

Aus dem Zentrum der Inneren Medizin
Klinikum der Johann Wolfgang Goethe Universität,
Frankfurt am Main
Medizinische Klinik III, Schwerpunkt Angiologie
(Direktor: Prof. Dr. med. A. Zeiher)

**Aktivitäten der Gerinnungsfaktoren VIII und IX
bei Normalpersonen und Patienten mit venösen
Thrombosen**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
des Fachbereiches Medizin
der Johann Wolfgang Goethe - Universität
Frankfurt am Main

vorgelegt von
Jörn Schmitt
aus Frankfurt am Main

Frankfurt am Main, 2006

Dekan:	Herr Prof. Dr. J. Pfeilschifter
Referentin:	Frau PD Dr. E. Lindhoff-Last
Koreferent:	Herr Prof. Dr. F. Nürnberger
Datum der mündlichen Prüfung:	20.09.2007

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, Udo und Ursula Schmitt, die mich während meines Medizinstudiums und darüber hinaus emotional und auch finanziell unterstützten und es mir somit ermöglichten, dies erfolgreich zu beenden und diese Promotion durchzuführen.

Frau PD Dr. Lindhoff-Last danke ich für die Überlassung des Themas und die ausgezeichnete wissenschaftliche und menschliche Betreuung bei der Durchführung dieser Arbeit, sowie für die regelmäßige und anhaltende Motivation.

Ganz besonders möchte ich mich bei Herrn Dr. Marek Humpich für die enge freundschaftliche Zusammenarbeit während unserer Promotionen und darüber hinaus bedanken.

Der gesamten Arbeitsgruppe des Bereiches Angiologie gilt mein Dank für die unkomplizierte und angenehme Zusammenarbeit während der gesamten Zeit, die mit viel Freude verbunden war.

Meiner Frau, Sonja Schmitt, möchte ich für die Geduld danken, mit der sie mich von Anfang an bei der Durchführung der Arbeit begleitet hat.

Abkürzungen:

t-PA	Tissue plasminogen activator
anti Xa	Anti Xa Einheiten
APC	Aktiviertes Protein C
APLA	Antiphospholipid Antikörper
APS	Antiphospholipid Syndrom
aPTT	Aktivierte partielle Thromboplastinzeit
AT	Antithrombin
atyp. T	atypisch lokalisierte Thrombose
AVT	Armvenenthrombose
BMI	Body mass index
CAPS	catastrophic antiphospholipid Syndrom
CT	Computertomographie
dRVVT	Diluted Russel's viper venom time
ELISA	Enzyme linked immuno sorbent assay
F IX (a)	Faktor IX (aktiviert)
F V (a)	Faktor V (aktiviert)
F VII (a)	Faktor VII (aktiviert)
F VIII (a)	Faktor VIII (aktiviert)
F X (a)	Faktor X (aktiviert)
F XI (a)	Faktor XI (aktiviert)
F XII (a)	Faktor XII (aktiviert)
F XIII (a)	Faktor XIII (aktiviert)
HCV	Hepatitis C virus
HIV	Human immunodeficiency virus
HLA	Human leucocyte antigen
HMWK	High molecular weight Kininogen
IE	Internationale Einheiten
IU	International Units
KI	Konfidenzintervall
LA	Lupusantikoagulanz
LE	Lungenembolie
LETS	Leiden Thrombophilia Study
LR	Lupusratio
n	Anzahl
NHS	National Health System
NP	Normalplasma
OR	Odds Ratio
PAI	Plasminogen activator inhibitor
PAT	Patient
PC	Protein C
PK	Präkallikrein
PS	Protein S
RIA	Radio Immunoassay
SD	Standardabweichung

SVT	Sinusvenenthrombose
TAFI	Thrombin aktivierbarer Fibrinolyse Inhibitor
Temp.	Temperatur
TF	Tissue factor
TFPI	Tissue factor pathway inhibitor
TPZ	Thromboplastinzeit
TVT	Tiefe Beinvenenthrombose
UFH	Unfraktioniertes Heparin
u-PA	Urokinase plasminogen activator
UVT	Unterschenkelvenenthrombose
VK	Variationskoeffizient
vWF	von Willebrand Faktor

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	9
1.1	Hämostase.....	9
1.1.1	Primäre Hämostase.....	9
1.1.2	Sekundäre Hämostase.....	11
1.1.3	Physiologische Gerinnungsinhibitoren.....	13
1.1.4	Fibrinolyse.....	14
1.2	Die Virchow Trias	15
1.3	Thrombophilie	16
1.3.1	Hereditäre Thrombophilien	16
1.3.1.1	Die APC Resistenz.....	16
1.3.1.2	Prothrombinmutation	17
1.3.1.3	Gerinnungsinhibitorenmängel	18
1.3.2	Erworbene Thrombophilien.....	20
1.3.2.1	Antiphospholipidantikörper	20
1.3.3	Thrombophilien bisher ungeklärter Ätiologie.....	22
1.3.3.1	Erhöhte Faktor VIII Werte.....	22
1.3.3.2	Erhöhte Faktor IX Werte	24
1.3.4	Gerinnungsdiagnostik.....	26
1.4	Fragestellung	27
2	Material und Methoden	28
2.1	Reagenzien, Materialien und Geräte	28
2.1.1	Blutentnahme.....	28
2.1.2	Zentrifugation	28
2.1.3	Lagerung.....	28
2.1.4	Vormessungen und Messungen.....	28
2.2	Ethikkommission.....	31
2.3	Kontrollkollektiv	31
2.3.1	Zusammensetzung des Kollektives	31
2.3.2	Entnahme und Verarbeitung der Proben	32
2.4	Patientenkollektiv	33
2.4.1	Zusammensetzung des Kollektives	33
2.4.2	Entnahme und Verarbeitung der Proben	34
2.5	Optimierung der Präanalytik und Kalibrationen	35
2.5.1	Präanalytik zur Messung der F VIII – Aktivität.....	35
2.5.2	Vormessungen mit Heparinen:.....	36
2.5.3	Kalibrationen / Kontrollen.....	36
2.6	Testdefinitionen.....	37
2.6.1	Tests für die Messung der Faktoren (Faktor VIII, Faktor IX).....	37
2.6.2	TPZ – Test	37
2.6.3	APTT – Test	37
2.6.4	MixCon-LA	38
2.6.5	Dilute Russell’s Viper Venom Time (dRVVT).....	38
2.6.6	PTT-Tauschtest.....	39
2.7	Messungen.....	40
2.7.1	Auftauen der Plasmen.....	40
2.7.2	Messungen der Plasmen des Normalkollektives und der Patienten	40
2.8	Ergebniserfassung und Statistische Methoden	41
2.8.1	Ergebniserfassung.....	41
2.8.2	Statistische Auswertung	41

	2.8.3	Perzentilen und Normwert Definitionen	41
	2.8.4	Angewandte statistische Tests	42
3		Ergebnisse.....	43
3.1		Präanalytik der Faktor VIII – Aktivitätsmessungen	43
	3.1.1	Intra - Assay Vergleich bezogen auf die Faktor VIII – Aktivität bei Verwendung von verschiedenen Verdünnungen.....	43
	3.1.2	Inter – Assay Vergleich bezogen auf die Faktor - VIII – Aktivität bei Verwendung verschiedener Vorverdünnungen	45
	3.1.3	Beeinflussung der Faktor VIII – Messung durch in vitro Zusatz verschiedener Heparine	46
3.2		Demographische und anamnestische Daten der eingeschlossenen Probanden und Patienten	48
	3.2.1	Eingeschlossene Kontrollpersonen und Patienten.....	48
	3.2.2	Demographische Daten der Kollektive	49
	3.2.3	Anamnestische und klinische Daten der Kollektive.....	51
3.3		Normalkollektiv.....	53
	3.3.1	Einfluss oraler Kontrazeptiva auf die Aktivität der Faktoren VIII und IX	53
	3.3.2	Einfluss des Geschlechtes auf die Aktivität der Faktoren VIII und IX	56
	3.3.3	Einfluss des Alters auf die Aktivität der Faktoren VIII und IX	59
	3.3.4	Einfluss des BMI auf die Aktivität der Faktoren VIII und IX	61
	3.3.5	Einfluss des Rauchens auf die Aktivität des Gerinnungsfaktor VIII und des Gerinnungsfaktor IX	62
	3.3.6	Lineare Regressionsanalysen für die Aktivität der Faktoren VIII und IX innerhalb des Normalkollektives.....	63
3.4		Vergleich der Gerinnungsfaktoraktivitäten zwischen Probanden und Patienten	65
	3.4.1	Vergleich der Faktor VIII Aktivitäten zwischen Normal- und Patientenkollektiv	65
	3.4.2	Vergleich der Faktor IX Aktivitäten zwischen Normal- und Patientenkollektiv	66
	3.4.3	Berechnung einer unkorrigierten Odds Ratio und des 95% Konfidenzintervalles für das Risiko einer venösen Thrombose bei erhöhten Aktivitäten des Faktor IX	67
	3.4.4	Berechnung einer korrigierten Odds Ratio und des 95% Konfidenzintervalles für das Risiko einer venösen Thrombose bei erhöhten Aktivitäten des Faktor IX	68
4		Diskussion	69
4.1		Präanalytik.....	69
4.2		Evaluation der Inter- und Intraassay Testungen.....	69
	4.2.1	Messung von mit Heparinen versetzten Plasmen	70
4.3		Demographische und anamnestische Daten	72
	4.3.1	Demographische Daten der Kollektive	72
	4.3.2	Anamnestische und klinische Daten der Kollektive.....	73
4.4		Auswertung der Einzelfaktormessungen.....	74
	4.4.1	Das Normalkollektiv	74
	4.4.1.1	Faktor VIII Aktivitäten	74
	4.4.1.2	Faktor IX Aktivitäten	77
	4.4.2	Vergleich des Normalkollektivs mit dem Patientenkollektiv.....	79
5		Zusammenfassung	81
5.1		Zusammenfassung in Englischer Sprache	83
6		Literaturverzeichnis	85

7	Anhang	91
7.1	Aufklärungsbogen für Probanden.....	91
7.2	Fragebogen für Probanden	92
7.3	Studienprotokoll	93
7.4	Ethikantrag	95
7.5	Ethikvotum	102
7.6	Lebenslauf	104
7.8	Ehrenwörtliche Erklärung.....	105

1 Einleitung

1.1 Hämostase

Dem Gerinnungssystem kommen zwei an sich gegensätzliche Aufgaben zu. Zum Einen findet eine ständige Gerinnungshemmung statt, diese Antikoagulation ist physiologischerweise notwendig, um den Blutfluss aufrecht zu erhalten. Zum Anderen muss es bei Gefäßverletzungen möglichst schnell und effektiv, jedoch auf den Ort der Läsion begrenzt, zu einer Blutstillung durch Bildung eines Gerinnsels kommen. Unter physiologischen Umständen sind diese beiden Funktionen im Gleichgewicht. Kommt es durch eine Störung dieses hämostaseologischen Gleichgewichtes zum Überwiegen einer Seite, so resultiert entweder eine starke Blutungsneigung oder es kommt zur Bildung intravasaler Thromben und zum Entstehen von Embolien(1).

In diesem System der Hämostase spielen neben dem Gefäßendothel die Blutplättchen, die Gerinnungsfaktoren, die Gerinnungsinhibitoren sowie das fibrinolytische System eine wesentliche Rolle.

1.1.1 Primäre Hämostase

Die Hämostase lässt sich unter physiologischen Umständen in eine primäre und sekundäre Phase unterteilen. Sobald das Endothel eines Gefäßes geschädigt wird und das darin fließende Blut mit den darunter liegenden subendothelialen Strukturen in Kontakt kommt, beginnt die primäre Phase. Nach der Verletzung des Gefäßes kommt es durch nervöse und humorale Wege ausgelöst zu einer Konstriktion des betroffenen Gefäßes, und die aus dem Blut durch Kontakt mit dem Subendothel aktivierten Thrombozyten adhären, aggregieren und bilden so den primären Verschluss der Gefäßläsion (2). Dieser erste Thrombus ist labil und bedarf der Verfestigung durch eine Vernetzung, welche in der folgenden sekundären Phase durch das plasmatische Gerinnungssystem und die Bildung von Fibrinpolymeren erfolgt. Während die primäre Phase in Sekunden abläuft und vor allem den akuten Blutverlust sowie den Austritt von Blut aus Kapillaren, Arteriolen und Venolen kontrolliert, ist die sekundäre Phase vor allem zum Schutz vor einem Blutungsrezidiv wichtig. Beide sind eng miteinander verzahnt, und beeinflussen sich gegenseitig in ihren Abläufen (3).

Das normale Endothel unterhält einen geregelten Blutfluss durch die Bildung von Blutgerinnungsinhibitoren und Plättchenaggregationshemmern ebenso wie durch die Ausbildung einer Barriere zwischen den hämostatischen Blutbestandteilen und den prokoagulatorischen subendothelialen Strukturen. Die plasmatische Blutgerinnung wird dabei durch die Bildung und Sekretion von Heparansulfat und Thrombomodulin gehemmt, die Fibrinolyse durch Bildung und Sekretion von Tissue Plasminogen Activator (t-PA), Urokinase Plasminogen Activator (u-PA) sowie Plasminogen Aktivator Inhibitoren (PAI) moduliert. Die Aggregation und Adhäsion der Thrombozyten wird durch die Freisetzung von Prostazyklinen gehemmt. Die von der Blutströmung zu trennenden Strukturen sind vor allem das Kollagen, das über den von Willebrand Faktor (vWF) die Thrombozyten aktiviert, sowie Makrophagen, Fibroblasten und glatte Muskelzellen, die durch die Sekretion von Gewebefaktor (= Tissue Factor, TF) die plasmatische Gerinnung starten(4). Die Thrombozyten spielen in der Hämostase eine zentrale Rolle (5).

An gesundem Endothel gibt es keine Anhaftungsmöglichkeiten für Thrombozyten. Kommt es zu einer Verletzung, werden die subendothelialen Matrixproteine (wie z.B. Kollagen, Fibronectin, Laminin) und somit deren Rezeptoren freigesetzt, allen voran der vWF, über welchen die Thrombozyten mittels ihres Glykoprotein Ib Rezeptors adhäreren. Nachdem die Adhäsion der Thrombozyten an der Gefäßwand stattgefunden hat, und diese hierdurch aktiviert wurden, aggregieren sie mit einander. Die Thrombozytenaktivierung führt zur einer Konformationsänderung des Oberflächen - Glykoprotein IIb/IIIa Rezeptors der Thrombozyten, welcher nun in der Lage ist, über die Bindung an Fibrinogen sich mit weiteren Thrombozyten zu verbinden und so ein Aggregat zu formen. Diese zunächst labile Bindung wird im Rahmen der sekundären Hämostase durch Umwandlung des Thrombus – assoziierten Fibrinogens in stabilisierende „Fibrinfäden“ gefestigt.

1.1.2 Sekundäre Hämostase

Die plasmatische Gerinnung wurde traditionell in eine extrinsische (exogene) und eine intrinsische (endogene) Kaskade aufgeteilt, die gemeinsam in die Bildung von aktiviertem Faktor X mündeten und danach eine gemeinsame Endstrecke bis zur Bildung des Fibrins aus Fibrinogen durchliefen. Diese strenge Trennung wird heute nicht mehr in diesem Sinne aufrechterhalten, da gezeigt werden konnte, dass der Faktor VIIa nicht nur zur Aktivierung des Faktor X, sondern auch direkt zur Aktivierung des Faktor IX führt (sogenannte Josso – Schleife) (6) (siehe Abbildung 1, Seite 12). Die Gerinnungsfaktoren werden als inaktive Vorstufen (Proenzym) gebildet und werden durch proteolytische Spaltung in ihren aktiven Zustand (Enzym) überführt. In diesem aktiven Zustand sind sie nun selbst Serinproteasen und können den nächsten, in der Kaskade folgenden Gerinnungsfaktor aktivieren.

Die Aktivierung über den exogenen Weg erfolgt nach einer Gefäßschädigung und dem Kontakt von Faktor VII mit dem dadurch freigesetzten Tissue Factor (TF), welche einen Komplex bilden (TF/FVIIa Komplex). Dieser Komplex ist nun in der Lage, die Gerinnungsfaktoren IX und X zu aktivieren. Faktor IXa selbst ist ebenfalls in der Lage, Faktor X zu aktivieren. Hierbei dient ihm Faktor VIIIa als Kofaktor. Über den Tissue Factor Pathway Inhibitor (TFPI) besteht in Assoziation mit F Xa eine negative Rückkopplung auf den TF/FVII Komplex.

Die endogene Gerinnungsaktivierung wird ausschließlich durch im Gefäßsystem selbst enthaltene Substanzen initiiert (siehe Abbildung 1, Seite 12). Am Anfang steht hier der Gerinnungsfaktor XII, welcher an negativ geladene Oberflächen bindet, hierdurch aktiviert wird und als Faktor XIIa im Komplex mit Präkallikrein (PK) und High Molecular Weight Kininogen (HMWK) den Faktor XI aktiviert. Aktivierter Faktor XI führt zu einer Aktivierung von Faktor IX, wodurch der sogenannte intrinsische Tenase Komplex entsteht, welcher in der Lage ist, den Faktor X zu aktivieren. Bei der Aktivierung des Faktor X steht dem Faktor IX der Faktor VIII als Cofaktor zur Seite, in dem er dessen proteolytische Potenz verstärkt. Eine Aktivierung des Faktor XI ist auch durch an Endothelzellen gebundenes und durch HMWK aktiviertes Präkallikrein unter Umgehung des Faktor XII möglich.

Ist es zu einer Aktivierung des Faktor X zu FXa gekommen, wird durch FXa veranlasst Prothrombin zu Thrombin zu spalten, wobei FXa erst durch die Kofaktoren Faktor V und Faktor VIII seine maximale Umwandlungsgeschwindigkeit erreicht. Diese ist etwa 300.000 mal grösser als die des FXa alleine. Faktor V wird durch Thrombin aktiviert, so dass hier ein positiver Feedback Mechanismus besteht.

Thrombin ist ein wesentliches Enzym der Gerinnungskaskade, das Fibrinogen in Fibrin umwandelt (7). Aus Fibrinogen entstehen nach Spaltung durch Thrombin zunächst Fibrinmonomere, welche sich zu Polymeren zusammenlagern und den Thrombozytenthrombus vernetzen und stabilisieren. Eine weitere Stabilisierung erfolgt durch den ebenfalls vom Thrombin aktivierten FXIIIa. Dieser führt zu einer irreversiblen, kovalenten Verknüpfung der Fibrinpolymere, und bindet zusätzlich α_2 -Antiplasmin, welches das Gerinnsel zusätzlich vor einer Fibrinolyse schützt.

Fremdoberflächenkontakt

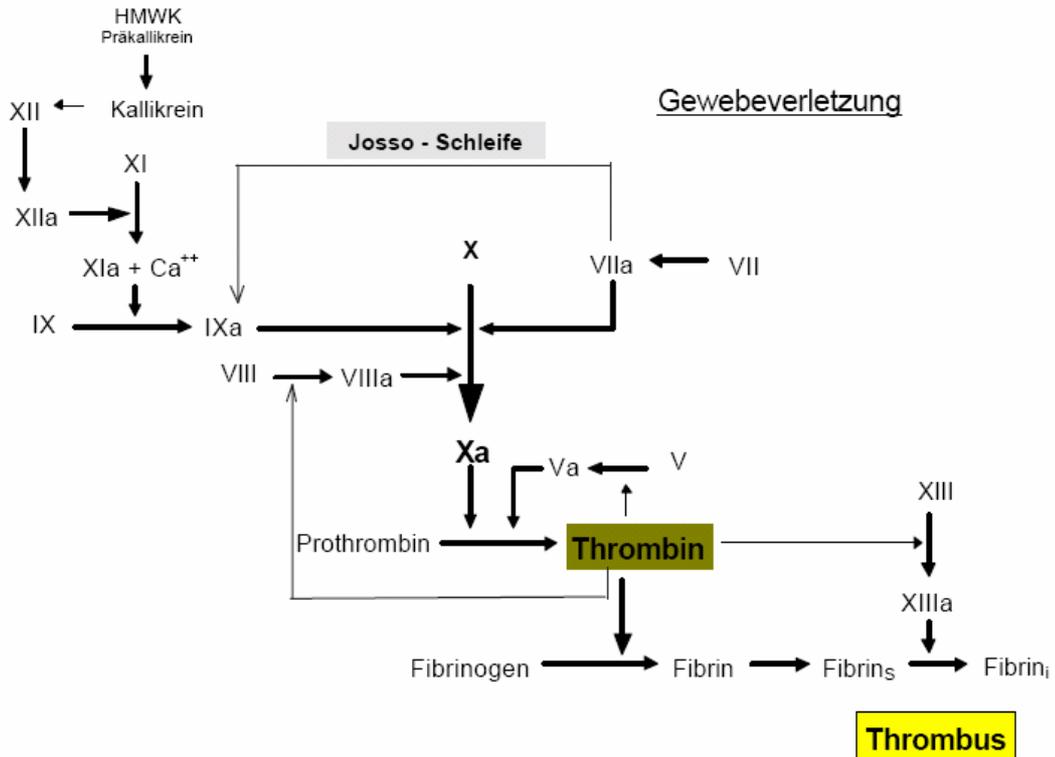


Abb. 1: Die Gerinnungskaskade

1.1.3 Physiologische Gerinnungsinhibitoren

In diesem komplexen System der Hämostase gibt es einige Kontrollmechanismen, die eine überschüssige Gerinnung verhindern sollen. Im Bereich der exogenen Gerinnungsaktivierung ist dies der Tissuefactor Pathway Inhibitor (TFPI), welcher gemeinsam mit dem FXa den Komplex aus TF und FVIIa inhibiert. Der wesentlichste endogene Inhibitor ist das Antithrombin, welches neben Thrombin und Faktor Xa auch andere Gerinnungsfaktoren (FIXa, FXIa, FXIIa sowie Kallikrein) in ihrer Aktivität abschwächt (8).

Neben dem TFPI und dem Antithrombin ist Protein C ein weiterer ebenso wichtiger Gerinnungsinhibitor (9). Protein C ist in seiner Bildung Vitamin K abhängig und ist, wenn durch Thrombin aktiviert, eine Protease, die gezielt die Cofaktoren V und VIII inaktiviert. Als Cofaktor für aktiviertes Protein C (APC) dient das ebenfalls Vitamin K abhängig gebildete Protein S.

Das körpereigene Heparansulfat sowie das Heparin wirken 1000fach beschleunigend auf die Bildung von Thrombin – Antithrombin Komplexen und entfalten hierdurch ihre antikoagulierende Wirkung. Ein weiterer sehr effektiver Ansatz zur medikamentösen Gerinnungshemmung besteht in der Verabreichung von Vitamin K Antagonisten. Vitamin K ist für die funktionstüchtige Synthese der Gerinnungsfaktoren II, VII, IX und X sowie der Gerinnungsinhibitoren Protein C und S in der Leber erforderlich. Eine Blockierung dieses Vitamins führt zur Sezernierung nicht funktionsfähiger Vorstufen der Vitamin K abhängigen Gerinnungsfaktoren und dadurch zu einer Verhinderung der Fibrinbildung (10).

1.1.4 Fibrinolyse

Die Fibrinolyse ist der physiologische Gegenspieler der Hämostase und steht unter physiologischen Bedingungen mit ihr im Gleichgewicht. Das fibrinolytische System ist ähnlich der sekundären Hämostase kaskadenartig aufgebaut, einem Enzym geht jeweils ein zu aktivierendes Proenzym voraus. Im Mittelpunkt der Fibrinolyse steht das Plasmin, dessen inaktives Proenzym das Plasminogen ist. Plasminogen wird vor allem durch den von Endothelzellen sezernierten Tissue Type Plasminogen Aktivator (t-PA) aktiviert. Ein weiterer Aktivator ist der Urokinase Type Plasminogen Aktivator (u-PA), der von nicht endothelialen Zellen gebildet und sezerniert wird. Zu Beginn einer Gerinnselbildung wird von den Thrombozyten und den beteiligten Endothelzellen Plasminogen Aktivator Inhibitor (PAI) ausgeschüttet, der in dieser Phase die Fibrinolyse unterbinden soll, eine ähnliche Aufgabe erfüllt der thrombinaktivierbare Fibrinolyse Inhibitor (TAFI) (11).

1.2 Die Virchow Trias

Bereits 1856 wurde von Rudolf Virchow eine These zur Entstehung von Thrombosen veröffentlicht, die bis heute ihre Gültigkeit behalten hat (12). Er sah damals Zustandsveränderungen in den Bereichen der Blutströmung, der Zusammensetzung des Blutes sowie der Gefäßwand als die Faktoren an, die die Entstehung einer intravasalen Thrombusbildung auslösen. Diese von Virchow damals beschriebenen 3 Faktoren werden als Virchow Trias beschrieben. Nur selten genügt eine Veränderung alleine, um eine Thrombose auszulösen, meistens müssen mehrere Faktoren zusammen kommen, demnach ist die Thromboseentstehung ein multifaktorielles Ereignis (13).

Das Hauptaugenmerk in der Genese insbesondere von venösen Thrombosen gilt derzeit der Hyperkoagulabilität und somit einem gestörten Gleichgewicht zwischen physiologischen Gerinnungsfaktoren und ihren Gegenspielern, den Inhibitoren.

Im Bereich einer Schädigung der Gefäßwand sind besonders Veränderungen am Endothel als Ursache für eine Thrombusentstehung zu sehen. Schäden können zum Einen mechanisch herbeigeführt werden. Hier sind neben Traumata auch chirurgische und internistische Eingriffe zu nennen. Andererseits sind aber auch indirekte Schädigungen des Endothels möglich. Kommt es z.B. im Bereich einer Extremität zu einer Ischämie, so kommt es auch an den Endothelzellen zu einer Hypoxie und durch Stoffwechselprodukte zu einer metabolischen Schädigung. Auch immunologische Vorgänge jeder Art, z.B. bei Entzündungen, können das Endothel schädigen (12).

