



***ex-TDT*: Ein Thrombingerierungstest für den extrinsischen Weg der Blutgerinnung**

Sonja Zürn

2018

Klinik für Anästhesiologie

der Ludwig-Maximilian-Universität München

Direktor: Prof. Dr. Bernhard Zwißler

Aus der Klinik für Anästhesiologie
Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. Bernhard Zwißler

*ex-TDT: Ein Thrombingerierungstest für den
extrinsischen Weg der Blutgerinnung*

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Sonja Zürn
aus
Backnang
2018

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Bernhard Heindl

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Bernd Engelmann
Prof. Dr. Helmut Ostermann

Mitbetreuung durch die

Promovierte Mitarbeiterin: Dr. Susanne Lison

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 12.04.2018

Teile der Doktorarbeit wurden bereits auf der 57. Jahrestagung der Gesellschaft für Transfusionsmedizin und Hämostaseologie in München 2013 veröffentlicht:

Poster: Extrinsic activation of the thrombin dynamics test in patients on oral anticoagulation with phenprocoumon

Abkürzungsverzeichnis

aPTT	activated partial thromboplastin time (aktivierte Thromboplastinzeit)
AT	Antithrombin
AUC	area under the curve („Fläche unter der Kurve“)
BCS	Behring Coagulation System (Gerinnungsmessgerät der Firma Behring)
CAT	calibrated automated thrombin generation („geeichte automatisierte Thrombinbildung“)
CTI	corn trypsin inhibitor
DIC	disseminated intravascular coagulation (disseminierte intravasale Gerinnung)
DVT	deep venous thrombosis (tiefe Venenthrombose)
ETP	endogenous thrombin potential („endogenes Thrombinpotential“)
ex-TDT	extrinsischer Thrombin Dynamik Test
F.II, V,...	Faktor II, V,...
F.IIa	aktivierter Faktor II = Thrombin
HC II	heparin cofactor II
IBE	Institut für Medizinische Informatik Biometrie Epidemiologie
IL-1	Interleukin I
INR	international normalized ratio (internationale normierte Ratio)
in-TDT®	intrinsischer Thrombin Dynamik Test
ISI	International Sensivity Index
ISTH	International Society on Thrombosis and Haemostasis
LMWH	low molecular weight heparin (niedermolekulares Heparin)
LPS	Lipopolysaccharide
LT	lag time

	(Latenzzeit)
LTA	Licht- T ransmissions- A ggregometrie (= „Born-Aggregation“)
MW	M ittelwert
PAI-I	P lasminogen- A ktviator-Inhibitor Typ I
PAR	p rotease- a ctivated receptor („Protease-aktivierter Rezeptor“)
PFA-100	p latelet f unction a nalyzer (Thrombozytenfunktions-Analysegerät)
PFP	p latelet f ree p lasma (plättchenfreies Plasma)
PL	P hospholipide
PN I	P rotease N exin I
POC	p oint o f c are („Labordiagnostik am Patientenbett“)
PPP	p latelet p oor p lasma (plättchenarmes Plasma)
PRP	p latelet r ich p lasma (plättchenreiches Plasma)
PS	P rotaminsulfat
PT	p rothrombin t ime (Prothrombinzeit)
rF.VIIa	r ekombinanter a ktivierter F aktor VII
sec	s econd (Sekunde)
SP	s tandard human p lasma (Standardhumanplasma)
StabwN	Standardabweichung aus seiner Grundgesamtheit
s.u.	siehe u nten
TAFI	t hrombin- a ctivated f ibrinolysis i nhibitor (Thrombin-aktivierter Fibrinolyse-Inhibitor)
TAT	T hrombin- A ntithrombin-Komplex
TDT	t hrombin d ynamic t est (Thrombin Dynamik Test)
TEG	T hrombelastographie

TF	tissue factor („Gewebefaktor“)
TFPI	tissue factor pathway inhibitor („Inhibitor des gewebefaktorinduzierten Wegs“)
TM	Thrombomodulin
TNF- α	Tumornekrosefaktor α
TTP	time to peak („Zeit bis zum Maximum“)
UFH	unfraktioniertes Heparin
vWF	von-Willebrand-Faktor
vWS	von-Willebrand -Syndrom
z.B.	zum Beispiel

Inhalt

1	Einleitung	1
1.1	Das Hämostasesystem	1
1.1.1	Initiation	4
1.1.2	Amplifikation	5
1.1.3	Propagation	6
1.1.4	Termination	7
1.2	Die Rolle des Thrombins	9
1.3	Die Rolle des Tissue Factors	12
1.4	Laborchemische Untersuchung des Gerinnungssystems	14
1.4.1	Globaltests	14
1.4.2	Diagnostische Lücken	15
1.4.3	Spezifische, klinisch etablierte Gerinnungstests	17
1.4.4	in-TDT - ein weiterer, spezifischer Gerinnungstest	18
1.5	Zielsetzung und Fragestellung	20
2	Materialien und Methoden	22
2.1	Materialien und Geräte	22
2.1.1	Auflistung der verwendeten Materialien	22
2.1.2	Auflistung der verwendeten Geräte	23
2.1.3	Verwendetes Plasma	23
2.1.4	Aufbereitung des Plasmas	24
2.2	Methoden	25
2.2.1	Durchführung des ex-TDT	25
2.2.2	ex-TDT-Messung zur Auswahl des geeigneten Tissue factors (TF)	27
2.2.3	ex-TDT-Messung zur Ermittlung eines Normalkollektivs	27
2.2.4	ex-TDT-Messungen bei Faktor-Mangel-Plasmen	28
2.2.5	ex-TDT-Messung bei hypokoagulatorischem Patientenplasmen	28

2.2.6	ex-TDT-Messung bei maximal möglicher Thrombingenerierung	28
2.2.7	ex-TDT-Messung bei hyperkoagulatorischem Plasma schwangerer Patientinnen	29
2.2.8	Auswertung und statistische Methoden	29
3	Ergebnisse	31
3.1	Auswahl des Tissue Factors	31
3.1.1	Recombiplastin	33
3.1.2	Innovin	34
3.1.3	PPP	35
3.1.4	Thromborel	36
3.1.5	Ausgewählte Tissue Faktoren	37
3.2	Ergebnisse der ex-TDT-Messungen beim gesunden Spenderkollektiv	38
3.3	Ergebnisse der ex-TDT-Messungen bei Faktor-Mangelplasmen	39
3.4	Ergebnisse der ex-TDT-Messungen bei hypokoagulatorischen Plasmen	44
3.4.1	Plasmarückstellproben bei Einzelfaktormangel	44
3.4.2	Plasmaproben marcumarisierter Patienten	45
3.5	Ergebnisse der ex-TDT-Messungen beim Normalkollektiv unter Zugabe von PPSB	48
3.6	Ergebnisse der ex-TDT-Messungen von marcumarisiertem Plasma unter Zugabe von PPSB	50
3.7	Ergebnisse der ex-TDT-Messungen von Plasma schwangerer Patientinnen als Beispiel für Hyperkoagulation	54
4	Diskussion	58
4.1	ex-TDT im Vergleich zu „Calibrated Automated Thrombin Generation“ (CAT)	60
4.2	Durchführbarkeit des ex-TDT	63
4.3	Einfluss des Tissue Factors auf die Thrombingenerierung	64
4.4	Aussagekraft des ex-TDT	65
4.4.1	Der ex-TDT beim „Normalkollektiv“	65

4.4.2	Aussagekraft bei Hypokoagulation (angeboren, sowie medikamentös verursacht)	66
4.4.3	Aussagekraft bei Hyperkoagulation	68
4.5	ex-TDT als potentieller zukünftiger Globaltest	70
5	Zusammenfassung	73
6	Literaturverzeichnis	76
7	Danksagung	81
8	Eidesstattliche Erklärung	82
Ort, Datum	Unterschrift Doktorandin	82

1 Einleitung

1.1 Das Hämostasesystem

Das hämostatische System schützt den Körper im Falle einer Verletzung der Gefäße vor unkontrolliertem Blutverlust und Einblutungen in das umliegende Gewebe. Dies ist nur durch ein perfektes Zusammenwirken von vaskulären, zellulären und plasmatischen Komponenten möglich (vgl. [1]).

Die primäre Hämostase kommt hauptsächlich durch Vasokonstriktion und den mechanischen Verschluss kleiner Gefäße durch Thrombozytenaggregation zustande (vgl.[2]). Die Adhäsion der Thrombozyten an den Wundrändern unter hohen Scherkräftebedingungen, wie sie im arteriellen Gefäßsystem vorliegen, wird überwiegend durch den von-Willebrand-Faktor (vWF) sowie durch die thrombozytären Rezeptoren für die subendothelialen Matrixproteine (zum Beispiel (= z.B.) Kollagen, Fibronectin, Laminin) vermittelt.

Durch die Bindung des vWF zwischen Subendothel und dem Glykoproteinkomplex Ib/IX/V auf der Thrombozytenoberfläche und die bis dahin schon gebildete kleine Thrombinmenge (s.1.1.2) werden die Thrombozyten aktiviert. Die Folgen davon sind: Formänderung, Offenlegen von Phospholipiden und Freisetzung von Gerinnungsmediatoren. Die Formänderung geschieht durch Ausbildung von Pseudopodien (Ausstülpungen der Plasmamembran), wodurch die Thrombozyten besser aneinander und an der Plasmamembran haften können (vgl.[3]). Außerdem werden hierdurch negativ geladene Phospholipide nach außen gekehrt und so in Verbindung mit positiv geladenen Calciumionen für die Gerinnungsfaktoren eine prokoagulatorische Zelloberfläche geschaffen [4]. Nach ihrer Aktivierung schütten die Thrombozyten Granula aus, die weitere Mediatoren für die Aggregation sowie die Gerinnungsfaktoren Faktor VII (F.VII) und Faktor V (F.V) enthalten.

Da der gebildete Thrombozytenthrombus noch sehr labil ist, muss er im Zuge der sekundären Hämostase durch Bestandteile der plasmatischen Gerinnung stabilisiert werden.

Um die plasmatische Gerinnung zu beschreiben, nutzte man lange Zeit das sogenannte Kaskaden- oder Wasserfallmodell, welches von Macfarlane, Davie und Ratnoff [5, 6] bereits 1964 entworfen wurde. Dieses Modell unterteilt sich in einen „extrinsischen“ und

„intrinsischen“ Weg, wobei jeder aus der Abfolge von sich nacheinander proteolytisch aktivierenden Enzymen besteht, die mit der Aktivierung des Faktor X (F.X) in eine gemeinsame Endstrecke münden (s. Abb.1). Am Ende steht die Bildung von Thrombin aus Prothrombin, welches wiederum Fibrinogen zu Fibrin umwandelt. Faktor XIII (F.XIII) stabilisiert das entstehende Gerinnsel.

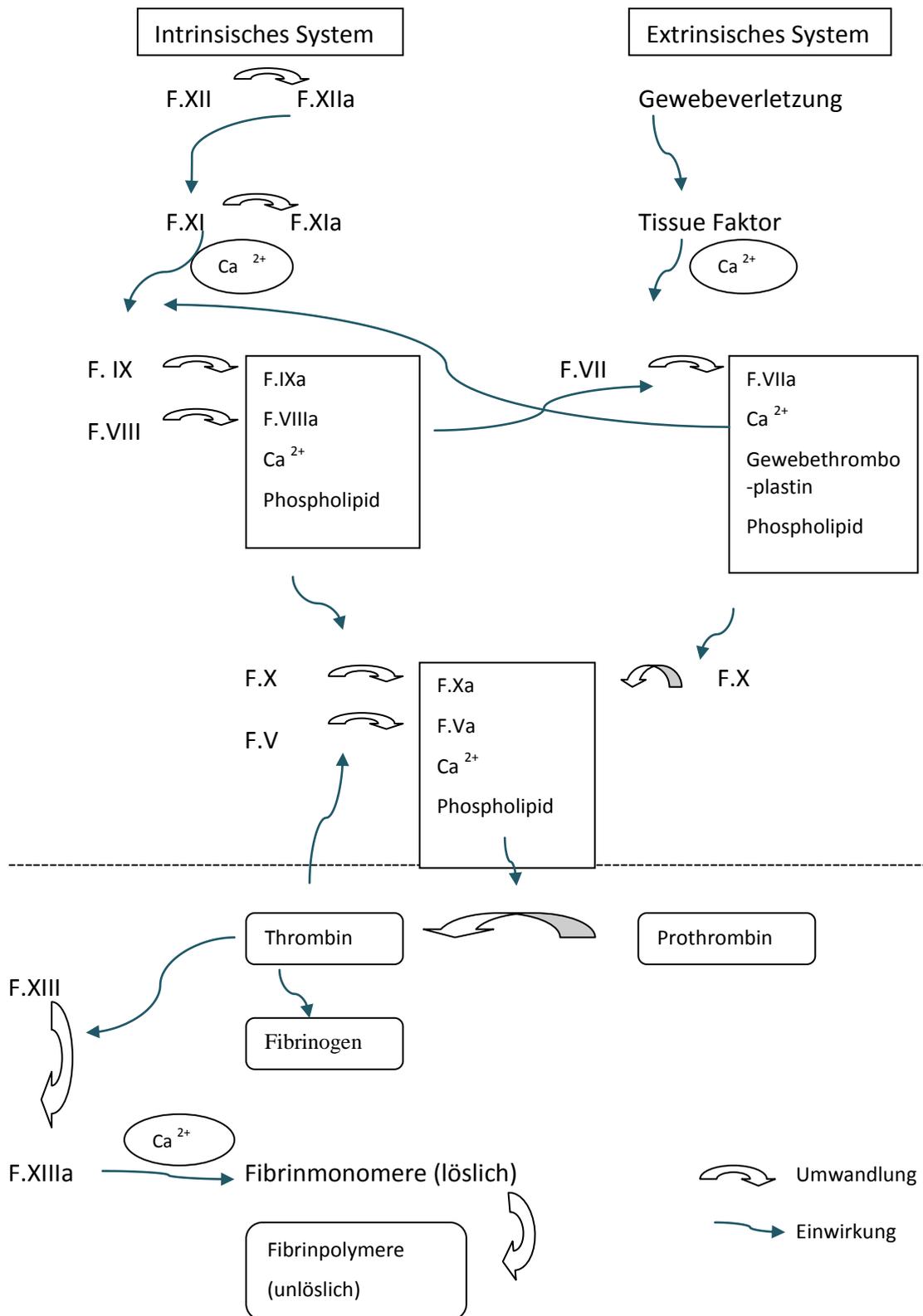


Abb.1: Kaskadenmodell der sekundären Hämostase; stark vereinfacht und modifiziert nach [7].

Diese ursprüngliche Vorstellung eignet sich gut, um die Screeningtests „Prothrombin time“ (= PT) und aktivierte Thromboplastinzeit (= aPTT), die mit dem „extrinsischen“ und „intrinsischen“ Weg korrespondieren, darzustellen.

Das Modell erklärt jedoch nicht ausreichend die physiologischen und pathophysiologischen Gegebenheiten der *in vivo* Gerinnung. Patienten mit einem Mangel an Faktor VIII (= F.VIII) oder Faktor IX (= F.IX) leiden an Hämophilie A bzw. B, einer Krankheit, die zu lebensbedrohlichen Blutungen führen kann, während ein Faktor XI (=F.XI)-Mangel sich viel geringer auf die Gerinnung auswirkt [8]. Ein Faktor XII (= F.XII)-Mangel, der erste Gerinnungsfaktor auf der „intrinsischen“ Seite, führt sogar zu keiner erhöhten Blutungsgefahr [9].

Dieses Modell der Blutgerinnung wurde in den vergangenen Jahren durch ein zellbasiertes Modell von Hoffman und Monroe abgelöst, in dem Zellen, v.a. Tissue factor (TF)-tragende Zellen und Thrombozyten, mit den von ihnen exprimierten Oberflächenstrukturen als Bindestelle für die Gerinnungsfaktoren eine wichtige Rolle spielen [9]. In diesem Modell werden der „extrinsische“ und „intrinsische“ Weg nicht mehr getrennt voneinander betrachtet. Man sieht vielmehr die zellulären und plasmatischen Bestandteile zusammen in einem System, in dem sie sich gegenseitig in sich überlappenden Phasen aktivieren und auch hemmen [9]. Diese Abläufe werden in Initiation (Beginn), Amplifikation (Verstärkung) und Propagation (Ausweitung) unterteilt [4, 10].

1.1.1 Initiation

Der erste Schritt der Hämostase findet auf TF-tragenden Zellen statt. Diese Zellen kommen nicht im Gefäßsystem, sondern nur in den umgebenden Gewebszellen vor, um eine unkontrollierte Gerinnungsaktivierung zu vermeiden. Der TF ist ein integraler Membranbestandteil dieser Zellen.

Erst nach Gewebsverletzung kommen die TF-tragenden Zellen mit dem endogenen F.VII/F.VIIa des zirkulierenden Blutes in Kontakt [11]. F.VII ist der einzige Gerinnungsfaktor, von dem sich schon 1% in aktivierter Form (F.VIIa) im Blut befindet [12], alle anderen Faktoren müssen erst aktiviert werden (s. Abb.2).

Auf der Oberfläche den TF-tragenden Zellen aktiviert der TF/F.VIIa Komplex F.X zu F.Xa und F.IX zu F.IXa.

Neben TF befindet sich auf den TF-tragenden Zellen auch F.V, der zusammen mit F.Xa nun den sogenannten Prothrombinase-Komplex (vgl. [13]) bildet (s. Abb.2).

Diese Verbindung ist in der Lage, aus dem sich in der Umgebung der Zelle befindenden Prothrombin, kleine Mengen an Thrombin zu bilden [14] (s. Abb.2).

Die Bildung und Wirkung von F.Xa ist in dieser Phase nur auf der Zelloberfläche der TF-tragenden Zellen möglich. Sobald F.Xa von diesen Zellen weg dissoziiert, wird er sofort von dem sich im Blut befindenden Tissue Factor Pathway Inhibitor (=TFPI) und Antithrombin (AT) inhibiert [4]. Dadurch stellt der Organismus sicher, dass nur am Ort der Verletzung und nicht disseminiert, Gerinnung erfolgt.

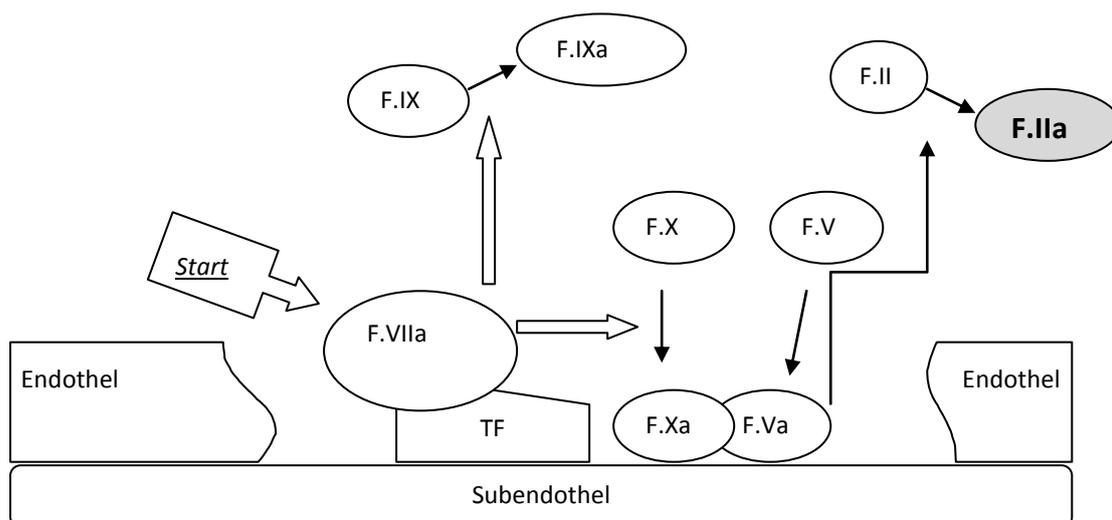


Abb.2: Initiation. F.VIIa bindet an die TF-tragende Zelle und startet die Gerinnung. F.IX und X werden aktiviert. Der F.Xa/V.a-Komplex aktiviert F.II, es bilden sich kleine Mengen Thrombin.

(basierend auf [4, 9]).

1.1.2 Amplifikation

Die Initiationsphase endet mit der Bildung von Thrombin, welches als Initialzündung für die nachfolgenden Gerinnungsvorgänge wirkt.

Die initial gebildete Thrombinmenge bindet rezeptorvermittelt an Thrombozyten und führt zu deren Aktivierung, d.h. die Thrombozyten durchlaufen nun die bereits erwähnten prokaogulatorischen Veränderungen (s.1.1) (s.Abb. 3).

Des weiteren aktiviert Thrombin die thrombozytär gebundenen Faktoren XI und V zum F.XIa und F.Va. Thrombin spaltet ebenso die im Plasma befindliche vWF/F.VIII-Verbindung [9, 10], wodurch eine Aktivierung des F.VIII zum F.VIIIa durch Thrombin möglich ist (s. Abb.3).

So lagern sich auf der aktivierten Thrombozytenoberfläche nun die Kofaktoren des Tenase (F.VIIIa/F.IXa)- sowie des Prothrombinase (F.Va/F.Xa)-Komplexes an [11], welche wichtige Verstärkermechanismen in der weiteren Thrombingenerierung, d.h. der Propagation, darstellen.

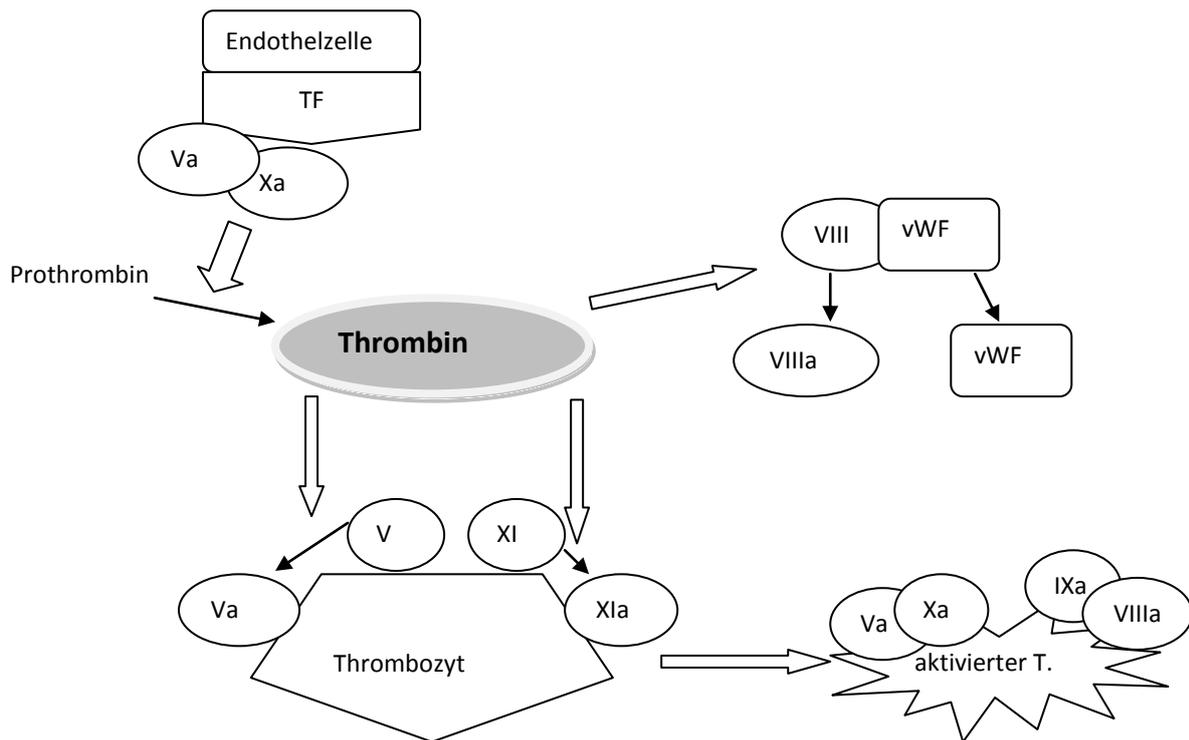


Abb.3: Amplifikation. Das initial gebildete Thrombin bindet an Thrombozyten. Hier aktiviert es die Faktoren V und XI, die Thrombozyten durchlaufen prokoagulatorische Veränderungen. Die F.VIII/vWF-Verbindung wird gespalten, F.VIII aktiviert (basierend auf [4, 9]).

1.1.3 Propagation

Tenase- und Prothrombinase-Komplexe haben wesentlich Anteil am sogenannten „Thrombinburst“, d.h. einer explosiven Thrombinbildung, die schließlich in der Thrombusbildung mündet.

Die thrombinaktivierten Thrombozyten exprimieren negativ geladene Phospholipide, an die sich der Tenase (F.VIIIa/F.IXa)-Komplex anlagert und auf deren Oberfläche der Tenase-Komplex zu einer weiteren Aktivierung von Faktor X zu F.Xa führt (s. Abb.4).

Faktor Xa bildet schnell mit dem thrombozytär gebundenen F.Va den Prothrombinase-Komplex und ist so in der Lage, große Mengen an Prothrombin in Thrombin umzuwandeln.

Die von Thrombin selbst hervorgerufene Verstärkung durch die Aktivierung der Kofaktoren V, VIII und XI führt zu einer 1000fachen Vervielfachung der Thrombinbildung (s. [11]), Abb.4).

Das gebildete Thrombin spaltet von Fibrinogen die Fibrinopeptide A und B in Monomere, die spontan polymerisieren und ein Gerinnsel bilden [11]. Stabilisiert wird das Gerinnsel durch den Faktor XIII, der ebenfalls durch Thrombin aktiviert wird [9, 15] (s. Abb.4).

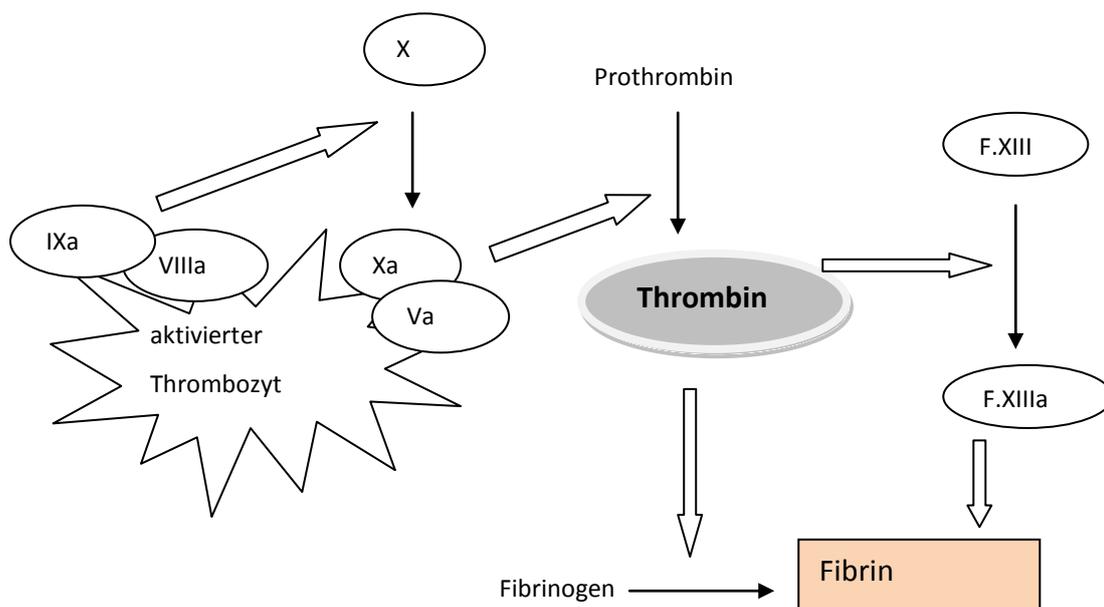


Abb.4: Propagation. Der Tenasekomplex lagert sich auf dem aktivierten Thrombozyten an und aktiviert F.X zu F.Xa. F.IXa bildet mit F.Va den Prothrombinasekomplex, welcher in der Lage ist große Mengen Prothrombin in Thrombin zu spalten. Thrombin bildet Fibrin, dieses wird durch F.XIII stabilisiert (basierend auf [4, 9]).

1.1.4 Termination

Endothelzellen bieten nicht nur die Reaktionsfläche für die prokoagulatorische Seite der Gerinnung, sie sind gleichfalls auch für antikoagulatorische Effekte zuständig.

Während der Thrombinbildung diffundiert stets ein kleiner Teil des Thrombins weg vom Ort der Verletzung und gelangt in den Blutkreislauf. Entweder wird es dann dort sofort von ebenfalls zirkulierendem AT inhibiert oder bindet, sobald es auf eine intakte Endothelzelle trifft, an das dortige Thrombomodulin (= TM), mit dem es einen Komplex bildet und

hierdurch seine Spezifität ändert. Der TM/Thrombin-Komplex aktiviert Protein C, welches zusammen mit Protein S die Faktoren F.Va und F.VIIIa inaktiviert [10, 13].

1.2 Die Rolle des Thrombins

Thrombin (F.IIa) spielt in der Hämostase eine zentrale Rolle. Es kann sowohl aktivierend, als auch inhibierend auf die Gerinnung wirken und beeinflusst die Fibrinolyse. Daneben ist es an Entzündungsreaktionen beteiligt [16]. Ist die Funktion des Thrombins in irgendeiner Weise gestört, kann es folglich entweder zu Blutungen oder Thrombosen kommen [17].

