärts- und Vorwärtsregression			
Abhängige Variable	<i>r</i>	R^2	korrigiertes R^2_{korr}
b FC <150	0,764	0,583	0,575
a FC <150	0,796	0,634	0,623

Tabelle 3.21. Modellzusammenfassung der Regressionsanalyse.

3.3.8.1.4. Varianzanalyse (ANOVA)

Varianzzerlegung und *F*-Test

Zur Überprüfung, ob ein signifikanter simultaner Einfluss mehrerer erklärender Variablen (β_n) auf die Variabilität der abhängigen Variable (y) besteht, wird mit einem *F*-Test in einer Varianzanalyse die gesamte Variabilität der abhängigen Variable in die durch das Regressionsmodell erklärte ("Regression") und in die nicht erklärte ("Residual") Variabilität zerlegt und auf Signifikanz überprüft (siehe auch Kapitel 2.13.2.4.).

Durch die Division der Werte der Spalte "Quadratsumme" durch die Spalte mit der Anzahl der Freiheitsgrade ("df") entstehen die Ergebnisse in der Spalte "Mittel der Quadrate", das ist die durchschnittliche Variation. Der Quotient aus der durchschnittlich erklärten Variation (Varianz) und durchschnittlich nicht erklärten Variation folgt einer *F*-Verteilung. Analog dem Signifikanztest für Regressionskoeffizienten wird bei Vorgabe einer Irrtumswahrscheinlichkeit α geprüft, ob das empirisch erhaltene Streuungsverhältnis gleich oder größer ist als das gemäß einer *F*-Verteilung zu erwartende kritische. Die Nullhypothese, dass die Regression insgesamt die Variabilität von y nicht erklärt, kann abgelehnt werden, da das Signifikanzniveau von $F < \alpha$. Die hohe Signifikanz von *F* zeigt, dass der Regressionsansatz einen bedeutenden Teil der Variabilität von der basalen FC <150 bzw. von der aktivierten FC <150 erklären kann, d.h. dass die FC zu einem großen Teil durch die eingeschlossenen Variablen bestimmt wird. Demnach liegt ein signifikanter Effekt der eingeschlossenen Variablen auf die basale und aktivierte FC vor. Im Vergleich zum obigen *t*-Test wird deutlich, dass der *F*-Test nur allgemein prüft, ob mehrere Erklärungsvariablen gemeinsam einen regressionsanalytischen Erklärungsbeitrag leisten, so dass sich das Testen einzelner Regressionskoeffizienten auf Signifikanz nicht erübrigt. Der *F*-Test kann auch als Signifikanzprüfung interpretiert werden, ob R^2 gleich 0 ist.

b FC <150	Quadrat-summe	df	Mittel der Quadrate	F	Signifikanz
Regression	235259,16	5	47051,83	69,47	p < 0,001
Residuen	167962,21	248	677,27		
Gesamt	403221,37	253			

Tabelle 3.22. ANOVA für die basale FC.

a FC <150	Quadrat-summe	df	Mittel der Quadrate	F	Signifikanz
Regression	186467,46	7	26638,21	60,85	p < 0,001
Residuen	107695,34	246	437,79		
Gesamt	294162,81	253			

Tabelle 3.23. ANOVA für die aktivierte FC.

3.3.8.2. Regressionsdiagnostik

Zur Überprüfung der Voraussetzungen des Regressionsmodells werden die empirischen Residualwerte ε_i auf Verletzungen untersucht (siehe auch Kapitel 2.13.2.5.). Die Überprüfung der Kovarianz der Residualwerte für verschiedene Beobachtungen zeigt in der Durbin-Watson-Statistik äußerst geringe negative Autokorrelationen der Residualwerte (für b FC <150: $d = 1,89$; für a FC <150: $d = 1,94$), so dass davon ausgegangen werden kann, dass keine signifikante Autokorrelation der Residualwerte besteht. Der Konditionsindex in der Kollinearitätsdiagnose zeigt für die basale FC <150 eine moderate (16,84) und für die aktivierte FC <150 eine starke (29,35) Multikollinearität an. Da die Toleranzen in der Kollinearitätsstatistik für beide unabhängigen Variablen groß sind, und der Konditionsindex für die aktivierte FC <150 nicht über 30 liegt, sehen wir keine grobe Verletzung der Voraussetzungen gegeben. In den einzelnen graphischen Darstellungen der Residualwerte gegen die erklärenden Variablen und gegen die Vorhersagewerte (ohne Darstellung) zeigen sich keine Verletzungen der Homoskedastizität der Residualwerte (Konstanz der Varianz der Residuen). Die Streuung der Residualwerte variiert nicht systematisch, und die Residualwerte zeigen eine konstante Varianz. Es kann also von Homoskedastizität ausgegangen werden. Zur Überprüfung der Frage, ob die Voraussetzung der Normalverteilung der Residualwerte erfüllt wird, führen wir einen Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstest durch. Durch diesen wird überprüft, ob eine beobachtete Verteilung an eine theoretische Verteilung (hier: Normalverteilung) ange-

passt werden kann, bzw. ob eine solche vorliegt. Dabei werden sowohl die nicht-standardisierten, als auch die standardisierten Residuen untersucht, die sich bei der Regressionsanalyse ergeben.

Kolgomorov-Smirnov-Anpassungstest		
2-seitige exakte Signifikanz	Residualwerte	
	unstandardisiert	standardisiert
Basale FC <150	p = 0,005	p = 0,010
aktivierte FC <150	p = 0,012	p = 0,023

N = 254

Tabelle 3.24. Test auf Normalverteilung der Residualwerte.

Die Annahme einer Normalverteilung der Residuen wird mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha = 0,005$ (basale FC <150) bzw. $\alpha = 0,012$ (aktivierte FC <150) abgelehnt. Aufgrund der Histogrammdarstellung der standardisierten Residuen und der Q-Q-Plots (nicht dargestellt) entscheiden wir uns trotz Verletzung der Annahme einer Normalverteilung der Residualwerte für die Verwendung des Regressionsmodells, da wir die Abweichung der empirischen Residualwerte ε_i von der Normalverteilung zwar als signifikant, aber nicht als gravierend einstufen. Diese Verletzung betrifft die Ergebnisbewertung von Tests, die auf Normalverteilung beruhen. Dies trifft für den Standardfehler von b , die entsprechenden t-Werte und die darauf beruhenden Tests zu; also auch auf den t-Test auf signifikante Unterschiede von b gegen Null und die Bestimmung des 95%-Konfidenzintervalles von b . Diese Ergebnisse sollten kritisch bewertet werden. Insgesamt sehen wir die Durchführung einer Regressionsanalyse als zulässig an, da weder eine Autokorrelation noch Heteroskedastizität besteht und die Kleinst-Quadrat-Schätzer der Regressionskoeffizienten daher unter diesen Annahmen optimal im statistischen Sinne sind (Gauss-Markov-Theorem).

4. Diskussion

4.1. Testeigenschaften

4.1.1. Grundvoraussetzungen

Es wurde ein einfacher, präziser und aussagekräftiger Fibrinolysetest entwickelt, in den die Gesamtaktivität der Aktivatoren und Inhibitoren des Plasmas summarisch einfließt. Als "Globaltest" ist er in der Lage, Störungen der Fibrinolyse als Ursache von Thrombosen zu erfassen.

Das Prinzip dieses neuen Testes entspricht einem zweistufigen, indirekten enzymatischen Assay. In der ersten Stufe wird eine bestimmte Menge Urokinase zugeführt, welche mit Plasminogenaktivatorinhibitoren interagiert. Hierbei wird hauptsächlich PAI-1, bei Schwangeren aber auch PAI-2 erfasst. Die noch freie Urokinase aktiviert Plasminogen zu Plasmin. Die vorhandenen Antiplasmin im Plasma, hauptsächlich α_2 -Antiplasmin, werden oxidativ inaktiviert, ohne die Aktivität von Urokinase, PAI oder Plasmin wesentlich zu beeinflussen. Wir wählten eine Konzentration des wirksamen Oxidans Taurin-Chloramin in einem mittleren Bereich, bei der eine ausreichende Inhibition des α_2 -Antiplasmins vorliegt, ohne die FC zu beeinträchtigen. In unserem Messansatz bleibt eine α_2 -Antiplasminrestaktivität vorhanden, die eine Messung der fibrinolytischen Kapazität mittels des entstehenden Plasmins erlaubt, aber trotzdem als relevanter Faktor in die FC eingeht. Schließlich wird die resultierende Plasminmenge mit Hilfe eines chromogenen Substrates quantifiziert.

In einer zweiten Variante wird die Fibrinolyse sehr potent mit Dextransulfat stimuliert. Dies geschieht über eine Aktivierung der Kontaktphase der Gerinnung, welche insbesondere Faktor XII, aber auch Faktor XI, Präkallikrein und High Molecular Weight Kininogen (HMWK) umfasst. Die Konzentration der Kontaktaktivatorlösung (50 nmol/l Dextransulfat) liegt in einem Bereich der submaximalen Stimulation der Fibrinolyse (Kapitel 3.1.1., Abbildung 3.1.). Höhere Konzentrationen von Dextransulfat würden die FC zu einem alleinigen Plasminogentest machen, da Inhibitoren bei sehr starker Plasminogenaktivierung durch die Kontaktphase nur verhältnismäßig gering wirksam sind. Durch diese beiden Varianten kann sowohl die basale, plasminogenaktivatorabhängige, als auch die kontaktphasenabhängige Fibrinolyse dargestellt werden.

4.1.2. Kalibration

Der Test wurde anhand eines Plasmapools gesunder Spender kalibriert. Da sich die Kalibrationskurve im oberen Aktivitätsbereich abflacht, wurde ein oberer Cut-Off von 150% festgelegt (Kapitel 3.1.3., Abbildung 3.3.). Bei einer nicht verdünnungsechten Kalibrationskurve ist eine Extrapolation der Werte nicht zulässig. Wir entschlossen uns dazu, höhere Werte als 150% in der FC als 150% zu werten (oberer Cut-Off), da eine Plasma-Vorverdünnung zu systematischen Veränderungen in der Messwertfestlegung führen kann.

4.1.3. Präzision und Reliabilität

Die FC ist entsprechend der Empfehlungen zur Prüfung der Präzision und Reliabilität von D. Stamm ⁽¹⁴¹⁻¹⁴²⁾ hinreichend präzise in der Serie und von-Tag-zu-Tag (Kapitel 3.1.5.). Die Unpräzision ist kleiner als 1/12 der Referenzinterwalls. Für die Prüfung der Unpräzision in der Serie (Tabelle 3.2.) haben wir etwas bessere Ergebnisse erzielt als für das Kontrollplasma bei der Untersuchung der Kollektive zur Prüfung der Unpräzision von-Tag-zu-Tag (Tabelle 3.1.). Nur bei einer der untersuchten Kontrollserien liegt der Variationskoeffizient über 5% (basale FC Serie 1).

Die Werte des Kontrollplasmas sind näherungsweise normalverteilt, die Standardabweichung für die beiden FC-Varianten ist etwa gleich. Nur der Variationskoeffizient ist aufgrund der niedrigen Werte der basalen FC sehr hoch (>20%). Die Lage eines Kontrollplasmas am kritischen Entscheidungsbereich ist an und für sich vorteilhaft. Die Werte der basalen FC des Kontrollplasmas PreciClot[®] II sind jedoch viel niedriger als der ermittelte Referenzwert und die festgelegte Entscheidungsgrenze. Die Werte der aktivierten FC liegen am unteren Rand des Referenzwertes und sind damit niedriger als die Entscheidungsgrenze. Die Wahl von PreciClot[®] II ist aus diesem Grund kritisch zu werten. Der mit der Präzisionskontrolle untersuchte Bereich deckt den kritischen Entscheidungsbereich nicht genügend ab. Es ist daher zu empfehlen, in Zukunft ein anderes Kontrollplasma zu verwenden, welches einen geeigneteren Bereich überprüft.

4.1.4. Validität

Zur Validierung prüften wir den Einfluss von PAI-1, Fibrinogen und Plasminogen auf den Test (Kapitel 3.1.6.).

In den Untersuchungen zum Einfluss von PAI-1 auf die FC können wir für die angewendeten Analyseverfahren (Berichrom[®]-PAI [Aktivität], TintElize[®] PAI-1 [Antigenkonzentra-

tion]), wie auch schon E. Eriksson ⁽¹⁰³⁾, zeigen, dass PAI-1 in dem verwendeten Blutentnahmemedium (normales Na-Citrat) über mehr als zwei Stunden ausreichend stabilisiert wird (Abbildung 3.4.). Bei Proben, die unzentrifugiert stehen gelassen werden (Standzeiten für antikoaguliertes Vollblut), fanden wir eine ansteigende PAI-1-Antigenkonzentration. Diese hat aller Wahrscheinlichkeit nach ihre Ursache in der Freisetzung der latenten Form von PAI-1 aus den Thrombozyten, womit der fehlende Einfluss auf die PAI Aktivität erklärt wird. Dies entspricht auch den Ergebnissen von Declerck und Lang ^(32, 106, 143). Bei den Proben, die nach der Zentrifugation stehen gelassen werden (Standzeiten für Plasma), ist ein Abfall in der PAI-1-Antigenkonzentration zu verzeichnen, insbesondere in der ersten Stunde und bei normalem Na-Citrat, jedoch ohne Korrelation zur PAI Aktivität. Bei der FC ist auch, besonders in der ersten Stunde, eine leichte Abnahme bei zunehmenden Standzeiten erkennbar (Abbildung 3.5.). Dieser Effekt lässt sich nicht einem einzelnen Faktor zuordnen, sondern stellt einen allgemeinen Aktivitätsverlust der beteiligten Faktoren dar.

Den direkten Einfluss von PAI-1 auf die FC im Sinne einer äquimolaren Interaktion mit Urokinase können wir in einem Modell durch Addition von PAI-1 zu unterschiedlichen Plasmen gut darstellen (Abbildung 3.6.). Bei etwa äquimolarer Konzentration von PAI-1 und Urokinase wird die Aktivität der Urokinase erwartungsgemäß soweit inhibiert, dass die Generierung von Plasmin in der FC zum Erliegen kommt. Die FC selbst ist in der Lage, auf PAI-1 ab einer Plasmakonzentration von 4 bis 8 U/ml zu reagieren. Diese Werte stimmen in etwa mit dem in der Literatur angegebenen oberen Normbereich von PAI-1 überein ^(32, 103, 144-146).

Die Kontrolle des Einflusses von Fibrinogen auf die FC stellt sich nicht einfach dar, da in einem Additionsmodell von Fibrinogen nicht alle Präparate anwendbar sind. Entweder sind sie in unserem Testansatz nur schwer löslich, enthalten Plasminogen oder sind nicht ausreichend deklariert. Wir entschieden uns für das Fibrinogenpräparat Haemocomplettan[®], in dem laut Hersteller kein Plasminogen enthalten ist. In diesem Modell können wir keinen Einfluss von Fibrinogen auf die FC feststellen. Relevant ist die Untersuchung eines Fibrinogeneinflusses, weil durch Zugabe der Oxidationslösung Fibrinogen- und Fibrinabbauprodukte, wie durch T. Stief gezeigt ^(87, 147-149), oxidiert werden können. Dies führt zu einer gesteigerten Fähigkeit der Plasminogenaktivierung durch t-PA, weil t-PA mit größerer Affinität an oxidierte Fibrinogenabbauprodukte bindet als an unmodifizierte. Eine Oxidation von Fibrinogen- und Fibrinabbauprodukten scheint während der Durchführung der FC nicht in dem Ausmaß stattzufinden, dass eine Plas-

minogenaktivierung induziert würde.

Der direkte Einfluss von Plasminogen auf die FC kann gut dargestellt werden. Sowohl in einem Modell mit Plasminogen als Testsubstanz, als auch in einem Modell mit Addition von Plasminogen zu unterschiedlichen Plasmen, wird die Abhängigkeit der FC von der Plasminogenkonzentration sichtbar (Abbildung 3.7.). Dies ist durch die Konzipierung des Tests einsichtig und auch gewollt. Letztendlich wird mit der FC die Generierung von Plasmin aus Plasminogen gemessen.

4.1.5. Störgrößen

Als Störgrößen der FC untersuchten wir Antioxidantien, parenterale Antikoagulantien (Heparin, Nadroparin, Danaparoid und Lepirudin), Phenprocoumon, Aprotinin, Traneamsäure, Thrombozyten und Bilirubin.