Veränderungen des Strömungsverhaltens des Blutes im Gefäßsystem sind die zweite Säule der Virchow Trias. Hierzu gehört eine verlangsamte Blutströmung, die zu einer Stase führen kann. Aber auch das Auftreten von Turbulenzen des Strömungsprofils, wie im Bereich von Erweiterungen (Aneurysmata), Engstellen oder auch defekten Venenklappen kann zur Entstehung von Thrombosen führen.

Im Bereich der Veränderungen der Blutzusammensetzung findet man sowohl zelluläre als auch plasmatische Störungen. In diesen Bereich fallen viele der bekannten angeborenen und erworbenen Thrombophilien (siehe Kapitel 1.3), welche zum grössten Teil auf Veränderungen und damit einem Ungleichgewicht im Bereich des plasmatischen Gerinnungssystems beruhen. Auch ein Anstieg der zellulären Blutbestandteile, z.B. ein erhöhter Hämatokrit bei Dehydratation oder Polycythämie, oder eine erhöhte Thrombozytenzahl z.B. bei essentieller Thrombozythämie, kann zur Thromboseentstehung beitragen.

1.3 Thrombophilie

1.3.1 Hereditäre Thrombophilien

Hierunter sind alle angeborenen zu venösen Thrombosen prädisponierenden Umstände zusammengefasst. Das Vorliegen einer solchen Thrombophilie sollte immer dann bei einem Patienten in Betracht gezogen werden, wenn eine Thrombose in „jungem“ Alter (< 60. Lebensjahr) auftritt, sie als spontane Thrombose ohne auslösende Risikosituation entsteht, es sich um rezidivierende Ereignisse handelt, eine atypische Lokalisation vorliegt oder wenn bereits bei Familienangehörigen Thrombosen aufgetreten sind. Meist ist aber auch bei den angeborenen Thrombophilien eine zusätzliche auslösende Situation vorhanden wie beispielsweise eine lange Flugreise oder eine Operation. Das Thromboserisiko kann durch das Auftreten mehrerer angeborener Gerinnungsstörungen potenziert werden, so dass das Risiko für das Auftreten einer spontanen Thrombose dadurch ansteigt. Betrachtet man ein Thrombosekollektiv unter den oben genannten Gesichtspunkten, so lässt sich in ca. 50% der Fälle eine zugrundeliegende Thrombophilie feststellen. Letztendlich handelt es sich aber doch bei den allermeisten venösen Thrombosen um ein multifaktorielles Geschehen (14).

1.3.1.1 Die APC Resistenz

Bei der APC – Resistenz handelt es sich um eine Unempfindlichkeit des Faktor V gegenüber seinem physiologischen Inaktivator, dem Protein C. Erstmals wurde ein solcher Zusammenhang von Dahlbäck et al. (15) beschrieben. Es handelt sich hierbei um eine Punktmutation an Position 506 im Faktor V Gen, die zu einem Aminosäureaustausch von Glutamin an Stelle des Arginins im Faktor V – Protein führt. Dadurch kommt es zu einer Unempfindlichkeit des Faktor Va gegenüber dem Protein C. Diese Mutation wird nach dem Entdeckungsort in Holland Faktor V Leiden Mutation genannt (16). Es sind inzwischen weitere Mutationen beschrieben, die allerdings lediglich 5% der Mutationen in diesem Sinne ausmachen (17). Alle diese Mutationen beziehen sich lediglich auf eine Unempfindlichkeit des Faktor V bzw. Va, der ebenfalls durch Protein C inaktivierbare Faktor VIII bleibt hierdurch unbeeinflusst und wird unverändert durch die Serin – Protease, das Protein C, gespalten.

Die Verteilung der Faktor V Leiden Mutation ist auf Kaukasier begrenzt, in den meisten europäischen Ländern existieren in der Normalbevölkerung Prävalenzen von 3-7 % (18). Betrachtet man ein Kollektiv von Patienten mit venösen Thrombosen, so ist eine Inzidenz der Faktor V Leiden Mutation in 20-40% zu finden (19). Die Vererbung erfolgt autosomal dominant, bei der homozygoten Form wird ein 50 – 100fach erhöhtes relatives Risiko für die Entstehung einer venösen Thrombose beobachtet, bei der heterozygoten Form liegt ein immer noch etwa 7fach erhöhtes relatives Risiko vor.

Die bei APC Resistenz entstehenden venösen Thrombosen sind in 60% der Fälle spontaner Genese, in ca. 40% liegen zusätzliche exogene Faktoren wie z.B. eine Schwangerschaft, die Einnahme oraler Kontrazeptiva, eine Operation oder eine Immobilisation vor.

Die bisherigen Daten konnten lediglich Zusammenhänge zwischen venösen Thrombosen und der APC Resistenz zeigen, im Bereich der arteriellen Strombahn ist die Datenlage noch inkonsistent.

Kommt es zu einem gleichzeitigen Vorliegen von einer APC Resistenz und einer weiteren thrombophilen Diathese z.B. einer Prothrombinmutation, eines Antithrombin-, Protein C - und/oder Protein S - Mangels, so kommt es zu einem besonders hohen Thromboembolierisiko mit einem Auftreten der Thrombose vor allem in jungen Jahren.

1.3.1.2 Prothrombinmutation

Diese wurde 1996 erstmals von Poort et al. (20) beschrieben, es handelt sich hierbei um eine Mutation in der nicht translatierten Region des Prothrombin – Gens. Dieser Bereich ist für die Genexpression verantwortlich, die Mutation ergibt eine verstärkte Expression von Prothrombin im Plasma in einer Höhe von 115% bis 130%. Der Pathomechanismus, der für die erhöhte Thromboseinzidenz verantwortlich ist, ist wahrscheinlich ein erhöhtes endogenes Thrombinpotential, das bei Risikosituationen zum Tragen kommt. Es wird eine Prävalenz der Mutation von 2-3% in der kaukasischen Normalbevölkerung angenommen, in Thrombosekollektiven finden sich Inzidenzen dieser Mutation von 7-16%. Das relative Risiko von Trägern der heterozygoten Mutation ist etwa 3fach erhöht (21).

1.3.1.3 Gerinnungsinhibitorenmängel

Hierzu zählen angeborene Mangelzustände der wichtigen Gerinnungsinhibitoren Antithrombin, Protein C und Protein S. Alle drei Inhibitoren werden in der Leber gebildet, wobei die Produktion von Protein C und Protein S Vitamin K – abhängig erfolgt.

Beim angeborenen Antithrombinmangel, werden zwei Typen unterschieden, die auf zahlreichen verschiedenen Mutationen beruhen. Der Typ I Mangel äußert sich in einer verminderten Konzentration an Antithrombin bei normaler Molekülstruktur (quantitativer Defekt), der Typ II Mangel beruht auf einer abnormen Molekülstruktur mit reduzierter Aktivität (qualitativer Defekt). Es konnten genetische Mutationen des Typ I Defektes sowie 116 Mutationen des Typ II Defektes identifiziert werden (22). Der hereditäre Antithrombinmangel ist selten und kommt in der Normalbevölkerung mit einer Inzidenz von 0,3% vor, in Thrombosekollektiven in 1% bis 4% der Fälle. Der Typ I Defekt ist häufiger als der Typ II Defekt, bei heterozygoten Patienten kommt es meist vor dem 35 Lj. zur Ausbildung einer Thrombose, während homozygote Patienten bereits in der Neonatalperiode an Thromboembolien versterben. Neben den angeborenen Antithrombinmangelzuständen gibt es viele Ursachen für einen erworbenen Antithrombinmangel, so z.B. Synthesestörungen bei Lebererkrankungen, ein erhöhter Verbrauch bei Verbrauchskoagulopathien und im Rahmen einer Sepsis (diese gehen meist auch mit einem Verbrauch bzw. einer verminderten Synthese von prokoagulatorischen Faktoren einher), exsudative Enteropathien sowie beim nephrotischen Syndrom (23;24). Auch eine Therapie mit Heparinen führt über einen erhöhten Umsatz zu erniedrigten Konzentrationen an Antithrombin.

Auch beim angeborenen Protein C Mangel sind etwa 200 Polymorphismen bzw. Mutationen beschrieben (25), Es wird ebenfalls ein Typ I und einen Typ II Mangel unterschieden. Der Protein C – Mangel wurde erstmals von Griffin et al. 1981 (26) beschrieben, die Inzidenz in der Normalbevölkerung liegt bei etwa 0,2% (27). Das grösste Risiko besteht in Zusammenhang mit zusätzlichen prädisponierenden Risikofaktoren, Träger einer heterozygoten Mutation haben ein etwa 6fach erhöhtes Risiko bzgl. der Entstehung einer venösen Thrombose (28). Bei homozygoten Trägern kommt es meist bereits im Neugeborenenalter zu thromboembolischen Komplikationen bis hin zur Purpura fulminans. Abzugrenzen von den hereditären Störungen sind die erworbenen Protein C Mangelzustände, die abgesehen von Verlust- bzw. Verbrauchssituationen auch durch eine Therapie mit oralen Vitamin K Antagonisten herbeigeführt werden können. Eine Gefahr besteht hier in der Initialphase der Behandlung mit oralen Antikoagulantien, in der Protein

C aufgrund seiner kurzen Halbwertszeit schneller abfällt als dies die prokoagulatorischen Gerinnungsfaktoren tun. Durch diesen raschen „Protein C – Sturz“ kann es beim angeborenen Protein C – Mangel zu sog. Marcumarnekrosen der Haut kommen.

Der Protein S Mangel wurde erstmals 1984 im Hinblick auf ein thrombophiles Potential beschrieben (29). Das Protein S ist ein in Abhängigkeit von Vitamin K in der Leber und dem Gefäßendothel gebildeter Kofaktor des Protein C bei der Inaktivierung der Faktoren Va und VIIIa. Es liegt im Plasma zu 60% an Komplement C4b-BP gebunden und zu 40% frei vor. Es gibt 3 verschiedenen Arten eines Protein C Mangels, die sich bzgl. der Neigung zu venösen Thrombosen nicht unterscheiden. Der Typ I Mangel liegt bei einer verminderten Gesamtkonzentration von Protein S (und damit der Aktivität) wegen einer Synthesestörung vor; der Typ II Mangel weist ein dysfunktionelles Protein mit normaler Plasmakonzentration auf; der Typ III Mangel besteht bei lediglich vermindertem freiem Protein S. Der angeborene Protein S Mangel beruht auf einer von 126 beschriebenen Mutationen, wobei eine Homozygotie meist bereits im Neugeborenenalter zu einer Purpura Fulminans führt. Es gibt einige Zustände die einen erworbenen Protein S Mangel bedingen, so z.B. eine Schwangerschaft, die Einnahme von Östrogenen sowie Lebererkrankungen und die Therapie mit Vitamin K Antagonisten. Es werden auch Autoantikörperbildungen gegen Protein S in Zusammenhang mit Infektionen (HIV, Varizellen) sowie bei systemischem Lupus Erythematodes mit und ohne Antiphospholipid Syndrom beschrieben (30). Bezüglich der Inzidenz eines Protein S Mangels in der Normalbevölkerung gibt es keine genauen Zahlen.

1.3.2 Erworbene Thrombophilien

Hierzu zählen alle thrombophilen Zustände, die ein Mensch in seinem Leben erwerben kann, und die im Verlauf häufig persistieren.

1.3.2.1 Antiphospholipidantikörper

Antiphospholipidantikörper sind eine heterogene Gruppe von Antikörpern. Die Antigene sind negativ geladene gerinnungsaktive Phospholipide sowie das Cardiolipin und das β_2 – Glykoprotein I. Der prothrombotische Effekt beruht auf der Komplexbildung der meisten dieser Antikörper mit Prothrombin. Die Namensgebung stammt zum einen von der ersten Beobachtung bei Patienten mit systemischem Lupus Erythematoses (31), und zum anderen von der In - vitro verlängerten plasmatischen Gerinnung (verlängerte aPTT). Diese basiert darauf, dass die für die Gerinnung benötigten Phospholipide im Reagenzglas nur in begrenzter Menge vorhanden sind. Es kommt somit trotz der in vivo bestehenden Hyperkoagulabilität in vitro zu einer messbaren aPTT Verlängerung (32;33). Der Nachweis von Lupusantikoagulanzen wird mittels phospholipidabhängigen Gerinnungstesten (Such- und Bestätigungstest oder MixCon LA Test) und zusätzlichen, immunologischen Nachweisverfahren für die einzelnen Antikörper (RIA und ELISA) durchgeführt (34).

Um das Krankheitsbild eines Antiphospholipidsyndroms zu diagnostizieren, benötigt man mindestens ein klinisches Symptom (venöse und/oder arterielle Thrombosen oder wiederholte Spontanaborte) sowie den Nachweis von Antiphospholipidantikörpern.

Es wird beim Nachweis von Antikörpern sowie klinisch manifesten Thrombosen zwischen einem sogenannten primären und einem sekundären Antiphospholipidsyndrom (APS) unterschieden (35).

Das primäre APS tritt, ohne dass eine weitere Systemerkrankung vorliegt, kann in Einzelfällen familiär gehäuft auftreten (v.a. HLA DR4 und DR7) (36). Das sekundäre APS ist entweder mit einer Autoimmunerkrankung (systemischer Lupus, Sjögren Syndrom oder rheumatoide Arthritis), einer Infektion (HIV, HCV, Lues oder Malaria) oder mit der Einnahme von Medikamenten (Thiazide, Phenothiazine, Hydralazin oder Captopril) assoziiert (37).

In der gesunden Normalbevölkerung wird eine Prävalenz leicht erhöhter APLA – Titer (Antiphospholipid Antikörper) in 2 – 5 % gefunden, bei Patienten, welche an einem

systemischen Lupus erkrankt sind, immerhin in 12 – 34%. Die Inzidenz eines thromboembolischen Ereignisses beträgt bei nachgewiesenen APLA 2 Ereignisse in 100 Patientenjahren.

Als Sonderform des Antiphospholipidsyndromes ist das CAPS (katastrophales APS) zu nennen, bei dem es statt des sonst üblichen Befalls größerer Gefäße zu Mikrothrombosen und als Folge dessen zu einem Multiorganversagen kommt. Eine Ursache für diese fulminanten Verläufe, welche häufig letal enden, konnte bisher nicht gefunden werden (38).

1.3.3 Thrombophilien bisher ungeklärter Ätiologie

1.3.3.1 Erhöhte Faktor VIII Werte

Der Faktor VIII ist ein Glykoprotein, welches in der Leber aber auch in vielen anderen Zellen, z.B. den Endothelzellen und der Milz gebildet wird (39;40). Der Genlocus des Faktor VIII ist auf dem langen Arm des X – Chromosoms gelegen (Region Xq28), es besteht aus 186.000 Basenpaaren, wobei lediglich 5% kodierend sind (41). Innerhalb dieses Gens konnten viele Mutationen unterschiedlicher Art nachgewiesen werden, welche zu defekten FVIII Molekülen und somit zu einer Haemophilie A führen (42). Das Faktor VIII Molekül wird als Heterodimer an das Plasma abgegeben, und zirkuliert hier in einem gemeinsamen Komplex mit dem von Willebrand Faktor (vWF), der es stabilisiert (43).

In der Gerinnungskaskade fungiert der Faktor VIII bzw. seine aktivierte Form, der F VIIIa als Cofaktor für den Faktor IXa bei der Umwandlung von Faktor X in Xa (44). Er kann diese Umwandlung um das 100.000 fache beschleunigen.

Die Regulation der Faktor VIII Aktivität im Plasma ist von vielen Einflüssen abhängig. Der grösste Teil der Faktor VIII Moleküle ist im Blut an den von Willebrand Faktor (vWF) gebunden (45) und zirkuliert so. Die Höhe der Aktivität des Faktor VIII zwischen verschiedenen Individuen variiert bei nicht verwandten Personen deutlich stärker als bei Zwillingen, dies legt eine genetische Beeinflussung nahe, welche in verschiedenen Untersuchungen bewiesen werden konnte (46;47). Auch Abhängigkeiten der Faktor VIII Plasma Spiegel von der Blutgruppe und dem vWF Plasma Spiegel konnten gezeigt werden. Hierbei fiel eine Differenz von 22,4 IU/dl zwischen der Blutgruppe 0 und den anderen Blutgruppen auf, dies gilt ebenso für den vWF mit einer Differenz von 31,5 IU/dl (48;49). Die Höhe des vWF Faktors beeinflusst vor allem die Halbwertszeit des Faktor VIII und dadurch die Plasmalevel (50;51).

Auch „Akut – Phase – Reaktionen“ führen zu erhöhten Faktor VIII Aktivitäten im Plasma, es konnte jedoch gezeigt werden, dass Werte bei Patienten mit Thrombosen unabhängig von akut Phase Reaktion persistierend erhöht bleiben können (52;53).

Auch wird eine Abhängigkeit der Faktor VIII Aktivitäten vom Geschlecht beschrieben, sowie ein Ansteigen mit zunehmendem Alter (54;55). Bisher konnte keine Beeinflussung durch die Einnahme von oralen Kontrazeptiva beschrieben werden (56;57).

Erhöhte Werte des Faktor VIII werden über die Theorie des „gain of function“, also das Erlangen eines höheren Potentials zur Thrombinformation, als thrombophil eingestuft.

Initial wurde 1969 von Jick eine Thrombophilie durch die „Nicht 0“ Blutgruppen beschrieben (58;59) inzwischen ist jedoch deutlich geworden, dass dies lediglich über erhöhte Werte des Faktor VIII zustande kommt (60). Bei Faktor VIII Leveln über 150 IU/l wird ein 6fach erhöhtes relatives venöses Thrombose Risiko gegenüber Probanden mit Leveln unter 100 IU/l angegeben (60-62).

1.3.3.2 Erhöhte Faktor IX Werte

Der Gerinnungsfaktor IX spielt eine essentielle Rolle innerhalb des Gerinnungssystems. Etwa 1 Patient aus 30.000 Männern hat einen Faktor IX Mangel die so genannte Hämophilie B (63;64).

Auf der anderen Seite wird eine erhöhte Präsenz des Faktor IX mit einer Neigung zu venösen Thrombosen in Zusammenhang gebracht. Erstmals wurde bereits 1977 von Aledort das Auftreten von Thrombosen bei der Verwendung von Faktor IX Konzentraten zur Behandlung der Hämophilie B beschrieben (65). In 2 Studien wurde ein Zusammenhang von erhöhten Faktor IX Antigenleveln mit der Entstehung einer venösen Thrombose in Zusammenhang gebracht (66;67). Van Hylckama untersuchte innerhalb des Kollektives der „Leiden Thrombophilia Study“ (19) den Zusammenhang zwischen erhöhten Faktor IX Antigen Leveln und venösen Thrombosen. Es konnte ein 2,5 fach erhöhtes Risiko gefunden werden. Als erhöht wurden in dieser Studie Werte angesehen, die oberhalb der 90% Perzentile des zum Vergleich verwendeten Normalkollektives lagen. Lowe führte eine Subgruppenanalyse an 66 Frauen mit einer venösen Thrombose und 163 Kontroll - Individuen durch. Er konnte eine 2,3 fach erhöhtes Risiko für erhöhte Plasmalevel finden. Als erhöht wurden Werte oberhalb von 150IU/dl gewertet. In einem Review aus dem Jahre 2001 bezüglich des Faktor IX und venösen Thrombosen stellt Lowe fest, dass weitere Studien benötigt werden, um einen sicheren Zusammenhang von erhöhten Faktor IX Werten, weiteren Risikofaktoren und venösen Thrombosen zu sichern (68).

Auch der Genlocus des Faktor IX liegt wie der des Faktor VIII auf dem langen Arm des X – Chromosoms. Bisher konnte jedoch keine Verbindungen zwischen den beiden Genen des Faktor VIII und des Faktor IX beschrieben werden (z.B. eine gemeinsame Promotorregion oder ein Aktivatorgen).

Der Faktor IX ist ein einkettiges Glykoprotein, welches aus 415 Aminosäuren besteht. Er wird Vitamin K abhängig (posttranslationale – γ – Carboxylierung) in der Leber gebildet. Es sind mehrere Polymorphismen sowohl auf Gen- als auch auf Proteinebene beschrieben, welche zu einer Haemophilie B führen (69). Für erhöhte Werte bzw. Aktivitäten wurde bisher kein Polymorphismus nachgewiesen.

Der Faktor IXa ist eine Serinprotease, welche für die Konversion des Faktor X in den aktiven Faktor Xa verantwortlich ist. Gemeinsam mit seinem Kofaktor VIIIa und anionischen Phospholipiden wird er als Xase (Tenase) Komplex bezeichnet. Wie der

exakte Mechanismus der Beeinflussung des aktiven Zentrums des F IXa bei der Umwandlung des F X durch den F VIIIa vonstatten geht, ist nicht bekannt.

1.3.4 Gerinnungsdiagnostik

Die Labordiagnostik beruht entweder auf einem Nachweis des Faktor IX Moleküls im Sinne eines Antigen Nachweises nach der ELISA Methode oder einer so genannten Einstufenmethode. Hierbei wird ein quantitativer Nachweis des Faktor IX geführt, unabhängig davon, ob die Menge des bestimmten Faktor VIII oder Faktor IX Proteins (Antigens) funktionstüchtig ist oder nicht.

In der von uns verwendeten Einstufenmethode wird ein qualitativer Test bezüglich der Gerinnungsaktivität des zu untersuchenden Gerinnungsfaktors durchgeführt. Hierbei wird eine modifizierte Methode der aktivierten partiellen Thromboplastinzeit durchgeführt. Diese bezeichnet die In - vitro - Gerinnungszeit von Plasma aus venösem Citratblut nach Zusatz von Calciumionen und einer Aktivatorsubstanz. Für die Bestimmung eines Einzelfaktors wird ein so genanntes Mangelplasma zugesetzt, welches eine Aktivität von < 1% des zu untersuchenden Faktors enthält, alle anderen Gerinnungsfaktoren jedoch in ausreichender physiologischer Konzentration (70). Dies hat zur Folge, dass die gemessene Gerinnungszeit ausschließlich von der Aktivität des zu untersuchenden Faktors der Probe abhängt.

Die für die Bestimmung der partiellen Thromboplastinzeit ebenso wie für die Einzelfaktorenmessungen eingesetzten partiellen Thromboplastine sind Phospholipidgemische, welche den Plättchenfaktor 3 ersetzen und die Gerinnung von Plasma beschleunigen. Als Aktivatorsubstanz dienen anorganische oder organische Substanzen, die der beschleunigten Gerinnung als Kontaktoberfläche dienen.

Vor der Durchführung der Messungen muss ein Test des jeweils verwendeten Mangelplasmas an mindestens einem nach WHO – Standard definierten Referenzplasma durchgeführt und dessen vorbeschriebene Aktivität bestätigt werden (70).

1.4 Fragestellung

Die bisher veröffentlichten Arbeiten bzgl. des thrombophilen Potentials der Gerinnungsfaktoren VIII und IX zeigen noch offene Fragen auf.

Die Studienlage für den Faktor VIII ist deutlich ergiebiger als die für den Faktor IX.

So beruhen die bisher berechneten und veröffentlichten relativen Risiken für den Faktor IX auf Messungen von Antigenleveln mittels Elisa. Eine Arbeit, die Aktivitätsmessungen mit Antigenbestimmungen korreliert, existiert hier nicht. Des Weiteren sind die Test - Kits zur Aktivitätsbestimmung der Gerinnungsfaktoren ursprünglich zu Identifizierung von Patienten mit Blutungsneigungen/Hämophilien und somit erniedrigten Aktivitäten entwickelt worden, über deren Stabilität und Zuverlässigkeit bei erhöhten Werten existieren ebenfalls keine Daten. Auch der Einfluss von Begleitumständen wie dem Body Mass Index (BMI), dem Alter, Nikotinabusus, dem Geschlecht sowie der Einnahme oraler Kontrazeptiva ist nur unzureichend beschrieben bzw. widersprüchlich.

Es ergaben sich daher die folgenden Fragen, die in der vorliegenden Arbeit beantwortet werden sollten:

Ist eine Beeinflussung der Aktivität der Gerinnungsfaktoren VIII und IX durch das Geschlecht, die Einnahme oraler Kontrazeptiva, das Alter, den BMI oder einen Nikotinabusus nachzuweisen?

Ist eine erhöhte Aktivität der Gerinnungsfaktoren VIII und IX als unabhängiger Risikofaktor für die Entstehung einer venösen Thrombose nachweisbar und wenn ja, mit welchem relativen Risiko?

Dies sollte im Rahmen einer Case – Control – Studie analysiert werden. Es musste somit zunächst ein ausreichend großes Normalkollektiv etabliert werden, um in diesem den Einfluss der oben genannten Einflussgrößen auf die Aktivität der beiden Faktoren zu untersuchen. In einem zweiten Schritt sollte der Vergleich mit einem Patientenkollektiv mit venösen Thrombosen erfolgen.