Thrombin ist eine Serinprotease, auf deren Oberfläche sich 2 „loops“ (Schleifen), die das aktive Zentrum umgeben und 2 Anionen-Bindungsstellen befinden. Diese negativ geladenen Bindungsstellen reagieren mit den Cofaktoren und Substraten von Thrombin und ermöglichen so eine Interaktion [17].

Die prokoagulatorischen Wirkungen des Thrombin sind (s. auch Abb.5):

- Proteolytische Abspaltung zweier Fibrinopeptide von Fibrinogen, wodurch Fibrin entsteht. Die einzelnen Fibrinmonomere können spontan polymerisieren und ein stabilisierendes Netzwerk um die bereits aggregierten Thrombozyten bilden [17, 18].
- Thrombin aktiviert den F.XIII zu F.XIIIa (s. Abb.4). Dieser trägt zur Stabilität des Fibrinnetzes bei, indem er die Glutamin- und Lysinreste der Fibrinmonomere miteinander quervernetzt [18].
- Das Fibringerinnsel wird zudem noch durch den TAFI (= thrombin-activated fibrinolysis inhibitor) stabilisiert. Dieser wird durch den Thrombin-Thrombomodulin-Komplex aktiviert und entfernt die Lysinreste am Fibrin. Diese wirken sonst als Bindungsstellen für fibrinolytische Proteine [17, 18].
- Thrombin kann seine eigene Bildung über eine feedback-Schleife verstärken. Ein Teil des in der frühen Initiations-Phase gebildeten Thrombins aktiviert die Faktoren V und VIII [9, 17], die zusammen mit den F.Xa und F.IXa jeweils einen Komplex bilden können, der zur Thrombinbildung führt (s. 1.1.2: Amplifikation und Abb.3) [10, 17].
- Durch die Aktivierung des F.XI zu F.XIa durch Thrombin kann mehr F.IXa gebildet werden, was wiederum in einer gesteigerten Thrombingenerierung mündet [4, 9, 18].
- Die kleine Menge Thrombin, die initial durch den TF-F.VIIa/F.Xa-Komplex gebildet wird, aktiviert über die PAR 1 (= protease-activated receptor) und PAR 4, die

anhaftenden Plättchen [19, 20]. Diese durchlaufen die bereits beschriebenen gerinnungsfördernden Veränderungen (s.1.1 und 1.1.2) [4, 18].

Die antikoagulatorischen Wirkungen des Thrombin (s. auch Abb.5):

- Thrombin führt über die Aktivierung von Protein C in Verbindung mit dessen Kofaktor Protein S zur Inhibition der Faktoren Va und VIIIa (s. 1.1.4: Termination). Zusätzlich ist aktiviertes Protein C in der Lage die Thrombingenerierung abzuschwächen [17].
- Der Thrombin/TM-Komplex hemmt den Plasminogen-Aktivator-Inhibitor (= PAI-I), hierdurch wird eine Steigerung der Fibrinolyse erreicht.

Die Thrombinbildung wird zusätzlich zur eigenen Inhibition in seiner Wirkung begrenzt durch:

TFPI (inaktiviert F.Xa, wenn er sich in einem Komplex mit TF/F.VIIa befindet),

AT (hemmt F.Xa und Thrombin) [16, 18, 20, 21].

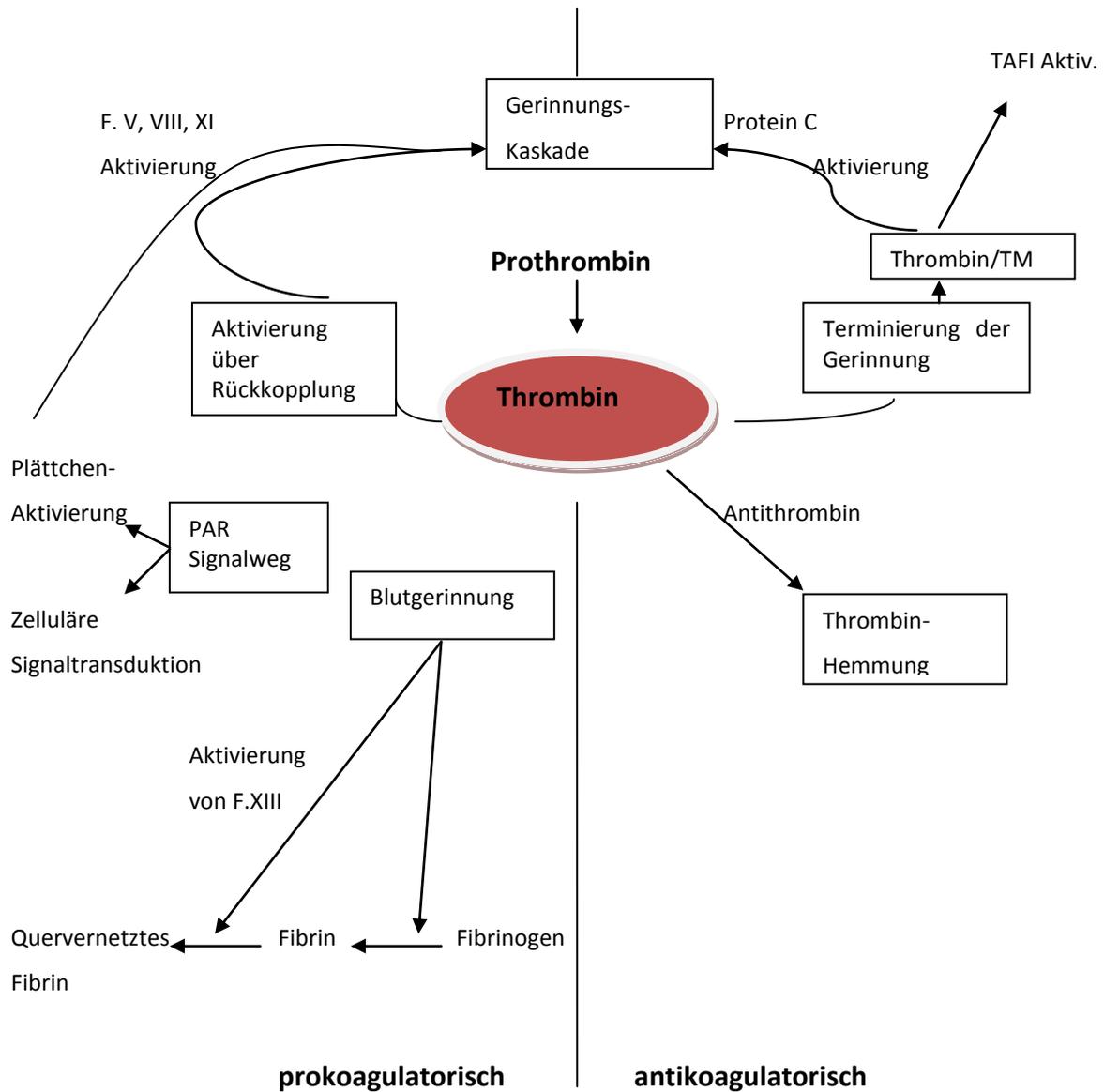


Abb.5: Die zentrale Rolle des Thrombins in der Hämostase (modifiziert nach [22]).

1.3 Die Rolle des Tissue Factors

Schon 1862 wird von Alexander Schmidt eine zytoplasmatische Substanz entdeckt, die die Fähigkeit hat, Prothrombin zu Thrombin umzuwandeln [23]. Paul Morawitz bezeichnet diese Substanz 1905 als Thrombokinase und stellt daraufhin eine Gerinnungstheorie auf, die vor allem auf den vier Komponenten Thrombokinase, Calcium, Prothrombin und Fibrinogen basiert [24]. Diese Theorie beeinflusst die Gerinnungslehre in den darauffolgenden 50 Jahren stark. So entwickelt A.J. Quick 1935 einen nach ihm benannten Prothrombin-Test, den sogenannten Quick-Test, der bis heute im klinischen Alltag verwendet wird. 1985 kann TF zum ersten Mal aufgereinigt und die DNA isoliert werden [25]. Die komplette genetische Sequenz des Proteins wird 1989 von Nigel Mackman entschlüsselt [23]. Dabei zeigt sich, dass es aus einer hydrophilen extrazellulären Domäne, einer transmembranären hydrophoben Domäne und einem kurzem zytoplasmatischen Teilstück besteht. D.W. Banner et al. gelingt es 1996 die extrazelluläre Struktur des TF darzustellen, wie sie an F.VIIa gebunden ist [26] und somit den für die Initiierung der Blutgerinnung entscheidenden Komplex bildet.

TF befindet sich hauptsächlich in der Adventitia der Gefäßwände [27], um so sofort nach einer Verletzung die Gerinnung initialisieren zu können [25, 28]. Daneben findet TF sich noch in Organkapseln, der Epidermis, dem Arbeitsmyokard des Herzens, der Lunge und im Uterus [28, 29]. Dies sind Organe, die stark durchblutet sind und dadurch vor großem Blutverlust geschützt werden müssen.

Neben seiner großen Bedeutung in der Hämostase, scheint TF auch bei der Embryogenese unabdingbar zu sein. In einem „Knock-out“-Maus Experiment wurde gezeigt, dass alle Mäuse ohne TF schon in der frühen embryonalen Phase versterben [23, 30].

Neben Endothelzellen kann die TF-Synthese auch von Monozyten und Makrophagen bei längerer Stimulation durch Lipopolysaccharide (= LPS) und Zytokine wie IL-1 (= Interleukin I) oder TNF- α (= Tumornekrosefaktor α), angeregt werden [28, 31]. Hieraus erschließt sich auch die Wirkung des TF bei einer Sepsis. Durch die vermehrte TF-Synthese kann es zu einer übermäßigen Blutgerinnung bis hin zur „disseminierten intravasalen Gerinnung“ (= DIC) kommen [16, 28].

Außerdem scheint TF auch eine Rolle bei Tumorwachstum, Metastasierung und Angiogenese durch die „up“-Regulation des spezifischen Wachstumsfaktors zu spielen [28, 32].

In hämostaseologischen Laboren wird der TF überwiegend zur Bestimmung der Prothrombinzeit benötigt. Hier dient er, wie auch *in vivo*, als Initiator der Thrombinbildung. Dazu wird der Gewebsfaktor entweder aus tierischem Gewebe isoliert oder rekombinant hergestellt.

1.4 Laborchemische Untersuchung des Gerinnungssystems

Bei der Auswahl eines Gerinnungstests muss unterschieden werden, ob dieser als Screeninguntersuchung, als sogenannter Globaltest oder zur genaueren Differenzierung einer vermuteten bzw. vorhandenen Gerinnungsstörung (angeboren oder erworben) durchgeführt werden soll.

1.4.1 Globaltests

Die am häufigsten durchgeführten Gerinnungstests sind die Bestimmung der Prothrombinzeit (= PT) und der aktivierten Thromboplastinzeit (= aPTT). Mit diesen beiden Tests lässt sich die plasmatische Gerinnung orientierend untersuchen.

Mit der PT-Zeit wird hauptsächlich der Einfluss der Faktoren II, VII und X auf die Gerinnung erfasst, mit der Bestimmung der aPTT der Einfluss der Faktoren VIII, IX, XI und XII (s. Abb.6).

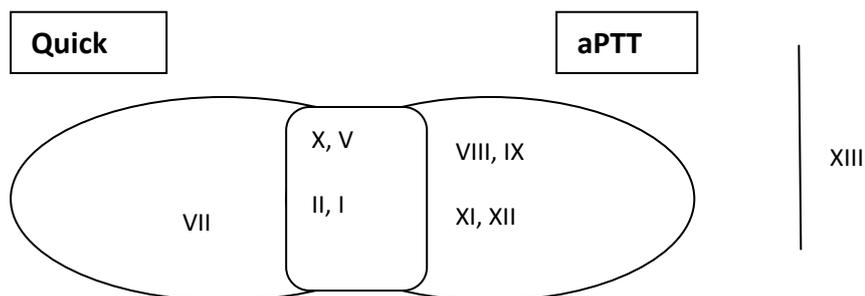


Abb.6: Zuordnung der Globaltests Quick-Test und aPTT zu den von ihnen erfassten Gerinnungsfaktoren.

Die PT ist auch bekannt unter dem Synonym Quick-Test und misst die Gerinnungszeit (in Sekunden (=sec)) von Zitratplasma nach Zugabe von Ca^{2+} und Thromboplastin (Tissue Factor). Der „extrinsische“ Weg wird vor allem durch die Vitamin-K-abhängigen Faktoren II, VII, X beeinflusst, weshalb die Bestimmung der PT-Zeit zur Überwachung einer Cumarin-Therapie geeignet ist. Die Gerinnungszeit wird mit Hilfe einer Bezugskurve zum Quickwert (%) umgerechnet. Der Normalwert beträgt 70 – 130%.

Da die kommerziell erhältlichen Thromboplastinreagenzien selbst eine lot-zu-lot-Variabilität haben, d.h. die verschiedenen Chargen Schwankungen aufweisen und auch untereinander häufig zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen führen [33], wird international die INR (=

International Normalized Ratio) berechnet, um eine bessere Vergleichbarkeit zwischen den Laboren zu gewährleisten. Hierbei wird die PT des zu untersuchenden Plasmas durch die PT eines Normalplasmas geteilt und mit dem „International Sensivity Index“ (= ISI) potenziert. ISI ist ein Faktor, der die Sensitivität des verwendeten Thromboplastinreagenzes in Beziehung zu einem internationalen Standard setzt [34].

$$INR = \left(\frac{PT_{test}}{PT_{normal}} \right)^{ISI}$$

Mit der aPTT (in sec) wird die Zeit gemessen, die vergeht, bis sich im Citratplasma nach Zugabe von einem Phospholipidgemisch und Ca^{2+} ein Gerinnsel bildet. Die aPTT-Messung ist nicht standardisiert, weshalb der Referenzbereich sehr von den verwendeten Reagenzien und dem Labor abhängig ist [35]. Die Gerinnungszeit kann zwischen 10-50 sec liegen. Die Bestimmung der aPTT ist u.a. ein Screeningtest für Hämophilie A oder B (Mangel an F.VIII oder IX). Diese reagiert aber erst mit einer Verlängerung, wenn die Faktorkonzentration unter 30-50% liegt [36]. Daneben wird die aPTT unter anderem zur Überwachung und Kontrolle einer Therapie mit unfraktioniertem Heparin verwendet.

Ein weiteres Testverfahren ist die Bestimmung der Thrombinzeit. Hier wird nach Zugabe einer standardisierten Menge Thrombin zum Citratplasma, die Zeit bis zur Fibrinbildung aus Fibrinogen gemessen. So können alle etwaigen plasmatischen Thrombinbildungsstörungen auf die Fibrinbildung bei der Messung keinen Einfluss nehmen [37]. Die Thrombinzeit-Bestimmung wird hauptsächlich als Suchtest für Störungen in der Fibrinpolymerisation, eingesetzt [37, 38].

1.4.2 Diagnostische Lücken

Das derzeitige Basislabor zur Bestimmung der Gerinnung umfasst in der Regel die Bestimmung von aPTT, Quickwert und die Thrombozytenzahl. Hierbei muss beachtet werden, dass diese Testsysteme zwar einen Großteil der Gerinnung abbilden, aber nicht das gesamte Gerinnungssystem untersuchen können.

Mit aPTT und Quickwert lässt sich der Zeitpunkt der ersten Gerinnselbildung bestimmen. Hier sind jedoch erst 5% des Prothrombins in Thrombin umgesetzt [43, 44]. Über die weitere

Kinetik der Thrombinbildung kann mit diesen beiden Tests keine Aussage getroffen werden, diese scheint aber in der *in vivo* Hämostase große Bedeutung zu haben [41].

Daneben gibt es diagnostische Lücken bei der Beurteilung von hypokoagulatorischen Zuständen.

Die aPTT-Messung weist folgende Einschränkungen auf:

- es kommt erst bei Faktorkonzentrationen <30-50% zu Verlängerungen in der aPTT [36]
- bei sehr niedrigen Werten korreliert die aPTT nicht gut mit der verbleibenden Restaktivität [45]
- sie ist kein Suchtest für einen Vitamin-K-Mangel und als Überwachung für die Therapie mit Marcumar ungeeignet
- der Faktor VII wird nicht erfasst

Die Quickwert-Bestimmung hat ebenfalls Einschränkungen:

- die Faktoren VIII und IX werden nicht erfasst
- keine Überwachung einer Heparintherapie.

Auch hyperkoagulatorische Zustände werden von beiden Tests nur unzureichend dargestellt.

Es ist nicht geklärt, inwieweit eine verkürzte aPTT-Zeit pathologisch ist. Verkürzungen können postoperativ, als Akute-Phase-Reaktion (Erhöhung der F.VIII-Konzentration) und im 3. Trimenon einer Schwangerschaft bis post partum auftreten. Hier gibt es Hinweise, dass die Verkürzung mit einem erhöhten Thromboserisiko verbunden ist [47].

Weitere diagnostische Lücken von aPTT und Quickwert sind: Faktor XIII-Mangel, Thrombozyopathien, leichte Formen des von-Willebrand-Syndroms (= vWS), angeborene thrombophile Risikofaktoren (z.B. Antithrombin-Mangel, APC-Resistenz, Mangel an Protein C und/oder Protein S) und eine Hyperfibrinolyse.

Auch zur Bestimmung der Wirksamkeit und Überwachung der Therapie der „neueren“ oralen Antikoagulantien, die direkt einzelne Faktoren der Gerinnungskaskade hemmen, sind aPTT und PT nicht geeignet [48-50]

1.4.3 Spezifische, klinisch etablierte Gerinnungstests

Spezifische Gerinnungstests werden in der Regel durchgeführt, wenn einer der Globaltests auffällig ist und/ oder die anamnestische Befragung des Patienten Hinweise auf eine gesteigerte oder verminderte Blutgerinnung ergeben.

Bei unklarer Blutungsneigung können zur genaueren Ursachenforschung vorrangig eingesetzt werden:

- Einzelfaktorbestimmungen einschließlich Fibrinogen- und F.XIII-Bestimmung
- von-Willebrand-Faktor (= vWF) -Konzentrations-Messung und vWF-Aktivitätsmessung
- Thrombozytenfunktionstests (*in-vivo*, und *in-vitro*-Blutungszeit)
- Rotem®-Testverfahren

Das Rotem® ist die Weiterentwicklung der 1948 von Hellmut Hartert entwickelten Thrombelastographie (TEG) [39]. Die Gerinnung wird durch die Zugabe von Calcium und Aktivatoren in Gang gesetzt. Es gibt verschiedene Ansätze, die sich in der Zugabe des Aktivators unterscheiden. So wird z.B. TF beim EXTEM (ähnlich der Quick-Messung), Kontaktaktivatoren beim INTEM (vgl. aPTT) oder TF + Plättcheninhibitor beim FIBTEM (zur qualitativen Ermittlung des Fibrinogen-Status) zugegeben.

Nach der Aktivierung werden die Zeit bis zur Gerinnselbildung, die Gerinnselbildung selbst sowie auch die maximale Gerinnselfestigkeit, -stabilität und -fibrinolyse gemessen [38]. Diese quantitative wie auch qualitative Messung der sekundären Hämostase wird heute v.a. als Point of Care (= POC)- Diagnostik bei Verdacht auf operativ erworbene Gerinnungsstörungen in der perioperativen Medizin und zum Ausschluss einer Hyperfibrinolyse eingesetzt[37-39].

Mit der Einführung der Rotem®-Messung kann der Einfluss der Fibrinolyse und die Thrombusqualität auf die Blutgerinnung erfasst werden. Thrombopathien und das vWS werden jedoch weiter nicht detektiert, Einzelfaktorbestimmungen sind auch hier nicht möglich.

Bei erwiesener Thromboseneigung können unter anderem folgende Bestimmungen sinnvoll sein:

- D-Dimere (Fibrinospaltprodukte)
- Antithrombin
- Protein C/S-Aktivitätsbestimmung
- aktiviertes Protein C (=APC)-Resistenz.

1.4.4 in-TDT - ein weiterer, spezifischer Gerinnungstest

Ein weiterer Gerinnungstest, der bereits in Studien Anwendung findet (z.B. [40]), ist der in-TDT®. Dies ist ein Thrombindynamiktest, welcher für die „intrinsische“ Seite und die gemeinsame Endstrecke der Gerinnungskaskade sensitiv ist.

Beim in-TDT® wird Prothrombin mit einem chromogenen Substrat markiert. Die Gerinnung wird über den intrinsischen Weg mit einem Kontaktaktivator gestartet und die Thrombinbildung durch die Spaltung des chromogenen Substrats photometrisch aufgezeichnet.

Die maximale Geschwindigkeit des Substratabbaus ist am „peak“ erreicht, wird durch die 1.Ableitung der Thrombinbildungskurve berechnet und entspricht definitionsgemäß der maximal möglichen Thrombinbildungsdynamik [41]. Dieser Wert wird normalerweise in % in Bezug auf ein mitgemessenes Standardplasma angegeben.

Hiermit kann nicht nur der Zeitpunkt der ersten Thrombinbildung gemessen werden, wie es bei den klassischen Globaltests geschieht, sondern auch die Thrombinkinetik bestimmt werden. Diese scheint für die *in vivo* Vorgänge bei der Hämostase von großer Bedeutung zu sein [42].

Ein weiterer Vorteil ist die einfache und günstige Durchführung auf routinemäßig in Gerinnungslaboren verwendeten, automatischen Gerinnungsanalysegeräten sowie die Schnelligkeit des optischen Verfahrens.

In Anlehnung an den in-TDT[®] etablieren und untersuchen wir in dieser vorliegenden Arbeit einen ex-TDT (ex-TDT = extrinsic thrombin dynamic test).

1.5 Zielsetzung und Fragestellung

Bisher gibt es keinen Gerinnungstest, mit dem auf einfachem und schnellem Weg das hämostatische Potential eines Patienten vollständig erfasst werden kann.

Mit den in der Routinediagnostik etablierten Globaltests Quick-Bestimmung und aPTT lässt sich ein Großteil der Blutgerinnung darstellen, dennoch weisen diese Testsysteme diagnostische Lücken auf (s. 1.4.3). Quickwert und aPTT lassen eine Aussage darüber zu, wann die Thrombinbildung startet, jedoch keine Aussage über die weitere Thrombindynamik bis hin zur maximalen Thrombinbildung. Man kann mit ihnen daher nicht den individuellen hämostatischen Phänotyp eines Menschen abbilden. Dies zeigt sich beispielsweise bei hämophilen Patienten mit derselben Faktorrestaktivität, die dennoch nicht automatisch dasselbe Blutungsrisiko/-profil zeigen [51, 52].

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es daher, die ex-TDT-Messung als neuen Test zu etablieren und auf seine klinische Praktikabilität zu prüfen.

Mit dem in-TDT[®] lässt sich eine erniedrigte Thrombinbildungsfähigkeit aufgrund von Faktormängeln des „intrinsischen“ Wegs (F.XII, XI, IX, VIII) sowie bei Mangel der Faktoren der gemeinsamen Endstrecke (F.X, V und II) feststellen. Des Weiteren zeigt sich eine konzentrationsabhängige verminderte Thrombinbildung bei Einsatz von Inhibitoren wie Heparin und Heparinoiden und eine erhöhte Thrombinbildung beim Einsatz von Aktivatoren (Tissue Faktoren) [41].

Um das gesamte plasmatische Gerinnungssystem abbilden zu können, muss noch die über den „extrinsischen“ Weg, durch TF, ausgelöste Thrombinbildung untersucht werden. Hier wird dann auch z.B. die Auswirkung eines F.VII-Mangels auf die Kinetik der Thrombinbildung sichtbar.

Ziel der ex-TDT -Messung ist es, das maximale „Thrombinbildungspotential“ eines Plasmas im „extrinsischen“ Weg zu ermitteln. Es soll gemessen werden, wie viel funktionsfähiges Prothrombin sich in dem zu untersuchenden Plasma befindet, welches durch die Aktivierung mit einem TF zu Thrombin umgesetzt wird.

Bei den Messungen und der Durchführung des Tests, wird sich an dem bereits für den „intrinsischen“ Weg erhältlichen Test „Pefakit[®] in-TDT[®]“ (Pentapharm LTD, Basel, Schweiz),

orientiert. Dieser Test kann auf routinemäßig in Gerinnungslaboren verwendeten Messgeräten durchgeführt werden.

Die gemeinsame Anwendung des in-TDT® und ex-TDT soll es ermöglichen, die plasmatische Gerinnung in ihrer Gesamtheit zu untersuchen und damit eine globale und umfassende Aussage über das hämostatische Profil eines Menschen treffen zu können.

Um den ex-TDT durchführen zu können, muss zuerst ein geeigneter TF als Gerinnungsaktivator der „extrinsischen“ Seite gefunden werden. Ausschlaggebend hierfür ist:

- 1) eine mit den „in-TDT-Kurven“ vergleichbare „peak“-Bildung sowie

- 2) die routinemäßige Verfügbarkeit des TF in Gerinnungslaboren.

Der Test soll zuverlässig, schnell und leicht durchführbar sein und eine gute diagnostische Aussagekraft besitzen.

Um den ex-TDT zu evaluieren, wird das Testsystem an einem gesunden Normalkollektiv sowie hypo- und hyperkoagulatorischen Plasmen erprobt.

Die Anforderungen an den ex-TDT sind hier:

- 1) Beschreibung eines gesunden Normalkollektivs. Gibt es einen Messbereich, in dem die Thrombinbildung als normal angesehen werden kann und wo liegt dieser?
- 2) Aussagekraft bei Hypokoagulation. Wie verhält sich der Test bei Marcumar-Patienten bzw. isolierten Faktormangelzuständen? Ist er spezifisch für die Faktoren des „extrinsischen“ Wegs?
- 3) Aussagekraft bei Hyperkoagulation. Wie deutlich reagiert der ex-TDT auf erhöhte Faktoraktivitäten bei Schwangeren bzw. kann durch Zugabe von Prothrombinkonzentrat (= PPSB = Prothrombin, Prokonvertin, Stuart-Prower-Faktor, antihämophiler Faktor B) eine obere Grenze der Thrombinbildungsfähigkeit erreicht werden?

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien und Geräte

2.1.1 Auflistung der verwendeten Materialien

in-TDT®

Für die Bestimmung von in-TDT® wird das bereits vorhandene Set (Pefakit, TDTin-Aktivator; Pentapharm, Basel, Schweiz) verwendet. Es beinhaltet CaCl_2 , Fibrinbildungs-Inhibitor (H-Gly-Pro-Arg-Pro-OH) um Störungen der optischen Messung zu vermeiden und das chromogene Substrat (H-D-CHG-Ala-Arg-pNa²AcOH), mit welchem Prothrombin markiert wird.

Die Gerinnung wird durch Zugabe von 60µl des Aktivators (besteht aus: aPTT Reagenz auf Basis von Ellagsäure) zu 60µl des zu messenden Plasmas in Gang gesetzt.

ex-TDT

Als TF für die ex-TDT-Messungen werden verschiedene TF eingesetzt, die routinemäßig in der Gerinnungsdiagnostik bei der Quickwertbestimmung verwendet werden:

- RecombiPlasTin (HemosIL, diaPharma Group Inc., West Chester Ohio, USA)
- PPP (Thrombinoscope BV, Maastricht, Niederlande)
- Innovin (Behring, Marburg, Deutschland)
- Thromborel S (Behring, Marburg, Deutschland).

Als Vergleichsplasma für die zu untersuchenden Plasmen wird ein Standardplasma, Standard Human Plasma (= SP) (Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH, Marburg, Deutschland), mitgemessen. Um einen laborunabhängigen, allgemeingültigen Vergleichswert zu bekommen, wird jede neu angebrochene Charge SP zunächst gegen ISTH Plasma (NIBSC, South Mimms Potters Bar Hertfordshire, England), ein weltweit anerkanntes Standardhumanplasma, geeicht. (ISTH = International Society on Thrombosis and Haemostasis)

Bei Messungen zur Hypokagulation werden F.II, F.V, F.VII, F.VIII, F.IX, F.X, F.XI, F.XII-Mangelplasma (Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH, Marburg, Deutschland) verwendet. Mangelplasmen werden mittels Immunadsorption aus Normalplasma

hergestellt. Die Restaktivität des dabei entfernten Faktors liegt bei <1%. Die Aktivität der anderen Gerinnungsfaktoren beträgt mindestens 40% [53].

Bei Versuchen mit PPSB werden Plasma und Mangelplasma mit PPSB (Beriplex[®] P/N250, Behring, Marburg, Deutschland) versetzt.

PT, aPTT und Einzelfaktorbestimmung

Zur Gerinnungsaktivierung bei Quickwert-Bestimmung und aPTT-Messungen werden RecombiPlasTin und SynthASil reagents (HemosIL, diaPharma Group Inc., West Chester Ohio, USA) verwendet. Für diese Reagenzien liegt der vom Hersteller angegebene Referenzbereich für den Quickwert bei 70-130% (12 – 32 sec) und für die aPTT bei 28-34 sec.

2.1.2 Auflistung der verwendeten Geräte

Sowohl in-TDT[®]-, als auch ex-TDT werden auf dem Behring Coagulation System BCS (Siemens, Marburg, Deutschland) gemessen.

Quickwert und aPTT-Messungen, sowie die Einzelfaktormessungen werden auf dem ACL TOP System (Instrumentation Laboratory, Bedford, Massachusetts, USA) durchgeführt.