Der Einfluss von Antioxidantien in Form von Ascorbinsäure (Kapitel 3.1.7.1.) wurde sowohl in-vitro (Abbildung 3.8.) als auch in-vivo (Abbildung 3.9.) untersucht. Wir können deutlich den antioxidativen Effekt von Ascorbinsäure auf die Oxidationslösung des Testansatzes zeigen und damit auch die Wirksamkeit dieser Lösung demonstrieren. Hingegen haben sogar 3 g Ascorbinsäure oral (in Form von Brausetabletten) keinen Einfluss auf die FC. Bei einer der untersuchten Personen zeigt sich ein nicht plausibler Effekt der Ascorbinsäure. Nach Einnahme von Ascorbinsäure zeigt sich ein niedrigerer FC-Wert im Vergleich zum Wert vor Einnahme, welcher bei abnehmender Taurin-Chloramin-Konzentration gleich bleibt. Dieser Effekt lässt sich jedoch nicht auf die antioxidative Wirkung der Ascorbinsäure zurückführen, da man bei antioxidativer Wirkung von Ascorbinsäure im Plasma bei abnehmender Taurin-Chloramin-Konzentration einen zunehmenden Abfall der FC-Werte erwarten würde. Die Abweichungen müssen also andere Ursachen haben, weshalb wir einen relevanten antioxidativen Einfluss des Plasmas, auch mit Ascorbinsäure-Supplementierung, ausschließen.

Für die parenteralen Antikoagulantien (Kapitel 3.1.7.2.) stellen wir fest, dass unfraktioniertes (Heparin, Liquemin®) und niedermolekulares Heparin (Nadroparin, Fraxiparin®) konzentrationsabhängig zu einer biphasischen Veränderung der fibrinolytischen Aktivität führen (Abbildung 3.11.). In einem niedrigen Dosisbereich (kleiner als 0,4 IE Liquemin oder Fraxiparin/ml Plasma) wird ein leichter Aktivierungseffekt sichtbar. Dieser ist durch Bindung von Heparin an Heparinbindungsstellen von two-chain Urokinase sowie single-chain t-PA erklärbar. Wie bereits von anderen beschrieben ^(90, 129, 150), steigt durch diesen Vorgang die Plasminogenaktivatoraktivität und das fibrinolytische System

wird moduliert. Höhere Konzentrationen von Antikoagulantien führen zu einer deutlichen Verminderung der fibrinolytischen Aktivität. Der Grund für diesen Aktivitätsverlust bei sehr hohen Heparinkonzentrationen (höher als therapeutisch angewendet) könnte in der Interaktion mit verschiedenen Bindungsstellen liegen. Es ist bekannt, dass Heparin in Verbindung mit Antithrombin III Faktor XIa inhibieren kann. Dieser Effekt wäre dann aber hauptsächlich bei der aktivierten FC wirksam, der Aktivitätsverlust zeigt sich aber auch bei der basalen FC. Ebenso kann Heparin Urokinaseinhibitoren wie Antithrombin III und PAI-3 potenzieren ⁽⁴⁵⁾, sowie mit Antithrombin III zu einer Inhibition von Plasmin führen ⁽¹⁵¹⁾. Antifibrinolytische Aktivität von Heparin in hohen Konzentrationen ist an verschiedenen Stellen der Reaktionskaskade bis hin zur Umwandlung des chromogenen Substrates möglich.

Die beiden anderen untersuchten Antikoagulantien (Danaparoid, Orgaran[®] und Lepirudin, Refludan[®]) führen im gewählten Konzentrationsbereich zu ähnlichen Veränderungen, jedoch so geringem Ausmaß, so dass man von keiner relevanten Beeinflussung der FC sprechen kann. Dies veranlasste uns, bei allen mit Heparinen antikoagulierten Patienten eine Behandlung des Plasmas mit Heparinase vorzunehmen. Dabei zeigt sich, dass Heparin durch die enzymatische Behandlung des Plasmas neutralisiert werden kann (Abbildung 3.10.), ohne einen negativer Effekt auf die FC.

Der Einfluss von Aprotinin und Tranexamsäure (Kapitel 3.1.7.4.) auf unseren Test entspricht dem bereits von mehreren anderen Arbeitsgruppen dargestellten ⁽¹³⁰⁻¹³²⁾. Aprotinin reduziert durch seine Komplexbildung mit freiem Plasmin, ähnlich wie α_2 -Antiplasmin und andere Serin-Proteaseinhibitoren, die fibrinolytische Aktivität, wobei ansteigende Konzentrationen von Aprotinin zur ansteigenden Plasmininhibition führen (Abbildung 3.12.).

Tranexamsäure hat über die Bindung an Lysin-Bindungsstellen des Plasminogens (eine hoch und mehrere minder affine) einen biphasischen Effekt auf die Plasminogenaktivierung. Bindung von Tranexamsäure an die minder affinen Bindungsstellen von Plasminogen führt zur Konformationsänderung und damit zur Steigerung der Empfindlichkeit der Aktivierung von Plasminogen durch Urokinase und t-PA ⁽¹³³⁻¹³⁴⁾. Bindung von Tranexamsäure an die hoch affine Bindungsstelle vermindert die Bindung von Plasminogen und Plasmin an die Lysin-Reste von Fibrin. Bei niedrigen Tranexamsäurekonzentrationen kommt es daher zu einer moderaten Verstärkung der Plasminogenaktivierung und bei höheren Konzentrationen zur Inhibition der Plasminogenaktivierung. Dies

wurde bereits verschiedentlich gezeigt ^(131, 135-137). Diesen biphasischen Effekt der Tranexamsäure auf die Plasminogenaktivierung können wir deutlich bei der basalen FC zeigen. Für die aktivierte FC ist bei niedrigen Tranexamsäurekonzentrationen die Kontaktaktivierung stärker als die Inhibition der Plasminogenaktivierung (Abbildung 3.13.), so dass unsere Ergebnisse in etwa mit denen in der Literatur beschriebenen übereinstimmen ^(131, 137-138, 152).

Einen Einfluss von Thrombozyten (Kapitel 3.1.7.5.) auf die FC können wir ausschließen. Den Effekt der PAI-1-Freisetzung aus Thrombozyten können wir, wie oben bereits dargestellt, nur für die PAI-1-Antigenkonzentration (Abbildung 3.4.) nachweisen, ein Effekt auf die PAI-Aktivität zeigt sich nicht. Dieser Unterschied lässt sich durch das Vorhandensein von hauptsächlich inaktiven, latenten PAI-1 in den α -Granula der Thrombozyten erklären, so wie bereits von Declerck und Lang beschrieben ^(32, 106, 143). Eine "Kontaktaktivierung" durch Membranbestandteile zerstörter Thrombozyten ist nicht nachweisbar (Kapitel 3.1.7.5.).

Trübungen des Plasmas können zu Messfehlern bei der Bestimmung der FC führen. Aus diesem Grund untersuchten wir den Einfluss von Bilirubin auf die FC (Kapitel 3.1.7.6.). Der bei Erwachsenen geltende Referenzbereich für Gesamtbilirubin ist 0,3 – 1,0 mg/dl (5,1 – 17 μ mol/l) und für direktes Bilirubin 0,1 – 0,3 mg/dl (1,7 – 5,1 μ mol/l). Bei einigen Erkrankungen können Werte von 30 mg/dl Gesamtbilirubin (extrahepatischer Verschlussikterus) überstiegen werden. Selbst bei diesen Konzentrationen ist der Einfluss auf die FC aufgrund der kinetischen Messung der Plasminaktivität unbedeutend und zu vernachlässigen.

4.2. Analyse der Kollektive

4.2.1. Schwangerenkollektiv

Das fibrinolytische System in der Schwangerschaft ist bisher nur wenig untersucht, teilweise jedoch von Cerneca, Kemkes-Matthes, Kjellberg und Lindoff. Veränderungen betreffen alle Bereiche der Hämostase und Fibrinolyse und sind daher sehr komplex, was sowohl die Untersuchung, als auch die Interpretation angeht. In der vorhandenen Literatur wird neben einem Anstieg von Plasminogen, Urokinase und t-PA, auch ein Anstieg von PAI-1 und 2, von D-Dimer und ein geringer Anstieg von thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) beschrieben. PAI-1 ist hierbei im wesentlichen endothelialer Herkunft, während PAI-2 von Plazenta und Makrophagen produziert wird.

Diese Faktoren steigen bis zum Ende der 38. Schwangerschaftswoche an und fallen anschließend bis auf t-PA und D-Dimer wieder ab. Im Verlauf der Schwangerschaft kommt es demnach zu einem Anstieg des pro-, wie auch des antifibrinolytischen Potentials. Erhöhte D-Dimerspiegel weisen darauf hin, dass in der Summe eine (kompensier- te) Aktivierung des fibrinolytischen Systems resultiert.

Des Weiteren kommt es im Verlauf der normalen Schwangerschaft laut oben erwähnter Datenlage zur kontinuierlichen Zunahme des prokoagulatorischen Potentials, bedingt durch den Anstieg plasmatischer Gerinnungsfaktoren. Es steigen Fibrinogen, die Fakto- ren II, V, VIII und der von-Willebrand-Faktor kontinuierlich an und erreichen gegen Ende der Schwangerschaft Werte zwischen 160 und 310% der Norm, die Faktoren IX, X, XII und Präkallikrein erreichen Werte zwischen 110 und 190% der Norm. Die Faktoren XI und XIII vermindern sich, jedoch innerhalb des Normbereiches ⁽¹⁵³⁾. Erhöhte Konzentra- tionen von Gerinnungsfaktoren im Verlauf der Schwangerschaft sind gleichbedeutend mit einer Erhöhung des prokoagulatorischen Potentials, mit entsprechender Erhöhung des TPZ-Wertes (in Prozent) und Verringerung der aPTT (in Sekunden). So kommt es im Verlauf der Schwangerschaft zu einer Gerinnungsaktivierung mit Anstieg von Fibrinmonomer, Thrombin/Antithrombin-Komplex (TAT), als auch von Prothrombin Fragment F 1+2 und Fibrinopeptid A ⁽¹⁵³⁻¹⁵⁶⁾.

Veränderungen von Gerinnungsinhibitoren während der normalen Schwangerschaft betreffen aufgrund der veränderten Hormonkonzentrationen hauptsächlich das Protein C- und S-System. Es kommt es zu einem progressiven Abfall von Protein S. Gegen Ende der Schwangerschaft liegen Werte wie bei einem heterozygotem Protein S- Mangel vor. Diese Veränderungen werden auch bei Frauen unter oraler Kontrazeption beobachtet. Die Protein C- und Antithrombin III-Spiegel verändern sich während einer normalen Schwangerschaft nicht ⁽¹⁵³⁻¹⁵⁴⁾.

Den Anstieg des pro- und antifibrinolytischen Potentials können wir in dem von uns untersuchten Kollektiv durch den signifikanten Abfall der basalen FC und Anstieg der aktivierten FC im Vergleich zum Normalkollektiv zeigen (Kapitel 3.3.3., Tabelle 3.6.). Der Abfall der basalen FC ist hierbei Ausdruck für das erhöhte antifibrinolytische Poten- tial mit der angestiegenen PAI-Aktivität; der Anstieg der aktivierten FC ist Ausdruck für das erhöhte profibrinolytische Potential mit der angestiegenen Plasminogenkonzentration. Die anderen Parameter sind entsprechend der Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen, wie oben beschrieben, verändert. Unsere Untersuchungen an Schwangeren umfasst ein Kollektiv aus Frauen um den Zeitpunkt der Geburt herum. Eine Untersuchung zum

Verlauf der Veränderungen der FC während der Schwangerschaft erfolgte nicht. Bei einer kleinen Gruppe wurde postpartal eine Verlaufsuntersuchung durchgeführt. Hier zeichnete sich eine rasche Normalisierung der Werte ab (Kapitel 3.3.4., Tabelle 3.7.). Insgesamt können wir, wenn auch mit einem wesentlich kleineren Kollektiv, die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen reproduzieren ^(153-154, 156).

4.2.2. Kollektiv der Patienten unter oraler Antikoagulation

Zur Untersuchung eines Einflusses von oraler Antikoagulation mit einem Vitamin K-Antagonisten auf die FC wurden Blutabnahmen bei 25 Patienten zu zwei verschiedenen Zeitpunkten durchgeführt, die in Bezug auf ihren TPZ-Wert möglichst weit auseinander lagen. Beim Vergleich (Kapitel 3.3.5., Tabelle 3.8.) dieser Stichproben sind die Werte für TPZ und ProC Global erwartungsgemäß an den beiden Zeitpunkten ("TPZ-Wert hoch" und "TPZ-Wert niedrig") hoch signifikant unterschiedlich. Der Wert für die basale FC zum Zeitpunkt "TPZ-Wert hoch" ($53,0 \pm 22,0\%$) unterscheidet sich mit einer Signifikanz von $p = 0,02$ vom Zeitpunkt "TPZ-Wert niedrig" ($46,9 \pm 25,1\%$). Der signifikante Unterschied bei der basalen Fibrinolytischen Kapazität unter oraler Antikoagulation tritt vor allen bei Patienten ohne akute Thrombose auf, obwohl eine sichere Aussage aufgrund der kleinen Fallzahlen nicht möglich ist. Orale Antikoagulation scheint also einen Einfluss auf das fibrinolytische System zu haben, aber nicht in gleicher Weise, wie ein zu einer Thrombose führender Fibrinolysedefekt. Der Einfluss auf die Aktivität der Fibrinolyse ist primär nicht verständlich. Bei der aktivierten FC ist keine Differenz zu beobachten.

Die Gruppe um V. Roldan-Schilling ⁽¹⁵⁷⁻¹⁵⁹⁾ hat bei zwei ähnlich großen Kollektiven (13 und 36 Patienten) Untersuchungen über Veränderungen der fibrinolytischen Aktivität in Folge oraler Antikoagulation bei chronischem Vorhofflimmern durchgeführt. Bei diesen Patienten lagen vor Beginn der Antikoagulation im Vergleich zum untersuchten gesunden Normalkollektiv höhere Werte für PAI-1 und für den t-PA/PAI-1-Komplex bei gleicher t-PA und Plasminogen/Antiplasmin-Komplexkonzentration als Ursache für eine verminderte fibrinolytische Aktivität vor. Als Zeichen einer erhöhten Thrombinaktivität/Hyperkoagulabilität bei Vorhofflimmern waren D-Dimer und modifiziertes Antithrombin III in diesem Studienkollektiv im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht. Unter oraler Antikoagulation fielen die Werte von t-PA, PAI-1 und D-Dimer signifikant ab. In Verbindung mit einem Anstieg der Plasminogen/Antiplasmin-Komplexkonzentration kann das als Zeichen für eine Verbesserung der fibrinolytischen Aktivität angesehen werden. Zu

einem ähnlichen Ergebnis mit verbesserter fibrinolytischer Aktivität kam eine andere Gruppe (30 Patienten) ⁽¹⁶⁰⁾. Hier lag eine verkürzte Euglobulinlysezeit nach venöser Okklusion vor. Allerdings kam es im Gegensatz zu der vorhergehenden Gruppe zu erhöhten t-PA und gleichbleibenden PAI-1-Konzentrationen. Andere grundlegende Untersuchungen zur fibrinolytischen Aktivität unter oraler Antikoagulation sind nicht bekannt. Die hier beschriebenen Ergebnisse widersprechen dieser Aussage einer verbesserten fibrinolytischen Aktivität unter oraler Antikoagulation. Es ist zu bedenken, dass sich zwar die Größe der Kollektive unter oraler Antikoagulation gleichen, unser Kollektiv aber deutlich heterogener ist, weil bei den beiden anderen Arbeitsgruppen ausschließlich Patienten mit Vorhofflimmern untersucht wurden, in dieser Arbeit jedoch auch Patienten mit akuten thrombembolischen Ereignis und nach Durchführung von Herzklappen oder peripheren Bypass-Operationen bei AVK. Dadurch ist die Vergleichbarkeit eingeschränkt.

Weitere nicht signifikante Unterschiede zwischen den beiden Blutentnahmen zu Zeitpunkten unterschiedlicher oraler Antikoagulationsgrade sind noch als Tendenz bei der Fibrinplatte mit aktivierter Euglobulinfraktion (FP-DEF) und bei der aPTT zu erkennen. Bei der FP-DEF zeigt sich eine verminderte fibrinolytische Aktivität mit geringeren Lyseflächen unter oraler Antikoagulation ($p = 0,08$). Auch diese Differenz ist primär nicht verständlich, stimmt aber mit der bei der basalen FC gesehenen überein. Bei der aPTT liegt unter oraler Antikoagulation eine etwas verlängerte Gerinnungszeit vor ($p = 0,17$). Dieser Unterschied erklärt sich durch die Abhängigkeit der aPTT von den Faktoren IX, X und II. Die signifikanten Veränderungen der Protein C- und S-Werte im Vergleich zu den nicht signifikanten Veränderungen der Akzelerin-Inaktivierung (AKI), der aPC-Resistenz (APCR) und Faktor V-Leiden lassen die Interpretation zu, dass die Werte aufgrund bereits begonnener oraler Antikoagulation entstanden sind und im eigentlichen Sinne kein signifikanter Unterschied besteht.