2 Material und Methoden

2.1 Reagenzien, Materialien und Geräte

2.1.1 Blutentnahme

- Desinfektion: Neo – Kodan™ farblos Spray, der Firma Schülke & Mayr, Nordenstedt; Ch.
B.: 1037059
- Butterfly: Venofix™ 21G (0,8 x 20 mm) mit 30 cm Schlauch, der Firma B. Braun, Melsungen AG, Ch.-B.: 01B18825B1 und 99A14825B2
- Adapter: Multiadapter, der Firma Sarstedt Aktiengesellschaft & Co., Nümbrecht, Ch.-B.: 9220744 und 10990744
- Monovetten: 10 ml S-Monovette™ 9 NC, der Firma Sarstedt Aktiengesellschaft & Co., Nümbrecht, Ch.-B.: 9196507C und 1002991C

2.1.2 Zentrifugation

- Pipetten: Reference™ 500 ml und 1000 ml, der Firma Eppendorf AG, Hamburg
- RG's: Röhren, 5ml (75 mm x 13mm Ø), der Firma Sarstedt Aktiengesellschaft & Co., Nümbrecht; No.: 55.475
- Zentrifuge: Rotina 48 RC™ (Temp.: 20 °C, RPM: 3160, T: 2x 15 min.), der Firma Hettich Zentrifugen, Tuttlingen

2.1.3 Lagerung

- Cups: Mikro – Schraubröhre 2ml aus PP, der Firma Sarstedt Aktiengesellschaft & Co., Nümbrecht; Ref. No.: 72.609
- Truhen: Herafreeze™ (Model Nr. HFC 386 STD – V14) sowie HFU 86 - 450, der Firma Heraeus Instruments GmbH, Langenselbold;

2.1.4 Vormessungen und Messungen

- Wärmeblock: Thermomixer compact™ (Temp.: 37 °C, short mix 1100 U/min) , der Firma eppendorf AG, Hamburg
- Gerinnungsautomat: STA der Firma Roche – Diagnostics GmbH, CH – Basel.
- Heparine: Fraxiparin™ 1,0 (Nadroparin) (9500 anti Xa), der Firma Sanofi – Aventis, Berlin; Ch.-B.: 900573, verwendbar bis: 08/2002;

Innohep™ (Tinzaparin) 0,5 ml (10.000 anti Xa), der Firma Leo Pharma, Neu Isenburg; Ch.-B.: 9265Z81, verwendbar bis: 30.06.01;

Liquemin™ (unfraktioniertes Heparin) 0,5ml (7500 IE), der Firma Hoffmann – La Roche AG, CH - Basel, Ch.-B.: 52701, verwendbar bis: 09/2002;

- Normalplasma: IL – Test Normal c.p™. Instrumentation Laboratory (IL), Kirchheim; Ch.-B.: N0906574 verwendbar bis 03/2003
- Aqua Dest: Aqua ad injectabilia Braun, der Firma Braun, Melsungen, Ch.-B.: 1154A95, verwendbar bis 03/2006
- Mangelplasmen: F VIII: IL Test Factor Deficient Plasma VIII der Firma Instrumentation Laboratory, Kirchheim; Ch.-B.: N0805415, verwendbar bis: 06/2003;
F IX: IL Test Factor Deficient Plasma IX der Firma Instrumentation Laboratory, Kirchheim; CH.-B.: N0706539, verwendbar bis 01/2002;
- Kontrollen und Kalibratoren: STA – Unicalibrator™, der Firma Diagnostica Stago/Roche, F - Asnieres sur Seine; Ch.-B.: 601657 verwendbar bis 01/2001
STA – Preciclot Plus I™, der Firma Diagnostica Stago/Roche, F - Asnieres sur Seine; Ch.-B.: 609374 verwendbar bis 10/2002
STA – Preciclot Plus II™, der Firma Diagnostica Stago/Roche, F - Asnieres sur Seine; Ch.-B.: 609396 verwendbar bis 11/2002
STA – Preciclot Plus III™, der Firma Diagnostica Stago/Roche, F - Asnieres sur Seine; Ch.-B.: 609142 verwendbar bis 01/2002
- STA – Reagenzien: STA APTT LT™, der Firma Diagnostica Stago/Roche, F - Asnieres sur Seine; Ch.-B.: 609361 verwendbar bis 10/2002
STA – Calcium Chloride Solution™, der Firma Diagnostica Stago/Roche, F - Asnieres sur Seine; Ch.-B.: 609223 verwendbar bis 05/2002
STA Diluent Buffer™, der Firma Diagnostica Stago/Roche, F - Asnieres sur Seine; Ch.-B.: 609199 verwendbar bis 04/2002

STA Desorb. Solution, der Firma Diagnostica Stago/Boehringer Mannheim, F - Asnieres sur Seine; Ch.-B.: 694251 verwendbar bis 11/2000

Hepzyme™, der Firma Dade Behring/IBEX Technologies, Marburg; Ch.-B.: 528710 verwendbar bis 13.01.2003

STA Neoplastin Plus™, (Thromboplastin + 10ml Puffer Lösung) der Firma Diagnostica Stago/Roche, F - Asnieres sur Seine; Ch.-B.: 609277 verwendbar bis 06/2002

STA Washing – Solution™, der Firma Diagnostica Stago, F - Asnieres sur Seine; CH.-B.: 609409 verwendbar bis 01/2003

Küvetten: STA Cuvettes™, der Firma Diagnostica Stago, F - Asnieres sur Seine; Ch.-B.: 314900

Pathologische Lupus-Kontrolle: Lupus Inhibitor Plasma, der Firma Immuno AG Vienna, Ch.-B.: 2V01000, verwendbar bis 06/2002

aPTT-SP: IL, Mailand, Italien, Ch.-B.: N0706533, verwendbar bis 02/2002

Haemoliance SynthAFax aPTT: IL, Mailand, Italien, Ch.-B.: N0205355, verwendbar bis 02/2002

Calcium-Chlorid mit Polybrene: Heparin resistant CaCl₂, Gradipore, North Ryde, Australien, Ch.-B.: H9J014Ba, Mailand, Italien, verwendbar bis 10/2001

LAC-Screen: IL, Mailand, Italien, Ch.-B.: H9J023Aa, verwendbar bis 10/2001

LAC-Confirm: IL, Mailand, Italien, Ch.-B.: H9L005Aa, verwendbar bis 12/2001

Lupus-sensitive aPTT: PTT-LT, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany, Ch.-B.: 609361 verwendbar bis 10/2002

Faktor V-Mangelplasma: Coatest APC-Resistance V Kit, Haemochrom Diagnostica, Essen, Germany

2.2 Ethikkommission

Das Studienprotokoll der Studie wurde bei der bei der Ethikkommission der Johann Wolfgang Goethe Universität am 29.06.1999 eingereicht. Am 15.09.1999 erfolgte die zustimmende Bewertung (Geschäfts - Nr.: 133/99), nach dem eine Änderung der Patienteninformation vorgelegt worden war.

(Siehe Anhang Abschnitt 7.4 und 7.5, Seiten 97 - 105)

2.3 Kontrollkollektiv

2.3.1 Zusammensetzung des Kollektives

Das Kontrollkollektiv setzte sich aus 500 freiwilligen Blutspendern zusammen, die im Zeitraum vom 10.09.1999 bis zum 30.06.2000 beim Blutspendedienst Hessen des Deutschen Roten Kreuzes Blut spendeten.

Die Blutspender wurden nach eingehender Aufklärung und schriftlicher Zustimmung konsekutiv eingeschlossen, die Aufklärung bestand aus einem Aufklärungsbogen (siehe Abschnitt 7.1, S. 93) und einem Gespräch. Eingeschlossen wurden nur Probanden, die auch zur Blutspende an diesem Tag zugelassen wurden und die folgende Einschlusskriterien erfüllten: Alter zwischen 18 und 70 Jahren, in der Vorgeschichte keine venöse Thrombose, keine Lungenembolie, keinen Myokardinfarkt, keinen Schlaganfall, keine Lebererkrankung, keine Thrombophlebitis, keine Therapie mit Antikoagulantien und kein Tumorleiden sowie keine aktive (in den letzten 4 Wochen) oder chronische Infektion. Gleichzeitig wurden mit Hilfe eines Fragebogens (siehe Abschnitt 7.2, S. 94) weitere demographische und medizinische Daten erhoben.

Zusätzlich zu den in der Studie durchgeführten Testen wurde die Testung auf Lupusantikoagulantien durchgeführt (siehe Kapitel 2.6.4 – 2.6.6 Seiten 33,34). Bei einer Blutspenderin ergab sich ein positiver Nachweis von Lupusantikoagulantien. Diese Patientin wurde von den weiteren Untersuchungen ausgeschlossen, da Lupusantikoagulantien zu einer falsch zu niedrigen Messung der Aktivität endogener Gerinnungsfaktoren führen können.

2.3.2 Entnahme und Verarbeitung der Proben

Nach Durchlaufen der Formalitäten des Blutspendedienstes, sowie nach Aufklärung, Bearbeitung des Fragebogens und Einwilligung in die Teilnahme an der Studie erfolgte frühestens 20 min. nach Eintreffen beim Blutspendedienst die Blutentnahme. Die Entnahme wurde vor der eigentlichen Blutspende durchgeführt. Hierfür wurde nach Desinfektion mit einer Butterfly-Nadel aus einer Brachial - Vene Blut in 20 ml Citrat - Monovetten (0,11 M Na-Citrat; Verhältnis Citrat : Vollblut 1:10) entnommen. Die entnommenen Proben wurden in das Gerinnungslabor der Medizinischen Klinik I, der Johann Wolfgang Goethe Universität gebracht, dort erfolgte die zweimalige Zentrifugation bei 1500 g für jeweils 20 Minuten. Danach wurde das Plasma in Microcups a 0,5 ml portioniert und bei -70°C eingefroren. Das maximale Zeitfenster zwischen Blutentnahme und Einfrieren betrug dabei 3 Stunden.

2.4 Patientenkollektiv

2.4.1 Zusammensetzung des Kollektives

Im Zeitraum vom 01.01.2000 bis zum 31.12.2001 wurden konsekutiv Patienten der Angiologischen Ambulanz des Zentrums für Innere Medizin der Johann Wolfgang Goethe Universität Frankfurt a.M., die mindestens eine venöse Thrombose erlitten hatten, eingeschlossen. Patienten wurden von der Studie ausgeschlossen, wenn sie eine der folgenden Bedingungen erfüllten: Alter < 18 Jahren und >70 Jahren, maligne, Leber- oder chronisch-entzündliche Erkrankungen, Schwangerschaft oder Puerperium sowie das Vorliegen von Antiphospholipid - Antikörpern. Es konnten insgesamt 374 konsekutive Patienten in der Studie erfasst werden. Die Thromboselokalisation wurde ebenfalls dokumentiert und schloss tiefe venöse Thrombosen der unteren Extremität (TVT), Armvenenthrombosen (AVT), Sinusvenenthrombosen (SVT), atypisch lokalisierte Thrombosen (atyp. T) sowie Lungenembolien (LE) ein. Die Diagnose der genannten thromboembolischen Erkrankungen erfolgte entweder mit Hilfe der farbcodierten Duplexsonographie, der Phlebographie, der Lungenperforations- Ventilationsszintigraphie oder einer Spiral – CT der Lunge. Bei Aufnahme füllte der aufnehmende Arzt gemeinsam mit dem jeweiligen Patienten einen standardisierten Fragebogen aus, der neben den Ausschlusskriterien auch demographische und medizinische Daten beinhaltete und bzgl. der demographischen Daten mit dem bei den Blutspendern verwendeten Fragebogen übereinstimmte (siehe Abschnitt 7.2 S. 94). Nach einem Screening von 467 Patienten im Verlauf von 2 Jahren konnten letztlich 374 eingeschlossen und den weiteren Tests zugeführt werden.

Die parallel durchgeführte Testung auf Lupusantikoagulantien ergab bei 12 Patienten einen positiven Wert. Diese Patienten mussten nachträglich ausgeschlossen werden, da Lupusantikoagulantien zu falsch zu niedrigen Messungen der Faktor VIII und Faktor IX Aktivitäten führen. Alle weiteren Untersuchungen wurden mit 362 Patienten durchgeführt.

2.4.2 Entnahme und Verarbeitung der Proben

Die Blutentnahme bei den Patienten erfolgte in der Angiologischen Ambulanz der Johann Wolfgang Goethe Universität Frankfurt a.M. entweder bei Erstvorstellung, bei einer Wiedervorstellung, oder im Rahmen der Marcumarsprechstunde. Dies führte zur Bildung von Untergruppen im Patientenkollektiv, da die Proben unter dem Einfluss von Marcumar gewonnen wurden. Für die Auswertung der Faktor IX Aktivitäten wurden 250 Patienten herangezogen, die kein Marcumar erhielten.

Durchgeführt wurde die Entnahme von der anwesenden MTA oder dem Dienstarzt im Entnahmeraum des Gerinnungslabors. Es wurde nach Desinfektion mit einer Butterfly-Nadel aus einer Brachialvene Blut in Citrat-Monovetten (0,11 M Na-Citrat; Verhältnis Citrat : Vollblut 1:10) entnommen. Anschliessend erfolgte die zweimalige Zentrifugation bei 1500 g für jeweils 20 Minuten. Danach wurde das Plasma in bis zu 5 Microcups a 0,5 ml portioniert und bei -70°C eingefroren. Das Vorgehen bei der Probenentnahme und der Verarbeitung war mit dem bei den Blutspendern identisch (Siehe Kapitel 2.3.2; S. 32)

2.5 Optimierung der Präanalytik und Kalibrationen

Zunächst wurden Tests, die für die Messung der Probanden- und Patientenplasmen zum Einsatz kommen sollten, auf ihre Stabilität und Anfälligkeit hin getestet und optimiert.

Da die Messergebnisse der Faktor VIII – Aktivität besonders störanfällig auf präanalytische Variable reagieren, wurden Untersuchungen zur Optimierung der Präanalytik nur für diese Faktorenmessungen durchgeführt.

2.5.1 Präanalytik zur Messung der F VIII – Aktivität

Zur Bestimmung der Gerinnungsfaktoraktivitäten wurde ein „One Stage Clotting Assay“ an einem voll automatisierten Gerinnungsautomaten durchgeführt.

Mit Hilfe eines Kalibrationsplasmas (Unicalibrator, Diagnostica Stago, Paris, Frankreich), das genau definierte Faktorenaktivitäten enthält (in der Regel 80 – 100%), wird eine Kalibration erstellt, bei der mit Hilfe von vier Verdünnungen (1:5, 1:10, 1:20 und 1:40) verschiedene Faktoren - Konzentrationen vom Gerinnungsautomaten vollautomatisch erstellt werden. Für die Herstellung der Verdünnungen wurde Diluent Puffer (Diagnostica Stago, Paris, Frankreich) verwendet. Um erhöhte Faktorenaktivitäten anhand dieser Kalibrationsgeraden ablesen zu können, wird diese extrapoliert. Um auch bei höheren Aktivitäten stabile und zuverlässige Messwerte zu erhalten, sollte getestet werden, ob nicht zuverlässigere Messwerte im Bereich > 100% bei einer fixen Vorverdünnung der Plasmaproben erhalten werden können.

Zu Beginn der Vormessungen wurden daher drei verschiedene Verdünnungsmodi des Faktor - VIII - Testes an dem Gerinnungsautomaten STA programmiert. Als Vorverdünnung des Plasmas wurden die folgenden Verdünnungsansätze gewählt: 1:5, 1:10 und 1:20. Es wurden nun 5 mal hintereinander die Faktor VIII Aktivitäten in Plasmen von 5 Patienten (Aktivitätsbereich 83 – 273%) mit allen 3 Testverfahren bestimmt, um die Intra – Assay Variation zu bestimmen. In einer zweiten Versuchsanordnung wurden die Faktor VIII Aktivitäten (F VIII 1:5 und F VIII 1:10) in 6 Patientenplasmen (Aktivitätsbereich 24 – 284%) 5 mal in Serie an 4 aufeinander folgenden Tagen gemessen. Hiermit wurden Inter – Assay Variationen bestimmt.

Die Messwerte wurden tabellarisch erfasst und Mittelwerte, Standardabweichungen und Variationskoeffizienten für jeden Tag und über die 4 Tage hinweg berechnet.

2.5.2 Vormessungen mit Heparinen:

Diese Versuchsreihe wurde von uns durchgeführt, um herauszufinden, ob bei Patienten, die mit Heparin behandelt wurden, die Messwerte der Faktorenaktivität verfälscht werden könnten, da insbesondere die unfraktionierten Heparine zu einer PTT – Verlängerung führen und auch für die Faktormessungen im „One – Stage – Clotting – Assay“ PTT – Reagenzien verwendet werden.

Lyophilisiertes Normalplasma wurde mit Aqua Dest. gelöst, durchmischt und 30 Minuten inkubiert. Es wurden nun mehrere Lösungen hergestellt, zum Einen wurde zu jeweils 1 ml Normalplasma 50, 100 bzw. 150 anti Xa Einheiten Innohep (Tinzaparin®, Leo Pharma, Neu Isenburg) oder Nadroparin (Fraxiparin®, Sanofi – Aventis, Berlin) gegeben, zum anderen wurden zu je 1 ml Normalplasma 50, 100 bzw. 150 IE unfraktioniertes Heparin (Liquemin®, Roche AG, Basel) gegeben.

Anschließend wurde aus diesen Plasmaproben die Faktor VIII Aktivität mit Plasmaverdünnungen von 1:5, 1:10 und 1:20 gemessen. Im Anschluss daran wurden alle Proben mit 1 ml Hepzime® (Dade Behring, Marburg), einem Heparinantagonisten, versetzt und erneut mit dem entsprechenden Testverfahren gemessen.

Die Messwerte wurden tabellarisch erfasst und Mittelwerte, Standardabweichungen und Variationskoeffizienten berechnet.

2.5.3 Kalibrationen / Kontrollen

An jedem Messtag wurden vor Beginn der Messungen Kalibrationen und Kontrollen durchgeführt. Die Kalibrationen umfassten die Messungen der Einzelfaktoren (Faktor VIII, Faktor IX) genauso wie die Bestimmung der Thromboplastinzeit sowie der aktivierten partiellen Thromboplastinzeit. Alle Verdünnungen wurden in Doppelbestimmung gemessen. Als Kontrollen wurde ein normales Kontrollplasma (STA – Preciplot Plus I™, Diagnostica Stago/Roche, Paris, Frankreich) sowie ein pathologisches Plasma (STA – Preciplot Plus II™, Diagnostica Stago/Roche, Paris, Frankreich) verwendet. Lagen die erhaltenen Werte im Referenzbereich, so wurde die Kalibration akzeptiert.

2.6 Testdefinitionen

2.6.1 Tests für die Messung der Faktoren (Faktor VIII, Faktor IX)

Zur Aktivitätsbestimmung der Gerinnungsfaktoren in den Plasmen der Probanden und Patienten wurde ein „One Stage Clotting Assay“ durchgeführt. Der Gerinnungsautomat STA verdünnte hierzu 50 µl des Plasma 1:5 mit Diluent Puffer, anschliessend wurden 50 µl Mangelplasma des jeweiligen Gerinnungsfaktors sowie 50 µl aPTT Reagenz hinzupipettiert und 240 Sekunden lang bei 37 °C inkubiert. Nach Ablauf der 240 Sekunden wurde die Clotbildung mit 50µl CaCl₂ (0,025M) angestossen und koagulometrisch die Gerinnungszeit (Clotting – Time) bestimmt. Anhand der so gemessenen Zeit wurde die Aktivität des im Plasma enthaltenen Gerinnungsfaktors (Faktor VIII oder Faktor IX) an der vorher festgelegten Kalibrationsgeraden vollautomatisch vom Gerinnungsanalyser bestimmt.

2.6.2 TPZ – Test

Die Bestimmung der Thromboplastinzeit (TPZ) wurde am Gerinnungsautomaten STA durchgeführt. Dabei wurden 50 µl des Plasma 1:1 mit Diluent Puffer Lösung versetzt, 100 µl Thromboplastinreagenz (STA Neoplastin Plus, Diagnostica Stago, Paris, Frankreich) zu dem Ansatz hinzugegeben, gemischt und 240 Sekunden bei 37 °C inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde koagulometrisch die Zeit bis zur Bildung eines Gerinnsels gemessen. Die Gerinnselbildungszeit wird vom Gerinnungsautomaten als Quickwert in % der Norm und als INR – Wert (International Normalized Ratio) umgerechnet und angegeben.

2.6.3 APTT – Test

Die aPTT Bestimmung wurde ebenfalls am Gerinnungsautomaten STA durchgeführt. Zunächst wurden 50 µl des Plasma mit Diluent Puffer Lösung im Verhältnis 1:1 verdünnt. Dann wurden 50µl APTT Reagenz (STA APTT LT, Diagnostica Stago, Paris, Frankreich) zu der Verdünnung hinzugefügt, gemischt und 240 sec bei 37°C inkubiert. Abschließend wurden 50µl CaCl₂ (0,025M) hinzupipettiert. Es folgte die koagulometrische Messung der Gerinnselbildungszeit in der Küvette, die in Sekunden angegeben wird.

2.6.4 MixCon-LA

Das Testverfahren beruht auf dem Testprinzip des aPTT-basierten Lupus Ratio Testes (LR) (71). Für die Testdurchführung wurde der STA Gerinnungs-Automat verwendet und das Verfahren automatisiert. Der erste Schritt bestand darin, dass 50 µl des zu messenden Plasmas in einem 1:1 Verhältnis mit 50 µl Normalplasma gemischt wurden. Daraufhin wurde die aPTT einmal mit dem aPTT-SP-Reagenz, welches eine niedrige Phospholipidkonzentration enthält, und ein zweites Mal mit dem SynthAFax-Reagenz, welches eine hohe Phospholipidkonzentration enthält, gemessen. Bei beiden Messungen wurden anschließend 50 µl einer heparin-antagonisierenden Calciumchlorid-Lösung hinzugefügt, die Polybrene enthält, um falsch positive Testergebnisse bei Proben, die Heparin enthalten, zu vermeiden. In dem gleichen Durchgang wurde zusätzlich die aPTT eines Normalplasmas sowohl mit dem phospholipidarmen wie auch mit dem phospholipidreichen Reagenz gemessen. Für jede zu messende Probe waren also 4 Messungen notwendig, die nach folgender Formel in Beziehung gesetzt wurden und die endgültige Ratio (Lupus Ratio: LR) ergaben:

$$LR = \frac{APTT-SP [sec] \text{ PAT+NP}}{SynthAFax [sec] \text{ PAT+NP}} : \frac{APTT-SP [sec] \text{ NP}}{SynthAFax [sec] \text{ NP}} \quad \text{PAT} = \text{Patient}; \text{NP} = \text{Normalplasma}$$

2.6.5 Dilute Russell's Viper Venom Time (dRVVT)

Das Testprinzip des dRVVT-Tests beruht auf der Aktivierung des Faktor X zu Faktor Xa durch ein Enzym, welches im Schlangengift der „Vipera russelli“ enthalten ist. In Anwesenheit von Lupus-Antikoagulans wird die phospholipid-abhängige Aktivierung von Prothrombin durch den gebildeten Faktor Xa inhibiert. Dadurch kommt es zu einer verlangsamten Thrombinbildung und damit zu einer messbar verlängerten Gerinnungszeit. Der im Rahmen dieser Arbeit verwendete Testkit besteht aus zwei kommerziell erhältlichen Reagenzien, einem phospholipid-armen Suchtest (LAC-Screen) und einem Bestätigungstest (LAC-Confirm), bei dem Phospholipide im Überschuss vorhanden sind. Somit sind pro untersuchter Plasmaprobe zwei Messungen nötig. Das Ergebnis wird in Form eines Quotienten dargestellt, indem das Resultat des LAC-Screen [sec] durch das Resultat des LAC-Confirm [sec] geteilt wird. Dieses Testverfahren wird in der Gerinnungsambulanz des Universitätsklinikums Frankfurt in der Laborroutine vollautomatisch durchgeführt. Es wird dabei der vom Hersteller empfohlene Normwert von 1,3 [Ratio] als Cutoff verwendet. Lediglich bei Patienten unter oraler Antikoagulation

liegt der Normwert mit 1,6 [Ratio] höher, dies ist das Ergebnis einer im Vorfeld dieser Arbeit durchgeführten Normwertbestimmung für oral antikoagulierte Patienten.

2.6.6 PTT-Tauschtest

Der PTT-Tauschtest ist ein einfaches, nicht standardisiertes PTT-basierendes Testsystem, welches im Gerinnungslabor der Universitätsklinik Frankfurt zur Routinediagnostik des Lupus-Antikoagulans eingesetzt und nach Etablierung eines neuen Testverfahrens, des MixCon-LA Testes, durch diesen ersetzt wurden. Als Suchtest diente ein phospholipid-armes und somit als lupussensitiv geltendes aPTT-Reagenz (aPTT-LT). Im Falle einer verlängerten PTT wurde manuell ein Bestätigungstest durchgeführt, bei dem das zu untersuchende Plasma mit Normalplasma in verschiedenen Verhältnissen (1+4, 1+1, 4+1) gemischt und die jeweilige Gerinnungszeit (PTT) gemessen wurde. Bei einem Defizit an Gerinnungsfaktoren wurde bereits in der 4+1-Mischung eine wieder normalisierte Gerinnungszeit erzielt. War jedoch ein höherer Anteil an Normalplasma für die Normalisierung der PTT notwendig, so war das ein starker Hinweis für das Vorhandensein von Lupusantikoagulantien.

2.7 Messungen

2.7.1 Auftauen der Plasmen

Alle Proben wurden direkt vor Messbeginn aufgetaut. Sie lagerten in einer Gefriertruhe bei -70 °C, die Microcups mit dem Plasma wurden daraus entnommen und in einem Wärmeblock bei 37 °C für 10 Minuten erwärmt, und anschließend für weitere 10 Minuten bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Nach Ablauf dieser Auftauphase wurden die Proben zur Analyse in den STA - Gerinnungsautomaten gestellt.

2.7.2 Messungen der Plasmen des Normalkollektives und der Patienten

Aus aufgetauten Plasmen der 500 Blutspender und der 374 Patienten wurden der Faktor VIII, der Faktor IX, die TPZ sowie die PTT bestimmt. Ebenso wurde bei allen Plasmen die Testung auf Lupusantikoagulantien durchgeführt (MixCon LA, dRVVT und PTT – Tauschtest, siehe Kapitel 2.6.4 – 2.6.6, Seiten 39,40). Vor Beginn der Messungen wurde täglich eine neue Kalibration durchgeführt und die Kontrollplasmen gemessen. Nur wenn die Kontrollen im entsprechenden Referenzbereich lagen, wurden die Messungen der Plasmaproben anschliessend durchgeführt.