2.1.3 Verwendetes Plasma

Nach der Genehmigung durch die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät München werden Rückstellproben von gesunden Blutspendern und Patienten für folgende Untersuchungen verwendet:

1. Bestimmung eines „Normalkollektivs“ mittels Rückstellproben von 10 gesunden Blutspendern.
2. Untersuchung von Hypokoagulation mittels Rückstellproben von 10 Marcumarisierten Patienten mit einem Quickwert zwischen 13 – 41% (Mittelwert: 27%).
3. Untersuchung isolierter Faktorenmängel mittels Rückstellproben bei insgesamt 42 Patienten, davon 3 Patienten mit Faktor-V-Mangel, 10 Patienten mit Faktor VII-

Mangel, 19 Patienten mit Faktor VIII-Mangel, 2 Patienten mit Faktor IX-Mangel, 3 Patienten mit Faktor XI-Mangel und 5 Patienten mit Faktor XII-Mangel.

4. Untersuchung von Hyperkoagulation am Beispiel von Rückstellproben von 7 schwangeren Frauen.

2.1.4 Aufbereitung des Plasmas

Die Plasma-Rückstellproben sind bei -80°C eingefroren und werden in einem 37°C warmen Wasserbad direkt vor ihrer Verwendung aufgetaut.

2.2 Methoden

2.2.1 Durchführung des ex-TDT

Die ex-TDT-Messung erfolgt in Anlehnung an den in-TDT® (s.1.4.2 und Abb.7).

In den Vorversuchen (s.2.2.2) werden jeweils 3 Messungen pro Testansatz durchgeführt, in den Hauptversuchen (s. 2.2.3 – 2.2.7) je 2 Messungen. Anschließend wird der Mittelwert bestimmt.

Die Thrombingenerierung wird auf dem Behring Coagulation System (BCS) gemessen.

Hierzu werden dem Gerät jeweils folgende Reagenzien zur Verfügung gestellt:

- Standardplasma, als Kallibrator
- das zu messende Plasma:
 - Plasma von gesunden Blutspendern
 - Standardisiertes Faktor-Mangelplasma
 - Plasma von Faktor-Mangelpatienten
 - Plasma von Marcumar-Patienten
 - Plasma von Schwangeren
- der TF, mit welchem aktiviert wird (Recombiplastin in den Verdünnungen 1:50 und 1:25, PPP unverdünnt, Innovin, Thromborel und TDTin-Aktivator)
- Pefachrom®, ein chromogenes Substrat, womit Prothrombin markiert wird und welches, während der Spaltung von Prothrombin zu Thrombin, zu p-Nitro-Anilin (p-NA) abgebaut wird. Dieses Produkt kann von einem Photometer bei 405nm durchgehend gemessen werden.
- Pefabloc® (= Fibrinpolymerisationsinhibitor) wird zugegeben, um die Bildung eines Fibringerinnsels zu verhindern und damit die optische Messung nicht zu beeinflussen.
- NaCl 0,9%.

Pefachrom® 10 µmol/vial wird mit 20ml CaCl₂ (25mM) gelöst. Danach wird Pefabloc® 50mg/vial mit 5ml des gelösten Pefachrom® aufgelöst.

Die Reagenzien werden im Messansatz mit folgender Menge angesetzt:

Reagenz	Volumen
SP oder Plasma-Probe	60 μ l
Tissue Factor	60 μ l
Pefachrom®/Pefabloc®-Reagenz	60 μ l

Nachdem das Plasma mit dem entsprechenden TF aktiviert wird, folgt eine Inkubationszeit von 180sec bei 37°C. Danach werden die 60 μ l des Pefachrom®/Pefabloc®-Reagenz hinzugegeben.

Ab diesem Zeitpunkt zeichnet der BCS die Extinktion bei 405nm auf.

Vom maximalen Extinktionswert wird die erste Ableitung berechnet, welche der maximalen Thrombingenerierung des gemessenen Plasmas entspricht. Die maximale Thrombinbildungsfähigkeit des ISTH-Plasmas wird als 100% angesehen und alle anderen Werte werden hierzu in Relation gesetzt.

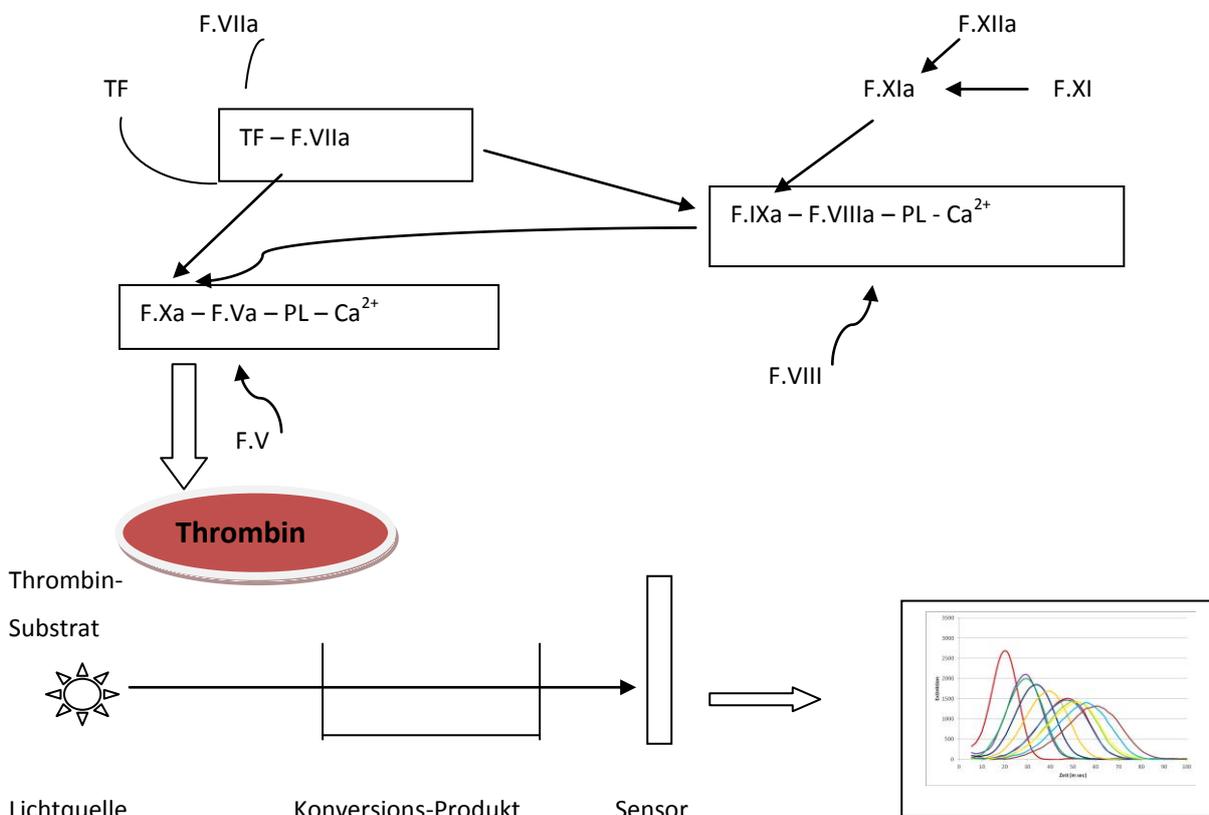


Abb.7: Schematische Darstellung der TDT-Messung (modifiziert nach [41]).

2.2.2 ex-TDT-Messung zur Auswahl des geeigneten Tissue factors (TF)

TF ist ein sehr potenter Aktivator der Gerinnung. Schon kleine Mengen an TF haben große Wirkungen. Hierdurch zeigen verschiedene TF-Konzentrationen einen deutlich unterschiedlichen Einfluss auf die Thrombingenerierung [54, 55]. Die verwendeten TF Recombiplastin, Innovin und Thromborel werden pur und in den Verdünnungen 1:10 – 1:100 gemessen. Die Verdünnung 1:10 bedeutet 1 Teil TF und 9 Teile an destilliertem Wasser.

Ziel ist es, die optimale Konzentration, d.h. die passende Verdünnung, zu finden. Die Auswahl des geeigneten TF wird in Anlehnung an die Messergebnisse beim in-TDT[®] getroffen. Im Einzelnen wird auf eine geeignet lange „on-set-time“ und eine ausreichend hohe „peak“-Bildung in der optisch ermittelten Kurve geachtet. Der TF PPP zeigt bereits in Vorversuchen nur wenig Aktivierung, weshalb er nur unverdünnt gemessen wird. Die Potenz des beim in-TDT[®] verwendeten Kontaktaktivators (TDTin-Aktivator) ist im Vergleich zu der Potenz von TF deutlich niedriger, sodass im „intrinsischen“ Testansatz grundsätzlich nur die vom Hersteller vorgegebene, unverdünnte Substanz verwendet wird. Die beim in-TDT[®] gemessenen Werte dienen als Referenzwerte für die Auswahl der TF für den ex-TDT.

Das routinemäßig mitgeführte ISTH dient als Referenzwert. Dieses international anerkannte Standardhumanplasma weist immer dieselbe Zusammensetzung auf.

2.2.3 ex-TDT-Messung zur Ermittlung eines Normalkollektivs

Die TF Innovin und Thromborel werden nur in den Vorversuchen eingesetzt, sie sind als TF für den ex-TDT nicht gut geeignet (s.3.1.2 und 3.1.4). In den nachfolgenden ex-TDT-Bestimmungen (3.2– 3.7) werden sie nicht mehr verwendet.

Die durchschnittliche Thrombingenerierungsfähigkeit eines Normalkollektivs wird durch ex-TDT-Messungen der Plasmarückstellproben gesunder Blutspender ermittelt. Die Messungen werden mit allen im Verlauf der Vorversuche ausgewählten TF (s.3.1.5) und deren passenden Verdünnungen (Recombiplastin 1:50, 1:25, PPP, in-TDT-Aktivator) durchgeführt.

2.2.4 ex-TDT-Messungen bei Faktor-Mangel-Plasmen

Die TDTex-Messungen werden mit allen ausgewählten TF (s.3.1.5) bei Faktor-Mangelplasmen durchgeführt. Die Mangelplasmen werden zuerst unverdünnt gemessen, danach wird stets in einem bestimmten Verhältnis (s.u.) Standardplasma hinzugefügt, welches alle Gerinnungsfaktoren in normaler Menge enthält. Durch diese Zugabe wird die Gerinnungsfähigkeit erhöht und die Thrombinbildung gesteigert.

Die Zugaben an SP sind: Mangelplasma pur (keine Zugabe von SP), 1:64, 1:32, 1:16, 1:8, 1:4, und 1:2

1:64 bedeutet: 10µl SP + 630µl Faktor-Mangelplasma

1:2 bedeutet: 100µl SP + 100µl Faktor-Mangelplasma.

SP selbst wird als Kontrolle stets unverdünnt mitgemessen.

2.2.5 ex-TDT-Messung bei hypokoagulatorischem Patientenplasmen

Die Thrombinbildungsfähigkeit von hypokoagulatorischem Patientenplasma wird durch ex-TDT-Messungen von Rückstellproben von Patienten mit einem definierten Faktormangel (s. 2.1.3), sowie bei Patienten unter Vitamin-K-Antagonisten-Therapie gemessen.

2.2.6 ex-TDT-Messung bei maximal möglicher Thrombingenerierung

PPSB ist ein Prothrombinkomplex-Präparat und enthält neben den Vitamin-K-abhängigen Faktoren II, VII, IX und X, Protein C und S und geringe Mengen an Heparin.

Im klinischen Alltag wird PPSB zur Reversierung von Vitamin-K-Antagonisten, unter anderem bei bedrohlichen Blutungen und/oder dringlichen Operationen, eingesetzt [56]. Die Gabe von 1 IE PPSB pro kg Körpergewicht erhöht die Konzentration von F.VII und IX um 1-2% und die Konzentration von F.II und X um 2-4% [57].

Die Berechnungsformel für die benötigten Einheiten, um die verringerten bzw. fehlenden Faktoren im Blutplasma ersetzen zu können, lautet:

$$\text{Erforderliche Einheiten} = \text{Körpergewicht (kg)} \times \text{gewünschter Faktor-Anstieg (\%)} \times 1,2 \text{ [57].}$$

In einem *in vitro* Testansatz versuchen wir die maximal mögliche Thrombingenerierung des Plasmas von gesunden Spendern zu ermitteln.

Vor der Messung wird PPSB in aufsteigenden Mengen zu den Plasmaproben hinzugegeben. Hierbei wird folgendermaßen vorgegangen:

$$\begin{aligned} \text{Stammlösung } 10\text{ml PPSB} &= 250 \text{ IE} \\ 1 \mu\text{l} &= 0,0250 \text{ IE} \\ \text{Daraus folgt z.B.} \\ 5 \text{ ‰} &= 5 \mu\text{l PPSB in } 1000 \mu\text{l Plasma} \\ &= 0,125 \text{ IE}/1000 \mu\text{l Plasma} \\ &= 0,125 \text{ IE}/ \text{ml Plasma} \end{aligned}$$

Durch die zusätzliche Gabe dieser Faktoren soll eine mögliche Steigerung der Thrombinbildung untersucht werden. Einerseits soll die Initiationsphase durch das „Mehr“-Angebot an F.VII verstärkt werden und gleichzeitig, durch Erhöhung der Konzentration an Prothrombin, eine quantitativ vermehrte Thrombinbildung ermöglicht werden.

Daneben wird die Reversierbarkeit von Marcumar durch PPSB und die maximal mögliche Thrombinbildung an Plasmen von Marcumarpatienten untersucht.

Die ex-TDT-Messung erfolgt wie unter 2.2.1 beschrieben.

2.2.7 ex-TDT-Messung bei hyperkoagulatorischem Plasma schwangerer Patientinnen

Die Aussagekraft des ex-TDT bei Hyperkoagulation wird anhand von ex-TDT-Messungen von Rückstellproben schwangerer Patientinnen untersucht. Es ist bekannt, dass während einer Schwangerschaft die Konzentration der Gerinnungsfaktoren (mit Ausnahme des F.XI) zunimmt, während gleichzeitig die Konzentration von Protein S abnimmt und damit die Gerinnungsfähigkeit des Plasmas erhöht wird [58].

2.2.8 Auswertung und statistische Methoden

Die Auswertung der TDT-Messungen auf dem BCS-Gerät erfolgte mit dem Programm „BCS Auswertung.exe“ (Patrick Sokoll Technologies, München, Deutschland). Die weitere Sammlung der Daten, sowie deren rechnerische Umsetzung in Tabellen und Abbildungen, erfolgt mit Excel 2003 von Microsoft Deutschland GmbH.

Berechnet werden Mittelwert und Standardabweichung.

Die Korrelationsberechnungen erfolgen mit SPSS mit Hilfe des IBE (= Institut für Medizinische Informationsverarbeitung Biometrie und Epidemiologie) München.

3 Ergebnisse

3.1 Auswahl des Tissue Factors

Für die Auswahl des geeigneten TF und seiner Konzentration ist eine ausreichend lange „on-set-time“ sowie die „peak“-Bildung entscheidend (s. Abb.8).

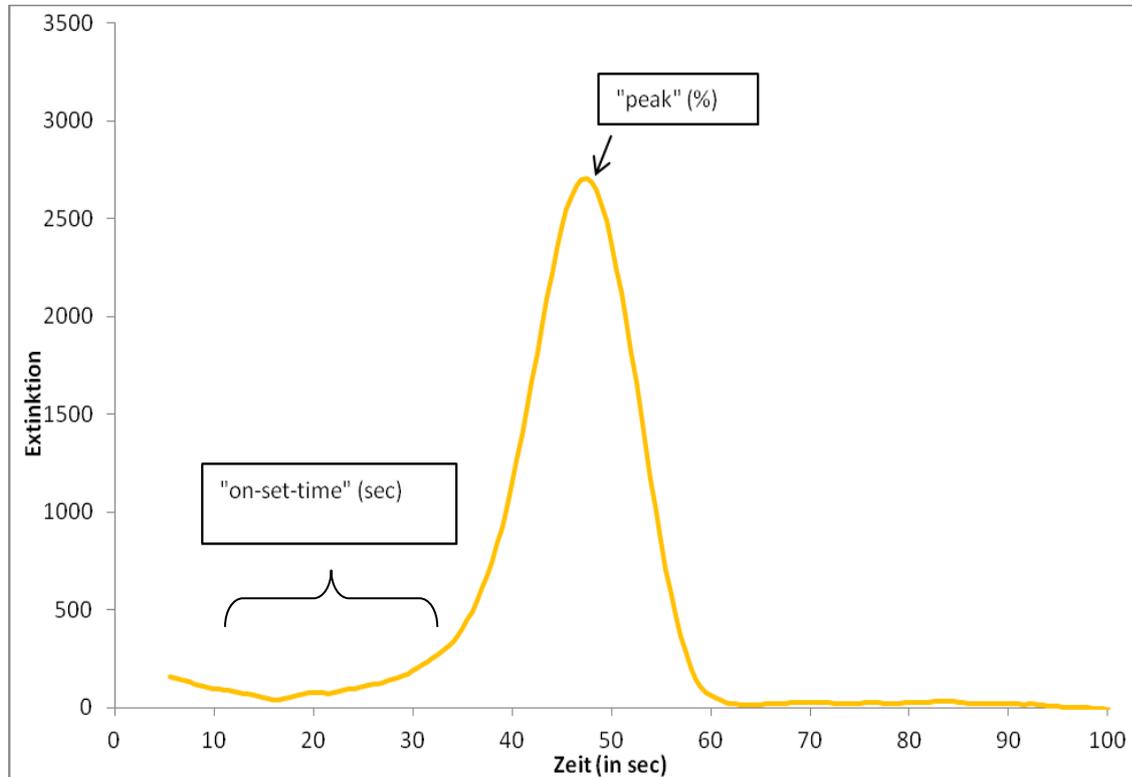


Abb.8: Graphische Darstellung der Kriterien „on-set-time“ und „peak“ für die Tissue Factor Auswahl.

Mit der „on-set-time“ wird die Zeit bis zur ersten messbaren Thrombinbildung gemessen. Diese Zeit entspricht in etwa dem Quick-Wert auf der „extrinsischen“ Seite und der aPTT auf der „intrinsischen“ Seite. Ist diese Zeit zu kurz, kommt es zum sofortigen Thrombinburst, sodass keine Aussage über den Ablauf der Thrombinbildung getroffen werden kann. Es ist so nicht möglich, die Thrombinbildung von der Initiation bis zur maximalen Thrombingenerierung abzubilden.

Der „peak“ (= Extinktion) entspricht der maximal möglichen Thrombinbildung des gemessenen Plasmas. Entscheidend für die Auswahl des TF ist ein vergleichbarer Wert zum gemessenen „peak“ bei der in-TDT® Messung.

Bei geringeren „peak“-Werten und weniger steil ansteigenden Kurven besteht die Gefahr, dass teilweise der Thrombinabbau schon begonnen hat und somit nicht mehr die maximale Thrombinbildungsfähigkeit abgebildet wird.

Die getesteten TF werden alle bereits standardmäßig in hämostaseologischen Laboren, v.a. zur Quick-Wert-Bestimmung, verwendet.

Die Abbildungen 9-12 zeigen die Messverläufe der Verdünnungsreihen (s. 2.2.2) für die vier untersuchten TF. Die dargestellten Kurven sind Mittelwert-Kurven aus jeweils dreifach durchgeführten Messungen für die jeweilige Verdünnung.

3.1.1 Recombiplastin

Recombiplastin hat den Vorteil, dass er rekombinant hergestellt wird. Da jede Charge von einem Klon abstammt, erbringt dieser TF stabilere und damit besser vergleichbare Messungen.

Recombiplastin in den Verdünnungen 1:25 sowie 1:50 erfüllt die gewünschten Voraussetzung für den gesuchten TF (s. Abb.9).

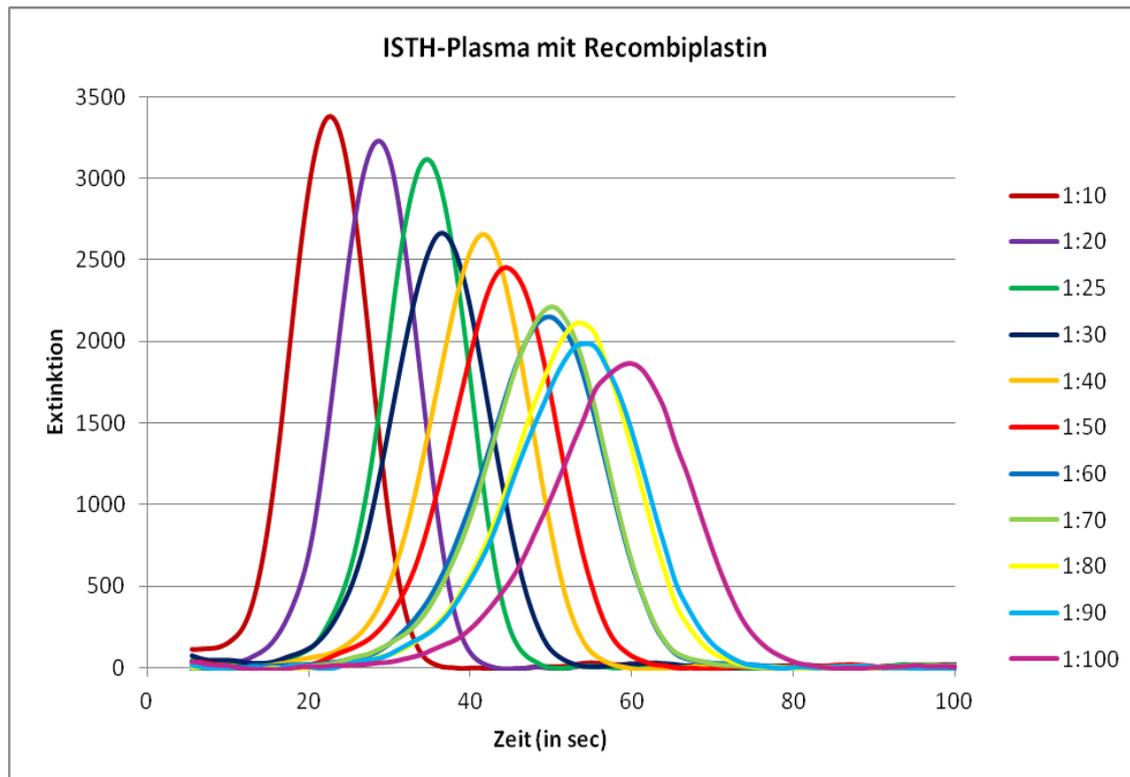


Abb.9: Darstellung der Zeit bis zur ersten Thrombinbildung sowie der maximal messbaren Extinktion in Abhängigkeit von der Konzentration des TF (hier: Innovin) bei Aktivierung von ISTH-Plasma. (Kurve: MW aus n = 3 Messungen).

3.1.2 Innovin

Der ebenfalls getestete TF Innovin in der Verdünnung 1:10 hat zwar einen passenden „peak“, allerdings eine zu kurze „on-set-time“ (s. Abb. 10). Bei höheren Verdünnungen ist die „on-set-time“ adäquat, der „peak“ allerdings zu gering. Außerdem ist Innovin kein rekombinanter TF, d.h. er verhält sich von Charge zu Charge sehr variabel.

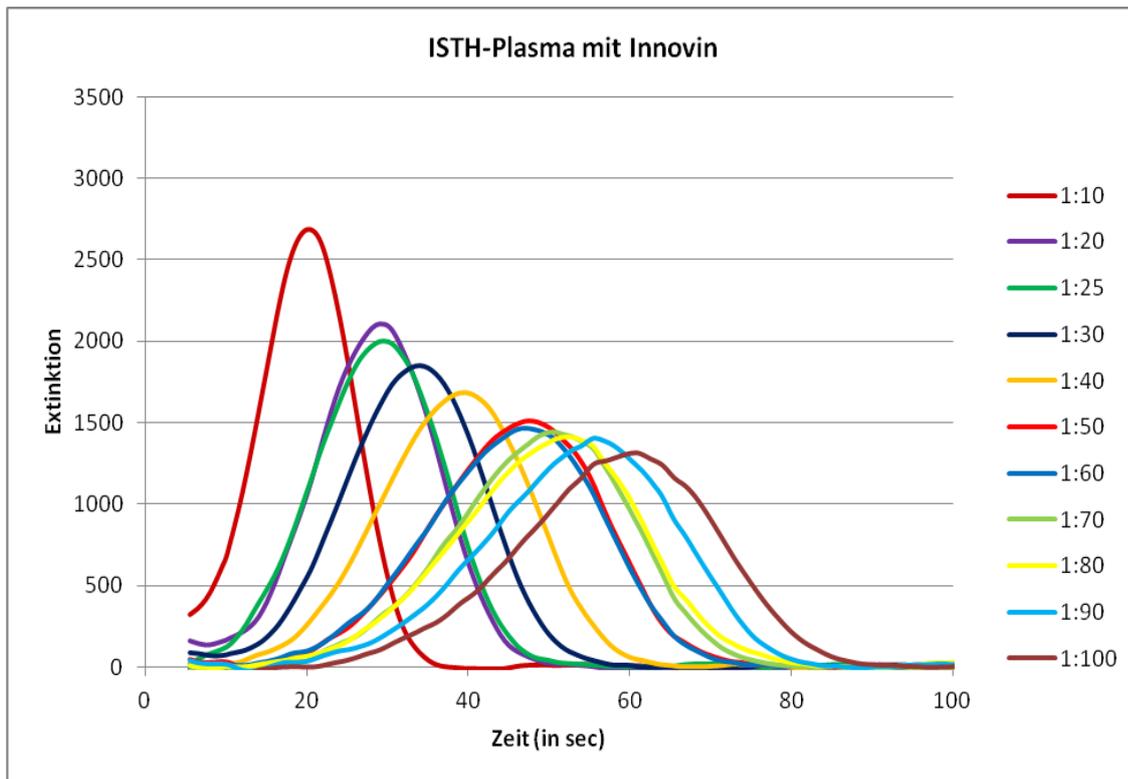


Abb.10: Darstellung der Abhängigkeit von Extinktion und Zeit bis zur ersten Thrombinbildung von der Konzentration des TF (hier: Innovin) bei Aktivierung von ISTH-Plasma (Kurve: MW aus n = 3 Messungen).

3.1.3 PPP

Bei dem getesteten TF PPP ist bereits in unverdünntem Zustand keine hohe Extinktion zu messen, weshalb er nicht weiter verdünnt wird (s. Abb. 11). PPP zeigt jedoch eine ausreichend lange „on-set-time“, weshalb er auch für die nachfolgenden Messungen in Frage kommt.

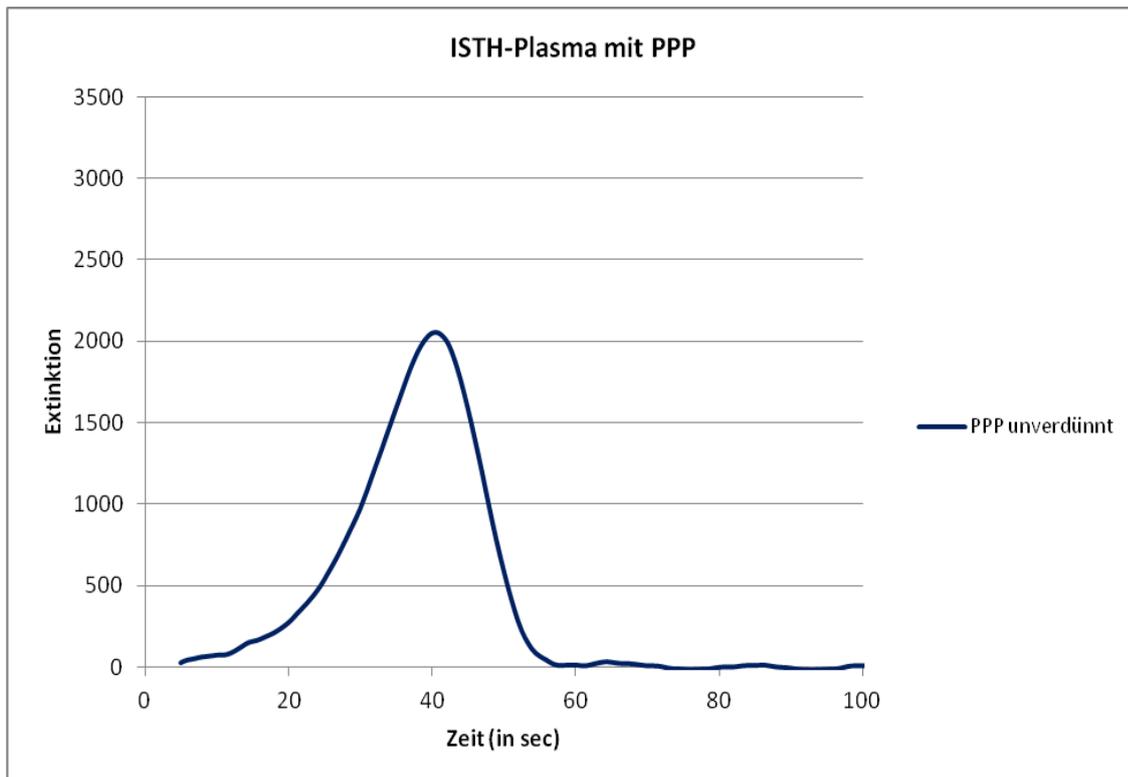


Abb.11: Aktivierung des ISTH-Plasmas mit dem unverdünnten TF PPP (Kurve: MW aus n = 3 Messungen).