4.2.3. Thrombosekollektiv

Die untersuchten Parameter des Normalkollektives wurden direkt mit denen des Thrombosekollektives (Gesamt) und den einzelnen Untergruppen verglichen (Kapitel 3.3.6. und 3.3.7.1.). Für die FC in beiden Varianten ergibt sich ein hoch signifikant niedrigeren Median des Kollektives "Thrombosekollektiv (Gesamt)" (T) und der Untergruppe "akute Thrombose ohne Thromboseneigung" (T-) im Vergleich zum Normalkollektiv. Die beiden anderen Untergruppen haben auch einen tendenziell niedrigeren

Median, eine Signifikanz ist aber aufgrund der deutlich geringeren Fallzahlen nicht zu beobachten. Dies gilt bis auf einzelne Ausnahmen auch für alle anderen Parameter. Dieses Ergebnis zeigt, dass die FC als Globaltest in der Lage ist, eine geschwächte Fibrinolyse als mögliche Ursache einer Thrombose zu erfassen.

Der Interquartilbereich der sich unterscheidenden Kollektive überschneidet sich, so dass ein Entscheidungskriterium für das Vorliegen einer Thrombose aufgrund eines positiven Testergebnisses nicht ohne falsch positive bzw. falsch negative Ergebnisse festgelegt werden kann. Ein eindeutiges einfaches diagnostisches Kriterium für Thrombose ist die FC demnach nicht. Das ist nicht anders zu erwarten, da nur ein geringer Anteil aller Thrombosen eindeutig durch Fibrinolysedefekte verursacht wird. Allerdings liegt bei bis zu 30-40% aller Patienten mit tiefer Beinvenenthrombose eine eingeschränkte fibrinolytische Kapazität vor ^(60, 62, 161-162). Dabei spielen vor allen Dingen erhöhte PAI- oder erniedrigte t-PA-Werte eine Rolle ⁽¹⁶²⁻¹⁶⁴⁾, nach venöser Okklusion insbesondere eine vermehrte Freisetzung von PAI-1 und eine verminderte Freisetzung von t-PA, d.h. eine verminderte fibrinolytische "Antwort" ^(57, 62, 162) in Verbindung mit einer verlängerten Euglobulinlysezeit ⁽⁶⁰⁾. Auch von erhöhten PAI- und t-PA-Werten bei tiefer Beinvenenthrombose wurde berichtet ^(57, 62, 165). Andererseits konnte eine andere Gruppe anhand einer großen prospektiven Kohortenstudie von Patienten mit erstmaliger venöser Thrombose zeigen, dass keine systemischen Unterschiede in Bezug auf PAI-1, t-PA und die Euglobulinlysezeit zwischen Patienten mit und ohne Thromboserezidiv im Verlauf bestehen ⁽¹⁶⁶⁾. Der bedeutend größere Anteil an akuten tiefen Beinvenenthrombosen wird hauptsächlich durch verminderte Aktivität an Antithrombin III, und Protein C und S (einschließlich aPC-Resistenz) verursacht.

Bei der Verwendung unseres Normkollektives im Vergleich zu den Thrombosekollektiven muss bedacht werden, dass hier Personen mit deutlich unterschiedlichen Altersmedianen verglichen werden (24,0 Jahre beim Normkollektiv NK vs. 54,0 Jahre beim Thrombosekollektiv T). Gerinnung und Fibrinolyse verändern sich aber bekanntermaßen altersabhängig ⁽¹⁶⁷⁾. Zur Etablierung und Evaluierung verwendeten wir dennoch ein Normkollektiv mit einem deutlich niedrigeren Altersmedian. Dies hat den Vorteil, dass Einflussgrößen auf die Fibrinolyse, wie Erkrankungen oder Medikamente, so gering wie möglich gehalten werden. Dadurch wurde das Thrombosekollektiv einem möglichst „gesundem“ Normkollektiv gegenübergestellt, was unter Umständen eine mögliche Altersabhängigkeit des Parameters verschleiern. Die Altersabhängigkeit der Fibrinolytischen Kapazität selber muss noch in weiteren Experimenten untersucht werden.

4.2.3.1. basale und aktivierte Fibrinolytische Kapazität (FC)

Die basale FC ist ihrer Konzeption entsprechend in der Lage, bei der unstimulierten Fibrinolyse hauptsächlich die Inhibitoren zu erfassen. Dies zeigt sich in einer mittelstarken negativen Übereinstimmung mit den PAI-Werten ($r = -0,47$), sowie in schwachen Übereinstimmungen mit Plasminogen ($r = 0,38$) und D-Dimer ($r = -0,28$). Auch die PAI-Werte bei den Thrombosekollektiven liegen höher, die Plasminogen Werte leicht höher und die D-Dimerwerte deutlich höher als beim Normalkollektiv, wodurch eine Thromboseeigung durch erhöhte PAI-1-Spiegel und eine akute Thrombose durch erhöhte D-Dimerkonzentration angezeigt wird. Geringe Übereinstimmungen zeigen sich auch noch für Faktor XII ($r = 0,20$), α_2 -Antiplasmin ($r = 0,20$) und Antithrombin III ($r = 0,19$). Diese Korrelationen sind, obwohl hoch signifikant, aufgrund des geringen Korrelationskoeffizienten ($r \leq 0,20$) in Bezug auf die FC nicht sonderlich relevant.

Im Vergleich der basalen mit der aktivierten FC besteht eine gute Übereinstimmung ($r = 0,65$). Beide bilden also ähnliche Merkmale ab. Diese Übereinstimmung ist ähnlich stark wie die der Fibrinplatten mit normaler und aktivierter Euglobulinfraktion (FP-NEF und FP-DEF) untereinander ($r = 0,72$). Es besteht eine schwach bis mittelstarke Korrelation der basalen FC zur Fibrinplatte selbst (FP-NEF: $r = 0,44$; FP-DEF: $r = 0,33$), dies stimmt mit den Ergebnissen aus den Untersuchungen der Kollektive überein. Hier liegen die FC- und Fibrinplattenwerte bei den Thrombosekollektiven niedriger als beim Normalkollektiv und zeigen entsprechend eine verringerte Fibrinolyseaktivität an.

Im Gegensatz zur basalen FC ist die aktivierte FC aufgrund ihrer Konzeption hauptsächlich in der Lage, die kontaktphasenvermittelte Aktivierung von Plasminogen abzubilden. Dabei ist der methodische Ansatz der Kontaktaktivierung mittels eines Polyanion, bzw. Glykosaminoglykan (Dextransulfat) sowohl beim Verfahren der FC, als auch der Fibrinplatte wirksam, erkennbar an den Korrelationen zwischen FC und Fibrinplatte. Die Höhe der Korrelation der aktivierten FC gegenüber den Fibrinplattenvarianten ist in etwa gleich wie die für die basale FC. Nur ist hier die Übereinstimmung zur Fibrinplatte mit aktivierter Euglobulinfraktion (FP-DEF) ($r = 0,44$) größer als die zur Fibrinplatte mit normaler Euglobulinfraktion (FP-NEF) ($r = 0,40$), also genau umgekehrt wie bei der basalen FC.

Die Wirksamkeit der Kontaktphasenaktivierung zeigt sich in einer mittelstarken Übereinstimmung der aktivierten FC mit den Parametern Faktor XII ($r = 0,55$) und Plasminogen ($r = 0,52$). In diesem Zusammenhang steht die Beobachtung, dass die Faktor XII-Werte

beim Thrombosekollektiv (Gesamt) (76%) niedriger liegen als beim Normalkollektiv (98%), die Plasminogenwerte dagegen jedoch höher (117,4% vs. 98,1%). Dabei deuten die niedrigeren Faktor XII-Werte eher eine verminderte kontaktphasenabhängige Fibrinolyse an. Die erhöhten Plasminogenwerte sind eher reaktiv zu verstehen. In der Summe fällt die aktivierte FC aber für die Thrombosekollektive T ("Thrombosekollektiv (Gesamt)") und T- ("akute Thrombose ohne Thromboseneigung") im Vergleich zum Normalkollektiv niedriger aus.

Des Weiteren bestehen schwache Korrelationen der aktivierten FC bezüglich D-Dimer ($r = -0,26$) und TPZ ($r = 0,32$). Die negative Korrelation zu D-Dimer ist gleich stark wie bei der basalen FC ausgeprägt. Insgesamt ist D-Dimer als Thromboseparameter jeweils schwach negativ mit der basalen ($r = -0,28$) und der aktivierten FC ($r = -0,26$) korreliert. Somit scheint die FC in der Lage zu sein, eine Thrombose anzeigen zu können. Noch stärker verhält sich die Fibrinplatte zu D-Dimer ($r = -0,40$ für FP-NEF und $r = -0,55$ für FP-DEF). Also scheint die Fibrinplatte besser als die FC in der Lage zu sein, Thrombosen anzeigen zu können. Dabei werden für D-Dimer positiv prädiktive Werte von 9,5 - 25% angegeben bei negativ prädiktiven Werten von 98 - 99,6% und odds ratio's von 2 bis 4 für erhöhte Werte (abhängig von der jeweiligen Methode)⁽¹⁶⁸⁻¹⁷⁰⁾.

Die Korrelation der FC (insbesondere der aktivierten FC) mit α_2 -Antiplasmin (b FC: $r = 0,20$; a FC: $r = 0,58$) ist primär nicht verständlich. Möglicherweise kann man sie durch wechselseitige Korrelationen erklären, die durch eine kompensatorische Reaktion auf erhöhtes Plasminogen bedingt sind. Es besteht auch eine Korrelation von α_2 -Antiplasmin zu Plasminogen ($r = 0,38$), wodurch auch die α_2 -Antiplasminkonzentration mit der Höhe der FC verbunden ist, da eine Korrelation von Plasminogen zur FC besteht (b FC: $r = 0,38$; a FC: $r = 0,52$). Die Fibrinplatte als Referenzparameter der Fibrinolyse zeigt ähnliche Korrelationen zu α_2 -Antiplasmin ($r = 0,21$ für FP-NEF und $r = 0,32$ für FP-DEF). Auf der anderen Seite lässt sich die Korrelation zwischen der FC und α_2 -Antiplasmin durch einen leichten Abfall der α_2 -Antiplasminwerte beim Thrombosekollektiv (Gesamt) (98,5% vs. 108,3%) erklären, die aber im Normbereich liegen. Bei niedrigeren Werten der aktivierten FC beim Thrombosekollektiv liegen gleichzeitig auch etwas niedrigere Werte für α_2 -Antiplasmin vor. Darin zeigt sich auch, dass unsere eingesetzte Oxidationslösung suffizient in der Lage ist, α_2 -Antiplasmin zu inhibieren. Falls das nicht der Fall wäre, würden erhöhte α_2 -Antiplasminwerte zu einem niedrigeren FC-Wert führen.

In diesen Korrelationen zeigt sich die Fähigkeit der FC in beiden Varianten, die wesentlichen Einflussparameter der Fibrinolyse abzubilden, ohne einseitig zu sein. Die basale FC ist sensitiver in Bezug auf PAI-1, die aktivierte FC sensitiver in Bezug auf Faktor XII und Plasminogen. Ebenso zeigen sich Hinweise für das Vorliegen einer Thrombose an der Korrelation zu D-Dimer.

4.2.3.2. Fibrinplatte (FP)

Bei den Fibrinplattenuntersuchungen in ihren beiden Varianten mit normaler (FP-NEF) und aktivierter (FP-DEF) Euglobulinfraktion, die ähnlich wie die FC bezüglich ihrer Plasmavorbereitung aufgebaut sind, ergeben sich hoch signifikant kleinere Lyseflächen in den Thrombosekollektiven im Vergleich zum Normalkollektiv. Diese beiden Tests messen wie die FC die fibrinolytische Aktivität in einer Art Globaltest, erzielen aber eindeutigere Ergebnisse. Eine praktikable Lösung zur Erfassung einer fibrinolytischen Gesamtkapazität stellen sie aber wegen der aufwendigen Durchführung nicht dar, sonst wären sie in der Routinediagnostik weiter verbreitet.

Die Fibrinplatte als Referenzmethode zeigt für die beiden Varianten mit normaler und aktivierter Euglobulinfraktion (FP-NEF und FP-DEF) im Vergleich zu den einzelnen anderen Parametern eine jeweils ähnlich starke Korrelation. Die Kontaktphasenstimulation scheint bei der Euglobulinfraktion einen nicht so großen Einfluss zu haben wie bei der FC und ihren Varianten. Dazu ist die Fibrinplatte vermutlich methodisch nicht in der Lage, da die Euglobulinfraktion in dem Agarose-Plasminogen-Fibrin-Gemisch keine Modulation einer Kontaktphasenaktivierung zulässt.

Faktor XII zeigt übereinstimmend eine etwas stärkere Korrelation für die Fibrinplatte mit aktivierter Euglobulinfraktion (FP-DEF) ($r = 0,43$) als für die Fibrinplatte mit normaler Euglobulinfraktion (FP-NEF) ($r = 0,32$). Plasminogen ist in der Fibrinplatte im Überschuss enthalten. Deshalb hat das Plasma-Plasminogen keinen Einfluss auf die Lysegröße. (Plasminogen wird aber in der FC gut erfasst.) Die beiden Varianten der Fibrinplatte haben im Vergleich zur basalen FC eine schwächere Korrelation zu PAI-1. Auffällig ist die deutlich stärkere negative Korrelation zu D-Dimer im Vergleich zur FC (FP-NEF $r = -0,40$, FP-DEF $r = -0,55$). Die Fibrinplattenmethode scheint gegenüber der FC im stärkeren Maße einen Hinweis auf eine Thrombose geben zu können.

Im Vergleich zu anderen Arbeitsgruppen sind wir bei Untersuchungen der Fibrinolyse mittels der Fibrinplatte zu ähnliche Ergebnissen gekommen: bei Patienten mit thrombembolischen Ereignis sind die Lyseflächen kleiner als bei gesunden Probanden. Die

Unterschiede zwischen den Ergebnissen einzelner Arbeitsgruppen erklären sich hauptsächlich durch methodische Abwandlungen im Aufbau der Fibrinplatte und sind nicht von gravierender Bedeutung⁽¹⁷¹⁻¹⁷³⁾.

4.2.3.3. TPZ und aPTT

TPZ und aPTT zeigen für die Kollektive T ("Thrombosekollektiv (Gesamt)") und T- ("akute Thrombose ohne Thromboseneigung") im Vergleich zum Normalkollektiv eine hoch signifikant verzögerte Gerinnung mit niedrigeren TPZ- und höheren aPTT-Werten. Diese Unterschiede sind wahrscheinlich nicht relevant, einerseits wegen der geringen Differenz der Werte, andererseits können, trotz größter Sorgfalt und persönlicher Kontrolle, Patienten erst nach Beginn einer antikoagulatorischen Therapie eingeschlossen worden sein. Aus allen weiteren Korrelationen lässt sich nur die Aussage treffen, dass eine gleichsinnige Korrelation in Bezug auf die gemessene Gerinnungszeit besteht.

Untereinander korrelieren TPZ und aPTT negativ mit $r = -0,33$.

4.2.3.4. Fibrinogen

Bei allen Thrombosekollektiven ist die Fibrinogenkonzentration hoch signifikant und deutlich höher als beim Normalkollektiv und liegt oberhalb des Referenzwertes, auch wenn der Interquartilabstand z.T. sehr groß ist. Eine erhöhte Fibrinogenkonzentration (Hyperfibrinogenämie) ist z. B. bei genetischen Varianten oder bei Akute-Phase-Reaktion (Entzündung/Gewebeschädigung) zu beobachten und stellt einen starken Risikofaktor für eine Thrombembolie dar. Dadurch wird deutlich, dass es sich bei den ausgewählten Kollektiven um Personen mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung eines thrombembolischen Ereignisses handelt. Bemerkenswert ist, dass selbst das Thrombosekollektiv "nur alte Thrombose/positive Familienanamnese" (T p) höhere Fibrinogenwerte aufweist. Insgesamt konnten wir die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen reproduzieren, z. B. von A. Swiatkiewicz⁽¹⁶⁵⁾. Fibrinogen korreliert des Weiteren mittelstark mit D-Dimer ($r = 0,56$) und PAI ($r = 0,53$). Schwache bis mittelstarke Übereinstimmung besteht für die Fibrinplatte mit aktivierter Euglobulinfraktion (FP-DEF) ($r = -0,47$), die Korrelation zur Fibrinplatte mit normaler Euglobulinfraktion (FP-NEF) ist nur schwach ($r = -0,30$) ausgeprägt.