2.8 Ergebniserfassung und Statistische Methoden

2.8.1 Ergebniserfassung

Die einzelnen Messwerte der Gerinnungsanalysen wurden auf einen an den STA - Automaten angeschlossenen Drucker ausgegeben und anschließend zur weiteren Bearbeitung in eine Tabelle des Tabellenkalkulationsprogramm Microsoft Excel, Version 97 eingegeben, welche bereits die übrigen Daten der Probanden und Patienten enthielt.

2.8.2 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wurde nach Besprechung der Verfahren und Teste mit Herrn Dr. rer. med. Hanns Ackermann, Abteilung für Biomathematik des Klinikums der Johan Wolfgang Goethe Universität Frankfurt am Main, mit Hilfe des Statistikprogrammes SPSS (Version 11.5) sowie des Statistikprogrammes BiAS (7.06; 2002) durchgeführt.

2.8.3 Perzentilen und Normwert Definitionen

Zur Cut Off Definition wurden die 90% und die 10% Perzentile der Messwerte des Normalkollektives verwendet. Werte oberhalb der 90% Perzentile wurden als erhöht, Werte unterhalb der 10% Perzentile wurden als erniedrigt gewertet.

Somit lagen im Normalkollektiv per Definition 10% erhöhte und 10% erniedrigte Werte vor. Darüber hinaus wurde im Normalkollektiv die Abhängigkeit von Geschlecht, Alter, dem Body Mass Index, der Einnahme oraler Kontrazeptiva sowie des Nikotinabususes analysiert, bevor eine Berechnung der Odds Ratios erfolgte.

2.8.4 Angewandte statistische Tests

Im Rahmen der statistischen Auswertung wurden die folgenden Tests verwendet: zur Prüfung auf Normalverteilung der Kolmogorov – Smirnov sowie der Shapiro – Wilk Test, für den Mittelwertvergleich zweier unabhängiger, nicht normalverteilter Stichproben der nicht parametrische Mann – Whitney U Test (= Wilcoxon Ranksum Test). Waren mehr als 2 Untergruppen zu analysieren, wurde der H – Test nach Kruskal und Wallis sowie der Mediantest eingesetzt. Um eine Signifikanzberechnung bei dichotomen Variablen durchzuführen, verwendeten wir den Chi² 4 Felder Test. Es wurde zur Korrektur der Einflüsse auf die Aktivität der Gerinnungsfaktoren eine lineare Regressionsanalyse innerhalb des Normalkollektives durchgeführt.

Für die Berechnung eines relativen Risikos im Rahmen einer Case – Control Studie wurden Odds Ratios mit dem zugehörigen 95% Konfidenzintervall (multiple logistische Regression) kalkuliert.

3 Ergebnisse

3.1 Präanalytik der Faktor VIII – Aktivitätsmessungen

3.1.1 Intra - Assay Vergleich bezogen auf die Faktor VIII – Aktivität bei Verwendung von verschiedenen Verdünnungen

Da die kommerziell erhältlichen Tests entwickelt wurden, um Patienten, die unter einer Blutungsneigung leiden, zu untersuchen, sind sie darauf ausgelegt, niedrige Aktivitäten der Gerinnungsfaktoren zu messen. Da unsere Fragestellung hohe Werte bei Patienten mit Thrombosen untersucht, war es für uns von Interesse, ob ein Abweichen von den gebräuchlichen Verdünnungen zuverlässigere und reproduzierbarere Ergebnisse erbringen würde.

Die Tabelle 3.1 (siehe Seite 45) zeigt die Ergebnisse der Intra – Assay Testung.

Es wurden 3 Verdünnungen (1:5; 1:10 und 1:20) von 5 Plasmaproben mit verschiedener Faktor VIII Aktivität fünfmal nacheinander innerhalb eines Tages gemessen. Die angegebenen Standardabweichungen und Variationskoeffizienten sind Mittelwerte und beziehen sich auf alle Messungen (n=5) einer Verdünnung bei Plasmen (n=5) mit verschiedenen Aktivitäten. Die geringste Standardabweichung und der niedrigste Variationskoeffizient zeigte sich bei einer Verdünnung von 1:5.

		Verdünnung	Verdünnung	Verdünnung
		1:05	1:10	1:20
Plasma 1	Mittelwert [%]	83,4	85	82,8
	Standardabweichung	1,62	2,83	3,87
	Variationskoeffizient	1,95	3,33	4,67
Plasma 2	Mittelwert [%]	104	102,2	98,2
	Standardabweichung	3,22	3,06	4,12
	Variationskoeffizient	3,1	2,99	4,19
Plasma 3	Mittelwert [%]	155,8	165,8	165
	Standardabweichung	11,79	18,08	17,54
	Variationskoeffizient	7,57	10,91	10,63
Plasma 4	Mittelwert [%]	257,6	251,4	248
	Standardabweichung	10,97	11,57	9,25
	Variationskoeffizient	4,26	4,6	3,73
Plasma 5	Mittelwert [%]	245,4	265	273
	Standardabweichung	6,86	10,9	10,14
	Variationskoeffizient	2,79	4,11	3,71
Gesamt	Standardabweichung	6,89	9,29	8,98
	Variationskoeffizient	3,93	5,19	5,39

Tabelle 3.1: Darstellung der Mittelwerte, Standardabweichungen und Variationskoeffizienten der einzelnen Plasmen und Verdünnungen der Inter – Assay - Testung sowie der Gesamtwerte. Es zeigen sich die besten Werte für die Verdünnung 1:5.

3.1.2 Inter – Assay Vergleich bezogen auf die Faktor - VIII – Aktivität bei Verwendung verschiedener Vorverdünnungen

Der Vergleich der beiden Verdünnungen 1:5 und 1:10 bezogen auf die Inter – Assay Varianz ergab die in Tabelle 3.2 gezeigten Ergebnisse. Dargestellt sind die Mittelwerte der an 5 Tagen in je 5 Messungen erhaltenen Aktivitäten der einzelnen Plasmen (n=6).

Die geringste Varianz ergab sich erneut für die Verdünnung 1:5 im Bereich des gesamten betrachteten Aktivitäts-Spektrums der untersuchten Aktivitäten (Range: 23% bis 312 %).

Daher wurde die Vorverdünnung 1:5 von uns als die stabilste angesehen und sowohl für die Messungen des Faktor VIII als auch für die Messungen der Aktivitäten des Faktor IX verwendet, da die Bestimmung auf dem selben Prinzip beruht.

		Verdünnung 1: 5	Verdünnung 1 : 10
Plasma 1	Mittelwert (%)	23,2	23,55
	Standardabweichung	1,03	0,88
	Variationskoeffizient	4,44	3,76
Plasma 2	Mittelwert (%)	82	81,55
	Standardabweichung	2,18	3,45
	Variationskoeffizient	2,67	4,22
Plasma 3	Mittelwert (%)	106,45	107
	Standardabweichung	3,05	3,81
	Variationskoeffizient	2,87	3,57
Plasma 4	Mittelwert (%)	207,05	200,7
	Standardabweichung	4,78	5,72
	Variationskoeffizient	2,33	2,85
Plasma 5	Mittelwert (%)	205,15	216,75
	Standardabweichung	4,27	7,3
	Variationskoeffizient	2,11	3,42
Plasma 6	Mittelwert (%)	312,65	286,15
	Standardabweichung	6,95	8,05
	Variationskoeffizient	2,24	2,84
Mittelwert Gesamt	Standardabweichung	3,71	4,87
	Variationskoeffizient	2,77	3,44

Tabelle 3.2: Inter - Assay Vergleich der Vorverdünnungen 1:5 und 1:10. Es wurden 6 Plasmen (Range: 23% bis 312 %) je 5 mal an 5 aufeinander folgenden Tagen gemessen. Die stabilsten Aktivitäten konnten mit der Verdünnung 1:5 gemessen werden.

3.1.3 Beeinflussung der Faktor VIII – Messung durch in vitro Zusatz verschiedener Heparine

In Tabelle 3.3 sind die Ergebnisse der Messungen der mit Heparinen versetzten Plasmen wiedergegeben und die Abhängigkeit der Faktor VIII Aktivität von der jeweiligen Heparinkonzentration bei 3 verschiedenen Heparinen dargestellt. Man erkennt, dass die gemessene Faktor VIII Aktivität mit zunehmenden Heparinkonzentrationen stark abnimmt, bis sie kaum noch nachweisbar ist. Misst man mit einer höheren Vorverdünnung (1:10 bzw. 1:20 gegenüber 1:5) kann man den Effekt der Heparine abschwächen, jedoch nicht ganz aufheben. Der Effekt ist bei den drei getesteten Heparinen (Tinzaparin, Nadroparin und Liquemin als UFH) in etwa gleichwertig, wobei Tinzaparin und Liquemin initial eine stärkere Reduktion der Aktivität des Faktor VIII bewirken, da sie auf Grund ihres höheren Molekulargewichtes eine stärkere Verlängerung der PTT bewirken als Nadroparin.

Setzt man den mit Heparinen vermischten Proben 1 ml Hepzyme zu, so kommt es bei den beiden niedermolekularen Heparinen (Tinzaparin und Nadroparin) nahezu zum Erreichen des Ausgangswertes. Beim Hinzugeben des Hepzymes zu den mit Liquemin versetzten Proben wird der Ausgangswert bei allen Dosen erreicht. (siehe Tabelle 3.4)

Wir konnten hier zeigen, dass eine stärkere Vorverdünnung den Effekt von Heparin auf die Aktivitätsmessung des Faktor VIII reduzieren kann, diesen jedoch nicht ausreichend an den Ausgangswert heranbringt.

Der Zusatz einer Heparinase, hier Hepzyme, kann den Effekt sowohl eines niedermolekularen als auch eines unfraktionierten Heparins auch in hohen Dosierungen neutralisieren. Die Proben zeigen dann eine lediglich geringe Abweichung von der Ausgangsmessung.

Aufgrund dieser Vormessungen wurden heparin - kontaminierte Proben in unserem Kollektiv mit Hepzyme versetzt und erst dann gemessen.

Probe	Verdünnung 1:5	Verdünnung 1:10	Verdünnung 1:20
	F VIII Aktivität [%]	F VIII Aktivität [%]	F VIII Aktivität [%]
Normal Plasma (Kontrolle)	93	90	89
Tinzaparin 50 anti Xa	46	62	77
Tinzaparin 100 anti Xa	17	41	66
Tinzaparin 150 anti Xa	6	22	49
Nadroparin 50 anti Xa	66	74	83
Nadroparin 100 anti Xa	41	59	75
Nadroparin 150 anti Xa	29	51	65
UFH 50 IE	55	77	83
UFH 100 IE	17	50	69
UFH 150 IE	3	23	57

Tab 3.3: Einfluss verschiedener Heparine in unterschiedlichen Konzentrationen und unterschiedlichen Vorverdünnungen mit Diluent Puffer.

Probe	Verdünnung 1:5 F VIII Aktivität [%]
Normal Plasma (Kontrolle)	93
Hepzyme + Nadroparin 50 anti Xa	86
Hepzyme + Nadroparin 100 anti Xa	85
Hepzyme + Nadroparin 150 anti Xa	81
Hepzyme + Tinzaparin 50 anti Xa	87
Hepzyme + Tinzaparin 100 anti Xa	82
Hepzyme + Tinzaparin 150 anti Xa	87
Hepzyme + UFH 50IE	92
Hepzyme + UFH 100IE	92
Hepzyme + UFH 150IE	94
Hepzyme + Normalplasma	100

Tabelle 3.4: Faktor VIII Aktivitäten einer Plasmprobe nach Zusatz unterschiedlicher Heparinkonzentrationen und der Heparinase Hepzyme.

3.2 Demographische und anamnestische Daten der eingeschlossenen Probanden und Patienten

3.2.1 Eingeschlossene Kontrollpersonen und Patienten

Es wurden initial 467 Patienten mit venösen Thrombosen gescreent, von denen 374 die Einschlusskriterien erfüllten. Bei den Kontrollpersonen erfüllten alle die Einschlusskriterien. Nach Abschluss der Messungen für Lupusantikoagulantien mussten 12 Patienten sowie eine Probandin nachträglich aufgrund des Nachweises von positiven Lupusantikoagulantien von den weiteren Messungen ausgeschlossen werden. Lupusantikoagulantien führen zu einer „falsch“ zu niedrigen Bestimmung der Faktor VIII und Faktor IX Aktivität. Es konnten daher die Messwerte von 362 Patienten und 499 Probanden ausgewertet werden. Zur Subgruppenanalyse der Faktor IX Aktivität wurden 112 Patienten, die wegen ihres thromboembolischen Ereignisses Phenprocoumon einnahmen, nicht berücksichtigt, da der Vitamin K – Antagonist zu einem Absinken des Vitamin K abhängigen Faktor IX führt. Eine Faktor IX Erhöhung konnte daher bei Patienten unter oralen Antikoagulantien nicht analysiert werden.

3.2.2 Demographische Daten der Kollektive

Die demographischen Daten der beiden Kollektive sind in Tabelle 3.5 (siehe Seite 50) einander gegenübergestellt. Es zeigt sich ein hochsignifikanter Unterschied bzgl. des Geschlechtes. Die Altersverteilung und die Verteilung des BMI ist bei den beiden Kollektiven weniger stark ausgeprägt ebenfalls signifikant unterschiedlich. Bezüglich des Nikotinabususes unterscheiden sich beide Kollektive nicht.

	n =	Geschlecht	Alter	BMI	Nikotinabusus
		Frauen (%)	Median (Range)	Median (Range)	n (%)
Probanden	499	157 (59,9)	43 (19 / 70)	25 (16,8 / 42)	107 (21,2)
Patienten	362	217 (31,5)	45 (18 / 70)	25,8 (18,1 / 57,4)	93 (25,7)
Signifikanz (p)		< 0,001	0,028	0,046	0,994

Tabelle 3.5: Die demographischen Daten der Kollektive sowie Signifikanzberechnungen bei Unterschieden der Kollektive bzgl. Geschlecht, Alter, Body Mass Index und Nikotinabusus.

Bei der Testung auf Normalverteilung konnte diese weder für das Alter, noch für den BMI in einem der Kollektive gezeigt werden, die mit dem Kolmogorov – Smirnov Test berechneten p – Werte lagen bei $< 0,001$. Daher erfolgt die Angabe der Daten als Perzentilen (Quartilen) mit dem jeweiligen Median. Die Berechnung der Signifikanzniveaus erfolgte mit dem nicht parametrischen Mann – Whitney U Test. Bei der graphischen Darstellung wurden Boxplots verwendet (siehe Abbildung 3.1, Seite 51).

In einem Boxplot werden graphisch die 25% und die 75% Quantile als untere und obere Begrenzung der Box dargestellt. Der Balken, der sich innerhalb der Box befindet, stellt den Median dar. Zusätzlich werden noch das 10% und 90% Quantil als sog. Whiskers am unteren bzw. oberen Ende der Verlängerungen dargestellt. Ausreißer und Extremwerte können zusätzlich einzeln ober- bzw. unterhalb der Quantilen angezeigt werden.

Ein Boxplot kann somit die Darstellung der Verteilung eines Parameters innerhalb eines Kollektives und vor allem auch die Gegenüberstellung mit einem zweiten, einem Vergleichskollektiv, in einer Graphik ermöglichen.

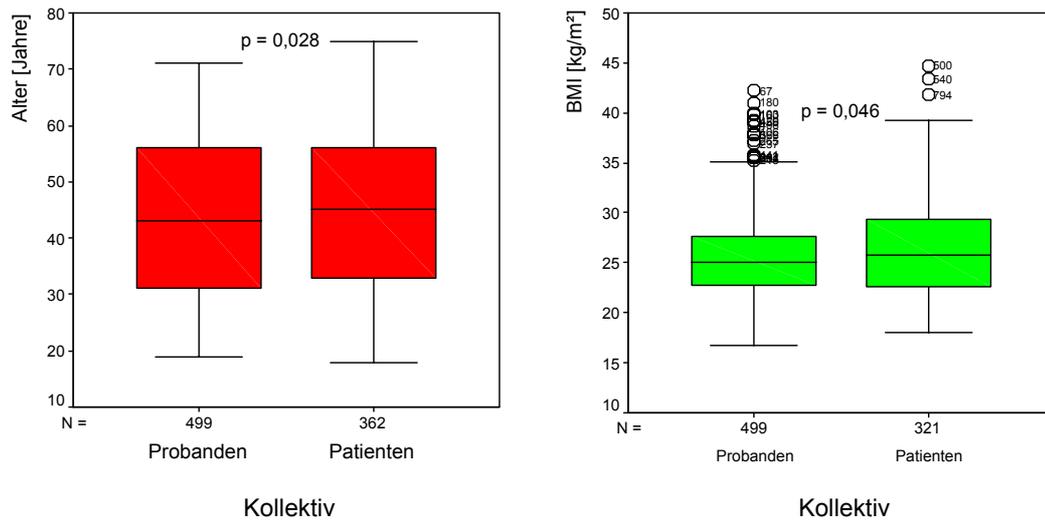


Abbildung 3.1: Boxplots zur Darstellung der Alters- und BMI - Verteilung im Probanden- und Patientenkollektiv. Es zeigen sich jeweils signifikante Unterschiede beim Alter mit einem p – Wert von 0,027 und beim BMI mit einem p – Wert von 0,044.

3.2.3 Anamnestische und klinische Daten der Kollektive

Betrachtet man die Familienanamnese von Angehörigen ersten Grades der Personen in beiden Kollektiven bzgl. thromboembolischer Ereignisse, so weisen die Patienten erwartungsgemäß signifikant häufiger eine positive Familienanamnese auf. Eine positive Familienanamnese ließ sich bei den Normalpersonen bei immerhin 11,4 % erheben, dem gegenüber gaben 30,7 % der Patienten an, Familienangehörige ersten Grades zu haben, die ein solches Ereignis aufwiesen. Der berechnete Unterschied war hochsignifikant ($p < 0,001$).

Betrachtet man isoliert die in der Familienanamnese erwähnten Lungenembolien, so berechnen sich auch hier ein hochsignifikanter Unterschied ($p < 0,001$).

Die Daten werden in Tabelle 3.6 dargestellt.

Familienanamnese		Probanden (n = 499) in % (Anzahl)	Patienten (n = 362) in % (Anzahl)	p – Werte
Thrombosen	Keine	88,6 (443)	58,3 (211)	< 0,001
	Einfach pos.	11,4 (57)	24,9 (90)	
	Mehrfach pos.	0 (0)	5,8 (21)	
Lungenembolien	Keine	98 (489)	80 (288)	< 0,001
	Positiv	2 (11)	9,1 (33)	

Tabelle 3.6: Familienanamnese bzgl. thromboembolischer Ereignisse bei Familienangehörigen ersten Grades. Vergleich des Probanden- mit dem Patientenkollektiv.

Im Patientenkollektiv traten venöse Thrombosen in unterschiedlichen Lokalisationen auf. Dies waren bei 89% der Patienten (n=322) Thrombosen der tiefen Beinvenen (TVT). Bei 23% (n=82) handelte es sich um Rezidivthrombosen, auch atypisch lokalisierte Thrombosen sowie isolierte Lungenembolien wurden miterfasst. Für Details zu Lokalisation und Häufigkeit venöser Thromboembolien siehe Tabelle 3.7 (Seite 53).

Art der Thrombose	Häufigkeit	Prozent
Proximale Beinvenen	197 / 362	55,0
Unterschenkelvenen	47 / 362	13,1
Rezidivthrombosen	82 / 362	22,9
Armvenen	12 / 362	3,4
Sinusvenen	3 / 362	0,8
Isolierte Lungenembolie	6 / 362	1,7
Penisvenen	8 / 362	2,2
Augenvenen	1 / 362	0,3
V. Cava inferior	2 / 362	0,6

Tabelle 3.7: Lokalisationen und Häufigkeiten der Thrombosen innerhalb des Patientenkollektives.

Insgesamt wurden 59 klinisch symptomatische Lungenembolien bei den 362 eingeschlossenen Patienten gezählt, dies entspricht 16,3%.

Innerhalb des Patientenkollektives, ohne diejenigen Patienten welche orale Antikoagulantien einnahmen, konnten 72 (29%) mit einer APC – Resistenz, 7 (2,8%) mit einem Protein C Mangel, 22 (8,4%) mit einem Protein S Mangel, 11 (4,2%) mit einem Antithrombin Mangel sowie 14 (5,6%) mit einer Prothrombinmutation (20210A) identifiziert werden.

3.3 Normalkollektiv

3.3.1 Einfluss oraler Kontrazeptiva auf die Aktivität der Faktoren VIII und IX

Es wurden zwei Untergruppen des Normalkollektives miteinander verglichen, um einen Einfluss oraler Kontrazeptiva auf die Aktivität der Faktoren VIII und IX zu untersuchen.

Es wurden 51 Frauen, die die Pille zum Zeitpunkt der Blutentnahme einnahmen mit 48 altersgematchten Frauen verglichen, die keine oralen Kontrazeptiva eingenommen hatten. Ein Alter zwischen 20 und 40 Jahren musste in beiden Kollektive vorliegen.

Aufgrund des gematchten Alters zwischen 20 und 40 Jahren wurde lediglich eine Untergruppe aller Frauen des Normalkollektives für diese Berechnung herangezogen. Insgesamt waren in unserem Normalkollektiv 102 Frauen ohne die Einnahme oraler Kontrazeptiva sowie 55 Frauen unter Einnahme oraler Kontrazeptiva vorhanden.

Es zeigte sich trotz einer identischen Alters - Range (20 – 40 Jahre) ein signifikanter Unterschied bzgl. des medianen Lebensalters. Die Frauen, die orale Kontrazeptiva einnahmen, waren signifikant jünger als die Frauen ohne Einnahme oraler Kontrazeptiva ($p < 0,001$).

Bezüglich des BMI zeigte sich kein signifikanter Unterschied.

Die Aktivität des Faktor VIII war bei Frauen, die orale Kontrazeptiva einnahmen, höher als bei den Frauen die keine oralen Kontrazeptiva eingenommen hatten. Der Unterschied war jedoch statistisch nicht signifikant, wahrscheinlich bedingt durch die grössere Schwankungsbreite der Faktor VIII – Aktivitäten und die geringe Fallzahl.

Bei den Faktor IX Aktivitäten zeigten sich ebenfalls höhere Werte unter oralen Kontrazeptiva, dieser Unterschied war jedoch hoch signifikant. (siehe Tabelle 3.8 und Abbildung 3.2, Seiten 55 und 56)

Lineare Regressionsanalysen bzgl. des zu untersuchenden Gerinnungsfaktors als abhängige Variable, und BMI, Alter und Pilleneinnahme wurden anschließend durchgeführt. Hier zeigte sich für den Faktor VIII keine signifikante Abhängigkeit von Alter und BMI. Bezogen auf die Faktor - IX konnte eine Abhängigkeit von der Einnahme oraler Kontrazeptiva sowie vom BMI bestätigt werden. Eine signifikante Abhängigkeit der Aktivitäten des Faktor VIII oder IX vom Alter innerhalb der Kollektive konnte ausgeschlossen werden. (siehe Tabelle 3.9, Seite 55)

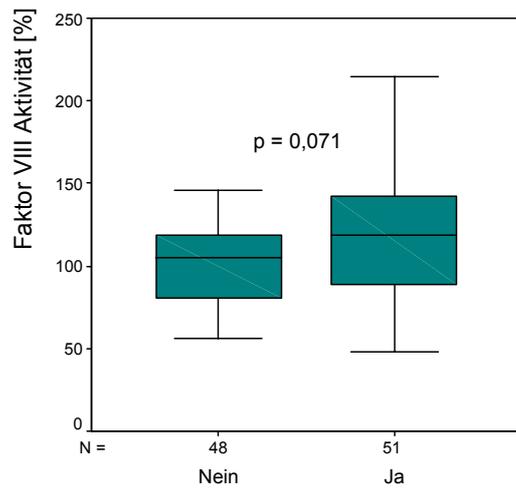
Aufgrund dieser Daten wurden Frauen, die orale Kontrazeptiva eingenommen hatten, von den weiteren Untersuchungen ausgeschlossen.

Einnahme oraler Kontrazeptiva	Alter	BMI	Faktor VIII [%]	Faktor IX [%]
NEIN (n = 48)				
Median	31,5	22,25	105,5	104
Range	21 - 40	16,8 - 35,1	56 - 250	66 - 163
JA (n = 51)				
Median	23	21,8	119	130
Range	20 - 39	18,7 - 39,1	48 - 215	78 - 183
Signifikanz (p)	< 0,001	0,983	0,071	< 0,001

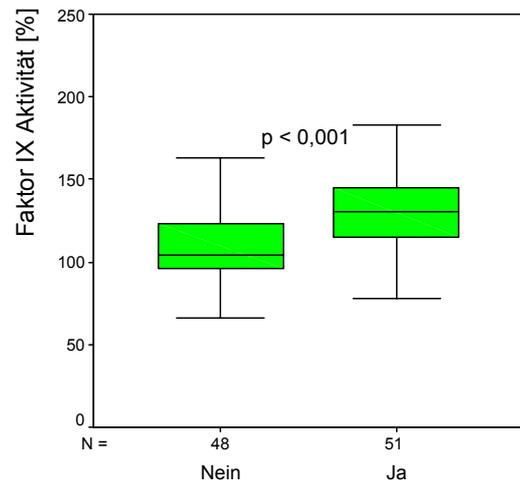
Tabelle 3.8: Vergleich der Frauen im Normalkollektiv mit und ohne Einnahme oraler Kontrazeptiva.