3.1.4 Thromborel

Beim rekombinanten TF Thromborel misst man ebenfalls in der geringen Verdünnungen genügend hohe „peaks“, allerdings ist die „on-set-time“ in jeder Verdünnung zu kurz (s. Abb. 12).

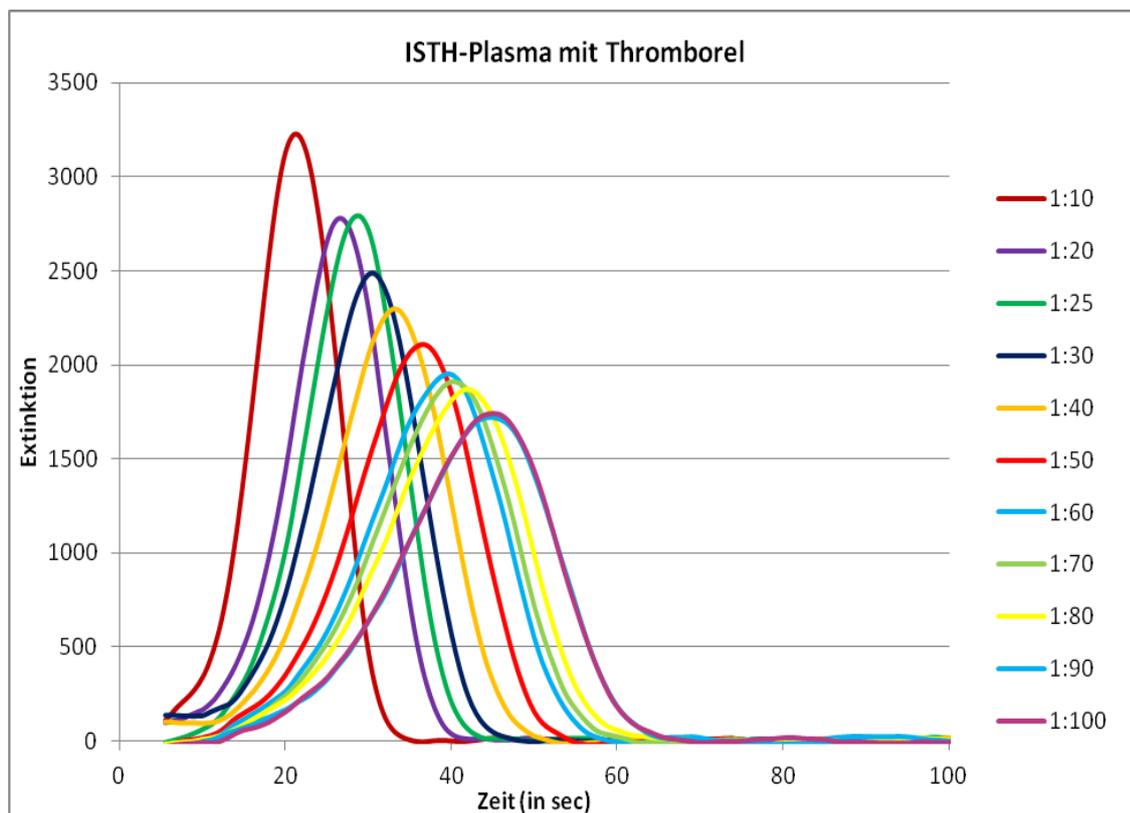


Abb.12: Darstellung der Abhängigkeit von Extinktion und Zeit bis zur ersten Thrombinbildung von der Konzentration des TF (hier: Thromborel) bei Aktivierung von ISTH-Plasma (Kurve: MW aus n = 3 Messungen).

3.1.5 Ausgewählte Tissue Faktoren

Die in Abb.13 gezeigten TF (Recombiplastin in den Verdünnungen 1:50 und 1:25, PPP) erfüllen die zuvor definierten Kriterien weitestgehend und werden für alle nachfolgenden ex-TDT-Messungen in den Hauptversuchen ausgewählt.

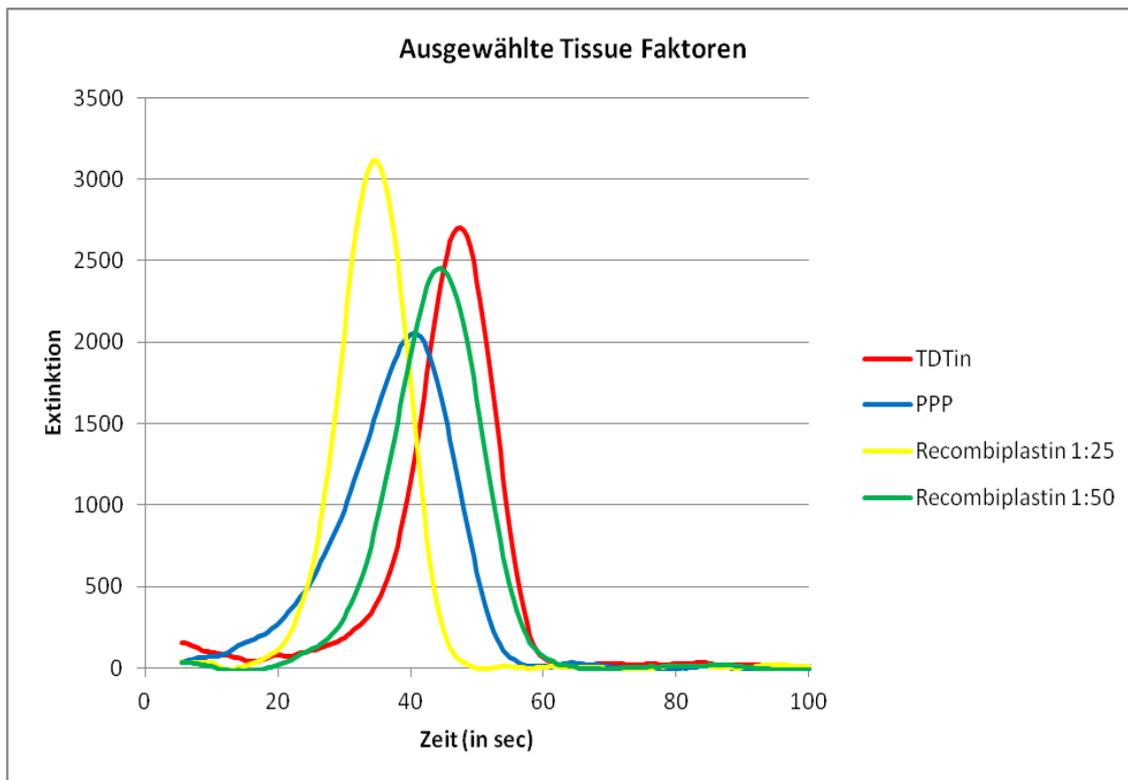


Abb.13: Darstellung der ausgewählten TF sowie dem intrinsischen Aktivator TDTin für die nachfolgenden ex-TDT-Messungen (Kurve: MW aus n= 3 Messungen).

3.2 Ergebnisse der ex-TDT-Messungen beim gesunden Spenderkollektiv

Mittelwerte beim Normalkollektiv

	Extinktion	peak (%)	on-set-time (sec)
TDTin	2562	93	46
PPP	2247	109	39
Recombi 1:50	2542	104	41
Recombi 1:25	3025	102	32

Tab.1: Mittelwerte der Extinktion, des peaks (%) und on-set-time (%), abhängig vom verwendeten TF, beim Normalkollektiv (n =10).

Mit den Messungen an einem gesunden Spenderkollektiv wird ein Bereich festgelegt, der, abhängig vom jeweils benutzten TF, als Normalbereich definiert werden kann. Der Normbereich erstreckt sich hier von der, im Normalkollektiv minimal gemessenen Thrombinbildung bis zur maximal gemessenen Thrombinbildung (s. auch Tab.1).

Die Normalbereiche sind:

- PPP: 103 – 115%
- Recombi 1:50: 97 – 112%
- Recombi 1:25: 92 – 109%.

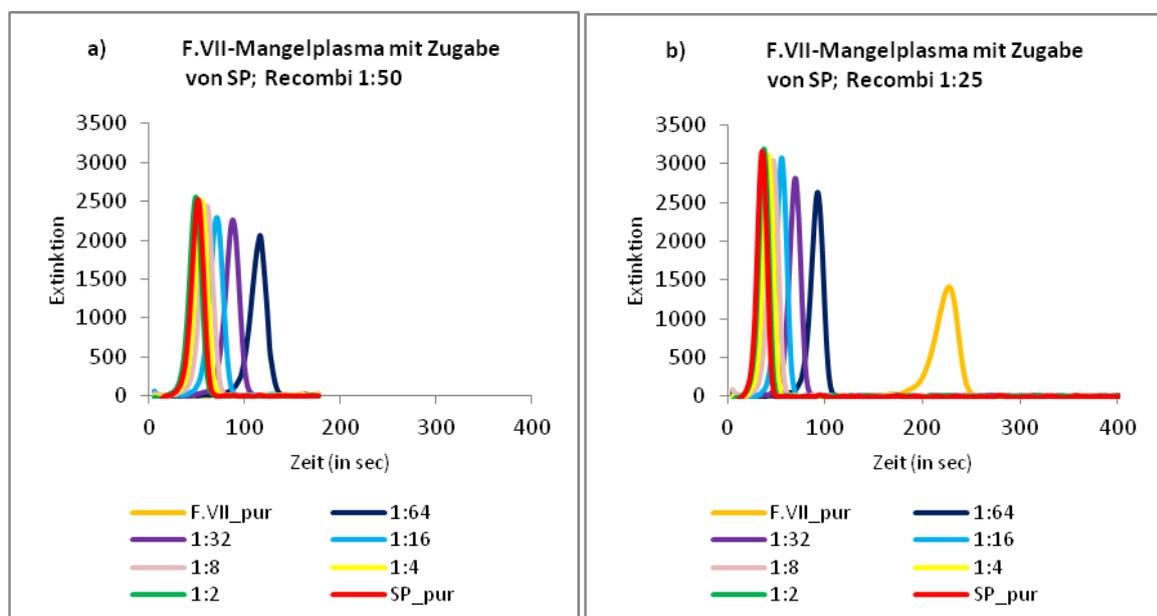
3.3 Ergebnisse der ex-TDT-Messungen bei Faktor-Mangelplasmen

Bei den ex-TDT-Messungen der verschiedenen Faktor-Mangelplasmen (F.II – F.XII-Mangel) wird deutlich, dass der ex-TDT tatsächlich nur für den „extrinsischen“ Weg sensitiv ist und somit nur ein Mangel der Faktoren II, V, VII oder X erkannt wird (Abb. 14 a)-c), 15 a)-d)). Alle anderen Faktor-Mängel werden ausschließlich bei der in-TDT®-Messung erkannt (Abb. 15).

Gibt man zu den Mangelplasmen Standardplasma hinzu, sieht man, in Abhängigkeit von der zugegebenen Menge an SP, eine verbesserte Thrombingenerierung. Je mehr SP, welches alle Gerinnungsfaktoren in normaler Menge enthält, zugegeben wird, desto höher ist die Extinktion beim ex-TDT, d.h. desto höher ist die Thrombinbildungsfähigkeit (s. Tab. 2-4).

Faktor VII-Mangelplasma

Die Abb.14 a)-d) zeigen den Zusammenhang zwischen der Thrombinbildung und dem vorhandenen F.VII-Mangel. In Abb.14 a)-c) wird das F.VII-Mangelplasma mit extrinsischen Aktivatoren, den TF, aktiviert. Je ausgeprägter der F.VII-Mangel ist (Kurve: F.VII_pur), desto kleiner ist die gemessene Thrombinbildungsfähigkeit (s. auch Tab.2). In Abb.14d) wird mit dem Kontaktaktivator TDTin gestartet. Hier kann der F.VII-Mangel nicht erkannt werden, da die Aktivierung zur Thrombinbildung des Plasmas nicht über den extrinsischen, sondern mit Kontaktaktivator, über den intrinsischen Weg stattfindet. Bei Durchführung beider Tests kann unterschieden werden, ob sich der Faktormangel auf der extrinsischen oder intrinsischen Seite der Gerinnungskaskade befindet (s. Tab.2).



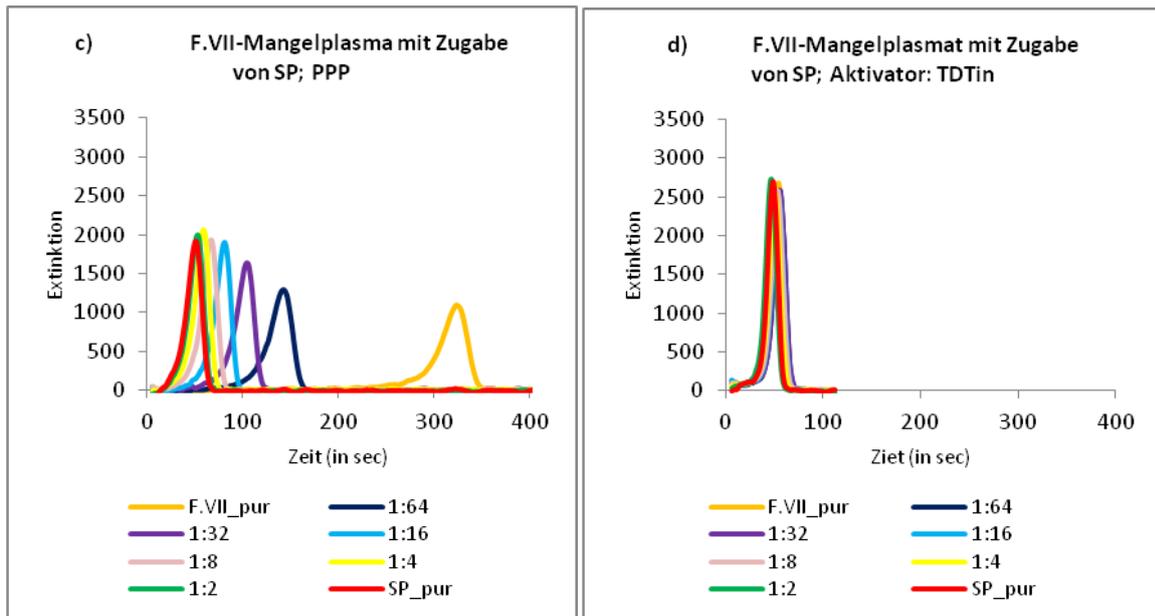


Abb.14 a)-d): ex-TDT-Messungen / in-TDT®-Messung bei F.VII-Mangelplasma ohne (F.VII_pur) und mit Zugabe von Standardplasma (Anzahl der Messungen je Kurve n=2).

	TDTex Recombi 1:50 peak (%)	TDTex Recombi 1:25 peak (%)	TDTex PPP peak (%)	TDT-Wert in-TDT®-Test peak (%)
F.VII-MP_pur	64	46	57	101
F.VII-MP_1:64	83	84	66	97
F.VII-MP_1:32	92	91	84	97
F.VII-MP_1:16	93	99	97	95
F.VII-MP_1:8	99	99	100	97
F.VII-MP_1:4	101	100	104	96
F.VII-MP_1:2	103	103	102	103
SP_pur	102	102	102	102

Tab.2: Messergebnisse des TDTex und in-TDT® in Abhängigkeit von der Ausprägung des Faktor-VII Mangels (Anzahl der Messungen je Verdünnung und Testansatz: n = 2).

Faktor II Mangelplasma

Die maximal mögliche Thrombinbildung ist abhängig von der Faktor-II-Mangelkonzentration (Abb.15 a)-d) und Tab. 3). F.IIa (= Thrombin) liegt auf der gemeinsamen Endstrecke, weshalb

der Mangel mit der ex-TDT-Messung (a-c), als auch mit dem in-TDT[®](d), erkannt werden kann.

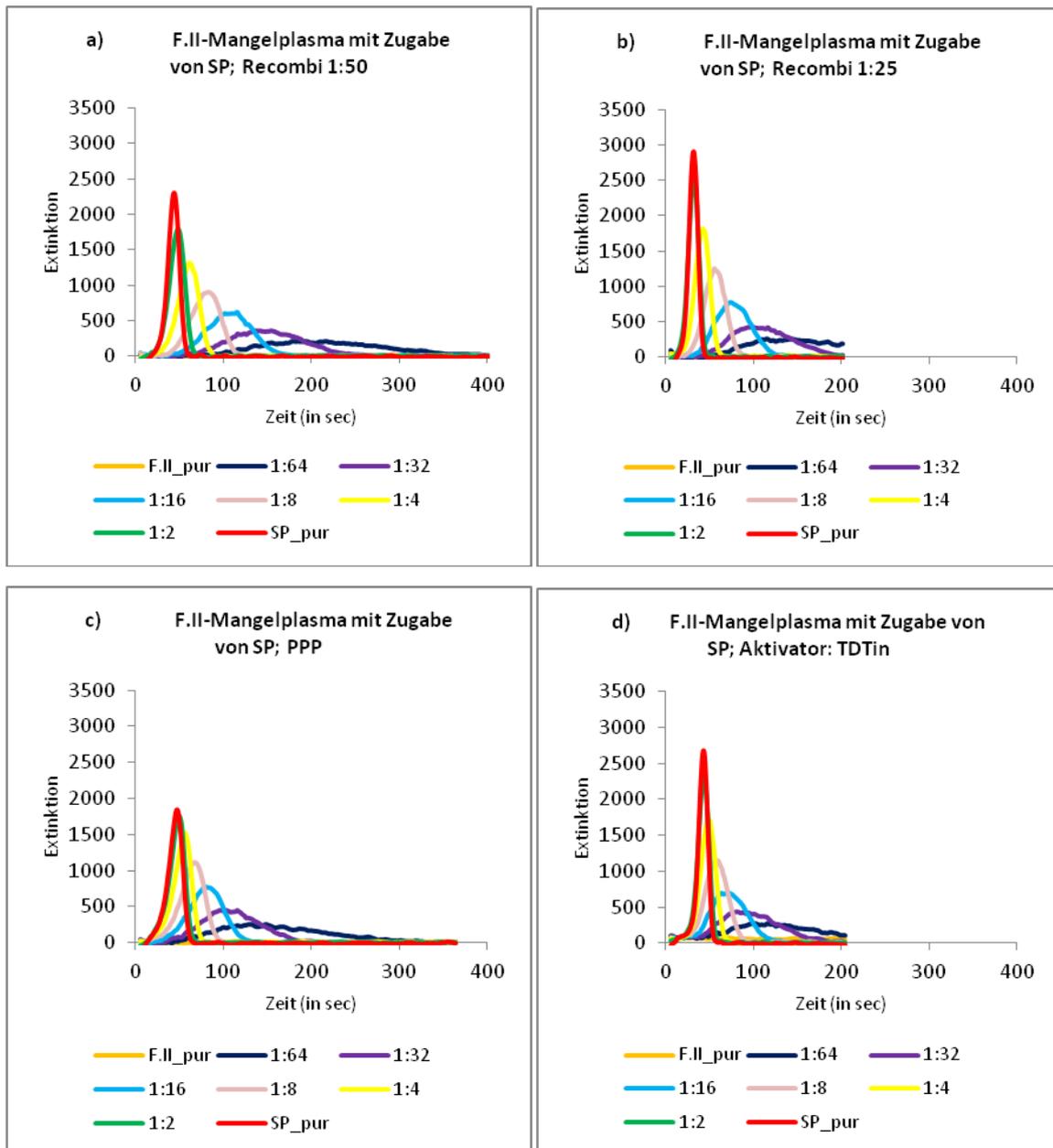


Abb.15 a)-d): ex-TDT-Messungen / in-TDT[®]-Messung bei F.II-Mangelplasma ohne (F.II_pur) und mit Zugabe von Standardplasma (Anzahl der Messungen je Kurve n=2).

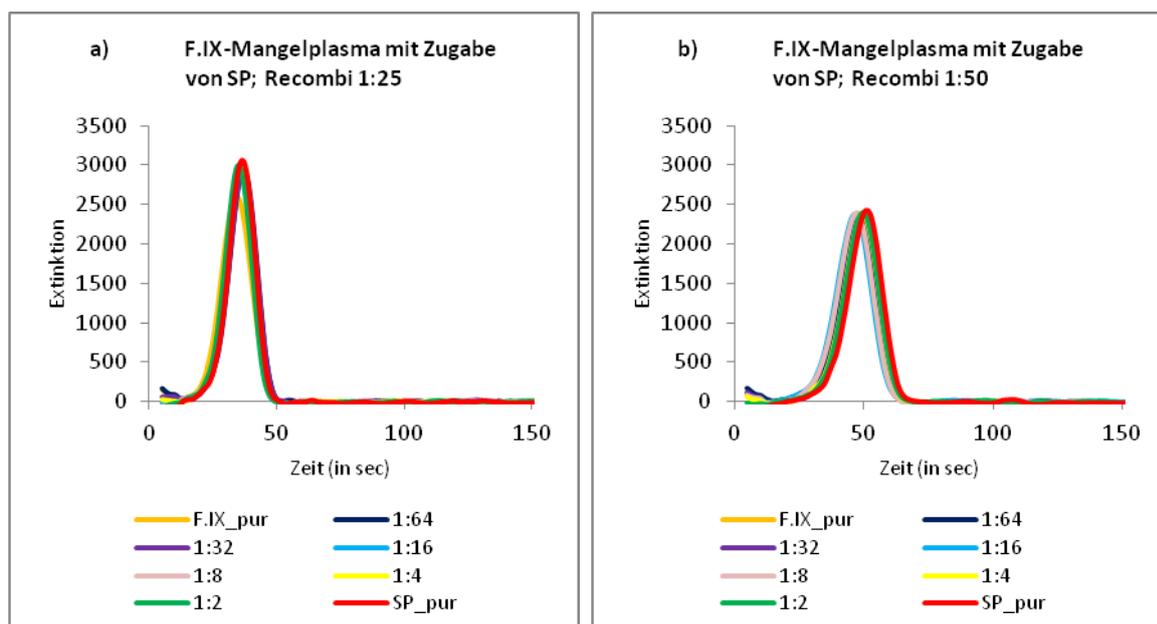
Die maximale Thrombinbildungsfähigkeit (%) ist abhängig von der Ausprägung des F.II-Mangels. Sie kann sowohl durch Aktivierung über den extrinsischen (Recombi 1:50 und 1:25, PPP), als auch intrinsischen (in-TDT[®]) Weg gezeigt werden.

	TDTex Recombi 1:50 peak (%)	TDTex Recombi 1:25 peak (%)	TDTex PPP peak (%)	TDT-Wert in-TDT®-Test peak (%)
F.II-MP_pur	1,8	2,3	2,4	3,5
F.II-MP_1:64	9,8	8,9	13,6	10,4
F.II-MP_1:32	16,5	15,3	24,3	16,3
F.II-MP_1:16	27,4	26,9	40,6	26,9
F.II-MP_1:8	40,3	43,5	58,5	43,6
F.II-MP_1:4	58,1	63,5	80,5	65,4
F.II-MP_1:2	78,7	88,9	92,7	88,5
SP_pur	102	102	102	102

Tab.3: Messergebnisse des TDTex und in-TDT® in Abhängigkeit von der Ausprägung des Faktor-II Mangels (Anzahl der Messungen je Verdünnung und Testansatz: n = 2).

Faktor IX Mangelplasma

In den Abbildungen 16 a)-c) und Tab. 4 wird der F.IX-Mangel nicht entdeckt, da mit extrinsischen Aktivatoren gestartet wird. Bei Anwendung des in-TDT® (Abb. 16 d)) wird der F.IX-Mangel entdeckt, da die Aktivierung zur Thrombinbildung des Plasmas hier über den intrinsischen Weg stattfindet.



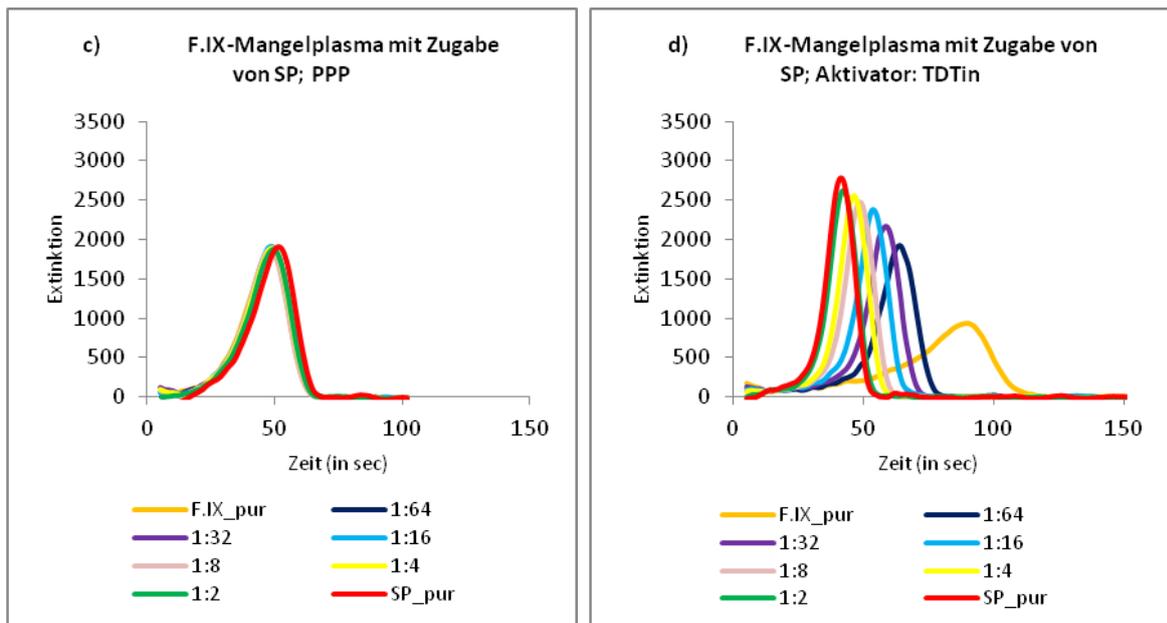


Abb.16 a)-d): ex-TDT-Messungen / in-TDT®-Messung bei F.IX-Mangelplasma ohne (F.IX_pur) und mit Zugabe von Standardplasma (Anzahl der Messungen je Kurve n=2).

Die maximale Thrombinbildungsfähigkeit(%) in Abhängigkeit von dem Mangel an F.IX scheint in der ex-TDT-Messung nach Aktivierung mit TF unverändert. Eine Differenzierung kann ausschließlich durch die Aktivierung im in-TDT® abgebildet werden.

	TDTex Recombi 1:50 peak (%)	TDTex Recombi 1:25 peak (%)	TDTex PPP peak (%)	TDT-Wert in-TDT®-Test peak (%)
F.IX-MP_pur	98,4	97,8	94,8	34,3
F.IX-MP_1:64	98,9	98,2	95,6	70,9
F.IX-MP_1:32	99,1	97,4	96,7	79,5
F.IX-MP_1:16	99,1	99,2	97,2	87,1
F.IX-MP_1:8	99,8	100,2	95	90,7
F.IX-MP_1:4	99,7	99,4	95,9	94
F.IX-MP_1:2	100,3	99,4	94,7	96,1
SP_pur	102	102	102	102

Tab.4: Messergebnisse des TDTex und in-TDT® in Abhängigkeit von der Ausprägung des Faktor-IX Mangels (Anzahl der Messungen je Verdünnung und Testansatz: n = 2).

3.4 Ergebnisse der ex-TDT-Messungen bei hypokoagulatorischen Plasmen

3.4.1 Plasmarückstellproben bei Einzelfaktormangel

Bei den TDT-Messungen des Plasmas von Patienten mit einem spezifischen Faktormangel (s.2.1.3) wird deutlich, dass der ex-TDT mit seinen Aktivatoren Recombiplastin und PPP ausschließlich für den extrinsischen Weg sensitiv ist. D.h. ein Mangel des Faktors VII lässt sich durch den ex-TDT erkennen. Ein Faktor-XII, -XI- oder VIII-Mangel kann durch den ex-TDT nicht aufgedeckt werden. Aktiviert man bei diesen Mängeln allerdings mit dem TDTin-Kontaktaktivator, zeigt sich die reduzierte Thrombinbildung. Ein Faktor-V-Mangel wird sowohl vom ex-TDT, als auch vom in-TDT® in der Messung erkannt. Durch die gleichzeitige Durchführung des ex-TDT und in-TDT® kann man differenzieren, ob ein intrinsischer und/oder extrinsischer Faktor im Plasma verringert ist.

Des Weiteren kann eine hohe Korrelation zwischen dem Ausmaß des F.VIII-Mangels und der gemessenen Thrombinbildungsfähigkeit, dem in-TDT-Wert (in %) (Abb.17) festgestellt werden. Der Korrelationskoeffizient beträgt hier $r = 0,881$.

Der Zusammenhang zwischen einem F.VII-Mangel- und der Thrombinbildung im ex-TDT ist mit einem Korrelationskoeffizienten von $r = 0,522$ jedoch nur mäßig (Abb.18).