4.2.3.5. Antithrombin III

Zwar haben die Thrombosekollektive einen hoch signifikant niedrigeren Antithrombin III-Wert als das Normalkollektiv, sämtliche Mediane der Untergruppen liegen aber im Normbereich. Für das Thrombosekollektiv Tp ("nur alte Thrombose/positive Familienanamnese") ist dieser Unterschied nicht so stark ausgeprägt wie für die anderen Untergruppen. Antithrombin III korreliert mittelstark mit D-Dimer ($r = -0,58$) als Hinweis für eine Assoziation zu einer Thrombose, sonst schwach mit anderen Parametern. Es lässt sich aber anhand eines Antithrombin III-Wert im unteren Normbereich keine sichere Thromboseneigung diskutieren. Diese Ergebnisse stehen in Übereinstimmung mit anderen Ergebnissen, z.B. von ^(61, 165, 174-178), die daraufhin deuten, dass ein Großteil aller Thrombosen durch verminderte Konzentrationen von Antithrombin III und Protein C und S begünstigt werden.

4.2.3.6. Faktor XII

Die Thrombosekollektive haben einen hoch signifikant niedrigeren Faktor XII-Wert als das Normalkollektiv. Für die Thrombosekollektive T+ ("akute Thrombose mit Thromboseneigung") und Tp ("nur alte Thrombose/positive Familienanamnese") ist dieser Unterschied nicht so stark ausgeprägt wie für die anderen Untergruppen. Die Mediane liegen nur knapp oberhalb des Normbereiches. Dies stimmt mit anderen Untersuchungen überein ^(61, 165, 179) und entspricht der Tatsache, dass die Fibrinolyse von Kontaktphasenfaktoren abhängig ist.

4.2.3.7. ProC Global

Für das Protein C-System Testkit ProC Global ergeben sich hoch signifikant niedrigere Werte für die Thrombosekollektive, die in ihrem Median, bis auf das Thrombosekollektiv Tp ("nur alte Thrombose/positive Familienanamnese"), unterhalb des Normbereiches lagen. Zum einen kann auch hier nicht endgültig ausgeschlossen werden, dass trotz größter Sorgfalt Patienten nach Beginn einer antikoagulatorischen Therapie eingeschlossen worden sind, zum anderen kommt auch hier die Tatsache zum Tragen, dass Defekte im Protein C- und S-System (einschließlich aPC-Resistenz) für einen großen Anteil der thrombembolischen Ereignisse verantwortlich sind, also auch für die in unserem Kollektiv. Die Untersuchungen darüber sind vielfältig und entsprechen in etwa den unseren ^(124, 165-166, 175, 177, 180-188).

4.2.3.8. α_2 -Antiplasmin

Bei den Thrombosekollektiven T ("Thrombosekollektiv (Gesamt)") und T- ("akute Thrombose ohne Thromboseneigung") liegen die Mediane des α_2 -Antiplasmin hoch signifikant niedriger als beim Normalkollektiv. Dieser Unterschied ist aber nicht stark, da die Mediane dicht beieinander und auch im Normbereich liegen. Gleichzeitig hat das Thrombosekollektiv T+ ("akute Thrombose mit Thromboseneigung") im Vergleich zu T- ("akute Thrombose ohne Thromboseneigung") ein hoch signifikant höheres α_2 -Antiplasmin. Für die fibrinolytische Aktivität hat dies jedoch keine Bedeutung, weil ein niedrigeres α_2 -Antiplasmin mit einer niedrigeren antifibrinolytischen Aktivität verbunden ist. Im Literaturvergleich wurden sowohl normale ⁽¹⁸⁹⁾, als auch erhöhte ⁽¹⁹⁰⁾ Werte für α_2 -Antiplasmin bei akuter Thrombose gefunden. Ebenso wurde eine Blutungsneigung bzw. Hyperfibrinolyse bei α_2 -Antiplasminmangel beschrieben ⁽¹⁹¹⁻¹⁹³⁾. Diese Angaben über erhöhte bzw. normale Werte von α_2 -Antiplasmin entsprechen in etwa unseren eigenen Ergebnissen, da die Abweichung vom Normalkollektiv nur gering und zu vernachlässigen ist (108,3% vs. 98,5 bzw. 91,6%). Der Grund für unser etwas erniedrigtes α_2 -Antiplasmin ist am ehesten als reaktive Hyperfibrinolyse zu verstehen.

4.2.3.9. Plasminogen

Plasminogen ist in allen Thrombosekollektiven im Vergleich zum Normalkollektiv hoch signifikant erhöht. Das Thrombosekollektiv T- ("akute Thrombose ohne Thromboseneigung") hat dabei ein signifikant niedrigeres Plasminogen als Tp ("nur alte Thrombose/positive Familienanamnese"). Auch dieser Unterschied ist wie beim α_2 -Antiplasmin nicht stark und für die fibrinolytische Aktivität ohne Bedeutung.

Hereditäre Plasminogenmangel sind eine seltene Ursache für eine Thrombembolie ^(161, 177, 194-195) und sind bei unseren Ergebnissen so gut wie ausgeschlossen. Über das Verhalten des Plasminogens im Verlauf einer akuten Thrombose gibt es keine genauen Aussagen ⁽¹⁸⁹⁾. Bei uns war das Plasminogen bei den Thrombosekollektiven im Vergleich zum Normalkollektiv leicht, aber hoch signifikant erhöht (98% vs. 117%). Das Plasminogen liegt damit immer noch im Normbereich, die Erhöhung lässt sich, wie auch bei α_2 -Antiplasmin, ggf. reaktiv verstehen.

4.2.3.10. D-Dimer

Beim D-Dimer ist der Interquartilbereich bei den Thrombosekollektiven deutlich größer

als beim Normalkollektiv. Die Werte liegen zudem, außer beim Kollektiv Tp ("nur alte Thrombose/positive Familienanamnese"), hoch signifikant über dem Normalkollektiv, als deutlichen Hinweis für eine akute Thrombose. Das Kollektiv Tp hat auch einen höheren Median mit einem deutlich größeren Quartilabstand als das Normalkollektiv. Das ist aber aufgrund der zu geringen Fallzahl nicht verwertbar, da die Streubreite beim Normalkollektiv ebenso groß ist. Zwischen den Thrombosekollektiven T- ("akute Thrombose ohne Thromboseneigung") und Tp ("nur alte Thrombose/positive Familienanamnese") besteht ein signifikanter Unterschied. D-Dimer als Thromboseindikator zeigt schwache bis mittelstarke Übereinstimmungen mit verschiedenen Risikofaktoren für Thrombose und Indikatoren für eine eingeschränkte fibrinolytische Aktivität (Antithrombin III ($r = -0,58$), Fibrinogen ($r = 0,56$), Fibrinplatte mit aktivierter Euglobulinfraktion (FP-DEF) ($r = -0,55$), Fibrinplatte mit normaler Euglobulinfraktion (FP-NEF) ($r = -0,40$), PAI ($r = 0,37$), ProC Global ($r = -0,36$), Faktor XII ($r = -0,30$)).

D-Dimer ist bekanntermaßen ein mit akuter Thrombose assoziierter Parameter⁽¹⁹⁶⁾. Er hat vor allem einen hohen negativ prädiktiven Wert und eignet sich daher zum Ausschluss einer akuten Thrombose⁽¹⁶⁹⁻¹⁷⁰⁾. Aus diesem Grund ist es auch nicht verwunderlich, dass beim Thrombosekollektiv Tp ("nur alte Thrombose/positive Familienanamnese") im Vergleich zum Normalkollektiv selbst ohne akute Thrombose erhöhte Werte vorkommen. Bei erhöhten Werten besteht ein erhöhtes Risiko für eine Thrombose mit einer odds ratio von 2 bis 4⁽¹⁹⁷⁾.

4.2.3.11. PAI-1

PAI-1 als maßgeblicher Fibrinolyseaktivatorinhibitor liegt in den Thrombosekollektiven im Vergleich zum Normalkollektiv in signifikant höherer Aktivität vor. Auch als allgemeiner Indikator für eine Thromboseneigung zu werten. Erhöhte PAI-1-Werte werden zum großen Teil für eine reduzierte fibrinolytische Aktivität verantwortlich gemacht und im Zuge dessen auch für venöse Thrombosen^(145, 198-201), obwohl PAI-1 selbst ein schlechter prädiktiver Parameter ist⁽²⁰²⁾. So kann man im Verlauf einer akuten Thrombose einen bis zu dreifach höheren PAI-1-Wert finden als im gesunden Normalkollektiv^(165, 196). Dieser erhöhte Wert normalisiert sich aber in den meisten Fällen⁽¹⁶⁶⁾. Unsere Ergebnisse spiegeln dies wider: bei den Thrombosekollektiven liegt ein etwa zweifach höherer PAI-1-Wert als beim Normalkollektiv vor. Eine Ausnahme bildet das Thrombosekollektiv Tp ("nur alte Thrombose/positive Familienanamnese"), bei dem sogar ein

dreifach höherer Wert gefunden wurde bei nur geringem Interquartilbereich. Möglicherweise liegen hier angeborene Defekte in der Regulation der PAI-1-Konzentration vor.

4.3. Regressionsanalyse

In der Regressionsanalyse (Kapitel 3.3.8.) wurden zusätzlich zu den Parametern der Korrelationsanalysen als weitere Parameter das Alter und Geschlecht der Personen, sowie eine Variable zur Kollektivklassifikation (Dummy-Variable für das Normal-, Schwangeren- und Thrombosekollektiv) eingeführt. Dabei ergeben sich in der Regressionsanalyse für die beiden FC-Varianten bei der Berechnung der Regressionsgleichung unterschiedliche standardisierte beta-Koeffizienten als erklärende Einflussvariablen auf die FC, in etwa entsprechend den Ergebnissen in den Korrelationsanalysen.

Für die basale FC wird PAI-1 als hauptsächliche erklärende (negative) Einflussvariable mit einem beta von -0,57 gefunden. Als weitere wesentliche Variable wird Plasminogen identifiziert (beta = 0,51). Der Einfluss anderer Variablen ist im Vergleich dazu deutlich geringer. Die Fibrinplatte mit normaler Euglobulinfraktion (FP-NEF) als Fibrinolyse-Referenzparameter hat ein beta von 0,18, das Geschlecht ein beta von 0,13 und das Thrombosekollektiv lediglich ein beta von -0,12. Sie führen demnach nur zu einer geringen mathematisch/statistisch erklärbaren Beeinflussung der basalen FC. Dies entspricht auch der Beobachtung der basalen FC im Vergleich der Kollektive (Kapitel 3.3.6.1.). Dort ergibt sich zwar eine hoch signifikante Differenz des Normalkollektives bezüglich der Thrombosekollektive T ("Thrombosekollektiv (Gesamt)") und T- ("akute Thrombose ohne Thromboseneigung"). Diese ist aber nicht besonders groß (63,6% vs. 49,2%). Somit ist auch kein größeres beta zu erwarten. Der mathematisch/statistisch erklärbare Einfluss der Fibrinplatte mit normaler Euglobulinfraktion (FP-NEF) auf die basale FC ist im Vergleich zum Korrelationskoeffizienten ($r = 0,44$) deutlich geringer.

Die Variablen Alter, TPZ, aPTT, Fibrinogen, Antithrombin III, Faktor XII, ProC Global, D-Dimer, Fibrinplatte mit aktivierter Euglobulinfraktion (FP-DEF) und das Schwangerenkollektiv werden aus der Berechnung der Regressionsanalyse entsprechend der vorher festgelegten Aufnahme- und Ausschlusskriterien bei der kritischen Wahrscheinlichkeit des F -Wertes von $p = 0,05$ ausgeschlossen. Erstaunlich ist der Ausschluss der Fibrinplatte mit aktivierter Euglobulinfraktion (FP-DEF) und D-Dimer als erklärende Variable für die basale FC, obwohl Korrelationen von $r = 0,33$ bzw. $r = 0,28$ vorliegen.

Insgesamt entspricht dies in etwa den gefundenen Korrelationskoeffizienten und der biochemischen Konzeption des Testes. Die gefundenen Variablen haben einen hoch

signifikanten Einfluss auf die basale FC und erklären 58,3% der Höhe des Messwertes. Dabei sind PAI-1 und Plasminogen die wesentlichen erklärenden Parameter für die Variabilität der basalen FC. Sie wird demnach hauptsächlich durch die Höhe dieser beiden Parameter bestimmt. Die anderen Parameter haben einen deutlich geringeren Einfluss auf die basale FC. Dies steht im Einklang mit der Literatur, in der eine reduzierte Fibrinolytische Aktivität, meist PAI-1 vermittelt, in bis zu 30-40% für venöse Thrombosen verantwortlich gemacht wird (siehe Kapitel 4.2.3.11.).

Für die aktivierte FC wird Plasminogen als hauptsächliche erklärende Variable mit einem beta von 0,52 gefunden. Das Thrombosekollektiv hat einen mathematisch/statistisch negativen Einfluss auf die aktivierte FC mit einem beta von -0,26, entsprechend der größeren Differenz der Werte der aktivierten FC im Vergleich zur basalen FC beim Vergleich des Normalkollektives mit den Thrombosekollektiven (Kapitel 3.3.6.1. und 3.3.6.2.). Die weiteren erklärenden Variablen α_2 -Antiplasmin (beta = 0,21), Fibrinplatte mit aktivierter Euglobulinfraktion (FP-DEF) (beta = 0,19), Faktor XII (beta = 0,17), PAI (beta = -0,16) und Antithrombin III (beta = -0,14) haben einen geringeren Einfluss auf die aktivierte FC, obwohl z.B. für das α_2 -Antiplasmin eine Korrelation von $r = 0,58$ vorliegt. Der Einfluss einer kausalen Variable wie Faktor XII oder der Fibrinplatte mit aktivierter Euglobulinfraktion (FP-DEF) ist trotz einer mittelstarken Korrelation ($r = 0,44$ bzw. $r = 0,55$) nur gering.

Die Variablen Alter, Geschlecht, TPZ, aPTT, Fibrinogen, ProC Global, D-Dimer, Fibrinplatte mit normaler Euglobulinfraktion (FP-NEF) und das Schwangerenkollektiv werden auch hier wieder aufgrund der vorher festgelegten Aufnahme- und Ausschlusskriterien ausgeschlossen. Auch hier wird wieder FP-NEF und D-Dimer ausgeschlossen.

Bei der aktivierten FC haben die gefundenen Variablen einen hoch signifikanten Erklärungsanteil von 62,3% der Höhe des Messwertes, wobei das Plasminogen den wesentlichen erklärenden Parameter für die Variabilität der aktivierten FC darstellt. Des Weiteren wird noch durch den Zustand Thrombose ein Teil der Höhe der aktivierten FC erklärt. Die anderen Parameter haben einen geringeren Erklärungsanteil. Plasminogen hat sowohl in der basalen, wie auch in der aktivierten FC vergleichbare beta-Werte (0,51 bzw. 0,52), so dass beide Testsysteme die Stärke der Abhängigkeit der Fibrinolyse von Plasminogen vergleichbar abbilden. Bei der aktivierten FC ist die Wirkung der Kontaktaktivierung größer als die Wirkung der Fibrinolyseinhibitoren (PAI-1). Dies ist durch den prinzipiellen Aufbau des Testsystems der aktivierten FC zu verstehen, da eine starke Kontaktaktivierung immer zu einer starken Umsetzung von Plasminogen zu

Plasmin führen muss. Das wird sich wiederum in einem Testsystem mit Plasmin als Endsubstrat niederschlagen, sofern nicht Plasminogen selber Ursache einer Thrombose ist. Im Widerspruch dazu steht die Tatsache, dass bei uns Plasminogen in den Thrombosekollektiven im Vergleich zum Normalkollektiv erhöht war. Dies alleine müsste eigentlich in den statistischen Analysen zu negativen Koeffizienten führen und nicht wie bei uns zu positiven. Jedoch haben die Thrombosekollektive unabhängig bzw. trotz des höheren Plasminogens in unserem Testsystem eine niedrigere Fibrinolytische Kapazität. Eine erniedrigte Fibrinolyse lässt sich also nicht auf ein erniedrigtes Plasminogen reduzieren, sondern auch die Regulation von Plasminogen/Plasmin mit Aktivatoren und Inhibitoren kommt in Betracht.

Für beide FC-Varianten besteht kein erklärender Einfluss durch das Alter, TPZ, aPTT, Fibrinogen, ProC Global, D-Dimer und Schwangerschaft. Der Grund für den fehlenden erklärende Einfluss durch das Schwangerenkollektiv dürfte in der geringen Fallzahl der Schwangeren (N = 17) liegen, da im Vergleich des Schwangerenkollektives mit dem Normalkollektiv ein eindeutiger und hoch signifikant niedrigerer basaler FC-Wert gefunden wurde, der sich am ehesten durch hohe PAI-Spiegel (insbesondere PAI 2) erklären lässt. Bemerkenswert ist noch der mathematisch/statistisch fehlende Einfluss durch Fibrinogen auf die FC, obwohl Fibrinogen ein Risikofaktor für Thrombose ist und bei den Thrombosekollektiven im Vergleich zum Normalkollektiv hoch signifikant höhere Werte hat. Fibrinogen ist zwar ein Risikofaktor für Thrombose, aber scheinbar durch einen anderen Mechanismus und wird von daher auch nicht in der FC erfasst (siehe Kapitel 3.1.6.3.). Außerdem ist die Überschneidung der Werte bei den Thrombosekollektiven mit denen aus dem Normalkollektiv sehr stark.