		Nicht standardisierte Koeff.		Standardisierte Koeff.	T	Signifikanz
		B	Standardfehler	Beta		[p]
Faktor VIII	(Konstante)	111,66	26,01		4,29	0,00
	Alter	-0,72	0,72	-0,12	-1,00	0,32
	BMI	0,64	1,04	0,07	0,62	0,54
	orale Kontrazeptiva	9,72	8,28	0,13	1,17	0,24
Faktor IX	(Konstante)	52,41	16,39		3,20	0,00
	Alter	0,17	0,45	0,04	0,38	0,71
	BMI	2,17	0,65	0,31	3,31	0,00
	orale Kontrazeptiva	23,99	5,22	0,45	4,60	0,00

Tabelle 3.9: Lineare Regressionen, Abhängige Variablen sind der jeweilige Faktor. Es zeigte sich für das untersuchte Subkollektiv (Frauen zwischen 20 und 40 Jahren), eine hochsignifikante Abhängigkeit für den Faktor IX von der Pilleneinnahme und dem BMI, für den Faktor VIII zeigen sich keine Abhängigkeiten. Der B – Wert von 23,99 zeigt uns an, dass bei Frauen mit oralen Kontrazeptiva eine um 23,99% höhere Aktivität vorliegt.



Einnahme oraler Kontrazeptiva



Einnahme oraler Kontrazeptiva

Abbildung 3.2.: Vergleich der Frauen im Normalkollektiv mit und ohne Einnahme oraler Kontrazeptiva bzgl. der Aktivität des Faktor VIII und Faktor IX. Graphische Darstellung mit Boxplots, sowie Angabe des Signifikanzniveaus. Der Faktor VIII zeigt unter der Einnahme oraler Kontrazeptiva eine deutlichere Streuung v.a. zu höheren Werten hin, erreicht jedoch keine statistisch signifikant höheren Werte. Der Faktor IX ist bei Frauen unter der Einnahme oraler Kontrazeptiva insgesamt erhöht, dies ist auch statistisch signifikant.

3.3.2 Einfluss des Geschlechtes auf die Aktivität der Faktoren VIII und IX

Im Normalkollektiv wurden unter den Probanden Untergruppen anhand des Geschlechtes gebildet. Es wurden 342 männliche und 102 weibliche Probanden eingeschlossen, wobei Frauen die zum Zeitpunkt der Blutentnahme orale Kontrazeptiva einnahmen (n=55) nicht berücksichtigt wurden (siehe Tabelle 3.10, Seite 58). Der Vergleich der Untergruppen bzgl. des BMI und des Alters zeigte für beide Gerinnungsfaktoraktivitäten einen signifikanten Unterschied (BMI: $p < 0,001$ und Alter: $p = 0,006$). Probanden männlichen Geschlechtes zeigten einen durchschnittlich höheren BMI und waren älter (siehe Tabelle 3.10, Seite 58).

Der Vergleich der Aktivitäten der Gerinnungsfaktoren VIII und IX zwischen den beiden Geschlechtern zeigte trotzdem keinen signifikanten Unterschied (Faktor VIII $p = 0,149$ und Faktor IX $p = 0,613$ (Mann Whitney U Test)) (siehe Tabelle 3.11, Seite 58). Bei der graphischen Auftragung der Daten fällt beim Faktor VIII eine größere Streuung der Messwerte bei Männern als bei Frauen auf (Abbildung 3.3, Seite 59).

Eine Geschlechtsabhängigkeit der Aktivität der Gerinnungsfaktoren VIII oder IX konnte daher nicht nachgewiesen werden.

	Männer	Frauen	Frauen mit oralen Kontrazeptiva	Frauen ohne orale Kontrazeptiva	Gesamt	Signifikanz [p]
Anzahl	342	157	55	102	499	
Alter Median (Min - Max)	46 (20 – 70)	35 (19 – 65)	24 (20 – 49)	41 (19 – 65)	43 (19 – 71)	0,006
BMI Median (Min - Max)	25,6 (18,2 - 42,2)	23,3 (16,8 - 39,1)	22,4 (18,7 - 39,1)	23,7 (16,8 – 38)	25 (16,8 - 42,2)	< 0,001

Tabelle 3.10: Demographische Daten der Probanden differenziert nach Geschlecht und der Einnahme oraler Kontrazeptiva. Berechnung des Signifikanzniveaus zwischen Männern und Frauen ohne orale Kontrazeptiva.

Geschlecht		Faktor VIII [%]	Faktor IX [%]
Weiblich	Anzahl	102	102
	Minimum	54	66
	25 % Perzentile	86	98
	Median	104	114
	75 % Perzentile	125	137
	90 % Perzentile	141	152
	Maximum	250	208
	Männlich	Anzahl	342
Minimum		39	64
25 % Perzentile		86	101
Median		106	119
75 % Perzentile		133	134
90 % Perzentile		164	151
Maximum		277	244
Signifikanz [p]			0,149

Tabelle 3.11: Geschlechtsspezifische Auswertung (nur Frauen ohne orale Kontrazeptiva) der Faktor VIII und Faktor IX Aktivitäten.

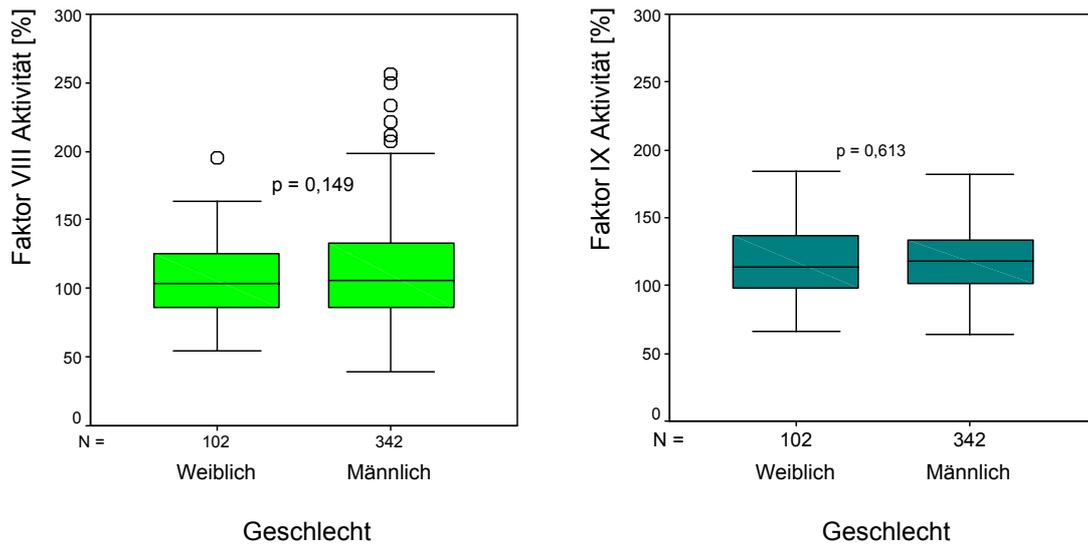


Abbildung 3.3: Geschlechtsspezifische Auswertung (nur Frauen ohne orale Kontrazeptiva) Darstellung der Aktivitäten von Faktor VIII und IX als Boxplots. Der Faktor VIII zeigt eine grössere Streuung der gemessenen Aktivitäten bei Männern.

3.3.3 Einfluss des Alters auf die Aktivität der Faktoren VIII und IX

Um den Einfluss des Alters auf die Faktoren VIII und IX zu untersuchen, bildeten wir innerhalb des Normalkollektivs anhand von Altersdekaden 5 Untergruppen:

(20 – 30 Jahre (n = 75), 31 – 40 Jahre (n = 100), 41 – 50 Jahre (n = 100), 51 – 60 Jahre (n = 106), 61 – 70 Jahre (n = 61). Zwei Probandinnen, die jünger als 20 Jahre waren, wurden aus dieser Kalkulation ausgeschlossen. Zum Untergruppenvergleich wurden der H – Test nach Kruskal und Wallis sowie der Median Test angewendet.

Es zeigte sich ein hochsignifikanter Unterschied der einzelnen Dekaden mit einem zunehmenden Anstieg der Aktivitäten der Faktoren VIII und IX mit dem Alter (p jeweils < 0,001) (siehe Abbildung 3.4, Seite 61). Es fällt dabei auf, dass die Faktor VIII – Aktivität erst ab dem 40. Lebensjahr signifikant ansteigt, während die Faktor IX – Aktivität kontinuierlich mit steigendem Lebensalter zunimmt. Auch der BMI steigt signifikant mit zunehmendem Alter an (siehe Abbildung 3.5, Seite 61).

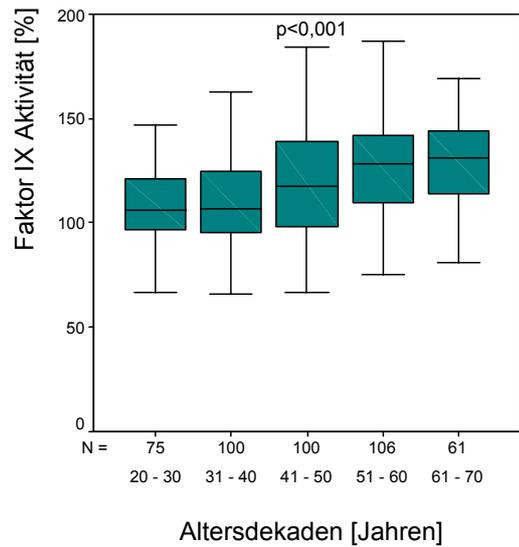
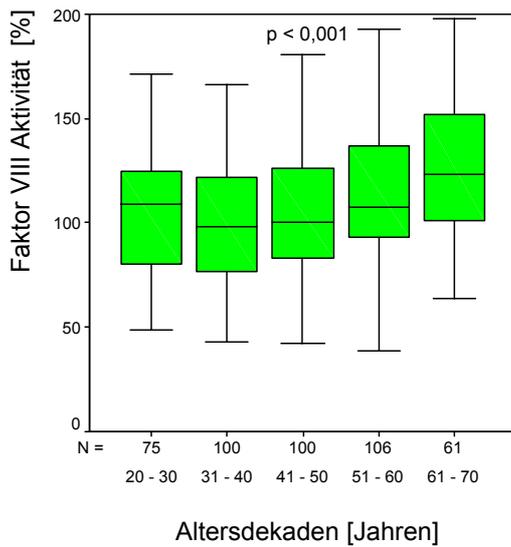


Abbildung 3.4: Verteilung der Faktor VIII und Faktor IX Aktivitäten in den fünf gebildeten Altersdekaden. Die Verteilung innerhalb jeder Dekade wird durch einen Boxplot dargestellt. Es kann gezeigt werden, dass es bei beiden Gerinnungsfaktoren sowohl zu einem Anstieg des Medians der Aktivitäten als auch der einzelnen Quantilen kommt.

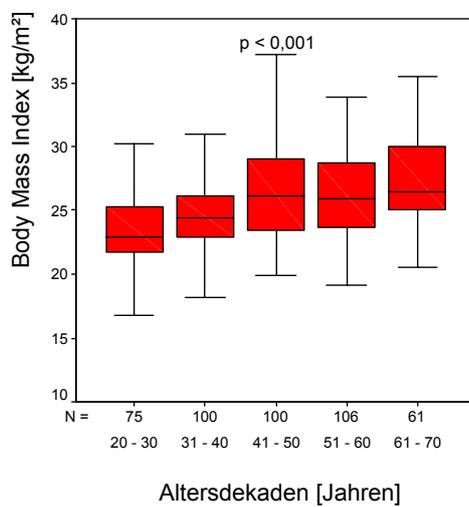


Abbildung 3.5: Stellt man den BMI graphisch dar (innerhalb der einzelnen Altersdekaden als Boxplot) so zeigt sich ein stetiger Anstieg mit zunehmendem Alter. Dies ist statistisch hoch signifikant.

3.3.4 Einfluss des BMI auf die Aktivität der Faktoren VIII und IX

Die Beeinflussung der Aktivitäten der Faktoren VIII und IX durch den BMI sollte möglichst unabhängig vom Einfluss des Lebensalters untersucht werden. Das Kollektiv wurde daher in Untergruppen aufgeteilt. Die erste Untergruppe setzte sich aus allen Probanden (ausgeschlossen Frauen mit oraler Kontrazeption) bis einschließlich des 40. Lebensjahres zusammen. Die zweite Untergruppe erfasste alle Probanden (ausgeschlossen Frauen mit oraler Kontrazeption), die älter als 40 Jahre waren. Um den Einfluss des BMI auf die Aktivität der Gerinnungsfaktoren VIII und IX darzustellen, wurden diese Altersklassen in Probanden mit einem BMI < 27 kg/m² und in solche mit einem BMI von ≥ 27 kg/m² unterteilt.

Der Vergleich der Aktivitäten des Faktor VIII zeigte in beiden Altersklassen eine Abhängigkeit vom BMI mit signifikant höheren Werten in der Gruppe mit einem BMI ≥ 27 kg/m² (siehe Tabelle 3.12).

Die Aktivitäten des Faktor IX zeigte in dem jüngeren Patientenkollektiv ebenfalls signifikant höhere Werte bei den Personen mit einem BMI ≥ 27 kg/m² als bei Probanden mit einem niedrigeren BMI (p < 0,001; siehe Tabelle 3.12). Dieser Effekt des BMI auf die Faktor IX – Aktivität konnte auch bei der älteren Untergruppe beobachtet werden, war hier aber nicht so stark ausgeprägt (p = 0,023; siehe Tabelle 3.12)

Alter bis 40 Jahre		Alter [Jahren]	Faktor VIII [%]	Faktor IX [%]
BMI < 27 (n = 143)	Median	31	99	105
BMI ≥ 27 (n = 33)	Median	33	115	126
Signifikanz	p =	0,355	0,027	< 0,001
Alter über 40 Jahre				
Alter über 40 Jahre		Alter [Jahren]	Faktor VIII [%]	Faktor IX [%]
BMI < 27 (n = 161)	Median	55	104	124
BMI ≥ 27 (n = 107)	Median	56	114	129
Signifikanz	p =	0,47	0,007	0,023

Tabelle 3.12: Aufteilung des Kollektives anhand des Alters, in Probanden unter und über 40 Jahren.

Innerhalb dieser Gruppen erfolgte ein Vergleich der Aktivitäten der Faktoren VIII und IX in Abhängigkeit vom BMI.

Es konnten jeweils höhere Aktivitäten bei adipöseren Personen beobachtet werden. Dies war in allen Fällen statistisch signifikant.

3.3.5 Einfluss des Rauchens auf die Aktivität des Gerinnungsfaktor VIII und des Gerinnungsfaktor IX

Es wurden anhand der Anamnese des Fragebogens 2 Untergruppen gebildet, zum einen jene Personen, die einen Nikotinabusus angegeben hatten (n = 92) und solche, die diesen verneint hatten (n = 352).

Betrachtet man die demographischen Daten der beiden Untergruppen, so lässt sich ein signifikanter Unterschied beim Alter der Probanden feststellen. Die Nichtraucher waren im Median 4,5 Jahre älter, dies war bei einem p – Wert von 0,016 statistisch signifikant. Der BMI wies keinen signifikanten Unterschied zwischen Rauchern und Nichtrauchern auf.

Der Vergleich der Faktorenaktivitäten ergab einen signifikanten Unterschied zwischen Rauchern und Nichtrauchern für den Faktor VIII, mit niedrigeren Werten bei den Rauchern. Der Median bei Personen mit Nikotinabusus lag bei 102%, in der Gruppe ohne Nikotinabusus bei 106 % (Abbildung 3.6).

Der Vergleich der Faktor IX Aktivitäten konnte keinen signifikanten Unterschied zwischen Rauchern und Nichtrauchern zeigen (siehe Abbildung 3.6).

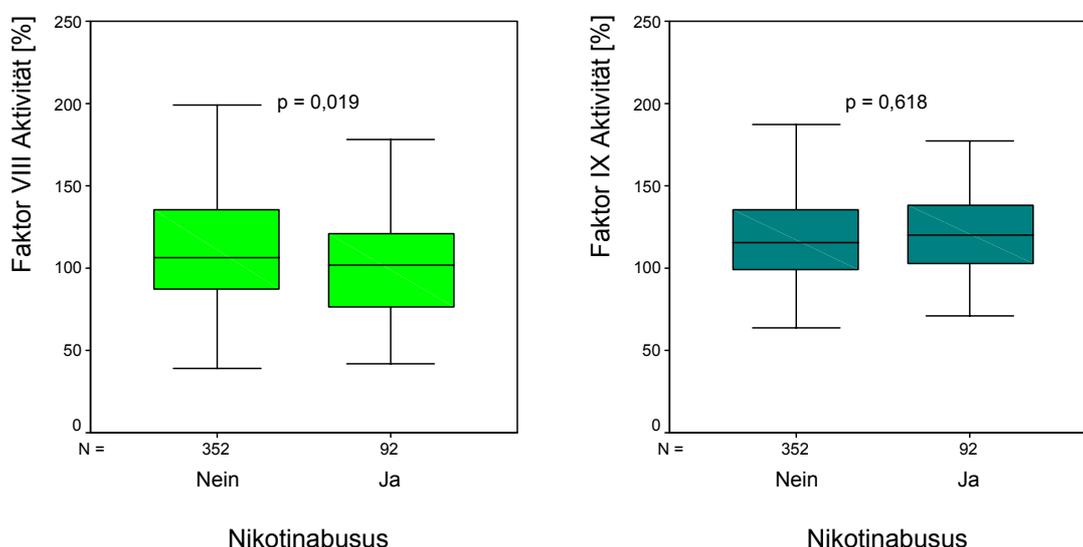


Abbildung 3.6: Vergleich der Aktivitäten der Gerinnungsfaktoren VIII und IX bzgl. des Nikotinabusus. Es zeigt sich bei der graphischen Darstellung mittels Boxplots bei den Aktivitäten des Faktor VIII der Raucher, dass bei geringfügig niedrigerem Median tendenziell niedrigere Faktor VIII – Aktivitäten gemessen werden konnten. Die Aktivitäten des Faktor IX zeigten keine signifikanten Unterschiede beim Vergleich von Rauchern und Nichtrauchern.

3.3.6 Lineare Regressionsanalysen für die Aktivität der Faktoren VIII und IX innerhalb des Normalkollektives.

Zum Abschluss der Berechnungen im Normalkollektiv und der Untersuchung der Einflüsse der in den vorangegangenen Kapiteln dargestellten Einflussgrößen (Geschlecht, Alter, BMI und Nikotinabusus), führten wir eine lineare Regression durch, die alle diese Einflussgrößen berücksichtigte.

Eine lineare Regression ist ein statistisches Verfahren, mit dem man unter Berücksichtigung mehrerer Variablen, den Einfluss jeder einzelnen auf eine vorher definierte Abhängige, unter Angabe der Signifikanz untersucht. Ein negativer Wert von B zeigt ein Abfallen der Abhängigen - Parameter mit einem Zunehmen der Variablen an, B gibt demnach die Steigung der Regressions – Geraden an.

Bei den Faktor VIII - Aktivitäten konnten die bisher beschriebenen Abhängigkeiten bestätigt werden. Es zeigte sich ein signifikanter Anstieg der Faktor VIII - Aktivitäten mit zunehmendem Alter (B positiv $p = 0,034$), sowie mit steigendem BMI (B positiv $p = 0,002$). Ebenso konnten die signifikant niedrigeren Werte bei Rauchern bestätigt werden (B negativ $p = 0,018$).

Auch beim Faktor IX konnten die zuvor beschriebenen Abhängigkeiten durch diese lineare Regression bestätigt werden. Es zeigte sich eine positive Abhängigkeit vom Alter (B positiv $p < 0,001$). Auch die signifikante Beeinflussung der Aktivität des Faktor IX durch den BMI konnte hier mit höheren Werten bei steigendem BMI bestätigt werden (B positiv $p < 0,001$). (siehe Tabelle 3.13, Seite 65)

		Nicht standardisierte Koeffizienten		Standardisierte Koeffizienten	T	Sign.
		B	Standardfehler	Beta		
Faktor VIII	(Konstante)	60,943	12,075		5,047	0,000
	Alter	0,284	0,134	0,103	2,126	0,034
	Geschlecht	3,050	4,053	0,036	0,753	0,452
	BMI	1,305	0,427	0,150	3,057	0,002
	Nikotinabusus	-9,870	4,159	-0,111	-2,373	0,018
Faktor IX	(Konstante)	61,095	8,570		7,129	0,000
	Alter	0,463	0,095	0,227	4,880	0,000
	Geschlecht	-3,649	2,876	-0,057	-1,269	0,205
	BMI	1,668	0,303	0,257	5,504	0,000
	Nikotinabusus	0,939	2,951	0,014	0,318	0,751

Tabelle 3.13: Lineare Regression für den Faktor VIII und den Faktor IX bzgl. der Einflussgrößen Alter, Geschlecht, BMI und Nikotinabusus. Es bestätigen sich die zuvor berechneten Abhängigkeiten mit entsprechenden Signifikanzen.

3.4 Vergleich der Gerinnungsfaktoraktivitäten zwischen Probanden und Patienten

3.4.1 Vergleich der Faktor VIII Aktivitäten zwischen Normal- und Patientenkollektiv

Die Überprüfung der gemessenen Faktor VIII Aktivitäten des Patientenkollektivs auf Normalverteilung, die mit dem Kolmogorov – Smirnov und dem Shapiro - Wilk Test durchgeführt wurde, ergab, dass keine normalverteilten Werte vorlagen. Daher wurde zur Definition des oberen Cut – Off Wertes für erhöhte Werte die 90 % Perzentile des Normalkollektivs verwendet, die bei einer Aktivität von 158% lag.

Bei einem im Rahmen einer anderen Promotionsarbeit durchgeführten Vergleichsuntersuchung, der von uns gemessenen Faktor VIII - Aktivitäten mit den Faktor VIII – Aktivitäten, die aus den selben Plasmaproben innerhalb einer Woche nach der Blutentnahme innerhalb des Routinegerinnungslabors bestimmt worden waren, zeigten sich deutliche Diskrepanzen. Bei den kurz nach dem Einfrieren gemessenen Proben der Patienten konnten deutlich höhere Faktor VIII - Aktivitäten gemessen werden als bei den Bestimmungen, die nach einer Aufbewahrungszeit derselben Probe bei -70°C von mehreren Monaten durchgeführt worden waren.

Dies wurde von uns auf die längere Lagerungszeit (bei -70°C) zurückgeführt. Bisher war in der Literatur nicht beschrieben worden, dass die Faktor VIII – Aktivität in tiefgefrorenen Proben in Abhängigkeit von der Lagerdauer der Proben absinken kann, so dass diese Problematik zu Beginn der Durchführung der Doktorarbeit nicht absehbar war.

Da hier die Gefahr eines systematischen Fehlers, bei unterschiedlich langen Lagerzeiten der beiden Probenkollektive drohte, konnten wir keinen Vergleich der beiden Kollektive bzgl. erhöhter Faktor VIII Aktivitäten durchführen.

3.4.2 Vergleich der Faktor IX Aktivitäten zwischen Normal- und Patientenkollektiv

Bevor der Vergleich der beiden Kollektive durchgeführt wurde, erfolgte die Prüfung auf Normalverteilung der gemessenen Faktor IX Aktivitäten. Diese ergab mit dem Kolmogorov – Smirnov Test und dem Shapiro – Wilks Test in beiden Kollektiven einen p – Wert $< 0,001$. Dies bedeutet, dass keine Normalverteilung bzgl. des Faktor IX vorlag.

Der Cut – Off Wert für erhöhte Werte wurde daher anhand der 90% Perzentile des Normalkollektives festgelegt. Er lag bei 151% Aktivität.

Innerhalb des Patientenkollektivs wurde für den Vergleich der Faktor IX Aktivitäten eine Untergruppe gebildet. Aus ihr wurden alle Patienten, die zum Zeitpunkt der Blutentnahme eine orale Antikoagulation durchführten, ausgeschlossen, da der Vitamin K Antagonismus der oralen Antikoagulantien zu niedrigeren Faktor IX Aktivitäten bei diesen Personen führt, und es ansonsten zu einem systematischen Fehler gekommen wäre. In der Subgruppe der Patienten ohne orale Antikoagulantien befanden sich 250 Personen, 112 waren auf Grund der Einnahme von Vitamin K Antagonisten ausgeschlossen worden.

Der Vergleich der Kollektive anhand des Cut Off Wertes von 151% für erhöhte Aktivitäten zeigte signifikante Unterschiede mit höheren Aktivitäten auf der Seite der Patienten mit einer venösen Thrombose. Auch bei einem Mittelwertvergleich der Absolutwerte konnte dies gezeigt werden. (siehe Tabelle 3.14)

	Erhöhte Aktivitäten ($\geq 151\%$) [n / %]	Normale Aktivitäten ($< 151\%$) [n / %]	Mittelwerte [Aktivität in %]	Signifikanzen: Mann - Whitney - U
Normalkollektiv	47 (444) / 10,6	397 (444) / 89,4	119	
Patientenkollektiv	92 (250) / 36,8	158 (250) / 63,2	137	$< 0,001$

Tabelle 3.14: Vergleich der F IX Aktivitäten zwischen den Kollektiven, als Mittelwertvergleich zweier nicht normalverteilter Stichproben (Mann - Whitney - U), und als χ^2 - Vier - Felder Test für erhöhte / normale Werte.

3.4.3 Berechnung einer unkorrigierten Odds Ratio und des 95% Konfidenzintervalles für das Risiko einer venösen Thrombose bei erhöhten Aktivitäten des Faktor IX

Wir konnten folgende Odds Ratio mit den zugehörigen Konfidenz Intervall, zur Risiko Abschätzung bezüglich dem Erlangen einer venösen Thrombosen bei erhöhten Aktivitäten des Faktor IX berechnen: Odds Ratio 4,9 (95% KI 3,3 – 7,3).

Wobei wir hierfür alle Probanden ohne Pilleneinnahme und diejenige Patienten berücksichtigten welche zum Zeitpunkt der Blutentnahme keine orale Antikoagulation einnahmen.