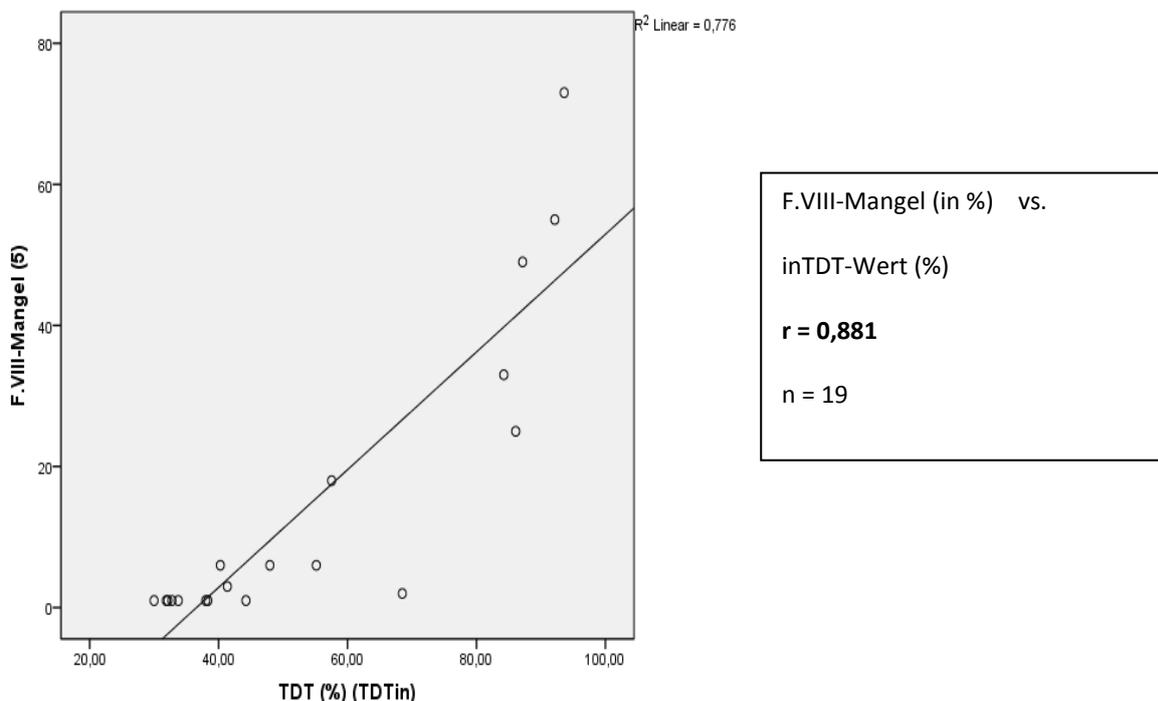


Abb.17: Hohe Korrelation zwischen dem F.VIII-Mangel und inTDT (%).

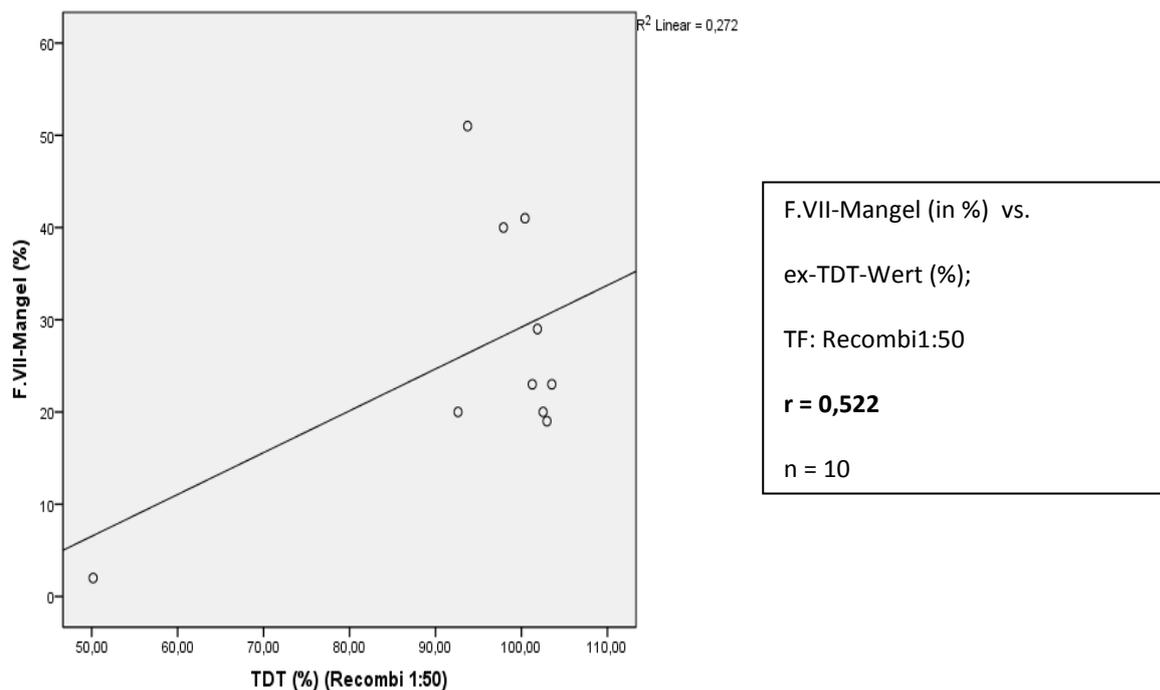


Abb.18: Mäßig hohe Korrelation zwischen dem F.VII-Mangel und exTDT (%).

3.4.2 Plasmaproben marcumarisierter Patienten

Bei Patienten unter Marcumar-Therapie, d.h. mit einer deutlichen Reduktion der funktionstüchtigen Vitamin-K-abhängigen Faktoren II, VII, IX und X, ist die Thrombinbildungsfähigkeit sichtbar herabgesetzt (s.Abb.19).

Der Mittelwert der Extinktion aller 10 ex-TDT-Messungen liegt, bei Aktivierung z.B. durch den TF Recombi 1:25, bei 3052, d.h. bei ca. 60% (s. Tab.5 und 6). Die im Vergleich gemessene Extinktion des SP liegt hier bei 2351, bzw. bei 92-115% beim Normalkollektiv (s. 3.2).

Der gleichzeitig mitbestimmte Quickwert dieser Patienten liegt im Mittel bei 27%.

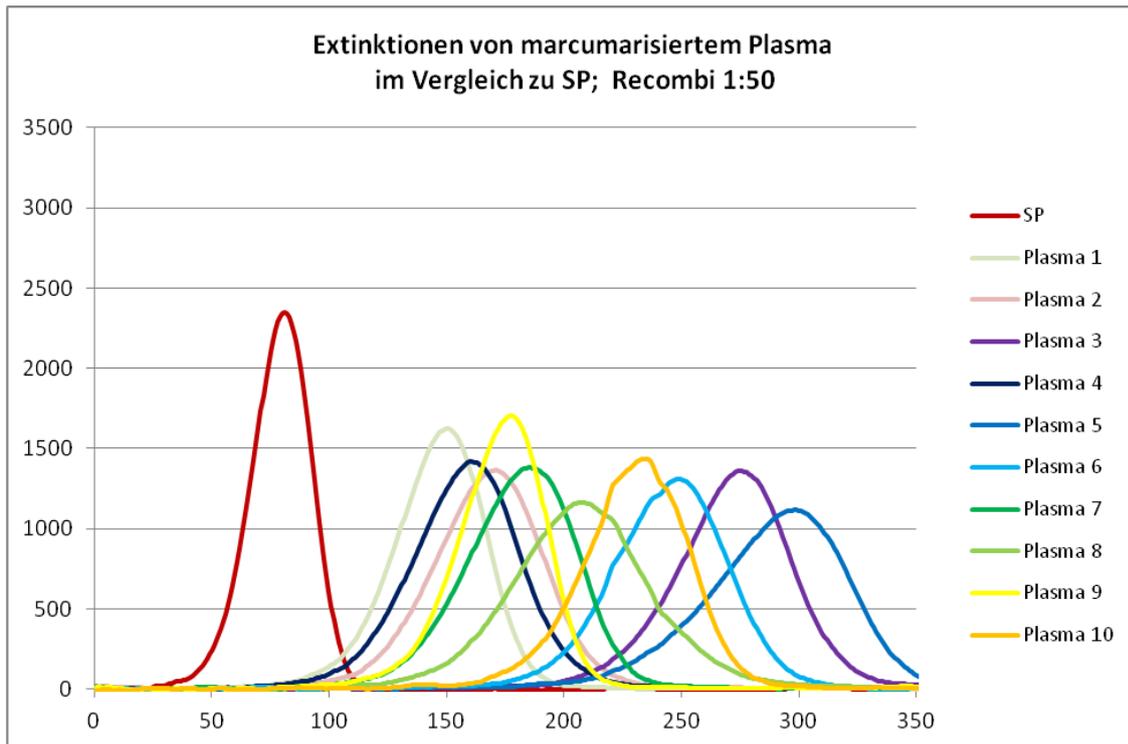


Abb.19: Das Thrombinbildungspotential des Plasmas marcumarisierter Patienten ist deutlich reduziert. Als Aktivator wird hier beispielhaft Recombi 1:50 verwendet (n=10, MW aus je 3 Messungen).

	Recombi 1:50	Recombi 1:25	PPP	TDTin-Kontaktaktivator
Extinktion des SP (im Vergleich)	2351	3052	1870	2612
Extinktion bei Marcumar-Plasmen	1390 ± 171	1826 ± 242	1223 ± 125	1684 ± 292
Prozentwert zum SP	56% ± 7,6	60% ± 8,4	62% ± 6,7	63% ± 11

Tab.5: Durchschnittlich erreichte maximale Extinktion und Prozentwerte der marcumarisierten Plasma-Proben im Vergleich zur Extinktion des SP (n = 10 mit MW und SD).

Patienten unter Marcumar

	Extinktion	peak (%)	on-set-time (sec)
TDTin	1684,3	62,8	67
PPP	1223,1	61,5	115
Recombi 1:50	1390,5	56,2	110,4
Recombi 1:25	1826,6	59,5	87,2
Quick	---	26,8	---

Tab.6: Übersicht über die ermittelten Mittelwerte bei der ex-TDT-Messung von marcumarisiertem Plasma mit verschiedenen TF (n=10, MW aus je 3 Messungen).

3.5 Ergebnisse der ex-TDT-Messungen beim Normalkollektiv unter Zugabe von PPSB

Die ex-TDT-Messung bei Plasma von gesunden Spendern ergibt einen Bereich, der als „normal“ definiert werden kann (s. 3.2). Er liegt, abhängig vom TF, mit dem aktiviert wird, zwischen 92% - 115% (s. 3.2, Tab.1).

Durch die Zugabe von PPSB kann die Thrombinbildung gesteigert werden (Durchführung s.2.2.6). Nach der Zugabe von 25‰ PPSB = 0,625 IE/ml wird jedoch ein Plateau erreicht (s. Abb. 20 und 21 und Tab.7). Dieses ist allerdings auch abhängig vom jeweils verwendeten TF (s. Abb.21). Darüber hinaus ist keine weitere Steigerung der Thrombinbildung messbar. Bei einem 75kg schweren Menschen mit ca. 2887 ml Plasma entspricht dies etwa einer Zugabe an PPSB von 1800 IE (s. 2.2.6).

Ebenso verhält es sich mit den gleichzeitig bestimmten Quick-Werten der gesunden Plasmaspender. Der Quick-Wert steigt initial schnell an, dann wird jedoch ein Plateau zwischen 5‰ und 25‰ erreicht (Abb.21).

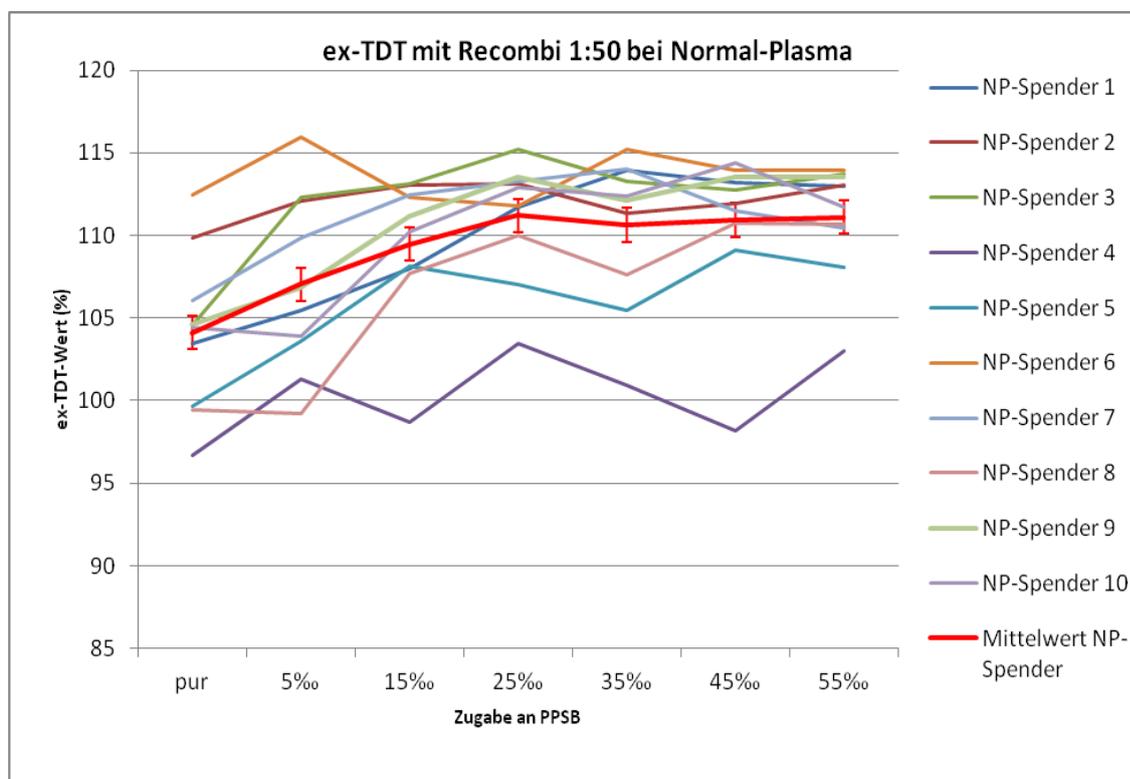


Abb.20: ex-TDT-Messungen (Aktivator Recombi 1:50) bei Plasma-Proben gesunder Spender. Steigerung der Thrombinbildung durch Zugabe von PPSB (n= 10, Kurven: MW aus je 2 Messungen; rote Kurve: MW ± SD).

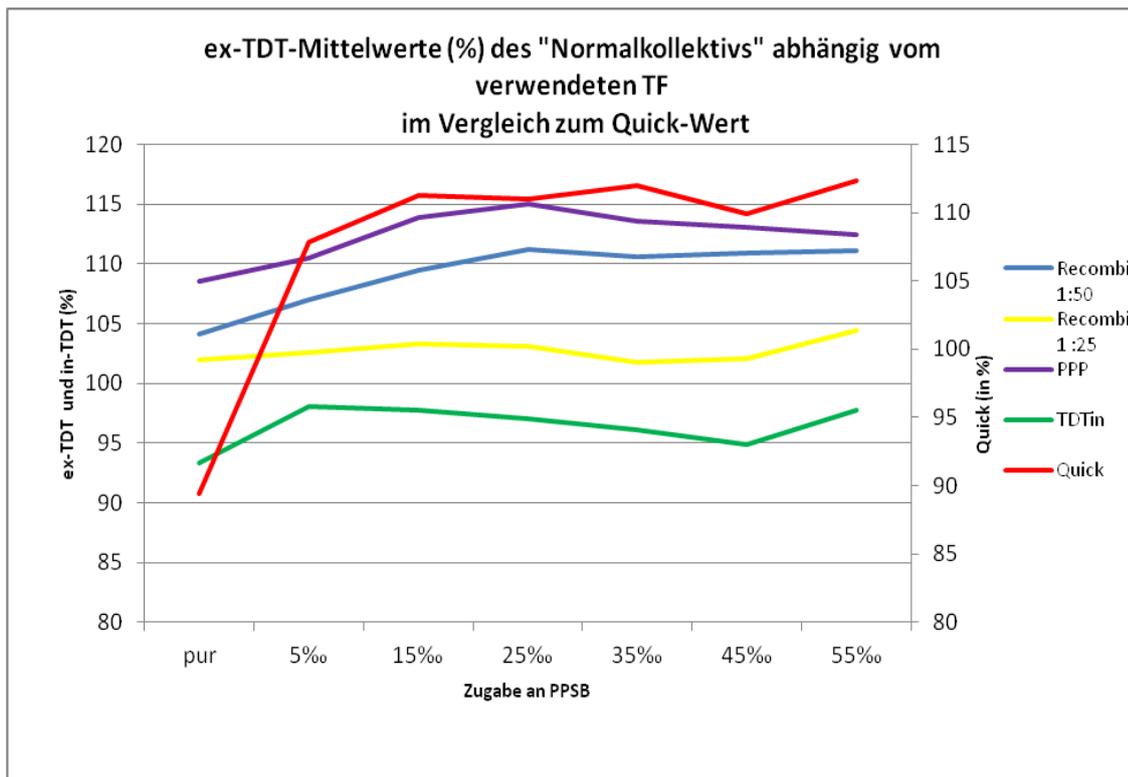


Abb.21: Mittelwertkurven (n= 10) der ex-TDT-Messungen – abhängig vom gewählten Aktivator - bei Plasma des „Normalkollektivs“ unter Zugabe von PPSB. Gleichzeitige Darstellung des Quick-Werts unter Zugabe an PPSB.

Tissue Factor/Aktivator	ex-TDT / in-TDT (%)	ex-TDT / in-TDT (%)
	peak - „Norm“	peak - „Maximum“ nach Zugabe von 25‰ PPSB
Recombi 1:50	97% - 112%	103% - 115% (MW: 111% ± 3,4)
Recombi 1:25	92% - 109%	92% - 109% (MW: 103 ± 5)
PPP	103% - 115%	109% - 120% (MW: 115% ± 2,9)
TDTin	69% - 101%	77% - 104% (MW: 97% ± 7,1)

Tab.7: Vergleich des „normalen“ Thrombinbildungsbereichs (ex-TDT / in-TDT „Norm“) und dem Bereich der maximal möglichen Thrombinbildung von Plasma gesunder Spender (n = 10) nach Zugabe von 25‰ PPSB (ex-TDT „Maximum“).

3.6 Ergebnisse der ex-TDT-Messungen von marcumarisiertem Plasma unter Zugabe von PPSB

Das Thrombinbildungspotential des Plasmas von Patienten unter oraler Antikoagulation ist, wie unter 3.4.2 ersichtlich, herabgesetzt.

Durch Zugabe von PPSB zum Plasma lassen sich bei den Marcumar-Patienten annähernd „Normalwerte“ erreichen (s. Abb. 22-26). Bei der Aktivierung mit Recombi 1:50, 1:25 und PPP wird bei der Zugabe von 25‰ PPSB \pm 0,625 IE ein Plateau erreicht, über das hinaus keine höhere Thrombingenerierung mehr erreicht werden kann. Für einen 75 kg schweren Menschen unter Marcumar-Therapie bedeutet das, dass etwa 1800 IE PPSB gebraucht würden, um wieder eine „normale“ Thrombinbildung zu erreichen. Dies gilt allerdings nur unter der Voraussetzung, dass der Quick-Wert im „normalen“ therapeutischen Bereich liegt.

Die Thrombinbildungsfähigkeit erhöht sich nach der 25‰-PPSB-Zugabe auf Werte zwischen 70% (Minimum bei Rec 1:50) und 110% (Maximum bei Rec 1:50). Die Messungen beim Normalkollektiv zeigen ohne Zugabe von PPSB eine durchschnittliche Thrombinbildung (abhängig vom verwendeten TF) zwischen 92 und 115% (s. 3.2). Diese Werte werden nach PPSB-Zugabe nun auch bei marcumarisiertem Plasma erreicht.

Damit entspricht das Thrombinbildungspotential von Plasma marcumarisierter Patienten nach PPSB-Gabe in etwa dem eines Normalkollektivs.

Durch den medikamentös verursachten Mangel der Faktoren II, V und X, die auf der gemeinsamen Endstrecke liegen, kann die verminderte Thrombinbildungsfähigkeit auch in der TDT-Messung nach Aktivierung mit in-TDT-Aktivator gezeigt werden (s. Abb. 25).

In der Zusammenschau der Mittelwert-Kurven der ex-TDT-Werten aller TF (Abb. 26) sieht man, dass sich diese Thrombinbildungskurven unabhängig vom verwendeten TF sehr ähnlich verhalten: Nach Zugabe von 15‰ PPSB flacht die Kurve ab und ab 25‰ PPSB-Zugabe wird ein Plateau erreicht. In Abb. 26 wird der gleichzeitig gemessene Quickwert der Plasmen mit aufgetragen. Dieser steigt mit zunehmender PPSB-Gabe ebenfalls an, erreicht das Plateau etwas später (etwa ab 35‰iger PPSB-Gabe), damit aber auch den Normbereich.

Zwischen den Quickwerten und ex-TDT-Werten der Plasmen marcumarisierter Patienten lässt sich nur eine mäßig hohe Korrelation feststellen; $r = 0,5$ (Abb. 27).

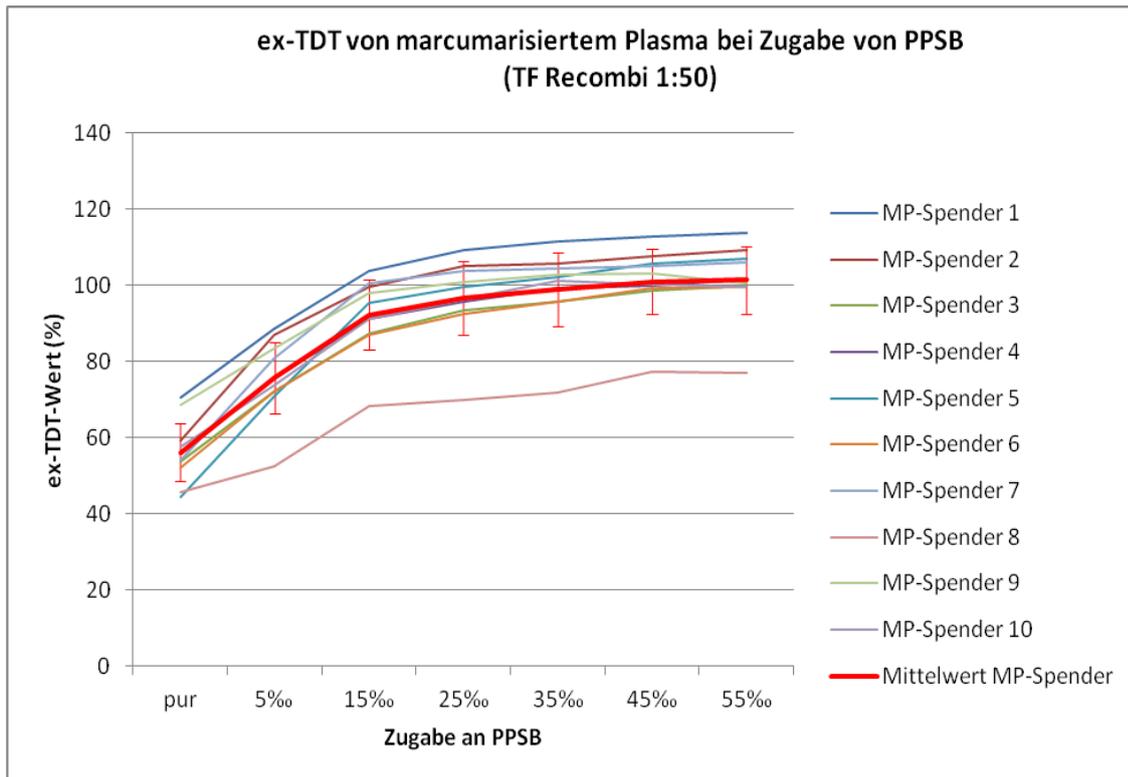


Abb.22: ex-TDT-Messungen (TF: Recombi 1:50) bei Plasma-Proben marcumarisierter Spender. Steigerung der Thrombinbildung durch Zugabe von PPSB (n= 10, Kurven: MW aus je 2 Messungen; rote Kurve: MW \pm SD).

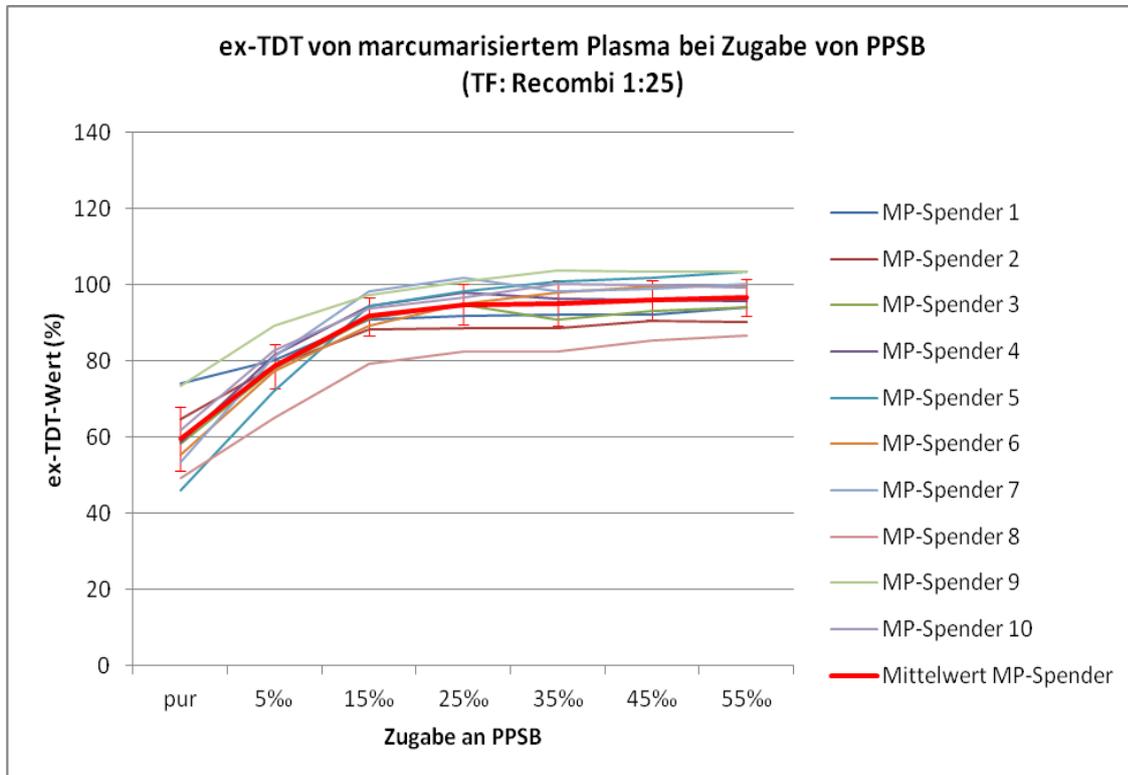


Abb.23: ex-TDT-Messungen (TF: Recombi 1:25) bei Plasma-Proben marcumarisierter Spender. Steigerung der Thrombinbildung durch Zugabe von PPSB (n= 10, Kurven: MW aus je 2 Messungen; rote Kurve: MW \pm SD).

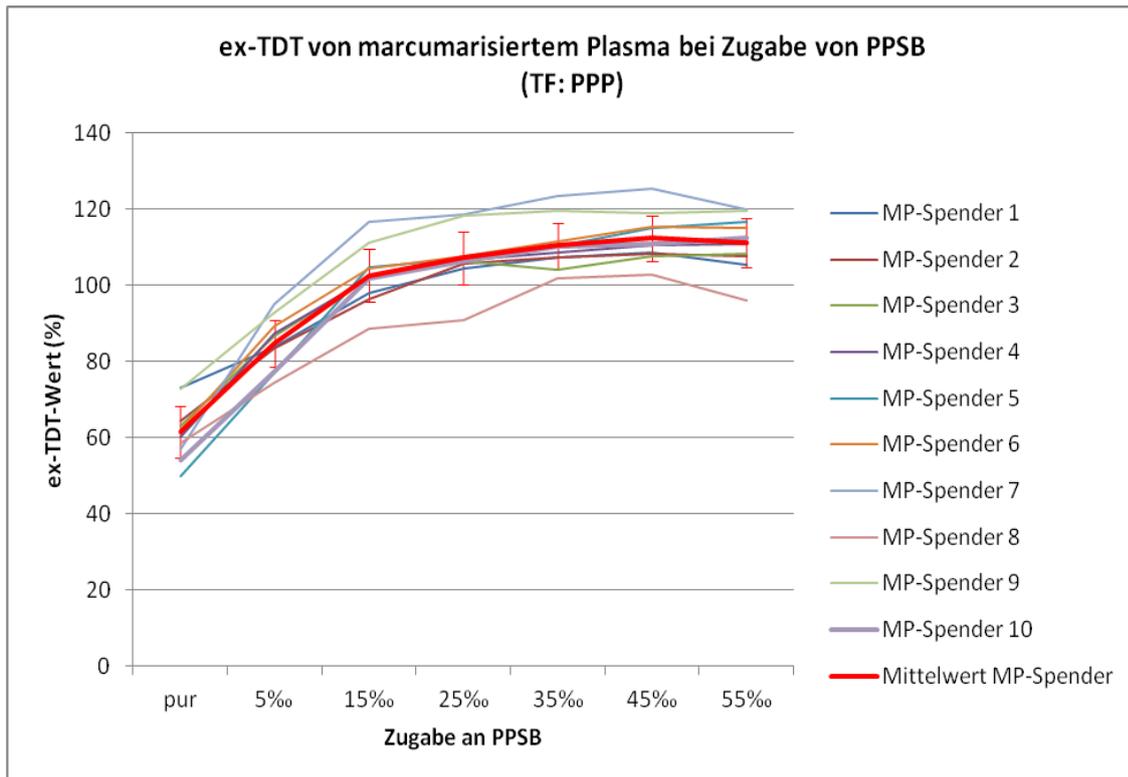


Abb.24: ex-TDT-Messungen (TF: PPP) bei Plasma-Proben marcumarisierter Spender. Steigerung der Thrombinbildung durch Zugabe von PPSB (n= 10, Kurven: MW aus je 2 Messungen; rote Kurve: MW ± SD).