4.4. Präliminäre Aussagen hinsichtlich der Übereinstimmung der FC-Varianten mit Thrombose und der FC-Varianten untereinander

Zur weiteren Beurteilung der Verwendung der FC als diagnostischen Test zur Erkennung einer Thrombose führten wir präliminäre Untersuchungen durch, die aber aufgrund der zu geringen Fallzahl und der Zusammensetzung des Thrombosekollektives keine ausreichende Aussagefähigkeit besitzen.

Zur Abschätzung der diagnostischen Sensitivität und Spezifität legten wir ein Entscheidungskriterium (Cut-Off) für die basale und aktivierte FC fest, anhand dessen die beiden FC-Varianten in Werte ober- und unterhalb des Entscheidungskriteriums dichotomisiert werden. Anschließend lässt sich daraus das relative Risiko für das Vorhanden-

sein einer Thrombose bei einer FC unterhalb des Entscheidungskriteriums errechnen. Als Voraussetzung dafür wählen wir für den Vergleich von Thrombose- und Normalkollektiv das Thrombosekollektiv T- ("akute Thrombose ohne Thromboseneigung"). Der Anteil der Varianz der FC, also der Anteil der Variation der FC-Werte an der gesamten Variation, der durch das Vorliegen einer Thrombose erklärt wird, liegt für diese Untergruppe für die basale FC bei 4,0% und für die aktivierte FC bei 8,4% (Zusammenhangsmaß Eta^2). Beim Thrombosekollektiv T ("Thrombosekollektiv (Gesamt)") liegt das Zusammenhangsmaß Eta^2 für die basale FC bei 5,6% und für die aktivierte FC bei 9,9%. Es handelt sich aber beim Thrombosekollektiv T- um die größte einheitliche Untergruppe, Störfaktoren und Fehler dürften bei dieser Gruppe am geringsten sein.

Anhand dieser Analyse wird deutlich, dass der Gesamtzusammenhang zwischen der Varianz der basalen und aktivierten FC und dem Vorliegen einer Thrombose also nur schwach ausgeprägt ist. Maximal 9,9% der Varianz der (aktivierten) FC lässt sich durch eine Thrombose erklären. Die aktivierte FC scheint aufgrund des Zusammenhangsmaßes besser in der Lage zu sein, Fibrinolysestörungen als Ursache für eine Thrombose zu erkennen. Der Zusammenhang von Varianz der FC und Vorliegen einer akuten Thrombose bzw. von Fibrinolysestörungen und Thrombose im ganzen Kollektiv ist dabei insgesamt nur schwach ausgeprägt, da sich zum einen Eta^2 eben auf das ganze Kollektiv (Normalkollektiv und eine Thrombosekollektiv-Untergruppe) bezieht und zum anderen im Verhältnis aller venösen Thrombosen auch nur ein geringer Anteil durch eine Fibrinolysestörung verursacht wird.

Der große Hauptanteil aller Thrombosen wird dabei durch Hämostasestörungen verursacht (hauptsächlich Störungen der Aktivität von Antithrombin III und Protein C und S, einschließlich aPC-Resistenz (z.B. Faktor V-Leiden)). Wenn man aber bedenkt, dass sich das Eta^2 auf eine Gruppe von $N = 237$ für das Normalkollektiv und das Thrombosekollektiv T ("Thrombosekollektiv (Gesamt)"), bzw. $N = 211$ für das Normalkollektiv und Thrombosekollektiv T- ("akute Thrombose ohne Thromboseneigung") bezieht, bei denen jeweils ein Anteil von 31,6% bzw. 23,2% Thrombosen vorliegen, so stimmt der Anteil der erklärenden Varianz der FC-Varianten durch Vorliegen einer Thrombose in etwa mit dem in der Literatur angegebenen Anteil überein ^(62, 145, 161-162, 164, 166, 198, 200). So liegen hier Angaben vor, dass bis zu 30-40% der thrombembolischen Ereignisse mit einer eingeschränkten fibrinolytischen Kapazität einhergehen, so wie eingangs schon erläutert (Kapitel 4.2.3.11.). Dabei steht eindeutig PAI-1 im Vordergrund, wie das von uns auch in der Regressionsanalyse für die basale FC bestätigt wird ^(62, 145, 161, 164, 166, 198, 200).

Eine eindeutige Zuordnung einer eingeschränkten fibrinolytischen Kapazität als kausale Ursache für eine Thrombose ist dabei erst nach Ausschluss anderer Ursachen, wie z. B. durch Störungen beim Antithrombin III und Protein C und S einschließlich aPC-Resistenz zu treffen ^(58, 165, 174-175, 177, 182-185).

Anschließend legen wir für die Gruppe des Normalkollektives und des Thrombosekollektives T- ("akute Thrombose ohne Thromboseneigung") mit Hilfe der Receiver-operating-characteristic curve (ROC-Kurve) die Lage eines Entscheidungskriteriums (Cut-Off) für die FC zur Erkennung von Thrombosen bei der maximalen Effizienz fest. Die ROC-Kurve stellt die Wahrscheinlichkeit der richtig positiven Resultate eines diagnostischen Testes als Funktion der Wahrscheinlichkeit der falsch positiven Resultate dar und legt somit die diagnostischen Sensitivität und Spezifität fest. Für die basale FC liegt das Entscheidungskriterium bei der maximalen Effizienz von 33,0% der bei uns gemessenen Fibrinolytischen Kapazität mit einer daraus folgenden diagnostischen Sensitivität von 32,7% und diagnostischen Spezifität von 96,3%. Für die aktivierte FC liegt es bei 66,2% der Fibrinolytischen Kapazität mit einer diagnostischen Sensitivität von 42,9% und diagnostischen Spezifität von 94,4%. Der Zusammenhang ist nach dem χ^2 -Test und dem exakten Test nach Fischer hoch signifikant ($p < 0,001$) für beide FC-Varianten.

Das Entscheidungskriterium der basalen FC liegt deutlich unterhalb der aktivierten FC. Die basale FC scheint erst bei stark erniedrigten Werten auf eine Thrombose hinzudeuten. Dies entspricht etwa den Ergebnissen der Untersuchung des Zusammenhanges von FC und Thrombose. Hier zeigt die basale FC nur einen halb so starken Zusammenhang mit Thrombose wie die aktivierte FC ($\text{Eta}^2 = 5,6\%$ vs. $9,9\%$ für T und $4,0\%$ vs. $8,4\%$ für T-). Bei der basalen FC liegt das Entscheidungskriterium auch bei einem nur halb so hohen Wert wie bei der aktivierten FC. Ebenso liegt der Median der basalen FC für das Normalkollektiv und das Thrombosekollektiv T bzw. T- niedriger als bei der aktivierten FC (für NK: $63,6 \pm 55,7\%$ vs. $91,8 \pm 72,9\%$; für T: $53,0 \pm 42,7\%$ vs. $76,3 \pm 34,2\%$; für T-: $49,2 \pm 54,1\%$ vs. $72,3 \pm 35,2\%$). Die Ergebnisse stimmen also in etwa überein.

Nach Festlegung der Lage des Entscheidungskriteriums erfolgt eine Dichotomisierung der beiden FC-Varianten in Werte ober- und unterhalb der Entscheidungsgrenze. Aus den dichotomisierten Variablen der FC und der verwendeten Gesamtkollektiv-Teilgruppe (Normalkollektiv und Thrombosekollektiv T- ("akute Thrombose ohne

Thromboseneigung")) wird untersucht, welche Vorhersagekraft die FC für eine akute Thrombose besitzt, bzw. welches relative Risiko für eine Person mit einem FC-Wert unterhalb des Entscheidungskriteriums für eine akute Thrombose besteht.

Die positive Vorhersagewahrscheinlichkeit (positiv prädiktiver Wert) für das Vorliegen einer Thrombose bei FC-Werten unterhalb der Entscheidungsgrenze liegt bei der basalen FC bei 72,7% und der aktivierten FC bei 70,0%. Die negative Vorhersagewahrscheinlichkeit (negativ prädiktiver Wert) für den Ausschluss einer Thrombose bei FC-Werten oberhalb der Entscheidungsgrenze liegt für die basale FC bei 82,5% und für die aktivierte FC bei 84,5%. Das errechnete relative Risiko (odds-ratio) für eine Thrombose bei FC-Werten unterhalb der Entscheidungsgrenze ist demnach für die basale FC 12,6-fach und für die aktivierte FC 12,7-fach gegenüber unserem Normalkollektiv erhöht. Damit besitzt die FC laut diesen präliminären Untersuchungen folgende Testcharakteristiken:

Testcharakteristiken	basale FC <150	aktivierte FC <150
Entscheidungsgrenze	33,0%	66,2%
Diagnostische Sensitivität	0,327	0,429
Diagnostische Spezifität	0,963	0,944
Effizienz	0,815	0,825
positiv prädiktiver Wert	0,727	0,700
negativ prädiktiver Wert	0,825	0,845
odds-ratio	12,61	12,75

Tabelle 4.1. Testcharakteristik der FC.

Damit ist die FC bei dieser niedrigen Sensitivität und hohen Spezifität für Thrombose im eigentlichen Sinne kein Screening-Test, sondern vielmehr ein spezifischer Test zur Erkennung bzw. zum Ausschluss von durch Fibrinolysestörungen verursachten Thrombosen. Die Übereinstimmung der beiden FC-Varianten bei der diagnostischen Entscheidung für eine vorliegende Thrombose liegt bei 61,3% (Cohen-Kappa-Koeffizient). Darin zeigt sich auch der unterschiedliche Informationsgewinn durch die FC-Varianten.

Für den häufigsten prothrombogenen Defekt, die Faktor V-Leiden Mutation, wird ein in etwa drei- bei fünffach erhöhtes relatives Risiko für das Auftreten einer venösen Thrombose bei heterozygoter Mutation angegeben ^(180-182, 186-188, 203-204). Für die Mutation G20210A im Prothrombin Gen wird ein in etwa zwei- bis vierfaches Risiko angegeben

(182, 187, 203, 205-207). Für andere Defekte werden vergleichbare relative Risiken errechnet, die für kombinierte Störungen erheblich höher liegen.

Das in unserem Kollektiv errechnete Risiko ist zum einen auffallend hoch und stimmt zum anderen für beide FC-Varianten auffallend gut überein. Der Test Fibrinolytische Kapazität bildet nicht einen spezifischen Parameter der Fibrinolyse ab, sondern soll eine fibrinolytische "Summenaktivität" widerspiegeln. Es wirken also verschiedene Defekte innerhalb des fibrinolytischen Systems zusammen und sollen hierin abgebildet werden. Dabei sind im Endergebnis, der Vorhersage von Ereignissen, beide Varianten gleichwertig, auch wenn beide im einzelnen unterschiedliche Aspekte der Fibrinolyse messen. Aufgrund des nur kleinen Kollektives und seiner Zusammensetzung müssen diese Aussagen über relative Risiken vorsichtig interpretiert werden. Sie sind nicht ohne weitere Analysen auf größere Kollektive übertragbar.

Falls bei der Abklärung eine akuten Thrombose keine Ursache im herkömmlichen Bereich erworbener und angeborener Thromboseneigung gefunden wird, ist dieser Fibrinolyse-Globaltest in der Lage, Ursachen innerhalb der Fibrinolyse zu erkennen. Die therapeutische Konsequenz einer verminderten Fibrinolytischen Kapazität entspricht dann der von anderen Ursachen thrombembolischer Ereignisse: vorübergehende oder permanente Antikoagulation.

5. Zusammenfassung

Es wurde ein Fibrinolyse-Globaltest (Fibrinolytische Kapazität, FC) in zwei Varianten (basal und aktiviert mit Dextransulfat) vorgestellt. Das Prinzip des Testes ist ein zweistufiger, indirekter enzymatischer Assay. In der ersten Stufe wird Urokinase zugeführt, welche mit Plasminogenaktivatorinhibitoren interagiert. Die noch freie Urokinase aktiviert Plasminogen zu Plasmin. Die vorhandenen Antiplasminen im Plasma, hauptsächlich α_2 -Antiplasmin, werden oxidativ mit Taurin-Chloramin inaktiviert, ohne die Aktivität von Urokinase, PAI oder Plasmin wesentlich zu beeinflussen. Schließlich wird die resultierende Plasminmenge mit Hilfe eines chromogenen Substrates quantifiziert. In einer zweiten Variante wird die kontaktphasenabhängige Fibrinolyse vorher sehr potent mit Dextransulfat stimuliert.

Dieser Test ist in der Lage, summarisch Störungen der Fibrinolyse als Ursache von Thrombosen zu erfassen, da in ihn die Gesamtaktivität der Aktivatoren und Inhibitoren des Plasmas einfließt. Nach Kalibration und Untersuchungen zur Präzision und Reliabilität wurde zur Validierung des Testes der Einfluss von PAI-1, Fibrinogen und Plasminogen untersucht. Störgrößen wie Antioxidantien, parenterale Antikoagulantien (Heparin, Nadroparin, Danaparoid und Lepirudin), Phenprocoumon, Aprotinin, Tranexamsäure, Thrombozyten und Bilirubin wurden ebenfalls untersucht. Zusätzlich wurde der Test anhand eines Normal-, Thrombose- und Schwangerenkollektives evaluiert. Ebenfalls untersucht wurde jeweils ein kleines Kollektiv von Schwangeren im Zeitverlauf und ein Kollektiv von Patienten unter oraler Antikoagulation.

Beide FC-Varianten sind dabei unterschiedlich in der Lage die wichtigsten prothrombotischen Faktoren abzubilden. So reagiert die basale FC eher auf Veränderungen der PAI-1- und Plasminogenkonzentrationen, die aktivierte FC eher auf Plasminogen und das Vorhandensein einer Thrombose als unabhängigen Parameter. Thrombose wird also durch die aktivierte FC besser als durch die basale FC diagnostiziert, erkennbar an dem höheren beta-Koeffizienten für Thrombose in der Regressionsanalyse (-0,12 vs. -0,26), dem höheren Zusammenhangsmaß Eta^2 von FC und Thrombose (5,6% vs. 9,9%), sowie der höheren Lage der Entscheidungsgrenze (Cut-Off) bei der FC für eine Thrombose (33,0% vs. 66,2%).

Bei den präliminären Untersuchungen zur Testcharakterisierung zeigt sich allerdings, dass beide FC-Varianten ähnliche Sensitivität, Spezifität und prädiktive Werte für Thrombose besitzen, wie auch ähnliche Werte des relativen Risikos für Thrombose bei

FC-Werten unterhalb der Entscheidungsgrenze (12,6 und 12,7). Hier zeigt sich, dass durch die unterschiedliche Lage des Cut-Offs die unterschiedlich gute "Erkennbarkeit" von Thrombosen der beiden FC-Varianten kompensiert wird. Die Güte der Thromboseerkenntbarkeit ist also für beide Varianten gleichwertig, obwohl die Übereinstimmung untereinander nur 61,3% beträgt.

Falls bei der Abklärung eine akuten Thrombose keine Ursache im herkömmlichen Bereich erworbener und angeborener Thromboseneigung gefunden wird, ist dieser Fibrinolyse-Globaltest in der Lage, Ursachen innerhalb des fibrinolytischen Systems zu erkennen.