Als Parameter wurde die Gruppenzugehörigkeit (Proband = keine Thrombose bzw. Patient = Thrombose) und eine erhöhte Aktivität des Faktor – IX ($\geq 151\%$).

3.4.4 Berechnung einer korrigierten Odds Ratio und des 95% Konfidenzintervalles für das Risiko einer venösen Thrombose bei erhöhten Aktivitäten des Faktor IX

Um eine Risikoabschätzung für das Erlangen einer venösen Thrombose bei erhöhten Aktivitäten des Gerinnungsfaktors IX durchführen zu können, berechneten wir die Odds Ratio. Diese gibt an, um welchen Faktor das Risiko innerhalb einer Gruppe höher ist, das es zu einer venösen Thrombose kommt. Um den Einfluss des Faktor IX möglichst isoliert zu beschreiben, führten wir eine korrigierte Berechnung bzgl. des Alters, des BMI, des Geschlechtes und des Nikotinabususes durch. Die Berechnung erfolgte mit einer binär logistischen Regression, da die abhängige Variable binär verteilt ist (Thrombose ja/nein). Mit Hilfe dieser Regressionsanalyse konnte eine korrigierte Odds Ratio von 3,98 für erhöhte Faktor – IX Aktivitäten mit einem 95 Prozent Konfidenzintervall von 2,5 bis 6,3 berechnet werden (siehe Tabelle 3.15). Es zeigte sich eine hochsignifikante, positive Assoziation erhöhter Faktor IX – Aktivitäten mit dem Auftreten venöser Thrombosen, die unabhängig von BMI, Alter und Geschlecht war.

Es konnte hieraus geschlossen werden, dass Personen mit einer erhöhten Faktor IX Aktivität ein 4fach erhöhtes Risiko für die Entstehung einer venösen Thrombose aufweisen.

	Regressions- koeffizient B	Standard -fehler	Signifi- kanz	Odds Ratio	95,0% Konfidenzintervall für Odds Ratio's	
					Unterer Wert	Oberer Wert
Alter	-0,0013	0,0075	0,864	0,999	0,984	1,014
Geschlecht	-1,7967	0,1934	0,000	0,166	0,114	0,242
BMI	0,0270	0,0217	0,214	1,027	0,985	1,072
erhöhte Faktor IX Aktivität	1,3829	0,2347	0,000	3,987	2,517	6,315
Konstante	-0,1910	0,6152	0,756	0,826		

Tabelle 3.15: Ergebnisse der binär logistischen Regression bzgl. einer stattgehabten Thrombose als abhängige Variable. Die Odds Ratio für das Risiko einer venösen Thrombose bei erhöhten Faktor IX – Aktivitäten lässt sich mit 3,98 berechnen.

4 Diskussion

4.1 Präanalytik

4.2 Evaluation der Inter- und Intraassay Testungen

Nachdem die Entscheidung zur Verwendung eines Ein – Phasen – Gerinnungstestes gefallen war, musste dieser für unsere Fragestellung – der Messung erhöhter Faktorenaktivitäten - evaluiert werden. Die erhältlichen und in der Laborroutine üblichen Tests wurden in der Vergangenheit für die Bestimmung erniedrigter Faktorenwerte im Rahmen der Hämophilie - Diagnostik entwickelt. Auch in der aktuellen Ausgabe des DIN Taschenbuches für die Hämostaseologie wird beim Faktor IX Test auf die besondere Bedeutung des Testes bei der Unterscheidung der Hämophilien A und B hingewiesen (70). Da wir bei unserer Fragestellung vor allem erhöhte Werte erwarteten und diese zuverlässig und reproduzierbar bestimmt werden sollten, führten wir eine entsprechende Evaluation der notwendigen Präanalytik durch. Die zur Testung verwendeten Plasmen hatten erwartete Aktivitäten zwischen 100 und 300%. Es wurden neben der Standard Verdünnung von 1:5 höhere Verdünnungen getestet, um herauszufinden, ob höhere Verdünnungen eine größere Genauigkeit durch geringere Extrapolation der Eichgeraden für erhöhte Werte erreichen könnten.

Es zeigte sich, dass innerhalb des verwendeten Aktivitätsspektrums die beste Reproduzierbarkeit der Werte mit einer Verdünnung von 1:5 (Standard) gefolgt von der 1:10 Variante erhalten werden konnte. Dies galt sowohl für die Intra-, als auch für die Inter - assay Messungen.

Dies spricht dafür, dass die bei der Kalibration anhand des Normalplasmas bei einer Verdünnung von 1:5 erstellten Eichgerade eine sehr hohe Qualität erreicht, und somit die Extrapolation bis in hohe Aktivitätsbereiche ermöglicht und zulässt. Durch eine stärkere Verdünnung kann diese Genauigkeit nicht weiter verbessert werden, im Gegenteil, es kommt zu stärkeren Schwankungen und Ungenauigkeiten. Ob es sich hierbei um Ungenauigkeiten bei den Pipettiervorgängen des Gerinnungsautomaten handelte, die sich sowohl auf die Güte der Eichgeraden als auch auf die Einzelmessungen auswirkten, oder die hohen Verdünnungen zu ungenügenden Faktorenkonzentrationen führten, lässt sich anhand unserer Untersuchungen nicht beurteilen.

Diesbezüglich ist anzumerken, dass im Durchführungsteil des DIN Handbuches empfohlen wird, Konzentratproben mit einer Aktivität > 100% mit einem Puffer soweit zu verdünnen,

dass eine Aktivität um 100% zu erwarten ist. Dies ist nach unseren Messungen aus den oben genannten Gründen nicht zu empfehlen (73).

4.2.1 Messung von mit Heparinen versetzten Plasmen

Diese Untersuchungen wurden durchgeführt, um eine Beeinflussung der Messungen der Einzelfaktoren durch Heparin im Patientenplasma zu analysieren, da Patienten mit venösen Thrombosen häufig mit Heparinen insbesondere in der Akutphase der venösen Thrombose behandelt werden.

Da unfraktionierte Heparine und zu einem geringeren Ausmass auch niedermolekulare Heparine die PTT verlängern können und die Faktor VIII und Faktor IX Messung mit PTT Reagenz durchgeführt werden, könnte es durch Heparine zu einer falsch zu niedrigen Messung der Einzelfaktoraktivitäten kommen. Im DIN Handbuch für Hämostaseologie wird darauf verwiesen, dass:“ ein Einfluss von Heparin oder Heparinoiden auf die Bestimmung auszuschließen ist (73). Darüber hinaus ist in der Literatur beschrieben, dass das heparinabbauende Enzym Heparinase dem Patientenplasma zugesetzt werden kann, so dass der Heparineffekt auf die PTT anschliessend nicht mehr nachweisbar ist (72;73).

Es liegt jedoch keine Arbeit vor, welche die Effektivität des Zusatzes von Heparinase bei Einzelfaktormessungen beschreibt. Aus diesem Grund führten wir eine entsprechende Evaluation des möglicherweise die Messung der Einzelfaktoren störenden Heparineffektes durch. Bei allen getesteten Heparinen zeigte sich mit zunehmender Heparinkonzentration ein Absinken der gemessenen Faktor VIII – Aktivität in vitro. Bereits durch eine Erhöhung der Ausgangsverdünnung liess sich der Heparineffekt auf die Faktormessungen abschwächen, es konnte jedoch keine Normalisierung der Faktorenwerte erreicht werden, so dass dieses Verfahren nicht ausreicht, um kontaminierte Proben exakt auf ihre Faktorkonzentration testen zu können.

Durch die Verwendung der Heparinase liess sich die Ausgangsaktivität bei unfraktioniertem Heparin unabhängig von der Heparin - Konzentration wiederherstellen. Bei den niedermolekularen Heparinen liess sich bis auf eine geringe Erniedrigung der Aktivität ebenfalls die Ausgangsaktivität fast wieder erreichen. Dies deckt sich mit den für die PTT in den oben genannten Studien gemessenen Ergebnissen.

Aufgrund dieser Ergebnisse entschlossen wir uns, keine Patientenplasmen von heparinbehandelten Patienten in die Studie einzuschließen, da eine zu grosse Verfälschung der Messergebnisse durch die Heparinkontamination zu erwarten war. Allerdings kann an

Hand unserer Messergebnisse belegt werden, dass in Einzelfällen im Routinegerinnungslabor durch Zusatz von Heparinase relativ genaue Faktor VIII – Aktivitäten trotz Heparinkontamination gemessen werden können.

4.3 Demographische und anamnestische Daten

4.3.1 Demographische Daten der Kollektive

Um ein Normalkollektiv aufzubauen und dessen Daten sowie Plasmaproben zu erhalten, gibt es mehrere Möglichkeiten. Im Glasgow MONICA Survey III wurden Patienten aus allgemeinen Praxisregistern angeschrieben und im Rahmen eines angebotenen Gesundheits Checks eingeschlossen (74). Die Leidener Arbeitsgruppe entschied sich, in ihrer Leiden Thrombophilia Study (LETS) für sogenannte „matched pairs“, das bedeutet, jeder eingeschlossene Patient mit einer Thrombose sollte in seinem Umfeld einen bzgl. Alter, Geschlecht und BMI ähnlichen Probanden für das Normalkollektiv finden, welcher dann für das Normalkollektiv erfasst wurde (60).

Wir entschieden uns, unser Normalkollektiv über den Blutspendedienst zu rekrutieren. Die Methode, über ein zentrales Register Patienten aus Praxen zu rekrutieren, ist innerhalb des deutschen Gesundheitssystems nicht anwendbar, da keine dem englischen National Health System (NHS) vergleichbare „einfach“ zugänglichen zentralen Register vorhanden sind.

Beim Vergleich unseres Normalkollektives mit dem Patientenkollektiv kamen jedoch Unterschiede zum Vorschein, die sich durch das konsekutive Einschliessen der Personen nicht vermeiden ließen.

Es zeigte sich, dass im Kollektiv der Blutspender ein deutliches Überwiegen von Männern gegenüber Frauen bestand. Dies lässt sich vor allem durch die Zulassungskriterien des Blutspendedienstes zur Blutspende wie z.B. eines Hämoglobinwertes von mindestens 12,5g/dl, weniger durch eine generell höhere Blutspendebereitschaft von Männern erklären.

Die Geschlechtsverteilung zeigte daher beim Vergleich des Normalkollektives mit dem Patientenkollektiv einen signifikanten Unterschied ($p < 0,001$), in geringerem Ausmaß zeigte dies auch die Verteilung des Alters ($p = 0,028$) und die des BMI ($p = 0,046$). Diese Unterschiede zwischen den Kollektiven sind zur Vermeidung eines systematischen Fehlers zu berücksichtigende Störgrößen, deren Einfluss und Relevanz in dem jeweiligen Kapitel diskutiert wird. Daher führten wir bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse eine Berechnung von korrigierten Odds Ratios mit Hilfe der multiplen logistischen Regressionsanalyse durch.

4.3.2 Anamnestische und klinische Daten der Kollektive

Eine positive Familienanamnese in Bezug auf Thrombosen ließ sich signifikant häufiger bei den Patienten mit venösen Thrombosen (30,7% der Fälle) als bei den Personen des Normalkollektives (11,4% der Fälle) nachweisen. Unter einer positiven Familienanamnese wird die thromboembolische Erkrankung mindestens eines Blutsverwandten ersten Grades verstanden. Die Häufigkeit der vor allem von den Normalpersonen angegebenen betroffenen Familienangehörigen erscheint im Vergleich zu den Daten von White et al. in unserem Normalkollektiv sehr hoch (75), dieser beschreibt eine Inzidenz von 1:10.000 bzgl. einer positiven Anamnese. Diese Inzidenz berechnete er über die gesamte Population der USA anhand der dortigen Statistiken, so dass sich ein deutlicher Unterschied bzgl. der beobachteten Kollektive zeigt.

Die in unserem Patientenkollektiv beobachteten Zahlen bzgl. bekannter Thrombophilien decken sich gut mit den in der Literatur bisher angegebenen. So wurden für die heterozygote Faktor V Leiden Mutation in Thrombosekollektiven Inzidenzen von 20-40% angegeben (19), wir beobachteten 29%. Für die heterozygote Prothrombinmutation werden 7-16% beschrieben (21), hier konnten wir in unserem Kollektiv 5,6% nachweisen, Antithrombin Mängel wurden in 1-4 % beschrieben, in unserem Patientenkollektiv zeigten diesen Mangel 4,4%. Der Protein C- bzw. Protein S - Mangel wird mit Inzidenzen zwischen 1,3 und 3,1 % angegeben (76). Dies deckt sich gut mit der von uns in unserem Kollektiv gesehenen Inzidenz von Protein C Mängeln (2,8%), beim Protein S Mangel fanden sich in unserem Patientenkollektiv deutlich mehr Patienten (8,4%). Dies könnte seine Ursache darin haben, dass sich von uns untersuchte Patientenkollektiv aus einer spezial Ambulanz der Universitätsklinik rekrutierte, in der eine solche Häufung eher zu erwarten ist als dies in einem allgemeinen Kollektiv der Fall wäre.

4.4 Auswertung der Einzelfaktormessungen

4.4.1 Das Normalkollektiv

4.4.1.1 Faktor VIII Aktivitäten

Bezogen auf die Faktor VIII – Aktivitäten, die im Normalkollektiv gemessen wurden, sollte festgestellt werden, welche äußeren Einflüsse bei Messungen der Gerinnungsfaktoraktivitäten von Relevanz sind.

Zunächst wollten wir die Frage der Beeinflussung klären, da dies Auswirkungen auf die Definition unserer Normwerte haben könnte.

Anhand des standardisierten Fragebogens (siehe Anhang 7.2, S. 94), welchen wir nach den Erkenntnissen bereits durchgeführter und veröffentlichter Studien (54;74) sowie nach den eigenen Erfahrungen gestalteten, erfragten wir mögliche Einflussgrößen wie BMI, Einnahme oraler Kontrazeptiva, Nikotinkonsum etc.

Ein altersabhängiges Ansteigen der Faktor VIII – Aktivitäten ließ sich nicht nur in unserer Studie, sondern auch in den Untersuchungen von Lowe et al. (74) und Balleisen et al. (54) nachweisen, so dass davon ausgegangen werden kann, dass das zunehmende Lebensalter von Patienten einen signifikanten Einfluss auf die Höhe der gemessenen Faktor VIII – Aktivitäten hat. Gleichzeitig weisen Patienten mit ansteigendem Lebensalter ein exponentiell ansteigendes venöses Thromboserisiko auf, das im Alter > 75 Jahren 1 : 100 pro Jahr beträgt, wogegen ein junger Mensch nur ein Risiko von etwa 1 : 10.000 pro Jahr hat, eine venöse Thrombose zu erleiden (77;78). Möglicherweise sind die mit zunehmendem Lebensalter ansteigenden Faktor VIII – Werte ein Marker für dieses zunehmende venöse Thromboserisiko. Obwohl mit steigendem Lebensalter auch der Body Mass Index ansteigt, konnte durch die durchgeführte Regressionsanalyse belegt werden, dass der durch das Lebensalter bedingte Faktor VIII Anstieg unabhängig vom BMI ist. Oger et al. konnten in einer Arbeit, die gezielt das Thromboserisiko und die Faktor VIII Aktivitäten bei Personen oberhalb des 70. Lebensjahres untersuchte eine Übereinstimmung des Risikos für erhöhte Werte mit dem jüngerer Personen finden (79). Interessant ist die Beobachtung, dass in der Dekade von 20 – 30 Jahren ein zunächst höherer Median beobachtet werden konnte, der niedrigste Median der Faktor VIII - Werte in der Dekade von 30 – 40 Jahren gesehen wurde und sich schließlich ein kontinuierlicher Anstieg der Mediane im Alter über 40 Jahren zeigte.

Geschlechtsspezifische Unterschiede bzgl. der gemessenen Faktor VIII – Aktivitäten konnten in unserer Studie nicht beobachtet werden. Auch in der Literatur hatten sich hierfür keine Hinweise ergeben (54;74), so dass die Faktor VIII – Aktivität als unabhängig vom Geschlecht angesehen werden kann.

Die Einnahme oraler Kontrazeptiva beeinflusste die Höhe der Faktor VIII Aktivität nicht signifikant, allerdings zeigte sich ein Trend zu höheren Faktor VIII - Aktivitäten bei den Frauen, die orale Kontrazeptiva einnahmen. Da diese Subgruppe eine relativ geringe Fallzahl aufwies, könnte dies eine Ursache für die fehlende Signifikanz sein. In der Literatur nehmen lediglich Balleisen et al. (54) explicit Stellung zu einer Beeinflussung der Faktor VIII Aktivität durch orale Kontrazeptiva. Er konnte in seiner Arbeit, in der er die Faktor VIII - Aktivitäten von 1306 Frauen (74% ohne orale Kontrazeptiva und 26% mit Einnahme oraler Kontrazeptiva) untersuchte keine Korrelation der Faktor VIII Werte mit der Verwendung oraler Kontrazeptiva darstellen. In 2 weiteren Arbeiten (Abdollahi et al. (80) und Bloemenkamp et al. (81)), in denen das Kollektiv der „Leidener Thrombophilia Study (LETS)“ (19) verwendet wurde, konnte jeweils der additive Effekt von adipösen Personen und der Verwendung oraler Kontrazeptiva auf die Erhöhung der Faktor VIII - Aktivitäten evaluiert werden, es wurde jedoch nicht zu einer direkten Einflussnahme durch orale Kontrazeptiva Stellung genommen. Betrachtet man die Daten der Frauen mit und ohne orale Kontrazeptiva (OK) im Kontrollkollektiv der LETS, so kann keine Beeinflussung des Faktor VIII gesehen werden. (Frauen ohne OK: normale Faktor VIII – Aktivitäten n = 89, erhöhte n = 15; mit OK: normale Faktor VIII – Aktivitäten n = 51, erhöhte n = 14). Nicht eindeutig ist in dieser Studie die Definition der Einnahme oraler Kontrazeptiva, da diese bei Einschluss in das Kollektiv der Studie und nicht zum Zeitpunkt der Blutentnahme erfolgte.

Es zeigt sich im Weiteren eine signifikante Abhängigkeit der Faktor VIII – Aktivitäten vom Body Mass Index (BMI), wobei die Subkollektive der Probanden mit höherem BMI signifikant höhere Faktor VIII - Aktivitäten aufwiesen. Auch die lineare Regression konnte die Abhängigkeit (höhere Faktor VIII Aktivität bei größerem BMI) unter Berücksichtigung anderer möglicher Einflussgrößen wie Alter, Geschlecht oder dem Nikotinkonsum belegen.

Dies steht im Widerspruch zu der Publikation von Balleisen (54), in der keine Abhängigkeit des Faktor VIII vom Körpergewicht gefunden werden konnte. Abdollahi et al. (80) untersuchten vor dem Hintergrund der Frage eines erhöhten Risikos für venöse Thrombosen bei adipösen Individuen die Abhängigkeit des Faktors VIII vom BMI. Er beschreibt eine positive Anhängigkeit mit einem Regressionskoeffizienten von 1,7. Dies

bedeutet, dass ein Anstieg der Faktor VIII Aktivität um 1,7% bei einem Anstieg des BMI um 1. Dieser wird korrigiert für Alter und Geschlecht angegeben. Seine Auswertungen bestätigen somit unsere Auswertung. Als Ursache für die unterschiedlichen Ergebnisse der Untersuchungen von Balleisen auf der einen Seite und denen von Abdollahi und uns auf der anderen Seite, fallen im Studiendesign keine wesentlichen Unterschiede auf. So ist als Mass für die Adipositas von Balleisen der Brocaindex (in Prozent des Standardgewichtes als Körpergrösse in cm -100 definiert) gewählt worden, von uns und Abdollahi der BMI. Die Mittelwerte beider Indices geben für die untersuchten Populationen ein vergleichbares Niveau an. Alle Gruppen führten eine Regressionsanalyse durch, wobei in der Publikation von Balleisen nicht angegeben wird, welche Parameter in diese eingeschlossen wurden. Abdollahi führte seine Berechnungen in einem Kollektiv durch, dass sowohl Patienten mit venösen Thrombosen als auch Kontrollen einschloss. Dies ist ein wichtiger Unterschied zu den von uns bzw. Balleisen verwendeten Kollektiven. Aufgrund den in der Publikationen erwähnten Methoden lassen sich die differenten Ergebnisse nicht abschliessend begründen. Die Auswertung bzgl. des Nikotinkonsums und der Faktor VIII - Aktivitäten konnte signifikant niedrigere Werte bei Rauchern zeigen, dies war sowohl in der Regressionsanalyse als auch beim Mittelwertvergleich auffällig. In der Literatur gibt es 2 Arbeiten, welche ebenfalls eine negative Korrelation zwischen den Aktivitäten des Faktor VIII und dem Nikotinkonsum angeben. Sowohl in der Arbeit von Balleisen et al. (54) als auch bei Conlan et al. (82) waren die Unterschiede jedoch nicht signifikant, so dass dies von uns zum ersten mal berechnet werden konnte.

Der Anstieg der Faktor VIII – Aktivität mit dem Alter wurde quantitativ bisher lediglich von Balleisen (54) beschrieben, er konnte einen Anstieg mit einem Regressionskoeffizienten von 0,236 für Männer und 0,278 für Frauen beschreiben. In unseren Daten findet sich ein solcher Anstieg mit einem Koeffizienten über beide Geschlechter von 0,286, so dass unsere Ergebnisse durch die Publikation von Balleisen bestätigt werden konnten.

Anhand dieser Ergebnisse ist zu diskutieren, ob man für verschiedene Altersbereiche unterschiedliche Normbereiche definieren sollte. Betrachtet man den Verlauf der 90% Perzentilen der jeweiligen Dekaden, so ist folgender Verlauf zu beschreiben: 2. Dekade:152%; 3. Dekade: 138%; 4. Dekade: 154%; 5. Dekade: 163%; 6. Dekade: 170%. Würde man diese als Obergrenze der jeweiligen Normwerte in der jeweiligen Dekade verwenden, so würde man dem physiologischen Anstieg der Faktor VIII – Aktivitäten mit steigendem Lebensalter eher gerecht.

In den bisherigen Publikationen wurde dies nicht berücksichtigt.

4.4.1.2 Faktor IX Aktivitäten

Die Untersuchungen der Aktivitäten des Faktor IX führten wir analog zu denen des Faktor VIII durch.

Bei den Berechnungen innerhalb des Normalkollektives konnten wir beim Vergleich der Frauen mit und ohne orale Kontrazeptiva signifikant höhere Faktor IX - Aktivitäten bei den Frauen finden, die orale Kontrazeptiva eingenommen hatten. Die bisherigen Publikationen zu diesem Thema (66;83;84) konnten ebenfalls höhere Werte unter der Einnahme von oralen Kontrazeptiva feststellen. Kluft und Lansing bezogen sich hierbei isoliert auf Pillenpräparate der dritten Generation, während wir diesen Effekt ohne eine Differenzierung in verschiedene Präparategenerationen zeigen konnten, da in unserer Untersuchung die Subgruppe der Frauen unter oralen Kontrazeptiva zu klein war ($n = 51$), um hier eine solche Differenzierung durchführen zu können. Der berechnete Effekt war so relevant, dass wir die Frauen mit oralen Kontrazeptiva aus allen nachfolgenden Berechnungen bezüglich Normwertdefinition, geschlechtsspezifischen Vergleichen sowie der Berechnung des relativen Risikos ausschlossen. Dies sollte grundsätzlich beachtet werden, wenn es darum geht, Cut – off Werte in Normalkollektiven bzgl. der Faktor IX – Aktivitäten festzulegen. In den bisherigen Publikationen fand diese relevante Einflussgröße bei Normwertdefinitionen keine Berücksichtigung.

Wir konnten keinen Unterschied der Faktor IX - Aktivität zwischen den Geschlechtern nachweisen. Dies deckt sich mit den Ergebnissen von Hylckama et al. , die dies in ihrem Normalkollektiv bezüglich Faktor IX Antigen Leveln ebenfalls nicht nachweisen konnten (66). In dieser Arbeit wurden jedoch Frauen mit oralen Kontrazeptiva von den Berechnungen nicht ausgeschlossen, obwohl ein Effekt wie von uns auch beschrieben worden war.

Wir konnten einen signifikanten Anstieg der Faktor IX Aktivitäten mit zunehmendem Lebensalter zeigen, wobei dieser Anstieg erst ab dem 40. Lebensjahr deutlich wurde. Dieser Anstieg war unabhängig von anderen Einflussgrößen, und setzte früher ein als in der Publikation von Hylckama beschriebenen Population, die einen relevanten Faktor IX Anstieg erst ab einem Alter von 55 Jahren aufwies (66). Dies könnte dadurch begründet sein, dass in dieser Publikation Probandinnen, die orale Kontrazeptiva nutzten, von den Berechnungen nicht ausgeschlossen worden waren, so dass möglicherweise die Aktivitäten des Faktor IX bei den jüngeren Probandinnen in dieser Studie als „falsch“ zu hoch eingeschätzt wurden.

Ein signifikanter Einfluss eines höheren BMI auf die Aktivitäten des Faktor IX zeigte sich innerhalb des gesamten Normalkollektives, wobei der Anstieg auf höhere Werte in höherem Alter geringer ausgeprägt war als in jüngeren Jahren (< 40. Lebensjahr). Eine Abhängigkeit der Faktor IX Antigen Level vom BMI wurde auch von Lowe beschrieben, auch hier konnten höhere Werte bei Probanden mit höherem BMI gefunden werden (74).

Eine Abhängigkeit der Faktor IX Aktivitäten vom Nikotinkonsum konnte in unserem Kollektiv nicht gefunden werden, während von Lowe et al. bei männlichen Rauchern signifikant höhere Werte nachgewiesen werden konnte (74).