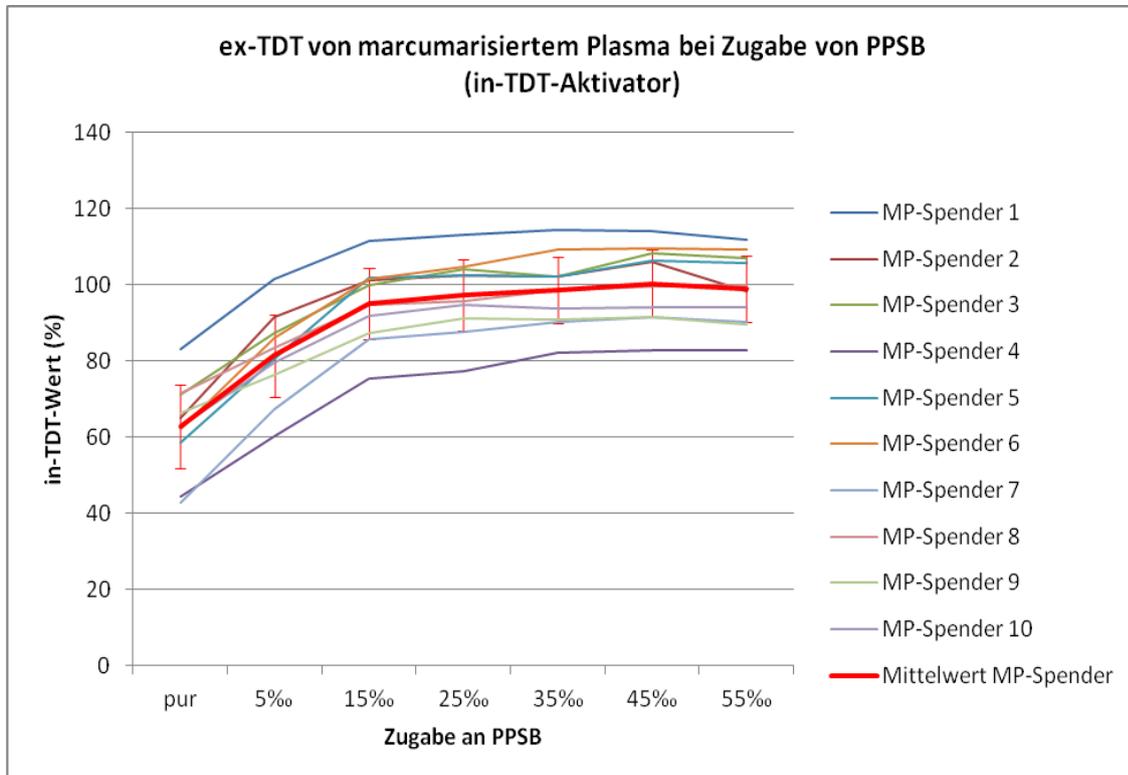


Abb.25: TDT-Messungen (Kontaktaktivator des in-TDT®) bei Plasma-Proben marcumarisierter Spender. Steigerung der Thrombinbildung durch Zugabe von PPSB (n= 10, Kurven: MW aus je 2 Messungen; rote Kurve: MW ± SD).

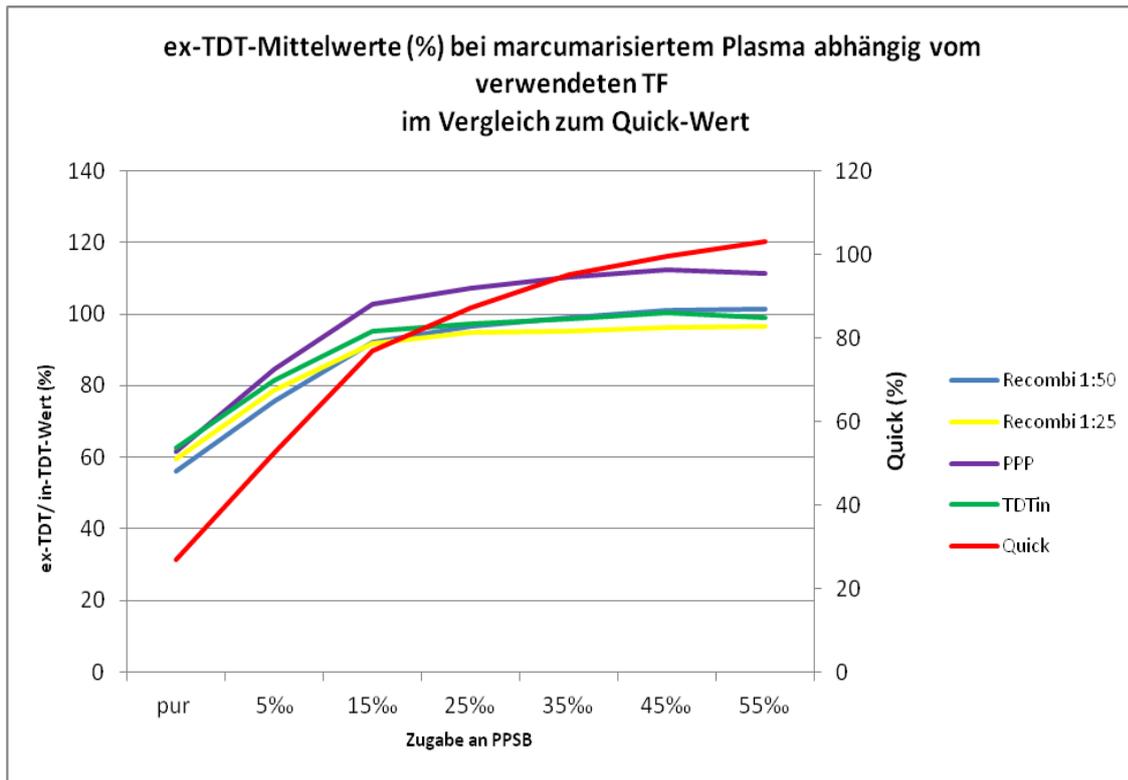


Abb.26: Mittelwertkurven (n= 10) der ex-TDT-Messungen – abhängig vom gewählten Aktivator - bei marcumarisiertem Plasma unter Zugabe von PPSB (s. Abb. 22-25). Gleichzeitige Darstellung des Quick-Werts unter Zugabe an PPSB.

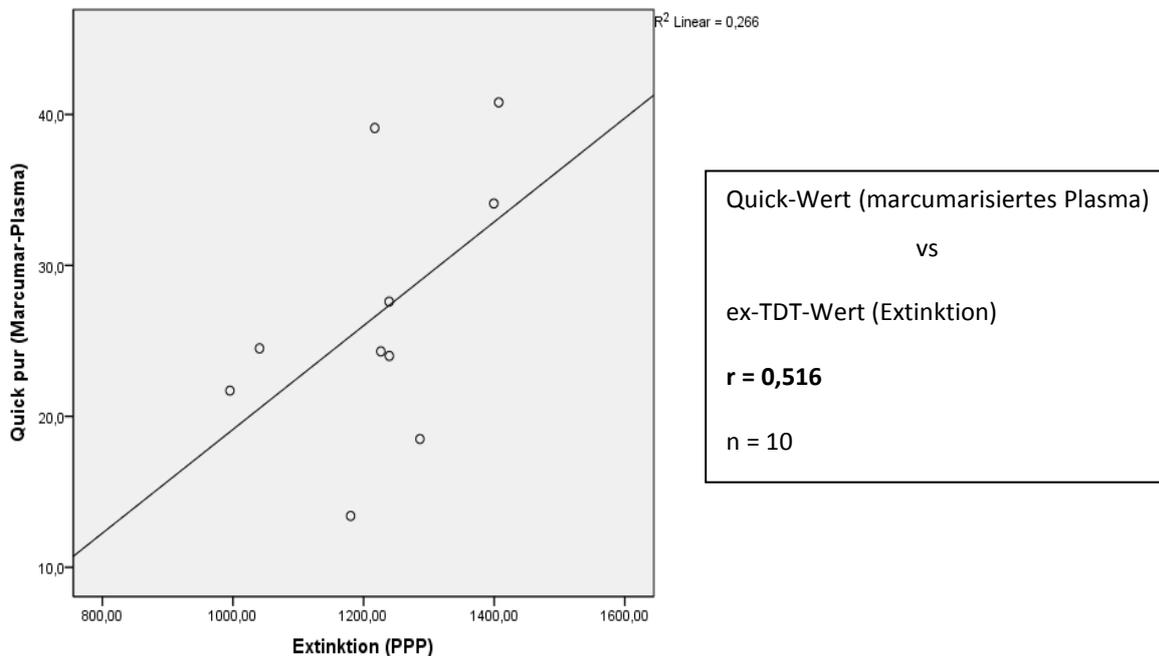


Abb.27: Geringe Korrelation zwischen Quick-Wert und Extinktion des marcumarisierten Plasmas (hier: Aktivierung durch PPP).

3.7 Ergebnisse der ex-TDT-Messungen von Plasma schwangerer Patientinnen als Beispiel für Hyperkoagulation

Die TDT-Messungen bei Hyperkoagulation werden mit Plasma von schwangeren Patientinnen im dritten Trimenon durchgeführt. Während einer normal verlaufenden Schwangerschaft nimmt die Konzentration der Gerinnungsfaktoren, v.a. die der Faktoren VII, VIII und X, stetig zu und erreicht zum Geburtstermin ein Maximum [59, 60].

Bei den ex-TDT-Messungen mit Recombi 1:50 und PPP zeigt sich zwar ein höheres Thrombinbildungspotential als beim SP, die Steigerung scheint aber nicht nur von einem einzigen erhöhten Faktor abhängig zu sein. Schwangere mit einem nur mäßig erhöhten F.VII erreichen teilweise gleich hohe oder auch höhere Extinktionen, als Schwangere mit einem deutlich erhöhten F.VII (Abb. 28, 29). Auch in den Korrelationsberechnungen (Abb. 31a) + b)) wird deutlich, dass mit dem ex-TDT eine Hyperkoagulation nicht zuverlässig und eindeutig nachgewiesen werden kann. Dies zeigt sich auch daran, dass beim ex-TDT durchgeführt mit PPP als Aktivator ein mäßiger Zusammenhang zwischen F.VII-Konzentration und den ex-TDT-Werten festgestellt werden kann ($r = 0,62$; s. Abb. 31b)). Im ex-TDT mit Recombi 1:50 wird jedoch eine negative Korrelation für den alleinigen Zusammenhang zwischen F.VII-Konzentration und ex-TDT-Werten ($r = -0,366$; s. Abb. 31a)) errechnet.

Bei der TDT-Messung mit dem inTDT-Aktivator werden trotz deutlich erhöhtem F.VIII (s.Abb.30) keine höheren Extinktionen als im SP erreicht. In der Korrelationsauswertung zwischen F.VIII-Erhöhung und Thrombinbildung (TDT-Wert) ist ein mit einem Korrelationswert von $r = 0,738$ positiver Zusammenhang erkennbar (Abb. 32).

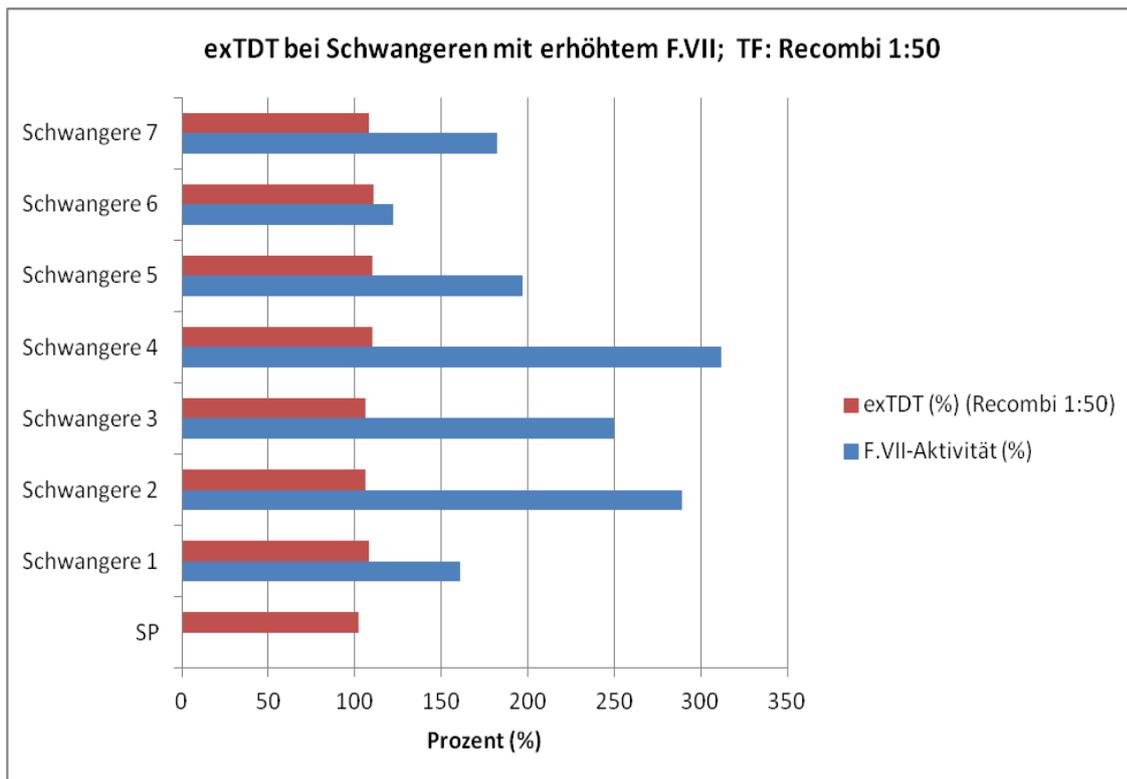


Abb.28: Elevierter exTDT (%) bei schwangeren Patientinnen (n= 7) im Vergleich zum SP, jedoch keine eindeutige Korrelation mit der erhöhten F.VII-Aktivität (%). TF: Recombi 1:50.

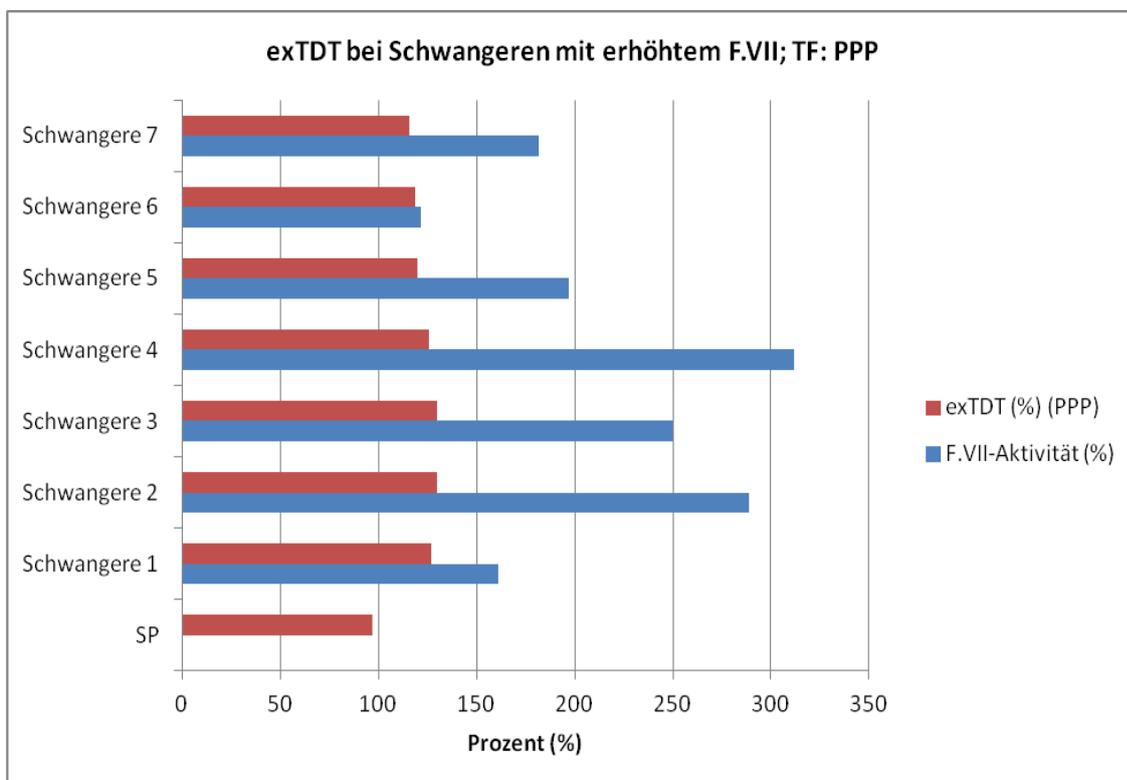


Abb.29: Elevierter exTDT (%) bei schwangeren Patientinnen (n= 7) im Vergleich zum SP, jedoch keine eindeutige Korrelation mit der erhöhten F.VII-Aktivität (%). TF: PPP.

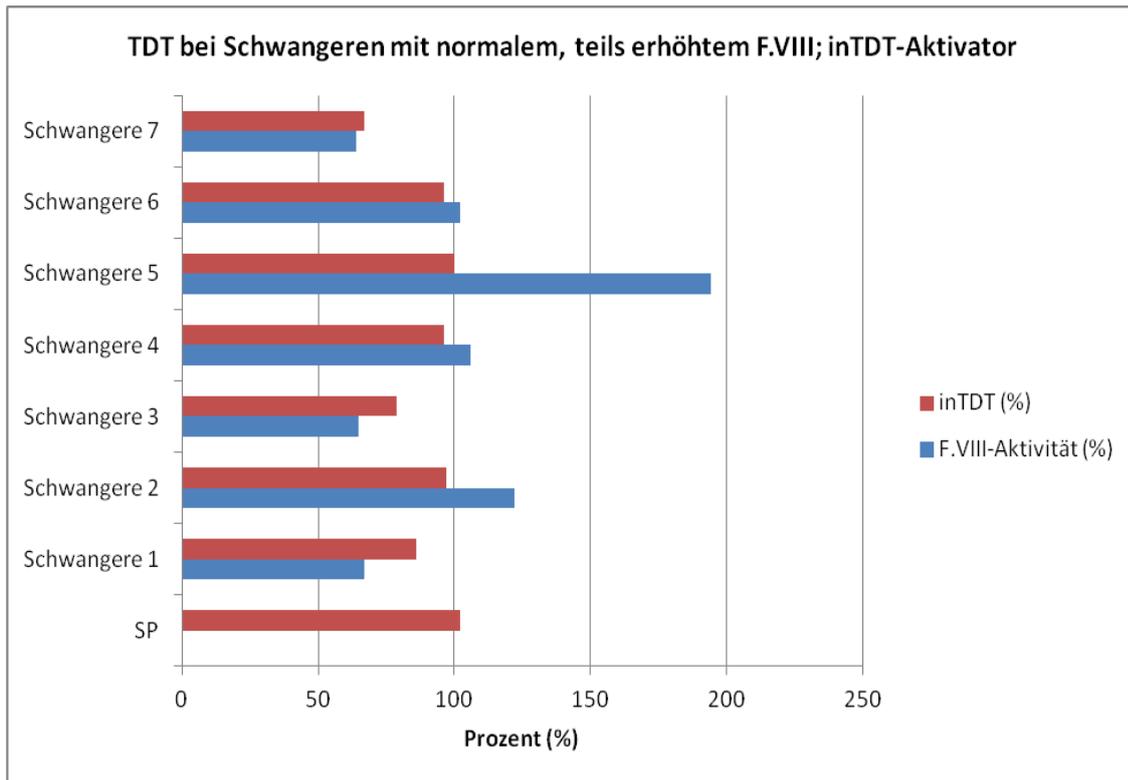
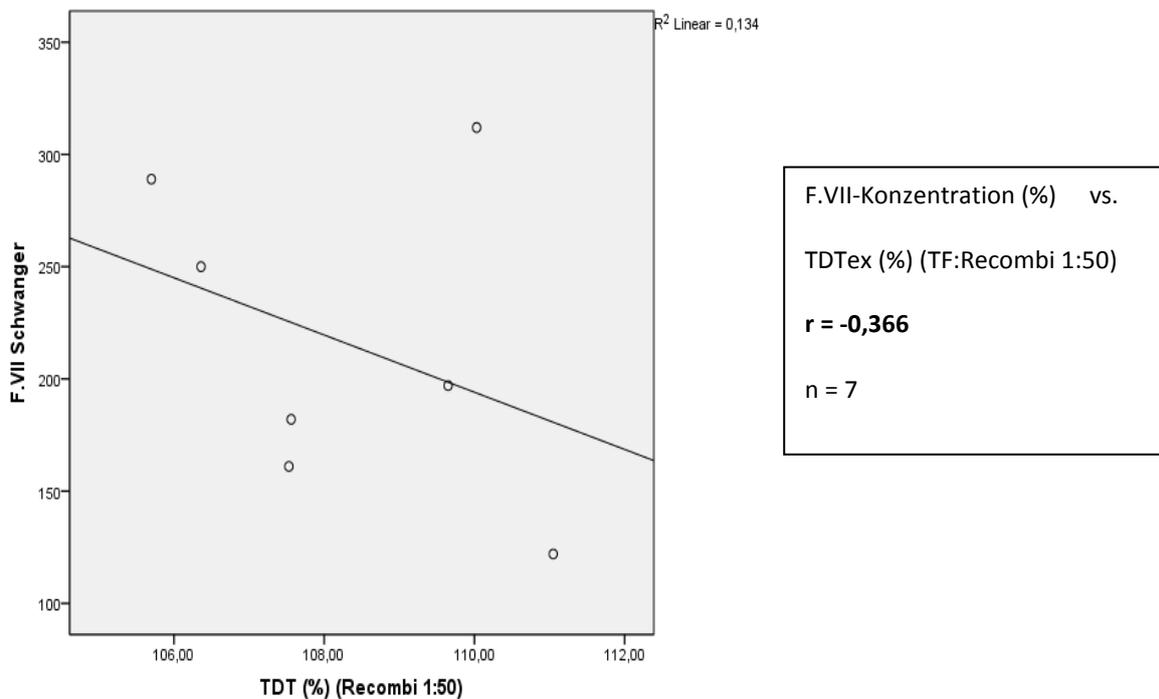
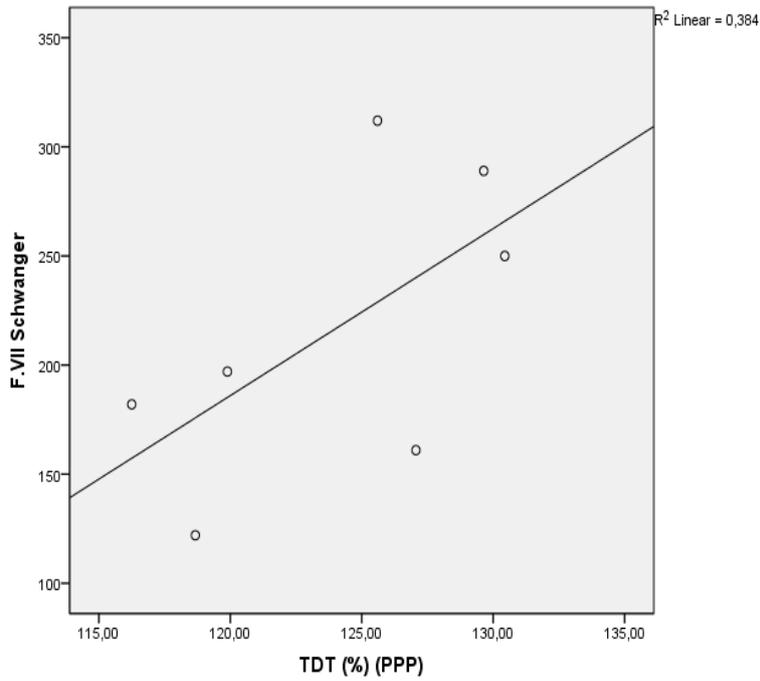


Abb.30: Elevierter inTDT (%) bei schwangeren Patientinnen (n= 7) im Vergleich zum SP, jedoch keine eindeutige Korrelation mit der erhöhten F.VIII-Aktivität (%). inTDT-Aktivator.



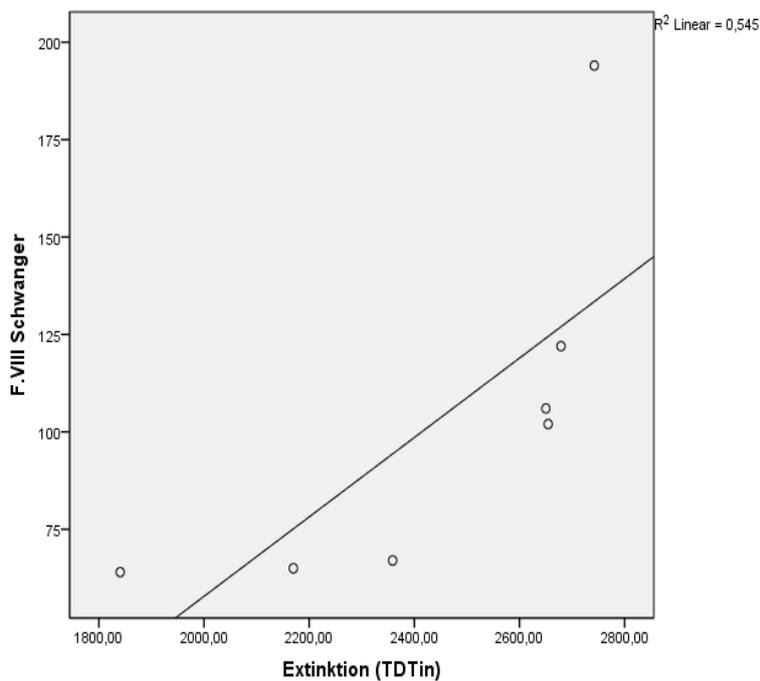
a)



F.VII-Konzentration (%) vs.
 TDTex (%) (TF: PPP)
r = 0,620
 n = 7

b)

Abb.31a) und b): Darstellung der Korrelation zwischen den F.VII-Werten (%) schwangerer Patientinnen und ihrer Thrombinbildung. Es lässt sich keine eindeutige Korrelation darstellen.



F.VIII-Konzentration (%) vs.
 TDT-Wert (%) (Aktivator:
 TDTin)
r = 0,738
 n = 7

Abb.32: Darstellung der Korrelation zwischen F.VIII-Werten (%) und Thrombinbildung. Es wird mit dem intrinsischen inTDT-Aktivator aktiviert. Es zeigt sich eine Tendenz, aber keine besonders hohe Korrelation.

4 Diskussion

Mit dem Thrombingenerierungstest (ex-TDT) soll ein potentiell globaler Blutgerinnungstest für den extrinsischen Weg untersucht und vorgestellt werden.

Ziel ist es, einen Test zu finden, der zuverlässig und sensitiv die Thrombinbildung für den extrinsischen Weg der Gerinnung anzeigt, sowie schnell, leicht und zuverlässig durchführbar ist.

Der Test basiert auf dem Aufbauprinzip des bereits erhältlichen Tests in-TDT®. Ähnlich wie die Methode von Hendrik C. Hemker et. al [61] welche das endogene Thrombingenerierungspotential (endogenous thrombin potential = ETP) bestimmt, soll durch den ex-TDT die maximal mögliche Thrombinbildungsfähigkeit gemessen werden.

Um die Thrombinbildung über „extrinsische“ Faktoren auslösen zu können, werden zuerst hierfür geeignete TF gesucht und zwei mögliche Faktoren gefunden: Recombiplastin in den Verdünnungen 1:50 und 1:25, sowie PPP.

Entscheidend für die Auswahl ist, dass bei der Durchführung des ex-TDT mit diesen TF eine genügend lange „on-set-time“ (Zeit bis zur ersten Thrombinbildung) und ein ausreichend hoher „peak“ (maximale Thrombinbildungsfähigkeit) ähnlich zu den Werten im in-TDT® erreicht werden kann.

Der Test soll das aktuelle hämostatische Profil eines Menschen möglichst genau abbilden können, d.h. er soll in der Lage sein, sowohl eine verminderte, eine normale und eine gesteigerte Thrombinbildungsfähigkeit detektieren zu können.

Diese Kriterien werden anhand verschiedener Kontrollgruppen überprüft:

- ex-TDT-Messungen von Plasmen gesunder Blutspender, um ein „Normalkollektiv“ zu beschreiben
- ex-TDT-Messungen von kommerziell erhältlichen Faktor-Mangelplasmen, Plasmen von Patienten mit spezifischem Faktor-Mangel, sowie Plasmen von Patienten unter oraler Antikoagulation als Modell für eine Hypokoagulation
- ex-TDT-Messungen von Plasmen Gesunder, sowie markumarisierter Patienten unter Zugabe von PPSB zur Darstellung der maximal möglichen Thrombinbildungsfähigkeit

- ex-TDT-Messungen von Plasmen schwangerer Patientinnen als Modell für eine Hyperkoagulation.