Schlagworte:

Fibrinolyse, Globaltest, Thrombose, Oxidantien

LITERATURVERZEICHNIS

- (1) Butenas S., Mann K.G.: Blood coagulation. *Biochemistry (Mosc)*.2002; 67: 3-12.
- (2) Mann K.G., Butenas S., Brummel K.: The dynamics of thrombin formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*.2003; 23: 17-25.
- (3) Roberts H.R., Monroe D.M., Oliver J.A., Chang J.Y., Hoffman M.: Newer concepts of blood coagulation. *Haemophilia*.1998; 4: 331-4.
- (4) Walsh P.N., Ahmad S.S.: Proteases in blood clotting. *Essays Biochem*.2002; 38: 95-111.
- (5) McVey J.H.: Tissue factor pathway. *Baillieres Best Pract Res Clin Haematol*.1999; 12: 361-72.
- (6) Levi M., Hack C.E., de Boer J.P., Brandjes D.P., Buller H.R., ten Cate J.W.: Reduction of contact activation related fibrinolytic activity in factor XII deficient patients. Further evidence for the role of the contact system in fibrinolysis in vivo. *J Clin Invest*.1991; 88: 1155-60.
- (7) Rodeghiero F., Castaman G., Ruggeri M., Cazzavillan M., Ferracin G., Dini E.: Fibrinolytic studies in 13 unrelated families with factor XII deficiency. *Haematologica*.1991; 76: 28-32.
- (8) Yarovaya G.A., Blokhina T.B., Neshkova E.A.: Contact system. New concepts on activation mechanisms and bioregulatory functions. *Biochemistry (Mosc)*.2002; 67: 13-24.
- (9) Sakata Y., Loskutoff D.J., Gladson C.L., Hekman C.M., Griffin J.H.: Mechanism of protein C-dependent clot lysis: role of plasminogen activator inhibitor. *Blood*.1986; 68: 1218-23.
- (10) Hockin M.F., Jones K.C., Everse S.J., Mann K.G.: A model for the stoichiometric regulation of blood coagulation. *J Biol Chem*.2002; 277: 18322-33.
- (11) Andreasen P.A., Egelund R., Petersen H.H.: The plasminogen activation system in tumor growth, invasion, and metastasis. *Cell Mol Life Sci*.2000; 57: 25-40.
- (12) Festuccia C., Dolo V., Guerra F., Violini S., Muzi P., Pavan A., Bologna M.: Plasminogen activator system modulates invasive capacity and proliferation in prostatic tumor cells. *Clin Exp Metastasis*.1998; 16: 513-28.
- (13) Binnema D.J., Dooijewaard G., Turion P.N.: An analysis of the activators of single-chain urokinase-type plasminogen activator (scu-PA) in the dextran sulphate euglobulin fraction of normal plasma and of plasmas deficient in factor XII and prekallikrein. *Thromb Haemost*.1991; 65: 144-8.

- (14) Binnema D.J., Dooijewaard G., van Iersel J.J., Turion P.N., Kluft C.: The contact-system dependent plasminogen activator from human plasma: identification and characterization. *Thromb Haemost.*1990; 64: 390-7.
- (15) Bouma B.N., Griffin J.H.: Deficiency of factor XII-dependent plasminogen proactivator in prekallikrein-deficient plasma. *J Lab Clin Med.*1978; 91: 148-55.
- (16) Espana F., Aznar J., Estelles A.: Factor XII-induced fibrinolysis. Diminished proactivator activity and drastic reduction of activator activity in Fletcher factor-deficient plasma gamma globulin. *J Lab Clin Med.*1982; 100: 756-70.
- (17) Hauert J., Nicoloso G., Schleuning W.D., Bachmann F., Schapira M.: Plasminogen activators in dextran sulfate-activated euglobulin fractions: a molecular analysis of factor XII- and prekallikrein-dependent fibrinolysis. *Blood.*1989; 73: 994-9.
- (18) Kluft C., Dooijewaard G., Emeis J.J.: Role of the contact system in fibrinolysis. *Semin Thromb Hemost.*1987; 13: 50-68.
- (19) Kluft C., Trumpi Kalshoven M.M., Jie A.F., Veldhuyzen Stolk E.C.: Factor XII-dependent fibrinolysis: a double function of plasma kallikrein and the occurrence of a previously undescribed factor XII- and kallikrein-dependent plasminogen proactivator. *Thromb Haemost.*1979; 41: 756-73.
- (20) Kok P., Nilsson T.: Assay characteristics and fibrin affinity of plasminogen activators of the intrinsic fibrinolytic system. *Thromb Res.*1986; 41: 197-209.
- (21) Miles L.A., Greengard J.S., Griffin J.H.: A comparison of the abilities of plasma kallikrein, beta-Factor XIIa, Factor XIa and urokinase to activate plasminogen. *Thromb Res.*1983; 29: 407-17.
- (22) Tsuda H., Miyata T., Iwanaga S., Yamamoto T.: Analysis of intrinsic fibrinolysis in human plasma induced by dextran sulfate. *Thromb Haemost.*1992; 67: 440-4.
- (23) Mullertz S., Clemmensen I.: The primary inhibitor of plasmin in human plasma. *Biochem J.*1976; 159: 545-53.
- (24) Chmielewska J., Ranby M., Wiman B.: Evidence for a rapid inhibition to tissue plasminogen activator in plasma. *Thromb Res.*1983; 31: 427-36.
- (25) Chmielewska J., Wiman B.: Determination of tissue plasminogen activator and its "fast" inhibitor in plasma. *Clin Chem.*1986; 32: 482-5.
- (26) Erickson L.A., Ginsberg M.H., Loskutoff D.J.: Detection and partial characterization of an inhibitor of plasminogen activator in human platelets. *J Clin Invest.*1984; 74: 1465-72.
- (27) Erickson L.A., Hekman C.M., Loskutoff D.J.: The primary plasminogen-activator inhibitors in endothelial cells, platelets, serum, and plasma are immunologically related. *Proc Natl Acad Sci U S A.*1985; 82: 8710-4.

- (28) Hekman C.M., Loskutoff D.J.: Kinetic analysis of the interactions between plasminogen activator inhibitor 1 and both urokinase and tissue plasminogen activator. *Arch Biochem Biophys.*1988; 262: 199-210.
- (29) Loskutoff D.J., Sawdey M., Mimuro J.: Type 1 plasminogen activator inhibitor. *Prog Hemost Thromb.*1989; 9: 87-115.
- (30) Vaughan D.E., Declerck P.J., Van Houtte E., De Mol M., Collen D.: Reactivated recombinant plasminogen activator inhibitor-1 (rPAI-1) effectively prevents thrombolysis in vivo. *Thromb Haemost.*1992; 68: 60-3.
- (31) Juhan Vague I., Alessi M.C., Fossat C., Declerck P.J., Kruithof E.K.: Plasma determination of plasminogen activator inhibitor 1 antigen must be performed in blood collected on antiplatelet/anticoagulant mixture. *Thromb Haemost.*1987; 58: 1096.
- (32) Lang I.M., Schleef R.R.: Calcium-dependent stabilization of type I plasminogen activator inhibitor within platelet alpha-granules. *J Biol Chem.*1996; 271: 2754-61.
- (33) Levin E.G.: Quantitation and properties of the active and latent plasminogen activator inhibitors in cultures of human endothelial cells. *Blood.*1986; 67: 1309-13.
- (34) Seetharam R., Dwivedi A.M., Duke J.L., Hayman A.C., Walton H.L., Huckins N.R., Kamerkar S.M., Corman J.I., Woodeshick R.W., Wilk R.R., et al.: Purification and characterization of active and latent forms of recombinant plasminogen activator inhibitor 1 produced in *Escherichia coli*. *Biochemistry.*1992; 31: 9877-82.
- (35) Lawrence D.A., Loskutoff D.J.: Inactivation of plasminogen activator inhibitor by oxidants. *Biochemistry.*1986; 25: 6351-5.
- (36) Deng G., Royle G., Wang S., Crain K., Loskutoff D.J.: Structural and functional analysis of the plasminogen activator inhibitor-1 binding motif in the somatomedin B domain of vitronectin. *J Biol Chem.*1996; 271: 12716-23.
- (37) Lindahl T.L., Sigurdardottir O., Wiman B.: Stability of plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1). *Thromb Haemost.*1989; 62: 748-51.
- (38) Seiffert D., Ciambone G., Wagner N.V., Binder B.R., Loskutoff D.J.: The somatomedin B domain of vitronectin. Structural requirements for the binding and stabilization of active type 1 plasminogen activator inhibitor. *J Biol Chem.*1994; 269: 2659-66.
- (39) Sigurdardottir O., Wiman B.: Complex formation between plasminogen activator inhibitor 1 and vitronectin in purified systems and in plasma. *Biochim Biophys Acta.*1990; 1035: 56-61.
- (40) Stief T.W.: A direct approach in fibrinolysis diagnostic: mimicry of the leukocyte by attack by oxidants. *Thromb Res.*1989; 56: 213-20.

- (41) Stief T.W., Martin E., Caso F., Rodriguez J.M.: Oxidation susceptibility of plasminogen activator inhibitors of human plasma. *Thromb Res.*1990; 60: 177-80.
- (42) Estelles A., Gilabert J., Andres C., Espana F., Aznar J.: Plasminogen activator inhibitors type 1 and type 2 and plasminogen activators in amniotic fluid during pregnancy. *Thromb Haemost.*1990; 64: 281-5.
- (43) Estelles A., Gilabert J., Aznar J., Loskutoff D.J., Schleef R.R.: Changes in the plasma levels of type 1 and type 2 plasminogen activator inhibitors in normal pregnancy and in patients with severe preeclampsia. *Blood.*1989; 74: 1332-8.
- (44) Mackinnon S., Walker I.D., Davidson J.F., Walker J.J.: Plasma fibrinolysis during and after normal childbirth. *Br J Haematol.*1987; 65: 339-42.
- (45) Stief T.W., Radtke K.P., Heimburger N.: Inhibition of urokinase by protein C-inhibitor (PCI). Evidence for identity of PCI and plasminogen activator inhibitor 3. *Biol Chem Hoppe Seyler.*1987; 368: 1427-33.
- (46) Anderson F.A., Jr., Wheeler H.B., Goldberg R.J., Hosmer D.W., Patwardhan N.A., Jovanovic B., Forcier A., Dalen J.E.: 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; 151: 933-8.
- (47) Coon W.W., Willis P.W.d., Keller J.B.: Venous thromboembolism and other venous disease in the Tecumseh community health study. *Circulation.*1973; 48: 839-46.
- (48) Gillum R.F.: Pulmonary embolism and thrombophlebitis in the United States, 1970-1985. *Am Heart J.*1987; 114: 1262-4.
- (49) Kierkegaard A.: Incidence of acute deep vein thrombosis in two districts. A phlebographic study. *Acta Chir Scand.*1980; 146: 267-9.
- (50) Lilienfeld D.E., Godbold J.H., Burke G.L., Sprafka J.M., Pham D.L., Baxter J.: Hospitalization and case fatality for pulmonary embolism in the twin cities: 1979-1984. *Am Heart J.*1990; 120: 392-5.
- (51) 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; 232: 155-60.
- (52) Kakkar V.V., Howe C.T., Flanc C., Clarke M.B.: Natural history of postoperative deep-vein thrombosis. *Lancet.*1969; 2: 230-2.
- (53) McKelvie P.A.: Autopsy evidence of pulmonary thromboembolism. *Med J Aust.*1994; 160: 127-8.
- (54) McLachlin J., Richards T., Paterson J.: An evaluation of clinical signs in the diagnosis of venous thrombosis. *Arch Surg.*1962; 85: 58-64.

- (55) Silverstein M.D., Heit J.A., Mohr D.N., Petterson T.M., WM O.F., Melton L.J., 3rd: Trends in the incidence of deep vein thrombosis and pulmonary embolism: a 25-year population-based study. *Arch Intern Med.*1998; 158: 585-93.
- (56) Conard J., Veuillet Duval A., Horellou M.H., Samama M.: [Study of coagulation and fibrinolysis in 131 cases of recurrent deep vein thrombosis]. *Nouv Rev Fr Hematol.*1982; 24: 205-9.
- (57) Grimaudo V., Bachmann F., Hauert J., Christe M.A., Kruithof E.K.: Hypofibrinolysis in patients with a history of idiopathic deep vein thrombosis and/or pulmonary embolism. *Thromb Haemost.*1992; 67: 397-401.
- (58) Heijboer H., Brandjes D.P., Buller H.R., Sturk A., ten Cate J.W.: Deficiencies of coagulation-inhibiting and fibrinolytic proteins in outpatients with deep-vein thrombosis. *N Engl J Med.*1990; 323: 1512-6.
- (59) Korninger C., Lechner K., Niessner H., Gossinger H., Kundi M.: Impaired fibrinolytic capacity predisposes for recurrence of venous thrombosis. *Thromb Haemost.*1984; 52: 127-30.
- (60) Prins M.H., Hirsh J.: A critical review of the evidence supporting a relationship between impaired fibrinolytic activity and venous thromboembolism. *Arch Intern Med.*1991; 151: 1721-31.
- (61) Schafer A.I.: The hypercoagulable states. *Ann Intern Med.*1985; 102: 814-28.
- (62) Wiman B., Hamsten A.: Impaired fibrinolysis and risk of thromboembolism. *Prog Cardiovasc Dis.*1991; 34: 179-92.
- (63) Hutt E.D., Kingdon H.S.: Use of heparinase to eliminate heparin inhibition in routine coagulation assays. *J Lab Clin Med.*1972; 79: 1027-34.
- (64) Zimmermann J.J., Oddie K., Langer R., Cooney C.L.: The release of heparinase from the periplasmic space of *Flavobacterium heparinum* by three-step osmotic shock. *Appl Biochem Biotechnol.*1991; 30: 137-48.
- (65) Christensen U.: pH effects in plasmin-catalysed hydrolysis of alpha-N-benzoyl-L-arginine compounds. *Biochim Biophys Acta.*1975; 397: 459-67.
- (66) Kruithof E.K., Ransijn A., Bachmann F.: Influence of detergents on the measurement of the fibrinolytic activity of plasminogen activators. *Thromb Res.*1982; 28: 251-60.
- (67) Stief T.W., Aab A., Heimbürger N.: Oxidative inactivation of purified human alpha-2-antiplasmin, antithrombin III, and C1-inhibitor. *Thromb Res.*1988; 49: 581-9.
- (68) Stief T.W., Martin E., Jimenez J.M., Rodriguez J.M.: Protection of urokinase from plasminogen activator inhibitors in human plasma by hydrophobic agents. *Thromb Res.*1990; 58: 199-203.

- (69) Eliasson M., Evrin P.E., Lundblad D., Asplund K., Ranby M.: Influence of gender, age and sampling time on plasma fibrinolytic variables and fibrinogen. A population study. *Fibrinolysis*.1993; 7: 316-23.
- (70) Kluft C., Jie A.F., Rijken D.C., Verheijen J.H.: Daytime fluctuations in blood of tissue-type plasminogen activator (t-PA) and its fast-acting inhibitor (PAI-1). *Thromb Haemost*.1988; 59: 329-32.
- (71) Geerts W.H., Code K.I., Jay R.M., Chen E., Szalai J.P.: A prospective study of venous thromboembolism after major trauma. *N Engl J Med*.1994; 331: 1601-6.
- (72) Rubinstein I., Murray D., Hoffstein V.: Fatal pulmonary emboli in hospitalized patients. An autopsy study. *Arch Intern Med*.1988; 148: 1425-6.
- (73) Wheeler H.B., Hirsh J., Wells P., Anderson F.A., Jr.: Diagnostic tests for deep vein thrombosis. Clinical usefulness depends on probability of disease. *Arch Intern Med*.1994; 154: 1921-8.
- (74) Rydzewski A., Takada Y., Takada A.: Stimulation of plasmin catalyzed conversion of single-chain to two-chain urokinase-type plasminogen activator by sulfated polysaccharides. *Thromb Haemost*.1989; 62: 752-5.
- (75) Wuillemin W.A., Eldering E., Citarella F., de Ruig C.P., ten Cate H., Hack C.E.: Modulation of contact system proteases by glycosaminoglycans. Selective enhancement of the inhibition of factor XIa. *J Biol Chem*.1996; 271: 12913-8.
- (76) Baker M.S., Green S.P., Goss N., Katrantzis M., Doe W.F.: Plasminogen activator inhibitor 2 (PAI-2) is not inactivated by exposure to oxidants which can be released from activated neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun*.1990; 166: 993-1000.
- (77) Lind S.E., McDonagh J.R., Smith C.J.: Oxidative inactivation of plasmin and other serine proteases by copper and ascorbate. *Blood*.1993; 82: 1522-31.
- (78) Sidelmann J., Jespersen J., Kluft C., Gram J.: The effect of chemical anti-inhibitors on fibrinolytic enzymes and inhibitors. *Clin Chim Acta*.1997; 261: 43-56.
- (79) Stief T.W., Heimburger N.: Inactivation of serine proteinase inhibitors (serpins) in human plasma by reactive oxidants. *Biol Chem Hoppe Seyler*.1988; 369: 1337-42.
- (80) Stief T.W., Stief M.H., Ehrenthal W., Darius H., Martin E.: Nonradical oxidants of the phagocyte type induce the activation of plasmatic single chain- urokinase. *Thromb Res*.1991; 64: 597-610.
- (81) Kalyanaraman B., Sohnle P.G.: Generation of free radical intermediates from foreign compounds by neutrophil-derived oxidants. *J Clin Invest*.1985; 75: 1618-22.