In unseren Untersuchungen wurden erstmals Faktor IX - Aktivitäten statt der in den bisherigen Publikationen (66;74;85;86) verwendeten Faktor IX - Antigen Level gemessen. Dies bedeutet, dass anstatt der in einem Plasma vorhandenen und unter Umständen nicht funktionstüchtigen Proteine, die tatsächlich vorhandene Aktivität des Faktor IX zur Bildung eines Gerinnsels gemessen wurde.

Auch wurden bei den Berechnungen der Einflussgrößen erstmals Frauen die orale Kontrazeptiva eingenommen hatten, von den weiteren Berechnungen ausgeschlossen. Dies ist vor allem für die Definition von Normbereichen von Wichtigkeit, zumal Patientinnen mit venösen Thrombosen orale Kontrazeptiva aufgrund des durch orale Kontrazeptiva erhöhten venösen Thromboserisikos im Normalfall nicht einnehmen.

4.4.2 Vergleich des Normalkollektivs mit dem Patientenkollektiv

Nach den Auswertungen des Normalkollektivs und der Einstufung der potentiellen Einflussgrößen auf die Aktivität der Faktoren VIII und IX konnte mit den im Normalkollektiv berechneten Cut – off Werten die Berechnung des relativen Risikos für das Erlangen einer venösen Thrombose bei erhöhten Werten durchgeführt werden.

Für den Faktor VIII führten wir diesen Vergleich bzw. die Berechnung des relativen Risikos wegen dem von uns beobachteten Rückgang der Faktor VIII - Aktivitäten während der Lagerungszeit nicht durch. Diese Instabilität ist zuvor noch nicht in der Literatur beschrieben worden. Es wurde auch in keiner der Publikationen eine Lagerungszeit bis zur Durchführung der Messungen angegeben. Ob dies ein Problem ist, das sich lediglich bei Aktivitätsmessungen von Gerinnungsfaktoren auswirkt oder auch bei antigenen Nachweismethoden mittels ELISA auftritt, muss weiter erforscht werden.

Bei der Auswertung der Faktor IX – Aktivitäten konnte diese Problematik nicht beobachtet werden, so dass hier ein Vergleich der Kollektive untereinander bzw. die Berechnung des relativen Risikos für das Entstehen einer venösen Thrombose durchgeführt werden konnte.

Personen mit Faktor IX – Aktivitäten oberhalb von 151% wiesen nach unseren Berechnungen bei einer Odds Ratio von 3,98 (95% Konfidenz Intervall 2,57 – 6,31) ein etwa 4 fach erhöhtes Risiko für venöse Thrombosen auf im Vergleich zu Personen mit niedrigeren Faktor IX - Aktivitäten. Unsere Berechnung wurde für das Alter, das Geschlecht und den BMI korrigiert durchgeführt. Wir führten diese Korrektur durch, um eine exakte Risikoabschätzung zu erlangen, obwohl wir keinen Effekt des Geschlechtes auf die Faktor IX – Aktivität zuvor hatten berechnen können. Die nicht korrigierte Odds Ratio war mit 4,9 (95% Konfidenz Intervall 2,3 – 7,3) lediglich um 1 different von der korrigierten. Dies bedeutet, dass das erhöhte Risiko für die Entstehung einer venösen Thrombose von den Faktoren Alter, Geschlecht und BMI bei erhöhten Faktor IX – Aktivitäten nur gering beeinflusst ist und erhöhte Faktor IX – Aktivitäten demnach einen unabhängigen Risikofaktor für das Entstehen einer venösen Thrombose darstellen.

Der Faktor IX ist anders als z.B. der Faktor VIII nicht als akutes Phase Protein bekannt (66;87), so dass unabhängig von dem Abstand von 3 Monaten zwischen Thrombose und Blutentnahme nicht von einer Beeinflussung der erhöhten Aktivitäten durch das Ereignis der Thrombose auszugehen ist.

Die in der Literatur angegebenen relativen Risiken für die Entstehung einer venösen Thrombose bei erhöhten Aktivitäten des Faktor IX bestätigen die von uns gefundenen Daten weitgehend.

Lowe et al. (88) berechneten eine Odds Ratio (OR) von 2,34 in einem Kollektiv aus 66 Frauen mit venöser Thrombose und 163 Kontrollpersonen. Das Alter lag zwischen 45 und 64 Jahren, bei ansonsten nahezu identischen Kriterien für Einschluss und die Regressionsanalyse. Die niedrigere OR ist am ehesten auf die im Vergleich zu unserer Population sehr selektierte Studienpopulation zurückzuführen.

Die Studie von Hylckama et al. (66) wurde mit Personen aus der „Leiden Thrombophilia Study“ (19) durchgeführt. Hier konnte eine für Alter, Geschlecht und die Einnahme oraler Kontrazeptiva korrigierte Odds Ratio von 2,8 berechnet werden, wenn die 90% Perzentile des Normalkollektives als Cut Off verwendet wurde. Diese lag im Kollektiv von Hylckama bei 129U/dl. Wurde der Cut Off auf 150 U/dl angehoben (wobei dieser noch oberhalb der 95% Perzentile des in dieser Arbeit verwendeten Normalkollektives von 142 U/dl liegt) , so wurde eine OR von 3,2 berechnet, welche der von uns berechneten sehr nahe kommt. Unterschiede zu unserer Arbeit bestanden in mehreren Punkten. So wurde hier ein quantitativer Nachweis von Proteinstrukturen des Faktor IX mit einem ELISA Verfahren durchgeführt und keine Aktivitätsbestimmung entsprechend einem qualitativen Verfahren wie in unserer Arbeit. Der Grund für die Entscheidung zu diesem Testverfahren von Hylckama et al. könnte in der sehr langen Lagerungszeit ihrer Proben liegen. Die Phase des Einschlusses erstreckte sich von 1988 bis 1992, es wird kein exakter Zeitpunkt angegeben zu dem analysiert wurde, da es aber eine nachgeschaltete Untersuchung war, die Patienten und Probanden alle innerhalb von 6 Wochen gemessen wurden, ist von einer minimalen Lagerungszeit von bis zu 5 Jahren auszugehen. Des weiteren wurden Patientinnen, die orale Kontrazeptiva einnahmen, zwar bei der Korrektur der Odds Ratios berücksichtigt, jedoch nicht bei der Bestimmung der Normalwerte ausgeschlossen. Auch eine Korrektur für den BMI erfolgte nicht. Diese Differenzen könnten ausschlaggebend für unterschiedliche Höhe der Ergebnisse bei der Berechnung der Odds Ratios und Cut Off` s sein.

Mit den Ergebnissen unserer Arbeit liegt eine exakte und auf Aktivitätsmessungen basierende Cut Off Definition vor, sowie eine Risikoabschätzung für das Erlangen einer Thrombose, die weitere Einflussgrößen berücksichtigt und ebenfalls auf der Methode der Aktivitätsmessungen basiert.

5 Zusammenfassung

Erhöhte Faktorenaktivitäten der Gerinnungsfaktoren VIII und IX standen seit längerer Zeit in dem Verdacht, unabhängige thrombophile Risikofaktoren darzustellen. Die Studienlage hierzu ist bzgl. der Wahl der untersuchten Kollektive, der Messmethoden, sowie der berücksichtigten Einflussgrößen uneinheitlich. Daher wurde die vorliegende Studie durchgeführt, um zum einen in einem Normalkollektiv die die Faktorenaktivität möglicherweise beeinflussenden Störgrößen wie Body Mass Index (BMI) oder ein steigendes Lebensalter zu definieren, und um andererseits die Häufigkeit erhöhter Faktor VIII und IX Aktivitäten bei Patienten mit venösen Thrombosen unter Berücksichtigung dieser Störgrößen im Vergleich zum Normalkollektiv exakt zu analysieren.

Es wurden 500 Blutspender konsekutiv als Normalkollektiv eingeschlossen. Diesem wurde ein Patientenkollektiv von 374 konsekutiven Patienten mit venösen Thrombosen gegenübergestellt.

Beide Kollektive wurden an Hand eines einheitlichen, standardisierten Fragebogens bezüglich ihrer Eigen- und Familienanamnese befragt. Darüber hinaus erfolgte eine Blutentnahme unter standardisierten Bedingungen.

Als Messmethode für die Faktorenaktivität von Faktor VIII und IX wurde ein Einstufengerinnungstest verwendet, hierbei wird die Aktivität eines einzelnen Gerinnungsfaktors gemessen. Alle zu untersuchenden Plasmen wurden auf Lupusantikoagulantien getestet, um Probanden und Patienten mit positiven Lupusantikoagulantien von den weiteren Berechnungen ausschließen zu können, da Lupusantikoagulantien die Faktormessergebnisse verfälschen können. Dies wurde in den bisherigen Veröffentlichungen nicht berücksichtigt.

Mit Hilfe des Normalkollektives wurde die 90% Perzentile als Cut Off für erhöhte Faktorenwerte definiert (FVIII = 158%; FIX = 151%).

Bei Analyse des Faktors VIII konnten mit Hilfe einer linearen Regressionsanalyse folgende Störgrößen als relevant für die Faktorenaktivität innerhalb des Normalkollektives beschrieben werden: Raucher wiesen signifikant niedrigere Faktor VIII – Aktivitäten als Nichtraucher auf, während ein steigender BMI und ein steigendes Lebensalter zu signifikant höheren Faktor VIII -Aktivitäten führten. Ein Einfluss des Geschlechtes, sowie ein signifikanter Einfluss oraler Kontrazeptiva auf die Faktor VIII - Aktivitäten konnte nicht nachgewiesen werden.

Die Aktivitäten des Faktor IX zeigten im Normalkollektiv ebenfalls eine Abhängigkeit von steigendem Lebensalter, höheren BMI Werten sowie im Gegensatz zur Faktor VIII – Aktivität auch von der Einnahme oraler Kontrazeptiva, wobei alle diese Zustände zu signifikant höheren Faktor IX Aktivitäten führten.

Ein Vergleich der Höhe der Faktor VIII – Aktivitäten der Patienten mit venösen Thrombosen zum Normalkollektiv konnte leider nicht durchgeführt werden, da festgestellt wurde, dass eine unterschiedlich lange Lagerzeit der tiefgefrorenen Plasmaproben der Patienten zu einem Absinken von erhöhten Faktor VIII – Aktivitäten führen kann. Dies wurde in der Literatur bisher nicht beschrieben und war daher zu Beginn der Studie nicht bekannt.

Im Gegensatz hierzu blieben die erhöht gemessenen Faktor IX – Aktivitäten auch nach einer längeren Lagerzeit stabil, so dass hier eine Risikoberechnung für erhöhte Faktor IX – Aktivitäten in Bezug auf das Auftreten venöser Thrombosen mit einer korrigierten Odds – Ratio erfolgen konnte.

Die für BMI, Alter und Geschlecht korrigierte Odds Ratio beträgt 3,98 mit einem 95% Konfidenzintervall von 2,5 – 6,3. Es ist somit von einem ca. 4 fach erhöhten relativen Risiko für venöse Thrombosen bei erhöhten Faktor IX – Aktivitäten auszugehen, so dass diese einen neuen thrombophilen Risikofaktor für venöse Thrombosen darstellen.

5.1 Zusammenfassung in Englischer Sprache

Elevated activities of clotting factor VIII and IX are suspected to be relevant and independent risk factors for venous thromboembolism. The literature on this topic is differing in terms of study population, the measurement methods and the considered confounders on clotting factor activity. This study was planned and carried out to define the influence of suspected confounders like Body Mass index (BMI) and increasing age on clotting factor activities. The second aim was to perform an exact analysis of the incidence of elevated clotting factor VIII and IX activities in patients and controls by considering the previously observed confounders.

The study population consisted of 500 consecutive blood donors as controls and 374 consecutive patients that had suffered from venous thromboembolism. The medical history of both groups was taken by the same standardized questionnaire. The collection of blood samples was also standardized and identical in both groups.

The activities of clotting factor VIII and IX were determined by an one stage clotting assay. All plasma samples were tested for lupus anticoagulants to detect patients and controls with positive testing and exclude them from further analysis because lupus anticoagulants can falsify the clotting factor measurements.

The cut off values for elevated clotting factor activities were defined as the 90th percentile of control subjects (F VIII = 158%; F IX 151%).

We could describe the following confounders of clotting factor VIII activities as relevant by linear regression analysis among control subjects: smoking caused significant lower factor VIII activities, while higher BMI values and an increasing age lead to significant higher factor VIII activities. We could not find a significant influence by gender or the use of oral contraceptives on the activities of clotting factor VIII.

The activities of clotting factor IX among control subjects were also influenced by rising age and BMI values and in contrast to factor VIII also by the use of oral contraceptives in women. All the described confounders lead to higher activities of factor IX.

We could not perform the planned analysis between controls and patients concerning activities of clotting factor – VIII because a lowering in the activities of clotting factor VIII could be found the longer the samples were stored frozen. This is not described in the existing literature, and thus was not known when starting the study.

In contrast to the factor VIII activities the activities of clotting factor IX remained constant over time and the planned analysis could be performed. We performed a risk stratification

concerning elevated factor IX – activities and the incidence of venous thromboembolism by calculating corrected odds ratios.

We included BMI, age and sex in our correction. The corrected odds ratio is 3,98 and its 95% confidence interval ranges from 2.5 to 6.3. This predicts an approximately 4 times higher risk for venous thromboembolism with elevated activities of clotting factor IX. Factor IX therefore is a new and independent risk factor for venous thromboembolism.

6 Literaturverzeichnis

Reference List

- (1) Aird WC. Coagulation. *Crit Care Med* 2005; 33(12 Suppl):S485-S487.
- (2) Hartwig JH. The platelet: form and function. *Semin Hematol* 2006; 43(1 Suppl 1):S94-100.
- (3) Mann KG. Thrombin formation. *Chest* 2003; 124(3 Suppl):4S-10S.
- (4) Nesheim M. Thrombin and fibrinolysis. *Chest* 2003; 124(3 Suppl):33S-39S.
- (5) Hartwig JH. The platelet: form and function. *Semin Hematol* 2006; 43(1 Suppl 1):S94-100.
- (6) Josso F. [Thrombin, enzyme of hemostasis and thrombosis: a model of enzymatic autoregulation]. *Pathol Biol (Paris)* 1977; 25 Suppl:6-9.
- (7) Mann KG, Butenas S, Brummel K. The dynamics of thrombin formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23(1):17-25.
- (8) Eilertsen KE, Osterud B. Tissue factor: (patho)physiology and cellular biology. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2004; 15(7):521-538.
- (9) Marlar RA, Kleiss AJ, Griffin JH. Human protein C: inactivation of factors V and VIII in plasma by the activated molecule. *Ann N Y Acad Sci* 1981; 370:303-310.
- (10) Nesheim M. Thrombin and fibrinolysis. *Chest* 2003; 124(3 Suppl):33S-39S.
- (11) Nesheim M. Thrombin and fibrinolysis. *Chest* 2003; 124(3 Suppl):33S-39S.
- (12) Nielsen HK. Pathophysiology of venous thromboembolism. *Semin Thromb Hemost* 1991; 17 Suppl 3:250-253.
- (13) Rogers JS. Hypercoagulable states. *W V Med J* 1993; 89(2):61-63.
- (14) Gathof BS, Picker SM, Rojo J. Epidemiology, etiology and diagnosis of venous thrombosis. *Eur J Med Res* 2004; 9(3):95-103.
- (15) Dahlback B, Carlsson M, Svensson PJ. Familial thrombophilia due to a previously unrecognized mechanism characterized by poor anticoagulant response to activated protein C: prediction of a cofactor to activated protein C. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90(3):1004-1008.
- (16) Bertina RM, Koeleman BP, Koster T, Rosendaal FR, Dirven RJ, de Ronde H et al. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature* 1994; 369(6475):64-67.
- (17) Castoldi E, Rosing J. Factor V Leiden: a disorder of factor V anticoagulant function. *Curr Opin Hematol* 2004; 11(3):176-181.
- (18) Rees DC, Cox M, Clegg JB. World distribution of factor V Leiden. *Lancet* 1995; 346(8983):1133-1134.

- (19) Koster T, Rosendaal FR, de Ronde H, Briet E, Vandenbroucke JP, Bertina RM. Venous thrombosis due to poor anticoagulant response to activated protein C: Leiden Thrombophilia Study. *Lancet* 1993; 342(8886-8887):1503-1506.
- (20) Poort SR, Rosendaal FR, Reitsma PH, Bertina RM. A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. *Blood* 1996; 88(10):3698-3703.
- (21) Kyrle PA, Mannhalter C, Beguin S, Stumpflen A, Hirschl M, Weltermann A et al. Clinical studies and thrombin generation in patients homozygous or heterozygous for the G20210A mutation in the prothrombin gene. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18(8):1287-1291.
- (22) Lane DA, Kunz G, Olds RJ, Thein SL. Molecular genetics of antithrombin deficiency. *Blood Rev* 1996; 10(2):59-74.
- (23) Lane DA, Olds RR, Thein SL. Antithrombin and its deficiency states. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1992; 3(3):315-341.
- (24) Blajchman MA. An overview of the mechanism of action of antithrombin and its inherited deficiency states. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1994; 5 Suppl 1:S5-11.
- (25) Reitsma PH, Bernardi F, Doig RG, Gandrille S, Greengard JS, Ireland H et al. Protein C deficiency: a database of mutations, 1995 update. On behalf of the Subcommittee on Plasma Coagulation Inhibitors of the Scientific and Standardization Committee of the ISTH. *Thromb Haemost* 1995; 73(5):876-889.
- (26) Griffin JH, Evatt B, Zimmerman TS, Kleiss AJ, Wideman C. Deficiency of protein C in congenital thrombotic disease. *J Clin Invest* 1981; 68(5):1370-1373.
- (27) Miletich J, Sherman L, Broze G, Jr. Absence of thrombosis in subjects with heterozygous protein C deficiency. *N Engl J Med* 1987; 317(16):991-996.
- (28) Simioni P, Sanson BJ, Prandoni P, Tormene D, Friederich PW, Girolami B et al. Incidence of venous thromboembolism in families with inherited thrombophilia. *Thromb Haemost* 1999; 81(2):198-202.
- (29) Comp PC, Nixon RR, Cooper MR, Esmon CT. Familial protein S deficiency is associated with recurrent thrombosis. *J Clin Invest* 1984; 74(6):2082-2088.
- (30) Sorice M, Arcieri P, Griggi T, Circella A, Misasi R, Lenti L et al. Inhibition of protein S by autoantibodies in patients with acquired protein S deficiency. *Thromb Haemost* 1996; 75(4):555-559.
- (31) Triplett DA, Brandt JT. Lupus anticoagulants: misnomer, paradox, riddle, epiphenomenon. *Hematol Pathol* 1988; 2(3):121-143.
- (32) FRICK PG. Acquired circulating anticoagulants in systemic collagen disease; auto-immune thromboplastin deficiency. *Blood* 1955; 10(7):691-706.
- (33) Bick RL, Baker WF, Jr. The antiphospholipid and thrombosis syndromes. *Med Clin North Am* 1994; 78(3):667-684.

- (34) Lindhoff-Last E, Humpich M, Schmitt J, Rodiger S, Seifried E, Bauersachs R. MIXCON-LA: a precise, sensitive and specific aPTT-based assay for detection of lupus anticoagulant. *Clin Appl Thromb Hemost* 2002; 8(2):163-167.
- (35) Cervera R, Piette JC, Font J, Khamashta MA, Shoenfeld Y, Camps MT et al. Antiphospholipid syndrome: clinical and immunologic manifestations and patterns of disease expression in a cohort of 1,000 patients. *Arthritis Rheum* 2002; 46(4):1019-1027.
- (36) Asherson RA, Khamashta MA, Ordi-Ros J, Derksen RH, Machin SJ, Barquinero J et al. The "primary" antiphospholipid syndrome: major clinical and serological features. *Medicine (Baltimore)* 1989; 68(6):366-374.
- (37) Lao M, Setty S, Foss C. Antiphospholipid antibody syndrome. A literature review. *Minn Med* 2001; 84(4):42-46.
- (38) Rojas-Rodriguez J, Garcia-Carrasco M, Ramos-Casals M, Enriquez-Coronel G, Colchero C, Cervera R et al. Catastrophic antiphospholipid syndrome: clinical description and triggering factors in 8 patients. *J Rheumatol* 2000; 27(1):238-240.
- (39) Fay PJ. Factor VIII structure and function. *Int J Hematol* 2006; 83(2):103-108.
- (40) Fang H, Wang L, Wang H. The protein structure and effect of factor VIII. *Thromb Res* 2006.
- (41) Herrmann FH, Wulff K. [Factors VII, VIII, IX, and X: molecular genetics and gene diagnosis]. *Hamostaseologie* 2004; 24(2):94-107.
- (42) LANDBECK G. [Blood diseases with factor VIII deficiency.]. *Thromb Diath Haemorrh* 1962; 6(Suppl 2):60-66.
- (43) Wise RJ, Dorner AJ, Krane M, Pittman DD, Kaufman RJ. The role of von Willebrand factor multimers and propeptide cleavage in binding and stabilization of factor VIII. *J Biol Chem* 1991; 266(32):21948-21955.
- (44) Josso F. [Thrombin, enzyme of hemostasis and thrombosis: a model of enzymatic autoregulation]. *Pathol Biol (Paris)* 1977; 25 Suppl:6-9.
- (45) Wise RJ, Dorner AJ, Krane M, Pittman DD, Kaufman RJ. The role of von Willebrand factor multimers and propeptide cleavage in binding and stabilization of factor VIII. *J Biol Chem* 1991; 266(32):21948-21955.
- (46) Orstavik KH, Magnus P, Reisner H, Berg K, Graham JB, Nance W. Factor VIII and factor IX in a twin population. Evidence for a major effect of ABO locus on factor VIII level. *Am J Hum Genet* 1985; 37(1):89-101.
- (47) Gill JC, Endres-Brooks J, Bauer PJ, Marks WJ, Jr., Montgomery RR. The effect of ABO blood group on the diagnosis of von Willebrand disease. *Blood* 1987; 69(6):1691-1695.
- (48) Gill JC, Endres-Brooks J, Bauer PJ, Marks WJ, Jr., Montgomery RR. The effect of ABO blood group on the diagnosis of von Willebrand disease. *Blood* 1987; 69(6):1691-1695.