Als Referenzwert wird die Thrombinbildung von ISTH-Plasma bestimmt. Gegen diesen Wert wird SP, welches in hämostaseologischen Laboren weit verbreitet ist, geeicht und als Kallibrator bei jeder Messung mitgeführt.

Es kann für die Thrombinbildungsfähigkeit im ex-TDT, vergleichbar dem Quick-Wert, ein Normalbereich definiert werden. Er ist spezifisch für die Faktoren des „extrinsischen“ Weges, erkennt hypokoagulatorische Zustände und zeigt Zusammenhänge zwischen dem Ausmaß eines Faktormangels der extrinsischen Kaskade und der Verminderung in der Thrombinbildung an. Mit dem ex-TDT lassen sich hyperkoagulatorische Zustände nur sehr eingeschränkt darstellen.

In der nachfolgenden Diskussion soll der ex-TDT zuerst mit dem „Calibrated Automated Thrombin Generation“ (CAT) verglichen werden, einem anderen Test, welcher das endogene Thrombinpotential misst. Anschließend wird auf die Durchführung und die Einflussfaktoren des Test-Ansatzes eingegangen.

Danach werden die vom ex-TDT erzielten Ergebnisse diskutiert, um dann den Test als möglichen Gerinnungstest einzuordnen und zu bewerten.

4.1 ex-TDT im Vergleich zu „Calibrated Automated Thrombin Generation“ (CAT)

Schon seit 1953 gibt es einen von Robert Gwyn Macfarlane und Rosemary Biggs entwickelten Test zur Messung der maximalen Thrombinbildung [39, 62]. Dieser ist jedoch lange Zeit in Vergessenheit geraten, weil er in der Durchführung sehr aufwendig ist. Erst Hemker et.al gelingt es mit dem CAT eine Methode zu entwickeln, mit der die Thrombinbildung kontinuierlich und v.a. automatisiert durch die Umsetzung eines chromogenen Substrats, aufgezeichnet werden kann [39, 61]. Die Aktivierung erfolgt beim CAT über eine Mischung aus einem TF und einer spezifischen Menge an Phospholipiden [62, 63].

Die Berechnung des Substratumsatzes beim CAT erfolgt als Extinktionsbestimmung. Das aktive Zentrum von Thrombin wird nicht nur von Antithrombin, sondern auch von α 2-Macroglobulin blockiert, weshalb das von diesem Komplex gemessene Signal, immer vom Gesamtsignal abgezogen werden muss [44, 63]. Aus der so erhaltenen Kurve wird die 1.Ableitung gebildet und man erhält die Thrombingenerierungskurve, das sogenannte Thrombogram® ([64]), mit ihren verschiedenen Komponenten (s. Abb. 33).

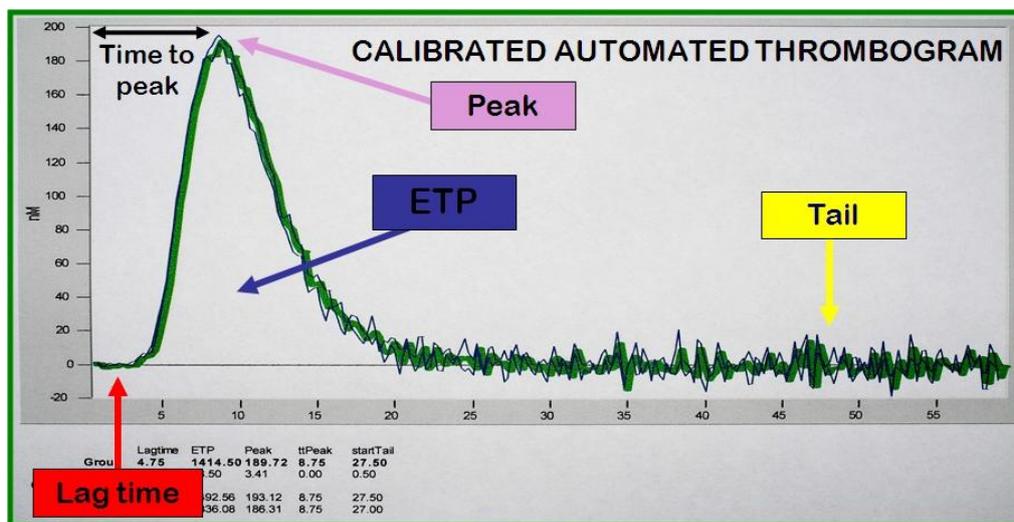


Abb.33: ([65]) Thrombingenerierungskurve des CAT, mit lag time (LT), time to peak (TTP), peak height und endogenous thrombin potential (ETP).

Die „lag time“ (= LT) entspricht hauptsächlich dem Quickwert, da der Aktivator größtenteils ein TF, jedoch mit einer definierten Menge an Phospholipiden, ist. Bezüglich der TDT-Messungen lässt sich die „lag time“ mit der „on-set-time“ vergleichen, d.h. der Zeit bis zur ersten Thrombinbildung. Die „time to peak“ ist die Zeit, die benötigt wird, bis das Maximum der Thrombinbildung erreicht ist. Am „peak“ ist das Maximum der Aktivierung erreicht. Die

„area under the curve“ (AUC) entspricht dem ETP. Mit dem ETP wird der Einfluss von Aktivatoren wie auch von Inhibitoren auf die Thrombinbildung erfasst. Allerdings muss der Einfluss der Inhibitoren *in vitro* eher als artifiziell angesehen werden.

Das verwendete chromogene Substrat hat im Gegensatz zu seinen Vorgängern, nur einen sehr geringen inhibitorischen Effekt auf die Reaktionen von Thrombin und reagiert auch nur sehr langsam, weshalb die Thrombinbildung komplett registriert werden kann [61]. Ein Nachteil des chromogenen Substrats ist, dass es nur in plättchenarmen Plasma (=PPP = platelet poor plasma), d.h. defibriniertem Plasma, verwendet werden kann. Die Extinktionsmessung ist ansonsten durch die durch Fibrin verursachte Trübung nicht möglich. Die Defibrinierung verändert jedoch die Kinetik des Thrombins. Das Substrat konkurriert mit Antithrombin um das aktive Zentrum des Thrombins, weshalb der Thrombinabbau langsamer wird und das gemessene ETP künstlich erhöht wird [61, 66]. Dieser Effekt kann rechnerisch korrigiert werden.

Seit 2000 gibt es ein fluorogenes Substrat, dass die Messung in plättchenreichem Plasma (=PRP) erlaubt [67]. Dadurch kann auch das Zusammenspiel von Thrombin und Thrombozyten [63, 68], sowie der Einfluss von Fibrin auf die Gerinnung im CAT mitberücksichtigt werden.

Der CAT wird bis jetzt viel zu wissenschaftlichen Zwecken in Laboren verwendet, um das Gerinnungspotential des Blutes komplett erfassen zu können, jedoch bisher nicht in der Routinediagnostik eingesetzt.

Die einzelnen Komponenten des CAT werden durch die individuelle Zusammensetzung des Plasmas bzw. von Veränderungen im Messprotokoll und durch den Gebrauch unterschiedlicher Reagenzien (z.B. verschiedener TF) unterschiedlich beeinflusst. K. Machlus et al. [54] untersucht den Einfluss von erhöhten F.VIII, F. IX und F. XI –Konzentrationen auf die einzelnen Komponenten in PPP und PRP und variiert dabei zusätzlich die Konzentration des zugegebenen TF. Dabei zeigt sich, dass der Einfluss der erhöhten Faktorenkonzentration auf das Thrombinbildungspotential in PPP und PRP nahezu identisch ist, die Zeit bis zur maximalen Thrombinbildung aber stark beeinflusst wird. Durch die erhöhten Faktoren kommt es zu höheren ETP- und peak-Werten, wobei der Anstieg der peak-Werte proportional größer ist. Der Einfluss der TF wird unter 4.3 noch genauer erläutert.

Der ex-TDT erfasst die maximale Thrombinbildung, d.h. es wird die 1. Ableitung der maximalen Extinktion (= „peak“) berechnet (s. 2.2.1). Hier ist alles funktionsfähige Prothrombin in Thrombin umgesetzt und die maximale Aktivierung erreicht. Mehr Thrombin, als zu diesem Zeitpunkt gebildet ist, ist der Körper von sich aus nicht in der Lage, zu generieren.

Mit dem ex-TDT können alle weiteren Ursachen, die Einfluss auf die plasmatische Gerinnung nehmen, angeborene (z.B. F.VII-Mangel) oder erworbene (z.B. Antikoagulantientherapie, Hyperkoagulopathie in der Schwangerschaft, etc.), erfasst werden.

Die Zeit bis zur ersten Thrombinbildung (LT beim CAT, on-set-time beim ex-TDT) wird bestimmt, hat allerdings nur eine untergeordnete Rolle. Die Zeit bis zur maximalen Thrombinbildung (TTP) wird in der Auswertung des ex-TDT nicht berücksichtigt, weil sie vielen Einflüssen unterliegen.

Die maximal mögliche Thrombinbildung scheint auch nach oben limitiert zu sein, wie sich bei der ex-TDT-Messung nach Zugabe von PPSB zum Normalplasma zeigt. Die Thrombinbildung kann noch leicht gesteigert werden, erreicht dann aber im oberen Normbereich ein Plateau. Dies ist physiologisch sinnvoll, da der Körper sich vor einer gesteigerten Gerinnungsfähigkeit und damit verbundenem Thromboserisiko schützen will.

4.2 Durchführbarkeit des ex-TDT

Damit ein Blutgerinnungstest Anwendung findet, muss eine leichte und zuverlässige Durchführbarkeit gewährleistet sein. Die Ergebnisse sollten vergleichbar und reproduzierbar sein. In der nachfolgenden Tabelle (Tab. 8) werden die Unterschiede in Bezug auf Durchführung und Ergebnisse zwischen CAT und ex-TDT dargestellt.

	CAT	ex-TDT
Plasmaaufbereitung	Geringe Spuren von Thrombozyten oder Leukozyten im PFP beeinflussen deutliche LT und ETP-Werte (s. Dragaud et al. [69]).	(Einfluss auf ex-TDT-Werte bei Resten von zellulären Bestandteilen im Plasma nicht untersucht).
Vergleichbarkeit der Ergebnisse	Beeinflusst durch die Präanalytik, das verwendete Referenzplasma bzw. durch den Kallibrator, das zu messende Plasma, die Geräte sowie der TF (s. 4.3).	Durch Eichung gegen ISTH-Plasma wird ein 100%-Wert der Thrombinbildungsfähigkeit festgelegt. SP wird gegen ISTH geeicht und bei allen weiteren ex-TDT-Messungen als Kallibrator mitgeführt.
Zeitaufwand	Sehr hoch, bisher nur für wissenschaftliche Zwecke verwendet [39].	Auf dem weit verbreiteten BCS-Gerät durchführbar. Es ist möglich, viele Messungen zeitgleich und in kurzer Zeit (etwa 15min) durchzuführen.
Thrombinbildungsfähigkeit	ETP entspricht der „area under the curve“ und erfasst den Einfluss von Aktivator und Inhibitoren, welche <i>in vitro</i> eher als artifiziell angesehen werden.	Nur die max. Thrombingenerierung ist entscheidend (= 1.Ableitung der max. Extinktion, peak).

Tab.8: Unterschiede zwischen CAT und ex-TDT bezüglich Durchführbarkeit und Ergebnis.

4.3 Einfluss des Tissue Factors auf die Thrombingenerierung

Die Auswahl des TF beeinflusst die messbare, maximal mögliche Thrombingenerierung eindeutig mit. Bei den ex-TDT-Messungen desselben Plasmas, welches durch verschiedene TF (hier: Innovin, Thromborel, Recombiplastin, PPP) und den Kontaktivator TDTin aktiviert wird, misst man sehr unterschiedliche Extinktionswerte. Auch die TF-Verdünnung (hier: Recombiplastin 1:50 und 1:25) nimmt Einfluss auf die Messung. So können bei einem Mischverhältnis, welches mehr TF enthält (hier Recombiplastin 1:25), höhere Extinktionen gemessen werden.

Die bei den ex-TDT-Messungen verwendeten TF (Recombi 1:50, 1:25 und PPP) sind sensitiv für den extrinsischen Weg der Gerinnung. D.h. eine veränderte Thrombinbildungsfähigkeit des Plasmas wird bei Aktivierung mit diesen TF nur bei einer Konzentrationsveränderung der Faktoren II, V, VII und X beobachtet (s.3.3).

K. Machlus et al. sowie auch A. Dielis et al. untersuchen den Einfluss von verschiedenen TF-Konzentrationen auf die Thrombingenerierung [54, 55]. Je höher die TF-Konzentrationen sind, desto höher fallen auch ETP und peak aus und desto kürzer ist die Zeit bis zur ersten Thrombinbildung. Allerdings benutzt Dielis zwei verschiedene TF (PPP 1pM und Recombiplastin 13,6pM), der von Machlus benutzte TF ist nicht bekannt. Dies schränkt die Vergleichbarkeit ein, da durch die Verwendung von verschiedenen TF schon unterschiedliche ETP-Werte erreicht werden.

Aus diesem Grund ist es wichtig, bei den ex-TDT-Messungen immer ein Standardplasma als Kallibrator mitzumessen, das zuvor mit dem jeweiligen TF aktiviert wird und gegen ISTH-Plasma geeicht ist. Erst dann kann der gemessene Wert richtig einordnet werden. Die von uns verwendeten TF für den ex-TDT sind alle als Aktivator gut einsetzbar. Es werden genügend hohe peaks erreicht, um die 1. Ableitung davon berechnen zu können und die „on-set-time“ ist ausreichend lange, um den Zeitpunkt der ersten Thrombinbildung abbilden zu können. Ein weiterer Vorteil des Recombiplastin ist seine derzeit schon routinemäßige Verwendung bei der PT-Zeit-Messung (Quickwert-Bestimmung).

4.4 Aussagekraft des ex-TDT

4.4.1 Der ex-TDT beim „Normalkollektiv“

Bei den durchgeführten ex-TDT-Messungen von Rückstellproben gesunder Blutspender kann ein Normalbereich für die Thrombinbildung definiert werden. Dieser liegt mit nur geringer Streuung bei etwa 100% (92% - 115%).

In den bisherigen Studien, die das ETP bestimmen, um die veränderte Thrombingenerierung z.B. bei Hämophilen nach F.VIII-Gabe [52] oder die intraindividuellen Veränderung des ETP bei gesunden Personen über ein Jahr hinweg [70] zu beobachten, wird der Vergleichswert stets studienintern durch die verwendeten Geräte, TF (-Konzentrationen) festgelegt. Ein allgemeingültiger Normalbereich, wie er hier für den ex-TDT bestimmt wird, existiert bisher noch nicht. Durch die Definition eines solchen Normbereichs gewährleistet man jedoch die bessere Vergleichbarkeit von Messergebnissen, auch bei der Testdurchführung in verschiedenen Laboren. Des Weiteren spart die einmalige Eichung und daraufhin folgende Festlegung des Normbereichs viel Zeit, was für die etwaige Einführung des ex-TDT in die Routinediagnostik auch von Bedeutung ist.

Auch bei dem weit verbreiteten Globaltest aPTT wird die Vergleichbarkeit der Ergebnisse durch den verwendeten Aktivator beeinflusst, wodurch der „Normbereich“ der gemessenen aPTT laborabhängig ist. Die Prothrombinzeit wird in Deutschland noch als „Quick“-Wert angegeben, welcher wiederum auch abhängig vom verwendeten TF ist. Hier gibt es jedoch die Möglichkeit, den „Quick“ in den INR umzurechnen, wodurch eine größere Vergleichbarkeit erreicht wird. Zur Kontrolle der Antikoagulantientherapie ist der INR aber auch nur in der stabilen Phase geeignet [1].

Der Vorteil vom ex-TDT ist die labor- und studienübergreifende Vergleichbarkeit, sofern vor der Messung eine Eichung mit ISTH stattfindet, wie von uns gezeigt wird.

Außerdem kann mit dem ex-TDT das individuelle Thrombinbildungspotential zu jedem Zeitpunkt abgebildet werden, d.h. die Wirkung äußerer Einflüsse (z.B. Antikoagulantien-Therapie) oder innerer Veränderungen (z.B. Schwangerschaft) [71] auf die Thrombinbildung kann nachgewiesen werden.

4.4.2 Aussagekraft bei Hypokoagulation (angeboren, sowie medikamentös verursacht)

Bei den Messungen des Thrombinbildungspotentials von Faktor-Mangelplasma, Plasmen von Patienten mit einem spezifischen Faktormangel und unter Markumar-Therapie (Mangel der Faktoren II, VII, IX, X) kann gezeigt werden, dass die gemessene Thrombinbildung verringert ist.

Es wird deutlich, dass ein Zusammenhang zwischen Faktorkonzentration und gemessenem TDT-Wert besteht, auch wenn dieser nicht eindeutig linear korreliert. Mit sinkender Konzentration nimmt auch der TDT-Wert ab. Zwei Patienten mit derselben Faktorkonzentration können dabei einen unterschiedlichen TDT-Wert aufweisen, was auf individuelle Einflüsse auf die Thrombingenerierung hinweisen könnte, z.B. genetisch durch die Blutgruppe [51]) oder durch die Umwelt, z.B. Schwangerschaft.

Der ex-TDT zeigt sich sensitiv für den extrinsischen Weg. Eine verringerte Thrombinbildung aufgrund einer verminderten Faktorkonzentration wird nur erkannt, wenn es sich um den F.VII, X, V oder II handelte.

Handelt es sich um einen F.VIII- oder F.IX-Mangel (Hämophilie A und B), so muss mit dem in-TDT[®]-Kontaktaktivator der in-TDT[®]-Test durchgeführt werden um das Thrombinbildungspotential abzubilden.

Normalerweise werden bei F.VIII- oder F.IX-Mangel Aktivitätsmessungen zur Diagnosestellung, Einschätzung der Schwere der Erkrankung (leicht mittel, schwer) [72] sowie zum Messen der Wirksamkeit von prophylaktischer bzw. therapeutischer Faktorengabe, verwendet [73]. In der Regel besteht ein Zusammenhang zwischen der Klinik der Krankheit und der F.VIII/F.IX-Aktivität [74].

Dass dieser Zusammenhang nicht immer zwingend bestehen muss und der Phänotyp sich bei derselben Faktorkonzentration dennoch unterscheiden kann [51, 52, 75] sieht man bei manchen hämophilen Patienten mit Faktorkonzentrationen unter 1 IU/dl. Bei einigen Patienten kommt es zu spontanen Blutungen, bei anderen nicht [52]. Die Blutungsausprägung bei gleichem Faktorenwert ist laut Marijke van den Berg sehr verschieden: 3-10% aller Patienten mit schwerer Hämophilie haben keine Gelenkblutungen, aber manche Patienten mit nur leichter Hämophilie (12%) benötigen wegen häufiger Blutungen eine Prophylaxetherapie [51].

Auch die gemessenen ETP-Werte von Patienten mit derselben Faktorkonzentration weisen eine hohe Diskrepanz auf [45, 75].

R. Al-Dieri untersucht den Zusammenhang zwischen Gerinnungsfaktoren, den Parametern des CAT (ETP, peak) und der Schwere der beobachtbaren Blutungen bei Patienten mit angeborenem Faktormangel (II, V, VII, X, XI, XII). Er stellt fest, dass der peak-Wert sensitiver auf einen Abfall der Faktorkonzentration reagiert als das ETP [76]. Zu schweren Blutungen kommt es erst, wenn der ETP-Wert <20% war, zu milden oder gar keinen Blutungen bei ETP-Werten >30% [77], was Faktorkonzentrationen von 1-2% entspricht (außer F.II, hier wird schon bei einem Wert von 50% nur noch ein halbnormales ETP erreicht) [76].

Bei den in-TDT[®]-Messungen bei F.VIII-Mangel werden ähnliche Befunde gefunden (s. 3.4.1). Es zeigt sich zwar ein Zusammenhang zwischen Faktor-Konzentration und TDT-Wert, allerdings ist dieser nicht streng linear. Dies könnte bedeuten, dass die Bestimmung des Thrombingenerierungspotential klinisch relevanter sein könnte als die Faktorenaktivität.

Die Frage, wieviel Thrombin der Patient trotz Faktormangel noch zu bilden in der Lage ist, kann auch bei der Entscheidung für oder gegen eine prophylaktische Therapie bei diesen Patienten (v.a. Hämophile) interessant werden. Ebendies gilt für die Wirkungsüberprüfung der Substitutionstherapie durch Messung der Thrombinbildung.

Das Plasma von Marcumarisierten Patienten zeigt ebenfalls verringerte ex-TDT-Werte. Trotzdem haben die Patienten mit (nahezu) denselben Quick-Werten nicht denselben ex-TDT-Wert, d.h. die Thrombinbildung ist individuell unterschiedlich.

Eine ähnliche Beobachtung macht auch die Gruppe um Brummel et al., die die Wirkung von Vitamin-K-Antagonisten untersucht und feststellt, dass innerhalb einer Gruppe, die ungefähr mit demselben INR eingestellt ist, die PT-Zeiten, sowie auch die TAT (Thrombin-Antithrombin)-Komplexe stark variieren. Eine Versuchsperson wird bei stabil richtig eingestelltem INR über sechs Monate untersucht und zeigt auch intraindividuell große Varianzen [78]. So scheint auch bei richtig eingestelltem INR die Möglichkeit einer Über- bzw. Unterdosierung gegeben zu sein und die Bestimmung der Thrombingenerierung könnte eine Alternative darstellen. Die Hauptindikationen für den Einsatz von Vitamin-K-Antagonisten sind Vorhofflimmern, Thromboseprophylaxe und mechanische Herzklappen

[79]. Wird der Ziel-INR nicht erreicht oder ist er zu niedrig, besteht die Gefahr einer Thrombenbildung, wird der Ziel-INR überschritten ist die Blutungsgefahr nochmals erhöht. Beides gilt es zu vermeiden und kann laut Brummel et al. aber nicht zwingend über den richtig eingestellten Ziel-INR ausgeschlossen werden [78].

Unsere ex-TDT-Messungen zeigen ebenfalls diese inter- und intraindividuellen Schwankungen der Thrombinbildungsfähigkeit bei vergleichbaren Faktorenmängeln.

4.4.3 Aussagekraft bei Hyperkoagulation

Die Zugabe von PPSB zum Plasma der gesunden Spender zeigt, dass die Thrombinbildungsfähigkeit nur geringfügig gesteigert werden kann.

Die Thrombinbildung des markumarierten Plasmas kann durch Zugabe von PPSB auf normale ex-TDT-Werte angehoben werden, nicht jedoch darüber hinaus.

Die ex-TDT-Werte schwangerer Patientinnen im dritten Trimenon liegen knapp über dem von uns definierten Normbereich. Hier lässt sich aber kein eindeutiger Zusammenhang eines erhöhten Einzelfaktors auf die Thrombinbildung finden. Die erhöhte Thrombinbildungsfähigkeit scheint vielmehr multifaktoriell bedingt zu sein.

Zu ähnlichen Ergebnissen kommen auch McLean et al, welche in einer longitudinalen Studie das ETP Schwangerer untersucht haben. Die Thrombinbildung im dritten Trimenon ist auch hier leicht erhöht, jedoch nicht statistisch signifikant [60].

Die Bestimmung der Thrombinbildungsfähigkeit könnte bei der Einschätzung einer Thromboseneigung eventuell sehr hilfreich sein.

Die Entstehung eines Thrombus wird von verschiedenen Risikofaktoren, genetischen (F.V-Mutation, erhöhte Protein C und S-Werte, etc.), sowie erworbenen (Einnahme von oralen Kontrazeptiva, Schwangerschaft, Alter, etc.), unterschiedlich stark beeinflusst. Dies macht es schwierig, das Risiko einer Thrombose abzuschätzen. Nicht jeder Mensch mit einem oder mehreren Risikofaktoren benötigt eine Therapie, da die Blutzusammensetzung eines jeden Menschen unterschiedlich ist [80, 81] und deshalb auch jede Veränderung dieser Zusammensetzung zu einer Veränderung in seinem Profil führen kann.

A. van Hylckama Vlieg et al. untersucht den Zusammenhang von erhöhtem ETP, dem erstmaligen Auftreten einer tiefen Beinvenenthrombose (deep venous thrombosis = DVT), sowie erhöhten ETP-Werten und etwaigen DVT-Rezidiven [82]. Dabei stellt sich heraus, dass Menschen mit einem idiopathisch erhöhten ETP-Wert (cut-off war ein Wert über der 90. Perzentile im Vergleich zur Kontrollgruppe) ein 1,7-fach erhöhtes Risiko haben, eine Thrombose zu erleiden. Ein gesteigertes Rezidivrisiko bei höheren ETP-Werten kann nicht bestätigt werden.

Zu einer relativ akuten, klinisch relevanten Veränderung im Gerinnungssystem Richtung Hyperkoagulabilität und den damit verbundenen thromboembolischen Ereignissen kann es durch größere, operative Eingriffe kommen.

Bisher wird aber nur wenig untersucht, ab welchem Zeitpunkt genau die gesteigerte Gerinnbarkeit beginnt, außerdem ist es mit den routinemäßig verwendeten Tests PT und aPTT nicht möglich, Hyperkoagulabilität sicher zu messen [83].

S. Lison et al. untersucht mit dem bereits erhältlichen in-TDT® die Thrombingenerierungskapazität nach Bypass-OPs an verschiedenen postoperativen Tagen. [40]. Am ersten postoperativen Tag kann die gesteigerte Thrombinbildung mit in-TDT® gezeigt werden. Durch Warfarin-Gabe kann die erhöhte Thrombinbildung, die ein Risiko für thromboembolische Ereignisse darstellen kann, gesenkt werden [40].

Mit dem ex-TDT kann eine gesteigerte Thrombinbildungsfähigkeit, im Vergleich zum von uns definierten Normbereich, festgestellt werden. Die genaue Ursache der Hyperkoagulabilität kann mit dem ex-TDT jedoch nicht sicher differenziert werden.

4.5 ex-TDT als potentieller zukünftiger Globaltest

Ob die Blutgerinnung normal, verringert oder gesteigert ist, wird durch sehr viele Faktoren beeinflusst. Die individuelle Blutzusammensetzung führt schlussendlich zu einem ganz bestimmten Gerinnungsprofil [80, 84], welches sich aber immer wieder ändern kann (z.B. durch Krebserkrankungen, Medikamente). Die am häufigsten verwendeten Gerinnungstests Quick-Test und aPTT sagen nur wenig über das individuelle hämostatische Profil eines Patienten aus, da sie nur die ersten 5% der Thrombinbildung messen [43, 71], nicht sensitiv genug für milde Gerinnungsstörungen sind [36] und keine Aussagen über eine Hyperkoagulabilität zulassen [77, 85]. Oftmals werden deshalb noch ergänzend Einzelfaktoren-Tests durchgeführt, um von den Einzelaktivitäten auf das Hämostasesystem als Ganzes zu schließen [71].

Daher wäre ein Globaltest, der den individuellen Phänotyp [80], sowie die äußeren Umstände in seiner Messung berücksichtigt, sehr hilfreich bei der Risikoabschätzung, Therapieentscheidung [63] und Therapieüberwachung. T. Baglin weist in seinem Reviewartikel auch darauf hin, dass dieser künftige Globaltest, er bezieht sich hauptsächlich auf den CAT, von noch größerer Bedeutung wäre, wenn er nicht nur den aktuellen klinischen Status eines Patienten widerspiegelte, sondern auch deutlich zur Verbesserung des outcomes beitragen könnte [71].

Der Vorteil bei der Messung des Thrombingenerierungspotentials liegt darin, dass dieser Parameter besser mit dem klinischen Bild der Blutungstendenz einzelner Patienten korreliert, als die bisher verwendeten Standardtests (aPTT, Quick-Test) [43]. Der bisher im wissenschaftlichen Bereich eingesetzte CAT ist ein solcher Thrombingenerierungstest, mit dem sich eine gesteigerte Thrombingenerierung messen lässt, welche wiederum mit einem erhöhten Thromboserisiko in Verbindung gebracht wird [82]. Auch die Auswirkungen einer prokoagulanten [86, 87] bzw. antithrombotischen [85] Therapie auf die Thrombingenerierung wurden bereits untersucht und können mit dem CAT gemessen und überwacht werden. Der routinemäßige Einsatz dieses Testansatzes ist durch den hohen Zeitaufwand und seine Störanfälligkeit jedoch eingeschränkt.

Der hier vorgestellte ex-TDT als etwaiger zukünftiger Globaltest hat mehrere Vorteile:

- Er ist einfach, schnell und unkompliziert in der normalen Gerinnungsdiagnostik mit den dort bereits etablierten Reagenzien und Geräten durchführbar.