- (82) Nishida A., Kimura H., Sugioka K., Nakano M.: The ability of granulocytes to generate superoxide anions and hypochlorite during phagocytosis: comparison of neonatal granulocytes with adult granulocytes. *Biol Neonate*.1990; 58: 145-51.
- (83) Vogt W.: Complement activation by myeloperoxidase products released from stimulated human polymorphonuclear leukocytes. *Immunobiology*.1996; 195: 334-46.
- (84) Vogt W., Hesse D.: Oxidants generated by the myeloperoxidase-halide system activate the fifth component of human complement, C5. *Immunobiology*.1994; 192: 1-9.
- (85) Weiss S.J.: Tissue destruction by neutrophils. *N Engl J Med*.1989; 320: 365-76.
- (86) Stief T.W., Lenz P., Becker U., Heimburger N.: Determination of plasminogen activator inhibitor (PAI) capacity of human plasma in presence of oxidants: a novel principle. *Thromb Res*.1988; 50: 559-73.
- (87) Stief T.W., Martin E., Jimenez J., Digon J., Rodriguez J.M.: Effect of oxidants on proteases of the fibrinolytic system: possible role for methionine residues in the interaction between tissue type plasminogen activator and fibrin. *Thromb Res*.1991; 61: 191-200.
- (88) Sigurdardottir O., Wiman B.: Identification of a PAI-1 binding site in vitronectin. *Biochim Biophys Acta*.1994; 1208: 104-10.
- (89) Gallimore M.J., Friberger P.: Chromogenic peptide substrate assays and their clinical applications. *Blood Rev*.1991; 5: 117-27.
- (90) Klauser R.J.: Induction of fibrinolysis by polyanions in human plasma. *Thromb Haemost*.1988; 60: 324-7.
- (91) Kluff C.: Studies on the fibrinolytic system in human plasma: quantitative determination of plasminogen activators and proactivators. *Thromb Haemost*.1979; 41: 365-83.
- (92) Miles L.A., Rothschild Z., Griffin J.H.: Dextran sulfate-dependent fibrinolysis in whole human plasma. *J Lab Clin Med*.1983; 101: 214-25.
- (93) Jespersen J., Kluff C.: Increased euglobulin fibrinolytic potential in women on oral contraceptives low in oestrogen--levels of extrinsic and intrinsic plasminogen activators, prekallikrein, factor XII, and C1-inactivator. *Thromb Haemost*.1985; 54: 454-9.
- (94) Permin P.: Properties of the fibrinokinase-fibrinolysin system. *Nature*.1947; 160: 571-2.
- (95) Astrup T., Müllertz S.: The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity. *Arch. Biochem. Biophys*.1952; 40: 346.

- (96) Campbell S.J., Mackie I.J., Robinson G.E., Machin S.J.: Contact factor mediated fibrinolysis is increased by the combined oral contraceptive pill. *Br J Obstet Gynaecol.*1993; 100: 79-84.
- (97) Deogny L., Weidenbach A., Hampton J.W.: Improved fibrin plate method for fibrinolytic activity measurements: use of bentonite precipitation and agar solidification. *Clin Chim Acta.*1975; 60: 85-9.
- (98) Edward N.: Methods for improving the sensitivity and specificity of the fibrin plate. *J Clin Pathol.*1972; 25: 335-7.
- (99) Haverkate F., Brakman P.: Letter: The fibrin plate assay -- some crucial conditions. *Thromb Diath Haemorrh.*1975; 34: 312-3.
- (100) Marsh N.A., Arocha Pinango C.L.: Evaluation of the fibrin plate method for estimating plasminogen activators. *Thromb Diath Haemorrh.*1972; 28: 75-88.
- (101) Safarik I.: A modified fibrin plate for rapid detection of proteinases and proteinase inhibitors in fractions after liquid chromatography. *J Biochem Biophys Methods.*1988; 17: 277-83.
- (102) Walton P.L.: An improved fibrin plate method for the assay of plasminogen activators. *Clin Chim Acta.*1966; 13: 680-4.
- (103) Eriksson E., Tengborn L., Risberg B.: The effect of various anticoagulant/antiplatelet mixtures on determination of plasminogen activator inhibitor, platelet proteins and hemostasis parameters. *Thromb Haemost.*1989; 61: 511-6.
- (104) Seljeflot I., Haaland A.H., Arnesen H.: Stability of plasma PAI-I at room temperature. *Thromb Res.*1994; 73: 75-8.
- (105) Alessi M.C., Gaussem P., Juhan Vague I., Aiach M., Musutelli J.J., Lenz P., Keuper H.: The determination of functional plasminogen activator inhibitors (PAI) based on the inhibition of urokinase: PAI normal range and circadian variations in healthy donors; Comparison with other methods. *Fibrinolysis.*1990; 4: 177-81.
- (106) Declerck P.J., Alessi M.C., Verstreken M., Kruithof E.K., Juhan Vague I., Collen D.: Measurement of plasminogen activator inhibitor 1 in biologic fluids with a murine monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay. *Blood.*1988; 71: 220-5.
- (107) Ranby M., Bergsdorf N., Nilsson T., Mellbring G., Winblad B., Bucht G.: Age dependence of tissue plasminogen activator concentrations in plasma, as studied by an improved enzyme-linked immunosorbent assay. *Clin Chem.*1986; 32: 2160-5.
- (108) Reddy K.N., Markus G.: Mechanism of activation of human plasminogen by streptokinase. Presence of active center in streptokinase-plasminogen complex. *J Biol Chem.*1972; 247: 1683-91.

- (109) Teger Nilsson A.C., Friberger P., Gyzander E.: Determination of a new rapid plasmin inhibitor in human blood by means of a plasmin specific tripeptide substrate. *Scand J Clin Lab Invest.*1977; 37: 403-9.
- (110) Newman D.J., Henneberry H., Price C.P.: Particle enhanced light scattering immunoassay. *Ann Clin Biochem.*1992; 29: 22-42.
- (111) Quick A.J.: The prothrombin time in haemophilia and in obstructive jaundice. *J Biol Chem.*1935; 109: 73-4.
- (112) Quick A.J., Stanley-Brown M., Bancroft F.W.: A study of the coagulation defect in haemophilia and in jaundice. *Am J Med Sci.*1935; 190: 501-11.
- (113) Spicer E.K., Horton R., Bloem L., Bach R., Williams K.R., Guha A., Kraus J., Lin T.C., Nemerson Y., Konigsberg W.H.: Isolation of cDNA clones coding for human tissue factor: primary structure of the protein and cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.*1987; 84: 5148-52.
- (114) Köhler M., Dati F., Kolde H.J.: Aktivierte partielle Thromboplastinzeit- Standortbestimmung-Standardisierung der Methode, Interpretation der Befunde und Grenzen der Anwendbarkeit. *J Lab Med.*1995; 19: 162-6.
- (115) Proctor R.R., Rapaport S.I.: The partial thromboplastin time with kaolin. A simple screening test for the first stage plasma clotting factor deficiencies. *Am J Clin Pathol.*1961; 36: 212-9.
- (116) Clauss A.: Rapid physiological coagulation method in determination of fibrinogen. *Acta Haematol.*1957; 17: 237-9.
- (117) Friberger P., Egberg N., Holmer E., Hellgren M., Blomback M.: Antithrombin assay - the use of human or bovine thrombin and the observation of a "second" heparin cofactor. *Thromb Res.*1982; 25: 433-6.
- (118) Odegard O.R., Lie M., Abildgaard U.: Heparin cofactor activity measured with an amidolytic method. *Thromb Res.*1975; 6: 287-94.
- (119) Ratnoff O.D., Colopy J.E.: A familial hemorrhagic trait associated with deficiency of clot promoting fraction of plasma. *J Clin Invest.*1955; 34: 602.
- (120) Martinoli J.L., Stocker K.: Fast functional protein C assay using Protac, a novel protein C activator. *Thromb Res.*1986; 43: 253-64.
- (121) Boyer-Neumann C.: A new functional assay for human Protein S activity. *Fibrinolysis.*1990; 4: 61.
- (122) Wolf M., Boyer Neumann C., Martinoli J.L., Leroy Matheron C., Amiral J., Meyer D., Larrieu M.J.: A new functional assay for human protein S activity using activated factor V as substrate. *Thromb Haemost.*1989; 62: 1144-5.

- (123) Kraus M., Noah M., Fickenscher K.: The PCAT--a simple screening assay for assessing the functionality of the protein C anticoagulant pathway. *Thromb Res.*1995; 79: 217-22.
- (124) Toulon P., Adda R., Perez P.: Sensitivity of the ProC global assay for protein C pathway abnormalities. clinical experience in 899 unselected patients with venous thromboembolism. *Thromb Res.*2001; 104: 93-103.
- (125) Freyburger G., Andras M., Sanchez G., Hall C.M., Rosen S.: Response to activated protein C upon storage of whole blood and plasma. *Thromb Res.*1999; 93: 89-95.
- (126) Rosen S., Johansson K., Lindberg K., Dahlback B.: Multicenter evaluation of a kit for activated protein C resistance on various coagulation instruments using plasmas from healthy individuals. The APC Resistance Study Group. *Thromb Haemost.*1994; 72: 255-60.
- (127) Hintz G., Riess H., Huhn D.: Akzelerin-Inaktivierung bestimmt Resistenz gegenüber aktiviertem Protein C. *Klin Lab.*1995; 41: 113-7.
- (128) Bertina R.M., Koeleman B.P., Koster T., Rosendaal F.R., Dirven R.J., de Ronde H., van der Velden P.A., Reitsma P.H.: Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature.*1994; 369: 64-7.
- (129) Rijken D.C., de Munk G.A., Jie A.F.: Interaction of plasminogen activators and plasminogen with heparin: effect of ionic strength. *Thromb Haemost.*1993; 70: 867-72.
- (130) Khan M.M., Gikakis N., Miyamoto S., Rao A.K., Cooper S.L., Edmunds L.H., Jr., Colman R.W.: Aprotinin inhibits thrombin formation and monocyte tissue factor in simulated cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg.*1999; 68: 473-8.
- (131) Petersen L.C., Brender J., Suenson E.: Zymogen-activation kinetics. Modulatory effects of trans-4-(aminomethyl)cyclohexane-1-carboxylic acid and poly-D-lysine on plasminogen activation. *Biochem J.*1985; 225: 149-58.
- (132) Royston D.: Aprotinin versus lysine analogues: the debate continues. *Ann Thorac Surg.*1998; 65: S9-19; discussion S27-8.
- (133) Kojima T., Gando S., Morimoto Y., Mashio H., Goda Y., Kawahigashi H., Kemotsu O.: Systematic elucidation of effects of tranexamic acid on fibrinolysis and bleeding during and after cardiopulmonary bypass surgery. *Thromb Res.*2001; 104: 301-7.
- (134) Suenson E., Lutzen O., Thorsen S.: Initial plasmin-degradation of fibrin as the basis of a positive feed-back mechanism in fibrinolysis. *Eur J Biochem.*1984; 140: 513-22.
- (135) Brockway W.J., Castellino F.J.: Measurement of the binding of antifibrinolytic amino acids to various plasminogens. *Arch Biochem Biophys.*1972; 151: 194-9.

- (136) Castellino F.J., Ploplis V.A., Powell J.R., Strickland D.K.: The existence of independent domain structures in human Lys77-plasminogen. *J Biol Chem.*1981; 256: 4778-82.
- (137) Christensen U.: Allosteric effects of some antifibrinolytic amino acids on the catalytic activity of human plasmin. *Biochim Biophys Acta.*1978; 526: 194-201.
- (138) Takada A., Takada Y.: Effects of tranexamic acid on the conversion of Glu-plasminogen I and II to its Lys-forms. *Thromb Res.*1985; 40: 171-9.
- (139) Takada A., Takada Y.: Inhibition by tranexamic acid of the conversion of single-chain tissue plasminogen activator to its two chain form by plasmin: the presence on tissue plasminogen activator of a site to bind with lysine binding sites of plasmin. *Thromb Res.*1989; 55: 717-25.
- (140) Lourenco D.M., Dosne A.M., Kher A., Samama M.: Effect of standard heparin and a low molecular weight heparin on thrombolytic and fibrinolytic activity of single-chain urokinase plasminogen activator in vitro. *Thromb Haemost.*1989; 62: 923-6.
- (141) Stamm D.: A new concept for quality control of clinical laboratory investigations in the light of clinical requirements and based on reference method values. *J Clin Chem Clin Biochem.*1982; 20: 817-24.
- (142) Stamm D.: Experience with quality control in clinical chemistry. *Z Lebensm Unters Forsch.*1986; 182: 372-84.
- (143) Declerck P.: [Plasminogen activator-inhibitor 1: biochemical, structural and functional studies]. *Verh K Acad Geneeskd Belg.*1993; 55: 457-73.
- (144) Grubic N., Stegnar M., Peternel P., Kaider A., Binder B.R.: A novel G/A and the 4G/5G polymorphism within the promoter of the plasminogen activator inhibitor-1 gene in patients with deep vein thrombosis. *Thromb Res.*1996; 84: 431-43.
- (145) Wiman B.: Plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1) in plasma: its role in thrombotic disease. *Thromb Haemost.*1995; 74: 71-6.
- (146) Wiman B., Andersson T., Hallqvist J., Reuterwall C., Ahlbom A., deFaire U.: Plasma levels of tissue plasminogen activator/plasminogen activator inhibitor-1 complex and von Willebrand factor are significant risk markers for recurrent myocardial infarction in the Stockholm Heart Epidemiology Program (SHEEP) study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*2000; 20: 2019-23.
- (147) Stief T.W., Marx R., Heimburger N.: Oxidized fibrin(ogen) derivatives enhance the activity of tissue type plasminogen activator. *Thromb Res.*1989; 56: 221-8.
- (148) Stief T.W., Martin E., Digon J., Martin Noya A., Parody R., Rodriguez J.M.: Single chain-urokinase binds to oxidized fibrin(ogen) derivatives. *Thromb Res.*1990; 59: 351-61.

- (149) Stief T.W.: Oxidized fibrin stimulates the activation of pro-urokinase and is the preferential substrate of human plasmin. *Blood Coagul Fibrinolysis*.1993; 4: 117-21.
- (150) Grimaudo V., Omri A., Kruithof E.K., Hauert J., Bachmann F.: Fibrinolytic and anticoagulant activity after a single subcutaneous administration of a low dose of heparin or a low molecular weight heparin-dihydroergotamine combination. *Thromb Haemost*.1988; 59: 388-91.
- (151) Anonick P.K., Wolf B., Gonias S.L.: Regulation of plasmin, miniplasmin, and streptokinase-plasmin complex by alpha 2-antiplasmin, alpha 2-macroglobulin, and antithrombin III in the presence of heparin. *Thromb Res*.1990; 59: 449-62.
- (152) Lammle B., Duckert F.: Different assessment of plasmin with different substrates. In vitro alteration of plasmin, influence of epsilon-aminocaproic acid and tranexamic acid upon its activity. *Thromb Haemost*.1980; 43: 112-7.
- (153) Kemkes-Matthes B.: [Changes in the blood coagulation system in pregnancy]. *Z Kardiol*.2001; 90 Suppl 4: 45-8.
- (154) Cerneca F., Ricci G., Simeone R., Malisano M., Alberico S., Guaschino S.: Coagulation and fibrinolysis changes in normal pregnancy. Increased levels of procoagulants and reduced levels of inhibitors during pregnancy induce a hypercoagulable state, combined with a reactive fibrinolysis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*.1997; 73: 31-6.
- (155) Kjellberg U., Hellgren M.: Sonoclot signature during normal pregnancy. *Intensive Care Med*.2000; 26: 206-11.
- (156) Lindoff C., Lecander I., Astedt B.: Fibrinolytic components in individual consecutive plasma samples during normal pregnancy. *Fibrinolysis*.1993; 7: 190-4.
- (157) Marin Ortuno F., Roldan Schilling V., Marco Vera P., Martinez Martinez J.G., Toral Noguera A., Garcia de Burgos Rico F., Calatayud Sendra R., Sogorb Garri F.: [Improvement in fibrinolytic function following anticoagulant treatment in chronic rheumatic atrial fibrillation]. *Rev Esp Cardiol*.1999; 52: 25-30.
- (158) Roldan V., Marin F., Marco P., Martinez J.G., Calatayud R., Sogorb F.: Hypofibrinolysis in atrial fibrillation. *Am Heart J*.1998; 136: 956-60.
- (159) Roldan V., Marin F., Marco P., Climent V., Martinez J.G., Monmeneu J.V., Bodi V., Garri F.S.: Anticoagulant therapy modifies fibrinolytic dysfunction in chronic atrial fibrillation. *Haemostasis*.2000; 30: 219-24.
- (160) Grulich-Henn J., Loechelt K., Speiser W., Muller-Berghaus G.: Increased tissue-plasminogen activator (t-PA) levels in patients under oral anticoagulant therapy. *Blut*.1989; 58: 39-43.
- (161) Bick R.L., Pegram M.: Syndromes of hypercoagulability and thrombosis: a review. *Semin Thromb Hemost*.1994; 20: 109-32.