- (49) Jeremic M, Weisert O, Gedde-Dahl TW. Factor VIII (AHG) levels in 1016 regular blood donors. The effects of age, sex, and ABO blood groups. *Scand J Clin Lab Invest* 1976; 36(5):461-466.
- (50) Sodetz JM, Pizzo SV, McKee PA. Relationship of sialic acid to function and in vivo survival of human factor VIII/von Willebrand factor protein. *J Biol Chem* 1977; 252(15):5538-5546.
- (51) Vlot AJ, Mauser-Bunschoten EP, Zarkova AG, Haan E, Kruitwagen CL, Sixma JJ et al. The half-life of infused factor VIII is shorter in hemophiliac patients with blood group O than in those with blood group A. *Thromb Haemost* 2000; 83(1):65-69.
- (52) O'Donnell J, Mumford AD, Manning RA, Laffan M. Elevation of FVIII: C in venous thromboembolism is persistent and independent of the acute phase response. *Thromb Haemost* 2000; 83(1):10-13.
- (53) Kamphuisen PW, Eikenboom JC, Vos HL, Pablo R, Sturk A, Bertina RM et al. Increased levels of factor VIII and fibrinogen in patients with venous thrombosis are not caused by acute phase reactions. *Thromb Haemost* 1999; 81(5):680-683.
- (54) Balleisen L, Bailey J, Epping PH, Schulte H, van de LJ. Epidemiological study on factor VII, factor VIII and fibrinogen in an industrial population: I. Baseline data on the relation to age, gender, body-weight, smoking, alcohol, pill-using, and menopause. *Thromb Haemost* 1985; 54(2):475-479.
- (55) Conlan MG, Folsom AR, Finch A, Davis CE, Sorlie P, Marcucci G et al. Associations of factor VIII and von Willebrand factor with age, race, sex, and risk factors for atherosclerosis. The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Thromb Haemost* 1993; 70(3):380-385.
- (56) Bloemenkamp KW, Rosendaal FR, Helmerhorst FM, Koster T, Bertina RM, Vandenbroucke JP. Hemostatic effects of oral contraceptives in women who developed deep-vein thrombosis while using oral contraceptives. *Thromb Haemost* 1998; 80(3):382-387.
- (57) Conlan MG, Folsom AR, Finch A, Davis CE, Sorlie P, Marcucci G et al. Associations of factor VIII and von Willebrand factor with age, race, sex, and risk factors for atherosclerosis. The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Thromb Haemost* 1993; 70(3):380-385.
- (58) Jick H, Slone D, Westerholm B, Inman WH, Vessey MP, Shapiro S et al. Venous thromboembolic disease and ABO blood type. A cooperative study. *Lancet* 1969; 1(7594):539-542.
- (59) Jick H, Porter J. Thrombophlebitis of the lower extremities and ABO blood type. *Arch Intern Med* 1978; 138(10):1566-1567.
- (60) Koster T, Blann AD, Briet E, Vandenbroucke JP, Rosendaal FR. Role of clotting factor VIII in effect of von Willebrand factor on occurrence of deep-vein thrombosis. *Lancet* 1995; 345(8943):152-155.
- (61) Kamphuisen PW, Eikenboom JC, Rosendaal FR, Koster T, Blann AD, Vos HL et al. High factor VIII antigen levels increase the risk of venous thrombosis but are

- not associated with polymorphisms in the von Willebrand factor and factor VIII gene. *Br J Haematol* 2001; 115(1):156-158.
- (62) Kamphuisen PW, Eikenboom JC, Bertina RM. Elevated factor VIII levels and the risk of thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21(5):731-738.
- (63) Rees DJ, Rizza CR, Brownlee GG. Haemophilia B caused by a point mutation in a donor splice junction of the human factor IX gene. *Nature* 1985; 316(6029):643-645.
- (64) Rizza CR, Spooner RJ, Giangrande PL. Treatment of haemophilia in the United Kingdom 1981-1996. *Haemophilia* 2001; 7(4):349-359.
- (65) Aledort LM. Factor IX and thrombosis. *Scand J Haematol Suppl* 1977; 30:40-42.
- (66) van H, V, van dL, I, Bertina RM, Rosendaal FR. High levels of factor IX increase the risk of venous thrombosis. *Blood* 2000; 95(12):3678-3682.
- (67) Lowe G, Woodward M, Vessey M, Rumley A, Gough P, Daly E. Thrombotic variables and risk of idiopathic venous thromboembolism in women aged 45-64 years. Relationships to hormone replacement therapy. *Thromb Haemost* 2000; 83(4):530-535.
- (68) Lowe GD. Factor IX and thrombosis. *Br J Haematol* 2001; 115(3):507-513.
- (69) Giannelli F, Choo KH, Rees DJ, Boyd Y, Rizza CR, Brownlee GG. Gene deletions in patients with haemophilia B and anti-factor IX antibodies. *Nature* 1983; 303(5913):181-182.
- (70) DIN - Taschenbuch 261, Hämostaseologie Normen. 2. Auflage ed. Berlin: Beuth Verlag GmbH, 2002.
- (71) Lindhoff-Last E, Humpich M, Schmitt J, Rodiger S, Seifried E, Bauersachs R. MIXCON-LA: a precise, sensitive and specific aPTT-based assay for detection of lupus anticoagulant. *Clin Appl Thromb Hemost* 2002; 8(2):163-167.
- (72) Harenberg J, Reichel T, Malsch R, Hirsh J, Rustagi P. Multicentric evaluation of heparinase on aPTT, thrombin clotting time and a new PT reagent based on recombinant human tissue factor. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1996; 7(4):453-458.
- (73) van den Besselaar AM, Meeuwisse-Braun J. Enzymatic elimination of heparin from plasma for activated partial thromboplastin time and prothrombin time testing. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1993; 4(4):635-638.
- (74) Lowe GD, Rumley A, Woodward M, Morrison CE, Philippou H, Lane DA et al. Epidemiology of coagulation factors, inhibitors and activation markers: the Third Glasgow MONICA Survey. I. Illustrative reference ranges by age, sex and hormone use. *Br J Haematol* 1997; 97(4):775-784.
- (75) White RH. The epidemiology of venous thromboembolism. *Circulation* 2003; 107(23 Suppl 1):I4-I8.
- (76) Pabinger I, Schneider B. Thrombotic risk in hereditary antithrombin III, protein C, or protein S deficiency. A cooperative, retrospective study. *Gesellschaft für*

- Thrombose- und Hamostaseforschung (GTH) Study Group on Natural Inhibitors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996; 16(6):742-748.
- (77) Oger E. Incidence of venous thromboembolism: a community-based study in Western France. EPI-GETBP Study Group. Groupe d'Etude de la Thrombose de Bretagne Occidentale. *Thromb Haemost* 2000; 83(5):657-660.
- (78) Oger E, Lacut K, Scarabin PY. [Deep venous thrombosis: epidemiology, acquired risk factors]. *Ann Cardiol Angeiol (Paris)* 2002; 51(3):124-128.
- (79) Oger E, Lacut K, Van Dreden P, Bressollette L, Abgrall JF, Blouch MT et al. High plasma concentration of factor VIII coagulant is also a risk factor for venous thromboembolism in the elderly. *Haematologica* 2003; 88(4):465-469.
- (80) Abdollahi M, Cushman M, Rosendaal FR. Obesity: risk of venous thrombosis and the interaction with coagulation factor levels and oral contraceptive use. *Thromb Haemost* 2003; 89(3):493-498.
- (81) Bloemenkamp KW, Rosendaal FR, Helmerhorst FM, Koster T, Bertina RM, Vandenbroucke JP. Hemostatic effects of oral contraceptives in women who developed deep-vein thrombosis while using oral contraceptives. *Thromb Haemost* 1998; 80(3):382-387.
- (82) Conlan MG, Folsom AR, Finch A, Davis CE, Sorlie P, Marcucci G et al. Associations of factor VIII and von Willebrand factor with age, race, sex, and risk factors for atherosclerosis. The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Thromb Haemost* 1993; 70(3):380-385.
- (83) Kluff C, Lansink M. Effect of oral contraceptives on haemostasis variables. *Thromb Haemost* 1997; 78(1):315-326.
- (84) Briet E, van Tilburg NH, Veltkamp JJ. Oral contraception and the detection of carriers in haemophilia B. *Thromb Res* 1978; 13(3):379-388.
- (85) Kluff C, Lansink M. Effect of oral contraceptives on haemostasis variables. *Thromb Haemost* 1997; 78(1):315-326.
- (86) Briet E, van Tilburg NH, Veltkamp JJ. Oral contraception and the detection of carriers in haemophilia B. *Thromb Res* 1978; 13(3):379-388.
- (87) Lowe GD. Factor IX and thrombosis. *Br J Haematol* 2001; 115(3):507-513.
- (88) Lowe G, Woodward M, Vessey M, Rumley A, Gough P, Daly E. Thrombotic variables and risk of idiopathic venous thromboembolism in women aged 45-64 years. Relationships to hormone replacement therapy. *Thromb Haemost* 2000; 83(4):530-535.

7 Anhang

7.1 Aufklärungsbogen für Probanden



Klinikum der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

Zentrum der Inneren Medizin - Medizinische Klinik I
Schwerpunkt Angiologie (Komm.Leiter: PD Dr. R. Bauersachs)

Studie zur Erstellung eines Normalkollektivs zur Validierung und Inzidenzberechnung von Thrombophilieparametern im Vergleich zu einem konsekutiv erhaltenen Patientenkollektiv mit thromboembolischen Komplikationen.

Probandeninformation und Einverständniserklärung

Sehr geehrte Probandin, sehr geehrter Proband,

vielen herzlichen Dank für Ihre Bereitschaft an der Teilnahme unserer Studie. Ziel unserer Studie ist die Erforschung von Gerinnungsfaktoren, die zu Thrombosen und zu Lungenembolien führen können und die zum Teil vererbt werden. Man kennt bereits mehrere dieser Faktoren aus Untersuchungen an Patienten, die derartige Komplikationen erleiden mussten. Unklar ist derzeit noch die Häufigkeit und Verteilung in einer gesunden Bevölkerungsgruppe, die keine derartigen Erkrankungen durchmachen mussten. Aus diesem Grund wollen wir diese Gerinnungsfaktoren und auch genetische Faktoren zur Thromboseneigung an gesunden Blutspendern wie Ihnen untersuchen.

Praktisch bedeutet die Teilnahme an unserer Studie für Sie lediglich eine einmalige zusätzliche Blutentnahme von 20 ml Blut sowie ein gemeinsames Ausfüllen eines kurzen Fragebogens. Für die Entnahme des Blutes verwenden wir eine dünne Kanüle, die für Sie keine große Belastung darstellt. Selbstverständlich steht es Ihnen zu jedem Zeitpunkt frei, die Studie ohne weitere Nachteile und ohne Auswirkungen auf die Blutspende abzubrechen.

Natürlich werden Ihre Daten unter Beachtung des Datenschutzes vertraulich behandelt. Sollten Sie über die Ergebnisse der Laboruntersuchungen gerne persönlich unterrichtet werden, müssten Sie uns Ihre Anschrift mitteilen.

Ich bin damit einverstanden, dass die im Rahmen der klinischen Prüfungen erfolgten Aufzeichnungen von Daten bei gesunden Probanden zur Überprüfung an den Auftraggeber an die zuständige Überwachungsbehörde oder die zuständige Bundesbehörde unter der Beachtung des Datenschutzes weitergegeben werden.

Ich,,
wohnhaft in,
geboren am erkläre mich damit einverstanden, an der
vorgenannten Studie teilzunehmen. Eine Kopie dieser Probandeninformation habe ich
erhalten.

..... Ort Datum Name Vorname Unterschrift Proband
..... Ort Datum Name Vorname Unterschrift Prüfarzt

7.2 Fragebogen für Probanden



Klinikum der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main

Zentrum der Inneren Medizin - Medizinische Klinik I
Schwerpunkt Angiologie (Komm.Leiter: PD Dr. R. Bauersachs)

Fragebogen Thrombophilie

Datum:

Name, Vorname:

Geburtsdatum:

Adresse/Telefon:

Geschlecht: männlich weiblich

Gewicht:kg Größe:cm

Ausschlusskriterien für die Studie

	ja	nein
Venöse Thrombose	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Lungenembolie	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Myokardinfarkt	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Schlaganfall	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Antikoagulantientherapie (z.B: Marcumar, Heparin s.c.)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Infektion , wenn ja , wie lange zurückliegend?, HIV	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Tumorleiden	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Lebererkrankungen (z.B. Leberzirrhose)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Thrombophlebitis	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Weitere statistische Informationen (kein Ausschlusskriterium !)

<i>Arteriosklerose-Risikofaktoren</i>	ja	nein	<i>Vorgeschichte</i>	ja	nein
Raucher	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Arthritis	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Diabetes mellitus	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Nierenerkrankung	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Bluthochdruck	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Lebererkrankung	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Hyperlipidämie (Cholesterin)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Blutungsneigung	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

<i>Familienanamnese</i>	ja	nein	wer
„offene Beine“	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
venöse Thrombose	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Lungenembolie	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Thrombophlebitis	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	

<i>Gynäkologische Fragen</i>	ja	nein	
Pille	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	seit wann
Anticonceptiva (prämenopausal)			Welche Wann
Hormonsubstitution (postmenopausal)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Welche Wann
Fehl- oder Totgeburt	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	SSW
Schwangerschaften	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Anzahl
Schwangerschaftskomplikationen	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Art

Medikamente :

.....

7.3 Studienprotokoll

Studienprotokoll

Ziel der Studie: Erstellung eines Normalkollektivs zur Validierung und Inzidenzberechnung von Thrombophilieparametern im Vergleich zu einem konsekutiv erhaltenen Patientenkollektiv mit thromboembolischen Komplikationen

Folgende Parameter sollen untersucht werden:

1. Faktor VIII-Aktivität (koagulometrisch)
2. Faktor IX-Aktivität (koagulometrisch)
3. Lupusantikoagulantien (DRVVT-Test und lupussensitive PTT als Screening-Methoden, PTT-Tauschtest und DRWT-Confirm mit Phospholipidzusatz als Bestätigungsteste)
4. Antiphospholipidantikörper (Anticardiolipin IgG, IgM, IgA von den Firmen Orgentec und Pharmacia, sowie Anti- β 2-Glykoprotein I-Antikörper IgG6 und IgM, Anti-Phosphatidyl Serin IgG und IgM, Anti-Phosphatidyl Inositol IgG und IgM und Anti-Phosphatidsäure IgG und IgM der Firma Orgentec)
5. Eine DNA-Extraktion erfolgt bei Patienten und Probanden, um später zusätzlich eine Genanalytik durchführen zu können (z.B. Prothrombinmutante)

Es ist geplant, **500 konsekutive Patienten der Angiologischen Ambulanz**, die sich wegen einer Phlebothrombose vorstellen, einzuschließen. Diese erhalten im Rahmen der Abklärung ihrer Thrombophilie in jedem Fall sowohl eine Genanalytik bezüglich Faktor V Leiden und der Prothrombinmutante, als auch eine Abklärung der oben genannten Parameter. Da bei frischen Phlebothrombosen der Faktor VIII vorübergehend ansteigen kann, werden nur Analysen ausgewertet, die mindestens 2 Monate nach stattgehabter Thrombose durchgeführt wurden. Patienten mit Tumoren werden ausgeschlossen, da Tumore per se zu einem erhöhten Faktor VIII führen können. Eigen-

Familienanamnese und Erhebung der Risikoprofile der Patienten werden an Hand eines standardisierten Fragebogens erhoben, damit die erhaltenen Daten einheitlich sind.

An Hand dieses Patientenkollektivs werden im Blutspendedienst **500 gesunde Blutspender ohne Thromboseneigung** als Kontrollkollektiv altersgematcht in die Studie eingeschlossen, nachdem sie eingehend über die durchzuführenden Blutuntersuchungen aufgeklärt wurden. An Hand eines standardisierten Fragebogens werden zunächst Eigen- und Familienanamnese erhoben, bevor die Blutentnahme erfolgt. Hierzu ist eine Blutentnahme von 20 ml Citratblut erforderlich, die bei den Blutspendeterminen vor der Blutspende erfolgt. Diese wird durch 2 Doktoranten vor Ort in Absprache mit dem Blutspendedienst durchgeführt. Sämtliche Blutproben werden innerhalb von 3h nach Blutentnahme entsprechend zentrifugiert und sofort bei - 70 Grad Celsius tiefgefroren. Da im Alter der Faktor VIII ansteigt, ist es vorgesehen, hier drei Altersgruppen in der Beurteilung zu bilden: 20. - 40. Lebensjahr, 40. - 60. Lebensjahr und > 60. Lebensjahr. Bei den anderen oben genannten Parametern ist eine solche Altersabhängigkeit bisher in der Literatur nicht beschrieben.

7.4 Ethikantrag



Klinikum der
Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

Prof. Dr. med. A. M. Ehrly

Frau Dr. Astrid Gießler
Ethik-Kommission

Haus 1

Zentrum der Inneren Medizin
Medizinische Klinik I
Endokrinologie, Diabetes und Angiologie
Direktor: Prof. Dr. med. K.-H. Usadel

Schwerpunkt Angiologie
Leiter: Prof. Dr. med. A. M. Ehrly
Theodor-Stern-Kai 7
60590 Frankfurt am Main
Tel. 069/6301-6096 - Fax 069/ 6301-7219

29.6.1999
pb

Antrag zur Beurteilung eines medizinischen Forschungsvorhabens im Fachbereich
Humanmedizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität

Sehr geehrte Frau Dr. Gießler,

hiermit beantragen wir die Prüfung des Forschungsvorhabens

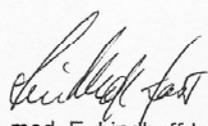
**Erstellung eines Normalkollektivs zur Validierung und Inzidenzberechnung von
Thrombophilieparametern im Vergleich zu einem konsekutiv erhaltenen
Patientenkollektiv mit thromboembolischen Komplikationen**

durch die Ethikkommission.

Das Formular Patienteninformation und die Einverständniserklärung sind beigelegt.

Mit freundlichen Grüßen


Prof. Dr. med. A. M. Ehrly


Dr. med. E. Lindhoff-Last

Anlage

ANTRAG ZUR BEURTEILUNG EINES MEDIZINISCHEN FORSCHUNGSVORHABEN IM
FACHBEREICH HUMANMEDIZIN DER JOHANN WOLFGANG GOETHE-UNIVERSITÄT

Allgemeine Angaben

1. Datum der Antragstellung:

22. Juni 1999

2. Bezeichnung des Vorhabens:

Erstellung eines Normalkollektivs zur Validierung und Inzidenzberechnung von Thrombophilieparametern im Vergleich zu einem konsekutiv erhaltenen Patientenkollektiv mit thromboembolischen Komplikationen.

3. Handelt es sich um eine multizentrische Studie ?

Nein

4. Hauptuntersuchender:

Frau Dr. med. E. Lindhoff-Last

5. Sonstige Untersuchende:

Dr. med. C. Thalhammer
cand. med. J. Schmitt
cand. med. M. C. Humpich

6. Abteilung und medizinisches Zentrum, in dem das Vorhaben durchgeführt werden soll:

Klinikum der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Zentrum der Inneren Medizin
Medizinische Klinik I
Schwerpunkt Angiologie
Gerinnungslabor

7. Abteilungsleiter:

Prof. Dr. med. A. M. Ehrly

8. Kostenträger:

entfällt

9. Wurde schon ein Antrag gleichen Inhalts bei einer anderen Ethik-Kommission gestellt?

nein

Beschreibung des Vorhabens

1. Ziel der Studie:

Erstellung eines Normalkollektivs zur Validierung und Inzidenzberechnung von Thrombophilieparametern im Vergleich zu einem konsekutiv erhaltenen Patientenkollektiv mit thromboembolischen Komplikationen.

2. Geplanter Beginn der Untersuchung und voraussichtliche Dauer der Studie:

Juli 1999 bis Dezember 1999

3.

a) Untersuchung an Patienten:

Anzahl/stationär: keine

Anzahl/ambulant: 500

Untersuchung an gesunden Probanden:

Anzahl: 500

b) Voraussichtliche Dauer der Behandlung- bzw. Untersuchungsphase für den einzelnen Patienten/Probanden: 10 Minuten

c) Alter der Patienten/Probanden: 18 Jahre bis 80 Jahre

d) Einschlusskriterien für Patienten/Probanden:

thromboembolische Komplikationen bei Patienten
keine thromboembolische Komplikationen bei Probanden
schriftliches Einverständnis der Patienten und Probanden

e) Ausschlusskriterien für Patienten/Probanden:

keine

4.

a) Studienart: Offene Studie: case-control-Studie

b) Dosis: entfällt

5. Handelt es sich um

Eine diagnostische Prüfung: ja

Eine therapeutische Prüfung: nein

Eine Verträglichkeitsprüfung: nein

Eine epidemiologische Prüfung: ja

Eine sonstige Prüfung: nein

6. Handelt es sich um einen Versuch, auf den das Arzneimittelgesetz Anwendung findet:

nein

einen Versuch, auf den die Strahlenschutzordnung oder die Röntgenverordnung Anwendung finden:

nein

7. Bei Arzneimittelprüfungen:

Sind die Unterlagen beim Bundesgesundheitsamt hinterlegt ? entfällt

Neu entwickelt, nicht registriert: entfällt

Bekannt, nicht registriert: entfällt

Bekannt, registriert: entfällt

Zugelassen: entfällt

Zugelassen, mit neuer Indikation und/oder Dosierung: entfällt

In andern Ländern zugelassen oder registriert: entfällt

8. Bestehen Zweifel an den Voraussetzungen der einschlägigen Paragraphen 40 und 41 des Arzneimittelgesetzes ?

entfällt

9. Bei sonstigen Untersuchungen:

Bestehen Zweifel an der Übereinstimmung des Vorhabens mit der revidierten Deklaration von Helsinki vom 10.10.1975 ?

nein

10. Dient die Studie unmittelbar dem Interesse der Patienten ?

nein, mittelbar

einem rein wissenschaftlichen Ziel ohne unmittelbaren diagnostischen und therapeutischen Wert für die Patienten ?

nein

dem untersuchenden Patienten ?

nein

der künftigen Entwicklung von diagnostischen und therapeutischen Verfahren ?

Ja

Der Gewinnung von Erkenntnissen über Ursachen von Pathophysiologie und Prognose bestimmter Krankheiten ?

Ja

Der Gewinnung von Erkenntnissen über spezielle Fragen des Gesundheitszustandes der Bevölkerung ?

Ja

Sonstige Zielsetzung:

nein

11. Bestehen Risiken für die Versuchsperson und Patienten ?

Nein

12. Inwieweit bedeutet die Studie eine zusätzliche Belastung für Patienten oder Probanden ?

Außer Blutentnahme keine Belastung

13. Welche typischen Nebenwirkungen oder Komplikationen sind zu erwarten ?

Hämatom nach Venenpunktion

14. Wie können Komplikationen erkannt und behandelt werden ?

Es sind keine Komplikationsfolgen zu erwarten.

15. Besteht ein Versicherungsschutz ?

Nein, nicht erforderlich

16. Ist der Leiter der klinischen Prüfung durch einen für die pharmakologisch-toxikologische Prüfung verantwortlichen Wissenschaftler über die Ergebnisse dieser Prüfung und die voraussichtlich mit der klinischen Prüfung verbundenen Risiken informiert worden ?

Es wird keine die pharmakologisch-toxikologische Prüfung durchgeführt, da keine Medikamente verabreicht werden.

17. Sind bereits oder werden zur Zeit gleichartige oder ähnliche Vorhaben durchgeführt worden ?

Nein

18. Zusammenfassung der für die Durchführung der klinischen Prüfung wesentlichen Vorergebnisse:

keine

19. Risiko – Nutzen – Abwägung:

Bis auf zusätzliche Blutentnahme kein Risiko für Probanden und Patienten, einmalige Blutentnahme von 20 ml

20. Sind Zwischenauswertungen vorgesehen und welche Abbruchkriterien bestehen gegebenenfalls ?

Nein

Wie wird über die Studie aufgeklärt ?

1. Über das Ziel der Studie:

Durch ein Informationsblatt, das dem Probanden ausgehändigt wird.
Bei den Patienten wird ein Routinethrombosescreening im Labor durchgeführt, das die entsprechenden Laborteste enthält, die im Normalkollektiv auf ihre Inzidenz hin untersucht werden.

2. Über die praktische Durchführung:

Siehe Informationsblatt.

3. Über den zu erwartenden Nutzen:

Siehe Informationsblatt.

4. Über die möglichen Risiken:

Siehe Informationsblatt.

5. Über die mit der Studie verbundenen Belästigungen:

Siehe Informationsblatt.

6. Über das Verweigerungsrecht bzw. die Möglichkeit, aus der Studie auszusteigen:

Siehe Informationsblatt.

7. Wer klärt auf ?

Frau Dr. med. E. Lindhoff-Last
Dr. med. C. Thalhammer
cand. med. J. Schmitt
cand. med. M. C. Humpich

Den Versuchsplan sowie ein Muster der Einverständniserklärung habe ich als Anlage beigefügt.

Frankfurt am Main, der 22. Juni 99


.....
Unterschrift des Studienleiters
Dr. med. E. Lindhoff-Last

Mit der Durchführung des
Forschungsvorhabens einverstanden:

.....
Unterschrift Leiter der Abteilung
Prof. Dr. med. A. M. Ehrly

7.5 Ethikvotum



Fachbereich Humanmedizin / Klinikum der Johann
Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

Ethik-Kommission Der
Vorsitzende

Frau
7239

Dr. Edelgard Lindhoff-Last
Medizinische Klinik I
frankfurt.de

Dr. Astrid Gießler
Telefon: (0 69) 63 01- 4597 od.

Telefax: (0 69) 63 01- 5922
e-mail: A.Giessler@em.uni-

15. September 1999

Geschäfts-Nr.: 133/99

BITTE STETS

ANGEBEN!

**Erstellung eines Normalkollektivs zur Validierung und Inzidenzberechnung von
Thrombophilieparametern im Vergleich zu einem konsekutiv erhaltenen
Patientenkollektiv mit thromboembolischen Komplikationen**

Sehr geehrte Frau Lindhoff-Last,

die Ethik-Kommission des Fachbereichs Humanmedizin der J. W. Goethe-Universität Frankfurt am Main hat sich am 13.09.1999 mit Ihrem vorgenannten Antrag befaßt und um einige Änderungen und Ergänzungen in der Patienteninformation und um Nachreichung eines Protokolls gebeten.

Nachdem Sie am 13.09.1999 eine entsprechend geänderte Fassung der Patienteninformation und das Protokoll vorgelegt haben, kann ich Ihnen mitteilen, daß nunmehr keine berufsrechtlichen und berufsethischen Bedenken gegen die Durchführung der obengenannten Studie bestehen. Wir bewerten die Studie zustimmend.

Über alle schwerwiegenden oder unerwarteten unerwünschten Ereignisse, die während der Studie auftreten und die Sicherheit der Studienteilnehmer oder die Durchführung der Studie beeinträchtigen könnten, muß der Vorsitzende der Ethik-Kommission unterrichtet werden. Eine Information über den Abschluß der Studie wird erbeten.

Nachfolgend sind die Mitglieder der Ethikkommission aufgeführt, die in der Sitzung am 13.09.1999 die o.g. Studie beurteilt haben:

Vorsitzender: Herr Prof. Dr.med. Dr.h.c. H. Breddin (Innere Medizin)

Herr Prof. Dr.med. M. Behne (Anästhesiologie)
Frau Dr.jur. M. Kayßer (Rechtswissenschaften)
Herr Prof. Dr.med. H. Bratzke (Rechtsmedizin)
Herr PD Dr.med. S. Harder (Pharmakologie)
Frau Prof. Dr. med. E. Helm (Innere Medizin)

Mit freundlichen Grüßen

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'iv. Gerchow', with a long horizontal flourish extending to the right.

Prof. Dr. med. J. Gerchow Vorsitzender

7.6 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Jörn Schmitt
Geburtsdatum: 27. Juli 1976
Geburtsort: Frankfurt am Main, Deutschland
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung

1982 –1986: Grundschule, Ebelfeldschule Frankfurt am Main
1986 -1995: Liebig - Gymnasium, Frankfurt am Main
1995: Abitur

Studium

1996 - 2003 Medizin an der Johann Wolfgang Goethe -
Universität, Frankfurt/Main.
09/1998 Ärztliche Vorprüfung (Physikum)
08/1999 Erster Abschnitt (1.Staatsexamen)
03/2002 Zweiter Abschnitt (2.Staatsexamen)
05/2003 Dritter Abschnitt (3.Staatsexamen)

Tätigkeit als Assistenzarzt

09/2003 – Heute Kerckhoff – Klinik Bad Nauheim, Abteilung für
Kardiologie, Direktor: Prof. Dr. C.W. Hamm
06/2006 - Heute Fellow im Fellowship Herzrhythmus;
Direktoren: Prof. J. Neuzner, Prof. M. Block
und Prof. H.U. Klein

Frankfurt am Main, den 11.09.2006

7.7 Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin der Johann Wolfgang Goethe - Universität in Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel:

„Aktivitäten der Gerinnungsfaktoren VIII und IX bei Normalpersonen und Patienten mit venösen Thrombosen“

im Zentrum der Inneren Medizin des Klinikums der Johann Wolfgang Goethe Universität, Frankfurt am Main, Medizinische Klinik III, Schwerpunkt Angiologie unter der Leitung von Frau PD Dr. med. E. Lindhoff-Last

ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner in- und ausländischen Medizinischen Fakultät bzw. Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Frankfurt am Main, den 11.09.2006