- Die eingesetzten TF für den ex-TDT sind bereits für andere Gerinnungstests (wie den Quick-Test) in Verwendung.
- Durch die Eichung gegen ISTH-Plasma sind die gemessenen Ergebnisse laborintern und laborübergreifend gut vergleichbar.
- Der ex-TDT ist sensitiv für die Gerinnungsaktivierung über den extrinsischen Weg. Eine verminderte Thrombinbildung durch Mangel der Faktoren II, V, X und VII wird sicher erkannt. Des Weiteren besteht auch eine mäßig bis hohe Korrelation zwischen dem vorhandenen Einzelfaktormangel und der gemessenen Thrombinbildungskapazität.
- Der ex-TDT ist in der Lage, das individuelle Thrombinbildungspotential eines Menschen abzubilden. Er erkennt gut hypokoagulatorische, aber nur mäßig gut hyperkoagulatorische Zustände.
- Der ex-TDT bietet eine Möglichkeit, das multifaktorielle Einwirken auf die Blutgerinnung und damit die Thrombinbildung zu untersuchen. Dies lässt sich beispielhaft an den untersuchten Plasmen schwangerer Frauen verdeutlichen, in dem man erhöhte ex-TDT-Werte völlig verschiedenen Ausmaßes messen kann. Die Steigerung scheint nicht auf die Konzentrationserhöhung eines einzelnen Faktors zurückzuführen zu sein, sondern ist das Ergebnis der Veränderungen aller Blutgerinnungsfaktoren zusammen.
- Der ex-TDT bildet den individuellen Phänotyp eines Menschen ab und könnte so zukünftig auch als Grundlage für Therapieentscheidung und – überwachung herangezogen werden. Bis jetzt scheint die Bestimmung der Thrombingenerierungskapazität die einzige Methode zu sein, die in der Lage ist, den kombinierten Effekt von Heparinen, Vitamin-K-Antagonisten und anderen Antikoagulantien zu messen [77].

Um die gesamte plasmatische Gerinnung eines Menschen abbilden zu können, sollte gleichzeitig mit dem ex-TDT der bereits vorhandene in-TDT® durchgeführt werden.

Zukünftige Untersuchungen sollten die folgenden Problemstellungen aufgreifen:

- Der ex-TDT wurde nicht mit Plasma von Neugeborenen und Kleinkindern getestet, die physiologischerweise erniedrigte Faktorkonzentrationen aufweisen [88] und damit einen anderen Normbereich hätten.

- Um den ex-TDT in der Routinediagnostik einsetzen zu können, muss er noch an größeren Patientenkollektiven validiert werden, um die hier ermittelten „Normbereiche“ zu verifizieren oder ggf. anzupassen.
- Weiter gilt es zu klären, ab welchem Wert (%) der verminderten Thrombinbildung eine erhöhte Blutungstendenz besteht, um zu einem besser angepassten, individuellen Therapieschema für den Patienten zu kommen.
- Außerdem sollten die Auswirkungen der einzelnen Antikoagulantien auf die ex-TDT-Werte untersucht werden.
- Schließlich ist es im Hinblick auf eine hyperkoagulatorische Situation wichtig, zu untersuchen, ob und ab welchem Wert (%) eine gesteigerte Thrombinbildung das Thromboserisiko erhöht.

5 Zusammenfassung

Thrombin ist das entscheidende Enzym in der Blutgerinnung, das Fibrinogen und Thrombozyten aktiviert. Trotzdem werden bisher in der klinischen Routine für die Blutgerinnung fast ausschließlich die Globaltests Quickwert-Bestimmung und aPTT angewandt, die nur einen kleinen Teil der Thrombinbildung messen können.

Hemker et al. hat mit dem CAT eine Methode entwickelt, mit der die Thrombinbildung vollständig und kontinuierlich aufgezeichnet werden kann [61]. Hierbei erhält man eine „area under the curve“, welche dem „endogenen Thrombinpotential“ (ETP) entspricht. Dieser Test ist jedoch sehr zeitaufwendig und stör anfällig, weshalb er bisher ausschließlich zu wissenschaftlichen Zwecken verwendet wird.

In dieser Arbeit sollte ein Thrombingenerierungstest für den extrinsischen Weg der Gerinnungskaskade gefunden werden, mit dem man die über TF ausgelöste maximale Thrombinbildungsfähigkeit eines Plasmas messen kann. Der ex-TDT soll sensitiv für den extrinsischen Weg sein, zugleich zuverlässig, schnell durchführbar und eine gute diagnostische Aussagekraft besitzen.

Bei der Testdurchführung orientieren wir uns an dem bereits erhältlichen und wissenschaftlich verwendeten in-TDT[®]. Dieser Test misst photometrisch die intrinsisch ausgelöste Thrombinbildung. Der in-TDT[®] wird, ebenso wie der von uns vorgestellte ex-TDT, auf dem weit verbreiteten BCS-Gerät gemessen. Dabei wird die Gerinnung über einen TF (ex-TDT) bzw. eine Kontaktaktivator-Reagenz (in-TDT[®]) ausgelöst und die Thrombinbildung kontinuierlich aufgezeichnet. Vom maximalen Extinktionswert wird die 1. Ableitung berechnet und als maximal mögliche Thrombinbildungsfähigkeit des untersuchten Plasmas angesehen.

Zur Durchführung des ex-TDT werden geeignete TF benötigt. Voraussetzung hierfür sind eine ausreichend lange on-set-time (Zeit bis zur ersten messbaren Thrombinbildung) und eine eindeutige „peak“-Bildung, ähnlich den in-TDT[®]-Messungen. Nach Möglichkeit sollten die TF bereits schon in Gerinnungslaboren etabliert sein.

Mit dem TF Recombiplastin in der Verdünnung 1:50 und 1:25 sowie dem TF PP werden geeignete Aktivatoren für den ex-TDT gefunden, die bereits lange in der Routinediagnostik verwendet werden.

Mit dem Testsystem wird ein gesundes Spenderkollektiv untersucht um herauszufinden, ob es ähnlich dem „Quickwert“ einen Bereich der Thrombinbildung gibt, der als „normal“ angesehen werden kann. ISTH-Plasma wird routinemäßig mitgeführt und dient als Referenzwert.

Der Normbereich kann anhand von Rückstellproben 10 gesunder Plasmaspender für jeden TF definiert werden. Er liegt für den TF PPP bei 103 – 115%, für Recombi 1:50 bei 97 – 112% und für Recombi 1:25 bei 92 -109%.

Weiter wird die Aussagekraft des ex-TDT bei verschiedenen hypokoagulatorischen Zuständen betrachtet. Es wird untersucht, ob der ex-TDT eine verminderte Thrombinbildungsfähigkeit des Plasmas bei Einzelfaktormangel, sowie bei Plasma von markumarisierten Patienten anzeigt und in welchem Maß eine Korrelation zwischen der gemessenen Thrombinbildung und dem Faktormangel (in %) bzw. dem Quickwert besteht.

Hierbei zeigt sich, dass der ex-TDT sensitiv für den Mangel an den Faktoren II, VII und X ist und eine mäßig bis hohe Korrelation zwischen dem Einzelfaktormangel und der Thrombinbildung besteht. Auch bei den 10 untersuchten Plasmen markumarisierter Patienten zeigt der ex-TDT eine deutlich reduzierte Thrombinbildung an, der ex-TDT -Wert liegt hier im Durchschnitt bei 60%, der Quickwert bei etwa 27%. Zwischen den gleichzeitig bestimmten Quickwerten und der Thrombinbildung lässt sich nur eine mäßige Korrelation herstellen ($r = 0,516$).

Wie sich der ex-TDT im hyperkoagulatorischen Bereich verhält, soll beispielhaft an Plasma schwangerer Patientinnen mit physiologischerweise erhöhten Gerinnungsfaktoren untersucht werden. Außerdem wird versucht durch Zugabe von PPSB zum Normalplasma eine obere Grenze der Thrombinbildungsfähigkeit zu finden.

Bei den ex-TDT -Messungen der Schwangeren lässt sich nur eine Tendenz erkennen. Die Thrombinbildung ist, gemessen am Standardplasma, nur leicht erhöht. Eine Aussage über die Gerinnbarkeit ist daher nur durch den direkten Vergleich zum SP möglich. Es ist auch kein eindeutiger Zusammenhang zwischen einem deutlich erhöhten Gerinnungsfaktor und der

Thrombinbildung nachzuweisen, vielmehr scheint die gesteigerte Blutgerinnung hier multifaktoriell bedingt zu sein.

Nach der Zugabe von PPSB zum Plasma des Normalkollektivs kann eine gesteigerte Thrombinbildung festgestellt werden. Diese ist nach oben jedoch beschränkt, da schon nach der Zugabe von 25‰ PPSB = 0,625 IE/ml ein Plateau erreicht wird. Beim Plasma der macumarisierten Patienten kann nach Zugabe von 25‰ PPSB \approx 0,625IE, d.h. für einen 75kg schweren Patienten etwa 1800 IE PPSB, ein Thrombinbildungspotential erreicht werden, welches dem des Normalkollektivs entsprach.

Mit dem ex-TDT kann hier ein Thrombingenerierungstest vorgestellt werden, der einfach, kostengünstig, schnell und zuverlässig auf derzeit routinemäßig verwendeten Geräten der Gerinnungsdiagnostik durchgeführt werden kann. Durch die Eichung des verwendeten TF gegen ISTH-Plasma sind die Messergebnisse laborintern und laborübergreifend vergleichbar. Der ex-TDT misst photometrisch die extrinsisch ausgelöste maximale Thrombinbildung.

Der Test zeigt sich sensitiv für die Gerinnungsaktivierung über den extrinsischen Weg und zeigt hier sicher hypokoagulatorische Zustände an. In der gemeinsamen Anwendung des von uns untersuchten ex-TDT und des bereits vorhandenen in-TDT® scheint es möglich, die plasmatische Gerinnung eines Patienten umfassend zu untersuchen und eine Aussage über das hämostatische Profil eines Menschen zu machen.

Für hyperkoagulatorische Zustände kann der ex-TDT nur eingeschränkt angewandt werden.

Vor allem im hypokoagulatorischen Bereich könnte die Bestimmung des individuellen Gerinnungsprofils wichtig werden. Hier zeigt sich bereits, dass die Thrombinbildung besser mit der Blutungstendenz eines Patienten korreliert, als die bisher verwendeten Globaltests (aPTT, Quickwert) [43]. Der ex-TDT könnte hier in Zukunft auch im Bereich der Therapieentscheidung und -überwachung eine Rolle spielen, da die Bestimmung der Thrombingenerierungskapazität bis jetzt die einzige Methode zu sein scheint, die in der Lage ist, den kombinierten Effekt von Heparinen, Vitamin-K-Antagonisten und anderen Antikoagulantien zu messen [77].

6 Literaturverzeichnis

1. Dörner, K., *Klinische Chemie und Hämatologie 69 Tabellen*. 6., aktualisierte Aufl. ed 2006, Stuttgart [u.a.]: Thieme. XXIV, 560 S.
2. Schmidt, R.F., *Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie ; mit ... 78 Tabellen ; [neue Approbationsordnung]*. 29., vollst. neu bearb. und aktualisierte Aufl. ed2005, Heidelberg [u.a.]: Springer. XXI, 994 S.
3. Behrends, J., *Duale Reihe Physiologie*. Vol. 1. 2009, Stuttgart: Thieme-Verlag.
4. Smith, S., *The cell-based model of coagulation*. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, 2009. **19**(1): p. 3-10.
5. Macfarlane, R.G., *An Enzyme Cascade in the Blood Clotting Mechanism, and its Function as a Biochemical Amplifier*. *Nature*, 1964. **202**(4931): p. 498-499.
6. Davie, E.W. and O.D. Ratnoff, *Waterfall Sequence for Intrinsic Blood Clotting*. *Science*, 1964. **145**(3638): p. 1310-1312.
7. Schmidt, R.F.H.L., Florian (Hrsg.); Thews, Gerhard (Hrsg.), *Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie*. Vol. 29. 2009, Heidelberg: Springer.
8. Gailani D, R.T., *Intrinsic pathway of coagulation and arterial thrombosis*. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 2007. **27**(12): p. 2507-2513.
9. Hoffmann, M., Monroe DM, *A cell-based model of hemostasis*. *Thrombosis and Haemostasis*, 2001. **85**(6): p. 958-965.
10. Hoffmann, M., *Remodeling the Blood Coagulation Cascade*. *Journal of Thrombosis and Thrombolysis*, 2003. **16**(1): p. 17-20.
11. Eberhard Kochs, H.A.A., Claudia Spies, *Anästhesiologie*. 2. Auflage ed2008, Stuttgart: Thieme Verlag. 411-415.
12. Morrissey, J.H., *Plasma factor VIII: measurement and potential clinical significance*. *Haemostasis*, 1996. **26**(1): p. 66-71.
13. Roberts, H.R., Monroe, D.M., Escobar, M.A., *Current concepts of hemostasis: implications for therapy*. *Anesthesiology*, 2004. **100**(3): p. 722-730.
14. Monroe, D.M., M. Hoffman, and H.R. Roberts, *Transmission of a procoagulant signal from tissue factor-bearing cell to platelets*. *Blood coagulation & fibrinolysis : an international journal in haemostasis and thrombosis*, 1996. **7**(4): p. 459-64.
15. Monroe DM, H.M., *What does it take to make the perfect clot*. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 2006. **26**(1): p. 41-48.
16. Allen KS, S.E., Kinasewitz GT, *Anticoagulant modulation of inflammation in severe sepsis*. *World Journal of Critical Care Medicine*, 2015. **4**(2): p. World J Crit Care Med.
17. Crawley, J.T., et al., *The central role of thrombin in hemostasis*. *J Thromb Haemost*, 2007. **1**: p. 95-101.
18. Davie, E.W., Kulman, J.D., *An Overview of the Structure and Function of Thrombin*. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 2006. **32**(1): p. 3-15.
19. Hung, D.T., Vu, T.K., Wheaton, V.I., Ishii, K., Coughlin, S.R., *Cloned platelet thrombin receptor is necessary for thrombin-induced platelet activation*. *Journal of Clinical Investigation*, 1992. **89**(4): p. 1350-1353.
20. Tanaka, K.A., N.S. Key, and J.H. Levy, *Blood Coagulation: Hemostasis and Thrombin Regulation*. *Anesthesia & Analgesia*, 2009. **108**(5): p. 1433-1446.
21. *Hämostaseologie*, B. Pötzsch and K. Madlener, Editors. 2010, Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

22. Crawley, J.T.C., A.C.; Lane, D.A. *Thrombin: multifunctional roles and therapeutic target*. 2006 [cited 2006; Available from: <http://www.clin-online.com/fileadmin/artimg/thrombin-multifunctional-roles-and-therapeutic-target.pdf>.
23. Bächli, M.D.E., *Historical review*. British Journal of Haematology, 2000. **110**(2): p. 248-255.
24. Morawitz, P., *Die Chemie der Blutgerinnung*. Ergebnisse der Physiologie, 1905. **4**: p. 307-422.
25. Mackman N, T.M., *Tissue factor: past, present, and future*. Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology, 2009. **29**(12).
26. Banner, D.W., et al., *The crystal structure of the complex of blood coagulation factor VIIIa with soluble tissue factor*. Nature, 1996. **380**(6569): p. 41-46.
27. Wilcox, J.N., Smith, K.M., Schwartz, S.M., Gordon, D., *Localization of tissue factor in the normal vessel wall and in the atherosclerotic plaque*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1989. **86**(8): p. 2839-2843.
28. Mackman, N., *Role of tissue factor in hemostasis and thrombosis*. Blood Cells, Molecules, and Diseases, 2006. **36**(2): p. 104-107.
29. Drake TA, M.J., Edgington TS, *Selective cellular expression of tissue factor in human tissues. Implications for disorders of hemostasis and thrombosis*. The American journal of pathology, 1989. **134**(5): p. 1087-1097.
30. Luther, T. and N. Mackman, *Tissue Factor in the Heart: Multiple Roles in Hemostasis, Thrombosis, and Inflammation*. Trends in Cardiovascular Medicine, 2001. **11**(8): p. 307-312.
31. Osterud, B., *Cellular interactions in tissue factor expression by blood monocytes*. Blood coagulation & fibrinolysis : an international journal in haemostasis and thrombosis, 1995. **6**(1): p. 20-25.
32. Yu, J.L., May, L., Klement, P., Weitz, J.I., Rak, J., *Oncogenes as regulators of tissue factor expression in cancer: implications for tumor angiogenesis and anti-cancer therapy*. Seminars in Thrombosis and Hemostasis, 2004. **30**(1): p. 21-30.
33. Kamal, A.H., A. Tefferi, and R.K. Pruthi, *How to Interpret and Pursue an Abnormal Prothrombin Time, Activated Partial Thromboplastin Time, and Bleeding Time in Adults*. Mayo Clinic Proceedings, 2007. **82**(7): p. 864-873.
34. Luxembourg, B.K., Manuela; Lindhoff-Last, Edelgard, *Basiswissen Gerinnungslabor*. Deutsches Ärzteblatt, 2007. **21**(104): p. 1489-1499.
35. Herold, G., *Innere Medizin* 2009, Köln.
36. Bidlingmaier C, E.W., Knöfler R, Olivieri M, Kurnik K, *Haemostatic testing prior to elective surgery in children? Not always!* Hämostaseologie, 2009. **29**(1): p. 64-67.
37. Barthels, M., *Gerinnungsdiagnostik*. Hämostaseologie, 2008. **28**(5): p. 320-334.
38. Spannagel M., M.G., *Hämostaseologische Globaltests*. Hämostaseologie, 2006. **26**(1): p. 27-37.
39. Lancé, M.D., *A general review of major global coagulation assays: thrombelastography, thrombin generation test and clot waveform analysis*. Thrombosis Journal, 2015. **13**(1): p. 1-6.
40. Lison, S., et al., *Enhanced Thrombin Generation After Cardiopulmonary Bypass Surgery*. Anesthesia & Analgesia, 2011. **112**(1): p. 37-45.
41. *Pefakit in-TDT*, D.N.P. Ltd and B. Pentapharm, Editors. 2011, LOXO GmbH: Basel.
42. Hemker H.C., B.S., *Thrombin generation in plasma: its assessment via the endogenous thrombin potential*. Thrombosis and Haemostasis, 1995. **74**(1): p. 134-138.

43. Van Veen, J.J., A. Gatt, and M. Makris, *Thrombin generation testing in routine clinical practice: are we there yet?* British Journal of Haematology, 2008. **142**(6): p. 889-903.
44. Wilkens, M., *Endogenous thrombin potential in practical use.* Hämostaseologie, 2011. **31**(2): p. 88-93.
45. Nair, S.C., et al., *Tests of global haemostasis and their applications in bleeding disorders.* Haemophilia, 2010. **16**: p. 85-92.
46. Morris, W.H., Kumar, A., *What is the significance of an isolated elevated activated partial thromboplastin time in the preoperative setting?* Cleveland clinical journal of medicine, 2007. **74**(1): p. 3-5.
47. Tripodi A, C.V., Martinelli I, Bucciarelli P, Mannucci PM, *A shortened activated partial thromboplastin time is associated with the risk of venous thrombembolism.* Blood, 2004. **104**(12): p. 3631-4.
48. Lison, S. and M. Spannagl, *Monitoring of direct anticoagulants.* Wiener Medizinische Wochenschrift, 2011. **161**(3): p. 58-62.
49. Adcock, D.M.G., R., *Direct Oral Anticoagulants (DOACs) in the Laboratory: 2015 Review.* Thrombosis Research, 2015. **136**(1): p. 7-12.
50. Eby, C., *Novel anticoagulants and laboratory testing.* International Journal of Laboratory Haematology, 2013. **35**(3): p. 262-268.
51. Van Den Berg, H.M., P.H.G. De Groot, and K. Fischer, *Phenotypic heterogeneity in severe hemophilia.* Journal of Thrombosis and Haemostasis, 2007. **5**: p. 151-156.
52. Lewis, S.J., et al., *Measurement of global haemostasis in severe haemophilia A following factor VIII infusion.* British Journal of Haematology, 2007. **138**(6): p. 775-782.
53. Siemens Healthcare Diagnostic Products, G., *Coagulation Factor VIII, IX, XI and XII Deficient Plasmas*, 2008: Marburg.
54. Machlus Kellie R., C.E.A., Wu Jogin R., Koch Gary G., Key Nigel S., Wolberg Alisa S., *Effects of tissue factor, thrombomodulin and elevated clotting factor levels on thrombin generation in the calibrated automated thrombogram.* Thrombosis and Haemostasis, 2009. **102**(5): p. 936-944.
55. Dielis, A.W.J.H., et al., *Coagulation factors and the protein C system as determinants of thrombin generation in a normal population.* Journal of Thrombosis and Haemostasis, 2008. **6**(1): p. 125-131.
56. Scharrer, I., *Gerinnungsaktive Therapeutika Antithrombin, FFP, PPSB, FXIII, rFVIIa.* Hämostaseologie, 2005. **25**(2): p. 209-212.
57. Behring, C., *Beriplex (R) P/N 250*, C.B. GmbH, Editor 2009: Marburg.
58. Hellgren, M., *Hemostasis during Normal Pregnancy und Puerperium.* Seminars in Thrombosis and Hemostasis, 2003. **29**(2): p. 125-130.
59. Brenner, B., *Hemostatic changes in pregnancy.* Thrombosis Research, 2004. **114**(5-6): p. 409-414.
60. McLean, K.C.e.a., *Tissue factor-dependent thrombin generation across pregnancy.* American Journal of Obstetrics & Gynecology 2012. **207**(2): p. 135.e1 - 135.e6
61. Hemker H. Coenraad, W.S.K.H., Béguin Suzette, *Continuous registration of thrombin generation in plasma, its use for the determination of the thrombin potential.* Thrombosis and Haemostasis, 1993. **70**(4): p. 617-624.
62. Macfarlane R. G., B., Rosemary, *A Thrombin Generation Test: The Application in Haemophilia and Thrombocytopenia.* Journal of Clinical Pathology, 1953. **6**(1): p. 3-8.
63. Castoldi, E. and J. Rosing, *Thrombin generation tests.* Thrombosis Research, 2011. **127**, Supplement 3(0): p. S21-S25.

64. Hemker H. Coenraad, G.P., Al Dieri Raed, Béguin Suzette, *The Calibrated Automated Thrombogram (CAT): a universal test for hyper- and hypocoagulability*. Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis, 2002. **32**: p. 249-253.
65. *Thrombin Generation Assays*. 2011 30-Nov-2011.
66. Hemker H. Coenraad, A.D.R., De Smedt Erik, Béguin Suzette, *Thrombin generation, a function test of the haemostatic thrombotic system* Thrombosis and Haemostasis, 2006. **96**(5): p. 553-561.
67. Hemker H. Coenraad, G.P.L., Wagenvoord R., Béguin Suzette, *The thrombogram: monitoring thrombin generation in platelet-rich plasma*. Thrombosis and Haemostasis, 2000. **83**(4): p. 589-591.
68. Sambrano, G.R., et al., *Role of thrombin signalling in platelets in haemostasis and thrombosis*. Nature, 2001. **413**(6851): p. 74-78.
69. Dargaud, Y. and C. Negrier, *Thrombin generation testing in haemophilia comprehensive care centres*. Haemophilia, 2010. **16**(2): p. 223-230.
70. Dargaud, Y., S. Francillon, and C. Negrier, *Intraindividual thrombin generation measurement variability in healthy adults over a one year period*. Thrombosis Research, 2009. **124**(2): p. 237-238.
71. Baglin, T., *The measurement and application of thrombin generation*. British Journal of Haematology, 2005. **130**(5): p. 653-661.
72. Salvagno, G.L., et al., *Thrombin generation assay: a useful routine check-up tool in the management of patients with haemophilia?* Haemophilia, 2009. **15**(1): p. 290-296.
73. Shima, M., T. Matsumoto, and K. Ogiwara, *New assays for monitoring haemophilia treatment*. Haemophilia, 2008. **14**: p. 83-92.
74. Dargaud Y, B.S., Lienhart A, Al Dieri R, Trzeciak C, Bordet JC, Hemker HC, Negrier C, *Evaluation of thrombin generating capacity in plasma from patients with haemophilia A and B*. Thrombosis and Haemostasis, 2005. **93**(3): p. 475-480.
75. Gatt, A.v.V., Joost J., Woolley, Anita M., Kitchen Steve, Cooper Peter, Makris Michael, *Thrombin generation assays are superior to traditional tests in assessing anticoagulation reversal in vitro* Thrombosis and Haemostasis, 2008. **100**(2): p. 350-355.
76. Al Dieri R, P.F., Santagostino E, Giansily M, Mannucci PM, Schved JF, Béguin S, Hemker HC, *The thrombogram in rare inherited coagulation disorders: its relation to clinical bleeding*. Thrombosis and Haemostasis, 2002. **88**(4): p. 576-582.
77. Hemker H. Coenraad, A.D.R., Béguin Suzette, *Thrombin generation assays: accruing clinical relevance*. Current Opinion in hematology, 2004. **11**: p. 170-175.
78. Brummel KE, P.S., Branda RF, Mann KG, *Oral anticoagulation thresholds*. Circulation, 2001. **104**(19): p. 2311-2317.
79. Dörner, K., *Klinische Chemie und Hämatologie* 2007, Kiel: Thieme Verlag Stuttgart.
80. Mann, K.G., et al., *Does the genotype predict the phenotype? Evaluations of the hemostatic proteome*. Journal of Thrombosis and Haemostasis, 2004. **2**(10): p. 1727-1734.
81. Brummel-Ziedins, K.E., et al., *Thrombin generation profiles in deep venous thrombosis*. Journal of Thrombosis and Haemostasis, 2005. **3**(11): p. 2497-2505.
82. Van Hylckama Vlieg, A., et al., *Elevated endogenous thrombin potential is associated with an increased risk of a first deep venous thrombosis but not with the risk of recurrence*. British Journal of Haematology, 2007. **138**(6): p. 769-774.

83. Lison, S.W., Georg; Spannagl, Michael; Heindl, Bernhard, *Postoperative changes in procoagulant factors after major surgery*. Blood, Coagulation and Fibrinolysis, 2011. **22**(3): p. 190 - 196.
84. Brummel-Ziedins KE, P.R., Mann KG, *Thrombin generation: phenotypic quantitation*. Journal of Thrombosis and Haemostasis, 2004. **2**(2): p. 281-288.
85. Hemker H. Coenraad, G.P., Al Dieri Raed, Regnault Véronique, de Smedt Eric, Wagenvoord Rob, Lecompte Thomas, Béguin Suzette, *Calibrated Automated Thrombin Generation Measurement in Clotting Plasma*. Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis, 2003. **33**(1): p. 4-15.
86. Keularts IM, H.K., Hemker HC, Béguin S., *The effect of DDAVP infusion on thrombin generation in platelet-rich plasma of von Willebrand type 1 and in mild haemophilia A patients*. Thrombosis and Haemostasis, 2000. **84**(4): p. 638-642.
87. Turecek PL, V.K., Keil B, Negrier C, Berntorp E, Astermark J, Bordet JC, Morfini M, Linari S, Schwarz HP, *Factor VIII inhibitor-bypassing agents act by inducing thrombin generation and can be monitored by a thrombin generation assay*. Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis, 2003. **33**(1): p. 16-22.
88. Guzzetta, N.A. and B.E. Miller, *Principles of hemostasis in children: models and maturation*. Pediatric Anesthesia, 2011. **21**(1): p. 3-9.

7 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei vielen Personen bedanken, die mich über die letzten Jahre bei der Erstellung dieser Doktorarbeit in so vielen verschiedenen Bereichen unterstützt und begleitet haben.

Mein größter Dank gilt Frau Dr. Susanne Lison für ihre kontinuierliche Förderung, Hilfe und Motivation während der ganzen Promotionsphase. Trotz zahlreicher eigener Aufgaben und Projekte nahm sie sich immer wieder die Zeit, um mich mit sehr viel Geduld, Wissen und wertvoller Kritik zu unterstützen. Ohne sie und ihre Nachsicht auch mit langen Wartezeiten, wäre diese Arbeit nicht zu Ende gestellt worden. Vielen Dank!

Ich danke auch genauso herzlich Herrn Prof. Dr. Bernhard Heindl, dem Doktorvater dieser Arbeit, für seine Begleitung, seine stets hilfreichen Anregungen zum wissenschaftlichen Arbeiten und Schreiben dieser Arbeit und vor allem, dass er mir die Möglichkeit gab, mich mit diesem Thema beschäftigen zu dürfen.

Vielen Dank an, Gabi, Madalina, Michaela und Melli, das Team der Hämostaseologischen Ambulanz des Klinikums der Ludwig-Maximilian-Universität München. Danke für euer Vertrauen und eure Offenheit mir gegenüber. Ich durfte mich bei euch vom ersten Augenblick an so willkommen fühlen, dass jeder Tag in eurem Labor eine Freude war.

Ein besonderer Dank gebührt auch Frau Dr. Carolin Peter und Dr. Birge-Dorothea Pelz, die mich als gute Freundinnen seit Beginn des Studiums begleitet, mich auch während der Erstellung dieser Doktorarbeit immer wieder motiviert und durch ihr unermüdliches Korrekturlesen zur Fertigstellung maßgeblich beigetragen hat.

Ich bedanke mich an dieser Stelle auch bei meiner Schwester Carola und vielen Freunden für ihre liebe Unterstützung, ihre Aufmunterungen und dass sie immer in den richtigen Momenten für mich da sind.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meinen Eltern ganz besonders bedanken. Ihre uneingeschränkte, liebevolle und vielseitige Unterstützung in allen Lebenslagen bedeutet mir unbeschreiblich viel. Ihnen ist diese Arbeit gewidmet.

8 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Sonja Zürn, an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema „*ex-TDT*: Ein Thrombingenerierungstest für den extrinsischen Weg der Blutgerinnung“ selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe. Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Backnang, 03.07.2018

Sonja Zürn