- (162) Wiman B., Hamsten A.: The fibrinolytic enzyme system and its role in the etiology of thromboembolic disease. *Semin Thromb Hemost.*1990; 16: 207-16.
- (163) Bick R.L., Jakway J., Baker W.F., Jr.: Deep vein thrombosis: prevalence of etiologic factors and results of management in 100 consecutive patients. *Semin Thromb Hemost.*1992; 18: 267-74.
- (164) Dawson S., Henney A.: The status of PAI-1 as a risk factor for arterial and thrombotic disease: a review. *Atherosclerosis.*1992; 95: 105-17.
- (165) Swiatkiewicz A., Jurkowski P., Kotschy M., Ciecierski M., Jawien A.: Level of antithrombin III, protein C, protein S and other selected parameters of coagulation and fibrinolysis in the blood of the patients with recurrent deep venous thrombosis. *Med Sci Monit.*2002; 8: CR263-8.
- (166) Crowther M.A., Roberts J., Roberts R., Johnston M., Stevens P., Skingley P., Patrassi G.M., Sartori M.T., Hirsh J., Prandoni P., Weitz J.I., Gent M., Ginsberg J.S.: Fibrinolytic variables in patients with recurrent venous thrombosis: a prospective cohort study. *Thromb.*2001; 85: 390-4.
- (167) Siegbahn A., Ruusuvaara L.: Age dependence of blood fibrinolytic components and the effects of low-dose oral contraceptives on coagulation and fibrinolysis in teenagers. *Thromb Haemost.*1988; 60: 361-4.
- (168) Cushman M., Folsom A.R., Wang L., Aleksic N., Rosamond W.D., Tracy R.P., Heckbert S.R.: Fibrin fragment D-dimer and the risk of future venous thrombosis. *Blood.*2002; Sep 26.
- (169) Johanning J.M., Franklin D.P., Thomas D.D., Elmore J.R.: D-dimer and calf circumference in the evaluation of outpatient deep venous thrombosis. *J Vasc Surg.*2002; 36: 877-80.
- (170) Dunn K.L., Wolf J.P., Dorfman D.M., Fitzpatrick P., Baker J.L., Goldhaber S.Z.: Normal D-dimer levels in emergency department patients suspected of acute pulmonary embolism. *J Am Coll Cardiol.*2002; 40: 1475-8.
- (171) Sidelmann J., Jespersen J., Gram J.: Plasminogen activator activity and plasma-coagulum lysis measured by use of optimized fibrin gel structure preformed in microtiter plates. *Clin Chem.*1995; 41: 979-85.
- (172) Nguyen G., Horellou M.H., Kruithof E.K., Conard J., Samama M.M.: Residual plasminogen activator inhibitor activity after venous stasis as a criterion for hypofibrinolysis: a study in 83 patients with confirmed deep vein thrombosis. *Blood.*1988; 72: 601-5.
- (173) Nilsson I.M., Ljungner H., Tengborn L.: Two different mechanisms in patients with venous thrombosis and defective fibrinolysis: low concentration of plasminogen activator or increased concentration of plasminogen activator inhibitor. *Br Med J (Clin Res Ed).*1985; 290: 1453-6.

- (174) Folsom A.R., Aleksic N., Wang L., Cushman M., Wu K.K., White R.H.: Protein C, antithrombin, and venous thromboembolism incidence: a prospective population-based study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*2002; 22: 1018-22.
- (175) Bertina R.M.: Genetic approach to thrombophilia. *Thromb Haemost.*2001; 86: 92-103.
- (176) van den Belt A.G., Sanson B.J., Simioni P., Prandoni P., Buller H.R., Girolami A., Prins M.H.: Recurrence of venous thromboembolism in patients with familial thrombophilia. *Arch Intern Med.*1997; 157: 2227-32.
- (177) Lane D.A., Mannucci P.M., Bauer K.A., Bertina R.M., Bochkov N.P., Boulyjenkov V., Chandy M., Dahlback B., Ginter E.K., Miletich J.P., Rosendaal F.R., Seligsohn U.: Inherited thrombophilia: Part 1. *Thromb Haemost.*1996; 76: 651-62.
- (178) Bertina R.M.: Molecular risk factors for thrombosis. *Thromb Haemost.*1999; 82: 601-9.
- (179) Sturzebecher J., Huyke R., Vogel G.: [Determination of factor XII, plasma prekallikrein and factor V in patients with thrombophilic states]. *Folia Haematol Int Mag Klin Morphol Blutforsch.*1984; 111: 492-6.
- (180) Rodeghiero F., Tosetto A.: Activated protein C resistance and factor V Leiden mutation are independent risk factors for venous thromboembolism. *Ann Intern Med.*1999; 130: 643-50.
- (181) Folsom A.R., Cushman M., Tsai M.Y., Aleksic N., Heckbert S.R., Boland L.L., Tsai A.W., Yanez N.D., Rosamond W.D.: A prospective study of venous thromboembolism in relation to factor V Leiden and related factors. *Blood.*2002; 99: 2720-5.
- (182) Margaglione M., Brancaccio V., De Lucia D., Martinelli I., Ciampa A., Grandone E., Di Minno G.: Inherited thrombophilic risk factors and venous thromboembolism: distinct role in peripheral deep venous thrombosis and pulmonary embolism. *Chest.*2000; 118: 1405-11.
- (183) Lane D.A., Grant P.J.: Role of hemostatic gene polymorphisms in venous and arterial thrombotic disease. *Blood.*2000; 95: 1517-32.
- (184) Varela M.L., Adamczuk Y.P., Forastiero R.R., Martinuzzo M.E., Cerrato G.S., Pombo G., Carreras L.O.: Major and potential prothrombotic genotypes in a cohort of patients with venous thromboembolism. *Thromb Res.*2001; 104: 317-24.
- (185) Martinelli I.: Risk factors in venous thromboembolism. *Thromb Haemost.*2001; 86: 395-403.
- (186) Leroyer C., Mercier B., Escoffre M., Ferec C., Mottier D.: Factor V Leiden prevalence in venous thromboembolism patients. *Chest.*1997; 111: 1603-6.

- (187) Lindmarker P., Schulman S., Sten-Linder M., Wiman B., Egberg N., Johnsson H.: The risk of recurrent venous thromboembolism in carriers and non-carriers of the G1691A allele in the coagulation factor V gene and the G20210A allele in the prothrombin gene. DURAC Trial Study Group. Duration of Anticoagulation. *Thromb Haemost.* 1999; 81: 684-9.
- (188) de Moerloose P., Reber G., Perrier A., Perneger T., Bounameaux H.: Prevalence of factor V Leiden and prothrombin G20210A mutations in unselected patients with venous thromboembolism. *Br J Haematol.* 2000; 110: 125-9.
- (189) Grzywacz A., Psuja P., Turowiecka Z., Lewandowski K., Zozulinska M., Zawilska K.: [Haemostatic defects in venous thromboembolic disease]. *Pol Arch Med Wewn.* 1995; 94: 307-13.
- (190) Teger-Nilsson A.C., Gyzander E., Myrwold H., Noppa H., Olsson R., Wallmo L.: Determination of fast-acting plasmin inhibitor (alpha2-antiplasmin) in plasma from patients with tendency to thrombosis and increased fibrinolysis. *Haemostasis.* 1978; 7: 155-7.
- (191) Francis C.W., Marder V.J.: Physiologic regulation and pathologic disorders of fibrinolysis. *Hum Pathol.* 1987; 18: 263-74.
- (192) Collen D., Lijnen H.R.: The fibrinolytic system in man. *Crit Rev Oncol Hematol.* 1986; 4: 249-301.
- (193) Kumada T., Abiko Y.: Physiological role of alpha 2-plasmin inhibitor in rats. *Thromb Res.* 1984; 36: 153-63.
- (194) Robbins K.C.: Classification of abnormal plasminogens: dysplasminogenemias. *Semin Thromb Hemost.* 1990; 16: 217-20.
- (195) Cooper D.N., Tuddenham E.G.: Molecular genetics of familial venous thrombosis. *Br Med Bull.* 1994; 50: 833-50.
- (196) Meissner M.H., Zierler B.K., Bergelin R.O., Chandler W.L., Strandness D.E., Jr.: Coagulation, fibrinolysis, and recanalization after acute deep venous thrombosis. *J Vasc Surg.* 2002; 35: 278-85.
- (197) Andreescu A., C., Cushman M., Rosendaal F.R.: D-dimer as a risk factor for deep vein thrombosis: the Leiden Thrombophilia Study. *Thromb Haemost.* 2002 Jan; 87: 47-51.
- (198) Huber K.: Plasminogen activator inhibitor type-1 (part one): basic mechanisms, regulation, and role for thromboembolic disease. *J Thromb Thrombolysis.* 2001; 11: 183-93.
- (199) Segui R., Estelles A., Mira Y., Espana F., Villa P., Falco C., Vaya A., Grancha S., Ferrando F., Aznar J.: PAI-1 promoter 4G/5G genotype as an additional risk factor for venous thrombosis in subjects with genetic thrombophilic defects. *Br J Haematol.* 2000; 111: 122-8.

- (200) Francis C.W.: Plasminogen activator inhibitor-1 levels and polymorphisms. *Arch Pathol Lab Med.*2002; 126: 1401-4.
- (201) Akar N., Yilmaz E., Akar E., Avcu F., Yalcin A., Cin S.: Effect of plasminogen activator inhibitor-1 4G/5G polymorphism in Turkish deep vein thrombotic patients with and without FV1691 G-A. *Thromb Res.*2000; 97: 227-30.
- (202) Booth N.A.: Fibrinolysis and thrombosis. *Baillieres Best Pract Res Clin Haematol.*1999; 12: 423-33.
- (203) Keijzer M.B., den Heijer M., Blom H.J., Bos G.M., Willems H.P., Gerrits W.B., Rosendaal F.R.: Interaction between hyperhomocysteinemia, mutated methylenetetrahydrofolatereductase (MTHFR) and inherited thrombophilic factors in recurrent venous thrombosis. *Thromb Haemost.*2002; 88: 723-8.
- (204) Alhenc-Gelas M., Arnaud E., Nicaud V., Aubry M.L., Fiessinger J.N., Aiach M., Emmerich J.: Venous thromboembolic disease and the prothrombin, methylene tetrahydrofolate reductase and factor V genes. *Thromb Haemost.*1999; 81: 506-10.
- (205) Folsom A.R., Cushman M., Tsai M.Y., Heckbert S.R., Aleksic N.: Prospective study of the G20210A polymorphism in the prothrombin gene, plasma prothrombin concentration, and incidence of venous thromboembolism. *Am J Hematol.*2002; 71: 285-90.
- (206) Mansilha A., Araujo F., Sampaio S., Cunha Ribeiro L.M., Braga A.: The POR-tromb Project: prothrombin G20210A mutation and venous thromboembolism in young people. *Cardiovasc Surg.*2002; 10: 45-8.
- (207) Leroyer C., Mercier B., Oger E., Chenu E., Abgrall J.F., Ferec C., Mottier D.: Prevalence of 20210 A allele of the prothrombin gene in venous thromboembolism patients. *Thromb Haemost.*1998; 80: 49-51.

DANKSAGUNG

Diese Arbeit wurde in der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. R. Hansen und später in der von Herrn Dr. M. Praus in dem Institut für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie, Charité - Universitätsmedizin Berlin, Campus Virchow-Klinikum (Prof. Dr. E. Köttgen) angefertigt.

Sehr herzlich möchte ich mich bei Herrn Dr. Hansen und besonders bei Herrn Dr. Praus für ihre umfassende und geduldige Betreuung bedanken.

Bei Herrn Prof. Dr. E. Köttgen bedanke ich mich für die Überlassung des Themas.

Herrn G. Kettelgerdes danke ich herzlich für seine großartige Hilfe bei der Konzeption und Umsetzung zahlreicher Versuchsanordnungen, sowie für die vielen Diskussionen und die nette Arbeitsatmosphäre.

Den Mitarbeitern der Gerinnungsanalyse des Zentrallaboratorium der Charité danke ich für ihre Hilfe bei der Bestimmung der Parameter Thromboplastinzeit, aktivierte partielle Thromboplastinzeit, Fibrinogen, Antithrombin III, Faktor XII und ProC Global sowie Protein C und S.

Den Mitarbeitern des Labors von Dr. G. Hintz danke ich für ihre Hilfe bei der Bestimmung der Parameter Akzelerin-Inaktivierung, APC-Resistenz und der Faktor V-Leiden Genotypisierung.

An dieser Stelle möchte ich mich bei meinen Eltern und Brüdern bedanken, die mir mein Studium ermöglichten und mich die ganze Zeit großartig unterstützten.

Bei Frau M-J Jussli möchte ich mich für ihre Begleitung und hartnäckigen Korrekturen am Manuskript bedanken.

für Anni

LEBENS LAUF

Tobias Willich, geboren am 01. Juni 1971 in Hamburg.

- Aug. '78 – Juli '91 Besuch der Freien Waldorfschule Nienstedten, Hamburg
Juni '91 Erlangen der Allgemeine Hochschulreife, Hamburg.
Sept. '91 – Nov. '92 Zivildienst in einer Schule für geistig behinderte Kinder, Hamburg.
Jan. '93 – März '93 Krankenpflegepraktikum, Innere Medizin (Onkologie), Hamburg.

STUDIUM

- April '93 – Mai '00 Medizinstudium an der Universität Hamburg, Freie Universität Berlin und Humboldt-Universität zu Berlin, sowie Universitätsspital Bern (Inselspital), Schweiz
Okt. '96 – März '99 Tutor im studentischen Praktikum, Klinische Chemie, Virchow-Klinikum, Berlin.
Nov. '97 - Jan. '99 Mitarbeit an dem Forschungsprojekt „Regulation des humanen Angiotensin II Typ 2 Rezeptor-Gen Promoters“ der Medizinischen Klinik (Kardiologie), Charité, Campus Virchow-Klinikum und des Deutschen Herzzentrums in der Arbeitsgruppe Dr. C. Warnecke/Prof. Dr. V. Regitz-Zagrosek.

FAMULATUREN

- Aug. '95 – Aug. '98 Innere Medizin (Onkologie, Gastroenterologie, Kardiologie), Radiologie (Sonographie), Allgemeinmedizin (Praxis).

PRAKTISCHES JAHR

- April '99 – März '00 Anästhesie und operative Intensivmedizin, Virchow-Klinikum, Berlin; Innere Medizin (Nephrologie und Notaufnahme), Virchow-Klinikum, Berlin; Chirurgie (Herz- und Gefäßchirurgie), Inselspital, Bern.

Mai '00 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung.

TÄTIGKEIT

Jan. '01 - Juli '02 Arzt im Praktikum, Kardiologie, Charité Berlin, Campus Benjamin Franklin.

seit Juli 2002 Assistenzarzt, Kardiologie, Charité Berlin, Campus Benjamin Franklin.

Wissenschaftliche Mitarbeit an experimentellen Forschungsprojekten (Regulation des TNF- α Rezeptor I und II bei Herzinsuffizienz, Einfluss von Clopidogrel auf verschiedene Chemokine und die Thrombozytenfunktion), Betreuung von Studien (CHARM, Valiant), Teilnahme am CHF-Register, statistische Auswertung verschiedener anderer Studien.

PUBLIKATIONSLISTE

Artikel:

C. Warnecke, T. Willich, J. Holzmeister, S. P. Bottari, E. Fleck, V. Regitz-Zagrosek: Efficient transcription of the human angiotensin II receptor subtype 2 gene requires intronic sequence elements. *Biochem J.* 1999; 340: 17-24.

Abstracts:

C. Warnecke, T. Willich, M. C. Cardoso, V. Regitz-Zagrosek: DNA-Elemente in Intron 1 und 2 aktivieren die Transkription des humanen Angiotensin II Typ 2 Rezeptor Gens. *Z. Kardiol.* 1999; 88, Abstract Suppl., 128 (abstract 661).

C. Warnecke, T. Willich, J. Holzmeister, V. Regitz-Zagrosek: Efficient transcription of the human angiotensin II type 2 receptor gene depends on intronic sequence elements. *Eur Heart J.* 1999; 20, Abstract Suppl., 38 (abstract P394).

C. Warnecke, T. Willich, E. Fleck, V. Regitz-Zagrosek: Intronic sequence elements activate human angiotensin II type 2 receptor gene transcription. *First European Meeting on Vascular Biology and Medicine, Nürnberg, Germany.* September 29 – October 1, 1999.

C. Warnecke, T. Willich, V. Regitz-Zagrosek: Intronic sequence elements increase the transcription rate of the human angiotensin II receptor subtype 2 gene. *Circulation.* 1999; Abstract Suppl

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich an Eides Statt, dass diese Dissertation von mir selbst ohne Hilfe Dritter verfasst wurde, auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt und die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur vollständig angegeben sind.